박테리아 유전체 재구성에 대한 연구 동향

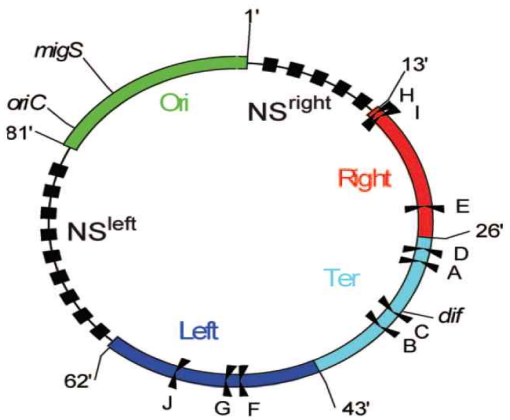
연세대학교 김지현 교수

1. 개요

J. Craig venter박사는 자가 복제(self-replication)가 가능한 인공합성 세포 개발을 목표로 2003년 작은 바이러스를 합성하였고, 2010년에는 작은 박테리아 염색체를 합성하는데 성공하였다. 인공합성 유전체를 개발하는 것이 중요한 만큼 실제로 존재하는 박테리아 유전체를 재구성하여 원하는 생산물을 만드는 연구 또한 합성생물학 발전에 중요한 연구 방향이라 할 수 있다.

박테리아 염색체 구조는 Ori domain과 Ter domain의 크게 두 가지로 구성된다<그림 1>. 염색체의 복제개시에 관여되는 Ori domain은 일반적으로 *oriC* 뿐만 아니라 이에 특이적으로 결합할 수 있는 *dnaA* 단백질과 함께 복제에 관여되는 유전자를 포함한다. 많은 박테리아에서 보존되어 있는 복제 시스템은 *oriC*에서 시작되어 복제 방향이라 불리는 좌우 replichore를 따라 진행되며, *ter*/*tus* 유전자로 구성된 Ter domain에서 replication fork가 만나 종결된다 (Emilie, 2007).

수많은 유전자로 구성된 박테리아 유전체 정보와 합성생물학 도구들을 바탕으로 유전체 재구성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구동향에서는 세포의 복제와 세포분열에 관여하는 유전체 재구성 연구를 바탕으로 cell viability 및 세포생장 양상 변화에 대한 연구 결과 및 동향에 대하여 소개하고자 한다.

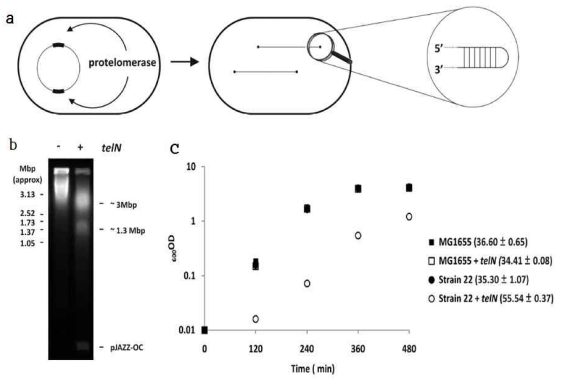


<그림 1> Macrodomain organization of the *E. coli* chromosome (Esnault, 2007)

2. Bacteriophage의 *telN/tos* system을 이용한 유전체 재구성

2013년도 ACS Synthetic Biology 논문에서는 *E. coli*의 single circular 유전체를 재구성하기 위하여 <그림 2a>와 같이 염색체가 2개 이상인 세균으로 알려진 *Vibrio* spp.의 DNA 복제 개시 유전자와 bacteriophage N1의 *tos* site를 유전체 내 intergenic 부분에 도입하고 protelomerase 유전자인 *telN*을 발현시켜 세포 내에서 2 개의 linear 유전체를 생산할 수 있는 strain 22를 재조합하였다.

<그림 2> 표에 나타낸 바와 같이 *E. coli* 유전체 내 *tos*가 도입된 위치에 따라 세포의 viability에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. *E. coli*의 single circular 유전체를 multiple 유전체로 생산 가능한 기술을 바탕으로 하나의 세포 내에서 *Vibrio* spp.와 같은 복제 시스템을 유도한 연구 결과이다.



