효모 세포 공장 개발을 위한 합성생물학

한국화학연구원 이주영

1. 개요

합성생물학(synthetic biology)과 대사공학(metabolic engineering)은 기존의 바이오 연료나 석유화학 기반의 범용성 제품에서 탈피하여 신규 기능성 소재 및 스페셜티(specialty) 제품의 생산이 가능한 새로운 미생물 세포 공장의 개발을 가능케 하고 있다 (그림 1). 단일 효소에 의해 생산되는 비천연 케미컬인 lactic acid나 xylitol이 효모에서 최초로 생산된 이후, 합성생물학의 발전과 함께 다수의 효소 반응에 의해 생산되는 amorphadiene, indolyglucosinolate, plant alkaloid 등과 같은 복잡한 케미컬의 생산도 가능해졌다.

최근 Amyris와 Sanofi는 파트너쉽을 맺고 효모에서 항말라리아 의약품인 artemisinin을 상업화 수준으로 개발하고 있으며, Evolva는 효모를 이용하여 F&F(Flavor & Fragrance)물질로 바닐라향을 내는 원료인 바닐린(vanillin)을 2014년에 제품으로 출시한 바 있다 (그림 2). 그러나, 생산하고자 하는 유용 타겟 화합물을 고농도·고수율로 생산할 수 있는 강력한 세포 공장 개발에 필요한 오랜 시간과 노력, 고가의 비용 때문에 효모에서 수백 개에 달하는 화합물의 생산이 시도되었지만 현재까지 상업화 수준에 이른 것은 일부에 그치고 있다. 합성생물학은 복잡한 바이오 시스템의 예측 가능한 조작을 가능하게 함으로써 실험실 기반의 미생물 세포 공장 기술과 제품 상용화 사이의 격차(죽음의 계곡, valley of death)를 극복할 수 있는 획기적인 연구 분야로 가능성을 인정받고 있다.

합성생물학을 기반으로 강력한 세포 공장을 개발하기 위해서 (1) 타겟 케미컬 생산에 필요한 생합성 대사경로의 발굴 또는 합성 (2) 숙주 세포 내에서 발굴한 생합성 대사경로의 효과적인 재조합 (3) 대사경로를 구성하는 각각의 효소들의 발현(expression)과 활성(activity) 최적화 (4) 전구체(precursor), 보조인자(cofactor), 에너지 등의 효과적인 공급을 위한 숙주 세포의 최적화가 필요하다.

본 논고에서는 효모 특히, 전통효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 비천연의 생합성 대사경로(non-native biochemical pathway)를 디자인, 재설계, 최적화하기 위해 합성생물학을 적용한 사례들을 살펴보고자 한다. 즉, 생합성 대사경로를 예측하기 위한 computational tool과 대사경로의 구성 요소인 DNA part를 재조합하고 숙주 세포 내로 도입하기 위한 분자 생물공학적 방법 및 도입된 대사경로를 최적화하기 위한 방법들에 대해 다루고자 한다.

