

식물 유래의 terpene계 고부가 바이오 화합물 생산을 위한 미생물 개량에 대한 연구 동향

한국화학연구원 바이오화학연구센터 이주영 (박사), 김재응 (박사), 손소희 (박사과정)

1. 개요

Terpene은 지구상에 존재하는 모든 천연물 중 가장 큰 비중을 차지하는 천연 화합물로서, 5만개 이상의 다양한 형태로 자연계에 존재한다. 자연계에 존재하는 대부분의 terpene계 화합물은 식물에서 얻어지며, 액체 연료로서의 잠재력을 가지는 것은 물론 식품, 제약, 화장품 산업에 응용될 수 있어 산업체들의 이목을 집중시키고 있다. 미생물을 이용한 terpene계 화합물의 생합성은 기존의 식물에서 추출하는 방식이 가진 소요 시간 대비 낮은 수율의 단점을 보완할 수 있는 최적의 생산 시스템으로 주목받고 있다. Terpene계 화합물은 mevalonate (MEV) 또는 non-mevalonate pathway (DXP)에서 파생된 C5 이소프렌을 기본 구성 요소로 하여 합성된다. 합성된 terpene계 화합물은 탄소의 개수에 따라 hemiterpenes (C5), monoterpenes (C10), sesquiterpenes (C15), diterpenes (C20), triterpenes (C30), tetraterpenes (C40)로 분류될 수 있다 (그림 1). 이러한 terpene계 물질은 Cytochrome P450 oxygenase (CYP)을 통한 산화반응과 glycosyltransferase (GT)를 통한 당화 반응을 통해 더욱 다양한 형태로 변화될 수 있다.

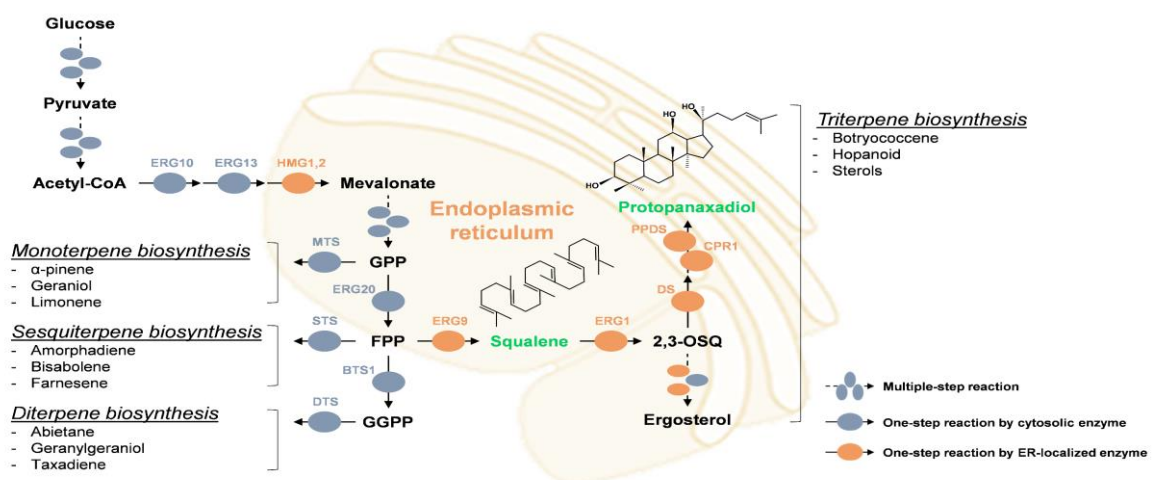


그림 1. 효모 세포 기반의 미생물을 이용한 terpene 생합성 경로
(Kim et al. *Metabolic Engineering* 2019)

