

유용산물 생산을 위한

재조합 생합성 대사회로 설계/구축



아주대학교 생명공학과
이 평 천 교수

미생물은 수천 년 전부터 인간에게 유용한 많은 물질들을 만들어 제공해 왔으며, 우리들은 이러한 미생물이 갖고 있는 다양한 대사회로의 결과물들을 이용하여 우리의 삶을 윤택하게 만들어왔다. 생물공학 초기에는 미생물을 이용한 유용산물의 생산을 생합성 대사회로차원의 인위적 조작이 아닌 전적으로 미생물이 갖고 있는 자연적 대사회로에 의존하였다. 즉, 우리가 원하는 물질을 생산하는 미생물을 스크리닝 한 뒤에 전통적인 균주개발법 (화학물질 및 UV조사 등)을 이용하여 생산공정을 최적화 하였다. 비록 균주 선택 및 스크리닝이 생산량증대 측면에서 상당한 기여를 한 것이 사실이지만 그러한 향상은 직접적인 결과가 아니었고 그 향상의 기작 또한 불명확하게 남아 있었던 것이 일반적이었다. 유전공학의 발달과 분자수준에서의 생합성 대사회로에 대한 지식의 축적 및 미생물 자체를 자유롭게 조작할 수 있는 유전적 방법의 발전 등에 힘입어 유용산물의 생산성 증가를 위한 생합성 대사회로의 조작뿐 만 아니라 신규 구조의 유용산물을 생산할 수 있는 생합성 대사회로의 재설계 및 재구축까지 많은 발전을 이루었다.

오늘날 지노믹스 (genomics)에 의하여 축적된 광범위한 DNA 서열을 이용할 수 있으며 이를 통하여 새로운 종류의 유용산물을 만들 수 있는 기회 또한 많아 졌다 (1-4). 더불어 체계적인 생합성 대사회로의 설계 및 구축이 가능해 졌으며, 많은 연구자들이 “자연”이 이용하고 있는 복잡한 대사회로의 진화 및 분화 방법을 모방하여 새로운 대사회로 재설계 및 구축에 이를 적용하여 더욱 다양한 신규 대사산물 등을 생성할 수 있는 재조합 대사회로를 창조 할 수 있었다.

생합성 대사회로는 보통 여러 단계의 효소적 단계로 구성되어 있어, 최적의 통합적 활성을 나타내기 위하여 개별 효소의 기능적 코디네이션 (Functional coordination)이 중요하다. 기능적 활성을 나타내는 생합성 대사회로의 최적화 및 대사 생성물의 다양화 등의 목적으로 대사회로상에 존재하는 개별효소의 특성을 변화 시키기 위한 인위적 조작이 활발히 진행되어 왔다. 최근에는 효소 및 생합성회로 수준이 아닌 시스템수준에서의 최적화를 위하여 새롭게 구축된 생합성 대사회로에 직간접적으로 상호작용을 하는 지놈상의 인위적 변화를 시도한 예도 보고되고 있다.

본 리포트에서는 이러한 최근 유용산물의 생산을 위한 외래/재조합 생합성 대사회로의 설계 및 구축 방법을 제시하고, 외래/재조합 생합성 대사회로공학 (Metabolic pathway engineering) 시에 자주 발생이 되는 문제점과 이를 해결하기 위한 다양한 접근법에 대하여 간단히 설명하여, 미흡하게나마 생합성 대사회로공학을 통한 유용산물의 생산에 대한 관심 있는 연구자들의 이해를 돕고자 한다.

생합성 대사회로는 보통 여러 단계의 효소적 단계로 구성되어 있어, 최적의 통합적 활성을 나타내기 위하여 개별 효소의 기능적 코디네이션 (Functional coordination)이 중요하다.

