다양한 유용 대사물질 생산을 위한 중요 대사 노드

중원대학교 의생명과학과 윤영걸 교수

1. 개요

살아있는 생명체의 생화학적 대사는 매우 복잡하며 다양하다. 그러나 대부분의 종속영양 생명체는 공통적으로 포도당을 분해하여 생물학적 구성물질과 에너지로 분해하는 능력을 갖고 있다. 즉, 다양한 대사 전구체와 세포의 기능 그리고 에너지 생성을 위한 탄소 중심의 대사 경로를 지니고 있다. 주요 탄소대사경로에는 대사경로 사이의 연결성으로 인하여 key metabolite node가 나타난다. Pyruvate, citric acid, tyrosine, aspartate 그리고 acetyl-CoA와 같은 5가지 노드는 바이오 연료에서부터 의약품 및 폴리머 전구체에 이르는 다양한 고분자물질 또는 화학물질의 전구체이다(Figure 1). 특히 acetyl-CoA는 fatty acid 및 terpene을 포함하는 대사물질을 합성하는 가장 잘 연결된 노드이다. 본 동향에서는 부가가치가 높은 생산물로 전환하는 과정에 있는 주요 metabolite node를 살펴보고자 한다. ..

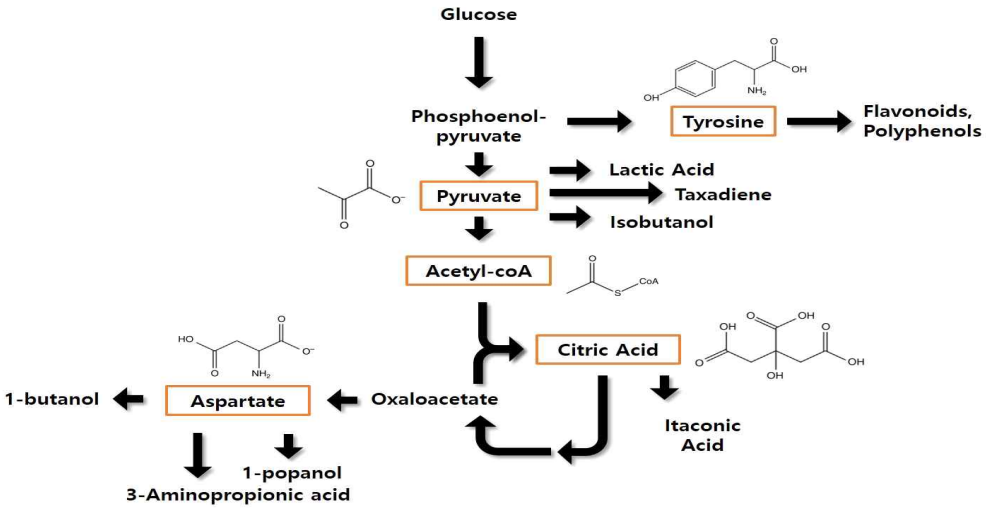

Figure 1. 탄소 대사에서 전구체로서 역할을 하는 주요 대사 node들(빨간색 박스).

Pyruvate 유래 대사물질

해당과정의 마지막에 위치하고 있는 pyruvate는 연결이 가장 잘되어 있는 대사물질 중의 하나로 중요한 아미노산(valine, leucine, 그리고 isoleoucine)의 전구체의 역할과 TCA 회로의 방향으로 진입할 수 있다. 이 노드에서 유래한 비교적 가장 흔한 생체물질은 에탄올 생산과 유사한 산화환원반응과 탈수소반응으로 생성된 lactic acid이다. 최근 3D 프린팅 기술을 이용하여 lactic acid를 bioplastic polylactic acid로 중합하는 것에 대한 관심이 증가하고 있다. 의생명과학 분야에 응용할 수 있는 생분해성 및 무독성 폴리머인 poly(lactate-co-glycolate)를 대장균에서 glucose와 xylose를 탄소원으로 하여 lactic acid를 생합성하고 이를 중합하여 생산할 수 있는 기법이 제시되었으며 또한 효모에서 높은 수준의 lactic acid 생산이 가능하게 되었다. 더불어 lactate dehydrogenase의 도입과 세포질에서의 NADH redox 수준을 조절하여 58.5 g/L의 lactic acid 생산을 확인하였다(1). Lactic acid 생산을 더욱 향상시키기 위해 스펀지와 유사한 육면체 입자에 Rhizopus oryzae를 고정시켜 glucose로부터 231 g/L의 lactic acid의 생산이 가능함을 보여주었다.

