

게놈편집기술과 그 응용

허명식, 김순의

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과학기술부문에서 첨단돌파전을 힘있게 벌려야 하겠습니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 39페이지)

과학의 진보는 기술의 진보에 의하여 추동된다. 실례로 세포생물학이라는 분야는 그 어떤 추상적사고나 철학적발견에 의해서가 아니라 유리세공사의 렌즈연마기술에서 혁신이 일어나면서 이전에는 볼수 없었던 세포의 세계 즉 자그마한 물방울속에서 미세한 생물들이 떠다니며 꿈틀거리는 세계를 발견하게 되면서 시작되였다. 현대생명과학도 1972년에 개발된 유전자공학기술에 의하여 시작되였다.

21세기초 인간게놈배렬의 결정으로 자기 발전의 튼튼한 토대가 마련된 생명과학분야에서는 2013년 2월 게놈편집 혹은 게놈공학기술이 개발된것으로 하여 새로운 혁신이 일어났으며 오늘 세계는 게놈편집기술의 일대 전성기를 맞이하고 생명과학에서는 대비약이 일어나고있다. 이것은 1972년 재조합DNA기술의 개발과 맞먹는 역사적사변으로서 유전자공학에 의하여 생물학이 현대생물학, 분자생물학에 기초한 생명과학으로 전환된것처럼 앞으로 생명과학은 게놈편집기술에 의하여 다시한번 새로운 비약적인 발전을 이룩하게 될것이다. 그리하여 오늘 세계는 게놈편집기술을 생명과학분야에서 일어난 최대급의 통권과도 같은 기술, 생명과학분야에서의 《최강의 무기》, 현대 프로메테우스의 불과도 같은 신화적인 기술로서 인류의 꿈을 실현할수 있는 《무기》가 마련되었다고 보고있다.

1. 생물학이 생명과학으로

게놈편집기술의 의의를 잘 알려면 생물학의 발전력사를 잘 알아야 한다.

19세기전반기 생물학은 단순히 기술학, 박물학에 지나지 않았으며 생명현상에 대하여서도 생기론에 기초하고있었다. 그러나 19세기 후반기 다윈의 진화론과 세포분열의 발견으로 세포의 중요성이 인식되면서 생명현상을 리해하려면 세포를 리해하여야 한다는것이 밝혀지고 그때로부터 박물학이였던 생물학이 진정한 실험과학으로 전환되였다.

20세기에 들어와 멘델법칙이 재발견되고 생화학과 유전학이 생겨났지만 여전히 독립적으로 발전하였다. 1902년 가로드가 선천성알갑툰오즘증을 연구하고 《물질대사의 선천적결함》이라는 논문을 발표하면서 생화학과 유전학을 융합시키려고 시도하였지만 여전히 생물학계에서는 유전자는 생화학적으로 단백질로 되어있다고 믿고있었다. 그것은 것처럼 다종다양한 생명현상의 기초를 이루고있는 유전자는 생화학적으로도 다양성이 가장 풍부한 물질로 되어있을것이라고 보고있었고 따라서 당시에 이미 발견된 단백질과 핵산, 다당류, 기름질과 같은 생체고분자물질들가운데서 단백질이 20개의 아미노산으로 이루어져있으므로 응답 유전자가 단백질로 되어있을것이라고 공인하고있었다. 그후 1941년 고펡이에 대한 연구

로부터 1유전자-1효소설이 제기되었지만 유전자에 대한 인식에서는 변함이 없었다. 1944년 에이버리가 *Streptococcus pneumoniae*균의 형질전환현상에 대한 10여년간의 연구를 통하여 《형질전환인자는 DNA이다.》라는 논문을 발표하였지만 누구도 그것을 믿으려 하지 않았다. 물론 그자신도 자기의 발견이 너무도 믿어지지 않아 10여년동안 실험을 반복하였다. 이 논문에 의하여 처음으로 형질전환인자 즉 유전자는 DNA로 되어있다는것이 밝혀졌으므로 생물학에서는 이 논문을 에이버리의 《폭탄선언》이라고 한다. 당시에 너무도 뜻밖이어서 선뜻 믿으려 하지 않았지만 1952년 T2파취에 대한 실험결과가 발표되면서 드디어 온 세계가 유전자는 생화학적으로 DNA로 이루어져있다는것을 믿게 되었다.[1]

이미 에이버리의 논문으로부터 DNA의 중요성을 인식한 워트슨과 크릭은 1950년부터 DNA의 2차구조에 대한 연구를 시작하여 1953년 4월 DNA의 두오리라선구조모형을 발표함으로써 현대생물학발전의 새로운 이정표가 마련되고 20세기 과학의 3대발견(일반상대성리론과 양자론, DNA의 두오리라선구조)중의 하나가 이루어졌다. 그리고 이때로부터 분자생물학의 본격적인 연구가 시작되었으며 생물학이 생명현상의 첫째가는 물질인 DNA에 기초하여 발전하게 되었다. 그리고 19세기부터 제기되었던 생물학의 3대문제 즉 후대는 어떻게 어미를 닮는가(유전), 1개의 수정란으로부터 어떻게 개체가 생겨나는가(발생), 생명은 어떻게 생겨났는가(진화)에 과학적해답을 줄수 있는 단서가 마련되었다. 그후 려이어 DNA의 반보존적복제물림새해명과 DNA폴리메라제의 발견, 유전암호의 해명, 제한효소와 리가제의 발견 등 분자생물학의 중요한 성과가 이룩되었다.

1972년 박사원생의 과제서로부터 중요한 암시를 받은 파울 버그가 곧 λ 파취의 DNA와 SV40의 DNA로 된 첫 재조합DNA를 만들어내놓음으로써 재조합DNA기술이 개발되었으며 분자생물학의 새로운 단계, 현대생물학의 역사가 시작되었다. 그리고 1975-1976년 막삼-길버트법과 썬거법이라는 DNA배열결정기술이 개발되면서 유전자공학기술이 더욱 완성되고 생화학적으로 가장 다루기 힘든 물질이었던 DNA가 가장 다루기 쉬운 물질로 전환되었으며 그후 현대생물학의 모든 성과가 이룩되었고 생물학이 생명과학으로 발전하였다. 물론 그 과정에 재조합DNA기술의 개발자인 버그자체의 발기에 의하여 1975년 아실로마국제회의가 열리고 여기서 DNA재조합기술의 안정성, 윤리성과 관련한 문제가 토의되어 재조합DNA 실험과 관련한 지침이 마련되었다. 그후 1983년 PCR법과 1998년 RNAi현상의 발견으로 유전자공학기술은 더욱 완성되었으며 그 연장선에서 20세기 현대생물학의 결정체로서 인간게놈배열이 결정되었다. 이렇게 다윈의 진화론이 제기된 때로부터 100년이 지나 DNA의 중요성이 인정되고 DNA의 두오리라선구조가 밝혀졌다면 그로부터 약 25년이 지나 유전자공학기술이 태어났고 그것에 의하여 또 25년후에 인간게놈배열의 결정이라는 분수령이 마련되었다.[2]

그런데 그로부터 10년이 지난 2013년 2월 게놈편집기술의 개발로 생명과학은 또 하나의 혁신적인 기술을 가지게 되었다.

