

Butanol 생합성 *Clostridium* 속 미생물 대사공학용 게놈 편집 도구 개발

우지은¹, 김민지¹, 이지원¹, 서효주¹, 이상엽², 장유신^{1*}

Development of Genome Engineering Tools for Metabolic Engineering of Butanol-producing *Clostridium* Species

Ji Eun Woo¹, Minji Kim¹, Ji Won Lee¹, Hyo Joo Seo¹, Sang Yup Lee², and Yu-Sin Jang^{1*}

Received: 22 November 2016 / Revised: 2 December 2016 / Accepted: 5 December 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Global warming caused from the heavy consumption of fossil fuel is one of the biggest problems to be solved. Biofuel has been gained more attention as an alternative to reduce the consumption of fossil fuel. Recently, butanol produced from the genus *Clostridium* has been considered as one of the promising alternatives for gasoline, fossil based fuel. Nevertheless, the lack of the genome-engineering tools for the genus *Clostridium* is the major hurdle for the economic production of butanol. More recently, genome engineering tools have been developed for metabolic engineering of butanol-producing *Clostridium* species, which includes genome scale network model and genome editing tools on the basis of mobile group II introns and CRISPR/Cas system. In this study, the genome engineering tools for butanol-producing *Clostridium* species have been reviewed with a brief future perspective.

Keywords: *Clostridium*, Genome engineering, Butanol, Mobile intron, CRISPR

1. INTRODUCTION

과다한 석유의 사용으로 대기 중 온실가스가 급증함으로써 기후변화와 같은 환경 문제가 크게 대두되고 있다. 이러한 환경문제를 야기하는 화석연료의 사용을 자제하고 차세대 대체 연료를 사용하고자 하는 노력이 최근 큰 관심을 받고 있다. 차세대 바이오 연료에 대한 관심의 증가에 따라 bio-butanol에 대한 관심이 커지면서 *Clostridium*을 이용하여 butanol을 생산하고자 하는 노력도 커지고 있다 [1]. 자연에서 분리한 야생형 *Clostridium* 균주들은 butanol을 생합성할 수 있는 대사 회로를 가지고 있으나, acetate, butyrate, acetone, ethanol과 같은 부산물들을 동시에 생산하는 것으로 잘 알려져 있다 [2]. 특히, butanol과 동시에 생산되는 acetone 및 ethanol과 같은 유기용매들의 영문 첫 글자만 따서 ABE fermentation으로 이름 지어지기도 했으나, 이들은 butanol 생산에 있어서 부산물 일 뿐이다. 차세대 연료로 사용 가능한 butanol을 생산하기 위한 숙주로서 *Clostridium*은 큰 매력을 가지고 있었지만, 오랜 기간 동안 이들의 대사회로를 조절하기 위한 효율적인 게놈 편집 도구들은 없었다 [1].

최근 수년 동안 *Clostridium*에 대한 게놈 정보들이 많이 발표되고 있으며, 게놈 정보를 활용한 *in silico* 모델 또한 빠른 속도로 개발되어 보고되고 있다 [3]. 이러한 게놈 정보와 이를 기반으로 구축된 *in silico* 모델은 목적하는 바이오화합물의 최적 생산을 위한 유전자 증폭 또는 knockout 대상을 효율적으로 제안해줄 수 있다. *Clostridium*을 사용하여 목적 바이오화합물 생산을 위한 대사공학에서 사용하는 게놈 편집은 mobile group II intron과 CRISPR/Cas 시스템을 이용하는 기술들이 최근 개발되어 활용되고 있다. 따라서, 본 논문에서는 바이오화합물 생산을 위한 *Clostridium*의 대사공학 도구로서

¹경상대학교 농업생명과학연구원

¹Institute of Agriculture & Life Science (IALS), Department of Agricultural Chemistry and Food Science Technology, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea
Tel. +82-55-772-1964, Fax. +82-55-772-1969
e-mail. jangys@gnu.ac.kr

²한국과학기술원 생명화학공학과

²Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 plus program), Bioinformatics Research Center, BioProcess Engineering Research Center, Center for Systems and Synthetic Biotechnology, KAIST, Daejeon 34141, Korea

게놈 정보 기반의 *in silico* 모델, mobile group II intron과 CRI-SPR/Cas 시스템을 이용한 게놈 편집 기술에 대해서 리뷰하고 향후 관련 분야의 발전 방향을 전망하였다.

2. Butanol 생산용 *Clostridium* 속 미생물 게놈 정보 및 *in silico* 모델의 개발

전체 게놈 정보는 butanol 생합성을 위한 최적 대사회로를 구성하기 위한 대사회로를 제공하기 때문에 대사공학에 있어서 매우 중요한 정보를 제공한다. 지금까지 butanol을 생합성할 수 있는 *Clostridium* 속 미생물 중, *C. acetobutylicum* (4.1 Mbp)의 전체 게놈 정보가 가장 먼저 보고되었다 [2, 4-6]. 이후, *C. beijerinckii* (6.0 Mbp) 및 *C. carboxidivorans* (5.7 Mbp)의 전체 게놈 정보가 분석되어 보고되었다 [7, 8]. 뿐만 아니라, butanol 생합성 능력은 없지만, 대사공학을 통하여 butanol 생산을 위한 host로 사용되고 있는 *C. ljungdahlii* (4.6 Mbp) 및 *C. tyrobutyricum* (3.1 Mbp)에 대한 전체 게놈 정보가 보고되었다 [9, 10]. 이와 같은 전체 게놈 정보는 대사네트워크의 구성을 통한 직관적인 대사공학을 위한 전략을 제공할 뿐만 아니라 시스템 차원에서 최적 butanol 생합성 대사회로를 최적 설계하기 위한 *in silico* 대사네트워크 구축을 위한 토대를 제공하기도 한다.

