성장정체상태 세포의 대사를 보는 새로운 관점과 연구방법

서울대학교 생명과학부 노정혜 교수 최준선 학생

1. 개요

자연계에 존재하는 대부분의 세균은 영양분이 부족하거나 제한된 상황에서 살아가며, 최소한의 에너지를 쓰면서 더 이상 증식하지 않는 성장정체상태(non-growing state)를 유지하고 있다. 그러나 세균을 연구하는 대부분의 연구는 자연계와 상반된 조건인, 영양분이 충분하고 세균들이 빠르게 자랄 수 있는 최적 조건에서 수행되고 있어, 여전히 자연계에서 일어나고 있는 세균의 생리 조절기작에 관해서는 여러 질문들이 풀리지 않은 채로 남아있다. 이러한 지식의 간극을 해소하기 위하여 많은 연구자들이 세포의 성장을 저지하는 다양한 조건에서 성장정체기의 세포를 연구함으로써, 자연계에서 일어나는 세포대사를 이해하려고 노력하고 있다. 특히 우리가 알고 있는 많은 천연물 신약이나 대사산물들이 영양분이 고갈된 정체성장기에 생산되고 있으므로, 정체성장기에 대한 새로운 이해는 새로운 신약물질을 찾고 생산하는데 필수적인 요건이 되고 있다. 본 동향보고에서는 현재까지 밝혀진 성장정체상태 세포의 특징과 대사조절기작에 관해 소개하고, 성장정체기의 세포를 연구하는데 사용되는 보다 진보된 최신의 연구방법들을 소개하고자 한다.

2. 정체성장상태의 세포연구

연구실 수준에서 자연계의 정체성장상태를 이해하기 위해, 아래와 같은 여러 조건에서 세포가 더 이상 자라지 못하는 상태를 관찰하고, 세포의 대응 기작에 관한 연구가 수행되고 있다.

1) Stationary phase

이 시기는 비연속배양(batch culture)에서 세균이 증식할 때 배지의 에너지원이 고갈되어 개체수의 증가가 나타나지 않는 시기를 뜻한다 (그림 1a). *Escherichia coli*의 경우, stationary phase로 접어들면서 세포 내 높은 에너지 수준의 분자 (ATP 와 ADP)에 결합된 adenylate의 비율을 나타내는 adenylate energy charge (AEC)가 감소하며 세균의 생존력 (viability)이 감소하기 시작한다. 최근 연구에 따르면, 이 시기에서도 여전히 일정한 수준의 단백질 합성은 유지되는 것으로 밝혀졌다.