현재 미생물을 이용한 terpene계 화합물의 생합성은 기존에 보고되고 알려진 특정 terpene계 화합물에 한정되어 있지만, 전산 생물학, 유전체학, 전사체학 등 다양한 바이오 Tech 기술의 발전과 함께 기존의 한계를 뛰어넘어 새로운 terpene계 화합물의 생합성을 가능하게 하는 연구들이 다양하게 시도되고 있다. 특히 식물 유래의 terpene계 화합물 생합성을 대체하고 새로운 terpene계 화합물의 생합성을 위해 효모와 박테리아를 생산 host로 이용한 연구들이 대표적이다. 그 중 효모는 terpene 생합성에 필요한 MEV 대사 경로와 endoplasmic reticulum(ER, 소포체)을 내재적으로 보유하고 있어 복잡한 terpene계 화합물의 생합성에 최적화된 미생물로 입증되었다. 박테리아를 이용한 terpene계 화합물의 생합성은 최근 성공 사례가 보고되었지만 여전히 식물 유래 CYPs 발현에 한계를 지니고 있다. 따라서 본 동향 보고서에서는 새로운 terpene 생합성 경로의 발굴과 미생물에서의 발현과 활성 정도, 식물 유래의 CYP와 GT를 활용한 다양한 terpene 계열의 화합물 생산의 확대 가능성에 관한 최근의 연구 성과들을 고찰해 보고자 한다.

1-1. 새로운 terpene 생합성 경로 발굴을 위한 Omics 연구의 활용 사례

식물 분비모의 추출물을 이용한 전사체 분석 연구에서 terpene과 대마 성분의 카나비노이드 (*Cannabis sativa*) 생합성에 관련된 유전자가 식물 분비모에서 과발현된다는 사실이 발견되었다. 이에, 최근 연구에서는 terpene과 카나비노이드를 합성하는 단백질 중 terpene 생합성에 관련된 단백질을 특정하기 위해 서로 다른 9개의 상업용 대마초 생산종에서 분비모의 전사체를 확보했다. 또한, *C. sativa*의 계통 분류 분석을 통해 24개의 O-methyltransferase와 aromatic prenyltransferase로 추정되는 8개의 단백질이 발견되었는데, 그 중 하나는 카나플라빈 A와 B의 생합성에 관련된 생합성효소로 밝혀졌다. 더불어, 여러 종류의 흡의 분비모에서 추출된 cDNA library에서 22,000개 이상의 발현 서열 꼬리표 (Expressed sequence tags, ESTs)를 확인하였고 이 정보는 TrichOME database에 저장되었다. 저장된 전사체의 정보는 천연물 생산 경로를 밝혀내기 위한 연구의 중요한 자료임과 동시에, 미생물을 이용한 다양한 terpene 생합성 연구 개발의 가능성을 높이고 있다.

1-2. 미생물에서의 terpene 생산을 위한 외래 유전자 발현 시스템의 개발 사례

최근 몇 년 동안 대마초와 홉 유래의 terpene 생산에 중요한 진전이 있었다. 지난 2018년에는 산업용 양조 효모가 개발되어 홉을 사용하지 않는 맥주 생산 기술이 등장하였다. 해당 효모는 대사 공학 기술과 수학적 모델을 기반으로 디자인된 유전 공학 기술인 design-build-learn-test cycle의 접목을 통하여 개발되었다. 개발된 효모는 맥주 생산에 적합하도록 형질 전환되어 당을 에탄올로 전환하는 능력을 유지하면서도 맥주의 맛을 결정 짓는 monoterpene계열의 linalool과 geraniol의 안정적인 생산을 유지하게 설계되었다. 카나비노이드의 경우, 두 전구체인 olivetolic acid와 geranyl pyrophosphate로부터 aromatic prenyltransferase을 통해 cannabigerolic acid가 생성된다. 이와 같이 생합성된 cannabigerolic acid는 여러 반응을 거쳐 tetrahydrocannabinolic acid (THCA), cannabidiolic acid (CBDA), 그리고 cannabichromenic acid (CBCA)과 같은 다양한 카나비노이드계 화합물로 전환된다. 최근에는 효모와 당을 이용해 THCA와 CBDA를 성공적으로 생산했다는 연구가 보고되었다. 또한, 형질 전환된 효모에 대사에 필요한 hexanoic acid의 유사체를 제공함으로써 비천연(unnatural) 카나비노이드계 화합물을 생산하는데 성공했다. 또 다른 연구에서는 맥주 고유의 쓴 맛을 결정짓는 β -bitter acid 생합성에 필요한 모든 단계의 대사 경로가 효모 시스템에서 구현될 수 있음을 보여주었다. 상기 연구에서는 식물 유래 terpene계 화합물의 생합성 경로를 효모 내에서 성공적으로 구현하고 성능을 높이기 위해 돌연변이 분석(mutagenesis analysis)이 핵심 tool로 사용되었다.

