

유전자 표적화를 위한 단백질공학 연구동향: Homing Endonucleases and Zinc Finger Nucleases

정대은 · 김근중*

전남대학교 생물학과

Trends in Protein Engineering for Gene Targeting: Homing Endonucleases and Zinc Finger Nucleases

Dea-Eun Cheong and Geun-Joong Kim*

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract Monogenic diseases are resulted from modifications in a single gene of human cells. Because their treatment with pharmacological medicine have a temporary effect, continuous nursing care and retreatment are required. Gene therapy, gene targeting and induced pluripotent stem cell (iPSC) are considered permanent treatment methods of them. In gene therapy, however, retroviral vectors that have potential toxicity caused by random insertion of harmful virus are used as vehicles for transferring genetic materials. On the other hand, gene targeting could replace and remove the modified gene though homologous recombination (HR) induced by site-specific endonucleases. This short review provides a brief overview on the recently tailored endonucleases with high selectivity for HR.

Keywords: Gene targeting, homologous recombination, homing endonuclease, zinc finger nuclease

서 론

유전자의 돌연변이에 의해 발생하는 여러 가지 질병 중, 하나의 유전자 변형으로 나타나는 질환을 monogenic disease라 한다. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)에 2010년 1월 까지 축적된 자료에 의하면, 특정 유전자와 연결된 질병이 2500개 이상이 존재하며, cystic fibrosis, duchenne muscular dystrophy, fabry disease, huntington's disease 및 X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) 등과 같은 질병이 이에 속한다 [1]. 실제로는 하나의 변형된 유전자와 관련된 질환의 종류가 10,000종이 넘는다고 알려져 있다. 이러한 질병 중, 관련된 유전자가 특정 효소를 암호화하고 있는 경우, 효소치환 치료 (enzyme replacement therapy)의 적용이

일반적이나 대부분이 한시적인 치료법으로 일생 동안 반복적인 투여를 해야 하는 경우가 많다. 지난 20년 동안 이러한 monogenic disease의 치료 방법으로, 특정한 세포 및 조직에 치료 효과를 지닌 유전인자의 삽입을 위한 gene therapy [2], 변이가 유발된 유전자의 정상 유전자로의 영구적 치환을 위한 homologous recombination (HR) 기반의 gene targeting [3], 그리고 최근 이슈가 되는 iPSC (induced pluripotent stem cell) 기술에 많은 연구가 진행되고 있다.

앞서 언급한 여러 monogenic disease들 중 SCID의 경우, B 또는 T 림프구의 결함에 의해 발생한다. 특히 X-SCID (인터루킨 수용체의 subunit을 암호화 하는 ILR2G의 돌연변이)와 ADA-SCID (adenosine deaminase gene의 돌연변이) 경우, gene therapy 기법 적용을 위한 이상적인 monogenic disease model로서 retroviral vector를 이용한 성공적인 치료 사례가 존재한다 [4,5]. 그러나, retroviral vector의 random 또는 semi-random integration에 의해 target 유전자 주변 염기서열의 변화가 유발되면 gene silencing, endogenous gene의 파괴 및 up-/downstream 영역의 변화로 유전자의

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-3403, Fax: +82-62-530-3409

e-mail: gjkim@chonnam.ac.kr

transcriptional activation 등을 유도해 세포 독성을 유발할 수 있다. 실제로 불명확한 원인으로 인하여 유전자 치료를 받던 환자가 사망한 사례 또한 존재한다 [6]. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 non-viral vector나 non-integrative vector의 개발이 시도되고 있다.

Monogenic disease 치료를 위한 다른 대안으로, 최근에는 gene targeting을 활용하기 위한 시도가 진행되고 있다. Gene targeting 기술은 1990년대에 소개된 이후로, mouse 등의 여러 model animal의 제작에 활용되어 Mario Capecchi와 Oliver Smithies가 physiology and medicine 분야의 Nobel상을 수상 (2007년)해 그 가치를 인정받았다 [7,8]. Gene targeting 기술은 retroviral 또는 lentiviral vector를 활용하는 gene therapy와 달리, 유전자 copy number의 변화 없이 고유의 promoter에 의해 발현이 조절될 뿐 아니라 viral vector의 random integration에 의한 잠재적 위험을 피할 수 있는 장점을 지닌다. 그러나 본질적으로 자연적인 homologous recombination (HR)에 의한 재조합 비율이 매우 낮은 단점이 존재한다 [9].

최근 표적 유전자 또는 염기서열의 double strand break (DSB)에 의해 유도되는 HR을 이용하는 gene targeting 효율 증대를 위한 tailored 또는 artificial nucleases의 개발과 활용이 보고되고 있다. 이러한 효소의 backbone으로 homing endonucleases와 zinc finger nuclease가 활용되고 있으며, 근본적으로는 자연적인 제한효소와 같이 인식영역 (recognition domain)과 절단영역 (cleavage domain)을 지닌 효소들로 개발된다. 본 글에서는 monogenic disease 치료를 위한 gene targeting 기술에 적용하기 위해, 현재 연구되고 있는 artificial endonucleases에 대해 간략히 소개하고자 한다.

