

**차세대 생물산업용 인공균주 개발**

**Development of Artificial Microorganisms  
for Future Biotechnology**

**한국과학기술원**

**과 학 기 술 부**

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 차세대 생물산업용 인공균주 개발 에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2002 . 9.

주관연구기관명 : 한국과학기술원

주관연구책임자 : 김 선 창

연 구 원 : 조 주 현  
" : 박 인 엽  
" : 유 병 조  
" : 성 봉 현  
" : 이 현 수  
" : 김 정 민  
" : 이 충 훈  
" : 이 원 식  
" : 이 준 형  
" : 이 진 선

## 최종보고서 초록

과제관리번호	2000-N-NL-01-C-160	해당단계 연구기간	2000. 6. 14 - 2002. 6. 13	단계 구분	1단계 / 2단계
<b>연구사업명</b>	중 사업명	국가지정연구실사업			
	세부사업명	국가지정연구실사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	차세대 생물산업용 인공균주 개발			
연구책임자	김 선 창	해당단계 참여연구원수	총 : 11명 내부 : 11명 외부 : 0명	해당단계 연구비	정부: 396,455천원 기업:        천원 계: 396,455천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술원 생물과학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>현재 유전체 염기서열이 완전히 밝혀졌고 그 기능도 대부분 알려진 대장균의 유전체를 선택적으로 조절하여 주어진 대사여건에 불필요하거나 관여하지 않는 유전자군을 제거하고 유용 목표물질의 생산에 필요한 유전자군 만으로 구성된 최소화된 새로운 인공대장균을 개발하여 생물공학 산업에 필요한 기반을 제공하고자 다음과 같은 세부 연구 내용을 수행하였음.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 대장균 생육 및 재 조건에서 특이적으로 발현되는 유전자의 선별 및 확인</li> <li>2. 새로운 세포 대사경로 설계 및 분석</li> <li>3. 제거할 불필요한 유전자의 설정</li> <li>4. 불필요한 유전자군 제거에 필요한 다기능 벡터의 제조 및 이용</li> <li>5. 대장균 불필요 유전자군 제거 및 확인 기술 개발</li> <li>6. Transposon을 이용한 대장균 유전자 제거용 대장균의 genome library 제조</li> <li>7. Transposon targeting 위치 확인</li> <li>8. 불필요한 대장균 유전체를 20%까지 축소 및 다양한 deletion mutant 제조.</li> </ol>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	최소유전체, 유전체 조작기술, 인공균주, DNA chip, Proteomics			
	영 어	Minimized genome, Genome engineering techniques, artificial strain, DNA chip, Proteomics			

# 요 약 문

## I. 제 목

차세대 생물산업용 인공균주 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

지금까지 인간에 필요한 생물 유래 유용물질을 대량으로 확보하기 위하여 돌연변이 및 유전자 조작 등을 통하여 개량된 미생물을 이용하였다. 그러나 현재 생물공학 산업에 사용되는 균주들은 성장에 필요한 유전자군 외에 진화과정에서 새로운 환경에 적응하기 위하여 외부에서 획득한 불필요한 유전자군을 많이 포함하고 있다. 이와 같은 불필요한 유전자군의 유지 및 발현으로 세포내 에너지원이 과도하게 사용되고 필요없는 물질도 생산되므로 균주에 많은 부담을 주어 균주의 생산성이 크게 저하될 뿐 아니라 제품의 분리·정제의 효율도 낮아 생산제품의 경제성이 크게 떨어졌다. 지금까지는 불필요한 유전자군의 존재를 알고도 이들의 유전체상의 정확한 위치와 기능 등의 유전정보 부족으로, 시행착오적으로 변이된 유전자를 세포에 그대로 둔 채 대사경로를 조절하여, 균주의 개량 및 생산성 향상에 한계가 있었다.

그러나 최근 여러 종류 생물체의 유전체 염기서열이 완전히 밝혀지고 이에 따른 post-genome시대 연구로 유전자의 기능분석 연구가 급진적으로 진행되고 있어 불필요한 유전자군의 탐색 및 선택적 제거를 통한 대사공학적으로 가장 효율적이면서 정확한 특성을 갖는 새로운 산업용 인공 균주의 개발이 가능해졌다. 본 연구에서는 현재 유전체 염기서열이 완전히 밝혀졌고 그 기능도 대부분 알려진 대장균의 유전체를 선택적으로 조절하여 주어진 대사여건에 불필요하거나 관여하지 않는 유전자군을 제거하고 유용 목표물질의 생산에 필요한 유전자군 만으로 구성된 최소화된 새로운 인공대장균을 개발하여 생물공학산업에 필요한 기반을 제공하고자 한다.

최소화된 새로운 인공대장균 개발을 위하여 주어진 환경에서 불필요한 유전자군을 DNA chip 및 protein chip을 이용하여 선별·확인하고, 이들을 Cre/loxP 및 Flp/FRT에 의한 site-specific recombination, I-SceI에 의한 double-strand breakage repair mechanism 및 homologous recombination을 이용하여 단계적으로 제거하여 크기는 최소화되었으나

생육에 저해가 없고 보다 향상된 기능을 갖는 새로운 인공균주를 개발하고자 한다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 대장균 생육 및 제 조건에서 특이적으로 발현되는 유전자의 선별 및 확인
  - 기존 *E. coli* database 검색으로 불필요 유전자 분류
  - DNA chip 이용, 대장균 유전자 검색
  - DNA chip을 이용, 영양배지 및 최소배지에서의 선택적 발현 유전자 및 단백질 선별
2. 새로운 세포 대사경로 설계 및 분석
  - 선택된 유전자중 제거 가능 유전자 선택·확인 및 새로운 대사경로 설정
3. 제거할 불필요한 유전자의 설정
  - 불필요한 유전자 제거용 primer 설계 및 제조
4. 불필요한 유전자군 제거에 필요한 다기능 벡터의 제조 및 이용
  - Cre/*loxP*, Flp/FRT를 이용, 선택적 유전자 제거용 벡터 제조 및 확인
  - Double-strand breakage repair system 이용 불필요 유전자 제거용 벡터 제조
  - 거대 유전체를 절단하기 위한 I-SceI 발현조절 벡터 제조
  - Markerless deletion을 위한 homologous recombination 시스템 관련 벡터 제조 및 negative/positive selection 벡터 제조
5. 대장균 불필요 유전자군 제거 및 확인 기술 개발
  - Deletion 부분의 확인과 선별용 marker 개발, primer 제조 및 벡터 제조
  - Screening에 필요한 제반 기술의 확립 및 가능성 검증
6. Transposon을 이용한 대장균 유전자 제거용 대장균의 genome library 제조
  - Transposon을 이용한 random targeting 수행. 불필요 유전자군 제거를 위한 marker를 지닌 수백 종의 대장균 genome library 구축
7. Transposon targeting 위치 확인
  - Transposon genome library의 targeting 위치 확인
8. 불필요한 대장균 유전체를 20%까지 축소 및 다양한 deletion mutant 제조
  - 대장균 생육에 불필요한 외래 유전자의 제거
  - 생물산업에 이용시 불필요한 혐기대사관련 유전자, LPS 및 flagella 관련 유전자 제거
  - 중복된 기능을 갖는 유전자 제거
  - 특정부위가 제거된 deletion mutant library 제조

- 대장균 4300여 ORF 중 860 ORF 제거

## IV. 연구개발결과

1. 생장에 불필요한 유전자군의 선별
  - 제거 가능 유전자 : Chemotaxis 및 이동관련 유전자, 외부유래 유전자, Paralogs
  - 제거 불가능 유전자 : 복제, 전사, 발현 관련 유전자, 필수영양소 전달 유전자, 세포구조 관련 유전자, ATP 및 환원력 생성 관련 유전자
2. 유전체의 일부를 선택적으로 제거시킬 수 있는 기술 개발
  - Cre-loxP system을 이용한 유전체 일부의 선택적 제거기술 개발
  - DSB(double strand breakage)를 이용한 유전체 일부의 선택적 제거 기술 개발
  - 도입된 외래유전자 marker가 남지 않게 유전체의 부분을 제거하는 기술 개발
  - Jumping transposon을 이용 유전체를 양방향으로 제거하는 기술 개발
3. Transposon을 이용, 유전체 최소화에 필요한 대장균 genome library 제고
  - Tn을 이용하여 loxP site를 유전체에 삽입한 library를 500여개 구축
  - E.coli mutant library를 이용하여 조합적 유전체 제거(combinatorial deletion)를 수행
4. 유전체 제거 부분 설정 및 제거에 필요한 targeting 벡터 제조
  - Cre/loxP, Flp/FRT 시스템 이용에 필요한 선택적 유전자 제거용 targeting 벡터 35 여개 제조 및 확인
  - Double-strand breakage repair system 이용한 불필요 유전자 제거용 targeting 벡터 10 여개 제조
  - Bacteriophage  $\lambda$  red system 이용한 거대유전체 부분 제거용 targeting 벡터 20 여개 제조
  - Markerless deletion을 위한 targeting 벡터 20 여개 제조
  - 유전체 양방향 제거용 벡터 15 여개 제조
5. 선택적 재조합과 E. coli genome library를 이용하여 대장균 유전체 크기를 20% 축소
  - 특정기능의 유전체 부분과 비특이적 기능의 유전체 부분을 여러 거대 유전체 조작 기술을 이용하여 제거하여 전체의 22% 제거

## V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구진이 개발하려고 하는 불필요 유전체가 제거된 인공균주는 생물공학 산업에

의 이용, 유전자의 기능 연구, 생물체의 진화연구에 기반이 되리라 예상이 된다. 그래서 우선 생물공학 산업에서의 이용과 관련해서는, 유전체 제거를 통해 만들어진 인공균주를 특허등록하고 국내 벤처회사나 기타 대사공학관련 회사에 기술 이전을 하여 유용한 물질의 생산에 이용하도록 한다. 그리고 생물화학공학 관련 연구진에게도 공급하여 타 연구에 이용하도록 한다. 그리하여 지금의 우리나라 발효산업의 국제경쟁력을 향상시키는데 도움이 되도록한다. 그리고 유전자의 기능연구 측면에서는 인공균주는 유전자의 기능을 다 알고 있으므로 다른 유전자를 이 균주에 첨가할 때, 변하는 기능을 통해 유전자의 기능을 연구할 수 있다. 진화에 대한 연구에 대해서도 최소 유전체라는 점을 바탕으로 하여 생물체 진화연구에 활용한다. 국내외 과학자들이 이용할 수 있도록 인공균주는 특허 등록을 한 후 우리나라의 균주 보급기관인 한국유전자은행(KCTC)에 보관하도록 하여 누구나 이용할 수 있도록 한다. 다만 산업적으로 이용할 경우에는 국내 산업을 위해서 특허를 이용한다.

# S U M M A R Y

## I. Title

Development of artificial microorganisms for future biotechnology

## II. Background

For the production of valuable biomolecules, many industrial microorganisms have been improved using conventional mutation methods and simple DNA recombination techniques. However, these approach have reached limitation in increasing the productivity of industrial microorganisms. During the course of evolution, the strains being used in the bioindustry have exogenously acquired many currently unnecessary genes, which were once needed for adapting to new environments, in addition to the genes needed for growth. The maintenance and expression of these unnecessary genes leads to excessive energy consumption and production of unneeded by-products, which in turn reduces the cost-effectiveness of the final product by decreasing the production efficiency of the microorganism and by complicating the purification process. Although the existence of these unnecessary genes was predicted, the strain improvement through gene manipulation has been limited by the lack of information on the sequences and functions of the genes. And, hence, metabolic engineering had to be accomplished by the reiterative trial and error process which resulted in simple mutations, but not the elimination of the unnecessary target genes.

The recent completion of genome sequencing of many microorganisms and post-genomic research are accelerating researches in functional genomics. Therefore, it is now possible to precisely identify, locate, and eliminate the unnecessary genes for metabolic engineering and obtain new strains with the highest production efficiency and desired characteristics. This research is aimed at engineering new microbial strains containing a minimal set of genes, which will lead to construction of artificial organisms with defined characteristics and higher production efficiency.

## III. Objectives

The objectives of this research are the construction of an artificial microbial strain containing a minimal genome, based on the completed genome sequence and functional genomics research of *E. coli*, and the application of the artificial strain for



the production of valuable biomolecules and functional studies of other genes.

The 1st stage sub-objectives are:

- (1) Identification and selection of genes that are non-essential for growth
- (2) Development of techniques for the selective deletion of genes from the genome
- (3) Construction of vectors for the targeting and deletion of the selected genes
- (4) Construction of an artificial microbial strain library by site-specific recombination and transposons.

The 2nd stage sub-objectives are:

- (1) Progressive deletion of the genome by using the artificial microbial strain library and construction of cross-hybrids
- (2) Development and characterization of the artificial strain containing a minimal genome
- (3) Introduction of metabolically useful exogenous genes into the artificial microbial strain
- (4) Mass production of useful biomaterials using the customized artificial microbial strains

## IV. Contents and Extent

1. Identification and selection of genes that are non-essential for growth
  - Selection of non-essential gene by searching *E. coli* databases
  - DNA chip analysis for *E. coli* genome
  - Selection of conditional expressed genes on rich and minimal media with DNA chip
2. Construction and analysis of new metabolic pathway
  - Identification and selection of genes that are removable and construction new metabolic pathway
3. Selection of deletion target genes
  - Design and generation of primers for deletion of non-essential genes
4. Construction of vectors for the selective deletion of genes from the genome
  - Construction of vectors for selective deletion with Cre/*loxP*, Flp/FRT system
  - Construction of vectors for deletion for non-essential genes with double-strand breakage repair system
  - Construction of vector for controlled expression of I-SceI to cut large genome
  - Construction of vectors for homologous recombination system used for markerless deletion and construction of vectors for negative and positive selection
5. Development of techniques for deletion and deletion confirmation of non-essential

gene clusters

- Development of markers, generation of primers, and construction of vectors for deletion region confirmation and selection
  - Establishment and confirmation of techniques for screening
6. Construction of genome library of *E. coli* for gene deletion by using transposon
    - Random targeting with transposon. Construction of hundreds kinds of *E. coli* genome library with marker for deletion of non-essential genes.
  7. Identification of transposon targeting position
    - Identification of transposon genome library targeting position
  8. Minimization of non-essential *E. coli* genome by 20% and construction of various deletion mutant
    - Deletion of foreign genes which are not essential for growth
    - Deletion of anaerobic respiration, LPS, and flagella-related genes which are not essential in industrial usage
    - Deletion of paralogs
    - Construction of deletion mutant library
    - Deletion of 860 ORFs among about 4300 ORFs

## V. Results

1. Selection of non-essential genes for growth
  - Removable genes : Chemotaxis and motility-related genes, horizontally transferred genes, and paralogs
  - Unremovable genes : Replication, transcription, and translation-related genes, essential nutrient transport-related genes, cell structure-related genes, and ATP and production of reduction potential-related genes.
2. Development of techniques for selective deletion of genome
  - Development of techniques for selective deletion with Cre/*loxP*, FLP/FRT system
  - Development of techniques for deletion for non-essential genes with double-strand breakage repair system
  - Development of techniques for markerless deletion
  - Development of techniques for bidirectional deletion using jumping transposon
3. Construction of genome library for genome minimization using transposon

- Construction of 500 library with *loxP* sites on the chromosome using transposon
  - Combinatorial deletion with *E. coli* mutant library
4. Construction of targeting vectors for selection and deletion of genome
    - Construction of 35 targeting vectors for selective deletion with Cre/*loxP*, Flp/FRT system
    - Construction of 10 targeting vectors for deletion for non-essential genes with double-strand breakage repair system
    - Construction of 20 targeting vectors for selective deletion with Bacteriophage  $\lambda$  red system
    - Construction of 20 targeting vectors for markerless deletion
    - Construction of 15 targeting vectors for bidirectional deletion
  5. Minimization of *E. coli* genome by 20% using combinatorial deletion of *E. coli* genome library
    - 22% minimization with specific and non-specific deletions, and various genome engineering techniques

## VI. Potential value

The idea of developing artificial strains was proposed in the past by several researchers but the implementation of the idea was not feasible due to the lack of data on the biochemical characteristics, genetic information, functional genomics, and genome manipulation techniques. With the complete genome sequencing of many microorganisms and the rapid development of new technological breakthroughs, such as DNA chips and proteomics, the foundation for the genesis of new artificial organisms has been established.

