

방선균유래 항생 · 항암물질 생합성 연구의 최근 연구동향

명지대학교 생명과학부

현창구 · 홍순광 / (주)아트만바이오사이언스

1. 항생 · 항암물질 생산의 보고로서 방선균

자연은 임상에서 유용하게 이용되는 항생제, 항암제, 면역억제제 뿐만 아니라 가축용이나 농업에 이용되는 생장촉진제, 살충제, 제초제, 구충제 등을 포함하여, 경이로울 정도로 무수한 생물학적 활성을 지니는 화합물들을 창조해 낸다. 이러한 생리활성물질을 생산하는 미생물 중 여전히 75% 이상은 방선균에 의한 것이며, 이러한 이유로 방선균은 항생물질로 대표되는 다양한 생리활성물질을 생산하는 천연유기화합물의 보고로서 신물질의 탐색 및 생합성 기작에 대해 깊이 연구되어 왔다. 실제적으로 최근 20년간 보고된 생리활성물질중 방선균 유래의 것은 대략 64% 정도로, 곰팡이류 25.6%, 기타 미생물 10%에 비해 여전히 높은 비율을 나타내고 있고, 더욱이 이러한 생리활성물질이 항암제인 경우에는 방선균 유래가 82%이상으로 절대 다수를 차지하고 있다고 보고되었다. 그러나 신규 생리활성물질 탐색과정에서 이미 밝혀진 물질이 재차 분리되는 악순환이 계속되면서, 그 경제성과 효용성이 현격하게 떨어지고 있기 때문에 신규 생리활성물질 탐색의 효용성을 높이는 다양한 노력이 수행되어지고 있다. 그러한 일례로 rare actinomycetes를 탐색하거나 target-directed screening, 발효조건 등에 변화를 주는 연구도 진행되고 있다. 최근, 분자생물학적 연구방법이 발달하면서 생리활성물질 생산균주에 대한 생합성 효소와 그 유전자들의 발현기작에 대한 연구가 고전적인 생리활성물질의 스크리닝 방법과 더불어 새로운 생리활성물질 탐색에 대한 중요한 연구 분야가 되고 있다. 실제로, 다양한 생리활성물질의 생합성 유전자들이 분리되고 분자유전학 수준에서 이들의 생합성 과정을 예측할 수 있게 되면서 생리활성물질 생합성 효소들 사이에 연관관계가 높다는 사실을 알게 되었다. 또한, 미생물들의 이차대사과정에 관여하는 효소들이 일차대사과정에 관여하는 효소와는 달리 절대기질특이성이 상대적으로 미약하기 때문에 본래의 기질과 유사한 여러가지 기질과 반응할 수 있다는 연구결과들은, 생리활성물질의 생합성 과정을 분자유전학적 수준에서 연구하는 연구자들에게 생합성 유전자를 계획적으로 조작하여 천연물의 구조를 변환시키는 연구를 시도케 하였으며, 그 결과 새로운 유전자의 도입과 특정 유전자의 발현을 차단시키는 방법을 이용한 신규 항생물질의 창출을 가능하게 하였다. Combinatorial Biosynthesis라고 명명된 이러한 신기술은 ① 생물체로부터 유용 생리활성물질 생합성 유전자를 확보하고, ② 이들을 합리적 신약구조 설계에 따라 조작·발현시켜며, ③ 생산된 신규물질을 분리 정제하여 그 구조를 분석함과 아울러 ④ 약효 및 신기능을 검색하는 일련된 과정으로 구성되며, 새로운 생물학적 역가나 내성문제를 극복한 천연물질 유도체 개발에 효과적으로 이용되기 시작했다.

본 고에서는 방선균이 생산하는 다양한 생리활성물질 중 항생 · 항암물질 생합성에 관한 2000년 이후부터의 연구동향과 유전자 조작을 통한 신규

항생 · 항암물질 개발동향, 그리고 앞으로의 전망에 대해 기술하고자 한다.