본 론

다양한 생리기작과 관련된 DNA의 구조와 정보가 알려지면서, 이를 효과적으로 제어할 수 있는 다양한 효소들이 분자 생물학 연구의 필수적인 인자들로 자리잡고 있다. 이러한 효소들 중, 외래 유전물질의 삽입을 제한한다는 의미로 명명된 제한효소는 전형적인 핵산분해효소 (DNase)와 달리 특정 서열을 인식하여 절단한다. 이미 여러 종류의 제한 효소가 다양한 생물에서 발굴되어 활용되고 있으나, 보다 다양한 서열 (예를 들면 자연적인 제한효소가 인식할 수 없는 서열)을 인식할 수 있는 효소의 필요성이 제기 되어, 새로운 서열을 인식할 수 있는 효소의 발굴이나 서열 특이성의 변화를 인위적으로 유도하려는 노력이 진행되고 있다. 이러한 효소의 대부분이 인식능과 절단능을 동시에 지니고 있고, 경우에 따라서는 이들 능력과 관련된 특정 부위의 선택적 절단과 다른 영역과의 융합이 가능해 많은 인공 제한 효소의 부품적 요소가 되고 있다.

분자 생물학 연구나 다양한 기법에 주로 활용되는 Type II 제한 효소 (Type II의 *FokI*, *BfiI* 및 *BmrI* 등과 같이 인식

영역과 절단 영역이 분리된 소수의 예를 제외)의 경우, gene targeting을 위하여 활용하거나 개량하기에 부적절하다. 주된 원인은, 인식 영역과 DNA 절단에 관계된 활성영역이 매우 인접해 있어 두 기능이 밀접한 상호작용을 하고 있기 때문이다. 따라서 기능성이 담보된 상태로 분리하기가 쉽지 않아 인공제한효소의 요소로 이용하는 사례는 많지 않다. 새로운 서열 특이성을 지닌 인공 제한효소의 제작과 관련되어 전형적인 제한효소의 분리와 재융합이 어려운 경우, 제한 효소가 아닌 MutH (Mismatch repair protein)를 이용하거나 [10], 제한 효소의 DNA-절단 활성을 불활성화해 SNase (Staphylococcal Nuclease) [11,12] 또는 *BmrI* 활성영역과 융합하는 방법을 통하여 절단위치가 다른 neoschizomer를 제작한 예가 있다 [13]. 이와 달리 최근 type IIB 제한 효소인 AolI, PpiI 및 TstI의 putative recognition domain의 swapping을 통하여 새로운 인식 서열을 갖는 제한효소를 제작한 예도 있다 [14].

비자연적인 인공 제한효소의 제작이 필요한 보다 근본적인 이유는 인식서열 길이에 있다. 일반적으로 활용되고 있는 Type II 제한효소의 대부분은 4 또는 6개까지의 특정 염기 서열을 인식하여 그 내/외부를 절단한다. 물론 *XcmI*의 경우와 같이, 인식서열 (CCANNNNNNNNNTGG)이 긴 경우도 있으나 고정된 서열은 단지 6개일 뿐이다. 6 bp의 특이 서열을 인식하는 제한 효소의 절단 부위는 4^6 (= 4096)당 한 번의 확률로 나타날 수 있다. 이 수치는 플라스미드 또는 평균적으로 1~2 kbp의 크기를 갖는 원핵생물의 유전자 조각이나 전형적인 클로닝 과정에 효과적으로 활용될 수 있음을 의미한다. 그러나 상대적으로 큰 유전 서열을 지닌 진핵세포 내부의 표적 유전자 또는 염기서열의 특정 위치를 절단하기 위해서는 긴 인식서열을 지닌, 즉 rare cutting이 가능한 endonuclease가 요구된다. 이를 위해서는 전형적인 미생물 유래 제한효소와 다른 backbone을 가진 nuclease가 필요하다.

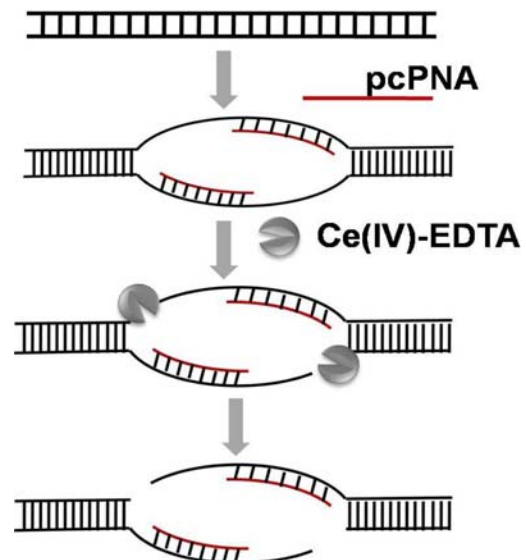


Fig. 1. Artificial cutter for site-selective hydrolysis of double-stranded DNA by chemistry-based ARCUT.

인위적인 DSB을 유도하기 위해 필요한 서열 특이성을 가진 artificial endonuclease의 제작에는 주로 homing endonuclease와 zinc finger의 서열 특이성과 *FokI* 활성 영역을 융합시킨 Zinc Finger Nuclease (ZFN)가 이용되고 있다. 이외에 긴 서열을 인식하여 절단할 수 있는 방법으로는 Fig. 1의 예에서와 같이, CeIV-EDTA complex와 PNA (peptide nucleic acids)를 사용하는 화학 기반의 artificial restriction DNA cutters (ARCUT)가 보고되었으나 *in vivo*에서의 활용이 제한적이다 [15]. 따라서, 전술한 두 가지 방법이 지닌 특성에 관해 좀 더 자세히 소개하겠다.

Homologous and non-homologous recombination

대사 과정 중 부산물로 나타나는 여러 활성 물질 또는 외부에서 유입되는 화학 물질, 자외선 등에 의해 여러 종류의 DNA 손상이 나타난다. 그 중 double strand breaks (DSBs)은 endonuclease, DNA excision repair, 항체 형성과 관련된 V(D)J recombination, meiotic recombination 및 transposition 과정 등에 의해 매우 빈번하게 발생하며, 수리되지 않는 경우에 tumorigenesis나 genomic rearrangement의 주된 원인이 된다. 따라서 생체에는 이를 수리하는 대표적인 기작으로 homologous recombination과 Non-homologous end joining (또는 illegitimate recombination) 시스템이 존재한다.

