

남극유래 저온적응 방선균의 항생물질 관련
생합성 연구 및 CYP 단백질의 응용

Antibiotic-related biosynthetic study of Antarctic
cold-adaptation Streptomyces and their CYP's
application



선문대학교 산학협력단

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “ 남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴 에 관한 연구(본과제명)” 과제의 위탁연구 “남극유래 저온적응 방선균의 항생물질 관련 생합성 연구 및 CYP 단백질의 응용 에 관한 연구(위탁과제명)” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자	:	박 현
위탁연구기관명	:	선문대학교
위탁연구책임자	:	오 태 진
위탁참여연구원	:	행 라 즈
“	:	비 카 스
“	:	한 소 라
“	:	유 상 철
“	:	김 기 화

요 약 문

I. 제 목

남극 유래 저온적응 방선균의 항생물질 관련 생합성 연구 및 CYP 단백질의 응용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

II-1. 극지방선균 유래 신기능 CYP 증명

II-2. 극지방선균 유래 CYP 단백질 엔지니어링을 이용한 활성의 극대화

II-3. 극지방선균 유래 CYP를 이용한 대사공학으로 신물질 창출

III. 연구개발의 내용 및 범위

III-1. 신기능 CYP 단백질의 확보와 기능 증명 및 크리스탈 제작과 구조 분석

III-2. CYP 단백질의 전자전이시스템 구축과 기질유연성 분석 및 적용

III-3. CYP 효소반응을 이용한 신물질 창출 및 구조 분석

IV. 연구개발결과

IV-1. 44종의 solubel한 단백질로부터 3종의 단백질 구조를 분석하여 투고함

IV-2. 105종의 CYP 관련 전자전이시스템과 기질유연성에 대한 분석을 완료하여 일부 변형 시도함

IV-3. 3종의 CYP 효소 반응으로 다양한 유도체를 생산하여 그들의 구조를 확인함

V. 연구개발결과의 활용계획

비극지 토양방선균 유전체와의 비교분석을 통하여 환경(온도) 적응 가능한 이차 대사 생합성에 대한 진화론적 연구에 활용하고자 함. 또한, 특히 CYP 단백질의 새로운 기능을 발굴하여 산업적으로 유용한 타겟 생리활성물질의 구조를 변형시켜 신물질을 생산하고자 함



S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

I. Title

Antibiotic-related biosynthetic study of Antarctic cold-adaptation Streptomyces and their CYP's application

II. Purpose and Necessity of R&D

II-1. Characterization of functionality about Polar Streptomyces-related novel CYP

II-2. Maximization of activity by engineering of Polar Streptomyces-related CYP

II-3. Creation of hybrid compound by metabolic engineering based on Polar Streptomyces-related CYP

III. Contents and Extent of R&D

III-1. Secure/functionalization of novel CYP and crystallization/structure analysis

III-2. Build of electron transport system and analysis of substrate-flexibility on CYP and their application

III-3. Creation/structure analysis of hybrid compound from CYP enzyme reaction

IV. R&D Results

IV-1. We purified 44 soluble CYP and analyzed their 3 kinds of CYP structure

IV-2. We finished analysis about electron transport system and substrate-flexibility on 105 CYP and tried to use for structural change

IV-3. We made several hybrid compound by using 3 kinds of CYP enzyme reaction and confirmed their structure

V. Application Plans of R&D Results

Genome analysis between Polar and non-Polar Streptomyces will be applied for evolution study on environmental (temperature) adaptation-possible secondary metabolite-related biosynthesis. Using the obtained special new CYP proteins, industrial useful hybrid compound will be produced by changing their structure



목 차

제 1 장 서론

- 1-1. 연구개발의 최종 목표
- 1-2. 연구개발의 연차별 연구목표 및 연구 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 2-1. 극지방선균의 다양성 분포에 따른 연구의 당위성 및 중요성
- 2-2. 방선균 유래 CYP 효소의 특징

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 3-1. 극지방선균 유래 신기능 CYP 증명
- 3-2. 극지방선균 유래 CYP 단백질 엔지니어링을 이용한 활성의 극대화
- 3-3. 극지방선균 유래 CYP를 이용한 대사공학으로 신물질 창출

제 4장 연구개발 최종 목표 및 달성도

- 4-1. 연구개발 최종 목표
- 4-2. 연구개발목표 및 달성도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 5-1. 학술적 파급효과 및 추가연구의 필요성
- 5-2. 경제적 파급효과 및 기업화 추진방안

본 문

제 1 장 서론

1-1. 연구개발의 최종 목표

남극유래 저온적응 방선균을 분리·동정하여 그들의 게놈 유전체를 확보·분석한 이후, 이차대사 (항생) 생리활성물질 관련 생합성유전자 집단의 생합성 과정을 해석하고자 함. 또한, 생합성 관련 단백질인 Cytochrome P450 (CYP)의 기능을 증명하고 효소의 활성 및 기질유연성을 극대화하여 신생명자원을 개발할 뿐만 아니라, 신규 생리활성물질을 발굴하여 관련 산업화연구의 모델로 활용하고자 함.

1-2. 연구개발의 연차별 연구목표 및 연구 범위

연차	연구 목표	연구 범위
1차년도 (2014)	극지방남극 이끼 유래 방선균 분리 및 동정	- 극지방방선균 분리, 동정 및 배양
		- 염기서열 분석 및 다양한 신균주 증명
		- 다양한 생리활성 조사 (항균, 항암, 항산화, 항결핵)
		- 극지방방선균 1종의 게놈 확보 및 분석
2차년도 (2015)	이차대사물질 관련 생합성 연구	- 이차대사생리활성 물질 분리
		- 이차대사생리활성 물질 관련 생합성 과정 연구
		- CYP 관련 유전자 확보 및 활성 연구
		- 극지방방선균 2종의 게놈 확보 및 분석
3차년도 (2016)	CYP 단백질 분석 및 산업적 응용	- 저온적응 생합성집단 해석 및 Key 유전자 해석
		- 대사공학을 이용한 신물질 창출
		- 극지방방선균 유래 저온적응 CYP 신기능 증명
		- 단백질모델링을 이용한 CYP 활성 극대화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

2-1. 극지방선균의 다양성 분포에 따른 연구의 당위성 및 중요성

방선균 (Streptomycetes & Actinomycetes)은 대표적인 그람양성 토양미생물로서 현재 사용되고 있는 항생제의 64% 그리고 항암제의 82% 이상이 방선균으로부터 생산되고 있음. 이러한 이차대사산물 관련 연구를 다각도로 진행하고 있지만 대사공학적 접근에 의한 생산성의 한계 등의 문제점을 보임. 그 이유는 아직까지 방선균 내 천연물의 생합성 관련 이차대사경로에 관한 동역학적인 정보가 매우 제한적이며, 조절 기작이 매우 복잡하고, 일차대사와 복잡하게 맞물려 있기 때문으로 사료됨. 따라서 보다 다양한 방선균, 특히 해양 미생물 등의 희귀미생물인 극지방선균들의 유전체 정보를 이용하여 그들 방선균의 생명현상 관련 수많은 유전자들의 변화 및 상호관계의 이해가 필요하다고 판단됨. 방선균은 생리화학적 특징과 토양 특성의 상호 작용에 따라 다양한 분포 특성을 나타냄. 특히 *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptosporangium* 속의 방선균은 하천과 해양 등 주로 수분이 많은 장소에서 많이 분포하고 있음. 또한 방선균의 다양성에 있어서 수평적인 변화보다는 토양 깊이에 따른 수직적 변화가 훨씬 크다는 결과보고와 계절 변화에 따른 분포 밀도 변동도 보고되어 있음. 따라서 남극생물 극지방선균 고유의 생명현상과 방선균 속 다양성 분포 변화를 조사하고 유전체 관련정보의 체계적인 연구가 수행되어야 한다고 생각됨.

