

기능성 핵산 고분자를 이용하는 분자 합성 생물학의 새로운 전개



고려대학교 생명정보공학과
백승필

E-mail : spack@korea.ac.kr

핵산 (DNA와 RNA)은 기본 단위체인 뉴클레오티드의 순차적인 배열을 통하여 여러 가지 생명 현상을 유지하고 구현하는 중요한 생체거대분자이다. 각각 생명체의 유전정보를 저장하고 전달하는 역할을 맡고 있으며 생리적 기능의 단백질과 함께 오랫동안 분자생물학 분야를 양분한 연구대상이기도 하다.

20세기 말 인간의 유전 정보의 해석이 완료되면서 그 중요성이 다시 부각되어 왔으며, 지금까지 유전체 및 전사체 해석을 위한 여러 핵산 응용 연구방식들이 개발되고 있다 [1]. 특히, 미세공간내 고밀도 핵산이 배열된 DNA칩 [2,3]또는 DNA 파티클 [4]과 같은 새로운 유전체/전사체 분석 개념의 도출은 최근의 나노바이오 테크놀로지의 유행을 선도한 가장 중요한 업적이기도 하다.

공학적 관점에서, 오랫동안 정보유지 및 전달자의 개념에서 벗어나 새로운 응용성을 가지는 생체고분자로서 핵산을 활용하게 된 것은 핵산 고유의 기본적 특징인 상보결합성(Complementary Binding Ability)이 있었기 때문이다. 즉, 서열에 따라 상대 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산의 자기조합능력은 다른 어떤 생체 고분자 또는 비생체 고분자가 가질 수 없는 응용적 장점이다. 이와 더불어 흔히 간과되고 있는 또 하나의 응용적 장점은 고순도의 핵산 고분자를 설계할 수 있는 기술이 현재 존재하고 있다는 것이다 [5-11].

핵산의 인공적 설계 - 핵산의 화학적 합성

주지의 사실이지만, 핵산은 리보스, 염기, 인으로 구성된 뉴클레오티드로 구성되어 있으며, 단 4종류의 염기인 Guanine, Adenine, Cytosine, Thymine (RNA의 경우 Uracil)의 순차적 배열만으로 수많은 서열 정보가 표현되고 있다. 약 50년 전 Watson과 Crick에 의해 DNA의 이중 나선 구조가 밝혀진 이후, 1955년에 Michelson과 Todd에 의하여 3'→5'-d(ITT) 디뉴클레오티드가 합성되면서부터 많은 학자들이 핵산의 인위적 설계법에 관심을 가지게 되었다 [5]. 특

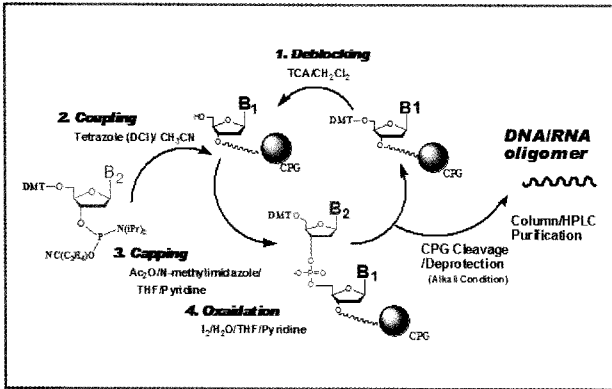


그림 1. 핵산고분자 합성의 반응 4 단계 (Phosphoramidite method)

