최신 연구동향

효모 내 세포 소기관 조절을 이용한 대사공학 연구동향

아주대학교 이평천 교수

1. 개요

기능성 대사 경로를 조절하는 작업은 비효율적 조절 반응, 최적화되지 않은 물리 화학적 환경, 경쟁 대사에 대한 대사중간물질의 손실, 대사산물 독성 등 여러 가지 문제를 야기한다 (Avalos, J.L. et al, 2013). 효모는 낮은 pH에서의 성장, 단순한 영양 요구, 바이러스 감염에 대한 낮은 확률 및 기질 및 대사산물 독성에 대한 높은 내성으로 인해 선호되는 산업 유기체이며, 유전자 조작의 용이성, 복잡한 이종 효소들의 발현 능력이 손쉬운 장점이 있다 (Shiba, Y. et al, 2007).

효모 대사 공학은 주로 세포질에서 대사 경로를 구축함에 집중되어왔다. 단백질 융합 및 합성 단백질 스케폴드와 같은 대사 경로 최적화 전략은 일부 대사 조절에 따른 생산성을 효과적으로 향상 시킬 수 있으나, 스케폴드에 구축 가능한 효소의 수는 이용 가능한 결합 도메인에 의해 제한되며, 단백질 융합체와 스케폴드는 효소 활성에 부정적 영향을 미친다 (Pompon, D., et al, 1996) (Dueber, J.E. *et al*, 2009). 따라서 다양한 전략이 개발되고 있으며, 최근 대두되는 대안 중 하나는 세ㅇㅇ포 소기관 내 대사 경로의 구축이다.

이러한 세포 소기관은 고유의 물리 화학적 환경, 효소, 대사산물 및 보조 인자와 같은 다양한 대사에 맞춤형 조건을 제공할 수 있다 (그림 1). 세포 소기관 내에 대사경로를 구축함으로써 고유의 기질농도와 효소가 증가 할 수 있으며, 이는 빠른 반응 속도와 향상된 생산성으로 이어질 수 있다. 또한 대사중간체를 세포 소기관 내에서 합성함으로써, 대사산물의 전환을 억제하고 대사 과정에 대한 독성 영향을 감소시킬 수 있다 (Ayer, A. *et al*, 2013).

세포소기관 조절의 장점에도 불구하고 실질적인 문제가 극복 될 때까지는 이와 같은 장점들의 실현이 불가능한 현실이다. 각각의 대사조절을 위해, 표적화할 소기관의 선정은 부적절한 생리 환경 및 필수 보조 인자 또는 전구체의 부적절한 공급이 효소 활성을 감소시킬 수 있으므로 신중하게 선택되어야한다. 또한 효소의 세포소기관으로의 표적화가 효소 활성에 미치는 부정적인 효과를 최소화하기 위해 주의를 기울여야한다. 더불어 세포 소기관 내 단백질 용량과 최대 소기관 체적은 제한적이므로, 이러한 매개 변수를 증가시키는 전략의 개발이 필요하다. 그러나 이러한 문제를 해결하는 것은 불가능한 일이 아니다. 첫째, 효모의 여러 세포소기관의 존재는 다양한 대사 구축에 큰 유연성을 제공한다. 둘째, 세포 내 소기관의 수와 체적을 변화시키는 전략뿐만 아니라 세포 소기관에 효소를 표적화하는 여러 기작들이 아직 밝혀지지 않았다. 마지막으로, 세포소기관의 세포막 전달체의 탐색을 통해 세포 소기관 내부의 대사 성분을 조작 할 수 있다. 이러한 문제의 해결은 세포 소기관 조절 전략을 통한 대사공학을 이용함으로써, 기존의 원핵세포보다 효모의 매우 중요한 장점이 될 수 있다.

