

# 고온성 Archaea의 Genetic Tools

이한승

신라대학교 바이오식품소재학과 교수, 극한미생물연구소 소장

올해 봄 학회 기간에 “Archaea의 명명법 정립을 위한 설문조사 및 공청회”가 열린 바 있다. 과거 진정세균(eubacteria)과 대비되는 개념으로 고세균(archaeobacteria)로 불리던 Archaea의 이름을 새로 붙이기 위해서였다(이하 Archaea를 고균으로 표기). 고균은 한 때 세균의 일종으로 분류되었으나 1990년 Carl Woese가 생물을 Bacteria, Archaea, Eucarya의 세 가지 domain으로 분류하면서, 세균과도 다르고 진핵생물과도 다른 독립적인 생물군으로 자리매김하기 시작했다. 특히 DNA 복제, 전사, 단백질 합성 등 central dogma와 관련된 효소들이 진핵생물과 더 유사하며 세균에는 없는 히스톤 단백질이 존재하는 등 고균이 계통분류학적으로 세균보다는 진핵생물과 더욱 가깝다는 사실이 알려지면서 진화적 관심이 집중되는 생물이기도 하다.

특히 고균이 미생물학자들의 관심을 끌기 시작한 것은 고온, 고염, 알칼리나 산성과 같은 극한 환경에서 고균들이 계속 분리되면서부터이고 그래서 고균과 극한미생물을 동일시하는 오해도 발생하고 있다. 계통분류학적으로 고균은 Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota, Thaumarchaeota의 5개 문(phylum)으로 분류되지만 그 생육특성에 따라 분류할 때는 고온성(thermophilic), 호염성(halophilic), 메탄생성(methanogenic)으로 분류하기도 한다. 현재까지 가장 많은 균주가 발견된 phylum은 Euryarchaeota이며 대부분의 호염성 고균과 메탄생성 고균들이 여기에 속한다. 하지만 가장 많은 연구가 진행되었고 주목을 받는 분야는 고온성 고균인데 그 중에서도 80도 이상의 온도에서 최적으로 성장하는 고

균을 초고온성(hyperthermophilic) 고균이라고 부른다.

초고온성 미생물에는 고균 뿐만 아니라 *Thermotoga*나 *Aquifex*와 같은 일부 초고온성 세균도 존재한다. 현재까지 몇몇 *Thermotoga* 속 세균에서 플라스미드가 분리되어 대장균과의 shuttle vector 등이 개발된 바 있으나(7) 아직 넘어야 할 기술적 한계가 많은 상황이다. 반면 최근 3-4년 동안 고온성 고균의 유전공학적인 기법(genetic tool)들은 연이어 개발되고 있으며 점점 다양한 연구에 이러한 기술들이 사용되고 있다. 현재까지 gene disruption이나 단백질의 homologous/ heterologous expression이 가능한 수준까지 genetic tool이 개발된 초고온성 고균은 Sulfolobales (*Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus islandicus*, *Sulfolobus solfataricus*)와 Thermococcales (*Thermococcus kodakarensis*, *Thermococcus onnurineus*, *Pyrococcus furiosus*)에 속하는 고온성 고균들이다.

## 1. Sulfolobales의 genetic tools

*Sulfolobus*는 생육 최적 온도가 80도 내외로 고온균과 초고온균의 경계에 위치하며 대부분의 초고온성 고균이 혐기성인데 반해 호기성인 것이 가장 독특한 특징이다. 또한 pH 2-3 정도의 산성에서 잘 자라는 호산균(acidophile)이며 crenarchaeota 가운데 유일하게 genetic tool이 개발된 생물체이다. 아울러 초고온성 고균 가운데 가장 먼저 유전공학적인 기법이 개발된 균주도 *Sulfolobus* 속 고균인데 1990년대 초반부터 *Sulfolobus*로부터 바이러스, 플라스미드, transposon 등이 발견되어 이를 이용한 shuttle vector의 제조와 형질전

