

## 대사경로 재설계를 통한 유용 화학물질 생산 전략



한국생명공학연구원 윤성호 박사

석유자원의 고갈과 환경문제의 대두는 합성유기화학 (synthetic organic chemistry) 기반의 화학산업으로부터 생산되어 오던 석유화학제품을 보다 환경친화적이고 자원 재사용이 가능한 바이오파이너리 (bio-refinery)에 대한 관심을 불러일으키고 있다. 전통적으로 생물공학에서는 다양한 미생물을 세포공장 (cell factory)로 이용하여 유용 화학물질을 생산하여 왔다. 하지만 미생물 대사는 대부분의 유용화학물질을 대량생산할 수 있도록 진화되어 있지 않기 때문에, 거의 모든 경우의 유용물질 생산 연구에서는 이용 미생물의 대사과정을 생산목적에 맞게 최적화시켜야 한다.

합성생물학(synthetic biology)은 모듈화되고 표준화된 생물부품 (biological part)을 조합하여 새로운 생물장치 (biological device)를 만들려고 한다. 대사공학은 일련의 대사경로 (metabolic pathway)를 최적화하여 생물학적 파이프 (biological pipe)를 구축함으로써 원하는 생산물을 최대한 만들려고 한다 (그림 1). 부품 대 파이프, 장치 대 생산물, 일견 다른 듯 하면서 비슷하기도 한 합성생물학과 대사공학의 연구방법 및 연구분야는 점점 서로의 장점과 기술을 채용하고 있다. 더욱이, DNA 시퀀싱 기술과 DNA 합성 기술의 비약적인 발전으로 다양한 생물부품을 값싸고 쉽게 제작할 수 있게 됨에 따라, 현재의 대사공학은 그동안 생물학적으로 합성 불가능했던 물질 생산에도 도전하고 있으며, 생산 수율 (product yield) 향상 뿐 아니라, 여러 배양 조건에서 대사 및 조절 작용을 제어(control)하려 하고 있다.

대사공학연구에서의 주요 목표 중 하나는 생산균주의 대사경로 최적화를 통한 생산수율(product yield)의 극대화이다. 자연적인 대사경로는 전사인자(transcription factor), 프로모터와 같은 수많은 조절 시스템(regulatory system)에 의해 제어되고 있기 때문에 대사경로 최적화를 위해서는 전사, 번역, 대사회로의 동역학(kinetics)의 정량적인 이해가 요구된다. 즉, 최종적으로 원하는 생산물로의 대사흐름 (metabolic flux)을 최대한으로 하기 위해서 미생물 내 조절 시스템을 변경하여야 한다. 대부분의 대사공학 연구에서는 특정 대사효소의 발현량을 증가시키거나, 원하는 대사경로와 경쟁하는 경로를 제거하기 위해 관련 유전자를 절단(gene knockout)하는 방법을 이용하여 왔다. 하지만, 많은 경우 이러한 시도는 필수적인 대사물질을 감소시키거나 독성 대사산물을 생성시켜 세포성장을 저해함

으로써, 전체적으로 보면 오히려 생산수율을 감소시킬 수 있다. 근본적으로 대사경로 최적화는 다변수 최적화 문제로서 목적 생산물에 이르는 단 하나의 대사흐름 조절 단계 (rate controlling step)만이 존재하는 것이 아니기 때문이다. 궁극적인 대사공학 접근방법이란 전체 대사경로의 정량적인 이해를 통해 컴퓨터로 대사 및 조절 경로를 디자인하고, 여러 합성생물학 툴을 이용하여 관련된 여러 대사효소들의 발현량을 조절함으로써 세포 공장을 구현하는 것이다. 본 기고에서는 대사경로 재설계를 통한 유용 화학물질 생산 전략에 대해 알아보하고자 한다.