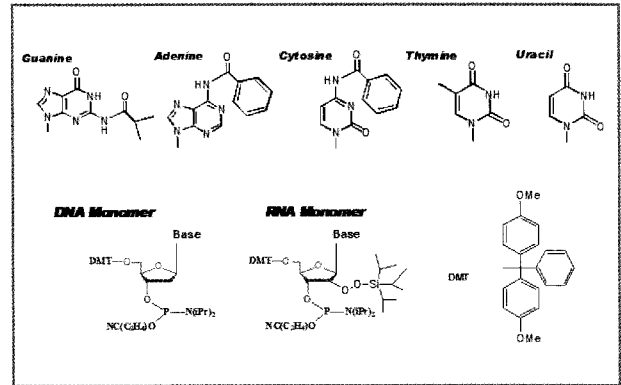


그림 2. 핵산고분자 합성에 사용되는 기본 염기별 Phosphoramidite 단위체

히, Letsinger와 Mahadevan등에 의하여 핵산의 고체상 합성법 [6]이 개발된 후에 phosphodiester method [7], phosphotriester method [8], phosphite triester method [9], H-phosphonate method [10] 등의 다양한 방법이 개발되어 왔다. [그림 1]에서 제시한 것은 현재 가장 많이 사용되고 있는 Phosphoramidite method를 이용한 핵산 합성 과정을 나타낸 것이다 [11]. Phosphoramidite method의 경우 크게 (1) Deblocking, (2) Coupling (3) Capping (4) Oxidation 으로 구성되는 4개의 반응과정이 순환하는 방식으로 원하는 핵산 서열을 고정상에 합성해 나갈 수 있다. Coupling 반응에 들어가는 일반적인 핵산단위체는 5'에 DMT (Dimethoxytrityl)기가 그리고 3'-에 N,N-diisopropyl O-(2-cyanoethyl) phosphoramidite기가 수식되어 있으며, 합성과정중의 부반응을 막기 위해 염기에 존재하는 Amine기 부분은 acylamine기 형태로 보호되어 있는 것이 일반적이다 (참고, 핵산고분자 합성 방식의 발달로 현재 무보호 형태의 다양한 합성 단위체 개발이 가능하다). [그림 2]는 각 염기별 Phosphoramidite단위체를 제시하고 있다 [13]. 합성 Cycle로 얻어진 결과물은 이후 염기 처리를 통한 고정상 분리과 Amine 보호기의 탈리 과정을 거쳐지며, 5'-에 남아 있는 DMT기의 소수성을 이용한 필터형 칼럼이나 HPLC를 통한 정제 과정 그리고 최종 산처리 (남아있는 말단 DMT기를 탈리)를 통해, 최종적으로 생체내에서 얻어지는 것과 동일한 성질의 인공

핵산 고분자를 고순도로 얻어낼 수 있다 [12].

핵산의 화학적 합성 vs 생화학적 합성

생화학적으로 핵산 고분자는 생체내에서 DNA (RNA) polymerase라는 효소가 핵산 단위체인 dNTP (Deoxynucleotide triphosphate) 또는 NTP를 기질로 사용하여 합성된다. DNA의 경우 PCR (Polymerase chain reaction)이라는 생체의 생화학 합성 시스템을 통해, 특정한 서열 부분을 대량 생산 및 증폭할 수 있으며, 지난 사반세기의 유전공학, 단백질공학, 세포공학 연구 발전에 기여한 가장 기본적인 실험기법으로 자리매김되어 있다 [13]. 하지만, 특정한 주형 서열 (Template strand)이 필요하기 때문에 원하는 서열의 핵산을 합성하지 못한다는 점 그리고 일정 크기 이하의 합성에는 부적절하다는 단점이 있었다. 이와 다르게, 앞서 설명한 핵산의 화학적 합성 방식의 경우 우리가 원하는 서열의 핵산을 자유롭게 설계할 수 있으며, 작게는 디뉴클레오티드부터 1,000bp 이상까지 다양한 크기의 핵산 고분자를 비교적 높은 수율로 합성이 가능하다는 새로운 응용적 장점을 가지고 있다. 이미, PCR에 사용되는 핵산 프라이머가 화학적 방법으로 합성되고 있으며, 최근에는 자동화 및 대량 생산체계를 통해 저렴한 가격에 원하는 서열의 핵산을 쉽게 얻을 수 있다. 현재, 합성 설계된 핵산은 생물, 약

학 계열과 같은 정통 생명과학 분야뿐만 아니라 생명공학 그리고 나노바이오공학과 같은 새로운 생물 응용/융합 분야의 중요한 생물 재료로서 널리 이용되고 있다 [14].

