

박테리아 퀴럼센싱 시스템의 합성생물학적 응용

한국생명공학연구원

김상윤, 권오석

1. 개요

박테리아는 진핵 생명체와 달리 비록 막으로 둘러싸인 핵이나 다른 세포내 기관이 없는 단세포의 원핵 생명체이지만 다양한 화학적 언어를 통하여 서로 신호를 주고받을 수 있는 능력을 갖고 있다. 즉 박테리아는 자가 유도물질 (autoinducer, AI)이라는 화학적 신호전달 물질을 생산하여 분비할 수 있으며 주변 미생물에 의해 분비되는 특정 AI를 감지하고 반응하는 퀴럼센싱 (quorum sensing)이라는 상호 신호전달 기전을 갖고 있다. 이는 특정 신호전달 물질을 매개로 신호를 주고받는 미생물들은 해당 물질의 농도가 임계치를 초과하게 되면 그들의 유전체 발현 변화를 함께 조율하게 된다 [Waters and Bassler, 2006]. 이렇게 한 군집 내 박테리아가 유전체 발현을 함께 조절함으로써 마치 다세포 생명체처럼 일치된 반응을 보일 수 있게 된다. 따라서 많은 박테리아는 퀴럼센싱을 통하여 이차대사산물 생산, 생물발광, 단백질 분비, 운동성, 포자 형성, 병원성 인자 생산, 플라스미드 전달, 바이오필름 형성, 스트레스 반응 등 다양한 세포 활성을 조절한다 [Williams, 2007].

퀴럼센싱 시스템을 구성하고 있는 신호물질, 수용체, 조절자, 타겟 프로모터 등 각각의 기능성 단위들이 모듈의 성격을 갖고 있어서 새로운 감지-조절 기능을 갖는 유전자 회로를 구축하기 위해 적합한 합성생물학 소재이다 [Garg et al., 2014]. 실제 박테리아 퀴럼센싱 시스템을 기반으로 개념검증이나 목적 네트워크 조절을 위한 다양한 유전자 회로 구축이 지속적으로 보고되고 있다. 또한 퀴럼센싱 시스템 엔지니어링을 통하여 군집 간 혹은 이종 간의 신호전달 네트워크를 구축할 수도 있을 것이다. 따라서 본 보고서에서는 종류에 따른 박테리아 퀴럼센싱 시스템의 개략적인 특징과 이들 시스템의 합성생물학적 활용 연구 동향을 고찰해 보고자 한다.

2. 박테리아 퀴럼센싱 시스템의 구성

퀴럼센싱은 높은 세포 농도에서 발광하는 해양성 그람 음성 세균인 *Vibrio fischeri*와 *V. harvey*에서 처음 발견되었으며 세균에 의해 autoinducer라는 신호분자가 생산되어 높은 농도로 축적되면 그 신호를 인지하여 타겟 유전자의 발현을 조절하는 신호전달 기전이다 [Nealson et. al, 1970]. 그람 음성 혹은 그람 양성 세균 등 세균의 종류에 따라 퀴럼센싱 시스템이 달라지는데 신호전달 물질의 성격이나 시스템 구성 형태에 따라 크게 다음 네 가지 형태로 구분할 수 있다 [Asad and Opal, 2008].

