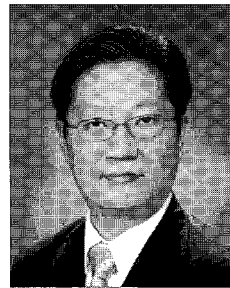
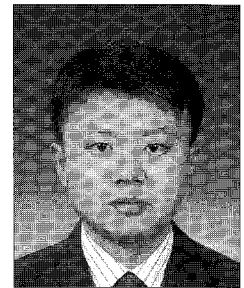


시스템 기법을 이용한 대사 합성 기술



포항공과대학교 화학공학과
정규열



울산대학교 생명화학공학과
홍순호

대사 전체 수준에서 새로운 대사 회로를 설계·제조하고 이를 활용하여 새로운 생체분자를 합성하는 기술을 대사 합성 기술이라고 하며, 이는 크게 유전자 네트워크 합성 기술과 주문형 생체분자 합성 기술로 분류된다. 유전자 네트워크 합성 기술 분야는 수소를 효율적으로 대량생산 할 수 있는 특정 미생물을 설계, 항생제 등의 의약품이나 의약 중간체를 효율적으로 생산할 수 있는 미생물의 설계, 우라늄과 같은 방사성 물질이나 TNT같은 위험 물질들을 검출하고 분해할 수 있는 biological system의 구축, 특정 악성 virus나 암세포만을 공격하는 biological weapon의 개발 등 다양한 분야에 응용 할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 주문형 생체 분자 합성기술은 기존의 석유 의존형의 화학산업을 바이오의존형 지속성장 가능 화학산업으로 변모시키기 위한 차세대 핵심 산업기술분야이며 바이오매스와 같은 저탄소 물질을 원료로 이용하여 산업적으로 필요한 다양한 구조의 화학물질 (바이오연료, 대체 원료, 특수기능물질 및 바이오플리머 등) 을 맞춤형 생체시스템 (대사공학)을 이용하여 생산하는 기술이다.

가. 유전자 네트워크 합성 기술

(1) 유전자 회로 합성 분야

유전자 회로 합성 기술(gene circuit engineering)은 세포 내 유전자 발현에 관련된 조절 인자들과 이들의 영향을 받는 유전자 서열, 즉 프로모터(promoter) 등 유전자 발현 인자들을 유전자 수준에서 분리하고 인위적으로 재구성하여 이들의 유기적 반응을 통해 유전자 발현 형태를 임의적으로 디자인 및 제어하고자 하는 분야이다.

유전자 회로 디자인 및 구현에 대한 최초의 실험적 결과로는 2000년 Leibler, Elowitz 교수 연구진 (Princeton University, USA)에서 개발한 진동 유전자 회로(oscillatory genetic circuit)를 들 수 있다¹. 이는 세 가지의 유전자 발현 억제인자(repressor) 즉 lacI, tetR, λCI와 이에 의해 조절 되는 프로모터를 이용해 유전자 회로를 디자인 하여 세포 내 유전자 발현을 진동형태로 조작할 수 있음을 보여주었다 [그림 4.1]. 같은 개념을 이용한 유전자 토글 스위치