2. 게놈편집기술의 개발과정

1) 표적화된 DSB의 발견

1989년에 게놈의 어떤 부위에 두오리사슬절단(DNA double-strand break: DSB)이 생기면 상동재조합(HDR)을 통하여 재조합률이 $10^7 \sim 10^{10}$ 정도로 높아진다는것이 발견되었다. 이것

은 표적유전자과피법에서 재조합률이 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 인데 비하여 너무도 혁신적이었다. 따라서 이러한 사실을 통하여 게놈내의 목적하는 부위에 DSB를 도입하면 그 부위에서의 재조합률을 대폭으로 높일수 있다는것을 알게 되었다.

2) 표적화된 DSB에 의한 indel의 도입

2002년에 게놈의 어떤 부위에 DSB가 생기면 외부에서 상동수복주형을 넣어주지 않아도 오유생성비상동말단연결(error-prone nonhomologous end-joining: NHEJ)수복물림새에 의하여 그 부위에 indel이 저절로 생긴다는것을 알게 되었다. 이것은 표적유전자과피법에서 어떤 부위를 변화시키려 하는 경우 반드시 외래DNA단편을 넣어주어야 하는 고전적인 방법에 비하여 매우 혁신적이었다. 또한 이러한 연구들을 통하여 DSB에 의하여 HDR와 NHEJ가 동작하면 이것은 진핵생물의 게놈을 마음먹은대로 그리고 정확히 수식시킬수 있는 위력한 경로로 될수 있다는것을 알게 되었다.(그림 1)

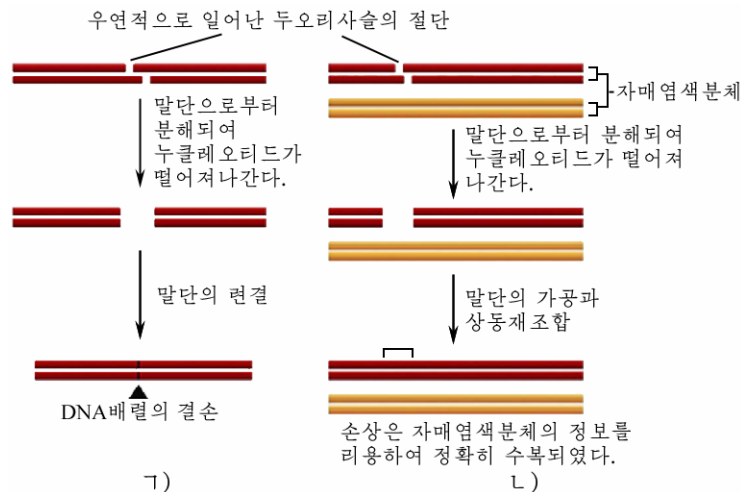


그림 1. DSB를 수복하는 두가지 물림새

1) 비상동말단연결, 2) 상동재조합

3) 프로그램화된 뉴클레아제의 개발

다음에 제기된 문제는 그러면 어떻게 하면 게놈DNA에서 목적하는 임의의 배열에 DSB를 도입하겠는가 하는것이였다. 따라서 이 분야의 전문가들은 게놈의 목적하는 배열을 절단하는 효소 즉 프로그램적인 뉴클레아제를 개발하기 위한데로 연구를 지향시키게 되었다. 그리하여 2001년에 아연손가락단백질에 기초한 프로그램화된 뉴클레아제가 개발되었다. 그 후 2005년에 진핵생물의 전사인자에 기초한 아연손가락뉴클레아제(Zn Finger Nuclease: ZFN)와 미생물의 가동인자에서 유래된 메가뉴클레아제(2006년), *Xanthomonas*세균의 전사활성화인자류사효과인자(transcription activator-like effectors: TALE)를 리용한 뉴클레아제(TALEN)가 개발되어 게놈편집기술의 기초가 마련되었다.

4) CRISPR의 연구과정

현재 게놈편집기술의 기본수법으로 되고있는 CRISPR/Cas계는 처음 1987년 대장균에 있는 수수께끼같은 반복배열에 대한 연구로부터 시작되었다. 당시 대장균에서 어떤 유전자를 연구하면서 그 유전자의 아래쪽에 29nt의 이상한 반복배열무리가 있다는것을 알게 되었다.

그런데 이 반복배열은 그때까지 발견된 일반적인 직렬반복배열과는 달리 29nt의 반복배열 사이에 32nt의 비반복배열이 있었고 이런것이 5조나 있었다.

2000년에 여러 미생물의 게놈배열이 결정되면서 진정세균의 40%이상과 고세균의 90%에 이러한 CRISPR가 있다는것이 밝혀졌다. 그것의 보편성으로부터 2002년에 이러한 특이한 반복배열을 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, 무리지어 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드롬반복배열, 크리스파라고 발음)라고 부르기로 합의하였다. 같은해 CRISPR관련(CRISPR-associated: Cas)유전자들이 잘 보존되어있고 CRISPR의 옆에 항상 놓여있다는것이 밝혀졌다.

2005년에 전환적인 사실이 밝혀졌다. 즉 반복배열사이에 있는 비반복배열(사이배열, spacer)이 염색체외배열이거나 과취기원의 배열이라는것이 밝혀졌다. 이것은 CRISPR배열이 전사되며 그런 배열이 있는 세균에는 비루스가 감염하지 못한다는 사실과 연결시켜볼 때 매우 흥미있는 발견이었다. 그리하여 과학자들은 CRISPR가 면역기억으로서의 기능을 수행하여 방어물림새로 작용하며 개별적인 사이배열이 핵산들사이의 워트슨-크리크염기쌍형성에 의하여 세균과취감염에 대한 방어를 촉진시킨다고 예측하게 되었다.

2007년 식품회사에서 요구르트와 관련된 *Streptococcus thermophilus*를 연구하던 과학자들이 II형CRISPR계가 적응면역계로서 작용하며 Cas효소가 사이배열획득과 과취방어에 참가한다는것을 밝혔다. 2008년에 대장균에 있는 I형CRISPR에 대한 연구를 통하여 CRISPR 무리가 전사되어 저분자crRNA로 전환되며 Cas누클레아제활성이 발휘되게 한다는것이 밝혀졌다. 또한 같은해 *Staphylococcus epidermidis*에 있는 III형CRISPR계에 의하여 플라스미드 접합이 차단되며 Cas효소의 표적이 RNA가 아니라 DNA라는것이 밝혀졌다.

한편 2005년에 원사이배열(protospacer)의 옆에 있는 PAM(Protospacer-adjacent motif)의 중요성이 인정되기 시작하였다.