2-2. 방선균 유래 CYP 효소의 특징

CYP는 헴과 부수적인 환원효소 구성성분들로 이루어진 다성분계 헤모프로테인로서 박테리아, 세균, 진핵생물 등 살아있는 생물체에서 여러 화학물질들의 산화과정에서 생촉매 역할을 수행하고 있음. 자연에 존재하는 CYP는 생물학적 관점에서 그 활성이 다양하며, 주로 박테리아 CYP는 생물 내부로부터 발생하는 이차대사물질인 지방산이나 항생·항암물질들의 생합성과정과 생분해과정 등에 포함된 산화반응을 촉매하며, 또한 탄소원으로 이용될 수 있는 물질을 얻거나 균독성 물질들의 독성을 제거하는 반응 등에 참여함. 특히 많은 항생·항암제 등을 생산하고 있는 방선균에서 발견된 CYP는 주로 모노옥시지나제 기능인 수산화반응 역할을 담당하며, NADPH-P450 reductase와 FDX와 같은 철-황 단백질을 필요로 함.

기존의 CYP가 생합성 과정 안에서 방향·위치 특이적인 산화반응 등을 촉매하여 그들의 생물학적 활성의 다양성을 제공하는 것 또한 최근에 증명되고 있는 상황임. 그러나 이들 CYP 효소들은 매우 한정적인 기질특이성을 가지며 산화반응의 위치 또한 상당히 다양하기 때문에 먼저 방선균의 CYP 효소들의 특이성을 분류·파악하고 기질유연성이 뛰어난 CYP 효소를 극지방선균으로부터 스크리닝하여 다양한 신규 물질들의 생산에 응용하는 연구가 절실히 요구되고 있는 실정임. 그러나, 방선균 CYP 효소의 유용성이 상당히 높음에도 불구하고 그들

의 특성에 대한 연구는 거의 이루어지지 못했으며, 또한 생화학적인 규명 또한 어려운 것이 현실임. 그 이유는 자연적으로 발생하는 CYP 효소들의 불안정성과 낮은 촉매활성, 그리고 상당히 낮은 단백질 발현 양과 반응의 복잡성, 및 한정적인 기질특이성 등을 들 수 있음. 따라서 CYP에 대한 전반적인 특성 파악에 대한 깊이 있는 연구를 위해 새로운 CYP 효소 등을 극지방선균에서 탐색하여 그들을 이용한 기질유연성 및 촉매활성을 극대화 시킬 수 있는 방법을 모색하여야 할 것임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

3-1. 극지방선균 유래 신기능 CYP 증명

본 연구팀은 지난 2년 (2014 ~ 2015년도) 동안 극지 유래 균주 스크리닝과 게놈 분석을 꾸준히 진행하여 왔으며, 2016년도에 8편의 complete 게놈 관련 논문 (*Bosea* sp. PAMC26642, 223: 38-39; *Hymenobacter* sp. PAMC26628, 223:50-51; *Variovorax* sp. PAMC28711, 225:46-47; *Burkholderia* sp. PAMC28687, 226:16-17; *Microbacterium* sp. PAMC28756, 226:18-19; *Fronidhabitans* sp. PAMC28766, 226:20-21; *Hymenobacter* sp. PAMC26554, 227:19-20; *Mucilaginibacter* sp. PAMC26640, 227:23-24 등)을 Journal of Biotechnology 저널에 투고·완료하였음. 또한, 위와 같은 균주들의 게놈 뿐만 아니라, 현재 본 연구팀에서 확보하고 있는 모든 균주들의 게놈분석 자료를 바탕으로 본 그룹은 다양한 기능의 CYP 유전자 (Self-sufficient CYP 34 종, alkane hydroxylase 8 종, CYP460-amine hydroxylase 5 종, Steroid hydrolyase 18 종, Terpenoid hydrolyase 32 종, Fatty acid hydrolyase 7 종, 및 CYP108B 1 종 등)를 확보하였으며 (Table 1), 그들의 발현과 기능 증명 관련 연구를 꾸준히 진행하여 왔음.

Table 1. 극지 유래 다양한 기능의 특이 CYP 관련 리스트

Function	Type	Sample No.	Sample name	Gene No.	Source
Self-sufficient P450	CYP102	1	SR8	4153	<i>Rhodococcus</i> sp.
		2	22724	5370	<i>Paenibacillus</i> sp.
		3	HSR18	1813	<i>Terrabacter</i> sp.
		4	NP167	562	<i>Curtobacterium</i> sp.
		5	23288	3454	<i>Terribacillus</i> sp.
		6	HSR18	3348	<i>Terrabacter</i> sp.
		7	NP167	1721	<i>Curtobacterium</i> sp.
		8	23288	4351	<i>Terribacillus</i> sp.
		9	HSR45	7263	<i>Dermacoccus</i> sp.
		10	22657	4436	<i>Bacillus</i> sp.
		11	NP108	3009	<i>Rhodococcus</i> sp.

		12	NP78	1859	<i>Streptomyces</i> sp.
		13	NP206	3110	<i>Curtobacterium</i> sp.
		14	22393	126	<i>Bacillus</i> sp.
		15	26561	304	<i>Sphingomonas</i> sp.
		16	23165	947	<i>Bacillus</i> sp.
		17	22965	728	<i>Bacillus</i> sp.
		18	23412	800	<i>Bacillus</i> sp.
		19	23319	498	<i>Bacillus</i> sp.
		20	23215	2798	<i>Bacillus</i> sp.
		21	25034	1065	<i>Bacillus</i> sp.
		22	23447	863	<i>Bacillus</i> sp.
		23	23408	1049	<i>Bacillus</i> sp.
		24	23324	3848	<i>Bacillus</i> sp.
		25	23239	3263	<i>Bacillus</i> sp.
		26	22942	770	<i>Bacillus</i> sp.
		27	22844	3630	<i>Bacillus</i> sp.
		28	22915	5949	<i>Bacillus</i> sp.
		29	23377	881	<i>Bacillus</i> sp.
		30	22915	5950	<i>Bacillus</i> sp.
		31	22724	3305	<i>Paenibacillus</i> sp.
		32	JS14-3	5583	<i>Flavobacterium denitrificans</i>
		33	12598	6261_6262	<i>Streptomyces alboniger</i>
		34	40806	4527	<i>Streptomyces morookaensis</i>
Alkane hydroxylase	CYP153D	1	14820	3127	<i>sphingomonas echinoides</i>
		2	26605	160	<i>Sphingomonas</i> sp.
		3	26410	1731	<i>Sphingomonas</i> sp.
		4	26617	1801	<i>Sphingomonas</i> sp.
		5	26621	3332	<i>Sphingomonas</i> sp.
	AlkB	6	HSR13	4470	<i>Rhodococcus</i> sp.
	LadA-a	7	KIS30-44	5014	<i>Burkholderia sacchari</i>
	LadA-A M	8	25886	758	<i>Pseudomonas</i> sp.
Amine hydroxylase	Cytochrome P460	1	14820	860	<i>sphingomonas echinoides</i>
		2	25886	2102	<i>Pseudomonas</i> sp.
		3	26605	4132	<i>Sphingomonas</i> sp.
		4	27130	347	<i>Psychroserpens</i> sp.
		5	27130	347	<i>Psychroserpens</i> sp.
Steroid hydroxylase	CYP106A	1	HSR18	4919	<i>Terrabacter</i> sp.
		2	22724	1530	<i>Paenibacillus</i> sp.

