박테리아 기반의 유용 단백질 발현전략 최신동향

전남대학교 생물학과 김근중 교수
유수경, 최혜지 박사과정

1. 개요

단백질 발현과 이를 기반으로 한 고생산은 생화학, 생리학 및 면역학 등을 포함한 기초 연구분야뿐만 아니라, 소재, 식품 및 의료 등에 걸친 다양한 산업 분야에서 요구하는 중요한 기반분야이다. 최근 과학과 의학의 발전으로 인간 수명이 늘어나고, 건강하고 행복하게 살아가고자 하는 사회적수요의 증가로 인해, 기능성 단백질 시장은 질병 치료를 위한 의료 분야를 넘어, 질병의 예방이나 미용, 자가면역 증진 등, 과거 천연물 소재 중심이었던 분야까지 영역을 확대하고 있다. 이는 기능성 단백질의 세계시장 규모가 2020 년에는 2,780 억 달러에 이를 것이라는 한국보건산업진흥원의 전망을 통해서도 확인할 수 있다[1].

단백질 발현과 생산분야에서는 동물 세포, 곤충 세포 및 효모 등 다양한 숙주들이 사용되고 있으며, 이를 제어하기 위한 획기적인 분자생물학적 도구가 개발되어 있다. 이중에서도 대장균은 짧은 배양 시간, 비교적 단순한 배양 조건과 배지를 이용한 고농도 배양의 용이함과 더불어 오랜 기간 축적된 많은 연구결과 등으로 인해 다른 숙주들에 비해 널리 활용되고 있다[2]. 그러나 이종 숙주로부터 유래한 단백질을 본래의 숙주와 다른 folding landscapes를 갖는 대장균에서 과발현 시킬 경우에 나타나는 현상들(기능이 없는 불용성 발현 혹은 낮은 발현율)은 잘 알려진 한계점이다. 그럼에도 불구하고 목적 단백질의 발현에 적합한 전략의 개발을 통해 다양한 재조합 단백질들이 대장균에서 성공적으로 발현되고 있다.

대장균에서 단백질을 발현하기 위한 전형적인 전략은 배지 조성, 배양 조건 (온도, pH, 용존산소 등을 조절), 발현유도 조건 최적화, 발현 시스템개발이나 개량 등을 포함한다. 발현 시스템개발이나 개량은, 일반적으로 숙주자체를 개량하는 것과 플라스미드 기반의 발현 벡터를 개발하는 것으로 구분할 수 있다. 전자의 경우, 단백질 접힘을 도와주는 molecular chaperon을 과발현하는 숙주, 막 단백질 발현에 따른 독성을 약화시킨 숙주, 대장균의 세포질을 산화적 환경이 유도되도록 개량한 숙주, rare codon tRNA를 과발현하는 숙주 등, 목적 단백질의 특성에 따라 선택 가능한 다양한 숙주들이 잘 알려져 있다. 후자의 발현 벡터 시스템에 경우도, 단백질 접힘을 도와주는 maltose binding protein, glutathione S trasnferase 및 NusA 등의 융합 파트너, 프로모터 (T5, T7, *tac*, *trc* 및 *csp*A 프로모터 등), transcription terminator (T0 및 rrnB terminator 등), 전사 조절인자 (LacI 및 AraC), replication ori (pUC, ColE1, pBR322 및 p15A 등) 등이 다양하게 조합된 벡터들이 이용되고 있다(그림 1)[3]. 뿐만 아니라 golden gateway cloning 및 Gibson assembly 등과 같은 ligation independent cloning을 통해 다양한 구성을 갖는 여러 종류의 발현 벡터들에 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 동시에 cloning이 가능한 시스템 또한 존재해, 반복적인 cloning으로 소모하는 시간을 최소화 할 수 있는 방법들도 소개되고 있다. 최근에는 이러한 발현 시스템을 최적화하는 전형적인 전략과 더불어, 기 보고된 여러 결과들을 토대로 도출된 생물정보학적 도구들을 이용해 전사 및 번역 개시 효율, 번역속도, aggregation hot spot 등을 예측하고, 목적 단백질을 암호화 하는 염기서열 또는 untranslational region (UTR)을 재설계하거나 수정하는 전략들이 이종 단백질 발현을 위해 접목되고 있다[4].