2010년에 CRISPR계의 기본기능과 물림새가 밝혀져 여러 연구집단들이 이 계를 여러 생물공학분야에 응용하였으며 대표적으로 과취에 저항성을 가진 요구르트생산성균주를 개발하였다. 그러나 아직은 게놈편집기술로까지는 발전하지 못하였다.

2010년에 II형CRISPR계의 기능물림새가 밝혀져 단순한 RNA-프로그램적인 DNA엔도누클레아제를 리용하여 게놈을 조작하는데 필수적인 기본성분들이 해명되었다. 그리하여 표적DNA를 절단하는데는 Cas유전자무리중에서 Cas9만이 필요하다는것, tracrRNA와 crRNA의 관계 등이 해명되었다. 2011년 CRISPR계를 다른 생물에 즉 *Streptococcus thermophilus*로부터 대장균으로 옮길수 있다는것이 증명되었다. 2012년에는 차르펜티어와 도우드나에 의하여 tracrRNA와 crRNA가 하나로 합쳐진 sgRNA(single guide RNA)상태에서도 기능을 수행한다는것이 증명되어 이 분야에서 중요한 전진이 이루어졌다. 2013년 두 연구집단에 의하여 CRISPR계가 포유동물세포에서도 동작한다는것이 발표[5, 6]되면서 게놈편집기술이 나오게 되었으며 현재 수많은 연구실들에서 이 기술이 널리 리용되고있다.

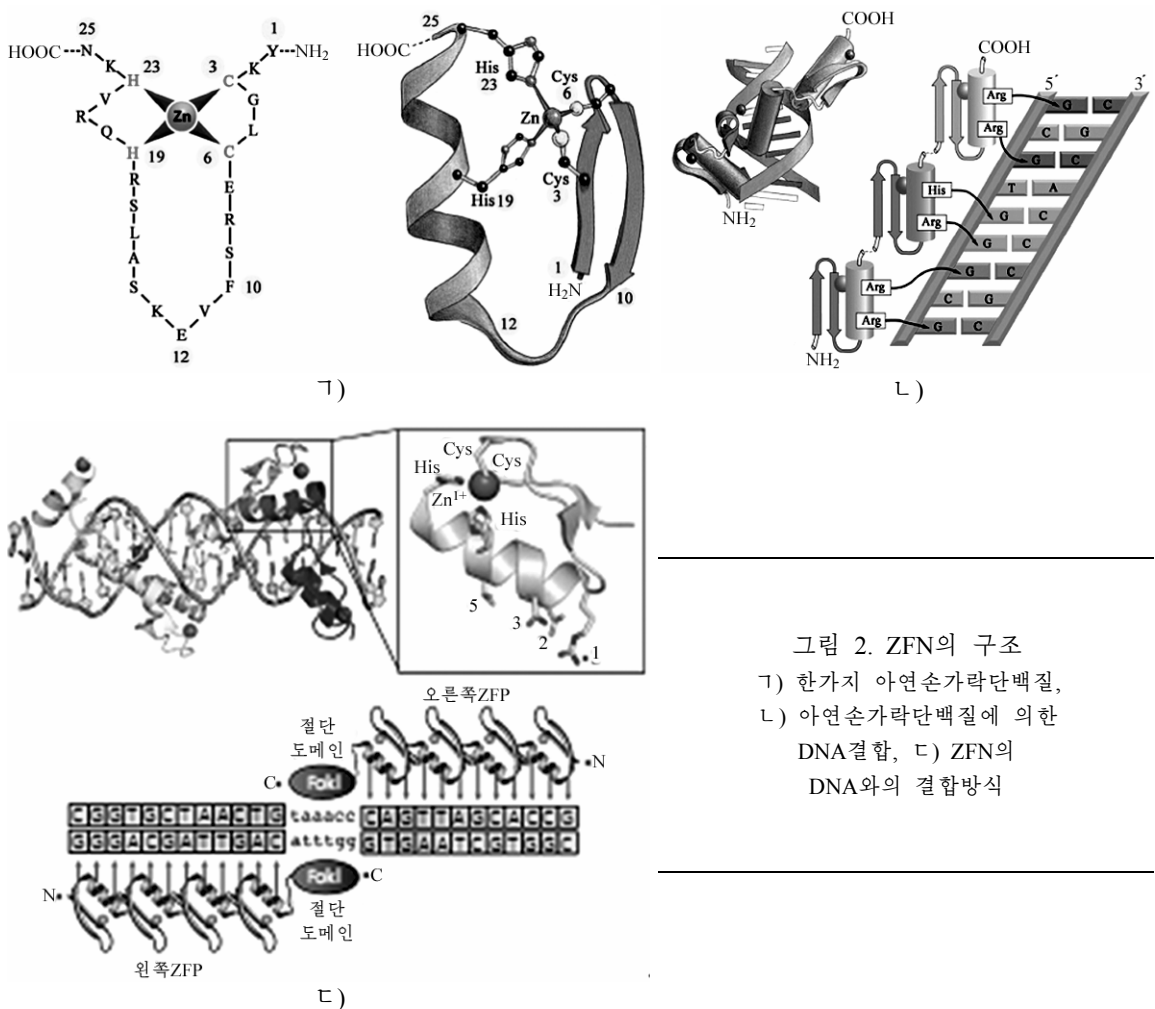
3. 게놈편집기술

게놈편집기술 혹은 게놈공학기술이란 게놈DNA를 절단하는 프로그램적인 누클레아제를 리용하여 게놈의 목적하는 배열을 세포내에서 편집하는 기술이다. 즉 프로그램적인 누클

레아제를 리용하여 게놈의 목적하는 부위에 DSB가 생기게 하여 재조합률을 비약적으로 높이고 그 부위에서 세포의 자연적인 오유생성비상동말단연결(NHEJ)에 의하여 1개이상의 누클레오티드가 탈락 또는 부가되게 하거나 목적하는 누클레오티드를 다른 누클레오티드로 바꾸며 상동재조합에 의하여 목적하는 외래단편이 그 부위에 끼여들어가게 하는 기술이다. 그러므로 여기서 기본은 어떻게 하면 게놈의 목적하는 부위에 DSB가 생기게 하겠는가 즉 프로그램적인 누클레아제를 개발하여 리용하는것이다. 그 효소에 따라 크게 4가지 즉 ZFN법, TALEN법, 메가누클레아제법, CRISPR법이 있다.[7]

1) ZFN법

이 기술에서는 진핵생물의 전사조절인자에 있는 아연손가락도메인의 구조를 리용한다. 아연손가락도메인은 약 30개의 아미노산으로 되어있고 3bp의 배열을 특이적으로 인식한다.(그림 2) 따라서 이 도메인을 실례로 6개 직렬로 연결하면 18bp의 배열을 인식하여 결합할수 있으며 여기에 DNA절단효소인 FokI의 누클레아제도메인을 연결하여 DNA를 절단하게 하였다.(ZFN) 따라서 게놈에서 목적하는 임의의 배열에 대하여 프로그램적으로 DNA를 절단할수 있는 수단이 마련되였다.[9]



2) TALEN법

2010년에 식물의 병원성세균인 *Xanthomonas*에서 발견된 DNA인식단백질(TALE)에 있는 DNA결합도메인은 33~35개의 아미노산으로 되어있고 매 도메인이 1bp의 배열을 인식하여 결합한다. 이러한 도메인을 여러개 연결하면 특이적인 배열을 인식하게 할수 있으며 C말단에 FokI의 뉴클레아제도메인을 붙여 절단하게 한다.(TALEN, 그림 3) 따라서 18bp의 배열을 인식하게 하려면 이 도메인을 18개 직렬로 연결하면 된다. 이것이 두번째로 되는 프로그램적인 뉴클레아제이다.

