



Toxicogenomic Analysis on Impacts of EDCs and Other Toxic Chemicals by using Both Japanese Medaka Fish and Bacterial cDNA Microarrays

김병찬¹ · 박경서¹ · 구만복^{2*}

¹광주과학기술원 환경모니터링 신기술 연구센터, ²고려대학교 생명과학대학

* e-mail: mbgu@korea.ac.kr

I. 서론

1. 분자 수준 생물지표 연구의 필요성

1995년 Stanford 대학의 P.O. Brown 그룹에서 DNA 칩의 개발을 Science 지에 게재한 이후 생명공학연구 전반에 걸친 DNA 칩의 응용 사례 발표가 지속적으로 증가되고 있다(Schena *et al.*, 1995). 유전체 연구로 다양한 종의 유전자 염기서열 정보가 쏟아지고 있고, 단일 유전자 구조와 기능 해석에 중점을 둔 기존의 연구 접근 방식과 더불어 동시에 전체 유전자의 발현 현상을 이해하고 각 유전자들의 발현 연관성을 살펴 보려는 노력들이 DNA 칩 개발로 인해 활발하게 진행되고 있는 것이다. DNA 칩 기술을 이용하여 수 천, 수 만 유전자의 발현 정도를 동시에(high-throughput) 정성적으로 진단 할 수 있으므로 전사체(transcriptome) 연구를 위해 DNA 칩 기술이 크게 주목 받고 있는 것이다. 따라서 DNA 칩은 생화학, 약학, 진단의학 분야 등 전사체 정보가 필요한 연구에 이미 광범위하게 사용되고 있다. 우리나라는 지난 40여년 간 급속한 산업화가 진행되어 오면서 이로 인해 다양한 오염물질들이 주변 환경으로 배출됨에 따라 오염도가 급증하고 있는 실정이며 이에 따른 수생태계를 비롯한 환경 생태계 파괴가 급격히 진행되고 있다. 다이옥신 류, 환경호르몬 류를 비롯한 각종 발암물질들은 극 미량으

로도 생태계를 파괴 및 교란시키며, 나아가 환경 보건에 치명적인 피해를 가져오나 기존의 기기분석법은 이들 물질의 정량 분석에 그치고 있고, 이들이 생태계 및 각종 생물 종에 미치는 독성 영향의 분석에는 한계가 있다(Sumpster and Jobling, 1995). 이러한 단점을 극복하기 위해 환경오염에 민감한 생물 종 지표 연구가 도입되고 있으나, 기존의 생물 종을 이용한 생물 독성 평가기법은 생물 종의 생사여부를 이용하여 생물 종별, 독성 물질 별 단편적인 독성 정도만을 평가할 수 있어 심층적이고 복합적인 독성평가기법의 도입이 절실하다. 이에 따라 생물 종의 특정 바이오마커(biomarker, 분자지표)를 이용한 독성평가 기법도 도입되고 있다. 대표적으로 환경호르몬에 민감하게 반응하는 biomarker 유전자로 vitellogenin, CYP1A 및 AhR 유전자 등이 알려져 있어 사용되고 있으며, 이외에 다른 바이오마커 유전자들의 발굴이 이루어지고 있다(Todorov *et al.*, 2002; Vethaak *et al.*, 2002). 바이오마커 유전자를 이용한 독성 평가는 이미 알려진 특정 독성 효과의 정도를 측정하고 단일 유전자에 미치는 영향을 평가하는 점에서는 강점을 보이지만 생명체 내부에서의 독성의 전반적인 효과와 독성에 관계되는 유전자간의 복잡한 유연관계를 설명하고 평가하는 데에는 한계가 있다. 선진국에서는 환경 변화에 높은 내인성을 지니지만 발암 원, 돌연 변이 원,

기형 유발원 등의 오염물질에 대해서는 높은 민감도를 지니는 송사리, 점박이송사리, 무당개구리 및 저서성 플랑크톤을 이용한 연구가 DNA 칩 및 Real-time PCR 기법을 이용하여 유전체 독성학(Toxicogenomics) 기반으로 이루어지고 있다. 유전체 독성학 기반 신기술을 환경 분야에 도입함으로써 기존 생물지표 연구를 통한 독성평가에서 불가능 했던 다양한 유전자 발현에 대한 high through-put 분석이 가능케 되었으며, 광범위한 오염물질에 대한 독성효과를 분자 수준에서 분석하고, 특정 새로운 화학물질에 대한 유전자 발현분석을 통한 독성 효과분류도 피할 수 있다. 또한 경제적 산업적 측면에서 볼 때 한 가지 유해화학물질에 대한 독성 분석 시, US\$2-4 million 정도의 비용이 소요되어(Neumann and Galvez, 2002) 경제적인 부담이 컸으나, 다량의 유전정보를 포함하고 있는 유전자 칩을 활용한 방법의 적용 시에는 특정 화학물질에 대한 생물체의 피해 정도를 신속하고 보다 저렴하게 분석할 수 있어 연구를 통해 개발된 유전체 독성학 기반 독성평가기법은 기술화를 통해 기술대체 및 수입대체효과를 통해 산업적 측면에 기여가 클 것이라 판단된다. 본고에서는 DNA 칩 및 real-time PCR 기법을 활용한 유전체 독성학 기반 독성평가 기법에 대한 국내외 기술 현황을 살펴보고 몇몇 응용 연구 기법을 소개하고자 한다.

II. 본 론

2.1 국내외 기술 현황

1) 국 외

이미 유럽, 미국, 일본 같은 선진국에서는 지표 생물 별 독성영향평가가 활발히 이루어지고 있다. 특히 G7, EPA guideline에 의해 그 실험법과 규제가 확립되어 있으며, 넙치 류, 장어 류 및 조개 류의 수서 생물체를 이용한 분자 생물지표 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 독일 베를린 공대의 생태독성실험실에서는 물고기 난황단백질(vitellogenin)을 검출하

는 방법과 조개류의 면역세포 시험법이 적용되고 있으며, 특히 막스 플랑크 연구소에서는 환경 독성 평가를 위한 zebra fish의 DNA 칩을 개발하는 연구를 수행하고 있다(그림 1). 미국에서는 기존 바이오마커 연구에 널리 사용되는 물벼룩이나 무지개송어, 무당개구리의 DNA 칩을 이용한 독성평가가 여러 그룹에서 활발히 추진되고 있으며, 일본에서는 송사리 DNA 칩을 만들기 위한 콘소시움이 구성되어 있다(그림 2). 그러나 국외에서도 유전자 칩과 Real-time PCR(실시간 중합효소 연쇄반응법)을 동시에 기반 기술로 활용하는 유전체 독성학 기반 분자생물지표 연구는 이제 막 태동하는 단계이다.

Major Boost for European Zebrafish Research

European Commission awards 12 million Euros to study zebrafish models for human development and disease

The European Commission has awarded an unprecedented 12 million Euros for zebrafish research to a consortium of 15 European institutions, led by the Max Planck Institute for Developmental Biology. The ZF-MODELS consortium hopes to establish zebrafish models for human diseases, discover genes that will lead to the identification of new drug targets and gain fundamental insights into human development.



Fig. 1. Zebrafish may not look much like humans, but their genes and the way they function are very similar. So similar in fact, that zebrafish can be very good models for human diseases.

