

맞춤형 식물 유전체 편집 기술을 활용한 고품질 식물체 육성

강 권 규
(kykang@hknu.ac.kr)
한경대학교 원예학과

정 유 진
(yuyu1216@hknu.ac.kr)
한경대학교 원예학과

Q: 맞춤형 식물 유전체 편집 기술이란?

A: 유전체(게놈)에서 특정한 유전자 염기서열 부분만을 대상으로 삭제, 교정, 삽입해서 편집하는 기술을 말합니다. 즉, 가위로 종이로 자르고 풀로 붙이며 연결하듯이 실제 식물의 유전정보물질인 DNA를 잘라내고 편집하는 기술입니다. 현재 식물유전공학분야에서 다루고 있는 유전자 재조합 기술은 매우 낮은 확률로 원하는 유전자 염기서열 부위를 잘라내고 또 역시 매우 낮은 확률로 원하는 유전자를 원하는 부위에 삽입할 수 있는데, 신기술인 유전자 편집기술은 매우 높은 정확도로 원하는 염기서열 부위를 인식해 삭제하는 기술로 주목을 받고 있습니다.

이 유전자 편집기술은 ZFN (Zinc Finger Nuclease)이라는 용어로 국제 학계에서 사용하고 있습니다. Nuclease는 핵산 (DNA)에 작용하는 효소 (단백질)인데, 단백질 구조가 손가락 (Finger) 모양으로 연결된 아연 (Zinc) 이온과 함께 생물 내 특정 유전자의

염기부위에 붙어 유전자가 작동하거나 작동하지 못하게 하는 스위치 구실을 수행하는 것입니다. ZFN은 현재 유전공학에서 널리 유용하게 쓰이고 있는 도구로서 제한효소 (Restriction Enzyme)와 같은 역할을 수행하는 현대 분자생물학 연구의 가장 중요한 도구 중 하나입니다.

Q: 생명공학에 이용되는 제한효소 (Restriction Enzyme)는 무엇인가?

A: 자식이 부모를 닮는 이유는 바로 DNA를 물려받기 때문입니다. 유전물질인 DNA의 이중나선 구조를 재단하면 식물에서 의약품을 비롯한 유용물질 생산이 가능하고, 인간의 유전자 치료도 가능하게 됩니다. 이러한 생명공학에 이용되는 여러 가지 유전자 재조합 기술 중 DNA와 RNA등의 핵산을 필요에 따라 자를 수 있는 것은 흔히 '생물학적 가위' 또는 '유전자 가위'라고 부르는 '제한효소

(Restriction Enzyme) 라는 독특한 효소 덕분입니다. 1978년에 스위스인 아버, 미국인 네이턴스와 햄스미스가 발견하여 노벨 생리의학상을 수상하였습니다. 이 효소는 DNA에서 특정 염기서열만을 인식하여 그 부위만을 가위처럼 자르는 특징을 가지고 있습니다. 제한효소의 발견 덕분에 인간의 DNA사슬을 포함하여 모든 생명체의 DNA에서 연구에 필요한 특정 부위만 잘라내는 일이 가능해졌습니다. DNA를 자른다는 것은 염기들이 서로 연결되어 있는 결합 (Phosphodiester 결합)을 끊어내는 것을 의미합니다. 제한효소는 원래 세균이 자신의 세포로 침입해 들어오는 바이러스와 같은 외부 DNA를 절단하기 위한 방어기전으로 작용하면서 자신을 보호해주는 역할을 맡고 있습니다 (바이러스는 세균보다 수십 배에서 수백 배 정도로 작다). 세균 자체도 물론 특정 제한효소에 의해 공격받을 수 있는 DNA 서열을 가지고 있기에 이것으로 문제가 일어날 것 같지만 자신의 DNA는 메틸레이션 (Methylation)이라고 하는 특수포장방법에 의해서 보호받게 되어 있습니다. 즉, 자신의 DNA는 절단부위의 염기 (Adenine, Cytosine)를 포함하여 자신의 제한효소가 스스로를 자를 수 없게 보호하고 있습니다. 어떻게 제한효소가 자신의 DNA인지 아닌지를 정확하게 판별해서 외부의 것만 잘라버리는지 참으로 놀라운 일이 아닐 수 없습니다.

