Engineering and Evolution of Enzyme

서울대학교 화학생물공학부
김병기 · 이재헌 · 박성희 · 서주현 byungkim@snu.ac.kr

최근의 연구 결과와 동향

효소반응공학과 효소의 진화에 대한 최신 연구동향에 대한 소식을 기술해 달라는 청을 받고 원고를 쓰려고 보니, 이 분야에 일하는 과학자로서 최근 2~3년 사이에 일어난 새로운 신개념의 연구가 많이 있었는가 하는 질문을 스스로에게 해보게 된다. 그러나 1997년 Maxygen사의 WILLEM P. C. STEMMER 그룹 및 CalTech의 Francis Arnold 그룹들에 의해 주도되었던 gene shuffling 기술(첫 번째 특허 U.S. Patent No. 5,605,793로 "Methods for In Vitro Recombination"라는 제목으로 1997년에 Maxygen 사에 의해 출원되었으며, 이 기술이 최근에는 molecular breeding 기술이라고 발전하였음)을 능가하는 기술개발은 크게 없지 않았나 사료되지만 많은 신규 기술개발이 이를 기본 기술로 하여 진보, 응용 및 발전을 거듭하게 되었다. 특기할 만한 사항으로는 Maxygen사는 이 기술로부터 다양한 분자 진화기술을 발전시켰으며 상동성이 높은(homologous) 유전자 내지는 같은 family에 속하는 유전자의 shuffling 기술을 개발하였고, Francis Arnold 그룹 등은 상동성이 낮은(nonhomologous) 유전자까지 recombination하는 기술을 개발하였다. 또한 미생물 염색체 전체를 가지고 유전자 shuffling 하여 원하는 특성을 가지는 균주 개발에 성공한 예들이 여러 논문에서 소개되었으나, 최근 들어서는 이 방법을 사용하여 새로운 균주 개발 보고가 뜸한 것으로 보아 그렇게 성공적이지는 못한 것으로 추측된다. 필자가 느끼기에는 새로운 유전자 진화기술의 진일보된 획기적 기술개발 보다는 오히려 최근 들어서 급속히 진척된 생물체의 유전자게놈 프로젝트로 인해 다양한 미생물, 동식물의 구성단백질, 조절단백질, 새로운 대사경로에 대한 효소의 확인 등을 수반하는 omics (genomics, proteomics, metabolomics 등) 연구와 세포 내 대사경로를 구성하고 이들의 동력학적(dynamic)거동을 대사체의 질량수지(mass balance)식으로 분석함과 동시에 새로운 대사 경로를 분자유전학적인 기술을 이용하여 균주에 신규도입 및 최적화하는 대사

공학(*metabolic engineering*)기술, 세포를 수개의 유전자 내지는 단백질의 해석으로 해결하기 보다는 거시적인 시각에서 세포 전체를 하나의 시스템으로 바라보고자 하는 시스템 생물학(system biology)의 발달로 여기에서 파생하는 다양한 문제(예 : 대사 경로의 속도 결정단계 관여 효소의 확인, 인위적인 기질 사용을 위한 대사 경로의 모방 내지는 수정, 새로운 대사경로를 사용하기 위한 세포 내 조절유전자의 진화 및 인위적인 조절 시스템 개발, 새로운 특정 적응증을 해결하기 위한 의료용 단백질의 진화 등)의 해결을 위해 관련 목적 단백질의 진화에 대한 중요성을 좀더 광범위하게 인식하게 되었으며, 이러한 예들이 다양하게 보고된 것이 주요 경향이 아닌가 사료된다. 또 다른 특징으로서는 급속하게 변화하는 생물의 유전자데이터 베이스의 폭발적인 증가와 컴퓨터의 계산능력 및 계산속도의 발전으로 유전자 서열의 해석, 단백질구조의 예측, 단백질-리간드 바인딩 비교, 단백질에 리간드를 바인딩 시킨 후에 주위의 아미노산 서열 변이를 통한 변이단백질의 개발, 단백질 공학으로 변형되는 신규단백질의 특성예측, 화학물질 독성스크리닝 등의 다양한 작업을 고속으로(high throughput screening(HTS)) 수행할 수 있는 기술들이 개발되고 있으며, 정확성 및 신뢰도를 향상시켜 컴퓨터를 통한 다양한 단백질의 개량 내지는 진화가 가능하게 된 것이 특기할 만한 발전이 아닌가 한다.

다른 한가지의 특징으로는 상기한 바와 같이 세포 내 대사경로의 삽입 및 삭제가 가능하고, 다단계 반응의 경우 대부분에서 나타나는 조효소 공급의 문제, 산화 환원효소의 불안정성 및 조효소(NAD(P)H) 재생산 문제, 효소의 안정성 및 분리정제의 어려움 등으로 인해 이런 문제점이 부각되는 시스템은 가급적 세포를 이용한 반응을 진행시키려고 시도하고 있으며 여기에서 파생되는 문제점을 해결하려는 노력을 경주하고 있다. 최근 들어 미국, 유럽 및 일본 등에서 진행되고 있는 minimal cell 및 cell factory 프로젝트들도 이런 점에서 일맥상통하는 점이 있다고 볼 수 있다.