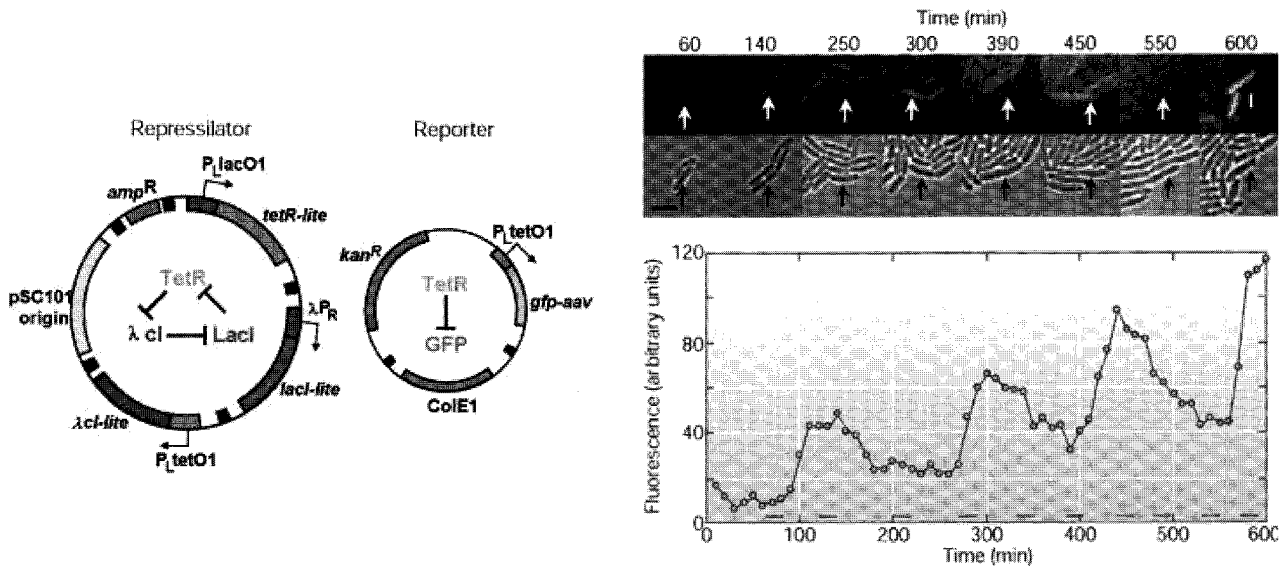


그림 4.1 oscillatory genetic circuit 및 진동 현상 (Elowitz & Leibler, 2000)

(genetic toggle switch)가 비슷한 시기에 Collins 교수 연구진(Boston University, USA)에 의해 발표 되었으며², MIT의 Drew Endy박사는 regulatory circuitry들을 모두 합성하여 자유자재로 우리가 원하는 biological system을 구축할 수 있게 하는 BioBricks을 고안 설계하였다³. Caltech의 Arnold 교수 연구팀은 유전자 회로를 디자인 및 구현한 후 방향성 진화(directed evolution) 기술을 이용하여 최적화시킴으로써 유전자 회로를 구현할 때 발생하는 문제점 중의 하나인 전사 조절인자 및 유전자 발현의 실험적 제어의 어려움을 극복하는 방안을 제시하였다⁴. 이후, Caltech의 Arnold 교수 연구팀과 Berkeley의 Akin 교수팀은 균체의 농도를 인식하는 유사한 시스템을 각각 발표하였으며, UCLA의 Liao 교수 연구진은 실제 세포내의 유전자 네트워크와 보다 가까운 유전자 회로로서 세포의 대사 조절 기작과 유전자 발현 조절 기작을 이용하여 “gene-metabolic circuit”을 제시하였으며, 아세트산 대사 기작을 이용한 “인공 정족수 인식 회로⁵” 및 “유전자 진동 회로⁶” 합성에 대한 연구 결과를 발표하였다. 2005년 미국 UC, San Francisco 대학의 Voigt교수팀은 외부의 광원에 반응하는 유전자회로를 대장균에 도입하여, 마치 자신의 사진을 찍는 듯한 기능을 하는 시스템을 개발하였다.

이외에 다양한 유전자 회로 합성에 대한 연구가 진행 및

발표되고 있는데 유전자 회로 합성에 대한 연구는 i) 포스트게놈 연구의 핵심이라 할 수 있는 세포내 유전자 네트워크의 구성 및 이에 의한 단백질 발현 네트워크에 대한 이해를 심화시키고, ii) 유전자 발현의 임의 제어 기술을 제공함으로써 대사공학 기술, 단백질 생산 기술, 바이오센서 및 유전자 치료 기술 등 생물 기술과 생물 산업 전반에 영향을 줄 것으로 기대되고 있다. 국내에서는 회로 합성을 위한 기본단위인 전사 조절 인자 각각에 대한 연구 수준은 매우 높은 편이며 활발히 진행되고 있으나, 이들을 인위적으로 재구성 및 합성하고자하는 연구는 거의 진행되지 않았다. 이는 유전자 회로 합성 분야가 기초 연구에 가까운 연구로서, 응용 연구 중심으로 운영되고 있는 국내 실정과 무관하지 않은 것으로 판단된다.