Image: Max Planck Institute for Developmental Biology

그림 1. 독일 막스 플랑크 연구소: 제브라피쉬를 이용한 발생생리학 연구

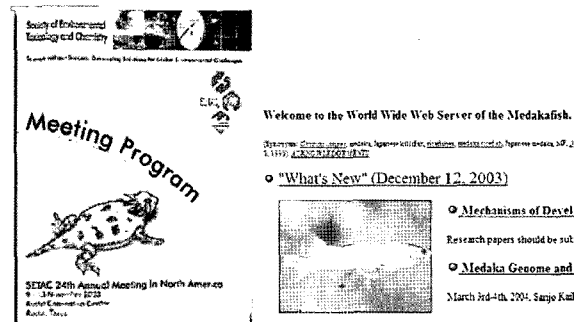
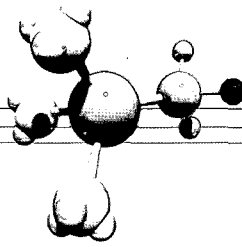


그림 2. 그림1. 미국 환경독성학의 조록 및 일본 송사리 유전체 연구 콘소시엄



2) 국 내

국내 일부 대학 및 연구소에서 물고기나 양서류를 이용한 바이오마커 선정 연구가 진행되고 있다. 이들 대학이나 연구소는 물고기의 일부 유전자를 활용하여 독성효과를 평가하는 데에 그치고 있어 생명체에 미치는 종합적인 독성효과를 평가하지는 못하고 있는 실정이다. K대학교에서는 설치류를 이용한 분자 수준의 생물지표 선정연구를 진행 중에 있으나 아직 초보적인 기초연구 단계에 있으며, H대학에서는 양서류를 이용하여 내분비계 장애물질의 발생독성 연구 및 독성기작에 대한 연구를 수행 중에 있으나 이 역시 기초연구 단계에 머물러 있다. 국내 K연구소에서는 녹조류 물벼룩 송사리 등의 생명체를 가지고 생물지표 연구를 하고 있으나 분자수준의 생물지표 연구에는 이르지 못하고 있는 실정이다.

2. DNA 칩 활용 바이오센서 연구

1) DNA 칩 informatics를 활용한 바이오마커 선별

DNA 칩으로부터 얻을 수 있는 유전자 발현 정보를 통해서 기존의 환경 바이오 모니터링 기법으로는 접근할 수 없었던 다양한 바이오 모니터링 연구가 가능케 되었다. 앞서 언급한 것처럼 DNA 칩의 활용성 중에 가장 크게 부각 되는 것은 특정 화학물질에 특이적으로 발현하게 되는 다양한 바이오마커를 transcription 수준에서 빠른 시간 내에 선별하고 확보할 수 있다는 점이다. 일반적으로 동물 세포 등에서 잘 알려진 바이오마커로는 내분비계 장애 물질에 대해 초과 발현되는 vitellogenin(난황단백질)을 들 수 있다. Vitellogenin의 발현 정도는 화학물질의 내분비계 장애 가능성을 가늠하는 중요한 척도로 활용되고 있다(Brasfield *et al*, 2002). 그러나 vitellogenin을 유도하기까지의 관련 유전자 발현 과정은 vitellogenin 단일 바이오마커로는 확인할 수 없는 한계가 있다. 대상물질의 환경 호르몬으로써의 작용 가능성을 제시해줄 뿐 다른 생리 활성적 영향을 단일 바이오마커 측정 결과로 판단하는 것은 무리가 있다. 독성 분석을 위한 바이오마커 활용

측면에서 DNA 칩 결과는 단일 유전자뿐만 다양한 유전자 간의 상관관계를 다양한 화학물질에 대해 좀 더 광범위하고 때로는 세세하게 추적 할 수 있도록 해준다.

그림 3은 15종의 화학물질에 대한 대장균 RFM443의 유전자 발현 패턴을 클러스터링한 결과이다. 15종 모두 동일한 유전자 발현 패턴이 나타나지 않으며 일부 비슷한 화학종의 경우 유의성을 나타내게 된다. 주로 발현되는 유전자들을 따로 선별하여 좀 더 단순화 시키면 칩 기반으로 독성 물질의 독성 효과를 스크리닝 할 수 있는 센서 개념의 DNA 칩으로의 활용이 가능해진다고 본다(그림 4).

