

유전자치료에서 히스톤이 매개하는 세포감염의 연구와 리용

김 일 석

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《진단과 치료방법을 개선하는데서 중요한것은 여러가지 선진방법을 널리 받아들이는것입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 76페이지)

사람들의 생명과 건강을 더 잘 보호증진시키자면 진단과 치료방법을 끊임없이 개선하여야 하며 그러자면 여러가지 선진적인 진단과 치료방법을 널리 받아들여야 한다.

유전자치료는 새로운 선진적인 치료방법으로서 유전병치료의 전도유망한 방법으로 인정되어왔다. 하지만 목적하는 유전자를 세포에 어떻게 넣겠는가, 유전자나르개로 무엇을 쓸것인가 하는것이 중요한 문제로 나선다.

세포감염(transfection)은 비루스의 핵산(DNA 또는 RNA)이나 플라스미드DNA 등을 세포에 감염시키는것으로서 지난 시기 재조합DNA실험에 널리 리용되였는데 오늘날에는 유전자치료에서 목적하는 유전자를 세포에 넣는 방식으로 크게 주목되고있다. 한편 히스톤(histone)은 진핵세포의 핵안에서 DNA와 복합체를 형성하는 염기성단백질로서 DNA와 효율적으로 결합할수 있고 세포질에 직접 들어가 핵안에 머물러있기에 알맞는 구조물인것으로 하여 비비루스성유전자송달의 효과적인 나르개로 주목되였다. 유전자공학의 급속한 발전으로 히스톤분자에 기초한 다기능융합단백질을 손쉽게 구축할수 있게 됨으로써 세포감염효율은 부단히 개선되고있다. 놀랍게도 히스톤은 이미 연구된 비비루스성유전자나르개인 양이온성중합체와의 협동작용으로 유전자의 세포감염을 실현함으로써 감염효율을 현저히 높인다는것이 증명되였다.

론문에서는 히스톤이나 히스톤에 기초한 융합단백질이 매개하는 세포감염의 최신연구성과와 앞으로의 전망에 대하여 론의하였다.

1. 유전자치료와 유전자나르개

유전병(genetic disease)은 유전자의 변이에 의하여 생기는 병으로서 그 수는 하나의 유전자에 한가지씩 있다고 하여도 헤아릴수 없이 많다. 현재까지 3천가지이상의 사람 유전병이 알려졌는데 대표적으로 낭포성섬유증, 근디스트로피, 낫모양적혈구빈혈증, 파브리병, 고체병, 용혈성노독성증후군, 유전성혈관부종, 후플레르증후군(Hurler syndrome), 니만-피크병, 뽕배병, 조로증, 저포스파타제혈증 등을 들수 있다. 이 모든 질병은 서로 다른 유전자의 손상으로부터 생긴다.[1] 많은 경우 사람들속에서 드물게 나타나기때문에 효과적인 치료법을 개발하기가 힘들었다.[2]

유전자치료(gene therapy)란 병적인 유전자에 의하여 장애된 세포에 비정상유전자에 대응하는 정상유전자를 도입하여 형질을 발현시킴으로써 결핍되였거나 낮아진 세포의 기능을 보충수정하는 치료방법을 말한다. 유전자치료에는 두가지 방법이 있는데 한가지는 생식세포수준에서의 유전자치료이고 다른 하나는 체세포수준에서의 유전자치료이다. 변이

세포의 계놈에 정상DNA를 도입하는 방법에는 ① 변이유전자를 자르고 그것을 정상 유전자로 바꾸는 방법, ② 변이유전자를 정상상태로 돌려세우는 방법, ③ 정상유전자를 변이세포에 도입하는 방법이 있다. 마지막방법이 사람에게 가장 많이 적용되었다.

사람을 대상으로 한 유전자치료의 첫 실험은 1990년 9월에 진행되었다.[3] 그후 1995년 8월부터 1997년 3월까지 말초혈액T세포를 과격으로 하고 레트로바이러스운반체를 리용하는 림상에서의 유전자치료가 당시 4살난 아데노신데아미나제(ADA)결손증환자(중증복합성면역 부전증환자)에게 적용되었다. 이 기간에 유전자도입조작은 4~6주일 간격으로 11번 진행되었으며 유전자도입조작후 환자에게 심어준 세포수는 850억개였다. 그후 많은 시간이 경과하였으나 유전자도입세포는 몸안에 계속 있었으며 치료효과는 계속 나타났다.[4]

지난 30년동안 유전자치료는 광범히 연구[5]되었으며 각이한 유전병치료의 전도유망한 방법으로 인정되어왔다.[6, 7] 유전자치료연구에서 최대의 관심사의 하나는 효율이 높고 안전한 유전자나르개(gene carrier)를 개발하는것이다. 현재 리용되고있는 유전자나르개들은 크게 비루스성나르개(viral carrier)와 비비루스성나르개(non-viral carrier)로 구분할수 있다.

비루스성나르개들가운데서 아데노비루스, 레트로비루스, 아데노관련비루스가 세포감염 효율이 높은것으로 하여 널리 리용되었다.[8] 비록 비루스성나르개가 유전자치료의 연구와 응용에 크게 기여하였지만 유전자포장능력의 한계점, 안전성문제(암발생과 면역원성), 대규모제약생산문제 등의 원인으로 여전히 심각한 우려를 자아내고있다.[9-11] 반면에 비비루스성나르개들은 이러한 문제 특히 안전성문제에 대하여 크게 우려할 필요가 없다는 것이 증명되었다.[12, 13]

한편 기초연구과정에 유전자치료를 위한 리상적인 유전자나르개는 세포밖과 세포안의 여러가지 장벽들을 극복할수 있도록 구축되어야 한다는것이 밝혀졌다. 이러한 장벽들을 극복하기 위하여 리상적인 유전자나르개는 ① 핵산을 응축시켜 나노크기의 안정한 립자속에 넣을수 있어야 하며 ② 특정한 세포에 찾아가 흡수되어야 하며 ③ 세포안에서의 분해를 막기 위하여 엔도솜-리조솜에서 탈출해야 하며 ④ 치료용DNA를 핵안에 넣을수 있어야 한다.

지금까지 양이온성의 리포솜이나 중합체들을 비롯한 여러가지 비비루스성나르개들이 성과적으로 개발되었는데 그중의 일부는 림상시험이 허가되었다.[14, 15] 이러한 다가 양이온들외에 단백질 또는 펩티드(이하 단백질/펩티드라고 함.)가 매개하는 유전자송달도 비루스성유전자나르개의 역할을 대신할수 있다는것이 립증되었는데[16-18] 그것은 유전자 공학적수법으로 단백질/펩티드를 높은 순도로 손쉽게 얻을수 있기때문이다. 한편 이러한 나르개들은 분해되어도 그 생성물이 펩티드의 작은 단편이나 아미노산이기때문에 생체 적합성(biocompatibility)의 견지에서도 유리하다.

DNA와 결합하는 천연단백질인 히스톤은 핵산을 응축시켜 포유동물세포에 유전자를 감염시키는데 리용되어왔다.[19] 진행세포에서 히스톤은 염색질의 주요구성성분이며 리진, 아르기닌과 같은 양전하를 띤 아미노산잔기를 많이 포함하는 작은 염기성단백질들이 8개 모인 8량체단백질이다. 이런 특성으로 히스톤은 정전기적호상작용으로 음전하를 띤 핵산과 쉽게 결합하며 그것을 응축시켜 나노크기의 립자속에 넣을수 있다.[20] 다른 중합체형 유전자나르개들과 달리 히스톤에 기초한 나노크기의 립자들은 세포먹기작용(endocytosis)이 아닌 다른 경로로도 세포에 흡수될수 있는데 이 경로는 에너근기에 의존하지 않는다.[21, 22] 더우기 이 립자들은 N말단에 1개이상의 핵국재화신호(nuclear localization signal: NLS)를 가지며 이러한 신호가 있어 핵안으로의 수송과 세포질에서의 그후 유전자발현이 쉽게 일어날수 있다.[23] 이러한 특이한 성질을 가지고있는것으로 하여 이 립자들은 효율높은 유전자나르개의 우수한 후보자로 되고있다.

2. 히스톤이 매개하는 세포감염

히스톤은 DNA를 응축시키고 뉴클레아제에 의한 분해를 막는 고유한 특성을 가지고 있는것으로 하여 세포감염의 전도유망한 유전자나르개로 벌써 오래전에 주목을 받았다. 1965년에 양이온성폴리아민뿐아니라 히스톤도 혈청알부민보다 더 쉽게 포유동물세포에 흡수(3천배나 더 쉽게 흡수)된다는것이 관측되었다.[24] 한편 히스톤은 폴리-L-리진, 프로타민, 폴리-L-오르니틴과 같은 양이온성중합체들과 유사한 세포감염능을 나타내었다. 그후 유전자송달효율을 높이기 위하여 히스톤에 기초한 각이한 화학구조물들이 설계되었으며 그것들에 의해 세포감염능이 현저히 개선된다는것이 수많은 연구를 통하여 확인되었다. 표 1에 유전자나르개로 련결히스톤, 핵심히스톤 및 히스톤류사단백질을 리용한 연구자료들을 종합하였다.