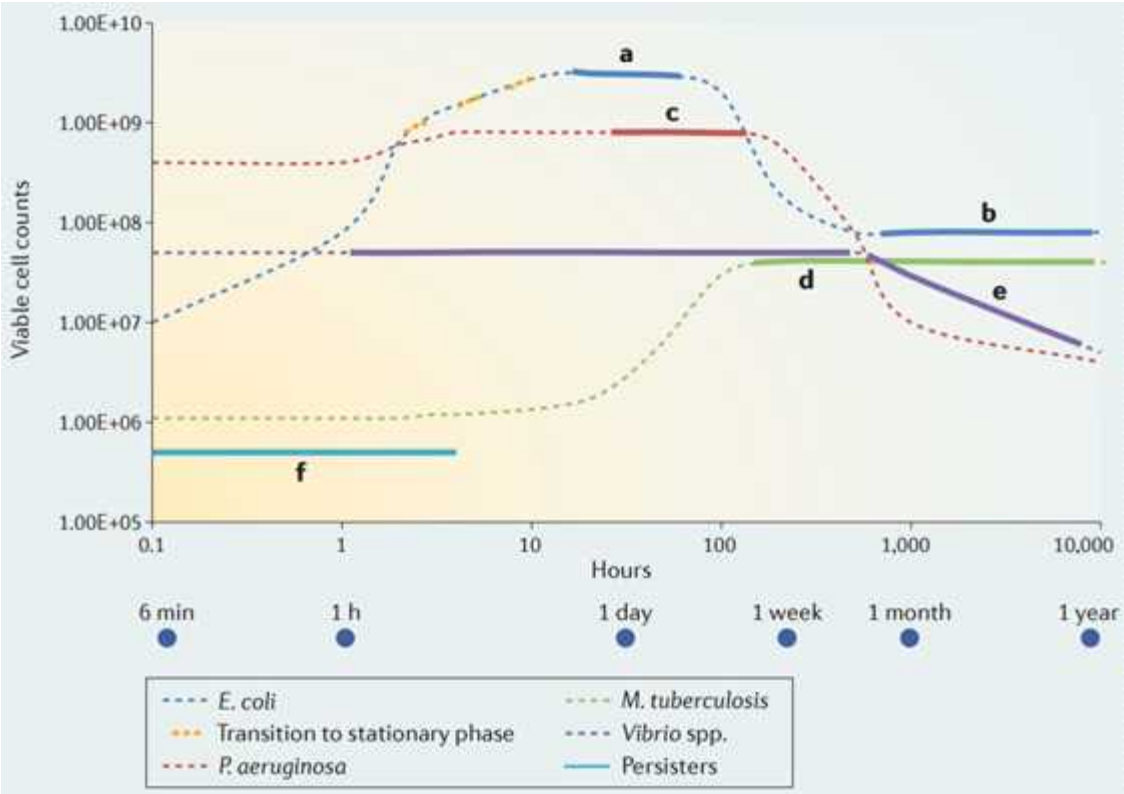

그림 1. 대표적인 성장정체상태 (non-growing states)1 (a) Stationary phase : 비연속 배양에서 이용 가능한 영양분의 감소에 따라서 세포의 성장이 느려지다가 멈추는 시기. (b) Long-term stationary phase : stationary phase이후 세포 수의 급격한 감소를 거치면서 세포의 성장과 죽음이 균형을 이루어 일정수준의 세포수가 유지되는 시기. 이 때 생존에 유리한 표현형(GASP)이 나타남. (c, d) 산소가 부족한 상황(체내 감염 상황)에서 P. aeruginosa (c), M. tuberculosis (d) 가 성장하지는 않지만 세포 수를 일정하게 유지하는 시기. (e) Viable but Non-culturable(VBNC) : 생존능력은 있지만 colony를 형성하지 못하는 형태. (f) Persister : 영양분의 유무와 상관없이 세포가 성장하지 않는 형태로써 주로 항생제 내성과 연관성이 있음.

2) Long-term stationary phase & GASP phenotype

Stationaryphase이후, 전체 세포 중에서 일부는 분해되어 영양분이 되고 다른 나머지는 이를 이용해 다시 성장을 하는데, 이때 세포의 생장과 사멸의 비율이 균형을 이루는 long-term stationary phase가 나타난다 (그림 1b). 이 시기에서 다시 생장하는 세포는 돌연변이에 의해서 다른 세포에 비해서 성장의 우위성을 보이는 표현형(GASP; growth advantage in stationary phase)이 나타난다(그림 2; 5번 성장기). 또한 다양한 유형의 GASP을 보이는 세포들로 구성된 population은 지속적으로 변화하면서 heterogeneity를 보인다(세포의 heterogeneity에 관해서는 아래에 좀더 자세히 소개함). GASP상태의 세포들은 생존에 유리한 유전자들을 발현하여 적응하고 불규칙적이지만 세포 분열을 지속하는 특징을 가진다. GASP상태의 세포들이 자연계의 세포의 특징을 잘 보여주는 하나의 형태 일 수 있다.