또 다른 DNA 칩의 응용 예로, 연속 배양되는 대장

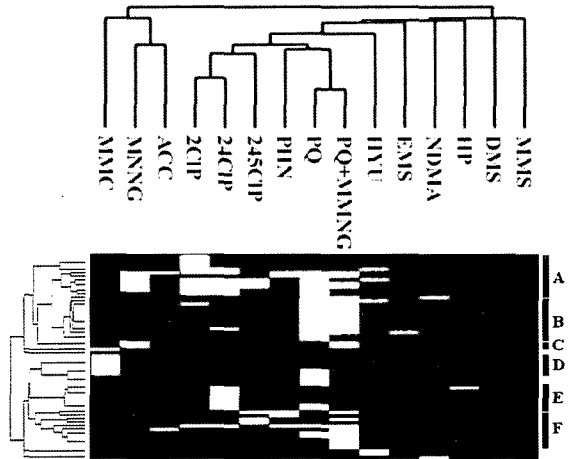


그림 3. 15종의 화학물질에 대한 E.coli RFM443의 DNA 발현 패턴 양상과 이에 근거한 클러스터링

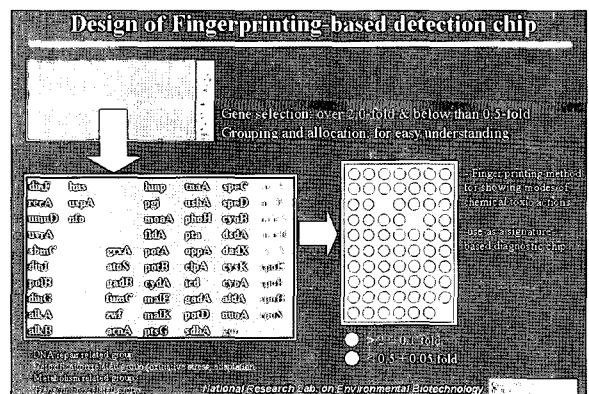


그림 4. 칩 기반 바이오센서의 개발 예

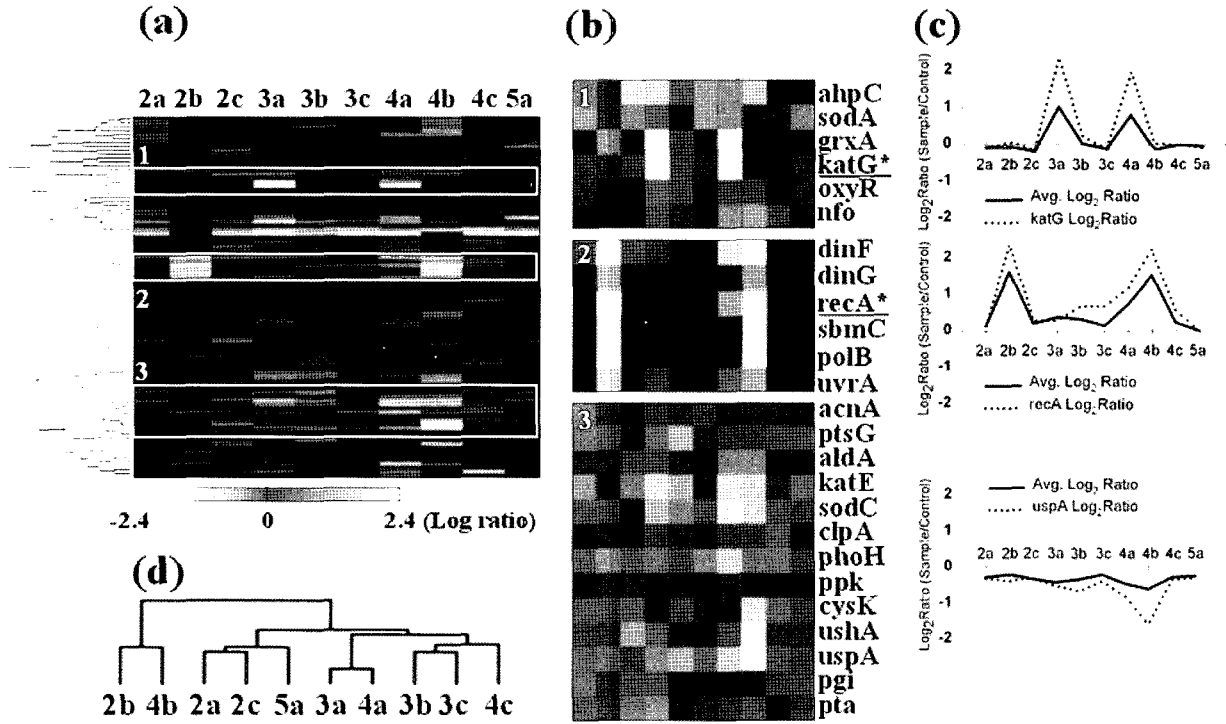


그림 5. 연속 배양 과정 중 mytomycin C(유전자 손상 물질-2b, 4b)와 hydrogen peroxide(산화적 손상 물질-3a, 4a)를 주입했을 때의 유전자 발현 변화 및 이에 대한 유전자 발현 clustering.

균에 특정 스트레스를 가하여 특이적으로 발현되는 유전자를 검출 할 수도 있다. 그림 5는 대장균의 연속 배양 중 유전자 손상과 산화적 손상을 일으키는 물질을 각 단계별로 주입하였을 때의 유전자 발현 변화 패턴을 보여 준다. 이와 같이 생물 반응기에서의 여러 가지 외란(toxin, 온도 변화, pH 변화, 배양 조성액 변화, 산소 농도 변화 등)이 가해질 경우 각 상황에서의 유전자 발현을 살펴보고 특정 유전자의 변화를 추적하게 되면 특정 외란의 정도를 예측 할 수 있게 되고 안정적인 배양을 위한 환경 조건을 유전자 발현 기반으로 최적화 할 수 있다.

이들 결과로부터 각 화학물질 및 생물 중에 가해지는 외란에 대한 유전자 발현 패턴을 data base 화하여 그 화학물질의 유전자 발현 유도 과정을 통해 독성 정도를 예측 하고 분류할 수 있다. 또한 각각의 유전자 발현 패턴 특이성으로부터 멀티 바이오마커 스크리닝이 가능하다. 궁극적으로 DNA 칩 결과로부터

선별된 유전자 군을 이용하여 독성 분석에 용이한 DNA 칩의 개발이 가능하다 할 수 있겠다. 실제 수천, 수 만의 유전자 중 어느 화학물질에 어느 유전자가 발현될지는 알 수 없으나 데이터베이스 축적을 위한 실험 과정 중 그 대상 후보 군이 선정 될 수 있고 이들 중 대표성이 나타나는 몇몇의 유전자를 선별하고 조합하여 유전자 수 측면에서 축소화된 DNA 칩을 활용하면 여타 다른 화학물질이나 환경 시료의 독성을 분석하는데 훌륭한 환경 독성 바이오센서의 역할을 할 수 있는 것이다.

2) DNA 칩을 이용한 바이오마커 선별과 이를 활용한 바이오센서 제작

환경 독성 바이오센서 및 바이오 모니터링에 사용되는 기술은 첫째 특이한 유해 화학물질을 독립적으로 탐지하고 정량화 시킬 수 있는 화학물질에 특이한 바이오센서 시스템이 존재해야 하는데 화학물질에

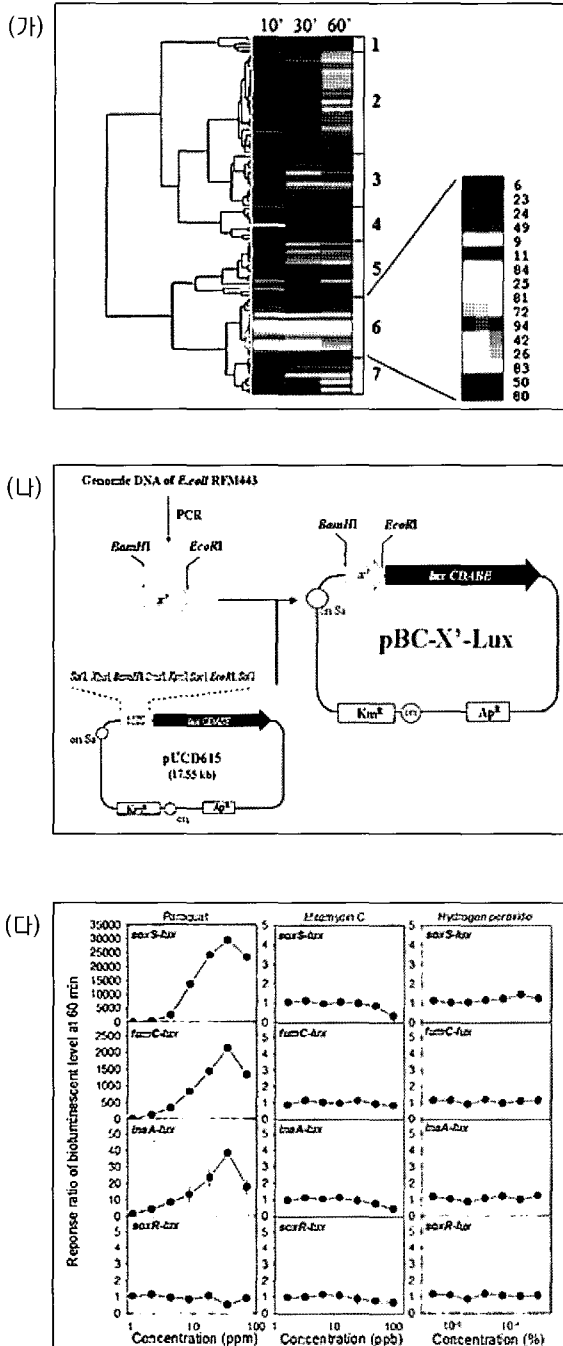
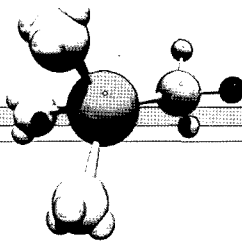


그림 6. DNA 칩 기반 정보를 활용한 whole-cell based 바이오센서의 제작. (가) 특정 독성 물질에 대한 시간에 따른 *E. coli* RFM443의 유전자 발현, (나) (가)의 결과로부터 특정 바이오마커를 선별하고 이의 프로모터 유전자를 *lux* 유전자와 결합하여 whole-cell 바이오센서를 제작하는 과정 (다) 제작된 바이오센서의 독성 물질에 대한 선택적 탐지결과(Kim et al., 2005).