표 1. 히스톤과 히스톤에 기초한 펩티드들이 매개하는 유전자전이

| 히스톤 종류 | 단백질 | 핵산 | 세 포 종류 | 도움 인자 | 세 포감염 효률 | 세 포독성 | 참고 문헌 |
|-----------|-----------------|-------------------------------|--|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------|
| 련결 히스톤 | H1 | 플라즈 미드 | NIH-3T3 | Ca ²⁺ | 리포펙틴과 류사함. | 판정못함. | 25, 26 |
| | H1 C말단 펩티드 | 플라즈 미드 | 293T, NIH-3T3, COS-7 | 클로 로킨 | 리포펙틴보다 20배 높음. | 판정못함. | 27 |
| | 히스톤H1. 4F펩티드 | siRNA, dsRNA, 플라즈 미드 | HeLa, Vero, K562, Caco II, ND7, BHK21, 293T, Sua 4.0, A549, HT1080 | Ca ²⁺ | 리포펙타민, 리포펙틴과 류사하거나 더 높음. | 리포펙타민, 리포펙틴보다 독성이 적음. | 28 |
| | H1 C말단 펩티드 | 플라즈 미드 | 293T, NIH-3T3 | Ca ²⁺ | 리포펙타민보다 높음. | 판정못함. | 29, 30 |
| | H1 | 플라즈 미드 | 심근세포 | — | DOSPER보다 높음. | 판정못함. | 31 |
| | H1 | 플라즈 미드 | NIH-3T3 | Ca ²⁺ | 판정못함. | 판정못함. | 32 |
| | H1 | 플라즈 미드 | NIH-3T3, HepG2, Huh7, CT26, HUVEC, ECV304 | Ca ²⁺ | 린산칼시움보다 두배 높음 | 판정못함. | 33 |
| | H1 | 플라즈 미드 | ECV304 | Ca ²⁺ | 판정못함. | 뚜렷한 세포 독성이 없음. | 34 |
| | H1 | 플라즈 미드 | NIH-3T3, HeLa, COS-7 | — | H1이 량친매성폴리 아민의 세포감염 효률을 개선함. | 뚜렷한 세포 독성이 없음. | 35 |
| | H1 | HIV-1 Tat 유전자 플라즈 미드 | 림과종T세포 | — | 효과가 없음. | 판정못함. | 36 |
| | H1 | 플라즈 미드 | COS-7 | — | 효과가 없음. | 판정못함. | 37, 40 |
| | 갈락토실화 된 H1 | 플라즈 미드 | HepG2 | Ca ²⁺ 와 클로로킨 | 판정못함. | 판정못함. | 38 |
| | H1 | 플라즈 미드 | NIH-3T3 | — | 기름질의 세포 감염효률을 높임. | 판정못함. | 39 |

| 표제 속 | | | | | | | |
|---|------------|------------------|---|------------------|--|------------------------|----------|
| 히스톤 종류 | 단백질 | 핵산 | 세 포 종류 | 도움 인자 | 세 포감염 효를 | 세 포독성 | 참고 문헌 |
| 핵심 히스톤 | H2A | 플라즈 미드 | COS-7 | — | 폴리-L-아르 기닌, 폴리-L- 리진, 폴리-L- 리진/폴리-L- 아르기닌배합물, 기타 히스톤, 리포솜보다 높음. 리포펙타민, 리포 펙틴, 린산칼시움 보다 높음. 수퍼펙트보다 높음. | 판정 못함. | 40, 41 |
| | H2A | dsRNA | 조혈조직세포 | — | 리포펙타민, 리포 펙틴, 린산칼시움 보다 높음. | 뚜렷한 세포 독성이 없음. | 42 |
| | H2A | 플라즈 미드 | NXS2 신경 아종세포 | — | 수퍼펙트보다 높음. | 판정 못함. | 17 |
| | H2A | HIV-1 Tat 유전자 | 림과종T세포 | — | 효과가 없음. | 판정 못함. | 36 |
| | H2B | 플라즈 미드 | COS-7, HTC, MCF-7 | — | 리포펙타민보다 2.5배 높음. 리포펙틴, DOTAP, 리포펙타민, DOSPER, DEAE- 덱스트란, 폴리-L- 리진보다 높음. 리포펙틴, DEAE- 덱스트란보다 2~30배 높음. | 판정 못함. | 43 |
| 히스톤 류사 단백질 | H3, H4 | HIV-1 Tat 유전자 | 림과종T세포 | — | 리포펙타민과 류사함. | 판정 못함. | 36, 44 |
| | TmHU | 플라즈 미드 | NIH-3T3, 293T, U251, A431 | Ca ²⁺ | 리포펙타민과 류사함. | 리포펙타민보다 독성이 적음. | 45 |
| | HPhA | 플라즈 미드 | NIH-3T3, HEK293, HL-7702, HepG2, COS-7, HeLa | Ca ²⁺ | 리포펙타민과 류사함. | 리포펙타민 보다 독성이 적음. | 46 |
| | HPhA | 플라즈 미드 | 비인두암세포 | Ca ²⁺ | 리포펙타민보다 높음. | 판정 못함. | 47 |
| | HPhA | shRNA | HL-7702 | — | 리포펙타민보다 높음. | 리포펙타민 보다 독성이 적음. | 48 |
| <i>Bifidobacteri um longuem</i> 유래의 HU | 호열성 히스톤 | 플라즈 미드 | HeLa | — | 판정 못함. | 뚜렷한 세포 독성이 없음. | 49, 50 |
| | | 플라즈 미드 | HEK293 | — | 판정 못함. | 뚜렷한 세포 독성이 없음. | 51 |

1) 연결히스톤과 핵심히스톤이 매개하는 세포감염

진핵세포에서 염색질을 이루는 기본구조단위는 뉴클레오솜이다. 뉴클레오솜은 단백질인 히스톤(H1, H2A, H2B, H3, H4의 5종류가 있음.)과 DNA로 이루어진 핵단백질구조체이다. 즉 히스톤 H2A, H2B, H3, H4가 각각 두분자씩 모여 이루어지는 히스톤8량체(히스톤핵심)를 약 146bp의 DNA가 거의 두바퀴 둘러감고있다. 이렇게 형성된 구조를 핵심립자라고 한다. 두 핵심립자사이의 연결부를 이루는 DNA에 한분자의 히스톤H1이 결합되어있다.

핵심립자의 직경은 10nm이다. 이러한 누클레오솜구조는 DNA의 염기배열과 유전자의 종류에 관계없이 모든 진핵생물에 보편적인 구조이다. 개개의 누클레오솜은 히스톤H1에 의하여 구슬을 실에 꿰는 모양으로 연결되어 폴리누클레오솜사슬을 이룬다. 핵심히스톤들과 달리 편결히스톤H1은 히스톤8량체형성에는 참가하지 않지만 염색질의 응축에 크게 기여한다. 폴리누클레오솜사슬은 코일모양으로 감겨 솔레노이드구조를 가진 직경이 30nm인 염색질섬유를 이룬다. 솔레노이드구조형성에 H1과 2가금속이온이 관여한다.[52]

정제된 히스톤H1이 수많은 세포그룹에서 유전자전이를 효율적으로 유도한다는것은 이미 오래전에 알려졌다.[25-27] 실제로 송아지흉선의 히스톤H1은 NIH-3T3세포에서 유전자전이를 일으켰다.[25] H1의 C말단과 SV40의 NLS로 구성된 재조합히스톤(NLS-H1)은 양이온성 기름질과 유사한 세포감염효율을 나타냈다.[27] 더우기 NLS-H1/리포펙틴/DNA나노복합체를 리용하는 세포감염에서는 유전자발현효율이 리포펙틴/DNA보다 20배나 높았다. 옹근 길이의 히스톤H1뿐아니라 히스톤H1의 단편들도 유전자의 세포감염을 매개할수 있었다. H1의 C말단도메인을 포함하는 단편 즉 히스톤H1.4F는 고정화된 세포와 원래의 유리형세포에서 DNA, siRNA(작은간섭리보핵산), dsRNA(두오리사슬리보핵산)를 송달한다는것이 증명되었다.[28] 히스톤H1.4F를 리포펙틴(Lipofectin), 리포펙타민(Lipofectamine)과 비교해본 결과 세포감염효율이 유사하거나 더 높았다. 한편 히스톤H1.4F는 독성이 적고 세균용해물로부터의 대량정제가 가능하기때문에 효능높은 유전자나르개로 리용될 전망이 있었다.