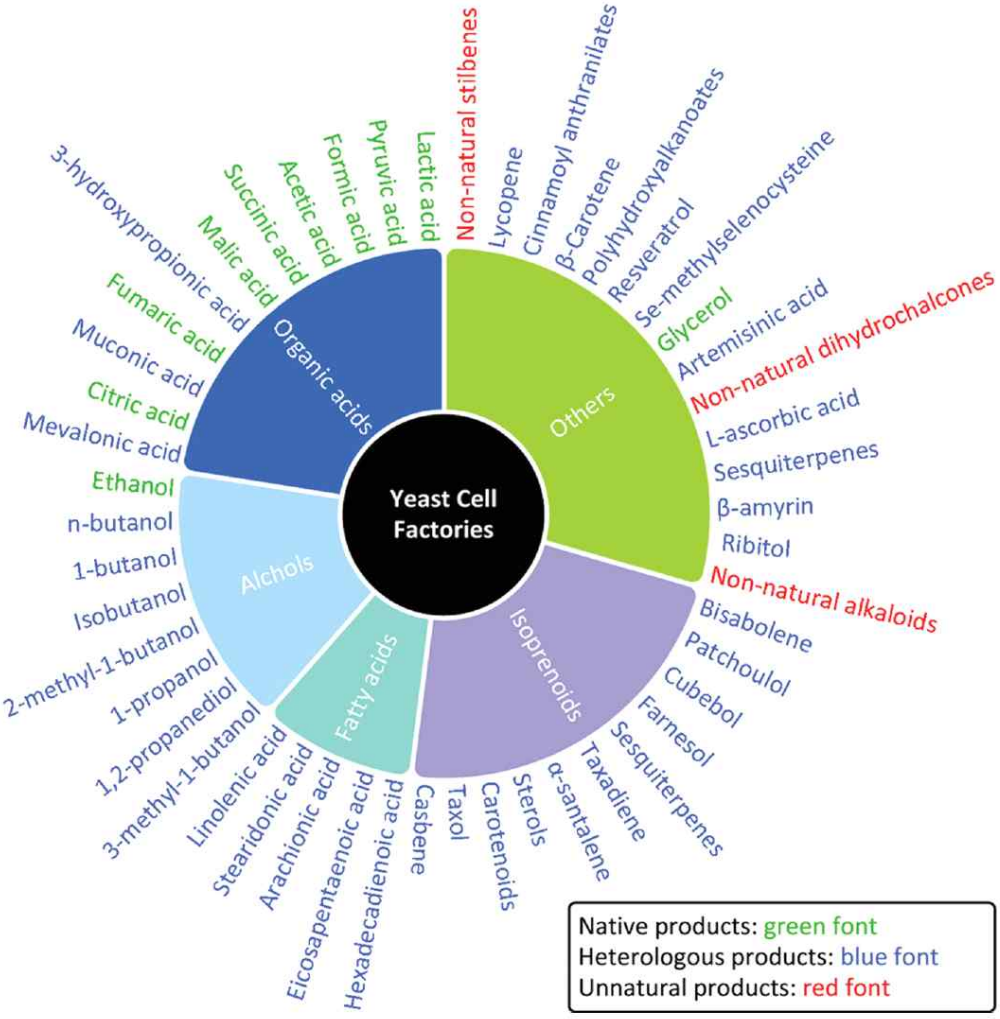

그림 1. 효모에서 생산된 케미컬의 예[1]

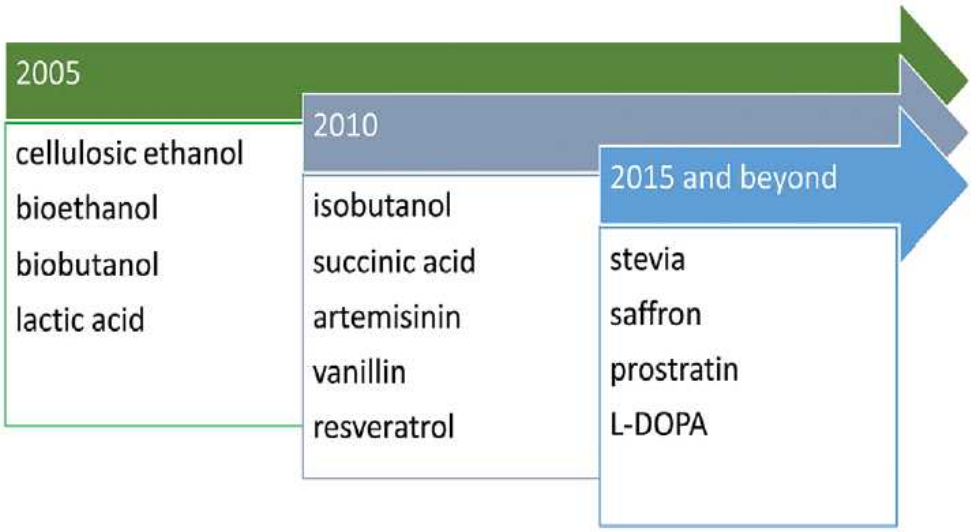

그림 2. *S. cerevisiae* 기반 벌크·정밀 케미컬의 시장 진입 연대표[2]

