

미생물 대사체에서 화학생물학 연구를 위한 새로운 방법

Introduction of New Tools for Chemical Biology Research on Microbial Metabolites

박소림, 임성일 | 전통식품연구단

So-Lim Park, Sung-il Lim | Traditional Food Research Group

최근 대량 고속 탐색법(high throughput screening, HTS)이 신약 개발을 위한 주요 기술로 자리 잡고 있다. 천연물보다 화학적으로 합성된 화합물을 HTS에 적용하는 것은 정제과정이라는 단점이 있기 때문이다. 하지만 그럼에도 불구하고 여전히 천연물은 신약의 개발의 주요한 원천으로 여겨지고 있다. 천연물의 단점을 극복하기 위해 미생물 대사체에 초점을 맞춘 RIKEN Natural Products Depository(NPDepo)를 구축 중이다. 여기에서는 1) 미생물 대사체의 생합성 유전자 클러스터의 대사공학과 2) 미생물 대사체의 fraction library, 3) 화합물 어레이(chemical array)를 사용한 새로운 스크리닝 시스템과 GLORIA를 이용하여 생산된 단백질 library의 개발에 대해 기술한다.

화학생물학은 유기화합적인 측면에서 복잡한 생물학적 시스템의 미스터리를 풀어나가는 것이 주요 목적이다. 이는 농화학의 개념과 일치한다: '화학에 기초하여 농업적 현상을 설명하는 것'. 그 중 하나가 벼 키다리병(비정상 벼의 이상신장)을 일으키는 곰팡이에서 분리된 지베렐린에 대한 연구로 이 연구는 이

후 식물 호르몬 연구의 발단이 되었다. 또 다른 예로 곰팡이 대사체와 kojic acid가 있다. 천연물 화학은 중요한 생물학적 현상을 다스리는 화학물질의 동정이 중요하다.

1980년대 미생물 대사체 분야는 학계 및 제약 산업 분야에 널리 퍼져 있었다. 많은 항암 화합물과 콜레스테롤 합성 저해제, 면역억제제가 미생물 대사체로부터 하나씩 발견되었다.

신약 스크리닝은 미생물 대사체를 사용하였으나 1990년대 서서히 감소하기 시작했다. 당시 제약 회사들이 HTS 방법을 사용하고 있었고 미생물 대사체로부터 화합물을 분리하는 것보다 합성화학을 통한 합성이 HTS에 더 적합하다는 생각을 가지고 있었다. 이는 천연물 화학에 걸림돌이 되어왔다. 그러나 인류의 생존을 위협하는 질병이 있을 때마다 그 치료제는 식물이나 미생물로부터 발견되어져 왔다. 하지만 최근 일어나고 있는 기후 변화에 지구 생물종이 변화하고 있고 현재 10만 종 이상의 동식물이 멸종 위기에 놓여 있어 종의 다양성을 확보하는 것이 인류의 생존이 걸린 문제로 대두되어지고 있다. 따라서 미생물 대사체

역시 신약 스크리닝 후보로 사용되어야 하며 이에 신약 발굴에 있어 미생물 대사체의 이용을 위한 새로운 방법을 제시한다.

천연물을 스크리닝 자원으로 사용하는데 있어 단점은 HTS에 사용되는 화합물의 공급이 어렵다는 것이다. 이러한 단점을 극복하기 위해 다음과 같은 세 가지 접근을 시도하였다.

대사 공학(Pathway Engineering)

미생물 산물의 생합성 연구에 있어 최근의 진보는 많은 종류의 유도체를 발생시킬 가능성이 있다는 것이다. 가끔 생산물을 만들기 위해 사용한 미생물이 느리게 자라거나 유전적으로 불안정할 경우가 있는데 이러한 경우는 전체 생합성 유전자 클러스터를 클론화 시키거나 다시 조작 할 필요가 있다. 게다가 다른 적당한 숙주에 유전자 클러스터를 발현시키는

것이 필요할 수도 있으며 이중발현은 새로운 유도체의 합성 같은 흥미로운 가능성을 제시하기도 한다. Phoslactomycins(PLMs)의 actinomycetes 유전자 클러스터와 tautomycin, RK-682, fumitremorgins의 곰팡이 유전자 클러스터를 클론화 하였다.

