

## 대사 조절 분석 기법을 이용한 L-Threonine 생산 재조합 대장균 개발

최종일 · 박영훈 · †양영렬

CJ BIO연구소

(접수 : 2006. 12. 14., 게재승인 : 2007. 2. 10.)

### Development of L-Threonine Producing Recombinant *Escherichia coli* using Metabolic Control Analysis

Jong il Choi, Young Hoon Park, and Young Lyeol Yang†

CJ Corp. R&D Center for Bioproduct, Gayangdong, Gangseo-gu, Seoul 157-724, Korea

(Received : 2006. 12. 14., Accepted : 2007. 2. 10.)

New strain development strategy using kinetic models and metabolic control analysis was investigated. In this study, previously reported mathematical models describing the enzyme kinetics of intracellular threonine synthesis were modified for mutant threonine producer *Escherichia coli* TF5015. Using the modified models, metabolic control analysis was carried out to identify the rate limiting step by evaluating the flux control coefficient on the overall threonine synthesis flux exerted by individual enzymatic reactions. The result suggested the production of threonine could be enhanced most efficiently by increasing aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*) activity of this strain. Amplification of *asd* gene in recombinant strain TF5015 (pCL-P<sub>aroF</sub>-*asd*) increased the threonine production up to 23%, which is much higher than 14% obtained by amplifying aspartate kinase (*thrA*), other gene in threonine biosynthesis pathway.

**Key Words** : Metabolic control analysis, threonine, *Escherichia coli*, aspartate semialdehyde dehydrogenase

#### 서론

최근 염색체 염기서열 분석 기술의 발전과 생물정보학을 이용한 대용량 데이터 처리 기술에 따라 다양한 생명체의 염기서열과 유전자 해독이 이루어지고 있다. 이에 따라 대사 산물의 생산 및 생산량 증대를 목적으로 재조합 DNA 기술을 이용한 미생물의 개량이 대사공학의 핵심적인 분야가 되었다 (1). 이전까지 대부분 사용하고 있는 미생물 개량 기술은 돌연변이 방법이었으나, 돌연변이 방법은 경험적인 방식에 의해 나타난 최종 산물의 생산량에만 초점을 두고 있어 어떠한 경로로 조절되고 변형되어 생산성이 증가되었는가에 대한 과학적인 접근 방법이 아니므로 미생물의 특성을 정확히 파악할 수 없는 단점이 있었다.

따라서 미생물 내의 생합성 경로의 대사 공학을 위한 올바른 목적 유전자의 선별이 균주 개량의 핵심이 되었다. 그러나 여전히 유전자의 생물학적 기능에 대한 이해가 미

흡하고 미생물의 대사 네트워크 (metabolic network)의 복잡성 때문에 효과적인 균주 개량을 위한 목적 유전자를 선별하기 위한 방법에는 아직도 많은 연구가 요구되어 지고 있다 (2).

이러한 방법들 가운데서 최근에는 대사흐름 분석 (metabolic flux analysis)이나 대사조절 분석 (metabolic control analysis) 기술을 사용하여, 보다 효율적인 방법으로 대사공학 연구를 수행하고 있다(3-6). 대사흐름 분석 기술이란 미생물 내에서 일어나고 있는 생화학 반응식과 미생물이 밖에서 흡수하거나 분비하는 대사산물을 정량화함으로써 미생물 내부의 대사회로의 흐름을 예측하는 기술이다. 대사조절 분석은 얼마나 대사 흐름이 특정 효소의 활성과 대사체 농도에 따라 변하는지를 이해하기 위한 통계적인 모델링 기법이다. 대사조절 분석은 대사 시스템의 조절을 모델링하기 위한 방법을 수학적 형태로 제공하며 독립적인 변수 (parameters)가 대사 흐름이나 대사체의 농도 (variables)에 영향을 주는 상대적인 값을 묘사한다.