2. 생합성 대사경로 디자인을 위한 computational tool

특정 케미컬 생산을 위한 세포 공장을 설계하기 위한 첫 단계는 세포 내에 존재하는 중간 대사산물을 전구체로 이용하여 타겟 케미컬을 생산할 수 있는 생합성 반응을 스크리닝하고 선별하는 것이다. 생산하고자 하는 타겟 케미컬의 생합성 대사경로가 이미 밝혀져 있는 경우 간단하게 숙주 세포 내로 대사경로를 도입하여 생산에 이용할 수 있지만, 현재까지 알려진 226000개의 천연물 중 대부분의 생합성 대사경로는 완벽히 규명되지 않았거나[3], 자연에 존재하지 않아 화학적 합성을 통해 생산되는 경우가 많다. 따라서, 가능한 생합성 대사경로를 총체적으로 분석하고 종합하여 가장 효과적이고 실현가능한 대사경로를 평가하고 제시할 수 있는 computational tool은 생합성 대사경로를 디자인하는데 매우 유용하다 (표 1).

대부분의 생합성 대사경로 예측 알고리즘은 이미 알려져 있는 효소 반응과 대사경로를 기반으로 한다 (reference-based frameworks). 따라서 기존의 예측 알고리즘은 이미 알려져 있는 효소 반응에 국한되어 대사경로를 예측하는 한계를 가진다. 두 대사산물 간의 가능한 대사경로를 KEGG 데이터베이스를 기반으로 예측하는 FFM('From Metabolite to Meta-bolite')이 대표적인 예이다[4]. Chatsurachai 연구팀은 비천연 대사산물을 산업적으로 유용한 숙주에서 생산할 수 있도록 BRENDA와 KEGG 데이터베이스에 존재하는 모든 외래 대사경로를 기반으로 대사경로를 디자인하고 예측한 바 있다[5]. 그 결과, 33개가 채 되지 않는 외래 대사경로만으로 3154종류의 비천연물을 *S. cerevisiae*에서 생산할 수 있는 대사경로를 예측할 수 있었고 이 중 약 67%의 비천물의 경우 (1,3-propanediol, isoprene, α-farnesene 등)의 글루코스로부터 생산이 가능한 것으로 예측되었다.

표 1. 생합성 대사경로 예측에 사용되는 computational tool

Software	Software availability	Description
FFM	http://fmm.mbc.nctu.edu.tw/index.php	KEGG 정보를 기반으로 시작과 마지막 대사산물 사이의 대사경로 재구성
Chatsurachai *et al.*	http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/pathway˙search.zip	KEGG와 BRENDA DB를 기반으로 숙주 세포 내의 대사경로를 타겟 대사산물 (비천연) 생산과 연결
Metabolic Tinker	http://osslab.lifesci.warwick.ac.uk/Tinker˙Download.aspx.	CHEBI와 RHEA DB를 기반으로 전구체(중간 대사체)와 타겟 화합물 사이의 실현가능한 경로 예측
eQuilibrator	http://equilibrator.weizmann.ac.il/eQuilibrator	특정 조건 하에서(pH, ionic strength, reactant, product 농도) 생합성 반응의 매개변수 예측
Retropath	http://www.issb.genopole.fr/˜faulon/retropath.php	가능한 생합성 경로 예측 및 도출된 생합성 경로의 순위화

Metabolic Tinker는 acetoacetyl-coA에서 isoprenoid 화합물의 전구체인 isopentenyl diphosphate의 생산이 가능한 대사경로를 예측하는데 사용된 바 있다. 또한, acetoacetyl-coA 외에도 S-adenosyl-L-homocysteine에서 생산 가능한 새로운 대사경로를 제시하였다. 이 외에도 특정한 pH, 대사경로에 관여하는 대사산물의 농도, 보조인자(cofactor)의 농도 등 특정 조건 하에서 최적화된 생합성 대사경로와 매개변수의 예측이 가능한 software도 개발되었다 (eQuilibrator).

이미 알려져 있는 생합성 경로를 기반으로 하는 알고리즘 외에도 신규(*de novo*) 대사경로를 설계하고 재구성할 수 있는 알고리즘도 개발되어 사용되고 있다. Biochemical Network Integrated Computational Explorer (BNICE)는 신규 대사산물과 대사경로를 발굴하기 위해 개발되었고[6], 실제로 1,2,4-trichlorobenzene을 생분해할 수 있는 신규 대사경로[7]와 pyruvate에서 1-butanol을 생합성할 수 있는 9개의 신규 대사경로를 설계하였다[8].