히스톤H1의 C말단쪽의 짧은펩티드(H1C)가 금붕어 *Carassius auratus*로부터 클론화되었으며 DNA결합 및 응축능력이 옹근길이의 히스톤H1과 유사하다는것이 증명되었다.[29, 30] 또한 세포그룹 293T와 NIH-3T3을 모형으로 리용할 때 리포펙타민에 비해 H1C의 세포감염효율이 더 높았다. 이 연구결과들은 C말단도메인이 주로 DNA결합에 관여한다는 다른 연구자료들과 일치하였다.[53-55]

한편 히스톤H1이 매개하는 세포감염은 도움인자 특히 Ca^{2+} 에 의존한다는것이 밝혀졌다.[25] 배양액속의 Ca^{2+} 은 히스톤H1이 매개하는 세포감염에 미치는 혈청의 저해효과를 막았다.[34] 더우기 Ca^{2+} 은 엔도솜-리조솜에서 나노복합체를 재조직화하고 다음 그것이 세포질속으로 방출되게 하였으며 이와는 대조적으로 세포에 의한 히스톤H1-DNA나노복합체의 흡수는 Ca^{2+} 에 의존하지 않았다.[33] 놀랍게도 히스톤H1은 양친매성리포솜시약인 1,3-디-올레오일옥시-2-(6-카르복시-스페르밀)-프로필아미드(DOSPER)와 배합하여 세포감염을 일으키는데 리용될수 있으며 DOSPER를 단독으로 쓸 때보다 세포감염효율이 높았다.[31] 이와 유사한 결과는 히스톤H1이 포유동물배양세포에서 양친매성폴리아민의 세포감염을 개선한 연구에서도 얻어졌으며 감염효율은 2'-(1'',2''-디-올레오일옥시프로필디메틸-암모니움브로미드)-N-에틸-6-아미도-스페르민테트라삼불화초산염/포스파티딜에타놀아민(DOSPA/PE) 등의 리포솜표품들의 수준과 유사하였다.[35]

편결히스톤H1뿐아니라 핵심히스톤들도 유전자나르개로서 광범히 연구되었다. 히스톤H2A는 히스톤8량체의 1개 구성성분으로서 진핵세포에서 게놈DNA를 응축하고 유전자의 세포감염을 효율적으로 매개한다고 생각되었다.[37, 40] β -갈락토시다제알림유전자를 모형으로 리용하였을 때 H2A가 많은 포유동물세포그룹에 대한 유전자감염효율이 제일 높았지만 H1, H2B, H3, H4는 그 정도의 효율을 나타내지 못하였다.[40] 양이온성리포솜이 매개하는 세포감염과는 대조적으로 히스톤H2A-dsRNA를 나르개로 리용하였을 때 가재의 조혈조직세포에서 독성이 더 낮고 유전자침묵효율은 더 높았다.[42] 따라서 히스톤H2A는 세포감염의 시약으로 안전하면서도 값죽고 재생가능한 유전자송달체를 제공하며 특히 가재, 새우와 같은 갑각동물의 예민한 세포들에서 높은 감염효율을 나타냈다.

한편 뚜렷한 항종양효과를 얻기 위하여 히스톤H2A가 인터로이킨-2(IL-2)와 단일사슬 IL-12(scIL-12)의 송달에 리용되었는데 IL-2유전자의 세포감염에 의해 흰쥐신경아종모형에서 자연살상세포의 유도를 통한 종양억제효과가 나타났다.[17] 그러나 상품화된 리포솜시약인 수퍼펙트(SuperFect)는 종양세포증식을 부분적으로밖에 억제하지 못하였다. 유사하게 수퍼펙트를 단독으로 쓸 때보다 H2A가 매개하는 scIL-12유전자송달에 의하여 인터페론- γ 의 생성량이 더욱 증대되었다. 더우기 히스톤H2A는 레트로바이러스가 매개하는 세포감염을 증대시켰는데 세포독성은 검출되지 않았다.[56] 주목할것은 H1과 H2A의 세포감염이 두가지 독자적인 물림새에 따라 진행된다는것인데 실제로 H2A에서는 C말단단편이 없어도 세포 감염효율이 거의 감소하지 않았지만 히스톤H1이 매개하는 유전자송달에서는 C말단이 결정적인 역할을 하였다.[41] 더우기 히스톤H2A가 매개하는 유전자전이에서는 여분의 Ca^{2+} 이나 클로로킨이 요구되지 않았다. H2A가 매개하는 세포감염은 37개 아미노산으로 이루어진 N말단펩티드와 연관되어있는데 이 펩티드는 DNA결합, 핵안으로의 송달과 밀접한 연관이 있다. 결국 히스톤H2A를 나르개로 리용하는 유전자세포감염은 두가지 물림새 즉 ① 정전기적 호상작용에 의한 안정한 DNA결합과 응축, ② 히스톤H2A NLS를 통한 H2A-DNA나노복합체의 핵안으로의 수송을 거쳐 일어난다.[41]

히스톤H2B는 세포먹기작용이 아닌 다른 방식으로 헬라세포(HeLa cell)에 유전자를 옮겨넣는다는것이 밝혀졌다.[43] 히스톤H2B가 매개하는 세포감염은 효율이 리포펙타민보다 약 2.5배 더 높았다. 히스톤H2B의 경우에는 N말단꼬리와 공모양도메인이 둘 다 효율적인 유전자송달에 필요하였다. H2B의 N말단꼬리는 상대적으로 아르기닌과 리진의 함량이 높고 전형적인 단백질변환도메인(protein transduction domain: PTD)배열을 포함하고있었다면 H2B의 공모양도메인은 구조속에 핵안으로의 수송에 필요한 NLS를 포함하고있었다. H2A와 유사하게 H2B가 매개하는 세포감염에서도 Ca^{2+} 이나 클로로킨은 요구되지 않았다.

히스톤H3과 H4인 경우에는 그것들의 세포감염효율을 림파종T세포에서 다른 유전자송달제와 비교해보았는데 이 두 히스톤단백질이 기름질 또는 양이온성중합체에 기초한 시약들보다 세포감염효율이 더 높다는것이 밝혀졌다.[36, 44] 그러나 H1과 H2A는 이 계들에서 유전자의 세포감염을 일으키지 않았다. 한편 히스톤H3과 H4의 세포감염효율은 나르개/DNA비율과 항온처리시간에 의존하였으며 이 두 히스톤인 경우에 Ca^{2+} 이나 클로로킨이 요구되지 않았다. 다른 연구에 의하면 CHO세포와 NIH-3T3세포를 모형으로 리용하는 경우 히스톤H3을 양이온성중합체인 폴리에틸렌이민(polyethylenimine: PEI)과 배합하면 세포감염효율이 높아진다.[57] 그럼에도 불구하고 일부 연구를 통하여 외부에서 넣어준 히스톤H3이 주입량에 의존하면서 유전자발현을 억제한다는것이 증명되었는데 그것은 아마도 세포안의 나노복합체로부터 플라스미드DNA(pDNA)가 비효율적으로 해리되기때문이라고 본다.[58] 따라서 이 히스톤들의 세포감염능력과 상세한 물림새는 앞으로 더 연구되어야 한다.

그외에 세포감염의 효율은 히스톤의 종류에 따라 다를뿐아니라 어느 생물의 히스톤인가에 따라서도 달라진다. 실제로 pEGFP-N3플라스미드를 모형으로 리용하고 BHK-21 세포를 감염시키는 실험에서는 송아지흉선의 히스톤이 병아리적혈구의 히스톤보다 세포 감염효율이 더 높았다.[59]

2) 히스톤류사단백질이 매개하는 세포감염

진핵생물히스톤을 유전자나르개로 림상에 리용하는데서 문제로 되는것은 분자량이 커서 면역응답을 초래할 우려가 있는것이다.[60, 61] 이 문제를 해결하기 위하여 진핵생물히스톤 대신 고세균이나 세균의 히스톤을 리용하려는 연구가 진행되었는데 새 히스톤들은 안전

하면서도 효율적인 유전자송달을 보장할수 있는 우수한 특성들을 가지고있었다.[46, 49, 62] 즉 ① 진핵생물히스톤과 유사한 DNA결합 및 응축능을 가지며 ② 분자량(1만이하)이 상대적으로 작기때문에 면역원성과 세포독성이 낮고 ③ 열, 변성제, 유기용매에 대한 안정성이 높으며 ④ 가혹한 반응조건에서도 화학수식을 쉽게 할수 있었다.

고도호열세균 *Thermotoga maritima*의 히스톤류사단백질인 TmHU도 DNA를 손쉽게 응축시켜 나노복합체속에 넣을수 있었는데 DN아제 I에 의한 분해를 받지 않는 우점이 있었다.[63, 64] TmHU는 여러 포유동물세포에서 안정하면서도 시한부적인 유전자감염을 매개하였는데 그 이유는 이 단백질에 2개의 NLS가 들어있기때문이다.[45]

한편 고세균 *Pyrococcus horikoshii* OT3의 재조합히스톤류사단백질(HPhA)의 구조와 유전자송달능력에 대한 체계적인 연구도 진행되었다.[46-48, 65, 66] HPhA의 립체구조를 연구한데 의하면 똑같은 단량체 2개가 조립되어 호모2량체를 이루고 그속에 4개의 음이온이 있어 DNA분자가 결합할수 있는 구역을 형성하고있었다.[67] 더우기 HPhA의 립체구조에서는 두 단량체사이에 티로신잔기들의 그물구조가 이루어지고 더 큰 소수성의 접촉영역이 있으며 용매가 접근할수 있는 영역은 작고 수소결합의 수는 더 많기때문에 HPhA는 열안정성이 현저히 높고 특히 높은 온도와 높은 염농도조건에서도 DNA응축능력을 가지게 된다는것이 확인되었다.[46] 그러나 Pb^{2+} 이 있으면 HPhA와 DNA의 복합체형성이 영향을 받는다고 한다.[65] HPhA가 각이한 진핵세포에서 유전자송달을 매개하는 경우 적당한 Ca^{2+} 농도에 의해 세포감염효율이 높아졌으며 혈청은 세포감염에 거의 아무런 영향도 주지 않았다.[66] 이와는 대조적으로 양이온성의 기름질이나 중합체가 매개하는 유전자송달에서는 혈청에 의해 세포감염효율이 극적으로 낮아졌다. 이러한 자료들에 기초하여 그후 p53유전자(종양억제유전자. 정상세포에서 세포순환조절작용을 함. DNA의 변이나 여러가지 스트레스가 작용하면 이 유전자의 작용으로 세포는 아포토시스를 일으킴. 그러나 이 유전자가 변이된 암세포에서는 세포증식이 조절되지 못하므로 세포가 무단히 증식하며 아포토시스가 억제되어 종양세포가 무질서하게 증식하게 됨.)의 송달을 매개하는 나르개로서 HPhA가 리용되었는데 시험관내실험조건과 생체내실험조건에서 모두 긍정적인 종양억제효과가 나타났다.[47]

한편 호열균 *Geobacillus kastophilus* HTA426의 호열성히스톤유전자 *GK2215*가 탐색되어 대장균 *Escherichia coli* BL21에서 성과적으로 대량발현되었다.[49, 50] 이 히스톤은 DNA결합 및 응축능력이 우수하였으며 높은 온도와 DN아제 I에 의한 분해로부터 pDNA를 보호하는 좋은 성질이 있었다. 더우기 이 히스톤에 의해서 플라스미드 pEGFP-N3과 pGL-3의 세포감염이 성과적으로 실현되었으며 생체적합성도 좋았다. 흥미있게도 이 호열성히스톤을 PEI와 배합하면 세포감염효율이 현저히 높아졌다.