전자의 homologous recombination의 경우 double strand break repair (DSBR)와 synthesis-dependent strand annealing (SDSA)이 포함된다 (Fig. 2). DSBR과 SDSA 수리 과정의 첫 단계는, homologous sequence와 상호작용이 가능한 3' single-stranded DNA overhang을 만들기 위한 end resection이 진행된다. 그 후 DSBR의 경우, end resection에 의해 나타난 두 개의 3' overhang이 homologous sequence와 holiday junction을 형성한 후 DNA 합성과 접합 순으로 보수한다. SDSA의 경우, 이와는 다르게 annealing 및 치환 과정을 통해 homologous sequence와 결합한 후 gap-filling 및 접합을 통해 수선된다. 상기한 두 기작에서, 전자는 crossover와 non-crossover가 절반씩 나타나는 반면, 후자는 항상 non-crossover 형태로 DSB가 수선되는데 그 차이가 있다. DSBs 수리를 위한 또 다른 기작인 non-homologous end joining (NHEJ)의 경우에는, Ku70, Ku80와 DNA-PKcs 등의 단백질들이 DSBs 말단 부위와 결합하여, homologous recombination의 염기서열간 상보적인 결합을 대체한다. 즉 NHEJ의 경우 DNA 간의 상호작용이 아닌 단백질간의 상호작용으로 DSBs 말단 부위를 접합한다 (Fig 3). 따라서 DSBs의 구조에 따라 여러 종류의 기작이 포함된다. 특히 제한효소에 의해 절단되는 것과 같은 단순한 구조가 아닌 경우, 말단 부위에서 소량의 염기가 제거되는 단계가 포함되기도 한다. 이러한 기작은 서열 정보의 유실은 물론, 한 곳 이상의 DSB가 발생하는 경우 chromosome translocation 등을 유발해 유전체의 안전성을 낮출 수 있다 [16].

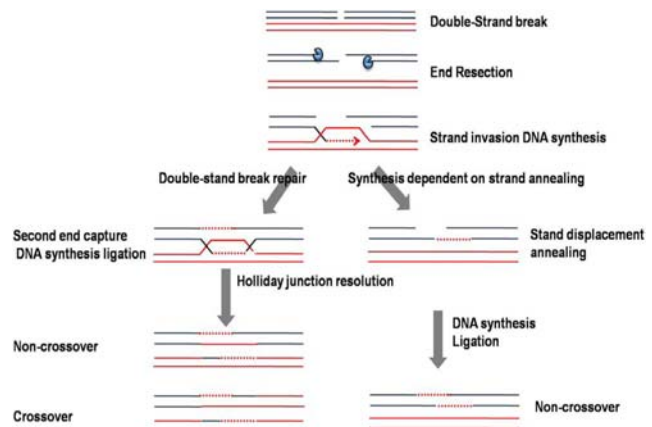


Fig. 2. Comparison of double strand break repair (DSBR) and synthesis-dependent strand annealing (SDSA) in homologous recombination for repairing double-strand breaks (DSB).

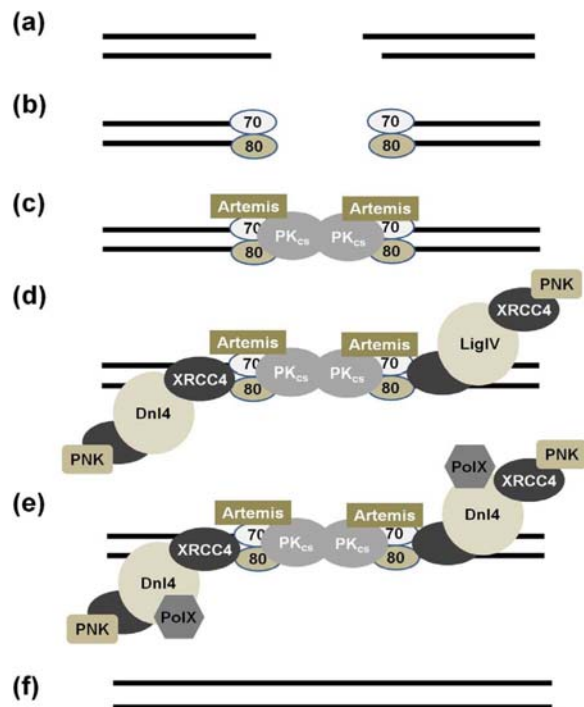


Fig. 3. Repair of DSBs by mammalian NHEJ. (a) DSBs result from breakage of the phosphodiester bonds of DNA by ionizing radiation and some chemicals etc. (b) Ku70 and Ku80 bound to free ends of DSB. (c) Thereafter, DNA protein kinase (PKcs) and Artemis were recruited. Subsequently, the phosphorylated Artemis was produced by PKcs. In this procedure, as homologous sequences in homologous recombination were annealed to complementary sequences, these complexes bridged between free ends of DSBs. (d) PKcs complexes recruited DNA ligase IV and XRCC4, and then, polynucleotide kinases (PNK) bound to resulting complexes. (e) DSBs were repaired by Gap-filling by X family DNA polymerase and sealing the nick by ligase IV. (f) Double-stranded breaks were restored.