2. 방선균에서의 항생 · 항암물질 생합성 효소 연구동향

가. 국외의 경우

2000년대 이전의 항생 · 항암물질 생합성 과정에 대한 연구는 Polyketide 계열의 화합물에 집중되어 있었다. 항생물질 생합성에 관한 유전자 수준의 기초적인 지식이 없었던 1980년대 중반, 영국 John Innes Institute의 Hopwood 박사팀이 Nature지에 actinorhodin 생합성 유전자인 *actI* 유사유전자가 모든 aromatic polyketide 생산균주에 존재한다는 southern data 하 나는 방선균을 연구하는 전 세계 석학들에게는 신선한 충격이었다. 그 후 actinorhodin과 같이 aromatic polyketide 생합성 과정을 연구하는 그룹들이 속속 등장하게 된다. 그 대표적인 그룹으로 위스콘신대 약학대학(현재는 KOSAN 부사장으로 재직 중)의 Hutchinson(tetracenomycin, daunorubicin), 스페인의 Salas(mithramycin), 워싱턴대학의 Floss(gramicidin), 미네소타대학의 Sherman(oxytetracycline) 그룹 등이 있다. 이와 유사하게 modular polyketide 계열 화합물인 erythromycin 생합성 유전자와 생합성 규칙이 규명되면서 항생제 생합성에 대한 분자유전학적 고찰은 aromatic polyketide에서 modular polyketide로 옮겨가게 된다. 그 이유 중의 하나는 modular polyketide 생합성 과정은 상당부분 규칙성을 가지고 있기 때문에 유전자조작을 위한 합리적인 설계가 용이했지만, aromatic polyketide인 경우 합리적으로 유전자 조작을 시도해 봤지만 초기의 예상과는 달리 shunt product들이 너무 많이 생산되는 관계로 연구의 진행을 어렵게 했기 때문이다. 또한 신규 화합물의 확보 수 측면과 경제적 이윤 창출 가능성면, 방선균 이외의 다른 곰팡이류 유래의 polyketide synthase(PKS)에 적용 가능성등의 면에서 modular PKS가 훨씬 유리했기 때문이다. 이러한 배경으로 erythromycin의 ketosynthase module 유전자를 이중 탐침으로 하여 avermectin, tylosin, picromycin, rifamycin 생합성 유전자들이 일본 Kitasato 연구소의 Omura, 영국의 Leicester 대학의 Cundliffe, 미네소타 대학의 Sherman, 워싱턴대학의 Floss 그룹에서 각각 분리되어 생합성 과정에 대한 연구와 이를 바탕으로 유전공학 기법을 이용한 신규 생리활성물질 창출 연구가 진행중에 있다.

2000년대에 들어 방선균을 대상으로 한 생리활성물질 생합성 연구면에서 변화된 것은 크게 세가지라고 볼 수 있다.

첫째는 미국과 영국이 독점하던 생리활성물질 생합성 연구와 유전자 조작을 통한 신규 생리활성물질 개발분야에 스페인, 독일 연구그룹이 놀랍도록 빠르게 따라가고 있다는 것이다. 그 대표적인 주자는 독일의 Bechthold 그룹과

표 1. 2000년 이후 보고된 항생 · 항암물질 생합성 유전자

항생, 항암물질	생산균주	화합물군	연구그룹	발표논문
Simocyclinone	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Anquicyclines	Bechthold (독일)	Antimicrob. Agents Chemother. 46(5):1174-82 (2002)
Candididin	<i>Streptomyces griseus</i>	Polyenes	Gil (스페인)	Microbiology. 148(Pt1):51-9 (2002)
Evernimicin	<i>Micromonospora carbonacea</i>	Orthosomycins	Hosted (미국)	J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27(6):386-92 (2001)
Amphotericin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Polyenes	Caffrey (아일랜드)	Chem. Biol. 8(7):713-23 (2001)
Complestatin	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Polyketides	Khosla (미국)	Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(15):8548-53 (2001)
Avilamycin A	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Orthosomycins	Bechthold (독일)	Chem. Biol. 8(6):569-81 (2001)
Spinosad	<i>Saccharopolyspora sp. in osa.</i>	Polyketides	Baltz (미국)	Chem. Biol. 8(5):487-99 (2001)
Bleomycin	<i>Streptomyces verticillus</i>	Peptide-Polyketides	Shen (미국)	Chem. Biol. 7(8):623-42 (2000)
Coumermycin	<i>Streptomyces rishiriensis</i>	Coumarins	Heide (독일)	Antimicrob. Agents Chemother. 44(11):3040-8 (2000)
Nystatin	<i>Streptomyces noursei</i>	Polyenes	Zotchev (노르웨이)	Chem. Biol. 7(6):395-403 (2000)
Novobiocin	<i>Streptomyces spheroides</i>	Coumarins	Heide (독일)	Antimicrob. Agents Chemother. 44(5):1214-22 (2000)
C-1027	<i>Streptomyces globisporus</i>	Enediynes	Shen (미국)	Antimicrob Agents Chemother. 2000 Feb;44(2):382-92.
Pimaricin	<i>Streptomyces natalensis</i>	polyenes	Aparicio (스페인)	Chem. Biol. 7(11):895-905 (2000)
Enterocin	<i>Streptomyces maritimus</i>	Polyketides	Moore (미국)	Chem. Biol. 7(12):943-55 (2000)
Spectinomycin	<i>Streptomyces spectabilis</i>	Aminoglycoside	Suh (한국)	FEMSMicrobiol. Lett. 183(1):183-9 (2000)

스페인의 Salas 그룹이다. Bechthold 그룹은, anquicycline 항암제인 urdamycin과 simocyclinone, orthosomycin 계열의 avilamycin, lantibiotic인 landomycin의 생합성 및 응용에 관한 연구를 진행중이고, Salas 그룹인 경우, mithramycin, elloramycin, oleandomycin, rebeccamycin을 대상으로 연구를 진행중이다. 이 밖에도 gyrase B 저해제인 coumarins계열의 항생제 novobiocin과 coumermycin를 연구하는 독일의 Heide, polyenes 계열의 항생제인 Candididin, pimaricin인 경우 스페인의 Gil, Aparicio 그룹에 의해 각각 연구가 진행중이다.