특이한 효소를 활용하거나 혹은 생물체 전체를 활용한다(Rowe-Taitt et al., 2000). 이들은 일반 기기 분석 방법으로 측정하는데 걸리는 시간과 장비 및 경제성 등을 극복해 낼 수 있다는 점에서 매우 유리하나, 유사화학물질이 혼합되어 있을 경우에는 그 분석의 효용성이 떨어질 수밖에 없다. 두 번째는 지구상의 모든 생명체가 외부의 환경오염으로 인한 스트레스를 받을 때 그 독성으로 인하여 자신을 보호하고자 가지는 스트레스 반응 대사과정과 방어 기작을 활용하는 기술이다. 독성 물질로 인한 생물체의 반응을 유전자 수준에서의 대응을 준비하게 되는데 독성 물질과 접촉 시 그 피해 정도에 따라 이를 회복하거나 대응하기 위한 요소 유전자들의 발현이 진행되며 이를 유도하는 유전자를 스트레스 유전자라고 명칭 한다. 바로 이들 스트레스 유전자의 선별을 위해 DNA 칩이 활용될 수 있으며 새로운 스트레스 유전자의 기능을 분석함으로써 다양한 형태와 기능을 갖는 환경 바이오센서를 제작할 수 있다. 그림 6은 유전자 칩을 활용해서 독성 물질 탐지를 위한 whole-cell 기반 바이오센서를 제작하는 개념도이다. DNA 칩 결과에서 스크리닝된 바이오마커 유전자의 프로모터 영역을 발광(*lux*)/형광(GFP) 유전자로 대변되는 소위 리포터 유전자와의 결합을 통하여 세포에 특이적인 스트레스를 유도하는 독성 물질을 탐지할 수 있는 유전자 재조합 바이오센서를 개발하여 활용할 수 있다(Daunert et al., 2000; Gu et al., 2002; Kim et al., 2005). 이 기술은 DNA 칩이 transcription 수준에서의 발현 여부를 알려주는데 비해 translation 수준 즉 단백질 발현 수준에서의 독성 평가에 활용될 수 있다는 측면에서 서로 상호 보완적인 관계로 발전해 나갈 수 있다.

이렇게 제작된 다양한 whole-cell 기반 바이오센서는 최종적으로 cell 칩 기반의 high throughput 독성 모니터링용 바이오센서로서의 역할을 수행할 수 있다(Lee et al., 2005). 96 well 혹은 384 well 기반의 칩에 적절한 고정화 지지체를 이용하여 각 well에 서로 다른 독성 스트레스 탐지가 가능한 유전자 재조합된

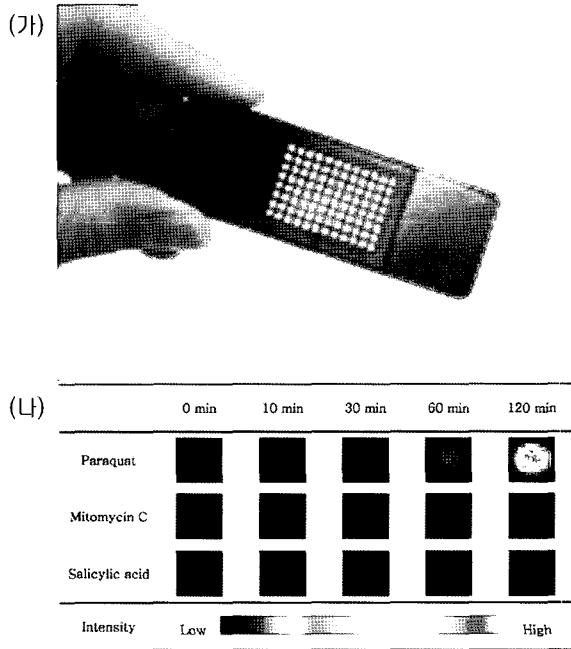


그림 7. (가) 96 well 기반 cell 칩, (나) cell 칩의 발광 신호를 CCD 카메라로 탐지하는 영상.

cell 을 고정화 하여 cell 칩을 구성한다(그림 7). Cell 칩에 독성 및 스트레스 기작을 알고 싶은 물질을 노출 시키고 각 well 에서의 발광량을 CCD 카메라를 이용하여 검출하면 특이적으로 발광량이 증가하는 well 을 선별 할 수 있고 이에 해당하는 유전자 재조합 된 cell 의 특성에 따라 노출 시킨 물질의 독성 및 스트레스를 초고속으로 스크리닝 할 수 있다. 이와 같은 개념의 cell 칩은 DNA 칩 의 transcription 수준에서 선별된 바이오마커 유전자의 발현을 세포 대사과정 중에서 표현될 수 있도록 함으로써 손쉬운 바이오 센서의 제작을 가능케 한다.

3. DNA 칩을 이용한 유전체 독성(Toxicogenomics) 연구

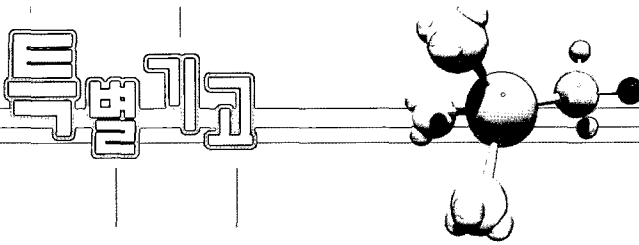
1) 유전체 독성 연구 체계

2001년 10월 통계로 Chemical Abstract Service(CAS)에는 유기, 무기 화학물질을 통틀어 대략 1800만 종의 화학물질이 등록되어 있다. 이들 화학물질은 산업 전반에 걸쳐 인류에게 막대한 부를 안겨주고 있지만 이들

의 환경과 인간 건강에 대한 잠재적인 위해성을 간과해서는 안 된다. 생물학적 관점에서 화학물질의 독성을 판별하는 가장 일반적인 방법은 animal/fish/bacteria test를 이용한 bioassay다. 개체에 직접 화학물질을 투여 혹은 접촉 시켜 사멸 정도를 확인함으로써 LD (lethal dose), LC(lethal concentration) 값의 기준 농도를 결정하고 이를 근거로 화학물질의 독성 강도와 여부를 구분 짓게 된다. 그러나 자연 환경에 유출되는 화학물질들은 단일 종 만이 아니며 또한 현재 유출되는 화학물질의 10% 정도만이 유출 후 분석 가능한 것으로 알려져 있다. LD, LC 기준의 농도는 화학물질이 사멸을 유도하기까지 세포나 개체에 미치는 생리 활성적 영향의 지표는 전혀 제시 해 줄 수 없는 것이 사실이다. 즉, 저 농도에 오랫동안 노출 될 경우 나타나는 세포의 생리활성 변화에 의한 독성이 더 심각할 수 있다는 의미이다.

이런 관점에서 볼 때 화학물질의 독성 정도를 밝혀 내기위해 유전자 발현수준에서 화학 물질이 어떠한 영향을 미치는지 반드시 살펴볼 필요성을 느끼게 된다. 따라서 독성학적 측면에서 새로운 독성 정보를 알려줄 수 있는 도구의 필요성이 대두되고 있는 시점에서(Neumann and Galvez, 2002) DNA 칩 기술은 이의 궁극증을 해결해 줄 강력한 도구가 된다. 특히 각종 생물체의 genome 시퀀스와 이에 따른 EST(Expression Sequence Tag) 정보가 체계적으로 축적되고 있는 상황에서 대상 생물 종의 DNA 칩 활용은 생물체의 화학물질에 대한 반응 기작을 확인하는데 강력한 도구로 자리잡고 있다. 이와 같이 독성 물질에 대한 전체 유전자 발현 패턴을 분석하고 조절하는지 밝히는 연구 분야가 유전체 독성연구이며 이를 위한 DNA 칩의 활용은 필수불가결 하다 할 수 있겠다. DNA 칩 활용을 통한 유전체 독성 연구 체계가 위 그림 8에 잘 나타나 있다.