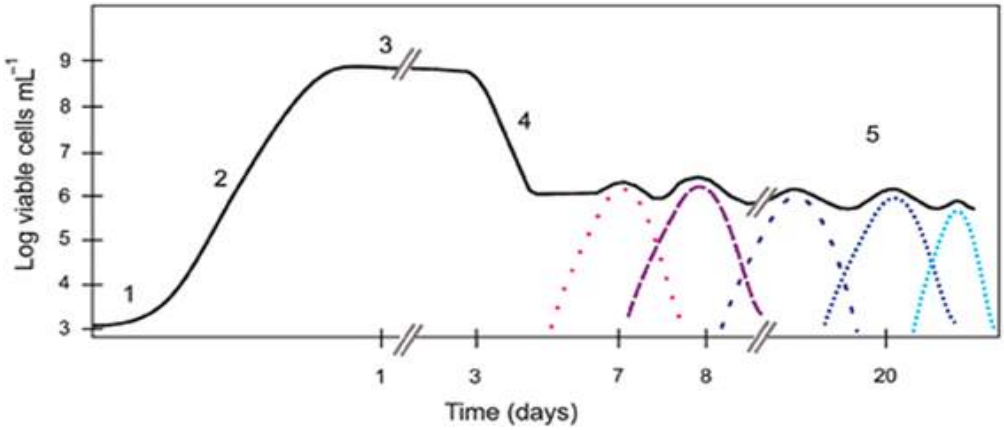

그림 2. 시간에 따른 E. coli 의 성장단계

3) VBNC (Viable but Non-culturable) 상태

정체성장기(growth-arrested states)에서 세포의 생존력(viability)이 사라진 것으로 생각했던 세포들이 실제로는 살아있지만 colony를 형성하지 못하는 형태인 VBNC (viable but non-culturable) state임을 확인한 연구들이 있다. 실제로 환경에 존재하는 많은 세균들이 VBNC상태이며, 실험 환경에서 배양되지 않는 이유는 이 때문일 것으로 생각된다.

4) Persisters

영양분이 충분한 조건이지만 성장이 멈춰있는 상태를 persister state라 한다. 세포가 활발히 분열하고 있는 상황에서도 일부 세포들은 가역적으로 persister의 형태로 존재함으로써 heterogeneity를 나타내기도 한다. Persister

상태로 들어가는 기작과 영양분 고갈상태에서 정체성장기(growth arrest)로 들어가는 기작 사이에는 공통의 조절 요소가 있을 것으로 예상된다

3. 성장정체기의 heterogeneity

전체적인 성장을 멈춘 상태(growth arrested state)의 세포군집에서는 서로 다른 특성을 가지는 세포들이 함께 존재한다(heterogeneous population). 이러한 현상은 다양한 growth arrested state에서 관찰 할 수 있으며, long-term stationary phase에서 특정 상황에서 유리한 population이 우의를 점하고 변화하는 조건에 맞춰 또 다른 population의 점유가 증가하게 되는 heterogeneity를 보이게 된다. 이 현상은 표현형과 유전자의 다양성에 따라 우선 생장하는 population이 결정되어 나타나는 현상으로 해석된다. 정체성장기의 heterogeneity는 persister state에서 관찰 할 수 있을 뿐 아니라, biofilm에서도 확인된다9. Pseudomonas aeruginosa와 Bacillus subtilis가 형성하는 biofilm은 상대적으로 영양분의 공급이 원활한 biofilm 표면의 세포들이 내부의 세포들보다 높은 성장률과 대사 효율을 나타낸다(그림 3). 정체성장기에서 다양한 상태의 세포들이 섞여있는 heterogeneity로 인해, population 수준에서 진행한 실험 결과로는 정체 성장기의 세포를 온전히 이해하는데 문제점이 발생한다. 따라서 이러한 점을 해결하고 세포들간의 차이점을 보다 정확하게 분석하기 위해서 단일세포 수준의 세포 변화를 확인 할 수 있는 실험방법이 개발되고 있다.

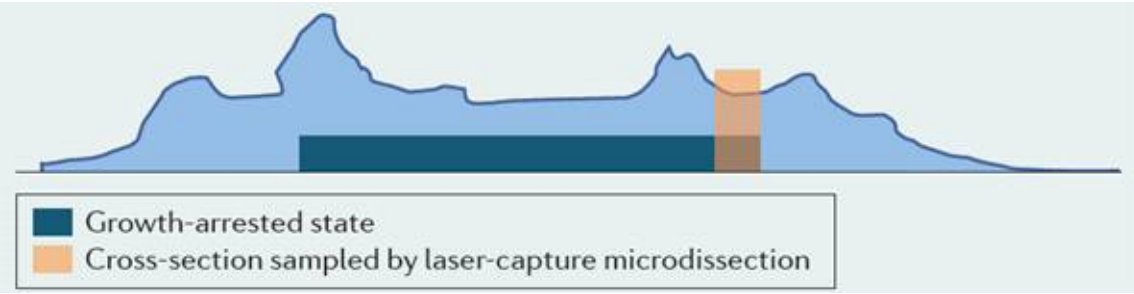

그림 3. P. aeruginosa 가 형성하는 biofilm내부의 heterogeneity

4. 성장정체기 연구를 위한 분석법

성장이 멈춘 세포들은 대사 활동 (metabolic activity)이 느리고 새로 합성되는 고분자 (macromolecule)들의 signal도 매우 낮다. 그뿐 아니라 앞서 설명한 것과 같이 이 시기에는 여러 population이 섞인 heterogeneity를 나타내어, 이를 연구하기 위해서는 각 세포단위로 그리고 세포내의 아주 낮은 활성을 정밀하게 감지 할 수 있는 새로운 분석법이 필수적이다.

