

는 조효소는 산화된 형태(NAD+)가 환원된 상태(NADH) 보다 구성비가 높고, 환원이 중요한 동화과정에서는 환원된 조효소(NADPH)가 산화된 것(NADP+)보다 상대적으로 많이 존재한다. 이러한 특성은 유기물은 물론 무기물을 에너지원으로 이용해 호흡이나 발효로 성장하는 대부분의 생물에서 볼 수 있는 공통된 현상이다. 특화된 기능과 관련된 이들의 균형을 유지하는 것이 매우 중요하기 때문에, 두 조효소간에는 항상성 유지를 위한 상호전환 경로도 존재한다.

전술한 내용과 같이 생태계의 모든 세포에서 산화/환원 조효소의 비율이나 양은 매우 중요한 생리활성 지표로 쓰일 수 있어, 다양한 분야에 기초자료로 활용될 수 있다. 예를 들어 NADPH 의 농도를 정확하고 신속하게 정량할 수 있으면, 생체 내 생합성에 관련된 효소활성이나 대사회로의 설계, 나아가서는 다양한 방어기작의 이해나 관련된 질환을 예측하는데 많은 도움을 받을 수 있을 것이다 (그림 2 참조).

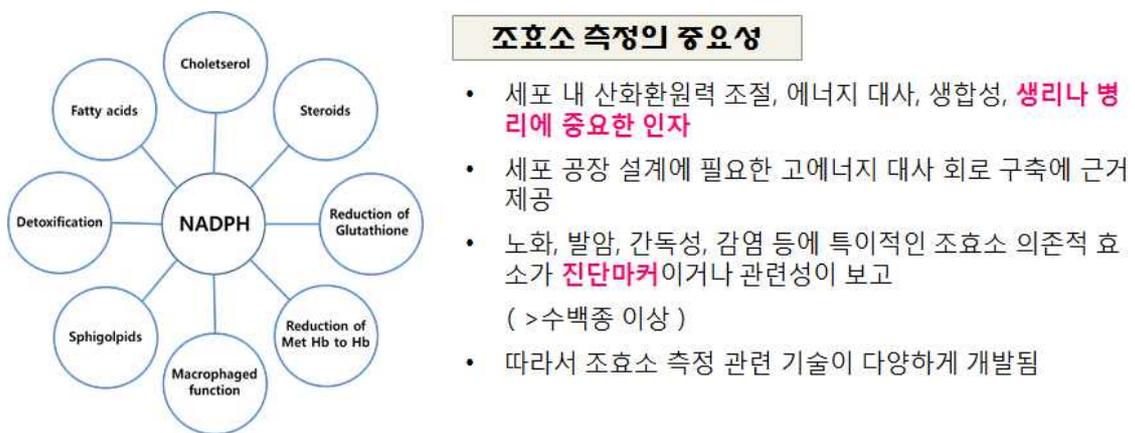


그림 2. 환원된 조효소 NADPH 의 정확한 정량과 탐침이 지닌 세포생리 활성 이해범위

이러한 다양한 적용점을 지닌 조효소의 탐침이나 정량법 개발에 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, 광합성을 포함한 생합성 과정이나 면역방어, 항산화 기작 등에서 중요한 역할을 하고 있음에도, NADH 분석 시스템에 비해 활용가능한 방법이 적은 NADPH 정량법 개발에 많은 노력이 집중되고 있다. 확립된 NADPH 정량법은, 아래 그림 3에서와 같은 방법(coupling assay)으로 다른 조효소의 농도를 예측하는데도 이용할 수 있을 것이다.