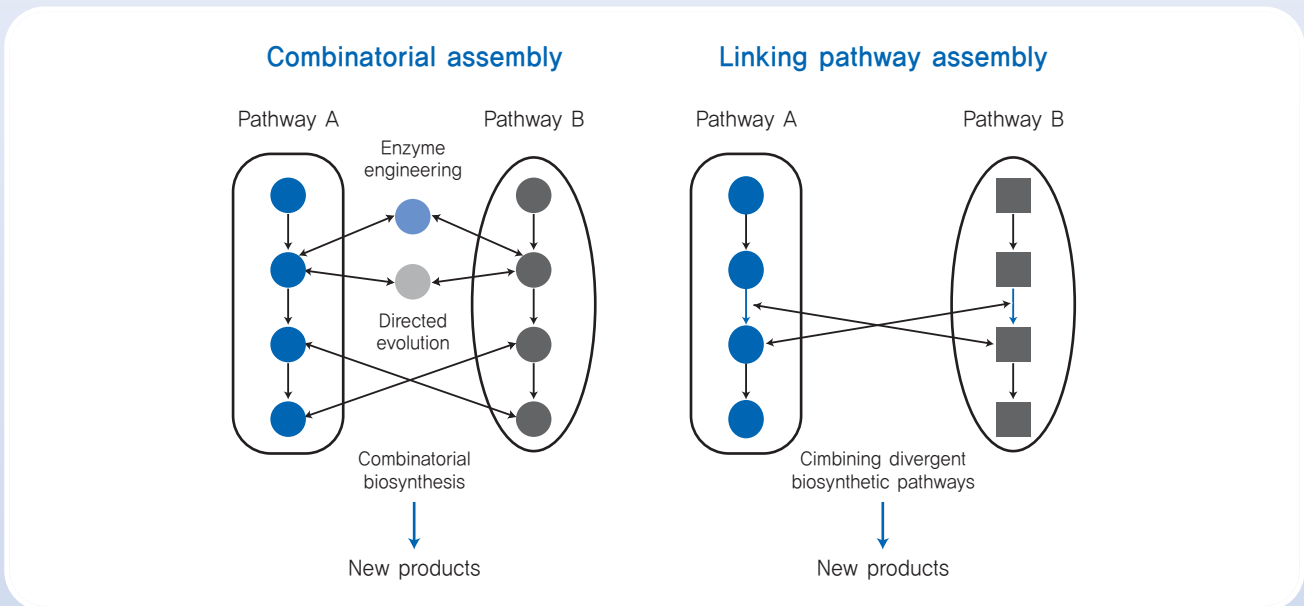
1. 재조합 생합성 대사회로의 설계 및 구축방법

생합성 대사회로공학은 외래 숙주 (heterologous host)에서 단백질 생산 등과 같은 고전적 유전공학적 접근법과는 상당한 차이점이 있다. 특히, 생합성 대사회로 설계/구축 시에 고려할 요소들이 상대적으로 외래 숙주 세포의 대사회로와 시스템적 또는 국부적으로 복잡한 관계를 갖는 경우가 많다. 이에 대한 간략적인 내용을 중점적으로 살펴보겠다.

일반적으로 유용산물을 위한 재조합 생합성 대사회로의 구축은 다양한 소재로부터 관련 생합성효소의 확보 및 이의 체계적인 반응서열 (reaction sequence) 설계부터 시작된다. 이 경우 보통 다양한 반응서열 설계 기법들이 존재하며, 그 중 대표적인 것 중에 조합합

성법 (combinatorial approach) 등이 있다 (그림 1).

이들 반응서열 설계 기법으로 동물, 식물, 메타지노믹스 (Metagenomics) 등 다양한 유전자 소재로부터 생합성회로 유전자 군을 얻어 미생물 등의 새로운 숙주세포에 새롭게 재조합 생합성회로를 재구축할 수가 있다 (5-7). 이러한 성공적인 스토리에도 불구하고 재조합 생합성회로의 구축 시에 자주 발생하는 문제점도 많이 보고 되었다. 예를 들면, 전구체 (precursor)의 존재 유무, 생합성관련 효소의 co-factor 및 reducing agent 존재/양의 문제, 생합성회로효소들이 기능적 코디네이션 문제, 외래 숙주 내 대사회로와의 재조합 생합성 대사회로와의 기능적 연결성 등이 고려해야 할 요소



〈그림 1〉 대사회로의 재설계 방법의 예

evolution 기법이 광범위하게 이용되어 왔으며, 그 외 plasmid의 copy number를 통한 발현 조절, 프로모터 (promoter)의 세기 및 조절을 이용한 조절, mRNA의 안정성 등을 이용한 조절 등이 보고되었다 (12-14). 지속적인 효소 수준의 최적화 연구는 다양한 신규 구조의 유용산물의 창조에 많은 영향을 끼칠 것으로 예상된다.

