

Odorless Escherichia coli and Usefulness of Sustainable Diffuser

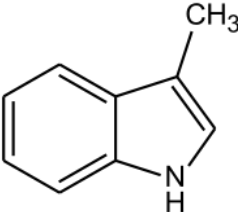
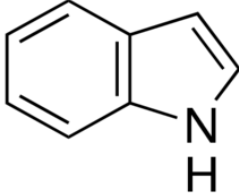
자연과학대학 화학과
20148002 강동혁
20168019 김도욱

Odorless Escherichia coli and Usefulness of Sustainable Diffuser

1. Information on Research Team

Name	Student ID	Department	Career	Role
강동혁	20148002	화학과	석박통합과정	팀장
김도욱	20168019	화학과	석박통합과정	팀원

2. Project Summary

Objective	<ol style="list-style-type: none"> 1. 대장균이 악취를 내는 대사 과정 및 원인 분석 2. 대장균의 대사 과정 변형 3. 좋은 향을 내는 대장균 제작
Description	<p>생화학을 공부하는 학생들이라면 누구나 대장균에게서 나는 역한 냄새 때문에 고통을 겪은 적이 있을 것이다. 우리는 이런 경험을 통해 왜 대장균은 악취가 나는지, 어떻게 하면 악취를 없앨 수 있는지를 고민하게 되었다. 그리고 꽃 향기가 가득한 실험실을 위해 '향기로운 대장균을 만들자'라는 생각을 하게 되었다.</p> <p>이를 실현하기 위해서는 크게 두 가지 과정이 필요하다. 첫 번째로, 대장균이 내는 악취의 원인이 무엇인지 파악하고, 악취를 없앨 수 있는 방법을 찾아내어야 한다. 대변이나 방귀 냄새는 skatol이라는 물질에 기인한다. Skatol은 indole의 3번 탄소에 메틸기가 붙어있는 구조이다. 우리는 이처럼 indole 유도체들이 악취를 내는 직접적인 원인일 것이라고 생각한다. 따라서 우리는 대장균의 대사 과정을 엔지니어링하여 indole류의 화합물을 만드는 경로를 없애거나 조작하여 약화시킨다.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Figure 1. Structure of skatol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Figure 2. Structure of indole</p> </div> </div>

다음으로, 꽃 향기나 과일향 등 좋은 향기로 인식되는 물질들을 대장균 내에서 생합성하는 방법을 찾고자 한다. 이 때 사용될 아로마 물질들은 종류가 굉장히 다양하다. 여러 아로마 물질들은 생체 내에서는 반응 메커니즘이 명확하지 않거나 중요 효소들이 세균, 특히 대장균 내에서 발현되지 않는 경우가 많다. 우리는 citrus 향을 내는 limonene, menthol 향이 나는 menthol이나 과일 향이 나는 ester 류 화합물(benzyl acetate, butyl acetate) 등이 생합성 가능한지 조사하고 합성 과정을 최적화하고자 한다.

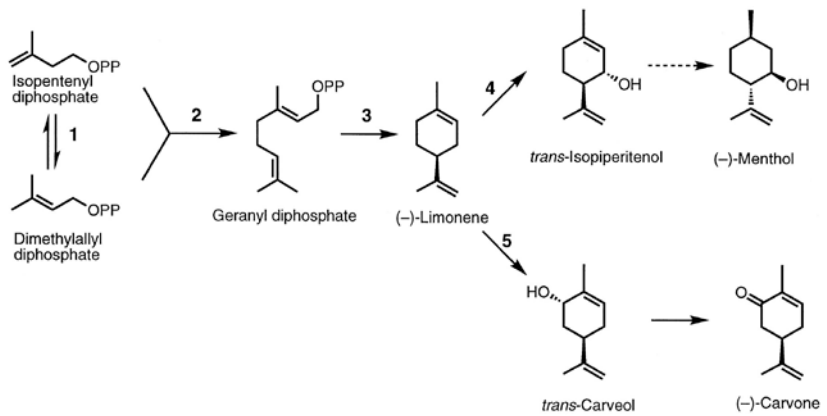


Figure 3. Biosynthesis pathway of limonene

우리는 향기로운 대장균 연구를 계획하면서 이 연구를 활용할 수 있는 몇몇 재미있는 방법을 떠올렸다. 향기를 내는 데에는 외부에서 가져온 특별한 효소들이 필수적이다. 표적 단백질과 아로마 물질 합성 효소를 융합한 재조합 단백질을 구성하면 냄새로 단백질의 발현 유무를 확인할 수 있다.

또 다른 아이디어는 우리와 커뮤니케이션하는 대장균이다. 아기나 강아지는 자신들이 불편할 때 소리를 이용하여 남들에게 알린다. 하지만 대장균은 스트레스를 받아도 우리에게 알릴 방법이 없다. 만약 대장균이 생존에 불리한 조건에서 향기를 내게 만들 수 있다면 우리는 대장균의 문제를 빠르게 알아차릴 수 있을 것이다.

무엇보다도 이번 연구를 통해 만들어진 향기로운 대장균은 연구환경 개선에 큰 도움을 줄 것이다. 테이블마다 달콤한 향기를 내는 대장균 플레이트가 놓여진다면 대학원생들이 자연스럽게 앉고 싶어지지 않을까?