		3	HSR18	4253	<i>Terrabacter</i> sp.	
		4	22724	4629	<i>Paenibacillus</i> sp.	
		5	22915	4129	<i>Bacillus</i> sp.	
		6	23377	3540	<i>Bacillus</i> sp.	
		7	3-4	5920	<i>Bacillus niacini</i>	
		CYP154C	8	12598	5696	<i>Streptomyces alboniger</i>
			9	NP206	4422	<i>Curtobacterium</i> sp.
	10		NP90	2854	<i>Streptomyces</i> sp.	
	11		40643	2175	<i>Streptomyces</i> sp.	
	12		W2061	93	<i>Streptomyces</i> sp.	
	13		26508	5729	<i>Streptomyces</i> sp.	
	14		NP191	1530-1531	<i>Streptomyces</i> sp.	
	15		40643	2389	<i>Streptomyces</i> sp.	
	16		W2061	4085	<i>Streptomyces</i> sp.	
	17		26508	1366	<i>Streptomyces</i> sp.	
	18		W2233	1029	<i>Streptomyces</i> sp.	
	Terpenoid hydrolyase	CYP101C	1	14820	1051	<i>sphingomonas echinoides</i>
		CYP101D	2	14820	124	<i>sphingomonas echinoides</i>
3			14820	126	<i>sphingomonas echinoides</i>	
CYP105A		4	39366	7181	<i>Streptomyces</i> sp.	
CYP105B		5	12257	8280	<i>Streptomyces canus</i>	
		6	12257	8962	<i>Streptomyces canus</i>	
		7	26508	746	<i>Streptomyces</i> sp.	
		8	40447	3918	<i>Streptomyces lactamdurans</i>	
CYP105D		9	12257	2264	<i>Streptomyces canus</i>	
		10	40643	2535	<i>Streptomyces</i> sp.	
		11	40806	630	<i>Streptomyces morookaensis</i>	
		12	40806	4909	<i>Streptomyces morookaensis</i>	
		13	41178	4336	<i>Streptomyces laurentii</i>	
		14	41178	5080	<i>Streptomyces laurentii</i>	
		15	NP191	4743	<i>Streptomyces</i> sp.	
		16	NP206	3274	<i>Streptomyces</i> sp.	
CYP105X		17	40447	7297	<i>Streptomyces lactamdurans</i>	
CYP107B		18	40447	5061	<i>Streptomyces lactamdurans</i>	
		19	KED	2697	<i>Streptomyces</i> sp.	
CYP107L		20	15944	6710	<i>Streptomyces carzinostaticus</i>	
		21	NP90	1784	<i>Streptomyces</i> sp.	
CYP109D		22	23288	2172	<i>Terribacillus</i> sp.	
CYP196A		23	14820	2323	<i>sphingomonas echinoides</i>	

		24	26410	2418	<i>Sphingomonas</i> sp.	
		25	26605	1053	<i>Sphingomonas</i> sp.	
		26	26617	1237	<i>Sphingomonas</i> sp.	
		27	26621	35	<i>Sphingomonas</i> sp.	
	CYP170A	28	12257	3148	<i>Streptomyces canus</i>	
		29	15944	2495	<i>Streptomyces carzinostaticus</i>	
		30	40185	546	<i>Streptomyces laurentii</i>	
		31	NP206	8598	<i>Curtobacterium</i> sp.	
	CYP170B	32	12598	3902	<i>Streptomyces alboniger</i>	
	Fatty acid hydrolyase	CYP102B	1	12257	1767	<i>Streptomyces canus</i>
			2	12598	6769	<i>Streptomyces alboniger</i>
3			15944	5901	<i>Streptomyces carzinostaticus</i>	
4			40185	3443	<i>Streptomyces laurentii</i>	
5			NP191	8159	<i>Streptomyces</i> sp.	
6			NP206	7307	<i>Curtobacterium</i> sp.	
CYP102T		7	SR8	2243	<i>Rhodococcus</i> sp.	
Deoxynivalenol hydrolyase	CYP108B	1	39638	2194	<i>Actinomadura verrucosopora</i>	

현재 진행하고 있는 확보 CYP 유전자 105 종에 대한 모든 발현과정은 다음과 같음. PCR 과정으로 클로닝하고 pET28a(+)/pET32a(+) 발현벡터 안으로 유전자 재조합하여 마지막으로 *E. coli* (대장균) 이중발현 실험을 수행하여 단백질 발현 양과 질을 조사함. 결과적으로 44종의 CYP 유전자 (Self-sufficient CYP 20 종, alkane hydroxylase 5 종, CYP106A 6 종, CYP154C 8 종, terpenoid hydrolyase 4 종, 및 CYP108B 1 종 등) 관련 soluble한 단백질을 모두 확인하였으며, 이중 일부 26410_1731 (CYP153D) 관련 soluble한 단백질 정제 사진을 Fig. 1에서 나타냄. 이렇게 확보된 다양한 기능의 CYP 단백질을 이용한 그들의 기능 증명 관련 연구는 현재 다방면으로 진행 중이며, 2017년도 안에 2편의 논문을 추가적으로 투고될 예정이다.

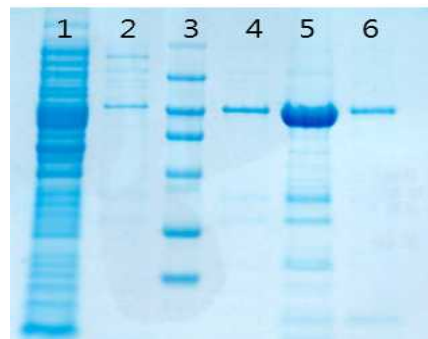


Figure 1. 정제 단백질 확인. 재조합된 유전자 26410_1731 (51 KDa)을 발현하여

15% SDS-PAGE로 확인한 결과. 1, crude extracts; 2, 10 mM imidazole; 3, marker; 4, 100 mM-1 imidazole; 5, 100 mM-2 imidazole; 6, 500 mM imidazole

또한, 다양한 CYP 단백질들의 기능을 이해하기 위하여 본 연구팀은 다음과 같은 단백질 대량 정제, 크리스탈 제조 및 단백질 구조 분석 연구 등을 꾸준히 수행하였음. 대량 (3 L)으로 대장균 이종발현을 수행하여 확보한 타겟 CYP 단백질을 TALON resin으로 1차 정제한 이후, FPLC를 이용하여 2차 정제함. 그리고 CYP 단백질 크리스탈 조건을 다양하게 조사하면서 그들의 크리스탈을 제작하여 그들의 구조를 해석함. 위와 같은 모든 단백질 구조 관련 연구는 극지연구소 이준혁 박사팀과 공동 수행하였음.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Crystal Structure of Cytochrome P450 (CYP105P2) from *Streptomyces peucetius* and Its Conformational Changes in Response to Substrate Binding

Chang Woo Lee ^{1,2,†}, Joo-Ho Lee ^{3,†}, Hemraj Rimal ³, Hyun Park ^{1,2}, Jun Hyuck Lee ^{1,2,*} and Tae-jin Oh ^{3,*}

¹ Division of Polar Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 406-840, Korea;

justay@kopri.re.kr (C.W.L.); hpark@kopri.re.kr (H.P.)

² Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 406-840, Korea

³ Department of BT-Convergent Pharmaceutical Engineering, Sunmoon University, Asansi 336-708, Korea;

shadowjhl@empal.com (J.-H.L.); rimalhem@gmail.com (H.R.)

* Correspondence: junhyucklee@kopri.re.kr (J.H.L.); jtoh3782@sunmoon.ac.kr (T.-J.O.);

Tel.: +82-32-760-5555 (J.H.L.); +82-41-530-2677 (T.-J.O.); Fax: +82-32-760-5509 (J.H.L.); +82-41-530-2279 (T.-J.O.)

† These authors contributed equally to this work.

Figure 2. 크리스탈 구조분석 완료한 CYP105P2 관련 논문

현재까지 전체 5개 CYP (CYP105P2, flavone hydroxylase; CYP153D17, alkane hydroxylase; CYP106A2 & CYP106A6, steroid hydroxylase; CYP105P2-flavone 등)의 크리스탈 제작을 완료하였으며, 2016년 5월에는 크리스탈 구조분석 관련 연구가 마무리된 CYP105P2 단백질 구조 해석 내용을 International Journal of Molecular Sciences 저널 (17:813. doi:10.3390/ijms17060813.)에 투고·완료 하였음 (Fig. 2). 또한, 크리스탈 구조분석 관련 연구가 마무리된 26605_160 (CYP153D17) 단백질 경우 또한 2016년도 12월, International Journal of Molecular Sciences 저널 (17:2067. doi:10.3390/ijms17122067.)에 논문을 투고·완료 하였음 (Fig. 3). 그리고 나머지 3개 CYP (23377_3540, 3-4_5920, 및 CYP105P2-flavone) 관련 구조 연구는 현재 마무리 해석을 진행 중이며, 2017년도 이내에 모두 추가적으로 투고될 예정임.