대장균을 숙주로 재조합 단백질 생산을 위해 활용 가능한 다양한 도구 및 전략들이

존재함에도 불구하고, 목적 단백질의 성공적인 발현은 항상 담보되지 못하고 있다. 특히 목적 단백질이 번역 후 변형(post translational modification)되거나 복잡한 이황화 결합이 기능적으로 중요한 경우, 이를 위한 능력이 없거나 낮은 대장균에서 발현하는 것은 극히 어려울 수 있다. 본 글에서는 대장균에서 발현이 불가능하거나 어렵다고 알려진 외래 단백질 또는 일반적으로 널리 활용하지 않는 숙주들을 기반으로 외래 단백질들을 성공적으로 발현한 논문들을 소개함으로써, 대장균 기반의 이종 숙주에서 목적 단백질 생산을 위해 적용 가능한 새로운 전략들을 살펴보고자 한다.

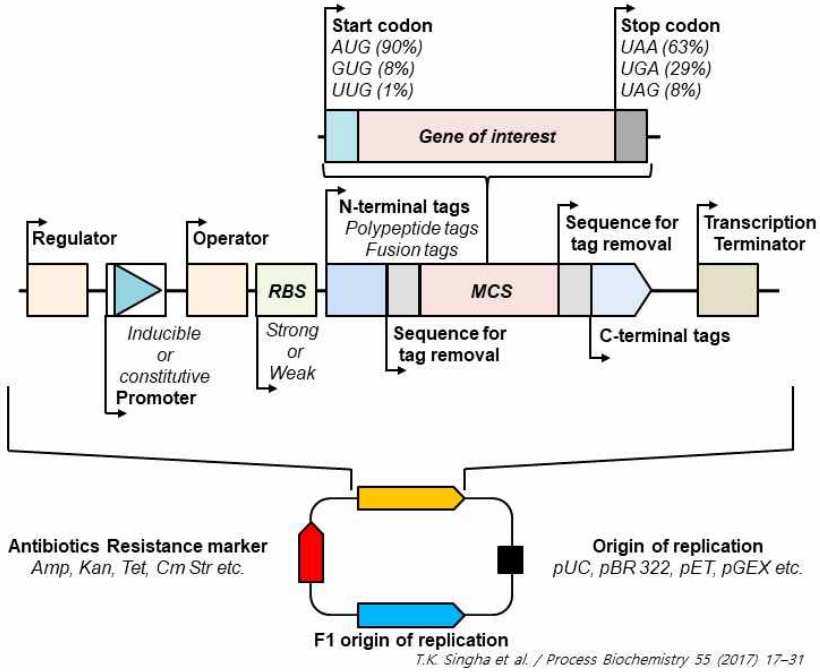


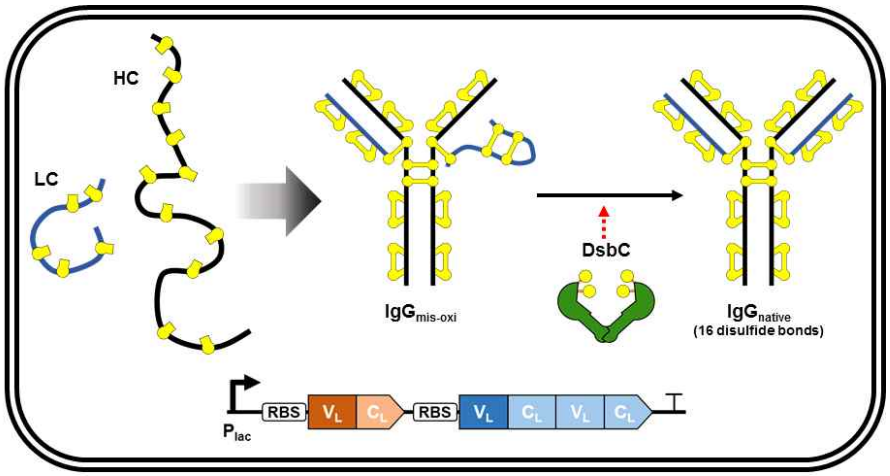
그림 1. 목적 유전자의 기능적 고발현을 위한 전형적인 발현벡터 시스템 개요도. 대장균에서 단백질 발현 시 사용되는 벡터는 구성요소(프로모터, transcription terminator, 전사 조절인자, replication ori 등)들의 조합에 따라 발현이 달라지므로 다양하게 조립하여 사용된다.