○ 목적효소를 어디에서 어떻게 확보하고 어떻게 응용할 것인가?

과학적으로 단백질의 진화론적 개량측면에서는 상기한 경향이 특징이라면 이를 응용하는 산업적인 측면에서는 최근 많은 기업들이 유전자 shuffling 방법을 이용하여 단백질 개량을 시도하고 있고, 컴퓨터를 이용한 제약 스크리닝에 관심을 가지고 세계적 제약기업들은 투자와 연구투자를 경주하여 목적 신규 단백질을 신속하게 확보하려 하고 있다. 그러나 이 논의를 산업용으로 필요한 효소반응에 국한시켜 이야기를 한다면 실험자가 원하는 효소를 신속하게 확보하기 위해서는 해당 효소들이 일단 연구되어 보고된 적이 있는 경우 우선 Swiss-Prot (http://www.expasy.org/sprot/) 이나 BRENDA(http://www.brenda.uni-koeln.de) 등의 데이터 베이스에서 목적반응을 보내는 효소를 쉽게 찾을 수 있기 때문에 이를 유전자 클로닝해서 사용하는 것을 가장 기본으로 생각할 수 있고, 여기에 등재되어있지 않은 효소의 경우는 알려진 생물체의 게놈 데이터에 같은 이름으로 gene annotation이 되어있는 유전자를 찾을 수만 있다면 이를 대장균이나 다른 박테리아에 클로닝해서 활성 분석을 하여 기능을 살펴보는 것이 가장 빠른 방법이다. 그러나 이런 방법으로는 실험자가 확보할 수 있는 최선의 효소를 항상 확보하기는 쉽지 않다. 효소의 경우는 활성을 반드시 확인하여야 하고, 활성분석 방법을 구축하는 것이 특수한 예를 제외하고는 그렇게 힘들지 않기 때문에, 아직도 많은 경우 전통적인 시험관에서의 enrichment culture 내지는, 고체한천배지 플레이트 및 96-well 플레이트에서 목적반응을 통한 목적효소의 고속 스크리닝 방법의 개발을 사용하는 것이 현실이다. 그러므로 실제적으로 각자가 수행하는 프로젝트에 필요한 효소를 실험실에서 얻는 것, 그리고 어떤 신규 특정 대사경로에서 중간 생성물 합성에 관여한 한 두 스텝의 단백질을 확보하는 것은 쉽지 않은 일이다.

특히 산업적 생산규모에서의 효소공정이나 발효(혹은 biotransformation)를 생각한다면 효소의 안정성(pH, 온도, shear rate, 금속이온, 산화조건 등), 효소의 재사용 여부, 조효소(PLP, NAD(P)H, FAD, FMN, heme 등)의 필요유무, 기질과 산물의 사용농도에 따른 기질과 산물의 활성저해, 효소 발현정도, 분리정제 수율 및 비용 등 다양한 변수를 고려하여 어떤 특성의 효소를 확보할 것인지는 실험자의 과학적이고도 종합적인 판단을 요구하고 있다. 마지막으로 최근 들어 급증한 연구 방향은 전통적인 방법으로 효소 및 단백질을 스크리닝하지 못하는 경우 현재로는 배양이 불가능한 특수 자연계에 존재하는 생물체에서 유래하는 유전자 즉 메타게놈을 이용

한 효소의 스크리닝을 수행하는 경향이 있다. 기존의 배양 가능한 미생물에서 확보할 수 있는 효소에서 원하는 성질을 발견할 수 없는 상황인 경우 전혀 새로운 기능의 효소를 선별하기 위한 방법으로 사용될 수 있다고 생각된다. 수개의 성공적인 예가 보고는 되어있으나, 자연계상의 어떤 유전자가 발현이 가능한지가 아직 정확히 규명되어있지 않기 때문에 기존의 전통적인 세포를 이용하는 방법에 비해 현재로서는 크게 산업적으로 영향력이 있는 것 같지는 않지만 지속적인 연구를 통해 새로운 효소의 다양성(diversity)을 찾을 수 있지 않을까 사료된다.

이와 같은 총체적이고 종합적인 목적효소의 획득을 위해 실험자가 맞닥뜨리는 문제는 보통 다음의 3가지 경우로 크게 대별될 수 있지 않을까 사료된다.

1. Shall we screen or evolve functional enzymes?
2. Shall we design or screen functional enzymes?
3. Shall we evolve or design functional enzymes?