최근 대장균 (*Escherichia coli*)에서의 L-threonine 생합성 경로에 대한 효소 반응의 수학적 모델이 Christophe Chassagnole 등(7, 8)에 의하여 발표되었다. Threonine은 필수 아미노산의 일종으로 사료 및 식품 첨가제로서 널리 사용되며 의약품으로 수액제 및 의약품의 합성 원료로도 사용되고

† Corresponding Author : CJ Corp. R&D Center for Bioproduct, 92-1 Gayang-dong, Gangseo-gu, Seoul 157-724, Korea

Tel : +82-2-3660-0520, Fax : +82-2-3660-0501

E-mail : ylyang@cj.net

있다 (9).

따라서 본 논문에서는 대장균 threonine 생합성 경로에 관하여 보고된 수학적 모델을 대사조절 분석 기법을 이용하여 분석하여 속도 결정 단계를 확인하고, 속도 결정 단계로 확인된 효소 반응의 유전자 발현을 증폭하여 threonine 생산성을 향상시키는 연구를 수행하였다. 또한 threonine 생합성 경로의 다른 효소 반응의 유전자를 증폭한 결과와 비교하여 효과적인 균주 개량을 위한 대사조절 분석 기법의 가능성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmid

대장균 NovaBlue Singles™ Competent Cells (Novagen, San Diego, CA, USA)는 plasmid의 제작을 위한 균주로만 사용하였다. Threonine 생산 균주로는 보고된 TF5015를 사용하였다 (10). 대장균에서의 염색체 유전자 서열은 보고된 *E. coli* K12 genome sequence를 사용하였다(11). 유전자 발현을 위한 plasmid로는 pCL1920 (12)을 사용하였으며, promoter로는 대장균의 *aroF* promoter를 사용하였다. 연구에 사용된 primer들은 Table 1에 정리하였다. 중합효소 연쇄반응법 (PCR법)은 Expand™ High Fidelity PCR system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 PCR Thermal Cycler MP (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)로 수행하였다. DNA sequencing은 Bigdye terminator cycle sequencing kit (PerkinElmer Co., Boston, MA, USA)과 Taq polymerase를 사용하여 ABI Prism™ 377 DNA sequencer (Perkin Elmer Co.)로 분석하였다.

Table 1. Primers used in PCR experiments

Primer 1	5' - cgg ggt acc tgc tgg tca agg ttg gcg cgt - 3'	<i>aroF</i>
Primer 2	5' - ccg gat atc gat cct gtt tat gct cgt ttg - 3'	promoter
Primer 3	5' - ggg ccc ggg atg aaa aat gtt ggt ttt at - 3'	<i>asd</i>
Primer 4	5' - ggg ctgc agg tac gcc agt tga cga ag - 3'	
Primer 5	5' - ggg gat atc atg cga gtc ttg aag ttc - 3'	<i>thrA</i>
Primer 6	5' - ggg ctg cag tca gac tcc taa ctt cca - 3'	

### *asd*, *thrA* overexpression vector의 제작

먼저 발현에 필요한 promoter를 벡터인 플라스미드 pCL1920에 삽입하였다. 대장균의 염색체에 존재하는 *aroF* 유전자의 promoter를 사용하기 위하여 각각 primer 1 및 2를 이용하여 대장균 야생주 W3110의 염색체 DNA를 주형으로 하여 중합효소 연쇄반응법 (PCR법)(13) (PCR 조건: Denaturing = 95°C, 30초/Annealing = 53°C, 30초/Polymerization = 72°C, 1분, 30회)에 의해 약 700 쌍의 *aroF* 유전자의 promoter 부분을 증폭하였다. 얻어진 DNA 단편을 *KpnI* 과 *EcoRV*의 제한 효소로 절단하고 같은 제한 효소로 절단된 pCL1920 plasmid를 T4 DNA ligase를 이용하여 라이게이션하여 pCL-P<sub>aroF</sub>를 제작하였다.