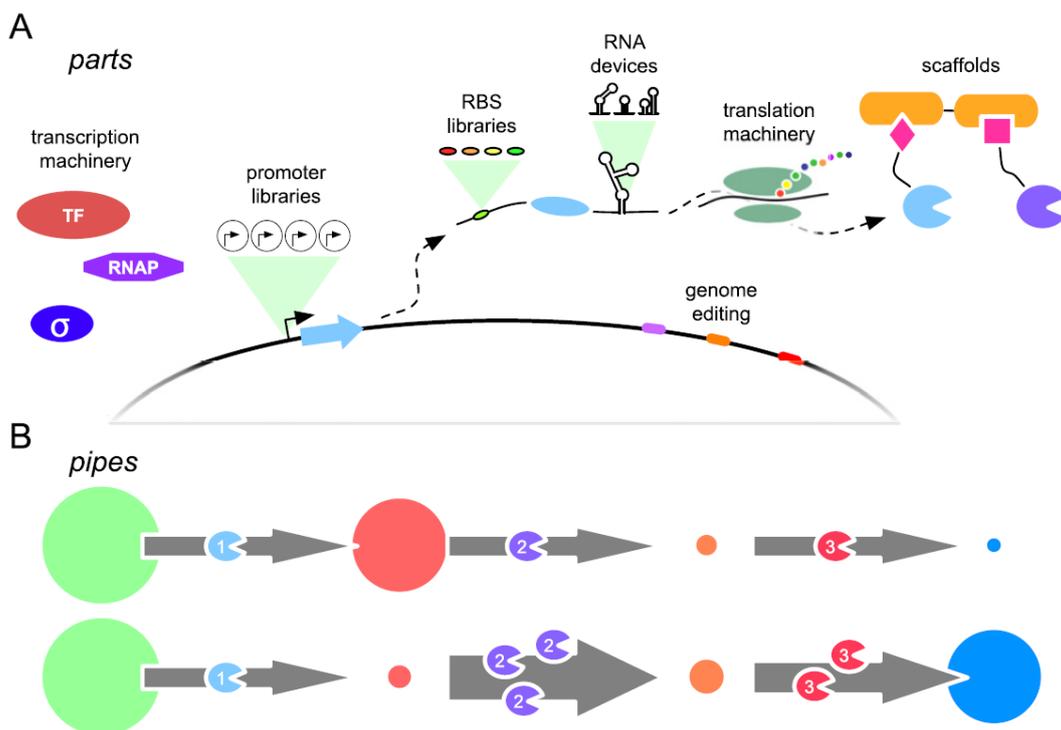


그림 1. 대사경로 최적화를 위한 부품과 파이프 (A) 합성생물학에서는 대사흐름을 제어하기 위하여 전사요소(transcription machinery), 대사효소 유전자의 프로모터, ribosome binding site(RBS), 번역 요소 (translation machinery)를 정밀 조절할 수 있는 부품을 개발한다. (B) 대사공학에서는 이러한 합성생물학 부품을 이용하여 최종생산물질로의 대사흐름을 최대화할 수 있도록 파이프를 구성한다. 일반적으로 이러한 파이프에서는 중간 단계의 효소 발현량을 증가시키고, 중간 대사산물의 축적은 감소시킨다. [Image from (Boyle and Silver 2012)]

### 돌연변이법에 의한 생산균주 개발

대사공학 연구에서 원하는 특성을 갖는 균주를 개발하기 위하여 유전자 돌연변이 (mutagenesis)에 많이 의존하여 왔다. 이는 합리적 설계 (rational design)에 대비되는 개념으로, 미생물 내 대사회로나 조절 기작에 대한 정보가 부족할 때, 유일하게 쓸 수 있는 방법이다. 돌연변이법에 의한 균주개발의 성공 여부는 생성될 수 있는 돌연변이 균주의 라이브러리 수와 더 중요하게는 대용량 선별방법 (high throughput screening)의 존재하느냐

에 달려 있다. 예를 들어, 1000 개의 유전자 중 4개만 돌연변이를 도입한다 해도  $1000C_4$ , 약  $4 \times 10^{10}$  에 달하는 mutant가 생성될 수 있어야 한다.