Pyruvate는 해당과정 대사물질인 glyceraldehyde-3-phosphate의 condensation를 통해서 isoprenoid와 terpene을 합성하는 경로의 관문 역할을 한다. 최근에 isoprene pathway의 최적화를 통해 Taxol 또는 paclitaxel의 중간 대사체인 taxadiene의 생산을 1020 mg/L까지 올렸다(2). 또한, pyruvate는 acetyl-CoA와 함께 지방산 에스테르 생산을 위한 전구체로서 중추적인 역할을 하고 있다. 예를 들면 대장균을 이용하여 pyruvate로부터 isobutyl acetate를 19.7 g/L 정도의 효율로 생산했으며 더 나아가 비슷한 방식으로 longer chain isobutyl butyrate를 27.1 mg/L 정도로 생산한다는 것이 증명되었다(3). 이러한 pathway를 활용하여 longer chain esters (from C12–C18 fatty acid backbones)를 효모에서 25.4 mg/L, 대장균에서는 1 g/L 정도의 생산율을 확인하였다. 이와 같이 pyruvate 노드로부터의 높은 수준의 대사체 생산은 pyruvate와 같은 주요 metabolite node의 중요성을 다시 한번 강조하고 있다.

Citric acid 유래 대사물질

Citric acid는 acetyl-CoA가 에너지 생산을 위해 진입하는 TCA회로에서 중요한 노드 역할을 하는 유기산이다. Citric acid는 자체적으로 화장품, 식품, 음료 산업에서 방부제로서 활용 가능하다. 이 물질은 역사적으로 Aspergillus

niger의 발효를 통하여 생산되어 왔다. 그러나, 최근 대안으로 oleaginous yeast인 Yarrowia lipolytica에서 생산하기 위한 노력을 하고 있다(4). 특히 inulin을 분해하는 inulinase 효소의 도입으로 일반 삼각플라스크 배양에서도 거의 78 g/L 수준의 citric acid의 생산이 가능하였다. Citric acid는 또한 짧은 대사경로를 통해 itaconic acid와 같은 주요 전구체로 전환될 수 있다. Y. lipolytica 균주에서 cis-aconitic acid decarboxylase를 도입함으로써 citric acid로부터 itaconic acid를 4.6 g/L 정도 생산할 수 있음을 보여주었다(5). 이러한 결과들은 citric acid node가 중요한 대사경로에 위치하며 따라서 산업적으로 다양한 대사체를 생산하는 데 필요한 핵심 노드임을 의미한다.

