

The Role of Toxicogenomics in Environmental Science

윤 석 주(안전성평가연구소 독성유전체연구팀장)

환경학은 인류의 생활환경을 구성하고 있는 모든 분야에 적용되는 광범위한 학문이다. 이러한 환경학에서 환경오염(농약, 산업폐기물, 공장폐수등)에 대한 관심은 매우 높은 상황이다. 환경오염문제를 다른 학문적인 입장에서 정리한다면 바로 독성학이 될 것이다.

독성학은 실제로 다양한 학문분야가 활용되는 분야이다. 생물학적 지식 뿐 만 아니라 과학전반에 걸친 학문적 정보를 활용하여 독성평가에 활용하게 된다. 지금까지 개발되어 왔던 많은 신기술들을 독성학 분야에 적극적으로 적용하고 있다. 최근 인간게놈 프로젝트 종료 이후에 밝혀진 유전자 정보를 적극 활용할 수 있는 것이 바로 DNA chip을 이용한 genomics라는 분야이다. 이러한 대단위 유전자 발현정보를 이용하여 독성평가기술을 개발하여 활용하고자 하는 것이 toxicogenomics이다. 이런 toxicogenomics기술이 환경분야(특히 환경오염)의 연구에 어떻게 활용될 수 있는지 살펴보도록 한다.

Toxicogenomics의 탄생

Human genome project 완료선언과 더불어 미국의 NIH 산하기관인 NIEHS에서는 발 빠르게 National Center for Toxicogenomics(NCT)라는 조직을 갖추고 toxicogenomics에 관한 연구를 시작하게 된다. 용어 자체도 생소한 상태에서 NIEHS의 동향은 전 세계적으로 전체 유전자 정보를 이용한 독성학적 응용에 관심을 갖게 하였다. 당시 toxicogenomics는 엄밀히 말하면 transcriptomics라 할 수 있다. 이러한 toxicogenomics의 탄생배경에는 1995년 Stanford 대학의 Pat Brown 박사가 개발한 DNA chip을 이용한 microarray 실험

시스템이 있었다. 당시에 유전자 발현 분석은 northern blotting, differential display, real time PCR등을 이용한 노동집약적인 방법으로 진행되어 왔다. "One gene, one post-doc"이라는 말이 있을 정도로 유전자 발현정보에 관한 실험은 시간과 인력이 요구되는 것이었다. DNA chip의 개발로 인해 한 번의 실험으로 몇백개에서 몇 만개에 이르는 유전자의 발현정도를 확인할 수 있는 것은 가히 혁명적인 수준이었다. 이러한 기술을 바탕으로 독성물질 처리 후 얻어진 RNA에서 대량의 유전자의 발현변화를 확인할 수 있었던 것이다. 이와 같은 대량의 정보가 쏟아져 나오자 필수불가결적으로 생겨난 것이 생물정보학분야이다. 당시 생겨난 용어로 data mining이라는 말이 있을 정도로 대량의 정보 속에서 필요한 정보만을 얻어내는 것은 쉽지 않았던 것이다. 이러한 배경으로 시작된 toxicogenomics는 꾸준한 연구와 개발을 통해 미국의 EPA에서도 환경관련 바이오마커 개발 및 위해성 평가에 toxicogenomics의 도입을 적극적으로 지원하고 있다. 이웃 일본에서는 toxicogenomics의 중요성을 인식해서 정부와 16개 제약회사가 컨소시엄을 구축하여 150여개의 독성물질에 관한 유전자 발현정보를 데이터베이스화하는 대형 사업을 진행 중에 있다. 국내에서는 2004년부터 식약청을 중심으로 간독성물질을 중심으로 연구 사업이 진행 중에 있다.

Toxicogenomics란?

독성학(toxicology)과 유전체학(genomics)이 합쳐진 말로서 첨단 유전체학 기술을 독성학에 응용하려는 분야이다. 신조어인 만큼 정의를 내리기가 쉽지는 않