PLMs는 serine/threonine phosphatases에 대한 선택적 저해 활성이 있다. 비록 PLMs는 항종양과 항바이러스 활성이 있다 하더라도 다양한 유사체가 존재하고 발효 과정에서 낮은 역가를 가지고 있어 일부의 천연물 개발이 제한되어졌다. 이러한 단점을 회피하기 위해 *Streptomyces* sp. HK-803의 PLM 생합성 유전자 클러스터 전체 75-kb를 클론화하여 염기서열 분석을 하였다(fig. 1). PLM polyketide synthase의 loading domain과 7개의 extension modules가 비선형의 형태이며 cyclohexanecarboxylic acid(CHC) primer로 부터 E, Z-이중결합을 포함한 불포화된 polyketide chain 형태를 가지고 있다. plmS2에 의해 PLM-B의 CHC에서 유래된 side-chain의 수산화와

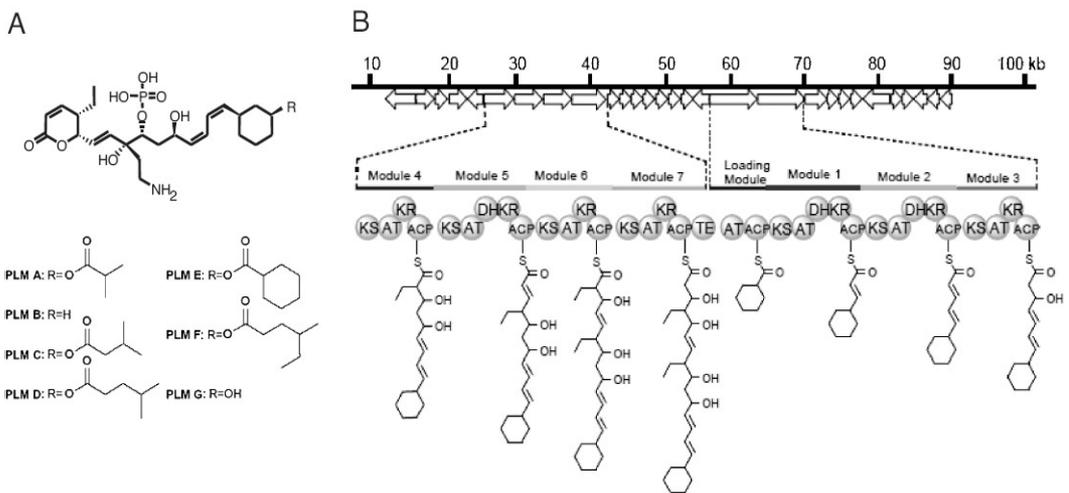


Fig. 1. Derivatives of phoslactomycins (A) and the gene cluster of phoslactomycins (B)

