연구성과

인공적인 산화스트레스내성 코리네박테리움

가톨릭대학교 김 필 교수

Artificial oxidative stress-tolerant *Corynebacterium glutamicum* / AMB Express 4:15 (2014)

Adaptive evolution of *Corynebacterium glutamicum* resistant to oxidative stress and its global gene profiling / Biotechnol. Lett. 35(5):709-717 (2013)

1. 연구배경

코리네박테리움은 20세기 들어서 산업적으로 가장 많이 배양되고 있는 산업용 미생물이다. 글루탐산을 비롯한 각종 아미노산, IMP 등 핵산의 대량 생산 뿐만 아니라 최근에는 다양한 바이오화학물의 생산용 호스트로써 코리네박테리움을 사용하고 있다. 이러한 코리네박테리움은 토양에 분포하는 그람 양성균이며, 인간에게 안전한 미생물이기 때문에 더욱 그 가치가 높아가는 추세이다. 산업공정에서의 미생물은 자연계와는 다른 종류의 인공적인 스트레스가 발생할 수 있다. 지나치게 높은 기질/산물의 농도, 온도, pH, 삼투압, 강제공급에 의한 산화 등 미생물이 맞서야 하는 환경조건이 자연계에서와는 매우 다르며, 이에 더하여 인위적인 특정 영양성분의 고갈에 의한 급격한 생리변화가 따르기도 한다. 이러한 인공적인 환경에 의한 산업미생물에 대한 스트레스는 세포생장저하나 산물생산활성 감소, 심지어 세포 파쇄에 의한 거품발생과 같은 현상으로 나타나므로, 산업적 관점에서는 스트레스에 내성을 갖는 산업미생물이 선호된다. 보다 높은 생산성을 추구하는 산업계 특성상 더 많은 이득이 발생할 수 있기 때문이다. 활성산소(ROS)는 산소호흡을 하는 모든 생물에서 에너지 생산을 위한 전자전달과정에서 부득이 발생하는 불완전 산화물들을 지칭한다. ROS는 반응성이 높아 세포 내 핵산이나 단백질에 손상을 주므로, 돌연변이, 대사경로의 파괴, 생장속도 저하를 일으키는 세포내 산화스트레스 인자이다. 이러한 산화스트레스의 경감은 보다 활발한 에너지 대

사와 생리활성을 유지시킬 수 있으므로, 산업용으로 활용할 가치가 높은 미생물의 생산성을 더욱 증진시킬 수 있기 때문에, 이를 확보하고자 연구를 시작하였다.

2. 연구결과

산업용 안전성 균주인 코리네박테리움의 산화스트레스 내성을 인공적으로 증진시키려면, 미생물 스스로 지니고 있는 방어기전을 탐색하여 이를 인공적으로 강화시킬 필요가 있었다. 이를 위해 코리네박테리움을 산화스트레스의 일종인 과산화수소(H_2O_2)를 포함하는 스트레스조건에서 장시간 연속배양하였다. 3개월에 걸친 연속배양과정에서 코리네박테리움은 점차 산화스트레스에 대한 내성이 증진하여, 초기에 0.5 mM농도의 과산화수소수에서 출발하여 최종적으로는 10 mM의 과산화수소 조건에서도 생장할 수 있는 후손을 얻어낼 수 있었다.

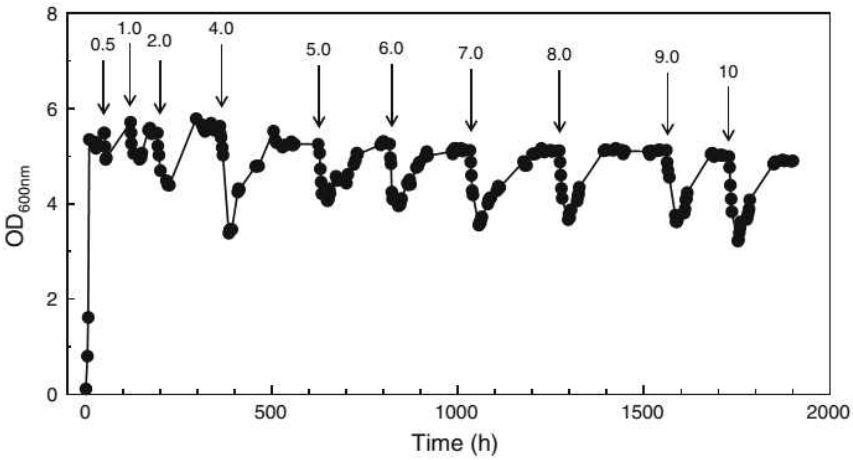

그림 1. 산화스트레스 대응 코리네박테리움의 적응진화

이렇게 얻어낸 산화스트레스 진화형 코리네박테리움은 원형 코리네박테리움과 비교하였을 때, 과산화수소 뿐 아니라 다른 산화스트레스 인자들에 대해서나 소수성스트레스, 산-염기 스트레스, 심지어는 항생제에 의한 스트레스까지 내성이 증진된 사실을 발견하였다.