Article

Crystal Structure of a Putative Cytochrome P450 Alkane Hydroxylase (CYP153D17) from *Sphingomonas* sp. PAMC 26605 and Its Conformational Substrate Binding

Chang Woo Lee ^{1,2,†}, Sang-Cheol Yu ^{3,†}, Joo-Ho Lee ^{3,†}, Sun-Ha Park ¹, Hyun Park ^{1,2},
Tae-Jin Oh ^{3,*} and Jun Hyuck Lee ^{1,2,*}

¹ Unit of Polar Genomics, Korea Polar Research Institute, Incheon 406-840, Korea;
justay@kopri.re.kr (C.W.L.); psh@kopri.re.kr (S.-H.P.); hpark@kopri.re.kr (H.P.)

² Department of Polar Sciences, University of Science and Technology, Incheon 406-840, Korea

³ Department of BT-Convergent Pharmaceutical Engineering, Sunmoon University, Asansi 336-708, Korea;
ysc9056@naver.com (S.-C.Y.); shadowjh@empas.com (J.-H.L.)

* Correspondence: tjoh3782@sunmoon.ac.kr (T.-J.O.); junhyucklee@kopri.re.kr (J.H.L.);
Tel.: +82-41-530-2677 (T.-J.O.); +82-32-760-5555 (J.H.L.);
Fax: +82-41-530-2279 (T.-J.O.); +82-32-760-5509 (J.H.L.)

† These authors contributed equally to this work.

Figure 3. CYP153D17 (26605_160) 단백질의 크리스탈 구조. A, overall structure; B, multiple sequence alignment



3-2 극지방서균 유래 CYP 단백질 엔지니어링을 이용한 활성의 극대화

확보된 극지 CYP 유전자 (Self-sufficient CYP 34 종, CYP460-amine hydroxylase 5 종, alkane hydroxylase 8 종, Steroid hydrolyase 18 종, Terpenoid hydrolyase 32 종, Fatty acid hydrolyase 7 종, 및 CYP108B 1 종 등) 중에서 현재 단백질-크리스탈 구조 분석을 마무리한 CYP 단백질에 대하여 그들의 기질 관련 구조 부분을 이해하기 위해 *in-silico* 분석을 수행하였음. 본 그룹에서 보유하고 있는 Discovery Studio 3.5 프로그램을 이용하여 기질과 단백질 간의 *in-silico* 분석을 진행하였음. 한 예로 이미 단백질 구조 분석이 마무리된 CYP153D17 (26605_160)을 대상으로 다양한 기질 관련 기능 분석한 결과, 기능은 alkane hydrolyase 로서 C10 (decane)부터 C15 (pentadecane) 까지 길이가 다양한 alkane 그룹의 기질을 대상으로 수산화 반응을 유도하리라 예상할 수 있었음 (Fig. 4). 따라서, 현재 이들 기질과의 *in-vitro* 효소 반응을 수행하고 있기 때문에 올 2017년도 안으로 기질별 CYP153D17 단백질의 기능을 마무리 증명하고 이를 논문화할 계획임.

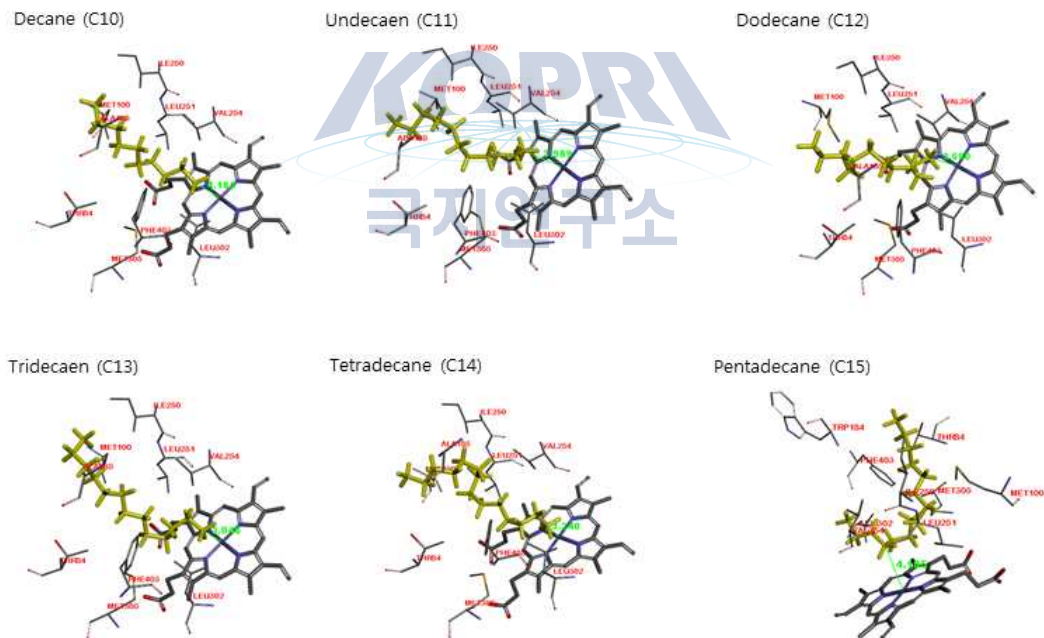


Figure 4. CYP153D17 (26605_160) real 단백질 구조 대상 다양한 alkane 기질을 사용하여 확보한 *in-silico* docking 분석 데이터

또한, 현재 단백질 구조분석이 거의 마무리 단계인 steroid hydroxylase (23377_3540) CYP106A2를 이용하여 Discovery Studio 3.5 프로그램으로 homology model 및 ligand docking 관련 연구를 진행하였음. 결과적으로, steroid hydroxylase (23377_3540) CYP106A2에 대한 모델을 제작하였으며 (Fig. 5), 4가지 스테로이드

계열의 기질 (androstenedione, corticosterone, progesterone, 및 testosterone)과 ligand docking 연구를 수행하여 대부분 그들 CYP-heme과 기질간의 거리가 4.0 ~ 5.9 Å 임을 확인할 수 있었음 (Fig. 6). 이러한 결과는 CYP106A2 (23377_3540)의 steroid hydroxylase 기능을 유추할 수 있는 의미 있는 연구 결과임.

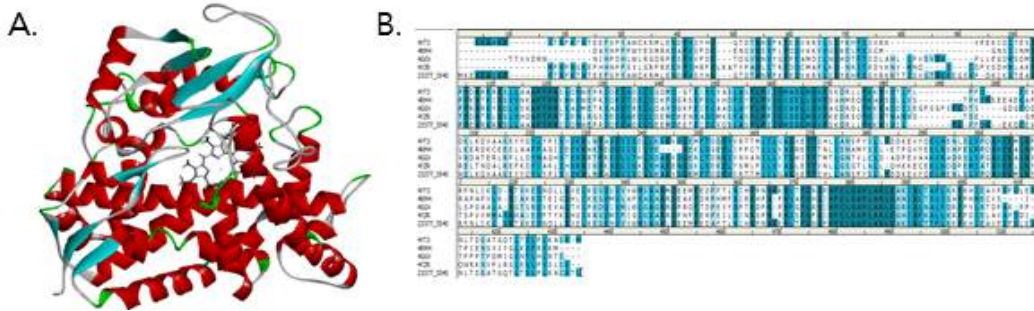


Figure 5. DS 3.5 프로그램을 이용하여 steroid hydroxylase (23377_3540) CYP106A2에 대한 model 제작. A, steroid hydroxylase (23377_3540) CYP106A2의 homology model; B, steroid hydroxylase (23377_3540) CYP106A2와 유사한 단백질들 간의 sequence 비교 분석