외래 유전자의 발현을 필요로 하는 미생물을 이용한 terpene 생산에서 비촉매성 foldase와 chaperone은 핵심 연구 전략 중 하나이다. THCA와 CBDA는 불안정하여 비효소적 반응을 통해 decarboxylated 형태로 변형되기 쉽다. 이러한 변형을 막기 위해, THCA 및/또는 CBDA와 결합한다고 알려진 촉매 활성이 없는 isomerase와 유사한 단백질인 CsaHIL을 발현하여 해당 물질을 기질로 사용하는 촉매 반응을 설계할 수 있다. 또한, 여러 foldase와 chaperone의 upregulation을 통해 미생물에서 THCA의 생산이 20배 가량 증가한 연구 결과를 비롯해 효모 균주에서 CPR5 chaperone 단백질의 과발현을 통해 외래 단백질 발현 시스템을 개선시켜 tetraterpenes의 생산을 5배 가량 증가시킨 연구 결과가 보고된 바 있으며 (그림 2), 이는 미생물을 이용한 terpene 생산의 최적화에 있어서 유망한 전략으로 평가되고 있다.

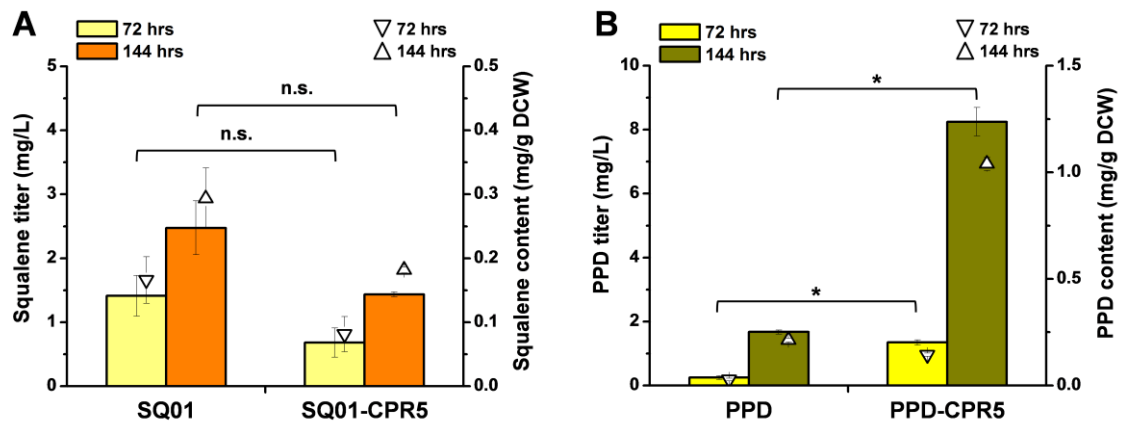


그림 2. 외래 단백질 발현 시스템의 개선을 통한 스쿠알렌 (A) 생산량 변화와 프로토파낙시디올 (B) 생산량 증가 (Kim et al. *Metabolic Engineering* 2019)

1-3. 미생물의 cytochrome P450 oxygenase 기능 최적화

미생물을 이용한 terpene 생합성 기술은 특성이 파악된 terpene 생합성 효소와 terpene을 다양화시키는 데에 관여하는 CYP와 GT 효소의 부족으로 발전 속도가 제한되고 있다. 최근 보고된 연구에서는 Terpene 생합성 효소에 의한 한계를 전산 생물학을 통하여 *C. sativa*로부터 55개의 새로운 terpene 생합성효소를 발견함으로써 극복하고자 했다. 또한, CYP 효소는 hydroxylation, ring closure 및 arrangement와 같은 반응을 통한 terpene계 화합물의 다양성을 확보하는데 중요한 원동력으로 여겨지고 있는데, 이러한 CYP 효소들은 대부분 세포 내의 소포체(ER)에 분포하여 terpene 생합성효소의 활성을 돕는다. 하지만 식물에 최적화된 CYP 효소들을 미생물에서 발현하여 효소 활성을 갖게 하는 데에는 많은 어려움이 있다. 특히 ER과 같은 세포 소기관을 가지고 있지 않은 원핵생물에서는 진핵생물에서 CYP 효소와 전자 전달체 사이에 전자를 수송하는 cytochrome P450 reductase (CPR)의 난발현이 주된 장애요인으로 작용한다. 몇몇 연구팀에서는 식물 유래의 CYP 효소와 세포막 단백질을 융합시켜 CPR 효소와 함께 발현함으로써 CYP 효소 활성을 갖는 대장균 설계에 성공한 바 있다. 이에 반해, *Saccharomyces cerevisiae*와 *Yarrowia lipolytica* 같은 효모의 장점은 대장균과는 다르게 내재된(endogenous) ER 시스템이 있다는 것이다. 이와 같은 장점을 이용하여 *S. cerevisiae* 효모에서 6개의 CYP 효소의 발현을 최적화 시켜 1 g/L 이상의 산화된 casbene을 생산한 연구 결과가 보고된 바 있다.

