효모에 적용되는 발현조절용 프로모터 개발 연구동향

아주대학교 강현준, 이평천

개요

효모는 오랜 시간 동안 인류와 밀접한 관계를 유지하고 있는 미생물로서 전통적인 발효식품에서부터 최근의 다양한 재조합 단백질과 유용 대사산물의 생산에 이르기까지 많은 분야에서 널리 이용되고 있다. 최근 합성생물학과 대사공학의 발전으로 효모를 이용하는 친환경, 고효율의 생물공정 개발 연구는 많은 연구자들과 산업체에게 여러 면에서 큰 관심을 집중시키고 있다. 특히 진핵생물 최초로 유전체 염기서열이 해독되어 발표되었고 다양한 신호전달체계와 대사회로의 특성이 밝혀지면서 효모를 고기능 산업용 균주로 이용하기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔다 (Borodina and Nielsen 2014).

효모는 유용한 단백질이나 대사산물의 생산을 위한 매우 중요한 플랫폼 균주로서 이를 대사공학적으로 이용하기 위해서는 세포 내에서 일어나는 다양한 대사유동 (metabolic fluxes)과 회로의 미세한 제어가 필수적이다. 그리고 이러한 제어는 주로 대사회로에 연관되는 유전자들의 발현 조절을 통해 수행될 수 있다. 따라서 적절한 발현 세기와 조절 기작을 갖는 프로모터 (promoter)의 사용은 새로운 대사회로의 구축에 있어 특정 유전자의 전사 (transcription) 수준을 조절하는 매우 중요한 요소이다. 유전자의 상위서열에 존재하는 프로모터는 전사조절 인자와 RNA 중합효소 결합부위로 구성되어 있으며, 유전자 발현을 조절하는 가장 직접적인 도구이다 (Struhl 1989, Da Silva

and Srikrishnan 2012). 효모에서 유전자의 전사를 제어할 수 있는 다양한 프로모터들의 특성과 그 조절 기작은 비교적 잘 알려져 있지만, 최근에는 원하는 산물의 생산을 위해 알려진 프로모터 외에 새로운 특성을 갖는 합성 프로모터의 개발이 주목 받고 있다 (Redden and Alper 2015).

따라서 효모의 대사공학적 이용을 위해 유전자 발현 조절에 이용되고 있는 다양한 프로모터들의 종류와 발현 세기의 조절기작 그리고 최근 합성생물학적 기법을 이용한 새로운 프로모터 개발에 대한 동향을 살펴보고자 한다.

1. 효모의 프로모터

1.1 프로모터의 구조

일반적으로 효모의 프로모터는 핵심 프로모터 (core-promoter)와 상부 조절 서열 (upstream regulatory sequence, URS)로 구성되어 있다. 핵심 프로모터는 유전자의 바로 앞 부분에 위치하고 있으며 RNA 중합효소가 결합하여 전사개시 자리 (transcription start site, TSS)에서 전사를 시작할 수 있게 하는 부위이다. 따라서 핵심 프로모터 부위는 유전자의 전사를 위한 필수적인 요소이다. TSS와 함께 전사의 방향성을 결정하는 TATA box는 TSS의 상부 40 ~ 120 bp 위치에서 발견된다 (Hahn and Young 2011). 효모의 프로모터는 세포의 성장과 함께 지속적으로 작동하는 구성적 프로모터 (constitutive promoter)와 특정 환경이나 물리적 자극에 의해 작동하는 조절 프로모터 (regulated or inducible promoter)로 나뉘며, TATA box는 주로 조절 프로모터에서 발견된다. 또한 효모에서 전사는 조절 프로모터에 의한 집중식 전사 (focused transcription)와 구성적 프로모터에 의한 분산식 전사 (dispersed transcription)로 구분할 수 있다 (Struhl 1986, Juven-Gershon and Kadonaga 2010).