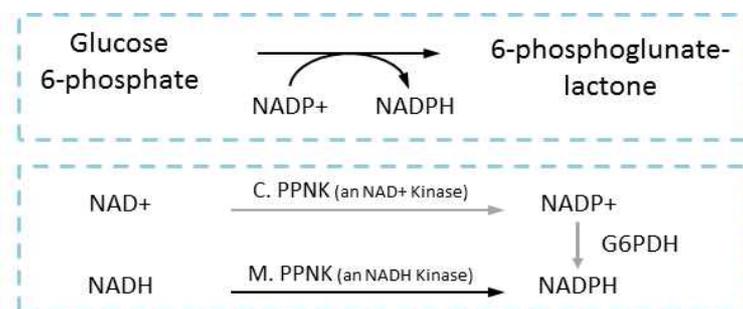


그림 3. 산화와 환원된 조효소의 상대적 측정을 위한 coupling assay 효소원의 예

생리활성 주요 지표자인 NADPH 정량에 이용되는 가장 일반적인 방법은, 화합물 자체가 지닌 구조적 특성(반응하는 고유한 파장)을 이용한 흡광도나 형광을 측정하는 것이다. 흡광도는 고유 파장인 340 nm에서 측정하고, 형광의 경우는 350 nm 근방에서 빛을 조사한 후, 방출 파장(대략 450-460 nm)에서 측정한다. 이러한 방법은 조효소 자체를 측정함으로써 연관된 효소나 기질 없이 비교적 간단하게 이용할 수 있으나, 낮은 흡광계수(molecular extinction coefficient)나 양자수율(quantum yield)로 인해 상대적으로 많은 양의 시료를 필요로 한다. 따라서 비교적 정확한 조성물의 성분비를 아는 인위적인 실험재료(*in-vitro*)와 달리, 다양한 생체시료에 직접 적용(*in-vivo*)하기에는 문제가 있다. 그나마 적용 가능한 *in-vitro* assay 의 경우, 흡광과 형광측정에 이용되는 파장에서 간섭을 유발할 수 있는 생체 내 유사물질이나 동일한 관능기를 지닌 물질을 제거해야 한다. 신호/간섭 비율에 영향을 주는 생체내외 간섭요소들의 제거를 위한 전처리 과정(간섭물질 제거를 위한 응집유도나 원심분리)은 또 다른 문제점을 유발한다. 상기 과정을 통해 NADPH를 농축하는 효과를 지녀 간섭을 줄일 수 있지만, 전처리 시간에 따른 NADPH의 자연산화가 일어나기 때문이다. 잘 알려진 바와 같이 NADPH의 경우, 공기에 노출되면 특정 pH 에서 산화가 용이한 화학적 특성을 지니고 있기 때문이다. 따라서 NADPH의 산화를 억제하거나 구조적인 안정성을 유지하는 시약의 첨가가 별도로 요구되고 있다. 경우에 따라서는, 산화된 조효소(NADP⁺)의 환원을 직접 유도하는 효소나, 특정한 기질의 산화반응을 통해 환원을 유도하는 또 다른 효소가 포함된 커플링 반응을 이용한다. 하지만 이들 반응에 이용되는 효소원이 추가로 인해, 두 개 이상의 효소활성을 동시에 유지하여야 하고, 조효소와 정량적으로 반응하는 또 다른 기질을 첨가해야 하는 단점을 지닌다. 특히, 가장 감도가 높은 방법으로 알려진 예 - NADPH를 조효소로 이용해 양자수율이 높은 특정 기질의 전환을 유도하는 - 에서 볼 수 있듯이, NADPH 자체를 측정하는 것이 아니라 같은 몰비로 전환되는 인공기질을 이용해 상대적으로 높은 감도로 정량할 수 있는 방법에서도, 이와 같은 문제로 인해 사용에 부분적인 제약이 따른다.

상기 방법들로 인해, *in-vitro* 에서 NADPH 를 정량하는 연구들은 많은 결과를 도출하고 있으며, 실험 조건이나 상황에 따라 대안이 될 수 있는 다양한 방법들이 개발/시판되고 있어 상호보완적으로 활용이 가능하다. 이와는 달리, 생체 내(*in-vivo*)에서 NADPH 를 정확히, 특히 실시간에 가깝게 정량할 수 있는 방법은 개선의 여지가 뚜렷하다. 본고에서는 이와 관련된 기술적 진보와 관련된 특성에 관해 간단히 살펴보았다.

2. 대사공학이나 세포개량에 이용 가능한 생체 내 조효소 측정 연구동향

1) NADPH 생체 내 측정 주요연구 개괄정리

현재까지 보고된 조효소 NADPH 의 생체 내 측정, 즉 real time imaging을 목표로 하는 연구와 관련된 대표적인 연구논문들은 다음과 같다. 우선, 조효소 자체가 지닌 형광(양자수율이 낮아 신호가 적긴 하지만)을 직접 측정해 세포 내의 환원된 조효소 NADPH 정량을 광학적으로 구현한 논문(Blacker and Duchen, 2014)이 보고되었다. 이 논문의 경우, 조효소의 화학적 특성과 광학기계의 특성에 기반해 정량(fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)을 시도하였다. 살아있는 세포에서의 실시간에 가까운 조효소의 정량 혹은 이미징 구현을 형질전환시킨 리포터(genetically encoded NADPH fluorescence sensors)을 이용해 본격적으로 시도한 논문은 대략 3편(Tao et al., 2017; Goldbeck et al.,

2018; Amir Roshanzadeh et al., 2019) 정도가 보고되었다. 비록 연구에 이용된 세포(진핵 혹은 박테리아)가 다르고, 정량/이미징에 필요한 장치도 특화된 것을 이용하지만 생체 내 조효소의 실시간 정량/검출이라는 목표에 가깝게 접근한 결과들이 도출되고 있다.