2. 세포 소기관의 대사공학적 응용

박테리아의 경우 대부분의 대사 반응이 세포질에서 일어나며, 그람 음성 박테리아는 주변 세포질을 가지고 있다. 최근 단백질 기반 박테리아 마이크로컴파트먼트(BMCs)의 동정에도 불구하고 대사 과정 및 능력에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 부분이 많다 (Kerfeld et al, 2010). 대조적으로 효모는 미토콘드리아, 퍼록시좀, 골지체, 소포체, 액포 및 세포벽을 포함하여 잘 특성화 된 단백질 위치 표식 태그를 갖는 많은 세포 내 소기관을 가지고 있다. 이러한 장점은 세포 소기관 내 부분적 또는 완전한 대사경로의 구축 가능성을 나타내며, 여러 연구기관에서 기존의 세포질 내 대사 구축 및 세포 소기관 내 대사 구축을 통해 야생형 균주와 비교함으로써, 이러한 접근 전략의 잠재력을 확인하고 있다.



그림 1. 효모 세포 소기관 구획화의 개요 (S.K.Hammer et al, 2017).

2.1. Mitochondria

두 개의 세포막으로 둘러싸인 미토콘드리아 기질은 세포질보다 높은 pH, 낮은 산소 농도 및 더 높은 산화 환원 전위를 제공한다(Orij, R. et al, 2009)(Hu, J. et al, 2008). 미토콘드리아는 아미노산 생합성, 트리 카발산 (TCA) 회로, 광범위한 보조 인자, 대사산물에 대한 경로, heme and iron-sulfur cluster (ISC) 생합성의 고유 소기관이다 (Lange, H et al, 1999). 효모 미토콘드리아에 단백질을 표적으로 할 수 있는 N- 말단 미토콘드리아 위치 표적 신호는 미토콘드리아 내 다양한 대사 경로의 구획화에 중요한 역할을 한다 (Hurt et al, 1985).

이러한 미토콘드리아의 세포소기관으로서의 특징을 이용한 대사공학적 연구가 최근 이루어지고 있다. 그 예로 미토콘드리아 내 효소 표적화를 이용해 *S. cerevisiae*에서 식물성 터피노이드인 valencene과 amorphadiene의 생산이 있다 (Farhi, M. *et al*, 2011). 메발로네이트 생산을 향상시키기 위해 cytosolic non-feedback-inhibited 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA 환원 효소(tHMG1)를 과발현시킨 후 기존의 cytosol에서 대사 발현과 달리 sesquiterpene synthase를 mitochondria에 표적화 하여 1,200µg/L valencene과 20mg/L amorphadiene을 생산했다. cytosolic sesquiterpene synthase를 보유하고 있는 균주와 비교했을 때, 이 titer는 각각 8 배와 20 배의 향상을 나타냈다 (그림 2).

더 나아가 효모 미토콘드리아에서 amorphadiene synthase (ADS)의 과발현 및 8 개의 FDP(Farnesyl diphosphate) 대사 경로를 구축함으로써, 427mg/L의 amorphadiene을 생성했다 (Yuan et al, 2016). 또한 tHMG1의 3개 복제본, 코돈 최적화 된 ADS 및 경쟁대사인 ergosterol 경로의 조절을 통해 미토콘드리아 표적화 대사로 개량된 *S. cerevisiae* 균주는 1.2 g/L 이상의 amorphadiene을 생성 했으며, Fed-batch 발효를 통해 41 g/L의 생산성을 확보했다 (Westfall, P.J. et al, 2012). 이는 미토콘드리아 내 이종대사의 구획화에 기존의 대사공학적 접근이 합쳐졌을 때 얼마만큼의 생산성 증대가 이루어 질 수 있는지를 보여준다.

또 다른 예로 이종 이소프렌 합성 효소 (isoprene synthase, ISPS)의 2 개의 복제본과 함께 동일한 8개의 FDP 생합성 대사 경로를 미토콘드리아에 표적화시킴으로써, 108 mg/L의 이소프렌을 생산했으며, 이는 해당 세포질 균주에 비해 1.7 배 증가했다(Lv, X. et al, 2016). 여기서 개발된 미토콘드리아 내 이소프렌 이종대사 구획화 균주는 이소프렌 대사의 부산산물인 스쿠알렌을 80% 적게 생성하여 어떻게 구획화가 부산물 형성을 감소시킬 수 있는지를 보여준다.

