

특집: 생리활성물질의 최근 연구동향(II)

Combinatorial Biology에 의한 생리활성 물질의 다양성 확보

손 광 희
생명공학연구소

앞으로도 계속 미생물을 포함한 천연자원이 신의약과 같은 활성물질 연구의 중요한 대상이 될 것인가? 아마도 그럴 것이다. Whitman이 거론한 미생물 자원의 방대함뿐만 아니라 새로이 등장하는 세포에 대한 정보 및 기술이 이들의 활용성을 높일 것이기 때문이다[1-3]. 특히 새로운 기술 중에 combinatorial biology이 큰 관심을 끌고 있다.

1998년도 미국 산업미생물학회(Society for Industrial Microbiology, Aug. 9-13, 1998, Denver, Colorado)의 발표자 중에 methymycin과 picromycin의 생합성 유전자에 대한 연구결과를 제시한 Y. Xue가 최우수 논문상을 받았다[4]. 그 연구내용은 미생물 대사물질의 독특한 구조 다양성을 확보하려는 노력 가운데 이뤄진 결과로 이미 PNAS에 발표된 논문을 근거로 하고 있다[5]. 이러한 생합성 경로 및 관련 유전자에 대한 결과는 다시 같은 연구그룹 내에서 수행된 신규 항생물질의 생합성으로 이어져 미국화학회지에 발표되었다[6]. 이것은 유전 정보의 이해를 바탕으로 한 생합성 도구를 조합화학(combinatorial chemistry)의 영역에서 활용하는 과정을 보여 주고 있다. 즉 생합성에 관계된 gene cluster를 규명하고, 이를 바탕으로 복잡한 다단계효소군의 조합적 조작에 의해 최종적으로는 신규의 물질을 생산해 내는 방법이다. 이와 같이, 신물질 연구가 '선도물질(lead compound)의 제시와 그 유도체의 합성 내지는 변환'이라는 도식에서 벗어나고 있는 것이다.

여기에 새롭게 제시되는 용어가 combinatorial biosynthesis이다[7, 8]. 이미 신약 개발 방법론의 하나로 자리잡은 combinatorial chemistry는 HTS(high throughput screening)와 연결되어 그 효용성이 이미 확인되었고, 적절한 기본골격을 출발점으로 하여 다양한 유사화합물을 도출하고 있다[9]. 이러한 조합론적인 방법을 생합성 경로에 적용한 것이 combinatorial biosynthesis로 자연에 존재하는 반응경로 및 기구를 변용하여 자연에 존재하지 않는 비천연물질(unnatural natural products)을 확보하려는 의도적이고 정교한 신물질 창출방법이다[10]. 이 방법론은 산업적 가치가 높고 또 그 생합성 과정이 비교적 상세히 밝혀진 polyketide계 물질에 자주 적용되고 있는데, 이들 polyketide계 물질은 module 형태의 복합효소계(PKS; polyketide synthase)를 그 생합성에 채용하고 있어서 생합성 단계별로 조합론적인 접근이 더욱 가속화 된 경우이다. 샌프란시

스코 소재 캘리포니아대학의 Santi교수와 스탠포드의 Khosla교수는 이미 이러한 combinatorial biosynthesis의 잠재력을 인식하고 Kosan Bioscience(Burlingame, CA, USA)를 공동 설립하여 PKS를 이용한 신규 polyketide류를 개발하고 있다. Polyketide 화합물은 연간 100억 달러 가량의 판매량을 보이는 중요한 물질군으로, 그들은 수십만 종의 신규 물질을 만들 예정이며 활성을 높이기 위해 분자구조의 변화를 유도하고 있다. 이들은 erythromycin의 전구체인 6-deoxyerythronolide B(6-dEB) 생합성 유전자에 site-directed mutation을 가하고 이때 생겨난 mutant의 배양물에 '고안된 합성분자'를 첨가할 때 이 분자를 기질로 인식하여 polyketide의 생합성을 계속하는 mutant로부터 천연물 비슷한(natural-product-like) '비천연 polyketide'의 library를 구축하고 있다.

이와 같이 combinatorial biology는 '미생물 대사 산물로부터 신물질 창출'의 패러다임에서 'library 확보에 의한 분자 다양성 확보'의 패러다임으로 신물질 연구의 축이 이행하는 다리 구실을 하여 이른바 '비천연 천연물질'을 생산하는 생합성 기구를 제공하며, 그 개념의 상당부분을 combinatorial chemistry와 공유하고 있다.