At the heart of the artificial strain development technology lies the selective deletion of non-essential genomic segments and insertion of exogenous genes using the new genome engineering techniques developed by our group. At the present stage, our research is focused on the development of a new artificial strain containing a minimal set of genes for growth and then application for the construction of customized strains. However, this system can also be applied not only to other microorganisms but also to animals and plants.

Therefore, this research contributes to both basic life science research and application research. The successful completion will lead to the development of new microorganisms that will revolutionize the bioindustry, which will elevate the domestic research level to world-class status and provide for a massive source of economic advantage.

# C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction / 13

Chapter 2. State of the art / 20

Chapter 3. Results / 23

Chapter 4. Achievements / 43

Chapter 5. Application plan / 49

Chapter 6. Foreign scientific information / 51

Chapter 7. References / 52

## 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 / 13
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황 / 20
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 / 23
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 / 43
- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 / 49
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 / 51
- 제 7 장 참고문헌 / 52

## 제 1 장

---

# 연구개발과제의 개요

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 개요

지금까지 인간에 필요한 생물 유래 유용물질을 대량으로 확보하기 위하여 돌연변이 및 유전자 조작 등을 통하여 개량된 미생물을 이용하였다. 그러나 현재 생물공학 산업에 사용되는 균주들은 성장에 필요한 유전자군 외에 진화과정에서 새로운 환경에 적응하기 위하여 외부에서 획득한 불필요한 유전자군을 많이 포함하고 있다. 이와 같은 불필요한 유전자 군의 유지 및 발현으로 세포내 에너지원이 과도하게 사용되고 필요없는 물질도 생산되므로 균주에 많은 부담을 주어 균주의 생산성이 크게 저하될 뿐 아니라 제품의 분리·정제의 효율도 낮아 생산제품의 경제성이 크게 떨어졌다. 지금까지는 불필요한 유전자군의 존재를 알고도 이들의 유전체상의 정확한 위치와 기능 등의 유전정보 부족으로, 시행착오적으로 변이된 유전자를 세포에 그대로 둔 채 대사경로를 조절하여, 균주의 개량 및 생산성 향상에 한계가 있었다.

그러나 최근 여러 종류 생물체의 유전체 염기서열이 완전히 밝혀지고 이에 따른 post-genome시대 연구로 유전자의 기능분석 연구가 급진적으로 진행되고 있어 불필요한 유전자군의 탐색 및 선택적 제거를 통한 대사공학적으로 가장 효율적이면서 정확한 특성을 갖는 새로운 산업용 인공 균주의 개발이 가능해졌다. 본 연구에서는 현재 유전체 염기서열이 완전히 밝혀졌고 그 기능도 대부분 알려진 대장균의 유전체를 선택적으로 조절하여 주어진 대사여건에 불필요하거나 관여하지 않는 유전자군을 제거하고 유용 목표물질의 생산에 필요한 유전자군 만으로 구성된 최소화된 새로운 인공대장균을 개발하여 생물공학산업에 필요한 기반을 제공하고자 한다.

최소화된 새로운 인공대장균 개발을 위하여 주어진 환경에서 불필요한 유전자군을 DNA chip 및 protein chip 등의 functional genomics 기술을 이용하여 선별·확인하고, 이들을 자체 개발한 DNA 재조합 기술을 이용하여 단계적으로 제거하여 크기는 최소화 되었으나 생육에 저해가 없고 보다 향상된 기능을 갖는 새로운 인공균주를 개발하고자 한다.

## 제 2 절 연구 개발의 필요성

### 1. 연구개발의 경제·사회·기술적 필요성

#### 가. 기술적 측면

Post-genome시대인 21세기의 생명공학 연구는 막대한 연구 자금과 자원, 인력을 투입하여 얻은 생물 유전체의 염기서열 분석결과와 유전자 기능연구를 수행하여 얻은 생물 유전체정보를 실제 생물 기초연구 및 생명공학산업에 어떻게 효율적으로 이용하여, 생명

현상을 규명하고 인간에 유용하게 이용하느냐에 연구의 핵심을 두고 있다. 인류의 질병 치료용 물질과 인류생활 및 건강에 유용한 물질 탐색 후에는 이들 물질을 최고급으로 대규모로 확보하는 것이 가장 중요하다. 이와 같은 유용물질을 대량으로 확보하기 위하여 동물 및 식물세포에 비해 발효공정에 유리한 미생물을 가장 많이 이용하고 있다. 그러나 미생물을 이용한 기존의 생물공학 방법도 미생물세포의 세포기작 및 유전체정보의 부족으로 인하여, 임의적인 돌연변이 유발과 부분적인 유전자 조작 및 발효조건 최적화 등을 통하여 생산량을 증가시키고 있어 생산성 증대에 한계에 도달하였다. 또한 현재 생물 산업에 널리 이용되고 있는 산업용 균주는 필요한 물질을 생산함과 동시에 불필요한 물질을 만드는 유전자군을 포함하고 있어 과도한 에너지 소모 등으로 유용물질 생산에 아주 비효율적이다. 따라서 미생물의 생산성을 획기적으로 증대시키기 위해서는 최근에 폭발적으로 밝혀지고 있는 유전정보에 근거하여 유용 미생물의 대사경로를 체계적으로 분석하여 불필요한 유전자군을 밝히고 이들의 유전체를 제거하여 새로운 고기능 대사공학용 균주 및 세포주를 인위적으로 구축하여, 이를 생물기초연구 및 유용물질을 대량생산하는 생물산업에 직접 적용해 생산성을 극대화시키는 새로운 기술이 필요하다.

## (1) 기술의 기반성

대장균의 유전체 염기서열 분석완료 및 유전자 기능 정보 축적과 본 연구진의 거대유전체 조작기술을 이용하여 개발된 최소화된 인공대장균은 생물산업제품 생산, 대상공학 연구, 산업용 균주 개량, 유전체 기능 연구, 유전체 진화연구 등의 전반에 걸친 연구에 중요한 기반이 되는 연구이다(그림 1).

### (가) 생물산업 및 대사공학에의 이용

최소 유전체를 지닌 인공 균주는 우리가 원하는 특정 물질의 생산에 관련된 유전자군만을 이용하여 목적하는 물질의 생산에 초점을 맞출 수가 있어 기존의 생산성과는 비교할 수 없을 정도의 수율을 가져올 수 있다. 그리고 원하는 유전자만이 발현되어 불필요한 물질의 생산이 억제되므로 유용물질의 생산연구에 들어가는 비용을 줄일 수 있을 뿐 아니라 분리 정제의 효율이 높아져 고급제품을 생산할 수 있다. 이 인공균주를 키우기 위해서 필요한 배지도 많이 줄어들어 경제적인 측면에서도 크게 도움을 줄 것이다. 또한 유용물질 생산에 관련된 정확한 대사경로 연구에 이용되어 최적의 대사경로를 구축하고 연구하는데 근간이 되는 균주로 이용될 수 있다. 즉 본 과제는 생물산업의 생산성 증대에 획기적인 전기를 갖고 올 수 있다.

### (나) 균주 개량

여러 생물체는 각자의 독특한 장점을 가지면서 진화해왔다. 인공균주는 특정목적(빠른



생장, 생성물의 세포 외로의 배출, 발효최적화 등)에 필요하게 만들 수 있다. 이런 최소의 필요 유전자를 지니고 있는 균주의 유전체에 다른 생물의 특이한 유전자나 유전체를 도입해 유용한 기능을 지닌 새로운 균주를 만들 수 있을 것이다. 그러면 자연에 존재하는 균주를 필요할 때마다 찾아야하는 필요가 없이 우리가 필요한 균주를 개량하여 이용할 수가 있을 것이다. 또한 본 기술은 다른 미생물이나 동·식물에 적용하여 새로운 종의 개발에 이용될 수 있다.

#### (다) 유전체 기능 연구(Functional Genomics)

최소 유전체의 인공균주는 유전체의 기능정보가 많이 알려질수록 개발하기가 용이하고, 기존에 연구된 유전자들의 기능정보에 바탕을 두고 만들어진다. 하지만 이 인공균주의 장점의 하나로는 유전체의 기능 연구에 피드백 효과를 가지고 있다는 것이다. 기존의 유전 정보를 바탕으로 하여 유전체의 제거를 통해 인공균주가 만들어지지만, 생장에 불필요한 불특정 다수의 유전자를 단계적으로 제거함으로써 이전에 숨어있던 기능이 드러나는 유전자도 있을 것이다. 그리고 유전체의 최소화 과정 중에 균주의 기능 변화를 봄으로써 유전자의 기능 연구에 추정치 아닌 가시적인 결과를 가져올 수 있을 것이다. 그리고 최소화된 인공균주에 제거된 유전자나 외부의 유전자를 도입하여 이들의 발현 연구를 통한 유전자의 기능 연구가 가능하다.

#### (라) 진화 연구(Evolution)

Bioinformatics를 이용한 진화연구는 여러 생물에 공통적으로 존재하는 유전자들을 염기 서열이나 아미노산 서열의 공통성을 비교하여 각 생물체가 어떻게 진화해 왔는지 연구하는 것이다. 그러나 이 연구의 문제점은 단순히 유전자의 조그만 부분의 공통성으로 그 전체 유전자의 특징을 결정지어 버리려고 하는 것이다. 즉 서로의 공통점을 바탕으로 하여 유전자의 기능을 추정해 진화에 대해 연구하는 것이다. 본 연구를 통하여 만들어지는 인공균주는 특정 목적에 최적화된 유전자의 조합을 지니고 있게 만들 수 있을 뿐 아니라 생장에 필요한 최소의 유전자만으로 이루어진 균주를 만들 수 있을 것이다. 그렇다면 이 균주는 진화의 초기의 생물에 가까울 것이고 이 인공균주를 바탕으로 하여 미생물 진화 과정에 대하여 조금 더 정확하게 연구를 할 수 있을 것이다.

### (2) 기술의 핵심성

유전체 기능 분석 및 유전체 정보를 이용하여 유전체의 불필요한 부분을 선택적으로 제거하여 간단하고 잘 정의된 성질을 지니는 최소의 유전체를 지닌 새로운 인공균주를 만들어, 불필요한 대사경로를 제거해 유용한 물질의 생산에 필요한 대사적 에너지를 모으고 불필요한 물질의 생산을 줄여 유용물질을 경제적으로 대량생산할 수 있는 연구는 21

세기 post-genome 시대의 꼭 필요한 핵심이 되는 중요한 연구이다. 지금까지는 유전자기능 정보부족으로 필요한 유전자군과 불필요한 유전자군의 구별이 불가능했으나 최근에 완성된 유전체 염기서열 분석과 이에 따른 유전체 기능연구로 선택적으로 필요한 유전자군만 남기고 불필요한 유전자군을 제거할 수 있게 되었다. 불필요한 유전자군의 확인을 위해서, 개발되어 상업적으로 이용 가능한 대장균 DNA chip을 이용하여 주어진 제반 발효조건에서 대장균 성장에 불필요한 유전자군을 선별하고, 불필요한 유전자군을 선택적으로 제거하기 위해서는 본 연구팀이 개발한 Cre/loxP 및 Flp/FRT-mediated site-specific recombination 방법과 I-SceI mediated double-strand breakage repair 방법 및 P1 phage transduction 등을 복합적으로 이용한다. 이들 방법을 복합적으로 이용하기 위하여 수십 종류의 Targeting Vector와 Screening 방법이 필요한데 일단 원하는 유전자의 효과적인 단계적 제거 기술이 확립되면 이 기술은 다른 미생물 뿐 아니라 동·식물에도 적용될 수 있는 생물산업 전체의 핵심기술이다.

본 연구팀은 지난 6년 간 Cre/loxP, Flp/FRT를 이용한 site-specific recombination을 이용하여 대장균에서 50-100kb의 유전체 조작을 분리하고 이를 원형의 DNA 상태로 세포 내에서 수십 배 증가시키는 기술을 개발하였고 이를 yeast에도 적용하여 2편의 해외 논문도 발표하며 인공균주 개발 관련 기본적인 기술을 축적하였다.

본 기술은 생물공학에 의한 유용물질 생산과 발효 등에 필요한 새로운 최적 인공균주를 개발하는 것이 주목적인데 현재까지 본 연구를 수행한 곳은 전세계적으로 없고 본 연구실만 지난 5-6년간 대장균 유전체의 염기서열 결정과 기능연구가 완료되기를 기다리며 기초 실험을 수행하여 왔고 현재는 본 과제를 수행할 최적이라고 생각된다. 조금이라도 늦게 시작하면 해외에서 본 연구팀을 초월하여 조기 완료가 가능한 과제이다. 본 과제는 현재 관련 기술의 발전과 본 연구실의 축적된 기술 그리고 전세계에서 속속들이 밝혀지는 Functional Genomics 정보를 이용하므로 성공 가능성이 매우 높고, 성공 시 그 효과는 생물공학의 유용물질 대량생산 분야에 큰 혁명적인 일이 될 것이며 또한 이를 전세계 생물공정 관련 분야에 널리 적용될 수 있고 한국의 생물공학 수준을 한 단계 도약시킬 수 있는 유용한 연구분야이다.

지금까지는 유전자 재조합 기술과 대사흐름조절 기술 그리고 돌연변이 이용 기술을 숙주 균주 개량에 적용하였을 때, 숙주 균주의 유전체 정보의 부족으로 인하여 예측하지 못했던 대사 산물이 나오거나 생산량이 적거나 생산 이후의 분리가 어려운 문제점이 있다. 그러나 새로 밝혀진 유전체 기능정보와 그 분석기술을 이용하면 그 기능을 명확히 아는 숙주 균주를 제조하여 우리가 원하는 물질을 정확하게 생산할 수가 있게 된다(그림 2).