또한, 대장균 W3110으로부터 aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*)를 클로닝하기 위하여 primer 3 및 4를 이용하여 마찬가지로 방법으로 약 1104 염기쌍의 *asd* 유전자를

증폭하였다. 얻어진 DNA 단편을 *SmaI* 과 *PstI*의 제한 효소로 절단하고 같은 제한 효소로 절단된 pCL-P<sub>aroF</sub> 플라스미드를 T4 DNA 라이게아제를 이용하여 라이게이션하여 재조합 vector pCL-P<sub>aroF</sub>-*asd*를 제조하였다. aspartate kinase (*thrA*)는 primer 3과 4를 이용하여 얻어진 PCR product를 *EcoRV*-*PstI* 제한 효소를 이용하여 pCL-P<sub>aroF</sub>-*thrA*를 제작하였다.

### 배양 조건

유전자 조작을 위한 재조합 대장균의 배양은 Luria-Bertani 배지 (LB, 10 g of Bacto tryptone, 5 g of Bacto-yeast extract, 10 g of NaCl per liter)를 사용하였다. Threonine 생산을 위한 역가 배양액의 조성은 글로코스 70 g/L, 효모 추출물 2 g/L, 암모늄 설페이트 28 g/L, 마그네슘 설페이트 0.5 g/L, 페러스 설페이트 5 mg/L, 망간 설페이트 5 mg/L, L-메티오닌 0.15 g/L, 칼슘 카르보네이트 30 g/L, 포타슘 디히드로젠포스페이트 1 g/L과 같다. 역가 배양은 250 mL flask에 25 mL의 배지에서 진탕 배양하였다. 배양 조건은 33°C, 200 rpm에서 48시간 배양하였다. 필요할 경우 항생제 spectinomycin (Sp, 50 mg/L)를 배지에 첨가하였다. Flask 배양 결과는 triplicate으로 하여 평균값을 사용하였다.

### 분석 방법

세포 성장은 562 nm에서의 optical density로 측정되었다 (Beckman DU659, Fullerton, CA, USA). Threonine의 농도는 high performance liquid chromatography (Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 대사조절 분석

대장균의 threonine 동역학적 효소 반응은 보고된 Christophe Chassagnole의 모델(7, 8)을 사용하였으며, Threonine 생산 대장균 TF5015의 유전학적 특성에 맞게 변수들을 변형하였다. Flux control coefficient나 concentration control coefficient 값들의 계산은 인터넷 환경 하에서 미생물의 동역학적 행동을 모사할 수 있는 JWS online(14)을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### Threonine 생합성 경로의 flux control coefficient값의 계산

Threonine 생합성은 aspartate로부터 threonine까지 5가지 효소, 즉, aspartate kinase (*thrA*, *lysC*, *metL*), aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*), homoserine dehydrogenase (*thrA*, *metL*), homoserine kinase (*thrB*), threonine synthase (*thrC*),가 관여하는 것으로 알려져 있다. 대장균에서의 threonine 생합성 경로에 대한 효소 반응의 수학적 모델은 Christophe Chassagnole 등에 의하여 이미 발표되었다(7, 8). 하지만, 발표된 수학적 모델은 야생 대장균 미생물에 관한 정보를 이용하여 얻어진 것으로서 본 연구에서 사용된 threonine 생산 대장균 TF5015의 경우 야생 미생물과는 다른 threonine 생합성 효소들의 특성을 가지고 있기 때문에

TF5015에 맞도록 threonine 생합성 효소들의 반응식을 수정하였다. 즉 TF5015의 염색체 서열 분석 결과로부터 threonine의 생합성 경로의 aspartate kinase homoserine dehydrogenase의 주요 유전자인 *thrA* 내의 염기서열 변이가 확인되었기 때문에, aspartate kinase 효소의 피드백 저해가 해제되었으므로 논문에 발표된 수학적 모델에서 threonine에 의한 aspartate kinase의 inhibition 영향을 제거하였다.

이렇게 변형된 model을 JWS online에서 여러 variable의 대한 값들에 대한 concentration control coefficient와 flux control coefficient 값들을 계산하였다. Reference flux로는 threonine의 마지막 생합성 효소에 의한 flux를 사용하였다. 계산된 각각 효소의 증폭에 따른 threonine 대사 흐름의 증가량을 상대적으로 비교한 결과는 Table 2와 같다.

