합성생물학 기반 *Bacillus subtilis* 셀팩토리 개발 동향

한국생명공학연구원 김상윤 박사, 권오석 박사

1. 개요

그람 양성세균인 *Bacillus subtilis*는 토양세균의 일종으로 세균의 염색체 복제나 내포자 (endospore) 형성과정과 같은 기초연구를 위한 모델 균주로 오랫동안 사용되고 있으며 최근에는 유전체 정보를 바탕으로 전사체, 단백체, 대사체 등 각종 오믹스 분석도구를 이용하여 시스템생물학적 차원에서 외부 환경변화에 대한 유전체 수준의 반응을 연구하는 모델로 사용되고 있다 [1]. 또한 빠른 생장과 광범위한 기질 활용능력을 바탕으로 효소, 항생제, 터페노이드 등 유용 생물소재 생산과 오염원의 생물학적 정화를 위한 산업용 균주로 주목 받고 있다. 특히 GRAS (generally recognized as safe) 균주인 *B. subtilis*는 우수한 발효 특성을 갖고 있고 최대 리터당 20-25 g의 높은 단백질 분비 능력이 있어 세제, 섬유, 의약 산업용 재조합 단백질 생산 균주로 큰 장점을 갖고 있다. 실제 현재 사용되는 상업용 효소의 약 60% 정도가 *B. subtilis*에서 생산된다는 보고도 있다. 그 밖에도 natural competency, 용이한 유전체 삽입, 포자 형성을 통한 효과적 균주 보관이나 표면 발현 등의 장점이 있다. 이러한 특성을 바탕으로 최근 *B. subtilis*를 셀팩토리로 개발하기 위한 합성생물학적 접근이 시도되고 있는 바 본 고에서는 유전자 발현조절기구 개발, 단백질 분비발현 개선, 유전체 편집 도구 개발, 최소 유전체 연구 동향 등을 살펴보고자 한다.

2. *Bacillus*의 유전자 발현 도구 개발

새로운 단백질의약품과 백신 등이 지속적으로 개발됨에 따라 효율적인 단백질 발현 시스템의 필요성도 증대되고 있다. 특히 적절한 발현 숙주와 생산 조건의 선택은 의약품 수준의 단백질 생산을 위한 생산공정 수립에 결정적 요소가 되기 때문에 발현시스템의 선택이 매우 중요하다. 원핵미생물 중 대장균 (*Escherichia coli*)과 고초균 (*B. subtilis*)은 고농도 대량 배양을 통한 경제적 생산이 가능하기 때문에 산업용 재조합단백질 생산을 위해 자주 사용

되는 원핵미생물 균주들이다. 특히 *B. subtilis*는 대장균과 달리 GRAS 균주이며, 내독소 (endotoxin)로 불리는 외막의 lipopolysaccharide를 생산하지 않고 생산된 단백질 배지로 분비할 수 있는 능력이 우수한 특징을 갖고 있다. 그러나 *B. subtilis*가 가지고 있는 여러 가지 장점에도 불구하고 이 균주를 사용하여 생산된 단백질 제품은 최근 일부 의료용 단백질 생산이 시도되고 있기는 하지만 대부분 산업용 효소에 국한되어 있다 (표 1). 이는 (1) 적절한 발현 벡터의 부족, (2) 플라스미드 불안정성, (3) 단백질 분해효소, (4) 부정확한 단백질 접힘 등 외래 단백질 생산용 셀팩토리로써 *B. subtilis* 가 갖고 있는 주요 문제점들에 기인한다. 최근 이런 단점을 극복하기 위하여 프로모터 개발과 최적화 발현모듈설계 등의 연구가 활발히 진행되고 있다.

표 1. *B. subtilis* 활용 재조합 단백질 생산 예 [2].