환법이 개발되기 시작하여 현재는 대부분 전기충격법 (electroporation)을 통해 형질전환을 수행하고 있다. 가장 먼저 개발된 호스트는  $\beta$ -galactosidase (*lacS*)가 결실된 *S. solfataricus*로서 intact *lacS*를 포함한 genetic element를 형질전환시켜 유당이 포함된 최소배지에서 자라는 transformants를 고르거나 X-gal을 이용해서 white/blue selection하는 방법이었다. 그 이후 열에 안정한 대장균의 hygromycin phosphotransferase (*hph*) 변이 유전자를 이용하여 transformants를 선별하는 방법이 개발되었고 피리미딘 생합성 경로에 관여하는 *pyrF* (orotidine 5-phosphate decarboxylase) 결실 균주를 이용하여 uracyl auxotroph로서의 성질과 5-fluoroorotic acid (5-FOA) 저항성을 동시에 이용하는 선별법도 개발되었다. (1)

현재까지 *Sulfolobus* 속 균주 가운데 특정 유전자의

deletion이나 단백질 발현에 성공적으로 사용된 호스트 균주는 *S. acidocaldarius*, *S. islandicus*, *S. solfataricus*의 세 종인데 그 중에서 초창기부터 가장 많이 사용하고 있는 균주는 *S. solfataricus* PBL2025이다. *S. solfataricus* PBL2025 균주는 natural *lacS* 음성 변이체(negative mutant)로서 인위적으로 *lacS*를 제거한 변이체의 단점인 revertancy를 보이지 않는다는 장점이 있다. 하지만 고체배지에 도달하기 전에 1-2주 정도 액체 배양을 해야 하기 때문에 시간이 오래 걸리는 단점이 있고 야생형보다 세포의 크기가 큰 형태학적 차이점도 있다. 현재까지 *S. solfataricus* PBL2025를 호스트로 사용한 여러 셔틀 벡터들(pEXSs, pKMSD48, pMSS, pJlacS, pMJ0503)이 개발되었으며 이 중 pMJ0503 바이러스 벡터에 *araS* inducible promoter를 사용하여 단백질의 유도적 과발현(overexpression)에 성공하였다.

표 1. Sulfolobales과 Thermococcales의 특징과 genetic tools

	Sulfolobales	Thermococcales
Phylum	Crenarchaeota	Euryarchaeota
Organisms	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> <i>Thermococcus kodakarensis</i> <i>Sulfolobus islandicus</i>	<i>Thermococcus onnurineus</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i> <i>Pyrococcus furiosus</i> COM1
Growth conditions	Thermoacidophiles	Hyperthermophiles
Transformation method	Electroporation	Natural competence
Antibiotics	Hygromycin, simvastatin	Simvastatin
Prototrophic marker	<i>lacS</i> ( $\beta$ -galactosidase) <i>pyrF</i> (orotidine 5-phosphate decarboxylase) <i>pdaD</i> ( <i>argD</i> , arginine decarboxylase)	<i>pyrF</i> (orotidine 5-phosphate decarboxylase) <i>trpE</i> (anthranilate synthase $\alpha$ subunit) <i>trpAB</i> (tryptophan synthetase) <i>hisD</i> (histidinol dehydrogenase) <i>pdaD</i> (arginine decarboxylase)
Alcohol resistance marker	<i>adh</i>	<i>adh</i>
CFU/ $\mu$ g DNA	$10^3 - 10^6$	$10^2 - 10^5$
Inducible promoters	<i>araS</i> , <i>maIE</i>	<i>cipA</i>