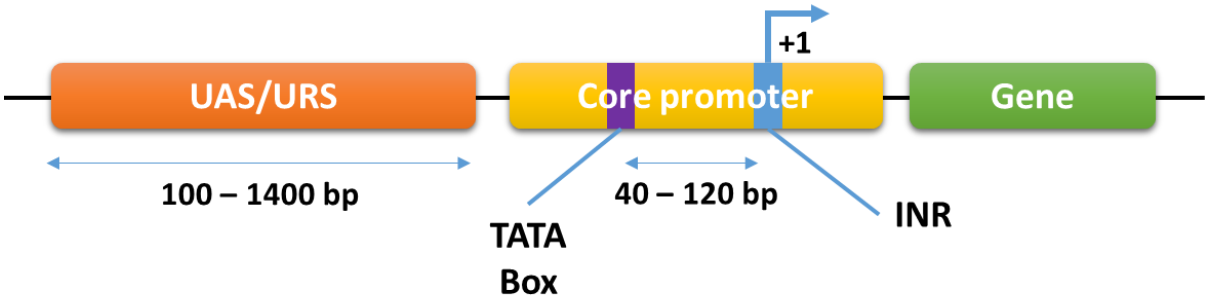

그림 1. 일반적인 효모 프로모터의 구조.

1.2 상부 시스 활성 요소 (Upstream *cis*-acting promoter elements)

효모의 핵심 프로모터 부위의 상부에는 다양한 자극에 대해 전사를 조절할 수 있는 부가적 조절 서열이 위치하는데 이를 시스 조절 요소 (*cis*-regulatory elements) 라고 한다. 이러한 요소들은 약 10~30 bp 정도의 길이를 갖는 짧은 서열로서 전사조절 인자 (transcriptional factor)가 결합하여 유전자의 발현을 조절하는데 있어 중요한 역할을 담당한다 (Ptashne and Gann 1997, Hahn and Young 2011). 효모의 몇몇 프로모터는 특정 자극에 대한 하나의 시스 조절 요소를 포함하는 단순한 구조를 갖고 있지만 일부 프로모터는 여러 개의 반복된 시스 조절 요소를 갖고 있으며 반복되는 수에 따라 전사에 대한 반응도 달라지는 양상을 나타낸다 (Hahn and Young 2011). 따라서 최근에는 효모의 합성생물학적 이용을 위해 적절한 시스 조절 요소가 포함된 맞춤 조절 합성 프로모터의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다.

1.3 양방향 프로모터 (Bidirectional promoter)

일반적으로 효모에서 각 유전자는 각각의 프로모터에 의해 발현을 조절 받게 된다. 하지만 서로 반대방향으로 전사되는 인접한 두 유전자가 하나의 프로모터에 의해

조절되는 경우가 존재하는데 가장 대표적인 것이 갈락토오스 (galactose)에 의해 발현 유도되는 GAL 프로모터 (P_{GAL})이다. *GAL10* 유전자와 *GAL1* 유전자는 서로 반대방향으로 전사되고 두 유전자의 전사개시 자리 사이에 유전자의 발현을 조절하는 약 600 bp 정도의 GAL 프로모터가 존재한다. 글루코오스 (glucose) 존재 시에는 비활성화되는 P_{GAL}는 갈락토오스에 의해 발현 유도되어 두 유전자의 발현을 개시한다 (West, Yocum et al. 1984). 이러한 양방향 프로모터 (bidirectional promoter)는 효모의 합성생물학이나 대사공학적 이용에 있어서 유전자 발현에 필요한 DNA 서열의 길이를 줄이고 두 개의 유전자를 동시에 조절할 수 있다는 장점을 갖고 있어 널리 이용되고 있다 (Neil, Malabat et al. 2009).

그림 2. 양방향 활성을 갖는 GAL 프로모터의 구조.

2. 효모 프로모터의 종류와 특성

2.1 구성적 프로모터 (Constitutive promoters)

구성적 프로모터는 주로 세포 성장의 모든 단계에서 항상 일정하게 발현되는 유전자들에서 발견된다. 해당과정, 세포 구조, 전사와 번역 같은 세포 내 중추적인 역할을 담당하는 단백질들을 암호화하는 유전자들이 이러한 구성적 프로모터를 보유하는 것으로 알려져 있다. 이러한 프로모터에 의한 유전자의 전사는 외부환경이나 성장단계에

영향 받지 않고 거의 일정하게 유지되므로 대사공학에서 매우 유용하게 이용되고 있다.