Homing endonucleases

앞서 언급한 것과 같이 HR은 DSB 또는 다른 종류의 DNA 결손의 수리를 위한 매우 보존적인 DNA 복구 시스템이다. Endogenous 서열의 치환과 관련된 HR은 기본적으로 수 백 개의 상동 염기쌍을 요구하며, 말단부가 자유로운 DNA에 의해 활성이 유도된다. 이러한 HR의 특성은 1980년대 후반부터 효모에서부터 확인되었다. 다른 종류의 세포도 이러한 시스템을 지니지만, 형질전환이 일어난 세포에서 발생하는 HR의 비율이 높은 효모와 달리, 다른 경우에는 그 비율이 1~0.1%로 매우 낮은 것이 관찰되었다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 triplex forming oligonucleotides (TFOs), RNA-DNA oligonucleotides (RDOs) 및 short fragment homologous replacement (SFHR) 등과 같은 oligonucleotide를 활용하는 방법, site specific recombination [17]을 이용한 gene correction 방법과 site specific endonuclease를 활용한 gene targeting 기술이 개발되었다. 이들 중 site specific endonuclease를 활용하는 경우에는 앞서의 것들과 달리 완전한 gene insertion과 inactivation이 가능한 장점이 있어 다양한 분야에서 지속적으로 연구되고 있다.

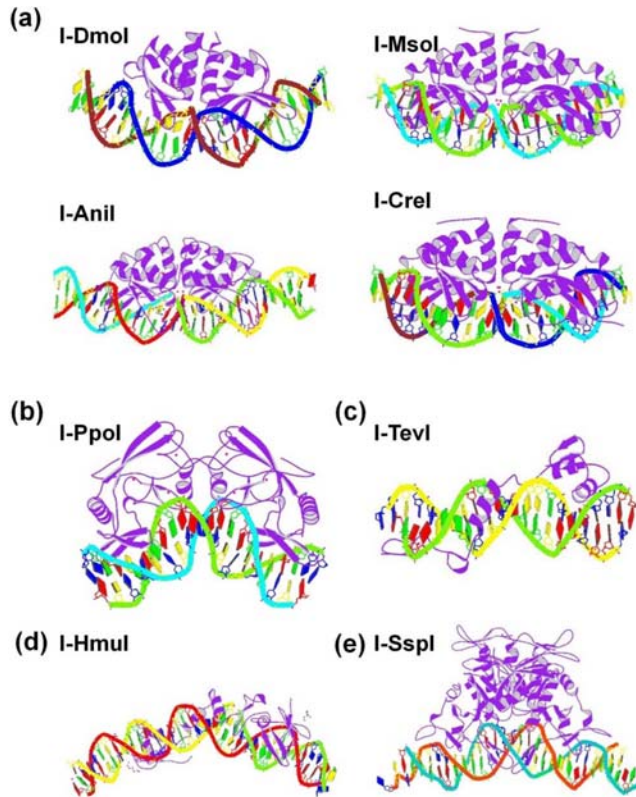


Fig. 4. Crystallographic structure of a typical homing endonuclease in each family. (a) LAGLIDADG family: monomeric I-Dmol and I-Anil, homodimeric I-Msol and I-Crel (b) homodimeric I-Ppol in His-Cys box family (c) I-TevI in GIY-YIG family (d) I-Hmul in HNH family (e) Tetrameric I-Sspl in PD-D/E-XK family.

Gene targeting을 위한 site-specific endonuclease는 앞서 설명한 6 bp를 인식하는 전형적인 제한 효소와 달리 12 bp ~40 bp의 긴 염기 서열을 인식/절단하는 meganuclease ($10^8 \sim 10^9$ 길이의 무작위 서열에서 하나 이하의 인식부위가 나타날 확률을 지님)로 알려져 있다. 대표적으로 homing endonuclease (HE)와 다음에 설명할 zinc finger nuclease가 있다. HE의 경우, 1970년대에 intron-encoded “homing endonuclease (HE)”로 소개 되었으며 eukaryote는 물론 archaea와 bacteria에서도 발견되고 있다. HE는 동물세포를 포함한 다른 종류의 세포에서도 double stranded DNA를 절단 하여 homologous recombination (HR) 또는 Non-homologous recombination (NHEJ)을 유도할 수 있는 특징을 지니고 있다 [18].

HR을 이용한 gene targeting에 필요한 DSB 유도가 가능한 HE는 conserved peptide motif에 따라 다른 활성 기작을 지니며 [19], 크게 LAGLIDADG, HNH, GIY-YIG, His-Cys box와 PD-(D/E)XK의 5개 family로 구분된다 (Fig. 4). 이중에 NHEJ 기작에 의해 나타날 수 있는 세포독성 없이 HR을 유도할 수 있는 single stranded nicking이 가능한 HNH 또는 GIY-YIG family 효소가 주목을 받고 있다 [20-21]. 하지만, 이들의 낮은 서열특이성은 세포독성을 유발할 수 있는 단점이 있다. 이와는 달리 PD-(D/E)XK family는 높은 서열특이성을 지닌 장점이 있으나 활성에 4차 구조 (tetrameric structure)가 필요해 개량을 위한 변이효소의 제작이 어렵다.