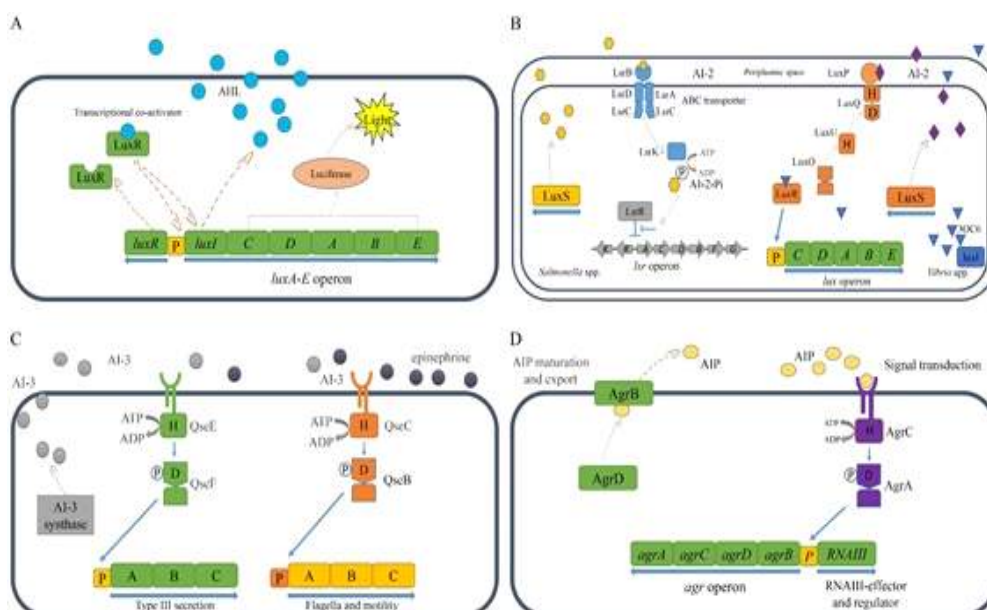


그림 1. 박테리아 퀴럼센싱 시스템의 유형 및 특성

Autoinducer type 1 (AI-1) system

Vibrio 종에서 처음 발견된 *luxR/luxI* 시스템이 대표적인 AI-1 형태 퀴럼센싱 시스템이다 (그림 1a). LuxI 단백질에 의해 생성되는 N-actyl-homoserine lactones (AHL)은 쉽게 확산될 수 있는 수용성 물질이다. 세포 밀도가 높아져 AHL이 일정농도 이상 축적되면 LuxR 단백질에 결합하여 활성형 전사촉진 복합체를 형성하고 생물발광 오페론과 같은 타겟 유전자의 발현을 촉진하게 된다. AI-1 형태 퀴럼센싱 시스템은 많은 병원성 그람 음성 세균에서 발견되며 신호분자의 상세 구조, 신호 수용체의 종류 및 작용기전, 조절 타겟 등은 세균 종간에 차이가 있다. 흥미로운 점은 일부 박

테리아에서는 AHL 분자를 합성할 수는 없으나 LuxR 유사 수용체를 (대장균의 경우 SdiA)를 발현하여 다른 그람 음성세균의 신호를 수신하여 활용할 수 있는 경우도 있다 [Ahmer, 2004].

Autoinducer type 2 (AI-2) system

이 시스템은 *V. harveyi* 생물 발광 조절 시스템으로 처음 발견되었으며 많은 그람 음성세균과 그람 양성세균에서 공통적으로 존재하는 퀴럼센싱 시스템이다. LuxS 단백질이 관여하는 대사산물이 신호분자로 사용되며 *Vibrio* 종의 경우 붕소 원자를 포함하는 환상형 다중고리구조 물질이 사용되지만 *Salmonella* 종의 경우 붕소가 포함되지 않은 furane 분자가 사용된다 [Bassler, 2002]. *Vibrio* 종의 AI-2 퀴럼센싱 시스템의 경우 신호수용 및 전달은 단백질의 특정 히스티딘-아스파테이트 잔기 간의 인산기 전이에 의해 구동되는 2개-인자 신호전달계를 기반으로 복잡한 경로를 거쳐 진행된다. 세균 밀도가 높아져 AI-2 농도가 높아지면 periplasm에 존재하는 LuxP에 결합하고 LuxQ-LuxU-LuxO 2개-인자 신호전달계의 인산화는 차단되고 전사촉진 단백질인 LuxR 발현이 증대되어 결과적으로 타겟 생물발광 유전자의 발현이 촉진되게 된다. 한편 장내 세균의 경우 AI-2는 periplasm에 존재하는 LsrB 수용 단백질과 결합하여 세포 내로 유입된 후 LsrK 효소에 의해 인산화된다. 인산화된 AI-2는 LsrR 전사억제 단백질의 작용을 차단하여 결과적으로 타겟 오페론의 발현이 활성화되게 된다. AI-2 형태 퀴럼센싱 시스템의 역시 세균 종에 따른 신호분자구조 및 신호전달 기전의 다양성이 존재하며 일부 LuxS 신호분자 생산 단백질 없이 수용-신호전달 시스템만 갖고 있는 경우도 있어 이종 간 퀴럼신호 수신수단으로 활용될 것으로 추정된다.