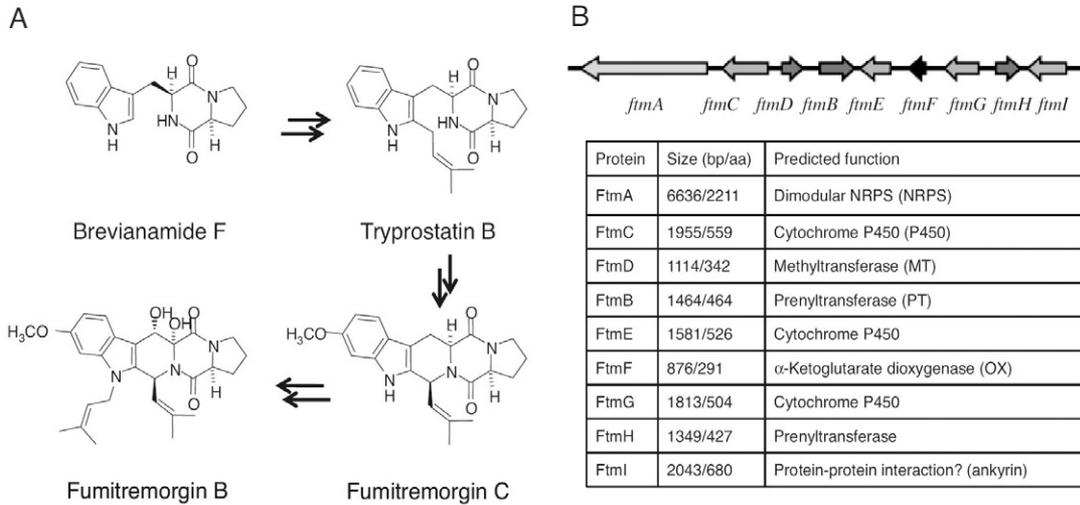


Fig. 2. Derivatives of fumitremorgins (A) and the gene cluster of fumitremorgins (B)

에스테르화는 PLM 유사체를 남겼다. plm2 결실 돌연변이는 야생균주보다 6배나 높은 역가를 가진 PLM-B를 선택적으로 생산하였다. 이 돌연변이와 생합성 유전자 클러스터는 공학적으로 조작된 미생물을 이용하여 개선된 하이브리드 PLMs의 생산을 용이하게 하였다. 게다가 원균주(original strain)의 배양액으로부터 새로운 유도체 deaminohydroxyl PLM-B를 분리하였다. 이 유도체는 PP2A 활성을 저해하고 급성골수성 백혈병 세포(HL-60)가 과립구(granulocytes)와 단핵백혈구(monocytes)로 분화하는 것을 유도한다. 이외는 달리 PP2A의 저해제로 알려져 있는 okadaic acid는 HL-60 세포의 분화를 유도하지 못했다.

Fumitremorgin C, *Aspergillus fumigatus*에 의해 생성되는 diketopiperazine mycotoxin은 BCRP(breast cancer resistance protein)의 특이 저해제이다.

*Aspergillus fumigatus*의 fumitremorgin의 유전자 클러스터를 클론화 하였고 fumitremorgin family의 여러 유도체를 분리하였다(fig. 2). *ftm* 유전자 클러스터와 dimodular type nonribosomal peptide synthetase 유전자(*ftmA*), 2개의 prenyltransferase 유전자(*ftmB*, *ftmH*), 3개의 P450 유전자(*ftmC*, *ftmE*, *ftmG*), methyltransferase 유전자(*ftmD*)를 포함한 27-kb DNA 조각을 클론화 하였다. Fumitremorgin 유도체와 BCRP에 대한 저해 활성의 구조학적 활성 관계는 fumitremorgin C의 고리화로 밝혀졌다. 여러 fumitremorgin 유도체의 축적을 위해 타겟 유전자 불활성화와 *ftm* 유전자의 이중 과발현을 행하였다. Fumitremorgin 생합성 유전자 클러스터 대 사공학은 diketopiperazine의 많은 유도체의 생성과 그것들의 생물학 활성도 측정을 가능하게 해주었다.

Fraction Library

미생물 배양액의 부분 정제된 샘플을 모은 것을 fraction library라 하는데 이는 HPLC로부터 얻어진 분획 모두를 말한다(fig. 3). 각 분획은 부분 정제되어 지고 서로 다른 화합물들이 공존하기도 한다(순도 50% 이상). 모든 분획들은 HPLC-mass spectrometer와 photodiode array system으로 분석하였고 계획적인 정제에 따라 발효 배양액으로부터 동일한 많은 양의 샘플을 얻을 수 있었다. 정제 전 타겟 화합물의 생물학적 활성을 숨기는 화합물을 발견하였으나 fraction library를 이용하여 천연물 스크리닝에서 부

딛히는 난관을 극복하였다. 이제는 물리화학적인 특성(체류시간, UV, 분자량)과 생물학적 특성을 갖춘 fraction library의 데이터베이스를 구축하고 있다. Fraction library는 conventional bioassay와 최근 개발된 화합물 어레이를 이용한 신약 후보 물질 스크리닝에 이용되어진다(fig 4).

