

Micro Column 2

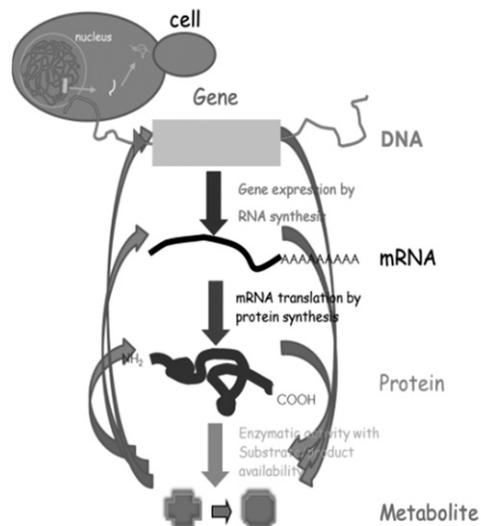
질량분석시스템을 이용한 미생물 대사체학

이도엽
국민대학교 발효융합학과 교수

1. Metabolomics의 개요

Post-genome 시대의 도래와 더불어 유전체, 단백질체 기술 등이 비약적으로 발전하였으나, 최근 생체 기능의 조절과 관련하여 최종 대사산물로서 직접적으로 역할을 수행하고 있는 대사체(metabolite) 연구의 중요성이 부각되었다. 이에 따라 대사체를 중심으로 신진대사활동을 총체적으로 이해하는 새로운 -omics 연구 분야인 metabolomics가 post genomic era를 선도할 수 있는 분야로 새롭게 주목을 받고 있다. 일반적으로 대사체는 생물 세포, 조직, 장기의 모든 대사 과정 중 생성되고 소모되는 산물의 총칭이다. 이중 일차 대사체는 직접적으로 정상적인 성장, 분화 및 번식을 포함하고, 이차 대사체는 위와 같은 과정을 포함하지 않지만 생태 기능에 중요한 역할을 하는 화합물을 일컫는다. 일반적으로 생체의 phenotype을 가장 잘 나타내고 정량화 할 수 있는 작은 생체 분자로서 완전한 대사체의 프로파일은 그 자체로서, 또는 유전자의 발현(gene expression)과 연관된 data와 조합하여 생체에서 진행되고 있는 여러가지 생리학적 기전에 관한 정보를 제공한다. 또한 대사체학은 유전자 표현형과 발현량, 단백질체의 분석만으로 해석할 수 없는 세포 내 변화 등의 상관관계를 대사 네트워크수준의 전체적 고찰을 통하여 획득된 결과를 바탕으로 최종생성물과 그로 인한 분자수준에서의 표현형을 결정지을 수 있는 유일한 연구 분야이며, 이러한 특이적 장점으로 말미암아 다양한 분야에서 본 대사체(당, 핵산, 아미노산, 지질 대사체 및 2차 대사산물) 기술에 대한 관심 및 요구도가 급격히 증가하고 있다. 이와 더불어 유전자 표현형 및 전사체와 효소의 발현량, 단백질의 post translational modification, 그리고 allosteric activation과 inhibition등의 metabolic network level에서 이루어지는

복잡다단한 cellular process의 포괄적 이해를 통해 최종 생성물을 비롯하여 그와 연관을 갖는 다양한 조절인자 대사체를 동시 다발적으로 모니터링 함으로써 대사과정을 system 관점에서 관찰하고 해결책을 제시할 수 있는 가능성을 제공한다. 이러한 초정밀분석기술인 대사체 프로파일링 연구는 검출의 정확성과 검출 분자의 종류와 범위에 따라서, metabolites를 특정 타깃을 선정하지 않고 총체적으로 분석하는 metabolite profiling과 특정 metabolites를 분석하는 targeted analysis으로 나눌 수 있다. 이와 같은 분석을 위해 미량 분석기기인 기체크로마토그래피/질량분석기, 액체크로마토그래피/질량분석기, 또는 미세전기영동기/질량분석기 등의 최첨단 분석기기들이 필수적이며, 분석된 자료를 정리하기 위한 고급 통계프로그램도 필요하다.



[그림 1] 대사체와 다른 분자 구성 성분과의 다양한 상관관계를 통해 궁극적인 cellular phenotype을 형성하게 된다.