*C. acetobutylicum*의 대사흐름에 대한 화학량론 모델 (stoichiometric model)은 전체 게놈 정보가 밝혀지기 전인 1984년에 최초로 만들어졌으며 [11], 이후 다양한 연구들에서 *C. acetobutylicum*의 세포 내의 대사흐름을 분석하기 위한 도구로 활발히 활용되고 있다 [1, 12-15]. 이후, *C. acetobutylicum*의 전체 게놈 정보에 기반한 게놈 수준 대사네트워크 모델들이 개발되어 보고되었다 [16-19]. Senger 등 (2008)은 flux-balance analysis (FBA)와 세포막을 통한 세포 내부로의 총 proton 흐름으로 정의되는 specific proton flux (SPF) 개념을 이용하였다. 해당 연구에서는 SPF가 산생성기일 때는 음의 값이고, 용매생성기일 때는 양의 값인 점에 착안하여 두 개의 phase를 구분하였다 [17, 18]. 같은 해에 Lee 등 (2008) 또한 산생성기와 용매생성기를 구분하는 모델을 제안하였다. 산생성기에는 flux distribution을 결정하기 위하여 FBA를 적용하여 세포 형성을 최대화하는 방법을 적용하였고, 용매생성기에는 acetic acid와 butyric acid의 흐름에 대해서만 예외로 하고 나머지 흐름의 변화에 대해서는 최소화하는 방법 (minimization of metabolic adjustment, MOMA)을 적용하였다 [16]. Gallardo 등 (2016)은 Senger 등 (2008)의 SPF 개념을 이용하여 *C. acetobutylicum*의 게놈 수준 대사네트워크 모델을 보고하였다. *C. beijerinckii*의 대사네트워크 모델 또한 SPF 개념을 이용하여 만들어져 보고되어 있다 [20]. Butanol을 생산하는 *Clostridium* 중, kinetic 모델은 처음으로 *C. saccharoperbutylacetonicum*에 대한 대사네트워크 모델로 제안되었다 [21]. 이후 다른 그룹에서 효소 활성이 동적으로 반영된 *C. acetobutylicum*에 대한 kinetic 모델을 제안하였다 [22]. 이러한 효소의 활성

은 pH 같은 외부환경으로부터 영향을 받기 때문에, 또 다른 그룹에서는 pH 변화에 따른 *C. acetobutylicum*의 kinetic 모델을 제안하였다. 이와 같은 모델에서는 chemostat에서 pH 4.5 부근에서는 용매생성기로 이들 용매 생산에 관여하는 효소들을 코딩하는 *sol* 오페론이 활성화되고, 환경의 pH가 상승하게 되면 이들 효소들의 활성이 감소하는 경향을 대사네트워크 모델에 반영하였다 [23-26]. 하지만, 유전자 발현 등의 조절에 관여하는 pH와 같은 환경적 요인이 어떻게 대사산물 생산에 연결되어 있는지를 정확히 알 수 없기 때문에, 이들 모델들은 다른 조건에서의 결과들에 대한 시뮬레이션에 있어서는 제한적일 수밖에 없다 [27]. 최근에는 대사 반응 (metabolic reactions), 유전자 조절 (gene regulation), 환경 신호 (environmental cues)를 모두 반영한 *C. acetobutylicum*의 모델 개발이 시도되었다 [28]. 해당 모델을 이용한 연구에서는 대사산물의 생산, 포자형성, 세포독성 등의 상호관계들을 모사할 수 있었다 [28].

3. Mobile group II intron을 이용한 butanol 생합성 *Clostridium* 속 미생물 게놈 편집

3.1. Mobile group intron 발현 및 형질전환 방법

Mobile group intron을 이용하여 *Clostridium* 속 미생물 게놈 편집을 위해서는 숙주 내에서 복제가 가능한 plasmid가 존재하여야 한다. 대표적 butanol 생합성 *Clostridium*인 *C. acetobutylicum*과 *C. beijerinckii* 세포에서 복제 및 유전이 가능한 plasmid는 1990년대에 다수 개발되어 보고된 바 있다. 이들 *Clostridium*에서 복제 가능한 대표적인 replicon은 *Enterococcus faecalis* 유래 pAMb1, *Clostridium butyricum* 유래 pCB102, *Bacillus subtilis* 유래 pIM13인 것으로 알려져 있다 [29-31]. pAMβ1 replicon으로부터 pMTL21E가 만들어졌으며 [29], pIM13 replicon으로부터 pFNK1이 제작되었다 [30]. 현재 널리 사용되고 있는 대부분의 *Escherichia coli* - *C. acetobutylicum* shuttle vector에는 상기 replicon들이 이용되고 있다. 하지만, *C. acetobutylicum*은 상기 shuttle vector를 이용한 대사공학에 제한이 있었는데, 그것은 *E. coli*에서 분리한 plasmid를 형질전환하면 효율이 매우 낮기 때문이다. *C. acetobutylicum*은 5'-GCNGC-3' 서열을 인식하는 매우 강력한 restriction system (*Cac824I* 유전자가 암호화)이 있기 때문이다. 이 문제는 *B. subtilis* phage Φ 3T I methyltransferase를 이용하여 *E. coli*로부터 분리한 plasmid를 메틸화한 후 형질전환하는 방법이 개발되면서 해결되었다 [32]. 이러한 plasmid 및 형질전환 기법을 기반으로 mobile group II intron을 이용 가능하게 되었다.

