



국립 경상대학교 분자유전 실험실

윤한대/ hdyun@gsnu.ac.kr

국립경상대학교 농업생명과학대학은 지방대학으로는 유일하게 세계수준의 대학원 육성사업 (BK21) 농업생명과학분야에 선정되어 농업부분의 생명공학 (식물공학, 동물공학, 식품미생물공학, 농업환경공학) 연구에서 세계최고로 지향하고 있다. 환경생명화학과는 2003년 농화학에서 환경생명화학으로 학과 명칭이 개명되므로서 BT와 ET 산업을 지향하며 높은 수준의 연구인력을 키워나가고 있다. 환경생명화학과 내 미생물분자유전학 실험실은 윤한대 교수님 지도아래 3명의 박사과정과 7명의 석사과정 그리고 4명의 학부 연구생들로 구성되어 있으며 미생물 배양과 동정, 다양성 확보, 유용유전자 및 효소 탐색과 분리 등 여러 분자생물학적 연구 시스템들이 고루 갖추어져 있다. 현재 한우의 반추위에서 미생물들의 다양성 확보와 metagenomic library를 통한 cellulase, lipase, xylanase, pectate lyase, amylase 등과 같은 산업적으로 유용한 유전자와 효소를 분리 중에 있고 미생물 quorum sensing에 관한 연구에 총력을 기울이고 있다.

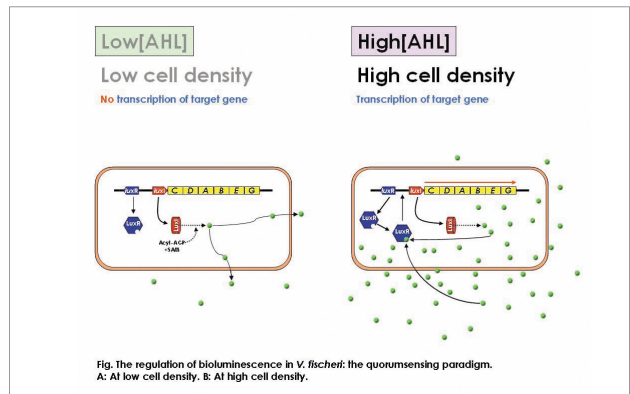
세균의 의사전달 (Quorum sensing)

미생물들은 온도나 pH, 삼투압, 및 영양물질 등과 같은 다양한 환경 요인에 의해 영향을 받으면서 생존하고 있고 환경억제 요인들이 존재하는 서식처에서 적당한 기회가 주어질 때마다 주위 환경의 변화에 신속하게 대처하기 위한 그들 자신들만의 적응체계를 발달시켜 왔다. 그러한 변화성과 적응성은 환경 조건의 폭넓은 변화에 생존하고 변창할 수 있는 능력을 소유하는 유기체의 결정적인 특성으로서 대부분의 미생물들이 다양한 환경 상태를 극복하도록 디자인된 생화학적 경로를 암호화하는 커다란 유전정보를 저장하고 있다. 다양한 조건에 반응하는 미생물들은 특정신호에 의해 자극되어질 때 그 특정신호의 인식과 정보를 specific transcription과 같은 세포내 반응으로 전환하는 신호전달 체계를 가진다.

미생물의 sensing과 response mechanisms에 대해 연구자들은 small signalling molecules 이용을 통하여 cell-to-cell communication 형태로 최근 밝히게 되었다. 상당수 signalling molecule-mediated sensing과 response pathways가 정의되고, 일반적으로 quorum-sensing (QS)알려진 제어 형태의 범위 내에 들어오게 되었다. Quorum-sensing라는 용어는 Fuqua 등에 의해 처음으로 사용되었다. 그 과정은 low-molecular-mass signalling molecule 생산과 미생물의 세포 밀도에 관련된 세포의 농도에 의존한다. Signalling molecule은 세포에 의해 인지될 수 있으며 이것은 전 집단이 결정적인 농도 (특이한 cell density에 해당)에 도달하면 concerted action을 시작하게 된다. 미생물에서 유래된 signalling molecule의 chemical classes가 확인되었다. 광의로 2가지의 main categories로 나눈다:

(1) Gram-positive bacteria에서 흔히 이용되는 amino acids 및 short peptides.