그리고 이런 방법론의 기초에는 genomics에 대한 충분한 기초연구가 요구된다. 조합화학과 genomics의 활용에 대한 하나의 예가 버클리의 Schultz 등과 김성호박사가 공동 연구한 kinase inhibitor 탐색 결과일 것이다[11]. 이들이 자신들의 연구에 지대한 역할을 했다고 밝힌 것을 인용하면 ① combinatorial chemistry와 HTS의 응용에 의한 저분자 library의 창출능력, ② 다양한 출처로부터 규명된 방대한 gene sequence, ③ ligand 고안에 활용할 ligand-protein 상호관계의 정밀한 구조 규명 등이다. 이러한 예에서 보듯, 조합론적인 기술, genomics의 정보, 그리고 입체구조 정보 등이 새로운 생리활성 물질의 연구에 융합되고 있어서 combinatorial biology가 단순히 polyketide계 물질의 창출에 머무르지 않고 이른바 화학생물(chemical biology)과의 접목이라는 또 다른 발전 방향을 제시하고 있다[12].

Combinatorial 방법론

분자생물학과 genomics는 질병의 새로운 target과 경로를

표 1. 조합화학 방법에 의한 물질 합성의 강점

	Traditional chemistry	Combinatorial chemistry
Compounds per one chemist month	4	3,300
Total cost	\$30,000	\$40,000
Cost per compound	\$7,500	\$12

Source: Persidis[9]가 Booze, Allen & Hamilton의 조사보고를 인용한 자료.

밝히는 기초기구가 되며 이를 이용한 combinatorial 방법론은 기존 화합물에 새로운 분자다양성을 부여할 수 있을 것이다. 따라서 combinatorial biology는 약제 저항성을 회피하거나, 약리 특성이 개선된 신약개발의 대상이 될 분자구조의 활용 범위를 넓히고 연구 및 개발의 소요시간은 현저히 줄일 수 있을 것으로 기대된다[13]. 통상적인 신약개발 과정에서는 대략 10,000개의 화합물 중 하나가 신약개발로 들어가며 시장진입까지는 대략 12년, 소요경비는 3억 달러 이상이 소요된다. 그럼에도 불구하고 성공하는 경우에는 연간 약 10억 달러의 시장이 형성되므로 신약탐색은 계속되고 있으며 combinatorial 방법과 같은 신기술이 부지런히 공급되고 있다. 조합화학의 경우(표 1)에서 보듯이 일반적인 방법론에 비해 개발비 경쟁력이 뛰어나다.

Combinatorial 방법의 시작은 library의 확보로 시작된다. 어떤 기준에 따라 확보된, 활성이 기대되는 잠재적 후보 집합체를 shape library[14]라고 한다. 만일 DNA 재조합 과정에서 유전 정보에 변화를 주게되면 이것은 단백질 혹은 저분자 최종 산물에 다양성을 부여하게되어 단백질 혹은 저분자물질로 구성된 library를 구성하게된다. 이때 DNA 조작을 통한 변화를 유도할 때 우리가 원하는 기능을 가진 물질을 얻기 위해서는 의도적 조합화 과정(combination)이 필요하다. 이 생명기구를 이용한 의도적 조합화 과정이 combinatorial chemistry와 같은 맥락에서 combinatorial biology라는 용어로 자리잡게 되었다.

유기합성법과 DNA를 이용한 생합성의 경우를 비교하여 개

념이 비슷한 combinatorial chemistry와 combinatorial biology를 설명하면 (표 2)와 같다. 항염증 활성의 cathepsin D 저해제 후보물질의 확보를 combinatorial chemistry를 이용하여 진행하고 있다[15]. 화학반응 작용점을 여러 개 갖고 있는 골격(scaffold)으로서 hydroxyethylamine core를 출발점으로 하여, 동시에 미량의 여러 반응이 가능한 고체상 유기합성을 통해 유기화합물을 library로 확보하였다. 합성시약의 종류를 근거로 계산할 수 있는 분자다양성은 10억이며 실제 사용된 library size는 2천 개였다. 또한 library를 보다 효과적으로 확보하기 위한 논리적 방안으로, 단백질분해 효소인 cathepsin D의 결정 구조에 잘 맞는 형태의 화합물을 중심으로 새 library를 구성해나가는 것이 제시되었다. 한편, human growth hormone (hGH)의 경우 재조합 DNA와 viral display 기술에 의해 생산되는 hormone 분자를 library로 확보하였다. M13 phage에 재조합 DNA를 packaging 하고 고정화된 protein receptor에 통과시켜 이 receptor에 결합하는 재조합 hGH를 coat protein으로 발현하는 mutant를 선별하는 과정을 반복한다. 아미노산 종류 및 분자크기에 근거한 이론적 분자다양성은 $(20 \times 20 \times \dots \times 20)$ 이 185번 반복된 20^{185} 이며 실제 사용된 library size는 천만 개였다. 그런데, high throughput screening(HTS) 및 robotics를 동원해서 스크리닝 한다면 선별 대상인 library size가 너무 크기만 하면 비효율적이므로 조합화를 최적화 할 필요가 있는데 이를 위해서 protein receptor와 보다 결합력이 강한 viral clone을 선별하고 증폭하는 방법을 제시하고 있다.