Strain number	Strain's relevant genotype	Strain viability		Anticipated chromosome sizes (Mbp)*
		without *telN*	with *telN*	
1	OriC(wt), *tos1*	Yes	Yes	4.64
2	OriC, OriC3, *tos1*, *tos3*	Yes	No	2.58 + 2.06
3	ΔOriC(wt), OriC3, *tos1*, *tos3*	Yes	N/A	N/A
4	OriC(wt), OriC3, *tos1*, *tos4*	Yes	No	1.29 + 3.35
5	ΔOriC(wt), OriC3, *tos1*, *tos4*	Yes	N/A	N/A
6	OriC(wt), OriC1, *tos1*, *tos3*	Yes	No	2.58 + 2.06
7	ΔOriC(wt), OriC1, *tos1*, *tos3*	Yes	N/A	N/A
8	OriC(wt), OriC1, *tos1*, *tos4*	Yes	No	1.29 + 3.35
9	ΔOriC(wt), OriC1, *tos1*, *tos4*	Yes	N/A	N/A
10	OriC(wt), OriC4, *tos1*, *tos3*	Yes	No	2.58 + 2.06
11	ΔOriC(wt), OriC4, *tos1*, *tos3*	Yes	N/A	N/A
12	OriC(wt), OriC4, *tos1*, *tos4*	Yes	No	1.29 + 3.35
13	ΔOriC(wt), OriC4, *tos1*, *tos4*	Yes	N/A	N/A
14	OriC(wt), OriC2, *tos1*	Yes	Yes	4.64
15	OriC(wt), OriV2, *tos1*	Yes	Yes	4.64
16	ΔOriC(wt), OriV2, *tos1*	Yes	No	(4.64)
17	OriC(wt), OriV3, *tos1*, *tos3*	Yes	No	2.58 + (2.06)
18	OriC(wt), OriV1, *tos1*, *tos3*	Yes	No	2.58 + (2.06)
19	OriC(wt), OriV4, *tos1*, *tos8*	Yes	No	2.62 + (2.02)
20	OriC(wt), OriV1, *tos1*, *tos5*	Yes	Yes (few colonies)	3.71 +(0.93)
21	ΔOriC(wt), OriV1, *tos1*, *tos5*	Yes	N/A	N/A
22	OriC(wt), OriV4, *tos1*, *tos7*	Yes	Yes	3.27 + (1.37)

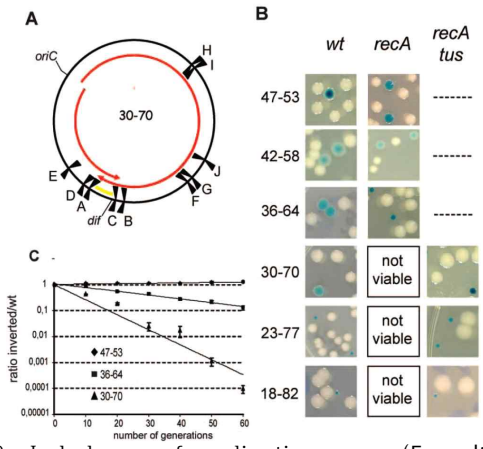
*The size of the chromosome, whose replication is driven by the OriV element is indicated between parentheses

<그림 2> Chromosome fragmentation strategies (Liang, 2013)
a, *tos*/protelomerase(*telN*)를 이용한 fragmentation; b, Pulse-field gel electrophoresis을 이용한 유전체 구조 분석; c, 생장속도 측정

3. Macrodomain의 inversion에 의한 유전체 재구성

Ori와 Ter domain 두 macrodomain의 inversion을 유도한 후 *E. coli* 유전체를 재구성하는 방법으로 복제 방향을 나타내는 replichore의 inversion으로 유전체를 재구성하는 연구도 진행되었다. *E. coli* 유전체 내 여러 유전자 위치에 *attB*와 *attP*를 삽입한 뒤 Int/Xis system을 이용하여 inversion을 유도하고 *lacZ* integrity에 의하여 발현되는 β-galactosidase의 활성화로 inversion된 유전체를 확인하였다.

<그림 3B>에서 나타낸 것과 같이 *recA*(recombinase), *tus*(terminstion protien) 유전자와 좌우 replichore의 비율이 cell viability와 cell growth에 영향을 주는 것을 확인하였다. *E. coli* 유전체 재구성을 유도할 수 있는 합성생물학 도구와 유전체 구조의 balance가 중요하다는 것을 보여주는 연구 결과이다.