Autoinducer type 3 (AI-3) system

AI-3 퀴럼센싱 시스템은 2개-인자 신호전달계를 신호수용 및 전달 기구로 사용하고 있으며 AI-3 신호분자가 세포막에 부착된 센서단백질에 부착하면 자가 인산화와 인산기 전이과정을 거쳐 조절단백질이 활성화 된다 (그림 1c). 아직 AI-3 신호분자의 정확한 구조는 밝혀지지 않았으며 catecholamine과 비슷한 구조일 것으로 추정되고 있다. 흥미로운 것은 AI-3 퀴럼센싱 시스템은 인간 스트레스 호르몬인 epinephrine 또는 norepinephrine을 인지할 수 있다. 이 시스템은 주로 장 감염성 그람 음성세

균들에서 발견되었으며 아직 그람 양성세균에서 발견된 예는 없다 [Walters and Sperandio, 2006].

Autoinducer peptide (AIP) system

이 시스템은 그람 양성세균 특이적인 퀴럼센싱 시스템으로 포도상 구균의 accessory gene regulator (Agr) system이 대표적인 예이다 (그림 1d). 이 시스템은 autoinducer peptide (AIP)로 알려진 짧은 cyclical peptide 를 신호분자로 사용 한다 [Gov et al., 2004]. AIP 는 AgrD에 의해 생성되고 번역 후 변형을 거친 후 AgrB 를 통해 세포 밖으로 분비된다. AIP 가 수용체 AgrC 센서에 부착하면 단백질 인산화 및 인산기 전이과정을 통해 AgrA 전사조절 단백질이 활성화된다.

3. 박테리아 퀴럼센싱 모듈을 이용한 유전자 회로

전술한 바와 같이 기능성 모듈로 구성된 박테리아 퀴럼센싱 시스템은 해당 모듈의 변형 및 조합을 통하여 새로운 유전자 회로를 제작하기 위한 주요 합성생물학 소재로 사용될 수 있다 [Mangwani et al., 2012]. 그 대표적인 예가 다양한 세포간 신호전달체를 구성하는데 적용된 *V. fischeri* 의 퀴럼센싱 시스템이다. 이 시스템은 공여세포에 의해 생산되는 AHL 분자가 세포막을 통과하여 확산되고 수용세포의 LuxR 전사촉진 인자에 부착하여 생체 발광에 관련된 유전자의 발현을 촉진하게 된다. 2004년 Basu 등은 이 시스템을 대장균에 적용하여 파형 발현 네트워크를 만들었는데 공여세포에서 유도 생산된 AHL이 인접한 파동 생산 수용세포로 전달되면 AHL-LuxR 복합체를 형성하여 초기에는 CI 전사 억제 단백질과 녹색형광 단백질의 발현을 동시에 촉진하게 된다 [Basu et al., 2004]. 그러나 시간이 지남에 따라 세포 내 CI 단백질이 임계농도 이상 축적되면 오히려 녹색형광 단백질의 발현을 억제하게 되는 시스템이다. 이런 시스템은 시간적 공간적으로 달라지는 신호 전달 물질의 농도를 감지하여 표지 유전자의 발현양을 변화시킬 수 있는 성질이 있다 (그림 2). 이 연구팀은 2005년 AHL 농도에 따라 즉 공여 세포로부터의 거리에 따라 다른 형광단백질을 발현하도록 프로그램된 수용세포를 이용하여 공여세포 주위에 형성되는 AHL 농도 구배에 따라 환형의 패턴을 형성하는 인공의 다중세포 신호전달계를 만들 수 있었다 [Basu et al., 2005].