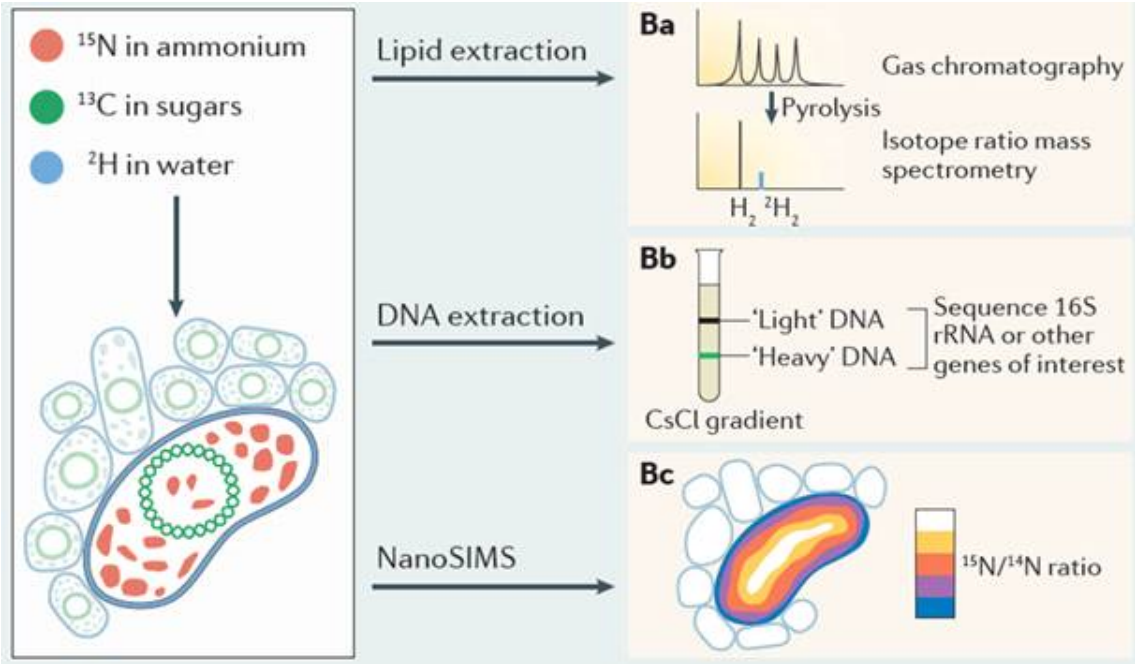

그림 4. Isotope labeling을 이용한 정체성장기 세포 분석기술

정체성장기 연구는 세포의 일정한 growth arrested state를 지속할 수 있는 retentostat cultivation이 이용된다. 이 배양법은 chemostats와 유사하게 일정한 영양분을 공급하지만, 세포는 버리지 않고 계속 유지하여 성장이 멈춰있는 환경에서 세포의 변화를 관찰할 수 있다. Heterogeneous population내에서 활성을 가진 세포를 탐지 하기 위해서는 아미노산 유사체를 이용한 단백질 표지와 그 표지와 반응하여 단백질을 분리 할 수 있는 BONCAT (Bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging)기술을 이용하거나, heavy isotope(^{15}N,^{13}C,^{2}H)labeling법을 이용할 수 있다 (그림 4). Isotope labeling법은 민감도가 향상된 GC-MS기술을 접목시켜 특정 조건에 합성되는 lipid (그림 4-Ba)와 여러 군집 내에서 활발한 대사를 나타내는 세포 DNA의 분리(그림 4-Bb)를 확인가능 하도록 한다. 최근 들어 population 수준이 아니라 세포수준으로 분리해 하나의 세포를 관찰할 수 있는 microfluidic device 들이 개발 되어, 물질대사가 활발한 세포만을 개별적으로 선별(FISH, fluorescence in situ hybridization)하고 subcellular scale로 세포내부의 물질대사변화 분석(NanoSIMS, nanoscale secondary ion mass spectrometry)도 가능 해졌다 (그림 4-Bc).