*S. cerevisiae*에서 다양한 발현 세기를 나타내는 몇몇 구성적 프로모터의 특성은 잘 알려져 있다. 특히 해당과정에 관여하는 효소들의 유전자인 *PGK1, TPI1, PDC1, ADH1, TDH3, PYK1*의 프로모터들과 번역 신장 인자 (translation elongation factor, *TEF1* and *TEF2*), cytochrome c isoform (*CYC1*), actin (*ACT1*)의 프로모터들은 그 특성이 밝혀져 있어 대사공학에 있어 유전자 발현을 위한 도구로서 많이 사용되고 있다 (DeMarini, Carlin et al. 2001). 하지만 이들 프로모터의 발현 세기는 플라스미드 (plasmid) 형태로 이용하였을 경우와 염색체 내에 삽입할 경우 또는 어떠한 리포터 단백질을 이용하여 분석하는가에 따라 조금씩 달라진다는 보고가 있다. 최근에 *S. cerevisiae*의 구성적 프로모터들의 발현 세기를 비교한 Partow와 Sun의 연구에서 일반적으로 대부분의 구성적 프로모터들의 활성은 탄소원에 따라 달라진다는 것이 밝혀졌다 (Partow, Siewers et al. 2010, Sun, Shao et al. 2012). 글루코오스를 이용하는 회분식 배양 (batch cultivation)에서 각 프로모터들은 다음과 같은 순서의 발현 세기를 나타냈다.

$$\mathbf{P_{TEF1} \sim P_{PGK1} \sim P_{TDH3} > P_{TPI1} \sim P_{PYK1} > P_{ADH1} > P_{HXT7}}$$

하지만 글루코오스가 전부 소모된 후에 즉, 세포가 완전한 호흡대사 (respiratory metabolism)로 들어갈 경우 각 프로모터의 발현 세기는 이전에 보였던 순서와 다른 양상을 보였다.

$$\mathbf{P_{TEF1} \sim P_{HXT7} > P_{PGK1} > P_{TPI1} \sim P_{TDH3} > P_{PYK1} \sim P_{ADH1}}$$

탄소원이나 산소 유용성과 관계없이 P_{TEF1}는 항상 높은 활성을 나타냈고, P_{CYC1}과 P_{ADH1}은 낮은 활성을 유지하였다. 그리고 P_{PYK1}과 P_{TDH3}의 경우 탄소원에 따라 활성의 변화가 있지만 같이 측정한 다른 프로모터들과 비교하면 중간 정도의 활성을 보였다.

구성적 프로모터는 세포의 성장단계나 특정 자극에 상관없이 유전자를 일정하게

발현시킬 수 있는 장점이 있지만 지금까지 보고되어 왔던 조건 외에 다른 환경적 조건에 적용하였을 때 그 발현이 변화할 수 있는 가능성이 있다는 것에 유의해야 한다.

2.2 조절 프로모터 (Regulated or promoters)

조절 프로모터는 외부환경의 변화 혹은 특정 자극에 대해 반응하여 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 이다. 이러한 프로모터는 주로 시스 조절 요소에 전사활성인자 (transcriptional activator)또는 전사억제인자 (transcriptional repressor)가 결합하여 유전자의 발현을 조절하게 된다. 특정 자극에 대해 전사조절인자가 프로모터 상부 시스 조절 요소에 결합하거나 결합되어 있던 인자의 해리에 따라 프로모터 부위의 형태가 변화하게 되고 이러한 변화에 의해 유전자 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. 대사공학에서 이러한 조절 프로모터는 다양하게 이용되고 있는데 특히, 원하는 산물을 생합성 하는 회로에서 특정 유전자가 높은 활성으로 일정하게 발현될 경우 그 부산물 또는 중간대사체가 세포에 독성을 나타내거나 세포 성장에 영향을 주어 원하는 산물의 생산이 오히려 감소하는 역효과를 보이기도 한다. 따라서 이러한 생합성 회로에서 일부 유전자 발현을 조절하기 위해 다양한 조절 프로모터들이 사용되고 있다 (Da Silva and Srikrishnan 2012). 조절 프로모터의 사용은 최종 산물생산 과정에 있어서 특정 시간 또는 특정 인자의 첨가에 의해 세포의 성장에 대한 영향을 감소시키면서 회로의 활성을 조절할 수 있는 장점이 있다.