Product	Yield
α-amylase (AmyS)	-
α-amylase (AmyQ)	1-3 g/L
Proinsulin	1 g/L
Lipase A	600 mg/L
Streptavidin	35-50 mg/L
scFv	10-15 mg/L
hEGF	7.0 mg/L
Endoglucanase	8300 U/L
IFN-alpha 2	0.5-1 mg/L
Poly (30hydroxybutyrate) depolymerase	1.9 mg purified protein/L
Endocellulase (Puradax®)	-
Subtilisin (AprE)	-

B. subtilis 균주에서 효율적으로 이종 유전자를 발현하기 위한 프로모터들이 개발되었다 (표 2). 우선 대장균에서 고효율 유전자 발현 시스템으로 알려진 T7 expression system [3]과 *groE* 프로모터 및 *lac* operator, *gsiB* ribosome binding site (RBS)로 구성된 P_{grac}100 프로모터 등이 있다 [4]. 이 두 프로모터는 IPTG 유도성 프로모터로 높은 유도 발현이 가능하지만 IPTG의 높은 가격과 독성 때문에 대량 배양 공정에 적용하기에는 적합하지 않다. 따라서 IPTG에 비해 유도 발현 정도는 낮지만 maltose 또는 mannitol과 같이 상대적으로 저렴하고 안전한 물질을 유도 인자로 사용하는 프로모터들

도 개발되었다 [5]. 또한 배양 조건 변화에 따라 stationary phase나 포도당 결핍에 의해 자가유도발현이 가능한 P_{cry3Aa}나 P_{manP} 같은 프로모터들도 개발되었다 [6, 7].

표 2. *B. subtilis* 유전자 발현 시스템 예 [8].

Promoter	Induction factor	Plasmid	β-Galactosidase activity
P_{glv}-M1	Maltose	pLJ-2	13.8 U/mL[a]
P_{T7}	IPTG	pMT1	-
Modified P_{cry3Aa}	Auto-inducible	pD82	5,228 Miller units
P_{mtlA}	Mannitol	pKAM12	13,000 Miller units
P_{manP}	Auto-inducible	pMW168.1	-
P_{grac}100	IPTG	pHT100	37,840 Miller units
P_{lapS}	IPTG	pLus-Hyb	26,037 Miller units

한편 최근에는 열 충격, 고농도 염, 독성 금속, 막스트레스를 유발하는 에탄올 등 외부 스트레스에 반응하는 데 관련된 80종 이상의 *B. subtilis* 단백질 유전자 프로모터를 녹색형광단백질 유전자에 연결한 발현 카세트를 각각 유전체에 삽입하여 발현을 비교한 연구결과가 보고되었다 [9]. 이 연구를 통해 향후 합성생물학용 바이오 소자 (biobrick element)로 활용할 수 있으며 최대 1,960배까지 타겟 유전자의 발현을 유도할 수 있는 다양한 스트레스 유도성 프로모터 라이브러리가 확보되었다. 나아가 유전자 발현을 보다 정교하게 조율할 수 있는 유전자 회로 (genetic circuit)도 개발되었다 [10]. 즉 전사 조절을 위한 프로모터, 번역 조절을 위한 RBS, 타겟 유전자 (GOI), 그리고 타겟 단백질의 분해 속도를 조절하기 위한 말단 (SsrA tags)을 포함하며, 각 요소의 제작과 치환이 용이하게 하고 유전체 삽입이 주변 유전자 발현의 영향을 배제하는 요소를 포함하는 표준화된 모듈 형태의 expression operating unit을 제작하고 유전체의 특정부위 *amyE* (알파 아밀라아제) 위치에 선별용 항생제 (spectinomycin) 내성 유전자와 함께 삽입하여 발현할 수 있는 시스템이다 (그림 1).

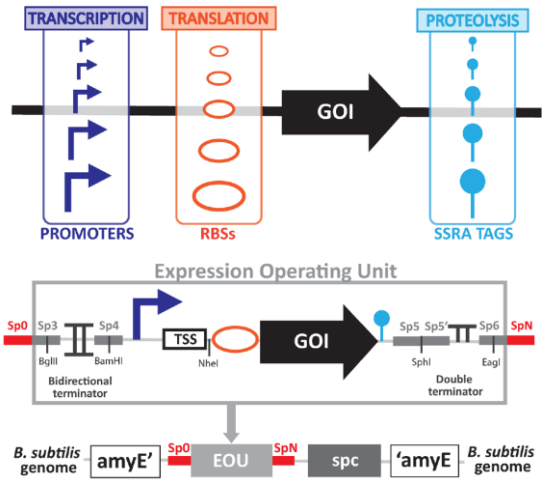

그림 1. *B. subtilis* 도입 유전자 발현 정밀제어를 위한 유전자회로 [10].