5. 성장정체기 세포의 대사

주변환경의 영양분이 고갈되어 정체성장기에 진입한 세포들은 성장을 하지 못하더라도 세포의 생존에 필수적인 기본 구성요소와 세포 내 에너지를 일정 수준으로 유지하고, 환경 변화를 인지 하고 즉각 대응 할 수 있는 조절 기작을 보유해야 한다. 이를 위해서는 세포 막의 PMF(proton motive force) 유지는 필수적이지만 세포가 최적조건에서 사용하던 기작을 유지 할 수 없으므로, 기존과는 다른 기질을 이용해 에너지 생산하거나 다른 우회 경로를 사용하여 PMF를 유지한다.

세포가 사용하는 기질이 고갈되면 세포는 성장을 멈추고 세포내의 구성성분(주로 ribosome 혹은 인지질막)을 일부분 분해(catabolism)하여 필수적인 에너지원으로 사용 한다. 이 과정에서 세포는 점차 크기를 줄여 부피 대비 표면적을 극대화 시킴으로써 물질 수송능력을 극대화 시켜 환경에 적응한다. 여러 세균들(E. coli, Vibrio cholera, V. harbeyi)이 에너지 고갈 상황에서 β-oxidation을 통해 인지질막을 분해하는 것이 확인 되었으며, 세포는 동시에 분해산물인 acetyl-CoA를 에너지원으로 사용하는 유전자의 발현을 증가 시키고 TCA cycle 대신에 우회 경로인 glyoxylate shunt(그림 5 회색 화살표)를 선택해 세포내의 최소한의 물질대사를 지속 한다.

세포는 세포막의 전자화학적 농도 구배(electrochemical gradient) 유지를 위해 수소가 아닌 다른 기질을 사용하기도 한다. 대표적인 예로서, 병원균은 인체에 감염하면 산소가 매우 부족한 hypoxia 상태에 놓이게 되고 PMF를 이용해 합성되는 ATP와 전자전달계의 최종 전자 수용체로 사용할 산소 역시 부족하다. 이 상황에 적응 하기 위해 Mycobacterium tuberculosis(그림 5 붉은색 화살표)는 TCA cycle을 반대로 진행시켜 생성된 succinate를 세포 밖으로 수송하면서 electron gradient를 이루어 PMF를 유지하여 에너지를 생산한다.

기근 상황에서 세포는 세포 내부의 상황을 환경에 맞춰 변화시키는 것 뿐 아니라 세포외부의 기질을 최대한 세포 내로 수송하기 위하여 결합력이 강한 수송단백질들(high-affinity transporters)의 발현을 증가 시킨다. 이 현상은 GASP 상태인 균주 연구를 통해서 확인할 수 있으며, 해당 세포들은 자연형 균주 보다 외부의 아미노산을 받아들이거나(scavenging) 세포내부의 물질을 분해(catabolism)에 관여하는 유전자들의 발현이 증가함이 확인 되었다.

