

2016 DECEMBER

vol.51

51

융합

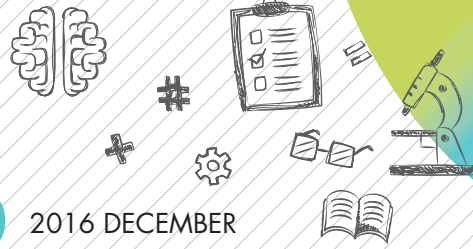
Weekly TIP

Technology • Industry • Policy

유전자 편집기술

안주명 | 융합연구정책센터





Technology

Industry

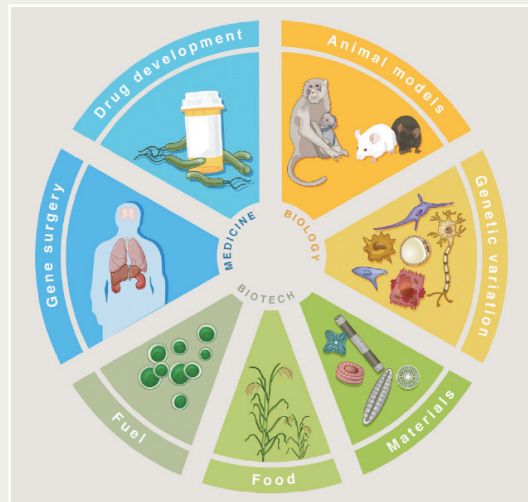
Policy

유전자 편집기술

안주명 | 융합연구정책센터

선정 배경

- 생명공학기술은 미생물을 이용한 유전자 재조합(Recombination)을 통한 형질전환을 기반으로 발전해 왔다고 해도 과언이 아닐 만큼 DNA의 변형 (Modification)이 모든 실험의 기초가 되었음
 - 1967년 DNA 접착제(Glue) 역할을 하는 DNA ligase¹⁾, 이후 1968년 대장균의 특정 DNA부분만 잘라내는 제한 효소(EcoR1²⁾)의 발견은 DNA 재조합을 가능케 하였으며, 이로써 생명공학의 새로운 지평을 열게 됨
- 최근 유전자 가위로 알려진 CRISPR-Cas9 시스템을 통한 DNA 변형기술은 유전자 조작이 아닌 편집이라 불리며 신의 영역에 도전한다고 일컬어짐



▲ 그림1. 유전자 편집기술의 응용분야

출처 : Cell (2014) 157(6) 1262-78

1) Gellert, M. (1967) Formation of covalent circles of lambda DNA by E. coli extracts. Proc. Natl Acad. Sci. USA 57, 148-155
2) Meselson, M. and R. Yuan (1968). DNA restriction enzyme from E. coli. Nature 217(5134): 1110

- CRISPR-Cas9 시스템을 통해 미생물뿐만 아니라 동물세포, 쥐, 초파리, 소, 돼지, 어류 등 거의 모든 생물의 유전체 정보를 마음대로 수정 가능함
- 이에 따라 동·식물 품종 개발을 통한 소재, 식품 및 연료생산 그리고 임상시험 및 질환 연구 등 그 응용범위가 무궁무진함

● 이에 CRISPR-Cas9 시스템을 중심으로한 유전자 편집기술에 대해 살펴보고자 함

유전자 편집기술



● **(개념)** 생물체에는 자발적 혹은 외부요소(ex. 자외선)에 의해 DNA 손상이 일어나고, 그 중 가장 치명적 손상인 DNA의 double-strand가 잘리게 되면(DSBs, Double-strand breaks) 이에 대응하는 복구(Repair) 기작이 2가지로 나뉨