1-4. 세포 소기관(Subcellular organelle) 개량을 통한 terpene 생산 농도 증가 전략 사례

Metabolic flux를 최적화시키는 기존의 방법에서 탈피하여, 세포 소기관(subcellular)의 형태를 변형시켜 산화된 terpene의 생산을 증가시키는 새로운 패러다임의 전략은 최근 연구에서 그 성공 가능성을 보여주었다. 효모 ER의 크기에 관여하는 조절 인자(regulation factor)인 INO2 단백질을 과발현 시킴으로써, ER biogenesis를 촉진시켜 실제 효모의 ER 사이즈가 증가됨을 확인하였고 결과적으로 ER의 단백질 수용 능력과 단백질 folding 능력이 증가되는 것을 확인하였다 (그림 3). 구체적으로, ER에 국한하여 발현되는 단백질에 형광단백질을 결합하여 해당 능력의 증가를 확인하였으며, 동시에 해당 효모 균주의 성장 효율 증가를 비롯해 스쿠알렌 생산량은 71배, CYP 효소를 매개로 하는 프로토파낙시디올의 생산량은 8배 가량 증가 하였음을 확인 할 수 있었다 (그림 4).

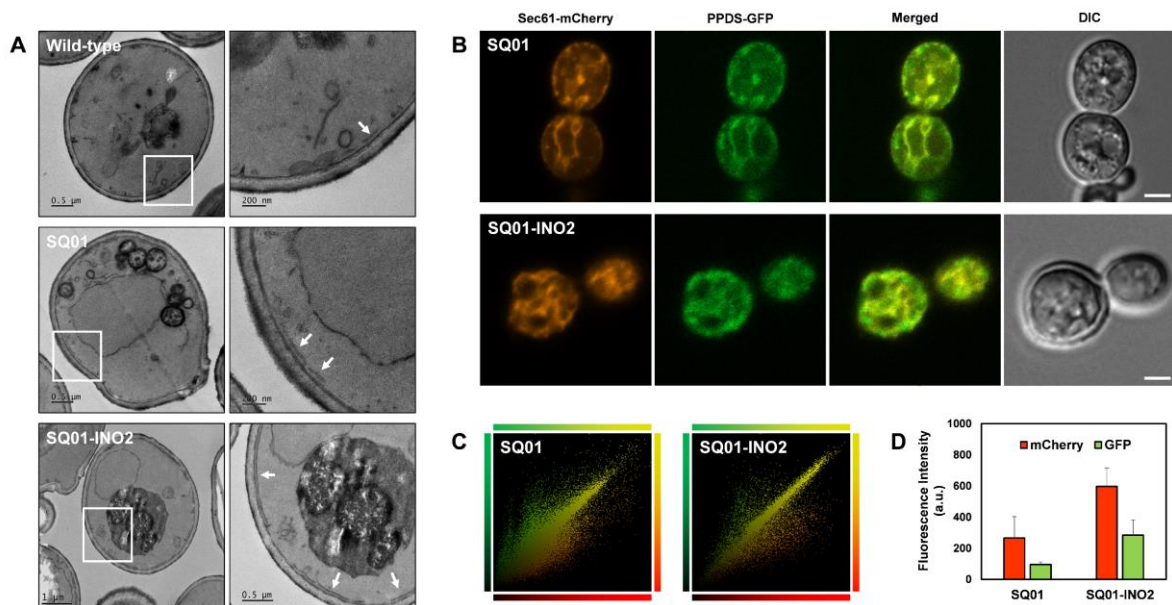


그림 3. 효모 ER 거대화(A)를 통한 단백질 수용 (B & C) 및 folding 능력 (D) 개선
(Kim et al. *Metabolic Engineering* 2019)

