최근의 연구 동향을 이해할 수 있도록 몇 편의 논문을 요약하여 하나의 주제로 소개합니다.

Polyketide genome mining in fungi

Ahuja M, Chiang YM, Chang SL, Praseuth MB, Entwistle R, Sanchez JF, Lo HC, Yeh HH, Oakley BR, Wang CC (2012) Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* 134:8212-8221

Ishiuchi K, Nakazawa T, Ookuma T, Sugimoto S, Sato M, Tsunematsu Y, Ishikawa N, Noguchi H, Hotta K, Moriya H, Watanabe K (2012) Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics. *Chembiochem* 13:846-854.

Polyketide는 acetate unit의 연속적인 축합에 의하여 생성되는 일련의 천연물질을 통칭하며 미생물, 곰팡이, 식물에서 두루 발견된다. Polyketide 화합물은 임상에서 유용하게 이용되고 있는 항생제, 항진균제, 항암제, 면역 억제제, 고지혈 치료제 뿐 아니라 가축용이나 농업에 이용되는 생장촉진제, 살충제, 구충제 등 다양한 구조의 생리 활성 물질들을 포함한다. Polyketide는 그 구조적 다양성에도 불구하고 동일한 생합성 기작에 의하여 그 골격이 합성되며, 이 경로를 polyketide pathway라 일컫는다. Polyketide의 탄소 골격은 acyl-thioester 전구체의 연속적인 decarboxylative *Claisen* condensation에 의하여 생성된다. 이와 같은 polyketide synthase의 축합 반응은 지방산 생합성 효소의 그것과 동일한 것으로서, 이들 두 효소는 구조적으로도 매우 유사하다. 특히 본 기고에서 소재로 하는 곰팡이 polyketide synthase의 경우 동물의 지방산 생합성 효소와 매우 유사하며, 곰팡이의 지방산 생합성 효소는 이 둘과는 다른 구조적 특성을 보유한다. 현재 진행되고 있는 polyketide 생합성에 관한 연구는 대부분 다음의 두 가지 경우에서 그 타당성을 찾고 있다. 첫째는 polyketide synthase의 놀라운 특성들이 기초 연구 분야에서 효소의 기질 인식, 반응 기작 및 단백질 상호 작용을 이해할 수 있는 탁월한 소재를 제공하여 주기 때문이다. 둘째는 기존의 유기합성방법으로 만들 수 없는 복잡한 화학구조들을 유전자 공학을 통한 combinatorial biosynthesis로서 만들 수 있는 가능성에서 찾는다. Genome mining 기법은 유전체 정보를 위에 제시된 polyketide 생합성 연구에 활용하는 이외에 유전체 내에 잠재된 새로운 polyketide 생합성 경로 및 생리활성물질을 발굴하는 연구를 가능케 한다. 즉, 주요 미생물의 유전체 내에 coding 되어있는 모든 polyketide 화합물의 구조를 판독하고, 유전자 재조합 기술을 통하여 이들 미지 polyketide 화합물의 생합성을 유도하는 것이 가능하다. 이를 통하여 실험실 배양 조건에서 발견되지 않은 새로운 polyketide 생리활성물질의 발굴을 도모할 수 있으며, 병원성 미생물의 경우 아직 발견된 바 없는 독성물질의 동정을 도모할 수 있다.

곰팡이 polyketide synthase은 동물의 지방산 생합성 효소와 같은 multi-domain 구조로 대변되며 이를 분류상 *iterative* type I polyketide synthase라 지칭한다 (본 기고에서 polyketide synthase의 구체적인 분류와 각 domain의 생화학적 특성은 다루지 않음). 현재 다수의 곰팡이 유전체가 일반에 공개되어 있으며, 이들을 활용한 genome mining 연구는 유전자 재조합 기술이 기 성립된 *Aspergillus* 균주들에 집중되어 있다. 일반적으로 각 곰팡이 유전체에는 20개 정도의 *iterative* type I polyketide

synthase가 존재하다. 곰팡이 유전체 정보에 존재하는 polyketide 생합성 잠재력을 파악하는 것을 polyketide genome mining 이라 지칭할 때 미지의 유전자가 생산하는 polyketide 구조를 동정하는 기법은 크게 두 가지로 대변될 수 있다. 첫 번째 접근 방법은 다수의 이차대사 생합성 유전자들이 실험실 조건에서는 적절히 발현되지 못하는 점을 배려하여, 대상 곰팡이 세포에 유전체 재조합 기술을 적용하여 특정 유전자 또는 유전자단 (biosynthetic gene cluster)의 발현을 활성화하는 기법이며, 또 다른 접근 방법이 특정 유전자를 surrogate host에서 이종발현하여 생산된 대사물질을 동정하는 방법일 것이다. 후자 접근법의 숙주는 yeast가 가장 적절한 선택일 것이다. 첨부하고자 하는 바는 해당 기술들의 적용 가능 범위는 비단 곰팡이 또는 polyketide 생합성에만 국한되는 것은 아니다.