2. 유용단백질 생산과 적용점 발굴을 위한 유전자 고발현 최신동향

Next generation sequencing 과 유전자 합성기술의 진보로 다양한 환경 또는 생명체로부터 유래한 유용 유전자원들을 발굴하고 실험실에서 합성하는 것이 가능해지고 있다. 하지만 궁극적인 유용성의 평가는 발현이 전제된 단백질이 필요하기에 기능 확인 및 검증은 여전히 많은 문제들을 지니고 있다. 앞서 설명한 대로 유전자 발현, 즉 단백질의 생산을 위해 여러 전략이 개발되어 활용되고 있으나, 목적하는 단백질을 생산하기 위한 시스템을 일반화하기 어렵고, 단백질 발현을 위해 우선적으로 적용되는 대장균 기반 발현 시스템 역시 그들이 지닌 단점들(제한된 단백질 분비 및 이황화 결합 형성능, 번역 후 변형, codon usage, 동시에 일어나는 전사와 번역 등)로 인해, 기능성 발현을 위한 모든 조건 또는 인자들을 시험하기 어렵다는 문제가 늘 지적되어 왔다. 하지만 하기의 예에서와 같이 이러한 난제에 의미 있는 해결책을 제시한 최신 결과들이 보고되어, 박테리아 기반의 외래 유전자 발현유도의 한계가 상당한 수준까지 극복될 것으로 추정된다.

최근 앞서 언급한 대장균 발현 숙주의 단점 중 하나인 이황화 결합 형성능을 향상

시켜, 과거에는 대장균에서 생산이 어려울 것이라 여겨진 항체 생산이 가능하다고 보고되었다. 16개 이황화 결합을 포함하는 heterotetramer인 항체는 그 크기와 구조적 복잡성으로 인해, 항체에 일부 영역을 제거한 Fab, scFv 및 diabody 등의 형태로 재구성하거나 이황화 결합 형성을 위해 주변 세포질에서 발현하는 전략들이 활용되고 있었다[5]. 그러나 전자의 경우 전항체(whole chain antibody)에 비해 기능이나 안정성을 담보하기 어렵고, 후자의 경우 주변 세포질에서의 발현은 정확한 이황화 결합을 위한 molecular chaperon의 기능에 필요한 에너지 부족과 항체의 각 단위체가 동일 비율로 분비되어야 하는 문제로 인해 구조(native structure) 형성에 불리한 문제가 있다. 이러한 단점을 근본적으로 극복하기 위한 전항체 발현을 시도한 논문의 저자들은, 주변 세포질에서 발현되는 disulfide isomerase (DsbC)를 세포질에서 발현시킴으로써, 앞서 언급한 문제들 중 세포질에서의 이황화 결합유도와 동일비율로 분비시켜야 하는 문제들을 해결하였다. 대장균의 낮은 이황화 결합 형성능은 익히 잘 알려진 문제로, 이를 해결하기 위해 glutathione oxidoreductase (gor) 와 thioredoxin reductase (trx)를 결손시킨 숙주들이 활용되고 있다. 그러나 이 두 유전자에 결손으로 만들어진 수동적인 산화적 환경은 항체가 갖는 복잡한 이황화 결합을 온전한 형태로 구축하기에 부족할 수 있다. 이에 이황화 결합 형성을 능동적으로 부양하는 DsbC의 아미노 말단 부위에 신호서열을 제거해 세포질에서 발현시켜 대장균의 이황화 결합능을 향상시켰다(그림 2). 또한 주변 세포질이 아닌 세포질에서 단백질 발현을 유도하여 분비과정에 대한 문제를 회피하였으며, heavy chain과 light chain을 함께 전사 및 번역시키던 기존 전략과 달리 각 chain의 유전자 앞에 RBS를 배치하여 transcriptional coupling 시킨 후, 각각이 ribosome에 의해 독립적으로 번역되도록 유전회로를 설계했다. 그리고 Fc domain의 remodeling(아미노산 치환)으로 여러 FcγR에 결합 가능하여 glycosylation 과정도 우회하는 방법을 제안하였다. 추가적으로 protein disulfide isomerase(PDI)와 같은 샤페론을 숙주에 추가하여 단백질 구조의 안정성을 높였다. 결과적으로 대장균의 이황화 결합능 향상과 구조적 리모델링을 통해 완전한 기능과 구조를 갖는 항체의 생산이 가능함을 증명하여, 대장균을 항체의 생산숙주로서 새로이 추가하는 결과를 보여 주었다[6].