생합성 대사경로를 예측하는 알고리즘의 정확도와 예측력의 실험적인 검증이 여전히 남아있는 숙제이지만, 최적화된 생합성 대사경로를 예측하고 신규(*de novo*) 대사경로를 설계할 수 있는 computational tool은 강력한 세포 공장 개발에 매우 유용한 tool임은 의심할 여지가 없다.

3. 대사경로 조립 tool

지난 수십 년 동안 DNA part들을 조립하기 위해 cloning의 정확도, 속도, 효율성 등을 향상시킨 수많은 합성생물학 tool이 개발되었다. 전통적인 제한효소에 의한 절단과 실링 기반의 클로닝 기법이 제한효소의 절단이 불필요한 Gibson isothermal assembly, in-fusion, uracil-specific excision reaction (USER) 클로닝, circular polymerase extension cloning (CPEC), ligase cycling reaction (LCR), modular cloning system (MoClo), *in vivo* homologous recombination 등의 기법으로 대체되고 있다 (그림 3).

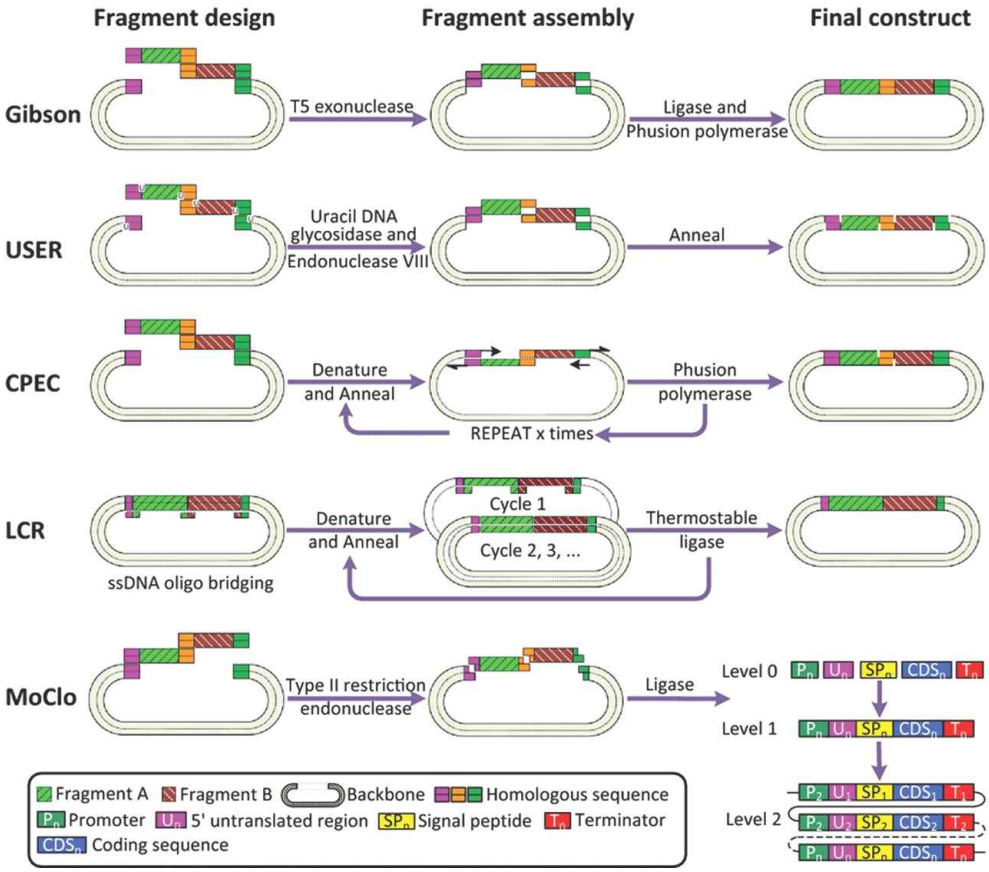

그림 3. DNA 조립 기법의 예[1]