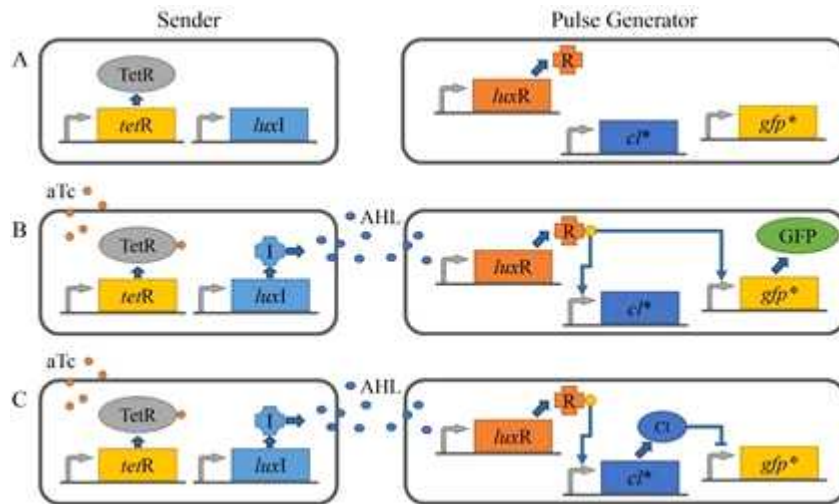


그림 2. 퀴럼센싱 시스템을 이용한 파형 발현 네트워크

한편 3개 플라스미드 모듈을 이용하여 토글 스위치와 퀴럼센싱 신호 전달계를 연결하여 유전자 네트워크를 구축한 예도 있다 (그림 3). 첫 번째 센싱 모듈은 *V. fischeri*의 *luxI*와 *luxR* 유전자를 *lux* 프로모터를 이용하여 오프론 형태로 발현하며 반대 방향으로 LacR 발현하고, 두 번째 조절 모듈은 서로의 발현을 억제하는 LacR과 CI 단백질을 발현하고, 세 번째 output 모듈은 CI 억제 프로모터에 의해 형광단백질을 발현하도록 구성되었다 [Kobayashi et al., 2004]. *luxI* 유전자를 가지고 있는 세포의 농도가 높아지면 AHL-LuxR 복합체 농도가 증가하여 센서 모듈의 LacR 발현을 촉진한다. 한편 조절 모듈의 LacR 발현은 CI에 의해 억제되는데 CI의 발현은 센서와 조절 모듈로부터 발현되는 전체 LacR 양에 의해 억제된다. CI 발현이 감소하면 output 모듈의 형광단백질 발현이 증가된다. 이 시스템의 모듈형 구조 때문에 *gfp* 유전자 대신에 특정 유전자를 삽입하여 해당 단백질의 발현을 세포 농도에 의해 조절할 수 있다.

대장균을 이용하여 개체 수를 자가 조절할 수 있는 회로가 만들어진 예도 있다 [You et al., 2004]. 즉 퀴럼센싱 시스템에 독성단백질 발현을 연계하여 군집 내 세균농도에 따라 세포 사멸을 조절할 수 있게 하였다. 세균 밀도가 높아지면 AHL-LuxR 복합체가 *luxI* 프로모터에 연결된 killer 유전자의 발현을 유도하여 결국 세포 사멸을 유발하게 된다. 이런 세포 밀도 기반의 유전자 발현 조절시스템은 외래 세포독성 단백질의 발현과 회수를 자가 조절하는 경제적인 발효공정 개발에 활용될 수 있다.