*S. solfataricus*보다는 상대적으로 나중에 사용되기 시작한 *S. acidocaldarius*과 *S. islandicus* 균주는 유전공학적 호스트로 사용하는데 한 가지 단점이 있는데 제한효소가 없는 *S. solfataricus*와 달리 *SuiI*에 의한 restriction barrier가 있다는 점이다. 하지만 *S. acidocaldarius*과 *S. islandicus* 균주에서는 *pyrEF*에 결실에 의한 *uracyl auxotroph*로서의 성질은 물론 5-fluoroorotic acid (5-FOA)를 이용한 역선택(counterselection)이 가능한 것이 특징이다. (9) *S. acidocaldarius*에서는 arabinose transporter 시스템이 없기 때문에 *araS* 프로모터를 이용한 유도 발현이 불가능한 것이 단점이었는데, 최근 염색체에 삽입되지 않는 독립적인 플라스미드에 maltose에 의해 유도되는 *malE* promoter를 이용한 발현 시스템이 개발되었다. (3) 또한 *S. islandicus*에서는 *simvastatin*을 이용한 선별법이 2010년에 확립되었고 가장 최근에는  $\Delta argD$  (arginine decarboxylase) 변이체의 agmatine 영양요구성(auxotrophy)을 이용하여 최소배지가 아니라 tryptone이나 yeast extract가 포함된 복합배지에서 do selection이 가능한 시스템이 개발되었다. (17)

## 2. Thermococcales의 genetic tools

Thermococcales는 황을 환원하는 초고온성 중속영양생물이며 고균의 phylum 중에 Euarchaeota에 속한다. Thermococcales에 속하는 genus에는 *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Palaeococcus*가 있는데 이중 *Thermococcus*와 *Pyrococcus*는 게놈 프로젝트 초창기에 whole genome 서열이 보고되어 유전학부터 기능유전체학과 비교유전체학에 이르기까지 가장 많은 연구가 이루어진 초고온성 고균이다. 현재 Thermococcales의 genetic tool이 가장 활발하게 이용되는 이유는 Sulfolobales의 경우와는 달리 natural competency를 이용한다는 점이다. 이는 빠르고 쉽고 효율적으로 형질전환이 가능하다는 점에서 매우 큰 장점이라고 할 수 있다. 또한 제한효소가 없어서 세포 내로 도입된 외래 DNA가 분해되는 restriction barrier가 없다는 것도 또 다른 장점이다.

유전공학적 기법 개발의 초창기인 1996년 *Pyrococcus abyssi*에서 pGT5 플라스미드가 발견되어 이를 이용한 genetic tool의 개발이 수년간 시도되었다. 이를 통해 PEG를 이용한 형질전환법과 pYDS2 서플렉터가 개발되는 등 약간의 진전이 있었으나 가장 중요한 gene disruption이나 단백질 발현까지는 성공하지는 못했다. (12) Thermococcales 가운데 가장 먼저 genetic tool이 완성된 균주는 *Thermococcus kodakarensis* 인데 2003년 homologous recombination에 의한 *trpE* disruption 방법을 개발하여 트립토판 영양요구주(auxotroph)를 만드는데 성공하였다. (14) 처음 이 방법이 개발될 당시에는 염화칼슘을 사용한 형질전환 방법을 사용하였으나 후속 연구에 의해 염화칼슘은 competency에 영향을 주지 않는 것으로 밝혀졌고 균주 자체의 natural competency가 있는 것으로 확인되어 더 쉽게 형질전환이 가능해졌다. (15) 그리고 2007년 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase 저해제인 *simvastatin*을 이용한 선별법이 개발되어 더 효과적인 gene deletion과 발현이 가능해졌다. (13) 이 방법은 *Thermococcus kodakarensis*의 glutamate dehydrogenase (*gdh*) promoter에 HMG-CoA reductase 유전자를 연결하여 target gene에 삽입하는 방식인데, 정상적으로 HMG-CoA reductase 유전자가 목적 유전자 자리에 삽입되어 발현되면 *simvastatin*이 10-20mM 함유된 배지에서 균주의 생육이 가능해지므로 쉽게 transformants를 선별할 수 있게 되는 원리이다. 또한 gluconeogenic 조건에서 과발현 fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) 유전자 프로모터를 사용하여 유전자 발현을 조절할 수 있는 방법도 개발되었다.