화합물 어레이(Chemical Array)

화합물 어레이 기술은 미생물 생산물을 신약 스크리닝에 사용하기 위한 새로운 플랫폼이다. 화합물 어

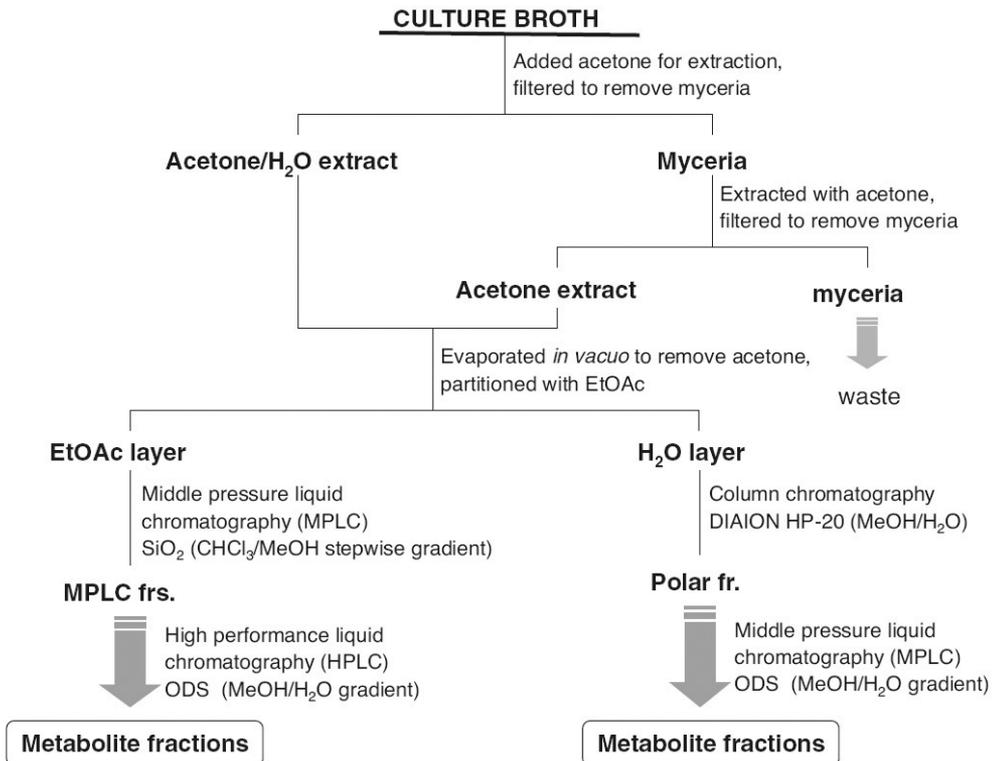


Fig. 3. Construction of a microbial metabolite fraction library

레이의 기본은 DNA 어레이에서 유래한 것이다. 만약 몇 천개의 화합물이 슬라이드 글라스 위에서 어레이 되고 작은 분자량의 단백질이 반응하는 것을 탐지하기 위해 사용된다면 화합물 어레이는 신약 스크리닝의 혁명적인 방법을 제공할 것이다.