(2) Gram-negative bacteria에서 드물게 이용되는 fatty acid derivatives. Quorum-sensing은 autoinduction이라고도 불리며 세균이 자신의 세포 농도를 계측할 수 있는 environmental sensing system을 말한다. Autoinduction은 세포수 농도와 함께 발현되는 유전자의 transcriptional activator protein에 의해 적은 분자의 diffusible signal molecule (autoinducer)의 상호작용에 의존한다. Signaling molecule은 세포에 의해 인지될 수 있으며 이것은 전 집단이 결정적인 농도 (특이한 cell density에 해당)에 도달하면 concerted action을 시작하게 된다. 이러한 signal 분자는 세균의 세포로부터 확산되어 세포성장의 한 기능으로 주위에 축적된다. 일정한 수에 이르면 이러한 signal은 일련의 target gene 전사를 조절하기 위해 co-inducer로 작용한다. Gram-negative bacteria에서 대부분의 autoinducer는 N-acylhomoserine lactones (AHLs) family에 속한다. AHLs는 antibiotic biosynthesis, virulence factor 생산, exopolysaccharide biosynthesis, bacterial swarming, plasmid conjugal transfer 및 stationary phase로의 전이 등과 같은 상이한 세균 기능을 조절하는 역할을 한다.



이와 같은 세포와 세포사이의 의사전달은 해양발광 세균인 *Vibrio fischeri*에서 처음으로 설명되었으며 (Hastings & Nealson, 1977 ; Nealson & Hastings, 1979) 인간 및 식물 병원성과 관련된 그람 음성 세균을 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히, 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis, CF) 원인균인 *Pseudomonas aeruginosa*, 식물병원균인 *Erwinia carotovora* 등이 QS system에 의해 병원성이 발현된다는 것이 밝혀지면서 QS system을 차단하여 병원성을 조절하려는 시도가 진행되고 있다. Rumbaugh (2000)와 Chugani (2001) 등은 *P. aeruginosa*의 QS system을 차단하여 화상을 입은 환자에게 세균감염이 일어나는 기작을 구명하고 Si를 이용하여 세균감염을 억제할 수 있는 새로운 방법을 발견하였으며, Dong (2001) 등은 *E. carotovora*가 생성하는 Si를 분해하는 효소를 최초로 발견하여 식물병원성을

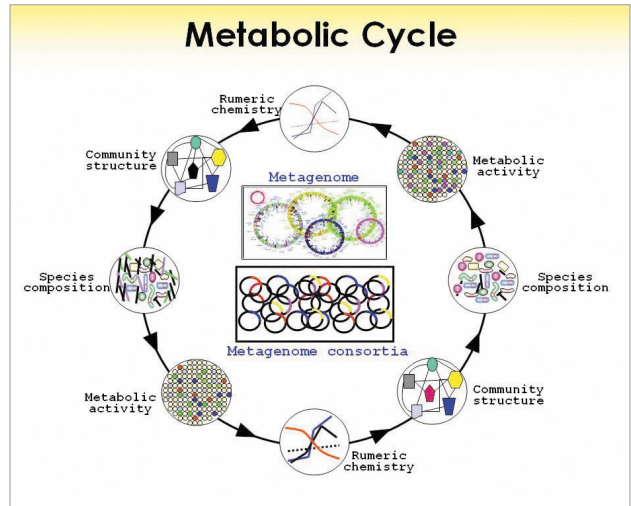
조절하고 채소, 감자, 담배 등의 형질전환식물을 만들어 식물 자체가 세균이 생성하는 시를 분해함으로써 병원성을 조절할 수 있다고 보고하였다. 지금까지 미생물에 의한 질병 치료를 위해 항생제를 투여하거나 식물병원균에 의한 농작물의 피해를 줄이기 위해 화학농약을 살포하여 왔으며 이러한 처방은 장기간 사용하였을 때 미생물은 항생제에 대한 내성을 가지게 되고 농작물의 농약 잔류와 같은 문제들을 야기하는 부작용이 수반되었다. 그러나 이들 미생물이 병원성을 유발하기 위해 필요한 의사전달을 차단하여 병 유발을 방지할 수 있다면 새로운 병 방제 대책을 수립할 수 있을 것이다. 배추, 감자와 같은 작물에 연부병을 일으키는 *Erwinia carotovora*는 pectin methyl esterases, pectate lyases, pectin lyases, polygalacturonases, cellulases, proteases 등을 포함한 많은 세포벽분해효소를 생성하는 식물병원균이다. 세포벽분해효소는 식물조직의 분해에 관여하는데 병원균이 낮은 세포밀도로 존재할 때는 세포벽분해효소의 생산이 억제되어 식물조직을 분해하지 못하고 정족수의 개체군 밀도에 도달되면 세포 상호간에 acyl HSLs (acyl homoserine lactones)이라는 시를 방출하여 QS system을 통해 세포벽분해효소를 대량 분비하여 식물세포벽을 와해시킴으로서 식물에 연부병을 일으키게 된다. 만일 이러한 병원성 유발인자인 acyl HSLs를 분해하여 QS system을 차단하면 세포벽 분해효소의 분비가 억제되어 *E. carotovora*는 연부증상을 일으키지 못하게 된다. 더욱이 시를 분해할 수 있는 유전자를 작물 내로 도입시켜 형질전환식물체를 얻는다면 식물병원균을 더욱 효과적으로 방제할 수 있을 것이다. 이와 같이 QS system을 조절하여 병원성 인자인 시를 억제하거나 분해시킴으로써 항생제 내성과 같은 문제를 해결할 수 있을 것이며 농약의 사용을 절감시켜 지구환경 보전 및 친환경 농산물의 생산성 증대로 농가 소득 증대를 향상시킬 수 있을 것이다.

