

여러 가지 Carbon Sources 에서 성장하는 *Eschericia Eoli* 의 동적 거동 예측

이성근, 김인혁, 김미정, 황규석*

부산대학교 화학공학과

(kshwang@pusan.ac.kr*)

Dynamic Behavioral Prediction of Various Carbon Sources-grown *Escherichia coli*

Sung Gun Lee, In Hyuk Kim, Mi Jeong Kim, Kyu Suk Hwan*

Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan, Korea.

(kshwang@pusan.ac.kr*)

서론

최근 완전히 서열화된 미생물 지놈들을 신속하고, 정확하게 전산적 분석을 실시하여, 세포 전체의 종합적인 생화학적 대사경로를 구축할 수 있게 되었다. 이로 인해서 세포의 기능을 PC상에서 모사할 수 있는 여러 가지 *In silico* models에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서 FBA(flux balance analysis)는 상세한 속도식이 부족한 상황에서 대사 능력(metabolic capabilities), 세포 성장을, 대사 부산물, 기질의 농도와 원하는 성분을 생성시킬 수 있는 중요한 반응들을 정확하게 분석할 수 있다 [5, 6, 7]. 분석에 필요한 정보는 대사경로의 양론계수, 대사이요구량, 그리고 기본적인 물리화학적 제약조건이며, 이러한 정보는 잘 알려져 있기 때문에 쉽게 이용할 수 있다.

최근에 몇몇 연구자들은 조절 제약 조건(regulatory constraints)을 Varma가 제안한 dFBA(dynamic flux balance analysis)에 통합 시키려고 시도하고 있다. 그 이유는 제약조건들이 미생물의 거동에 큰 영향을 미치기 때문이다. dFBA에서 조절 제약 조건은 논리적 방법 [1]으로 표현되어질 수 있다. 이 방법을 가진 dFBA는 *E. Coli*의 이단계 적응성장을 정량적으로 예측하기 위해서 사용되어졌다.

논리적 표현방법은 생성규칙(production rule—If than rule)과 불린논리(boolean logic)로 표현된 논리식(logic equation)을 사용한다. 이러한 생성시스템(production system)은 어떤 조건에 따른 결과, 즉 상황을 나타내는 지식을 쉽게 규칙으로 표현할 수 있는 장점이 있다. 반면에 이러한 불린 규칙은 (I) binary system이기 때문에 복잡한 조절 단백질의 상호관계를 표현할 수 가 없는 문제가 발생될 수 있다 [2]. (II)어떤 규칙들이 순서대로 적용되었는지 알 수 없기 때문에 [8], 외부 환경 변화에 따른 유전자들의 조절 메커니즘을 알 수 가 없었

다. 또한 (III)최적의 대사 흐름 분석, 최대 성장률, 그리고 세포의 거동을 예측하기 위해서, linear programming package(LINGO)와 spreadsheet package (EXCEL)을 사용하여왔다. 이러한 프로그램은 예측 결과를 비주얼하게 표현하는 데에 한계가 있고, 사용자가 모델의 입력 변화의 영향을 쉽게 알 수가 없었다.

본 논문에서는 위에서 언급한 것들을 해결하기 위해서, (I)조절 요소들(regulatory protein, genes, effectors etc.) 사이의 관계를 더욱더 유연하게 표현하기 위해서 결합의 정도를 나타내는 가중치 개념을 도입하였다. (II)외부환경 변화에 따른 유전자들의 조절 메커니즘을 표현하기 위해서, 정의된 기호로 계층적 조절 네트워크(hierarchical regulatory network)를 모델링하였다. (III)사용자가 쉽게 정량적으로 예측할 수 있고, 비주얼한 결과를 보여줄 수 있는 통합 시스템을 개발하였다. 프로그램 개발은 비주얼 프로그램 환경인 LabVIEW에서 실행되었다.

본론

1. Visual Programming

모든 프로그래밍 과정은 LabVIEW version 7.1(National Instruments Ltd.)에서 만들어 졌고, 1GByte RAM을 가진 IBM Computer에서 실행되어졌다. 최적의 플러스 분배와 최대 성장률을 구하기 위해서, LabVIEW에서 지원하는 Sub.VI인 Linear Programming Simplex Method.VI를 사용하였다.