2) FLIM 를 이용한 NADPH 자체 형광기반 정량과 이미징

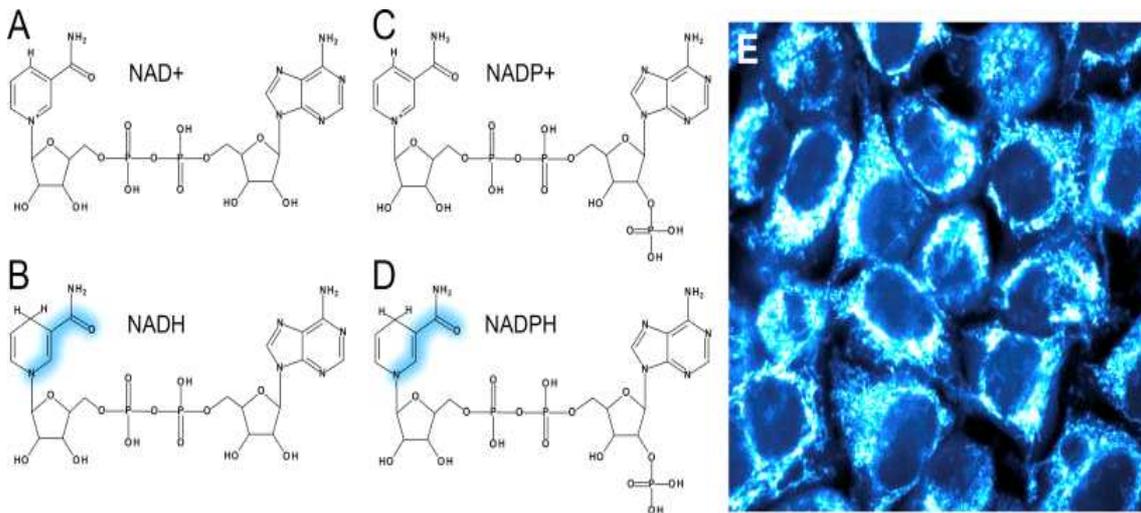


그림 4. 환원된 조효소의 자체형광을 이용한 생체 내 조효소 정량과 이미징 그림 (Thomas S. Blacker and Michael R. Duchon, 2016, Free Radic Biol Med).

위 그림에서 볼 수 있는 것처럼, 환원된 두 개의 조효소 NADH 와 NADPH 는 산화된 조효소 NAD+ 와 NADP+ 와 달리 자체 형광에 유리한 공명구조상의 변화된 형태를 지니고 있다. 따라서 두 개의 환원된 조효소는 직접적인 형광측정이 가능한 구조물이다. 실제로 고해상도 confocal 이나 two photon 형광현미경을 통해 그림과 같은 이미지의 환원된 조효소에 해당되는 결과를 얻을 수 있다 - 그림에서는 조효소가 풍부한 mitochondria 주변의 이미지를 보여주고 있으며, 같은 환경에서 조효소가 상대적으로 적은 핵 주변의 이미지는 이와 같은 주변현상(밝은 파란색)을 보여주지 않는다. 하지만 이러한 영상 이미지에서는 세포내에 혼합되어 있는 두 개의 환원된 조효소, 즉 NADH 와 NADPH 를 구분할 수 없다. 따라서 조효소 자체의 일반적인 형광이미지로는 두 조효소의 구분이 어려운 것으로 알려져 있었다. 하지만, 이 논문의 저자들은 두 조효소가 광학적으로는 기본적인 특성이 같더라도(spectrally identical), 각각의 조효소가 보여주는 형광수명 (fluorescence lifetime, 형광이 지속되는 시간)이 다르다는 것을 발견하였다. 이러한 특성은 용액상(in solution)에 존재하는 조효소에 의해서가 아니라, 효소(단백질)와 결합한 조효소에 의해 나타나는 현상이다. 따라서 이를 구분할 수 있는 수학적 모델과 특정 파장에서의 형광세기/지속시간 등을 각각의 pixel 에서 고려해, 살아 있는 세포에서 환원된 두 조효소가 내는 형광을 구분할 수 있는 방법을 제안하였다. 결과적으로 고가의 장비를 사용해야 하는 한계가 있기는 하지만, 환원된 조효소의 상대적인 비율을 이미지로 결정할 수 있음을 보여 주었다. 이때 사용된 원리가 fluorescence lifetime imaging (FLIM) 이다.