상기한 내용에서 1) 효소의 스크리닝이라 함은 일반적으로 enrichment culture 내지는 고체한천배지, 및 96-well 플레이트로 신규 효소를 보유한 균주의 선별 방법을, 2) 효소의 진화(evolution)라 함은 이용한 목적 기능의 효소를 시험관 진화(in-vitro evolution or gene shuffling)를 기본으로하고 이로부터 생긴 효소 변이주의 활성 비교를 통해 목적 효소를 찾는 방법을, 3)디자인(design)이라 함은 효소의 구조 및 기능을 컴퓨터 모델로 단백질 구조를 확립하여 위치 특이적 변이주를 제조하거나, 주어진 기질과 결합 및 반응할 수 있는 단백질 구조를 예측하거나 리간드인 기질을 예측하는 방법을 총칭한다.

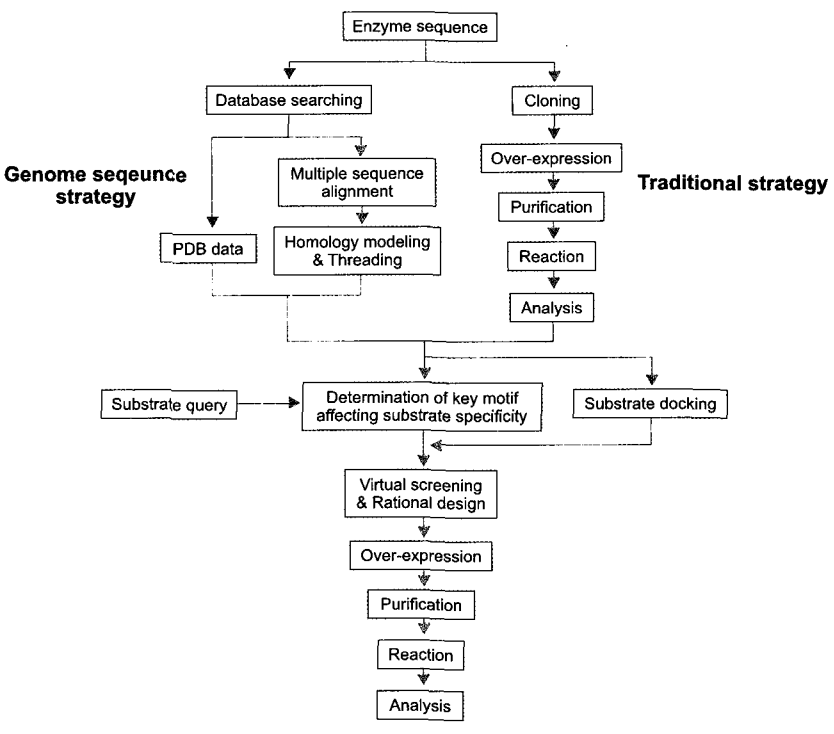
1. 공공의 데이터베이스에서 목적유전자를 찾을 수 있는 경우는 목적유전자를 좀더 변형시켜 목적에 맞도록 기능을 향상시킬 것인가 아니면 처음부터 목적에 맞는 효소를 자연계나 보관된 균주군에서부터 스크리닝 할 것인가를 결정하여야 할 것이다. 보통의 경우 데이터베이스에서 찾은 효소에서 목적에 맞는 기능이 거의 확보되고 약간의 기능 향상이 요구된다면 효소의 실험관 진화를 시도하는 것이 바람직하다고 사료된다. 그러나 데이터베이스 상의 효소가 목적기능을 거의 가지고 있지 않은 경우는 이를 진화시켜 사용하는 방법보다는 새로운 기능을 가진 효소를 처음부터 스크리닝하여 사용하는 것을 권장하고 싶다. 그러나 새로운 기능의 효소 활성을 쉽게 확인하는 방법의 존재유무에 따라 다른 선택이 가능하다. 주로 enrichment culture가 불가능하고 효소 변이주 하나 하나를 반응용기에서 테스트해야 하는 경우는 고속 스크리닝(HTS)이 불가능하기 때문에 진화적 방법을 사용하는 것은 거의 불가능하다고 이야기할 수 있다.