최근에 합성생물학 연구에서 개발된 돌연변이 도입방법은 균주의 대사정보를 돌연변이 유도에 적용하여 원하는 특성을 가진 돌연변이 라이브러리를 만드는 데 중점을 두고 있다. Global Transcription Machinery Engineering (gTME) 은 전사개시에 관련된 유전자들에만 선택적으로 돌연변이를 도입함으로써 전체 유전자의 상대적인 전사속도를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, *S. cerevisiae*의 TATA-binding protein에 돌연변이를 주어 원 균주보다 20% 균체성장이 향상된 에탄올 내성 균주를 찾아 내었다 (Alper et al. 2006). 돌연변이를 도입할 유전자들을 어느 정도 알고 있다면, 다중 자동화 유전 설계 (Multiplex Automated Genome Engineering (MAGE)) 방법으로 동시에 유전체 내 여러 군데에 mutation을 도입할 수 있다 (그림 2). 대장균에서 lycopene 생산균주를 개발하기 위하여, MEP 경로 내의 모든 유전자들의 RBS 염기서열을 조합적으로 변형시킴으로써 단시간 내에 lycopene을 대량으로 생산할 수 있는 균주를 개발할 수 있었다 (Wang et al. 2009).

이러한 조합적 돌연변이 방법은 원하는 특성을 가진 균주를 개발하는 데 유용한 방법임에는 틀림이 없지만, 대용량 선별방법이 존재하지 않을 경우 사용에 제한이 있다. 즉, 에탄올 내성 균주는 에탄올이 포함된 배지에서 빠른 성장을 보이거나, lycopene 생산 균주는 색깔 변화로 대용량으로 선별할 수 있다. 하지만, 대부분의 대사과정에 관련된 유전자들에 변형이 오면, 균체 성장이 저해 되거나, 생산물이 과량 축적되었음을 판별할 수 있는 기준이 모호할 때는 조합적 돌연변이 방법은 이용되기 어렵다. 또한, 원하는 생산물이 많이 생산하는 균주를 찾았다 해도 균체 성장이 저해되는 경우가 많아 여러 번의 실험을 반복하여야 하며, 균체 성장과 생산능이 모두 우수한 균주를 찾기란 매우 어렵다는 단점이 있다.

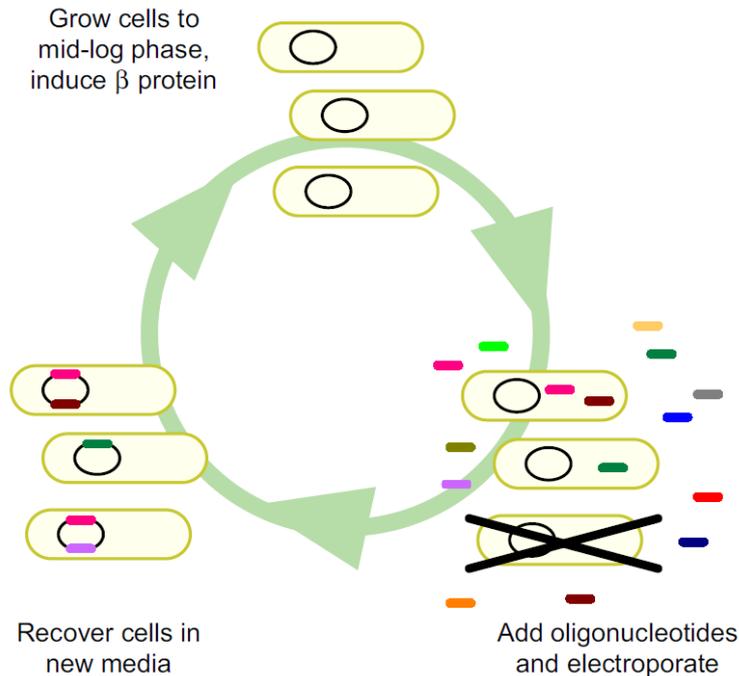


그림 2. Multiplex Automated Genome Engineering(MAGE). [Image from (Boyle and Silver 2012)]