이렇게 프로그램적인 뉴클레아제로서 ZFN, TALEN 등이 있지만 일련의 결합이 있다. 우선 그것들이 모듈구조로 되어있으므로 매 도메인들사이의 호상작용에 의하여 문맥에 따라 배열결합특이성이 달라지고 다음으로는 기능적인 ZFN, TALEN을 설계하여 조립할 때 DNA결합특이성을 확인하는데 많은 시간과 품이 들며 끝으로 하드웨어와 소프트웨어가 하나로 일체화된것으로 하여 목적하는 DNA배열에서 한 뉴클레오티드만 달라져도 새로운 ZFN, TALEN효소를 설계하고 발현시켜 확인해야 하는 등 리용에서 불편한 점이 많았다. 그리하여 보다 값죽고 편리하고 쉬운 방법이 요구되었다.[9]

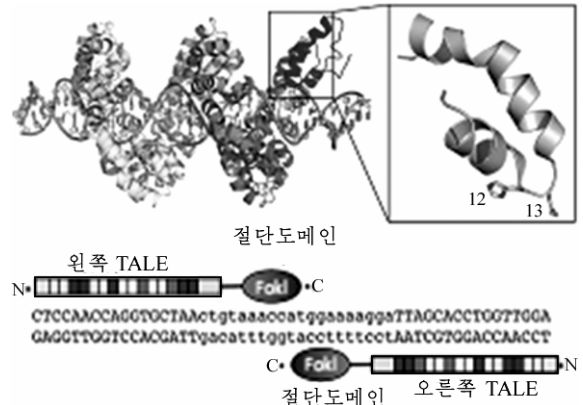


그림 3. TALEN의 구조

3) CRISPR법

세균의 면역계로서의 CRISPR/Cas계 세균의 면역계로서의 CRISPR/Cas를 보면 세균의 게놈에는 CRISPR자리가 있으며 외래DNA가 들어오면 Cas단백질이 그것을 절단하여 단편으로 만들고 그중 어느 한 배열이 CRISPR자리의 반복배열사이에 사이배열로 삽입된다. 그후 그 DNA를 가진 비루스에 감염되면 CRISPR자리가 전사되어 crRNA가 만들어지고 그것이 tracrRNA 및 Cas와 복합체를 형성하여 외래DNA에 있는 상동배열을 표적으로 하여 그것을 절단해버린다.(그림 4) 즉 CRISPR/Cas계는 세균이 외래DNA를 《기억》하여두었다가 그것이 다시 들어오면 격파하는 면역계이다.[1]

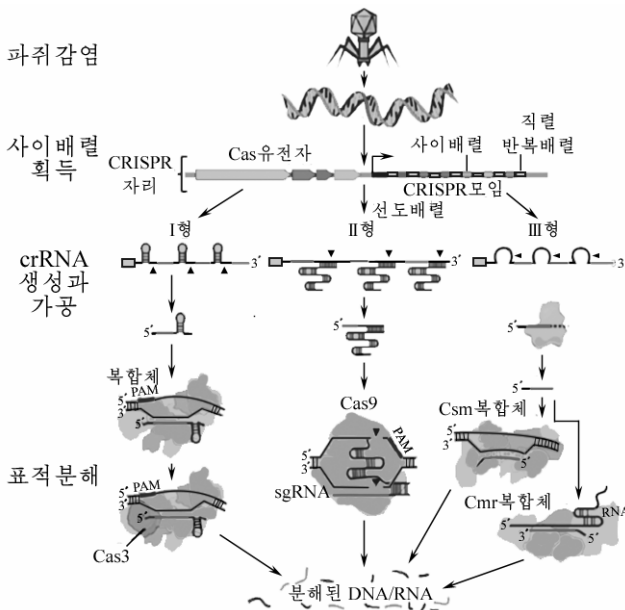


그림 4. CRISPR/Cas계의 면역작용의 원리와 형태

CRISPR에 기초한 게놈편집기술 CRISPR법은 초기에 일명 CRISPR/Cas9 법이라고 하였지만 그후 Cpf1이나 FnCas9와 같이 보다 우월한 뉴클레아제

가 개발되면서 간단히 CRISPR법이라고 한다. 이 기술은 매우 쉽고 값죽으며 정확도가 높은것으로 하여 게놈편집기술의 기본기술로 되고있으며 이 기술이 개발되면서 세계적으로 게놈편집기술이 보편화되었다.

CRISPR/Cas계에는 I, II, III, IV, V형이 있는데 II형계가 매우 단순하고 쓰기 편리한것으로 하여 게놈편집기술에서 기본수단으로 리용된다.

II형CRISPR/Cas계에서는 사이배럴부분이 전사되어 생긴 crRNA가 다른 부분에서 전사된 tracrRNA와 상보적결합을 통하여 특이적인 복합체를 이루고 이것이 Cas9단백질과 결합하여 게놈DNA에 있는 crRNA와 상보적인 부분을 절단한다. 한편 Cas9단백질은 crRNA와 tracrRNA의 복합체만이 아니라 그것을 하나로 연결시켜 만든 sgRNA와도 결합하여 작용한다. 따라서 이것을 리용하여 게놈배렬을 편집할 때에는 실험자가 목적하는 게놈DNA배렬에 해당하는 sgRNA를 설계하여 Cas9단백질의 유전자와 함께 1개의 운반체로 세포내에서 발현되게 하면 된다.(그림 5)

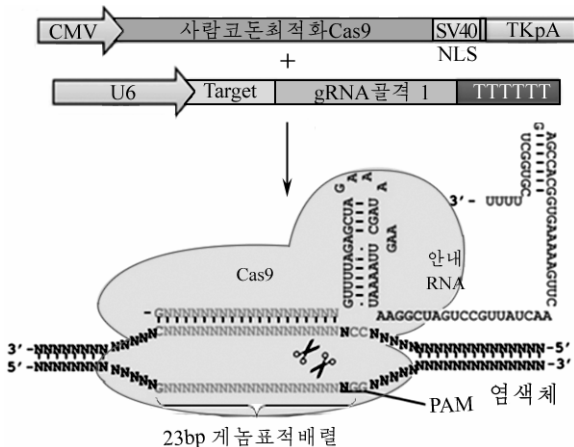


그림 5. CRISPR법의 작용모식도

에 외래DNA단편이 삽입되기도 한다.

gRNA를 설계하는 경우 그 길이는 약 19~20bp이며 3'말단에 PAM(Protospacer Adjacent Motif)배렬이 반드시 있어야 한다. PAM은 Cas단백질이 자기의 기능을 수행하는데서 필수적인 배렬이며 Cas9인 경우 5'-NGG 또는 5'-NAG이다. 인간게놈에서 5'-NGG는 평균 8bp에 한번씩 나타난다.