3.2. Mobile group intron을 이용한 solventogenic *Clostridium* 속 미생물 유전자 결실

모델 미생물로서 연구가 잘 되어 있는 *E. coli*와 *Saccharomyces cerevisiae*와는 달리, solventogenic *Clostridium* 유전자 결실 및 게놈 편집은 최근까지 쉬운 일이 아니었다. 2007년 이

전에는 상동성재조합 기법을 이용하여 목적하는 유전자에 plasmid를 single-crossover시켜 목적유전자의 기능을 파괴하는 기법이 활용되었으나, 그 성공확률이 매우 낮았다. 성공한 예는 *C. acetobutylicum* *buk* 유전자를 목적하여 mutation을 일으켜 만든 PJC4BK 균주가 대표적인 것이다 [33]. 이후, solventogenic *Clostridium* 유전자 결실에 대한 괄목할 만한 연구 결과는 보고된 바 없었다. 비로소 2007년에 mobile group II intron을 이용한 유전자 결실 기법이 solventogenic *Clostridium*에 성공적으로 적용됨으로써 유전자 결실 및 게놈 편집 연구가 활발히 진행되었다 [34, 35].

일명 ‘TargeTron’ (*Clostridium*에 응용한 경우는 ‘ClosTron’으로 명명되기도 함)으로 불리는 mobile group II intron 기술은 mobility를 가지는 intron을 게놈 상의 목적 유전자에 삽입할 수 있는 기술이다 (Fig. 1). Mobile group II intron은 bacteria 뿐만 아니라 fungi, protozoa, algae, archaea 등 다양한 종에서 고르게 발견되는 것으로 보고되어 있다 [36]. 중온균인 solventogenic *Clostridium* 유전자 결실 및 게놈 편집에는 *Lactococcus lactis* 유래 *Ll.LtrB* intron이 사용되고 있다 [1]. *Ll.LtrB* intron은 intron RNA 도메인과 open reading frame (ORF) 도메인으로 크게 구분할 수 있다. Intron RNA 도메인은 exon binding sites (EBS)1, EBS2, δ 로 구성되어 있는 splicing 자리를 포함한다 [37]. ORF 도메인은 역전사효소 (RTase), maturase, endonuclease를 암호화하는 유전자를 포함한다 [36]. 고온균인

Clostridium thermocellum 유전자 결실에는 고온에서 melting이 가능한 *Thermosynechococcus elongates* 유래 *TeI3c/4c* intron을 이용하는 것으로 알려져 있다 [38]. Mobile group II intron이 목적 유전자에 삽입되는 mechanism을 retrohoming이라 칭하며, splicing된 intron RNA와 역전사효소가 RNA-단백질 복합체를 형성한 후 목적 유전자에 intron RNA를 역전사하는 것으로 알려져 있다 [37].

이 기법을 응용하여 *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*와 같은 주요 butanol 생산 *Clostridium*의 *spo0A*, *pta*, *ack*, *ptb*, *buk*, *hbd*, *hydA*, *argA*와 같은 단일 유전자 결실 돌연변이들이 제작되어 보고된 바 있다 [1, 34, 35]. Mobile group II intron을 이용한 유전자 결실은 숙주에서 복제 가능한 plasmid를 바탕으로 하기 때문에, 두 번째 유전자 결실을 위해서는 먼저 첫 번째 유전자 결실에 사용하였던 plasmid의 제거가 필요하다. 이와 같은 과정을 거쳐 이중 돌연변이를 제작하는 것은 매우 까다로운 일이었다. 이러한 이유로 mobile group II intron을 solventogenic *Clostridium* 유전자 조작에 적용하기 시작한 2007년으로부터 3년 뒤인 2010년에 처음으로 *agrA/spo0A* 이중 돌연변이체가 개발되어 보고된 바 있다 [39]. 2012년에는 첫 번째 유전자 결실에 사용한 plasmid의 제거 없이 다음 순서의 유전자를 결실할 수 있는 새로운 방법이 개발되어 *pta/buk*, *pta/ctfB*, *ptb/buk*와 같은 다수의 이중 돌연변이체를 포함하여 *pta/buk/ctfB*와 같은 삼중 돌연변이 *C. acetobutylicum* 제작에