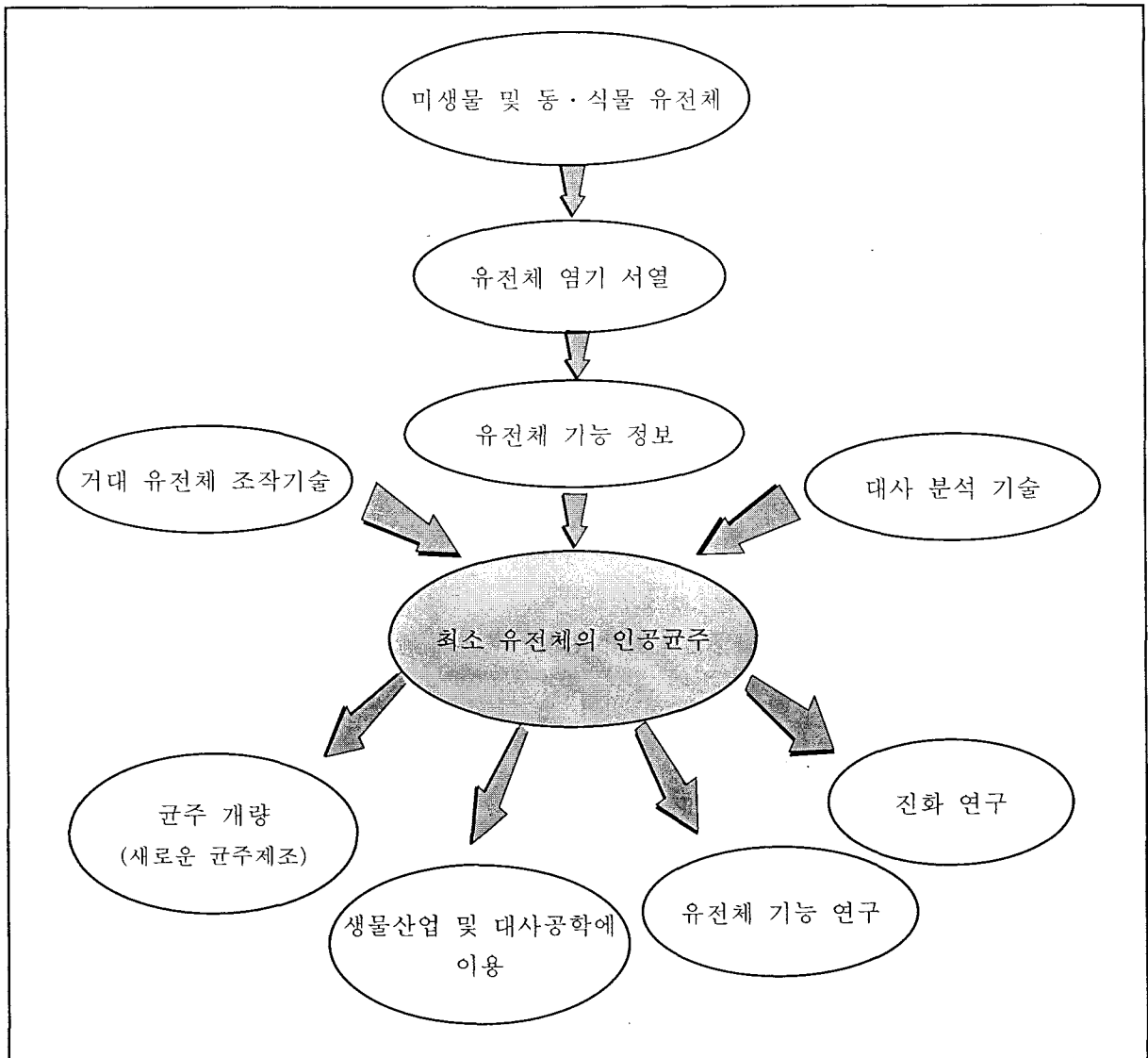


그림 1. 인공균주 구축 및 이의 응용

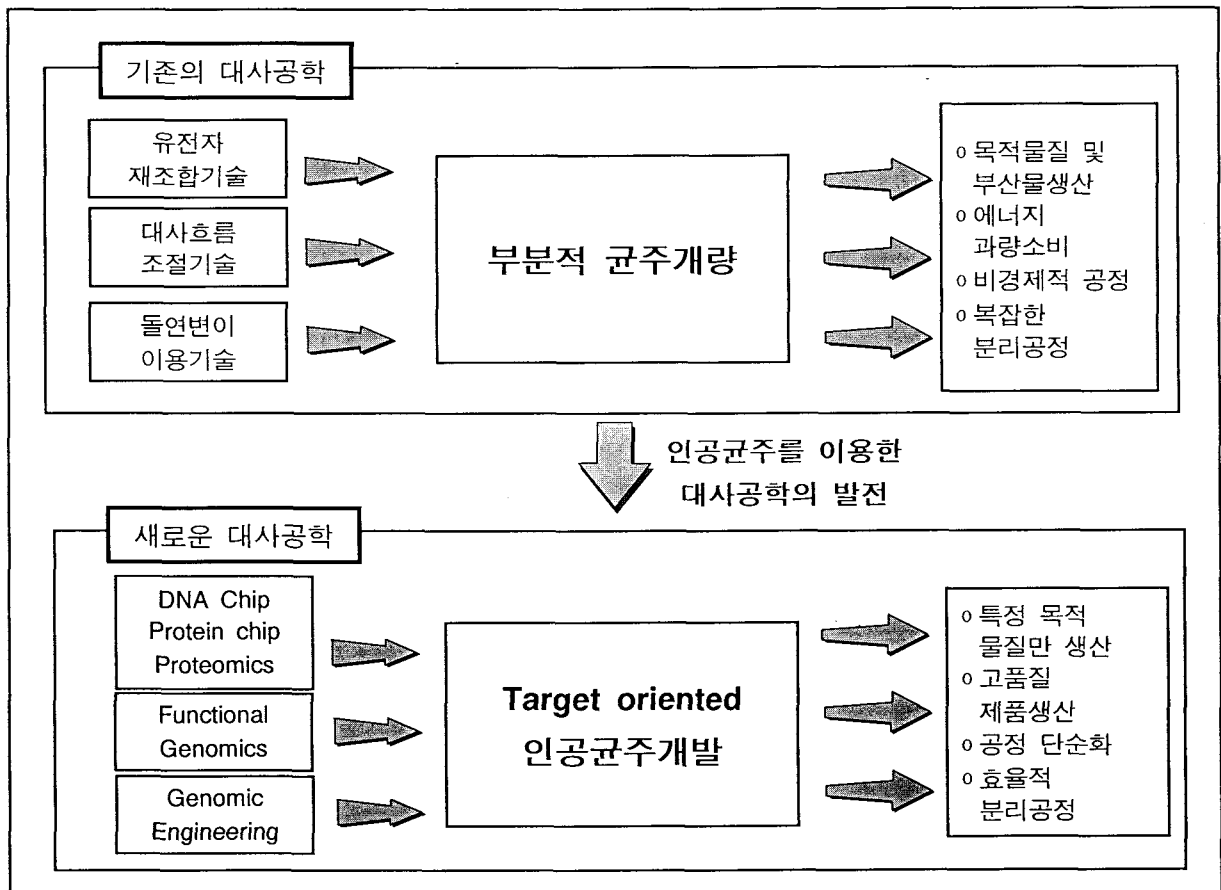


그림 2. 인공균주를 이용한 대사공학의 새로운 발전 및 변화

## 나. 경제·산업적 측면

현재 생물공학적인 방법에 의한 유용물질 대량생산에 이용되는 산업용 균주는 이들의 유전체의 염기서열 분석이 완료되기 전에 재래적인 돌연변이 방법이나 초기의 유전자 조작 기술을 이용하여 부분적 또는 시행 착오적 방법에 의하여 개발된 균주들이다. 대사경로에 필요한 유전자 외에 불필요한 유전자를 그대로 두고 균주를 개발하여 경제성이 크게 떨어진다. 즉 불필요한 유전자가 존재함으로써 이들의 복제, 전사, 발현 등에 많은 효소, 조효소, 에너지 등이 소비되어 공급되는 배지의 상당부분이 불필요한 물질 생산에 이용되므로 유용물질 생산 효율 저하는 물론이고 이들을 분리 정제할 때 불필요한 단백질 및 대사물질이 공존하여 분리 정제를 어렵게 하여 유용물질의 회수율도 크게 저하되게 된다. 그러나 본 연구팀이 개발하게 되는 최소 최적 인공균주는 불필요한 유전자의 제거로 불필요한 물질의 생산을 줄여 생산성을 높이고 분리 정제를 효과적으로 할 수 있게 할 뿐만 아니라 균주의 크기 축소로 발효용 발효조의 제반 공정 개발의 단순화에 기여하게 되어 생산단가를 크게 낮추고 제품의 품질을 높일 수 있다. 따라서 개발된 인공균주를 이용하면 생산한 유용물질의 순도를 높일 뿐만 아니라, 생산 원가가 낮고 제품의 생산성이 높아 해외 수출 시 가격 경쟁력을 높여 많은 경제적 이득을 얻을 수 있다. 뿐만 아니라 본 과제 수행중 축적된 기술을 다른 생물 즉 동·식물에 적용할 수 있게 되어 생명공학 기술의 공통기반 기술확보에 크게 기여할 수 있고 이들 기술을 국제특허를 내거나 해외기술과 Cross-licensing을 통하여 국내 생물산업 보호에 크게 기여할 수 있다.

## 다. 사회·문화적 측면

생물공학이 인간에게 가장 중요한 연구 분야중 하나인 이유는 인간에 필요한 수많은 유용물질을 생물체에서 탐색하게 하고 이를 값싸게 대량으로 인간에게 공급하게 하며 인간을 질병, 기아, 환경 등의 문제로부터 해방시켜줄 수 있기 때문이다.

이를 위해서는 생물공학제품의 대량생산에 널리 이용되는 미생물의 끝없는 개량이 필요하다. 지금까지의 방법의 한계성을 극복한 한 차원 높은 인공균주를 개발하기 위하여 Post-genome 시대의 functional genomics를 이용한 본 연구는 유전체 등의 복잡한 과학을 일상생활권으로 끌어들이 과학의 결과를 인간의 사회·문화적 생활 향상에 기여할 수 있다. 인간의 지식을 이용한 새로운 생명체의 제조 가능성과 이의 유용성에 대하여 일반인들에게 일깨워주어 과학의 중요성과 함께 생명체 신비에 대한 경외감을 갖도록 할 수 있다. 본 연구결과를 이용하여 필요한 물질을 고품질로 값싸게 대량으로 인간에게 공급할 수 있게되어 질병, 기아, 환경 등의 문제에서 해방되게 하여 보다 풍요롭고 건강한 인간적인 삶을 누릴 수 있다.

## 제 2 장

---

# 국내외 기술개발 현황

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국외 기술 동향 및 수준

유전체를 거대분자 형태로 분리하는 기술은 미국 위스콘신대학의 Szybalski (*Gene*, 1993)에 의하여 처음 제안되었고, 헝가리 국립과학연구소의 Posfai(*Nucleic Acids Research*, 1994)에 의하여 거대 유전자를 자체 숙주 내에서 증폭하는 방법이 개발되었다. 그러나 이들은 유전체 염기서열 분석을 보다 정확하게 하기 위해 시도했지 새로운 인공균주를 만들고자 하지는 않았다.

전세계적으로 새로운 인공 균주의 개발은 아직 수행된 적이 없으나, 1999년 미국의 유전체 연구재단(The Institute for Genomic Research, TIGR)의 크레이그 벤터(Craig Venter) 박사가 사람의 폐와 생식기에 살고있는 무해한 박테리아인 마이코플라즈마 게니탈리움(*Mycoplasma genitalium*)을 이용하여 새로운 박테리아의 합성을 앞으로 10년 내에 완성하겠다고 밝혔다. Craig Venter는 지구상에 알려진 것 중 유전자의 숫자가 가장 적은 마이코플라즈마 게니탈리움의 480개 유전자 중 생명유지에 필수적인 약 300여 개 유전자의 기능을 명확히 밝힌 뒤, 인공세포질 속에서 이들 필수 유전자를 이용하여 염색체를 합성하여 새로운 종류의 박테리아를 창조하고자 한다고 하였다.

현재의 연구단계는 기존의 유전자를 하나씩 파괴함으로써 실험실의 조건에서 살아가는데 필요한 최소의 유전자를 밝히는 연구를 수행하는 중이다. 따라서 현재는 알려지지 않은 유전자의 기능연구를 수행함과 동시에, 필요한 유전자군을 모아서 새로운 균주를 만드는 일을 계획하고 있어, 새로운 인공균주의 제조에는 상당한 시간이 걸릴 것으로 생각된다.

앞서 언급한 마이코플라즈마를 이용한 방법을 제외하고는 전체 유전체를 이용하여 새로운 박테리아를 만드는 연구는 진행되고 있지 않다. 그 이유는 유전체 기능 연구에 따른 축적된 유전체 정보 없이는 새로운 인공균주 개발이 불가능했기 때문이다.

### 제 2 절 국내의 기술동향 및 수준

국내에서는 지금까지 어떤 대학이나 연구소, 기업체에서 염기서열 분석을 통해 알려진 유전 정보를 이용하여 새로운 균주를 만들려는 연구를 수행하고 있지 않다. 다만 대사공학적인 목적으로 외래유전자를 재조합 DNA기술을 이용하여 형질도입, 형질전환하여 균주를 개량하거나 대사경로를 조절하기 위한 불필요한 유전자 적중(knock-out) 실험을 하고 있다.

본 연구진이 인공균주 제조에 필요한 기초연구를 하여 지난 5년간 대장균과 효모의 유

전체를 거대분자 형태로 선택적으로 제거하고 증폭시킬 수 있는 기반기술을 확보하였고 (*Genetic Analysis*, 1998; *Gene*, 1998), 현재는 인체세포에 적용하는 연구를 수행중이다. 따라서 본 연구팀이 국내에서는 유일하게 유전체를 거대분자형태로 임의로 조작할 수 있는 기술을 보유한 팀이다. 국내외 많은 연구진들이 본 연구진의 기반 기술을 전수 받아 왔으며, 현재 본 연구진의 유전체 거대분자 조작기술은 국제적 수준이다.

따라서 선진국도 아직 시도하지 않은 선도적인 대사공학용 인공균주의 개발기술을 확고히 하여 새로운 인공균주를 개발하고 이를 국제적인 수준의 국내 발효기술을 이용하여 대사공학적으로 이용을 한다면 선진국보다 앞서는 기술개발로 국내외의 생명공학 산업에 크게 기여할 것이다.

### 제 3 절 현 기술상태의 취약성

인간에게 유용한 물질을 생산하는 차세대 분야인 생물공학산업에 이용되고 있는 숙주 균주의 경우 그 특징이 명확하지 않고 유용물질의 생산에 있어서 불필요한 대사산물의 생성과 유용한 물질의 분리·정제의 어려움과 같은 여러 문제를 가지고 있다. 앞으로의 생물공학산업의 발전을 위해서는 목표물질의 생산에 부합되는 새로운 인공균주의 개발이 절실하다. 인공균주 개발에 필요한 거대유전체 조작기술과 유전체기능 분석연구는 현재 초보 단계이고 단편적이다. 그러므로 이들을 복합적으로 연결시켜 새로운 유전체를 만들어 우리가 원하는 특정물질을 대량으로 생산해줄 새생명체를 만드는데 이용할 수 있어야 한다.

본 연구에서는 현재 단편적으로 개발되고 있는 유전체조작 및 분석기술을 총체적으로 결합시키고 현재 계속 연구되어 많은 결과가 발표되는 유전체기능 연구정보를 적극 활용하여 새로운 인공균주를 개발하고자 한다.

### 제 4 절 앞으로의 전망

인공균주 개발은 그간 여러 학자에 의해서 제안이 되었으나 이를 위한 미생물의 생화학적 연구 부족과 생물체의 유전 정보 및 거대 유전체 조작 기술의 부족으로 연구를 하지 못하였다. 21세기에는 DNA chip과 Functional Genomics를 비롯한 새로운 여러 분야의 급속한 발전으로 인공 생물체 제조에 대한 모든 제반 조건이 갖추어졌다고 하겠다.

본 연구진이 개발하고자하는 대사공학용 인공균주 개발기술의 핵심은 유전체의 불필요한 부분을 선택적으로 제거하거나, 외부로부터 필요한 유전자군을 도입하여 새로운 생물체를 만들어 내는 기술로써, 현재 기술은 대장균에 국한시켜 개발할 예정이나 본 연구진의 기술은 다른 모든 유용미생물 뿐 아니라, 동·식물에도 적용할 수 있는 생물산업의 가장 핵심적인 기반 기술로 생명공학 전 분야에 널리 이용될 수 있다.

또한 인공균주 개발은 현재 활발히 진행되고 있는 DNA chip 및 Proteomics기술을 이용하여 관련 대사경로를 정확하게 규명하고, 이를 산업에 응용할 수 있으므로 DNA 및



Protein chip 개발이나 대사공학 관련 연구에 직접 이용될 수 있다.

따라서 본 기술은 기초연구 뿐 아니라 전세계적 생물산업에 이용될 수 있고, 본 연구의 성공적인 수행은 새로운 인공균주의 개발을 가능케 하여 생물산업에 일대 혁신을 가져올 수 있어, 국내의 생명공학 연구수준을 국제적 수준으로 충분히 도약시킬 수 있고 본 연구의 원천적 기술을 전세계에 공급하여 막대한 경제적 이득을 도모할 수 있다.