Cas9는 원래 *Streptococcus pyogenes*기원(따라서 SpCas9라고도 함)이므로 진핵생물에서 발현시키는 경우 핵국재신호(NLS)배렬과 폴리A배렬을 붙여주고 해당 생물의 코돈에 맞추어 발현시켜야 한다.

게놈편집기술에서 현재 제기되는 기본 문제점은 표적외효과이다. Cas9는 gRNA와 5

그러면 목적하는 게놈배렬에 DSB가 도입되고 그것이 NHEJ물림새에 의하여 세포내에서 자연적으로 수복되면서 그 부위에 1개이상의 누클레오티드가 삽입되거나 결실되며 그러면 그 부위가 변이된다. 그 부위가 단백질을 암호화하는 엑손부분에 해당 경우에는 읽기틀이 달라지면서 단백질이 만들어지지 않거나 변이단백질이 만들어지므로 해당 유전자가 파괴되게 된다.(그림 6) 한편 sgRNA와 Cas9가 발현되게 하고 동시에 외래DNA단편을 함께 넣어주면 목적하는 부위

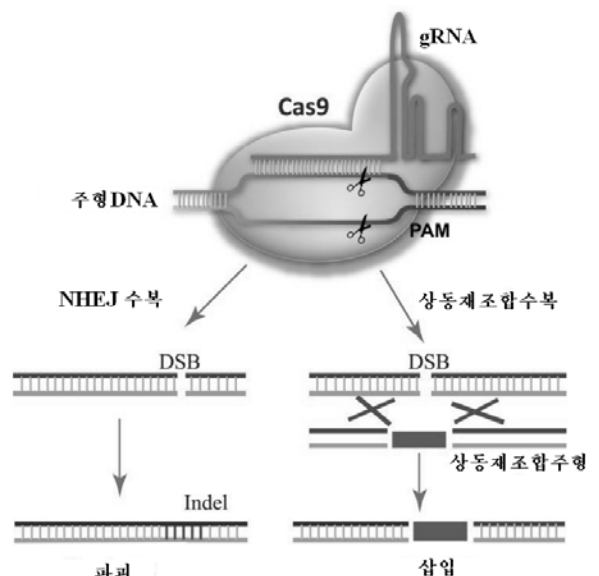


그림 6. CRISPR법의 작용원리

개의 뉴클레오티드가 차이나도 표적배열을 절단한다. 이러한 표적외효과로 하여 현재 게놈 편집기술은 그 리용이 제한을 받고있다. 그러나 최근에 Cas9-HF1, eCas9(1.1), HypaCas9 등이 개발되면서 Cas9의 특이성이 높아지고있으며 그외에도 Cas9니카제법을 비롯하여 표적외효과를 최대로 줄이기 위한 여러가지 방법이 연구되고있다.[2, 7, 9]

CRISPR/Cas9이외의 뉴클레아제들 CRISPR에 기초한 현재의 게놈편집기술은 매우 우월한 수단이지만 역시 결함이 있다. 현재의 게놈편집기술은 주로 결실/삽입에 기초하여 유전자나 DNA배열에 변이를 도입하여 기능을 파괴시키는것이 기본이다. 그리고 그것도 임의의 결실/삽입에 기초하므로 실험마다에서 재현성이 없다. 그러나 몇개 뉴클레오티드를 결실/삽입시켰다고 하여 곧 편집인것은 아니다. 비유적으로 책의 한페이지를 없앴다고 하여 그 책의 편집이 완성된것은 아니다. 더 나아가서는 게놈DNA배열에서 필요한 염기를 다른 염기로 바꾸거나 필요한 DNA단편을 추가하며 결실/삽입도 재현성있게 진행되게 하여야 한다. 또한 현재의 Cas9는 sgRNA설계에서 PAM배열이 반드시 있어야 하므로 배열설계에서 목적하는 임의의 배열을 표적으로 할 때 제한성이 있다. 따라서 현재 새로운 Cas단백질을 찾아내거나 만들어내기 위한 연구가 치열한 경쟁속에 벌어지고있다.

실제로 현재의 Cas9단백질은 너무 커서(1 338~1 438개 아미노산) 보통 유전자치료의 운반체로 쓰이는 비루스운반체에 그 유전자를 넣을수 없다. 그리하여 2015년 12월 *Staphylococcus aureus*에서 크기가 SpCas9의 약 3/4이면서도 게놈편집효률이 같은 SaCas9(Cpf1)가 발견되었으며 *Francisella novicida*에서도 유용한 Cas9(FnCas9)가 발견되었다. 그리하여 Cpf1유전자를 유전자치료에 널리 쓰이는 비루스에 넣어 흰생쥐에서 듀센근디스트로피의 원인유전자를 정정하는데 리용되었다.

한편 C2c2(혹은 Cas13)이라는 새로운 효소가 발견되었는데 이것은 DNA가 아니라 RNA를 절단하며 따라서 2017년에 CRISPR/Cas13을 리용하여 식물에서 RNA비루스를 방어하는 기술이 개발되었다.

한편 Cas9를 변화시켜 절단기능은 없고 여기에 DNA의 문자를 다른 문자로 바꾸는 효소를 연결하여 2016년에는 게놈의 목적하는 부위에 있는 C를 T로, 2017년에는 게놈에서 목적하는 부위의 A를 G로 변화시키는 염기편집기술이 개발되었다. 이 기술이 림상에 도입되면 32 000가지의 점변이에 의한 유전병중 각각 절반을 치료할수 있는 전망을 가지고있다.

2016년 5월에 완전히 새로운 게놈편집체가 개발되었다. 아고나트족에 속하는 NgAgo라는 단백질은 안내RNA나 특이적인 PAM에 대한 요구도 없이 짧은 DNA배열만 있으면 그것에 상보적인 배열을 프로그램적으로 절단한다. 이것은 세균에서 발견된 단백질이다.

게놈편집기술에서는 프로그램적인 뉴클레아제가 기본이므로 앞으로 보다 유용한 Cas나 아고나트족에 속하는 새로운 Ago나 NgAgo가 계속 발견 및 개발되어 사람들이 요구하는대로 게놈배열을 마음대로 편집하게 될것이다.