autoinduction은 대부분 autoinducer synthase와 inducer의 receptor protein으로 이루어진 'LusR-Lux' family system으로 이루어 졌으며, 이 체계를 갖는 거의 모든 박테리아가 공생으로 존재해 박테리아와 숙주간의 특이한 생리적 상호작용의 관점에서 매우 흥미롭다. N-acyl homoserine lactone (AHL)의 신호 전달이 병원성 박테리아에서 병원성 요소를 조절하는데 중요한 역할을 하는 것에 착안하여, 이 신호전달 경로를 파괴하여 박테리아에서 병원성 요소의 발현을 막아 이것의 침습을 막는 방법의 탐색이 진행 중이다. 즉 AHL antagonist가 감염을 방지하는 therapeutic agent로서의 가능성이 관심을 끌으며 이밖에도 AHL 혹은 AHL을 기초로 한, 박테리아의 검출 및 그 숫자의 산출, 숙주 세포의 신호 반응의 trigger 개발 등, 많은 생물공학적인 응용이 가능하여 N-acyl homoserine lactone에 관한 연구는 앞으로 도 계속 각광받으며 활발히 진행될 것으로 사료된다.

미생물 다양성 확보

1978년에 C. R. Woese, L. J. Magrum과 G. E. Fox가 일반 원핵세균 (prokaryotes)과는 또 다른 고세균 (archaea) 미생물 군집이 있다는 보고를 한 이후, 환경 내 미생물군집 중 대부분의 미생물을 인공적으로 배양하기 어렵다는 사실을 알게 되었다. 이에 많은 배양기술이 개발되어지고 또한 배양기술을 통하지 않은 미생물 군집 구조 분석 방법도 개발되어졌다. 거의 대부분의 archaea에 속하는 세균들은 인간이 살아갈 수 있는 일반적 환경이 아닌 극한 조건의 환경, 즉 고염, 고온, 고압, 혐기적 조건에서 견딜 수 있는 능력을 가진 세균이었다. 바로 이러한 군집에 속하는 세균들에게서 생산되어지는 효소는 산업환경에서 매우 유용하게 사용되어질 것이라고 생각하였으며 실제로 그러하였다.