조절 프로모터를 이용한 전사 수준에서 유전자 발현의 조절은 프로모터의 종류에 따라 유도인자 (inducer)의 첨가 또는 세포성장 시기에 따른 특정 대사산물의 축적이나 영양분 고갈 등 다양한 방법에 의해 조절될 수 있다. 대표적인 예로 갈락토오스 대사에 필수적인 *GAL4*, *GAL10* 유전자의 프로모터인 GAL 프로모터 (P_{GAL})가 있다. 이 프로모터는 글루코오스가 존재할 경우 활성이 억제 되었다가 갈락토오스의 첨가에 의해 강한 활성을 나타낸다. *S. cerevisiae*에서 GAL 프로모터는 핵심 프로모터

상부에 위치한 Gal4 결합부위에 의해 조절되며 이러한 조절 시스템은 대사공학적으로 이미 다양한 산물의 생산을 위해 이용되고 있다 (Hawkins and Smolke 2006, Hawkins and Smolke 2008). 하지만 탄소원이 달라짐에 따라 세포 전체의 신호 전달 네트워크도 변화된다는 단점이 있다. 갈락토오스 외에도 말토오스 (maltose)나 수크로오스 (sucrose)같은 당에 의해 조절되는 프로모터들도 알려져 있다 (Park, Shiba et al. 1993, Finley, Zhang et al. 2002).

특정 영양분에 의해 조절되는 프로모터로는 세포 내 인산 (phosphate) 농도에 의해 조절되는 *PHO5* 유전자의 프로모터 (P_{PHO5}), 필수 아미노산의 하나인 메티오닌 (methionine)에 의해 억제되는 *MET25*, *MET3* 유전자의 프로모터 (P_{MET25}, P_{MET3}), 글루코오스에 의해 조절되는 *ADH1*의 프로모터 (P_{ADH1}) 등이 있다. *CUP1* 유전자의 프로모터 (P_{CUP1})도 조절 프로모터로서 종종 이용되고 있는데, P_{CUP1}은 세포 내 구리 항상성 (copper homeostasis) 유지를 위한 유전자의 프로모터로서 구리 이온의 첨가에 의해 활성이 상향 조절된다. 이 프로모터 역시 상부에 전사 활성을 조절하는 인자의 결합 부위가 존재하여 세포 내 구리 이온의 상태에 따라 유전자 발현을 조절한다 (Koller, Valesco et al. 2000).

특정 영양분 고갈에 의한 유전자 발현의 조절은 세포가 성장하면서 자체적으로 발현이 조절되므로 비싸거나 독성이 있는 유도체를 첨가하는 방식의 프로모터를 사용하는 방식보다 분명한 장점을 갖고 있다. 따라서 이와 같은 자체 유도 (self-inducing) 프로모터들에 대한 연구는 이전부터 많이 진행되어 왔다 (Sledziewski, Bell et al. 1990, Abe 2007). 세포가 성장하면서 받게 되는 온도와 압력의 변화, 산소농도 등 다양한 물리적 자극에 의해 조절될 수 있는 유전자들의 프로모터들이 대사공학적으로 이용될 수 있는데, 온도변화에 따라 발현이 변화하는 *SIR3* 유전자의 프로모터(P_{SIR3}), 산소 결핍에 의해 발현이 유도되는 *DAN1* 프로모터 (P_{DAN1}) 등이 대표적 이다. P_{SIR3}는 35℃에서는

프로모터의 활성이 없지만 25℃로 온도를 낮추게 되면 활성을 나타내는 프로모터로서 여러 면에서 장점이 있지만 반응이 상당히 느리다는 단점이 있다 (Sledziewski, Bell et al. 1990). 그리고 P_{DAN1}는 산소 농도가 높을 경우 활성이 억제 되고 산소가 고갈되면 유전자 발현을 유도한다고 알려져 있다 (Abe 2007). P_{DAN1}는 전체적으로 일정한 산소 농도를 유지하기 힘든 대용량 공정에서 유용하게 이용될 수 있다.

Regulatory stimulus	Promoter	Induction	Repression
Nutrient	P_{MET3}/P_{MET25}	Absence of methionine	Methionine
Nutrient	P_{GAL1}/P_{GAL10}	Galactose	Glucose
Nutrient	P_{PHO5}	Phosphate depletion	
Nutrient	P_{ADH2}	Glucose depletion	Glucose
Nutrient	P_{HXT7}	Glucose depletion	
Nutrient	P_{CUP1}	Addition of copper ions	
Physical	P_{SIR3}	25 ℃	35 ℃
Physical	P_{DAN1}	Oxygen depletion	