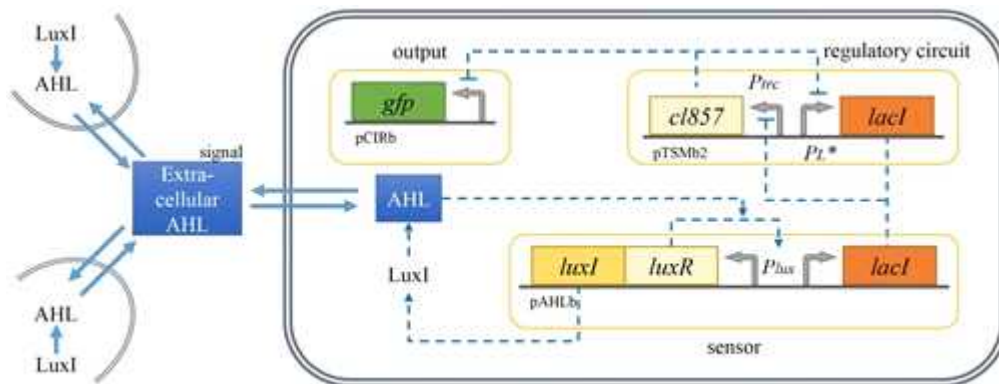


그림 3. 토글 스위치와 퀴럼센싱 신호전달계를 연결한 유전자 네트워크

4. 박테리아 퀴럼센싱 모듈을 이용한 세포 군집간 신호전달 회로

퀴럼센싱 시스템은 한 집단 내에 존재하는 동일한 성질을 갖는 세포 간의 신호전달 뿐만 아니라 다른 성질 혹은 이종 세포간의 신호전달 네트워크 구축에도 사용될 수 있다. 일례로 두 종류의 퀴럼센싱 신호물질과 대장균을 이용하여 인공의 포식-피식 세포 시스템을 만들었는데 이때 포식세균은 피식세균을 죽이는 독성 단백질을 발현을 유도하는 신호물질을 발산하고 반대로 피식세균은 해당 독성단백질의 발현을 억제하는 신호물질을 생산하여 포식세포를 보호하도록 설계되었다 [Balagadde et al., 2008]. 이 경우 두 세균 그룹의 성장과 사멸 비율에 따라 한쪽이 우위를 차지하거나 그 우열이 상호 바뀔 수도 있게 된다.

AHL을 이용한 신호전달을 통하여 두 종류의 세균 군집이 조합적으로 반응하는 컨소시엄을 만든 예도 있다 (그림 4). 즉 함께 위치한 두 대장균 군집이 AHL 교환을 통하여 양방향으로 신호를 전달할 수 있으며 두 군집 모두 충분한 밀도로 존재할 때만 타겟 유전자의 발현이 유도되도록 설계되었다 [Brenner et al., 2007]. 따라서 이 인공 공동 컨소시엄은 두 군집의 밀도를 입력신호로 하는 AND gate라고 할 수 있다. 미생물 공동 컨소시엄은 바이오필름과 같은 다양한 성장행태로 이루어지며 수일간 행태가 유지될 수 있다. 인공적으로 설계된 바이오필름 컨소시엄은 감염을 차단하거나 체내 유해세균의 제거에 적용될 수 있을 것이다.