4. 게놈편집기술의 응용

CRISPR에 기초한 게놈편집기술은 개발되자마자 곧 그것이 유전자공학기술과 맞먹는 매우 중요한 기술이라는것이 인식되어 세계적인 경쟁이 시작되었다. 세계는 앞으로 이 기술이 유전자공학기술과 마찬가지로 생명과학과 의학, 농업, 환경 등 인간생활의 모든 측면을

변화시킬 거대한 잠재력을 가진 기술로 보고 이에 대한 기초연구와 응용연구에 달라붙었으며 현재 생명과학은 게놈편집기술의 일대 전성기를 맞이하고있다.

1) 유전자공학과 게놈편집기술의 공통점과 차이점, 우월성

공통점 우선 개발경위가 비슷하다. 유전자공학도 세균에서의 제한—수식현상을 연구하면서 개발된것처럼 게놈편집기술도 세균의 면역응답을 연구하는 과정에 개발되었다. 이로부터 기초과학의 중요성을 다시한번 알수 있다.

다음으로 두 기술이 모두 DNA를 대상으로 하고있는것이다.

차이점 한마디로 유전자공학은 유전자를 대상으로 하여 그것을 마음대로 다루는 기술이라면 게놈편집기술은 게놈DNA를 대상으로 하여 그것을 마음먹은대로 조작하는 기술이다.

공정상으로 볼 때 유전자공학기술은 DNA단편을 대상으로 하여 시험관내에서 DNA를 절단하고 연결하거나 증폭하여 조작하고 그것을 다른 생물에 넣어주어 발현시킨다. 따라서 유전자공학에서는 DNA를 절단하는데 제한효소를 리용하며 기타 리가제와 PCR법 등을 리용하여 시험관에서 DNA를 조작하고 외래DNA를 다른 생물에 넣어준다.

그러나 게놈편집에서는 시험관내에서 프로그램적인 누클레아제를 만들어 혹은 CRISPR법인 경우 sgRNA배열만 설계하여 Cas9유전자가 있는 운반체에 삽입해주고 세포에 넣어만 주면 모든 과정이 세포내에서 자연적인 물림새에 의하여 진행되며 개변세포를 선별하기만 하면 된다.

CRISPR기술의 우월성 CRISPR기술은 유전자공학기술보다 여러 측면에서 우월하다.

우선 CRISPR법은 매우 쉽고 값죽다. 실례로 유전자공학기술의 하나인 표적유전자파괴법으로 흰생쥐에서 1개의 유전자를 파괴하는 경우 1년에 5만US\$의 원가가 든다. ZFN법을 리용하는 경우에는 6개월에 15 000US\$의 원가가 든다. 그러나 CRISPR법을 리용하면 몇주 동안에 100US\$의 원가면 얼마든지 1개의 유전자를 파괴할수 있다.

다음으로 CRISPR법을 리용하는 경우 한번에 수십개의 유전자를 동시에 편집할수 있다. 실례로 표적유전자파괴법이나 ZFN법, TALEN법으로는 한번에 1개의 유전자밖에 파괴하지 못하지만 CRISPR법으로는 한번에 수십개, 최고 62개의 게놈부위를 편집할수 있다.

또한 게놈편집기술의 효율이 매우 높다. 게놈편집기술은 게놈에 DSB가 생기면 재조합률이 비약적으로 높아진다는 사실에 기초하고있는것으로 하여 편집률이 30~80%에 이르고있다. 그러나 표적유전자파괴법에서는 변이률이 $10^{-9}\%$ 로서 너무도 낮다.

게놈편집기술에서는 게놈편집의 정확성이 매우 높다. 지난 시기 유전자치료나 유전자전이식물에서는 목적하는 유전자단편이 게놈의 임의의 부위에 제멋대로 삽입되었다. 그러나 게놈편집기술을 리용하는 경우에는 목적하는 유전자단편을 사람이 목적하는 게놈의 부위에 정확히 삽입시킬수 있다.

또한 게놈편집기술은 진정세균과 고세균, 진핵생물 등 지구상의 모든 생물계에 적용할수 있다. 실례로 유전자공학기술의 하나인 RNA간섭기술은 위력한 기술이지만 진핵생물에 밖에 도입할수 없었다.

한편 게놈편집기술을 도입하는 경우 유전자공학과 관련한 설비만 있으면 되며 특별한 설비가 따로 요구되지 않는다.

다음으로 게놈편집기술을 식물에 도입하는 경우 매우 시끄러운 유전자전이식물의 조절통제를 벗어날수 있다. 현재 세계적으로 게놈편집작물은 고전육종법으로 만든 변이계통

과 같다고 보고 유전자전이작물로 취급하지 않고있으며 따라서 이것은 이 기술의 응용에서 매우 유리한 측면으로 된다.

2) 생명과학의 기초분야에서의 응용

게놈편집기술의 개발에 의하여 생명과학의 기초분야에서는 일대 변혁이 일어나고있다. 더우기 현재 수많은 생물들의 게놈배열이 결정되었지만 그 대부분의 기능이 밝혀지지 않은 조건에서 게놈배열의 기능을 연구할수 있는 매우 강력하고 간편하며 값죽은 기술이 개발된것으로 하여 앞으로 생명현상의 리해에서는 커다란 전환이 일어나리라고 보고있다.

유전자 혹은 게놈배열의 편집에 의한 기능해석 유전자의 기능을 해석하는데서 가장 위력한 수법은 그 유전자를 파괴하고 그것에 의한 표현형의 변화를 관찰하는 거꿀유전학적수법이다. 그런데 유전자를 파괴하는데 지금까지는 표적유전자파괴법과 RNAi법이 리용되었다. 물론 이 방법들이 위력한 방법들이지만 모든 실험수법이 고속대량화된 오늘의 요구를 더는 충족시키지 못하며 시간과 품이 많이 들고있다.

실례로 표적유전자파괴법은 목적하는 유전자가 호모로 파괴된 흰생쥐를 얻어내는데 1년이라는 세월이 요구된다. 그후 RNAi법이 개발되었지만 유전자의 발현억제가 일시적이고 불완전한것으로 하여 역시 제한성이 있었다. 그런데 CRISPR법에서는 단순히 20bp의 표적배열에 대하여 안내RNA를 설계하여 운반체에 넣어만 주면 목적하는 배열을 얼마든지 마음대로 편집할수 있다. 그러므로 목적하는 유전자를 매우 쉽게 파괴할수 있게 되었으며 따라서 현재 게놈이 밝혀진 모든 생물에서 전혀 기능을 알지 못하는 50%의 유전자들의 기능을 해석하고 비암호DNA의 기능을 밝히는데서 커다란 전진이 일어날것이다. 더우기 ENCODE계획에서와 같이 게놈의 매 염기배열의 기능을 해석하는데서 이 수법은 리상적인 방법으로 된다.[7]

CRISPR기술과 가시화, 후생연구에서의 리용 다른 응용분야로서 CRISPR/Cas계에서 Cas 효소의 DNA배열절단활성을 없애고(deadCas9, 간단히 dCas9라고 한다.) 여기에 여러가지 효과단백질들을 련결하여 리용하는 여러가지 기술이 개발되어 생명과학의 기초연구분야에서 커다란 변혁이 일어나고있다.