기능성 핵산고분자의 설계 - 새로운 물성의 핵산 고분자

화학적합성이 가지는 또 하나의 장점은 기본적인 4종류의 염기 외에도 적절한 기능분자들을 도입할 수가 있어 생체내에서 발견되는 것과 다른 새로운 기능성의 핵산 고분자를 설계할 수 있다는 것이다. 이것은 기본적인 유전정보 및 전달이라는 역할과 더불어 새로운 물성이 부가/결합된 복합 기능성의 새로운 인공 생체 재료의 탄생을 의미하는 것으로서, 최근 핵산을 기반으로 한 고효율 생명공학 및 나노바이오공학 응용 시스템 개발 연구를 촉발하였다. 특히 고분자 말단에 Amine기를 도입한 핵산 고분자를 칩표면과 공유결합시켜 DNA칩을 구성하거나, Thiol기를 도입한 핵산고분자를 나노사이즈의 금 나노입자에 자기조합배열 시켜 고감도 유전자 검출 시스템을 개발한 것은 이미 잘 알려진 응용 예들이다. 그 밖에도, Hyperxanthine, 8-Oxoguanine 등 변형 염기 등을 도입한 핵산 고분자의 경우, 유전자 손상 및 수복과 관련한 생체 기작을 관찰할 수 있는 중요한 분자 프로브로의 활용이 가능하다. 또한, 형광을 나타내는 분자가 도입된

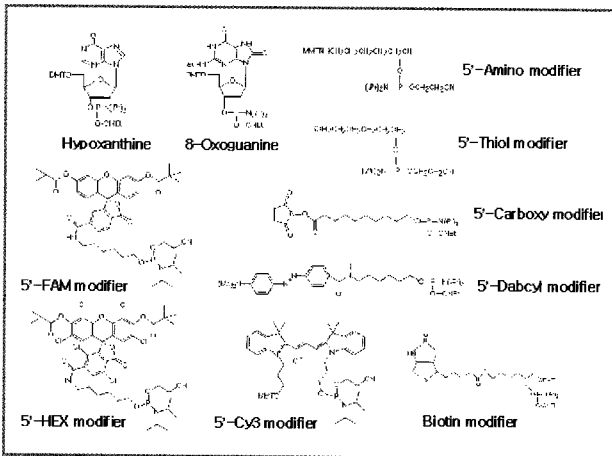


그림 3. 기능성 핵산고분자 설계에 이용되는 Phosphoramidite단위체들

핵산고분자는 Molecular beacon 이나 Bioimaging용 기능성 분자로 활용되어 세포내 변화를 실시간 관찰하는 분자 시스템 개발에 응용될 수 있다. 이외에도, Biotin 또는 Cholesterol과 같은 다양한 분자 기능기 도입을 통해 새로운 생리기능 탐색 등에 유용한 생체 프로브 분자로 활용이 가능하다. 더욱이 RNA 기반의 생명제어방법의 개발 (anti-sense technology, non-coding RNA analysis, RNA interference 등)에 핵산고분자의 응용이 가능하다.[그림 3]은 현재 상용적으로 이용이 가능한 다양한 Phosphoramidite단위체들의 예이다 [15].

자체 반응성을 가진 핵산의 설계 - 새로운 개념의 핵산고분자의 개발

본인은 2005년 Oxanine이라는 반응성 염기를 활용하여 자체 반응성을 가지는 새로운 핵산 고분자를 개발하였다. 이것은 핵산 고분자의 화학적 합성방식을 응용 개발한 것으로, Oxanine의 Phosphoramidite단위체를 구성하고 이를 핵산 고분자에 도입하는 새로운 화학 합성법과 정제법을 기반으로 하고 있다 [16]. Oxanine은 Guanine의 Purine 염기환내의 2차 Amine이 산화된 형태인 일종의 변형 염기이다. Oxanine은 자체 반응성이라는 독특한 기능성을 가지고 있는데, 그것은 [그림 4]와 같이, 일종의 반응 활성화된 Carboxy기 형태인 O-acylisourea구조가 염기환내에 존재하기 때문이다. 일반적으로, Carboxy기의 반응성을 올리기 위해