- 인위적인 DSBs을 발생시켜 세포내 자연적인 복구기작을 이용하여 원하는 유전자를 붙이고 삭제하는 기능을 유전자 편집기술이라 함

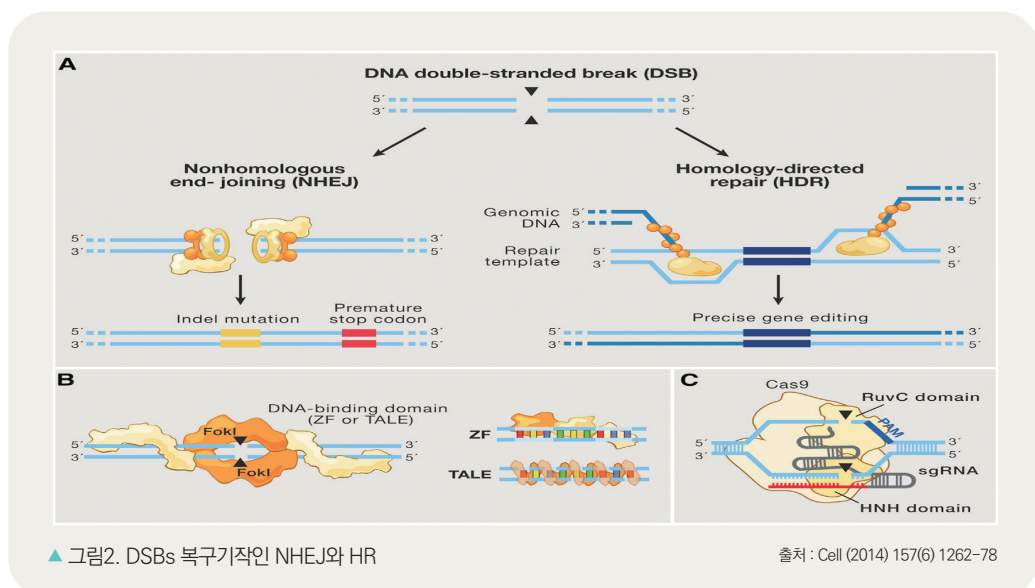
※ 유전자가위 자체를 유전자 편집 기술이라고 일컬음

(1) Non-Homologous End-Joining(NHEJ) : 에러를 수반하면서 DNA 절단 부분을 연결함

- 잘린 DNA 절단 부분에 몇 개의 염기서열을 더하거나 제거하는 삽입과 결실을 수반하는 세포내에서 자주 사용되는 교정 방법

(2) Homologous Recombination(HR) : 유사한 염기서열을 주형으로 이용하여 DNA를 에러 없이 정확하게 복구(그림 HDR, homology-directed repair)

- 보통 세포에서 1/106~1/107의 매우 낮은 효율로 일어나지만 유전자가위와 함께 자르고자 하는 부분과 유사한 염기서열을 가진 donor DNA를 함께 도입하면 원하는 부위에서의 HR효율을 최대 수십만 배 이상까지 유도



● (유전자 가위) 원하는 DNA 부분만을 잘라내는 도구



- 1세대 ZFNs(Zinc Finger Nucleases)

- 아프리카 발톱개구리(African clawed frog)에서 유래한 인공 DNA 효소
- 손가락과 유사한 구조를 이용하여 특정 DNA에 결합

※ ZFN Module 하나에 3bp*를 인식하여 DNA 특정부위 인식을 위해서는 3~5개의 ZFN module이 필요함

* base pair(염기쌍) : 핵산에 들어 있는 염기가 같은 핵산분자 혹은 다른 핵산분자 내의 염기와 특정한 조합으로 쌍을 형성하는 것

- Fok1* 제한 효소 사용

* 박테리아(Flavobacterium okeanoikoites)에서 유래한 효소로 5'-GGATG-3' site를 인지하며 DNA cleavage activity가 좋음

- 2세대 TALENs(Transcription activator-like effector nucleases)

- 식물성 병원체인 Xanthomonas에서 유래한 인공 DNA 효소
- TALE Module 1개가 1bp를 인식하여 Module을 DNA 맞춤형으로 정교하게 활용하기 용이하며, 보통 12~20bp 인식할수 있도록 Module을 연결하여 활용
- ZFN과 마찬가지로 Fok1 제한효소 사용

- 3세대 CRISPR-Cas9(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)시스템

- 화농연쇄상구균인 Streptococcus pyogenes 면역체계에서 유래
- CRISPR에는 Palindrome*과 특정 유전자인 spacer가 반복적으로 나열되어 있어 전사(transcription)를 통해 RNA를 생성하게 되고 이를 통해 Target DNA를 인식하고 Cas9 단백질(효소) 잘라냄