Tyrosine 유래 대사물질

방향족 아미노산(특히 tyrosine과 연결된 것)은 방향족고리라는 기능기로 인해 대사경로의 분기점 역할을 하는 node로 작동한다. 방향족 아미노산은 erythrose-4-phosphate와 phosphoenolpyruvate가 결합하는 shikimate pathway에 의하여 만들어진다. 일곱 단계의 효소적 변환 후 생산된 chorismate는 다시 tryptophan, phenylalanine과 tyrosine과 같은 방향족 아미노산 생합성의 분기점 역할을 한다. Chorismate는 또한 flavonoid와 polyphenol과 같은 화학물질의 생산을 유도하는 하류 경로를 가진 대사산물이다. 식물 유래 방향족 화합물은 항산화, 항염, 항바이러스, 그리고 항암 등의 약리적 특성을 보여준다. Tyrosine 유래 flavonoid인 p-coumaric acid와 naringenin는 유전공학적 방법으로 생산되고 있다. 효모에서 heterologous shikimate pathway의 도입과 부산물 생산 효소의 제거를 통하여 거의 2 g/L의 p-coumaric acid가 생산됨을 확인하였다(6). 최적화된 pathway balancing과 modular optimization을 통하여 대장균에서 29~100 mg/L의 naringenin 생산을 확인하였으며 추가적으로 flavonoids flavan-3-ol와 kaempferol 3-O-rhamnoside의 생산을 대장균에서 각각 40.7와 57 mg/L 정도로 확인하였다(7). Tyrosine 분기점은 오랫동안 Tamiflu의 전구체와 같은 활성의약품의 중요한 근원으로 작동하였다. 최근에 이 경로는 효모에서 thebaine와 hydrocodone과 같은 물질의 완전한 합성에 활용되었다. 따라서, 이 tyrosine node는 다양한 활성물질 생산을 위해 중요한 그리고 상호 연결을 제공하는 핵심 경로의 역할을 하고 있다.

Aspartate 유래 대사물질

Aspartate는 음전하를 지닌 아미노산으로서 threonine 생합성 및 3-aminopropionic

acid의 전구체이며 또한 TCA 회로와도 연결되어 있다. 최근 연구에서 Lactococus lactis와 효모로부터 유래한 2개의 효소를 대장균에 도입하여 2-ketobutyrate를 생산하였고 추가적으로 propanol와 butanol과 같은 알코올류도 각각 1 g/L의 수준으로 생산할 수 있음이 보여주었다(8). 또한 acrylamide, acrylonitrile 및 nylon-3 합성의 플랫폼 화학물질인 3-aminopropionic acid를 aspartate로부터 전환할 수 있는 단일 단계 효소 전환법을 이용하여 대장균에서 32 g/L 수준으로 생산할 수 있음을 입증하였다(9). 따라서 기술한 바와 같이 aspartate는 연료나 화학물질을 대량생산할 수 있는 unique node임을 알 수 있다.

Acetyl-CoA 유래 대사물질

세포의 모든 대사에 있어서 acetyl-CoA는 해당과정과 TCA 회로 사이에 위치하고 있기 때문에 매우 중요하다. 이 분자는 여러 대사과정에 가장 잘 연결되어 있는 대사체로서 많은 대사공학적 전략들의 초점이 되고 있다(Figure 2). Acetyl-CoA는 thioester bond와 acetic acid의 독특한 결합을 이루는 대사체로서 다양한 생합성 대사물질의 시작점 역할을 하고 있다. 더불어 carboxylation에 의하여 malonyl-CoA로 전환되어 fatty acid 및 terpene 생합성을 위한 중요한 중간 대사체로서의 역할도 수행하고 있다. 원핵 및 진핵생물에서 acetyl-CoA 생산과 소비 경로에 대한 최근의 연구결과들은 이 노드가 대사공학에서 매우 중요한 분기점임을 시사하고 있다.

지방산 합성 및 beta-oxidation 경로에는 acetyl-CoA 및 malonyl-CoA가 관여한다. 하나의 긴 지방산 분자에 여러 개의 malonyl-CoA가 결합되기 때문에 이러한 전구체를 최적화하여 생산하는 것이 중요하다. 대장균에서 지방산의 생합성과 관련된 3가지의 생합성 경로를 모듈화함으로써 결과적으로 8.6 g/L의 정도의 지방 생산율을 보여주었다(10). 또한 Y. lipolytica 와 같은 대체 호스트를 활용함으로써 85 g/L 수준의 매우 높은 생산율을 달성할 수 있었다. Acetyl-CoA와 malonyl-CoA에서 합성된 lipid는 다른 연료나 필수 화학물질의 생산에 이용될 수 있다(11). 한 예로 Y. lipolytica에 대두에서 유래한 lipoxygenase를 도입하여 5 mg/L 수준의 pentane을 생산하였다. 또한 대장균에서 beta-oxidation의 역반응을 이용하여 2.8 mg/L의 pentane과 4.3 mg/L의 heptane을 생산할 수 있음을 보여주었다. 더불어 세제 및 기타 개인위생용품으로서 유용한 fatty alcohol인 dodecanol과 tetradecanol을 thioesterase, acyl-CoA reductase 및 aldehyde reductase의 과발현을 통하여