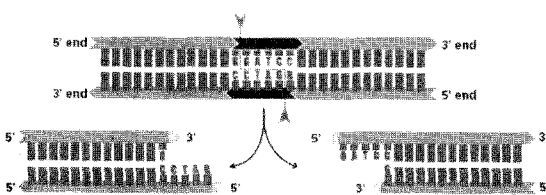
제한효소는 DNA 상에서 특정한 염기서열을 정확하게 찾아내어 절단합니다. 현재까지 수백 종의 제한효소가 알려졌는데, 이들 모두는 각기 다른 특정한

염기서열을 인식할 수 있습니다. 자른 부분을 이어주는 역할을 하는 접합효소 (Ligase)도 존재합니다. 이렇게 필요한 부분을 자르고 또 이어주는 유전자 재조합기술로 말미암아 당뇨병환자에게 새로운 생명의 길을 열어준 최초의 바이오 의약품인 인슐린을 박테리아로부터 대량 생산할 수 있게 되었습니다. 또 인간 성장 호르몬(HGH), 혈우병 환자를 치료하는 혈액응고인자 등 치료용 단백질, 백신, 항체 등 수많은 의약품을 개발할 수 있게 되어 치료 불가능했던 많은 질병으로부터 생명을 구할 수 있게 되었습니다.

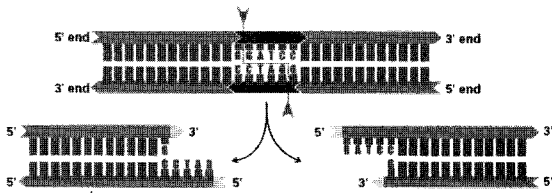
Q: 제한효소와 ZFN의 차이점은?

A: 제한효소는 시험관 (In Vitro)수준에서 DNA를 자르는데 쓰이는 반면에 ZFN은 생체 (In Vivo) 수준에서 DNA를 자르고 붙이는 기술입니다. 유전자 편집기술은 유전자 가위라고도 불리며, ZFN (Zinc Finger Nuclease)을 의미합니다. 즉, 인공제한효소 또는 맞춤형제한효소입니다. ZFN은 특정 염기서열에 결합하도록 맞춤형 제작한 Zinc Finger Protein에다 DNA를 절단하는 뉴클레아제를 연결해 만듭니다. ‘제한효소’는 널리 사용되고 있습니다만 유전자가위 (ZFN)은 이제 막 보급되고 있는 것으로 잘 알려져 있지는 않습니다.

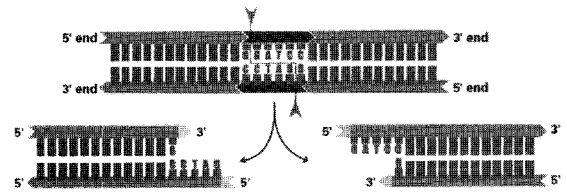
제한효소와 유전자가위 (ZFN)의 큰 차이점은, 인식하는 염기서열 길이의 차이에 있습니다. 제한효소는 보통 6개 염기쌍 (아데닌A-티민T, 구아닌G-시토신C)을 인식하여 절단하는 반면에 유전자 가위는 18~24개 염기쌍을 인식하기 때문에 완전히 다른 용도로 쓰입니다. 즉 제한효소는 시험관에서 DNA를 자르고 붙이는 DNA 재조합 기술 (또는 유전공학)의 핵심도구로서 1970년대 이후 생명공학 탄생의 결정적 도구였습니다.



제한효소는 DNA 상에서 특정한 염기서열을 정확하게 찾아내어 절단한다. BamHI이라는 제한효소의 경우, GGATCC이라는 특정부위를 인식해서 위의 그림과 같이 절단한다.



제한효소는 DNA 상에서 특정한 염기서열을 정확하게 찾아내어 절단한다. BamHI에 의한 제한효소의 경우, GGATCC이라는 특정부위를 인식해서 위의 그림과 같이 절단한다.



제한효소는 DNA 상에서 특정한 염기서열을 정확하게 찾아내어 절단한다. BamHI에 의한 제한효소의 경우, GGATCC이라는 특정부위를 인식해서 위의 그림과 같이 절단한다.