또한 최근에는 DNA 칩 연구로부터 확보된 독성 정보를 통합하고 관리하려는 움직임이 진행되고 있다. 2000년부터 미국의 NIEHS의 Toxicogenomics Research Consortium(TRC- <http://www.niehs.nih.gov/dert/trc/>)



CEBS Vision - Bioinformatics to Knowledge

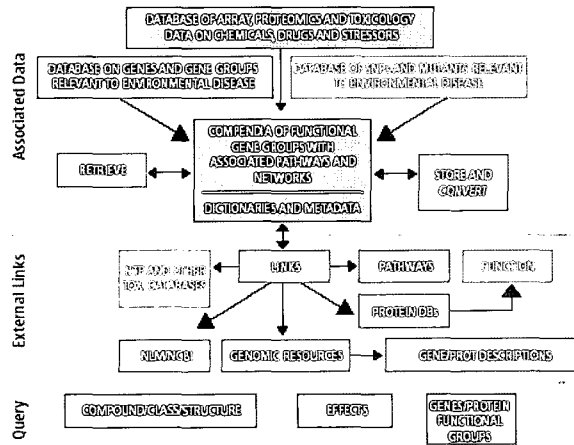
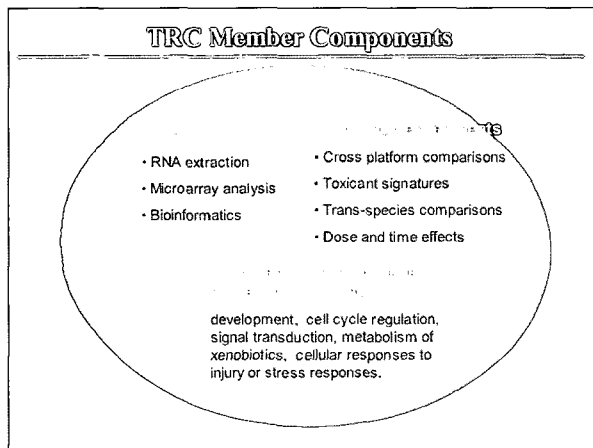


그림 8. The Chemical Effects in Biological Systems (CEBS) vision using toxicogenomic study combined with bioinformatics in NIEHS, USA. (<http://www.niehs.nih.gov/nct/cebs.htm>)



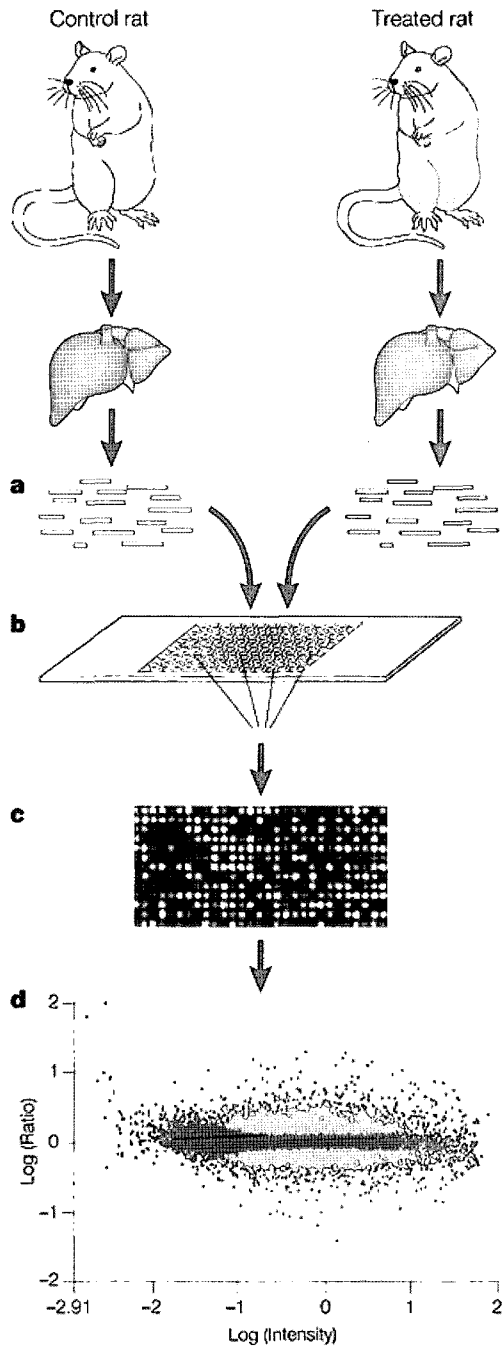
출처 : <http://www.niehs.nih.gov/dert/trc/intro.htm>

그림 9. 유전체 독성학 연구 콘소시움 분야 별 구성도.

home.htm) 을 중심으로 DNA 칩 연구 분야/독성학 연구 분야/분석 분야로 나뉘어 서로의 연구 결과를 공유하고 정보를 구축하고 있으며 그 핵심은 DNA 칩 연구와 분석 분야이다(그림 9). 이 콘소시움에는 미국의 NIEHS를 비롯하여 Duke University Medical Center, Fred Hutchinson Cancer Research Center / University of Washington, Oregon Health and Science University, Paradigm Genetics 등이 참여 하고 있다.

2) DNA 칩의 유독성학 연구로의 활용

유전체 독성학 연구는 화학물질이나 약품이 처리된 대상 세포나 개체가 어떠한 방식으로 유전자를 발현시키고 조절하는지를 유전체 수준에서 분석하는 것을 의미한다(Neumann and Galvez, 2002). 따라서 유전체 독성학 측면에서 DNA 칩을 활용하여 유전자 발현 패턴에 따른 화학물질 스크리닝, 화학물질에 의한 중간 생리활성 변화 분석, 독성학적 기작 분석을 수행할 수 있다(그림 10). DNA 칩을 이용한 유전체 독성학 연구는 서로 다른 클래스에 속하는 화학물질이 접촉된 시간이나 농도에 따라 대상 세포나 개체의 유전자 발현 패턴의 차이가 날 것이라는 점을 전제로 시작한다. 서로 다른 클래스에 속하는 화학물질은 잠재적으로 유전자 발현 양상에 차이를 보이게 될 것이며 이를 통해 화학물질에 특이적인 발현 양상을 DNA 칩으로 분석함으로써 첫째, 유전자 발현 네트워크 검증을 통해 환경 시료에 대한 잠재적인 독성 평가를 실시할 수 있으며, 둘째, 잘 분석된 화학물질의 유전자 발현 정보를 통해 미지 시료나 독성 분석이 이루어 지지 않은 신규 화학물질의 독성 정보를 비교하고 그 독성 효과를 예측 할 수 있고, 셋째, 멀티 바이오마커 역할을 기대 할 수 있다. 넷째, 사용되는 유전자 칩의 유전자 소스에 따른 중복되는 유전자 발현을 분석함으로써 중간 독성 비교 연구가 가능하며, 다섯째, 복잡 성상의 화학 종에 대한 생리활성 측면에서의 독성 분석이 가능하다. 마지막으로 여섯째, 화학물질의 급성 독성 혹은 장기 독성 효과를 판단할 수 있다. 이와 같은 가능성은 이미 몇몇 연구진들에 의해 제시되고 있다. Hepatotoxin 독성 분석을 위해 rat DNA 칩을 이용 각각의 hepatotoxin류에 대해 특이적인 유전자 발현 패턴을 분석하고 이들 간의 DNA 발현을 hepatotoxin류를 중심으로 clustering한 결과가 보고되었으며(Waring *et al*, 2001), 비슷한 구조를 갖는 화학물질에 따라 발현되는 유전자 패턴이 연관성 있게 분류된다는 보고도 있다. Bartosiewicz 는 물고기 DNA 칩을 이용하여 몇몇 환경 호르몬에 대한



Nature Reviews | Drug Discovery

그림 10. 유전체 독성학 연구를 위한 유전자 칩 실험 개요도 (Roger Ulrich & Stephen H. Friend *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 84 -88(2002))

DNA 발현 패턴이 달라짐을 확인 하였고 화학물질의 fingerprinting으로 유전자 발현 패턴을 이용할 수 있음을 제시 하였다(Bartosiewicz *et al*, 2001).