화합물 어레이가 시작 될 때 하버드 대학의 연구자들은 이와 유사한 연구를 시작했었다. 그들은 페놀 같은 acidic 화합물을 잡기 위해 기능화 된 diazobenzilidene 슬라이드 글라스를 사용했다. 그러나 기능적 그룹에 의존하지 않고 슬라이드 글라스 위에서 어떠한 타입의 저분자 물질이라도 잡아내는 새로운 방법이 필요했다. 저분자 물질이 슬라이드 글라스에 붙어서도 저분자 물질의 일부는 스페이서에 연결하는 데에는 사용할 수 있어야 하는 것이다. 만약 접착 단백질이 연결에 사용하는 부분을 인

지한다면 슬라이드 글라스 위의 저분자 물질에는 결합하지 못할 수도 있다. 왜냐하면 저분자 물질과 알려지지 않은 단백질 간 결합 부위를 예측하는 것이 어렵고 이는 화합물 어레이를 이용하여 새로운 목적 단백질을 위한 저분자 물질을 발굴하는 시도에서는 특히나 단점으로 작용한다.

이러한 단점을 극복하기 위해 비선택적 universal coupling method를 개발하였다. 프로토콜은 fig. 5에 설명되어져 있으며 저분자 물질 용액이 먼저 슬라이드 글라스에 인쇄되어지고 photoreactive linker로 코팅한다. 그런 뒤 건조하여 인쇄과정에서 생긴 용매를 제거한다. 고정화는 기능성 그룹과 관계없이 일어난다. 이 방법 사용 시 고정화된 저분자 물질 중 몇몇은 접착 가능한 단백질과의 친화성이 유지되기도 하며 슬라이드를 형광 라벨 단백질과 같이 반응시킬

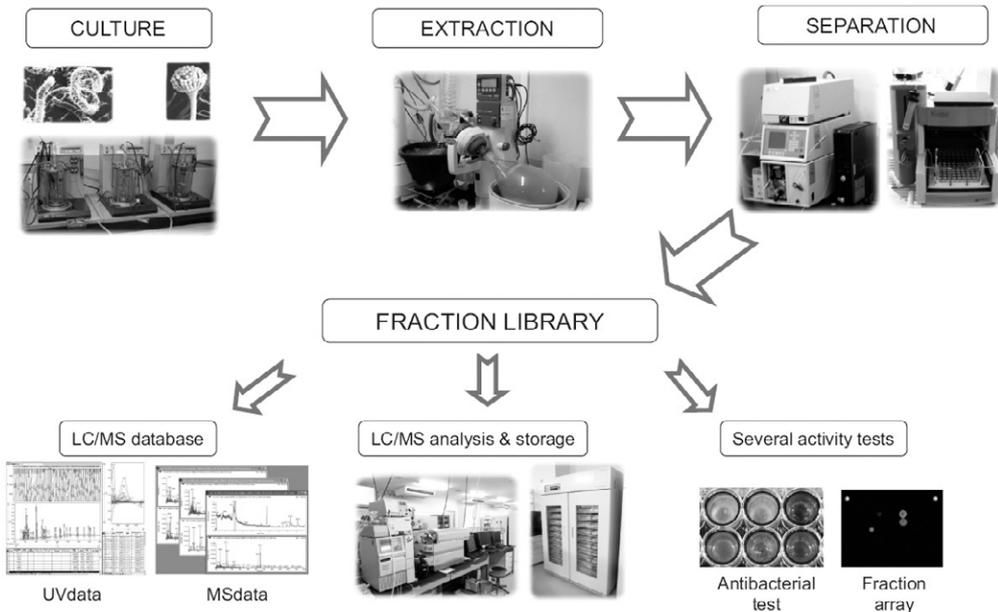


Fig. 4. Construction of fraction libraries. The fraction library are used for chemical arrays and biological screens.

경우에도 단백질과 저분자 물질 간의 반응을 탐색할 수 있다.