이소부탄올 또한 미토콘드리아 구획화를 사용하여 합성되었다 (Yuan et al, 2015). *S. cerevisiae*에서 이소부탄올 생합성에 관여하는 상위대사 효소들인 Ilv2p, Ilv5p 및

Ilv3p는 미토콘드리아 내에서 발현되는 반면, 하위대사 효소들인 a-케토산데카르복실라제(KDCs)와 알코올 탈수소 효소(ADHs)는 세포질에서 발현된다. 따라서 세포질 내에서 존재하는 하위대사 효소들의 미토콘드리아 내로 구획화 함으로써 635 mg/L의 이소부탄올을 생성하였으며, 이는 세포질에서 하위대사 효소를 발현하는 균주와 비교해 260%의 생산성 증대를 나타낸다.

또한 미토콘드리아 내 이소부탄올 대사경로의 구획화를 통해 130 mg/L의 이소펜탄올과 113 mg/L의 2-메틸-1-부탄올을 생산했으며, 이는 세포질 내 대사경로에 비해 370% 및 500%의 생산성 증대에 해당된다.

이러한 미토콘드리아는 그 수와 크기를 조절하여 잠재적으로 이종대사의 세포소기관으로 표적화 함으로써 얻을 수 있는 이점을 향상시킬 수 있다. 예를 들어 호기성으로 성장하는 *S. cerevisiae*는 수가 많고 작은 크기의 미토콘드리아를 만들지만, 반면에 혐기성으로 성장하는 경우에는 수가 감소하고 크기가 거대해진 미토콘드리아를 만든다. 이 외에 성장 조건이나 유전자 발현을 조절을 통해, 효모의 발효를 방해하지 않으면서 미토콘드리아의 형태를 변화시키는 방법도 있어 활용 가능한 범위가 매우 넓다 (Visser, W. et al, 1995)(Okamoto, K. et al, 2005).



그림 2. 효모 미토콘드리아로의 부분적 또는 전체 이종 대사회로의 구획화 (S.K.Hammer, 2017).

2.2. Peroxisome

단일 세포막에 의해 결합 된 퍼록시좀은 아세틸-CoA를 세포 기관에 공급하는 지방산의 β 산화뿐만 아니라 과산화수소의 생성 및 제거에 관여한다(van der Klei et al, 1997). 퍼록시좀의 pH는 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만, 효모의 성장 조건에 따라 퍼록시솜의 수, 크기 및 효소 함량을 조절할 수 있는 특징은 상당 수 밝혀져 있다 (Saraya, R. et al, 2010). 퍼록시좀의 대사 경로 구획화에 유리한 점은 단백질 표적화 신호 PTS1과 PTS2가 peroxisomal matrix로의 대사 경로의 구획화를 가능하며, 퍼록시좀이 세포 성장에 필수적이지 않다는 점이다 (Rucktäschel, R. et al, 2011).

퍼록시좀을 이용한 이종 대사 경로 구획화의 예로 Hansuela polymorpha에 Penicillium chrysogenum으로부터 분리한 penicillin(PEN) 대사 경로를 퍼록시좀을 이용해 구획화 한 연구가 있다. PEN 생합성 대사 경로(그림 3)의 주요효소인 이소 페니실린 N 아실 전이 효소 (IAT)와 페닐 아세틸 CoA 연결효소(PCL)를 퍼록시좀으로 표적화 함으로써, H. polymorpha가 산업적 PEN 생산에 가장 일반적으로 사용되는 종인 P. chrysogenum 과 동일한 양의 생물학적 활성 PEN (약 1 mg/L)을 생산했다. 대조적으로, 세포질에서 IAT와 PCL이 존재하며, 퍼록시좀이 결핍 된 H. polymorpha 균주의 PEN 생산은 50% 낮은 생산성이 확인되었다 (Gidijala, L. et al, 2009).