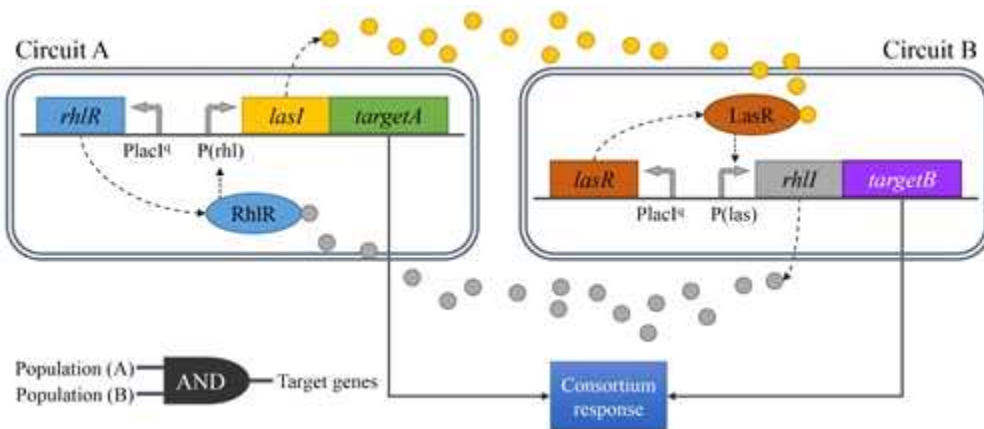


그림 4. 세균 군집 컨소시엄 반응 회로

한편 새이디 등은 비 병원성 대장균을 병원성 *P. aeruginosa*를 인지하고 사멸시킬 수 있도록 재설계하였다(그림 5). 즉 대장균 세포골격에 퀴럼 센싱, 세포사멸, 세포 용해 장치 등을 도입하였는데 이때 감지 기구는 *P. aeruginosa*의 type 1 퀴럼센싱 기전을 기반으로 항상 활성 *tetR* 프로모터를 이용해 *P. aeruginosa*의 AHL 3OC12HS 과 부착하는 LasR 전사조절 단백질을 발현하도록 하였다 [Saeidi et al., 2011]. 또한 LasR-3OC12HSL 전사조절복합체가 부착할 수 있는 *luxR* 프로모터로 pyocin S5와 lysis E7 단백질이 발현되도록 설계하였다. 따라서 *P. aeruginosa*가 분비하는 3OC12HSL를 인지하여 lysis E7과 pyocin S5 단백질이 발현되어 축적되고 lysis E7 단백질이 임계 농도에 달하면 대장균의 세포막에 구멍을 내어 세포 내에 축적되어있던 수용성 단백질 pyocin S5가 분비되어 결국 타겟 병원균을 공격하여 사멸을 유발하게 된다.