또한, 지질 생합성에 관여하는 효소인 PAH1 단백질을 제거한 효모 균주에서 유사한 메커니즘을 통해 비슷한 결과를 나타내었다. 이러한 전략은 β -amyrin과 medicagenic acid 생산에도 적용되어서 각각의 물질의 생산량을 8배, 16배 증가시켰다. 합성생물학의 새로운 패러다임은 미생물 기반의 terpene 생합성에 핵심적인 기술의 진보를 가져옴으로써 다양한 terpene 유도체의 생합성을 위한 효모 균주 개발에 적용 될 수 있을 것으로 예상된다.

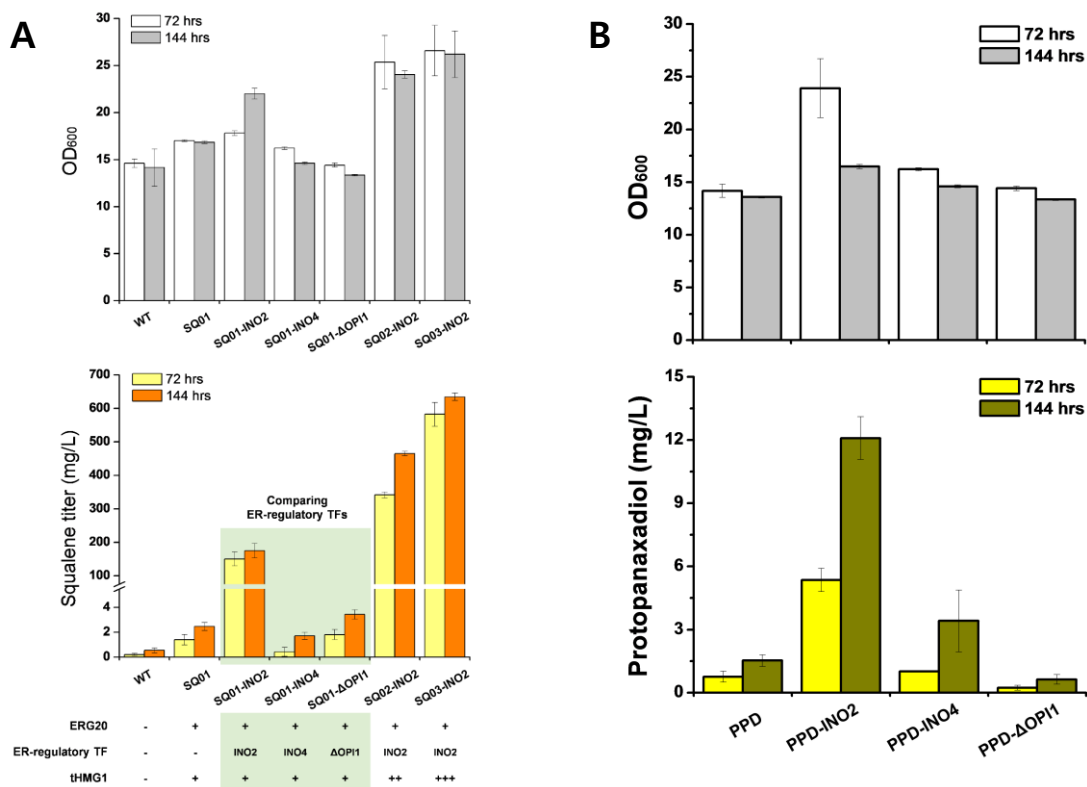


그림 4. INO2 과발현을 통한 스쿠알렌 (A)과 프로토파낙시디올 (B)의 생산량 증가 (Kim et al. *Metabolic Engineering* 2019)