3) iNap sensor 기반 NADPH 의 실시간 정량과 이미징

FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 비롯하여 다양한 기술들이 형광단백질을 이용한 분자간의 상호작용을 모니터링하는 도구이다. 이러한 기술은 단백질-단백질간 상호작용만아니라 단백질과 ligand, 그리고 단백질과 기질, 더 나아가서는 단백질과 조효소간의 상호작용도 추적할 수 있는 많은 혁신적인 도구들을 제공한다. 형광단백질 자체도 end to end 융합에 의한 형광능의 변화는 물론, circular permutation site 에 기반한 in-frame 융합도 가능하기 때문에 형광변화에 근거한 많은 상호작용 모니터링 도구들을 제공한다. 이러한 원리를 이용하여 조효소의 농도나 산화/환원 상태를 측정하는 기술들이 알려져 있다. 아래 그림에서 볼 수 있는 예, 즉 SoNar 라는 융합단백질이 이러한 도구들을 제공한 좋은 예이다. SoNar 는 형광단백질(cpYFP)을 *Thermus aquaticus* 유래의 단백질, 즉 Rex 의 NADH binding domain 에 융합시킨 재조합 단백질이다. 이를 위해 다양한 surface loop 혹은 circular permutation site 에 형광단백질을 융합한 후, 조효소 NADH 의 첨가에 의해 형광이 변화하는 융합단백질을 선별한 것이 SoNar 이다. 결과적으로 조효소와의 결합에 의해 NADH 결합 영역의 구조변화가 유발되고, 이러한 변화가 형광단백질의 형광차이를 유발하는 원리에 의해 조효소의 양을 정량하거나 이미징할 수 있는 것이다.

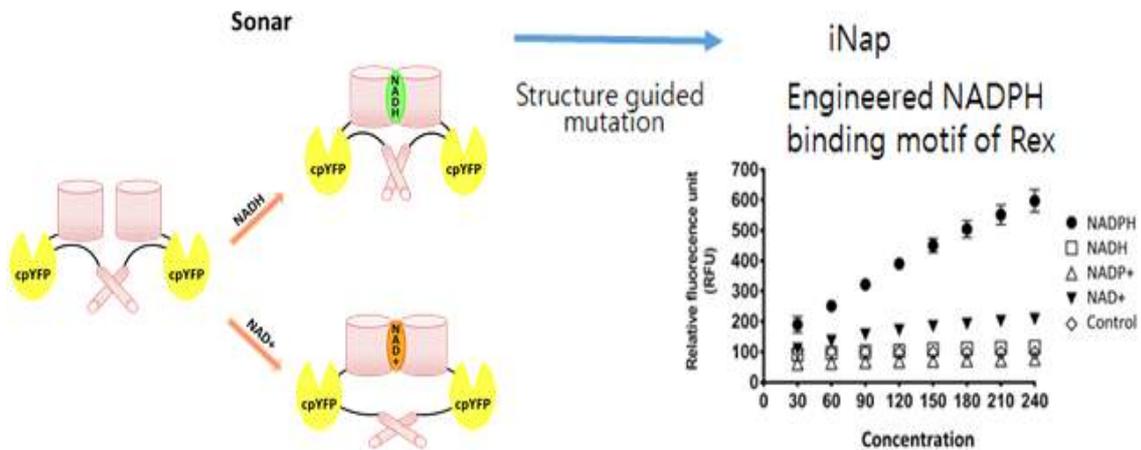


그림 5. 단백질 Rex 의 조효소 결합영역에 형광단백질을 삽입하여 정량과 이미징에 이용한 재조합 단백질 SoNar. SoNar 의 조효소 선택성을 NADH 에서 NADPH 로 변화시킨 단백질이 iNap 이다.