3. 단백질 분비경로 재설계

Bacillus 종은 동종 유래 단백질을 20~25 g/L까지 분비하는 특성을 가지고 있어 유망한 재조합단백질 생산용 셀팩토리 숙주로 주목 받고 있다. 그러나 이종 단백질 분비 발현 시 맞는 분비 경로의 부재, 단백질 유도 채널 (protein-conducting channel) 부족, 분비스트레스 발생 등으로 인하여 분비 효율이 현격히 저하되는 경향이 있다. 최근 이런 문제점들을 해결하기 위하여 주요 단백질 분비 경로인 Sec-SRP 경로나 Tat (twin-arginine translocation) 경로들을 재설계하는 연구들이 주로 수행되고 있다 [11]. 일례로 분비 타겟 단백질과 세포막의 유도 채널 단백질과 직접 작용하는 SecA 단백질의 C-말단에서 61개 아미노산이 제거된 변이 SecA를 발현함으로써 이종단백질의 분비 발현을 증대시킨 결과가 보고되었다 (그림 2) [12]. 또한 표지 유전자 (Penicillin G Acylase, PGA) 발현 벡터를 이용하여 *B. subtilis* 의 Tat 분비 경로에 관련성이 있을 것으로 추정되는 24개의 signal peptide 의 단백질 분비 효율을 비교 평가한 결과도 보고된 바 있다 [13]. 한편 최근 일본 연구진은 *B. subtilis* 168 균주 유전체의 20.7%에 해당하는 865개 유전자가 제거된 최소유전체 MGB874 균주를 이용하여 암모니아를 생성하여 배지의 산성화 방지에 기여하는 glutamate dehydrogenase (RogG) 발현을 증대시킴으로써 숙주의 단백질 분비 스트레스를 제거하여 외래 α-amylase AmyK38를 효율적으로 분비 발현 할 수 있음을 밝혔다 [14]. 위와 같이 *Bacillus* 단백질 분비 경로를 부분적으로 조작함으로써 몇몇 단백질의 분비능을 증대시킬 수 있지만 외래 단백질을 보다 효율적으로 생산할 수 있는 범

용 셀팩토리 개발을 위해서는 시스템생물학 및 합성생물학 도구를 이용하여 단백질 분비 경로에 대한 시스템 차원의 해석과 재설계가 필요하다.

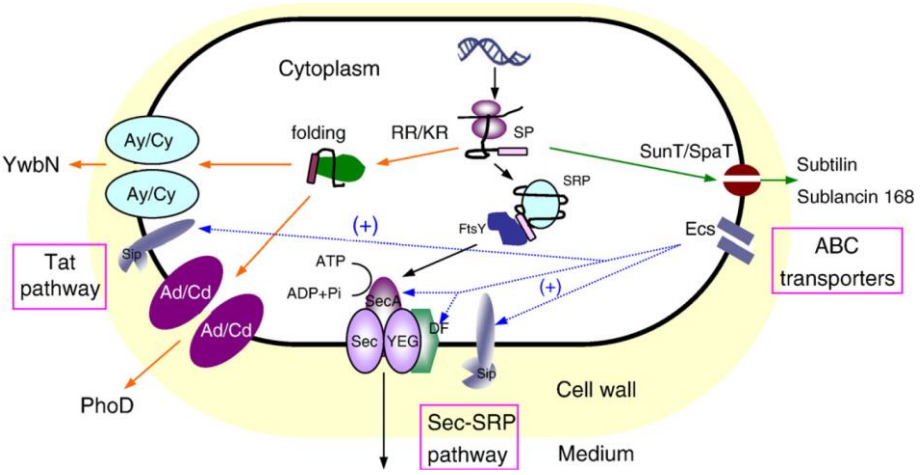

그림 2. *B. subtilis*에서의 단백질 분비 경로 모식도 [11].