둘째는 이전의 연구가 aglycone에 집중된 것에 비해, 현재는 glycone moiety의 생합성 경로와 당 전이효소에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다는 것이다. Glycone 생합성 효소 자체에 대한 연구는 미네소타대학 Liu 그룹의 D-desosamine 생합성 효소들의 기질특이성에 대한 연구와 하버드 대학 Walsh그룹이 수행한 epivancosamine에 대한 연구가 주목받을만하며, 당전이효소인 경우 독일 Bechthold 박사팀은 Urdamycin의 4개의 당전이효소 각각의 기질특이성과 당전이효소 자체의 active site를 규명한 바 있다.

마지막으로, 2000년대 이전의 유전자조작을 통해 창출된 신규 생리활성물질들이 실제적으로 부가가치를 창출할 예가 없다는 사실에 반성하여, 현재의

생합성 연구의 대상은 과거와는 달리 훨씬 목적 의식적이라는 것이다. 즉, 경제성 있는 화합물 구조를 미리 예측해서 연구를 개시하거나, 현재 임상연구 중인 화합물을 연구의 대상으로 삼는 등이 그것이다. 전자의 경우, 대표적인 예로 버지니아 Commonwealth 대학의 Reynolds 박사팀이 연구중인 ansatrienin을 들 수 있다. 이들은 동물구충제이며 반합성적으로 생산되는 doramectin을 생물학적으로 개발하기 위해 ansatrienin의 CHC (cyclohexylcarbonyl CoA) 생합성 과정에 대한 연구를 수행하였고, 후자의 경우 미국 Schering-Plough사의 Hosted 그룹이 수행한 evernimicin과 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center의 Thorson 그룹(현재는 위스콘신대 약학대학에 근무중임)이 수행중인 calicheamicin과 esperamicin, 위스콘신 대학 Shen 그룹의 C-1027을 들 수 있다. Evernimicin은 orthosomycin 계열의 항생제로 최근 vancomycin 내성세균에 탁월하다는 임상결과로 인해 주목받고 있으며, calicheamicin, esperamicin, C-1027은 enediyne 계열의 항암제로 기존의 항암제와는 전혀 다른 작용기작과 화학적 구조를 가지고 있다. 특히 calicheamicin인 경우 최근 FDA에서 임상승인이 나와 있는 상태로 최근 주목받고 있는 화합물군이다. 2000년 이후 보고된 항생 · 항암물질 생합성 유전자에 대한 연구동향은 표 1을 참고하기 바란다.

나. 국내의 경우

국내에서의 방선균에서의 생리활성물질 생합성 과정에 대한 연구동향은 대부분 전문학술지에 의해서라기 보다는 국내의 학술대회에 발표되는 포스터에 의한 것이 많다. 유일하게 전문학술지에 보고된 예는 명지대 서주원 박사팀의 Spectinomycin gene cluster가 유일하며, 1990년대 중반 대전 생명공학연구소 이정준 박사팀의 연구한 daunorubicin 생합성 유전자인 *dnrF*에 대한 연구가 전부인 듯 하다. 그러나 우리나라 역시 2000년대 들어와서 본격적으로 방선균을 대상으로 한 생리활성물질 생합성 연구가 진행중이며, 그 대표적인 예로 선문대와 GeneChem의 neocarzinostatin과 gentamicin, 생명공학연구소 이정준 박사팀과 선문대의 Rubradirin, 명지대 서주원 박사팀의 Spectinomycin과 Bluensomycin을 포함한 5개의 aminoglycoside 계열 항생제 생합성에 대한 연구가 진행중인 것으로 알려져 있다. 또한 본인이 대표이사로 있는 Atman Bioscience사와 명지대에서도 Indolocarbazoles, Aminoglycosides, Anthracyclines, Eneidyne 계열의 생리활성물질 생합성에 관한 기초연구가 진행중에 있다.

3. 유전자조작을 통한 방선균에서의 신규 항생·항암물질 개발동향

가. 고전적인 유전자 조작 방법을 통한 신규 생리활성물질의 개발

유전자 조작 기술을 이용한 새로운 구조의 생리활성물질 개발은 주로 polyketide 계열과 peptide 항생물질에 집중되어 있는데, 이는 이들 항생제 생합성 경로에 대한 분자유전학 연구가 활발히 진행되며 기인한다. 대부분 초기의 연구는 target gene disruption, tailoring modification, domain 또는 module replacement 방법을 이용한 것이다. Target gene disruption 방법은 특정 유전자를 inframe이나 insertional inactivation으로 제거한 후 획득된 mutant가 축적하는 대사산물을 이용하는 것이다. 이 대사산물(대사중간체)이 생물학적 활성을 가지는 경우, 그 자체가 신규 생리활성물질로서 가능성을 가질 수 있으며, 생물학적 활성이 없어도 신규 생리활성물질과 반합성품을 개발하기 위한 중요한 재료가 될 수 있다. Tailoring modification 방법은 구조적으로 유사한 생리활성물질 생산균주에 hydroxy, methyl, amino group 등을 생성토록 인위적으로 해당 유전자를 도입하는 방법으로, 이차대사 생합성 효소들의 flexibility를 이용하는 것이다. Module replacement는 주로 modular polyketide 화합물의 생합성 module를 새로 첨가하거나 제거함으로써 aglycone ring의 구조가 일부 변환된 화합물을 획득하는 방법이다. 상기의 세가지 방법은 현재에도 이용되고 있으나 최근의 연구수준에 비해서는 고전적인 방법에 속한다고 할 수 있다.