위의 간단한 예에서 보았듯이 combinatorial biology 방법은 화학과 생물의 지식과 기술에만 국한되는 것이 아니다. 특히 library size가 커질수록 이를 효율적으로 선별해내기 위한 자동화과정이 필요하고, assay 방법론이 정교해져야한다. 따라서 이 분야는 재료공학, 응용수학, instrumentation 및 computer science까지 요구하는 종합적 특성을 가지고 있으며 가장 기본이 되는 유전적 정보의 확보[16] 또는 생합성 과정의 규명[17]이 가속화되는 것과 어울려 급격히 팽창하고 있는 분야이다[18].

표 2. Combinatorial 방법론

Methods	Combinatorial chemistry	Combinatorial biology
Products	Cathepsin D inhibitor	Human growth hormone
Library type	Small organic molecules	Protein site-directed mutants
Synthesis method	Solid-state, spatially addressable	Recombinant DNA and viral display
Theoretical Diversity	Greater than 10^9 (based on available synthetic reagents)	Greater than 20^{185} (total randomization)
Actual library size	Two libraries, 1,000 members each	Greater than 10^7
Target molecule	Cathepsin D (protease enzyme)	Growth hormone receptor
Desired effect	Inhibition of enzyme	Binding to receptor and antagonism of signalling
Screening method	Individual enzyme inhibition assays	Collective screening of recombinant virus
Optimization?	Use of directed library starting with crystal structure of enzyme complex	Selection and amplification of tight-binding viral clones

Combinatorial biology가 적용되는 분야는 다양해서 Hybrid polyketide antibiotics의 생산, 배양이 어려운 미생물의 유전정보를 배양 가능한 균주에서 발현시키는 과정, 미생물들의 대사경로를 산업용 생산숙주로 이전시키는 일, 유전자 발현 조절에 필요한 적절한 ligands를 개발하는 것 등이 있으며 최종적으로는 '비천연 천연물질'로서 신물질 탐색에의 응용을 들 수 있다.

Combinatorial Biology 대상으로서 Polyketide 물질군

Polyketide류는 방선균 등이 생산하는 중요한 천연물로 coenzyme A-activated carboxylic acid의 중합화로 형성된다. Module형태의 polyketide synthase(PKS)는 각각의 중합과정마다 module효소를 사용해서 각 단위의 산화상태와 stereochemistry를 지정하며 생합성을 수행하는 커다란 다기능 효소이다. 지난 2-3년간의 이론적 성숙기를 거쳐 이제는 module을 수정(modify)하거나 교체하여 hybrid 효소를 만들고 이 변경된 효소가 새로운 polyketide의 생합성 하는 방법이 combinatorial biology로서 '가능성 있는 개념'에서 ' 입증된 기술'로 제시되었다[7, 19].

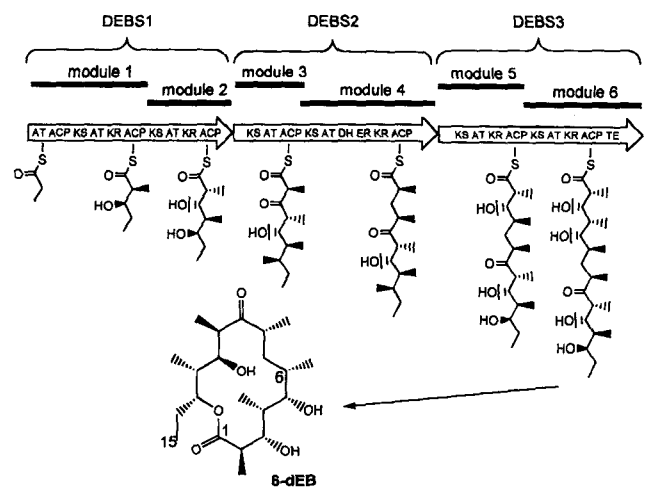
Polyketide류는 다양한 구조를 가지며 의약의 풍부한 공급원이 되고 있다[20]. 항생제 erythromycin, tetracycline, methy-mycin, 항암제 doxorubicin, enediynes, 면역억제제 rapamycin, FK506, antiparasitic 제제 avermectin, nemadectin, 항진균제 arthropticin, griseofulvin, 심장순환기약제 lovastatin, compactin 그리고 동물약품 monensin, tylosin이 그 산업적 예이며 rapamycin과 FK506은 이른바 bioprobe¹⁾로서 세포의 signal transduction규명에 사용되기도 했다[22]. 따라서 polyketide류는 자체로 유용한 활성물질로서 가치가 있고 또한 생체 세포 기능을 연구할 수 있는 중요한 단서가 되는 물질군이다.