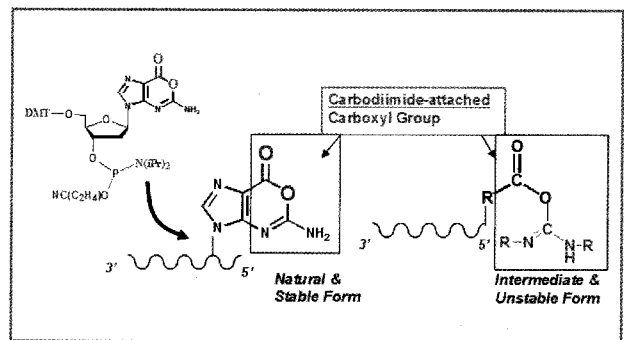


그림 4. Oxanie의 자체 반응성의 원리 및 이를 이용한 반응성 핵산고분자 설계

DCC (dicyclohexylcarbodiimide)나 EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)와 같은 Coupling용 화학시약을 처리하게 되는데 [17, 18], 이때 활성화형 중간체인 Carbodiimide-activated carboxy기 (*O*-acylisourea구조와 동일)가 형성된다. [그림 4]에서 보는 바와 같이, Oxanine의 경우 이와 동일한 구조를 분자구조내에 태생적으로 가지고 있어 Amine과의 반응을 통해 펩타이드 공유결합 형성이 가능하게 된다. 결국 Oxanine을 핵산 고분자에 도입 설계함으로써 자체 반응성을 가지는 핵산 고분자를 개발하게 된 것이다.

자체 반응성을 가진 핵산의 장점 - 핵산고분자 응용의 새로운 패러다임 전개

Oxanine함유 핵산 고분자, 즉 자체 반응성을 가지는 핵산고분자는 생물공학적인 응용에 있어 지금까지 존재하지 않았던 다음의 여러 장점들을 가지고 있다.

첫째, Oxanine함유 자체 반응형 핵산고분자는 DCC나 EDC 같은 화학적 활성화 과정이나 반응 링커를 사용하지 않고 Amine기가 기능화된 표면 또는 파티클상에 공유결합형으로 고정화될 수 있다. 따라서, 화학적 활성화 과정에서 동반되던 화학적 변성 위험이나 소실이 적으며, 부반응물 등의 문제가 없기 때문에 보다 고순도의 공유 결합 반응 결과를 얻을 수 있다. [그림 5]는 Oxanine의 반응성을 일종의 링커로 활용하여 핵산 고분자형 프로브를 Amine 기능화된 칩 표면에 직접 부착결합시켜 유전자 분석에 응용한 예이다 [19].

둘째, Oxanine함유 자체 반응형 핵산고분자는 염기 조건 (pH 10.5까지)에서도 Amine기능기와 고효율의 공유 결합 반응이 가능하다. 일반적으로 EDC 처리로 얻게 되는 Carbodiimide-activated carboxy기와 Amine과의 공유결합 반응은 약산성 조건하에서 수행된다. 그 이유는 형성되는 중간체인 활성화 Carboxy기가 약간의 염기조건에서도 쉽게 가수분해되기 때문인데, 문제는 약산성 조건에서는 오히려 Amine의 구핵성(Nucleophilicity)이 저하되기 때문에 전체적으로 Amine과 활성화된 Carboxy

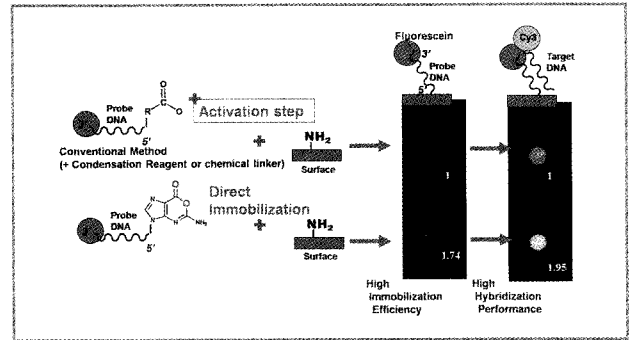


그림 5. Oxanine의 자체 반응성을 활용한 새로운 DNA 표면고정화 방식

간의 공유결합형성의 효율성이 떨어진다. 이와 다르게, Oxanine의 경우는 pH 10.5까지 Carbodiimide-activated carboxy기 형태가 염기환 내에 유지되기 때문에, 오히려 염기 조건에서 Amine과의 공유결합형성에 높은 수행능을 보인다. [그림 5]에서 보는 바와 같이 형광 물질을 이용하여 조사한 결과, 자체 반응형 핵산고분자 프로브의 경우 일반적인 화학적 고정화된 핵산 프로브보다 높은 표면 고정화율 (고정화된 핵산고분자에 수식된 Fluorescein 측정치) 그리고 고정 프로브의 목적 유전자 검출 능력 (목적 핵산고분자에 수식된 Cy3 측정치)에 높은 능력을 보임을 확인하였다.

