Evolutionary adaptation 및 reverse engineering 기반의 최근 연구동향

울산과학기술대학교 이성국 교수

1. 연구배경

오늘날 합성생물학 (Synthetic biology)은 생물공학 (Biotechnology) 기반의 다양한 바이오화학 산업 분야에 새로운 패러다임을 제시하면서 나날이 비약적으로 변화 발전해가고 있다. 이를 반영하듯 합성생물학은 최근 화학물질, 의약 등 산업적 생산에 있어 핵심적인 기술로의 잠재성을 인정받고 있다. 더욱이 현재 다양한 genomics, transcriptomics, metabolomics, proteomics 등 오믹스 기반의 분석기술과 유전자 합성기술들의 발전으로 합성생물학의 성장속도는 가속화되어 가고 있는 실정이다. 이로 인해 예전에는 할 수 없었지만 지금은 가능한 'evolutionary adaptation'과 'reverse engineering'과 같은 기술들이 각광을 받고 있으며 미생물의 원하는 표현형을 설계하는데 있어 중요한 기술로 인식되고 있다. 자연과 유사한 evolution 환경을 인공적으로 재현하여 미생물의 특정 표현형을 획득하기 위한 evolutionary engineering은 생체분자 (biomolecule), 대사회로 (metabolic pathway), 나아가 생물특성을 파악하는데 있어 유용하다. 특히 이렇게 얻어진 정보를 이용하여 생물학적 시스템을 수정·보완·재설계하는 'Reverse engineering'기술과 접목되어 최적화된 인공미생물을 제작하는데 필수적인 방법으로 응용되고 있다.

'Directed (molecular) evolution' 혹은 '*in vitro* evolution'은 전형적인 evolutionary engineering 방법으로, random mutagenesis와 *in vitro* recombination의 반복적인 과정을 통해 분자적 다양성 유도하여 HTS (high-throughput screening or selection)로 특정 표현형이나 향상된 library member를 동정하는 접근이다. 비교적 짧은 시간 내에 원하는 표현형을 얻을 수 있어 보편적으로 이용되는데 error-prone PCR 기반의 mutagenesis, DNA shuffling의 recombination 등이 여기에 해당된다. 하지만, 삭제변이(deleterious mutations)의 축적, 낮은 교차율(crossover rate) 등의 문제로 인해 제한된 개체(population)만이 선별되어 이를 개선하기 위한 다양한 방법들이 시도되고 있다. 또한 이는 플라스미드 상에서 아주 극히 제한적인 유전자만을 변이 시킬 수 있어 대사경로 및 생물학적 시스템 등의 개량이 아닌 일반적으로 효소 개량에 주로 활용되고 있다.

'Evolutionary adaptation' 혹은 'adaptative evolution'은 'directed evolution'과는 달리 지놈 수준에서 광범위하게 돌연변이를 일으키고 이들 중 최적화된 변이 균주를 분리할 수 있어 최근 주목받고 있는 방법으로, 배지나 배양조건 등의 특정 환경변화에 적응하여 살아갈 수 있도

록 면밀히 디자인하여 고체 혹은 액체배양을 통해 적응된 진화개체(evolved population)를 선별하는 방법이다 [그림 1]. 생물체 프로세스의 복잡성에 의해 쉽게 얻을 수 없는 다양한 표현형을 이러한 방법으로 얻을 수 있는데 metabolic engineering 기술과 더불어 유용산물을 생산하는 산업균주의 개발에 효과적인 방법으로 제시되고 있다. 최근의 DNA sequencing 기술의 발전으로 과거에 비해 표현형들의 유전정보 분석이 쉽게 이루어지는데 이러한 추세로 인해 evolutionary adaptation 방법이 현재 선호되고 있고 이를 통해 최적화된 돌연변이를 분리하고 이들의 지놈분석으로 표현형의 유전정보와 이를 활용가능하게 되었다.