이런 고전적인 유전자 조작을 통한 신규 생리활성물질 개발의 대표적인 예로, KOSAN의 Leonard Katz 박사가 Abbott Lab에 근무했던 시절 개발했던 11-dehydroxy-erythromycin을 들 수 있다. 이는 erythromycin 생합성 유전자중 *eryF*를 gene disruption방법으로 불활성화시켜 개발되어 상품화 단계에 와 있는 관계로 현재까지도 가장 가치있는 연구중의 하나로 받아들여지고 있다. 또한 미국 나스닥 등록 회사인 KOSAN의 연구진들은 erythromycin 생합성 유전자들의 module 치환으로 다양한 erythromycin aglycone(erythronolide B) 유도체를 개발하였다. Peptide 항생제의 경우, peptide를 생합성하는 activation domain을 gene replacement를 통해 치환하여 새로운 구조의 hybrid peptide 항생제 개발이 독일 Philipps-Universitat의 Mohamed A. Marahiel 박사팀에 의해 성공적으로 수행되었다. 그러나 이들 모두 개발된 신규 항생물질로 인해 직접적인 경제적 가치를 창출하지는 못한 상태이다.

국내의 경우, Combinatorial Biology에 관한 연구로 구체적인 결과는 아직

발표된 것이 없지만 그 기초연구로서 항생제 생합성 유전자에 대한 연구가 대학연구소 및 국가기관연구소에서 진행되고 있다. 유일한 예로서 1990년대 중반에 생명공학연구소에서 수행한 anthracycline 계열의 항암제에 대한 연구를 들수있는데, 연구진들은 daunorubicin의 11-hydroxylase(*dnrF*) 유전자를 aclacinomycin 생산균주에 gene adding함으로써 신규물질을 창출할수 있었다. 일종의 tailoring modification 방법을 이용한 것이다.

나. Glycone변환을 통한 신규 생리활성물질 개발

신규 생리활성물질을 개발하는 중요한 방법은 생리활성물질의 aglycone의 특정위치에 결합하는 sugar moieties를 변환시키는 것이다. 많은 경우 이러한 sugar moieties가 생물학적 활성뿐만 아니라 기질인식 및 결합 안정성에 중요한 역할을 수행한다고 보고 되었기 때문에, 많은 연구자들은 생리활성물질의 당부분의 변환을 유도하고자 2000년도에 들어 당전이효소와 당 생합성 유전자에 대한 연구에 박차를 가하게 된다. 생리활성물질에 부착된 가장 풍부하고 다양하게 존재하는 sugar moiety는 6-deoxyhexose(6-DOH)로 식물, 미생물, 곰팡이등을 포함한 다양한 종에서 발견되며, 현재까지 약 70여 종류의 6-DOH가 생리활성물질의 구조적 구성성분으로써 존재한다고 알려져 있다. 6-DOH는 4-keto-6-deoxy intermediate를 경유하여 nucleoside diphosphate-activated hexoses로부터 생성되고, 이런 4-keto-6-deoxy intermediate 생성에는 dNDP-glucose synthase와 dNDP-glucose 4,6-dehydratase 효소가 관여하는 일반적인 두개의 생합성 과정이 필요하며, 5-또는 3,5-epimerase 효소의 관여로 D-form 또는 L-form으로 전환되는 구조적 다양성을 취하게 된다. Aglycone core의 특이적 부분에 장착되는 sugar moiety는 그 구성방법에 있어서도 O-glycosylation, N-glycosylation, C-glycosylation을 통해 mono, di, 또는 oligosaccharide등의 다양한 형태와 길이로 존재한다. 이런 sugar moiety는 당전이효소에 의해 aglycone에 부착되며, 당전이효소는 일반적으로 sugar substrate, aglycone substrate에 site specific하게 작용한다고 알려져 있다. 현재 sugar moiety의 생합성에 관한 연구는 개별유전자의 mutation으로 인해 축적되는 중간대사산물을 분석함으로써 이루어져 있으며, 개별유전자의 기능은 문헌과 GenBank에 보고된 data를 근거로 비교함으로써 진행되어 왔다.

그러나 Module change 방법을 통한 신규 Polyketide와 peptide의 구조적 변화를 주는 고전적인 방법과 달리, 당 구조나 당 부착부위를 변화를 주는 일은 쉬운 작업이 아니었다. 그 이유중의 하나는 당전이 효소의 기질특이성이다. 또한 다양한 aglycone과 sugar moiety, 당전이효소를 이용한 *in vitro* 효소반응으로 신규물질을 개발하려는 노력 역시 항생·항암물질의 구조를 이루는 당이 natural sugar가 아닌 NDP로 활성화되어 있어 화학적 합성 역시 쉬운 일이 아닌 관계로 얼마전까지는 불가능한 일이었다.