4. 유전체 편집 도구 개발

전통적으로 미생물 유전체 편집은 타겟 유전자에 선별표지 유전자를 포함하는 카세트를 삽입하는 방법으로 수행된다 (그림 3). 그러나 선별표지 유전자로 주로 사용되는 항생제 내성 유전자의 경우 재조합 균주의 유전체 내에 잔존할 경우 항생제 내성 확산이나 GMO 등의 문제가 야기될 수 있고 또 사용 가능한 1차 선별표지 유전자의 종류가 제한적이기 때문에 다수 유전자를 대상으로 연속적인 조작이 필요한 경우 선행 편집에 사용된 표지유전자를 제거해야 할 필요가 있다 [15]. 이때 1차 선별표지 유전자의 제거를 효율적으로 확인하기 위한 counter-selection marker 들이 사용되는데 *B. subtilis*의 경우 피리미딘 대사경로 효소로 피리미딘 아날로그를 독성 물질로 전환할 수 있는 uracil phosphoribosyltransferase (*upp*)나 orotidine 5'-phosphate decarboxylase (*pyrF*), mRNA를 분해하는 endoribonuclease (*mazF*)나 DNA gyrase를 억제하는 F 플라스미드 유래 독소 (*ccdB*) 등을 유도성 프로모터를 이용하여 발현하거나 spectinomycin 내성 유전자 (*bla1*) 산물에 의해 억제되는 프로모터(P_{bla})에 라이신 생합성 유전자 *lysA* 유전자를 연결하여 조건부 영양요구성을 유발하는 방법 등이 보고되었다 [15, 16].

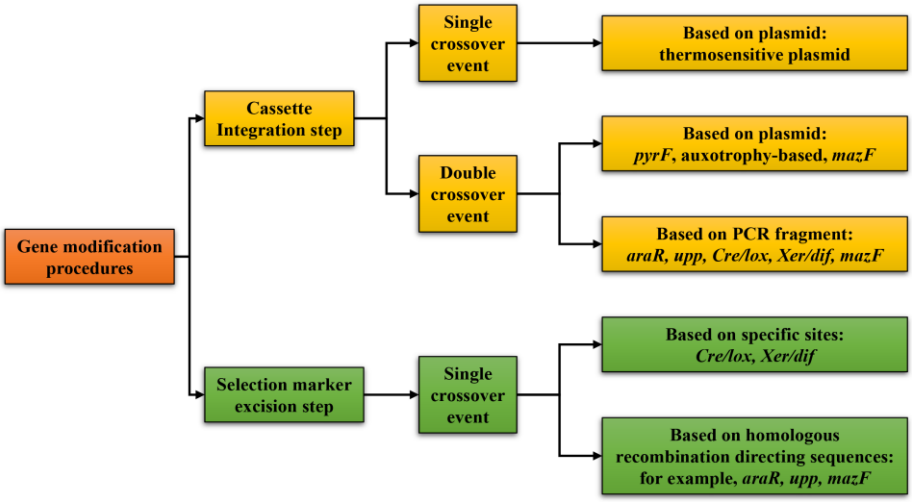

그림 3. 유전체 조작 개요 [17].

보다 효율적인 유전체 편집방법으로 최근 *Streptococcus pyogenes* 유래의 type II CRISPR-Cas9 시스템을 사용한 *B. subtilis* 유전체 편집 기술이 개발되었다 (그림 4). 이 시스템은 파아지나 플라스미드 같은 외래 유입 유전물질을 제거하는 세균의 면역시스템을 응용한 방법으로 우선 Cas9 nuclease와 결합한 single-guide RNA (sgRNA)가 20-bp의 타겟 DNA에 상보적으로 결합하면 Cas9이 protospacer adjacent motif (PAM)인 NGG 서열을 인지하여 5'-말단쪽으로 3-bp 떨어진 부분을 절단하게 된다. 이렇게 형성된 double strand break (DBS)이 숙주에 의해 복구되는 과정 중에 상동 DNA 단편 등을 활용하여 유전체 편집이 유도되는 시스템이다 [18-20]. 최근 Altenbuchner가 구축한 single-plasmid 기반의 Cas9 시스템은 temperature-sensitive replication origin (pE194ts), mannose-inducible promoter P_{manP} 등을 포함하며 single guide RNA (sgRNA) 및 상동 염기서열을 이용하여 효율적으로 타겟 유전자 편집이 가능한 시스템이다. 한편 미생물에서도 상동 DNA가 불필요한 CRISPR-Cas9 non-homologous end-joining (NHEJ) 기술도 개발되었다 [21]. 즉 *Mycobacterium tuberculosis* 균주의 double-stranded break (DSB) repair에 관여하는 단백질 중 Ku 및 LigD의 유전자를 Cas9과 함께 대장균 세포에 도입함으로써 원하는 타겟 유전자 절단 부위에서 NHEJ이 일어나게 하는 기술이다. 흥미롭게도 *Bacillus* 균주 또한 예기치 못한 DSB 대응하기 위한 Ku, LigD 유전자를 가지고 있는 것으로 보고되었다 [22]. 이는 상동 염기서열과 관계없이 sgRNA만으로 유전체 조작이 가능함을 시사한다.