1-5. 생산 host 미생물의 engineering을 통한 타겟 화합물의 축적 능력을 향상시킨 사례

미생물 기반의 terpene 생합성의 또 다른 bottleneck은 생산하고자 하는 물질의 세포 내 축적을 방해하는 독성 혹은 중간 물질의 잠재적인 독성이다. 차세대 바이오 연료 화합물로 주목 받는 sesquiterpene 계열의 bisabolene을 상용화 하기 위해서는 세포 내의 축적률을 높이는 것이 필수적이다. 이에, 세포 내의 지방소립자(lipid droplet)를 개량하여 소수성인 terpene 계열 화합물의 축적을 유도하는 연구가 다양하게 진행중이다. 효모 지방소립자의 재설계는 지방을 소모하는 유전자를 제거하여 triacylglycerol의 과생산 및 축적을 유도하여 세포 내의 지방소립자의 크기를 조절하는 전략을 통해 이루어 진다. 해당 전략을 통해 *S. cerevisiae*에서 acyclic tetraterpene 계열의 lycopene 생산 농도를 2.37 g/L 수준으로 증가시킨 연구 결과가 최근 보고된 바 있다. 또한, 이를 내재적으로 지방 축적 성능이 우수한 효모 균주인 *Yarrowia*에 적용함으로써 지방소립자와 소수성 terpene 계열 화합물의 생산 증가와의 연관성을 입증한 연구 결과 역시 보고되었다. 최근 연구 결과에 따르면 효모의 peroxisome 개량을 통해 전례 없는 높은 수준의 스쿠알렌 생산이 보고되

었는데, 해당 연구는 효모의 peroxisome이 식물의 trichome과 유사한 기능을 수행하기에 가능했던 연구 결과라고 설명하고 있다. Terpene의 생합성에 있어서 효모의 peroxisome이 식물의 trichome과 유사한 환경을 제공한다는 결과는 아직 명확하지 않지만, peroxisome이 효모 내 terpene 생합성의 최적화를 위한 유망한 연구 전략이 될 것으로 전망된다.

마지막으로, 최근 세포 강성(cell stiffness)를 높여 terpene계 물질인 스쿠알렌의 축적을 용이하게 하여 생산량을 높인 연구 결과가 보고되었다. 효모 내 소수성 물질의 과생산은 2중층의 인지질로 구성된 세포막 (cell membrane)에 축적되어 결과적으로 세포막의 특성을 약화시킨다고 보고된 바 있다. 이에, 세포막과 밀접한 관계에 있는 세포벽 (cell wall)의 강성을 높여 약화된 세포막을 보전하는 전략이 적용되었다. 세포벽 조절 인자로 알려져 있는 ECM33 단백질의 제거를 통해 세포벽의 강성을 결정짓는 세포 내의 chitin 함량을 높이고 (그림 5) 그 결과, ECM33 단백질이 제거된 효모 균주에서 스쿠알렌 생산량이 12% 가량 증가한 것을 확인하였다.

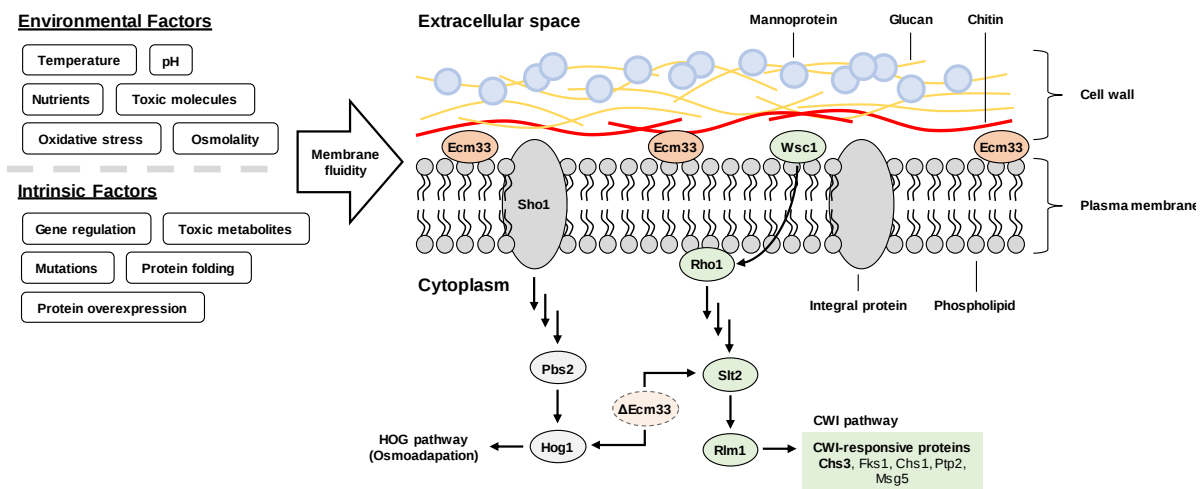


그림 5. 다양한 스트레스 인자로부터 세포벽 재설계를 통한 방어 기작
(Son et al. *journal of agricultural and food chemistry* 2020)