(2) 대사 경로 합성 분야

대사 경로 합성에 관한 연구는 생명체의 대사 경로 (metabolic pathway)를 인위적으로 디자인 및 합성하여 유용한 물질의 합성, 생산 공정 분석 및 최적화에 이용하고자 하는 분야로서 전통적인 대사 공학 기술의 연장선상에 있다 할 수 있다.

미국 UC Berkeley의 Jay D. Keasling 교수는

artemisinin 생합성에 관련된 유전자들을 대장균에 도입한 후 대사공학기술을 이용하여 이들 대사경로를 최적화함으로써 합성이 어렵고 가격이 비싼 말라리아 치료제인 artemisinin을 다량으로 생산하는 대장균을 만드는데 성공하였다⁷. Stanford의 Khosla 연구진의 경우 방선균의 polyketides 합성 경로에 관여하는 유전자들을 대장균에서 발현하고 관련 대사 경로를 인위적으로 재배치함으로써 다양하고 디자인된 polyketide를 생산할 수 있는 균주를 인위적으로 제작할 수 있음을 제시하였다⁸. 또한 MIT의 Stephanopoulos 연구진은 RNA-단백질 display 기술을 이용하여 trehalose 합성 경로를 칩위에 제작한 “metabolism-on-a-chip” 기술을 개발하여, 합성 공정 분석 및 최적화에 이용하였는데 이는 대사 경로를 생체 밖에서 인위적으로 디자인 및 합성함으로써 유용 대사 물질 생산 공정의 효율성 증진에 크게 기여할 것으로 평가되었다⁹. [그림 4.2].

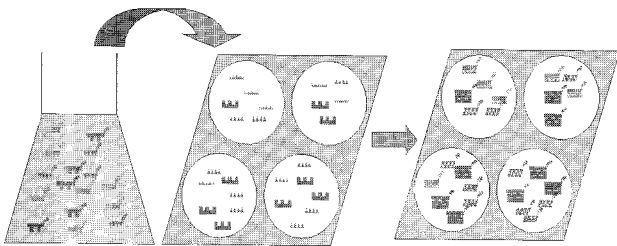


그림 4.2 “metabolism-on-a-chip” 제작과정 모식도

대사 경로 합성 분야의 경우는 응용 연구에 가까운 성격 때문에 국내에서도 비교적 활발히 진행되고 있다. 특히 21C frontier 미생물 유전체 사업단을 중심으로 유용 대사 물질의 생산 경로 합성을 위한 기반 기술 및 유전체 연구가 수행되고 있으며, CJ, 종근당 등의 산업체에서도 관심을 가지고 연구를 수행하고 있다.

(3) 인공 생명체 합성 분야

Synthetic biology에서 원하는 biological system의 제작 및 제조를 하나의 기능을 수행하는 작은 유전자군에서 더욱더 확장시켜 새로운 생명체를 직접 합성하고자 하는 인

공 생명체 (artificial organism) 합성에 대한 연구는 아직까지는 뚜렷할 만한 성과를 내고 있지는 않지만 빠르고 값싼 DNA sequencing과 합성, 생물 system을 고안하고 시뮬레이션 할 수 있는 효과적인 software들의 개발에 의해 이러한 일들이 결코 먼 미래의 일만을 아니라는 것이 다음과 같은 최근 연구들에 의해 입증되고 있다.

2002년 Wimmer 팀 (State University of New York at Stony Brook)은 DNA sequence 정보와 nucleotides의 화학적 합성 기술만을 가지고 활성을 갖는 7.5 kb의 폴리오 바이러스를 합성하였다¹⁰. 또한 미국 IBEA (Institute for Biological Energy Alternatives)의 Craig Venter 팀은 5.4 kb 정도의 박테리오파지 ΦX174를 이전보다 간단한 whole genome 합성 방법을 이용하여 단 14일 만에 제조하는데 성공하였다¹¹. 국내에서는 최소유전체 (minimal gene set)를 가지는 생명체의 제조에 대한 연구가 최소 유전체 대장균 제조를 중심으로 KAIST 김선창 교수 연구진에 의해 활발히 진행되고 있으며 기술 수준도 세계적 수준에 근접해 있다. 이러한 결과들은 우리가 원하는 기능의 유전자군을 단지 DNA sequence를 바탕으로 화학적으로 합성하여 그 기능을 발휘할 수 있게 할 수 있을 뿐만 아니라 더 나아가서는 우리가 원하는 인공 미생물들을 직접 합성해 낼 수 있다는 가능성을 제시해주고 있다.