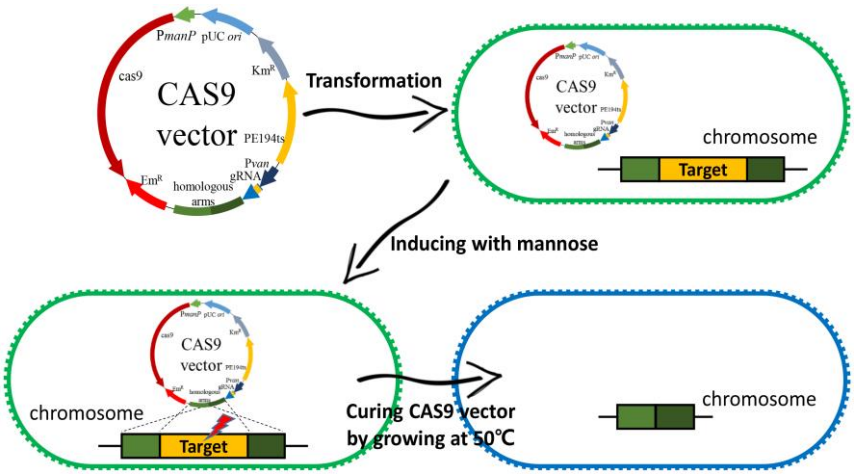

그림 4. CRISPR/Cas9 기반 *B. subtilis* 유전체 편집 메커니즘.

5. 최소 유전체 균주 개발

셀팩토리 설계 시 타겟 대사산물이나 단백질 생산 혹은 필수적인 세포 기능 수행을 위해 필요한 유전자 외에 불필요한 유전자를 제거할 수 있다면 에너지 소모 방지, 배양 최적화, 정제 효율 증대 등의 효과를 기대할 수 있다. EU 프로젝트 "*Bacillus* Minimal Genome"를 통해 셀팩토리 개선을 목표로 *B. subtilis* 168 균주에서 다량의 불필요한 AT-rich 영역과 두 개의 prophage (SPβ와 PBSX), 세 개의 prophage-like element (prophage 1, prophage 3, skin) 및 polyketide synthase (*pks*) operon을 삭제함으로써 유전체의 7.7 % (332 유전자) 제거했다 [23]. 이 최소유전체 균주는 야생형과 비교 시 거의 동일한 탄소 대사를 보였으며 competence, sporulation 및 proteolytic 활성 등에 변화는 없음이 확인되었다. 나아가 Morimoto 등은 전체 유전자의 약 20%가 제거된 *B. subtilis* MBG874 균주를 제작하였으며, *B. subtilis* 168 모균주와 비교 시 특히 cellulase나 protease 같은 일부 이종 단백질의 분비 발현이 향상됨을 확인하였다 [24]. 이는 arginine 분해에 관여하는 유전자들이 결손되어 세포 생산성이 증대되고 타 유전자 결손으로 플라스미드 카피수도 증가하여 결과적으로 타겟 단백질의 생산이 늘어난 것으로 해석되어 최소 유전체 균주 연구가 *Bacillus* 셀팩토리 개발의 효과적인 수단이 될 수 있음을 입증하였다 [25].