3) 중합체형미크로/나노립자속에 들어있는 히스톤-핵산복합체

히스톤은 핵산을 응축시켜 나노복합체속에 넣으며 이 복합체가 중합체형미크로/나노립자속에 들어가 각이한 물리적인자, 화학적인자, 효소적인자들의 존재하에서도 그 안정성을 높이고 내부물질들의 방출을 지연시켰다. 실험으로 성계의 정자로부터 얻은 히스톤H1(Sp H1)을 리용하면 pDNA의 세포감염효율과 안정성이 높아지고 DNA방출시간도 개선되었지만 Sp H1-pDNA를 알부민미크로구상립자속에 포괄고정화시키면 물리적 및 헤파린처리로부터 DNA를 더 잘 보호할수 있게 되었다.[68]

한 연구집단은 히스톤H2A를 골격으로 하여 재조합단백질(tera-H2A: TH)을 만든 다음 그것을 siRNA의 응축에 리용하였는데 최종적으로는 TH-siRNA나노복합체를 리포솜나노립자로

구축하였다.[69] 일단 나노립자가 시그마접수체가 매개하는 세포먹기작용으로 세포에 흡수되면 기름질피막은 엔도솜-리조솜안에 있는 효소들의 작용으로 벗겨지며 중심부의 TH-siRNA나노복합체가 엔도솜-리조솜의 환경에 드러나게 된다. 한편 벗겨진 양이온성 기름질들은 막기름질들과 이온쌍을 형성함으로써 엔도솜-리조솜을 불안정화시킨다. 결국 이렇게 중심부와 막으로 구성된 나노립자들은 시험관내실험조건과 생체내실험조건에서 모두 유전자침묵효과를 현저히 높였다. 놀랍게도 이 나노립자를 전신주입할 때 면역응답이 최소로 되었으며 독성은 무시할 정도였다.

4) 히스톤을 모의한 유전자나르개가 매개하는 세포감염

보통 히스톤에는 양전하를 띤 아르기닌과 리진의 함량이 높는데 이것은 정전기적호상작용으로 음전하를 띤 DNA와 안정한 나노복합체를 형성하는데 유리한 특성으로 된다. 이러한 특성에 주목하여 한 연구집단은 히스톤을 모의한 새로운 유전자나르개를 합성할 착상을 하였다.[70] 즉 구아니딘을 포함하는 아그마틴(Agm)과 히스티딘의 유도체인 히스타민(His)을 리용하여 일련의 히스톤모의나르개(PCAmHn)를 만들었는데 결과 p53유전자의 세포감염으로 긍정적인 증식억제효과가 나타났다. 세포를 투과하는 구아니딘기와 pH에 민감한 이미다졸기를 PCAmHn에 붙인 결과 세포에 더 잘 흡수되고 엔도솜에서의 탈출이 쉬워졌다. 이러한 특성외에 디술피드결합을 가지는 PCAmHn은 세포안의 환원물질인 글루타티온(GSH)에 의해 절단되면서 신속히 유전자를 방출하게 된다. 총적으로 볼 때 히스톤모의나르개는 여러가지 특성들을 종합적으로 고려하여 목적의식적으로 만들수 있으며 따라서 유전자치료에서 전도유망한 나르개로서 커다란 잠재력을 가지고있다.

3. 히스톤에 기초한 융합단백질/펩티드가 매개하는 세포감염

우에서 설명한바와 같이 시험관내실험조건과 생체내실험조건에서 세포감염효율을 더 높이자면 다기능유전자나르개를 개발하여 복잡한 세포막 및 세포안장벽들을 극복하여야 한다. 그러나 대부분의 히스톤들은 세포선택능이 없을뿐아니라 엔도솜-리조솜의 효소적 및 산성환경속에서 쉽게 분해될수도 있다. 이 문제들을 해결하기 위하여 유전자공학기술을 리용하여 히스톤에 기초한 융합단백질/펩티드를 구축하기 위한 연구가 심화되고 있는데 리상적인 유전자나르개의 설계에서 커다란 성과가 이룩되었다. 히스톤에 기초한 융합단백질/펩티드를 유전자나르개로 리용하기 위한 연구의 몇가지 기본적인 실패들을 표 2에 묶어주었다.

1) 세포선택능이 있는 히스톤융합단백질/펩티드

목표에 대한 인식능력과 세포감염의 효율을 개선하기 위하여 특정한 세포에 찾아가는 리간드들이 대부분의 비비루스성유전자나르개에 흔히 리용된다. 현재까지 많은 펩티드들이 각이한 세포와 조직을 찾아가는 능력을 가진다는것이 밝혀졌으며 따라서 이 펩티드들에 의해 송달계의 세포흡수율이 높아졌다.[78, 79] 일부 연구자들은 유선암세포그루 ZR-75-1의 표면항원을 찾아가는 펩티드(RVCFLWQDGRCVF)를 포함하는 히스톤H1에 기초한 재조합 융합단백질(FS3)을 구축하였다.[71] 이 융합단백질은 ZR-75-1세포에서의 유전자감염효율은 높았지만 MDA-MB-231세포에 대한 감염에는 뚜렷한 효과를 나타내지 않았다.

상피성장인자접수체를 찾아가는 히스톤H1융합단백질을 구축하기 위하여 합성올리고 펩티드 GE7[80, 81]이 리용되었다. 유전자공학기술을 적용한 이 융합펩티드에 의해 β -갈락토시다제유전자가 EGFR양성세포에 높은 효율로 감염된다는것이 증명되었다.[72]

표 2. 히스톤에 기초한 융합단백질/펩티드가 매개하는 세포감염

| 히스톤부분 | 기능펩티드부분 | 추가되는 기능 | 참고 문헌 |
|--------------------------------------|---|---|-------|
| 끝부분을 잘라낸 H1의 2개 반복단위 | 세포탐색펩티드 KALA펩티드 NLS펩티드 | ZR-75-1 유선암세포를 찾아간다. 엔도솜막을 불안정화시킨다. DNA를 핵안에 넣는다. | 71 |
| 히스톤H1 | GE7펩티드 HA20펩티드 | EGFR 발현세포를 찾아간다. 엔도솜방출 | 72 |
| 16개 아미노산잔기로 된 히스톤H1 펩티드가 두번 반복 | H5WYG펩티드 NLS펩티드 | 엔도솜방출 DNA를 핵안에 넣는다. | 73 |
| 16개 아미노산잔기로 된 히스톤H1 펩티드가 두번 반복 | H5WYG 혹은 Gp41펩티드 NLS펩티드 | 엔도솜방출 DNA를 핵안에 넣는다. | 74 |
| 히스톤류사단백질 HU | Antp 혹은 Tat펩티드 | 세포투과 | 51 |
| 16개 아미노산잔기로 된 히스톤H1 펩티드가 두번 반복 | HIV Gp41펩티드 NLS펩티드 | 엔도솜방출 DNA를 핵안에 넣는다. | 75 |
| 히스톤H1의 2개 C말단 반복부분 | 항HER2 항체의 scFv단편 HIV Gp41펩티드 NLS펩티드 | HER2 발현세포의 찾아간다. 엔도솜방출 DNA를 핵안에 넣는다. | 76 |
| 히스톤H2A펩티드가 4번 반복 | 세포탐색펩티드 PC-3 GALA펩티드 엘라스틴류사펩티드 | 전위선암세포 PC-3을 찾아간다. 엔도솜방출 면역계에 의한 인식을 최소화한다. | 77 |
| 히스톤H2A의 N말단 펩티드가 4번 반복 | 카텝신D 절단부위 GALA펩티드 | 엔도솜에서의 효소적분해에 의한 절단과 세포질제로의 핵산방출증가 엔도솜방출 | 69 |

아시알로당단백질접수체를 찾아가는 유전자나르개로서 일련의 갈락토실화된 히스톤들(H1, H2A, H2B, H3, H4)이 합성되었는데 히스톤H1에 기초한 나르개가 유전자송달효율이 제일 높았다.[82] 히스톤H1에 10개 갈락토실단위를 수식하였을 때 폴리-L-리진에 기초한 유전자나르개보다 세포감염효율이 11배나 높아졌다. 그다음 치료용IL-2유전자를 사람간암 세포에 감염시키는데 갈락토실화된 히스톤을 리용하였지만 감염효율은 리포펙타민보다 훨씬 낮았다.[83] 한편 다른 연구집단은 DNA와의 나노복합체형성에 미치는 갈락토즈도입의 영향을 체계적으로 조사하였다.[84] 수식되지 않은 H1-DNA나노복합체에 비하여 수식된 복합체의 용해도가 높아졌는데 이것은 아마도 나노복합체의 형성과 세포내 거동에서 결정적인 인자로 될수 있다. 한편 그것은 세포안에서 나노복합체로부터의 DNA방출의 형식과 정도에도 영향을 줄수 있다.