(4) 바이오나노머신 합성 분야

합성생물학의 기술을 적용하여 박테리아 등에 새로운 기능을 추가함으로써, 이를 바이오나노머신(bio-nanomachine)으로 활용하려는 다양한 연구들이 수행되어져 왔다. 이를 위하여 우선 자연계에 존재하는 나노머신들을 연구하여 기존의 생체시스템을 각각의 바이오부품 수준으로 이해하는 연구가 수행되어지고 있다. 그리고 각각의 바이오부품을 재조합하여 생명체를 새로운 바이오나노머신으로 합성하려는 연구들이 진행 중이나 아직까지는 기초적인 수준이다. 궁극적으로는 나노머신을 이용하여 나노스케일의 물체를 조작해야 되며, 의학, 환경, 우주, 군사분야 등에서 활용될 수 있고, 특히 약물전달에서 세포치료 등에 이르는 의학산업 분야에서도 혁명적인 역할을 하리라 기대

된다.

2008년 UC, San Francisco의 Voigt교수연구진은 T3SS(Type III Secretion System)는 동물세포에 직접 단백질을 분비할 수 있는 특성으로 인하여 라이브백신 혹은 바이오나노머신의 모델로서 많은 각광을 받고 있는 살모넬라균주의 침투 유전자 네트워크인 SPI-1(Salmonella Pathogenicity Island-1)의 동력학적인 거동을 수학적으로 분석하였다. 또한 2007년도 미국 UC, San Francisco의 Voigt교수 연구진은 유전자회로 재조합을 통한 AND gate 제작을 발표하였다. 이 AND gate는 살리실레이트와 아라비노스 두 개의 인자가 함께 존재하는 경우에만 신호로 인식하여 모델단백질을 생산하며, 두 인자 중 하나라도 존재하지 않으면 활성화 되지 않는 특징을 보여주고 있다 [그림 4.3].

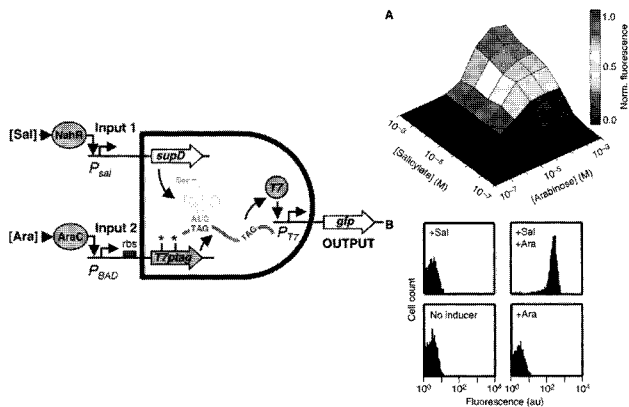


그림 4.3 AND gate model과 거동 분석¹²

- 주문형 생체 분자 합성 기술

자연계에 존재하는 다양한 화학구조와 이에 기인한 다양한 생물학적 활성을 갖는 수많은 천연 화학물질은 해당 물질을 만드는 생합성회로 또는 대사조절회로에 의해 결정된다. 생체 분자 합성 기술 및 대사공학 기술 중의 하나인 조합생합성회로공학 (combinatorial pathway engineering) 이 최근에 새롭게 대두되어 신규 유용 저분자물질의 생물

학적 생산에 많은 기여를 하고 있다. 구체적으로 조합생합성회로공학은 미생물이나 식물체가 생산하는 유용물질을 타겟으로 정하고 관련 생합성대사회로 (biosynthetic pathway)를 *in silico* 상에서 탐색 (지놈 마이닝, genome mining) 및 확보 후에 이를 시스템적으로 미생물균주 (대장균이나 효모 등)에 재설계 및 재구축하여 생산하는 기술을 핵심으로 한다.