LAGLIDADG family는 언급한 HEs들 중 가장 잘 알려져 있으며, DNA와 결합하는 중심 부에 다른 HE가 갖지 않는 매우 보존적인 구조 ($\alpha\beta\alpha\beta\alpha$)를 보인다. 이 family에는 하나의 단백질에 두 개의 LAGLIDADG 아미노산 서열 motif를 갖는 비대칭 형태의 monomer와 subunit 당 하나의 LAGLIDADG motif를 지니며 palindromic 또는 pseudopalindromic 서열을 인식하는 homodimer 구조를 갖는 효소들도 있다. 이러한 점은 진화적 관점에서 monomeric HE에 다른 domain을 이식 (grafting) 하는 과정으로 변형이 가능함을 보여준다. His-Cys box family의 경우에는 다양한 금속 이온과 상호작용이 가능하나, octahedral geometry를 구성할 수 있는 금속 이온들을 선호하는 특징이 있다 [22]. 이들은 일반적인 제한효소와 달리 DNA 결합부위의 아미노산 잔기 모두가 수소결합에 참여하고 있지 않아 염기와 상호작용을 변화시키는데 유리하다. 결과적으로 양쪽의 family에 속하는 대부분의 효소들이 지닌 서열특이성과 상대적으로 단순한 구조적 특성으로 인해 gene targeting을 위한 도구로서 고려되고 있다. 실제로, 3차 구조를 기반으로 I-PopI [23]과 I-CreI [24]의 서열 특이성을 변화시킨 예가 존재한다.

이처럼 각 HE family의 특성을 기반으로 살펴본 서열 특이성의 조절 가능성은, gene targeting에 필요한 DSB 목표 서열이 매우 광범위 (질환이나 개인에 따른 편차)하기 때문에, 매우 중요한 요소가 된다. 현재도 많은 종류의 야생

형 HE가 발견되고 있으나, 위의 조건을 만족하기에는 불충분한 것으로 알려져 있다. 따라서 제한적인 서열 특이성을 지닌 야생형 HE를 활용해야 하는 경우에는 대상이 되는 genome에 인식서열을 삽입하는 추가적인 단계가 요구된다. 이러한 점은 번거로울 뿐만 아니라, 치료를 목적으로 하는 HE의 활용에 큰 제약이 된다. 진술한 문제점의 해결책으로 야생형 HE의 서열 특이성 변화를 위해 단백질 공학 기법이 폭 넓게 적용되고 있다. 이러한 과정에는, 3차 구조 또는 인식 서열이 포함된 3차 구조를 바탕으로 관련된 아미노산의 변화를 유도하는 ‘zonal’ 접근법을 통하여 원하는 돌연변이를 선별하는 합리적 접근법이 주로 활용되고 있다. 그러나 라이브러리의 크기 및 스크리닝 기술에 의해 실 적용의 범위가 제한 받는다. 예를 들어 염기 서열을 인식하는 아미노산의 수가 LAGLIDADG family (DNA와 상호 작용하는 core motif인 $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ 의 첫 번째 helix의 1차 서열이 family의 명칭)와 같이 최소 9개로 가정할 때, 산술적으로 1.2×10^{11} 개의 mutant가 필요하다. 현재의 기술로는 이론적인 coverage에 근접한 라이브러리의 제작이 가능하나, 선별전략이나 clonal independency의 문제로 제한적인 접근만이 허용된다. 따라서 *in silico* 분석 결과를 기반으로 돌연변이를 유도하는 semi-rational mutagenesis 법이 주로 활용된다. 이러한 작업을 통하여 선별된 variants가 지닌 특성과 아미노산 서열과의 상관관계를 분석해 추가적인 조율과정 (tuning)으로 목적하는 서열에 보다 적합한 변이체를 선별하고 있다 [25,26]. 따라서 HE 변이 유발에 필요한 합리적 설계 (rationale design)과정에 DNA 인식 및 절단 기작 유추에 필요한 자세한 생물리/화학적 정보가 요구된다. 이러한 이유로 인해, 다음에 언급할 zinc finger nuclease와 비교할 때 아직은 초기 개발 단계에 머물러 있다.

Zinc Finger Nucleases (ZFN)

자연적인 기능 (본질적으로 내부영역)을 이용할 수 있는 HE와는 다르게, 다른 인공제한효소의 제작에는 전형적으로 두 개의 functional domain이 요구된다. 하나는 DNA binding domain이며, 다른 영역은 DNA cleavage domain이다. 이러한 인위적인 구조체로 가장 널리 알려진 것이, zinc finger를 binding (or recognition) domain으로 이용하고 cleavage domain으로 TypeIIs 제한 효소 (대표적으로 *FokI*)의 활성영역을 이용하는 ZFN (zinc finger nuclease)이다. ZFN의 서열 특이성은 특정영역에 인식능이 있는 zinc finger에 의해 조절되기 때문에, 목적 서열에 특이적인 motif의 design이 매우 중요하다. Zinc finger motif는 보존된 Cys2His2 잔기를 지닌 약 20~30개의 아미노산으로 구성된 $\beta\alpha$ 구조를 보이며, 구조내의 α -helix가 DNA 인식기능을 수행한다. 따라서 helix를 구성하는 아미노산의 변화를 유도하는 경우, 3개의 염기로 구성된 DNA 인식 서열을 조절 (서열변화와 길이의 변화도 가능)할 수 있을 뿐만 아니라, tandem하게 융합하여 9개 혹은 그 이상의 염기로 구성된 DNA를 인식하도록

설계할 수 있다. 실제로 zinc finger의 구조에 대한 정보 없이 서열 특이성을 변화시킨 예가 존재한다 [27].