PKS는 마치 부품의 조립라인처럼 작동하며, 그 생합성 과정과 유전적 정보가 잘 규명되어 있어서 각 조립라인마다 변경이 가능하고, 이러한 변경을 통한 hybrid antibiotics의 생산이 가능하다[23]. 만일 유전자 일부가 잘리면 작은 크기의 polyketide가 생산될 것이고, 효소의 일부분이 다른 기능으로 교체 되면 화학적으로 변화된 polyketide가 생산될 것이며, 새 단위가 삽입되면 복잡성이 증가된 polyketide산물을 생산할 수 있어서 combinatorial 잠재력이 크다. 특히 tetracyclin의 생합성에 관여하는 반복적(iterative) PKS 종류보다는, erythromycin aglycon의 생합성을 촉매하는 module형의 PKS가 더욱 combinatorial 잠재력이 큰데 module형 PKS는 서로 다른 active site를 가지고 각 탄소사슬 결합과 변형에 관여하기 때문이다.

Combinatorial potential(CP; 다양성; library size)은 PKS의 여러 효소중 중요한 acyl transferase AT의 숫자와 gene cluster내의 module 수효 M으로 추측이 가능하다. 즉, $CP=AT_L \times (AT_E \times 4)^M$ 인데 loading domain의 특이성별 AT수효 AT_L 과, 탄소사슬 길이를 연장하는 malonyl transferase 수효 AT_E , beta-carbon modifier 수효 4, 그리고 M이 변수로 작용한다. Erythromycin의 경우 $M=6$, $AT=3$ 으로 만 놓아도 $CP=10,000,000$ 가 계산된다. 그런데 통상 M은 10이상이므로 분자 다양성 창출을 위한 PKS의 combinatorial 잠재력은 아주 크다고 할 수 있다. 결국 polyketide와 combinatorial biology가 만나면 이론상으로는 거의 모든 목적의 요구에 부응할 수 있는 화합물을 매년 만들 수 있다고 계산된다.

Module형 효소인 PKS의 구조와 combinatorial 생합성의 방법은 다음과 같다. Deoxyerythronolide B synthase(DEBS)는 erythromycin의 모핵인 6-deoxyerythronolide B(6-dEB)를 생합성한다(그림 1). PKS의 loading domain은 acyl transferase(AT)와 acyl carrier protein(ACP)로 구성된다. 각 module은 ketosynthase(KS), AAT, ACP, 그리고 신장되는 polyketide 사슬의 beta-carbon을 변화시키는 3개 정도의 효소 domain으로 구성된다. PKS의 releasing domain은 thioesterase(TE)와 간혹 cyclase로 구성된다. 이러한 module형의 PKS 구조와 비교적 단순한 생합성 방법으로 인해 AT domain의 치환, loading domain의 변경, beta-carbon modifying domain의 변화, stereochemistry의 변화, PKS module의 융합, chemobiosynthesis, post-PKS modification, unnatural 숙주에서 polyketide의 발현, 그리고 truncated PKS의 창출 등이 가능하다.

Polyketide library의 생성 및 이를 통해 유도체를 개발하려는 combinatorial biology의 방법은 'Kosan Bioscience'의 공동 설립자이자 Stanford 대학의 교수인 Chaitan Khosla와 그의 연



DEBS is deoxyerythronolide B synthase. The active sites are as follows: AT, acyltransferase; ACP, acyl carrier protein; KS, ketosynthase; KR, β-ketoreductase; DH, dehydratase; ER, enoylreductase; TE, thioesterase

그림 1. PKS의 구조 및 6-dEB의 생합성[19].

1) Naturally occurring compounds and their derivatives useful for investigating mammalian cell function [21].

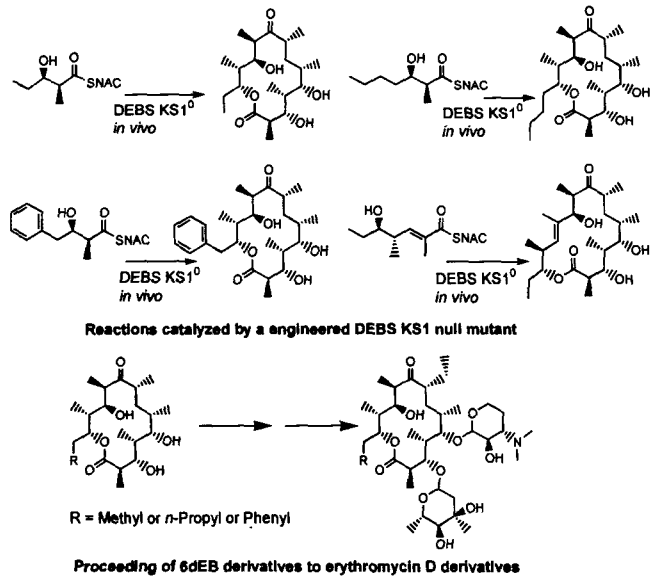


그림 2. DEB KS1 변이주가 진행시키는 전구물질 6-dEB 유사체 생성 반응.