* Palindrome: 5'과 3' 어느 방향에서 읽어도 DNA 염기배열이 같은 구조

- 최근 Cas9과 같은 Blunt-end*가 아닌 sticky end*로 DNA을 잘라내어 더 효율적인 유전자 편집이 가능한 Cpf1 단백질이 발견되어 CRISPR시스템의 지속적인 발전이 예상됨

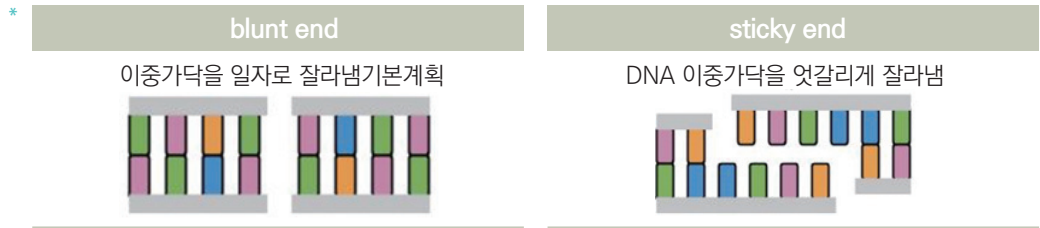


표1. 세대별 유전자가위의 특징

구 분	1세대 ZFNs	2세대 TALENs	3세대 CRISPR-Cas9
DNA 인식	징크 핑거 단백질	TALE 단백질	가이드 RNA
Nuclease (핵산가수분해 효소*)	Fok1	Fok1	Cas9/Cpf1
Nuclease activity	낮음(~24%)	높음(~99%)	높음(~90%)
변이생성 효율	대체로 낮음(~10%)	높음(~20%)	높음(~20%)
Non specific cleavage (원치않는 DNA 부분절단 가능성)	높음	낮음	다양함
장 점	-	설계가 쉽고 저렴함 (ZFNs 대비)	단순한 구조로 제작이 용이 정확성 및 효율성
단 점	설계가 어려움 가격이 비쌈	-	-

출처 : 바이오세이프티 Hot Topic vol.16, No.2 내용 재구성

* 핵산가수분해효소 : 핵산이나 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 사이를 연결하는 포스포디에스테르결합을 절단하는 효소