이러한 기본적인 사실에 근거해 ZFPs (Zinc finger proteins)의 설계 방법들이 소개되었다. 초기에 ZFPs의 제작에는 3개의 염기 서열을 인식하는 각각의 zinc finger를 3~4개 조합하여, 9~12 bp를 인식하도록 설계하는 modular assembly 방법이 활용되었다. 그러나 이러한 방법으로 제작된 zinc finger motif의 경우, 목적하는 서열을 인식하지 못하거나 특이성이 낮은 경우가 종종 발생하였다. 이는 tandem하게 융합된 각 motif 사이의 상호 작용이 염기서열 인식에 영향을 미쳤기 때문으로 확인되었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 융합되는 각 motif에 해당하는 염기 서열을 bait로, phage display를 반복적으로 수행해 목적하는 염기서열을 인식시키는 selection guided assembly법이 개발되었다 [28]. 최근에는 Sangamo Biosciences에서 개발해 상업화된 source [29,30] 또는 Zinc Finger Consortium [31-33]에 의해 개발된 “OPEN (oligomerized pool Engineering) source”를 토대로 설계되거나 제작되고 있다. OPEN은 3개의 염기를 인식할 수 있는 motif pool로 구성되어 있으며, GNN을 인식하는 16종과 TNN을 인식하는 16종의 motif pool이 제작되었다 [32].

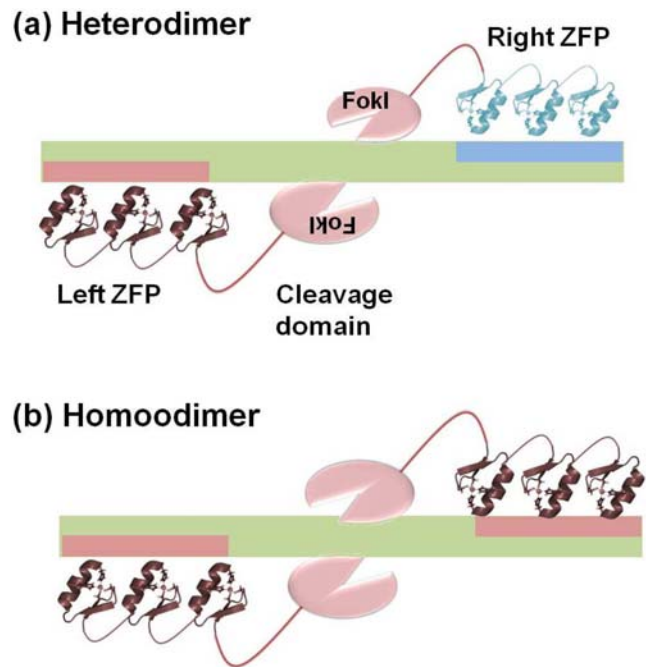


Fig. 5. Schematic representation of homo- and hetero dimeric zinc finger nucleases *in-vitro*.

활성영역으로 zinc finger에 융합되는 전형적인 예로써, *Flavobacterium okeanokoites*에서 유래한 *FokI*는 N-말단에 존재하는 DNA 인식영역과 C-말단의 절단영역이 linker에 의해 연결되어 non-palindromic 서열인 5'-GGATG-3'을 인식하는 전형적인 type II 제한 효소이다 [34]. 제한효소의

N-과 C-말단 영역이 독립적인 특징으로 인하여, zinc finger motif와 융합해 artificial nuclease의 제작에 용이하다. *FokI* 활성 영역에 하나의 catalytic center가 존재하기 때문에, 일반적인 Type II 제한효소와 같이 dimer 형태를 이룰 때 이중 DNA 가닥의 절단 효율이 증대된다. 따라서 원하는 부위의 완전한 절단을 위해서는 두 곳에서 인식서열에 결합하여야 한다 [35,36]. 이러한 특징으로 인해 다른 염기서열을 인식할 수 있는 각각의 zinc finger와 융합된 2종의 ZFN으로 더 긴 서열을 인식하게 이용할 수 있는 장점이 있다. 하지만 Fig. 5에서와 같이 hetero-dimer가 아닌 homo-dimer 형태로 작용하는 경우, 목적하지 않은 염기서열을 인식하여 절단할 수 있는 단점을 지니고 있다.

이러한 세포 독성을 줄이기 위해 방향적 인공 진화법 (directed evolution) 으로 hetero-dimerization 비율을 줄이거나 *FokI* 영역의 활성을 높인 예가 존재한다 [37,38]. 보다 근본적인 해결책으로, single peptide 내에 두 개의 *FokI* 활성영역을 삽입해 발현시킨 결과도 보고되었다 [39]. 아직 실제 응용까지는 많은 난제 (세포로의 도입과 발현, 특이성에 따른 side effect와 인공 제한효소 자체의 면역반응)들이 남아 있으나, embryo stem cell, induced pluripotent stem cell [30]등의 human cell 뿐만 아니라, plant [40]와 *Drosophila* [41-43], *C. elegans* [44]와 Zebra fish [45,46]등에 적용한 예가 있다. ZFN의 경우, 언급한 개략적인 추세를 포함한 최근 연구 동향은 참고문헌 (특히 몇몇 총설)에 자세히 언급되어 있다.

요 약

Monogenic disease의 치료를 위한 하나의 전략으로 viral vector를 이용한 gene therapy에 비해 독성이 적은 gene targeting 기술을 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구의 주된 관점은 자연적인 HR의 낮은 효율을 개선하기 위한 DSB 유도 방법으로, 선택성을 높일 수 있는 긴 염기서열의 인식이 가능한 artificial endonuclease의 개발이다. 본 글에서는 이러한 artificial endonuclease 중, 가장 많이 연구 되고 있는 homing endonuclease와 zinc finger nuclease를 간략히 소개하였다. 전자와 후자 모두, 인식 서열에 대한 일정 수준의 tolerance (인식 서열 일부가 특이적이지 않아 다른 염기로 구성된 경우)가 존재하여, 일정한 비율로 다른 target을 절단할 수 있는 가능성이 존재한다. 이러한 점은, meganucleases를 치료 목적으로 이용할 때 세포 독성을 나타내는 근본원인 중 하나이다. 두 중 모두 이러한 특성을 가짐에도 불구하고, 완전한 비자연적인 후자보다는 전자의 경우가 보다 효과적이며 낮은 세포독성을 보이는 것으로 보고되고 있다. 물론 실험 조건이나 적용되는 세포 종류, 인위적인 단백질의 발현 정도에 따라 세포 독성 유무 또는 정도에 차이가 나타남이 확인되고 있다. 이러한 사실들에 근거할 때, gene targeting을 유도하기 위한 artificial