2) 엔도솜-리조솜을 탈출하는 능력이 있는 히스톤융합단백질/펩티드

유전자나르개가 세포먹기작용으로 세포안에 들어간 다음에는 엔도솜에 갇히거나 리조솜에 의해 분해되는 일이 없어야 한다. 엔도솜막을 가로질러 옮겨놓기 위하여 H5WYG, KALA, GALA Gp41과 같은 여러 펩티드들에 대한 연구가 심화되었다.[85-87] 감염효율을 높이기 위하여 히스톤H1에서 끝부분을 잘라낸 2개 반복단위와 pH에 민감한 융합펩티드 H5WYG를 포함하는 융합단백질이 설계되었다.[73] 히스톤단편은 DNA를 결합 및 응축시켜 나노립자속에 넣는데 관여하고 융합펩티드(fusogenic peptide)는 엔도솜막을 효율적으로

파괴시켜 엔도솜에서 탈출하는데 관여한다. 또한 H5WYG펩티드나 Gp41펩티드를 리용하여 16개 아미노산잔기로 된 히스톤H1 펩티드가 두번 반복된 부분과의 융합단백질을 만들었다.[74] 이 두 유전자나르개는 DNA결합능력이 유사하며 혈청누클레아제에 의한 핵산분해를 막았다. 놀랍게도 두 나르개가 엔도솜-리조솜에서 탈출하는 능력이 차이나며 H5WYG펩티드를 리용한 나르개의 감염효율이 더 높았다.

3) 세포를 투과하는 능력이 있는 히스톤융합단백질/펩티드

촉각다리펩티드(antennapedia-peptide: Antp), 단순성헤르페스비루스(HSV)의 VP22단백질, 사람면역부전비루스(HIV)의 TAT도메인과 같은 세포를 투과하는 펩티드(cell penetrating peptides: CPP)들은 진핵세포와 비루스에 들어있는 단백질들의 짧은 배렬부분이다. 이 펩티드들은 해당 단백질들이 세포막을 통과하고 지어 핵안에 들어가게 하였으며 그 투과방식은 접수체와 에너기에 의존하지 않았다. 한 연구집단은 *Bifidobacterium longum*의 히스톤류사단백질 HU를 리용하여 Antp나 TAT도메인과의 융합단백질을 만들었으며 그다음 이 융합단백질들(Antp-HU 혹은 Tat-HU)을 HEK293세포의 감염에 리용하였다.[51] 이 재조합 단백질들은 pDNA를 나노복합체속에 응축시키고 알림유전자의 세포내송달과 발현을 촉진하였다. HU에 비하여 Antp-HU나 Tat-HU의 세포감염효율은 현저히 높았다. 더우기 히스톤에 CPP를 도입한 경우에도 막손상으로 인한 독성은 없었다.

4) 다기능펩티드를 포함하는 히스톤융합단백질

현재까지 알려진 대부분의 히스톤융합단백질들은 효율적인 세포감염에 필요한 기능 펩티드들을 적어도 2개 포함하고있는데 실제로 히스톤H1펩티드, 세포를 찾아가는 펩티드, 막을 파괴하는 펩티드인 KALA펩티드를 포함하는 융합단백질을 들수 있다.[71] 유전자 공학적수법으로 히스톤H1펩티드, 5HWYG융합펩티드, NLS펩티드를 조합한 여러도메인 단백질을 리용하여 pDNA를 세포핵안에 넣을수 있었다.[73] 마찬가지로 끝부분을 잘라낸 히스톤H1의 2개 반복단위와 HIV Gp41펩티드, NLS펩티드로 구성된 재조합유전자나르개도 만들었다.[75]

한편 Gp41펩티드, NLS펩티드, 항HER2항체의 scFv단편, 히스톤H1의 2개 C말단반복 부분으로 구성된 융합단백질이 설계되어 HER2양성유선암세포에 목적하는 유전자를 송달하는데 효과적으로 적용되었다.[76] 카렙신D의 절단부위를 사이에 두고 히스톤H2A의 N말단부분이 4번 반복되게 한 재조합단백질도 설계되었다.[69] 그리고 이 재조합단백질의 C말단에 GALA펩티드가 놓이게 하여 핵산이 엔도솜에서 탈출할수 있도록 하였다. 세포 먹기작용후에 엔도솜-리조솜안에서 pH가 낮아짐에 따라 카렙신D가 즉시에 자극되며 그다음 GALA펩티드에 의해 엔도솜안에 있던 물질들이 방출되었다. 일단 나노복합체가 세포질에 들어가면 세포질단백질들에 의한 경쟁적인 자리바꿈으로 핵산은 재조합단백질로부터 해리된다.

최근에는 세포를 찾아가는 펩티드 PC-3, 짧은 엘라스틴류사펩티드, GALA펩티드, 히스톤H2A펩티드의 4번 반복단위로 구성된 단일사슬융합펩티드가 만들어졌다.[77] 이 다기능펩티드에 의해 pDNA를 결합 및 응축시켜 표면에 양전하가 적은 나노크기의 구조물 속에 넣을수 있었다. 그리고 세포를 찾아가는 펩티드에 의해 전위선암세포 PC-3에만 나노립자가 감염되고 정상전위선세포나 란소암세포에는 감염되지 않았다. 또한 엘라스틴류사펩티드에 의해 IgG응답이 감소되었으며 혈액속에서의 순환시간이 증가하였다. 총적으로 볼때 유전자공학수법으로 1개 유전자나르개에 여러가지 기능이 추가됨으로써 리상적인 세포감염이 이루어지게 되었다.

4. 히스톤이 매개하는 세포감염의 물림새

1) 히스톤-DNA나노복합체의 형성

우에서 설명한바와 같이 히스톤에는 양전하를 띤 리진과 아르기닌이 많이 들어있는데 이것은 음전하를 띤 핵산과 결합하는데 유리한 특성으로 된다. 히스톤H2A의 N말단펩티드에서 이 잔기들을 변이시키면 세포감염효률이 떨어지는데 이로부터 히스톤이 매개하는 세포감염이 정전기적호상작용을 통한 안정한 나노복합체의 형성과 연관된다는것을 알수 있다.[37, 41] 모든 히스톤이 DNA와 결합한다고 알려졌지만 감염효률은 차이나는것 같다. 즉 히스톤H2A는 H1, H2B, H3, H4보다 감염효률이 높았다.[40] 따라서 핵산과의 나노복합체 형성, 나아가서 세포감염에는 정전기적호상작용외에 히스톤들의 특이적인 구조/도메인이 요구되었다.

히스톤H1의 경우 C말단도메인이 핵산의 응축에서 기본인자로 되는데 C말단을 수식하면 이 도메인의 충전하나 전하분포에 영향을 주지 않아도 결합능력에는 극적인 영향을 주었다. 히스톤H2A의 경우에는 한 무리의 DNA접촉부위들이 확인되었는데 DNA류사물과 집계부분의 호상작용에 알맞게 H2A의 N말단가까이에 놓여있다는것이 밝혀졌다. 이 집계부분의 립체구조는 2개의 짧은 α 라선으로 되어있고 DNA의 작은 홈을 따라 양전하를 띤 N말단이 놓여있었다. 누클레오솜핵심립자에서는 37개 아미노산으로 된 H2A의 N말단부분이 가장 큰 호상작용표면중의 하나이며 이 부분의 15, 17, 20, 29, 32번잔기에 5개의 DNA 접촉부위가 있다는것이 밝혀졌다.[41]

히스톤-DNA나노복합체의 형성과정에 대하여 일부 연구자들은 원자힘현미경(AFM)을 리용하여 히스톤과 λ -DNA의 자체조립과정을 각이한 히스톤/DNA비율조건에서 조사하였다.[32, 88] 히스톤과 DNA의 적당한 비율에서 히스톤-DNA나노복합체는 표면에 불규칙적인 5각형과 6각형의 그물형태를 취하였다. 이런 특유한 구조물은 아마도 두 단계의 자체조립과정 즉 DNA응축과 그후의 그물구조형성때문에 생긴다고 볼수 있다. Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 은 히스톤-DNA나노복합체의 응축을 촉진한다고 한다. 더우기 쌍초리털벌레로부터 분리한 히스톤류사단백질 HCcp3은 시험관내실험조건에서 pDNA를 액정상태로 유도한다는것이 밝혀졌는데 이것이 유전자의 포장과 전이에서 결정적인 단계라는 사실이 립증되었다.[89, 90]