Gibson 기법은 40 bp의 overlapping 서열을 가지는 3-4개의 DNA 조각을 90% 효율로 조립이 가능하다. Gibson 기법은 특히 길이가 큰 DNA 조각을 조립하는데 적합하여 *M. genitalium*의 583 kb 유전체를 인위적으로 합성하여 최초의 인공 박테리아 유전체를 합성하는데 사용한 기법이기도 하다[9]. In-fusion 기법은 15 bp의 overlap으로 DNA 조각을 조립하는 방법으로, 3개 DNA 조각을 40%의 효율로 조립할 수 있는 것으로 보고되고 있다[10]. Uracil-specific excision reaction (USER)은

7-12 bp의 짧은 overhang을 이용해서 2-7개의 DNA 조각을 90%의 고효율로 조립할 수 있는 기법이다. 다만, USER은 각 overhang에 반드시 deoxythymidine (dT)가 deoxyuridine (dU)로 치환되어 있어야 하므로 dU가 포함된 primer를 이용하여 조립에 이용할 DNA 조각들을 증폭해야 한다[11]. Circular polymerase extension cloning (CPEC)은 다수의 DNA 조각을 조립하기 위해 "denaturation-annealing-extension"의 cycle을 반복적으로 수행하는 기법으로 조립하고자 하는 DNA 조각의 수에 따라 cycle의 반복수가 결정된다. 저가의 비용과 95%의 효율로 4개까지 DNA 조각을 조립할 수 있지만 DNA의 extension 과정에서 mutation이 유도될 수 있다는 단점이 있다[12]. Golden Gate cloning으로 잘 알려져 있는 Type IIS 제한효소 기반의 Modular cloning system (MoClo)은 10개의 DNA 조각까지 90%의 효율로 조립할 수 있어 다수의 유전자 조각으로 구성된 33 kb의 큰 길이의 DNA를 3단계의 클로닝만으로 조립한 보고가 있다[13]. Single-stranded DNA bridging oligo를 이용하는 ligase cycling reaction (LCR)은 mevalonate 생합성 대사경로를 구성하는 12개의 DNA 조각들을 75% 효율로 조립이 가능하였다[14]. 마지막으로 *S. cerevisiae*의 DNA repair machinery를 이용하여 *S. cerevisiae* 세포 내에서 30-40 bp의 overlap으로 homologous recombination을 통해 DNA 조각들을 조립하는 *in vivo* recombination 방법이 있다. 최종 조립된 DNA 조각은 plasmid 형태로 *S. cerevisiae* 세포 내에서 복제되거나 유전체 내로 도입될 수 있다 (표 2). 이와 같이 합성 생물학을 응용한 homology 기반의 DNA assembly 기법들을 이용하여 비교적 큰 사이즈의 유전자들까지 좀 더 쉽고 빠른 방법으로 조합이 가능해졌다.

표 2. DNA 조립 기법[1]

조립 기법	DNA 조각의 overhangs	조립할 DNA 조각	최종 조립 길이 (kb)	효율
Gibson	40 bp overlaps	c. 4	900	90% (for 3 fragments)
In-fusion	>15 bp overlaps	2-3	c. 5	>60% (for 2 fragments)
USER	7-12 bp overlaps (반드시 1 dU가 포함)	3-7	c. 8	>90% (up to 7 fragments)
MoClo	4 bp overlaps과 type IIS 제한효소 인식 site	c. 10	33 (in 3 rounds)	>90%

LCR	60-90 bp bridging oligo	>10	20	>90% (up to 6 fragments) c. 75% (12 fragments)
in vivo recombination in *S. cerevisiae*	>40 bp overlaps	>10	>20	>90% (up to 6 fragments) c. 75% (12 fragments)