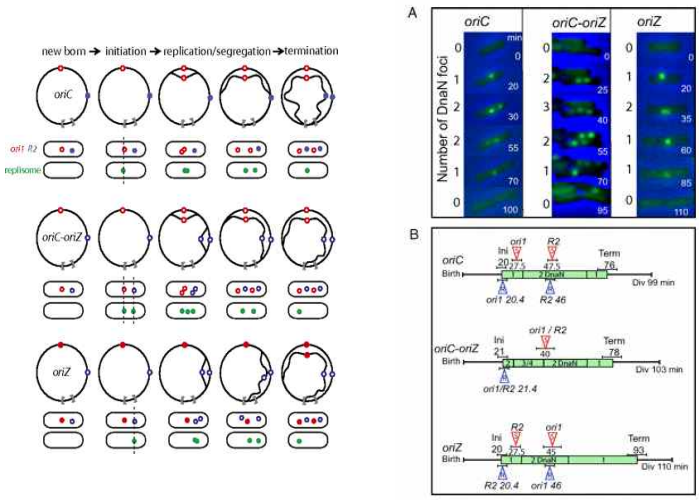
<그림 3> Imbalance of replication arms (Esnault, 2007)

A, *E. coli* chromosome replicore structure (replication arms, red arrow; replication fork, yellow; ten *ter* sites, black A to J); B, Colonies of imbalance strains; C, Co-culture assay를 이용한 성장속도 분석

4. 유전체 복제시스템 재구성

I. 복제 개시점(*oriC*) 삽입을 통한 재구성(DnaA-dependent)

여러 개의 복제개시점을 갖는 eukaryotes와 archaea와는 달리 박테리아는 하나의 복제 개시점인 *oriC*를 가지며 양방향 복제가 시작된다. 2011년도 Xindan의 연구팀은 대장균 염색체 내 *lacZ*유전자의 upstream 부분에 WT *oriC*를 삽입하고 *oriZ*라 명명하였다. 이 결과 각각의 *oriC, oriZ*위치에서 독립적인 양방향 복제 시스템이 일어나는 것을 replisome 분석을 통하여 확인 하였고, time lapse microscopy를 통하여 세포분열에 대한 현상을 연구하였다 <그림 4>. 이 연구는 *E. coli* 의 유전체 재구성을 통하여 eukaryotes와 archaea 같이 여러 복제개시점을 보유할 수 있는 가능성과 세포 복제와 분열을 실시간으로 분석할 수 있는 연구 방법을 제시한 논문이다.



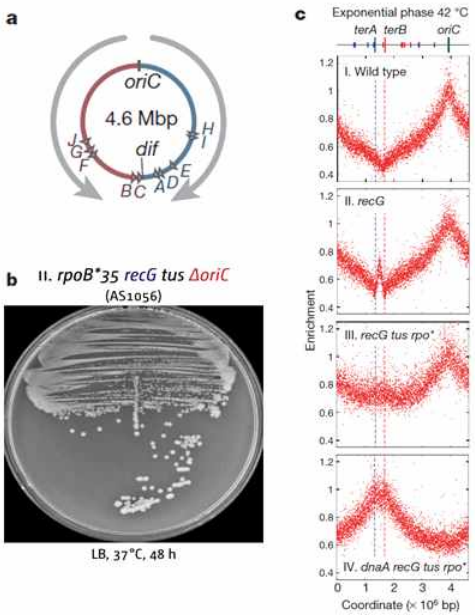
<그림 4> 세포 복제(A)와 분열(B)에 대한 패턴 분석 (Wang, 2011)

WT *E. coli* cells (*oriC*), cells with two replication origins (*oriC*-*oriZ*), and cells with only the ectopic origin (*oriZ*)

Ⅱ. 복제 개시점(*oriC*) 제거를 통한 재구성(DnaA-independent)

염색체 복제는 일반적으로 복제개시점인 *oriC*의 위치에 특이적으로 결합할 수 있는 *dnaA* 단백질에 의하여 복제 개시가 이루어진다고 알려져 있다. 최근 흥미로운 연구로 *E. coli* 복제개시 유도 인자인 *dnaA*나 *oriC*를 제거하였을 때 세포가 복제를 시작하지 못하기 때문에 세포가 살아갈 수 없지만, *oriC*와 DNA translocase(*recG*), Tus, RNA polymerase(*rpoB*)를 함께 제거하면 stable DNA replication(SDR)이 유도되어 replication fork collide(R-loop)를 일으키기 때문에 세포가 생장하게 된다는 연구 결과이다.