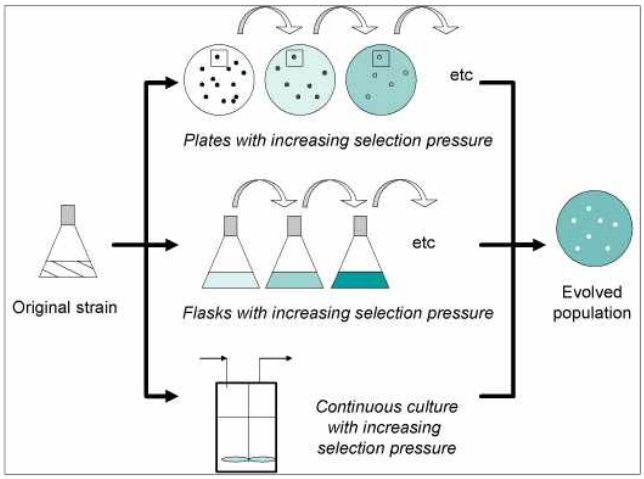

그림 1. Principle of evolutionary engineering [ref.1]

한편 reverse engineering 역시도 최근 들어 관심을 받고 있는데 이는 과거 값비싼 비용 등의 제한으로 'Forward engineering' 기반인 새로운 생물학적 part, device, system의 구축 (design)에만 국한되지 않고 이제는 'Reverse engineering'은 오믹스 기반으로 특정 미생물의 표현형에 대한 정확한 이해를 바탕으로 생물학적 시스템의 재디자인 (redesign) 할 수 있는 영역으로까지 확장되었다. 이로 인해 전통적 유전공학 기술에서의 부분적이고 제한적인 생명정보를 넘어 생명 시스템의 전반적인 이해를 토대로 보다 효율적·체계적으로 생명체에 대한 접근이 가능하게 되었다 [그림 2].

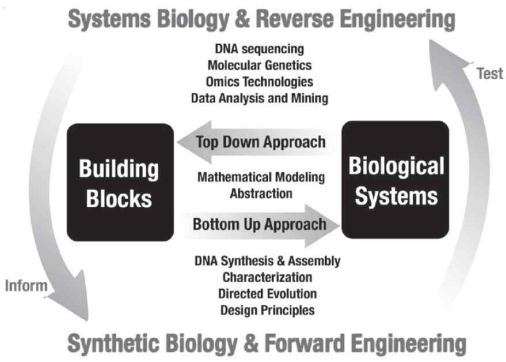

그림 2. Synergy between Synthetic and Systems Biology [ref. 3]

현재 합성생물학 분야에서 미생물 유래 산업적 바이오화학제품생산을 위한 가장 큰 화두 중 하나가 바로 고성능 맞춤형 산업적 생산균주의 개발이다. 현재 산업균주개발을 위한 일련의 노력들로 탄소원 이용성의 향상 (improved carbon source utilization), 생산성 증가 (increased product formation), 스트레스 저항성 (stress tolerance)을 획기적으로 늘리기 위한 시도가 이루어지고 있으며, 특정 phenotype 생성에 있어 기존 기술인 mutagenesis, screening, evolutionary engineering 등과 함께 최근의 reverse engineering은 산업적 생물공학분야에서 미생물 대사회로의 최적화 분석에 중요한 기법으로 자리매김하고 있다 [그림 3]. 생물체 프로세스의 복잡성으로 인해 생물체에 대한 완벽한 해석은 힘든 실정이지만 reverse engineering, DNA 합성 및 시퀀싱 기술의 발전은 보다 구체적이고 많은 생명현상의 분석과 예측을 가능하게 해주는 것은 부인할 수 없다.

앞으로 미래산업으로서의 잠재성이 큰 바이오화학산업의 성패는 최종산물을 경제성 있고 빠르게 생산하는 것이 중요하며 이를 위해서는 고성능 지능형/맞춤형 인공생명체 개발이 필수적이