4. 대사경로의 최적화 tool

목적한 타겟 산물의 생산을 위한 대사경로가 설계되고 제작되면 생산물의 생산성을 극대화하기 위한 대사경로의 최적화가 중요하다(그림 4). 다양한 합성생물학 기법들이 개발·적용되어 기존의 방법들로 해결하지 못했던 문제와 한계점을 해결하려는 시도들이 이뤄지고 있다. 대사경로를 구성하는 각 효소들을 coding하는 유전자들의 발현양을 조절하여 특정 효소의 활성을 억제하거나 세포에 독성을 유발할 수 있는 중간체가 축적되는 것을 감소시킴으로써 숙주 세포의 metabolic load를 완화시키고 생산성을 높일 수 있다. 또한 대사경로를 구성하는 효소들을 세포 내에서 인접하게 위치시킴으로 metabolic channeling 효과를 얻을 수 있다. 즉, 설계된 대사경로 상의 첫 단계에서 생산된 product가 다음 단계의 substrate로 이용할 수 있는 확률을 공간적으로 높여줌으로써 생합성 중간체들의 손실을 최소화하여 최종 산물의 생산성을 증가시킬 수 있다. 효소의 활성 증가를 위한 개량 역시 대사경로 최적화를 위한 핵심 요소로, 보조인자(cofactor)나 substrate 결합 특이성을 조절, 입체성 조절(allosteric regulation)을 제어하거나 효소 자체의 구조적 안정성을 증대시킴으로써 대사경로를 최적화할 수 있다.

대사경로를 구성하는 각 반응들의 공간적인 제약을 통해 대사경로의 효율을 증대시키는 metabolic channeling은 구획화(compartmentalization), fusion 또는 scaffolding을 통해서 각 효소들을 공간상 인접하게 위치시킨다. 이는 diffusion, degradation, 경쟁관계에 있는 다른 효소(competing pathway)들에 의한 중간체의 손실을 막고, 중간체에 의해 유발될 수 있는 독성 효과를 감소시키거나, 공간적으로 중간체의 양을 집중시킴으로서 반응의 turnover rate를 증가시키는 효과를 얻을 수 있다. 예로, *S. cerevisiae*의 세포질이 아닌 미토콘드리아에 isobutanol 생합성 대사경로를 도입·구획화함으로써 2.6배 생산량이 증가된 바 있다[15]. 마찬가지로, valencene와 amorphadiene 생합성 효소를 미도콘드리아에서 발현하여 각각 8배와 20배 생산량을 증가시킨 연구 결과도 보고되었다[16].