셋째, Oxanine은 핵산 염기의 하나이기 때문에, 핵산 고분자내 반응성 도입 설계에 있어 위치적 제약에서 자유롭다. 앞서 그림 3에서 예시한 반응 기능기 Phosphoramidite단위체를 이용하여 Thiol기, Amine기, Carboxy기 등등을 핵산 고분자에 수식할 경우, 일반적으로 5' 말단에 도입되어 사용된다. 이에 반해 Oxanine은 핵산 단위체의 일부분인 염기 형태이기 때문에 염기 서열의 어느 위치에도 도입이 가능하다. [그림 6]은 Oxanine의 자유로운 반응 도입 설계를 활용하여 이중 프로브형 DNA칩을 구상한 예이다. 이중 프로브형 DNA칩의 경우, 이중 결합을 통한 거대 목적 유전자 검출, Triplex 결합을 이용한 목적 유전자 검출 등 새로운 검출 개념의 DNA칩 시스템 구성이 가능하다. 현재 이중 프로브형 DNA칩 설계연구를 수행 중에 있으며, 향후에는 나노파티클, Capillary 구조 등 다양한 응용 플랫폼에 적용하여 효율적인 유전자 검출 시스템을 개발할 예정이다.

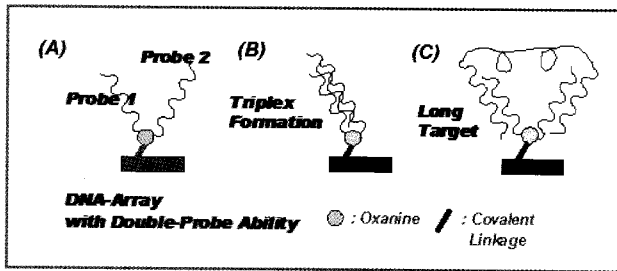


그림 6. 핵산 고분자의 반응점 설계를 이용한 이중 프로브형 DNA칩 설계

넷째, Oxanine은 Guanine과 유사한 구조를 가지고 있어 핵산고분자의 구조에 따른 기능성 변화 및 핵산 결합 단백질 간의 상호작용 해석과 같은 연구에 응용 가능하다. 현재 DNA와 관련한 생명과학 연구들의 경우, Guanine이 관여하는 여러 특이 구조들인 CpG 사이트, Z-DNA 구조, G-quadruplex 등이 유전병과 암 그리고 노화와 관련이 있기 때문에 최근 중요한 연구 대상이 되고 있다. 따라서, Oxanine은 Guanine을 대체해 사용할 경우, 중요한 구조적 정보들을 제공할 것으로 기대되고 있다. 무엇보다, Oxanine은 핵산결합 단백질과 특이 핵산서열과의 Major groove와 Minor groove 상호인식 과정에 있어 Guanine과 동일한 분자 상호작용 관계가 가능할 뿐만 아니라, 자체 반응성을 가지고 있어 분자간 상호작용의 결과 산물을 채취할 수 있는 중요한 미끼 분자(Bait molecule)로 응용이 가능하다. 현재, 핵산 단백질 상호작용기반의 Replication, Recombination, Repair를 비롯하여 각종 Regulation 기작등 생명현상을 지배하는 중요한 분자간 상호작용을 파악하는 중요한 분자 프로브로의 활용이 예상되고 있다.

핵산고분자를 이용한 인공 생명분자 설계 - 핵산 공학과 합성생물학의 만남

2003년 이후 Nature를 비롯한 여러 논문들에 합성 생물학이라는 새로운 개념의 연구 분야가 등장하여 최근 생명공학의 차세대 연구분야로 각광받고 있다 [20]. 아직까지는 생체 분자 고유의 기능성을 재배열하거나 재조합하는 방식의 범위를 벗어나지 못하고 있지만, 가까운 장래