특정 polyketide의 생합성에 관련되는 유전자들은 생합성 유전자군 (biosynthetic gene cluster)을 형성하여 유전체 상에서 인접하여 존재한다. 또한 이들은 하나 이상의 특이 전사 조절 인자 (pathway-specific transcriptional regulator)를 포함하는 것이 일반적이다. 따라서 특이 전사 조절인자를 과발현하여 해당 생합성 유전자군의 발현을 유도 또는 촉진하는 것이 가능하다. 그러나 특이 전사조절 인자의 과발현만으로 모든 *silent* polyketide pathway를 활성화하고 대상 polyketide 화합물의 축적을 유도할 수 있는 것은 아니다 (물론 이의 성공 사례도 다수 보고된 바 있다). 이에 대한 보안책으로 최근에 보고된 기법은 polyketide synthase 유전자 및 특이 전자 유전자의 promoter를 유전체 상에서 재조합하여 해당 유전자들의 발현을 유도하는 전략이다 (Ahuja *et al.*, 2012). 해당 전략은 대상 유전자의 상단에 gene-replacement를 수행한다는 측면을 활용하여 (intergenic region을 활용한다는 특징) 재조합 균주를 선별할 수 있는 selection marker (*A. fumigatus pyrG*)와 특정 promoter (*A. nidulans alcA* promoter)를 조합한 replacement cassette를 목표 유전자의 promoter 영역에 치환하는 기법을 활용하였다. 해당 기술을 model 균주인 *Aspergillus nidulans*에 적용하여 7개의 새로운 polyketide 구조의 동정을 보고하였다. 본 연구에서 제시된 전략을 *Aspergillus* 속 외의 곰팡이 균주에 적용하고자 한다면, 연구 대상 곰팡이 균주에 대한 genetic system (유전자 도입 방법 및 selection marker)이 기 수립되어야 함은 물론이며 해당 균주에서 연구자가 의도한 방식의 유전자 발현을 실현할 수 있는 promoter 자원도 확보되어야 할 것이다. 예를 들어 *A. nidulans alcA* promoter와 같이 균체 생장이 완료된 후에 활성화되는 promoter를 활용한다면 동정 가능한 polyketide (특히 toxin)의 범위를 확대할 수 있을 것이다.

곰팡이 polyketide 생합성 유전자의 이종 발현 방법 (Ishiuchi *et al.*, 2012)은 기존에 존재하는 유전자 재조합 기술들을 적절히 활용하여 실현 가능한 전략을 제시하였다고 평가할 수 있다. 구체적으로 상대적으로 크기가 큰 multi-domain polyketide synthase 유전자 (5 ~ 20 kb)의 발현 벡터 작성을 위하여 overlap extension PCR과 yeast homologous recombination을 활용한 *in vivo* cloning 전략을 활용하였다. 숙주로는 polyketide 생합성을 지원하는 재조합 균주를 활용하였다. 해당 숙주는 유전체 상에 malonyl-CoA syntethase 유전자 (*Rhizobium trifolii matB*)와 phosphopantetheinyl transferase (A. *nidulans npgA*)가 삽입된 균주이며 전자는 polyketide 생합성의 전구체 공급을 증가시키며, 후자는 yeast 숙주 내에서 발현된 외래 polyketide synthase의 homo-form 형성 (acyl-carrier domain에 phosphopantetheinyl group을 전이)을 촉진한다. 구축된 시스템을 적용하여 *Chaetomium globosum* 유전체 내의 미지 polyketide synthase들이 생산하는 polyketide 구조들을 동정하였다. 이와 같은 이종 발현 연구의 장점은 Ahuja *et al.* (2012)이 제시한 promoter engineering과 같이 대상 곰팡이에 대한 genetic system의 구축이 요구되지 않는다는 점이 있으며, 단점으로는 전체 polyketide pathway의 결과물 대신 해당 polyketide synthase가 생산하는 polyketide 기본 골격 만을 관찰할 수

있다는 점이다. 따라서 해당 유전체에 잠재된 polyketide 생합성 잠재력을 파악하는 데에는 한계가 있다 할 수 있으나, polyketide synthase 구조 또는 일차서열과 그 촉매 특성의 연관성을 연구할 수 있는 탁월한 기회를 제공한다. 부연하는 바 polyketide synthase에 의하여 생성된 polyketide 골격은 유전자군에 encoding된 다양한 효소 활성에 의하여 그 구조가 변형되고 다양해 진다. 간단한 예로서 발암성 진균독소로 잘 알려진 aflatoxin B1의 경우 그 생합성을 지정하는 polyketide synthase, norsolorinic acid anthrone synthase의 생성물 구조 만을 고려하여 aflatoxin B1과의 연관성을 유추할 수는 없다. 따라서 genome mining 연구의 확장에 있어서 polyketide pathway에 존재하는 polyketide synthase 이외의 다양한 촉매 활성의 중요성을 간과하지 말아야 할 것이다.

이상 언급된 polyketide genome mining 기술은 기 규명된 domain 정보에 의존하는 것임을 강조하고자 하며, 향 후 계속적인 genome mining 연구 성과는 유전자 정보 만으로 그 구조 예측이 가능한 polyketide pathway의 범위를 확대해 나갈 것이다. 또한 조합 생합성 기술을 통하여 새로운 polyketide 구조를 생산하는 데에 다양한 유전자 소재를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

▶ 권형진 / 명지대학교 생명과학정보학부