## 제 3 장

---

# 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구방법에서는 대장균 유전체의 기능연구와 미생물 비교유전학(comparative microbial genomics)을 토대로 대장균 성장에 불필요한 유전자들을 선별하고 이를 제거하기 위한 유전체 조작기술(genome engineering technique)을 개발하여 단계적으로 대장균 유전체를 축소시켜 새로운 맞춤형 생명공학 균주를 개발하고자 다음의 방법을 사용하여 연구를 수행하였다.

### 제 1 절 대장균 생육에 불필요한 유전자 선별 및 확인

#### 1. DNA chip를 이용, 특정조건하에서 유전자의 발현 여부 조사

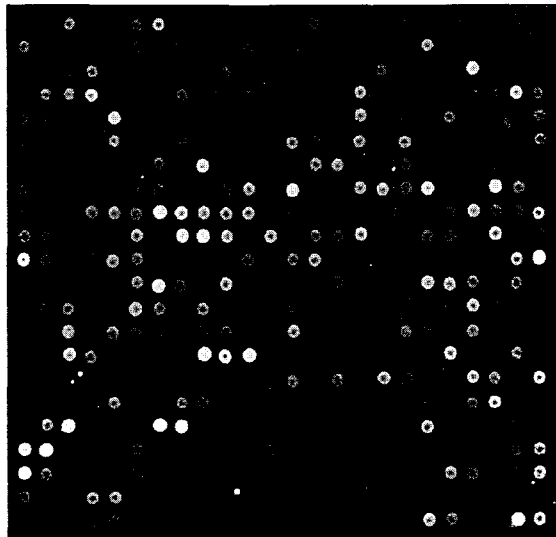
대장균의 약 4300여개의 모든 ORF를 정렬 고정화한 DNA chip과 미생물 기능연구 결과를 토대로 대장균 내에서 불필요한 유전자 군을 선별하였다. 이 실험에서 chip 상의 DNA와 결합반응을 할 probes는 대장균을 주어진 특정조건하에서 배양한 후 이들의 mRNA를 추출하고, 각각의 ORF를 인지하는 primers를 이용하여 각각의 ORF에 상응하는 cDNA 조각들을 합성하여 사용하였다. Hybridization반응 후 발색도와 차이를 DNA chip scanner를 이용하여 알아내고 DNA chip analysis program을 이용, 발현된 유전자군과 발현되지 않은 유전자 군을 분석하여 알아내고 발현된 유전자군 중에서도 그 발현 정도를 비교, 분석하였다. 본 실험은 *E. coli* DNA chip을 제조하여 공급하는 일본 Takara 사에 직접 방문하여 연구를 수행하였다.

#### 2. 영양배지 및 최소배지에서 선택적 발현 유전자 탐색

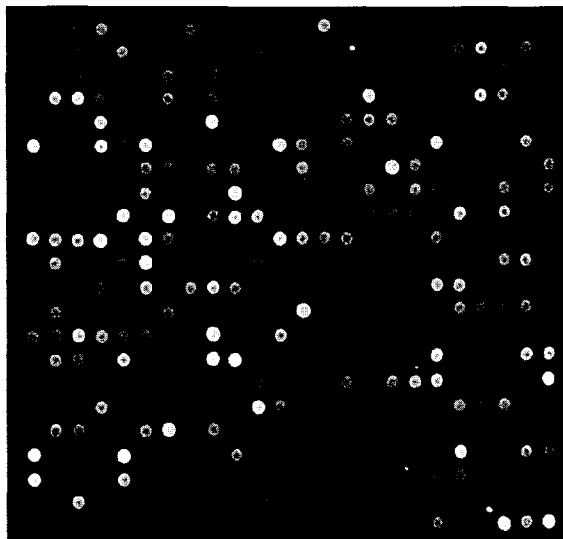
대장균을 LB 영양배지와 최소배지(M9또는 M63)의 두 배지조건 하에서 0.2% 포도당을 첨가하고 흡광도 600에서 0.6의 값이 될 때까지 배양하였다. 이렇게 배양된 대장균을 DNA chip process를 거쳐 각각의 두 배지조건에서 발현되는 유전자군과 발현되지 않는 유전자 군을 탐색하였다. 또한 대장균의 성장단계별로 발현되는 유전자 군을 비교·분석하였다(그림 3).

#### 3. 제거하고자 하는 유전체군 선택

미생물 유전체 분석 Database와 상기의 결과들을 바탕으로 제거되어야 할 유전자를 선별하였다. 우선적으로 최소배지 내에서 발현되지 않은 유전자군 들은 대장균의 성장이나 유용물질의 생산에 지장이 없을 것으로 간주되므로 제거대상 유전자 군으로 선별하였다. 또한 영양배지 내에서 발현되지 않는 유전자들도 제거대상으로 간주하고 이중 최소배지의 그것과 비교하여 제거대상 유전자 군을 선별하였다. 대장균의 stationary phase에서 발현되거나 생물 유용물질 생산에 장애가 되는 유전자를 아래그림 4의 internet site를 이용하여 제거대상 유전자를 선택하였다.



A. Exponential phase



B. Stationary phase

그림 3. DNA chip 분석 결과 (성장에 불필요한 유전자 탐색 LB배지와 M9배지)

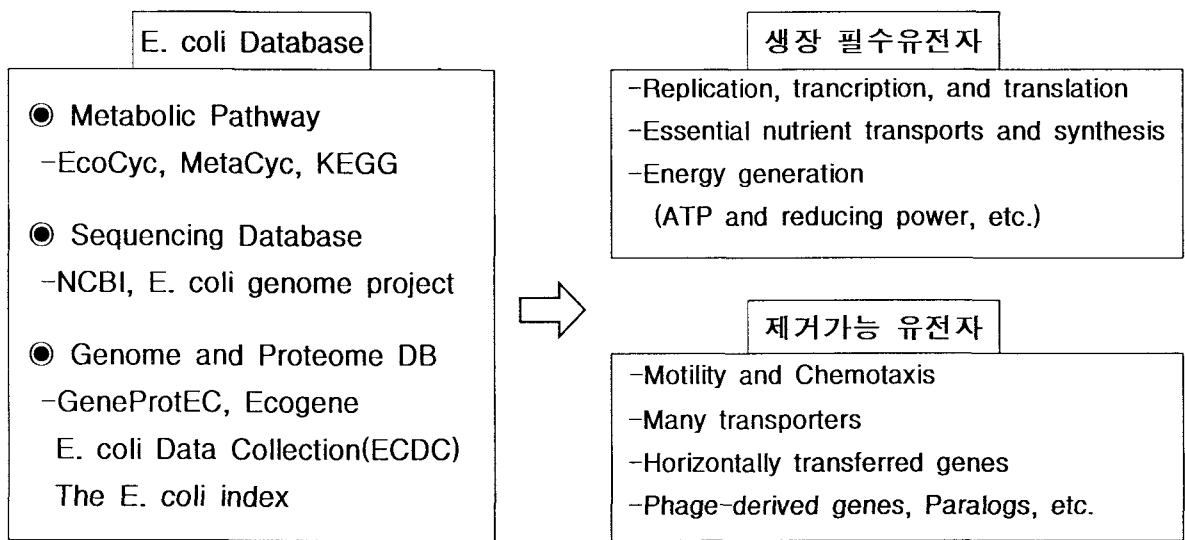


그림4. 제거대상 유전자 선별을 위한 대장균 Database

## 제 2 절 유전자군 선택적 제거기술 개발 및 Targeting 벡터제조

### 1. Cre-loxP 및 Flp/FRT excision system을 이용한 유전자 제거에 필요한 벡터제조

박테리오파지 P1에서 유래된 Cre/loxP site-specific recombination system은 여러 생물체에서 작용하는 system으로, 두개의 순방향의 loxP site 사이의 DNA fragment를 Cre protein이 작용하여 그 부분만을 절단하게되는 효과적인 DNA deletion system이다. 이를 위해 loxP site는  $\pi$  라는 특정 단백질이 있어야 복제할 수 있는 자살벡터(suicide vector)를 사용해 대장균의 유전체 내로 insertion하였다. 그리고 특정온도(30°C)와 tetracycline에 의해 Cre의 발현을 조절하는 벡터를 제조하였다. 그리하여 원하는 조건에서 Cre를 유도해 대장균의 유전체의 두개의 loxP 사이 부분을 제거하였다. 효모에서 유래한 Flp/FRT 시스템도 Cre/loxP 시스템과 같은 작용 원리를 지니고 있어 같은 방식으로 벡터를 제조하였다(그림 5).

### 2. I-SceI을 이용한 Double Strand Breakage(DSB)를 통한 유전체 제거

대장균 내의 제거하고자 하는 유전체의 양끝부분의 염기서열 일부를 I-SceI recognition site를 포함하고 있는 targeting 벡터 부위의 양쪽에 cloning하였다. 그리고 I-SceI site를 인지 및 절단하여 DSB를 형성하게 하는 제한효소 I-SceI을 벡터에 cloning한 후 대장균 내로 도입시켜 발현하였다. 발현된 I-SceI이 I-SceI 인식부위에 작용하여 DSB를 형성하게 되면 targeting된 유전체 부분이, cloning해서 도입한 동일한 유전체 부분과 recombination을 일으켜 선택된 부위가 제거되도록 하였다(그림6).

### 3. Markerless deletion에 의한 선택적 유전자군의 제거

대장균 유전체 조작 후 남아있는 항생제 저항 유전자 등의 외래 유전자를 제거하기 위하여, targeting 벡터를 제조하여 positive/negative double selection을 이용하여 외래 유전자없는 markerless deletion을 수행하였다. 제거대상으로 선택된 양끝의 유전자 각각을 PCR을 이용하여 그 일부를 자살벡터에 cloning하였다. 이때 이 두DNA fragment사이에는 하나의 selection marker를 함께 cloning하였다. 이러한 targeting 벡터 역시  $\pi$  protein의 발현이 있어야 증폭할 수 있는  $\gamma$ -ori를 가지고 있는 자살벡터이다. 따라서  $\pi$  단백질을 발현할 수 있는 온도민감성 자살벡터를 targeting벡터와 함께 도입하였다. 그러면 제거대상으로 선택된 양끝의 유전자와 homologous recombination이 일어나 선택된 유전체 부분을 제거시킬 수 있었다.

### 4. Bidirectional deletion을 통한 유전체 제거

대장균의 유전체의 임의 위치에 Tn $\gamma$   $\delta$ 의 전위효소 인식 부위 사이에 Cm<sup>R</sup> 유전자를 지니고 있는 DNA 단편을 Tn5 전위를 이용하여 삽입한다. 그 후 Tn $\gamma$   $\delta$ 의 전위효소를 온도 민감성 벡터를 이용하여 발현시킨다. 그러면 전위효소가 인식부위를 인식하여 유전

체의 좌우 방향으로 진행하면서 유전체를 제거한다. 이때 유전체 제거 여부를 쉽게 판별하기 위해서, Tn $\gamma$   $\delta$ 의 전위효소 인식 부위의 양 바깥쪽에 음성적 선별마커인 *sacB* 유전자와 *tetR* 유전자를 위치시켰다. 이와 같은 방법으로 양방향으로 유전체를 제거하여 sucrose와 kanamycin을 함유한 선택배지에서 성장하는 것을 선택했다. 이때 유전체의 제거된 부위에 있는 유전자들은 생장에 필수적인 것이 아니므로 생장에 필요없는 유전자들이 제거된 대장균의 유전체를 제조할 수 있었다(그림7).

#### 5. 유전체의 제거 확인과 선별용 marker개발

선택된 부분의 유전체가 제거된 대장균은 일차적으로 selection marker에 의해 선별된다. 이때 사용되어질 수 있는 selection markers로는 Cm<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, GFP(green fluorescent protein), 그리고 수종의 온도민감성 벡터를 제조하여 이용한다. 제거되어진 유전체 부분의 확인은 유전체 부분의 염기서열을 바탕으로 제작된 primer를 가지고 multiplex PCR를 수행함으로써 확인하고 다른 유전자의 발현에 미치는 영향을 DNA chip을 이용하여 분석하였다.

#### 6. Tn5을 이용한 random targeting으로 유전체 제거용 대장균 genome library구축

불필요한 유전자를 보다 효과적으로 짧은 시간에 대규모로 제거하기 위한 수단으로 대장균 유전체내에 *loxP* site를 무작위로 여러군데에 임의로 targeting하여 대장균 genome library를 구축하고 targeting된 곳의 위치를 확인하였다(그림 8). Transposase가 인식하는 transposon insertion sequences의 사이에 selection marker와 함께 *loxP* site를 cloning하였다. Cloning된 DNA 단편은 *in vitro*상에서 transposase와 반응하고 Mg<sup>2+</sup>가 존재하는 환경에서 대장균 내로 electro-transformation하여 유전체의 임의의 자리에 삽입하였다. Tn5에 의해 *loxP*가 삽입된 mutant 수백종을 선택하고 DNA sequencing으로 삽입위치와 *loxP*의 방향을 확인하여 500여종의 *E. coli* genome library를 구축하였다(그림 9, 10).