2. Fundamental Modeling Symbols

계층적 조절 네트워크를 구성하고 있는 오페론은 기호(Symbol), 간선(Arc), 가중치(Weight)로 구성되어 있다. 모델링 기호는 조절(regulation)을 위한 생물학적 기호들과 가중치를 위한 비생물학적 기호들로 구분된다. 프로모터, not gate, 오퍼레이터 기호들은 하나의 클러스터를 형성하여 유전자 전사(gene transcription)의 기능을 담당한다. 간선은 각 기호들 간에 인과관계의 유무와 가중치를 전파시키는 기능을 한다. 가중치가 심볼들의 활성화유무를 결정하기 위해서 사용되지는 것 이외에, 노드사이에 결합의 정도를 나타낼 수 있다. 이는 binary system으로 나타낼 수 없는 경우에 효과적으로 사용할 수 있다.

3. Construction of Hierarchical Regulatory Network

정의된 기호들로 구성된 계층적 조절 네트워크는 조절 단백질들이 어떻게 유전자들의 세트를 조절하는지 직관적으로 알 수 있다. 이 네트워크는 stimulus, modulon, regulon/operon, gene level, metabolic pathway level로 나눌 수 있다. Stimulus level은 단순한 환경 변화(a simple environmental change)를 나타낸다. Modulon level은 세포 외부 환경의 변화에 반응하고, 하나 이상의 효과를 나타내는 regulatory protein에 의해서 regulon/ operon을 통합적으로 조절하는 기능을 한다. Regulon/operon level은 common regulatory protein에 의해서 직접적으로 오페론들의 세트 또는 유전자들의 세트를 조절한다 [4]. Gene level은 오페론에 의해서 조절되는 유전자들의 active /inactive를 나타낸다. 이러한 유전자들은 metabolic pathway level에서 세포성장에 필요한 대사물질을 합성하거나 분해하는 기능을

하게 된다.

4. Central Metabolic Network of *E. coli*

본 논문에서는 이전에 연구되어진 central metabolic pathway of *E. Coli* [3]을 채택했다. central metabolic pathway에 관련된 21개의 조절단백질 중에서, 혐기성, 호기성, glucose, lactose, succinate, acetate, ethanol, tryptophan metabolism에 관련된 13개의 조절단백질들을 *In silico* system에 포함하였다.