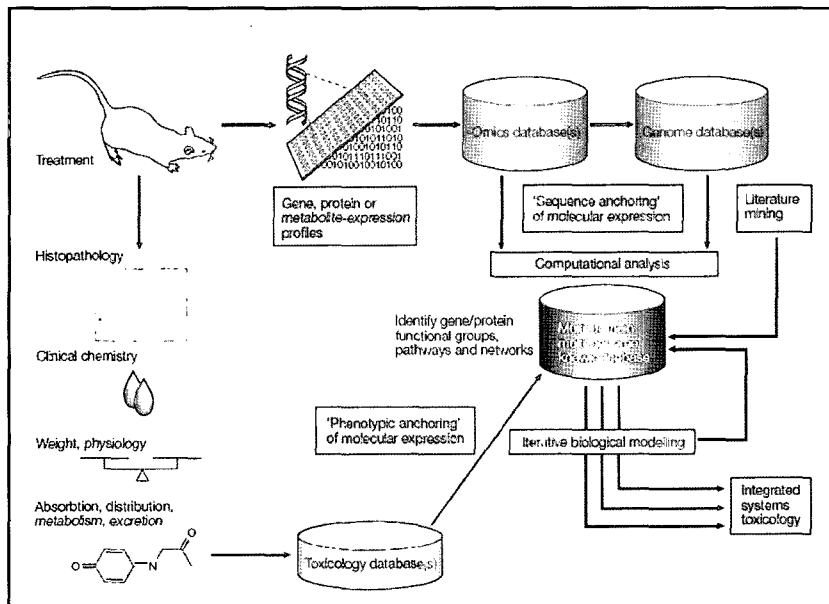
지만 좁은 의미로는 독성물질에 반응하는 mRNA의 발현을 genome 수준에서 연구하는 것(transcriptomics)이라 할 수 있고 넓은 의미로는 유전자 발현에 덧붙여 독성물질에 반응하는 단백질체(proteome)를 연구하는 proteomics, 독성물질의 대사체(metabolite)를 분석하는 metabo/lomics, 생물정보학과 기존의 독성평가 방법(조직병리, 혈액생화학)을 포함한다. 이러한 다양한 연구를 통해 생산된 데이터는 데이터베이스화하여 활용한다. 그림 1에서 알 수 있듯이 여러 분야의 데이터를 종합하여 활용하는 것이 관건이다. 궁극적으로 사람의 건강(신약, 기능성식품, 식품첨가물, 화장품, 생물체의약품)은 물론 환경(각종 산업공해, 화학물질, 유해물질등)에 영향을 미치는 부작용/독성작용을 규명하고 예방하고 치료하기 위해 BI/IT의 기술이 총체적으로 활용되어야 한다. 이러한 측면에서 볼 때 독성유전체기술을 이용한 새로운 독성평가기술의 개발은 시대의 흐름에 부합한다고 할 수 있다.

Toxicogenomics와 응용기술

Toxicogenomics 분야에서 활용되는 주요 기술을 세

부 분야별로 살펴보도록 한다. Transcriptomics에는 다양한 종류의 cDNA, oligonucleotide chip이 국내외 생명과학분야의 회사에서 생산되고 있다. 각 platform 별로 장단점이 존재하기 때문에 연구자의 실험목적 및 실험디자인에 맞추어 선택하면 될 것이다. 발견된 유전자의 확인을 위하여 realtime PCR을 이용하기도 한다. 최근에 생산되는 DNA chip은 재현성과 감도가 우수하기 때문에 realtime PCR을 이용한 확인은 점차 줄어들고 있는 추세이다. 최근에는 병리학적인 응용으로 Laser capture microdissection(LCM)을 활용한 연구가 진행되고 있다. LCM은 병변이 있는 세포 또는 조직부위만을 레이저를 이용하여 선택적으로 절제하는 방법이다. 이 방법을 이용하여 정상 세포 또는 조직과의 유전자 발현 비교를 통해 정확한 정보를 얻을 수 있다.

Proteomics에는 지금까지 활용되어 왔던 2D gel electrophoresis를 이용하여 단백질의 발현을 확인하고, 발견된 단백질중 독성물질등에 의해 새롭게 발현된 단백질을 추출하여 MALDI-TOF와 같은 분석기기를 이용하여 동정하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다. 또한 단백질 칩이라고도 불리는 SELDI-TOF와 같은



2004 Vol. 5 Nature reviews/genetics

그림 1. 통합적 독성평가 시스템

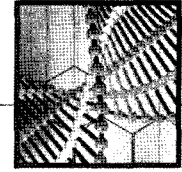


Table 1. 기타 활용가능한 데이터 베이스(VOLUME 114 | NUMBER 1 | January 2006 Environmental Health Perspectives)