6. 고찰

미생물 세포 재설계 노력은 대부분 유용 대사물질 생산, 외래 생합성 경로 발현, 외래 단백질 발현 등에 초점이 맞추어져 있으며 주로 일부 미생물을 대상으로 유전체 정보 해독, 시스템생물학적 분석, 합성생물학 도구 등을 활용하여 더욱 가속화 되고 있다. *B. subtilis*는 내포자 형성 등 기초연구 뿐만 아니라 산업용 효소 생산 등 응용연구의 대상인 대표적인 그람 양성세균이다. 특히 GRAS 균주로서 의료용 단백질을 포함한 고부가 단백질 생산과 터페노이드와 같은 유용생물소재 생산을 위한 셀팩토리 개발 가능성 때문에 더욱 주목 받고 있다. 최근 *B. subtilis* 168 균주를 모델로 유전자 발현조절기구 개발, 단백질 분비 경로 재설계, 유전체 편집 도구 개발, 최소 유전체 연구 등이 활발히 진행되고 있다 (그림 5). 한편 모델 균주 외에 전통 식품 등 다양한 소재로부터 각종 유용 기능을 갖는 *Bacillus* 균주들이 발굴되고 있고 상기한 각종 합성생물학 도구들을 적용할 수 있게 됨에 따라 *Bacillus* 기반의 유용 셀팩토리 개발 및 활용은 더욱 가속화될 전망이다.

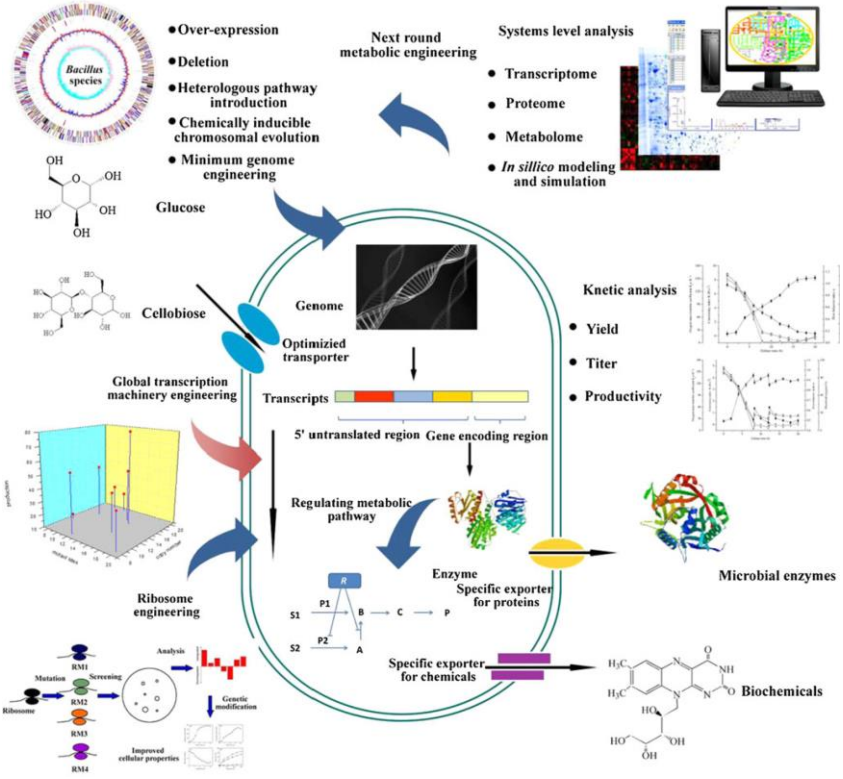

그림 5. *B. subtilis* cell factory 구축 모식도 [8].