(1) 아이소프레노이드계 화학물질

UC 버클리 대학의 Keasling 교수는 말라리아 치료제인 artemisinin 생합성에 관련된 유전자들을 대장균 및 효모에 도입한 후에 생체 합성 기술을 이용하여 새로이 재조합 및 재구축된 대사경로를 최적화함으로써 합성이 어렵고 가격이 비싼 말라리아 치료제인 artemisinin 을 대량으로 생산하는 재조합 대장균을 만드는데 성공하였다⁷ [그림 4.4]. 또한 아주대의 이평천 교수팀과 미네소타 대학의 Schmidt-Dannert 교수팀은 아이소프레노이드계인 Ubiquinone-8의 생합성 대사회로를 인위적 진화법 및 조합합성법을 이용하여 새로운 구조의 Ubiquinone 물질을 만들어 내었다.¹³ 아이소프레노이드계 대표물질인 카로테노이드에 대한 연구는 전 세계적으로 초보적인 단계이고, 미국 미네소타대학의 Schmidt-Dannert 교수팀에서 주도적으로 C40 카로테노이드에 대한 재설계 및 대사공학 연구를 수행하였다. 국내에서는 아주대 이평천 교수 연구팀과 경상대의 김선원 교수 연구팀이 카로테노이드 생합성에 대한 합성기술을 연구하고 있다. 하지만 위에서 서술한 것처럼, 제한적인 원천균주, 제한적 생합성 유전자군, C40 카로테노이드 생합성 회로에 국한된 연구 등으로 인하여 연구의 한계성이 있어 왔다. 또한 근본적인 카로테노이드의 구조적 문제점 (낮은 수용성 등)에 대한 연구가 거의 전무하다.

(2) 폴리키타이드계 화학물질

폴리키타이드는 항암제, 항생제, 면역억제제 등의 생리적 기능을 갖는 생체 물질로서 폴리키타이드 계열 화합물

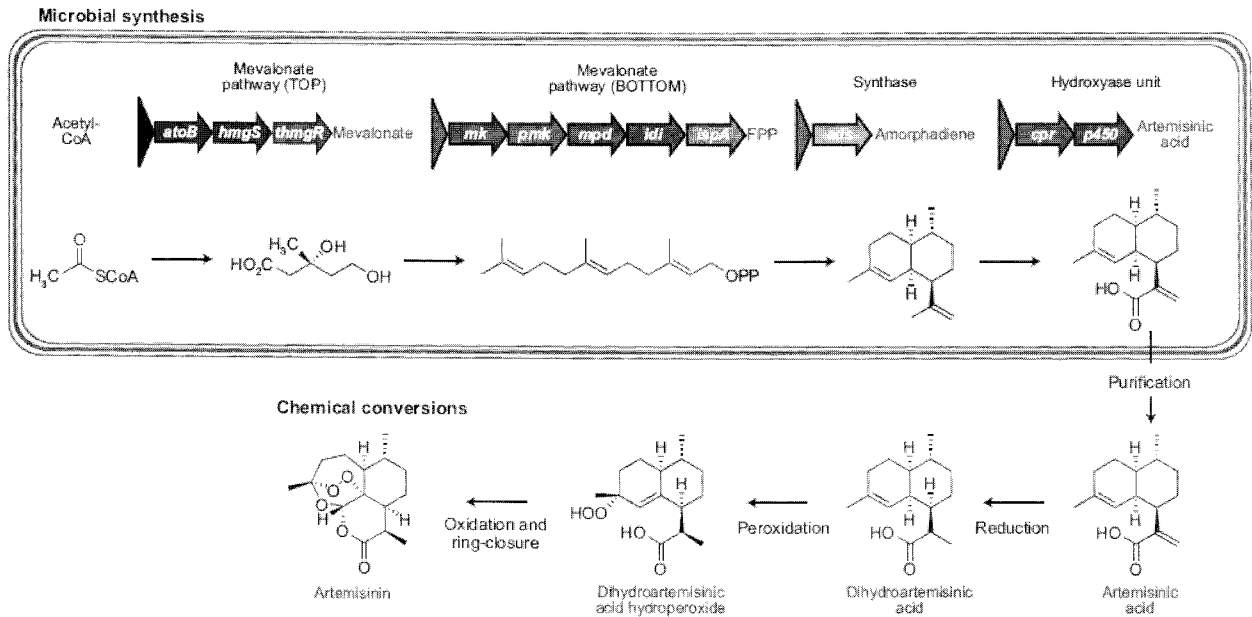


그림 4.4 말라리아 치료제인 artemisinin을 생체 합성 기술을 이용하여 생산하는 전략 (Martin et al. Nat Biotech 2003).