Acronym	Full name	Website and reference
ArrayExpress	ArrayExpress at EBI	www.ebi.ac.uk/arrayexpress (EBI 2005a)
GEO	Gene Expression Omnibus	www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (NCBI 2005a)
CIBEX	Center for Information Biology Gene Expression Database	cibex.nig.ac.jp (National Institute of Genetics 2005)
Tox-MIAMExpress	Toxicogenomics MIAMExpress	www.ebi.ac.uk/tox-miamexpress (EBI 2005b)
CEBS	Chemical Effects in Biological Systems	cebs.niehs.nih.gov (NIEHS 2005)
ArrayTrack	NCTR's Center for Toxicoinformatics-ArrayTrack	www.fda.gov/nctr/science/centers/ toxicoinformatics/ArrayTrack (NCTR 2005)

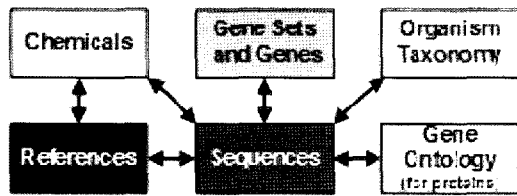


그림 2. CTD의 기본 구성

분석기기는 특히 발암기전 연구 분야에 활용되고 있다. 이외에도 정확한 분석을 위해 2D-MALDI, 2D-MS/MS, LC-MS/MS, ICAT-MALDI, ICAT-MS/MS 등과 같은 다양한 분석기기가 proteomics 연구에 사용되고 있다. Metabolomics에는 주로 NMR이 사용되며 혈액뿐만 아니라 뇨, 뇌척수액, 타액, 양수 등의 다양한 체액이 시료로 사용된다. 이 경우에는 비침투적(non-invasive)인 방법으로 분석이 이루어지기 때문에 인체에 응용할 경우 가장 이상적인 방법으로 생각되어진다. 그러나 분석기기에 대한 조작전문성 및 분석능력이 요구된다. Bioinformatics의 경우는 가장 중요한 부분이지만 전문 인력 수급과 infra구축이 어려운 것이 실정이다. 현재 toxicogenomics 연구를 수행하고 있는 기관에서 데이터 베이스 구축을 위해 기관별로 자체적인 시스템을 갖추기도 하지만 비용 및 운영에 많은 어려움을 겪고 있다. 아웃소싱을 통한 전문회사를 활용하는 것도 해결책이 될 수도 있다. 보다 많은 투자와 관심이 절실히 필요한 분야이다. 기본적인 유전자 발현 분석을 위한 소프트웨어 패키지가 국내외 IT관련 기업으로부터 출시되어

있다. 최근 toxicoinformatics라는 신조어가 생겨 독성학 연구에서의 생물정보학의 중요성이 강조되고 있다. Toxicoinformatics는 실제로 독성물질에 의한 유전자의 발현패턴을 투여 시간 및 농도에 따라 분석하는 필수적인 도구로 자리 잡고 있다. 정확하고 다양한 분석을 위해서는 유전자의 기능, 화학물질의 구조, 독성, 병리, 약물동태/분포, 유전독성등의 종합적인 자료가 추가되어야 할 것이다.

Comparative toxicogenomics database(CTD)

대부분의 만성질환의 병인은 환경인자와 유전자간의 상호작용에 의해 조절되는 생물학적 작용을 포함하게 된다. 환경인자는 천식, 암, 당뇨병, 고혈압, 면역결핍증, 파킨슨 병과 같은 질병에 영향을 주게 된다. 실제로 환경과 질병과의 관계를 설명하기 위해서는 화학물질이 세포내에 전달되거나 대사되고, 유전자와 상호작용을 하거나 유전자를 파괴하여 손상을 주는 것을 이용하게 된다. 하지만 이러한 화학물질에 의한 손상의 분자생물학적 기전은 잘 알려져 있지 않다. 질병은 DNA수복, cell cycle 조절 및 분화 등의 중요한 생물학적 과정을 담당하는 유전자가 손상당했을 때 일어날 수 있다. 화학물질과 질병과의 상호연관성을 설명하기 위해서는 방대한 인간 유전체, 다양한 화학물질의 환경 내에서의 조합, 유전적 다양성, 화학물질의 노출 환경 특이적 상황 등을 고려해야만 한다.