이러한 배경속에서 glycone에 변환을 통한 신규 생리활성물질의 개발연구는 두가지 형태로 진행되고 있다. 독일의 Bechthold 박사팀은 urdamycin 당전이효소의 연구를 통해, 상기 효소의 aglycone과 nucleotide sugar 기질인식 부위를 규명한 후 mix and match 방법을 통해 새로운 urdamycin 유도체를 개발하였으며, Salas 그룹은 원래의 sugar 구조를 modify하기 위해 당 생합성 유전자를 block하고 당전이효소의 flexibility를 이용하여 신규 생리활성물질을 창출하였다. 또한 KOSAN 및 Salas 그룹 연구진들은 개별적인 nucleotide sugar를 생산할수 있는 플라스미드를 제조하여 aglycone만 생산하는 mutant를 형질전환시킴으로써 신규 물질을 개발하거나 상기의 유전자를 *S. albus*나 *S. lividans*에 삽입 또는 재조합 플라스미드를 이용한 이중발현후 다양한 aglycone을 feeding함으로써 신규 생리활성물질 개발하였다. 그러나 최근에는 glycone 변환을 통한 신규 생리활성물질 개발분야에 있어

서 참신한 방법이 제창되었다. Glycorandomization이라고 명명된 이 방법은 Thorson 그룹이 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center에 있을 때 개발한 것으로, 그림 1과 같이 40종 이상의 sugar-phosphate를 합성한 후, 기존의 mutant에서 분리되었거나 유기합성법으로 합성된 aglycone과 당전이효소, dTDP-glucose synthase를 이용하여 *in vitro*에서 반응시키는 방법으로, 현재까지 보고되지 않은 새로운 신규 생리활성물질 개발가능성을 확인하였다(C&E News June 4, 2001). 그들은 novobiocin의 aglycone인 novobiocic acid와 그림 1의 sugar library, 그리고 novobiocin 당전이효소를 이용하여 상기의 sugar moiety 중 2개의 moiety가 novobiocic acid에 부착되는 것을 확인하였다. 이러한 glycorandomization 방법은 다음과 같은 장점을 가질 수 있다. 첫째는 생체내에서 신규 물질이 만들어지면 host가 새로운 생리활성물질에 죽는 즉, 내성문제를 걱정할 필요가 없다는 것이고, 두번째는 효소반응으로 최종산물이 소량 생성되어도 현재의 분석법으로 확인이 가능하다는 것이며, 세번째는 한순간에 다양한 효소반응을 동일시간에 수행하여 동일시간에 확인이 가능하기 때문에 기존의 방선균이나 대장균을 숙주로 이용하여 연구하는 것보다는 시간과 노력이 단축된다는 것이다. 즉, 일종의 HTS(high throughput screening)의 의미를 가질 수 있다는 것이다.

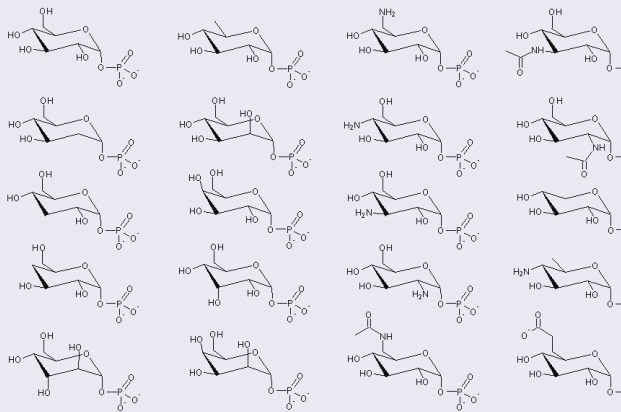


그림 1 Thorson 그룹에서 합성한 TDP-glucose synthase(Ep) 기질인 sugar-phosphate들

다. 반합성 생리활성물질의 생물학적 생산

반합성품으로 생산되는 생리활성물질을 유전자 조작을 통한 생물학적으로 생산한 예는 두 가지가 보고되었다. Hutchinson 박사가 위스콘신대에 재직할 때 개발한 epirubicin과 버지니아 Commonwealth 대학의 Kevin Reynolds 박사팀이 개발한 doramectin이 그것이다.

Epirubicin은 *S. peuceitius*에서 생산되는 doxorubicin의 반합성품으로, 구조적 차이로서는 doxorubicin의 sugar moiety가 L-daunosamine인데 반해 epirubicin은 L-4-epidaunosamine이라는 것이다. L-daunosamine과 같은 deoxysugar의 생합성 초기에는 공히 4-keto-deoxyglucose가 중간대사물로 존재하는데, 다음단계의 유전자들, 예를들면 doxorubicin인 경우 4-ketoreductase(*dnmV*), 또는 *dnmV*와 다른 stereospecificity를 보이는 비슷한 기능의 유전자, 즉 동물구충제 avermectin의 sugar moiety중의 하나인 oleandrose 생합성에 관여하는 *aveE*와 항생제 erythromycin sugar moiety중의 하나인 mycarose 생합성 유전자인 *eryBIV* 유전자들이 관여하여 ketoreductation이 일어나는 것이다(그림 2).