endonuclease의 서열 특이성을 증대시키는 것이 가장 중요하다. 그 외 여러 인자들에 대한 복합적인 연구 역시 필요함을 보여준다. 현재까지 실제 치료제로 쓰인 예는 없지만, 시험 관내에서 보이는 결과와 모델 개체에서 이루어진 표적화 정도, 관련된 단백질 치료제들이 지닌 잠재성을 비교할 때 매우 큰 가능성을 지니고 있음은 충분히 확인할 수 있다.

감 사

본 연구는 교과부 지원의 한국 연구재단 사업 (M10866020003-08N6602-00311)과 2단계 BK21 사업의 지원으로 수행되었습니다.

접수 : 2010년 4월 21일, 게재승인 : 2010년 6월 19일

REFERENCES

1. Amberger, J., C. A. Bocchini, A. F. Scott, and A. Hamosh (2009) McKusick's Online Mendelian inheritance in man (OMIM(R)). *Nucl. Acids Res.* 37: D793-796.
2. O'Connor, T. P. and R. G. Crystal (2006) Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat. Rev. Genet.* 7: 261-276.
3. Capecchi, M. R. (1989) The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5: 70-76.
4. Aiuti, A., S. Slavin, M. Aker, F. Ficara, S. Deola, A. Mortellaro, S. Morecki, G. Andolfi, A. Tabucchi, F. Carlucci, E. Marinello, F. Cattaneo, S. Vai, P. Servida, R. Miniero, M. G. Roncarolo, and C. Bordignon (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science.* 296: 2410-2413.
5. Gaspar, H. B., K. L. Parsley, S. Howe, D. King, K. C. Gilmour, J. Sinclair, G. Brouns, M. Schmidt, C. Von Kalle, T. Barington, M. A. Jakobsen, H. O. Christensen, A. Al Ghonaium, H. N. White, J. L. Smith, R. J. Levinsky, R. R. Ali, C. Kinnon, and A. J. Thrasher (2004) Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet.* 364: 2181-2187.
6. Abbott, A. (2006) Questions linger about unexplained gene-therapy trial death. *Nat. Med.* 12: 597.
7. Capecchi, M. R. (2001) Generating mice with targeted mutations. *Nat. Med.* 7: 1086-1090.
8. Smithies, O. (2001) Forty years with homologous recombination. *Nat. Med.* 7: 1083-1086.
9. Sedivy, J. M. and A. Dutriaux (1999) Gene targeting