화합물과 인간 유래 단백질의 많은 조합을 가리는 것은 Bradner 등이 cell lysates를 이용한 스크리닝 방법을 설립하였으며 이는 그 방법을 독특하고 계획적인 리간드 스크리닝 전략으로 변형하고 발전시킨 것이다. 화합물 어레이의 구성 플랫폼은 화합물을 보유하고 있는 Natural Product Depository(NPDepo), 화합물 어레이 분석을 위한 RIKEN의 Osada Laboratory의 Gene Library의 protein library로 구성된다(GLORIA). 화합물 어레이 시스템의 GLORIA를 사용해 100개 유전자를 클론화 하였으며 이를 붉은색 형광단백질(RFP)과 융합 발현시켰으며 RFP의 단독 발현도 진행하였다. 이를 HEK293T 세포에 감염시켜 세포 파쇄액을 준비하였다. HTS에 사용하기 위해 정제된 단백질 대신 1) 쉽게 준비할 수 있는 세포 파쇄액을 준비하였고, 2) 목적 단백질은 자연적인 접힘과 변형이 일어났을 것이다.

어레이에서 false positive signal을 제거하기 위해 merged display analysis를 행한다. 먼저 세포 파쇄액과 배양한 슬라이드 글라스에서 RFP가 결합된 목적 단백질과 단독 발현된 RFP가 각각 빨강과 초록색으로 컴퓨터상에 표시된다. 그런 다음 color figure가 맵상에서 하나로 합병된다. False positive signal은 노란색으로 표시되며 이는 RFP와 리간드의 결합에 의한 것이거나 리간드의 자동형광 시그널에 의한 것이다. 이는 false positive signal이 아니라 real-hit 화합물을 찾는데 목적을 둔 방법이기 때문이다(fig. 6).

GLORIA에 제안된 단백질들은 transferase 활성, hydrolase 활성, lyase 활성을 가지며 비효소적 단백질도 포함된다. 예를 들면 임상 치료의 타겟(aurora kinase B, MEK1)을 포함한 protein kinase를 포함한 transferase가 있다. 많은 단백질들이 full length로 발현되더라도 그 중 어떤 것들은 막단백질처럼 잘려지도록 디자인 된 것도 있다. HEK293T 세포 사용은 많은 강점이 있다. GLORIA에 등록된 단백질에는 많은