2013 Nature 저널에 발표된 이 연구는 NGS 서열 분석을 기반으로 한 replication profile을 통하여 복제개시 부위에 위치한 DNA 단편이 높은 빈도 값으로 나타나는 현상이 replication fork collide(R-loop)가 유발되는 부위에 대해서도 동일한 패턴으로 나타남을 규명하였다 <그림 5>. 그 외 *E. coli* 연구뿐만 아니라 여러 개의 복제개시점을 갖는 archaea로 알려진 *Haloferax volcanii*의 유전체 내 모든 복제개시 부위의 제거를 통하여 세포 생장이 7.5% 빨라지는 재조합 균주가 구축될 수 있음을 결과로 제시하였다 <그림 6>.

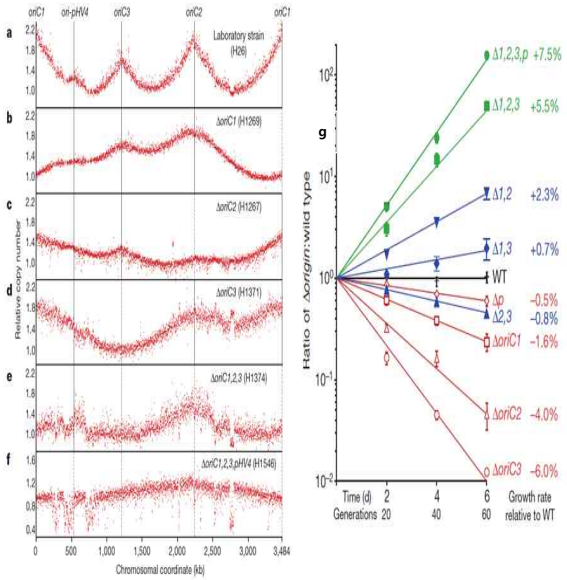


<그림 5> DnaA-independent replication (Rudolph, 2013)

a, DNA replicore 배열;

b, *dnaA* 또는 *oriC* 유전자가 파괴된 돌연변이 균주의 생장 분석;

c, Replication profile



<그림 6> Characterization of origin deletion in *H. volcanii* strains (Hawkins, 2013)

a-f, *oriC* 제거 균주 replication profile 분석;

g, Co-culture assay를 이용한 성장속도 분석

5. 고찰

유전체 정보를 활용한 미생물 대사회로의 재구성과 유용 유전자 발굴의 지속적인 연구를 위한 미생물 유전체 재구성 기술들은 세포 복제와 분열에 최적화된 균주 개발을 가능하게 할 것이며, 이를 활용한 지능형 바이오시스템 구축을 통하여 고속 생장 미생물 플랫폼 기술 설계 및 합성을 성공적으로 수행할 수 있을 것이다. 또한 이를 통해 다양한 바이오산업 분야의 생산성 증대를 기대할 수 있을 것이다.

<참고문헌>

1. Xiquan Liang, Chang-Ho Baek, and Federico Katzen, *Escherichia coli* with two linear chromosomes, 2013 *ACS Synth. Biol.*, 2, 734-740
2. Xindan Wang, Christian Lesterlin, Rodrigo Reyes-Lamothe, Graeme Ball, and David J. Sherratt, Replication and segregation of an *Escherichia coli* chromosome with two replication origins, 2011 *PNAS* 26, 243-250
3. Emilie Esnault, Michéle Valens, Olivier Espéli, and Frédéric Boccard, Chromosome structuring limits genome plasticity in *Escherichia coli*, 2007 *PLoS Genet*, 3, 2486-2499
4. Christian J. Rudolph, Amy L. Upton, Anna Stockum, Conrad A. Nieduszynski, and Robert G. Lloyd, Avoiding chromosome pathology when replication forks collide, 2013 *Nature* 500, 608-611
5. Michelle Hawkins, Sunir Malla, Martin J. Blythe, Conrad A. Nieduszynski, and Thorsten Allers, Accelerated growth in the absence of DNA replication origins, 2013 *Nature* 503, 544-547