- and somatic cell genetics: a rebirth or a coming of age? *Trends Genet.* 15: 88-90.
10. Friedhoff, P. and A. Pingoud (2007) Engineering Site-specific Endonucleases. pp. 111-123 In: Arndt, K. M., and Kristian M. Müller (eds). *Protein Engineering Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
 11. Albert Cotton F., E. E. H., Jr., and Margaret J. Legg (1979) Staphylococcal nuclease: Proposed mechanism of action based on structure of enzyme-thymidine 3', 5'-bisphosphate-calcium ion complex at 1.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 2551-2555.
 12. Pei, D. and P. G. Schultz (1990) Site-specific cleavage of duplex DNA with a lambda. repressor-staphylococcal nuclease hybrid. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 4579-4580.
 13. Chan, S.-h., Y. Bao, E. Ciszak, S. Laget, and S.-y. Xu (2007) Catalytic domain of restriction endonuclease BmI as a cleavage module for engineering endonucleases with novel substrate specificities. *Nucl. Acids Res.* 35: 6238-6248.
 14. Jurėnaitė-Urbanavičienė, S., J. Šerkšnaitė, E. Kriukienė, J. Giedrienė, Č. Venclovas, and A. Lubys (2007) Generation of DNA cleavage specificities of type II restriction endonucleases by reassortment of target recognition domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 104: 10358-10363.
 15. Katada, H. and M. Komiyama (2009) Artificial restriction DNA cutters as new tools for gene manipulation. *Chembiochem.* 10: 1279-1288.
 16. Mimitou, E. P. and L. S. Symington (2009) Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* 34: 264-272.
 17. Coates, C. J., J. M. Kaminski, J. B. Summers, D. J. Segal, A. D. Miller, and A. F. Kolb (2005) Site-directed genome modification: derivatives of DNA-modifying enzymes as targeting tools. *Trends Biotechnol.* 23: 407-419.
 18. Choulika, A., A. Perrin, B. Dujon, and J. Nicolas (1995) Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1968-1973.
 19. Stoddard, B. L. (2005) Homing endonuclease structure and function. *Q. Rev. Biophys.* 38: 49-95.
 20. Lee, G. S., M. B. Neiditch, S. S. Salus, and D. B. Roth (2004) RAG proteins shepherd double-strand breaks to a specific pathway, suppressing error-prone repair, but RAG nicking initiates homologous recombination. *Cell.* 117: 171-184.
 21. McConnell Smith, A., R. Takeuchi, S. Pellenz, L. Davis, N. Maizels, R. J. Monnat, and B. L. Stoddard (2009) Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-AniI LAGLIDADG homing endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 106: 5099-5104.
 22. Flick, K. E., M. S. Jurica, R. J. Monnat, Jr., and B. L. Stoddard (1998) DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-PpoI. *Nature.* 394: 96-101.
 23. Eklund, J. L., U. Y. Ulge, J. Eastberg, and R. J. Monnat, Jr (2007) Altered target site specificity variants of the I-PpoI His-Cys box homing endonuclease. *Nucl. Acids Res.* 35: 5839-5850.
 24. Redondo, P., J. Prieto, I. G. Munoz, A. Alibes, F. Stricher, L. Serrano, J.-P. Cabaniols, F. Daboussi, S. Arnould, C. Perez, P. Duchateau, F. Paques, F. J. Blanco, and G. Montoya (2008) Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature.* 456: 107-111.
 25. Chica, R. A., N. Doucet, and J. N. Pelletier (2005) Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 378-384.
 26. Ashworth, J., J. J. Havranek, C. M. Duarte, D. Sussman, R. J. Monnat, B. L. Stoddard, and D. Baker (2006) Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity. *Nature.* 441: 656-659.
 27. Desjarlais, J. R. and J. M. Berg (1992) Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7345-7349.
 28. Greisman, H. A. and C. O. Pabo (1997) A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science.* 275: 657-661.
 29. Urov, F. D., J. C. Miller, Y.-L. Lee, C. M. Beausejour, J. M. Rock, S. Augustus, A. C. Jamieson, M. H. Porteus, P. D. Gregory, and M. C. Holmes (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 435: 646-651.
 30. Isalan, M., A. Klug, and Y. Choo (2001) A rapid, generally applicable method to engineer zinc fingers illustrated by targeting the HIV-1 promoter. *Nat Biotech.* 19: 656-660.
 31. Wright, D. A., S. Thibodeau-Beganny, J. D. Sander, R. J. Winfrey, A. S. Hirsh, M. Eichinger, F. Fu, M. H. Porteus, D. Dobbs, D. F. Voytas, and J. K. Joung (2006) Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly. *Nat. Protocols.* 1: 1637-1652.
 32. Maeder, M. L., S. Thibodeau-Beganny, A. Osiaik, D. A. Wright, R. M. Anthony, M. Eichinger, T. Jiang, J. E. Foley, R. J. Winfrey, J. A. Townsend, E. Unger-Wallace, J. D. Sander, F. Müller-Lerch, F. Fu, J. Pearlberg, C. Göbel, JustinDassie, S. M. Pruett-Miller, M. H. Porteus, D. C. Sgroi, A. J. Iafrate, D. Dobbs, P. B. McCray Jr, T. Cathomen, D. F. Voytas, and J. K. Joung (2008) Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol. Cell.* 31: 294-301.

33. Sander, J. D., P. Zaback, J. K. Joung, D. F. Voytas, and D. Dobbs (2007) Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucl. Acids Res.* 35: W599-605.
34. Wah, D. A., J. Bitinaite, I. Schildkraut, and A. K. Aggarwal (1998) Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 10564-10569.
35. Bitinaite, J., D. A. Wah, A. K. Aggarwal, and I. Schildkraut (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 10570-10575.
36. Vanamee, É. S., S. Santagata, and A. K. Aggarwal (2001) FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J. Mol. Biol.* 309: 69-78.
37. Guo, J., T. Gaj, and C. F. Barbas Iii (2010) Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J. Mol. Biol.* 400: 96-107.
38. Szczepek, M., V. Brondani, J. Buchel, L. Serrano, D. J. Segal, and T. Cathomen (2007) Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotech.* 25: 786-793.
39. Mino, T., Y. Aoyama, and T. Sera (2009) Efficient double-stranded DNA cleavage by artificial zinc-finger nucleases composed of one zinc-finger protein and a single-chain FokI dimer. *J. Biotechnol.* 140: 156-161.
40. Cai, C., Y. Doyon, W. Ainley, J. Miller, R. DeKelver, E. Moehle, J. Rock, Y.-L. Lee, R. Garrison, L. Schulenberg, R. Blue, A. Worden, L. Baker, F. Faraji, L. Zhang, M. Holmes, E. Rebar, T. Collingwood, B. Rubin-Wilson, P. Gregory, F. Urnov, and J. Petolino (2009) Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol. Biol.* 69: 699-709.
41. Beumer, K. J., J. K. Trautman, A. Bozas, J.-L. Liu, J. Rutter, J. G. Gall, and D. Carroll (2008) Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105: 19821-19826.
42. Bronson, S. K., E. G. Plaehn, K. D. Kluckman, J. R. Hagaman, N. Maeda, and O. Smithies (1996) Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9067-9072.
43. Bibikova, M., M. Golic, K. G. Golic, and D. Carroll (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics.* 161: 1169-1175.
44. Carroll, D., K. J. Beumer, J. J. Morton, A. Bozas, and J. K. Trautman (2008) Gene Targeting in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* With Zinc-Finger Nucleases. pp. 63-77. In: Davis, D. G, and Kevin J. Kayser (eds.). *Chromosomal Mutagenesis.* Humana Press, Totowa, New Jersey.
45. Foley, J. E., J.-R. J. Yeh, M. L. Maeder, D. Reyon, J. D. Sander, R. T. Peterson, and J. K. Joung (2009) Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool ENgineering (OPEN). *PLoS ONE.* 4: e4348.
46. Doyon, Y., J. M. McCammon, J. C. Miller, F. Faraji, C. Ngo, G. E. Katibah, R. Amora, T. D. Hocking, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnov, and S. L. Amacher (2008) Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotech.* 26: 702-708.