세포들의 배양에는 생리적인 염조건이 요구되기때문에 세포감염과정에 나노복합체들은 분명히 응집될것이다. 세포감염효률은 응집되는 히스톤-DNA나노복합체와 연관이 있다는것이 밝혀졌으며 응집물은 폭넓은 H1/DNA질량비(0.1~30.0)에서 현저한 감염효률을 나타냈다.[32] 흥미있게도 저속원심분리후 상청액속에 가용성나노복합체와 응축된 나노복합체가 그대로 남아있었으며 DNA가 유전자발현을 유도하는데 충분한 량임에도 불구하고 복합체들에 의한 세포감염은 일어나지 않았다. 이 작고 치밀한 복합체들이 세포감염을 일으키지 않는 리유를 리해하기 위하여 크기가 각이한 히스톤H1-DNA나노복합체들의 세포흡수와 감염효률을 조사해보았다.[91] 연구자들은 이온세기가 각이한 조건에서 히스톤H1-DNA나노복합체들의 크기와 감염효률사이의 직접적인 관계를 조사하였는데 배지로 희석함이 없이 혼합물을 직접 계에 첨가하는 방법으로 세포감염을 일으켜보았다. 놀랍게도 작은 복합물을 세포에 직접 첨가할 때 아무런 세포감염도 관측되지 않았지만 배지로 희석한 후에는 높은 송달효률이 얻어졌다. 이 사실은 세포감염효률이 처음에 형성시킨 히스톤H1-DNA나노복합체의 크기와 구조와는 무관계하며 후에 일어나는 재응집과 연관이 있다는것을 보여주었다.

2) 히스톤-DNA나노복합체의 세포에로의 흡수와 세포내거동

세포먹기작용은 세포막이 우무러들면서 소포를 형성하는 과정에 세포밖의 물질을 세포안으로 끌어들이는것을 말한다. 세포먹기작용은 비비루스성유전자나르개가 세포안으로 들어가는 기본방식으로 널리 인정되었다. 따라서 일부 유전자나르개들은 접수체에 기초한 세포먹기작용으로 포유동물세포에 흡수되도록 설계되었는데 세포막위에 있는 접수체와 리간드분자사이에 호상작용이 있는 다음 세포흡수가 이루어진다.[92-94] 접수체와 리간드사이의 호상작용의 친화성과 클라트린피복합물(clathrin-coated pit)속의 이 두 성분의 농도가 접수체가 매개하는 세포먹기작용의 효율을 결정한다고 한다. 클라트린(clathrin)이 매개하는 세포먹기작용외에 미소음액작용(micropinocytosis), 식균작용(phagocytosis), 세포막오목이가 매개하는 세포먹기작용(caveolae-mediated endocytosis)을 비롯한 다른 방식으로 비비루스성 나르개들의 흡수가 이루어진다고 한다.[95-97] 한편 일부 펩티드들은 세포먹기작용이 아닌 완전히 다른 방식으로 세포막을 통과한다는 연구결과들도 있다.[18, 98] 이 모든 방식은 세포먹기작용과 달리 비표준방식으로서 일단 세포안에 들어가면 에네르기, 접수체, 온도에 의존하지 않는 과정을 거쳐 세포막을 불안정하게 한다.

히스톤, 폴리-L-리진, 폴리-L-아르기닌은 많은 양전하잔기(리진, 아르기닌)를 포함하며 따라서 이 분자들은 쉽게 원형질막을 통과할수 없고 단지 세포막에 들어붙을뿐이다.[99] 실제로 모든 연결히스톤과 핵심히스톤은 전형적인 세포먹기작용대신 피동적인 확산을 통하여 Colo-205세포와 HeLa세포의 원형질막을 직접 통과한다는것이 증명되었다.[21] 세포먹기작용에 의존하는 방식을 차단하기 위하여 리용된 낮은 온도, 높은 사탕물농도, ATP 제거의 조건에서도 위의 세포들에 히스톤들이 흡수되었다. 식균작용과 세포막오목이가 매개하는 세포먹기작용의 저해제들이 히스톤흡수에 아무런 영향도 미치지 않기때문에 히스톤이 이 두 작용과 관계없이 세포에 흡수된다는것이 밝혀졌다. 류사하게 히스톤H2A, H2B, H3, H4가 세포먹기작용이 아닌 다른 경로를 거친다는것이 원형질체와 식물세포에서 증명되었다.[22] 히스톤들이 배양세포에 통과해들어가는것이 포화되지 않았으며 노코다줄(포유동물세포에서 세포먹기작용을 차단하는데 흔히 리용되는 투블린파열시약)에 의해 저해되지 않았다. 비오틴을 표식한 히스톤과 효소연결면역분석에 기초한 계를 리용하여 히스톤 H2A, H3, H4가 다중소포와 큰 단중소포의 기름질이중층을 통과한다는것이 밝혀졌다.[100] 그러나 히스톤H2B는 리포솜에 결합은 하지만 단중소포와 다중소포를 통과하지 못하였다.

비록 히스톤들이 세포먹기작용이 아닌 다른 경로를 거쳐 세포안에 들어간다고 보고 있지만 히스톤-핵산나노복합체가 세포안에 들어가는 상세한 물림새에 대한 직접적인 증거는 없다. 실제로 히스톤H1을 형광색소로 표식하고 히스톤H1-DNA나노복합체의 세포흡수를 현미경법으로 조사한 결과 나노복합체가 엔도솜-리조솜소포속에 들어있다는것이 명백히 밝혀졌으며 이로부터 세포먹기작용물림새가 작용한다는것이 시사되었다.[33] 한 연구집단은 히스톤H1의 세포감염효율이 히스톤H1-DNA응집물의 형성과 렘판이 있다는것을 입증하였으며 응집물의 세포흡수가 식균작용에 의존하는 경로를 거친다고 밝혔다.[32]

일반적으로 히스톤-핵산나노복합체가 엔도솜-리조솜소포에서 탈출하여 세포줄에 들어가자면 외인성리조솜용해인자가 요구되었다. 그렇지 않으면 엔도솜-리조솜에 나노복합체들이 축적되면서 결국 리조솜효소들에 의한 분해를 받을것이다. 일반적으로 클로로킨은 엔도솜-리조솜소포의 산성환경을 중화시키는데 리용되는데 결과 엔도솜소포에서 나노복합체의 분해가 감소된다. 사실상 히스톤의 세포감염효율은 클로로킨의 첨가후에 증가하였다.[26, 27, 101] Ca^{2+} 을 낮은 농도로 리용할 때에도 류사한 효과가 얻어졌는데[34, 38] 그것은 아마도 작은 린산칼시움공침전물의 융합능력때문이라고 보았다.[102] 또한 Ca^{2+} 은

엔도솜-리조솜에서 세포감염나노복합체를 인식하고 세포줄에로의 방출을 조절한다는것이 밝혀졌다.[33]

3) NLS의 매개에 의한 히스톤-DNA나노복합체의 핵안들여가기

핵막구멍은 크기가 20~70nm로 제한되어있어 감염된 나르개-pDNA나노복합체가 핵안에 들어가는것을 방해한다.[103, 104] 큰 나노립자가 핵안에 들어가는것은 NLS배렬에 의해 유도되기때문에[105-110] 히스톤속에 NLS가 존재하면 pDNA를 핵안에 넣는것을 개선하는데 유리할것이다. 현재까지 4가지 핵심히스톤 모두가 NLS에 의존하는 방식으로 pDNA를 세포줄로부터 핵안으로 옮겨넣는다는것이 입증되었다.[23, 111-113] 히스톤들의 NLS배렬은 N말단영역에 위치하며 SV40 거대T항원의것과 유사성이 높다는것이 밝혀졌다.[23, 114]

pDNA를 COS-7세포에 넣기 위하여 전체 H2A분자를 포함하는 여러 펩티드들을 구축하였는데 그중에서 NLS도메인의 첫 1-37아미노산을 포함하는 펩티드의 세포감염효율이 제일 높았다.[41] 한편 핵안에 DNA를 효과적으로 넣을수 있게 유전자공학적으로 재구성한 히스톤H2B에 의해 세포감염효율이 현저히 높아졌다.[115] 그러나 히스톤H1이 핵안에 들어갈 가능성은 C말단에 양전하를 띤 잔기들의 비율이 높은가에 의하여 규정되며 그 이유는 잘 알려진 NLS의 명백한 배렬이 없기때문이다.[116] 놀랍게도 히스톤H1에 SV40 거대T항원 NLS를 도입하면 핵안에 들어갈 가능성이 높아진다고 한다.[27] 게다가 임포틴(β importin β)나 임포틴 7(importin 7)상동물질들의 그물구조가 히스톤들의 핵안으로의 수송을 매개한다고 보고있지만[108, 117, 118] 상세한 물림새는 아직 밝혀지지 않았다. 총적으로 볼 때 히스톤이 매개하는 유전자의 세포감염은 NLS부분과의 융합으로 더욱 높아질것이다.