DOI: 10.1038/ncomms9072

그림 2. 대장균에서 완전한 항체 발현 모식도. 대장균에서 완전한 항체를 발현시키기 위해 heavy chain과 light chain을 각각 번역하는 전략과 정확한 이황화 결합을 위해 DsbC 를 도입하고 구조적 리모델링을 통해 full-length로 발현시킨 전략을 나타낸 모식도이다.

대장균에서 발현이 어려운 이황화 결합을 갖는 단백질의 기능적 발현유도와 비천연 아미노산의 효율적 도입을 위한 전략으로 cysteine을 selenidecysteine으로 치환한 고효율 발현시스템도 보고되었다. Selenocysteine에 경우, cysteine보다 낮은 산화력을 요구해, 대장균의 세포질의 환원적 환경에서도 diselenide bond을 형성시킬 수 있는 장점이 있다. 이에 착안하여 희소 아미노산인 selenocysteine을 암호화하는 코돈을 사용할 수 있는 recorded bacterial strain 제작이 최근에 보고되었다. 대장균 균주에서 비천연 아미노산을 첨가를 위해 활용되는 amber codon을 selenocysteine으로 번역해 단백질을 합성하게 하는 변이체 제작은, 이황화 결합을 가진 β-lactamase을 이용해 미생물에 생존이 selenocysteine을 도입을 반영하도록 조건부 의존성을 부여해 selenoprotein 발현에 적합한 숙주로 개량하였다. 이러한 숙주를 활용해 불안정한 혹은 이황화 결합이 잘 이뤄지지 않는 단백질의 cystein을 selenocystein으로 치환하여, 이황화 결합을 diselenide bond로 대체함으로써 단백질의 안정성 및 환원 조건에 대한 저항성을 부여하였다. 이러한 결과는 diselenide bond 도입으로 안정성이 증가한 단백질 및 펩타이드 치료제 생산을 위해 대장균 숙주 기반 시스템의 활용이 가능함을 보여주었다[7]. 결과적으로 소개한 두 종의 전략들을 동시에 도입하는 경우, 항체를 포함한 이황화 결합을 포함하는 복잡한 단백질들 또한 대장균에서 성공적 발현이 가능해짐으로써, 대장균에서 발현 가능한 단백질의 종류가 더 다양해 질 수 있을 것이라고 사료된다.