초기의 효소 탐색을 위한 연구는 균주 배양에서부터 시작되었고 균주의 배양액에서 단백질을 정제하여 이를 이용하였다. 그리고 단백질의 아미노산 서열을 이용하여 미생물 염색체의 어느 부분에서 발현되는지를 탐색하고 그리고



이를 클로닝하여 대량생산을 하였다. 하지만 이러한 일련의 효소탐색 기술은 배양할 수 없는 미생물이 생산하는 효소를 찾을 수는 없다는 맹점이 항상 존재하고 있었다. 따라서, 연구자들은 기존 배양법을 배제한 상태에서 새로운 활로를 모색하기 시작하여 미생물 유전체 (microbial genome) 연구를 생각하게 되었다. 물론 배양가능한 미생물은 1% 미만일 것이라는 전제 하에 많은 연구자들이 나머지 99%를 차지하는 미배양 미생물 군집 spectrum은 생태학적으로나 산업적으로 더욱 중요하고 유용할 것이라고 판단하고 연구를 시작하였다. 처음에는 군집의 전체적인 다양성 (diversity)에 대한 spectrum을 조사하기 위해 16S rRNA gene만을 대상으로 구조를 분석하여 미배양성 미생물 군집중 archaea가 많은 분포를 차지한다고 보고되었다. 또한 eubacteria에 속하는 염기서열도 발견할 수 있었다.

모든 초식동물이 식물체의 구조적 성분으로부터 에너지를 획득하는 능력은 반추 미생물과의 상호작용에 의존한다. 이들 분해경로는 위 속에서 미생물 발효가 이루어지도록 하는 일련의 해부학적 적응을 보여준다. 반추에서 가장 잘 발달된 형태로 보여주는 pregastric fermentation의 장점은 동물은 휘발성 지방산과 비타민류를 이용할 뿐만 아니라 생성된 미생물 단백질도 이용할 수 있다는 점이다. 양과 소에서 반추는 소화기관의 총 용적의 64 ~ 71%를 차지하며 전체 체적의 9 ~ 13%가 된다. 반추는 농업에 매우 중요하다. 세계의 반추 가축의 총수는 350 억두 정도로 야생 반추의 수의 10배가 넘는다. 반추동물은 작물생산에 부적합한 경지에서 생산된 섬유소로부터 식품을 생산할 뿐만 아니라 벼짚과 stover와 같은 농산부산물을 급여함으로써 작물생산을 대체하고 있다. 생명공학기술은 의약품 생산 시스템으로 형질전환 양을 사용하여 반추동물을 개발하는 새로운 방법을 개발하고 있다.

반추는 절대혐기성균에 의해 지배되는 복잡하고 독립된 미생물 집단을 형성하고 있다. 이들의 경쟁적 상호작용은 매우 의의가 있으며, 최근 우점한 반추세균에 의한 bacteriocin 생성이 보고되었다. 특정한 서식처를 점유하는 새로운 종이 계속적으로 분리되고 있으며, 최근에는 acetogen, succinate 전문 utilizer, 높은 활성을 가진 deaminator, 가용성 tannin 분해 균주가 분리 보고되고 있다. 앞으로는 메타게놈 분석을 이용하여 16S rDNA 염기서열 다양성의 직접적인 분석으로 반추미생물 중에 배양되지 않고 있는 미생물의 실제적 비율을 알 수 있을 것이다. 생육율이 보다 적은 미생물들은 turnover에 의해 반추로부터 제외되었지만 총 미생물과 배양될 수 없는 미생물 사이의 차이는 다른 생태계에서만큼 크지 않을 것이다.

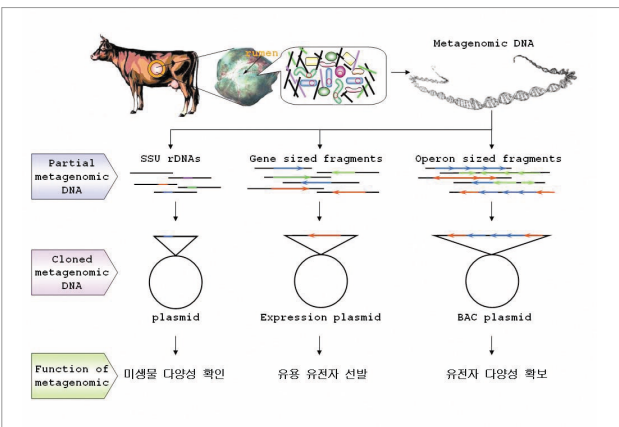
반추미생물 중 Prevotella 및 Butyrivibrio 종이 배양될 수 있는 가장 풍부한 세균으로 보고되었으나, 동일한 기주 내에서 공존하는 다양한 균주가 존재할 것이며, 이들 중에는 배양되지 않는 미생물도 발견될 것이다. 혐기배양기술의 어려움에도 불구하고 rRNA-based oligonucleotide는 enumeration probe

로 많은 관심을 끌게 되었고, PCR-based detection과 profiling procedure와 같은 방법은 다수의 상이한 grouping, 배양편견에 대한 독립, 반추동물의 상호관련 및 지리학적 변화에 대한 연구도 필요하다.