구팀이 누구보다도 많은 연구를 진전시켰다. 그들은 일반적으로 적용이 가능하고, 발효에 기반을 둔 전략을 사용하였다. 화학합성된 세포투과성 있는 비천연물 전구체를 기질로 하고 재조합된 PKS를 효소계로하여 전구체를 천연물 유사한 화합물로 변형시켰다. 세포안으로 통과할 수 있는 non-natural 기질로 NAC(N-acetylcysteamine) thioester가 사용되어 6-dEB의 구조 유사체들을 in vivo 조건에서 생합성 하였다(그림 2). 일단 합성된 6-dEB 유사체들은 erythromycin D 유도체로 계속 생합성이 진행되었다. 여기에 사용한 재조합 PKS는 ketosynthase (KS1)이 불활성화된 null mutant(KS1⁰)로 정상적인 생합성이 어려운 것이지만 그림에서와 같은 적절한 diketide가 NAC thioester로 공급되면 정상적인 생합성이 계속 진행된다. 즉 비천연 물질인 NAC thioester를 기질로 인식하고 받아들이는 일부 변형된 PKS system에서 정상 산물인 6-dEB의 유사체가 생산된 것으로 erythromycin 구조 변경의 combinatorial 방법론이 제시되었다[24, 25].

Macrolide 항생제의 Combinatorial biosynthesis

새로운 macrolide 항생제를 찾기 위해서는 새로운 deoxysugar 구조를 구성하고 이를 다양하게 변형된 macrolide aglycon에 결합시킬 수 있어야 한다. 그런데 대부분의 sugar gene들은 PKS gene의 양끝에 흩어져 있어서 전구체로서 새로운 구조의 당을 생합성 하기는 쉽지 않다. 한편 Streptomyces venezuelae가 생산하는 항생제 methymycin과 이의 cometabolite인 neomethymycin은 deoxysugar의 형성에 대한 좋은 예가 된다. 왜냐

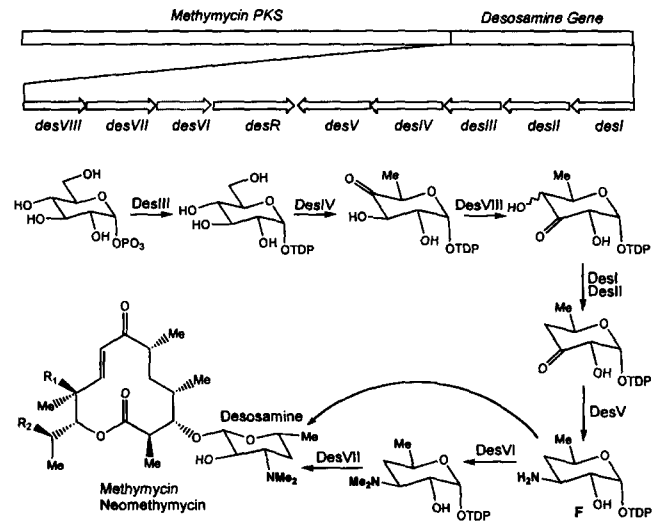


그림 3. Methymycin 유전자 및 생합성 경로.

하면 이 항생제는 erythromycin에도 존재하는 대표적 aminodeoxy sugar인 D-desosamine을 그 구조에 포함하고 있으며, 또한 단지 한 개의 당을 한 분자 내에 갖고 있어서 생합성 유전자의 규명이 훨씬 용이하기 때문이다. 그래서 Sherman 등은 약 60 kb의 methymycin/neomethymycin 유전자를 규명하여[5] 이 genomic 정보를 활용하여 새로운 macrolide를 생합성할 수 있었다[6]. Desosamine 생합성 유전자의 deletion에 의해 새로운 Metymycin 유사체를 만들기 위한 combinatorial biosynthesis과정은 (그림 3)과 같다.

PKS 유전자의 끝에 위치한 약 13 kb의 DNA가 이 deoxysugar의 유전자인데 9개의 ORF(*desVIII*, *desVII*, *desVI*, *desR*, *desV*, *desIV*, *desIII*, *desII*, *desI*) 중에서 *desR*이외에는 desosamine의 생합성에 관여한다. N,N-dimethyltransferase(DesVI)를 code하는 *desVI*을 변화시키기로 했는데 이는 *desVI*가 DNA상에서 다른 유전자에는 영향을 주지 않는 downstream에 위치하고, desosamine의 생합성경로상으로도 끝 단계에 간여하기 때문이다. *desVI*을 다른 gene으로 대체한 plasmid를 구성하여 생산균에 도입하여 *desVI*의 기능을 막아서 DesVI의 기질인 F가 생합성 경로에 축적되게 하였다. 축적된 F가 glucosyltransferase(DesVII)를 우회한 경로를 통해 aglycone에 결합하고 그 결과 -NH₂가 methylation 되지 않고 acetyl화된 N-acetylated aminosugar를 포함하는 신규의 항생제 두 가지가 생산되었다[6].