효모의 퍼록시좀의 지방산을 분해하는 특징으로, 퍼록시좀은 중간사슬지방산(MCFAs), 지방알코올, 알칸 및 올레핀을 포함하여 지방산에서 추출한 화학 물질을 생산하기 위해 이용되었다(Chen, L. et al, 2014). 가장 초기의 시도는 *S.cerevisiae*에서 β-산화 순환을 이용하여 저부가가치의 긴사슬지방산으로부터 MCFA를 생산하는 것이다. 광범위한 MCFA 분해를 막기 위해 연구진은 *S. cerevisiae*에서 아실-CoA 산화 효소(POX1)를 제거하고 *Yarrowia lipolytica* 유래의 POX2를 과발현 시켰다(그림 3). 이 후 올레익산에서의 성장은 야생형에 비해 MCFA 생산량을 3.34배, 총 지방산 생산량을 15.6% 증가시키는 결과를 얻었다.

또 다른 연구에서는, PTS2 표적화 신호를 부착한 이종 지방산 아실-CoA 환원 효소(FAR)를 *S.cerevisiae*의 퍼록시좀에 표적화하여 지방 아실-CoA β-산화 중간체를 중간사슬지방 알코올(C10 및 C12)로 전환시켰다. 추가로 PTS2 표적화 단백질의 퍼록시좀 세포막 수용체 PEX7과 cytosolic acetyl-CoA carboxylase(ACC1)의 발현을 통해 832.7 mg/L로 생산성을 더욱 향상시켰으며(그림 3), 이를 통해 단백질 전달을 증가시킴으로써 세포 내 효소총량을 증가시킬 수 있음을 입증했다 (Sheng, J et al, 2016).

퍼록시좀의 지방 아실-CoA와 NADPH 공급은 *S. cerevisiae*에서 alkane과 olefin 생산에 이용되어왔다. 연구자들은 세포 독성 알데히드 환원 효소(ALR)와 ADH에 의해

형성된 부산물에 의한 알데하이드 중간체의 손실을 피하기 위해 CAR 활성화 보조 인자와 박테리아 전자 전달 시스템과 함께 박테리아 알데히드 변형 산화 효소 (ADO)와 카르복실 산 환원 효소 (CAR)를 퍼록시좀으로 표적화 하였다 (Zhou, Y.J. et al, 2016). 이를 통한 퍼록시좀으로의 표적화는 세포질내 ADO와 CAR을 가진 유사한 균주에 비해 90%의 알칸 titer를 증가시켰다. 추가로 지방산 산화 효소 POX1과 지방 알데히드 탈수소 효소 HFD1을 제거하여 알칸 생성량이 1.2 mg/L로 증가하고 세포질 경로에 비해 부산물 축적이 50% 감소했으며, 퍼록시좀 생합성 factor를 조절하여 퍼록시좀의 수를 증가 시키면 알킨 생산이 3.5 mg/L로 향상되었다. 유사하게, 박테리아 P450 지방산 탈 카르복실화 효소(OleT)와 전자 전달 시스템이 세포질 대신에 퍼록시좀을 표적으로 삼을 때 올레핀 생성은 40% 증가했다 (그림 3).

퍼록시좀의 구획화가 많은 환경에서 유익한 것으로 입증되었지만, 퍼록시좀으로의 표적 경로가 항상 세포질 위치 측정보다 우월하지는 않다. 예를 들어 FDP와 lycopene 사이의 카로티노이드 경로 효소가 *P. pastoris*의 퍼록시좀으로 표적화 되었을 때, 퍼록시좀 및 세포질 표적화 균주에서 12~14mg/L의 미미한 lycopene 생산량 증가만이 관찰되었다 (Lee, P.C. et al, 2009).

최근 *S.cerevisiae*의 퍼록시좀에 이종 대사 효소를 표적화시키는 표적화 단백질의 아미노산 조절을 통해 이종 대사 효소의 표적화 효율 및 효소의 투과율을 증가시키는 등, 퍼록시좀 대사 조절의 새로운 접근방법이 꾸준히 개발되고 있다 (DeLoache, W.C., et al, 2016).