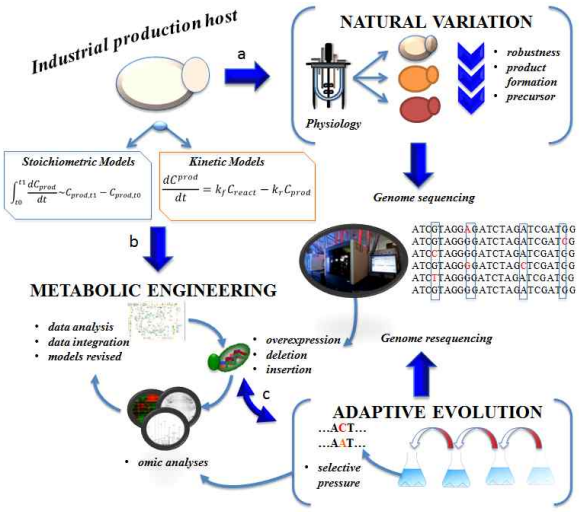

그림 3. Optimization of microbial metabolic pathways in industrial biotechnology [ref. 4]

다. 이에 최근의 본 연구실에서 개발된 지놈엔지니어링 적용 기술을 소개하고자 한다. 이는 지놈 수준에서 돌연변이를 빠른 속도로 제작할 수 있어 대사경로를 최적화하기 위해 아주 많은 경우의 수를 제작하고 이들 중에서 최적 변이 균주를 빠르게 선별할 수 있다. 본 방법은 evolutionary adaptation이 가지고 있는 문제점 (긴 시간 요소, 무작위 돌연변이, 낮은 변이율, 등)을 극복할 수 있어 맞춤형 인공 생명체 제작에 아주 유용하게 활용될 것이다.

최근의 지놈엔지니어링 기법들은 합리적인 유전체의 이해를 바탕으로 한 유전자 지도의 설계와 합성을 통해 대사산물의 생산량을 증가시킬 수 있는 방향으로 개발되고 있는데 이를 통해 다양한 지능형 인공 생명체를 제작할 수 있는 기반을 제공해 주고 있다. 이러한 기술가운데 MAGE (multiplex automated genome engineering)라고 알려진 기술은 ssDNA를 세포내로 도입시킴으로써 아주 간단하게 다수의 돌연변이를 비교적 단시간에 제작할 수 있게 해준다. MAGE는 mismatch repair에 관여하는 *mutS* 유전자 제거시킴과 동시에 λ-red system의 발현을 통해 ssDNA 삽입을 1000배까지도 증가시킬 수 있다. MAGE와 같이 ssDNA-mediated recombination의 경우 다른 plasmid나 dsDNA보다 유전자 도입(transformation)확률이 높기 때문에 보다 높은 효율의 유전자 재조합을 기대할 수 있을 뿐만 아니라 한 cycle당 소요되는 시간이 상대적으로 다른 기법들보다 짧아 많은 수의 돌연변이 균주를 만들 수 있다. 이러한 지놈엔지니어링을 접목한 합성생물학과 대사공학은 lycopene, squalene의 기능성 식품 혹은 의약품 등의 유용산물 생산이 가능한 다양한 platform 균주개발을 가능하게 한다. 그러나 기존 기술에서는 특정 *E. coli* 균주만이 이용될 수 있어 보다 다양한 대장균 균주로의 확장성이 현저히 떨어지고 있는 실정이다. 특히 유용산물의 산업적 생산을 위해서는 다양한 균주뿐만 아니라 산업용 대장균으로의 범용적인 기술이 꼭 필요하다. 이에 본 연구팀은 다양한 *E. coli*에서도 MAGE를 확장 가능하도록 할 수 있는 'pRED suicide plasmids' 기반의 새로운 기술을 최근 개발하였다 [그림 4].

2. 연구결과

- 본 연구에서는 portable pRED 플라스미드의 *mutS* 유전자로의 삽입으로 다양한 균주에서 지놈엔지니어링 적용을 가능하게 하였는데, pINZ 플라스미드에 클로닝된 이종 유전자의 대장균 지놈삽입 후 지놈엔지니어링을 이용하여 발현최적화를 유도할 수 있도록 Portable Lamda Red System (PLRS)을 구축하였다 [그림 4].
- 범용 균주에서 MAGE가 가능하도록 개발된 지놈기반 지놈엔지니어링 적용기술을 이용하여 효

율적으로 다양한 lycopene 생합성 변이대장균 생성되어 이를 스크리닝하여 대장균에서 lycopene 생합성이 성공적으로 변화됨을 확인할 수 있었다 [그림 5]. 새롭게 얻어진 균주들의 re-sequencing을 통해 lycopene 생합성에서 중요한 역할을 하는 *dxs* 와 *ipi*의 발현 강화와 관련된 다양한 염기서열의 RBS를 확인할 수 있었다.