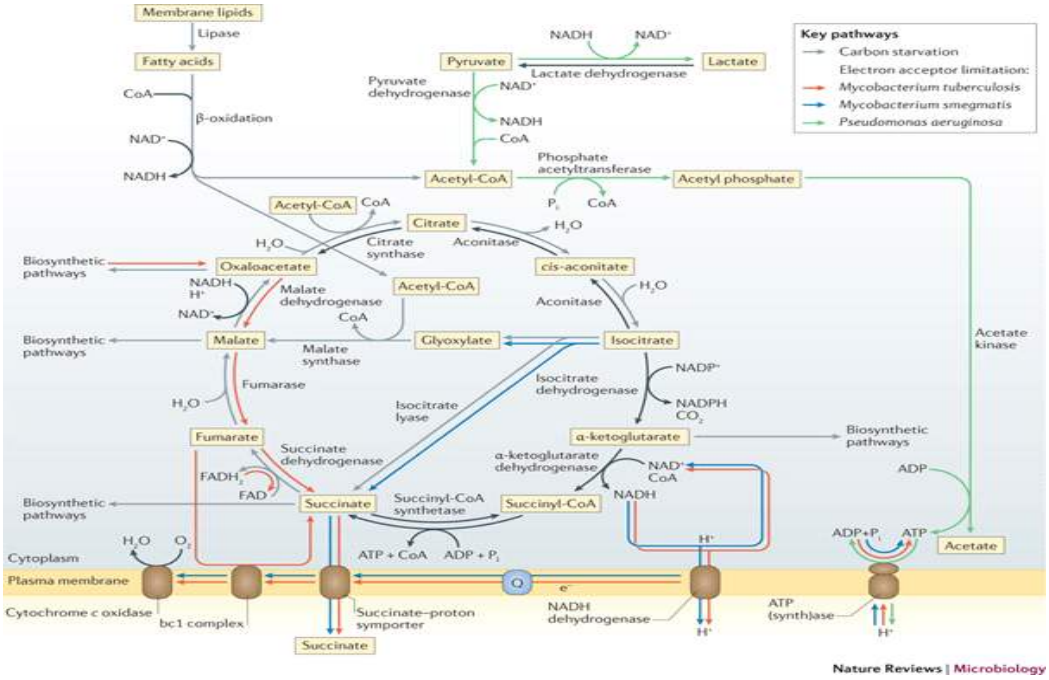

그림 5. 정체성장기 특이적인 대사 조절기작

6. 성장정체기에서의 유전자 발현 조절

영양이 풍부한 상태에서 지수성장을 하는 세포는 ribosome 유전자의 전사와 번역에 가장 많은 에너지를 소모하며 이 단계(rate-limiting step)가 가장 우선시 되고 지수성장기의 단백질 합성은 ribosome의 활성 따라 달라진다 (그림 6a; exponential phase). 정체성장기에서는 세포의 성장정체(growth arrest)가 유발된 환경 조건에 따라 제한된 영양성분이 다르지만 상황을 인지하고 각 환경에 적응하기 위해 세포는 stringent response가 일어난다. 해당 반응은 스트레스에 반응하는 RpoS 시그마 인자와 stringent response alarmone 으로 알려진 (p)ppGpp(guanosine pentaphosphate)의 두 가지 요소에 의해 매개된다. RpoS는 스트레스에 대항하는 유전자들의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 Dps(DNA-binding protein from starved cells) 단백질을 통해서 DNA를 응축시키고 세포 내부에서 발생되는 독성물질로부터 genomic DNA를 보호한다. (p)ppGpp는 DksA와 같은 co-regulators들과 함께 다양한 유전자발현을 조절하고, 특히 ribosome(rRNA, ribosomal protein)의 발현을 억제한다 (그림 6b; early stationary phase). 이런 역할은 세포 전체적인 유전자 발현을 감소시키며, 동시에 세포의 생합성 능력을 재조절 하여 스트레스 상황에 적응한다. RpoS와 (p)ppGpp는 장기간의 정체성장기에서는 오히려 세포 내에서 감소하는 경향을 보이며, RpoS에 기능적인 감소를 일으키는 돌연변이가 일어난 경우 오히려 이 시기에서의 생존 경쟁력을 높

였다. 따라서 RpoS와 (p)ppGpp는 세포가 지수성장기에서 정체성장기로 진입하는 구간에서 주된 역할을 할 것으로 생각된다.

앞에서 언급한 조절기작 외에도 세포는 small RNA인 6s RNA를 이용해 RNA polymerase holoenzyme과 promoter의 결합을 방해하거나 HPF(hibernation promoting factor)와 Rmf(ribosome modulation factor)에 의해 ribosome을 단백질 번역복합체로부터 분리시키는 방법으로 유전자의 발현을 억제 시킨다. 이때 격리된 ribosome은 에너지원으로 사용되거나 정체성장기에 필수적인 유전자를 발현하는데 재사용 된다. 정체성장기의 세포는 생존에 필수적인 유전자를 우선적으로 발현시키고, 이때 세포는 RNAP과 ribosome이 기질 부족으로 인해 멈추는 것을 완화 시키기 위해 보조 인자들도 함께 발현시킨다. 해당 유전자들의 발현 수준은 세포의 상태에 따라서 유동적으로 조절되어 영양분이 부족한 상황에서 세포의 필수적인 구성요소들을 유지시킬 수 있도록 한다(그림 6c).