실례로 dCas에 GFP단백질을 련결하면 산 세포의 핵에서 자기가 목적하는 게놈DNA배열이 어디에 놓여있는가를 직접 눈으로 볼수 있다.

또한 CRISPR/dCas를 리용하여 게놈의 목적하는 배열에 그것이 결합하였을 때 RNA폴리메라제가 결합하는것을 차단하여 그것의 전사활성을 차단할수 있으므로 이것을 CRISPRi 기술이라고 한다.

또한 dCas에 메틸화효소를 결합시켜 게놈의 목적하는 배열이 메틸화되었을 때 표현형에서 어떤 결과가 얻어지는가 등 후생현상을 연구하는데도 리용되고있다. 이렇게 CRISPR 기술은 생명과학의 기초분야에서 특히 게놈의 기능연구에서 하나의 전환점으로 되는 수법으로 되고있으며 따라서 앞으로 이 분야에서의 커다란 전진이 예상되고 그러면 생명현상의 총설계도인 게놈을 완전히 리해하는데 큰 기여를 하게 될것이다.(그림 7)

모형동물의 제작 CRISPR/Cas9법으로 유전자전이동물모형을 신속하게 만들수 있게 되었다. 지난 시기에는 유전자공학적방법이 아무리 발전되어도 게놈배열을 마음대로 변화시킬수 없었고 가능하다고 하여도 매우 많은 품이 들었다. 그런데 사람의 병을 연구하는데서 유전자개변동물모형은 매우 중요한 의의를 가진다. 지난 시기에는 병을 연구할 때 해당한 병에 대하여 표현형적으로 류사한 모형을 만들뿐이었지만 이제는 환자집단에서 발견된 유전

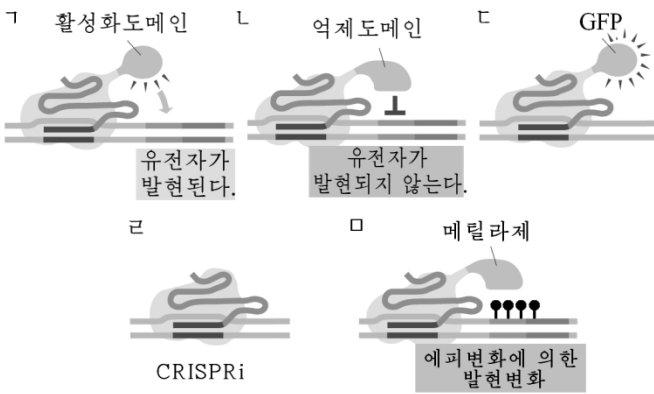


그림 7. CRISPR기술의 응용례

특히 이 기술로는 한번에 게놈의 여러 부위를 동시에 편집할수 있으므로 당뇨병이나 심장병, 정신분열증, 자폐증과 같은 다유전자병의 동물 및 세포모형을 만드는데서도 커다란 위력을 나타내고있다. CRISPR/Cas법 및 기타 게놈편집기술은 이미 줄말고기와 흰쥐, 흰생쥐, 초파리, 선충, 개구리 등 많은 생물들에 성과적으로 도입되어 모형생물이 만들어지고있다. 또한 CRISPR/Cas법으로 침팬지에서 목적유전자들을 개변하여 흰생쥐에서는 실현할수 없는 가짜약효과를 보기 위한 침팬지모형도 만들어졌다.

3) 의학, 농업 등에서의 응용

게놈편집기술에 의하여 의학분야에서 유전자치료의 방식이 달라지고있다. 전통적인 치료방법에서는 병의 증상을 일시적으로 개선하거나 치료인자를 게놈에 임의로 삽입하여 치료하려고 하였다. 그러나 ZFN과 TALEN 혹은 CRISPR를 리용하면 병의 원인을 게놈수준에서 정확히 수식하여 병의 증상을 영구적으로 제거할수 있다.(표) 지금까지 ZFN을 리용하여 X관련중증복합면역결핍증(X-linked severe combined immune deficiency: SCID), B형혈우병, 낫모양적혈구빈혈증, $\alpha 1$ -항트립신결핍증의 원인변이, 파킨슨병환자의 iPS세포에서 SNCA유전자에 있는 변이를 정확히 수복하였다. 한편 에이즈와 관련하여 HIV coreceptor C-C chemokine receptor type 5(CCR5)의 유전자를 변화시켜 HIV-1저항성을 부여하였으며 CRISPR를 리용하여 게놈에 삽입된 HIV비루스를 완전히 제거하였다. 이것은 이전의 약물로는 비루스의 증식을 억제할뿐이었다면 게놈편집기술로는 비루스를 완전히 제거하여 감염세포를 비감염세포로 전환시켰으므로 에이즈치료에서 하나의 혁명으로 되며 사람을 대상으로 한 첫 림상치료의 실례로 된다. 또한 치료용유전자를 게놈의 목적하는 곳에 안전하게 삽입시킬수 있으므로 단일유전자열성유전자병인 경우 즉 낭포성섬유증이나 낫모양적혈구빈혈증, 듀센근육발육이상과 같은 기능소실변이에 의한 병인 경우 CRISPR를 리용하여 원인변이를 정정할수 있다.

원인유전자가 한꼬빼만 되어도 병이 나타나는 우성음성병(실례로 트란스티레틴관련 유전성아밀로이드변성증이나 레틴티스색소증)에 대하여 해당 대립유전자를 불활성화시켜 치료효과를 얻을수 있다. 일부 단일유전자병이 게놈배열의 중복에 의하여 생겨나는데 CRISPR를 리용하여 치료할수 있다. 실례로 3번체반복배열병인 경우 두 부위에 동시에 DSB를 도입하여 그 부위를 떼버려 병을 치료할수 있다. 또는 PCSK9 혹은 안기오폠포에틴유전자를 결실시켜 스타틴에 저항성인 고콜레스테롤혈증이나 고지혈증을 치료할수 있다.

자변이를 그대로 모방하여 해당한 유전자변이를 신속히 모형화할수 있다. 실례로 지금까지는 흰생쥐를 리용하여 CCl₄으로 간염모형동물을 만든 다음 모든 간염약에 대한 효과를 검토하였다. 그러나 이제는 간염환자에게서 나타난 유전자변이별로 흰생쥐모형을 만들고 그것에 따르는 약물의 효과를 검토할수 있게 됨으로써 병의 분자생물학적연구와 약물개발에서 일대 전환이 일어나게 될것으로 보고있다.