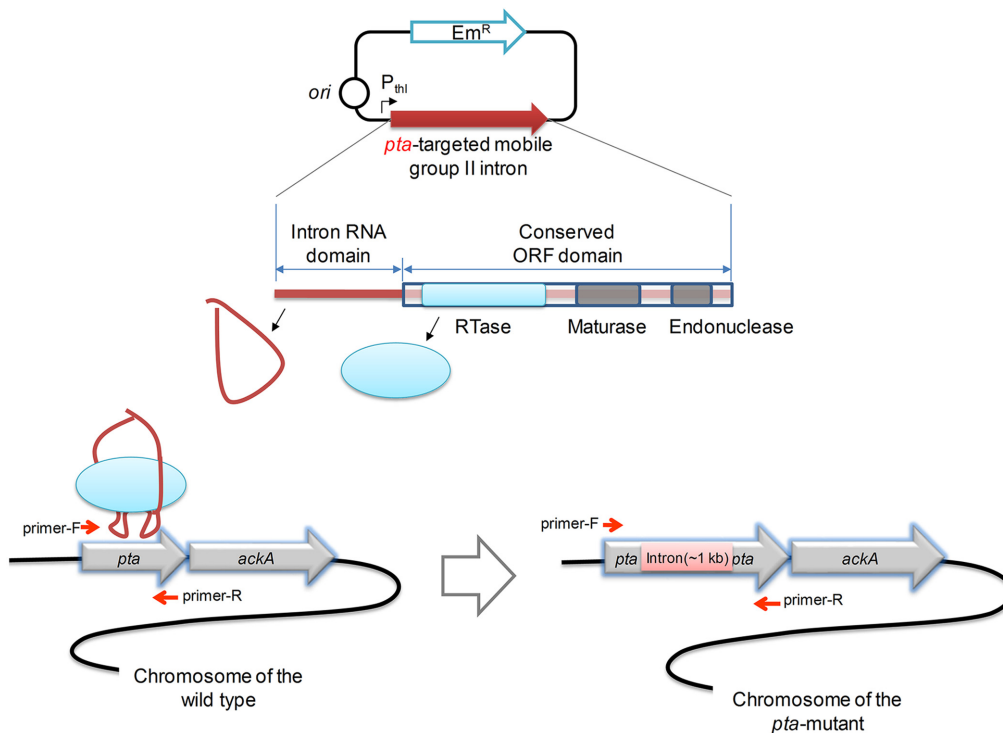


Fig. 1. Schematic presentation of the genome engineering by using the *L. lactis* *Ll.LtrB* mobile group II intron targeting the *pta* gene in a butanol producing-*Clostridium*. Abbreviations: *Em^R*, the gene encoding enzyme responsible for erythromycin resistant; *ori*, replication origin; RTase, reverse transcriptase; primer-F and primer-R, primers to confirm the integration of intron into the *pta* gene; *pta*, the gene encoding phosphotransacetylase; *ackA*, the gene encoding acetate kinase.

대한 보고가 있었다 [1]. 해당 연구에서는 돌연변이 선발 마커로 erythromycin과 chloramphenicol 항생제 내성에 관여하는 단백질을 암호화하는 유전자 2개를 사용하였으며, 한 세포 내에서 동일한 replicon을 가진 서로 다른 plasmid가 존재할 수 없는 plasmid incompatibility 특징을 활용하였다. 첫 번째 목적하는 유전자 결실을 위하여 erythromycin 내성 마커를 사용한다면, 두 번째 목적하는 유전자 결실을 위하여 첫 번째와 동일한 replicon을 가지는 chloramphenicol 항생제 내성 유전자를 가진 plasmid를 사용한 것으로 보고되었다 [1]. 같은 연구 그룹의 2014년 보고에 따르면, 사중, 오중 돌연변이 제작을 위한 네 번째, 다섯 번째 유전자 결실 과정에서는 앞서 사용한 방법이 적용되지 않음을 보고하고 있다 [40]. 그 이유에 대해서는 아직 정확하게 밝혀져 있지 않지만, 공존하던 동일한 replicon에 자연 돌연변이가 유발되었을 가능성을 제시하고 있다 [40]. 사중, 오중 돌연변이 *C. acetobutylicum* 제작을 위하여 두 개의 plasmid 중 한 개는 반드시 curing이 필요한 것으로 알려져 있다 [40]. 항생제 마커만 다르고 동일한 replicon을 가지는 두 plasmid 중 하나를 curing하기 위하여 두 항생제 중 하나만을 선택하여 (chloramphenicol을 함유하는 배지에서) 계대 배양함으로써 나머지 항생제 (erythromycin) 내성에 관여하는 plasmid를 제거한 것으로 보고하고 있다 [40]. 결국 이를 숙주로 이용하여 네 번째, 다섯 번째 유전자의 결실에 성공하여 *pta/buk/ctfB/adhE1*, *pta/buk/ctfB/adhE1/hydA* 돌연변이를 제작한 것으로 보고하고 있다 [40]. 비교적 짧은 시간(1주일 이하)의 계대를 통하여 나머지 plasmid의 제거가 가능했던 것으로 보고되고 있기 때문에 replicon의 돌연변이는 심각하지 않았을 것으로 추정된다. 즉, 한쪽 plasmid replicon에 발생했을 돌연변이가 두 plasmid의 상호 공존을 가능하게는 할 정도의 능력을 부여한 것으로 예측되지만, 특정 하나의 plasmid를 선택하기 위한 조건에서는 분리 가능한 정도인 것으로 추정된다.