### 대사회로의 모듈화를 통한 대사회로 최적화

대사 네트워크를 일련의 개별적인 모듈(module)로 구조화함으로써 복잡한 조절작용을 피하고, 관련 효소의 발현량을 보다 쉽게 조절할 수 있다. 예를 들어, 다변수 모듈화 대사공학 (Multivariate modular metabolic engineering, MMME)을 이용하여, 일련의 대사과정에 속한 효소 유전자들을 비슷한 전환속도 (turnover)를 갖는 유전자들끼리 그룹핑하고, 각 그룹별로 발현량을 조절함으로써, 원하는 대사흐름을 보다 쉽게 최적화시킬 수 있다. 그 대표적인 예로 대장균에서의 taxane 생산 연구를 들 수 있는데 (Ajikumar et al. 2010), 2-methyl-(D)-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway에 관련된 유전자들을 두 개의 오페론으로 모듈화하고, 각 오페론의 발현량을 프로모터 세기와 플라스미드 복제수 (copy number)로 조절함으로써, 기존 taxane 생산량을 15,000 배 높일 수 있는 최적의 대사회로를 구축할 수 있었다 (그림 3).

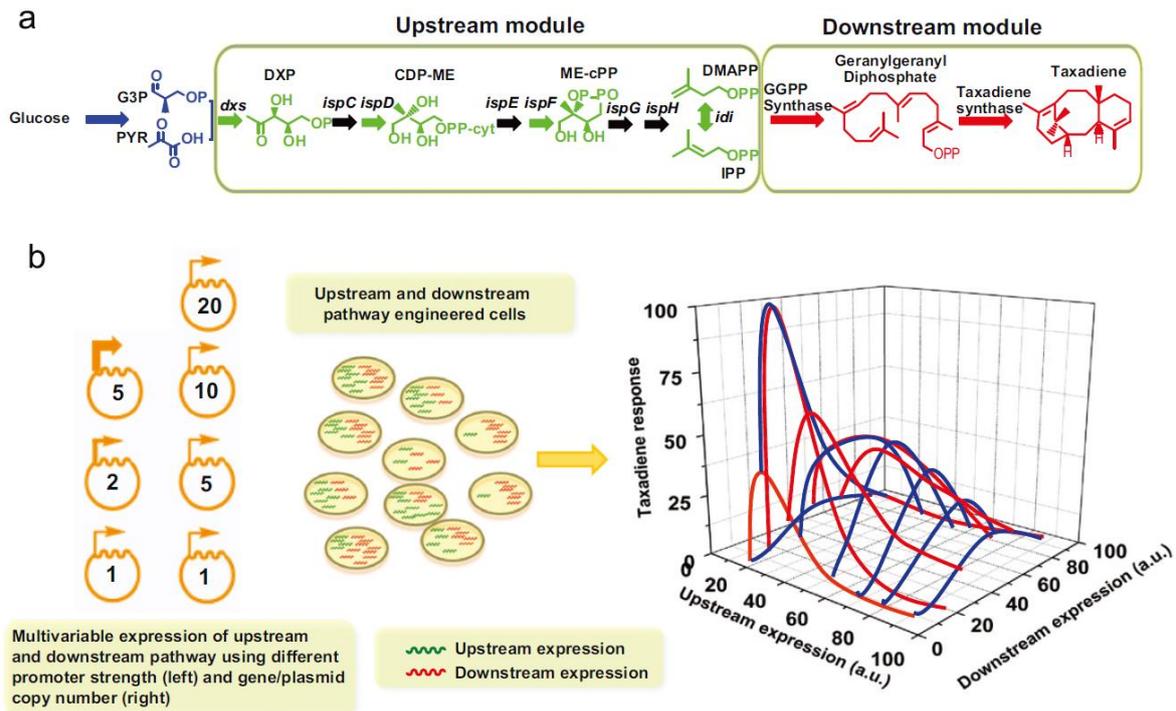


그림 3. 다변수 모듈화 기법 (Multivariate modular metabolic engineering, MMME)을 이용한 taxadiene 생산의 최적화 (a) glucose에서 taxadiene에 이르는 MEP 경로를 upstream module (G3P와 pyruvate부터 DMAPP와 IPP까지)와 downstream module (DMAPP와 IPP 부터 Taxadiene)의 두개로 모듈화하고, 관련 유전자를 오페론으로 구조화함. (b) 각 오페론의 발현을 프로모터 세기와 플라스미드 복제 수로 조합하여 최적의 taxadiene 생산량을 얻음. [Image from (Yadav et al. 2012)]