은 PKS (polyketide synthase) 라는 다기능의 효소 복합체에 의해 생합성 된다. 이러한 PKS는 연속적인 축합 반응에 관여하는 여러 개의 모듈로 구성되어 있으며, 최근에 이러한 PKS의 각 모듈을 인위적으로 분리하여 맞춤형으로 새로이 조합하여 합성하고 이를 통하여 새로운 생리활성 물질을 만들어 내려는 기술을 개발하고 있다. 국내의 경우, 이화여대, 인하대, 성균관대 등의 연구그룹이 생체 분자 합성기술 및 대사공학 기술을 이용하여 재조합 폴리키타이드 생산균주의 개발에 연구를 진행중이며, 신규구조의 폴리키타이드 물질을 만들기 위해 노력하고 있다.

(3) 숙신산

바이오매스를 이용한 생체분자 합성기술로 가장 상업성이 있는 숙신산의 경우, 한국과학기술원 장호남, 이상엽 교수 연구팀이 Succinic acid를 고농도로 생산하는 혐기성 숙신산 미생물인 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Manheimia sp.*와 미국 에너지부가 개발한 *E. coli* 변이 균주 NZN111의 pta, ldhA double knockout 등의 대사특성 및 발효에 관한 succinic acid 생산 기초연구를 수행한 바 있다. 숙신산의 생산효율이 우수한 반추위 유래 세균인

Mannheimia succiniciproducens MBEL 55E를 분리하고 이의 전체 유전체 염기서열 분석을 완료하였으며, 이를 기초로 다양한 대사공학 기술을 활용하여 균주를 업그레이드 시키고 있다. 동 그룹의 숙신산 생산성이 3.5 g/L/h를 넘는 세계 최고수준이며, 비록 rich한 조건의 복합배지 조성이지만 이러한 조건에서 발효 생산성 3 g/l/hr 균주개발 뿐만 아니라 경제성 확보에 필수적인 정제공정의 획기적 개선을 위해서 tri-n-octylamine을 이용한 반응추출법을 개발하였는데, 동 연구에서는 추출용매가 비해리성 carboxylic acid만 추출한다는 점에 착안하여 발효액의 pH를 적절히 조절함으로써 부산물인 acetic acid · pyruvic acid 등으로부터 효율적으로 숙신산을 분리해 내었다. 발효액 속의 포도당은 낮은 pH와 온도에서 결정화를 수행함으로써 제거할 수 있었으며, 이렇게 하여 약 73% 수율과 99.8% 순도를 얻었으나 반응추출법의 경제성에 대해서는 추가적인 검토가 있어야 할 것으로 예측된다.

또한 전남대의 연구결과, C4 화합물인 fumarate로부터 succinic acid를 생산하는 *Enterococcus faecalis* RKY1 균주를 개량해 우수한 수율(97%)의 공정을 개발했으며, 비대칭적인 hollow-fiber bioreactor(HFBR)에 세포를 고정

화시킨 후 연속적으로 숙신산을 배양하는 공법을 통해 생산성을 17.1 g/l/hr로 약 15일간 운전한 바 있다. 동 연구그룹은 먼저 *Rhizopus* 계열의 곰팡이를 이용하여 1단계에서 fumaric acid를 생산한 후 이를 succinic acid 생산균주를 투입하여 2단계에서 succinic acid를 생산하는 형태의 새로운 공법을 개발한 바 있다. 또한, 저가 원료의 이용 가능성을 타진하기 위해 rice bran 등을 활용한 연구개발도 진행한 바 있다.