2. 미생물 분야에서의 대사체학 적용

생의학 및 식물대사체 분석 관련분야에서는 연구가 활성화 되어 있으나 미생물 대사체 연구는 아직 초기연구단계 상태이다. 미생물 대사체 연구의 국가별 연구동향을 살펴보면 미국과 영국 등 유럽 국가들을 중심으로 연구가 활발히 이루어지고 있으며 우리나라와 일본 등 아시아 국가들도 미생물 대사체 분야에 많은 투자를 기울이고 있다. 우리나라는 건국대와 고려대를 중심으로 활발한 연구가 진행되고 있으나 상대적으로 적은 수의 연구팀에서 진행 중이다. 다양한 미생물 대사체학의 응용 중 다음과 같은 세 가지로 정리해보기로 한다.

2-1 대사공학 및 발효공정과 연계된 목적생산물의 향상을 위한 대사체학 접근

Ying-jin Yuan 연구 group은 단백질체와 연계된 대사체 분석기법을 이용하여 vitamin C의 전구체인, 2-ketogulonic acid(2-KGA) 산업적 생산에 사용되는, *Ketogulonigenium vulgare*와 *Bacillus megaterium*간의 artificial microbial community의 상호작용에 의한 2-KGA의 생산성 향상과 대사적 기전을 밝혔다(Zou, Hu *et al.*, 2012). 이뿐만 아니라, 재사용 가능한 바이오 매스의 중요성이 인식됨에 따라, biofuel로서 높은 가치를 인정받고 있는 n-butanol의 생산성 증가를 위해 *Saccharomyces cerevisiae*의 n-butanol에 관련 대사체와, 환원대사 과정에 관련된 대사체를 프로파일링함으로써 n-butanol의 생합성 과정의 문제 반응기작을 밝히고 이를 유전자 조작 및 대사공학 기법을 적용하여 n-butanol 생산성 향상에 기여가 보고 되었으며, 바이오매스의 lignocellulose의 전처리 과정 중 발생하는 아세트산과 포름산등의 약산에 내성을 갖춘 균주 개발을 위하여 non-targeted 대사체 프로파일링을 수행하였으며, 이를 통해 비산화 5탄당 인산경로(non-oxidative pentose phosphate pathway)의 특이적 비활성을 관찰, 이와 연계된 타겟 유전자를 설정하고, metabolic engineering을 통해 약산 내성을 보유한 균주를 개발되었다(Hasunuma, Sanda *et al.*, 2011). 또한 동

물사료 주원료 아미노산인 라이신의 미생물 공학적 생산 증대를 위하여, transcriptome과 metabolome의 연계분석 방식을 적용하여 *Corynebacterium glutamicum*의 라이신 생산과 관련된 대사기작과 조절기작을 밝히고 대사과정 중, 아미노산의 dynamic pattern의 분석을 통해, 트레오닌 exporter의 deletion과 라이신 exporter의 over-expression의 병행작업에 의해 획기적인 생산성 향상을 초래함, 또한 환원효소로서 NADPH의 선호성을 밝힘으로써 추후 대사공학의 방향을 제시한 연구결과들이 발표되었다(Krömer, Sorgenfrei *et al.*, 2004).

2-2 미생물의 계통학적 분리와 screening을 위한 대사체 연구

형태학에 의존했던 주관적인 미생물 분류법은 최근 분자생물학적, 또는 화학계통학적 방법과 같은 객관적인 시스템적 방법으로 점점 바뀌고 있으며, 또한 적은 비용으로 기존의 PCR, 염기서열분석과 같은 방법에 비해 높은 재현성을 구현할 수 있는 기술로 주목을 받고 있다. 예로서, 대사체 프로파일링을 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 metabolic footprinting으로 계통학적 분리 및 돌연변이의 고속 탐색과 세포밖 시료(exogenous metabolites)를 이용한 footprinting 접근방식을 통해 세포내 산물(endogenous metabolites)을 이용한 fingerprinting에 보완적이고 풍부한 생물대사학적 정보를 제공하고 표현형이 존재하지 않는 silent mutant의 유전학적 기능 규명한 논문이 발표되었다(Allen, Davey *et al.*, 2003). 또한 HPLC 분석상의 retention time과 UV 다양하고 독특한 스펙트럼의 조합을 통한 이미지 분석과 클러스터 분석을 이용해 *Penicillium* 종들간의 분류를 추정하였다(Smedsgaard and Nielsen 2005). 또한 Fungal 대사산물과 mycotoxin의 스크리닝을 위하여 LC-UV, 그리고 LC-TOF ms으로 연계된 분석 시스템을 확립하고 450여 개의 화합물로 구성된 데이터베이스를 구축함으로써, 대사산물의 생산과 생물 다양성에 관한 고속탐색 접근 방법의 하나로 화학적 계통 분류를 이용한 연구가 발표되었다(Nielsen

and Smedsgaard 2003). 항생제내성 및 유용한 생리활성물질을 생산하는 산업적 유용 fungus속인 *Penicillium*과 *Aspergillus*의 direct infusion 질량분석 기법을 이용한 대사체 프로파일링을 통해 primary metabolism과 secondary metabolism에 속한 특정 대사산물의 특성을 연계하고 새로운 물질 발굴을 위한 대용량 초고속 화학적/대사적 계통분리 시스템을 확립하였다(Larsen, Smedsgaard *et al.*, 2005).