앞선 본문 내용이 가용성일 때 기능을 갖는 단백질 발현에 대해 서술했다면, 이와 대조적으로 불용성 응집체 (inclusion body)로의 발현이 기능적 발현(기존의 관점으로는 다소 모순적인)인 단백질에 대해 소개하려고 한다. 치매 또는 크로이츠펠트-야콥병(sCJD)을 유발하는 것으로 알려진 beta-amyloid와 prion protein을 연구하기 위한 첫 번째 난관은 각 단백질에 구조 및 기능 검증을 위한 충분한 단백질을 확보할 수 없다는 것에 있다. 특히 prion protein의 경우 연구를 위해 죽은 동물이나 사람의 뇌에서 획득하는데, 이 양이 극히 적어 실험을 위한 충분한 양을 확보하기 어렵다. 따라서 다양한 연구팀에서 prion protein을 얻기 위해, 미생물 기반의 숙주를 이용하는 전략을 채용하였다. 그러나 기능성 단백질이 불용성 응집체라는 구조적 특징은 통상적인 발현 방법으로는 생산하기 어렵다[8]. 이러한 상황에서 미생물 숙주로부터 생산한 prion protein을 감염성을 갖는 불용성 응집체로 전환 가능함이 보고되었다. 이들은 감염성 프리온 (pathogenic prion strain;PrP^{sc})이 정상 프리온 (prion; PrP^{c})을 PrP^{sc}로 복제하는 활성을 이용해, bacteria에서 발현된 다량의 정상 프리온에 극 소량의 감염성 프리온을 촉매로써 활용하여 복제 증폭하는 시스템을 통해 인공 병원성 프리온(artificial PrP^{SC})을 얻을 수 있음을 보고하였다. 그러나 미생물 숙주로 생산한 PrP^{SC}에 경우, 병원성을 평가한 결과 신경세포에 대해 인간유래 프리온보다 감염성이 상대적으로 낮고, 프리온의 감염 위치가 다르게 나타났다[9]. 이는 인간 유래 프리온과 달리 glycosylation이 없는 미생물 숙주 유래 프리온에 구조적 차이에 기인하는 것으로 예상되며, 이는 sCJD 환자에서부터 추출한 PrP^{sc} strain이 여러 종류라는 기존의 보고들에 대한 근거를 제시하고 있다. 이러한 합성 프리온은 인간 프리온 복제에 대한 억제 또는 차단 효과를 갖는 합성 유사체를 디자인함으로써 인간 프리온 질병(신경 퇴행성 질환, 특히 알츠하이머)에 대한 새로운 치료 전략개발에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

최근에는 살아있는 숙주가 지닌 한계 또는 제한점을 뛰어넘어 단백질 발현 및 생산에 있어, 기존에 관점을 근본적으로 전환할 수 있는 단초를 제공하는 연구 결과도 보고되었다. 아직 기초단계에 불과하지만 완전한 인공세포의 개발이다. 기존의 인공세포는 일반 세포에서 발현에 문제가 되는 성분을 야생형 숙주로부터 하나씩 제거해가며 만들어지거나 (top-

down), 필요한 성분을 하나씩 넣어가며 완성하는 방식(bottom-up)으로 합성된 세포로 엄밀한 의미에서 인공 세포라 정의하기 힘들다[10]. 이와 비교해, 2018년 다국적 연합 연구팀이 새로운 관점에서 접근할 수 있는 인공 세포를 제작했다. 대사 활동을 위한 에너지 ATP 합성을 위해 두 개의 광변환 장치인 식물 유래의 photosystem II와 박테리아 유래의 proteorhodopsin을 조합해, 세포내 에너지 공장인 미토콘드리아를 모방한 인공 소포 시스템을 개발한 것이다. 이렇게 제작된 인공 소포를 거대한 인공 세포막 안에 위치시켜 빛과 외부 환경에 의하여 스스로 생체에너지(ATP)를 지속적으로 생산하고, 생산한 생체에너지(ATP)를 사용하여 액틴(actin)이라는 골격단백질을 형성한 후, 이를 통해 스스로 운동성(역동성)을 보여줄 수 있는 인공세포를 만들었다(그림 3)[11]. 이러한 인공세포는 일반 세포와 달리 목적하는 대사 작용만 수행하기 때문에, 복잡한 대사 회로를 갖는 살아있는 숙주기반 발현 시스템이 갖는 문제점으로 작용될 수 있는 요소들의 제거가 가능하다. 이는 in-vitro transcription 과 translation system 이 지닌 장점들을 보여주어, 난발현 단백질의 발현에 대한 근본적인 해결책을 제시 할 수 있을 것으로 사료되며, 인공세포를 통한 단백질 발현은 저비용 고효율 시스템으로 자리매김 할 것으로 예상한다.