**Table 2.** Flux control coefficient (FCC) of threonine biosynthetic enzyme

Enzyme	FCC for threonine synthase flux
aspartate kinase	24.7
aspartate semialdehyde dehydrogenase	56.5
homoserine dehydrogenase	18.2
homoserine kinase	0.6
threonine synthase	0

따라서 aspartate semialdehyde dehydrogenase (*asd*)의 양을 증가시켰을 경우 threonine 생합성 경로의 대사흐름이 가장 크게 증가한다는 결과를 얻었다. 이에 의해, 대장균 TF5015에서 threonine 생합성 경로에서 threonine의 생합성 속도를 제한하는 단계는 aspartate semialdehyde dehydrogenase에 의한 단계임을 알 수 있었다.

#### ***asd*와 *thrA*발현이 증가된 재조합 대장균에서의 threonine 생산**

대사조절 분석 기법에 의한 flux control coefficient 결과를 검증하기 위하여 대장균을 주형으로 하여 *asd*를 coding하는 유전자를 low copy number plasmid pCL1920 vector에 cloning하였다. 발현을 위한 promoter로는 대장균 weak promoter인 *aroF* promoter를 사용하였다. 또한 threonine pathway의 다른 유전자를 증폭한 결과와 비교하기 위하여 threonine pathway에서 aspartate kinase와 homoserine dehydrogenase를 coding하는 *thrA* 유전자 과발현 vector도 같은 *aroF* promoter와 pCL1920 vector를 이용하여 제작하였다.

제작된 pCL-P<sub>aroF</sub>-*asd*와 pCL-P<sub>aroF</sub>-*thrA*를 각각 threonine 생산 균주 TF5015에 형질전환하였다. 얻어진 균주들 TF5015 (pCL-P<sub>aroF</sub>-*asd*)와 TF5015 (pCL-P<sub>aroF</sub>-*thrA*)를 threonine 역가 측정배지를 이용하여 증폭에 따른 수율의 영향을 확인하였다.

Flask 배양 결과는 Table 3에 나타냈다. 48시간의 배양 이후 TF5015, TF5015(pCL-P<sub>aroF</sub>-*asd*)와 TF5015(pCL-P<sub>aroF</sub>-*thrA*)는 모두 비슷한 균체 농도를 가졌으나, threonine 농도에서는 *asd*와 *thrA*가 과발현된 균주에서 모두 증가하였다. TF5015와 vector만을 갖고 있는 TF5015(pCL-P<sub>aroF</sub>)의 threonine 농도는 모두 약 9.6 g threonine/L의 값을 가졌으나, TF5015(pCL-P<sub>aroF</sub>-*asd*)와 TF5015(pCL-P<sub>aroF</sub>-*thrA*)에서는 각

각 11.81 g threonine/L와 10.97 g threonine/L 농도를 가졌다. 특히 *asd*의 발현이 증가된 재조합 대장균에서는 threonine 농도가 23% 증가였으며, 이는 *thrA*를 과발현시킬 경우에 얻어진 14%보다 높은 농도의 증가를 보였다.

**Table 3.** Results of flask culture of recombinant *Escherichia coli* harboring pCL-P<sub>aroF</sub>-*asd* or pCL-P<sub>aroF</sub>-*thrA*\*

	OD562	THR (g/L)
TF5015	15.2 ± 0.3	9.6 ± 0.4
TF5015(pCL-P <sub>aroF</sub> )	15.1 ± 0.2	9.5 ± 0.3
TF5015(pCL-P <sub>aroF</sub> - <i>thrA</i> )	15.3 ± 0.2	10.97 ± 0.4
TF5015(pCL-P <sub>aroF</sub> - <i>asd</i> )	15.8 ± 0.2	11.81 ± 0.3

\*Cultures were carried out triplicates

이러한 결과들로부터 대사조절 분석 기법에 의하여 균주 개발 전략을 위한 유전자를 효과적으로 targeting할 수 있다는 사실을 확인 할 수 있었다. 또한 대장균 전체의 kinetic model을 가지지 않고 관심의 대상이 되는 생산물의 최종 pathway만의 model로부터도 균주 개발 전략을 이끌 수 있다는 사실을 확인하였다.