반추혐기성 곰팡이는 20년 전 어떤 flagellate protozoa가 사실은 곰팡이의 zoospore라고 처음으로 보고 이후 상당한 관심을 끌어 왔다. 이러한 chytrid fungi는 현재 초식동물의 내장에서만 발견된다. 그들은 미토콘드리아가 없는 대신 hydrogen-generating redox organelle (hydrogenosome)을 가지고 있는데 이것은 미토콘드리아, peroxisome, 분리된 endosymbiosis에서 유래된 것이라 추정된다. 더욱이 혐기성 ciliate protozoa는 rumen에서만 존재하는데 반추미생물 총량의 40% 이상이 되는 것으로 보고된다. 다수의 protozoa는 endosymbiotic metagenomic Archaea를 포함하는 것으로 보고되고 있다.

Metagenomic library를 통한 유용 유전자 및 식물세포벽 분해효소 확보

반추 미생물 효소 시스템은 주로 세포벽에 결합한 미생물일 것이며, 반추와 같은 고도의 경쟁적이고 수용성인 환경에서 식물 세포벽분해에 관련될 것이다. 혐기성 곰팡이에서 생산되는 세포벽분해효소의 소단위는 dockerin을 포함하여 섬유소 결합을 중재하는 scaffolding protein에 부착되며, cellulosome-like multi enzyme 복합체의 구조를 갖는다. 당질가수분해효소 외에도 어떤 acetyl esterase는 이러한 다중복합체로 되어있다. 반추 섬유소 분해 중 세균의 경우는 아직 분명하지 않다. *Fibrobacter succinogenes*의 endoglucanase F는 섬유소에 직접적으로 결합하지만 반추 세균에서 분리된 대부분의 섬유소 유전자들은 cellulose-binding domain을 암호화하는 염기가 없다. 다수의 *Ruminococcus* 속 섬유소 분해 유전자는 single domain enzyme을 암호화하는 것으로 보이나 이들 유전자의 어떤 것은 대장균에서 클로닝될 때 불안정하다는 증거가 있다. *Ruminococcus flavefaciens endA* 유전자는 본래 single domain enzyme을 암호화하는 것으로 생각되었으나 증폭된 염색체 DNA의 염기서열은 clostrial dockerin에 매우 상동성이 있는 지역을 포함하는 multidomain cellulase를 암호화하는 것으로 보고되었다. 다수의 *F. succinogenes* 효소들은 basic terminal region을 함유한다. 그들은 서열상동성이 없어 dockerin을 나타내지 않지만 세포표면에 효소부착과 관련이 있다.



섬유소분해 균에서 생산되는 xylanase는 하나 이상의 catalytic domain을 보여주며, 어떤 반추균 xylanase는 thermophilic xylanase의 열안정화에 관련되는 지역에 유사한 인접 sequence를 함유하며, 이 domain은 mesophilic rumen species에서의 확실한 역할을 수행하는 것으로 추측된다. Non-cellulolytic *Prevotella* 속에서 생산되는 xylanase는 단일도메인효소이다. 반추에서 기주동물의 생존에 기여한다는 것으로 보이지만 이러한 다양한 특징의 기능적 중요성은 분명하지 않다. 대부분의 경우 개개의 polypeptide의 촉매 역할과 구조기능 상호관련은 enzyme complex 혹은 시스템의 상호작용

의 구성원이 밝혀질 때 비로소 이해될 수 있을 것이다. 식물체는 토양과 같은 다른 환경에서 보다 turnover가 신속한 반추위에서 매우 빠른 속도로 분해된다. 이것은 고도의 활성분해 시스템으로 유도한다. 반추곰팡이 *Neocallimastix frontalis*의 crystalline-cellulose degrading complex는 지금까지 알려진 미생물 중에 가장 활성적인 것으로 보고되며 클로닝된 xylanase로 곰팡이에서 가장 활성이 있는 것으로 알려지고 있다. 고도의 섬유소분해활성을 설명하는 기작이 아직은 분명하지 않으며, 왜 chitinase가 crude *Neocallimastix* complex의 섬유소성 활성을 파괴하는지 아직 확인되지 않았다.