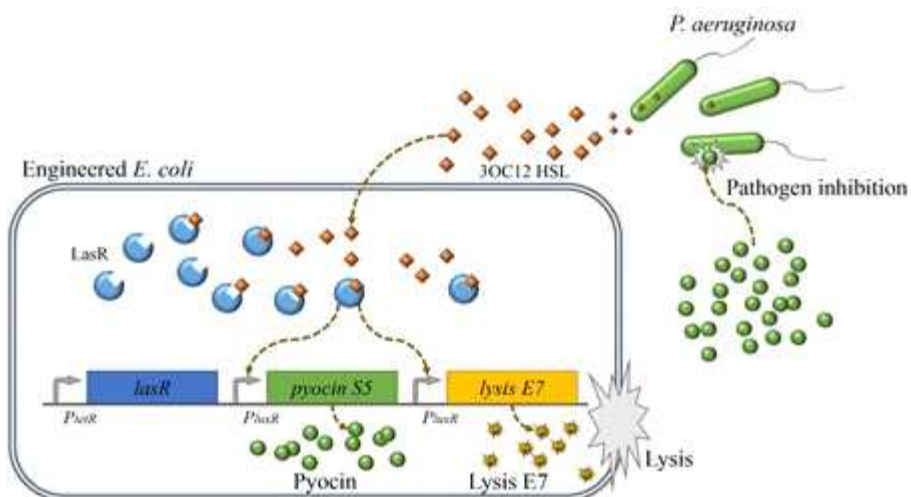


그림 5. 퀴럼센싱 시스템을 이용한 이종균 감지 제어 회로

한편 박테리아 퀴럼센싱 시스템을 기반으로 제작하는 유전자회로는 단지 세균에만 적용할 수 있는 것이 아니다. 그 대표적인 예로 앤더슨 등은 세균과 암세포 간의 상호작용 인공 회로를 설계하였는데 암 특이적 환경을 인지하여 HeLa, HepG2, U2OS 등과 같은 암세포 속으로 침입할 수 있는 대장균을 만들었다 [Anderson et al., 2006]. 이들은 우선 *Yersinia pseudotuberculosis* 유래 invasion (*inv*) 유전자를 퀴럼센싱 시스템의 조절을 받는 *lux* 프로모터, 저산소 (hypoxia)-감응 *fdhF* 프로모터, 혹은 아라비노스-유도성 *araBAD* 프로모터 등에 연결한 벡터를 구축하였다. 이 벡터를 갖고 있는 대장균은 각각, 높은 세균밀도, 혐기 배양조건, 혹은 아라미노스 유도 등에 의해 *inv* 유전자를 발현하여 암 세포에 침투할 수 있다. 즉 세균이 암 세포 주위에 축적되어 국부적인 세균밀도가 높아지거나, 호흡이 활발한 저산소 암 조직 주위에서만 *inv* 유전자 발현이 활성화 된다 (그림 6). 이런 접근 방법은 암 조직을 감지하고 암세포에 침투하여 항암물질을 분비할 수 있는 항암세균의 제조에 적용될 수 있다.