5. 히스톤과 다른 나르개들사이의 협동작용

비루스성나르개에 비하면 히스톤과 양이온성중합체들은 둘 다 아직 세포감염효율이 낮다. 그러나 이 두 종류의 나르개들은 유전자의 세포감염에서 협동작용을 한다는것이 밝혀졌다. 연구한데 의하면 해당한 계에서 PEI나 히스톤이 단독으로는 유전자의 세포감염을 매개하지 못하지만 최소량의 PEI와 히스톤을 배합할 때 세포감염효율이 극적으로 높아진다.[59] 이 연구결과로부터 이 두 성분사이에 상호효과(synergistic effect)가 있다는것이 명백히 밝혀졌다. 놀랍게도 서로 다른 생물종의 히스톤과 PEI를 배합할 때 세포감염효율이 서로 달랐다. 송아지히스톤과 PEI를 배합할 때 BHK-21세포에서 감염효율이 제일 높았으며 Vero V76세포의 경우에는 병아리히스톤과 PEI를 배합할 때 감염효율이 더 높았다. 히스톤H3과 PEI를 배합할 때에도 유사한 결과가 얻어졌다.[57]

흥미있게도 H3펩티드와 PEI를 배합할 때 세포먹기작용이 세포막오목이가 매개하는 세포먹기작용으로 옮겨져 감염효율이 높아졌다. 더우기 히스톤에 기초한 나노복합체는 내질망막의 유사분열후재분포과정에 엔도솜탈출을 회피하고 핵안에 통과해 들어간다는것이 밝혀졌다.[39] 한편 히스톤과 폴리(L-글루타민산)-g-PEI로 이루어진 효율적인 유전자전위제도 만들어졌다.[101] 이 계에서 히스톤은 핵안으로의 수송이 더 잘 진행되게 하여 폴리양이온들의 세포감염효율을 높인다고 본다.

화학적인 가교법으로 합성한 단백질-중합체잡종유전자나르개에서도 상호효과가 나타났다. 한 연구집단은 게니핀(genipin)을 리용한 가교법으로 호열성히스톤과 PEI의 잡종유전자나르개 즉 HGP를 설계하였다. 두 성분의 협동작용으로 잡종유전자나르개 HGP는 히스톤과 PEI를 단독으로 리용할 때보다 훨씬 세포감염효율이 높았다. 한편 게니핀의 도입으로 강한

붉은색형광을 내게 함으로써 치료진단목표를 달성하기 위한 효능높은 유전자나르개로 되게 하였다. 또한 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)/N-히드록시숙시니미드(NHS)가교반응을 통하여 만든 잡종유전자나르개에서도 호열성히스톤과 PEI의 협동작용이 나타났다.[50] 협동작용의 원인은 두가지 즉 양이온성중합체와 히스톤이 pDNA의 응축과 전이를 함께 촉진하며 히스톤이 핵안으로의 수송과 유전자의 발현을 더욱 증가시키기때문이라고 보고있다. 더우기 잡종유전자나르개들은 생체적합성이 좋았는데 그 이유는 양이온성중합체인 PEI보다 세포독성과 용혈작용이 적은것을 비롯하여 무독성의 히스톤이 차폐효과를 나타내기때문이라고 보고있다.

6. 결론과 전망

히스톤은 효율적인 비바이러스성유전자나르개로서 지난 20년이상 연구되어왔다. 1990년대 말에 재조합히스톤H1이 포유동물세포를 감염시키는 유전자나르개로 성과적으로 리용되었다. 그때로부터 천연히스톤들인 H1, H2A, H2B, H3, H4가 DNA를 결합하고 응축시키는 능력, 직접 세포막을 통과해서 핵안에 들어가는 능력 등의 고유한 특성을 가지는것으로 하여 세포감염을 효율적으로 매개한다는 수많은 연구자료가 보고되었다. 진핵생물의 히스톤 외에 고세균이나 세균의 히스톤류사단백질들도 유전자나르개로 리용될수 있다는 연구자료들이 제기되었다. 진핵생물의 히스톤에 비하여 이 히스톤류사단백질들은 면역응답이 적고 높은 온도, 유기용매, 변성제의 가혹한 조건에서도 안정성이 높았다. 그러나 히스톤이 매개하는 세포감염에는 목적하는 세포를 특이적으로 찾아가지 못하는것, 엔도솜-리조솜 탈출이 불충분한것, 세포내자극응답이 부족한것, 세포줄에서 효소에 의해 분해되는것 등 아직 많은 문제점들이 있다. 다행히도 유전자공학적수법의 빠른 발전으로 히스톤분자에 새로운 기능들을 손쉽게 임의로 추가할수 있게 되었다. 히스톤에 기초한 다기능융합단백질/펩티드들을 만들어 적지 않은 문제들을 해결하고있다. 또한 히스톤-핵산나노복합체들을 중합체형물질로 피복시켜 효소에 의한 분해를 막고 혈류속의 체류시간을 늘이며 적재한 유전자의 방출을 조절하고있다. 더우기 히스톤과 중합체를 배합하여 이 두 성분의 상호효과를 실현하고 유전자의 세포감염효율을 개선하고있다.

비록 히스톤이 매개하는 세포감염에는 커다란 잠재력이 있지만 해결하여야 할 연구과제는 많이 남아있다. 실례로 같은 히스톤의 세포감염효율도 연구자마다 차이난다. 한 연구결과에 의하면 히스톤들가운데서 히스톤H2A가 세포감염효율이 제일 높았지만[37] 다른 연구결과에서는 히스톤H3과 H4가 세포감염효율이 제일 높았다.[36] 그 원인은 아마도 이온, 알림유전자, 지어 히스톤들의 기원과 순도 등 실험조건들이 차이난기때문일것이다. 따라서 앞으로의 임상응용을 위하여 히스톤이 매개하는 세포감염의 물림새를 정확히 해명하는것이 중요하다.

한편 비록 비루스나 중합체에 기초한 나르개들에 비하여 히스톤의 독성은 무시할수 있지만 그것을 동물에 주사할 때에는 면역응답이 여전히 존재하게 된다.[119] 그러므로 히스톤이 매개하는 유전자송달은 그것들의 부정적인 효과를 제한하는 일정한 조건에서 진행하여야 한다. 그밖에 히스톤에 의하여 유도되는 면역응답이 밝혀지면서 히스톤의 면역원성을 최소화하려는 연구가 심화되었다. 실례로 히스톤이나 히스톤에 기초한 펩티드들의 크기를 제한함으로써 세포감염효율을 낮춤이 없이 면역응답을 줄일수 있었다. 한 연구결과에 의하면 H1의 C말단도메인을 포함하는 단편이 수많은 포유동물세포의 감염과정에 독성이 적었다고 한다.[28] 또한 진핵생물의 히스톤에 비하여 고세균이나 세균의 히스톤의 면역원성이 낮았는데 아마 그것들의 분자량이 상대적으로 작기때문일것이다.[46, 49, 62]

히스톤의 면역원성을 줄이려는 다른 연구에서는 히스톤-핵산복합체를 마이크로/나노립자속에 넣었다. 실제로 리포솜나노립자속에 재조합히스톤펩티드를 넣은 결과 명백히 면역자극효과는 감소하고 세포감염효율은 증가하였다.[69] 더우기 엘라스틴류사펩티드로 히스톤을 수식하면 면역유도률이 최소화되었는데 나노립자의 안정성은 그대로 유지되고 혈류속의 체류시간은 길어졌다.[120]

히스톤은 양이온성중합체들과 협동작용을 한다는것이 밝혀졌기때문에 협동작용송달계를 설계하여 엔도솜탈출과 핵안으로의 수송을 개선하여 세포감염효율을 높였다. 생체내실험 조건에서 히스톤이 매개하는 유전자송달에 의해 종양을 억제할수 있다는 더욱더 많은 연구 자료가 발표되고있다. 앞으로 히스톤이 매개하는 유전자치료가 암뿐만아니라 다른 질병들에 미치는 효과를 시험관내 및 생체내실험조건에서 판정하는데 연구가 집중될것이다. 유전자 나르개로서의 히스톤은 효율적이고 시한부적인 유전자치료법의 개발에 크게 기여할것이며 새로운 안전한 세포감염법은 반드시 현실화될것이다.

참 고 문 헌

- [1] R. Gambari et al.; Mol. Diagn. Ther., 23, 153, 2019.
- [2] N. Azie et al.; Clin. Pharmacol. Ther., 92, 135, 2012.
- [3] L. M. Muul et al.; Blood, 101, 7, 2563, 2003.
- [4] M. Onodera et al.; Expert Opin. Investig. Drugs, 9, 3, 543, 2000.
- [5] H. Han et al.; Biotechnol. Adv., 37, 1, 1, 2019.
- [6] T. Niidome et al.; Gene Ther., 9, 1647, 2002.
- [7] S. L. Ginn et al.; J. Gene Med., 15, 65, 2013.
- [8] L. H. Vandenberghe et al.; Gene Ther., 19, 162, 2012.
- [9] C. E. Thomas et al.; Nat. Rev. Genet., 4, 346, 2003.
- [10] C. Baum et al.; Human Gene Ther., 17, 253, 2006.
- [11] S. Nayak et al.; Gene Ther., 17, 295, 2010.
- [12] H. Yin et al.; Nat. Rev. Genet., 15, 541, 2014.
- [13] L. Li et al.; J. Biomed. Nanotechnol., 11, 739, 2015.
- [14] D. W. Pack et al.; Nat. Rev. Drug Discov., 4, 581, 2005.
- [15] M. Rezaee et al.; J. Control. Release, 236, 1, 2016.
- [16] M. S. Wadhwa et al.; Bioconjug. Chem., 8, 81, 1997.
- [17] D. Balicki et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 11500, 2000.
- [18] J. J. Schwartz et al.; Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 162, 2000.
- [19] A. Haberland et al.; Biotechnol. Appl. Biochem., 42, 97, 2005.
- [20] T. Jenuwein et al.; Science, 293, 1074, 2001.
- [21] E. Hariton-Gazal et al.; J. Cell Sci., 116, 4577, 2003.
- [22] J. Rosenbluh et al.; Biochim. Biophys. Acta, 1664, 230, 2004.
- [23] M. Baake et al.; J. Cell. Biochem., 81, 333, 2001.
- [24] H. J. Ryser et al.; Science, 150, 501, 1965.
- [25] M. Bottger et al.; Biochim. Biophys. Acta, 1395, 78, 1998.
- [26] S. V. Zaitsev et al.; Gene Ther., 4, 586, 1997.
- [27] J. D. Fritz et al.; Human Gene Ther., 7, 1395, 1996.