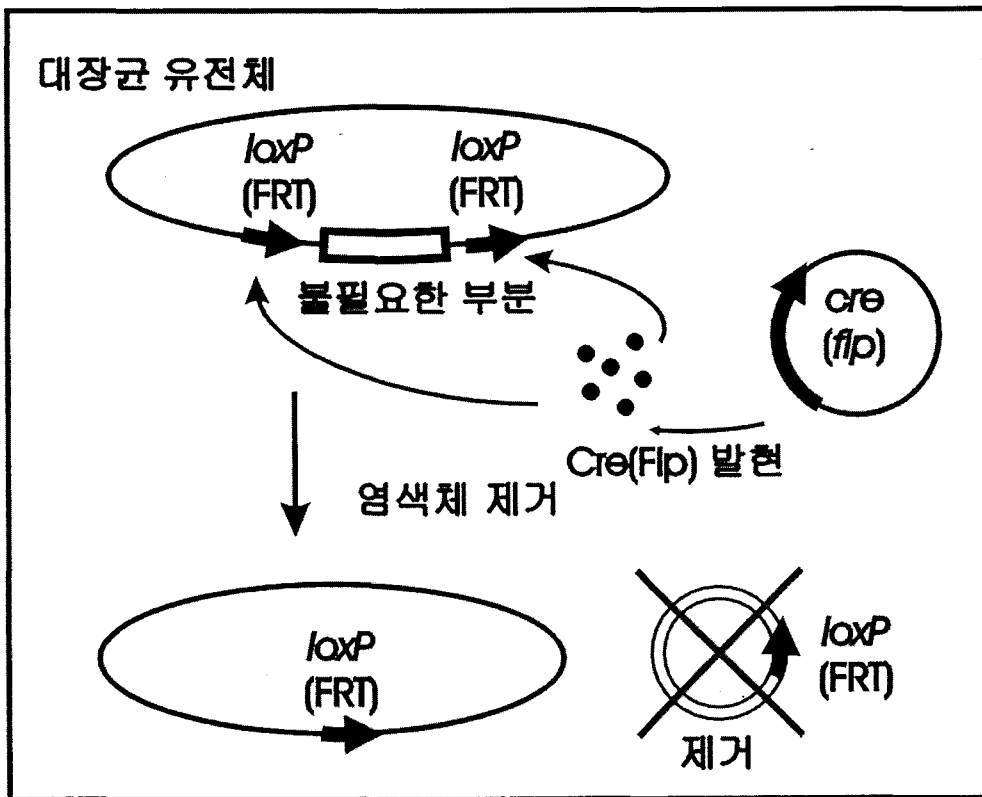


그림 5. Cre/*loxP* and Flp/*FRT* recombination



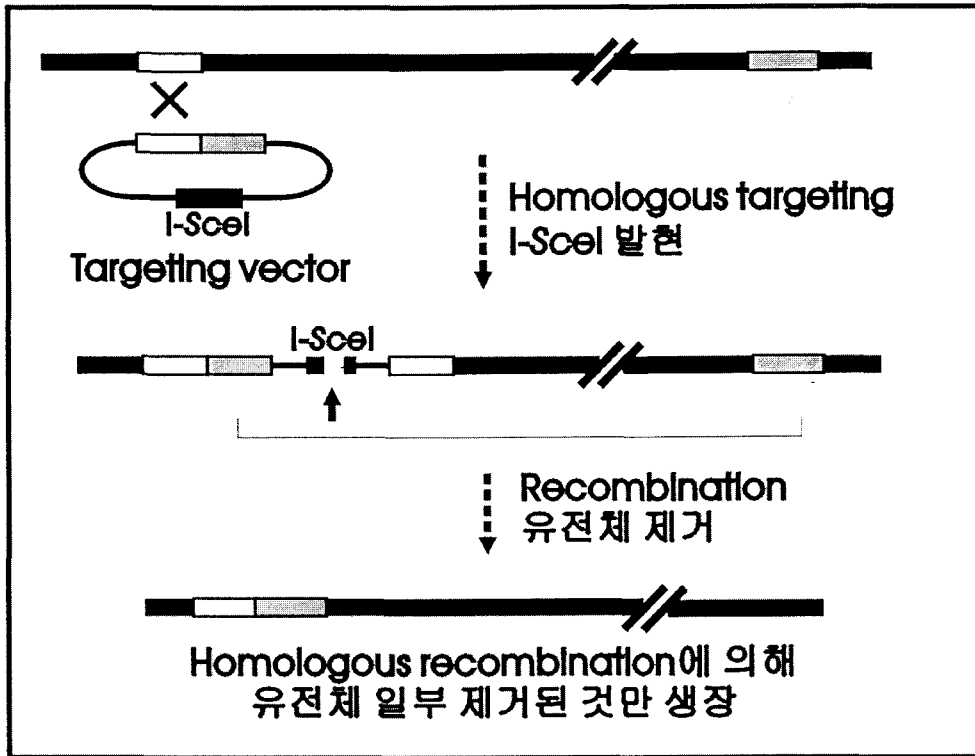


그림 6. I-SceI을 이용한 Double strand breakage

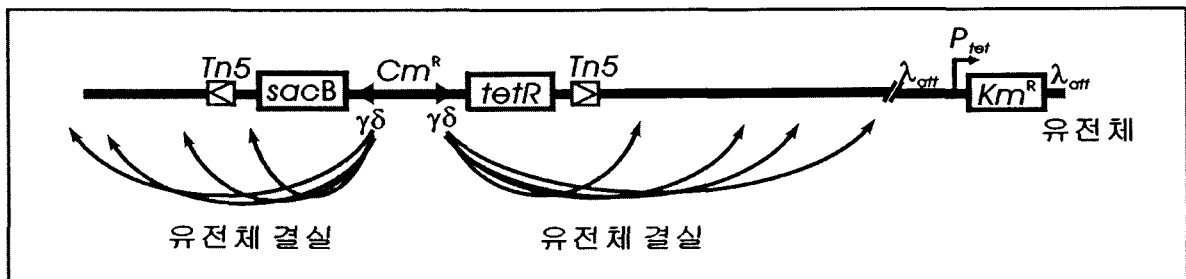


그림 7. bidirectional deletion을 통한 유전체 제거

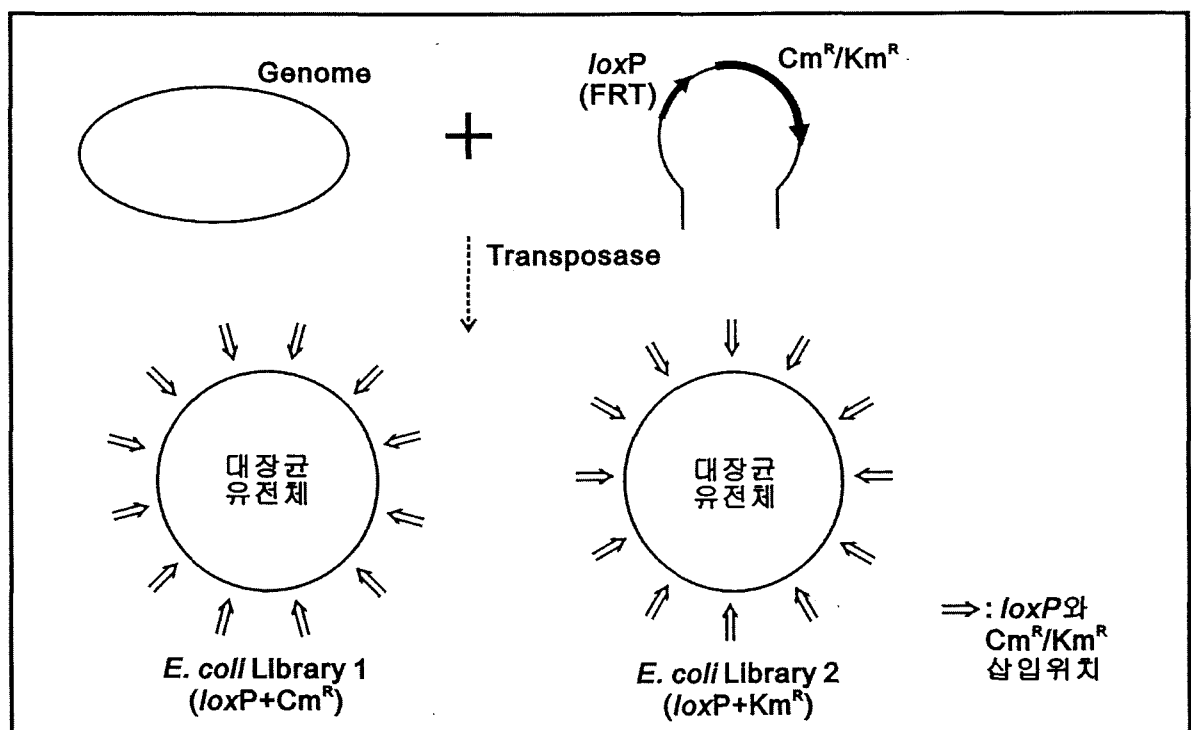
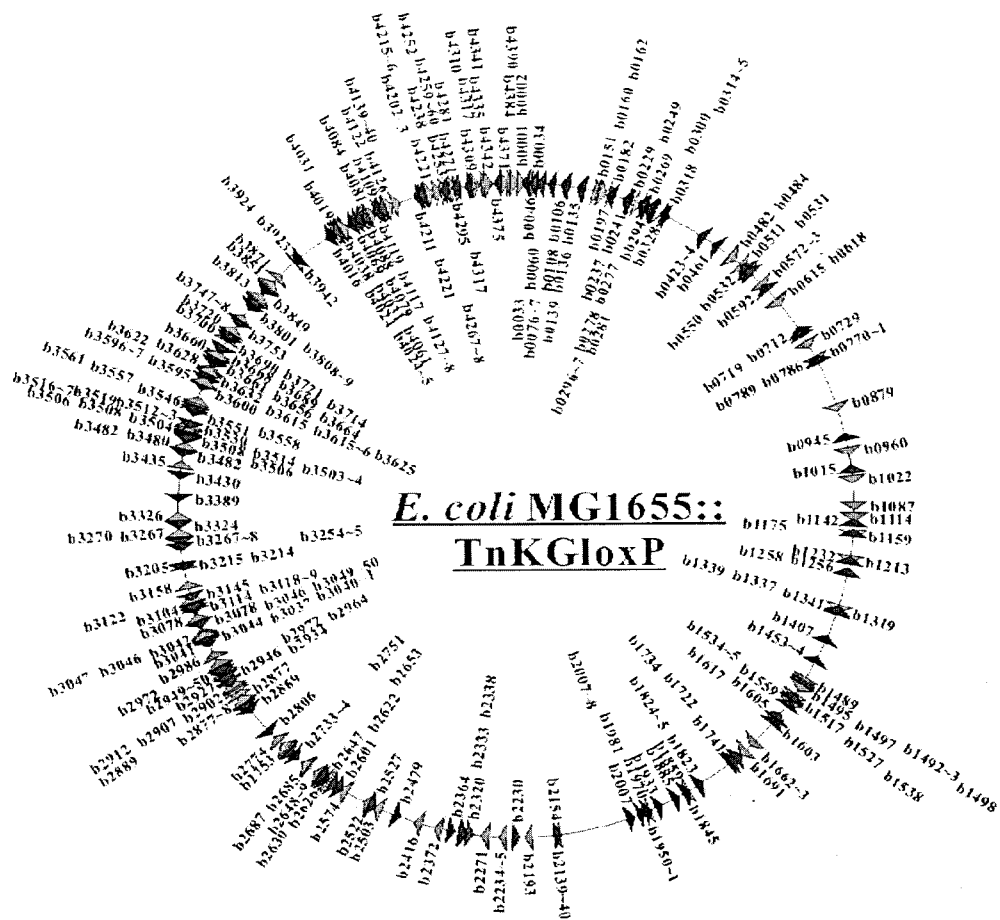


그림 8. Transposon을 이용한 *loxP*와 Cm<sup>R</sup>/Km<sup>R</sup>가 무작위로 *E. coli* genome에 삽입된 library 구축



*E. coli* genome library 1 (*loxP*+*Cm<sup>R</sup>*)

그림 9. 대장균 유전체에 *loxP*를 포함하는 Tn5가 삽입된 library의 삽입 위치도 1 (TnKGloXP: Tn5에 *Km<sup>R</sup>*, GFP, *loxP* 포함)



### 제 3 절 대장균 genome library를 이용한 단계적 제거

#### 1. 제거 대상으로 분류된 유전자군의 제거 및 확인

대장균 유전체 기능분석 정보와 DNA Chip을 이용한 특정조건하에서 대장균의 성장과 유용물질의 생산에 불필요하다고 선별된 유전자 군을 P1 transduction, Cre/loxP(Flip/FRT) recombination, I-SceI-mediated double strand breakage(DSB) system, markerless deletion을 이용하여 제거하였다. Transposon을 이용하여 제조된 *E. coli* genome library로부터 P1 transduction을 이용하여 그림 11과 같이 combinatorial deletion을 수행하여 불필요한 유전자가 제거된 *E. coli* genome deletion library를 만들었다. 제거된 유전체를 갖는 대장균은 주어진 selection marker에 의해 선택되어지고 이러한 선택에 의해 분류된 대장균은 제거된 유전자 군이 없어도 성장할 수 있는 균주로 간주하였다. 선택된 유전자군의 제거여부 확인은 PCR과 Southern hybridization을 이용하여 수행하였다.

#### 2. 불필요한 유전자를 지니고 있는 대장균 유전체의 거대 부분 제거

앞서 설명한 Cre/loxP recombination system을 이용하여 불필요한 유전자를 지니고 있는 대장균 유전체의 거대 부분을 제거하였다. 약 100kb 크기의, 유전자 argF에서 hemB 사이의 부분을 제거하였다. targeting 하고자 하는 부분의 DNA를 PCR로 증폭하여 gene targeting vector를 제조하였다. homologous recombination을 이용해 대장균 유전체 내에 targeting vector를 적중시켰다(그림 12). P1 transduction을 통하여 각각에 targeting된 gene 내의 loxP site를 하나의 유전체 내로 옮겼다(그림 13). 클로르테트라사이클린(cTc)을 이용하여 Cre 단백질을 발현하여 대장균 유전체의 거대 부분을 제거하였다(그림 14).

#### 3. 아미노산 합성경로에 관련된 유전자 군의 제거

아미노산을 합성하는데는 많은 에너지가 소비되어 중심 대사경로에 큰 부담으로 작용하며, 다른 대사 경로와 연결되어 복잡계를 형성하고 있어 대사 흐름 분석을 어렵게 한다. 따라서 아미노산 합성 경로가 제거된 균주는 보다 개선된 대사 효율성을 가지며, 대사 분석에 있어서 복잡성을 낮출 수 있게 된다

따라서 아미노산 합성에 관련된 유전자를 제거하였다(그림 15). 전체 아미노산 생합성에 관련한 유전자를 제거하는 과정에서 얻어진 변이주들의 연구를 통하여 개별적인 아미노산 합성 경로간의 연관성과 전체 대사에 주는 영향에 대한 분석이 가능하게 되었으며, 아미노산 대사와 미생물의 생리학적 특성과의 관계에 대한 이해를 높이게 되었다. 궁극적으로는 20개의 아미노산 합성 경로가 모두 제거되어, 보다 단순화된 대사경로를 가진 미생물을 통해서, 불필요한 대사로 인한 에너지 소비가 없고, 특정 대사 흐름의 효율적인 분석이 가능하게 되었다. 또한 단순화된 대사 경로에, 유용 물질 생산이나 대사 분석을 위한 특정 대사 경로를 도입함으로써, 물질 생산이나 대사 연구에 있어서 backbone을 제공하게 될 것이다.

#### 4. Biofilm 생합성에 관련된 유전자 군의 제거

우리는 미생물 발효 균주으로써 많이 사용되는 대장균으로부터, 이들 biofilm의 구조를 형성하는 물질들의 생산에 관여하는 gene들을 제거함으로써 새로운 인공균주를 개발하고자 하였다. 이 균주는 biofilm의 형성이 대폭 감소된 균주임과 더불어, 항생제나 inducer를 비롯한 여러 용질들의 확산 역시 증가된 균주가 될 것이다. 이는 실험실 단계에서는 screening시 background를 줄여주는 역할을 할 것이며, 생산환경에서는 biofilm의 형성으로 인한 기계의 수명 단축을 없애고 더 적은 양의 inducer로도 같은 양의 induction yield를 얻게 해 줄 것이며, 배지로 분비되는 결과물의 경우 생산된 양 중 더 많은 비율이 배지 속에 존재할 수 있도록 해 줄 것이다. 이러한 것은 결국 더 적은 비용으로 더 높은 생산성을 보장받는 것을 가능케 할 것으로 기대된다.

Deletion target으로 선정된 구간은 *csf* 유전자군, *wca* 유전자군, *fim* 유전자군으로 각각 *curli*, *colanic acid*, *type I pili*의 생합성에 관련된 유전자들이다. 대장균의 biofilm의 형성에 있어서 이들은 각각, *curli*와 *type I pili*는 물질의 표면과 미생물간의 부착 혹은 미생물과 미생물간의 부착에 필요한 것으로 보고되어 왔고, *colanic acid*는 이렇게 연결된 사이사이의 공간을 메우고 있는 것으로 알려져 왔다. 이들 유전자군 총 34.5kb는 markerless deletion system을 이용하여 제거되어졌고, 그 결과 biofilm 형성이 저해되는 것이 확인되었다(그림 16).

#### 5. P1 transduction을 이용해 단계적으로 유전체 축소된 대장균의 조합 구축

선택적 유전체의 제거로 얻어진 deletion mutant의 deletion 부위를 하나의 유전체로 모아 *E. coli* 유전체를 축소시키기 위하여 P1 transduction을 사용하였다. 제거된 부분들끼리의 조합을 위하여 필요할 경우, 각각 제거되어진 deletion mutant의 하나를 recipient로 삼고 다른 균주를 P1 phage로 lysis시킨 후 transduction시켜 두 개의 제거된 유전자 군을 하나의 유전체에 포함하도록 하였다. 이러한 방법을 반복해 단계적으로 대장균의 유전체를 축소시켰다(그림 17).