대사경로의 모듈화를 통한 유용물질 생산의 또 다른 예로는 대장균에서의 말라리아 치료제 전구체인 amorphadiene 생산을 들 수 있다 (Pitera et al. 2007). 초기 대사물질인 mevalonate와 farnesyl pyrophosphate (FPP)를 합성하기 위해 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)와 대장균 유래의 유전자들을 두 개의 오페론 (operon, 하나의 promoter에 의해 하나의 mRNA로 전사되는 일련의 인접한 유전자들)으로 구성하였다 (그림 4). FPP는 *Artemisia* 유래의 amorphadiene synthase (ads)와 cytochrome P450 monooxygenase (p450)에 의해 artemisinic acid로 전환되고, 이는 기존의 화학반응공정으로 artemisinin으로 전환될 수 있다. 중간 대사산물들의 과량 축적으로 인한 균체성장 저하, 외래 유전자의 발현 감소, 일련의 유전자들의 불균형한 발현 등을 막기 위해 외래 유전자들의 codon 최적화, 오페론 유전자들 사이의 염기서열 (intergenic region)을 변형, 세포 내 산화환원력 (redox potential)의 균형, transcriptome 분석을 통한 세포 내 stress원인 규명, 도입된 plasmid의 안정성 향상 (segregational stability) 등의 다양한 노력들이 최근까지 이루어지고 있다.

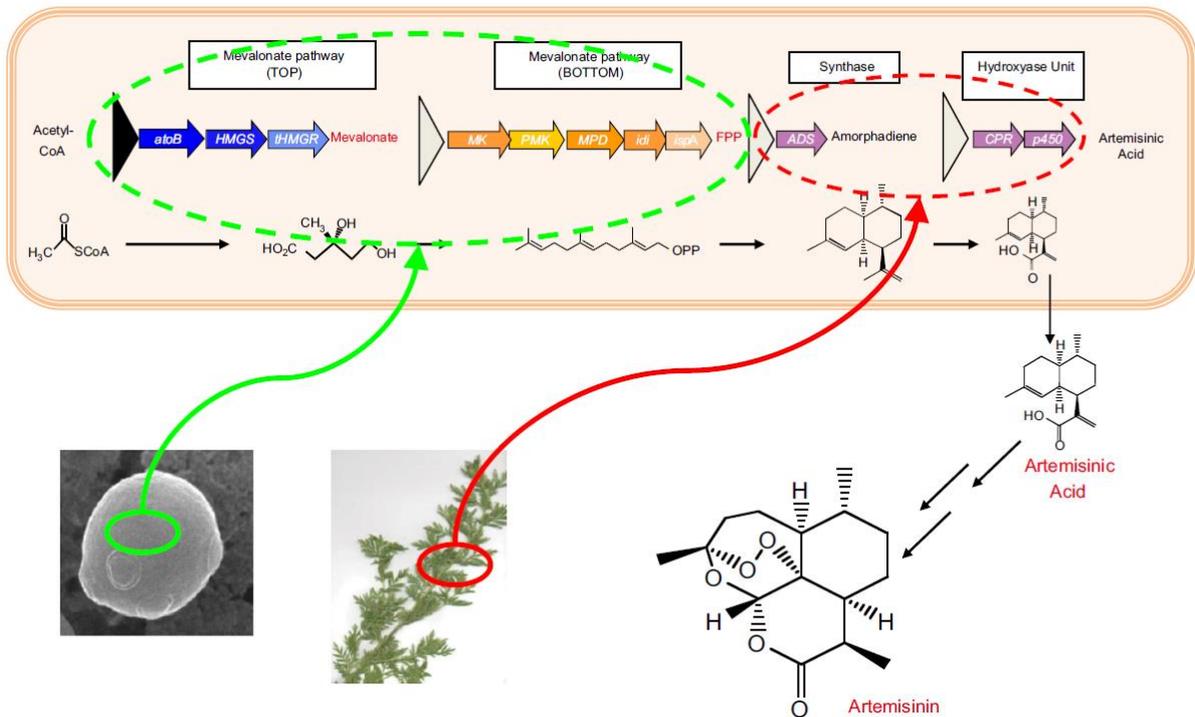


그림 4. 대장균에서의 대사회로 모듈화를 통한 말라리아 치료제 전구물질 (artemisinic acid)의 생산 [Image from (Keasling 2012)]