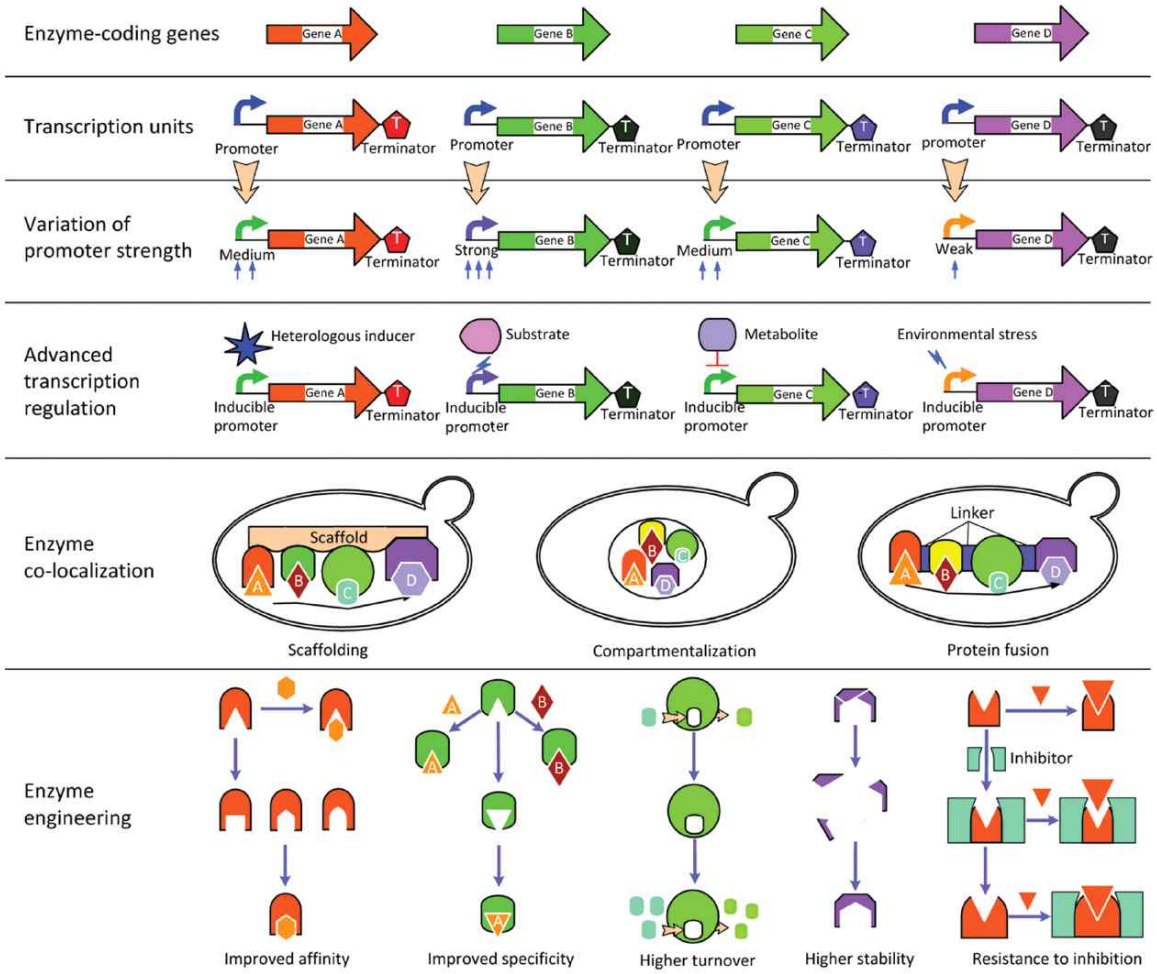

그림 4. 대사경로 최적화를 위한 합성생물학의 접근 방법[1]

*S. cerevisiae*에서 resveratrol의 생산량을 증가시키기 위해 핵심 효소인 4-coumarate-CoA ligase와 stilbene synthase를 fusion하여 fusion 단백질을 제작하여 도입했을 경우, 각각의 효소들을 별도로 발현하여 도입했을 때 보다 14배가량 생산량이 증가하는 것을 확인하였다[17]. Scaffolding을 이용한 경우에는 scaffold를 이용하지 않은 경우 보다 resveratrol 생산이 5배, fusion 단백질을 이용한 경우보다 2.7배 증가한 결과를 얻었다[18].

단백질 scaffold외에도 현재까지 scaffolding의 구조로 효모에서 RNA를 이용한 사례는 없지만 박테리아에서는 RNA를 scaffold를 이용하여 수소 생산을 48배까지 증가시켜 RNA 역시 scaffolding에 효과적으로 사용할 수 있다는 가능성을 제시하였다[19].

5. 고찰

합성 생물학은 복잡한 DNA part들을 명료하게 표준화시켜 보다 복잡한 시스템의 설계와 조작을 가능하게 만들었다. 즉 생명체의 유전자 네트워크를 단순화된 수학적 모델로 디자인하고, 과거에는 상상할 수 없었던 속도와 정밀성을 갖춘 재조합 DNA 기반의 분자생물학 기술을 이용하여 새로운 유전자 네트워크를 가지는 인공 미생물을 조립한다. 합성 생물학과 수백만 가지의 다양한 물질들을 생합성할 수 있는 가능성을 내재하고 있는 미생물 유전체의 접목은 바이오 연료 및 범용·정밀 화학제품, 신약 개발 등에 획기적인 혁신을 불러일으킬 수 있으며 식량, 에너지, 의약품 등 미래 산업에 광범위하게 응용이 가능할 것으로 기대된다.

미칠 파급효과는 매우 클 것으로 기대된다.

최근 주목 받고 있는 녹색산업과 헬스케어의 두 유망사업에 미칠 파급효과는 매우 클 것으로 기대된다.

. 따라서 합성 생물학은 최근 주목 받고 있는 녹색산업과 헬스케어의 두 유망사업을 아우르는 핵심 기반 기술로 미래 산업에 미치는 파급효과는 매우 클 것으로 예상된다.