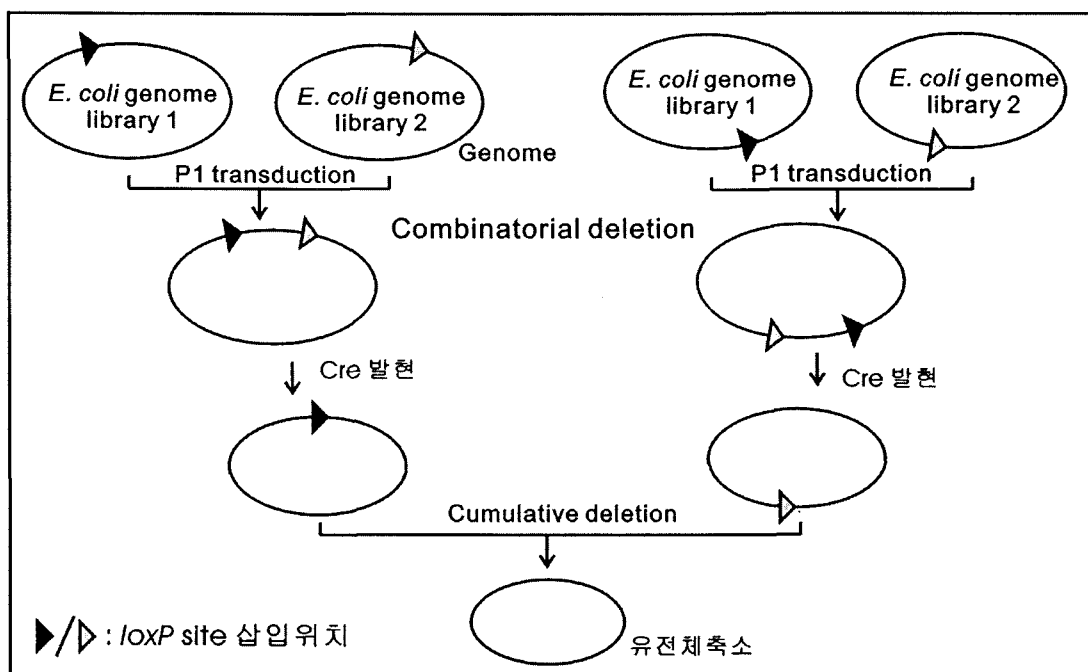


그림11. *E. coli* insertion genome library를 이용한 combinatorial deletion

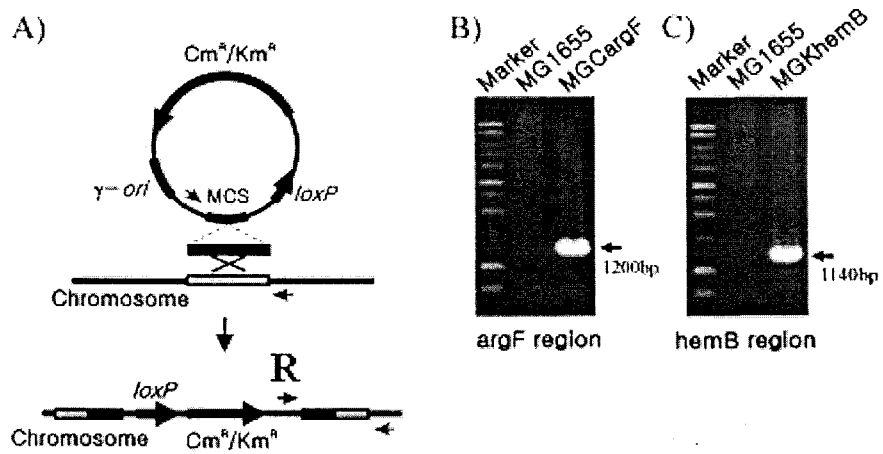


그림 12. PCR을 이용한 homologous recombination의 확인



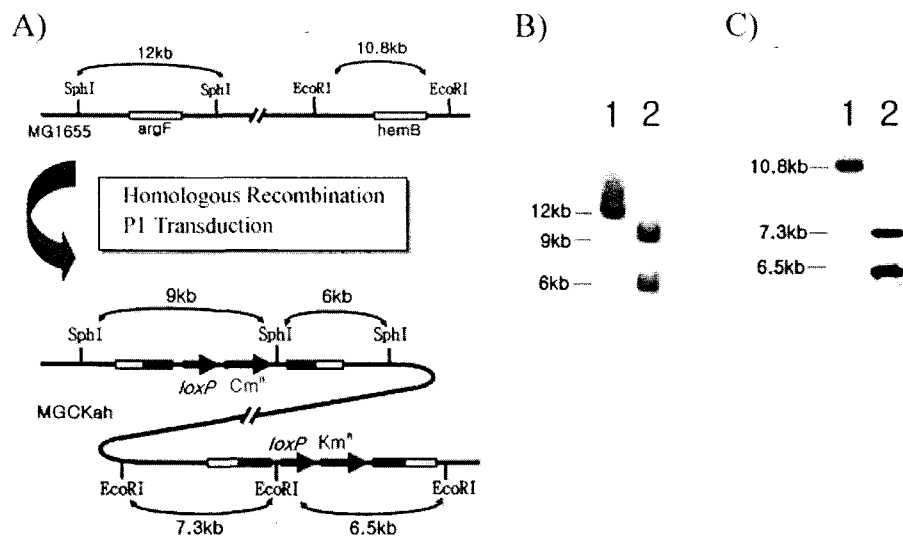


그림 13. Southern blot analysis를 이용한 P1 transduction을 통한 *loxP* site의 전달 확인

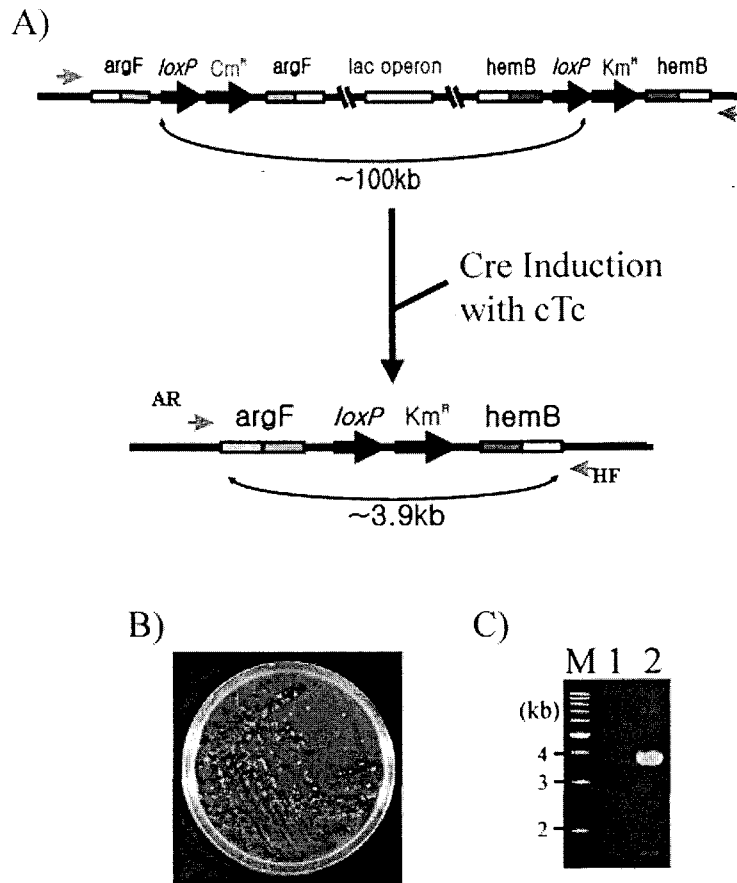


그림 14. 대장균 유전체의 불필요한 유전자를 지닌 거대 부분 제거 (*argF*-*hemB*).  
 A) 거대 유전체 부분 제거 모식도, B) 제거 부위에 속해 있는 *lac* operon을 이용한 거대 유전체 제거의 color selection, C) PCR을 이용한 유전체 부분 제거 확인

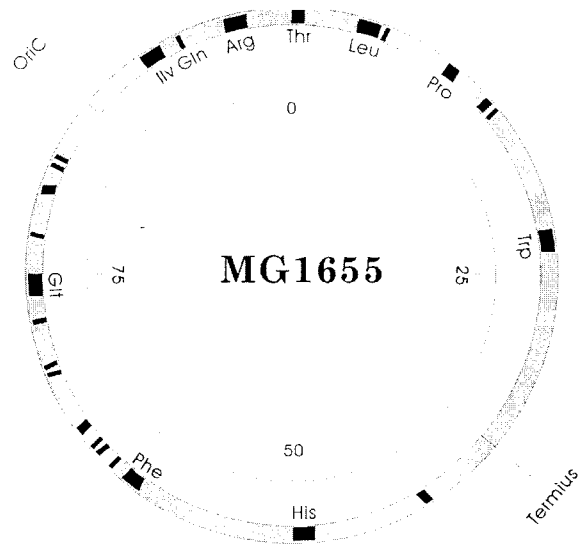


그림 15. target으로 선정된 아미노산 합성경로에 관계된 유전자 (12개의 아미노산 합성관련 operon과 12개의 단일 유전자로 전체 70kb)

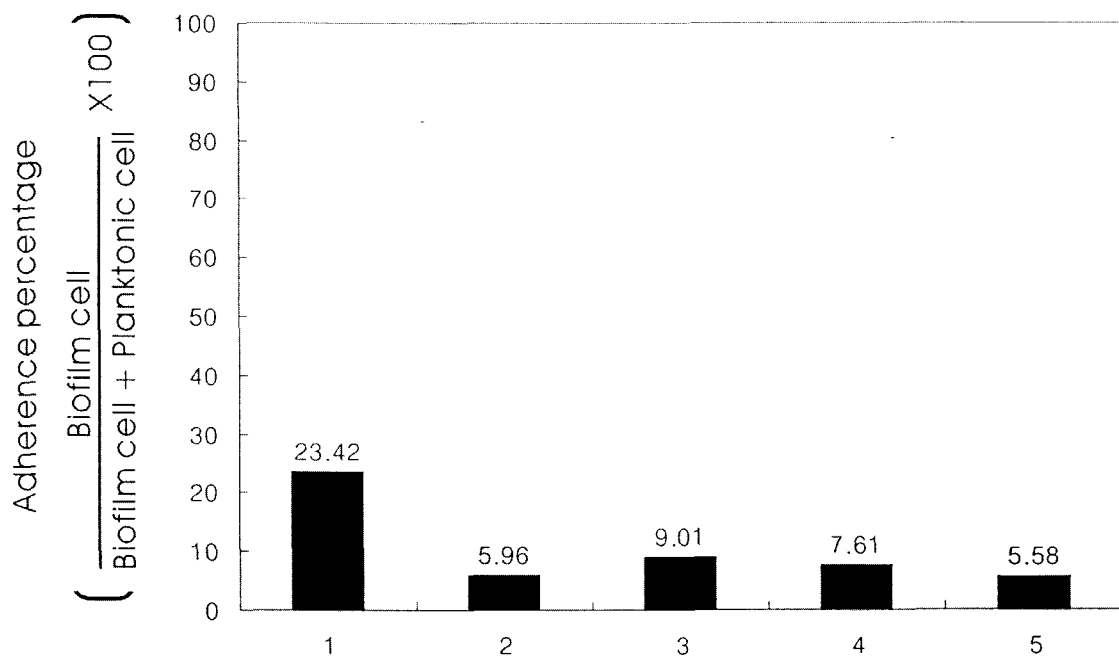


그림 16. Biofilm 관련 유전자가 제거된 mutant들의 biofilm 형성정도. (1: MG1655 wildtype; 2: curli관련 유전자가 제거된 mutant; 3: colanic acid 관련 유전자가 제거된 mutant; 4: type I pili 관련 유전자가 제거된 mutant; 5: curli, colanic acid, type I pili가 모두 제거된 mutant.)

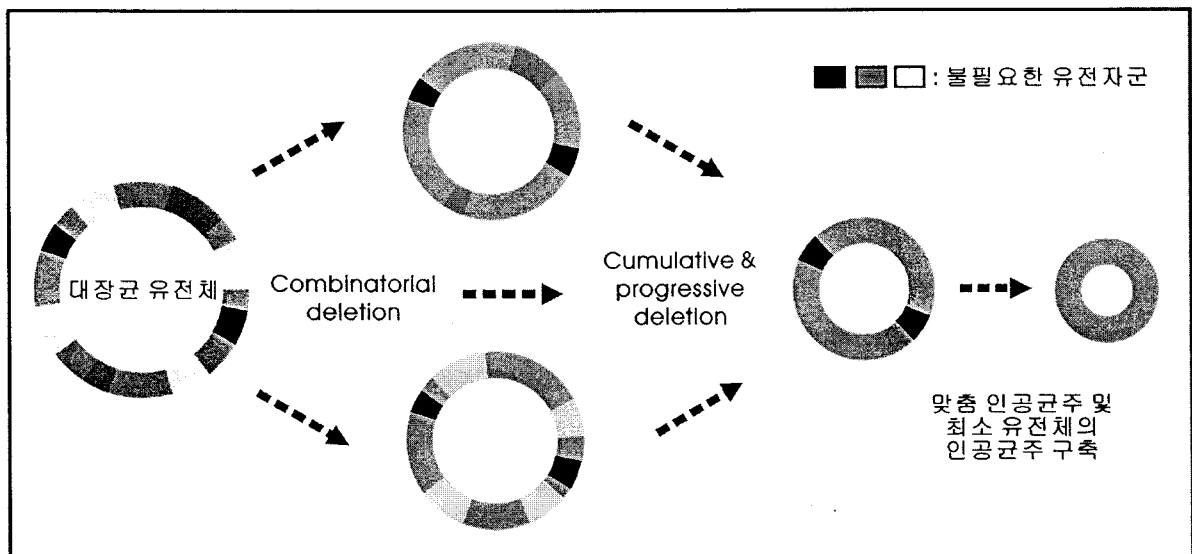


그림 17. P1 transduction에 의한 불필요한 유전체의 단계적 제거

## 제 4 절 인공대장균주의 대사경로 분석 및 재설계

### 1. 제거된 유전체를 갖는 대장균들의 대사경로 분석 및 재설계

단계적으로 유전체가 축소된 균주의 성장정도를 LB와 최소배지에서 비교하고 성장속도가 빠른 것을 선택적으로 선별하였다. 완성된 인공대장균주의 대사경로 및 flux analysis를 DNA chip 및 선택적 특수배지 조건에서 인공대장균의 특성과 기능을 분석하여 특정 유용물질 생산에 적합하도록 재설계하여 2단계 인공균주를 구축하도록 하였다.