상기의 예와 같이, 모듈화를 통한 대사경로 최적화는 최적화할 유전자 발현 개수를 획기적으로 줄임으로써 테스트하여야 할 재조합 균주 수를 줄일 수 있다. 더 나아가서 모듈화된 오페론은 안정적인 발현을 위해 플라스미드 형태보다는 염색체에 삽입되는 것이 바람직하며, 중간대사산물이 공간적으로 인접하게 생산될 수 있도록 protein scaffold로 관련 효소를 하나의 지지체에 모을 수 있다.

### 생체네트워크의 모델링과 시뮬레이션을 통한 대사회로 재설계

합성생물학의 중요한 특징 중 하나는 만들어질 유기체를 컴퓨터 상에서 미리 모델링하고 그 결과를 가상 시뮬레이션함으로써 최적의 생물시스템을 디자인한다는 것이다. 이러한 디자인 개념은 기존 생물학이나 생물공학에서는 거의 활용되지 않았던 것이지만, 근래 들어 합성생물학의 비약적 발전에 힘있어, 유전자 합성과 유전체 조작이 용이해지고, 다양한 분자조절 기구가 개발됨에 따라 점점 그 활용 가능성이 증대되고 있다. 다양한 오믹스 데이터를 기반으로 생산균주의 대사 및 조절 네트워크 모델을 구축하고, 이를 이용하여 시뮬레이션을 통해 제거, 증폭시킬 유전자를 찾아냄으로써 세포 내 전체 네트워크를 세포공장에 맞게 재구성할 수 있다.

지금까지 개발된 많은 생체반응 모델링 기법 중 실제 생물공정 개발에 이용되는 것은 유전체 수준의 대사 네트워크를 재구성하고 생화학적, 환경적 제약을 부과하여 시

물레이션을 통해 대사흐름을 분석하는 기법이다. 가령 인위적으로 세포 내 대사회로를 바꾸기 위해 특정 유전자를 제거하거나 새로운 유전자를 도입하였을 때의 영향을 미리 in silico로 예측함으로써 목적 대사회로와 유전자의 선택이 컴퓨터 상에서 가능해지고 최적화된 배양환경을 제시할 수 있어 실제 실험에 드는 시간·노력과 비용을 획기적으로 줄일 수 있다. 대사흐름 최적화 기법으로 여러 목적에 따라 다양한 방법들이 개발되어 왔다. 최적화 기법 자체로는 flux balance analysis, MOMA 등이 있고, 제거되어야 할 대사과정을 찾기 위해 OptKnock, OptForce 등을 이용할 수 있으며, 증폭되어야 할 대사과정은 FSEOF, EMILiO 으로 찾을 수 있다. 또한, 지금도 새로운 방법론들이 계속 제시되고 있다. 이렇듯 많은 대사 네트워크 시뮬레이션 기법은 모두 대사 과정을 표현한 대사 네트워크 반응계수행렬 (stoichiometric coefficient matrix)을 기반으로 하기 때문에 그 예측능은 대사 네트워크가 실제 균주의 모든 대사과정을 얼마나 반영하느냐에 달려 있다.