상기의 avermectin 이나 erythromycin sugar 모두 C4 위치의 hydroxy group은 epirubicin이 요구하는 configuration 상태로 존재하고 각각의

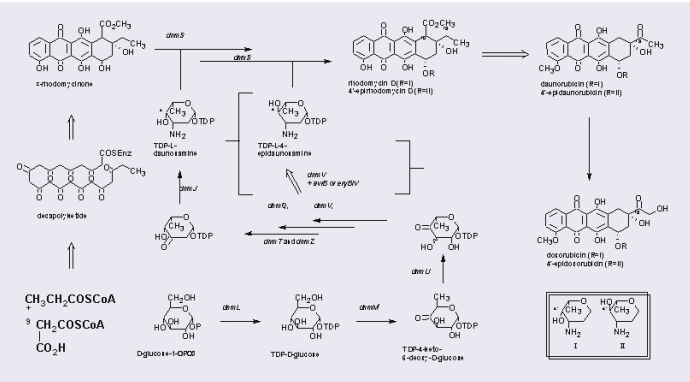


그림 2 The main steps in the biosynthetic pathway to daunorubicin and doxorubicin. The pathway to TDP-4-epidaunosamine, shown in brackets next to TDP-L-daunosamine, operates in the strains in which the *aveE* or *eryBIV* genes are substituted for *dnmV*.

당생합성 과정에서 *dnmV*, *aveE*, *eryBIV*의 기질은 4-keto-deoxyglucose로 동일하기 때문에, daunorubicin 생산균주에서 *dnmV* 유전자를 gene disruption으로 block시키고 *aveE*나 *eryBIV*를 도입시킴으로써 epirubicin을 직접 생물학적으로 생산할 수 있었던 것이다(그림 3).

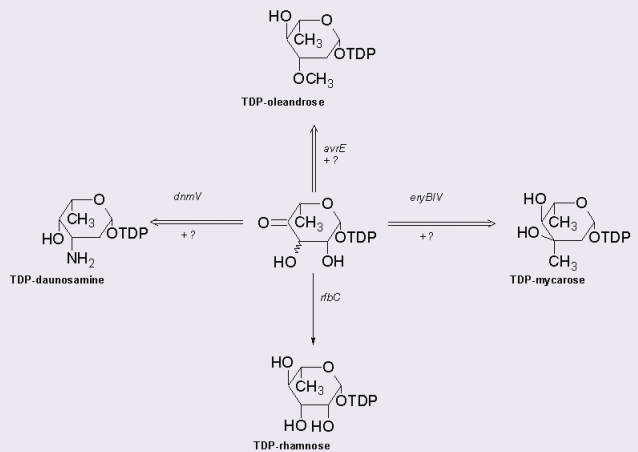


그림 3 The relationships between the gene and C-4 stereochemistry of the deoxydugar produced among the three TDP-4-ketohexose reductases discussed in the text

동물구충제 doramectin은 *S. avermitilis*에서 생산되는 avermectin의 유도체로, avermectin과는 달리 start unit가 CHC moiety로 치환되어 있는 구조이다. Avermectin의 생합성은 isobutyryl CoA와 methylbutyryl CoA를 이용하는데, Pfizer 연구진들은 상기의 branched-chain amino acids 대사 과정이 결여된 돌연변이체(*bkd* mutant)를 제작한 후 이 돌연변이체의 배양액에 다양한 start unit를 feeding하는 방법으로 무수한 avermectin 유도체를 개발하였다. Doramectin 역시 그러한 유도체중 하나로, 이 경우는 배지에 CHC를 첨가함으로써 생산할 수 있는 것이다. 이러한 배경에서, 버지니아 Commonwealth 대학의 Reynolds박사팀은 천연물중에서 CHC moiety를 가지고 있는 ansatrienin의 생합성 연구를 수행하여 CHC 생합성에 관여하는 유전자를 규명하고(그림 4) 이 유전자들을 *bkd* mutant에 도입함으로써, 기존의 doramectin 공정인 *bkd* mutant에 CHC를 첨가하는 방법 대신 생물학적으로 직접 생산하는 방법을 개발한 것이다(그림 5).

계속 진행될 것으로 보인다. 이러한 연구는 그 중요성에 비해 세계적으로 초보단계이기 때문에 우리나라가 선진국과 경쟁이 가능한 분야중의 하나가 될 수 있을 것이라 사료되고 이 분야에 대한 연구가 필요하다.

나. 신선향구조의 화합물에 대한 생합성 연구가 필요하다.

지금까지 생리활성물질 생합성 연구는 편형체계도 polyketide 계열의 화합물을 대상으로 연구를 진행시켰고, 유전자조작을 통한 신규 물질 개발도 이 화합물에 집중되었다. 이러한 과정속에서 방선균 생물학에 대한 지식은 축적되었지만 현실적으로 직접 부가가치를 창출한 예는 극히 드물다. 그러므로 이제는 기존의 것을 따라가기 보다는 새로운 계열의 생리활성물질에 대한 연구, 예를들면 enediyne이나 indolocarbazole, 기타 odd structure를 가진 화합물에 대한 접근이 필요하다. 현재의 방선균 유전자조작술이나 구조분석 수준은 우리나라도 선진국 수준에 근접해 있고, 10년동안 선진국에서 시도한 polyketide 와 관련된 기술축적은 위에 언급한 생리활성물질을 연구하는데는 결정적인 영향을 주지 못할 것으로 사료되기 때문에 경제적 가치가 있거나 독특한 구조를 가지는 생리활성물질의 생합성에 관한 연구의 시작이 미래의 경쟁력을 위해 필요하다.