## 제 4 장

---

# 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

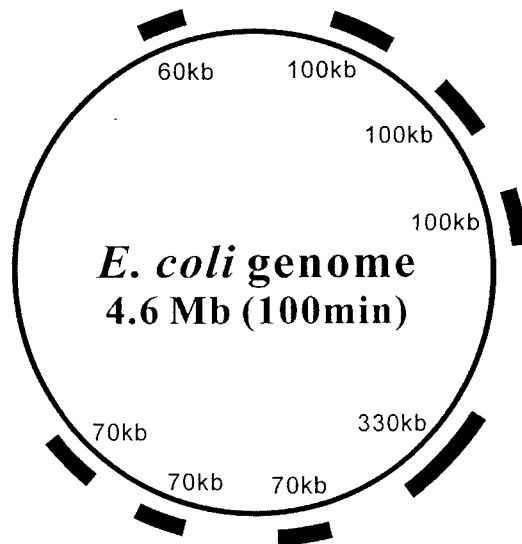
### 제 1 절 계획대비 달성도

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성 도(%)
1	생장에 불필요한 유전자군의 선별	<ul style="list-style-type: none"> <li>-DNA chip을 이용하여 발현패턴을 분석</li> <li>-Chemotaxis 및 이동 관련 유전자, 물질 전달 및 조절 유전자, 외부유래 유전자, paralogs등을 생장에 불필요한 유전자로 제거가능한 부분으로 선정</li> <li>-제거 불가능한 부분으로 복제, 전사, 발현과 관련된 유전자, 필수영양소 전달 유전자, 세포 구조 관련 유전자, ATP 생성과 환원력 생성에 관련된 유전자 등을 선정</li> <li>-약 900여 ORFs를 제거 대상으로 선정</li> </ul>	100
2	유전체의 일부를 선택적으로 제거시킬 수 있는 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>loxP</i>와 selection marker를 제거할 유전체 부위에 삽입하고 P1 transduction으로 두 개의 <i>loxP</i>를 하나의 유전체로 옮긴 뒤 Cre 단백질의 조건적 발현으로 두 <i>loxP</i> site의 부분을 제거하는 기술(deletion mutant 제조기술) 개발</li> <li>-DSB(double strand breakage)를 이용한 유전체 일부의 선택적 제거기술 개발</li> <li>-Counter-selection marker를 포함하는 벡터를 유전체에 삽입한 뒤 도입된 외래유전자 marker가 남지 않게 유전체의 부분을 제거하는 기술 개발(markerless deletion).</li> <li>-유전체 내에서 jumping transposon으로 유전체를 양방향으로 제거하고, 생존균주를 선별하여 제거정도를 확인하는 기술개발 (bidirectional deletion)</li> </ul>	100



3	Transposon을 이용, 유전체 최소화 필요한 대장균 genome library 제조	-Tn을 이용하여 <i>loxP</i> site를 유전체에 삽입한 library를 500여개 구축 (그림 8, 9, 10 참조) - <i>E. coli</i> mutant library를 이용하여 조합적 유전체 제거(combinatorial deletion)를 수행	100
4	유전체 제거 부분 설정 및 제거에 필요한 targeting 벡터 제조	-Cre/ <i>loxP</i> , Flp/FRT 시스템 이용에 필요한 선택적 유전자 제거용 targeting 벡터 35 여개 제조 및 확인 -Double-strand breakage repair system 이용한 불필요 유전자 제거용 targeting 벡터 10 여개 제조 -Bacteriophage $\lambda$ red system을 이용한 거대유전체 부분 제거용 targeting 벡터 20 여개 제조 -Markerless deletion을 위한 targeting 벡터 20 여개 제조 -유전체 양방향 제거용 벡터 15 여개 제조	100
5	선택적 재조합과 <i>E. coli</i> genome library 를 이용하여 대장균 유전체 크기를 20% 축소.	-특정기능의 유전체 부분과 비특이적 기능의 유전체 부분을 여러 거대유전체 조작 기술을 이용하여 제거 -Flagella 관련 유전자, 총 45kb -LPS의 core부분과 관련한 유전자 부분, 15kb -아미노산 생성 관련 유전자 부분, 30kb -Anaerobic 대사 관련 유전자, 62.2kb -박테리오 파아지 유래 유전자들, 45kb를 포함하여 약 943개의 ORFs (약 1Mb)를 제거하여 전체의 22% 제거 (그림 18, 표 1 참조)	110

● Large deletion regions



● Additional specific deletions

Anaerobic respiration pathway: 62.2kb
Core region of LPS: 15kb
Biofilm formation: 21.3kb
Flagella and Chemotaxis: 45kb
Amino acid biosynthesis: 70kb

그림 18. 대장균의 불필요한 유전체의 제거 부위 모식도(거대 유전체 및 특이 유전자 제거)

표 1. 제거된 유전자들의 기능과 크기

구분	기능	유전자	크기	비고
1	Anaerobic respiration	<i>hya</i> ABCDEF, <i>tor</i> ACDRST, <i>hyp</i> ABCDE, <i>hyc</i> HGFEDCBA, <i>hyb</i> GFEDCBA, <i>fdh</i> ED <i>fd</i> oHG <i>fd</i> hD, <i>nrf</i> ABCDEFGF, <i>frd</i> DCBA	~62.5kb	237 genes
2	Coreopolysaccharide of LPS	<i>rfa</i> DFCLKZYJIBSPGQ	~15kb	
3	Flagellar	<i>flg</i> NMABCDEFGHIJKL, <i>mot</i> BA <i>tap</i> , <i>fli</i> YZACDST, <i>flh</i> ACD <i>che</i> YBRWA, <i>fli</i> EFGHIJKLMNOPQR	~45kb	
4	Amino acid biosynthesis	<i>leu</i> LABCD, <i>ilv</i> HLMGMEDEA, <i>trp</i> EDCBA, <i>his</i> ABCDEFGHI, <i>asp</i> C	~70kb	
5	Enterochellin Betaine, choline cyanate catabolism lactose nitrate reductase formate dehydrogenase multi-antibioticresistance maltose PTS system Iron-dicitrate transporter D-glucuronate catabolism aminobutyrate transferase glycine proline transport propionate degradation taurin biosynthesis molybdenum catabolism O-antigen biosynthesis arabinose catabolism, etc.	<i>ent</i> DFCEBA <i>fep</i> AECGDB <i>fes</i> <i>bet</i> ABIT <i>cyn</i> RTSX <i>lac</i> AYZI <i>nar</i> VWYZU <i>fdn</i> GHI <i>mar</i> RAB, <i>emr</i> RAB <i>mal</i> XY <i>fec</i> EDCBARI <i>uxu</i> ABR <i>gab</i> DTP <i>pro</i> VWX <i>mhp</i> VRABCFET <i>tau</i> ABCD <i>mod</i> EABCD <i>rfc</i> glfrfbXCADB <i>gal</i> F <i>ara</i> CBAD, etc.	~85kb	
6	Phage derived genes		~45kb	41 genes
7	Scattered genes		~326kb	304 genes
8	Functional unknown genes		~390kb	361 genes
	Total	전체 유전체의 22% 제거	~1 Mb	943 ORFs

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

### 1. 유전체의 22%가 제거된 대장균 개발

사람이 인위적으로 디자인한 미생물이 국내연구팀에 의해 탄생이 가능해졌다. 본 유전체 공학 연구팀은 대장균이 보유하고 있는 4300여개로 추정되는 유전자 가운데 22%에 해당하는 943개의 유전자가 제거된 대장균을 개발하였다. 이는 본 연구팀이 자체 개발한 유전체 조작기술(genome engineering technique)을 이용하여 제조되었다. 이번 연구결과로 생물공학적으로 필요한 특정물질을 가장 효율적으로 생산할 수 있는 맞춤형 미생물 개발이 가능해졌다.

### 2. 유전체 축소용 대장균 library 구축

원하는 부위의 유전체를 제거하는데 획기적인 발판이 마련되었다. 기존의 연구와 산업적 이용 목적을 위해 유전체를 제거할 경우 몇 달이상이 걸렸다. 그러나 이번에 구축된 위치특이적 재조합 효소의 인식부위인 *loxP*를 삽입한 유전체 축소용 *E. coli* genome library 500여종을 이용할 경우, 원하는 유전자 군을 새로운 벡터제조나 PCR없이 72시간 이내에 제거할 수 있게 되었다.

### 3. 거대 유전체 임의 조작 제거기술 개발

거대 유전체를 쉽게 제거할 수 있는 여러 기술이 축적되었다. 이 기술 중 하나는 유전자 제거 때 사용하는 마커를 쓰지않고 흔적없이 잘라낼 수 있는 방법으로 기존에 산발적으로 사용되고 있는 기술들을 모아 발전시킴으로서 시간을 줄이고 효율을 극대화 할 수 있도록 개발된 고난도의 기술이다. 유전자를 다루던 시대에서 유전체를 다루는 시대로 이전하고 있는 시점에서, 이와 같이 유전체의 능숙하게 다룰 수 있는 기술의 개발은 생명과학 연구의 중요한 원천 기술이 될 것이다.

### 4. 신규 인공균주 제조 가능성 제시

이론적으로만 제시되었던 최소유전체를 지닌 생물이 실험적으로 제조되었다. 지금까지 20% 이상의 유전체가 제거된 대장균이 개발되었다. 수년내 40% 이상의 유전체가 제거된 대장균이 개발될 것으로 전망된다. 생장에 불필요한 유전자가 제거된 미생물을 제조하면 세포의 복잡한 프로세스를 잘 이해할 수 있게 되어 생명현상에 대해 보다 쉽게 이해할 수 있으며, 생물산업에 이용될 때 산업적 생산효율을 극대화할 수 있는 것은 물론 의약품 생산공정에서 분리·정제 단계를 축소할 수 있는 등 획기적인 산업적 응용이 가능해질 것이라고 기대되고 있다.

## 5. 기타 계획하지 않은 연구성과

본 연구진의 *E. coli* genome library는 불필요한 유전체 제거 뿐아니라 기능연구에 중요한 역할을 할 수 있음이 해외학회 발표(TIGR 미생물 유전체학회) 도중 확인되었다. 지금까지 수행한 Tn에 의한 gene knock-out에 의한 생육에 필요한 유전자 확인 방법에 큰 문제점이 있음이 밝혀졌다. 즉 유전자 제거 시, 각각의 유전자가 불필요한 유전자로 확인 되었어도 동시에 제거되면 생장에 저해됨을 확인하였다.

또한 본 연구진이 개발한 genome engineering 기술이 *Bacillus*를 포함한 다른 균에도 효과적으로 적용될 수 있음을 확인하였다.

## 제 5 장

---

# 연구개발결과의 활용계획

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

유전체 기능분석 및 유전체 정보를 이용하여 유전체의 불필요한 부분을 선택적으로 제거하여 간단하고 효과적이며 유전체 전체의 기능이 파악된 최소의 유전체를 지닌 새로운 인공균주를 만들어, 유용한 물질의 생산에 최적의 맞춤형 산업용균주 개발에 이용하는 연구는 21세기 post-genome 시대의 꼭 필요한 핵심이 되는 중요한 연구분야이다.

그동안의 최근의 생물산업의 추세는 대사경로를 분석하여 원하는 물질의 생산을 최적화 할 수 있는 새로운 대사경로를 설계 조절하는데 초점을 두고 있다. 하지만 이와 같은 방법으로는 부분적인 균주개량만 가능하고 근본적으로 효율이 향상된 균주를 얻기가 힘들다. 따라서 체계적이고 효율적인 유전체 제거 및 분석기술을 이용하여 유용물질 생산에 요구되어지는 유전자만을 발현시키고 이를 저해하거나 불필요한 유전자군을 완전히 제거함으로써 고효율의 산업미생물을 구축하여 생산비용절감뿐 아니라 분리 정제의 효율이 높은 고급제품을 생산할 수 있는 인공균주의 개발이 필요하다. 또한 미생물들이 가지고 있는 유용한 유전자군들(항생제 합성, 생물화학정밀제품, 환경독성물질 분해에 관련되는 유전자군)을 하나의 유용한 인공균주(빠른 성장, 생성물의 높은 정제효율, 발효최적화)에 도입하게 되면 그러한 물질들을 생성하는 미생물들의 까다로운 배양조건이나 낮은 생산성을 극복할 수 있게된다. 그리고 최근의 유전체 기능분석을 바탕으로 최소유전체를 규명하려는 시도는 주로 개개의 유전자들을 적중하여 미생물 성장에 필요한지를 분석하는데 의존하고 있다. 하지만 이는 유전자 자체가 유전체내에 남아있을 뿐만 아니라 여러 개의 유전자군을 불활성화 시키는 것에 적용하기 어렵다. 또한 유전자 개개의 적중실험에서 불필요하다고 분석되어진 유전자군이 실지로는 최소유전체의 성장에 꼭 필요한 유전자군인 경우가 종종 있다. 따라서 이러한 유전자 적중방법을 통해 미생물의 성장에 필요한 최소의 유전자를 규명하려는 시도는 실질적인 최소 유전자수를 규명하거나 최소유전체를 생성하는데는 적합하지 않다는 것을 알 수 있다. 그러므로 이러한 문제점들을 극복할 수 있는 방법은 유전체내 불필요한 유전자군들을 직접적으로 그리고 연속적으로 제거해나가면서 유전체 중 성장에 불필요한 유전자군이 어떤 것인지 규명하고 최소유전체를 구축 응용하는 연구가 필요하다.

따라서 본 연구팀은 2단계에서는 지금까지 본 연구진이 구축한 유전체 제거기술들 (Cre/loxP site-specific recombination, I-SceI을 이용한 double-strand breakage repair 방법, bacteriophage  $\lambda$  red system 방법등)을 이용하여 대장균 유전체내 불필요한 유전자군을 더욱더 포괄적으로 제거시켜 1단계에서 얻은 대장균 20%가 축소된 유전체보다 더욱 축소된 유전체를 갖는 인공균주를 개발하고자 한다. 또한 대장균내 불필요 유전자군의 직접적이고도 효율적인 선별을 위하여 jumping transposon을 이용한 유전체 양방향 동시 제거법을 이용하여 새로운 *E. coli* genome library를 구축하여 불필요한 유전자군의 선별 및 제거속도를 보다 가속화시키고자 한다. 그리고 이러한 방법들을 이용하여 개발된 많은

인공균주들은 proteomics를 이용하여 분석하고, 이중 최소영양배지 조건에서 성장이 왕성한 인공 균주를 선별하여 산업 적 유용물질 생산에 사용하고자 한다. 또한 2단계에서는 이미 구축된 *E. coli*에 Tn5와 *loxP* site를 갖는 *E. coli* genomic library와 bidirectional deletion 방법을 이용하여 대장균 유전체를 이론적으로 가능한 40%까지 축소시켜 고효율 균주를 제조할 뿐아니라 최소화된 대장균 유전체에 외부에서 유용유전자군을 도입하여 새로운 기능을 갖는 인공균주를 구축하여 기존에 사용하는 *E. coli* 균주를 고성능균주로 개발하여 국내외 생물산업에 보급하고자 한다.

본과제의 수행을 통하여 얻은 유전체 제거 기술 및 이를 이용하여 제조되고 있는 최소 유전체의 인공 균주가 제작이 되면, 빠른 성장속도, 에너지 집중, 유용물질 생성량 증대, 정제효율 증대의 특징을 지니는 산업적 유용 균주의 제조가 가능하다. 이와 같은 인공균주 및 유전체 조작기술을 현재 대사공학적 유용한 물질을 생산하는 세계적 기업체에 기술 이전하며 기술료를 받는다. 또한 최소 유전체의 적용을 대장균이 아니라 고초균을 비롯한 여러 미생물로 확대하여 미생물 전체의 재조합과 새로운 균주의 구축에 크게 이용될 수 있다. 그리고 현재 확보한 *E. coli* genome library와 유전체 조작 기술을 토대로 바이오 벤처를 세울 경우 미국 Maxygen 수준의 세계적 미생물 유전체 연구회사가 가능하며 생명공학에 맞춘 미생물 제조라는 새 기원을 열것으로 확신한다. 현재 미국(Wisconsin 대학 Dr. Frederick Blattner)과 일본에서 공동벤처 설립을 제의받고 있다.



# 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

유전체의 염기서열 분석을 보다 정확하게 하기 위한 시도로 미국 위스콘신 대학의 Szybalski는 유전체를 거대분자 형태로 분리하는 기술을 개발하였고, 헝가리 국립과학 연구소의 Posfai는 거대 유전자를 자체 숙주 내에서 증폭하는 방법을 개발하였다. 이러한 기술들을 바탕으로 하여, Craig Venter는 지구상에 알려진 생명체 중 유전자의 숫자가 가장 적은 *Mycoplasma genitalium*를 이용하여 생명유지에 필수적인 300여개의 유전자의 기능을 명확히 한 뒤, 인공세포질 속에서 이들 필수 유전자들을 이용해 염색체를 합성하여 새로운 종류의 박테리아를 앞으로 10년 이내에 만들어내겠다고 하였다.