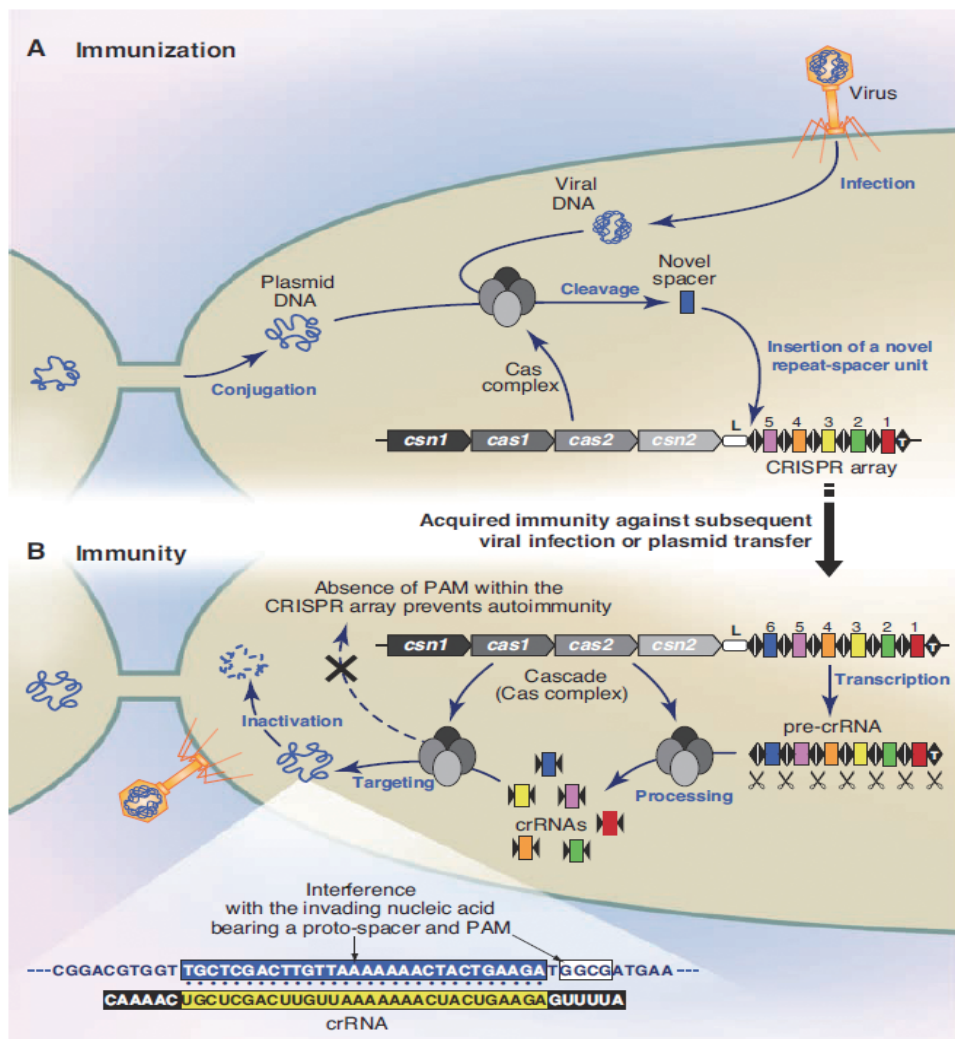
표2. 유전자 편집기술 활용

구 분	내 용	개념도
유전자 녹아웃 (Gene Knockout)	유전자 본래의 기능을 연구하기 위해 활용하는 방법으로 원하는 유전자만을 골라서 기능을 망가뜨려 단백질을 생산하지 못하게 하는 것	
유전자 삽입 (Gene Insertion)	유전자 발현을 살펴보기 위한 reporter system(ex. 형광단백질)을 삽입하거나 바이러스 vector를 사용하여 특정 유전자 삽입하기도 하였으나, 유전자편집기술을 통해 쉽게 정확한 위치에 삽입이 가능하게 되었음	
국소부위 유전자 교정 (Gene correction & point mutagenesis)	겸상적혈구 빈혈증과 같은 질병은 특정 유전자의 단 1개의 DNA 서열에 변이가 일어나 발생하여, 그 기능 및 치료를 위한 도구로 변이를 특이적으로 유도	

구분	내용	개념도
염색체 재배열 및 구조변이 (chromosome rearrangement and structural variation)	<ul style="list-style-type: none"> 염색체의 구조 변이의 종류에는 특정 염색체의 긴 부분이 없어진 결실(deletion), 특정부위가 반복되어 나타나는 중복(duplication), 그리고 염기서열이 뒤집어져서 읽히는 역위(inversion) 및 서로 다른 염색체(chromosome)간의 접합이 일어나는 염색체 재배열(전좌)이 있음 이는 질병에 따른 염색체구조가 정상인과 차이를 설명가능하여 질병모델연구에 활용 	

그림출처 : 바이오세이프티 Hot Topic vol.16, No.2

박테리아 면역시스템 CRISPR-Cas



< 박테리아 CRISPR/Cas 면역 메커니즘 >

< 뒷면 계속 >

- (A) 박테리아는 Cas complex*에 의해 침입한 바이러스의 DNA를 인식하여 그 DNA 일부 (Novel spacer)를 자신의 유전체인 CRISPR array에 새롭게 삽입시켜 둠
- (B) 전에 침입했던 바이러스가 다시 침입할 때에 DNA 전사를 통해 pre-crRNA를 생성하고 이는 Cas complex에서 mature crRNA를 생성하여 이는 다시 Cas complex에서 침입한 바이러스 DNA를 찾는 guide RNA 역할을 하며 침입한 DNA만을 찾아 절단하게 됨

* Target 유전자를 분해하는 Type I(Cas3), II(Cas9), III(Csm) 과정에서 각각의 다른 Cas complex protein들이 사용됨(Cell (2014) 157(6) 1262-78)

출처 : Science 327 (5962), 167-170

해외 동향

- 2013년에 등장한 크리스퍼(CRISPR-Cas9) 유전자 가위기술은 기초연구에서 동·식물의 품종 개발, 임상시험 및 질환 연구 등으로 응용범위 확대됨