아미노산 서열의 조합에 의한 신규의 고활성 protease저해제 선발

Prostate specific antigen(PSA)는 암세포 증식 및 침투에 직접적인 역할을 하는 serine protease이다. 따라서 PSA의 선택

표 3. PSA의 최적 기질을 찾기 위한 펩타이드 library의 창출과 조합화

	Substrate		k_{cat}/K_m
	...P ₄	P ₃ P ₂ P ₁ ↓ P ₁ ' P ₂ ' P ₃ '...	
Sequence from semenogelin			
I	GSQQLL ↓	HNKQEGRD	2.0
II	GISSQY ↓	SNTEERLW	46
Exchange of P ₁ residue between I and II			
III	GSQQLY ↓	HNKQEGRD	2.6
IV	QISSQL ↓	SNTEERLW	1.5
Substitution of P ₂ residue within II			
V	GISSGY ↓	SNTEERLW	70
VI	GISSAY ↓	SNTEESLW	1000
VII	GISSPY ↓	SNTEERLW	110
VIII	GISSFY ↓	SNTEERLW	1800
Substitution of P ₁ ' and P ₂ ' in VIII			
IX	GISSFY ↓	GNTTEERLW	1500
X	GISSFY ↓	ANTEERLW	1000
XI	GISSFY ↓	FNTTEERLW	-
XII	GISSFY ↓	QNTTEERLW	-
XIII	GISSFY ↓	SGTEERLW	1900
XIV	GISSFY ↓	SATEERLW	1500
XV	GISSFY ↓	SSTEERLW	2200

적이고 효과적인 저해제는 생리적으로 중요한 기능을 기대할 수 있다. Protease 일종인 PSA의 효소활성이 가장 잘 나타나는 펩타이드 기질의 아미노산 서열과 작용점을 규명하면, 보다 정밀한 정량법이 가능할 뿐 아니라 PSA의 효과적 저해제의 고산에 필요한 유전적 정보를 얻을 수 있을 것이다. 따라서 PSA의 정상적 기질인 semenogelin의 아미노산배열을 반복적으로 변화시켜 창출된 펩타이드 library를 통해 가장 효소활성이 높은 배열을 찾았다[26]. 표 3에서 보면 semenogelin의 아미노산 서열에서 시작해서 촉매효율(k_{cat}/K_m)이 높은 조합을 찾아가기 위한 반복적 실험이 제시되어 있다. 주로 cleavage site 주변(...P₂P₁ ↓ P₁'P₂'...)의 아미노산이 치환되었고 점점 활성이 높아 가는 배열을 찾아서 특정 서열(SSFY ↓ SS)가 cleavage site로 가장 효과적 작용점임을 알 수 있었다. 나아가 더욱 개선된 PSA의 cleavage site를 규명하기 위해 phage display를 통한 보다 큰 규모의 library 창출에 combinatorial 방법을 이용할 수 있다.

I과 II의 비교에서 촉매효율이 높은 II의 P₁위치 아미노산 Tyr이 효율에 중요한지 확인하기 위해 이를 I의 Leu를 서로 맞 교체하여 III과 IV의 서열을 만들었다. 이때 효율의 변화가 없어서 다시 II의 서열을 기준으로 P₂를 바꿔가며 V, VI, VII, VIII의 서열 갖는 library를 조사하여 촉매효율이 1800/46 배로 증가된 VIII를 찾아냈다. 나아가 VIII의 P₁'와 P₂'위치를 변화시키며 k_{cat}/K_m 가 2200까지 늘어난 XV의 서열을 찾아내어 원래의 기질인 semenogelin의 촉매효율 보다 2200/46배가 증가된 새로운 펩타이드(GISSFY ↓ SSTEERLW)를 library중에서

찾을 수 있었다.