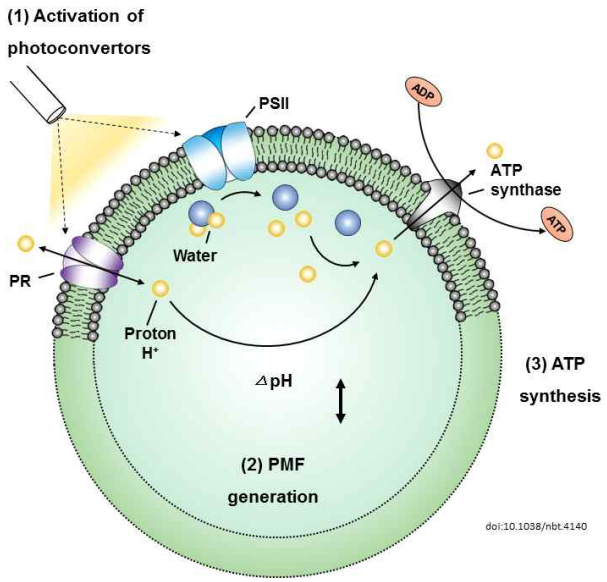


그림 3. 인공세포 구조와 광합성을 통한 ATP 합성 경로. 기존의 인공세포와 달리 광합성 작용에 필요한 단백질 부품을 조립하여 대사 활동에 필요한 ATP를 스스로 합성하여 사용하는 인공세포 단면도이다.

최근 휴먼 마이크로바이옴에 대한 연구 결과가 축적됨에 따라, 단백질에 발현 및 생산은 과거 산업적 대량 생산의 관점과 더불어, 특별한 목적을 갖는 외래 단백질의 발현이 정밀하게 조절되는 미생물 개발 기술이 요구되고 있다. 이러한 기술을 요구하는 대표적인 분야로는 장내 유익균을 이용한 질병 진단 및 치료 분야가 있다. 최근 *in vivo* 에서 장내 유익균 중 하나인 *Lactococcus lactis*를 이용하여 병원성 미생물인 *Vibrio cholerae*를 진단하고 치료하는 기술이 개발되었다. 이 기술은 *V. cholerae*의 병원성이 균체 수에 따라 증가하며, 산성 환경에서 증식이 억제되는 것에 착안한 것으로, 균의 농도에 따라 젖산 분비가 유도할 수 있도록 설계한 외래 단백질을 *L. lactis*에 도입해, *V. cholerae*의 인식 및 증식 억제를 통해

질병 발생률을 낮추는 전략을 이용하였다. 이를 위해, *V. cholerae* 가 생산하는 자가 유도인자인 AI-2를 인식하는 *V. cholerae* 유래 막 단백질인 CqsS의 아미노 말단 부위와 *L. lactis* 에서 Nisin 생산 오페론를 조절하는 전사인자인 NisR과 상호작용하는 NisK의 카르복실 말단을 융합한, 인공 융합 단백질을 제작하였다. 제작한 융합 단백질을 *L. lactis* 에 도입함으로써 *V. cholerae* 균체 수 증가로 자가 유도인자 AI-2에 농도가 증가할 경우, *L. lactis* 가 이를 인식해 신호(발광)를 낼 수 있게 된다. 이렇게 재조합된 *L. lactis*는 *V. cholerae*를 검출할 수 있을 뿐만 아니라 탄수화물을 젖산으로 전환하여 강력한 산성능력으로 *V. cholerae*의 증식을 억제함으로써, in vivo에서 콜레라 발생률을 낮추는 것을 확인하였다[12]. 콜레라는 발병 후, 심하면 몇 시간 내에 사망할 수도 있는 질병으로 빠른 질병 검출이 필요하다. 또한, 상대적으로 위생이 좋지 않은 개발도상국 등에서 주로 발생하므로 저렴한 비용으로 검출되어야 한다. 이 논문에서 제안한 전략은 *V. cholerae*와 *L. lactis*가 함께 장내에서 머무른다는 점에 착안하여 probiotics를 engineering함으로 기존의 문제들이 극복 가능함을 보여주었다.