4. CRISPR/Cas9을 이용한 butanol 생합성 *Clostridium* 속 미생물의 게놈 편집

최근 세균 면역계에서 발견되는 clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)을 이용하는 게놈 편집 기술은 생물 종을 가리지 않고 활발하게 연구되어 보고되고 있다. 세균 면역계에서는 CRISPR로부터 pre-crRNA가 전사되고 이들은 다시 crRNA로 가공되어, Cas9 단백질과 복합체를 형성하여 외부에서 침입한 phage DNA를 인식하여 제한하는 것으로 알려져 있다 [41]. 후속 연구에서, crRNA, Cas9 단백질, 이들 둘을 연결해주는 trans-activating crRNA (tracrRNA) 조합으로 목적하는 phage DNA의 제한이 in vitro 상에서 가능하다는 것이 증명되었다 [42]. 이를 기반으로 목적 DNA에 상보적인 guide RNA (gRNA)를 설계하여 crRNA 및 tracrRNA 대신 넣게 되면 목적 유전자의 이중가닥을 Cas9이 자르게 되어 게놈 편집 도구로 활용 가능하다는 것이 보고되었다 [42].

CRISPR/Cas9 시스템을 butanol 생합성용 *Clostridium* 게놈 편집에 이용하려는 연구도 활발히 진행되고 있다. 지금까지 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 게놈 편집에 성공한 예는 *C. ljungdahlii*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*를 이용한 연구에서 보고된 바 있다 [43-46]. 이들 4종의 *Clostridium* 게놈 편집에서는 모두 *Streptococcus pyogenes* 유래의 type II CRISPR/Cas9 시스템을 도입하였다 (Fig. 2). *C. ljungdahlii* 게놈 편집에서는 *cas9* 유전자 발현을 위하여 *C. acetobutylicum*의 thiolase 프로모터가 이용되었으며, gRNA 발현을 위하여 *C. acetobutylicum*의 *araE* 프로모터가 사용되었다 [43]. 외래로부터 도입한 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 *C. ljungdahlii*의 *pta*, *adhE1*, *ctf*, *pyrE* 유전자를 목적하였으며, 모두 계획한 게놈 편집이 가능했던 것으로 보고하고 있다 [43]. *C. beijerinckii*를 이용한 연구에서는 *cas9* 발현을 위한 *spoIIIE* 프로모터와 gRNA 발현을 위한 sRNA 프로모터(sCbei_5830)를 이용한 것으로 보고되었다 (Fig. 2). 상기 연구에서는 포자형성과 관련 있는 *spo0A* 유전자 편집을 시도하였으며, 이 돌연변이는 포자를 형성하지 않는 표현형을 나타내는 것으로 보고한 바 있다 [44]. 또 다른 연구에서는 *C. acetobutylicum*과 *C. pasteurianum*에서 동시에 호환 가능한 CRISPR/Cas9 시스템을 구축하여 보고한 바 있다 [45]. 상기 연구에서는 *C. acetobutylicum*과 *C. pasteurianum* 두 균주 모두에서 복제 가능한 pIM13 복제기구를 가지는 plasmid를 이용하였으며, *cas9* 발현을 위한 *C. pasteurianum*의 thiolase 프로모터와 gRNA 발현을 위한 *C. beijerinckii* sRNA 프로모터(sCbei_5830)를 사용한 것으로 알려져 있다 [45]. 상기 연구에서는 Cac 824I 제한효소를 암호화하는 *C. acetobutylicum*의 *cac1502* 유전자를 편집할 수 있음을 보고하였으며, 동일한 시스템을 이용하여 CpaAIR Type II 제한효소를 암호화하는 *C. pasteurianum*의 *cpaAIR* 자리에 혐기 조건에서 녹색형광단백질을 암호화하는 *afp* 유전자를 치환하는 것을 시연한 바 있다 [45].

또한, *Clostridium* 속의 경우, 약 74%가 CRISPR-Cas 자리를 가지는 것으로 알려져 있어, *Clostridium* 자체에 내재되어 있는 CRISPR/Cas 시스템을 이용할 수 있을 것이라는 기대가 큰 편이었다 (Fig. 3). 실제 2016년에 *C. pasteurianum*에 내재된 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 해당 균주의 게놈 편집을 시연하는 보고가 있었다 [46]. *C. pasteurianum*에는 type I-B CRISPR/Cas 시스템이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 외래 *cas9* 유전자의 도입없이 *cpaAIR*를 목적하도록 설계한 crRNA만으로 목적 유전자의 편집이 가능한 것으로 보고하였다 [46]. 실제로는 내재된 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 게놈의 목적 유전자를 편집했다고 하기보다 상동성재조합 (homologous recombination)을 일으켜서 게놈을 편집하고, CRISPR/Cas 시스템을 counter partner로 이용했다고 볼 수 있다 (Fig. 3). 상동성 재조합으로 편집된 게놈의 목적유전자에는 crRNA 결합자리가 사라져 Cas3에 의해서 절단이 일어나지 않기 때문에 오히려 생존하는 것을 볼 수 있다. 반면, 상동성 재조합이 일어나지 않은 경우는 crRNA와 Cas3에 의해서 절단되어 생존이 불가능한 특징을 이용한 게놈 편집의 예이다 (Fig. 3). Bu-