유전자 가위, zinc finger nuclease (ZFN)

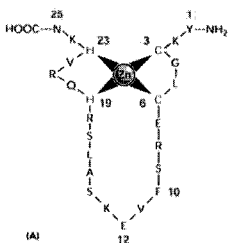
그러나 제한효소는 세포 또는 생명체의 유전자를 자르고 붙이는 데 사용할 수 없습니다. 너무 자주 DNA를 자르기 때문입니다. 제한효소를 인간 세포에서 발현시키면 염색체가 수만 조각이 나서 세포가 죽게 됩니다.

반면에 유전자가위 (ZFN)는 유전체에서 한 군데만 자르기 때문에 특이적인 조작이 가능합니다. 잘려진 유전자를 붙이는 일은 모든 세포내 내재하는 DNA 수선 기작에 의해 수행됩니다. 모든 생명체의 DNA는 환경적인 요인, 생물학적인 요인으로 수시로 그리고 무작위적으로 끊어집니다. 모든 세포는 끊어진 DNA를 이어 붙이는 시스템을 가지고 있습니다. 이를 이용해 원하는 염기서열을 집어 넣을 수도 있고 유전자를 녹아웃 (Knock-Out)할 수도 있습니다. 유전체 고쳐 쓰기를 할 수 있게 된 것입니다. 이를 유전공학에 대비하여 유전체공학이라고 합니다. 이 분야는 미국의 상가모 바이오사이언스 (Sangamo Biosciences, Inc.)와 연구자들의 모임인 징크 핑거

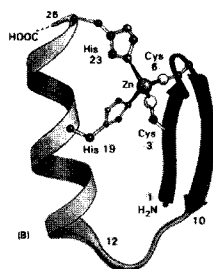
컨소시엄 (Zinc Finger Consortium) 그리고 서울대/(주)틀젠, 이렇게 3팀이 리드하고 있습니다. 유전자 가위 (ZFN)의 간편한 맞춤 제작이란, ZFN의 기본형 (FokI: Nuclease Domain)이 존재하고, 또 특정 유전자 염기서열에 반응하는 구조물이 간편하게 유전자 가위 (ZFN)에 모듈처럼 들어가는 방식을 취한 것이라고 할 수 있습니다.

Q: DNA를 절단할 위치는 어떤 원리로 인식하는 것인가?

A: 징크 핑거라는 단백질 (Zinc Finger Protein)과 DNA 염기서열 (A, T, G, C) 사이의 특이적 상호작용의 원리로 인식합니다. Zinc Finger Protein은 인간과 동물, 식물을 포함한 모든 진핵생물의 세포에 다수 존재하는 단백질로서 주로 특정 염기서열 DNA에 결합하여 유전자의 발현을 조절하는 전사인자



Zinc finger protein motif for DNA binding



DNA binding by zinc finger protein

(Transcription Factor)의 역할을 수행합니다.

앞서 말한 3팀의 ZFN 연구팀이 지난 10여 년간의 연구를 통해서 Zinc Finger Protein과 DNA 상호작용의 규칙을 파악했으며, 이를 바탕으로 어떠한 주어진 DNA 염기서열에 대해서도 이에 특이적으로 결합하는 새로운 DNA-Binding Protein을 만들 수 있게 되었습니다. 이를 이용해 인공전사인자 (Artificial Transcription Factor)를 만들어 특정 유전자의 발현을 촉진시킬 수도 있고 반대로 억제할 수도 있으며 특정 염기서열을 갖는 DNA를 절단하는 유전자가위(ZFN)를 만들어 세포 내에서 유전자 염기서열을 마음대로 편집할 수 있는 것입니다.

Q: 전사인자 (Transcription Factor)가 유전자 스위치 역할을 하는 것인가?