3. 신규 유용산물을 생산하기 위한 대사회로의 인위적 진화

새로운 구조의 유용산물을 생성하기 위한 생합성 대사회로 구축은 보통 세 종류의 방법을 이용한다. 첫째, 다양한 유전적 소재로부터 발굴된 생합성 대사회로관련 효소들의 조합을 통한 재조합 생합성 대사회로의 구축법; 둘째, 생합성대사회로 관련 개별효소의 기질 특이성 등의 고유성질의 변화를 통한 인위적 재조합 생합성회로의 구축법; 셋째, 앞서 제시된 첫 번째 와 두 번째 방법을 동시 수행을 통한 재조합 생합성회로 구축법 등이다. 이 세 종류의 방법은 실질적으로 신규 구조의 생성물을 얻기 위해서는 재조합 생합성회로 상 전구체에서 최종산물로의 효율적인 반응진행이 중요한 요소이며, 이에 관여하는 효소의 선택 및 인위적 조작 등이 핵심단계로 여겨진다. 2차 대사산물 생합성 대사회로의 경우, 대사회로상의 분화/진화에 중요한 역할을 수행하는 효소들은 대부분 생합성 회로의 마지막 단계 부근에 관여하는 경우가 많다. 이는 미생물의 경우, 새로운 환경에 신속하게 대응할 수 있도록 생합성회로의 유연적 분화 및 확장 등의 진화론적 측면과 관련이 있는 것으로 생각되고 있다. 최근 들어 효소의 기질특이성, 활성 등이 환경 변화 (전구체 종류 등)에 따라 크게 달라질 수 있다는 예들이 지속적으로 보고 되고 있는데 (15-16), 이는 생합성 대사회로 재설계를 통한 다양한 신규 구조의 생성물의 개발에 높은 가능성을 제공할 것으로 생각된다.

앞서 제시된 신규 구조의 다양성을 만드는 생합성 대사회로구축

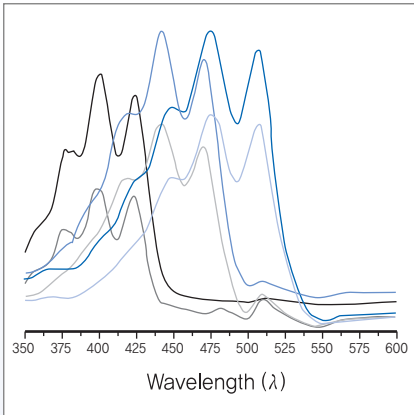
의 기본적인 원리 및 방법론을 설명할 수 있는 좋은 예로서 카로티노이드 생합성회로를 들 수 있다 (그림 2). 간단히 설명하자면, 다양한 소재로부터 발굴된 카로티노이드 생합성관련 유전자의 성공적 조합 (combination), 외래숙주 (대장균, 효모 등)에서의 재조합 카로티노이드 생합성 대사회로의 성공적 재구축, 대사회로관련 핵심 효소의 인위적 조작 (Directed evolution) 등으로 신규 카로티노이드 생합성 대사회로의 확장 및 분화가 가능하였다 (17), 또한 지놈 마이닝 (genome mining)기법을 통한 신규 효소군의 탐색과 이를 카로티노이드의 생합성회로의 융합 등으로 카로티노이드 생합성 대사회로의 인위적 진화 또한 가능하였다 (18).

한편, 전체 지놈 셔플링 (whole genome shuffling)을 이용한 유용산물 생산도 많은 발전을 이루었다. 폴리키타이드계 항생제의 생산성을 높이기 위해 지놈셔플링 기법이 초기에 개발되었으며, 그 방법으로는 주로 protoplast fusion의 유전공학적 기술을 이용한다 (19). 최근에는 지놈셔플링을 이용하여 낮은 pH에서도 성장억제를 안받는 *Lactobacillus* 균주의 개발, Pentachlorophenol (PCP)의 분해능력을 높인 *Sphingobium chlorophenolicum*의 개발 등의 보고가 있다.