2. 맺음말

미생물 기반의 생합성 기술을 활용하면 식물의 재배, 수확, 추출의 필요성이 줄어들어 경제적인 terpene 생산이 가능해 질 것으로 예상된다. 또한, 미생물을 이용한 terpene 생합성은 환경 친화적이며 천연 및 비천연 terpene계 화합물의 고농축 및 고순도 생산을 가능하게 한다. 미생물에서의 외래 단백질 발현에 관련한 기술의 진보는 향후 연구에 수많은 기회를 제공할 것으로 예상된다. 원핵생물을 이용한 terpene 생합성은 최근 연구들에서 좋은 성과를 거두었지만, 보다 복잡한

terpene 유도체 생합성에는 세포 내에 소포체(ER)를 가지고 있는 효모가 적합한 생산 host로써 향후 관련 연구에 플랫폼 균주로 활용될 것으로 전망된다.

3. 참고문헌

1. Yazaki K, Arimura G-I, Ohnishi T: "Hidden" terpenoids in plants: their biosynthesis, localization and ecological roles. *Plant Cell Physiol* 2017, 58:1615-1621.
2. Urlacher VB, Girhard M: Cytochrome P450 monooxygenases in biotechnology and synthetic biology. *Trends Biotechnol* 2019, 37:882-897.
3. Valliere MA, Korman TP, Woodall NB, Khitrov GA, Taylor RE, Baker D, Bowie JU: A cell-free platform for the prenylation of natural products and application to cannabinoid production. *Nat Commun* 2019, 10:565.
4. Booth JK, Page JE, Bohlmann J: Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *PLoS One* 2017, 12:e0173911.
5. Allen KD, McKernan K, Pauli C, Roe J, Torres A, Gaudino R: Genomic characterization of the complete terpene synthase gene family from *Cannabis sativa*. *PLoS One* 2019, 14: e0222363.
6. Braich S, Baillie RC, Jewell LS, Spangenberg GC, Cogan NO: Generation of a comprehensive transcriptome atlas and transcriptome dynamics in medicinal cannabis. *Sci Rep* 2019, 9:1-12.
7. Zager JJ, Lange I, Srividya N, Smith A, Lange BM: Gene networks underlying cannabinoid and terpenoid accumulation in cannabis 1. *Plant Physiol* 2019, 180:1877-1897.
8. Rea KA, Casaretto JA, Al-Abdul-Wahid MS, Sukumaran A, Geddes-Mcalister J, Rothstein SJ, Akhtar TA: Biosynthesis of cannflavins A and B from *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry* 2019, 164:162-171.
9. Ban Z, Qin H, Mitchell AJ, Liu B, Zhang F, Weng J-K, Dixon RA, Wang G: Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis. *PNAS* 2018, 115:E5223-E5232.
10. Denby CM, Li RA, Vu VT, Costello Z, Lin W, Chan LJG, Williams J, Donaldson B, Bamforth CW, Petzold CJ et al.: Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nat Commun* 2018, 9:965.
11. Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE: A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synth Biol* 2015, 4:975-986.
12. Reider Apel A, d'Espaux L, Wehrs M, Sachs D, Li RA, Tong GJ, Garber M, Nnadi O, Zhuang W, Hillson NJ et al.: A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2017, 45:496-508.
13. Luo X, Reiter MA, d'Espaux L, Wong J, Denby CM, Lechner A, Zhang Y, Grzybowski AT, Harth S, Lin W et al.: Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* 2019, 567:123-126.
14. Welling MT, Liu L, Raymond CA, Kretzschmar T, Ansari O, King GJ: Complex patterns of cannabinoid alkyl side-chain inheritance in cannabis. *Sci Rep* 2019, 9.
15. Xu J, Ai Y, Wang J, Xu J, Zhang Y, Yang D: Converting Simonene synthase to pinene or phellandrene synthases reveals the plasticity of the active site. *Phytochemistry* 2017, 137:34-41.
16. Zirpel B, Degenhardt F, Zammarelli C, Wibberg D, Kalinowski J, Stehle F, Kayser O: Optimization of D9-tetrahydrocannabinolic acid synthase production in *Komagataella phaffii* via post-

translational bottleneck identification. *J Biotechnol* 2018, 272:40-47.