- [28] I. Puebla et al.; J. Biotechnol., **105**, 215, 2003.
- [29] H. J. Jung et al.; Biotechnol. Prog., **24**, 17, 2008.
- [30] Q. Wei et al.; Enzyme Microb. Technol., **40**, 1484, 2007.
- [31] M. Kott et al.; Somat. Cell. Mol. Genet., **24**, 257, 1998.
- [32] H. Lucius et al.; Mol. Biol. Rep., **28**, 157, 2001.
- [33] S. Zaitsev et al.; Acta Histochem., **104**, 85, 2002.
- [34] A. Haberland et al.; Pharm. Res., **17**, 229, 2000.
- [35] V. Budker et al.; Biotechniques, **23**, 142, 1997.
- [36] I. Demirhan et al.; J. Hum. Virol., **1**, 430, 1998.
- [37] D. Balicki et al.; Blood, **90**, 527, 1997.
- [38] A. Haberland et al.; Biochim. Biophys. Acta, **1445**, 21, 1999.
- [39] N. L. Ross et al.; Mol. Ther. Nucleic Acids, **4**, e226, 2015.
- [40] D. Balicki et al.; Mol. Med., **3**, 782, 1997.
- [41] D. Balicki et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 7467, 2002.
- [42] H. Liu et al.; Dev. Comp. Immunol., **31**, 3406, 2007.
- [43] K. M. Wagstaff et al.; Mol. Ther., **15**, 721, 2007.
- [44] O. Hasselmayer et al.; Anticancer Res., **21**, 2377, 2001.
- [45] D. Esser et al.; Nat. Biotechnol., **18**, 1211, 2000.
- [46] L. Weng et al.; Protein Expr. Purif., **33**, 145, 2004a.
- [47] Y. Li et al.; Cancer Gene Ther., **14**, 968, 2007.
- [48] Y. Ding et al.; Int. J. Med. Sci., **10**, 957, 2013.
- [49] H. Han et al.; ACS Macro Lett., **4**, 575, 2015.
- [50] H. Shi et al.; New J. Chem., **39**, 6718, 2015.
- [51] E. V. Khokhlova et al.; Bull. Exp. Biol. Med., **151**, 717, 2011.
- [52] R. D. Kornberg et al.; Annu. Rev. Cell Biol., **8**, 563, 1992.
- [53] F. Moran et al.; Biophys. Chem., **22**, 125, 1985.
- [54] M. M. Bharath et al.; Biochemistry, **41**, 7617, 2002.
- [55] M. J. Hendzel et al.; J. Biol. Chem., **279**, 20028, 2004.
- [56] D. Singh et al.; Nucleic Acids Res., **24**, 3113, 1996.
- [57] M. J. Reilly et al.; Mol. Pharm., **9**, 1031, 2012.
- [58] H. Kamiya et al.; Int. J. Pharm., **392**, 249, 2010.
- [59] A. Schneeweiss et al.; Int. J. Pharm., **400**, 86, 2010.
- [60] M. Monestier; Methods, **11**, 36, 1997.
- [61] S. Iborra et al.; Vaccine, **22**, 3865, 2004.
- [62] F. Orfaniotou et al.; Extremophiles, **13**, 1, 2009.
- [63] D. Esser et al.; J. Mol. Biol., **291**, 1135, 1999.
- [64] A. Mukherjee et al.; Nucleic Acids Res., **36**, 3956, 2008.
- [65] Y. Wang et al.; Biometals, **28**, 207, 2015.
- [66] L. Weng et al.; Biochim. Biophys. Acta, **1702**, 209, 2004.
- [67] T. Li et al.; J. Mol. Biol., **325**, 1031, 2003.
- [68] O. N. Okoroukwu et al.; J. Microencapsul., **27**, 142, 2010.
- [69] Y. Wang et al.; J. Control. Release, **172**, 179, 2013.

- [70] P. Cui et al.; *Polym. Chem.*, **7**, 7416, 2016.
- [71] F. Soltani et al.; *Int. J. Pharm.*, **441**, 307, 2013.
- [72] F. Dai et al.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **129**, 456, 2003.
- [73] F. Sadeghian et al.; *Int. J. Pharm.*, **427**, 393, 2012.
- [74] M. Alipour et al.; *Sci. Rep.*, **7**, 41507, 2017.
- [75] A. Majidi et al.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **107**, 191, 2016.
- [76] R. Cheraghi et al.; *Int. J. Pharm.*, **515**, 632, 2016.
- [77] A. Hatefi et al.; *Biomacromolecules*, **18**, 2799, 2017.
- [78] N. Nasongkla et al.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 6323, 2004.
- [79] X. Yang et al.; *Biomaterials*, **32**, 4151, 2011.
- [80] G. Wu et al.; *J. Biol. Chem.*, **262**, 4429, 1987.
- [81] R. J. Cristiano et al.; *Cancer Gene Ther.*, **3**, 4, 1996.
- [82] J. Chen et al.; *Human Gene Ther.*, **5**, 429, 1994.
- [83] H. Junbo et al.; *Int. J. Mol. Med.*, **3**, 601, 1999.
- [84] A. Haberland et al.; *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **25**, 237, 1999.
- [85] W. Li et al.; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 967, 2004.
- [86] E. J. Kwon et al.; *Mol. Pharm.*, **7**, 1260, 2010.
- [87] D. Grasnack et al.; *Eur. Biophys. J.*, **40**, 529, 2011.
- [88] Y. Liu et al.; *Colloids Surf. B Biointerf.*, **134**, 17, 2015.
- [89] A. L. Ny et al.; *Biophys. Chem.*, **142**, 76, 2009.
- [90] S. Sun et al.; *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 23842, 2013.
- [91] A. Haberland et al.; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **42**, 107, 2005.
- [92] J. Chen et al.; *Nano Lett.*, **17**, 4526, 2017a.
- [93] W. Chen et al.; *Acta Biomater.*, **57**, 238, 2017.
- [94] X. Wang et al.; *J. Control. Release*, **263**, 39, 2017.
- [95] N. P. Gabrielson et al.; *J. Control. Release*, **136**, 54, 2009.
- [96] G. W. Jeong et al.; *Carbohydr. Polym.*, **178**, 322, 2017.
- [97] T. E. Park et al.; *Biomaterials*, **38**, 61, 2015.
- [98] H. Brooks et al.; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 559, 2005.
- [99] D. Ma et al.; *Biomaterials*, **35**, 4357, 2014.
- [100] J. Rosenbluh et al.; *J. Mol. Biol.*, **345**, 387, 2005.
- [101] J. Deng et al.; *Pharm. Res.*, **28**, 812, 2011.
- [102] A. M. Lam et al.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1463**, 279, 2000.
- [103] U. Kubitscheck et al.; *J. Cell Sci.*, **168**, 233, 2005.
- [104] L. Pan et al.; *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5722, 2012.
- [105] A. I. Aronsohn et al.; *J. Drug Target*, **5**, 163, 1998.
- [106] C. K. Chan et al.; *Gene Ther.*, **7**, 1690, 2000.
- [107] X. Hao et al.; *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 35613, 2017.
- [108] A. P. Lam et al.; *Gene Ther.*, **17**, 439, 2010.
- [109] Z. Yang et al.; *Nanoscale*, **6**, 10193, 2014.
- [110] M. A. Zanta et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 91, 1999.
- [111] P. Muhlhauser et al.; *EMBO Rep.*, **2**, 690, 2001.

- [112] N. Mosammaparast et al.; J. Cell. Biol., **153**, 251, 2001.
- [113] N. Mosammaparast et al.; J. Biol. Chem., **277**, 862, 2002.
- [114] R. Moreland et al.; Mol. Cell. Biol., **7**, 4048, 1987.
- [115] K. M. Wagstaff et al.; FASEB J., **22**, 2232, 2008.
- [116] M. Kaouass et al.; J. Control. Release, **113**, 245, 2006.
- [117] S. Jakel et al.; EMBO J., **18**, 2411, 1999.
- [118] C. W. Pouton et al.; Adv. Drug Deliv. Rev., **59**, 698, 2007.
- [119] J. A. Hardin et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 7410, 1983.
- [120] F. S. Nouri et al.; Pharm. Res., **32**, 3018, 2015.

주체110(2021)년 4월 5일 원고접수

Studies and Application of Histone-Mediated Transfection for Gene Therapy

Kim Il Sok

This review discussed the recent developments and the mechanism of histone-mediated transfection, and its future therapeutic possibility for genetic diseases.

Keywords: histone, transfection, gene therapy, gene delivery