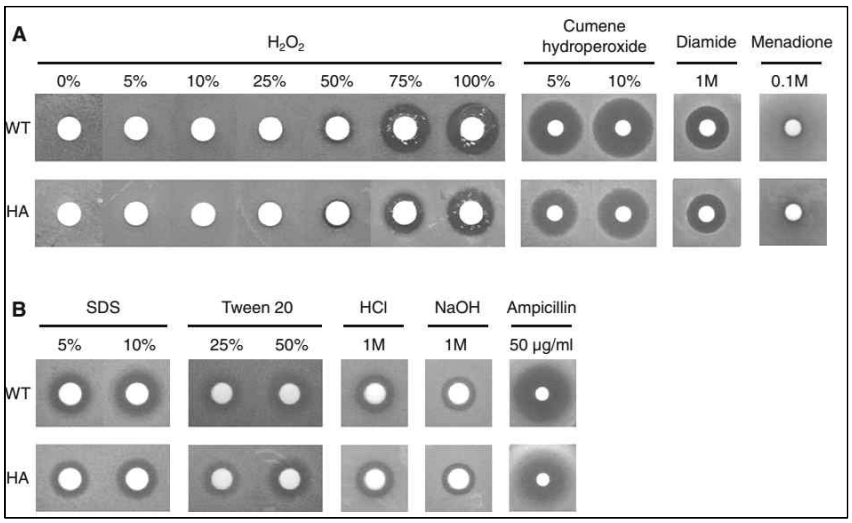

그림 2. 적응진화된 코리네박테리움의 여러 가지 스트레스 내성 증대

진화된 유전형질을 알아내기 위해 진화형과 부모형 코리네박테리움의 전사형질을 비교한 결과 전체 3,058 유전자 전사형질 중 2,187개의 전사형질이 바뀌어 있었으며, 특히, 해당과정이나 포도당합성과정 경로가 낮아진 대신에 TCA나 glyoxylate 경로가 증폭되었고, 다수의 DNA 수선단백질, 산화손상 수선단

백질, 전자전달과정의 단백질들 역시 함께 전사증폭됨을 알 수 있었다.

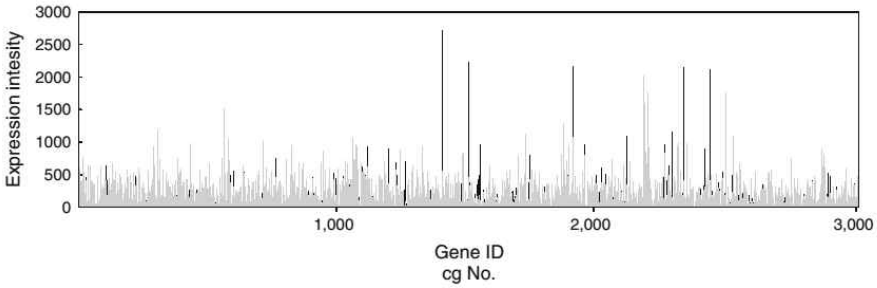

그림 3. 산화스트레스 적응진화된 코리네박테리움의 전사체 비교분석

인공적으로 부모형 코리네박테리움의 산화스트레스에 대한 내성을 증진시키기 위하여, 진화형 코리네박테리움의 전사증폭된 유전자들 중 특히 증폭되었던 pca분해경로의 효소군을 선별하여 각각 벡터에 클로닝하였다. Pca 분해경로는 benzoic acid, caffeic acid 등 방향족 화합물을 분해하는 경로로써, protocatochuate를 통해 결국 succinyl-CoA까지 변화하여 중심탄소회로로 연결된다.