4. 대사회로공학에 이용되는 탐색 (screening) 기술

앞서 설명한 인위적 진화접근법 (evolutionary strategy)을 신규/재조합 대사회로 구축 및 지놈 공학에 직접적으로 적용하기에는 실제로 엄청난 크기의 라이브러리를 탐색해야 하는 물리적/경제적 제약이 존재한다. 이를 해결하기 위해서 보통 3가지 탐색기술을 이용하는데 1) 대사회로의 생성물에 의한 숙주세포의 표현형 (phenotype)변화를 이용한 탐색, 2) 대사회로 생성물의 물리/화학적 성질을 이용한 기기분석적 (analytical instrument-based) 탐

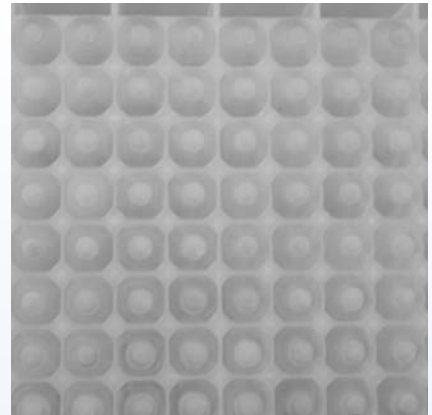
다양한 소재로부터 발굴된 카로티노이드 생합성관련 유전자의 성공적 조합 (combination), 외래숙주 (대장균, 효모 등)에서의 재조합 카로티노이드 생합성 대사회로의 성공적 재구축, 대사회로관련 핵심 효소의 인위적 조작 (Directed evolution) 등으로 신규 카로티노이드 생합성 대사회로의 확장 및 분화가 가능하였다.



(a) 카로티노이드의 고유 흡광도



(b) Sgsr plate



(c) 96-well plate

〈그림 3〉 카로티노이드의 흡광도 차이에 의한 탐색기법

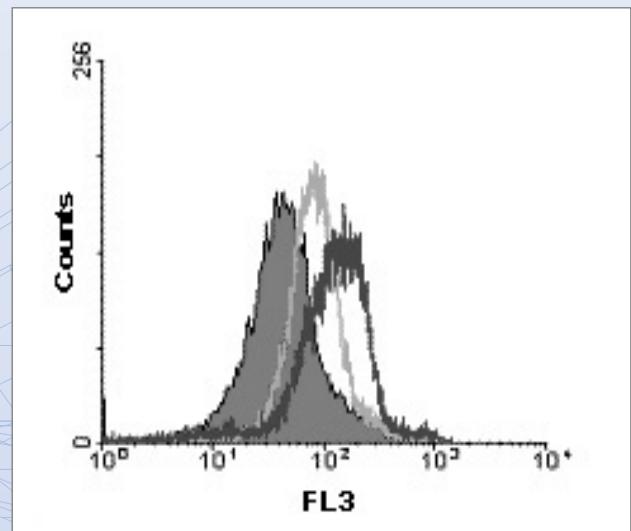
색, 3) 기능성 지노믹스 (Functional genomics)를 이용한 유전형 (genotype)과 표현형 (phenotype)의 연결을 이용한 탐색 등이다.

숙주세포의 표현형을 이용한 탐색의 대부분의 경우, 생성물의 형광 (fluorescence) 이나 흡광도 (absorbance)의 성질을 탐색기술에 이용한 것이다. 고유한 흡광도의 차이에 기인한 탐색기술의 예로서 카로티노이드 (carotenoid)를 들 수 있으며 (그림 3), 고유한 형광의 차이를 이용한 예로서는 테트라파이롤 (tetrapyrrole)의 일종인 포피린 (Porphyrin)의 FACS (fluorescence-activated cell sorting)을 이용한 탐색을 들 수 있다 (그림 4). 대사회로 생성물의 물리/화학적 성질을 이용한 기기분석적 탐색의 경우는 분석화학의 발전에 큰 영향을 받아왔는데, 그 주된 방법은 크로마토그래피(chromatography)와 분광기법 (spectrometry)을 기본 원리로 한 GC, GC-MS, LC-MS, FTIR, NMR 등의 분석기기를 이용한다. 현재 여러 탐색용 분석기기를 한 개의 시스템으로 간략화하는 시도가 많이 보고되어 있다. 예를 들면, 2차원적 크로마토그래피법 (예로써 Ion exchange 와 reverse phase column을 이용한 분리)과 Mass 또는 NMR을 한 개의 분석 시스템으로 연결하여 효율성 증대 및 시간을 단축시키는 예가 있다.