대장균에서 1.55 g/L 수준으로 생산할 수 있었다. 효모에서도 xylose를 기질로 1.2 g/L의 hexadecanol을 생산하였다.

Acetyl-CoA는 butanol, isopentenol, polyketide 그리고 terpene과 같은 중요한 생체분자의 전구체이다. Yu 등은 Clostridium tyrobutyricum에서 acetate와 butyrate를 생산하는 불필요한 유전자를 제거함으로써 L-butanol의 생산을 16 g/L로 이끌었다(12). 마찬가지로 대장균에서 에너지 요구량과 효소의 수를 줄이는 by-pass 반응을 통해 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 효과적으로 전환시킴으로써 1 g/L 수준의 isopentenol 생산량을 보여주었다. Polyketide는 fatty acid 합성과 유사하게 acetyl-CoA 및 malonyl-CoA로부터 생산된다. Acetyl-CoA 전구체 및 NADPH 생산을 증진시킴으로써 효모에서 triacetic acid lactone의 생산을 1.6 g/L 수준으로 증가시켰다. 또한 배지의 최적화와 함께 P450 cytochrome fr6R을 도입함으로써 그램 음성 박테리아인 Burkholderia sp. FERM BP-3421에서 thailanstatin을 2.5 g/L 수준으로 생산할 수 있었다(13).

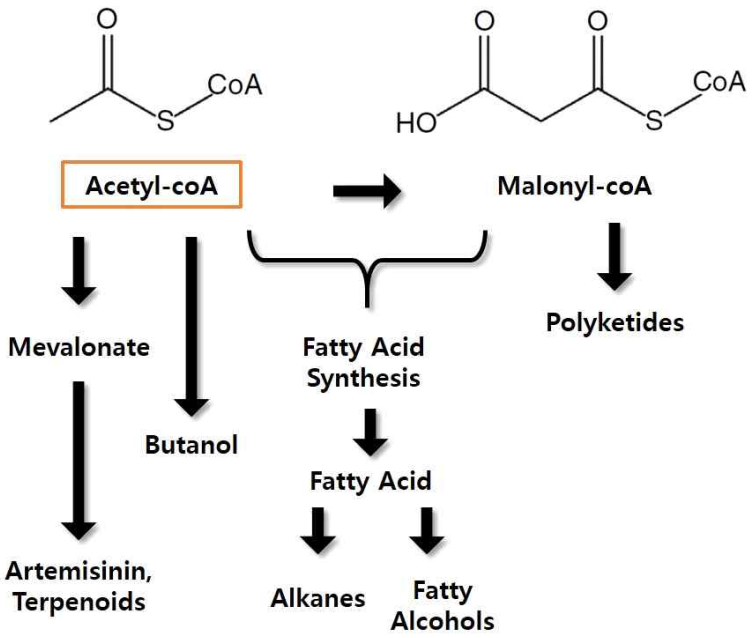

Figure 2. Acetyl-CoA(빨간색 박스)의 중심 node로서의 연결성.