이러한 문제를 해결하기 위한 수년간의 노력으로

Table 2. 현재 상용화되어 있는 환경관련 DNA 칩의 종류(VOLUME 114 | NUMBER 1 | January 2006 Environmental Health Perspectives)

Organism	Company	Organism	Company
<i>Escherichia coli</i>	Affymetrix Sigma-Genosys Takara	<i>Bos taurus</i>	Affymetrix
<i>Bacillus subtilis</i>	Affymetrix Sigma-Genosys	<i>Canis familiaris</i>	Affymetrix
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Affymetrix	<i>Mus musculus</i>	Affymetrix Agilent Sigma-Genosys ^b SuperArray ^b
<i>Helicobacter pylori</i>	Sigma-Genosys	<i>Rattus norvegicus</i>	Affymetrix Agilent SuperArray Takara ^c
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sigma-Genosys	<i>Homo sapiens</i>	Affymetrix Agilent Genotypic Sigma-Genosys ^b SuperArray ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	Affymetrix	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Affymetrix Agilent Takara
<i>Synechocystis</i> sp.	Takara	<i>Glycine max</i> L.	Affymetrix
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Affymetrix Agilent	<i>Oryza sativa</i>	Agilent
<i>Magnaporthe grisea</i>	Agilent	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Affymetrix
<i>Plasmodium falciparum</i>	Affymetrix	<i>Vitis vinifera</i>	Affymetrix
<i>Anopheles gambiae</i>	Affymetrix		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Affymetrix		
<i>Drosophila melanogaster</i>	Affymetrix		
<i>Micropterus salmoides</i>	EcoArray ^a		
<i>Pimephales promelas</i>	EcoArray ^a		
<i>Danio rerio</i>	Affymetrix Agilent		
<i>Xenopus laevis</i>	Affymetrix		

Company addresses are as follows: Affymetrix: Santa Clara, California, USA; Agilent: Palo Alto, California, USA; EcoArray: Alachua, Florida, USA; Genotypic: Bangalore, India; Sigma-Genosys: The Woodlands, Texas, USA; SuperArray: Frederick, Maryland, USA; Takara: Otsu Shiga, Japan.

^aThe bass and fathead minnow chips contain many genes important for toxicology response, including vitellogenin and several cytochrome P450s, among others. ^bThe cDNA or oligo microarrays have been designed to profile the expression of multiple genes involved in a specific biological pathway, or genes with similar functions or structural features. Mouse and human cDNA microarrays are also available for toxicology and pharmacology applications. This type of array is designed to determine the expression profile of genes responsible for metabolism of endogenous and exogenous compounds. ^cThis is a glass slide array immobilized with approximately 390 cDNA fragments of rat genes related to the stress and toxicity responses.

일반에 공개된 데이터베이스가 바로 Comparative Toxicogenomics Database(CTD; <http://ctd.mdibl.org>)이다. 이 데이터베이스에는 1) 염기서열과 단백질 시퀀스 2) 참고문헌 3) 수집한 유전자 정보 4) Gene Set 5) 화학물질 정보 6) Gene ontology term(생물학적 과정, 세포 구성성분, 분자생물학적 기능 포함) 7) Organism taxonomy 등이 포함되어 있다(그림2). 참고 문헌은 PubMed와 같은 데이터베이스에서 수집되어 사용되고 있다. 아직 완벽한 데이터베이스는 아니지만 화학물질의 유전자에 대한 작용관련 정보를 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. 그 외의 데이터 베이스

는 표 1에 첨부하였다.

Toxicogenomics와 독성학의 미래

처음으로 대량의 유전자 발현정보를 얻을 수 있는 microarray 기술이 소개되었을 당시에는 당장이라도 모든 생명의 기전이 밝혀질 것 만 같은 기대에 부풀어 있었다. 하지만 실제로 대량의 데이터가 생산되자 적절한 처리가 문제가 되었다. 이러한 상황을 극복하고자 생겨난 학문분야가 bioinformatics(생물정보학)이다. 알고리즘의 개발을 통해 유전자 시퀀스의 탐색, 관련 유전자 정보 탐색 등이 가능해지고, 누구나