표1. *Saccharomyces cerevisiae*의 조절 프로모터 종류와 특성

3. 이종 프로모터 (Heterologous promoters)

일반적으로 효모에서 대사회로를 구축함에 있어 다른 종의 프로모터는 잘 사용하지 못하였다. 다른 종에서 효모에 이용할 수 있는 프로모터를 찾는 것도 어려웠지만 효모에 적용하였을 때 발현 세기가 변화하거나 예상하지 못한 조절을 받을 수 있기 때문이다. 하지만 이종 프로모터의 사용은 많은 유전자 발현 카세트를 염색체 내에 삽입할 경우 내부 DNA 서열과의 유사성을 피해 원하는 부위로 삽입할 수 있다는

장점이 있다. 가장 잘 알려진 이종 프로모터의 예로 유전자 발현 카세트의 선택적 유전자 표지 (selectable marker)에 이용되는 *Ashbya gossypii*의 P_{TEF1}이 있다 (Gueldener, Heinisch et al. 2002). 이러한 이종 프로모터의 사용은 효모 내부 P_{TEF1}의 자리에 카세트가 삽입되는 것을 방지할 수 있다.

이종 프로모터 이용의 또 다른 장점은 효모 내부의 전사 네트워크에 영향을 받지 않고 유전자 발현을 조절할 수 있다는 것이다. 몇몇 진핵세포에서 강한 발현세기를 나타낸 바이러스성 프로모터인 P_{CMV} (human cytomegalovirus promoter)를 효모에 적용하여 강한 발현을 확인한 보고가 있었다 (Becskei, Seraphin et al. 2001). 하지만 이러한 프로모터는 실험 조건이나 대사 유형에 따라 조금씩 다른 결과를 보이기도 하고 P_{CMV}가 효모 전사 네트워크와 완전히 독립적인 것이 아니고 특정 조건에서 조절 받을 수도 있다는 것이 밝혀졌다 (Romero-Santacreu, Orozco et al. 2010). 따라서 효모에서 이종 프로모터를 이용하기 위해서는 프로모터의 조절 특성에 대한 분석이 반드시 선행되어야 한다. 또한 최근에는 이종 프로모터뿐만 아니라 이종 프로모터의 특정 조절 부위를 이용한 하이브리드 프로모터를 구축하여 유전자 발현을 조절하는 연구들도 많이 진행되고 있다.

4. 프로모터 엔지니어링 (Promoter engineering)

발현 세기와 조절 같은 프로모터의 특성을 최적화 하거나 원하는 대로 변형하기 위해 프로모터 서열을 변경하는 모든 방법을 프로모터 엔지니어링이라 한다. 프로모터 엔지니어링은 프로모터 특정 부위의 결실이나 전사인자 결합 부위의 증폭, 다른 프로모터들의 조합을 이용하는 합리적인 방식 (rational method)과 프로모터 전체 혹은 특정 부위에 무작위적인 돌연변이를 일으켜 프로모터의 특성을 변화시키는 무정향성 방식 (undirected method)으로 구분된다 (Blazeck and Alper 2013).

4.1 내생 프로모터의 변형 (Modification of endogenous promoter)

핵심 프로모터 부위와 상부 조절 요소로 구성되는 효모 프로모터의 모듈 구조는 합리적 방식의 프로모터 엔지니어링을 가능하게 만든다. 이러한 합리적 방식의 프로모터 엔지니어링의 기본적인 전략은 상부 조절 요소의 수를 변화시켜 프로모터의 특성을 원하는 방향으로 변형 시키는 것이다.

간단하게 프로모터의 5′ 말단의 조절 부위를 제거하는 것으로도 프로모터의 활성을 변화 시킬 있다. P_{ADH1}의 활성은 글루코오스가 고갈되거나 비발효성 탄소원을 이용하여 성장할 때 감소한다. 하지만 프로모터 상부의 약 1,100 bp (-414 부위에서 -1,500 bp 까지)를 제거한 P_{ADH1}의 활성은 글루코오스와 상관없이 일정하게 유지된다 (Ruohonen, Aalto et al. 1995). 또한 좀 더 세밀한 조절을 해야 할 경우, 하나 혹은 그 이상의 시스 활성 요소를 핵심 프로모터 상부에 결합시켜 이용할 수 있다. 예를 들어, 동일하거나 혹은 다른 유형의 조절 부위를 핵심 프로모터 상부에 여러 개 결합하여 다양한 발현세기를 나타낼 수 있게 하거나 프로모터 조절의 특성을 변화 시킬 수 있다. Blazeck은 서로 다른 활성을 갖는 내생 프로모터들의 핵심 프로모터 부위와 발현 세기를 조절하는 여러 상부 활성 요소들을 결합하여 약한 활성을 갖는 프로모터인 P_{CYC1}을 강한 활성을 갖는 프로모터로 변화 시킬 수 있음을 보였다 (Blazeck and Alper 2013). 이러한 전략은 P_{TEF1}과 P_{TDH3}와 같이 강한 활성의 프로모터도 약 40~50 %까지 활성을 증가 시킬 수 있다.