그림 3. 효모 퍼록시좀으로의 다양한 생합성 대사회로의 표적화 (S.K.Hammer, 2017).

2.3. Endoplasmic reticulum(ER) and Golgi

소포체과 골지는 새로 합성 된 단백질과 지질을 운반, 맞춤화 및 분류하기 위해 함께 작동한다. 소포체의 루멘은 단백질 폴딩 최적화를 위한 산화 환경 및 세포질과 유사한 pH 조건을 갖추고 있다 (Tu, B.P. & Weissman, J.S., 2004). 골지의 pH는 구획이 시스에서 트랜스 골지로 이동함에 따라 보다 산성조건이 되며, 분비성 소포에서는 5.2 정도의 낮은 pH 조건을 갖추고 있다 (Paroutis, P et al, 2004). 따라서 ER과 Golgi로의 표적화는 산화 조건, 점진적으로 낮은 pH, 복잡한 단백질 폴딩 또는 단백질 변형과 관련된 대사 경로에 도움이 될 수 있다. 대부분의 분비 단백질과 세포막 단백질은 ER에서 단백질을 유지하거나 골지체로 표적화 하는 추가 신호가 있는 동시 번역 기작을 통해 ER에 표적화된다 (Banfield, D.K. et al, 2011).

소포체의 triacylglycerides(TAGs)의 합성 및 지질체 형성에 근접한 수용력은 FAEE (fatty acid ethyl esters) 및 지방성 알칸 (fatty alkanes)을 생산하기 위해 *V.lipolytica*의 소포체에 이종 대사 효소를 표적화 하는 동기가 되었다. 소포체에 *Acinetobacter baylyi* ADP1 유래의 왁스 에스테르 합성 효소(AftA)의 표적화 (그림 4a)는 136.5 mg/L로 FAEE 생산을 증가 시켰으며, 이는 세포질 내 발현에 따른 생산량에 비해 약 20배 증가한 양이다 (Xu, P. et al, 2016). 비슷한 방식으로, *A.baylyi* ADP1 유래의 지방산 아실-CoA 환원 효소(ACR1) 및 박테리아 ADO를 소포체로 표적화하여 지방 알칸 생성량 titer를 16.8 mg/L로 증가시켰으며, 이는 세포질 내 발현에 비해 4배 증가된 결과이다. 이것은 또한 퍼록시좀 대사 경로에 비해 지방 알칸 생성이 1.5배 향상되었음을 나타낸다. 그러나 *Y.lipolytica*의 세포질에서 ACP 활성화 모듈과 함께 박테리아 CAR과 ADO를 발현 시키면 23.3 mg/L의 알칸이 생성되어 세포질에서 지방산의 추가 생산의 접근 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 세포질, 소포체, 및 퍼록시좀에서 전구체 물질을 동시에 생산하면 지방산 생산을 극대화 할 수 있을 것으로 예상된다.

지방산 유래 화합물의 생산 외에도, 효모 소포체는 양귀비 식물인 Papaver somniferum 로부터 opioid 생합성 대사 경로를 재구성하는데 사용되었다 (Thodey, K. et al, 2014). S.cerevisiae의 세포질 내에 모르핀 생합성에 필요한 주요 효소들인 테베인 이중 산화효소 T6ODM, CODM, 및 알도-케토 환원 효소 COR을 발현시켜 2.5 mg/L의 모르핀 및 3.2 mg/L의 포르핀 생합성 부산물인 neomorphine을 생산하였다. 이와 대조적으로, 소포체 세포막으로의 COR 효소의 표적화는 모르핀 생산을 3.1 mg/L로 증가 시켰고, neomorphine을 0.5 mg/L로 감소시켰다. 이는 COR이 여전히 세포질 구역에 존재함에도 불구하고 소포체 세포막에 고정되어있는 경우 T6ODM에 의해 생성된 neopinone이 COR에 의해 전환되기 전에 자연적으로 codeinone으로 전환되어 neopinone 합성에 더 많은 시간을 제공함으로써, 모르핀에 대한 경로 특이성 효율을 세포질 경로 44 % 로부터 소포체로 표적화된 COR 86%로 크게 증가시켰다.