현재의 연구단계는 기존의 유전자를 하나씩 파괴함으로써 실험실의 조건에서 살아가는데 필요한 최소의 유전자를 밝히는 연구를 수행하는 중이다. 따라서 현재는 알려지지 않은 유전자의 기능연구를 수행함과 동시에, 필요한 유전자군을 모아서 새로운 균주를 만드는 일을 계획하고 있어, 새로운 인공균주의 제조에는 상당한 시간이 걸릴 것으로 생각된다.

앞서 언급한 마이코플라즈마를 이용한 방법을 제외하고는 전체 유전체를 이용하여 새로운 박테리아를 만드는 연구는 진행되고 있지 않다. 그 이유는 유전체 기능 연구에 따른 축적된 유전체 정보 없이는 새로운 인공균주 개발이 불가능했기 때문이다.

## 제 7 장

---

# 참고문헌

## 제 7 장 참고문헌

1. Abremski, K., Hoess, R., Sternberg, N. (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32, 1301-1311.
2. Blattner, F.R., Plunkett III, G., Block, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.
3. Fang, F.C., Durland, R.H., Helinski, D.R. (1993) Mutations in the gene encoding the replication-initiation protein of plasmid RK2 produce elevated copy numbers of RK2 derivatives in *Escherichia coli* and distantly related bacteria. *Gene* 133, 1-8.
4. Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A., Murray, N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.
5. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
6. Hasan, N., Koob, M., Szybalski, W. (1994) *Escherichia coli* genome targeting, I. Cre-lox-mediated in vitro generation of *ori*-plasmids and their in vivo chromosomal integration and retrieval. *Gene*, 150, 51-56.
7. Hillen, W., Schollmeier, K., Gatz, C. (1984) Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance operon. II. Interaction of RNA polymerase and TET repressor with the *tet* operon regulatory region. *J. Mol. Biol.* 172, 185-201.
8. Hoess, R., Abremski, K. (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* 181, 351-362.
9. Kaczorowski, T., Szybalski, W. (1996) Automated four-color DNA sequencing using primers assembled by hexamer ligation. *Gene* 179, 195-198.
10. Kilby, N.J., Snaith, M.R., Murray, J.A.H. (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9, 413-421.
11. Kolter, R., Helinski, D.R. (1982) Plasmid R6K DNA replication. II. Direct nucleotide sequence repeats are required for an active gamma-origin. *J. Mol. Biol.* 161, 45-56.
12. Koob, M., Burkiewicz, A., Kur, J., Szybalski, W. (1992) RecA-AC: single-site cleavage of plasmids and chromosomes at any predetermined restriction site. *Nucleic Acid Res.* 20, 5831-5836.
13. Koob, M., Szybalski, W. (1990) Cleaving yeast and *Escherichia coli* genomes at a single site. *Science* 250, 271-273.
14. Koob, M., Szybalski, W. (1992) Preparing and using agarose microbeads. *Methods Enzymol.* 216, 13-20.
15. Koob, M., Cameron, DC. (1994) Minimizing the genome of *Escherichia coli*: Motivation and strategy. *Annul NY Acad Sci.* 745, 1-3.
16. Landy, A. (1993) Mechanistic and structural complexity in the site-specific recombination pathways of Int and FLP. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 699-707.

17. Levene, S.D., Zimm, B.H. (1987) Separations of open-circular DNA using pulsed-field electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4054-4057.
18. Lyznik, L.A., Rao, K.V., Hodges, T.K. (1996) FLP-mediated recombination of *FRT* sites in the maize genome. *Nucleic Acid Res.* 24, 3784-3789.
19. Mahillon, J., Kirkpatrick, H.A., Kijenski, H.L., Bloch, C.A., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Blattner, F.R. (1998) Subdivision of the *Escherichia coli* K-12 genome for sequencing: manipulation and DNA sequence of transposable elements introducing unique restriction sites. *Gene* 223, 47-54.
20. Miller, J.H. (eds): *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY, 1992.
21. Park, C., Dutton, D.P., Hazelbauer, G.L. (1990) Effects of glutamines and glutamates at sites of covalent modification of a methyl-accepting transducer. *J. Bacteriol.* 172, 7179-7187.
22. Pósfai, G., Koob, M., Hradecná, Z., Hasan, N., Filutowicz, M., Szybalski, W. (1994) *In vivo* excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res.* 22, 2392-2398.
23. Pósfai, G., Koob, Kolisnychenko, V., Bereczki, Z., Blattner, FR. (1999) Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res.* 27, 4409-4415
24. Sauer, B. (1987) Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2087-2096.
25. Sauer, B., Henderson, N. (1989) Cre-stimulated recombination at *loxP*-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acid Res.* 17, 147-161.
26. Sternberg, N., Hamilton, D. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination, I. Recombination between *loxP* sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467-486.
27. Szybalski, W. (1993) From the double-helix to novel approaches to the sequencing of large genomes. *Gene* 135, 279-290.
28. Wild, J., Hradecná, Z., Pósfai, G., Szybalski, W. (1996) A broad-host-range *in vivo* pop-out and amplification system for generating large quantities of 50- to 100-kb genomic fragments for direct DNA sequencing. *Gene* 179, 181-188.
29. Wild, J., Sektas, M., Hradecna, Z., Szybalski, W. (1998) Targeting and retrofitting pre-existing libraries of transposon insertions with *FRT* and *oriV* elements for *in vivo* generation of large quantities of any genomic fragment. *Gene* 223, 55-66.
30. Yoon, Y.G., Cho, J.H., Kim, S.C. (1998a) Cre/*loxP*-mediated excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. *Genet. Anal. Biomol. Eng.* 14, 89-95.
31. Yoon, Y.G., Posfai, G., Szybalski, W., Kim, S.C. (1998b) Cre/*loxP*-mediated *in vivo* excision of large segments from yeast genome and their amplification based on the 2 microm plasmid-derived system. *Gene* 223, 67-76.

---

# 연구결과 활용계획서

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국가지정연구실 사업			
	세부사업명	국가지정연구실 사업			
과제명		차세대 생물산업용 인공균주 개발			
연구기관		한국과학기술원 생물과학과	연구책임자	김선창	
총연구기간		2000년. 6월. 14일. ~ 2002년. 6월. 13일. ( 24 개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		396,455	-	396,455	
기술분야		생명과학(분자 세포공학 기술)			
참여기업					
공동연구기관					
위탁연구기관					
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ( )	2. 기술이전( )	3. 후속연구추진( )	4. 타 사업에 활용( )
		5. 선행 및 기 초연구( √ )	6. 기타목적활용 (교육,연구)( )	7. 활용중단(미활용)( )	8. 기타( )

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의  
거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.  
2. 기술요약서 1부

2002 년 9 월 6 일

연구책임자 :  
연구기관장 :

김 선 창  
한국과학기술원장(직인)



과학기술부장관 귀하

# 연구결과 활용계획서

## 1. 연구목표 및 내용

미생물 유전체 비교분석(comparative microbial genomics)과 새로운 유전체 조작기술(genome engineering technique)을 이용하여 대장균 생장에 불필요한 유전자군을 제거하여 최소 크기의 인공대장균을 제조하고, 이를 이용해 대사공학 및 생물학적 유용물질 생산에 적합하도록 미생물을 재설계, 제조하여 최적 생물산업용 맞춤형주를 개발하고자 하였다.

그 1단계로 다음과 같은 연구를 수행하였다.

- o 생장에 불필요한 유전자군의 선별
- o 유전체의 유전자를 선택적으로 제거시킬 수 있는 기술개발
- o 유전체 제거부분 설정 및 제거에 필요한 targeting vector 제조
- o Site-specific recombination 과 transposon을 이용, 유전체 최소화에 필요한 대장균 genome library 제조

## 2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	출원(등록)번호	공고일자	출원인	출원국	비고
분자내 양방향 유전체 제거에 사용되는 트랜스포존, 이를 이용한 미생물 변이주 제조 및 성장 비필수 유전자 선별 방법	10-2002-0021811	2002.4.20.	KAIST	한국	출원
항균활성을 갖는 펩타이드, 이들의 유도체 및 이들을 포함하는 항균 조성물	10-2002-0016445	2002.03.26	KAIST	한국	출원
트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용하는 염색체 특정부위가 제거된 미생물 변이주 제조방법	10-2002-0009647	2002.02.22	KAIST	한국	출원
메기로부터 분리한 신규한 항균 펩타이드 파라신과 그 용도	특허결정	2002.01.07	KAIST		등록
Antimicrobial peptide isolated from parasilurus asotus and its uses	US 6,316,597	2001.11.13	KAIST	미국	등록
생물학적 활성이 있는 신규한 펩타이드	10-0314721	2001.11.01	KAIST	한국	등록
Method for mass production of antimicrobial peptide	US 6,183,992	2001.02.06	KAIST	미국	등록



나. 프로그램 등록목록

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적

학술지 명칭	제목	게재일	호	발행기관	국명	SCI 여부
Nature Biotechnol	Minimization of <i>Escherichia coli</i> using a Tn5-coupled Cre/loxP recombination system	2002.	20	Nature Publishing Group	미국	○
Appl. Microbiol. Biotechnol.	Enhance expression of tandem multimers of the antimicrobial peptide buforinII in <i>Escherichia coli</i> by the DEAD-box protein and trxB mutant	2002	58	Springer-Verlag	독일	○
Journal of Immunol.	Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta	2002	168	미국 면역학회	미국	○
FASEB J.	Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucousa of fish	2002		미국 실험생물학협회	미국	○
Oncogene	p53 and its homologues, p63 and p73, induce a replicative senescence through inactivation of NF-Y transcription factor	2001	20	Nature publishing group	미국	○
Journal of Biochemistry and Molecular Biology	In vivo excision and amplification of large human genomic segments using Cre/loxP- and EBNA-1/oriP-mediated machinery	2001	34	한국 생화학회	한국	○
Biotechnol. Bioeng.	Orthophosphate anion enhances the stability and activity of endoxylanase from <i>Bacillus</i> sp.	2001	72	John Wiley and Sons	미국	○
J. Immunol.	Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I	2000	165	American Association of Immunologist	미국	○

학술지 명칭	제목	게재일	호	발행기관	국명	SCI 여부
Plant Molecular Biol.	Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, <i>Capsella bursa-pastoris</i>	2000	44	국제 식물 분자생물학회	네덜란드	○
J. Microbiol Biotechnol	Constitutive overexpression of the endoxylanase gene in <i>Bacillus subtilis</i>	2000	10	한국산업 미생물학회	한국	○
Proc. Natl. Acad. Sci. USA	Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II	2000	97	National Academy of Science	미국	○
Appl. Microbiol. Biotechnol.	Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant <i>Escherichia coli</i> using the <i>Bacillus</i> sp. endoxylanase signal sequence	2000	53	Springer-Verlag	독일	○
Biochemistry	Interaction of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor	2000	39	American Chemical Society	미국	○
계: 13						

○ 학술회의 발표 실적

학술발표제목	발표장소 (국명)	일시
Innate defence system of a stomach mediated by a histone H2A-derived antimicrobial peptide	2000년 한국생화학회 추계학술대회 (한국)	2000.10.6.
Genesis of artificial microorganisms for future biotechnology by genome engineering	2000년 한국분자생물학회 추계학술대회 (한국)	2000.10.12.
Generation of the antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the catfish skin by an enzymatic cascade reaction	2000년 한국분자생물학회 추계학술대회 (한국)	2000.10.12.
Antimicrobial and endotoxin neutralizing proteins of human placenta	2000년 한국분자생물학회 추계학술대회 (한국)	2000.10.12.

학술발표제목	발표장소 (국명)	.일 시
Cre/loxP- and large T antigen/SV40 ori-mediated in vivo excision and amplification of large genomic segments in human cell	2000년 한국분자생물학회 추계학술대회 (한국)	2000.10.12.
Minimization of the <i>Escherichia coli</i> genome using Tn5-coupled Cre/loxP recombination system	ASM/TIGR conference on microbial genomes (미국)	2001.1.28.
The killing of microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions	3th Cordon research conference on antimicrobial peptide (미국)	2001.3.18
Antimicrobial and endotoxin-neutralizing proteins of human placenta	3th Cordon research conference on antimicrobial peptide (미국)	2001.3.18.
Genesis of artificial strains based on microbial genomics	KSAM 2001 international symposium (한국)	2001.6.20.
Cathepsin D produces the potent antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in scaleless fish skin	International/ American Peptide Society (미국)	2001.7.
Development of a new strain by deletion of large genomic segments of <i>Escherichia coli</i>	9th international conference on microbial genomes (미국)	2001.10.28.
Minimization of the <i>Escherichia coli</i> genome using Tn5-coupled Cre/loxP excision system	9th international conference on microbial genomes (미국)	2001.10.28.
Development of a new strain by deletion of large genomic segments of <i>Escherichia coli</i>	102nd general meeting of american society for microbiology (미국)	2002.5.19
계:13		

### 3. 연구성과

※ 기술이전이나 기업화 완료 실적  
해당사항 없음

### 4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

해당사항없음

# 기술 요약서

## ■ 기술의 명칭

트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용하는 염색체 특정부위가 제거된 미생물 변이주 제조법

## ■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	2000-N-NL-01-C-160			
과제명	차세대 생물산업용 인공균주 개발			
사업명	국가지정연구실 사업			
세부사업명	국가지정연구실 사업			
연구기관	한국과학기술원	기관유형	학교	
참여기관(기업)				
총연구기간	2000. 6. 14. - 2002. 6. 13. (24개월)			
총연구비	정부( 396,455 )천원    민간(            )천원    합계( 396,455 )천원			
연구책임자 1	성명	김 선 창	주민번호	
	근무기관 부서	한국과학기술원 생물과학과	E-mail	sckim@mail.kaist.ac.kr
	직위/직급	교 수	전화번호	042-869-2619
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	유 병 조	소속/부서	KAIST / 생물과학과
	직위/직급	학생(박사과정)	E-mail	bju@bioneer.kaist.ac.kr
	전화번호	042-869-2659	FAX	042-869-2610
	주소	(305-701) 대전시 유성구 구성동 KAIST 생물과학과		

## ■ 기술의 주요내용

### [기술의 개요]

매 실험시 마다 타겟팅 벡터를 제조하고 PCR을 수행해야 했던 종래의 미생물 염색체 특정부위 제거 방법을 개선하여, 트랜스포존과 Cre/loxP 부위 특이적 재조합 방법을 이용하여 염색체의 특정부위가 제거된 미생물 변이주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 선별 마커와 loxP 부위를 가진 트랜스포존 및 상기 트랜스포존과 Cre 발현 벡터를 이용하여 미생물 염색체의 특정부위를 제거하여 새로운 미생물 변이주를 제조하는 방법에 관한 것이다.

### <기술적 특징>

- (1) 염색체의 임의 위치의 유전자가 망가진 유전체의 library를 만들 수 있다.
- (2) 확보된 library를 이용하여 유전체의 특정부위가 제거된 미생물을 빠르고 효율적으로 제조 가능

### [용도 · 이용분야]

- (1) 산업용 인공균주로써의 개발과 유전체 기능연구
- (2) 유용물질의 대량생산과 효율적 분리공정을 수행할 수 있는 인공균주의 개발로 시장 공략 가능
- (3) 많은 염색체-제거 변이주의 특성 분석 가능
- (4) 유상으로 특정 유전자가 knock-out된 균주를 타 연구자에 제공가능



■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

√	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
√	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
√	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[ 기술개요]

기술명	분자내 양방향 염색체 제거에 사용되는 트랜스포존, 이를 이용한 미생물 변이주 제조 및 비필수 유전자 선별방법
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input checked="" type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	트랜스포존의 분자내 전위와 선별마커를 이용하여 염색체의 임의 부위의 제거에 관한 것으로, 주어진 성장조건하에서 성장에 불필요한 유전자를 선별함과 동시에 유전자 일부가 제거된 새로운 미생물 변이주를 제조하는 새로운 방법