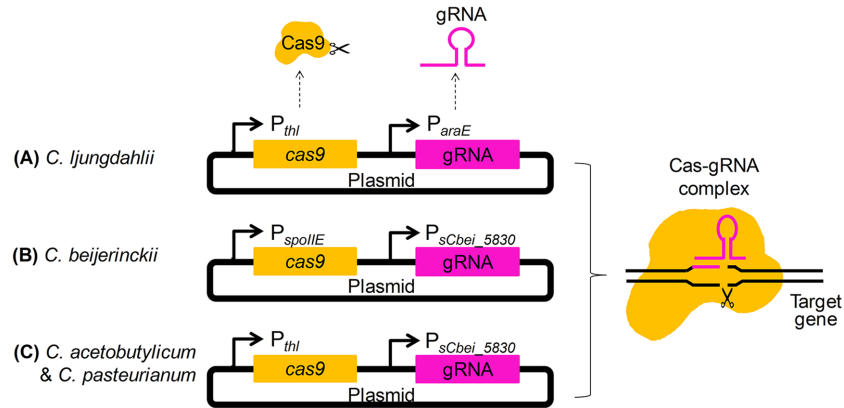


Fig. 2. Schematic presentation of the genome engineering by using the *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 system in *C. ljungdahlii*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, and *C. pasteurianum* [43-46]. (A) The *C. acetobutylicum* *thl* and *araE* promoters (P_{thl} and P_{araE}) were used for the transcription of the *Cas9* and gRNA in *C. ljungdahlii*, respectively. (B) The *C. beijerinckii* *spoIIIE* and *sCbei_5830* promoters ($P_{spoIIIE}$ and P_{sCbei_5830}) were used for the transcription of the *Cas9* and gRNA in *C. beijerinckii*, respectively. (C) The *C. pasteurianum* *thl* promoter (P_{thl}) and *C. beijerinckii* *sCbei_5830* promoter (P_{sCbei_5830}) were used for the transcription of the *Cas9* and gRNA, respectively, in both *C. acetobutylicum* and *C. pasteurianum*.

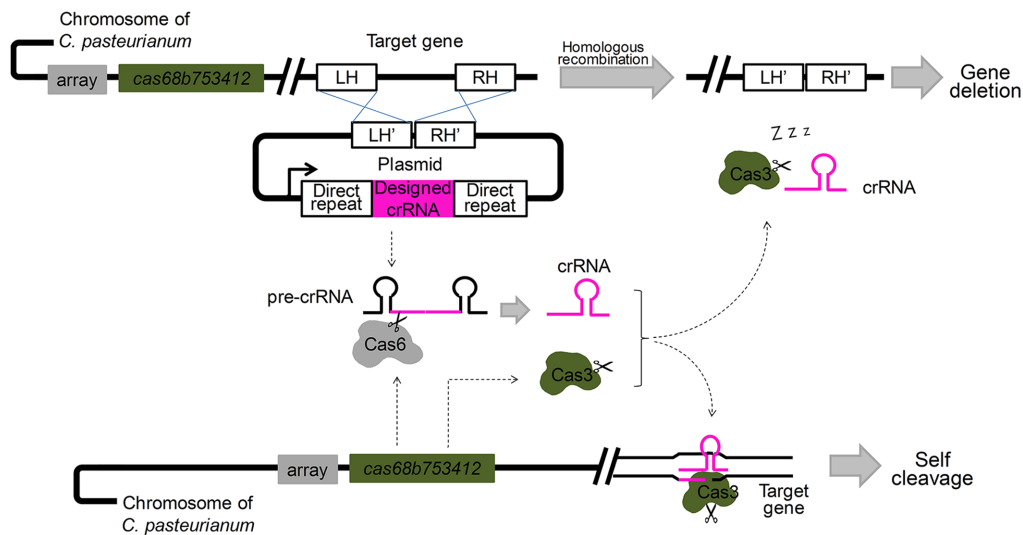


Fig. 3. Schematic presentation of genome engineering by using the inherent CRISPR/Cas system in *C. pasteurianum* [46]. In this case, the inherent CRISPR/Cas system was used as a counter partner for screening a gene deletion mutant generated by homologous recombination.

تانول 생합성용 *Clostridium*은 비교적 형질전환 효율이 매우 낮은 것으로 알려져 있기 때문에 내재되어 있는 CRISPR/Cas 시스템을 확인하고, 이들을 개발하여 이용하면 더욱 높은 효율의 게놈 편집 시스템으로 개발 가능할 것으로 전망하고 있다.

5. CONCLUSION

당해는 *Clostridium* 속 미생물을 이용하여 butanol을 산업적으로 생산하기 시작하지 100년이 되는 기념비적인 해이다.

100년의 기간 동안 butanol의 산업적 생산은 석유의 생산량 및 생산 단가에 반대 방향으로 의존하는 경향을 보였다. 최근에는 석유의 과다 사용으로 유발된 지구온난화를 늦추기 위하여 바이오 연료로 사용 가능한 butanol에 대한 관심이 다시 매우 커지고 있다. 지난 100년 동안 *Clostridium* 발효를 통한 butanol 생산 기술의 꾸준한 발전과 더불어, 최근에는 butanol을 생산하는 *Clostridium* 속 미생물 게놈 편집을 위한 기술들이 활발히 개발되어 보고되고 있다. Mobile group II intron을 이용한 게놈 편집 기술은 *Clostridium*을 연구하는 그룹들에서는 이미 대중화되어 있고, 최근 2년 동안에는 CRISPR/