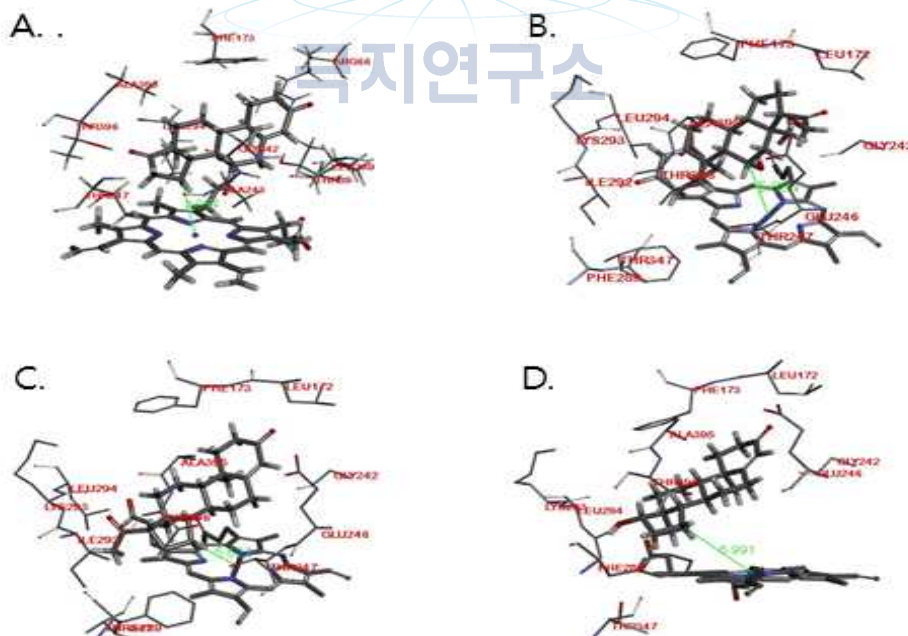
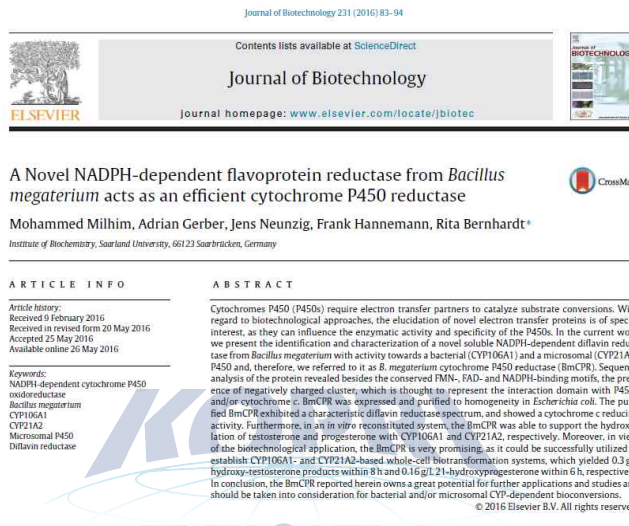


Figure 6. 제작한 model을 대상으로 다양한 스테로이드 계열 기질들과 ligand docking 한 결과. A, Androstenedione (4.0 Å); B, Corticosterone (5.9 Å); C, Progesterone (5.6 Å); D, Testosterone (5.9 Å)

그리고 CYP106A2 (23377_3540) 단백질에 대한 활성화에 필요한 전자전시스템 관

런 사용하는 전자전달계로는 adrenodoxin - adrenodoxin reductase 등에 대하여 다양한 연구들이 연구되고 있음. 따라서 본 연구팀에서도 이들 CYP의 활성을 극대화시키고자 최근 보고된 논문 (Fig. 7)을 바탕으로 cytochrome P450 reductase (CPR)와 ferredoxin (FDX) 관련 실험을 수행하였음. 현재 보유하고 있는 CYP106A2 관련 균주의 게놈 정보로부터 유사 CPR 및 ferredoxin (Fig. 8)등의 유전자를 클로닝하여 soluble한 단백질을 확보한 이후, 효소 반응에 사용하고 있기 때문에 2017년도 안으로 전자전이시스템 관련 연구를 마무리하여 추가적인 논문을 투고할 예정임.



극지연구소

Figure 7. CPR 및 Fdx에 대해 참고한 논문

BmCPR 23377_seq4514	NHLKVNQFNFDEAGLLNLLPILTEAKMLSDVLTARQSTSAEITFDVSTAPAFQIK 60 NLDVMNCFNFMEVAELIKLSPILTETQKILNLSLITASLSYKNIKATDPTMEADRGS 60
BmCPR 23377_seq4514	Flavophore Moiety QVDSQDPTLVISDITRQAGLAENKMTLEAKQKLNQVWYSQWNPYKPAHLKLDL 120 KITISQFLLNRSQDQKASAKWRLKSNKDFVITISGSEFYNNLKYKVL 120
BmCPR 23377_seq4514	FAD Ring FAD Ring HRESEFPLNLSLSTHLSRFRPLAENRFSYSLGSDGSEFFDQTTAFVQEL 88 180 HRESEFPLNLSLSTHLSRFRPLAENRFSYSLGSDGSEFFDQTTAFVQEL 88 180
BmCPR 23377_seq4514	P460 EELVYRPLPTEANILKGVLDLSEAKHSASAPPAEAPAGTSPYRTRPFKAE 240 TFLFRPMLPTEANILKGVLDLSEAKHSASAPPAEAPAGTSPYRTRPFKAE 240
BmCPR 23377_seq4514	FAD Ring VLENILNRRSQNFTVHLESLGSSRLTEPDRSLVYFNINSELDVMLMELDKPEE 300 VLENILNRRSQNFTVHLESLGSSRLTEPDRSLVYFNINSELDVMLMELDKPEE 300
BmCPR 23377_seq4514	FAD Ring SIVTWKEETPLPEALISNFEITVLTKPLQDAELTDNKLVAE--NREELKAVTQ 358 TVMWIKQDLKQLRESLISDFEITVLTKPLQDAELTDNKLVAE--NREELKAVTQ 358
BmCPR 23377_seq4514	FAD Ring GRVILDLRFRPQINAGDFVHLLNMLNLSVSHASASAPPAEAPAGTSPYRTRPFKAE 418 GRVILDLRFRPQINAGDFVHLLNMLNLSVSHASASAPPAEAPAGTSPYRTRPFKAE 420
BmCPR 23377_seq4514	NADPH ERNGVSLGSRILQPSDITFVYVLSGNKFKLPDDETFVINGSDGTVQSPFKEE 478 ERNGVSLGSRILQPSDITFVYVLSGNKFKLPDDETFVINGSDGTVQSPFKEE 480
BmCPR 23377_seq4514	NADPH ETGAWKQVFFSDQFYVDFVLETQKRLKQVLTQNDWAFSRDITGKQVYVQVLE 538 ETGAWKQVFFSDQFYVDFVLETQKRLKQVLTQNDWAFSRDITGKQVYVQVLE 540
BmCPR 23377_seq4514	NADPH SRELTFLERQVAVLSSDQVMMVDFNILEIETEEDKNSGAGVLELDQDNRYVQ 558 SRELTFLERQVAVLSSDQVMMVDFNILEIETEEDKNSGAGVLELDQDNRYVQ 600
BmCPR 23377_seq4514	RDVY 60C RDVY 60A

Figure 8. KORPI No. 23377 균주 내 존재하는 CPR과 BmCPR 시퀀스 비교 분석 데이터

3-3 극지방선균 유래 CYP를 이용한 대사공학으로 신물질 창출

본 연구팀에서 확보한 극지 유래 다양한 CYP 단백질 (Self-sufficient CYP 34 종, CYP460-amine hydroxylase 5 종, alkane hydroxylase 8 종, Steroid hydrolyase 18 종, Terpenoid hydrolyase 32 종, Fatty acid hydrolyase 7 종, 및 CYP108B 1 종 등)을 대상으로 다양한 기질 (fatty acid, alkane, steroid, 및 terpenoid) 관련 *in-silico* 분석을 통하여 효소 반응의 가능성을 모두 조사하고 현재 이들 CYP를 이용한 *in-vitro* 및 *in-vivo* enzyme assay 방법으로 새로운 신물질을 생산하는 연구를 수행하였음. 현재 사용 중인 단백질은 정제까지 확인된 21종 (Self-sufficient CYP 2 종, alkane hydroxylase 4 종, CYP106A 6 종, CYP154C 8종, 및 CYP108B 1 종)이며, 이중 한 종류의 단백질 정제 데이터를 보여줌 (Fig. 9).