DNA 칩이 갖는 또 하나의 활용성은 장기적인 관점에서의 독성(chronic toxicity) 분석이 가능하다는 것이다. 이를 위해서는 특정 물질이 유도하는 기작을 시간 별, 농도 별로 좀더 세분화하여 분석 할 필요가 있다. 일반적으로 발암물질이나 환경호르몬의 경우 급성 독성(acute toxicity) 보다는 장기적인 축척에 의한 독성이 문제가 된다(Afshri *et al*, 1999). 그림 11은 본 연구실에서 개발한 Japanese Medaka fish 의 functional DNA 칩을 이용하여 phenol 150 uM에 지속적으로 노출된 medaka fish의 유전자 발현 패턴 차이를 보여준다. 지속적인 화학물질의 노출은 지속적인 특정 유전자 발현 패턴 변화를 유발하며 DNA 칩을 활용하여 장기적인 관점에서의 독성 분석 수행이 진행 될 수 있음을 보여 준다.

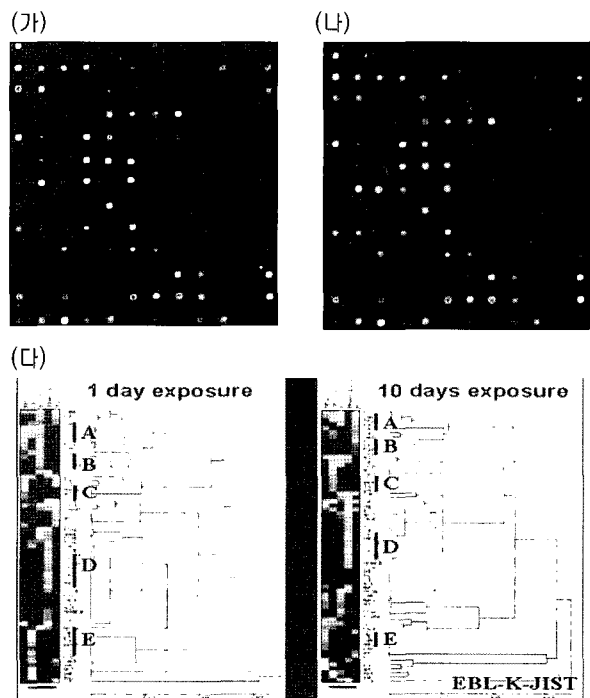
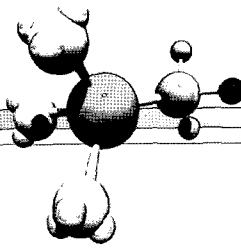


그림 11. (가) Japanese medaka에 150uM phenol을 노출 시킨 후 유전자 발현 패턴 분석 결과 (가) 1일, (나) 10일 후, (다) Japanese medaka에 EDCs 류, 페놀 등을 각각 1일 10일 동안 노출 시킨 후 유전자 발현 패턴을 clustering한 결과.



궁극적으로 화학물질의 시간에 따른 노출과 농도 별 노출을 통한 유전자 발현 패턴에 근거하여 화학물질의 독성 분석이 가능하며 이들로부터 얻어진 정보는 대사과정 흐름 분석과 fingerprint mapping 등의 분석 과정을 통해 화학물질이 미치는 독성을 좀더 세분화하여 관찰 할 수 있으며 나아가서는 실제 환경 생태계의 독성 분석과 risk assessment를 수행하는데 활용될 수 있을 것이다.

3) DNA chip과 Real time PCR기법을 조합한 유전체 독성학 연구

제한효소의 발견이 유전공학의 시작을 열었듯이, Polymerase Chain Reaction(PCR) 기술은 생명과학의 발전에 가속력을 실어 그 전성을 이루는데 일조했다 해도 과언이 아닐 것이다. DNA 칩은 단 한 번의 실험으로 다량의 유전자 발현 정보를 줄 수 있는 장점이 있으나, 민감도나 실험 비용면에서 문제점을 가지고 있고, 요구되는 시료의 양이 많은 단점으로 인해 반복 실험과 민감한 실험이 어렵다. 이에 대한 기술적 보완으로 Real-time PCR 기법을 통해 DNA 칩 실험 결과를 최종적으로 확인하고 타겟이 되는 유전자 발현을 비교 분석 함으로써 DNA 칩 실험에서 얻어진 결과의 신빙성을 높일 수 있다. 현재까지의 PCR은 주로 PCR 반응 후의 산물을 gel에서 분리해 확인하고 대강의 양을 어렵잡는데 그쳤다고 할 수 있겠으나 점차적으로 정확한 정량을 보다 신속히 할 필요성이 커지고 있다. PCR 반응 산물은 이론적으로는 기하급수적으로 증가하나 실제 tube안에서는 여러 limiting factor의 영향으로 어느 순간 이후에는 증가가 없는 plateau를 보인다. 즉, plateau에 도달하는 시점이 서로 다른 여러 반응을 어떤 한 end point에서 분석하는 것은 정량적으로 실제와 매우 다른 결과를 얻게 될 가능성이 크다고 볼 수 있다. 또한 같은 반응일지라도 한 요소의 미소한 차이가 매우 다른 결과를 나타내기도 한다(그림 12). 이러한 고전적인 PCR 방법이 갖는 문제점을 해결하고 각 PCR 단계를 exponential phase 범위 내에

서 측정하고자 매 cycle의 진행상황을 모니터링 하는 real-time PCR기술이 개발되었다. 이와 동시에, 매 cycle의 진행상태를 신속히 측정할 수 있도록, gel에서의 분리방법이 아닌, in-the-tube측정 수단으로 fluorescence detection 방법도 같이 개발되었다(그림 13).

Real-time PCR 실험에 사용되는 몇 가지 probe system 중 가장 대표적인 assay는 5' Nuclease Assay로 TaqMan probe를 이용한다. TaqMan probe의 한 끝에는 reporter fluorescent dye를 붙이고 다른 한 끝에는 quencher dye를 붙여, PCR이 진행될 때 5'끝의 reporter fluorescent dye가 떨어지면서 내는 고유의 형광을 정량하는 방식이다. 이 probe는 target의 고유 염기 서열이므로 specific product에만 붙으며, PCR 반응이 없으