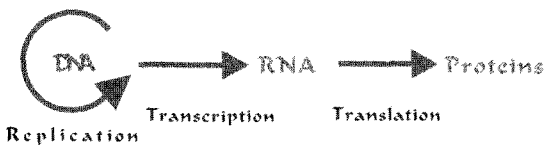
A: 모든 세포에 다수 존재하는 전사인자들은 특정 유전자로부터 단백질이 만들어지는 과정인 전사 과정을 촉진하거나 억제하는 “유전자 스위치”의 기능을 수행합니다. 전사인자들은 일반적으로 두 개의 서로 다른 역할을 하는 부분들로 구성되어 있습니다. 그 하나는 Zinc Finger와 같이 DNA를 특이적으로 인식하는 부분인 DNA결합 도메인이고 다른 하나는 여러 종류의 단백질들과 상호작용하여 전사를 촉진하거나 억제하는 기능을 담당하는 부분인

전사조절 도메인입니다. 이 두 부분은 조립식으로 구성되어 있어서 서로 다른 전사인자들로부터 유래하는 DNA결합 도메인과 전사조절 도메인을 연결해 인공적인 전사인자를 만들 수 있습니다. 자연계에 존재하는 전사인자들이 수 천, 수 만 개의 유전자들 가운데 특정한 유전자들에만 작용하는 이유는 바로 각각의 전사인자들이 서로 다른 DNA결합 도메인을 가지고 있기 때문입니다. DNA결합 도메인은 특정한 유전자의 염기서열을 인식하여 그 장소에 결합함으로써 전사인자가 그 유전자에만 작용하도록 유도합니다.

Q: ZFN(Zinc Finger Nuclease)을 이용한 생명공학 기술은?

A: 주어진 DNA 염기서열에 특이적으로 결합하는 Zinc Finger Protein 전사인자를 새롭게 만들고 이를 전사조절 도메인에 연결하여 조립식 맞춤형 전사인자를 만들어 원하는 유전자를 마음대로 조절하는 방법인 ZFN을 이용하면 각종 미생물, 동물, 식물 세포 내에 존재하는 수 많은 유전자들 가운데 원하는 유전자를 선택해서 임의대로 조절할 수 있습니다. 즉, DNA는 이중나선이기 때문에 이때 생성된 절단부위를 Double Strand Break(DSB)라고 하는데 모든 세포들은 DSB를 효과적으로 수선하는 내재적인 기능이 있습니다. 유전자의 교정이나 편집은 바로 이러한 내재적 수선 과정을 이용한 것입니다.

ZFN에 의해 유전체의 한 장소에 DSB가 생기면 세포가 이를 고치는 자발적인 과정에서 연구자가 원하는 변이를 일으킬 수 있습니다. 이 방법을 이용하면 세포 내에 존재하는 수만 개의 유전자 중 하나를 선택하여 일부를 망가트릴 수도 있고 반대로 고장 난 유전자를 고칠 수도 있는 것입니다. 예를 들어 질병을 초래하는 유전자에 돌연변이를 일으켜



DNA로 부터 단백질 합성과정

그 유전자에 의해 지정되는 단백질이 제대로 만들어지지 않게 할 수도 있고 기능을 모르는 유전자를 일부러 망가트린 후 그 효과를 관찰함으로써 그 유전자의 기능을 추정하는 유전학 연구수단으로 활용 할 수 있습니다. 또한 각종 가축, 작물의 특정 유전자 염기서열을 편집하여 형질이 개선된 개체를 만들어 고부가가치 품종을 육성할 수 있습니다.

Q: 실제로 ZFN(Zinc Finger Nuclease)을 이용한 연구성과가 있는지?

A: 김진수 서울대 교수(화학부) 연구팀은 ZFN 기술을 이용해 인간에서 에이즈 바이러스가 감염의 첫 단계로 세포 안으로 들어설 때에 그 관문이 되는 수용체인 인간 유전자 CCR5에 작동하는 ZFN을 만들어 CCR5를 제거 (Knock-Out)하는 방식으로 AIDS 치료체를 개발할 수 있다는 희망적 내용을 Genome Research에 2009, 2010년에 2편의 논문을 발표하였습니다. 30억 염기쌍 중에서 CCR5 유전자가 있는 자리를 정확히 찾아가 그 유전자 부위를 삭제함으로써 에이즈 감염 경로를 제거할 수 있었던 것입니다. 현재는 배양한 인간세포에서 실험에 성공한 것이니 앞으로 더 높은 단계의 효율성, 안전성 검증 실험이 이어질 것으로 보입니다.