2. 모델링을 통한 디자인 방법을 사용하는 것이 스크리닝 방법보다 바람직하다고 생각되는 경우는 공공의 데이터베이스에서 목적유전자를 찾을 수 있거나, 이미 기존의 스크리닝 된 효소가 미약하나마 목적 기능을 보유하고 있는 경우이다. 최근의 단백질 모델링 방법은 sequence homology가 약 30% 이상이 되면 꽤 근사한 단백질 구조 모델링이 가능하다고 알려져 있기 때문에 쉽게 유사한 단백질 구조를 만들 수 있고 이를 기반으로 목적효소 기능향상 전략이 가능하다. 가장 간단하게는 효소 활성부위(active site) 및 기질 바인딩 부위의 새로운 디자인 및 위치 특이적 변이를 통해서 가능하기 때문에 자연계에서 신규로 목적효소를 스크리닝하는 방법보다는 훨씬 빠른 방법으로 목적효소를 획득할 수 있다고 사료된다. 그러나 이렇게 획득한 효소의 활성이 실제로는 다양한 예에서 보여주고 있지만 로보트를 이용한 선별방법이나 다른 HTS 방법을 구현하여 전통적인 효소에서 선별한 경우보다는 좋지 않은 경우가 많기 때문에 효소

미래의 효소 스크리닝 및 진화의 길은 상기한 바와 같이 효소의 선별, 진화 및 디자인 등이 독립적이라기 보다는 항상 병렬적으로 동시에 일어나는 경우가 많지만 지금과 같은 속도로 생물체에서 유래하는 효소유전자의 수가 기하급수적으로 늘어나서 지구상의 모든 생명체에 대한 유전자 지도를 모두 가지고 있다면 이론적으로는 현재 실험실에서 효소반응 및 반응생성물의 증감을 통해 효소를 선별하는 기존의 방법이 거의 모든 면에서 컴퓨터 스크리닝으로 대치될 수 있다고 생각된다.

의 이용목적에 따라 선택을 해야 할 것이다. 즉 고전적인 HTS 스크리닝 방법이 역시 경쟁력이 있는 것도 항상 기억해야 할 것이다.

3. 상기한 스크리닝과 시험관 진화방법, 스크리닝과 모델링-디자인 방법 간의 선택은 그래도 쉽게 결정을 할 수 있다고 사료되지만, 시험관진화와 모델링-디자인 방법 간의 선택은 실험자의 주관적 경험에 따르는 경우가 많다. 실험에 정통한 그룹은 전자를, 디자인에 자신이 있는 그룹은 후자를 사용할 것이다. 그러나 두 방법 모두 다 이미 기 확보된 효소가 어느 정도의 목적기능을 가지고 있을 경우에 이를 향상시키기 위해 선택할 수 있는 방법이다. 최근에 들어 디자인 방법을 사용해 완전히 새로운 신규 기능을 효소에 부가한 경우가 수개 보고가 되긴 하였지만 이를 실용화할 수 있을 정도의 활성을 확보하도록 효소활성을 향상시키는 것은 다른 차원의 문제이기 때문에, 반복적인 새로운 시험관 진화 및 디자인 접근법이 요구된다고 하겠다.

미래의 효소 스크리닝 및 진화의 길은 상기한 바와 같이 효소의 선별, 진화 및 디자인 등이 독립적이라기 보다는 항상 병렬적으로 동시에 일어나는 경우가 많지만 지금과 같은 속도로 생물체에서 유래하는 효소유전자의 수가 기하급수적으로 늘어나서 지구상의 모든 생명체에 대한 유전자 지도를 모두 가지고 있다면 이론적으로는 현재 실험실에서 효소반응 및 반응생성물의 증감을 통해 효소를 선별하는 기존의 방법이 거의 모든 면에서 컴퓨터 스크리닝으로 대치될 수 있다고 생각된다. 문제는 지구상의 모든 생명체의 유전자 지도를 얻는다는 사실 자체가 불가능할 것이다라고 예측되기 때문에 컴퓨터를 이용한 효소의 스크리닝이 그렇게 실험자의 눈에 쉽게 다가서지 않을 뿐이다. 그러나 바이오 정보학적인 방법을 이용한 효소의 스크리닝은 그 어느 때보다도 중요하고, 앞으로도 이를 이용해서 보다 많은 예측과 실험결과가 도출될 것이라고 생각된다. 그리고 꾸준하게 이를 위한 단백질의 데이터 베이스가 증대될 것이라고 예측된다. 이와 같이 목적에 맞는 효소의 선별 및 디자인에 걸리는 속도가 지금보다도 몇 배에서 몇 십 배 이상 빨라지는 시대가 온다면 효소공학과 이를 이용 내지는 응용하는 다양한 기술의 발전이 기대된다. 특히 현재의 많은 화학반응 중 소량 다품종 만이 필요한 자연물의 합성의 경우는 다단계효소반응으로 풀 수 있는 예가 가장 많이 존재한다. 이렇게 된다면 지금 우리가 어렵게만 생각되는 컴퓨터를 이용한 가상공간상의 효소 스크리닝과 실험실적 방법을 이용한 고속 스크리닝이 매우 상호보완적으로 사용될 것을 기대한다(예 : 그림 1 참조). 또한 이와 더불어 우리가 원하는 대사경로를 합성해서 필요한 세포에 넣어주고 이를 이용한 다양한 화합물의 생산이 가능해 지는 시대가 있을 거라 예측을 해본다.〈그림 1〉

〈그림 1〉