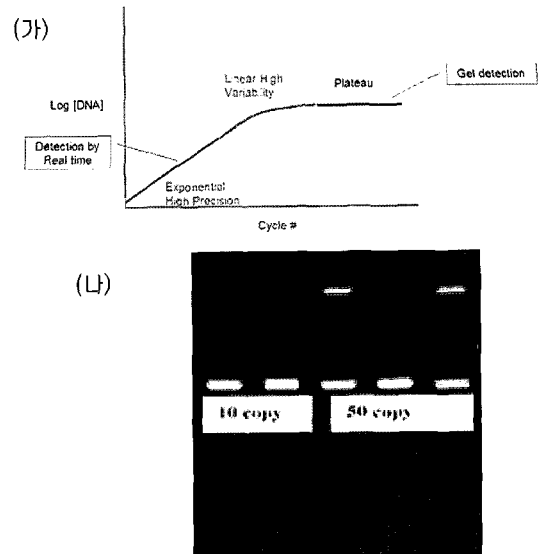
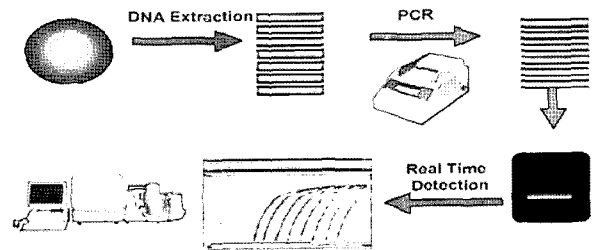


그림 12. (가) PCR Cycle에 따른 유전자양 그래프. (나) ETBR을 통한 젤 염색 검출법



(<http://www.appliedbiosystems.com/>)

그림 13. real time PCR 개념 및 구성요소

면 3'끝의 quencher dye에 의해 형광이 억제되도록 디자인된 것이다. PCR 반응이 많으면 비례적으로 형광의 양도 누적하여 증가하므로 간접적인 측정 수단이 될 수 있다. Real-time PCR 에서 유전자 발현을 정량하는데 있어 가장 중요한 개념은 CT(Threshold Cycle) 수치이다. 이 값은 probe의 reporter fluorescence 값이 base line 값을 지나는 시점의 cycle number로서, 즉, 큰 CT 값을 가질수록 적은 양의 initial 유전자량을 갖는 것을 의미한다. internal standard와 control sample의 CT 값으로 원하는 target sample CT 값을 보정하여 최종 값을 얻는다. Real-time PCR은 단일 유전자의 발현 양을 민감하게 분석 할 수 있기 때문에 DNA Chip으로부터 야기되는 민감도 문제를 극복할 수 있

으며, DNA 칩 에서 선별된 특정 유전자의 발현을 Real-time PCR로 확인함으로써 DNA chip의 비용상의 문제로 인한 반복 실험난점을 보완 해 줄 수 있다. 이러한 실험의 수행 개념도는 아래의 그림14 에 잘 나타나 있다. (가)에서 각각 독성물질을 처리한 실험군과 그렇지 않은 대조군의 실험을 수행하고 이렇게 얻은 RNA를 우선 DNA 칩에 적용시켜 그 발현 양상과 패턴을 (나)의 그림처럼 분석 할 수 있다. 이렇게 분석을 마친 후 관심의 대상이 되는 바이오마커 유전자나 또는 발현 억제된 유전자를 선정하여 (가)에서 사용됐던 RNA를 이용 (다)에서와 같이 정밀하게 각 유전자에 대하여 Real-time PCR을 수행하여 결과를 얻을 수 있다. 또한 Real-time PCR은 상대적으로 작은

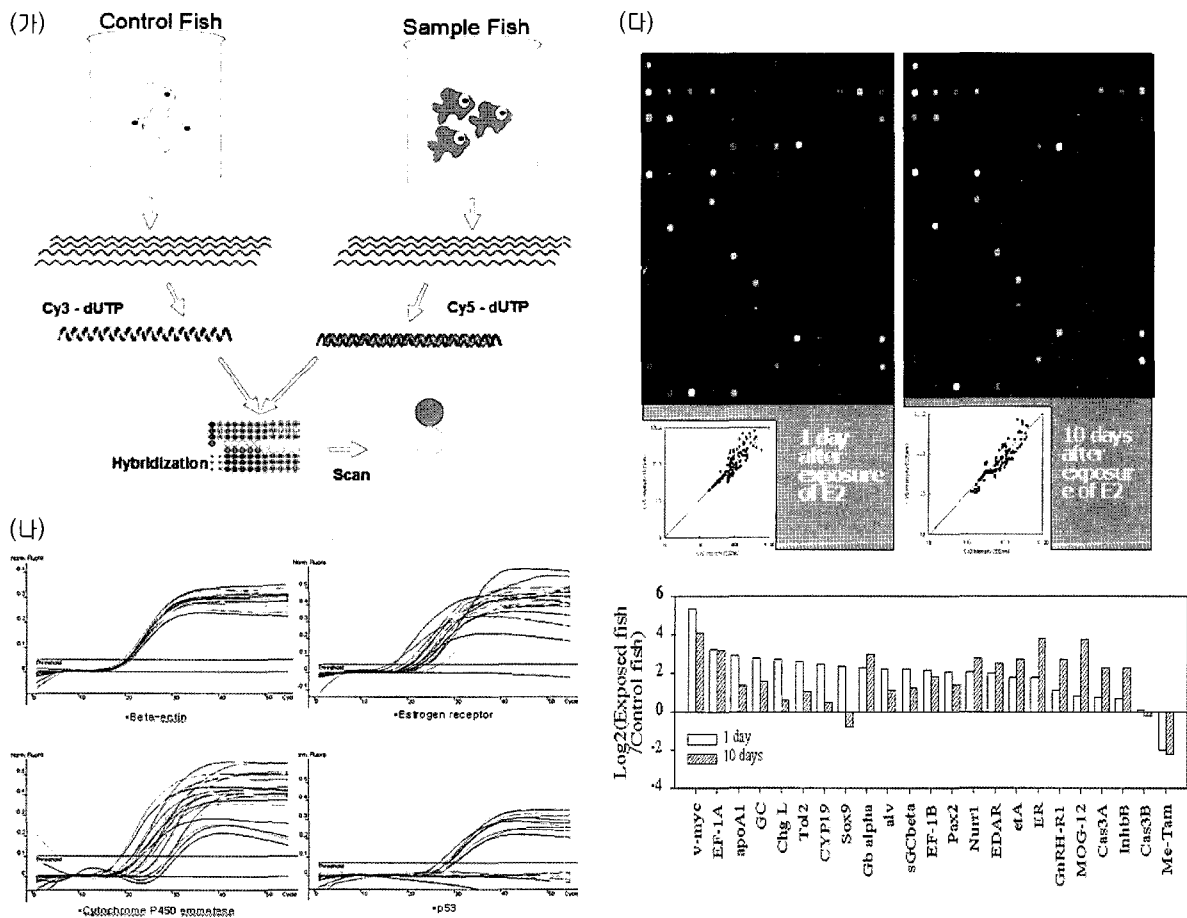
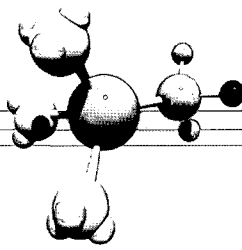


그림 14. DNA Chip과 Real-time PCR을 이용한 독성분석 방법도. (가) 샘플에서 DNA Chip 까지 과정, (나) DNA Chip 의 분석을 통한 과 발현 및 발현억제 분석, (다) 발현 양상을 Real time PCR을 이용해 정밀분석



양의 샘플 RNA 시료를 필요로 하며, 이러한 방식은 민감도 문제와 더불어 나타나는 DNA 칩이 상대적으로 많은 양의 RNA 시료를 요구하여 반복 수행 실험에 난점을 가지고 있는 점 역시 극복할 수 있다.