이외에도 프로모터 서열에 직접적인 변화를 주는 대신에 효모 내의 프로모터 활성 유도인자 (inducer)의 농도를 일정하게 유지되도록 하여 프로모터의 활성을 조절하는 연구도 보고 되었다. Napp과 Da Silva는 GAL 프로모터의 유도인자로 사용되는 갈락토오스의 높은 비용 문제를 해결하기 위한 방법으로 효모의 갈락토오스 대사에 관련된 유전자를 제거하여 세포 내 갈락토오스가 소비되는 것을 감소시켜 적은 양으로도

프로모터의 활성을 유지 할 수 있음을 보였다 (Napp and Da Silva 1994).

4.2 하이브리드 프로모터 (hybrid promoters)

하이브리드 프로모터는 내생의 다른 프로모터 혹은 다른 종의 프로모터 일부분들을 결합 시킨 프로모터이다. 이러한 프로모터는 주로 이종의 프로모터 조절 부위와 상동 핵심 프로모터 부위의 조합으로 구축된다. 하이브리드 프로모터의 개발에 있어서 중요한 핵심은 효모 본연의 전사 네트워크에 방해 받지 않는 유전자 조절 도구가 필요하다는 것이다. 대표적인 하이브리드 프로모터로는 박테리아에서 알려진 *tet* 작동자 (operator) 서열을 이용한 tet-off/tet-on 시스템이 있다. 이 시스템은 효모의 핵심 프로모터 부위와 *tet* 작동자 서열을 결합한 프로모터로서 테트라사이클린 (tetracycline)의 첨가에 따라 유전자 발현을 억제하거나 활성화 시킬 수 있다 (Gari, Piedrafita et al. 1997). 그리고 Purvis는 인간 세포의 안드로젠 반응 서열 (androgen-responsive sequence)과 효모의 구성적 프로모터인 P_{PGK1}의 핵심 프로모터 부위를 결합시켜 만든 하이브리드 프로모터를 이용하여 안드로젠의 첨가로 세포 성장에 영향을 주지 않으면서도 유전자의 발현을 증가시킬 수 있음을 보였다 (Purvis, Chotai et al. 1991). 그 밖에도 식물의 광수용체와 효모의 GAL 프로모터를 결합하여 어둠 속에서는 활성이 없고 빛에 노출되면 활성을 나타내는 빛 유도 프로모터 (light-inducible promoter)도 개발 되었다 (Shimizu-Sato, Huq et al. 2002).

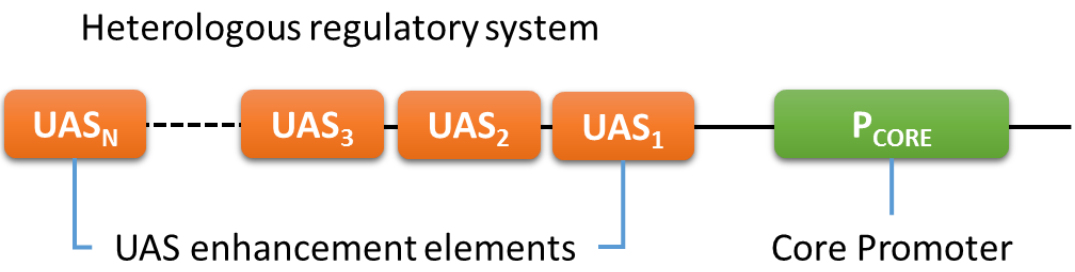

그림 3. 하이브리드 프로모터의 구조

4.3 최소화 프로모터 (Minimal promoter)