상기 그림의 재조합 단백질 리포터의 조효소 선택성을 NADH 에서 NADPH 로 변화시킨 단백질이 iNap 이다. 이를 위해 저자들은 다양한 database 내의 조효소 선택성과 관련한 구조적 차이를 분석하여 이를 Rex domain 에 도입하는 방법으로 선택성을 변화시켰다. 간단히 설명하면, 조효소 결합부위 주변의 아미노산 종류와 결합거리, 결합에 필요한 공간, 표면 전하(표면에 노출된 아미노산에 의한 알짜 전하의 차이, 예를 들면 NADH 와 NADPH 는 인산기에 의한 전하 값이 다르므로 이와 결합하는 아미노산도 산성이나 염기성이냐에 따라 큰 결합력의 차이가 유발됨)를 고려하여 NADPH 결합에 유리한 변이를 합리적으로 도입하였다. 이러한 structure-guided engineering 과정을 통해

조효소 선택성을 성공적으로 변화시켰고, 결합에 의한 구조변화가 유발되어 형광의 차이를 유발하는 SoNar 의 특성은 유지되게 함으로써 iNap 을 제작하게 된 것이다. 유전적인 클로닝과 형질전환 과정을 거쳐 세포 내로 도입된 iNap 이 조효소 결합에 의한 형광변화를 유발함으로써 실시간에 가까운 NADPH 의 정량/거동 이미지를 제공하게 된 것이다.

4) 조효소 결합 형광증진 mBFP 기반 NADPH 의 실시간 정량과 이미징

전술한 것처럼, FILM 과 iNap 기반의 조효소 측정 시스템은 실시간에 가까운 세포내의 조효소 정량과 이미징이 가능한 혁신적인 도구를 제공하고 있다. 이를 바탕으로 조효소 의존적인 대사활성이나 생리현상 연구에 새로운 분석기법으로 활용되고 있으며, 관련된 후속 연구도 꾸준히 진행중인 것으로 알려져 있다. 하지만 아직도 해결해야 할 부분적인 단점들이 존재한다. FILM 의 경우는, 환원된 두 조효소(NADPH 와 NADH) 사이의 완전한 분리(광학 특성이외의 생물학적 혹은 화학적 특성에 기반한)나 구분이 어려운 상황이며, 숙주에 따른 간섭인자의 종류나 환경이 달라, 조건에 따라 분석조건을 정밀하게 조정해야 하는 문제점이 있는 것으로 판단되어 진다. 또한 조효소 자체의 형광(intrinsic fluorescence)을 직접 측정하기에, 양자수율이 낮은 문제로 인한 측정한계가 존재하고, 이에 따른 S/N ratio 의 보정이라는 근본적인 문제를 지니고 있다.

iNap 의 경우는, 리포터로 이용되는 융합단백질의 발현과 접힘과정이 필요해, 통상적으로 maturation time 이라고 알려져 있는 신호응답(형광을 나타내기 까지 걸리는 시간) 지연이 불가피하다. 또한, 숙주의 전사/번역 기작이나 기구에 따라 발현정도의 차이를 극복할 최적조건(조효소양보다 많은 양의 물농도 이상으로 발현)의 탐색이 선결되어야 한다. 부수적인 문제점으로는 숙주의 folding landscape 에 따라 기능적 접힘이 어려운 경우도 존재할 수 있을 것이다. 이러한 문제는 리포터로 사용되어지는 단백질이 2개 이상의 multi-domain 을 지닌 융합단백질인 경우에 일반적으로 나타나는 현상이기 때문이다. 또한, 선택성이 개량된(NADH 에서 NADPH 로) 변이 단백질이 지닌 NADPH 에 대한 친화도(association constant)에 따라 이보다 결합력이나 친화도가 높은 주변 단백질(NADPH 를 조효소로 이용하는 많은 생체 내 단백질)에 의한 간섭도 문제가 될 수 있다. 경쟁적 저해의 일반적인 현상이 생길 수 있기 때문이다. 따라서 이러한 문제점들을 극복하거나 개선된 특성을 보여주는 새로운 시스템, 혹은 대안이 될 수 있는 또 다른 리포터 시스템의 개발에 대한 요구는 상존한다.

상기 문제를 부분적으로 극복한 대안이 될 수 조효소 정량/탐침 이미징 시스템이 최근에 보고된 메타지놈 유래의 새로운 탐침 단백질 mBFP를 이용한 리포터 시스템이다. 알려진 바와 같이, mBFP 는 일반적인 형광단백질들과 달리, 아미노산으로 구성된 형광단(fluorophore)을 지니고 있지 않아, maturation time 이 필요 없다. 또한 형광단의 생성에 필요한 산화과정을 요구하지 않아, 무산소 조건에서도 실시간에 가깝게 조효소를 탐침할 수 있는 새로운 리포터 단백질이다. 더군다나, 단순한 결합만으로 NADPH 자체의 형광을 ~10 배까지 증폭하는 특징을 지닌, SDR(short chain dehydrogenase/reductase) family 단백질의 일종이기에, 단백질의 발현과 접힘에 유리한 분자량이 작은(20-26 kDa) 단백질이다. 따라서 실험실에서 일반적으로 이용하는 다양한 숙주(미생물과 동물세포)에서 고발현되는 유리한 특성을 지니고 있어, 코돈 최적화나 복잡한 최적 발현조건 탐색없이 쉽게 이용할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이러한 특성에 기반한, 동물세포에서의 실시간에

가까운 NADPH 의 탐침이나 이미징에 관련된 논문이 최근에 출간되었다(그림 6).