다. 목적의식적인 생합성유전자 연구가 필요하다.

과거 5년동안 방선균에서의 유전자조작을 통한 신규 화합물의 개발방법은 일반적인 것으로 정착되었지만 방선균 분야에서 세계 최고의 기술력을 가졌다고 평가되는 미국 KOSAN에서도조차 현재까지는 직접적인 경제적 이윤을 창출하지 못하고 있다. 이는 연구의 목적의식 부재가 그 원인중의 하나라고 생각된다. 목적의식적인 연구중의 하나는 단연 반합성품의 생물학적 생산 연구라고 할 수 있다. 이러한 접근으로 만약 성공한다면 신약개발 기간보다 시간적으로 더 소요되는 임상 실험 기간을 배제할 수 있고, 개발 즉시 상품화할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문이다.

라. DNA chip으로의 응용이 필요하다

과거 10년동안 축적된 항생·항암물질 생합성에 관여하는 유전정보는 polyketide, aminoglycoside, polyene, orthosomycin, enediyne 등 많은 화합물에 걸쳐 충분히 쌓여있다. 그러므로 이러한 유전정보들을 이용한 DNA chip 개발이 가까운 미래에 신규 생리활성물질 개발 방법의 한 축을 형성할 것으로 기대된다. 특히 방선균의 유전체는 GC 함량이 75% 이상으로 지구상의 생명체중 가장 높은 GC 함량을 가지고 있어서, 이러한 DNA chip을 통한 생리활성물질 발굴에 더욱 요긴하게 이용될 수 있다. 예를 들면 시료를 개별적인 방선균 1종씩만을 가지고 하는 것이 아니라, 토양시료 그대로도 이용할 수 있다는 것이다. DNA chip 구성물이 고가의 화합물을 검출할 수 있는 탐침으로 포장되어 있으면, 일차적으로 수천개의 토양시료에서 metagenome을 분리하고, 이를 대상으로 먼저 검색한 후, 후보시료에서 다시 방선균을 분리하여 생산균주를 확보하는 것이다. 주지하다시피 한 종의 방선균은 적게는 4개에서 많게는 100여개의 생리활성물질을 생산하지만 많은 유전자들이 특정조건에서만 발현되어 최종산물을 생산하기 때문에, 천연물을 연구하는 연구자들이 간과해 버린 생리활성물질이 너무 많다는 것이 작금의 문제중의 하나인데, DNA chip으로의 검색은 이러한 문제점을 해결할 수 있을 것으로 기대한다. 실제적으로 고가의 indolocarbazole 함유 항암제, enediyne계열 항암제, alpha-glucosidase inhibitors, orsellinic acid 함유 슈퍼항생제들의 유전정보를 이용하여 이들 계열의 생리활성물질 생산 유전자를 검색할 수 있는 cDNA chip을 개발하면, 이를 통하여 이미 KRIBB나 해양연구소등에서 분리된 방선균인 경우는 전체 유전체를 대상으로, uncultured 방선균인 경우는 metagenome을 이용하여 검색한 뒤 그 결과를 이용하여 전자인 경우

target-directed 발효법으로 화합물을 직접 분리하고, 후자의 경우 현재 의약품으로 이용되는 고가 신약들의 구조를 rational하게 변환시킬 수 있는 유전자원과 생산균주 자체를 확보할 수 있다. 그러므로 cultured 및 uncultured 방선균을 대상으로 microarray를 기반으로한 targeted-directed screening 기술개발은 학문적뿐만 아니라 기술적으로도 중요한 신물질탐색 방법으로 자리매김 할 것이라 예상된다. 최근 방선균 유래 생리활성 물질 발굴용 DNA chip개발을 Takara Korea와 Atman Bioscience사가 공동으로 진행시키고 있는데 이 분야에 대한 연구가 더욱 절실히 필요하다고 사료된다.