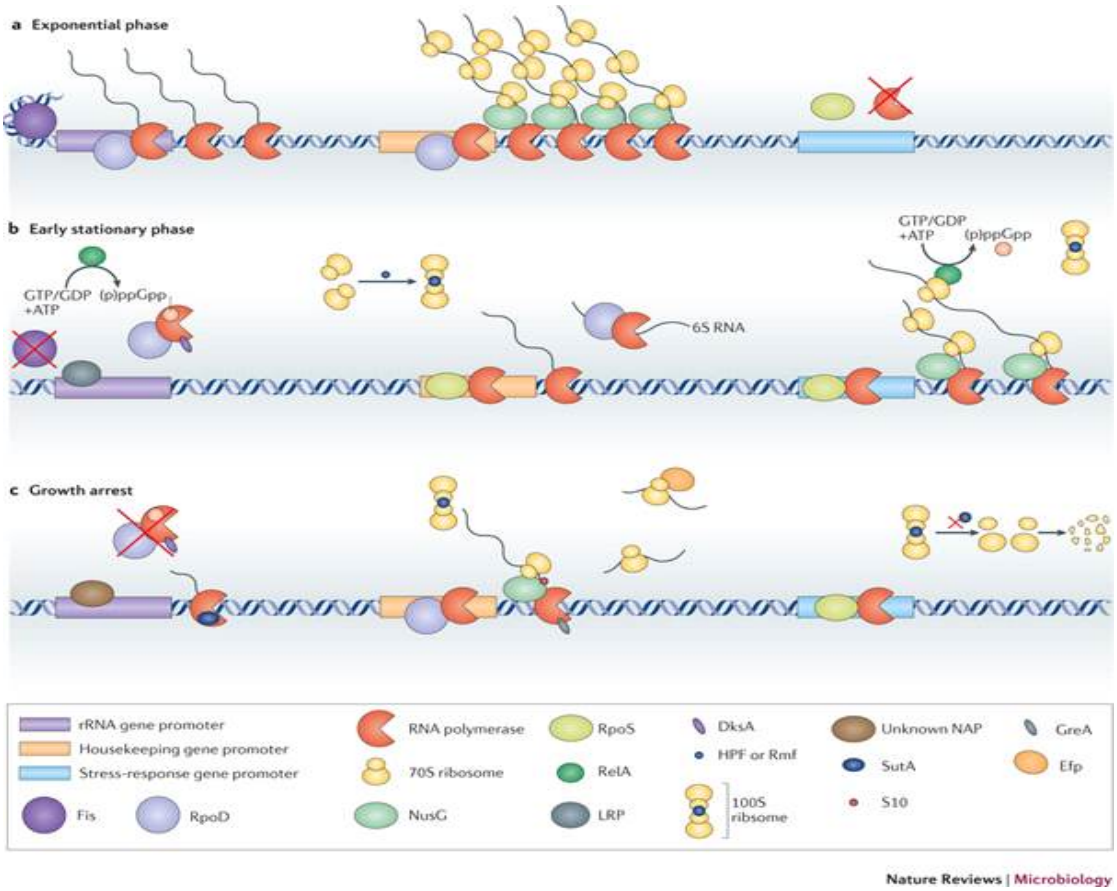

그림 6. 성장 단계별 전사와 번역조절

6. 결론 및 시사점

현재까지는 기근 상황에서 성장하지 않는 세균의 생리기작에 관한 연구가 시작단계에 있지만, 세포가 이 환경에서 기존과는 다른 대사조절기작을 이용해 여전히 생명력을 유지시키고 있음을 확인 할 수 있다. 세포는 에너지원으로 사용할 영양분이 부족한 상황에서 세포내의 물질 대사를 반대로 진행 시키거나, 다른 기질을 이용해 에너지 생산 및 대사를 진행하고, 스트레스 상황에서 대처 할 수 있는 다양한 조절 인자들을 발현 시켜 환경에 적응하는 방법을 가지고 있었다. 다양한 연구가 진행 되었으나 여전히 정체성장기의 population내의 세포들간의 heterogeneity에 관한 이해가 부족한 편이며, 단일 세포 수준에서 in-situ한 상태를 볼 수 있는 기술개발과 동시에 추가적인 많은 연구가 필요하다. 앞으로 활발한 정체성장기 세포에 대한 연구를 통해 자연에서 실제로 일어나고 있는 미생물의 생리적인 기작(environmental microbiology)을 이해하고 이것과 실험실환경에서 확인된 세포의 성장과 조절 메커니즘(molecular microbiology)간의 차이점들을 이해할 수 있을 것으로 생각된다.