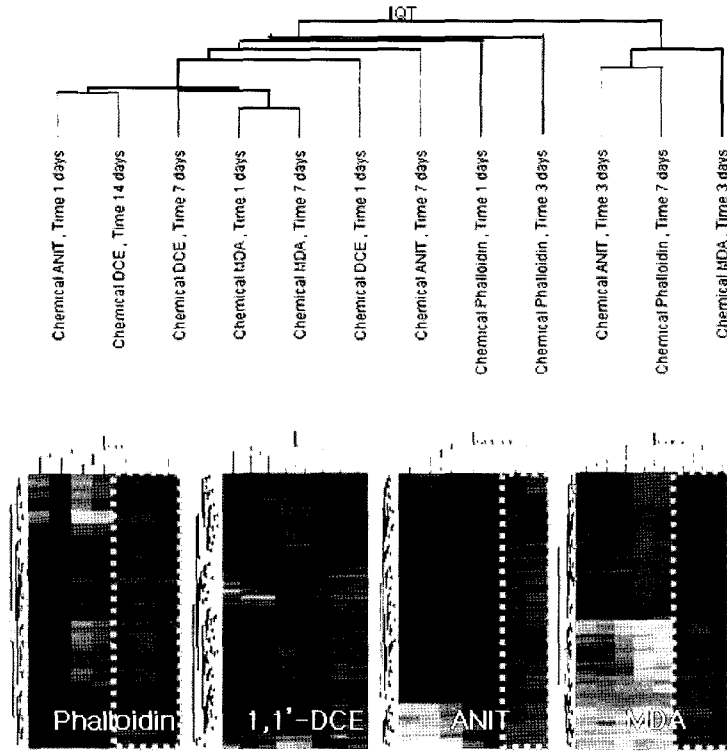
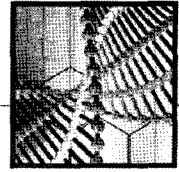


그림 3. 물질 특이적 유전자 발현변화

쉽게 문헌 검색을 할 수 있게 된 NCBI의 PubMed도 생물정보학의 발달에 의한 혜택이라 할 수 있다. 최근에는 환경학에 관련된 다양한 종의 DNA chip이 개발되어 상용화되고 있다(표2).

2005년 초에 미국 FDA는 pharmacogenomics를 이용한 약효관련 자료 제출에 관한 공식적인 가이드라인을 발표했다. 의무적 제출사항은 아니지만 참고자료로서 제출이다. 하지만 이러한 변화는 초기에 genomics 기술의 신약개발 및 독성평가연구에의 응용에 소극적이던 분위기를 반전시키기에 충분한 것이었다. 대형제약회사를 중심으로 이러한 자료를 준비하여 적극적으로 신약 후보물질의 약효 및 독성평가분야에 활용하고 있다.

Toxicogenomics의 가장 큰 장점인 대량의 정보를 단시간 내에 얻을 수 있다는 점은 high throughput screening (HTS)과 잘 연결이 된다. 신약개발의 측면에서는 독성평가 수준이 분자생물학적 기전의 수준에 이를 것이며 high throughput 안전성 스크리닝 및 표적

독성 스크리닝이 효율적으로 수행되기 위해서는 독성 유전체 기술이 활용될 것이다. 이를 통하여 독성으로 인하여 발생하는 문제를 분석하고 신약개발 의사결정이 가능하게 될 것으로 예상된다. 안전성평가의 측면에서는 장기간 실험을 요하는 발암성 시험 등의 기간을 단축시키고자하는 노력이 독성유전체연구를 통하여 이루어지고 있다. 이는 molecular signature라는 유전자 발현 패턴의 분석을 통한 특정유전자의 발현을 통한 독성물질의 발암성 여부를 예측하는 것이다.

본 연구팀에서도 최근 3년간 독성물질에 의한 마우스 간에서의 물질 특이적 유전자 발현분석에 관한 연구를 수행해왔다. 그 결과 유사한 독성을 나타내는 물질이라도 유전자 발현에는 각각 특이적 발현을 하고 있어 미지의 물질이라도 그 유전자 발현패턴을 분석하여 독성여부 및 유발하는 독성에 대한 예측을 할 수 있다고 전망하고 있다(그림3). 안전성평가에서 또 하나 빠질 수 없는 것이 바로 새로운 biomarker의 발