2-3 미생물 대사체 유동 분석 (flux analysis)과 연계된 대사체 연구

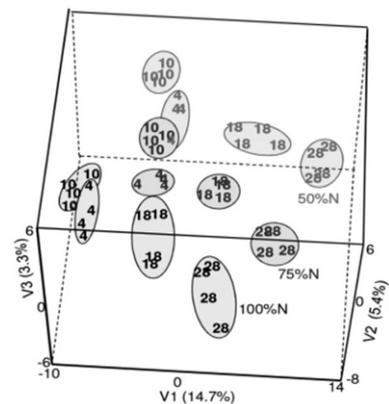
미생물 flux analysis의 세계적인 선도 연구그룹인 Princeton 대학의 Rabinowitz 교수 연구팀은 세포내 대사 flux의 정량분석을 위한 Kinetic fluxprofiling 기법과 대사체 유동성 변화의 효과적 snapshot을 위한 primary metabolite profiling 방법을 연계하여, 다양하고 심도 깊은 일차 대사과정의 이론적 재정립의 토대를 마련. 예를 들어, 효모에서의 인산화 독립적 기작을 통한 고감도 allostery에 의한 효모 pyruvate kinase 조절기작을 밝혔으며(Xu, Zhao *et al.*, 2012), 또한 생존 산화 스트레스 반응 및 non-respiratory 미토콘드리아의 기능 상관 관계를 효모 생존 전략의 연계(Xu, Amador-Noguez *et al.*, 2012). 이에 앞서 Uwe Sauer 그룹은 기체크로마토그래피-질량분석기(GC-MS)를 이용하여 대장균 변이주의 대사체 유동(metabolic flux) 분석을 실시하여 대사경로의 변화추이를 분석하였다(Fischer and Sauer, 2003). 연구에 주요한 핵심대사경로는 Entner-Doudoroff pathway; flux analysis; fluxome; metafor analysis; pentose phosphate pathway로 Uwe Sauer 그룹에서 대장균 변이균주를 이용, 미생물이 다양한 환경에 적응·성장하면서 생산하는 세포의 대사물질들의 빠른 진단을 위해 이들 관련 대사경로의 flux 변화에 초점을 맞춘 연구이다. 또한 동 연구진은 ¹³C-flux analysis와 metabolomics를 연동 분석 방법을 통해 총 6개의 이종 미생물을 검토 비교함으로써 일반적 정설로 알려진 5탄당 인산경로(pentose phosphate pathway)의 탈수소효소(dehydrogenase)의 비특이적 환원 조효

소 의존성을 규명하는 연구를 수행 발표하였다(Fuhrer and Sauer, 2009).

3. 대사체학의 연구 방향

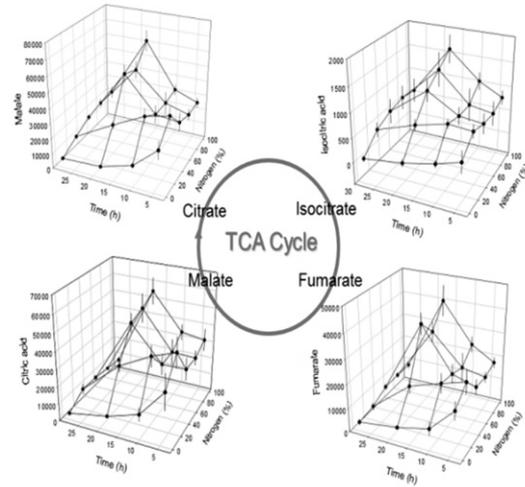
초고속 정밀 질량 분석 측정법의 결과로 생산되는 대량의 데이터는 Bioinformatics라는 새로운 분야의 수요를 필요로 하게 되었고, 이에 대한 투자와 지속적인 연구, 전문인력 양성이 metabolomics 분야의 성패를 가늠할 수 있는 중요한 요소가 되었다. 다음은 질량 분석 시스템으로부터 획득된 결과를 처리하고 분자수준(metabolite)의 정보를 생화학적, 생리학 수준에서 해석하고 연계시킬 수 있는 대표적 통계학과 생물정보학적 방법에 대해 예를 들어보도록 하겠다.