효모는 각 유전자의 발현을 위해 각각의 프로모터가 필수적이다. 따라서 효모에서 대사회로를 구축할 경우 이용되는 모든 유전자는 각각의 프로모터와 함께 준비되어야 한다. 일반적으로 이용되고 있는 효모 본연의 프로모터는 그 크기가 박테리아에 비해 거의 10배 정도 크다 (Singh 2014). 따라서 이러한 효모 프로모터의 크기는 합성생물학에서 효모를 이용하는데 있어 커다란 제약 중의 하나이다. 그래서 최근에는 효모의 프로모터 부위에서 핵심 요소들을 구성하여 최소화한 프로모터가 개발되고 있다. Redden과 Alper는 합성생물학적으로 효모의 최소화된 프로모터를 만들기 위해 공통 일치 서열 (consensus sequence)과 전사개시 자리, TATA box로 구성된 최소화된 핵심 요소들과 상부 활성 서열을 각각 합성하여 하이브리드 라이브러리를 구축하고 그 활성을 분석하여 가장 최소화되면서도 활성이 강한 효모 프로모터를 만들었다. 이들이 새롭게 합성한 프로모터는 기존의 효모 프로모터와 비교하여 크기가 약 80 % 감소하였지만 그 활성은 거의 유사하게 나타났다 (Redden and Alper 2015).

고찰

최근 대사공학과 합성생물학이 발전하면서 효모를 유용한 대사물질이나 재조합 단백질을 대량생산하는 플랫폼 균주로 이용하고 있다. 하지만 좀 더 효율적이고 고기능을 갖춘 효모 균주를 개발하기 위해서는 세포 내에서 일어나는 다양한 대사들을 우리가 원하는 시기에 원하는 방향으로 변화 시킬 수 있는 기술이 필수적이며, 이러한 조절 기술 중의 하나가 프로모터 엔지니어링이라고 할 수 있다. 물론 프로모터만 조절한다고 해서 모든 대사회로를 제어할 수 있는 것은 아니다. mRNA 안정성, 번역 활성, 단백질의 이동위치와 활성 등 다른 분자적 수준의 조절도 조화롭게 이루어져야만 한다. 하지만 분명한 것은 잘 알려진 프로모터를 최적화하고 맞춤화 하여 특정 유전자들의 발현을 조절하는 것은 대사공학과 합성생물학적으로 효모를 이용하는 것에 대한 매우 가치 있는 도구가 될 수 있다는 것이다. 효모에 존재하는 다양한 구성적 프로모터와 조절 프로모터들이 비교적 잘 알려져 있고, 이러한 프로모터를 기본으로 하여 맞춤형 프로모터 개발이 시도되고 있다. 다른 종의 조절 시스템과 효모 핵심 프로모터를 결합한 하이브리드 프로모터에서 최근에 보고된 최소화 프로모터까지 다양한 조건에 이용될 수 있는 프로모터들이 개발되고 있지만 여전히 특정 대사공학적 조건에 부합하는 프로모터에 대한 수요가 있다. 따라서 효모를 이용한 저비용 고효율의 생물공정 개발을 위해 프로모터 엔지니어링은 필수적이고 유용한 수단이 될 것이다.

인용문헌

Abe, F. (2007). "Induction of DAN/TIR yeast cell wall mannoprotein genes in response to high hydrostatic pressure and low temperature." FEBS Lett **581**(25): 4993-4998.

Becskei, A., B. Seraphin and L. Serrano (2001). "Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion." EMBO J **20**(10): 2528-2535.

Blazeck, J. and H. S. Alper (2013). "Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level." Biotechnol J **8**(1): 46-58.

Borodina, I. and J. Nielsen (2014). "Advances in metabolic engineering of yeast Saccharomyces cerevisiae for production of chemicals." Biotechnol J **9**(5): 609-620.

Da Silva, N. A. and S. Srikrishnan (2012). "Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in Saccharomyces cerevisiae." FEMS Yeast Res **12**(2): 197-214.

DeMarini, D. J., E. M. Carlin and G. P. Livi (2001). "Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in Saccharomyces cerevisiae." Yeast **18**(8): 723-728.

Finley, R. L., Jr., H. Zhang, J. Zhong and C. A. Stanyon (2002). "Regulated expression of proteins in yeast using the MAL61-62 promoter and a mating scheme to increase dynamic range." Gene **285**(1-2): 49-57.