Cas 시스템을 이용한 게놈 편집이 시연되고 있다. 또한 상당수 *Clostridium* 속 미생물에 CRISPR/Cas 시스템이 내재되어 있음이 밝혀지고 있고, 내재된 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 게놈 편집이 성공한 바 있어서 앞으로 이들을 이용하기 위한 노력이 활발히 진행될 것으로 보인다. 내재된 CRISPR/Cas 시스템을 이용할 경우 형질전환 등에서 많은 장점을 가지기 때문에 다양한 돌연변이 라이브러리를 제작할 수 있을 것으로 기대한다. 이러한 대규모 라이브러리를 이용할 경우, 지금까지 큰 발전이 없었던 butanol에 대한 내성이 향상된 *Clostridium* 속 미생물의 선발도 가능할 것으로 전망된다. 또한, 이와 같은 게놈 편집 도구의 발전에 따라 대사흐름이 변경된 *Clostridium*을 쉽게 만들 수 있기 때문에 이들을 배양하여 얻은 결과로 게놈 수준 대사네트워크 모델의 향상을 위한 기초 자료를 제공하여 우수한 butanol 생산 대사회로의 예측이 가능할 것으로 전망된다.

Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단의 이공분야기초연구사업 (과제번호: NRF-2016R1D1A3B04933184) 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Jang, Y. S., J. Y. Lee, J. Lee, J. H. Park, J. A. Im, M. H. Eom, J. Lee, S. H. Lee, H. Song, J. H. Cho, D. Y. Seung, and S. Y. Lee (2012) Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio* 3: e00314-12.
- Nolling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, and D. R. Smith (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 183: 4823-4838.
- Cho, C., Y.-S. Jang, H. G. Moon, J. Lee, and S. Y. Lee (2015) Metabolic engineering of clostridia for the production of chemicals. *Biof. Bioprod. Bioref.* 9: 211-225.
- Mo, X., J. Pei, Y. Guo, L. Lin, L. Peng, C. Kou, D. Fan, and H. Pang (2015) Genome sequence of *Clostridium acetobutylicum* GX AS18-1, a novel biobutanol production strain. *Genome Announc.* 3: e00033-15.
- Bao, G., R. Wang, Y. Zhu, H. Dong, S. Mao, Y. Zhang, Z. Chen, Y. Li, and Y. Ma (2011) Complete genome sequence of *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731, a solvent-producing strain with multi-replicon genome architecture. *J. Bacteriol.* 193: 5007-5008.
- Hu, S., H. Zheng, Y. Gu, J. Zhao, W. Zhang, Y. Yang, S. Wang, G. Zhao, S. Yang, and W. Jiang (2011) Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* EA 2018. *BMC Genomics* 12: 93.
- Li, N., J. Yang, C. Chai, S. Yang, W. Jiang, and Y. Gu (2015) Complete genome sequence of *Clostridium carboxidivorans* P7^T, a syngas-fermenting bacterium capable of producing long-chain alcohols. *J. Biotechnol.* 211: 44-45.
- Wang, Y., X. Li, Y. Mao, and H. P. Blaschek (2012) Genome-wide dynamic transcriptional profiling in *Clostridium beijerinckii* NC-IMB 8052 using single-nucleotide resolution RNA-Seq. *BMC Genomics* 13: 102.
- Lee, J., Y. S. Jang, M. J. Han, J. Y. Kim, and S. Y. Lee (2016) Deciphering *Clostridium tyrobutyricum* metabolism based on the whole-genome sequence and proteome analyses. *mBio* 7: e00743-16.
- Kopke, M., C. Held, S. Hujer, H. Liesegang, A. Wiezer, A. Wollherr, A. Ehrenreich, W. Liebl, G. Gottschalk, and P. Durre (2010) *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 13087-13092.
- Papoutsakis, E. T. (1984) Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 174-187.
- Papoutsakis, E. T. and C. L. Meyer (1985) Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 50-66.
- Kim, S., Y. S. Jang, S. C. Ha, J. W. Ahn, E. J. Kim, J. H. Lim, C. Cho, Y. S. Ryu, S. K. Lee, S. Y. Lee, and K. J. Kim (2015) Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum*. *Nat. Commun.* 6: 8410.
- Desai, R. P., L. M. Harris, N. E. Welker, and E. T. Papoutsakis (1999) Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metab. Eng.* 1: 206-213.
- Sillers, R., M. A. Al-Hinai, and E. T. Papoutsakis (2009) Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 38-49.
- Lee, J., H. Yun, A. M. Feist, B. O. Palsson, and S. Y. Lee (2008) Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 849-862.
- Senger, R. S. and E. T. Papoutsakis (2008) Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 101: 1036-1052.
- Senger, R. S. and E. T. Papoutsakis (2008) Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Development of specific proton flux states and numerically determined sub-systems. *Biotechnol. Bioeng.* 101: 1053-1071.
- Gallardo, R., A. Acevedo, J. Quintero, I. Paredes, R. Conejeros, and G. Aroca (2016) In silico analysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic response to an external electron supply. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39: 295-305.
- Milne, C. B., J. A. Eddy, R. Raju, S. Ardekani, P. J. Kim, R. S. Senger, Y. S. Jin, H. P. Blaschek, and N. D. Price (2011) Metabolic network reconstruction and genome-scale model of butanol-producing strain *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *BMC Syst. Biol.* 5: 130.
- Shinto, H., Y. Tashiro, G. Kobayashi, T. Sekiguchi, T. Hanai, Y. Kuriya, M. Okamoto, and K. Sonomoto (2008) Kinetic study of