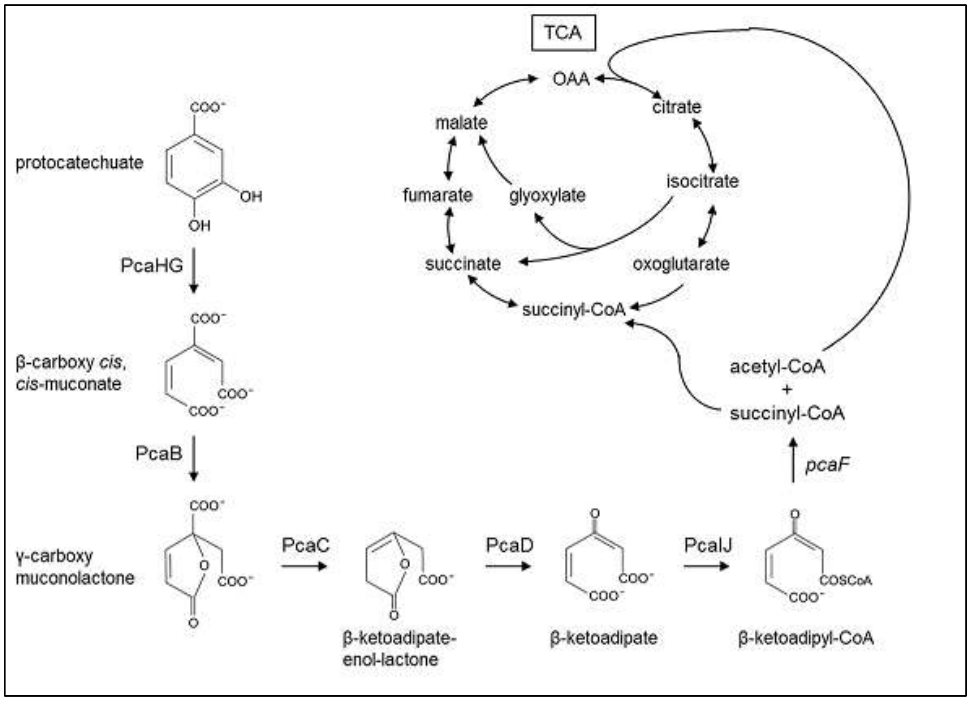

그림 5. Pca 분해경로

이런 pca 유전자군을 인공적으로 발현하도록 설계된 부모형 코리네박테리움은 산화스트레스 환경에서 pca 유전자군을 발현하지 않는 부모형 코리네박테리움에 비하여 생장

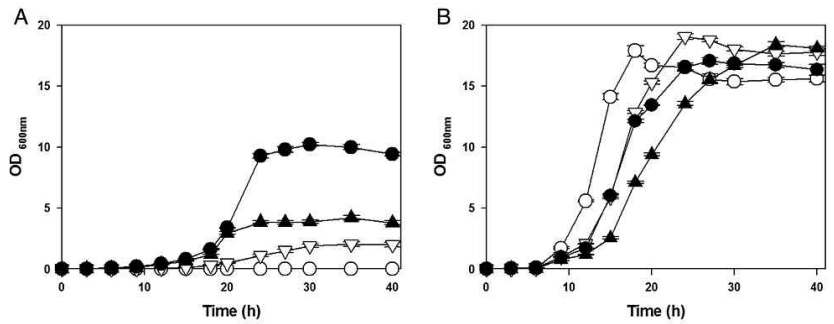

그림 6. Pca 유전자군 도입에 의한 인공적 산화스트레스 내성 코리네박테리움

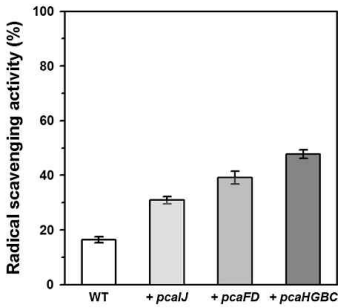

그림 7. Pca 유전자군 도입에 의한 세포질의 ROS-포획능력 증대

이 가능하였다. 이렇게 획득한 산화스트레스 내성의 원인으로는 세포질 안에서의 ROS 제거능력이 증가한 것이 그 원인으로 추정되었다.

3. 연구의 성과 및 의의

산업적으로 가장 많이 사용되는 미생물의 발효조건에서의 스트레스를 인공적으로 감소시킬 수 있음을 보였으므로, 여러 가지 화학물을 생산하는 공정에 적용하여 생산성을 높게 유지하는 산업적 균주로의 활용이 가능하게 되었다.

ROS가 스트레스의 원인임을 밝힘으로써, 이를 제거하는 능력을 도입하는 방안도 제시하였다. 이 연구의 결과를 계속 활용하여, 인공적으로 에너지수준을 높인 (그러나 ROS 스트레스는 낮추어 생장은 지속될 수 있는) 안전성 산업균주 코리네박테리움의 개발과 독성 산물 (i.e., cinnamaldehyde)에 대한 내성이 향상된 코리네박테리움의 개발을 후속연구에서 계속 활용할 수 있다.

그림 7. 인공적 산화스트레스 내성을 지닌 안전성 산업균주 코리네박테리움의 개발