더불어 여러 종에서 유래한 외래 단백질로 구성된 유전자 회로를 engineering하여 만든 bacteria biosensor를 삼킬 수 있는 캡슐형태로 만들어 위장 출혈을 측정한 연구결과가 보고되었다. 이 논문에서는 출혈을 감지하기 위해 적혈구로부터 분리된 heme을 biomarker로 인지하는 genetic circuit을 만들었다. 이 유전자 회로는 평상시엔 *L. lactis*로부터 유래한 heme-responsive 전사인자인 HrtR repressor에 의해 발현이 억제되도록 설계한 인공 프로모터인 $Pl_{(HrtO)}$ 아래에 삽입된 lux operon과 heme의 세포질 수송을 위한 *Escherichia coli* O157:H7로부터 유래한 ChuA 막 단백질로 구성된다. 결과적으로, 이 유전자 회로를 갖는 미생물 주변에 heme이 존재하는 경우, ChuA에 의해 세포질로 수송된 heme이 HrtR과의 결합해 lux operon 발현되어 발광하게 된다. 이렇게 생산된 빛은 전자 회로를 통해 heme의 농도를 외부 수신기로 전송하여 실시간으로 in-vivo 출혈을 확인 가능하도록 디자인 되었다(그림 4)[13]. 이러한 bacteria biosensor는 작용 기작을 질병 진단에만 국한하지 않고 검출에 결과에 따라 바이오 의약품에 해당하는 단백질 생산과 접목한다면, 즉각적인 진단과 치료를 동시에 수행 가능하다는 점에서 중요한 전략이라고 볼 수 있다.

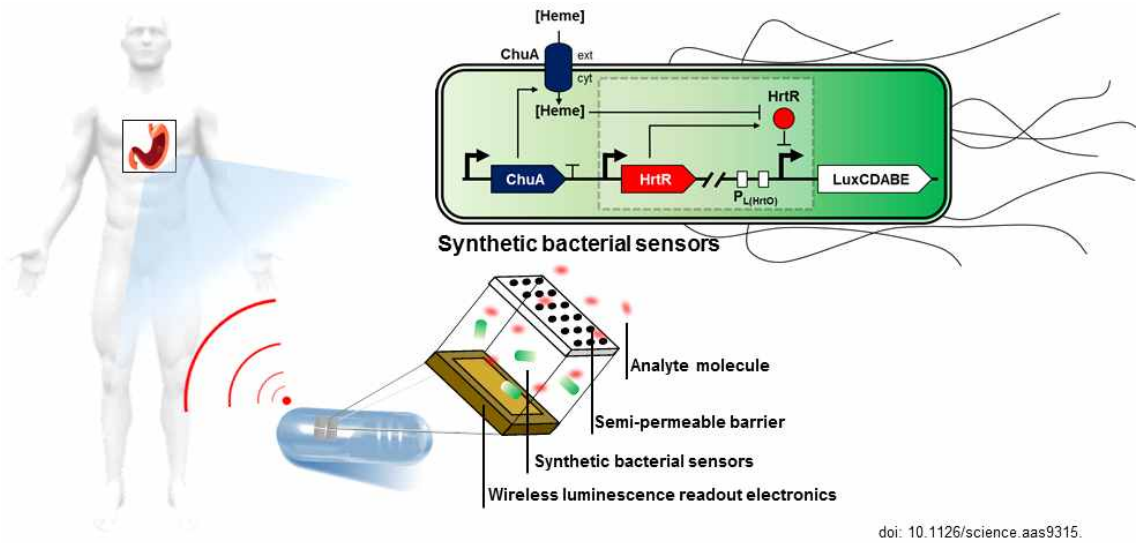


그림 4. 위장출혈 감지 유전자 발현회로를 지닌 bacteria biosensor 모식도. 위장출혈감지를 위해 유전회로를 도입한 probiotics의 개요도와 이를 캡슐화한 bacteria biosensor 모식도이다.