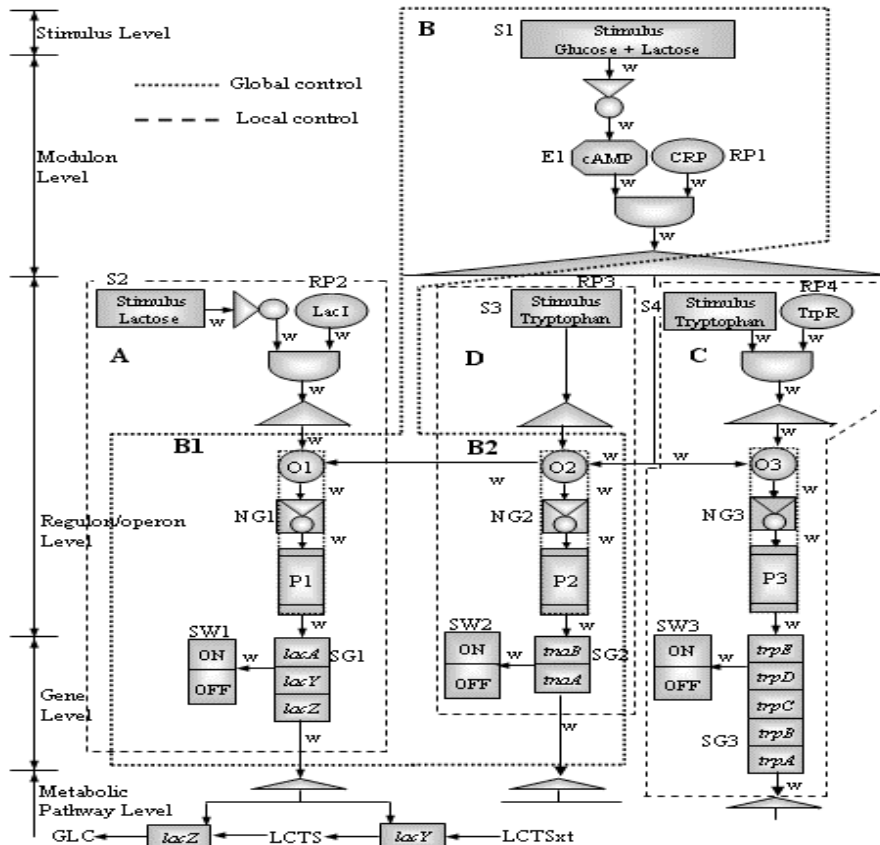


Fig. 1 Hierarchical regulatory network

5. Composition of *In silico* system

In silico system은 크게 네가지로 구성이 되어있다; Extracellular Environment Setting Mode and Constraints, Optimal Flux Distributions and Time Profile for Substrates, Dynamic Flux Distribution, Dynamic Hierarchical Regulatory Network.

결론

조절 네트워크의 계층적 구조 (Fig. 1), central metabolic pathway [3]와 parameters의 값들을 이용하여, 시간에 따른 유전자 조절을 모사함으로써, 본 연구에서 제시한 모델링이 설명되어졌다. Case Study1과 Case Study2을 simulation하기 위해서 초기조건 (biomass : 0.011 g/l,

glucose : 1.6 mM, lactose : 5.8 mM, tryptophan : 1 mM delay time : 0.5h)과 흡수율제한조건 (glucose : 6.5 mM, lactose : 3.0 mM, tryptophan : 2.0 mM, Oxygen : 15.0mM)을 정하였다.

Case Study 1. Glucose and Lactose in Medium

세포 외부환경에 glucose와 lactose가 있는 경우에, $t=0(h)$ 에서 $t=4.45(h)$ 에서 glucose가 대사되었다. $t=4.45(h)$ 에서 $t=4.95(h)$ 에서는 alternate carbon source인 lactose를 대사하기 위한 gene들이 발현되었고, $t=4.95(h)$ 에서 $t=8.59(h)$ 구간 동안 Lactose가 대사되었다.

Case study 2. Glucose and Tryptophan in Medium

세포 외부환경에 glucose와 tryptophan이 존재하는 경우에, $t=0(h)$ 에서 $t=4.45(h)$ 에서 glucose 대사구간이었고, $t=4.45(h)$ 에서 $t=4.95(h)$ 에서는 alternate carbon source인 tryptophan을 대사하는데 필요한 효소들이 발현되었다. $t=4.95(h)$ 에서 $t=8.59(h)$ 의 구간 동안 tryptophan가 대사되며, tryptophan이 소비되는 동안에 tryptophan을 생성 못하게 하기 위해서 *trpABCDE*가 계속비활성화 되었다.

본 연구에서 제시한 모델링방법과 *In silico* system은 사용자에게 예측 결과를 직관적으로 인지할 수 있는 방법을 제공할 수 있다. 정의된 기호들로 모델링한 계층적 조절 네트워크는 좋은 예이다. 이 시스템은 생물학자와 공학자에게 여러 환경 조건하에서 세포의 거동을 연구하는 할 때에 좋은 도구로서 사용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- [1] W.C. Covert, C. H. Schilling, and B. O. Palsson, Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism, *J. Theor. Biol.* **213**, 2001, 73–88.
- [2] M.W. Covert, E. M. Knight, J. L. Reed, M. J.Herrgard, and B. O. Palsson, Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks, *Nature*, **429**, 2004, 92-96.
- [3] C. H. Schilling, J. S. Edwards, Letscher D., and B.O. Palsson , Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **71(4)**, 2000, 286-306.
- [4] G. N. Stephanopoulos, A. A. Aristidou, and J.Nielsen, *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, 1998, pp180-193, Academicpress, London, UK.
- [5] A. Varma, B.W. Boesch, and B.O. Palsson, Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1993, 2465-2473.
- [6] A. Varma and B.O. Palsson, Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product Secretion in wild type *Escherichia coli* W3110, *Appl. Environ. Microbol.*, **60**, 1994a., 3724-3731.
- [7] A. Varma and B.O. Palsson, Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use, *Bio/Technology*, **12**, 1994b, 994-998.
- [8] P.H. Winston, *Artificial Intelligence*, 1992, pp119-137, Addison Wesley, U.S.A