- 이처럼 본 연구를 통해 유전자 재조합 효소를 발현하는 플라스미드의 지놈상 *mutS* 유전자로의 삽입을 통해 범용적인 대장균 지놈엔지니어링 적용 기술을 구축하여 여러 이종 유전자들의 대장균 지놈상의 도입을 용이하고 선별할 수 있게 도와주는 자살 플라스미드 제작을 하였다. 또한, 본 개발된 기술을 대장균내의 lycopene 생합성 대사경로를 최적화하는데 적용함으로써 바이오화학 산업용 다양한 인공 대장균 개발 기술임을 입증하는데 성공하였다.
- 본 기술은 다양한 유용물질 생합성 대사경로 최적화에 적용 가능하여 미생물 기반 바이오화학 산업에 관련된 생합성 대사경로 응용으로 확장이 될 수 있으며 바이오산업용 플랫폼 인공 대장균 제작에 필요한 지놈 수준의 다양한 합성생물학 기술 개발과 이를 활용한 맞춤형 인공 미생물 제작에 광범위한 시너지 효과 창출을 기대하고 있다.

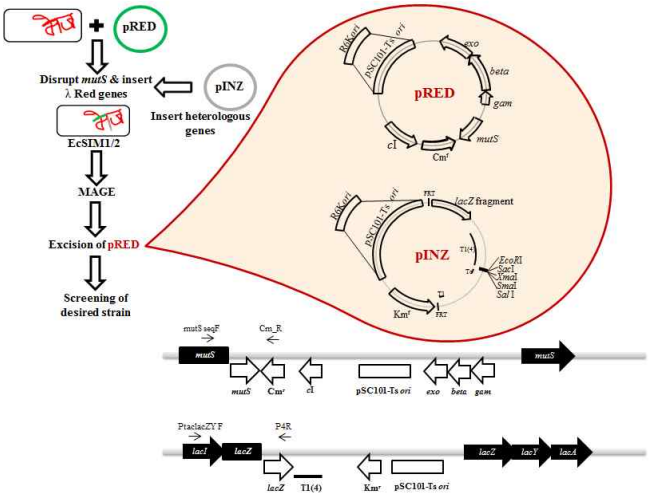

그림 4. The Portable Lambda-Red System (PLRS)

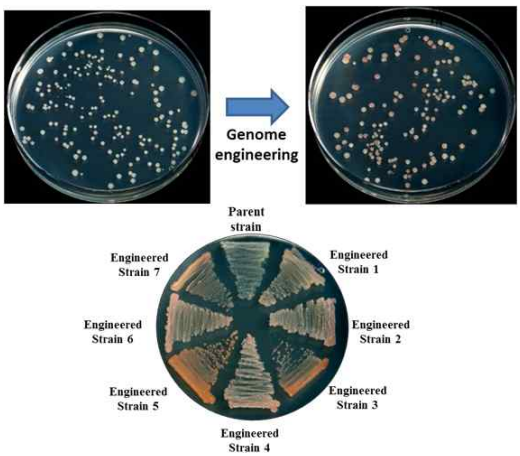

그림 5. PLRS system

3. 결론

본 연구개발은 생명공학 제품의 생산속도의 증대뿐만 아니라 수율의 증대, 그리고 신물질 개발 등을 위한 필수적인 기술로 자리매김할 것으로 예상된다. 이를 기반으로 다양한 바이오 화학물질 생합성 최적화 대사경로 제작 및 도입으로 생산단가 저감, 생산속도의 증대뿐만 아니라 수율의 증대, 그리고 신물질 개발 등을 위한 핵심적 기술로 자리매김한다면 바이오이코노미 시대를 준비하는데 향후 경제적 산업적 파급력은 높을 것으로 예상된다. 현재 세계 각국에서 대사공학적인 기술방법을 통하여 균주를 개량하려는 시도는 다양한 측면에서 이루어지고 있다. 이들 개량된 균주들은 화학(정밀화학물질, 범용화학물질), 의약, 의료(광학활성 의약품, 신규항생제), 환경(난분해성 화합물 분해, 생분해성 고분자), 농업(질소고정화, 해충내성) 등 다양한 산업 분야에 응용되고 있다. 최신의 연구개발 경향인 시스템생물공학 및 합성생물학의 발달로 인하여 균주를 부분적이 아니라 전체적으로 이해하고 처음부터 예측 가능한 조절기작들을 쌓아올려 새로운 균주를 개발하는 한 차원 높은 대사 최적화 기술들이 활발히 시도될 것으로 예상되며 우리도 이에 발맞춰