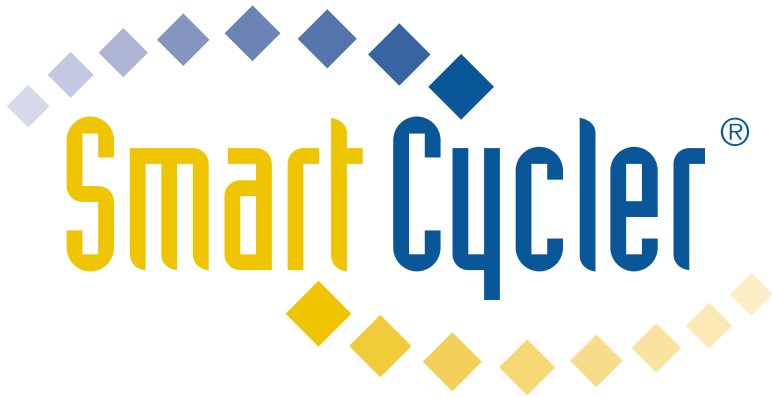
【참고문헌】

- Hutchinson CR; McDaniel R. Combinatorial biosynthesis in microorganisms as a route to new antimicrobial, antitumor and neuroregenerative drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2(12)**: 1681-90(2001).
- Khosla C. Natural product biosynthesis: a new interface between enzymology and medicine. *J. Org. Chem.* **65(24)**: 8127-33(2000).
- Mendez, C.; Salas, JA. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends in Biotechnol.* **19(11)**: 449-456(2001).
- Mendez C; Weitnauer G; Bechthold A; Salas JA. Structure alteration of polyketides by recombinant DNA technology in producer organisms-prospects for the generation of novel pharmaceutical drugs. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **1(4)**: 355-95(2000).
- Pfeifer BA; Khosla C. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65(1)**: 106-18(2001).
- Rodriguez, E; McDaniel, R. Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* **4(5)**: 526-534(2001).
- Trefzer A; Salas JA; Bechthold A. Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **16(3)**: 283-99(1999).



홍순광 (skhong@mju.ac.kr)
 명지대학교 생명과학과 부교수
 (주)아트만바이오사이언스사 대표이사

- 1978 - 1982 서울대학교 자연과학대학 미생물학과(학사)
- 1982 - 1984 한국과학기술원 생물공학과(석사)
- 1988 - 1992 동경대학교 대학원 응용생명공학과(박사)
- 1985 - 1989 (주)한정화학 중임연구소 주임연구원
- 1992 - 1993 University of Wisconsin, Madison(Post. Doc.)
- 1993 - 1996 생명공학연구소 미생물화학 연구그룹(선임 연구원)
- 1996 - 현재 명지대학교 생명과학과 부교수
- 1999 - 현재 (주)아트만바이오사이언스사 대표이사



Real Time Thermal Cycler



▶ 다양한 연구 목적에 유연하게 대응

Smart Cycler[®] System의 I-CORE[™] Module은 다양한 연구에 유연하게 대응하는 강력한 시스템입니다. Smart Cycler[®] Unit에는 16개의 I-CORE[™] Module이 장착되어 있고 각각이 독립되어 있으므로 16종의 다른 반응을 동시에 수행할 수 있습니다. 또 복수의 실험을 각각 다른 시간에 시작할 수 있어 1대의 Smart Cycler[®] System으로 여러 연구자가 공유할 수 있습니다.

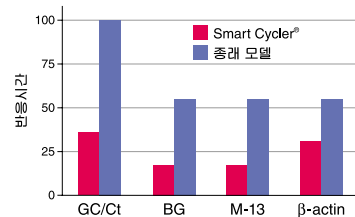
▶ Real Time Monitoring

Smart Cycler[®] System의 소프트웨어는 I-CORE[™] Module의 형광 시그널을 각각 모니터링할 수 있습니다. Real time으로 증폭곡선을 표시하여, 형광강도가 미리 설정한 최저값을 초과하면 증폭산물이 존재함을 인식합니다.

▶ 빠른 환경설정으로 연구효율 향상

Smart Cycler[®] Unit는 반응액을 목적 온도까지 신속하고 정확하게 도달하는 Heating/Cooling 기능으로 반응시간을 대폭 단축할 수 있으며, 빠른 온도변화와 실시간 검출 그리고 한번의 실험으로 다양한 반응과 형광검출이 가능하여 연구효율이 비약적으로 향상됩니다.

종래 모델과 Smart Cycler[®]의 반응시간 비교



▶ 4파장을 동시에 여기/검출 가능

Smart Cycler[®] Unit중 I-CORE[™] Module에는 반도체 소자로 구성된 광학계 Unit가 있어 다른 4 종류의 파장을 동시에 여기/검출합니다. 또 복수의 형광색소를 사용하면 한개의 반응액으로 4종류까지 target 유전자를 동시에 검출합니다.

Smart Cycler[®] System으로 사용 가능한 형광시약

Channel	1	2	3	4
Excitation(nm)	450~465	495~527	527~555	555~593
Emission(nm)	505~537	537~565	565~605	605~650
Simplex Dyes	FAM, SYBR [®] Green	TET, JOETAMRA	Cy3 [™] , EtBr, Alexa	ROX, Texas Red
Multiplex Dyes	FAM	TET	TAMRA	ROX

▶ 하나의 시스템으로 복수의 Smart Cycler[®] Unit 제어 가능

Smart Cycler[®] System은 한 시스템에 Smart Cycler[®] Unit을 6대까지 증설할 수 있어, 최대 96개 시료의 real time PCR이 가능합니다.

I-CORE™ Module이

보다 유연한 PCR을 실현합니다.

Smart Cycler® Unit는 독립적인 16개의 I-CORE™(Intelligent Cooling/Heating Optical Reaction: 특허 획득) Module로 구성되어 있고, I-CORE™ Module에는 heating/cooling기능과 검출용 optical block이 내장되어 있습니다.

16개의 Module을 각각 독립적으로 제어할 수 있으므로 1대의 Smart Cycler® Unit 내에서 16종류의 다른 protocol로 PCR할 수 있습니다.

또한 한개의 I-CORE™ Module이 정상적인 작동을 하지 않을 경우 다른 정상의 Module로는 실험을 계속할 수 있습니다.

Smart Cycler® System Diagram