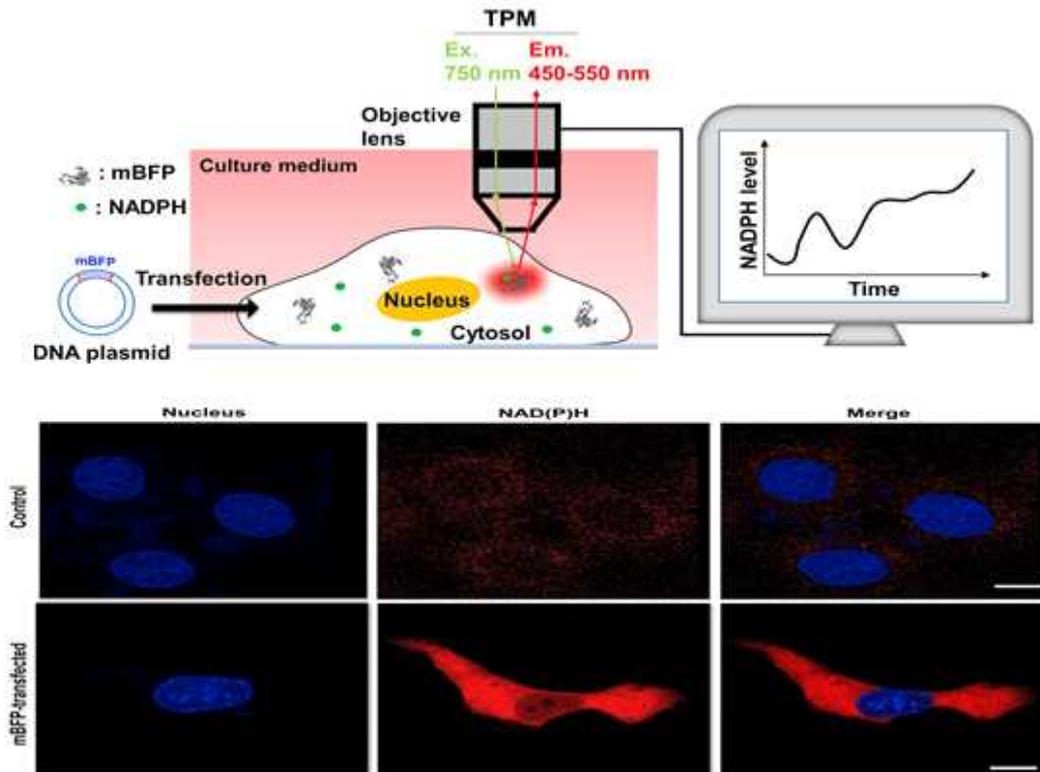


그림 6. 단순결합에 의해 조효소형광을 증진시키는 mBFP 기반 생체 내 NADPH 실시간 탐침. 생체 내로 도입된 유전자의 발현에 의해 조효소를 선택적으로 탐침하는 결과(핵과 세포질의 구분이 분명)를 보여준다.

그림에서와 같이, mBFP 를 암호화한 유전자로 동물세포를 형질전환 한 후, two photon microscope 를 이용해 관찰하면, 생체내에서의 조효소 NADPH 의 변화량을 이미지화해 실시간으로 관찰할 수 있는 기반 기술을 제공하고 있다. 이러한 조효소 flux 의 변화는 포도당의 유입에 의해 해당과정이 일어나면 증가하고, 대사과정을 저해하는 화합물(inhibitor)의 처리에 의해 감소하는 뚜렷한 패턴을 보여준다. 또한 미토콘드리아나 엽록체와 같은 환원된 조효소의 비율이 높은 세포소기관에서의 변화량도 정확히 측정할 수 있어, 일반적인 대사과정은 물론, 암대사, 에너지 생성량, 생합성 증가량에 비례적인 이미지를 보여주는 혁신적인 도구로의 활용이 기대되어 진다. 이러한 과정이 단순한 유전자의 형질전환만으로 구현이 가능하기 때문에, 기존에 문제가 되었던 신호지연이나 조효소와의 친화도(결합력)에 따른 간섭현상을 최소화할 수 있는 장점도 지니고 있음을 알 수 있다. 따라서 특정기질이나 대사물을 제공한 배지를 이용한 세포성장과정에서 생합성(유용 단백질이나 화합물)의 변화량을 실시간으로 계측할 수 있어, 최적의 대사공학 전략수립이나 배지 최적화 과정에 유용하게 활용할 수 있음을 보여주고 있다. 이때 이용한 two photon microscope 의 조사된 파장은 적외선 근처의 파장이라, 비파괴적인(non-invasive) 방법의 장점을 지녀 iNap 과 같은 자외선에 가까운 파장을 이용하는 방법에 비해 세포생리 유지에도 적합하다.