*Thermococcus kodakarensis*의 *simvastatin*/HMG-CoA reductase 과발현 시스템을 이용하여 국내연구진에 의해 발견된 *Thermococcus onnurineus* NA1 균주에서도 genetic manipulation이 가능하게 되었다. *T. onnurineus* NA1은 전체 genome에 8개의 hydrogenase gene cluster를 갖고 있는데 최근 carbon monoxide dehydrogenase (CODH) 유전자 클러스터 중 전자조절 단백질(TON\_1016)의 유전자를

disruption한 MC01 변이주를 제조한 결과 wild type 균주보다 수소생산능력이 3.8배가 증가됨을 확인하였다. (8)

가장 대표적인 초고온균의 모델 생물이었던 *Pyrococcus furiosus*에서도 genetic tool을 개발하려는 시도가 끊임없이 계속되었으나 다른 고온성 고균에 비해 별다른 성과를 거두지는 못하였다. 2010년 *P. abyssi*의 플라스미드로부터 shuttle vector인 pYS4를 construction한 후, simvastatin/HMG-CoA reductase 과발현 시스템을 이용하여 C-말단에 6개의 His-tag가 연결된 재조합 RNA polymerase subunit D (RpoD)를 *P. furiosus*에서 발현하고 정제하는데 성공한 것이 거의 유일한 보고였다. 그러나 이 방법은 copy number가 매우 낮고 natural competency가 없으며 gene disruption에 사용할 수 없는 단점이 있었다. (16)

하지만 2011년 *Pyrococcus furiosus* COM1 균주가 발견되면서 초고온성 고균의 유전학은 새로운 전기를 맞게 되었다. *P. furiosus* COM1 균주는 야생형인 *P. furiosus* DSM 3638 균주를 이용하여 *pyrF* deletion mutants를 만들려던 와중에 우연히 발견한 변이주이다. (11) COM1 균주의 가장 큰 특징은 매우 높은 natural competency를 갖고 있어서 형질전환을 위한 물리적 또는 화학적 처리가 필요 없다는 것이다. 또한 도입하려는 DNA가 circular/linear form이든 상관없이 외래 DNA를 받아들이고 homologous recombination이 매우 잘 일어나는 특징이 있다. 최근 *P. furiosus* COM1의 genome 서열이 보고되었는데 모균주인 *P. furiosus* DSM 3638이 35개의 insertion sequences (ISs)를 갖고 있는데 비해 COM1 균주는 45개의 IS들을 갖고 있어서 13개 유전자가 deletion되었거나 삽입 비활성화 되어 있었으며 그 외의 매우 많은 부위에서 rearrangements, deletions, single base change가 있는 것으로 확인되었다. (4)

*Pyrococcus furiosus* COM1 균주를 이용한 homologous/heterologous 단백질 발현이 최근 연이어 보고되고 있는데 *P. furiosus*의 cytoplasmic NADP(H)-dependent [NiFe]-Hydrogenase SHI를 과발현하여 wild

type 균주보다 10배의 활성 증가가 일어남을 확인하였으며 (5) 목질을 분해하는 고온성 세균인 *Caldicellulosiruptor bescii*의 lactate dehydrogenase (*ldh*)를 cold-shock 유도 단백질인 *sipA* promoter를 이용하여 발현하는데도 성공하였다. (2) 가장 최근에는 bacterial artificial chromosome (BAC) vector에 membrane-bound hydrogenase1 (*mbh1*) 프로모터와 *T. onnurineus*의 18개의 유전자(TON\_1563-1580)로 이루어진 formate hydrogen lyase (FHL) complex를 재조합한 25.8kb에 이르는 DNA를 *P. furiosus* COM1 균주의 염색체에 성공적으로 삽입하여 개미산(formate)으로부터 수소가 생산됨을 확인하는데 성공하는 등 그 응용 범위가 점차로 넓어지고 있다. (10)

이상과 같은 고온성 고균의 genetic tool이 본격적으로 개발되어 연구에 응용되기 시작한 것은 최근 3-4년의 일이다. 현재 고온성 고균 연구 가운데 가장 큰 관심을 받고 있는 분야는 바이오연료 분야로 새로운 유전자를 도입하여 바이오에탄올이나 바이오수소를 생산하기 위한 유전공학적 균주 개발이 매우 빠르게 이루어지고 있다. 또한 지금까지 잘 알려지지 않았던 고온성 고균의 생화학 또는 생리학적 연구에도 점점 더 많이 활용될 것으로 기대된다. 현재 국내에서 *Sulfolobus acidocaldarius*의 genetic tool을 이용한 연구는 부산대 차재호 교수팀이 (6), *Thermococcus onnurineus*를 이용한 연구는 한국해양과학기술원 강성균 박사팀이 수행하고 있는데 (8) 향후 국내에서도 이와 관련된 연구들이 더욱 활발히 일어나길 기대해 본다.