- 대사 합성 기술의 추진비전

국내 바이오매스기반의 산업 바이오 시장은 전통적인 발효산업인 아미노산·핵산 등의 식품첨가제 및 사료 첨가제 중심으로 형성되어 있으며, 실제 석유화학제품의 대체 화학 시장은 PLA 등 선진국의 제품을 일부 수입해서 가공하는 형태의 비교적 소규모이다. 따라서 기존의 화학회사나 바이오회사 모두 바이오매스기반의 화학제품 생산기술에 대한 투자에 소극적인 국내의 상황에서 민간분야의 적극적인 R&D 참여를 유도하기 위해서는, 정부의 적극적인 산업 바이오분야 육성정책과 더불어 효율적인 지원체제 구축을 위한 법적기반 구축되어야 한다.

즉, 환경친화적이고 미래 지속 가능한 화학산업의 발전을 위해 바이오매스기반의 화학제품 상업화를 지원하기 위

한 인증제, 정부우선 구매제도 등의 선진국과 같은 제도적 지원이 필요하다. 특히, 최근에는 전 세계적인 바이오매스 기반의 화학산업의 발전과 더불어 국내의 major 정유사와 화학회사들을 중심으로 생체분자 합성기술 및 관련 바이오리파이너리기술에 대한 이해와 수용의사 등의 관심이 매우 높아지고 있으며, 이들 회사의 정부과제 참여가 크게 증가하고 있는 상황에서 산업 바이오분야의 민간부문 R&D 투자를 더욱 활성화하기 위해서는 기술적 가능성을 선도적으로 타진할 수 있는 공공부문의 시스템 구축이 필수적이다. 바이오회사와 화학회사의 핵심 역량이 차별화된 상황에서 상호 기술적 이해의 차이에서 오는 바이오매스기반의 기술적 혁신에 대한 소극적 태도의 견지는 결국, 국가적으로 전 세계적인 mega-trend에 대한 준비에 대한 기회를 상실할 수 있기 때문이다.

따라서, 먼저 바이오기술과 화학기술이 융합된 바이오매스기반의 생체 분자 합성 기술 과 바이오리파이너리기술 과 같은 신산업 융합 분야의 민간부문 기술개발 리스크를 줄여주는 차원에서 정부와 공공부문이 우선적으로 핵심기반을 구축하고, 이를 통해 산업 바이오 도입 초기에 발생할 수 있는 기술적 문제점을 최소화하고 동시에 민간부문의 기업체의 적극적인 참여를 유도하는 공동 연구개발 시범사업 형태의 추진이 바람직하다고 판단된다.

8. 참고문헌

1. Elowitz, M.B. and S. Leibler, A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000. 403(6767): p. 335–8.
2. Gardner, T.S., C.R. Cantor, and J.J. Collins, Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000. 403(6767): p. 339–42.
3. Gibbs, W.W., Synthetic life. *Sci Am*, 2004. 290(5): p. 74–81.
4. Yokobayashi, Y., R. Weiss, and F.H. Arnold, Directed evolution of a genetic circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(26): p. 16587–91.
5. Bulter, T., et al., Design of artificial cell–cell communication using gene and metabolic networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(8): p. 2299–304.
6. Fung, E., et al., A synthetic gene–metabolic oscillator. *Nature*, 2005. 435(7038): p. 118–22.
7. Martin, V.J., et al., Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(7): p. 796–802.
8. Watanabe, K., et al., Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(17): p. 9774–8.
9. Jung, G.Y. and G. Stephanopoulos, A functional protein chip for pathway optimization and in vitro metabolic engineering. *Science*, 2004. 304(5669): p. 428–31.
10. Cello, J., A.V. Paul, and E. Wimmer, Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 2002. 297(5583): p. 1016–8.
11. Smith, H.O., et al., Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(26): p. 15440–5.
12. Anderson, J.C., C.A. Voigt, and A.P. Arkin, Environmental signal integration by a modular AND gate. *Mol Syst Biol*, 2007. 3: p. 133.
13. Lee, P.C., et al., Biosynthesis of ubiquinone compounds with conjugated prenyl side chains. *Appl Environ Microbiol*, 2008. 74(22): p. 6908–17.