한편, 두 분자의 acetyl-CoA를 다른 대체 경로를 이용하여 응축시켜

terpenes를 생산할 수도 있다. 이와 같은 mevalonate pathway는 지방산 합성과 마찬가지로 약학적 활성이 있는 다양한 분자의 생산을 가능하게 한다. 아마도 가장 성공적인 사례는 항말라리아제 artemisinin의 전구체인 artimisinic acid의 생산으로 대장균에서 최소 25 g/L의 수준으로 생산한 것이다(14). 이 경로의 또 다른 대사체인 amorphodiene의 경우에는 효모를 이용하여 40 g/L 이상으로 생산되었다. 추가적으로 terpene 화합물인 protopanaxadiol과 dammarenediol 등을 대사공학적인 노력을 통해 1 g/L 이상의 수준으로 생산하였다. 위에서 열거한 여러 결과에서 입증 된 바와 같이 acetyl-CoA 노드는 세포 내 주요 대사과정과 생체분자 사이의 유니크한 연결 고리로서 향 후 목적 대사물질의 생산증진을 위한 핵심 타겟이 될 것으로 생각된다.

세포 내에 존재하는 다양한 대사체는 새로운 대체연료, 화학물질 및 의약품의 기능을 할 수 있는 생합성 물질로 활용할 수 있도록 급속하게 연구되고 있다. 이러한 연구의 접근법 대부분은 소수의 중요 대사산물 노드 쪽으로 향하고 있다. Figure 1과 2에서 보듯이 중요 대사산물 노드는 화학이라는 작은 세계에서 서로 매우 긴밀하게 연결되어 있으며 따라서 하나의 product로부터 다른 대체 product를 빠르게 만들 수 있도록 서로를 활용할 수 있게 한다. 즉, 중요 대사 노드인 pyruvate, citric acid, tyrosine, aspartate 그리고 acetyl-CoA는 미생물과 대사공학을 이용하여 선택적으로 그리고 산업적으로 고부가가치의 생합성 대사물질을 생산할 수 있도록 해주며 따라서 생물기반 대사물질의 생산성을 증가시킬 수 있는 합리적인 타겟이 될 것으로 사료된다(15). 최근 급속히 발전하고 있는 CRISPR-Cas9과 같은 분자생물학과 유전자 편집기술로 인해 대사공학적 접근법은 현재 일반적으로 사용되고 있는 숙주 모델을 넘어서 더욱 확장될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Lee JY, Kang CD, Lee SH, Park YK, Cho KM (2015) Biotechnol Bioeng 112: 751-758.
2. Ajikumar PK, Xiao W-H, Tyo KEJ, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G (2010) Science 330: 70-74.
3. Rodriguez GM, Tashiro Y, Atsumi S (2014) Nat Chem Biol 10: 259-265.
4. Liu X-Y, Chi Z, Liu G-L, Wang F, Madzak C, Chi Z-M (2010) Metab Eng 12: 469-476.

5. Blazeck J, Hill A, Jamoussi M, Pan A, Miller J, Alper H (2015) Metab Eng 32: 66-73.
6. Rodriguez A, Kildegaard KR, Li M, Borodina I, Nielsen J (2015) Metab Eng 31: 181-188.
7. Yang SM, Han SH, Kim BG, Ahn JH (2014) J Ind Microbiol Biotechnol 41: 1311-1318.
8. Shen CR, Liao JC (2008) Metab Eng 10: 312-320.
9. Song CW, Lee J, Ko YS, Lee SY (2015) Metab Eng 30: 121-129.
10. Xu P, Gu Q, Wang W, Wong L, Bower A, Collins C, Koffas M (2013) Nat Commun 4: 1409.
11. Sheppard MJ, Kunjapur AM, Prather KLJ (2016) Metab Eng 33: 28-40.
12. Yu M, Zhang Y, Tang IC, Yang ST (2011) Metab Eng 13: 373-382.
13. Eustaquio AS, Chang LP, Steele GL, O'Donnell CJ, Koehn FE (2016) Metab Eng 33: 67-75.
14. Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, Leavell MD, Tai A, Main A, Eng D et al. (2013) Nature 496: 528-532.
15. Cordova LT, Alper HS (2016) Curr Opin Chem Biol 35: 37–42