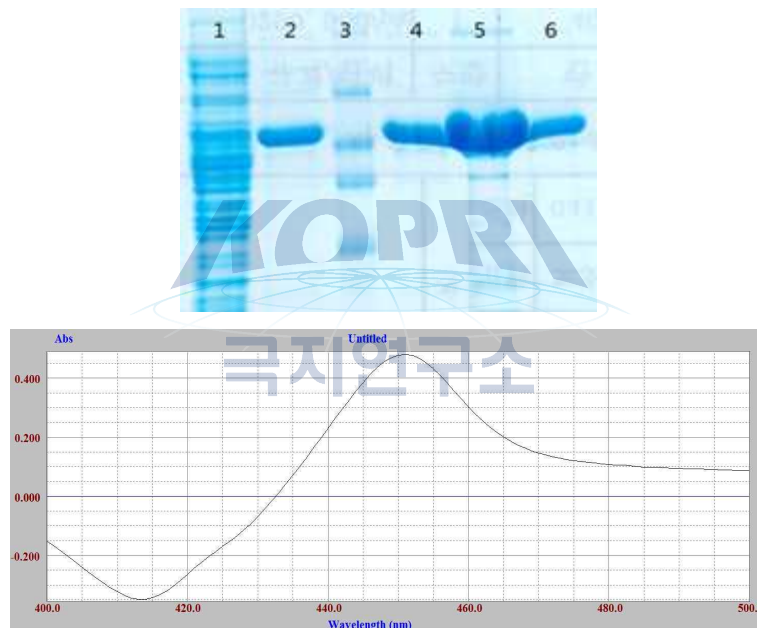


Figure 9. TALON resin을 이용한 단백질 정제 SDS-PAGE gel 사진과 관련 CYP의 CO-reduction 활성 확인 데이터

Steroid hydroxylase라고 생각되는 CYP106A 계열과 CYP154C 계열의 단백질을 대상으로 알려진 모든 25 개의 steroid (Fig. 10)를 기질로 사용하여 *in-vitro* 및 *in-vivo* enzyme assay 실험을 진행하였으며, 구조가 변경된 새로운 신물질은 HPLC, GC-MS, 및 NMR 구조 분석 등의 방법을 이용하여 분석하였음.

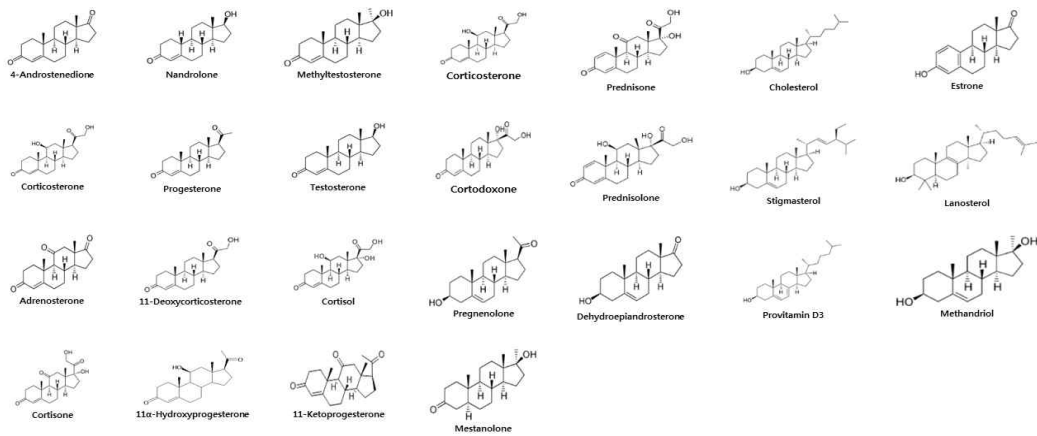


Figure 10. *In-vitro* 및 *in-vivo* enzyme assay에 사용된 모든 steroid 관련 기질의 구조

현재 CYP106A 계열인 23377_3540 CYP 단백질을 이용한 *in-vitro* assay 실험으로부터 새로운 구조의 신물질을 생산하였으며, HPLC 및 GC-MS 등을 이용한 구조 관련 데이터 중 일부의 자료를 보여줌 (Fig. 11). 결과적으로, CYP106A 단백질을 이용한 *in-vitro* assay로부터 일부 steroid의 수산화 반응은 확인하였으며, 현재 확보된 새로운 전자전이시스템을 사용하여 반응의 최적화를 진행하고 있으며 2017년도 안에 신물질의 양을 증가시켜 NMR 방법으로 그들의 구조를 명확하게 밝히고 이를 논문화할 계획임. 또한, 현재까지 반응에 사용한 기질은 총 5 종류이지만, 2017년도 안에 새로운 스테로이드를 기질로 더 반응시켜 다양한 신물질을 생산할 예정임. 이와 함께, 반응의 최적화를 *in-vivo* 상에서 대장균 이중발현시스템으로 시도하고 있기 때문에 많은 결과가 도출되리라 생각됨.

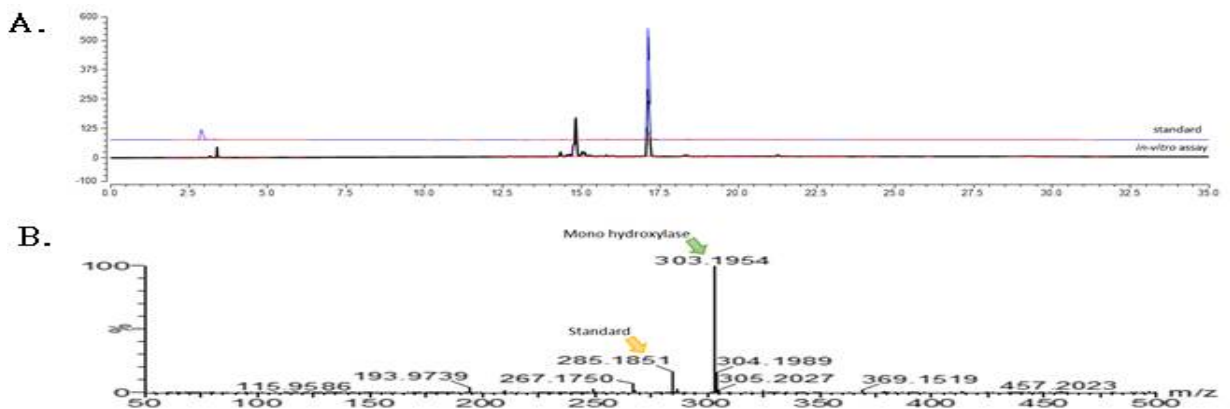


Figure 11. CYP106A 계열인 23377_3540 관련 CYP 단백질을 이용한 *in-vitro* enzyme assay 반응 이후, 확보한 신물질의 HPLC 및 GC-MS 분석 데이터. A,

Steroid hydroxylase HPLC 분석; B, Steroid hydroxylase GC-MS 분석

또한, CYP154C 계열인 W2233_1029 CYP 단백질을 이용한 *in-vitro* 및 *in-vivo* assay 실험으로부터 새로운 구조의 신물질을 생산하였으며, HPLC을 이용한 증명 데이터 중 일부의 자료를 보여줌 (Fig. 12). 결과적으로, CYP154C 단백질을 이용한 *in-vitro* 및 *in-vivo* assay로부터 일부 steroid의 수산화 반응은 확인하였으며, 현재 확보된 새로운 전자전이시스템을 사용하여 반응의 최적화를 진행하고 있으며 2017년도 안에 신물질의 양을 증가시켜 NMR 방법으로 그들의 구조를 명확하게 밝히고 이를 추가적으로 논문화할 계획임.