Gari, E., L. Piedrafita, M. Aldea and E. Herrero (1997). "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in Saccharomyces cerevisiae." Yeast **13**(9): 837-848.

Gueldener, U., J. Heinisch, G. J. Koehler, D. Voss and J. H. Hegemann (2002). "A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast." Nucleic Acids Res **30**(6): e23.

Hahn, S. and E. T. Young (2011). "Transcriptional regulation in Saccharomyces cerevisiae: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators." Genetics **189**(3): 705-736.

Hawkins, K. M. and C. D. Smolke (2006). "The regulatory roles of the galactose permease and kinase in the induction response of the GAL network in Saccharomyces cerevisiae." J Biol Chem **281**(19): 13485-13492.

Hawkins, K. M. and C. D. Smolke (2008). "Production of benzylisoquinoline alkaloids in Saccharomyces cerevisiae." Nat Chem Biol **4**(9): 564-573.

Juven-Gershon, T. and J. T. Kadonaga (2010). "Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery." Dev Biol **339**(2): 225-229.

Koller, A., J. Valesco and S. Subramani (2000). "The CUP1 promoter of Saccharomyces cerevisiae is inducible by copper in Pichia pastoris." Yeast **16**(7): 651-656.

Napp, S. J. and N. A. Da Silva (1994). "Enhanced productivity through gratuitous induction in recombinant yeast fermentations." Biotechnol Prog **10**(1): 125-128.

Neil, H., C. Malabat, Y. d'Aubenton-Carafa, Z. Xu, L. M. Steinmetz and A. Jacquier (2009). "Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast." Nature **457**(7232): 1038-1042.

Park, Y. S., S. Shiba, S. Lijima, T. Kobayashi and F. Hishinuma (1993). "Comparison of three different promoter systems for secretory alpha-amylase production in fed-batch cultures of recombinant Saccharomyces cerevisiae." Biotechnol Bioeng **41**(9): 854-861.

Partow, S., V. Siewers, S. Bjorn, J. Nielsen and J. Maury (2010). "Characterization of different promoters for designing a new expression vector in Saccharomyces cerevisiae." Yeast **27**(11): 955-964.

Ptashne, M. and A. Gann (1997). "Transcriptional activation by recruitment." Nature

386(6625): 569-577.

Purvis, I. J., D. Chotai, C. W. Dykes, D. B. Lubahn, F. S. French, E. M. Wilson and A. N. Hobden (1991). "An androgen-inducible expression system for Saccharomyces cerevisiae." Gene **106**(1): 35-42.

Redden, H. and H. S. Alper (2015). "The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters." Nat Commun **6**: 7810.

Romero-Santacreu, L., H. Orozco, E. Garre and P. Alepuz (2010). "The bidirectional cytomegalovirus immediate/early promoter is regulated by Hog1 and the stress transcription factors Sko1 and Hot1 in yeast." Mol Genet Genomics **283**(5): 511-518.

Ruohonen, L., M. K. Aalto and S. Keranen (1995). "Modifications to the ADH1 promoter of Saccharomyces cerevisiae for efficient production of heterologous proteins." J Biotechnol **39**(3): 193-203.

Shimizu-Sato, S., E. Huq, J. M. Tepperman and P. H. Quail (2002). "A light-switchable gene promoter system." Nat Biotechnol **20**(10): 1041-1044.

Singh, V. (2014). "Recent advancements in synthetic biology: current status and challenges." Gene **535**(1): 1-11.

Sledziewski, A. Z., A. Bell, C. Yip, K. Kelsay, F. J. Grant and V. L. MacKay (1990). "Superimposition of temperature regulation on yeast promoters." Methods Enzymol **185**: 351-366.

Struhl, K. (1986). "Constitutive and inducible Saccharomyces cerevisiae promoters: evidence for two distinct molecular mechanisms." Mol Cell Biol **6**(11): 3847-3853.

Struhl, K. (1989). "Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast." Annu Rev Biochem **58**: 1051-1077.

Sun, J., Z. Shao, H. Zhao, N. Nair, F. Wen, J. H. Xu and H. Zhao (2012). "Cloning and

characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in Saccharomyces cerevisiae." Biotechnol Bioeng **109**(8): 2082-2092.

West, R. W., Jr., R. R. Yocum and M. Ptashne (1984). "Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG." Mol Cell Biol **4**(11): 2467-2478.