7. 참고문헌

1. Liu Y, Li J, Du G, Chen J, Liu L: Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. *Biotechnol Adv* 2017, 35:20-30.
2. Westers L, Westers H, Quax WJ: *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2004, 1694:299-310.
3. Chen PT, Shaw JF, Chao YP, David Ho TH, Yu SM: Construction of chromosomally located T7 expression system for production of heterologous secreted proteins in *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* 2010, 58:5392-5399.
4. Phan TT, Nguyen HD, Schumann W: Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. *J Biotechnol* 2012, 157:167-172.
5. Heravi KM, Wenzel M, Altenbuchner J: Regulation of *mtl* operon promoter of *Bacillus subtilis*: requirements of its use in expression vectors. *Microb Cell Fact* 2011, 10:83.
6. Lee SJ, Pan JG, Park SH, Choi SK: Development of a stationary phase-specific autoinducible expression system in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* 2010, 149:16-20.
7. Wenzel M, Muller A, Siemann-Herzberg M, Altenbuchner J: Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation. *Appl Environ Microbiol* 2011, 77:6419-6425.
8. Liu L, Liu Y, Shin HD, Chen RR, Wang NS, Li J, Du G, Chen J: Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97:6113-6127.
9. Song Y, Nikoloff JM, Fu G, Chen J, Li Q, Xie N, Zheng P, Sun J, Zhang D: Promoter Screening from *Bacillus subtilis* in Various Conditions Hunting for Synthetic Biology and Industrial Applications. *PLoS One*

2016, 11:e0158447.

10. Guiziou S, Sauveplane V, Chang HJ, Clerte C, Declerck N, Jules M, Bonnet J: A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 2016, 44:7495-7508.
11. Ling Lin F, Zi Rong X, Wei Fen L, Jiang Bing S, Ping L, Chun Xia H: Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnol Adv* 2007, 25:1-12.
12. Kakeshtia H, Kageyama Y, Ara K, Ozaki K, Nakamura K: Enhanced Extracellular Production of Heterologous Proteins in *Bacillus subtilis* by Deleting the C-terminal Region of the SecA Secretory Machinery. *Mol Biotechnol* 2010, 46:250-257.
13. Zhu F-M, Ji S-Y, Zhang W-W, Li W, Cao B-Y, Yang M-M: Development and Application of a Novel Signal Peptide Probe Vector with PGA as Reporter in *Bacillus subtilis* WB700: Twenty-Four Tat Pathway Signal Peptides from *Bacillus subtilis* were Monitored. *Mol Biotechnol* 2008, 39:225-230.
14. Manabe K, Kageyama Y, Tohata M, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N: High external pH enables more efficient secretion of alkaline a-amylase AmyK38 by *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact* 2012, 11:74.
15. Zhang XZ, Yan X, Cui ZL, Hong Q, Li SP: *maz*F, a novel counter-selectable marker for unmarked chromosomal manipulation in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:e71.
16. Fabret C, Ehrlich SD, Noirot P: A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2002, 46:25-36.
17. Dong H, Zhang D: Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species. *Microb Cell Fact* 2014, 13:63.
18. Westbrook AW, Moo-Young M, Chou CP: Development of a CRISPR-Cas9 Tool Kit for Comprehensive Engineering of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 2016, 82:4876-4895.
19. Altenbuchner J: Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. *Appl Environ Microbiol* 2016, 82:5421-5427.

20. Christin JR, Beckert MV: Origins and Applications of CRISPR-Mediated Genome Editing. *Einstein J Biol Med* 2016, 31:2-5.
21. Su T, Liu F, Gu P, Jin H, Chang Y, Wang Q, Liang Q, Qi Q: A CRISPR-Cas9 Assisted Non-Homologous End-Joining Strategy for One-step Engineering of Bacterial Genome. *Sci Rep* 2016, 6:37895.
22. Brissett NC, Doherty AJ: Repairing DNA double-strand breaks by the prokaryotic non-homologous end-joining pathway. *Biochem Soc Trans* 2009, 37:539-545.
23. Westers H, Dorenbos R, van Dijl JM, Kabel J, Flanagan T, Devine KM, Jude F, Seror SJ, Beekman AC, Darmon E, et al: Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol* 2003, 20:2076-2090.
24. Morimoto T, Kadoya R, Endo K, Tohata M, Sawada K, Liu S, Ozawa T, Kodama T, Kakeshita H, Kageyama Y, et al: Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res* 2008, 15:73-81.
25. Manabe K, Kageyama Y, Morimoto T, Ozawa T, Sawada K, Endo K, Tohata M, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N: Combined effect of improved cell yield and increased specific productivity enhances recombinant enzyme production in genome-reduced *Bacillus subtilis* strain MGB874. *Appl Environ Microbiol* 2011, 77:8370-8381.