7. 참고문헌

1. Bergkessel, M., Basta, D. W. & Newman, D. K. The physiology of growth arrest: uniting molecular and environmental microbiology. Nature Reviews Microbiology 14, 549-562 (2016).
2. Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I. & Balaban, N. Q. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 556-561 (2014).
3. Finkel, S. E. & Kolter, R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 4023-4027 (1999).
4. Llorens, J. M. N., Tormo, A. & Martínez-García, E. Stationary phase in gram-negative bacteria. FEMS microbiology reviews 34, 476-495 (2010).
5. Ayrapetyan, M., Williams, T. C. & Oliver, J. D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. Trends in microbiology 23, 7-13 (2015).
6. Rotem, E. et al. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. Proceedings

of the National Academy of Sciences 107, 12541-12546 (2010).
7. Cohen, N. R., Lobritz, M. A. & Collins, J. J. Microbial persistence and the road to drug resistance. Cell host & microbe 13, 632-642 (2013).
8. Finkel, S. E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. Nature Reviews Microbiology 4, 113-120 (2006).
9. Liu, J. et al. Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. Nature 523, 550-554 (2015).
10. Landgraf, P., Antileo, E. R., Schuman, E. M. & Dieterich, D. C. BONCAT: metabolic labeling, click chemistry, and affinity purification of newly synthesized proteomes. Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols, 199-215 (2015).
11. Wagner, M., Nielsen, P. H., Loy, A., Nielsen, J. L. & Daims, H. Linking microbial community structure with function: fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays. Current Opinion in Biotechnology 17, 83-91 (2006).
12. Nyström, T. & Gustavsson, N. Maintenance energy requirement: what is required for stasis survival of Escherichia coli? Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1365, 225-231 (1998).
13. Lever, M. A. et al. Life under extreme energy limitation: a synthesis of laboratory-and field-based investigations. FEMS microbiology reviews 39, 688-728 (2015).
14. Kaberdin, V. R. et al. Unveiling the metabolic pathways associated with the adaptive reduction of cell size during Vibrio harveyi persistence in seawater microcosms. Microbial ecology 70, 689-700 (2015).
15. Eoh, H. & Rhee, K. Y. Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in Mycobacterium tuberculosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 6554-6559 (2013).
16. Geesey, G. G. & Morita, R. Y. Capture of arginine at low concentrations by a marine psychrophilic bacterium. Applied and Environmental Microbiology 38, 1092-1097 (1979).
17. Zambrano, M. M., Siegele, D. A., Almirón, M., Tormo, A. & Kolter, R. Microbial competition: Escherichia coli mutants that take over

stationary phase cultures. SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-259, 1757-1757 (1993).
18. Potrykus, K. & Cashel, M. (p) ppGpp: still Magical? Microbiology 62, 35 (2008).
19. Battesti, A., Majdalani, N. & Gottesman, S. The RpoS-mediated general stress response in Escherichia coli*. Annual review of microbiology 65, 189-213 (2011).
20. Karas, V. O., Westerlaken, I. & Meyer, A. S. The DNA-binding protein from starved cells (Dps) utilizes dual functions to defend cells against multiple stresses. Journal of bacteriology 197, 3206-3215 (2015).
21. Murray, H. D., Schneider, D. A. & Gourse, R. L. Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. Molecular cell 12, 125-134 (2003).
22. Notley-McRobb, L., King, T. & Ferenci, T. rpoS mutations and loss of general stress resistance in Escherichia coli populations as a consequence of conflict between competing stress responses. Journal of bacteriology 184, 806-811 (2002).
23. Starosta, A. L., Lassak, J., Jung, K. & Wilson, D. N. The bacterial translation stress response. FEMS microbiology reviews 38, 1172-1201 (2014).
24. Wassarman, K. M. & Saecker, R. M. Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. Science 314, 1601-1603 (2006).
25. Zundel, M. A., Basturea, G. N. & Deutscher, M. P. Initiation of ribosome degradation during starvation in Escherichia coli. Rna 15, 977-983 (2009).
26. Babin, B. M. et al. SutA is a bacterial transcription factor expressed during slow growth in Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences 113, E597-E605 (2016).