이러한 도구를 세포대사공학을 위한 숙주의 선별이나 특정숙주의 대사생리 모니터링에 실용용한 사례도 이미 발표되었다. 2015년에 Ng CY et al. 등에 의해 발표된 논문(Rational design of a synthetic Entner-Doudoroff pathway for improved and controllable NADPH regeneration. Metab. Eng.)에 따르면 세포 내의 조효소 측정에 문제가 없게 발현된 mBFP 를 이용하여 고생합성 숙주를 설계하는 대사공학과정에 유용하게 이용하였음이 보고되었다. 이 과정은 대사회로의 설계과정에서 생합성에 영향을 줄 수 있는 인자를, mBFP에 의해 증가된 (NADPH 양에 비례적으로)형광에 기반해 FACS 로 선별함으로써 수월하게 발굴한 결과를 보여주고 있다. 이외에 최근에 발표된 논문 (Goldbeck et al, 2018)에서는 *Corynebacterium glutamicum* 과 *Escherichia coli* 에서 실시간에 가깝게 환원된 조효소 NADPH 를 정량하고 이미지화한 결과를 보고하였다.

3. 맺음말

심도 있는 기초연구나 실용화의 출발점이 되는 원천/기반 기술의 중요성은 아무리 강조해도 지나치지 않다. 특히 합성생물학이 생물학 응용연구의 정점에 선 지금의 시기에서는 더욱 그렇다. 잘 알려진 바와 같이 합성생물학은 일련의 다른 공학연구체계처럼, 표준/규격화된 부품이나 소재를 논리적이며 합리적인 방법으로 유기적으로 통합한 후, 특정 목적에 따라 구동/제어시키는 것을 목표로 한다. 이런 과정에서 가장 필요한 요소가 부품이나 소재를 대상으로 표준화나 규격화의 요소를 지닌 대상을 발굴하는 것이다. 결국, 부품과 소재의 발굴에 필요한 라이브러리 형태의 자원과 이를 대상으로 한 선별전략이 가장 중요한 원천임을 알 수 있다. 이러한 과정에서 고도의 정밀성과 탐침 능력, 그리고 재현성있는 결과를 담보할 수 있는 정량/이미징 시스템이 필요함이 자명하다. 따라서 관련 기술개발에 많은 연구 자원(연구자와 연구비)이 투자되고 있다.

세포 대사과정 중, 에너지 획득에 필요한 산화(이화)과정에 참여하는 산화된 조효소나, 에너지 소비를 지원하는 환원(동화)과정에 참여하는 환원된 조효소는 대사/생리는 물론, 이에 기반한 세포성장이나 분열과정에서서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 시험관 환경이나 생체 내에서 정밀하고 신속하게 이를 탐침하는 과정은 기반/원천 기술로써 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 현재까지 많은 연구결과나 상업적으로 팔리고 있는 제품(kit)들이 이러한 목적에 부합하는 연구도구들을 제공하고 있다. 하지만 방법 각각이 지닌 문제점과 개선점에 관해서도 잘 알려져 있다. 도구나 기법, 장치는 많으면 많을수록 합리적인 결과 도출에 필요한 연구방법과 대조군을 제공할 수 있다. 이러한 과정에서 표준화되고 규격화된 부품이나 소재개발의 platform 이 될 수 있는 계측시스템도 확립될 것이다.

많은 연구결과나 기법, 도구들이 존재함에도 불구하고, 아직 생명현상의 중심원리에 관련된 일단의 central dogma 의 작동원리나 기작, 과정, 결과를 설명하는데 필요한 원천기술은 부족한 상황이다. 특히, off line 시스템이 아닌 on line - 실시간 정량과 탐침, 그리고 이에 기반한 이미징 도구의 개발에 많은 시간이 필요 할 듯하다. 이러한 시스템의 개발과 확립과정을 통해, 잠재력이 큰 결과물의 도출이 합성생물학을 통해 가능해 질 것이다.