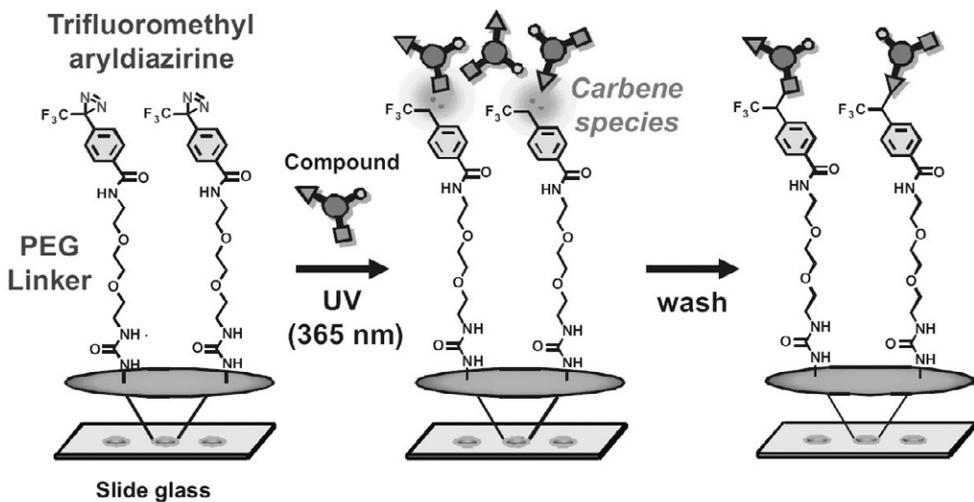


Fig. 5. Preparation of the chemical arrays

번역 후 수식이 존재하지만 이러한 변형은 *E. coli*에서 단백질 발현 시에는 일어나지 않는다. 번역 후 수식은 단백질의 구성과 기능에 있어 매우 중요하다. 이러한 특성 때문에 GLORIA의 단백질은 화합물 어레이 방법에 있어 유용하다. GLORIA의 가장 성공적인 예로 carbonic anhydrase II(CAII)와 진핵과 원핵생물에서 유래된 ubiquitous zinc 단백질을 들 수 있다. 이는 CO₂의 수화를 통한 녹내장 발병 같은 물리학적 과정을 조절한다. Acetazolamide는 녹내장과 발작의 치료약품으로 사용되는 CAII 저해제이다. 그러나 우울증과 의식 저하 같은 부작용 때문에 새로운 CAII 저해제의 탐색이 필요하다.

CAII를 위한 새로운 리간드를 얻기 위해 NPDepo로부터 10,000개에 가까운 화합물을 5개의 슬라이드 글라스 위에 점을 찍었으며 RFP 융합 CAII를 발현시

킨 HEK293T 세포 파쇄액을 준비하였다. Merged display analysis 합병 후에 2개의 성공적인 화합물을 확인하였다. CAII에 대한 1과 2번의 특이성을 시험하기 위해 GLORIA로부터 33 protein과 RFP의 융합 발현과 CAII와 RFP의 융합 단백질을 HEK293T 세포에서 발현시켜 세포 파쇄액을 준비하였다. RFP 융합 CAII가 발현된 세포 파쇄액만이 1과 2와 반응하여 1, 2가 CAII의 선택적인 저해제임을 제시하였다. CAII에 대한 1과 2의 부착 친화력을 평가하기 위해 isothermal calorimetry(ITC) 분석을 행하였다. CAII에 대한 1의 Kd값은 115 nM, 2의 Kd값은 324 nM이었으며 둘 다 acetazolamide에 대해 강력한 저해 활성을 보였다 (table 1). Phenyl 고리의 meta-위치의 sulfonamide의 치환은 para-위치에 sulfonamide가 있는 효과가 큰 화합물과 비교해서 CAII에 대한 효능의 저하를 가져왔