- (이종이식) 미국 하버드대 연구팀은 유전자 가위기술을 이용하여 인간 이식에 부적합한 유전자를 돼지 세포주에서 제거하는 데에 성공(Science지, 2015)

※ 돼지의 장기를 인간에게 이식하는 이종(異種) 이식이 가능해 질 것으로 전망

- (동·식물 개량) 말라리아 저항성 모기(2015) 및 유전자 가위기술을 활용하여 작물과 가축의 생산량 증대 등 동·식물의 개량 연구 활발

※ 돼지의 근육량 증가(2015), 피부색을 바꾼 개구리(2015), 일반 양식의 두 배 속도로 성장하는 복어 생산(2016), 수분 과정이 필요 없는 토마토 개발(2016) 등



- (치료제 개발) 미국 국립보건원(NIH)은 CRISPR-Cas9 기술을 이용한 차세대 세포치료제(CAR-T)*의 임상시험 승인(2016. 6)

* 카트(Chimeric Antigen Receptor T cell, CAR-T)는 암세포를 파괴하는 면역세포치료제로, CRISPR 기술을 통해 개량된 카트 (CAR-T) 치료제는 보다 정확하게 표적 암세포를 탐지하고 강력한 살상능력을 가질 것으로 기대

※ CRISPR 기술이 인간을 대상으로 임상시험을 승인 받은 것은 이번이 처음으로, 크리스퍼 3세대 유전자 가위기술의 치료제 시장 진입 가능성이 높아짐

- (플랫폼기술 개발) 일본 고베대 연구팀은 세포사멸을 방지해 유전자를 효율적으로 조작할 수 있는 새로운 유전자 편집기술 개발(Science지, 2016.8)

※ 기존 유전자 편집기술의 단점(세포사멸 등)을 보완한 기술로 선천성 난치질환 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대

● 2015년 4월 중국 중산대학이 세계 최초로 인간 배아의 유전체를 편집했다고 밝힌 이후, 인간 배아의 유전체 편집에 대한 안전성·윤리성 논란이 지속 되고 있으나 영국, 일본, 스웨덴은 기초연구를 허용

- 스웨덴, 카롤린스카대 연구팀은 맞춤형 아기를 출생시킬 수도 있는 완전 인간 배아를 이용한 유전자 편집 실험*에 착수(2016.9)

* 크리스퍼 유전자가위를 이용하여 완전 인간배아 세포에서 유전자 일부를 제거한 뒤 배아가 태아로 분화하는 과정을 살피는 과정을 통해 인간 유전자의 역할을 분석할 예정(이 실험에는 기증받은 냉동 배아 10여개가 사용), 스웨덴 정부는 14일 이내에 한 해 배아를 키운다는 조건 아래 이번 유전자 편집 실험을 허가

※ 스웨덴에서 인간배아의 유전자 편집 실험이 이뤄진 것은 처음으로 지금까지는 도덕적·윤리적 문제로 금기시 되었으나, 태아의 발생과정을 이해하게 되면 파킨슨병과 당뇨 등 난치병과 불임 등의 치료법 개발에 도움이 될 것이라 기대

출처 : 생명공학정책센터 BiolNwatch 16-79

국내 현황



● 서울대, 한양대 연구팀은 크리스퍼(CRISPR-Cas9) 유전자 가위 기술의 화학적 원리를 분자 수준에서 밝혀내는 데 성공(2016.11)

- RNA와 DNA가 결합하기까지 '열린 구조', '닫힌 구조'의 두 가지 형태를 거쳐 활성화된다는 사실을 규명

※ 연구결과는 Nature Communications지에 'Structural roles of guide RNAs in the nuclease activity of Cas9 endonuclease'라는 제목으로 발표(2016.11.2)

● 서울아산병원 연구팀은 새로운 유전자 가위인 'CRISPR-Cpf1'을 이용해 생쥐 유전자 편집을 최초로 성공(2016.6)