하급식물체의 반추위분해촉진은 가축생산에 이용되며 작물 부산물의 이용에 도움이 된다. 개개의 섬유소분해성 반추종은 복잡하고 고도로 진화된 효소 시스템을 가지고 있는데 표면공격, 산소의존반응의 결핍과 같은 내부제한 인자는 미생물 자체의 조작에 의해 쉽게 해결될 수 없을 것이다. 반추위에서 분해작용은 필요한 생육인자 결핍, 항영양인자, 급식변화로 인한 낮은 섬유소분해균의 밀도, 저해작용에 의해 손상이 올 수 있으며 섬유소분해균의 생육을 촉진하는 미생물 첨가제 혹은 영양분 enzyme cocktail에 의해 회복이 가능할 것이다. 다수의 섬유소분해 미생물 종은 농후사료의 급여로 인한 pH 감소에 민감하므로 섬유소분해능은 유전자조작에 의해 *Prevotella*종과 같은 저산성 내성균의 도입도 가능할 것이다. 식물구조는 소화율의 주요 인자가 되며, 현존하는 화학적, 효소적, 미생물학적 전처리의 목표가 된다. 식물육종과 조작을 통하여 식물의 다른 주요 성질을 변화시키지 않고 식물구조를 변화시킨다면 장기적으로 작물의 분해율을 증진시키는 해결책도 마련할 수 있을 것이다.

반추미생물의 연구는 유전적 분석의 개선된 기술에 의해 가속화된다. 이 분야 발전의 가장 큰 장애는 대부분의 반추 혐기성균의 산소 감수성 보다는 균주의 다양성과 상호관계가 잘 알려져 있지 않다는 사실이다. 반추세균에서 제한효소도 많이 발견되며 특히 *S. ruminantium* 균주에서 높은 비율로 발생하는데 아마 bacteriophage가 많다는 것을 반영한다.

반추미생물 연구에 대한 원동력은 선진국에서 효율적인 가축 생산을 위한 필요성에서 출발하였다. 특별한 오염, 병의 위험성으로부터 반추동물 생산의 원하지 않는 결과를 피하는 방향으로 연구가 강화될 것이며, 반추위에서 *Listeria monocytogenes*과 *E. coli* O157:H7 같은 병원균의 균체수 변화를 이해하기 위해서도 이에 대한 연구가 중요하다. 극복하기 힘든 일이지만 반추의 메탄화 작용은 시스템에서 지구 온난화에 관련되는 탄소 손실을 가져온다. 재미있는 선택으로 methanogenesis를 acetogenesis로 대체할 수 있으나 acetogenic bacteria는 성숙한 반추에서 수소를 위한 methanogen과는 결합할 수 없다.

반추는 모든 미생물 생태계에서 가장 잘 이해되고 접근이 쉬운 것 중의 하나이며 미생물 상호작용과 장내 혐기성균의 기본적인 이해를 위해 이에 대한 연구가 계속되어야 한다. 반추미생물에 대한 생명공학 기법은 상당히 고무적이어서 주요 혐기성균 종의 다양성, 생태, 생리를 이해하는데 있어 촉진 역할을 하는 연구 도구가 될 것이다. 한편으로는 반추미생물과 그들에서 유래한 유전자를 찾는 것을 목적으로 할 수 있다. 반추미생물 연구 영역에서 식물 세포벽 분해효소 유전자 뿐 만 아니라 protease, lipase, phytase 등에 관련된 영역도 추가될 것이다. 반추는 이미 경제면, 편리성을 극복하기 힘든 식물체에 대한 이동성이며, 자주적, 자기 증식적 발효시스템을 구성하고 있지만 반추미생물 혹은 이들 집합체를 이용한 혐기성 발효는 휘발성 지방산, 에탄올, 유산생산에도 적용할 수 있을 것이다.