질량 분석시스템을 통해 생성된 방대한 양의 데이터 결과는 데이터의 구조나 목적에 따라 metabolic phenotype의 총괄적 이해를 위해 principal component analysis(PCA), Partial Least Squares Regression(PLS) 등의 다변량통계분석을 통해 분석된다. 이는 다양한 오믹스분야에서 사용되는 통계기법으로서 관찰대상 변수의 개수를 줄여줌으로써 전체 데이터의 패턴을 적은 수의 새로운 변수로 나타내는 과정을 포함하고 있다. 궁극적으로 이러한 통계분석 기법은 복잡한 대사물질이 나타내는 패턴을 간소화하여 관찰집단의 동질성 확인 및 이질관찰집단간의 구분 그리고특정집단의 표



[그림 2] 다변량 분석중, Partial least squared regression 분석 기법을 통한 *C. reinhardtii*의 metabolomics phenotype 분석함(Lee, Park *et al.* 2012).

지신호를 찾아내는 것을 궁극적인 목적으로 한다. 이와 유사한 특징을 가지고 있는 clustering analysis는 관찰집단간의 상호 연관성을 수학적 모델을 통해 제시한다는 점에서는 다변량 통계분석법과 유사하나, 이와 더불어 변수(metabolite)들 간의 발현량 변화를 통해 상관관계를 제시함으로써, 단일분자 수준에서의 결과해석을 metabolic reaction, metabolic pathway 또는 이를 통해 표현되지 않고 잠재되어 있는 metabolic regulation 기전규명으로 확장시킬 수 있는 특징을 가지고 있다. 또한 gene의 알려진 기능과 homology search를 통한 미지 유전자의 기능에 기반한 metabolism의 해석수준을 넘어 실제적으로 대사과정을 통해 최종 생산되는 metabolite을 통한 직접적인 분석을 통한 연구가 필요로 되고 있으며, 이는 실제 측정되는 metabolite의 상관관계를 통한 대사기전의 해석 기법으로 방향을 잡고 있다. 이러한 노력의 일환으로 측정된 chemical structure의 유사성과 metabolic reaction의 기질과 생산물과의 상호관계 연계를 통해 새로운 개념의 metabolic structure를 재구성 하는 시도가 이루어 졌으며, 이는 multiple factor에 의한 다수의 변



[그림 3] 외부영양인자, 배양시간, 대사체 유동성의 3가지 요소를 3D-Clustering analysis를 이용하여 분석함으로써, TCA cycle intermediate의 dynamics co-regulation의 패턴을 분석함.

수(metabolite)가 각각 관찰대상 그룹의 대사과정에 미친 영향을 system 수준에서 정밀하고 포괄적인 관측과 해석을 가능하게 하는 기법을 마련하였다.

▶ 참고문헌

- Allen, J., et al. (2003). "High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting." *Nature biotechnology*21(6): 692-696.
- Fischer, E. and U. Sauer (2003). "Metabolic flux profiling of Escherichia coli mutants in central carbon metabolism using GC-MS." *European Journal of Biochemistry*270(5): 880-891.
- Fuhrer, T. and U. Sauer (2009). "Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism." *Journal of bacteriology*191(7): 2112-2121.
- Hasunuma, T., et al. (2011). "Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of Saccharomyces cerevisiae." *Microbial cell factories*10(2).
- Knømer, J. O., et al. (2004). "In-depth profiling of lysine-producing Corynebacterium glutamicum by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome." *Journal of bacteriology*186(6): 1769-1784.
- Larsen, T. O., et al. (2005). "Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery." *Natural product reports*22(6): 672-695.
- Lee, D., et al. (2012). "System response of metabolic networks in Chlamydomonas reinhardtii to total available ammonium." *Molecular & cellular proteomics: MCP*.
- Nielsen, K. F. and J. Smedsgaard (2003). "Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology." *Journal of Chromatography A*1002(1): 111-136.
- Smedsgaard, J. and J. Nielsen (2005). "Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics." *Journal of Experimental Botany*56(410): 273-286.
- Xu, Y.-F., et al. (2012). "Ultrasensitive regulation of anapleurosis via allosteric activation of PEP carboxylase." *Nature chemical biology*.
- Xu, Y.-F., et al. (2012). "Regulation of yeast pyruvate kinase by ultrasensitive allostery independent of phosphorylation." *Molecular Cell*.
- Zou, Y., et al. (2012). "Enhancement of 2-keto-gulonol acid yield by serial subcultivation of co-cultures of Bacillus cereus and Ketogulonigenium vulgare." *Bioresource technology*.