- substrate dependency for higher butanol production in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Process Biochem.* 43: 1452-1461.
22. Li, R.-D., Y.-Y. Li, L.-Y. Lu, C. Ren, Y.-X. Li, and L. Liu (2011) An improved kinetic model for the acetone-butanol-ethanol pathway of *Clostridium acetobutylicum* and model-based perturbation analysis. *BMC Syst. Biol.* 5: S12.
 23. Haus, S., S. Jabbari, T. Millat, H. Janssen, R.-J. Fischer, H. Bahl, J. R. King, and O. Wolkenhauer (2011) A systems biology approach to investigate the effect of pH-induced gene regulation on solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *BMC Syst. Biol.* 5: 10.
 24. Thorn, G. J., J. R. King, and S. Jabbari (2013) pH-induced gene regulation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture: parameter estimation and sporulation modeling. *Math. Biosci.* 241: 149-166.
 25. Millat, T., H. Janssen, H. Bahl, R.-J. Fischer, and O. Wolkenhauer (2013) Integrative modelling of pH-dependent enzyme activity and transcriptomic regulation of the acetone-butanol-ethanol fermentation of *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Microb. Biotechnol.* 6: 526-539.
 26. Millat, T., H. Janssen, G. J. Thorn, J. R. King, H. Bahl, R.-J. Fischer, and O. Wolkenhauer (2013) A shift in the dominant phenotype governs the pH-induced metabolic switch of *Clostridium acetobutylicum* in phosphate-limited continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 6451-6466.
 27. Liao, C., S.-O. Seo, and T. Lu (2016) System-level modeling of acetone-butanol-ethanol fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 363: fnw074.
 28. Liao, C., S.-O. Seo, V. Celik, H. Liu, W. Kong, Y. Wang, H. Blaschek, Y.-S. Jin, and T. Lu (2015) Integrated, systems metabolic picture of acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 8505-8510.
 29. Swinfield, T. J., J. D. Oultram, D. E. Thompson, J. K. Brehm, and N. P. Minton (1990) Physical characterisation of the replication region of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM beta 1. *Gene* 87: 79-90.
 30. Lee, S. Y., L. D. Mermelstein, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis (1992) Vector construction, transformation, and gene amplification in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 665: 39-51.
 31. Fox, M. E., M. J. Lemmon, M. L. Mauchline, T. O. Davis, A. J. Giaccia, N. P. Minton, and J. M. Brown (1996) Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Ther.* 3: 173-178.
 32. Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis (1992) Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology* 10: 190-195.
 33. Green, E. M., Z. L. Boynton, L. M. Harris, F. B. Rudolph, E. T. Papoutsakis, and G. N. Bennett (1996) Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology* 142: 2079-2086.
 34. Shao, L., S. Hu, Y. Yang, Y. Gu, J. Chen, Y. Yang, W. Jiang, and S. Yang (2007) Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Res.* 17: 963-965.
 35. Heap, J. T., O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter, and N. P. Minton (2007) The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* 70: 452-464.
 36. Lambowitz, A. M. and S. Zimmerly (2004) Mobile Group II Introns. *Annu. Rev. Genet.* 38: 1-35.
 37. Martinez-Abarca, F. and N. Toro (2000) Group II introns in the bacterial world. *Mol. Microbiol.* 38: 917-926.
 38. Mohr, G., W. Hong, J. Zhang, G. Z. Cui, Y. Yang, Q. Cui, Y. J. Liu, and A. M. Lambowitz (2013) A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum*. *PLoS One* 8: e69032.
 39. Heap, J. T., S. A. Kuehne, M. Ehsaan, S. T. Cartman, C. M. Cooksley, J. C. Scott, and N. P. Minton (2010) The ClosTron: mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J. Microbiol. Methods* 80: 49-55.
 40. Jang, Y.-S., J. A. Im, S. Y. Choi, J. I. Lee, and S. Y. Lee (2014) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for butyric acid production with high butyric acid selectivity. *Metabol. Eng.* 23: 165-174.
 41. Haurwitz, R. E., M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou, and J. A. Doudna (2010) Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 329: 1355-1358.
 42. Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
 43. Huang, H., C. Chai, N. Li, P. Rowe, N. P. Minton, S. Yang, W. Jiang, and Y. Gu (2016) CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium. *ACS Synth. Biol.* (doi: 10.1021/acssynbio.6b00044) in press.
 44. Wang, Y., Z.-T. Zhang, S.-O. Seo, K. Choi, T. Lu, Y.-S. Jin, and H. P. Blaschek (2015) Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system. *J. Biotechnol.* 200: 1-5.
 45. Bruder, M. R., M. E. Pyne, M. Moo-Young, D. A. Chung, and C. P. Chou (2016) Extending CRISPR-Cas9 technology from genome editing to transcriptional engineering in *Clostridium*. *Appl. Environ. Microbiol.* (doi: 10.1128/aem.02128-16) in press.
 46. Pyne, M. E., M. R. Bruder, M. Moo-Young, D. A. Chung, and C. P. Chou (2016) Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*. *Sci. Rep.* 6: 25666.