에는 인공적으로 합성된 새로운 생명시스템을 구현할 날이 오리라 기대된다 [21]. 향후의 합성 생물학 분야의 성공은 어떻게 생명 정보 또는 생명 기능성을 인공적으로 합성 및 구성하느냐에 달려 있다. 현재 DNA를 화학적으로 합성 및 결합하여 실제 생체내 기능을 수행할 합성 유전체를 구축하고자 하는 연구가 진행되고 있다 [22]. 이것은 인공 생명 개발을 향한 중요한 첫 단계이며 이를 계기로 다양한 인공 생명분자 설계가 뒤따를 것이다. 따라서, 인공핵산분자 설계를 기반으로 하는 핵산공학 연구 기법은 합성생물학의 발전과 함께 새로운 전기를 맞이하는 시점에 있다. 지금까지 기본적인 유전정보성, 상보결합성을 바탕으로 다양한 기능성을 부가시킨 새로운 핵산 고분자가 인공적으로 합성되어 왔다. 물론 RNA기반의 생화학적 치료 방법 개발을 비롯하여 고 효율의 생명공학 및 나노바이오공학 시스템 개발에 핵심 재료로 응용되고 있지만 많은 사람들이 재료 이상의 의미를 두지 않는 등 그 중요성을 크게 인식하지 못하고 있었다. 하지만, 향후의 인공핵산분자 설계 연구는 새로운 생체 분자 기능성과 정밀한 분자 응용 시스템 개발을 선도함으로써 합성생물학 발전을 이끌 중요한 축이 될 것이다.

참고문헌

- (1) Brown, P. O. and Bostein, D. (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nature Genetics Supple. 21, 33 - 37.
- (2) Beaucage, S. L. (2001) Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications. Curr. Med. Chem. 8, 1213 - 1244.
- (3) Pirrung, M. C. (2002) How to make a DNA chip. Angew. Chem. Intl. Ed. 41, 1276-1289.
- (4) Nam, J-M, Thanxton, C. S., and Mirkin, C. A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitives of proteins (2003) Science 301, 1884 - 1889.

- (5) Michelson, A. M. and Todd, A.R. (1995) Nucleotide part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide -containing a 3':5'-internucleotide linkage. *J. Chem. Soc.* 2632 - 2638
- (6) Lestinger, R. L. and Mahadevan V. (1965) Oligonucleotide synthesis on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3526 - 3527.
- (7) Khorana, H. G.. (1979) Total synthesis of a gene. *Science* 203, 614 - 625.
- (8) Reese, C. B. (2002) The chemical synthesis of oligo- and polynucleotide: a personal commentary. *Tetrahedron* 58, 8893 - 8920.
- (9) Caruthers, M. H. (1985) Gene synthesis machines- DNA chemistry and its uses. *Science* 230, 281-285
- (10) Blackburn, G. M. Gait, M. J. Loakes, D. and Williams, D. M. (2006) *Nucleic Acid in Chemistry and Biology* (2nd ed), RSC Publishing, Cambridge, UK, pp143 - 166
- (11) Bloomfield, V. A., Crothers, D. M. and Tinoco, I. (2000) *Nucleic Acids: Structure, Properties, and Functions*, University Science Books, Sausalito, CA, pp46 - 49.
- (12) Gait, M.J. (Ed) (1984) *Oligonucleotide synthesis: a Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK.
- (13) Mullis, K. B., Ferre, F, and Gibbs, R. A. (1994) *The Polymerase Chain Reaction*, Springer Science, Berlin, Germany.
- (14) Herdewijn, P. (2005) *Methods in Molecular Biology* 288 - *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Human Press, Totowa, NJ.
- (15) Glen Research: www.glenresearch.com.
- (16) Pack, S. P., Nonogawa, M., Kodaki, T. and Makino, K. (2005) Chemical synthesis and thermodynamic characterization of oxanine-containing oligode-oxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 33, 5771 - 5780.
- (17) Staros, J. V., Wright, R. W. and Swingle, D. M. (1986) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal. Biochem.* 156, 220 - 222.
- (18) Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, CA. pp 169 - 186.
- (19) Pack, S. P., Kamisetty, N. K., Ohtani, K., Nonogawa, M., Yamada, K., Yoshida, Y., Kodaki, T., and Makino, K. (2007) Direct Immobilization of DNA oligomers onto the amine-functionalized glass surface for DNA microarray fabrication through activation-free reaction of oxanine. *Nucleic Acids Res.* 35, e110.
- (20) Benner, S. A. (2003) *Synthetic Biology: Act natural*. *Nature* 421, 118
- (21) Ferber, D. (2004) *Microbes made to order*. *Science* 303, 158-161.
- (22) Glass, J.I. Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M. R., Maruf, M. Hutchison III, C. A., Smith, H.O., and Venter, J. C. (2006) *Essential genes of a minimal bacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 425 - 430.