4) Chemi-Toxicogenomics 기반 gene networking 연구

광범위한 유전자 발현 데이터와 real-time PCR로 재확인된 유전자 발현 독성 유전체 연구 관점에서 독성 물질에 대한 유전자 발현 network 분석을 가능케 한다(그림 15). 기존의 많은 통계학적 분석 방법을 통해 속속히 더욱 정교하고 분석적인 모티프를 활용한 방법들이 등장하고 있다. DNA chip에서의 유전자 발현 정도는 ratio값으로 나타나며 그 데이터의 양 또한 수천에서 수만에 이른다. 따라서 DNA 칩에서의 유전자 발현 network의 엄밀한 구성을 위해 다양한 알고리즘과 방법이 개발되고 있다. 유전자 발현에 대한 대표적인 통계 분석 법은 clustering 방법인데 이는 발현 양상이 비슷한 유전자 군을 군집 시켜주지만 그 유전자들이 반드시 동일 발현 선상에(regulatory network) 위치하는 것을 의미하지는 않는다.

그러나 유전자의 발현을 on-off 개념으로 변환시키게 되면 유전자 network 구성을 위해 흔히 logic 알고리즘인 'Boolean 알고리즘'을 활용할 수 있다. 이는 연속적인 유전자 발현흐름을 밝히는 데는 불리하나 특수 상황에서 연관 유전자들의 on-off 특성을 살펴 유전자 발현

network를 분석 할 수 있으며 각 화학물질을 유전자 발현 패턴을 근거하여 fingerprinting mapping을 할 수 있는 근거를 제시해준다(Hatzimanikatis and Lee, 1999). 이와 같은 특성을 이용하여 독성 환경 하에서의 생물 종의 유전자 발현 패턴이 어떻게 변화하는 가를 살피고 유전자 발현 흐름이 어떻게 조절되는지 알게 된다면 화학물질의 유전자 분석 방법에 근거한 독성 정보를 더욱 세분화 하여 구축 할 수 있으며 환경 분석 뿐만 아니라 독성 물질에 의한 질병 유발 인자 분석과 함께 새로운 해독제 제작 분야에도 응용될 수 있을 것이다.

III. 맺음말

이상과 같이 환경 분야에 응용될 수 있는 DNA 칩의 활용 가능성을 살펴보았다. 그러나 이들 기술이 확고히 접목되기 위해서는 해결해야 할 문제점들도 많은 것이 사실이다. DNA 칩을 이용한 정확한 환경 진단이 가능해지기 위해서는 칩으로부터 양산되는 무수히 많은 데이터의 정량, 정성적인 체계적인 분석, 민감도 향상 등이 고려되어야 한다. 비단 환경공학 분야의 적용을 위해서 뿐만이 아니라 DNA 칩의 연구는 데이터의 논리적인 해석과 정렬이 반드시 수반되어야만 한다. 이를 위해서는 체계적인 데이터 마이닝 방식의 적용(bioinformatics의 활용)과 학제간 융합 연구 구축이 필수적이다. 또한 한가지 간과해서는 안될 것은 mRNA의 발현이 세포수준에서의 반응을 완전히 대변 해주지 않는다는 점이다. 이의 측면에서 proteomics를 활용한 단백질 수준에서의 연구가 필요하다 할 수 있겠다. 적용 면에 있어서 아직까지는 DNA 칩의 민감도는 그다지 만족할 만한 수준은 아니다. 또한 실제 환경 시료의 진단을 위해서는 좀 더 간소화된 진단 과정이 필요하고 환경 바이오센서로서 손쉽게 활용되기 위해서는 DNA 칩의 플랫폼이 변화되어야 할 필요성이 있다. 언급된 문제점들을 해결할 수 있는 기술들이 지속적으로 등장하고 있으며 이런 점에도 불구하고 DNA 칩은 환경연구에 있어서 가히 혁명적이라 할

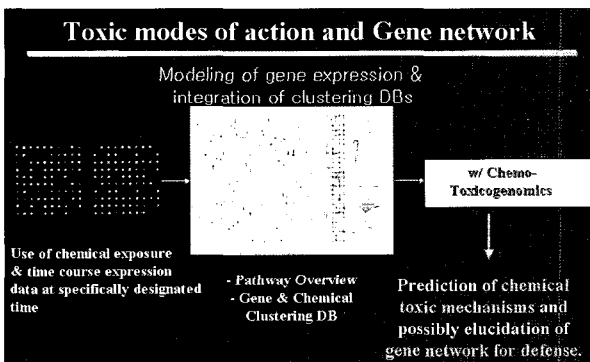


그림 15. DNA chip을 활용한 독성 유전체 학의 신기능 연구 흐름도

수 있는 강력한 도구로 자리잡게 될 것이다. 마지막으로 21세기 첨단 산업인 BT, IT, ET를 융합한 환경 바이오모니터링 기술의 체계적 개발은 환경독성 유전체 분석의 궁극적 목표인 안전한 보건 환경 유지를 달성 하는데 일조 할 수 있다고 본다.

IV. 참고 문헌

- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995 270, 467-470.
- Sumpter JP, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contaminants of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 1995, 103, 173-178.
- Todorov JR, Elskus AA, Schlenk D, Ferguson PL, Brownawell BJ, McElroy AE. Estrogenic responses of larval sunshine bass(*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) exposed to New York City sewage effluent. *Marine Environ. Res.* 2002, 54, 691-695.
- Vethaak AD, J. Lahr RV, Kuiper GC, Grinwis TR, Rankouhi JP, Gerritsen A. Estrogenic effects in fish in the Netherlands: some preliminary results. *Toxicology* 2002, 27, 147-150.
- Neumann NF, Galvez F. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnol. Adv.* 2002, 20, 391-419.
- Brasfield SM, Weber LP, Talent LG, Janz DM. Dose-response and time course relationships for vitellogenin induction in male western fence lizards(*Sceloporus occidentalis*) exposed to ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002, 21, 1410-1416.
- Rowe-Taitt CA, Golden JP, Feldstein MJ, Cras JJ, Hoffman KE, Ligler FS. Array biosensor for detection of biohazards. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 14, 785-794.
- Dauert S, Barrett G, Feliciano JS, Shetty RS, Shrestha S, Smith-Spencer W. Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chem. Rev.* 2000, 100, 2705-2738.
- Gu MB, Min J, Kim EJ. Toxicity monitoring and classification of endocrine disrupting chemicals (EDCs) using recombinant bioluminescent bacteria. *Chemosphere* 2002, 46, 289-294.
- Kim BC, Youn, CH, Ahn JM, Gu MB. Screening of target-specific stress responsive genes for the development of cell-based biosensors using a DNA microarray. *Anl. Chem.* 2005, 77, 8020-8026.
- Lee JH, Mitchell RJ, Kim BC, Gu MB. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis, *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 500-507.
- Ulrich R, Friend SH. Toxicogenomics and drug discovery: Will new technology help us produce better drug? *Nature Review: Drug Discovery* 2002, 1, 84-88.
- Bartosiewicz M, Penn S, Buckpitt A. Applications of gene arrays in environmental toxicology: fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo(a)pyrene, and trichloroethylene. *Environ Health Perspect.* 2001, 109, 71-74.
- Afshari CA, Nuwaysir EF, Barrett JC. Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology, and drug safety evaluation. *Cancer Res.* 1999, 59, 4759-4760.
- Waring JF, Jolly RA, Ciurlionis R, Lum PY, Praestgaard JT, Morfitt DC, Buratto B, Roberts C, Schadt E, Ulrich RG. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001, 175, 28-42.
- Hatzimanikatis V, Lee K. Dynamic analysis of gene network requires both mRNA and protein expression information. *Metabol. Eng.* 1999, 1, E1-7
- <http://www.niehs.nih.gov/nct/cebs.htm>
- <http://www.niehs.nih.gov/dert/trc/intro.htm>
- <http://www.appliedbiosystems.com>