유전자 조절 네트워크(gene regulatory network, GRN)는 시공간적으로 (spatiotemporally) 세포 내 생리작용(cellular physiology)을 조절하여 자원 활용을 최적화하고, 유전정보를 통합하여 다양한 환경 변화에 유기체가 적응하여 살아갈 수 있도록 해준다. 거의 모든 유기체는 외부환경과 끊임없이 반응하고 소통하기 위해 조절네트워크가 환경에 따라 변화하기 때문에, 유기체의 조절네트워크의 특성 및 거동 예측은 균주 개량에 매우 유용하게 이용될 수 있다. 따라서, 유전자 조절 네트워크를 대사 네트워크와 통합시킬 경우, 생산균주의 거동을 보다 정확히 예측할 수 있어, 유용화학물질 생산에 관련된 유전자들이 어떠한 메커니즘으로 조절, 발현되는 지에 대한 단서를 제공할 수 있기 때문에 보다 정확한 균주 디자인을 기대할 수 있다. 하지만, 조절 네트워크(transcriptional regulatory network)에서 transcription factor가 cis-regulatory element에 결합하여 해당 유전자 서열이 mRNA로의 발현으로 이어지는 데 수 분(minute)이 걸리는데 반해, 대사 네트워크 (metabolic network)는 효소의 빠른 turnover로 인해 sub-second 단위에서 작동한다. 즉, 대사과정과 조절과정은 반응시간이 다르기 때문에 이 둘을 하나의 모델로 통합하는 데 어려움이 있다. 현재 두 네트워크의 통합으로 제시된 방법으로는 transcription factor의 유전자 발현 (gene activity)을 세포내외의 환경에 따라 on/off의 Boolean 규칙으로 두고, 대사회로 상의 효소유전자들의 발현유무를 정하고 FBA를 수행하는 Regulatory FBA (rFBA) (Herrgard et al. 2006), transcription factor의 조절여부를 확률적으로 표현한 Probabilistic Regulation of Metabolism (PROM) (Chandrasekaran and Price 2010)등이 개발되었다.

## 결어

대사공학(metabolic engineering)은 미생물을 우리가 원하는 특성을 갖도록 조작하는 연구 분야로서, 특히, 자연계 내의 미생물을 유용 화학물질을 고효율로 생산할 수 있는 공장으로 바꾸어 왔다. 지금까지의 대사공학에서는 시행착오 방식의 유전자 재조합 기술을 통한 유용물질의 과량생산이 일부 가능했지만, 대부분의 경우 돌연변이에 의한 유기체의

성장능력저하, 부산물의 과량생산 등의 예상치 못한 부작용도 발견됐다. 또한 이러한 접근방법은 막대한 돈·시간·인력을 투입해야 하므로 가격경쟁력을 떨어뜨려 생명공학과 의약산업에 필수적인 효율적이고 신속한 신물질 개발에 적합하지 않다. 따라서 더욱 효율적인 방법으로 미생물의 대사특성을 개량하는 방식이 요구되며, 원하는 대사물질 생산을 위한 계획적이고 조직적인 전략 수립이 필요하다. 본문에서 기술하였듯이, 세포공장을 디자인하기 위해서, 가상세포 기술을 이용하여 목적 유전자를 찾아내거나, 대사 회로를 모듈화하여 전체 대사 네트워크를 정밀 조절할 수 있다. 이를 통해 궁극적으로는 Bio-CAD를 이용한 세포공장 설계가 가능할 것이다 (윤성호 2013). 하지만, 대용량 돌연변이 방법과 실험진화 기법은 세포공장 설계에서 우리가 고려하지 못한 요인들을 찾아낼 수 있다. 따라서, 균주 디자인과 돌연변이 방법, 실험진화를 적절히 융합한 비합리적으로 합리적인 접근방법 (irrationally rational approach)이 동원되어야 할 것이다.

## 참고문헌

1. Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G. 2010. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 330: 70-74.
2. Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. 2006. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* 314: 1565-1568.
3. Boyle PM, Silver PA. 2012. Parts plus pipes: synthetic biology approaches to metabolic engineering. *Metabolic engineering* 14: 223-232.
4. Chandrasekaran S, Price ND. 2010. Probabilistic integrative modeling of genome-scale metabolic and regulatory networks in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 17845-17850.
5. Herrgard MJ, Lee BS, Portnoy V, Palsson BO. 2006. Integrated analysis of regulatory and metabolic networks reveals novel regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* 16: 627-635.
6. Keasling JD. 2012. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metabolic engineering* 14: 189-195.
7. Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD. 2007. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 9: 193-207.
8. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. 2009. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* 460: 894-898.
9. Yadav VG, De Mey M, Lim CG, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. 2012. The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metabolic engineering* 14: 233-241.