식물에서 ZFN을 이용한 연구는 2011년 1월 24일 미국 PNAS(Proceedings of National Academy of Sciences)에 발표된 논문에서 Magdy Mahfouz 박사와 연구팀은 환경 스트레스에 견딜 수 있는 식물을 유전적으로 조작하여 사우디아라비아나 중동과 같이 물의 수량 및 품질이 제한적인 지역의 경우, 증가하는 인구의 영양학적 수요를 충족시킬 뿐만 아니라 일본과 같은 GM 제한적인 시장에 잉여 작물을 수출할 수 있는 길을 열어주는 스트레스 내성 작물을 키워서 그 성과를 볼 수 있을 것이라고 밝혔습니다.

또한 Shukla 등은 2009년 4월 29일자 Nature지 온라인판(AOP)에 “Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases” 라는 제목으로 옥수수의 IPK1 유전자를 변형시켜 이를 통해 제초제에 저항성을 가지면서 파이테이트(Phytate) 대사 (동물이 소화할 수 없는 옥수수의 화학물질)도 변형된 옥수수를 만들었다고 발표했습니다.

리뷰에 보면 ZFN 기술을 현재까지 인간 세포, 동물, 식물 포함해서 7개 생명체에 성공적으로 적용했다고 합니다. 궁극적으로 인간에게 유용한 모든 생명체에 적용될 것입니다.

Q: ZFN의 단점과 이를 극복한 앞으로의 전망?

A: 이 분야의 가장 큰 문제는 ZFN 제작의 어려움, 목표 지점 바깥의 돌연변이 제어 (Off-Target Mutation), ZFN 전달 기술 (Delivery) 등입니다. 첫 번째 문제는 앞서 발표된 국내 연구진의 논문과 외국 경쟁 그룹의 논문 발표를 통해 이제 해소되었다고 봐도 무방합니다. 목표 지점 바깥의 돌연변이 문제에 대해서도 곧 진전이 있을 겁니다. 가장 큰 난관은 이 방법이 작용하기 위해서 ZFN을 세포 안으로 전달하는 일입니다. ZFN을 단백질로 전달하지 않고 DNA 또는 RNA 형태로 전달하게 됩니다. DNA와 RNA는 세포에 따라서 잘 들어가는 경우도 있지만 아주 어려운 경우도 있습니다. Target DNA에 Binding 하여 염기서열을 제거하는 작업의 성공률이 23.24% 정도로 연구진들은 보고 있는데, 성공 여부는 세포내 돌연변이가 유도되느냐 여부로 판단이 됩니다. 그러므로 ZFN이 게놈 DNA에서 얼마만큼 특이적으로 Cleavage를 일으키는지에 대해 게놈 수준에서 더 많은 기초 연구가 필요합니다.

참고문헌

그리고 의학 분야의 응용이 가장 임팩트가 클 것으로 예상됩니다. 인간 유전자 염기서열을 고쳐서 질병을 치료한다는 개념은 기존 모든 치료 방법과는 구별되는 의학사의 신기원이 될 것으로 보고 있습니다. ZFN을 이용한 유전자 치료는 유전자 수술에 비유할 수 있습니다. Plastic Surgery는 인간의 외모를 바꾸는 것인데 유전자 가위는 유전체 DNA를 수술하는 것입니다. 현재 ZFN 기술이 가장 많이 보급된 분야는 유전학입니다. 연구자들이 자신이 연구하는 동물, 식물에서 ZFN을 이용해 특정 유전자를 망가트리거나 그 결과를 관찰함으로써 유전자의 기능을 연구하는 것입니다. 그 다음은 식물, 동물 생명공학입니다. 가축, 농작물, 어류의 유전자 개조가 가능합니다. 특히 ZFN을 이용해 만든 생명체는 GMO로 분류되지 않을 가능성이 있습니다. 왜냐하면 GMO는 외부 유전자를 도입하는데 비해 ZFN은 일시적으로 작용하고 사라지고 내부 유전자 염기서열이 변화하는 것이기 때문에 GMO가 아니라고 할 수 있습니다. 미래의 생명공학분야에서 ZFN 기술은 Gene Therapy (유전자 치료), Gene Regulation (유전자 조절), Gene Replacement (유전자 치환)에서 중요한 Platform 기술이 될 것입니다.

1. <http://gel.snu.ac.kr/>.
2. <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/abs/nature07845.html>.
3. <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/abs/nature07992.html>.
4. <http://www.zincfingers.org/>.
5. Townsend JA, et al. (2009) High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Nature 459: pp.442~445.