천연물질을 골격으로 하는 Combinatorial Biocatalysis

효소의 반응성을 이용해서 다양한 저분자 유기물 library를 창출 확보한다. 반복적 효소반응을 통해 다양성을 이끌어 내는 것으로 효소나 세포를 이용하거나, 천연조건 또는 비천연 조건에서 반응을 시키거나, 액상 혹은 고체상의 반응으로 수행될 수 있다. 이러한 효소를 이용한 combinatorial 기술의 한 방법이 combinatorial catalysis이다. 이 기술은 유전정보 보다는 합성촉매로서 효소의 특이성을 활용하고 있다. 이 기술은 신의약 탐색 및 개발을 위한 선도물질의 생산에 아주 유용하다. Combinatorial biocatalysis에 의해 library를 발생시킬 수 있는 기질 골격으로는 식물 추출의 천연물인 taxol을 비롯하여, 2,3-(methylenedioxy)benzaldehyde, adenosine, erythromycin, tropane, (±)-(2-endo,3-exo)-bicyclo(2.2.2)oct-5-ene-2,3-dimethanol, 그리고 bergenin등이 있다. 이중 플라보노이드 bergenin을 이용한 combinatorial biocatalysis의 예를 (그림 4)에 제시하였다[27].

Library를 창출할 촉매 후보가 되는 biocatalyst는 96-well plate를 이용한 1차로 선발과정을 거쳐 bergenin을 기질로 사용할 수 있는 16개의 정제 효소 및 25개의 미생물이 확보되었다. 이들 촉매로 2단계에 걸친 library 발생과정이 수행되어 총 600개의 유도체가 확보되었다. 이 과정은 질량분석기와 NMR

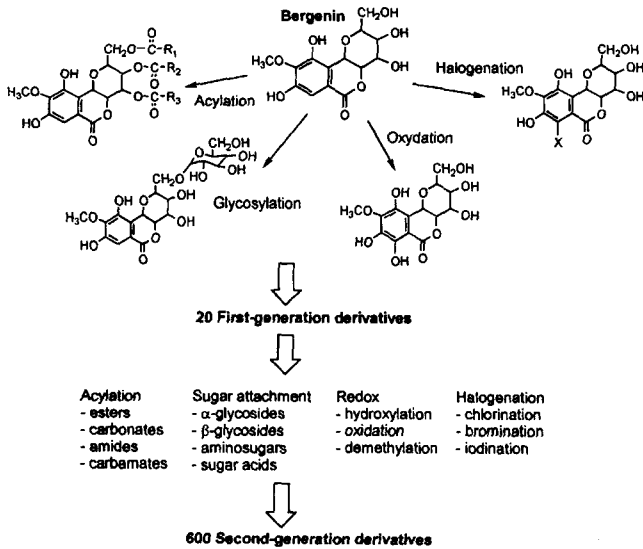


그림 4. Bergenin의 유도체 발생을 위한 combinatorial biocatalysis 과정.

로 분석되었고 xanthine oxidase와 urokinase를 대상으로 하는 활성검정 결과 처음의 골격인 bergenin보다 100배 활성을 보이는 저해제가 선발되었다.

결론 및 전망

이미 방선균을 비롯한 미생물이 생산하는 활성 물질 연구는 미생물, 생화학, 분자생물학 심지어 대량 생산의 방법까지 잘 알려져 있다. 그러나 단순히 lead compound를 찾기 위한 고전적 스크리닝 노력은 기지물질의 재발견이나 혹은 기지물질에 대한 새로운 기능의 부여에 머무르는 경향이 잦아지고 있다. 이를 해결하기 위해서 희귀 방선균의 확보나 특수 환경 미생물에 대한 연구 등으로 신규성을 창출하려는 노력이 치열하지만 이미 포화 단계에 들어간 이러한 일반론적인 접근에는 한계가 있을 것이다.

한편, HTS를 이용한 대량 스크리닝이 일반화되면서 기확보된 물질의 library가 충분한 거대 제약사들은 보유한 library로부터 새로운 활성이 확인된 물질을 찾기도 하였다. 그러나 검색 대상이 되는 신규 library의 창출하는데 있어서 일반적 유기합성기술로는 그 효율성에 문제점이 발견되었고, 이를 해결하기 위해 등장한 combinatorial chemistry에 의해 훨씬 효율적인 chemical library가 구축될 수 있었다(표 1). 실제 HIV 치료제인 Nevirapine의 성공사례도 combinatorial chemistry에 의해 reverse transcriptase 저해제를 합성하고 이로부터 개발 물질을 선정하는데 7개월밖에 걸리지 않았으며, 이후 임상 진입까지 총 1년 반의 짧은 시간에 해결 할 수 있었다[28].

따라서 이러한 combinatorial 기술이 genomics의 이해를 전제로 한 생합성 과정에 적용된다면 신규 활성물질의 연구에 생물산업

새로운 발전 계기가 될 것이다. 단지, 유기합성의 경우 잘 알려진 여러 가지 화학 반응을 조합하여 가장 확률이 높은 구조의 창출이 가능한데 비해, 생합성의 경우 보다 복잡하고 해석이 어려운 생체에 이를 적용하는 어려움이 있다. 하지만 최근 선충의 유전자가 규명되는 등 기본적인 genomics의 정보가 충분히 공급되는 발전속도로 보아 polyketide 물질뿐 아니라 다양한 활성물질의 개발에 이용이 가능 할 것이다.