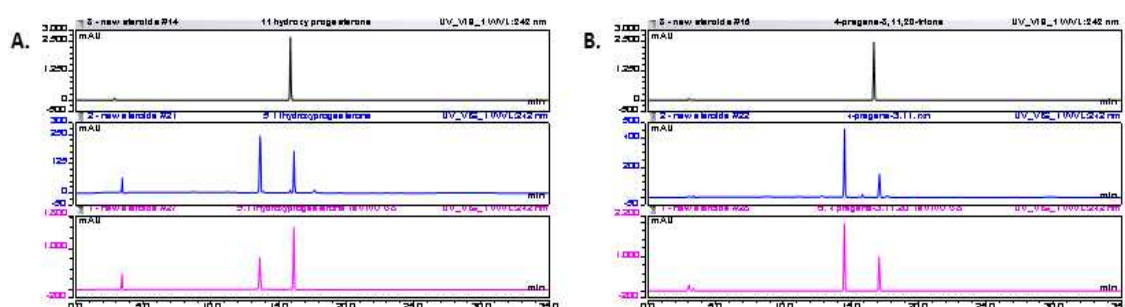


Figure 12. CYP154C 계열인 W2233_1029 단백질을 이용한 *in-vitro* 및 *in-vivo* assay 반응 이후, 확보한 신물질의 HPLC 분석 데이터. A, Hydroxyprogesterone 기질에 대한 반응 결과에 따른 HPLC 분석; B, 4-pregne-3,11,20-trione 기질에 대한 반응 결과에 따른 HPLC 분석

또한, fatty acid hydroxylase라고 생각되는 CYP106A 계열과 CYP102A 계열의 self-sufficient P450 단백질을 대상으로 알려진 모든 8 종류의 fatty acid (Fig. 13) 를 기질로 사용하여 *in-vitro* enzyme assay 실험을 진행하였으며, 구조가 변경된 새로운 신물질은 GC, GC-MS, 및 NMR 구조 분석 등의 방법을 이용하여 분석하였음.

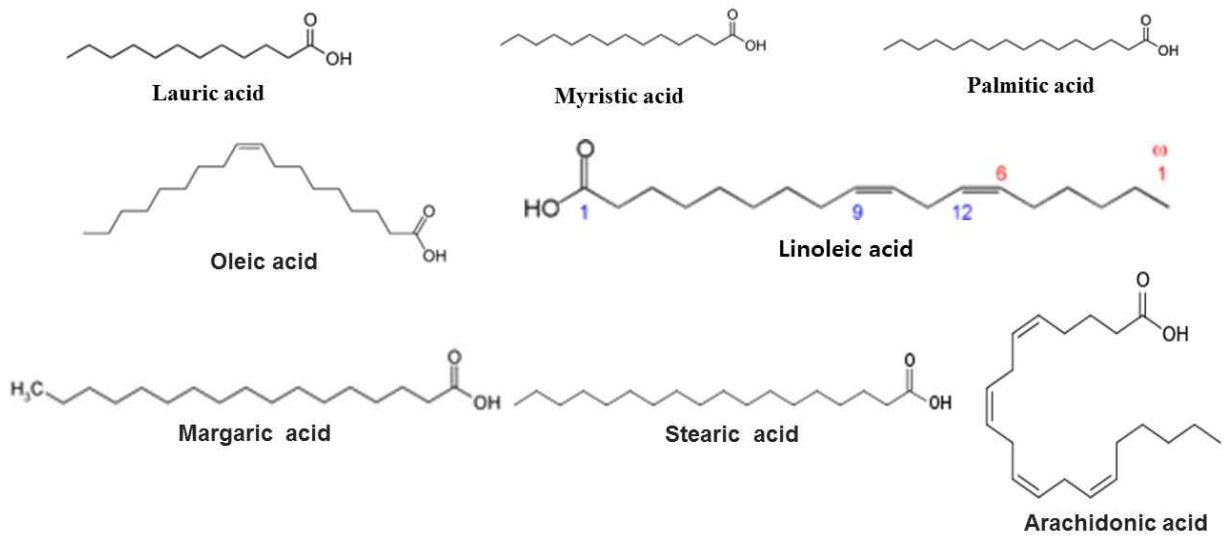


Figure 13. *In-vitro* enzyme assay에 사용된 8 종류의 fatty acid 구조

현재 CYP106A 계열인 25034-1065 CYP 단백질을 이용한 *in-vitro* assay 실험으로부터 새로운 구조의 신물질들을 생산하였으며, GC 및 GC-MS 등을 이용한 구조 관련 데이터 중 일부의 자료를 보여줌 (Fig. 14). 또한, CYP102A 계열인 22724_5370 CYP 단백질을 이용한 *in-vitro* assay 실험으로부터 새로운 구조의 신물질들을 생산하였으며, GC 및 GC-MS 등을 이용한 구조 관련 데이터 중 일부의 자료를 보여줌 (Fig. 15). 결과적으로, CYP106A 및 CYP102A 단백질을 이용한 *in-vitro* assay로부터 일부 fatty acid의 수산화 반응은 확인하였으며, 현재 반응의 최적화를 진행하여 신물질의 양을 증가시킴으로써 NMR 방법으로 그들의 구조를 명확하게 밝히고 이를 2017년에 추가적으로 논문화할 계획임.

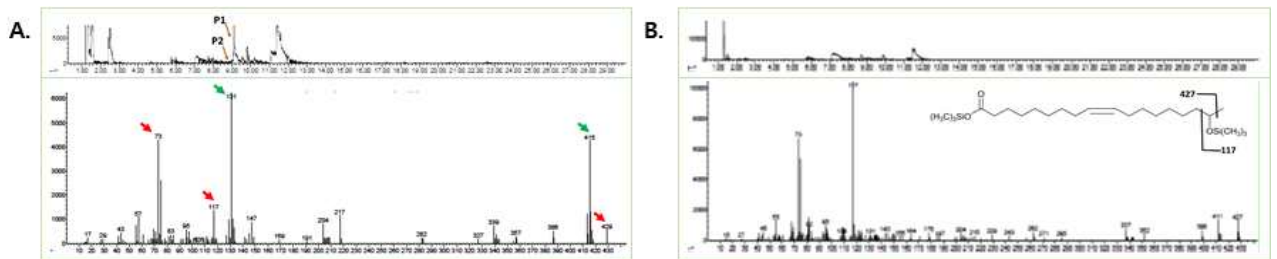


Figure 14. CYP106A 계열인 25034_1065 단백질을 이용한 *in-vitro* assay 반응 이후, 확보한 신물질들의 GC 및 GC-MS 분석 데이터. A, Stearic acid 기질에 대한 반응 결과에 따른 GC 및 GC-MS 분석; B, Oleic acid 기질에 대한 반응 결과 따른 GC 및 GC-MS 분석

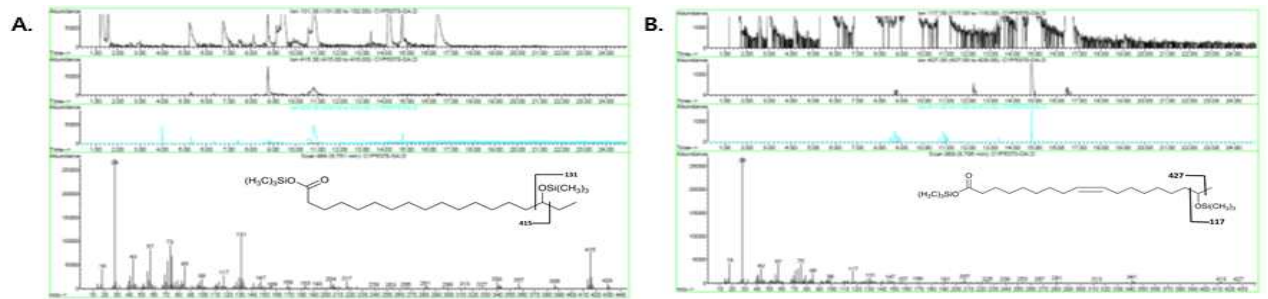


Figure 15. CYP102A 계열인 22724_5370 단백질을 이용한 *in-vitro* assay 반응 이후, 확보한 신물질의 GC 및 GC-MS 분석 데이터. A, Stearic acid 기질에 대한 반응 결과에 따른 GC 및 GC-MS 분석; B, Oleic acid 기질에 대한 반응 결과 따른 GC 및 GC-MS 분석