- 최근 발견된 4세대 유전자 가위인 Cpf1*을 이용하여 생쥐에서의 유전자 적중에 활용될 수 있는지를 최초로 증명

* 크리스퍼 Cpf1은 Cas9에 비해 비표적 위치에서 작동할 확률이 낮아 정확성이 높음

※ 연구결과는 Nature Biotechnology지에 'Generation of Knockout Mice by Cpf1-mediated Gene Targeting'라는 제목으로 발표(2016.6)

● 툴젠은 1세대에서 3세대에 이르는 전 세대의 유전자 가위를 모두 독자 개발한 기술경쟁력을 보유한 회사로 평가

- 최근 시그마 알드리치와 크리스퍼 유전자가위 사용 실시권에 대한 계약 체결하였고, 삼성사는 툴젠의 유전자 가위기술 개발에 참여 의사를 밝힘

※ 이재현 CJ 회장 등 범삼성(家)의 유전병 '샤르코-마리-투스(CMT)' 치료제 개발로 삼성병원에 이어 CJ 합류 추진. CJ헬스케어가 최근 돌진의 CMT 치료제 인간 임상* 과정에 참여하고 싶다는 의사를 밝힘

* '샤르코-마리-투스(CMT)병' 치료제 개발, 복지부 국책 과제 선정(2016.5)

출처 : 생명공학정책센터 BiolNwatch 16-79

시사점



- 제3세대 유전자가위기술은 새로운 응용을 통해 의약, 농업, 화학, 에너지 등 광범위한 산업에 영향을 미칠 것으로 전망되나 윤리적 관점의 논쟁이 진행 중

이슈	주요내용
유전자 오염 (Genetic pollution)	바람, 공기, 곤충 등 다양한 오염원에 의해 non-GE(genetically edited) 작물의 DNA 오염 가능
생물다양성 훼손 (Bio-invasion)	GE(genetically edited) 동물과 식물이 야생종을 위협
윤리적 위험 (Ethical hazards)	인공적으로 제작된 생명체에 대한 존엄성 저하 및 제조자에 의한 학대 우려
사회경제적 위험 (Socioeconomical hazards)	유전자 편집에 의해 생산된 식량 생산이 증가함에 따라 전통적 농업 방식 위협
종교적 반대 (Religious objections)	많은 종교단체에서는 GMO*와 유전자 편집기술을 반대하고 있으며, 대체장기 생산을 위해 유전자 편집 돼지 등 동물을 인간 생명 연장을 위한 도구로 이용하는 것을 반대

출처 : BioIndustry, 글로벌 CRISPR 시장 현황 및 전망(2016.08)

* GMO(Genetically Modified Organism) 유전자 변형 작물

- 특히, 식물자원의 경우 3세대 유전자가위인 CRISPR 시스템을 활용하게 되면 GMO에서 가장 중요하게 생각하는 외부 유전자의 유입 없이 교정이 가능하여 GM작물 분류 논란자체가 소모적일 것으로 예상됨
- 또한, 기존의 기술로는 치료할 수 없던 암, 에이즈, 및 희귀병 치료방법으로 활용될 수 있으나, 유전자의 정확한 제거 효율 또한 중요한 과제로 남아있음
- 우리나라의 경우 유전자편집기술에 기초과학분야에서는 선두수준을 유지하고 있으나, 임상치료제 개발 부분은 해외에 비해 뒤쳐져 있어 산·학·연·관 유기적 협력을 통한 발전이 필요
 - 세계적으로 아직 초기단계인 유전자 치료제 개발에 힘쓰게 되면 새로운 치료기술 선도가 가능할 것으로 기대됨

참고자료



1. 융합연구정책센터, 융합연구리뷰 Vol.2 No. 1(2016.01)
2. Hsu, Patrick D., Eric S. Lander, and Feng Zhang. "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering." *Cell* 157.6 (2014): 1262-1278.
3. Horvath, Philippe, and Rodolphe Barrangou. "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea." *Science* 327.5962 (2010): 167-170.
4. 바이오세이프티, Hot Topic Gene Editing, Vol.16, No.2
5. 생명공학정책센터, BioINwatch, 유전자 편집기술의 최근 R&D 동향, 2016. 11. 15
6. 생명공학정책센터, BioIndustry, 글로벌 CRISPR 시장 현황 및 전망 2016. 08
7. '유전자, 조작에서 편집하는 시대로' *Science Times* 2014.09.23.