다양한 효모 종은 각기 다른 골지 형태를 가지고 있으며, 이는 신진 대사 공학 응용에 도움이 될 수 있다 (Papanikou, E. & Glick, B.S., 2009). 또한 골지의 기능과 형태는 유전적으로 조절을 통해 변형 될 수 있습니다. 예를 들어 돌연변이 형태의 ARL1의 과발현은 골지 형태를 소낭에서 소포 및 세뇨관 구조로 변화시키며 (Lu, L. et al, 2001), 고농도의 N- acetylgalactosaminyltransferase-2(GalNAcT2)는 소포체에서 골지 단백질의 수와 골지의 크기를 증가시킨다 (Guo, Y. & Linstedt, A.D., 2006). 소포체 및 골지의 기능 및 대사물질 생산 능력과 구조적 변화의 관계성은 밝혀지지 않았지만, 이는 소포체 및 골지를 이용한 대사 경로 구획화 효과를 향상시키는 잠재성을 나타낸다.



그림 4. 효모 소포체 및 골지(a) 및 액포(b)로의 이종 대 사회로의 구획화 (S.K.Hammer, 2017).

2.4. Vacuole

효모 액포는 단백질을 분해 할뿐만 아니라 기아, 삼투압, 이온 충격에 대한 세포 반응, 및 해독 역할을 하는 소화 기관이다 (Klionsky, D.J. et al, 1990). 효모에서 가장 산성 pH를 가진 세포 소기관인 액포의 pH는 5에서 6.5 사이이며 (Li, S.C. & Kane, P.M., 2009), 대사 경로 구획화를 위한 독특한 환경을 제공한다. 세포 항상성 기작 역할을 수행하는 효모 액포는 단백질의 27 %가 트랜스 세포막 수송 단백질(transembrane transporters)이며, 따라서 액포 세포막을 가로 지르는 수송 능력을 이용 할 수 있다. 또한, 단백질이 액포로 이동하는 다양한 기작은 이종 대사 효소의 표적화를 용이하게 한다.

효모에서 메틸 할라이드 전이 효소 (MHT)는 메틸 그룹을 S-아데노실 메티오닌 (SAM)에서 할로겐화 이온으로 이동시켜 메틸 할라이드를 합성한다. 할라이드 이온과 SAM 이 액포에 저장되는 이점을 이용하기 위해 (Farooqui, J.Z. et al, 1983)(Wada, Y. & Anraku, Y., 1994), 이종성 MHT를 *S. cerevisiae*의 액포에 표적화 시켰다 (Bayer, T.S. *et al. , 2009*)(그림 4.b). 이것은 글루코스로부터 요오드화 메틸의 생산 속도를 증가 시켰고, 세포질 내 MHT 발현에 비해 1.5배 증가하였으며, *Endocladia muricata*에 의한 자연적 생산보다 1,200배 증가하였다 (Wuosmaa, A.M. & Hager, 1990). 또한, SAM 생산을 촉진하는 메티오닌이 배지에 첨가되었을 때의 생산성은 860 mg/L/h로 증가했다. 이 결과는 *S. cerevisiae*에서 SAM 축적을 증가시키는 것이 메틸 할라이드 합성을 더 향상시킬 수 있음을 시사한다.

액포의 크기와 수는 액포 생합성 경로에 도움이 되는 세포 외 환경의 변화에 따라 변화한다. 예를 들어, 고 삼투압 스트레스 동안 액포는 작은 구획으로 나누어 지는 반면, 저 삼투 조건 하에서 크기가 실질적으로 증가하여 세포 부피의 대부분을 차지한다 (Li, S.C. & Kane, P.M., 2009). 액포의 형태학적 조절은 유전적으로 조절이 가능하며, V-ATPase 복합체의 Vph1p 같은 액포 분해에 필요한 단백질의 제거는 액포의 수와 부피를 증가시킴으로써 액포를 표적으로 하는 대사 경로의 효율을 향상시킬 수 있다 (Bayer, M.J. et al, 2003).