17. Bathe U, Tissier A: Cytochrome P450 enzymes: a driving force of plant diterpene diversity. *Phytochemistry* 2019, 161:149-162.
18. Mitchell AJ, Weng J-K: Unleashing the synthetic power of plant oxygenases: from mechanism to application. *Plant Physiol* 2019, 179:813-829.
19. Song W, Yan S, Li Y, Feng S, Zhang J-J, Li J-R: Functional characterization of squalene epoxidase and NADPH cytochrome P450 reductase in *Dioscorea zingiberensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2019, 509:822-827.
20. Yang H, Liu F, Li Y, Yu B: Reconstructing biosynthetic pathway of the plant-derived cancer chemopreventive-precursor glucoraphanin in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 2018, 7:121- 131.
21. Liu F, Yang H, Wang L, Yu B: Biosynthesis of the high-value plant secondary product benzyl isothiocyanate via functional expression of multiple heterologous enzymes in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 2016, 5:1557-1565.
22. Sevrioukova IF, Li H, Zhang H, Peterson JA, Poulos TL: Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *PNAS* 1999, 96:1863-1868.
23. Wong J, de Rond T, d'Espaux L, van der Horst C, Dev I, Rios- Solis L, Kirby J, Scheller H, Keasling J: High-titer production of lathyrane diterpenoids from sugar by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 2018, 45:142-148.
24. Ro D-K, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J et al.: Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 2006, 440:940-943.
25. Kim J-E, Jang I-S, Son S-H, Ko Y-J, Cho B-K, Kim SC, Lee JY: Tailoring the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum for functional assembly of terpene synthesis pathway. *Metab Eng* 2019, 56:50-59.
26. Arendt P, Miettinen K, Pollier J, De Rycke R, Callewaert N, Goossens A: An endoplasmic reticulum-engineered yeast platform for overproduction of triterpenoids. *Metab Eng* 2017, 40:165-175.
27. Zargar A, Bailey CB, Haushalter RW, Eiben CB, Katz L, Keasling JD: Leveraging microbial biosynthetic pathways for the generation of "drop-in" biofuels. *Curr Opin Biotechnol* 2017, 45:156-163.
28. Zhao C, Kim Y, Zeng Y, Li M, Wang X, Hu C, Gorman C, Dai SY, Ding S-Y, Yuan JS: Co-compartmentation of terpene biosynthesis and storage via synthetic droplet. *ACS Synth Biol* 2018, 7:774-781.
29. Sadre R, Kuo P, Chen J, Yang Y, Banerjee A, Benning C, Hamberger B: Cytosolic lipid droplets as engineered organelles for production and accumulation of terpenoid biomaterials in leaves. *Nat Commun* 2019, 10:853.
30. Ma T, Shi B, Ye Z, Li X, Liu M, Chen Y, Xia J, Nielsen J, Deng Z, Liu T: Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene. *Metab Eng* 2019, 52:134-142.
31. Ma Y-R, Wang K-F, Wang W-J, Ding Y, Shi T-Q, Huang H, Ji X-J: Advances in the metabolic

engineering of *Yarrowia lipolytica* for the production of terpenoids. *Bioresour Technol* 2019, 281:449-456.

32. Liu Y, Jiang X, Cui Z, Wang Z, Qi Q, Hou J: Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of α -farnesene. *Biotechnol Biofuels* 2019, 12.
33. Liu GS, Li T, Zhou W, Jiang M, Tao XY, Liu M, Zhao M, Ren YH, Gao B, Wang FQ et al.: The yeast peroxisome: a dynamic storage depot and subcellular factory for squalene overproduction. *Metab Eng* 2020, 57:151-161.
34. Carvalho A, Hansen EH, Kayser O, Carlsen S, Stehle F: Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids. *FEMS Yeast Res* 2017, 17.
35. Pandey RP: Diversifying natural products with promiscuous glycosyltransferase enzymes via a sustainable microbial fermentation approach. *Front Chem* 2017, 5.
36. Son S-H, Kim J-E, Oh SS, Lee JY: Engineering cell wall integrity enables enhanced squalene production in yeast. *J Agric Food Chem* 2020.