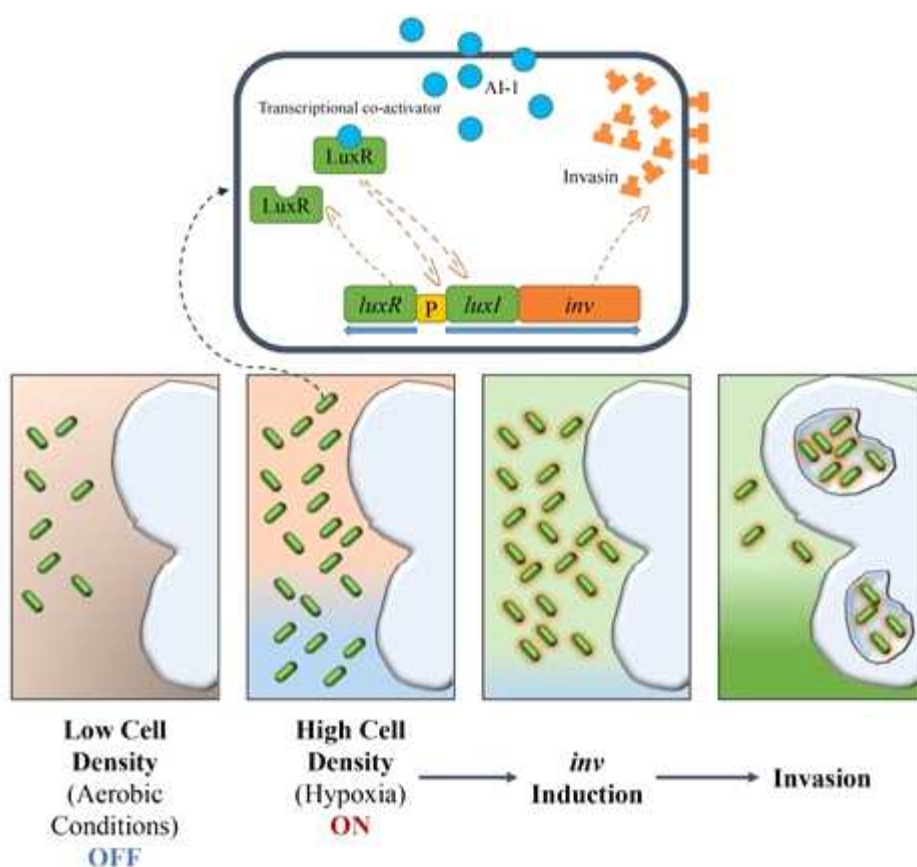


그림 6. 퀴럼센싱 시스템을 적용한 암세포 인지 침투 세균

5. 고찰

박테리아는 다양한 형태 커뮤니티의 구성원으로서 끊임없이 변화하는 외부 환경에 효율적으로 적응하기 위하여 신호전달물질, 센서, 신호전달 메커니즘을 포함하는 신호전달 시스템을 활용한다. 특히 AHL 이나 AIP 와 같은 신호전달 물질을 매개로 하는 퀴럼센싱 기반의 유전자 발현 조절기구는 다양한 형태의 커뮤니티를 형성하는 박테리아의 생존에 있어서 필수적인 세포간 신호전달 체계로 인식되고 있다. 따라서 여기서 언급한 대표적인 시스템들에 대한 연구 외에도 새로운 퀴럼센싱 신호전달계를 발굴하고 분석하기 위한 연구도 계속해서 활발히 진행되고 있다. 또한 최근에는 퀴럼센싱 시스템 정보를 활용하기 위한 연구도 부상하기 시작하였는데 신호전달 물질과 유사한 구조를 갖는 물질을 개발하기 위한 생명공학 연구가 그 예이다. 특히 이런 물질은 퀴럼센싱을 통해 병원성을 조절하는 세균을 제어하기 위한 새로운 항생제로 개발될 수 있는 가능성 때문에 주목 받고 있다. 아울러 세균의 퀴럼센싱 시스템 연구는 세포 내 혹은 세포간 신호전달, 혹은 동일 종 내 혹은 이종간 신호전달에 대한 정보와 나아가 다세포 생명체의 진화에 관한 정보를 제공할 수 있다는 점을 고려할 때 박테리아의 퀴럼센싱 시스템에 관한 정보와 모듈 소재는 합성생물학적으로 설계하고 제작하는 지능형 시스템의 효율적 운용을 위한 자가 조절 및 네트워크 조절 기구로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

6. 참고 문헌

1. Ahmer BMM (2004) Cell-to cell signaling on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 52:933-945.
2. Anderson JC, Clarke EJ, Arkin AP, Voigt CA (2006) Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria. *J Mol Biol* 355:619-627.
3. Asad S, Opal SM (2008) Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit Care*. 12:236.
4. Balagadde FK, Song H, Ozaki J, Collins CH, Barnet M, Arnold FH, Quake SR, You L (2008) A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Mol Syst Biol* 4:187.

5. Bassler BL (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109:421–424.
6. Basu S, Mehreja R, Thiberge S, Chen MT, Weiss R (2004) Spatiotemporal control of gene expression with pulse-generating networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6355–6360.
7. Basu S, Gerchman Y, Collins CH, Arnold FH, Weiss R (2005) A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature* 434:1130–1134.
8. Brenner K, Karig DK, Weiss R, Arnold FH (2007) Engineered bidirectional communication mediates a consensus in a microbial biofilm consortium. *Proc Natl Acad Sci* 104:17300–17304.
9. Garg N, Manchanda G, Kumar A (2014) Bacterial quorum sensing: circuits and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 105:289–305.
10. Gov Y, Borovok I, Korem M, Singh VK, Jayaswal RK, Wilkinson BJ, Rich SM, Balaban N (2004) Quorum sensing in staphylococci is regulated via phosphorylation of three conserved histidine residues. *J Biol Chem* 279:14665–14672.
11. Kobayashi H, Kaern M, Araki M, Chung K, Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ (2004) Programmable cells: interfacing natural and engineered gene networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8414–8419.
12. Mangwani N, Dash HR, Chauhan A, Das S. (2012) Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 22:215–227.
13. Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular control of synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313–322
14. Saeidi N, Wong CK, Lo TM, Nguyen HX, Ling H, Leong SSJ, Poh CL, Chang MW (2011) Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. *Mol Syst Biol* 7:521.
15. Walters M, Sperandio V (2006) Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 74:5445–5455.

16. Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346.
17. Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153:3923–3938.
18. You L, Cox RS III, Weiss R, Arnold FH (2004) Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature* 428:868–871.