제 4장 연구개발 최종 목표 및 달성도

4-1. 연구개발 최종 목표

- 극지방선균 유래 신기능 CYP 증명
- 극지방선균 유래 CYP 단백질 엔지니어링을 이용한 활성의 극대화
- 극지방선균 유래 CYP를 이용한 대사공학으로 신물질 창출

4-2. 연구개발목표 및 달성도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지방선균 유래 신기능 CYP 증명	1-1	신기능 CYP 단백질의 확보 및 기능 증명	- Complete 게놈분석 완료 및 신기능 관련 105종 CYP 유전자 확보 - 44종 CYP 단백질 분리·정제 및 기능 증명 수행	100 % - 게놈분석 관련 8편의 논문투고 - 신기능 CYP 확보 및 기능 증명
	1-2	신기능 CYP 단백질의 구조 분석	- 5종 CYP 단백질의 크리스탈 제작 - 2종 CYP 단백질 (CYP105P2 & CYP153D17)의 구조 분석 완료	100 % - CYP 단백질의 크리스탈 완성 - CYP 구조 관련 2편의 논문투고
2. 극지방선균 유래 CYP 단백질 엔지니어링을 이용한 활성의 극대화	2-1	CYP 단백질의 전자전시스템 구축	- 105종 CYP 단백질의 전자전시스템 유추 - CPR & FDX 관련 real 전자전시스템 구축	100 % - CYP 관련 전자전시스템 제시 - CYP 관련 전자전시스템 완성
	2-2	CYP 단백질의 기질유연성 조사 및 변형	- DS 3.5 프로그램을 이용한 105종 CYP 단백질의 기질유연성 조사 완료 - 105종 CYP 단백질의 기질유연성 변형 적용 시도	100 % - CYP 단백질의 기질유연성 제시 - CYP 단백질의 기질변형 제시
3. 극지방선균 유래 CYP를 이용한 대사공학으로 신물질 창출	3-1	<i>In-vitro</i> CYP 효소 반응을 이용한 신물질 창출	- CYP106A (steroid & fatty acid), CYP154C (steroid) 및 CYP102A (fatty acid) 단백질의 <i>in-vitro</i> 반응 완료 - 반응 생성 신물질의 구조분석	100 % - CYP 단백질의 <i>in-vitro</i> 반응 제시 - 구조분석 제시
	3-2	<i>In-vivo</i> 이종숙주 발현시스템 구축을 통한 신물질 창출	- CYP106A (steroid & fatty acid) 및 CYP154C (steroid) 단백질의 <i>in-vivo</i> 이종숙주 발현반응 완료 - 반응 생성 신물질의 구조분석	100 % - CYP 단백질의 <i>in-vivo</i> 반응 제시 - 구조분석 제시

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

5-1. 학술적 파급효과 및 추가연구의 필요성

신규 극지방선균의 유전자원의 확보에 기인한 유전체 연구는 기존 비극지 토양방선균의 유전체 등과 비교 분석을 통하여 생합성 기작과 조절기작을 규명할 수 있을 뿐만 아니라, 방선균에서 생산되는 이차대사산물 생합성 조절체계 및 그 기능을 밝히는 근본적인 해답을 제공하는데 크게 기여할 것임. 또한 극지방선균의 다양성 조사를 통하여 생리·화학적 관점에서 방선균의 생명현상 및 환경(온도)적응기작 등을 예측·추적할 수 있는 기반기술을 제공 하리라 사료됨. 기능유전체학을 활용한 체계적인 연구는 현재 초보적인 단계이며, 특히 방선균 유래 천연생리활성물질의 생산을 위한 기능유전체학과 대사공학의 접목 시도는 전무한 상태임. 따라서 본 연구에서 확보 가능한 극지 방선균의 유전자원과 본 연구팀에서 보유하고 있는 이중숙주 발현시스템 및 whole-cell biotransformation 방법의 접목 연구는 학문적 및 산업적 활용 차원에서 상당한 잠재력을 내포하리라 여겨짐.

아직까지 많은 부분 CYP 효소의 낮은 활성 관련 문제점을 해결하지 못하고 있는 실정이며, 이는 효소 특성 연구의 부재를 비롯하여 그들의 전자전이시스템 및 기질 유연성/특이성 연구가 체계적으로 이루어지지 못하였기 때문으로 생각됨. 따라서 본 연구로부터 얻을 수 있는 극지방선균 유전체의 CYP 효소 관련 유전자들을 기존에 알려진 유전체 등과 비교·분석하여 기술적으로 박테리아 CYP의 낮은 활성을 극대화시킬 수 있는 방법을 모색하고자 하며 또한 산업적으로 유용한 타겟 물질의 구조를 변형하여 활성 변화를 이끌어 낼 수 있으리라 확신함.

5-2. 경제적 파급효과 및 기업화 추진방안

분리·동정된 신규 극지방선균을 대상으로 향균·항진균·항암·항산화·항결핵 등의 활성을 조사한다면 극한 환경에서 생존하는 극지방선균으로부터 의약품으로 사용 가능한 신물질 발굴 차원에서도 이용 가치가 높음. 또한 CYP 효소는 유기합성이 어려운 다양한 유기화합물을 합성할 수 있는 근거를 제공할 뿐만 아니라, 향후의 산업적 적용 가능성에 따라 다방면으로 선택되어질 수 있는 기초기반기술을 보여줄 것임. 현재 한미 FTA 협상 이후, 국내 제약사는 혁신신약의 개발에 박차를 가하고 있음에도 불구하고 막강한 연구개발 인력과 기술력, 막대한 자본력 및 광대한 화합물 라이브러리를 보유한 거대 다국적 제약사들과 효율적으로 경쟁하기 위해서는 창의적인 우리만의 아이디어가 필요하고 우리만의 강점을 개발하여 활용해야 함. 따라서 향후 본 연구의 기초연구가 국내 제약사나 벤처기업들과 연계·연구될 경우, 유전자 특허, 물질특허 및 치료법 특허로 이어지도록 추가연구를 수행하여 높은 제약산업적 가치를 창출할 수 있음.

방선균 CYP 효소는 비활성탄소에 위치·입체 특이적으로 모노옥시제화반응을 시킬 수 있는 산업적으로 매우 유용한 생촉매이기 때문에 정밀합성이 어려운 기존 향생·항암물질들에서 선택적인 수산화반응을 통해 부가가치가 높은 신규 생리활성물질을 생산 가능할 것임. 또한 본

연구를 통하여 일반적인 CYP의 기질에 따른 생전환 가능성 등을 예상할 수 있을 것이며, 실제 *in-vivo* 또는 *in-vitro* 연구를 실시하여 경제·산업적으로 유용한 신규생리활성물질을 생산할 수 있는 방법으로 활용될 수 있으리라 생각됨.

편집순서 7

본 문

(작성요령)

1. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠, 등으로 하고,
 - 장은 17 포인트 중고딕체
 - 절은 15 포인트 명조체
 - 본문은 11 포인트 신명조체로 한다.
단, 본문의 내용 중 중요부문은 중고딕체로 사용할 수 있다.
2. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작한다.
3. 본문은 신명조체 11 포인트 횡으로 작성한다.
4. 페이지 번호는 하단 중앙 끝에 11 포인트로 한다.
5. 각주는 해당 페이지 하단에 8포인트 활자로 표기하며, 본문과 구분토록 한다.
6. 페이지 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작한다.
단, 삽입물이 있을 때는 그 삽입물의 크기에 불문하고 1면을 한 페이지로 하여 일련번호를 붙인다.
7. 한글, 한문, 영문을 혼용할 수 있다.
8. 뒷면지에 주의문을 넣는다.
9. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시한다.

뒷 면

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.