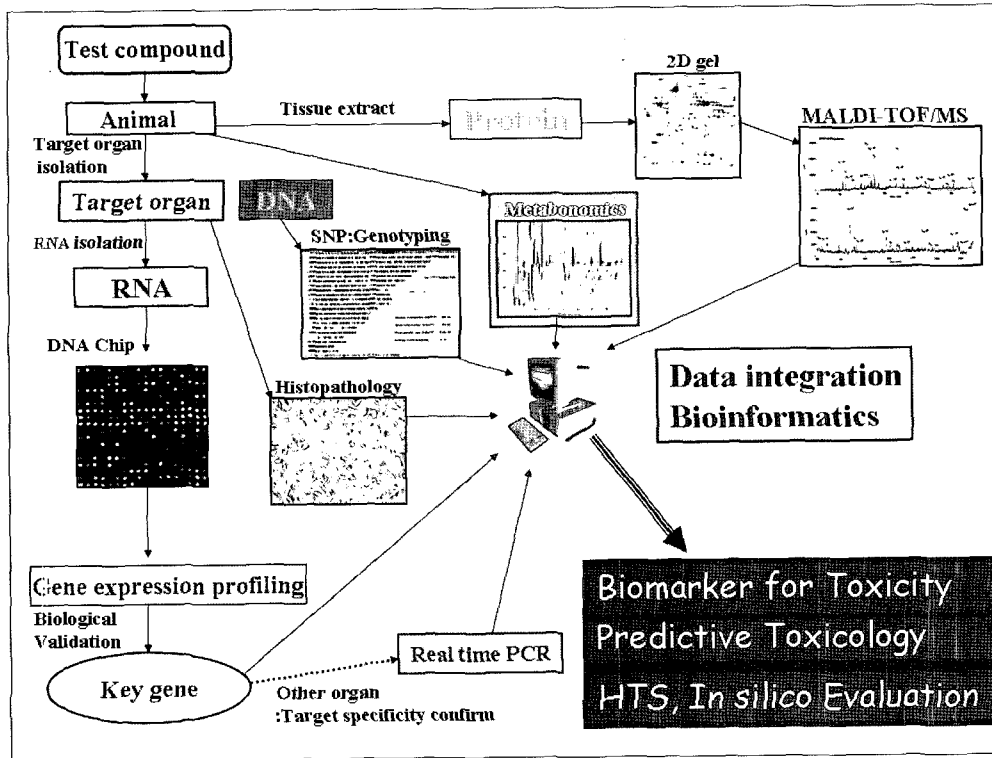


그림 4. KIT Integrated Toxicogenomics Service

굴이다. 간독성, 신장독성, 신경독성등의 장기 특이적 독성물질의 biomarker를 개발하여 신약후보물질의 독성을 조기 스크리닝하는 예측독성학(predictive toxicology)으로의 활약도 기대된다. 최근 BT와 IT기술의 융합이 가속화되는 가운데 in silico toxicology에 대한 기대도 높아지고 있다. 이것은 생물학적 정보(독성물질, 유전자발현, 병리 데이터, 혈액생화학 데이터, 화학적 정보등)를 활용하여 컴퓨터 시뮬레이션으로 가상생체(인체)에서의 독성물질/화학물질의 체내동태 및 안전성을 보다 정확하게 예측하는 것이다. 향후 미국 FDA는 신약의 허가신청시 인체모델에서의 안전성 시험결과를 요구할 것으로 전망되고 있어 관련 기술의 발전이 시급한 상황이다. 지금까지 기술한 toxicogenomics는 독성학에서의 새로운 기술로서 안전성평가, 신약개발, 식품안전, 법의학, 환경분야에 이르기까지 차세대 독성평가기술로서 활용이 기대되어진다.

KIT Integrated Toxicogenomics Service:

KIT는 2005년 9월 미국 Affymetrix사의 공식 서비스 프로바이더로 인증을 받음으로써 그간 KIT가 진행해 온 DNA chip관련 실험결과와 신뢰성과 재현성을 다시 한 번 입증 받았다. 이를 바탕으로 KIT는 전임상 독성평가 전문기관으로서 그간 쌓아온 20여년간의 노하우에 이번 신기술을 접목함으로써 향후 신약후보물질의 약효 및 독성스크리닝 분야에서 국내는 물론 전 세계적인 경쟁력 확보가 가능할 것으로 기대하고 있다. 실험설계부터 동물실험, 조직병리, 혈액생화학 및 유전자 발현분석까지 모든 과정을 one stop으로 해결할 수 있는 KIT Integrated Toxicogenomics Service(그림 4)는 국내의 제약회사와 대학 및 연구소의 DNA chip관련 연구를 지원하여 DNA chip을 활용한 독성평가에 기여함으로써 국가적인 infra로서 자리매김을 목표로 하고 있다.