3. 고찰

미토콘드리아, 퍼록시좀, 소포체, 골지, 및 액포는 효모 세포 소기관으로의 대사 경로 구획화가 세포질 경로 또는 기존의 경로 보다 실질적인 개선을 가져올 수 있다는 개념을 입증했다. 그러나 새로운 기술로서 효모 세포 소기관을 이용한 대사공학은 완전히 확립되기 전에 중요한 문제를 극복해야 한다. 이 개념의 성공의 열쇠는 세포 내 수송을 중재하는 세포막 단백질의 동정이 될 것이다. 운반체와 세포 소기관 수용체의 발현을 조절하는 것이 이미 미토콘드리아로의 pyruvate import를 증가시키고 표적화 효소를 퍼록시좀으로 수송하는데 유익하다는 것은 증명되었다 (Li, S. et al, 2015)(Sheng, J.et al, 2015)(DeLoache, W.C et al, 2016). 그러나 기술의 진화를 위해서는 인위적 대사 경로를 선호하는 세포 소기관의 크기, 수 및 활동을 조절하기 위해 세포 소기관의 생물 발생 및 역학에 대한 기본적인 이해를 증진시킬 필요가 있다.

Yeast subcellular engineering의 분야가 성숙하고 기술 된 도전을 극복함에 따라 인공 대사 경로에 대한 전례 없는 제어를 허용하는 조립 및 해체에 대한 엄격한 제어를 통해 (천연, 합성 또는 하이브리드) 미래에는 세포 소기관의 완벽한 조절이 가능할 것이라 기대한다.

참고문헌

1. Avalos, J.L., Fink, G.R. & Stephanopoulos, G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. Nat. Biotechnol. 31, 335-341 (2013).

2. Shiba, Y., Paradise, E.M., Kirby, J., Ro, D.K. & Keasling, J.D. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in Saccharomyces cerevisiae for high-level production of isoprenoids. Metab. Eng. 9, 160–168 (2007).

3. Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. & Urban, P. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. Methods Enzymol. 272, 51-64 (1996).

4. Dueber, J.E. et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. Nat. Biotechnol. 27, 753-759 (2009).

5. Siddiqui, M.S., Thodey, K., Trenchard, I. & Smolke, C.D. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. FEMS Yeast Res. 12, 144-170 (2012).

6. Ayer, A. et al. Distinct redox regulation in sub-cellular compartments in response to various stress conditions in Saccharomyces cerevisiae. PLoS One 8, e65240 (2013).

7. Kerfeld, C.A., Heinhorst, S. & Cannon, G.C. Bacterial microcompartments. Annu. Rev. Microbiol. 64, 391-408 (2010)

8. Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S. & Smits, G.J. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in Saccharomyces cerevisiae reveals a relation between intracellular pH and growth. Microbiology 155, 268-278 (2009).

9. Hu, J., Dong, L. & Outten, C.E. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. J. Biol. Chem. 283, 29126-29134 (2008).

10. Lange, H., Kispal, G. & Lill, R. Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. J. Biol. Chem. 274, 18989-18996 (1999).

11. Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., Suda, K., Oppliger, W. & Schatz, G. The first twelve amino acids (less than half of the pre-sequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into

the yeast mitochondrial matrix. EMBO J. 4, 2061-2068 (1985).

12. Farhi, M. et al. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. Metab. Eng. 13, 474-481 (2011).

13. Yuan, J. & Ching, C.B. Mitochondrial acetyl-CoA utilization pathway for terpenoid productions. Metab. Eng. 38, 303-309 (2016).

14. Westfall, P.J. et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, E111-E118 (2012).

15. Lv, X. et al. Dual regulation of cytoplasmic and mitochondrial acetyl-CoA utilization for improved isoprene production in Saccharomyces cerevisiae. Nat. Commun. 7, 12851 (2016).

16. Yuan, J. & Ching, C.B. Combinatorial assembly of large biochemical pathways into yeast chromosomes for improved production of value-added compounds. ACS Synth. Biol. 4, 23-31 (2015).