4. 참고문헌

1. Blacker, T.S., Mann, Z.F., Gale, J.E., Ziegler, M., Bain, A.J., Szabadkai, G., Duchen, M.R., 2014. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nat. Commun.* 5, 3936.
2. Gelman, S.J., Naser, F., Mahieu, N.G., McKenzie, L.D., Dunn, G.P., Chheda, M.G., Patti, G.J., 2018. Consumption of NADPH for 2-HG synthesis increases pentose phosphate pathway flux and sensitizes cells to oxidative stress. *Cell Rep.* 22 (2), 512-522.
3. Goldbeck, O., Eck, A.W., Seibold, G.M., 2018. Real time monitoring of NADPH concentrations in corynebacterium glutamicum and Escherichia coli via the genetically encoded sensor mBFP. *Front. Microbiol.* 9 (2564).
4. Gray, S.P., Di Marco, E., Okabe, J., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Montezano, A.C., de Haan, J.B., Koulis, C., El-Osta, A., Andrews, K.L., Chin-Dusting, J.P., Touyz, R.M., Wingler, K., Cooper, M.E., Schmidt, H.H., Jandeleit-Dahm, K.A., 2013. NADPH oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Circulation* 127 (18), 1888-1902.
5. Hwang, C.S., Choi, E.S., Han, S.S., Kim, G.J., 2012. Screening of a highly soluble and oxygen-independent blue fluorescent protein from metagenome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419 (4), 676-681.
6. Kupfer, D., Munsell, T., 1968. A colorimetric method for the quantitative determination of reduced pyridine nucleotides (NADPH and NADH). *Anal. Biochem.* 25, 10-16.
7. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schulz, D.W., Rock, M.K., 1961. The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling. *J. Biol. Chem.* 236, 2746-2755.
8. Patra, K.C., Hay, N., 2014. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39 (8), 347-354.
9. Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E., Ghigo, D., 2012. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* 53(3), 421-436.
10. Roshanzadeh, A., Kang, H., You, S.H., Park J., Khoa N.D., Lee, D.H., Kim, G.J., Kim, E.S., 2019. Real-time monitoring of NADPH levels in living mammalian cells using fluorescence-enhancing protein bound to NADPHs. *Biosens. Bioelectron.* 146, 111753.
11. Sallin, O., Reymond, L., Gondrand, C., Raith, F., Koch, B., Johnsson, K., 2018. Semisynthetic biosensors for mapping cellular concentrations of nicotinamide adenine dinucleotides. *Elife* 7.
12. Seo, P.W., Jo, E.S., You, S.H., Cheong, D.E., Kim, G.J., Kim, J.S., 2019. Structure-Guided Generation of a Redox-Independent Blue Fluorescent Protein from mBFP. *J. Mol. Biol.* 431 (17), 3191-3202.
13. Sies, H., Akerboom, T.P.M., Tager, J.M., 1977. Mitochondrial and cytosolic

- NADPH systems and isocitrate dehydrogenase indicator metabolites during ureogenesis from ammonia in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 72 (2), 301-307.
14. Smolke, C., 2009. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Tools and Applications*. CRC Press.
 15. Tao, R., Zhao, Y., Chu, H., Wang, A., Zhu, J., Chen, X., Zou, Y., Shi, M., Liu, R., Su, N., Du, J., Zhou, H.M., Zhu, L., Qian, X., Liu, H., Loscalzo, J., Yang, Y., 2017. Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism. *Nat. Methods* 14 (7), 720-728.
 16. Tu, J.M., Chang, M.-C., Huang, L.L.H., Chang, C.D., Huang, H.J., Lee, R.H., Chang, C.C., 2014. The blue fluorescent protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1 is a useful reporter for plant research. *Bot. Stud.* 55 (1), 79.
 17. Umemura, K., Kimura, H., 2005. Determination of oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in cell monolayers using a single extraction procedure and a spectrophotometric assay. *Anal. Biochem.* 338 (1), 131-135.
 18. Wu, J.T., Wu, L.H., Knight, J.A., 1986. Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin. Chem.* 32 (2), 314-319.
 19. You, S.H., Lim, H.D., Cheong, D.E., Kim, E.S., Kim, G.J., 2019. Rapid and sensitive detection of NADPH via mBFP-mediated enhancement of its fluorescence. *PLoS One* 14 (2), e0212061.