이러한 분석기기의 단일 시스템화 경향과 더불어 로봇릭 시스템 (그림 5)의 발전 및 더 나아가 두 시스템의 일원화는 향후 재조합 대사회로공학의 발전 및 유용산물의 생산 등에 막대한 영향을 미칠 것으로 생각이 된다.

5. 앞으로의 방향

앞에서 기술한 바와 같이 미생물 내에 새로운 외래 대사회로를 이성적으로 구축하기 위해서는 1) 관련 유전자들 (자연적 또는 인위적)의 도입, 2) 도입된 유전자들의 새로운 생합성 대사회로에의 융합, 그리고 3) 재조합 생합성 대사회로의 최적화의 단계가 필요했다. 재조합/신규 생합성회로의 설계 및 구축의 경우 앞에서 기술한 것처럼 “자연”이 이용한 생합성 대사회로의 생성/조절 및 분화 원리 및 방법을 새롭게 이해하고 이를 응용하게 된다면 전통적인 대사회로공

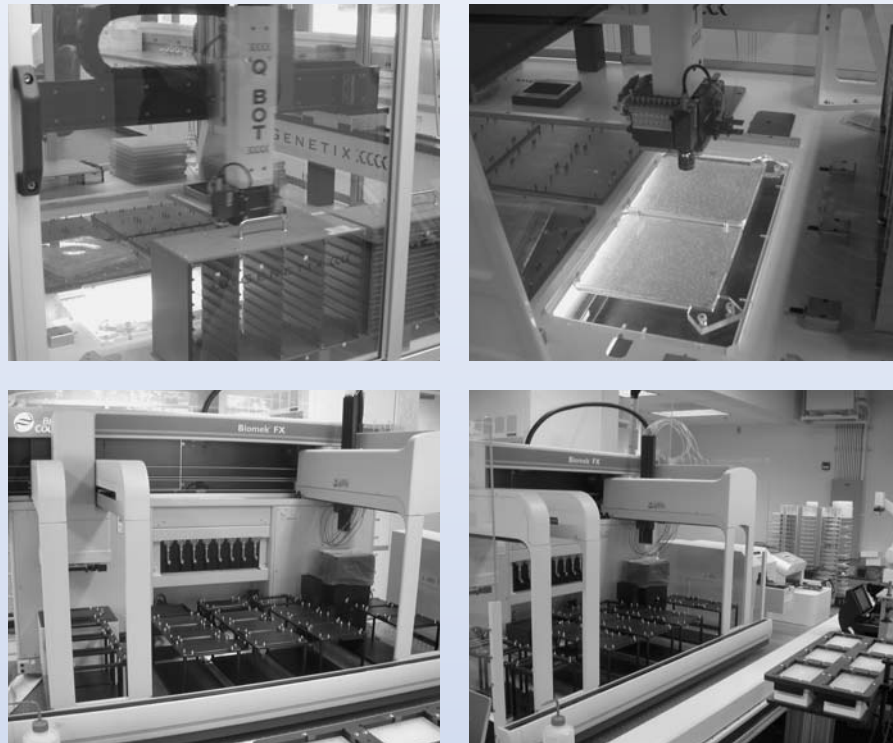


〈그림 4〉 포피린(porphyrins)의 형광 차이를 이용한 FACS 적용의 예

이러한 분석기기의 단일 시스템화 경향과 더불어 로봇 시스템의 발전 및 더 나아가 두 시스템의 일원화는 향후 재조합 대사회로공학의 발전 및 유용산물의 생산 등에 막대한 영향을 미칠 것으로 생각이 된다.