## 요 약

대사 공학을 이용한 생산 균주 개발의 핵심 기술은 원하는 대사산물을 과량으로 얻기 위하여 기존의 대사회로에서 제거, 증폭, 변경을 시켜야 할 유전자를 선정하는 것이다. 대사조절 분석 기법은 대사 흐름이 특정 효소의 활성에 따라 어떻게 변하는지를 예측하는 기술이다. 본 논문에서는 대장균의 threonine 생합성 효소 반응 kinetic model과 대사조절 분석 기법을 이용하여 threonine 생합성 flux를 가장 효과적으로 증가시키기 위하여 활성 증가가 필요한 효소가 aspartate semialdehyde dehydrogenase라는 것을 밝혔다. 이러한 결과를 확인하기 위하여 *asd*가 과발현된 vector와 threonine 생합성 경로의 다른 효소인 aspartate kinase를 coding하는 *thrA*를 과발현 시키는 vector를 제작하여 threonine 생산 균주인 TF5015에 형질전환하여 threonine 농도를 측정하였다. Flask 배양결과 대사조절 분석 기법으로 확인된 유전자 *asd*를 과발현시킬 경우가 생합성 경로의 다른 유전자를 과발현시킨 경우보다 더 높은 threonine 농도의 증가를 보였다. 이러한 연구 결과들은 효소 반응 kinetic model과 대사조절 분석 기법을 이용하여 원하는 product를 효율적으로 생산할 수 있는 생산 균주를 제작할 수 있게 할 것이다.

## REFERENCES

1. Raab, R. M., Tyo, K., and G. Stephanopoulos (2005), Metabolic engineering, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **100**, 1-17.
2. Lee, S. Y., Lee, D. Y., and T. Y. Kim (2005), Systems biotechnology for strain improvement, *Trends Biotechnol.* **23(7)**, 349-358.
3. Heijnen, J. J., van Gulik, W. M., Shimizu, H., and G.

- Stephanopoulos (2004), Metabolic flux control analysis of branch points: an improved approach to obtain flux control coefficients from large perturbation data, *Metab. Eng.* **6**(4), 391-400.
4. Visser, D. and J. J. Heijnen (2002), The mathematics of metabolic control analysis revisited, *Metab. Eng.* **4**(2), 114-23.
  5. Wiechert, W. and K. Noh (2005), From stationary to instationary metabolic flux analysis, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **92**, 145-72.
  6. Yang, C., Hua, Q., and K. Shimizu (1999), Development of a kinetic model for L lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* and its application to metabolic control analysis, *J. Biosci. Bioeng.* **88**(4), 393-403.
  7. Chassagnole, C., Rais, B., Quentin, E., Fell, D. A., and J. P. Mazat (2001), An integrated study of threonine pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli*, *Biochem. J.* **356**(Pt 2), 415-23
  8. Rais, B., Chassagnole, C., Letellier, T., Fell, D. A., and J. P. Mazat (2001), Threonine synthesis from aspartate in *Escherichia coli* cell free extracts: pathway dynamics, *Biochem. J.* **356**(Pt 2), 425-32.
  9. Ikeda, M. (2003), Amino acid production processes, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **79**, 1-35.
  10. Lee, J., Lee, D. E., Lee, B. U., and H. S. Kim (2003), Global Analyses of Transcriptomes and Proteomes of a Parent Strain and an Threonine Overproducing Mutant Strain, *J. Bacteriol.* **9**, 5442-5451.
  11. Blattner, F. R., Plunkett, G 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Y. Shao (1997), The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* **277**(5331), 1453-74.
  12. Lerner, C. G. and M. Inouye (1990), Low copy number plasmids for regulated low level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability, *Nucleic Acids Res.* **18**, 4631.
  13. Sambrook, J. and D. W. Russell (2001), Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  14. Olivier, B. G. and J. L. Snoep (2004), Web based kinetic modelling using JWS Online, *Bioinformatics* **20**, 2143-2144.