3. 맺음말

단백질 발현과 관련된 기존의 일반적인 전략은 전형적인 발현 시스템의 요소나 부품을 치환하거나 개량해 발현율의 변화를 유도하거나, 목적 유전자 자체의 인공진화를 통한 변이를 유발해 발현이나 기능이 개선된 재조합 단백질을 얻어내는 방법을 주로 이용하였다. 이러한 전략들은 많은 성공적인 결과들을 보고하며, 지금도 발현유도 연구 분야에 있어 주류를 형성하고 있다. 하지만 박테리아를 숙주로 이용하는 제한적인 환경에서는 근본적으로 해결하지 못한 몇몇 난제들이 존재하였다. 앞서 서술한 최근 연구 동향을 살펴보면, 이러한 문제점들의 대부분이 극복 가능한 요소로 생각되어 진다. 고등동물 유래의 고부가 단백질이 지닌 복잡한 이황화 결합이나 당화과정의 문제를 해결하였으며, 질병과 관련된 기능성 불용체를 고효율로 생산할 수 있는 기반을 제시하였기 때문이다. 이러한 전략들을 통해 박테리아, 특히 대장균을 인간이 필요로 하는 모든 단백질의 생산 숙주로 이용할 날이 멀지 않았음을 기대해 본다. 다세포 고등동물의 기원이며 현재에도 가장 풍부한 균총을 자랑하는 단세포 박테리아의 활용가치는 어디까지 일까?

4. 참고문헌

1) 이영찬 2014 보건산업백서.한국보건산업진흥원;2015.

2) Rosano, Germán L., and Eduardo A. Ceccarelli. "Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges." Frontiers in microbiology 5 (2014): 172.

3) Singha, Tapan Kumar, et al. "Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in Escherichia coli: A review." Process Biochemistry 55 (2017): 17-31.

4) Rao, Shilpa J., Sangeeta Chatterjee, and Jayanta K. Pal. "Untranslated regions of mRNA and their role in regulation of gene expression in protozoan parasites." Journal of biosciences 42.1 (2017): 189-207.

5) 홍효정. "치료용 항체의 개발 동향." 생화학분자생물학뉴스 (구 생화학뉴스) 31.2 (2011): 23-33.

6) Robinson, Michael-Paul, et al. "Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria." Nature communications 6 (2015): 8072.

7) Thyer, Ross, et al. "Custom selenoprotein production enabled by laboratory evolution of recoded bacterial strains." Nature biotechnology (2018).

8) Leclerc, Anne, Fernando MS Tomé, and Michel Fardeau. "Ubiquitin and β-amyloid-protein in inclusion body myositis (IBM), familial IBM-like disorder and oculopharyngeal muscular dystrophy: an immunocytochemical study." Neuromuscular Disorders 3.4 (1993): 283-291.

9) Kim, Chae, et al. "Artificial strain of human prions created in vitro." Nature communications 9.1 (2018): 2166.

10) Xu, Can, Shuo Hu, and Xiaoyuan Chen. "Artificial cells: from basic science to applications." Materials Today 19.9 (2016): 516-532.

11) Lee, Keel Yong, et al. "Photosynthetic artificial organelles sustain and control ATP-dependent reactions in a protocellular system." Nature biotechnology (2018).

12) Mao, Ning, et al. "Probiotic strains detect and suppress cholera in mice." Science

translational medicine 10.445 (2018): eaao2586.

13) Mimee, Mark, et al. "An ingestible bacterial-electronic system to monitor gastrointestinal health." Science 360.6391 (2018): 915-918.