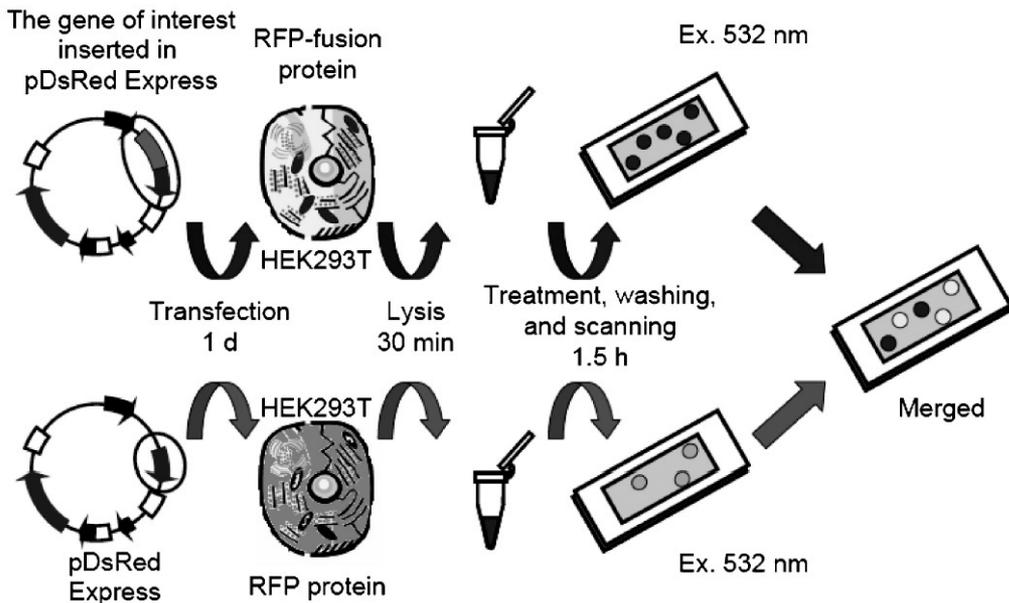


Fig. 6. Screen using the chemical array and protein library

다. 이러한 관찰에 의해 몇몇 유도체들이 합성되었고 새로운 유도체, 4는 가장 큰 CAII 저해 활성을 보여준다. 이 스크리닝 방법은 gene library(GLORIA)와 chemical library(NPDepo)와 함께 대용량 화합물 어레이 스크리닝을 가능케 한다. 인간유래 단백질에 대해 유용한 리간드를 동정하기 위해 GLORIA의 유전자 수와 NPDepo의 화합물 수를 늘렸으며 이러한 스크리닝에 사용할 유전자와 화합물의 확보는 현대적인 화학 생물학 연구와 신약 발굴 연구를 위해 화합물 어레이를 사용하는데 있어 유용한 도구로서 사용 되는데 해결되어야 할 애로사항 중 하나이다.

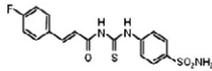
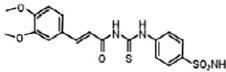
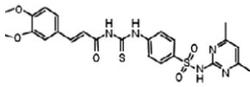
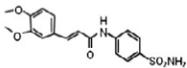
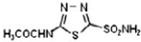
Future Prospects

많은 수의 bioprobe를 개발하는데 성공했고 최

근 계놈학의 진보는 유전자와 단백질의 구조와 기능에 대한 이해가 가능하게 했으나 세포에서의 단백질 간의 상호작용 같은 풀리지 않는 문제점들은 여전히 남아있다.

이 불분명한 메커니즘을 밝히기 위해 단백질 간 상호작용의 새로운 저해제 개발을 시도하고 있다. 화합물 어레이의 기본은 비효소 단백질을 위한 리간드의 스크리닝에 적합하다. 각 효소에 적합한 활성에 기초한 저해제를 확인하는 편리한 방법들은 많이 있지만 단백질 간 상호작용의 저해제를 찾는 효과적인 방법은 극소수이다. 이 경우 화합물 어레이가 대량 고속 방식에서 타겟 단백질의 direct binder를 탐색하는 것을 가능하게 한다. 풀리지 않는 생물학적 현상을 조사하기 위한 새로운 bioprobe의 개발은 우선적으로 수행되어야 하며 미생물이 이차 대사산물이라 불리는 다양하고 유용한 화합물을 생산하는

Table 1. CAII inhibitors

Name	Structure	Kd(nM)	IC ₅₀ (nM)
1		115	24
2		324	50
3		NT	5400 ± 67
4		66	6.8
Acetazolamide		NT	34

Compound 4 was newly synthesized, based on structure-activity relationship research. Kd values were determined by measurement with an isothermal calorimeter. IC₅₀ values were determined by enzymatic reaction.

이유를 밝혀야 한다. 최근 게놈 연구의 진보는 아직까지 풀리지 않는 미스터리에 도전할 수 있는 가능성을 제시한다. 이제는 많은 사람들이 이차 대사산물의 생산을 위한 생합성 유전자 클러스터를 쉽게 클론화 할 수 있으며 생산 공정의 조절 메커니즘을 분석 할 수 있다. 좀 더 미래에는 자고 있는 유전자 클러스터를 깨우기 위해 시스템을 발전시키는 것이며 잠재적인 신약 발견과 건강기능식품 소재 개발을 위한 새로운 bioprobe를 생산하는 것이다.

● 자료출처 ●

Osada H, Introduction of New Tools for Chemical Biology Research on Microbial Metabolites, biosci biotechnol biochem, 74(6), 1135-1140, 2010

박 소 림 공학석사

소 속 : 한국식품연구원 전통식품연구단

전문분야 : 미생물 발효 및 생리활성 평가

E-mail : slpark@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9349

본 내용은 자료출처의 원문을 번역 기술한 것입니다.