참고문헌

- Whitman, W. B., D. C. Coleman, and Wiebe W. J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6578-6583.
- Demain, A. 1998. Microbial natural products: alive and well in 1998. *Nature Biotechnol.* **16**: 3-4.
- Nisbet, L. J., Moore, M. 1997. Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Curr. Opi. Biotechnol.* **8**: 708-712.
- Xue, Y., L. Zhao, L. Zhou, D. Wilson, H-W. Liu, and D. H. Sherman. 1998. Methymycin and pikromycin biosynthetic genes from *Streptomyces venezuelae*: one gene cluster, two macrolide antibiotics. *SIM Annual Meeting Program* S117, p.76 (Best student abstract award).
- Xue, Y., L. Zhao, L. Zhou, H-W. Liu, and D. H. Sherman. 1998. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12111-12116.
- Zhao, L., Sherman, D. H. and Liu, H-W. 1998. Biosynthesis of desosamine: construction of a new methymycin/neomethymycin analogue by deletion of a desosamine biosynthetic gene. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 10256-10257.
- Reynolds K. A. Combinatorial biosynthesis: lesson learned from nature. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12744-12746.
- Borman, S. 1998 Biosynthesis, combinatorially: a variety of techniques nudge microbes to produce 'unnatural' natural products. *Chem. & Eng. News Sep.* **30**: 29-30.
- Persidis, A. 1998 Combinatorial chemistry. *Nature Biotech.* **16**: 691-693.
- Blanco, G., Fu, H., Mendez, C., Khosla, C. and Salas, J. A. 1998. Deciphering the biosynthetic origin of the aglycone of the aureolic acid group of anti-tumor agents. *Chem. Biol.* **3**: 193-196.
- Gray, N., Wodicka, L., Thunnissen, A-M. W. H., Norman, T. C., Kwon, S-J., Espinoza, F. H., Morgan, D. O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S.-H., Lockhart, D. J., Scultz, P. G. 1998. Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **281**: 533-538.
- Walsh, C. 1998. Chemical biology: information, mesoscale science and the engineering ethos. *Chem. Biol.* **5**: R177-R

- 179.
13. Kozarich, J. W. and Rich, D. H. 1997. Next generation therapeutics toward a new era in drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 149–150.
 14. Kenan, D. J., Tsai, D. E. and Keene, J. D. 1994. Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 57–64.
 15. Ellman, J., Stoddard, B. and Wells, J. 1997. Combinatorial thinking in chemistry and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2779–2782.
 16. Van Wageningen, A. M. A., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., Jones, M., Jones, S. J. M. and Solenberg, P. J. 1998. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotics. *Chem. Biol.* **5**: 155–162.
 17. Einsenreich, W., Mengard, B., Lee, M. S., Zenk, M. H. and Bacher, A. 1998. Multiple oxygenase reactions in the biosynthesis of taxoids. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 9694–9695.
 18. Khosla, C. 1996. Combinatorial chemistry and biology: an opportunity for engineers. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 219–222.
 19. Carreras, C. W. and Santi, D. V. 1998. Engineering of modular polyketide synthases to produce novel polyketides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 403–411.
 20. Rawls, R. L. 1998. Modular enzymes. *Chem. Eng. News* **March 9**, pp. 29–32.
 21. Osada H. 1998. Bioprobes for investigating mammalian cell cycle control. *J. Antibiotics* **51**: 973–982.
 22. Schreiber, S. L. 1998. Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **6**: 1127–1152.
 23. Kats, L. and Donadio, S. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 875–912.
 24. Leadlay, P. F. 1997. Combinatorial approaches to polyketide biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 162–168.
 25. Jacobsen, J. R., Hutchinson, C. R., Cane, D. E. and Khosla, C. 1998. Precursor-directed biosynthesis of erythromycin analogs by an engineered polyketide synthase. *Science* **277**: 367–369.
 26. Coombs, G. S., Bergstrom, R. C., Pellequer, J.-L., Baker, S. I., Narve, M., Smith, M. M., Tainer, J. A., Madison, E. L. and Corey, D. R. 1998. Substrate specificity of prostate-specific antigen (PSA). *Chem. Biol.* **5**: 475–488.
 27. Michels, P. C., Khmelnsky, Y. L., Dordick, J. S. and Clark, D. S. 1998. Combinatorial biocatalysis: a natural approach to drug discovery. *Trend. Biotechnol.* **16**: 210–215.
 28. 이종욱 1998. 선진국의 제약산업 및 신약개발 현황과 전망. *과학과 기술* 1998. **10**: 46–51.