## ▶ 참고문헌

1. Atomi, H., T. Imanaka, and T. Fukui. 2012. Overview of the genetic tools in the archaea. *Front. Microbiol.* 3, 337.
2. Basen, M., J. Sun, and M.W. Adams. 2012. Engineering a hyperthermophilic archaeon for temperature-dependent product formation. *MBio.* 3, e00053-12.
3. Berkner, S., A. Wlodkowski, S.V. Albers, and G. Lipps. 2010. Inducible and constitutive promoters for genetic systems in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles.* 14, 249-259.
4. Bridger, S.L., W.A. Lancaster, F.L. Poole 2nd, G.J. Schut, and M.W. Adams. 2012. Genome sequencing of a genetically tractable *Pyrococcus furiosus* strain reveals a highly dynamic genome. *J. Bacteriol.* 194, 4097-4106.
5. Chandrayan, S.K., P.M. McTernan, R.C. Hopkins, J. Sun, F.E. Jenney Jr, and M.W. Adams. 2012. Engineering hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* to overproduce its cytoplasmic [NiFe]-hydrogenase. *J. Biol. Chem.* 287, 3257-3264.
6. Choi, K.H., S. Hwang, and J. Cha. 2013. Identification and characterization of MalA in the maltose/maltodextrin operon of *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639. *J. Bacteriol.* 195, 1789-1799.
7. Han, D., S.M. Norris, and Z. Xu. 2012. Construction and transformation of a *Thermotoga-E. coli* shuttle vector. *BMC Biotechnol.* 12, 2-6750-12-2.
8. Kim, M.S., S.S. Bae, Y.J. Kim, T.W. Kim, J.K. Lim, S.H. Lee, A.R. Choi, J.H. Jeon, J.H. Lee, H.S. Lee *et al.* 2013. CO-dependent H<sub>2</sub> production by genetically engineered *Thermococcus onnurineus* NA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2048-2053.
9. Leigh, J.A., S.V. Albers, H. Atomi, and T. Allers. 2011. Model organisms for genetics in the domain archaea: Methanogens, halophiles, thermococcales and sulfolobales. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 577-608.
10. Lipscomb, G.L., G.J. Schut, M.P. Thorgersen, W.J. Nixon, R.M. Kelly, and M.W. Adams. 2013. Engineering hydrogen gas production from formate in a hyperthermophile by heterologous production of an 18-subunit membrane-bound complex. *J. Biol. Chem.* (published online December 7, 2013)
11. Lipscomb, G.L., K. Stirrett, G.J. Schut, F. Yang, F.E. Jenney Jr, R.A. Scott, M.W. Adams, and J. Westpheling. 2011. Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: Construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2232-2238.
12. Lucas, S., L. Toffin, Y. Zivanovic, D. Charlier, H. Moussard, P. Forterre, D. Prieur, and G. Erauso. 2002. Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5528-5536.
13. Matsumi, R., K. Manabe, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. 2007. Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host-marker system based on antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 189, 2683-2691.
14. Sato, T., T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* 185, 210-220.
15. Sato, T., T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka. 2005. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3889-3899.
16. Waage, I., G. Schmid, S. Thumann, M. Thomm, and W. Hausner. 2010. Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3308-3313.
17. Zhang, C., T.E. Cooper, D.J. Krause, and R.J. Whitaker. 2013. Augmenting the genetic toolbox for *Sulfolobus islandicus* with a stringent positive selectable marker for agmatine prototrophy. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5539-5549.