17. Visser, W. et al. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in Saccharomyces cerevisiae. Antonie van Leeuwenhoek 67, 243-253 (1995).

18. Okamoto, K. & Shaw, J.M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 39, 503-536 (2005).

19. van der Klei, I.J. & Veenhuis, M. Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle. Trends Microbiol. 5, 502-509 (1997).

20. Saraya, R., Veenhuis, M. & van der Klei, I.J. Peroxisomes as dynamic organelles: peroxisome abundance in yeast. FEBS J. 277, 3279-3288 (2010).

21. Rucktäschel, R., Girzalsky, W. & Erdmann, R. Protein import machineries of peroxisomes. Biochim. Biophys. Acta 1808, 892–900 (2011).

22. Chen, L., Zhang, J. & Chen, W.N. Engineering the Saccharomyces cerevisiae β -oxidation pathway to increase medium chain fatty acid production as potential biofuel. PLoS One 9, e84853 (2014).

23. Sheng, J., Stevens, J. & Feng, X. Pathway compartmentalization in peroxisome of Saccharomyces cerevisiae to produce versatile medium chain fatty alcohols. Sci. Rep. 6, 26884 (2016).

24. Zhou, Y.J. et al. Harnessing yeast peroxisomes for biosynthesis of fatty-acid-derived biofuels and chemicals with relieved side-pathway competition. J. Am. Chem. Soc. 138, 15368-15377 (2016).

25. Lee, P.C., Yoon, Yg. & Schmidt-Dannert, C. Investigation of cellular targeting of carotenoid pathway enzymes in Pichia pastoris. J. Biotechnol. 140, 227-233 (2009).
26. DeLoache, W.C., Russ, Z.N. & Dueber, J.E. Towards repurposing the yeast peroxisome for compartmentalizing heterologous metabolic pathways. Nat. Commun. 7, 11152 (2016).

27. Tu, B.P. & Weissman, J.S. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. J. Cell Biol. 164, 341-346 (2004).

28. Paroutis, P., Touret, N. & Grinstein, S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. Physiology (Bethesda) 19, 207-215 (2004).

29. Banfield, D.K. Mechanisms of protein retention in the Golgi. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, a005264 (2011).

30. Thodey, K., Galanie, S. & Smolke, C.D. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. Nat. Chem. Biol. 10, 837-844 (2014).

31. Klionsky, D.J., Herman, P.K. & Emr, S.D. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. Microbiol. Rev. 54, 266-292 (1990).

32. Li, S.C. & Kane, P.M. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. Biochim. Biophys. Acta 1793, 650-663 (2009).

33. Farooqui, J.Z., Lee, H.W., Kim, S. & Paik, W.K. Studies on compartmentation of S-adenosyl-l-methionine in Saccharomyces cerevisiae and isolated rat hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta 757, 342-351 (1983).

34. Wada, Y. & Anraku, Y. Chemiosmotic coupling of ion transport in the yeast vacuole: its role in acidification inside organelles. J. Bioenerg. Biomembr. 26, 631-637 (1994).

35. Bayer, T.S. et al. Synthesis of methyl halides from biomass using engineered microbes. J. Am. Chem. Soc. 131, 6508-6515 (2009).

Taking advantage of pools of halide ions and SAM in the yeast vacuole, the authors targeted a heterologous methyl halide transferase enzyme to the organelle, increasing the rate of methyl iodide production 1.5-fold. In co-culture with a cellulolytic bacterium, this engineered yeast strain was capable of methyl halide production from unprocessed cellulosic biomass.

36. Wuosmaa, A.M. & Hager, L.P. Methyl chloride transferase: a carbocation route for biosynthesis of halometabolites. Science 249, 160-162 (1990).

37. Bayer, M.J., Reese, C., Buhler, S., Peters, C. & Mayer, A. Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca2+-releasing channel. J. Cell Biol. 162, 211-222 (2003).

38. Sarah K Hammer & Jose L Avalos. Harnessing yeast organelles for metabolic engineering. Nat. Chem Biol. 13,2429 (2017).