다가오는 미래 생물경제사회 (Biobased economy)를 준비해야 된다. 본 연구팀에서는 [그림 6]에서와 같이 다양한 합성생물학 기술을 개발하고 이를 활용하여 바이오산업화 응용을 위한 인공미생물 개발에 노력하고 있다.

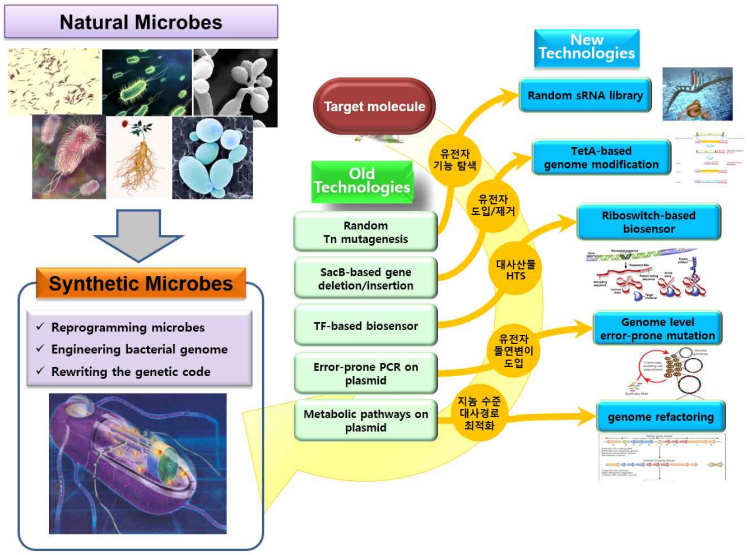

그림 6. Development of synthetic microbes based key biotechnologies

4. 참고문헌

1. Hahn-Hägerdal et al. (2005) Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. Microbial Cell Factories 4:31
2. Stephen Lutz, (2010) Beyond directed evolution- semi-rational protein engineering and design, Curr Opin Biotechnol. 21: 734-743.
3. Federici F, Rudge TJ, Pollak B, Haseloff J, Gutiérrez RA., (2013) Synthetic Biology: opportunities for Chilean bioindustry and education. Biol Res. 46, 383-93.
4. Herrgård, M., Panagiotou, G. 2012. Analyzing the genomic variation of microbial cell factories in the era of “New Biotechnology”. Comput Struct Biotechnol J. 3, e201210012.
5. Ryu Ys, Biswas RK, Shin K, Parisutham V, Kim SM, and Lee SK. (2014) A simple and effective method for construction of *Escherichia coli* strains proficient for genome engineering. PLoS ONE 9: e94266
6. Mosberg JA, Gregg CJ, Lajoie MJ, Wang HH, Church GM (2012) Improving lambda Red genome engineering in *Escherichia coli* via rational removal of endogenous nucleases. PLoS One 7: e44638.
7. Esvelt K, Wang HH (2013) Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. Mol Syst Biol 9: 641.
8. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, et al. (2009) Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Nature 460: 894-898.
9. Isaacs FJ, Carr PA, Wang HH, Lajoie MJ, Sterling B, et al. (2011) Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement. Science 333: 348-353.
10. Sandoval NR, Kim JYH, Glebes TY, Reeder PJ, Aucoin HR, et al. (2012) Strategy for directing combinatorial genome engineering in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 109: 10540-10545.
11. Yu DG, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, et al. (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 5978-5983.
12. Datta S, Costantino N, Court DL (2006) A set of recombineering plasmids for Gram-negative bacteria. Gene 379: 109-115.