Novelty / unusualness

GFP labeling, X-Gal blue white screening 등 합성생물학 분야에서 시각 정보를 이용하는 마커는 많다. 하지만 한 번에 사용할 수 있는 컬러 채널은 4가지 정도로 제한되어 복잡한 시스템을 연구하는 데는 한계가 있다. 이를 해결할 방법은 이전에는 없었다. 시각 못지 않게 인간의 후각 시스템도 민감도가 높는데, 현재까지는 이에 대한 연구

	<p>가 상대적으로 부족했다고 생각된다. 후각 정보를 활용하는 Olfactory reporter는 시각 정보와 함께 활용될 수 있는 새로운 마커가 될 수 있을 것이다.</p> <p>이러한 학술적인 의미 이외에도, 아름다움을 추구하는 인간의 본능은 후각의 영역에서도 마찬가지라고 생각한다. 모든 사람들은 좋은 향기를 맡고 싶어하고, 또 좋은 향기를 맡으면 기분이 좋아지게 된다. 이번 연구를 진행하면서 동시에 같은 연구실 사람들을 대상으로 '좋은 향기를 맡는 것이 대학원생의 프로젝트의 성공률에 어떤 영향을 미치는가'도 함께 조사해 볼 수 있을 것이다.</p>
Scholarly profundity	<p>우리의 연구는 크게 대장균의 악취를 제거하는 것과 향기를 내는 물질을 합성하는 것의 두 가지 부분으로 나누어진다. 먼저 대장균의 악취를 제거하기 위해서는 대장균의 대사 경로를 엔지니어링하여 악취의 원인이 되는 물질의 합성을 저해하여야 한다. 대사 경로를 조절하기 위해서는 관련 유전자를 불활성화하여 단백질의 활성을 제거하는 knock-out이나 단백질을 코딩하는 mRNA의 번역을 억제하여 활성을 줄이는 knock-down 방법을 통해 합성에 관여하는 단백질들을 조절하여야 한다. indole류는 트립토판 형성 등 대장균 내에서 생존과 관련된 역할에 관여하기 때문에 단백질의 활성을 제거하기보다는, 활성을 줄이는 knock-down 방법이 적절할 것으로 예상된다.</p> <p>Knock-down은 작은 RNA 조각인 small RNA(sRNA)가 mRNA와 결합하여 번역과정에서 필수적인 몇몇 유전적 요소(ribosome binding site, formyl methionine codon, etc)를 불활성화하는 방식으로 작동한다. sRNA가 mRNA의 어떤 위치에 결합하는지에 따라 단백질 발현의 정도가 달라지기 때문에 비교적 자유롭게 단백질 생산량을 조절할 수 있다. 또한 sRNA를 외부에서 지속적으로 제공할 필요 없이 plasmid에 on/off 가능한 프로모터 아래에 삽입하므로 대장균 내부에서 선택적으로 단백질 생산을 조절할 수 있다. 이러한 특징은 짧은 시간 동안 다양한 단백질의 생산을 제어할 수 있도록 하며, 표적 물질 생산에 최적화된 조건을 찾는 데 큰 도움이 된다.</p> <p>두 번째로 향기를 내기 위해서는 비교적 화합물인 limonene이나 furaneol 등의 화합물을 대장균 내에서 생합성하고 발현시켜야 한다. 대장균 내에 존재하는 선구물질들을 이용해서 합성해야 하기 때문에 선구물질 중 필요한 물질을 모두 합성하는 벡터를 설계해야 한다. 현재 우리가 첫째 목표로 삼고 있는 물질은 레몬향을 내는 limonene이다. limonene은 두 가지 이성질체가 있는데 (+)-limonene은 오렌지향으로, (-)-limonene은 강한 레몬향으로 인식된다. 자연계에 존재하는 효소들은 두 가지를 모두 합성할 수 있으며 두 이성질체 중 한 가지만을 선택적으로 합성하는 것도 가능하다.</p> <p>실험의 최종 목표는 외부의 간섭 없이 대장균 내에 존재하는 대사</p>

	<p>물질로만 (-)-limonene을 합성하는 것이다. 이를 위해서는 외래 효소들이 인식하는 substrate를 모두 대장균이 합성할 수 있어야 한다. 각 대사과정에 필요한 중간물질을 합성하는 효소들과 전술한 sRNA를 하나의 플라스미드에 construction한다면 기존에 사용되던 multi-plasmid system을 회피하여 더 값싸고 쉽게 (-)-limonene을 생산할 수 있을 것이다.</p>
<p>Research plan</p>	<p>I. 대장균 악취 제거</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 악취 후보 물질 및 후보 물질 합성 경로 조사 2. 각 경로에 존재하는 효소들에 특이적으로 작동하는 sRNA 제작 3. sRNA 생산 플라스미드 제작 및 대장균 내에서의 활성 확인 4. Knock-down 된 대장균에서 목적인 물질의 생산을 변화 확인 5. 대량 배양하여 악취가 사라졌는지 확인 <p>II. 아로마 물질 생합성</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 자연에 존재하는 아로마 물질 조사 및 후보 선택 2. 후보 물질의 생합성 과정 및 관련 효소, 단백질 조사 3. PCR을 통한 유전자 증폭 또는 유전자 합성으로 필수 유전자 확보 4. 확보된 유전자를 발현시키기 위한 플라스미드 시스템 제작 5. 각각의 유전자가 암호화하는 단백질의 생산 및 활성 확인 6. sRNA 플라스미드를 가진 대장균에서 후보 물질의 합성 유무 및 향기의 유무를 확인