학 접근법을 탈피하여 체계적이고 합리적인 재설계 기법이 개발되고 이에 따른 생합성 대사회로공학분야에 많은 발전을 기대할 수 있다. 더욱이 시스템생물학과 합성생물학의 발전을 통한 생합성 대사회로의 설계의 정교함/예측가능성이 한층 높아질 것으로 생각된다. 또한 향후 합성 지놈 (Synthetic genome) 및 지놈의 최소화 (Genome minimization) 등의 최신기법을 통한 최소한의 대사회로만을 갖는 미생물 숙주의 개발 등이 곧 실현될 것으로 예상이 됨에 따라 현재까지 제시되어온 생합성 대사회로공학 시에 발생하는 여

러 문제점들이 체계적으로 해결될 수 있을 것으로 기대된다. 결국에는 모든 대사회로공학 관련연구자가 꿈꾸어온 최상/최적의 “맞춤식 미생물공장 (Customized Microbial Cell Factories)”이 빠른 시일 내로 출현할 것으로 예상된다. 67



<그림 5> Robotic system의 한 예 (Q Bot system)

〈참고문헌〉

1. Hibbert, E. G. et al., Directed evolution of biocatalytic processes, *Biomol Eng* 22, 11, 2005.
2. McDaniel, R. and Weiss, R., Advances in synthetic biology: on the path from prototypes to applications, *Curr Opin Biotechnol* 16, 476, 2005.
3. Koffas, M., Evolutionary metabolic engineering, *Metabol Eng* 7, 1, 2005.
4. Chatterjee, R. and Yuan, L., Directed evolution of metabolic pathways, *Trends Biotechnol* 24, 28, 2006.
5. Szczebara, F. M. et al., Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast, *Nat Biotechnol* 21, 143, 2003.
6. Hwang, E. I. et al., Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster, *Appl Environ Microbiol* 69, 2699, 2003.
7. Watts, K. T., Lee, P. C., and Schmidt-Dannert, C., Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*, *Chembiochem* 5, 500, 2004.
8. Pfeifer, B. et al., Process and metabolic strategies for improved production of *Escherichia coli*-derived 6-deoxyerythronolide B, *Appl Environ Microbiol* 68, 3287, 2002.
9. Lee, P. C., Mijts BN and Schmidt-Dannert C Investigation of factors influencing production of the monocyclic carotenoid torulene in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, 538, 2004
10. Kwon, S. J. et al., A high-throughput screen for porphyrin metal chelatases: application to the directed evolution of ferrochelatases for metalloporphyrin biosynthesis, *Chembiochem* 5, 1069, 2004
11. Sanchez, A. M., Bennett, G. N., and San, K. Y., Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity, *Metabol Eng* 7, 229, 2005
12. Tao, L., Jackson, R. E., and Cheng, Q., Directed evolution of copy number of a broad host range plasmid for metabolic engineering, *Metabol Eng* 7, 10, 2005.
13. Meynial-Salles, I., Cervin, M. A., and Soucaille, P., New tool for metabolic pathway engineering in *Escherichia coli*: One-step method to modulate expression of chromosomal genes, *Appl Environ Microbiol* 71, 2140, 2005.
14. Kim, S. W. and Keasling, J. D., Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production, *Biotechnol Bioeng* 72, 408, 2001.
15. Aharoni, A. et al., The 'evolvability' of promiscuous protein functions, *Nat Genet* 37, 73, 2005.
16. Kazlauskas, R. J., Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis, *Curr Opin Chem Biol* 9, 195, 2005.
17. Lee, P. C. et al., Biosynthesis of structurally novel carotenoids in *Escherichia coli*, *Chem Biol* 10, 453, 2003.
18. Mijts, B. N., Lee, P. C., and Schmidt-Dannert, C., Identification of a carotenoid oxygenase synthesizing acyclic xanthophylls: Combinatorial biosynthesis and directed evolution, *Chem Biol* 12, 453, 2005.
19. Zhang, Y. X. et al., Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria, *Nature* 415, 644, 2002.