합성 생물학의 다양한 기술들을 이용하여 수백만 가지의 다양한 물질들을 생합성할 수 있는 가능성을 내재하고 있는 미생물 유전체에서 바이오 연료 및 범용·정밀 화학제품, 신약 개발에 이르기까지 무궁무진한 혁신을 불러일으킬 수 있다.

획기적인 혁신을 불러일으킬 수 있다.

수백만 가지의 다양한 물질들을 생합성할 수 있는 가능성을 내재하고 있는 미생물의 유전체와 합성 생물학의 다양한 기술들의 접목은 바이오 연료 및 범용·정밀 화학제품, 신약 개발에 획기적인 혁신을 불러일으킬 수 있다.

지난 20세기 초 화학 원소나 간단한 화합물을 이용하여 새로운 화합물을 제조하는 합성화학 이 산업 전반에 막대한 변화를 일으켰다. 마찬 가지로 21세기의 합성생물학이 산업에 미치는 파급효과 또한 매우 클 것으로 예상된다. 특히 합성생물학은 최근 주목 받고 있는 녹색산업과 헬스케어의 두 유망사업을 아우르는 핵심기반 기술로서 그 가치가 높다고 할 수 있다.

합성생물학을 통해 제작된 인공 미생물 및 박테리아를 사용하여 바이오 연료 및 화학제품, 신약 개발 분야에 혁신을 앞당길 수 있기 때문 이다. 또 합성생물학은 컴퓨터를 사용한 설계와 표준화된 바이오 부품을 사용함으로써, 바이오 기술의 산업화 기틀을 마련해 준다. 공학적 원칙을 사용하기 때문에 사전설계, 최적화, 대량생산 등 기존 제조업과 유사한 특징이 있어 파급효과는 더욱 크다고 할 수 있다

참고문헌

1. Mingji Li & Irina Borodina. Application of synthetic biology for production of chemicals in yeast *Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res.* (2015)
2. Eugene Fletcher, Anastasia Krivoruchko & Jens Nielsen. Industrial systems biology and its impact on synthetic biology of yeast cell factories. *Biotechnol. Bioeng.* (2016)
3. SeyedsayamdostMR, Clardy J Natural products and synthetic biology. *ACS Synth. Biol.* (2014)
4. Chou CH, Chang WC, Chiu CM, Huang CC, Huang HD. FMM: a web server for metabolic pathway reconstruction and comparative analysis. *Nucleic Acids Res.* (2009)
5. Chatsurachai S, Furusawa C, Shimizu H. An in silico platform for the design of heterologous pathways in nonnative metabolite production. BMC Bioinformatics (2012)
6. Hatzimanikatis V, Li C, Ionita JA, Henry CS, Jankowski MD, Broadbelt LJ. Exploring the diversity of complex metabolic networks. *Bioinformatics* (2005)
7. Finley SD, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. *In silico* feasibility of novel biodegradation pathways for 1,2,4-trichlorobenzene. *BMC Syst. Biol.* (2010)
8. Wu D, Wang Q, Assary RS, Broadbelt LJ, Krilov G. A computational approach to design and evaluate enzymatic reaction pathways: application to 1-butanol production from pyruvate. *J. Chem. Inf. Model* (2011)
9. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010;329:52-6.
10. Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, Sauro HM. In-fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Res.* (2010)
11. Nørholm MH. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol.* (2010)
12. Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries

and pathways. *PLoS ONE* (2009)

13. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE* (2011)
14. de Kok SD, Stanton LH, Slaby T, et al. Rapid and reliable DNA assembly via ligase cycling reaction. *ACS Synth. Biol.* (2014)
15. Avalos JL, Fink GR, Stephanopoulos G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat. Biotechnol.* (2013)
16. Farhi M, Marhevka E, Masci T, Marcos E, Eyal Y, Ovadis M, Abeliovich H, Vainstein A. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. *Metab. Eng.* (2011)
17. Zhang YH. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* (2011)
18. Wang Y, Yu O. Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells. *J. Biotechnol.* (2012)
19. Delebecque CJ, Lindner AB, Silver PA, Aldaye FA. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science* (2011)
20. Na, D. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nat. Biotechnol.* 31, 170-174 (2013).