표. 사람세포와 모형생물에 적용된 ZFN, TALEN, CRISPR법의 실례

수식 형태	생물	유전자	누클레아제
유전자파괴	사람	<i>CCR5</i>	ZFN
			TALEN
			CRISPR/Cas
	사람	<i>TCR</i> (T세포접수체)	ZFN
	줄말고기	<i>Gol</i> (Golden), <i>ntl</i> (꼬리없음), <i>kra</i>	ZFN
	돼지	<i>GGT1</i> ($\alpha 1,3$ -갈락토실옮김효소)	ZFN
		<i>LDLR</i> (LDL접수체)	TALEN
	소	<i>ACAN12</i> , <i>p65</i>	TALEN
	사람	<i>EMX1</i> , <i>PVALB</i>	CRISPR/Cas
	흰쥐	<i>IgM</i> , <i>Rab38</i>	ZFN
	애기장대	<i>ADH1</i> , <i>TT4</i>	ZFN
	선충	<i>Ben-1</i> , <i>rex-1</i> , <i>sdc2</i>	ZFN/TALEN
	햄스터	<i>DHFR</i>	ZFN
	초파리	<i>yellow</i>	ZFN
	벼	<i>OsSWEET14</i>	TALEN
유전자삽입	사람	<i>OCT4</i> , <i>PITX3</i>	ZFN/TALEN
		<i>CCR5</i>	ZFN
		<i>F9</i> (응고인자IX)	ZFN
	흰생쥐	<i>Rosa26</i>	ZFN
	사람	<i>AAVS1</i>	ZFN
			TALEN
			CRISPR/Cas
	사람	<i>VEGF-A</i>	ZFN
	줄말고기	<i>Th</i> (티로신히드록실라제), <i>fam46c</i> , <i>smad5</i>	TALEN
	강냉이	<i>IPK1</i>	ZFN
유전자교정	사람	<i>IL2RG</i>	ZFN
		<i>AIAT</i> ($\alpha 1$ -항트립신)	
		<i>HBB</i> (β -글로빈)	
	담배	<i>SNCA</i> (α -시누클레인)	ZFN
		<i>SuRA</i> , <i>SurRB</i> (아세토젖산합성효소)	
	초파리	<i>yellow</i>	ZFN

한편 2016년 8월에는 중국에서 CRISPR기술을 리용하여 T림과구의 PD-1유전자를 파괴하고 그것을 환자에게 넣어주어 사람의 폐암을 치료하는 림상시험이 진행되었다.

게놈편집기술에 의하여 장기이식용돼지육종에서 혁신이 일어나고있다. 이미 CRISPR기술을 리용하여 장기이식용돼지의 62개의 레트로바이러스와 20여개의 면역관련유전자들을 한번에 불활성화시켰다. 또한 CRISPR기술로 미오스타틴유전자를 변이시킨 개와 돼지가 만들어져 비육용으로 리용되고있다. 한편 CRISPR기술을 리용하여 돼지의 가장 심각한 전염병인 번식호흡증후군과 구제역병에 저항성인 돼지와 보통돼지보다 6배나 작은 애완용미니돼지, 뿔이 없는 소가 육종되었다.

한편 CRISPR와 ZFN, TALEN을 리용하여 벼와 강냉이, 밀, 보리를 비롯한 많은 알곡작물에서도 표적부위에 변이를 도입하여 병저항성이나 살초제저항성과 같은 유용한 형질을 부여하고있다. 실제로 떡가루병에 저항성인 밀과 오이, 로균병에 저항성인 오이, 손으로 다쳐도 색이 변하지 않는 버섯, 오래 보관하여도 쓴맛이 나지 않고 기름에 튀길 때 생기는 발암성물질인 아크릴아미드함량이 적은 감자, 올리브기름처럼 1가불포화지방산이 많은 콩, 그리고 에틸렌접수체유전자를 변이시켜 빨간 상태에서 오래 보관하여도 변하지 않는 도마도 품종을 개발하고있다.[8, 10] 특히 현재 이러한 유전자편집작물은 이전의 유전자재조합작물과는 다르므로 그것에 대한 규제조치가 완화될 전망이므로 그 응용속도가 더욱 빨라지리라 보고있다.[4]

4) CRISPR기술의 좋은 점과 나쁜 점

이 기술은 너무도 쉽고 정확하고 값죽은것으로 하여 생명과학분야에 급속히 파급되고 있는 한편 일부 애호가들까지 개입하여 이 기술을 리용하려고 하고있다.

실제로 바이오해커들이 이 기술을 벌써 리용하고있으며 한편 앞으로 이 기술이 테로분자들에게 악용되지 않으리라는 담보가 없는 조건에서 심각한 우려를 자아내고있다. 더우기 2015년 4월 중국에서 두 정자에서 유래된 계놈을 가진 배에 CRISPR기술을 리용하여 낫모양적혈구빈혈증과 관련한 유전자를 수식한 논문이 발표되면서 그 우려가 더욱 커졌다. 그리하여 세계적으로 이 기술의 룰리성, 안정성과 관련된 문제들이 심각하게 제기되어 여러 나라들에서 이것과 관련된 규제가 나오고 2015년 12월 계놈편집기술과 관련한 국제수뇌자회의에서 이 문제가 심각하게 토의되었을뿐아니라 성명까지 발표되었다. 이 회의는 아실로마 국제회의와 맞먹는 역사적인 회의로서 평가[3]되고있다.

오늘 세계적으로 이러한 CRISPR기술을 둘러싸고 치열한 연구 및 특허싸움이 일어나고 수많은 회사들이 우후죽순처럼 생겨나 막대한 돈을 이 분야에 투자하고있다.

우리모두는 과학으로 비약하며 첨단돌파전을 힘있게 벌릴데 대한 경애하는 최고령도자 김정은동지의 말씀을 높이 받들고 우리 나라에서 하루빨리 계놈편집기술을 농업과 의학 등에 도입하기 위한 연구를 심화시켜 과학기술강국건설에 적극 이바지해나가야 한다.

참 고 문 헌

- [1] 허명식; 유전자와 계놈, 김일성종합대학출판사, 513~633, 주체105(2016).
- [2] B. Alberts et al.; Molecular Biology of the Cell, Garland Science, 439~528, 2015.
- [3] D. F. Maron; Sci. Am., 1, 42, 2016.
- [4] Y. Ding et al.; Front. Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2016.00703, 2016.
- [5] P. Mali et al.; Science, 339, 823, 2013.
- [6] L. Cong et al.; Science, 339, 819, 2013.
- [7] M. Knox; Sci. Am., 12, 48, 2014.
- [8] S. S. Hall; Sci. Am., 3, 56, 2016.
- [9] H. Ledford; Nature, 536, 136, 2016.
- [10] L. Arora et al.; Front. Plant Sci. 8:1932. doi:10.3389/fpls.2017.01932, 2017.

Genome Editing Technology and Its Application

Ho Myong Sik, Kim Sun Ui

The recent rapid advances in genome editing technologies based on the CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9(CRISPR-associated protein 9) system allows biologists to edit genomic DNA of any cell in easy, precise and specific way, having a great potential for crop improvement, medicament development and gene therapy. Cas9 can be guided to specific locations within complex genomes by a single guide RNA. Using this system, DNA sequences within the endogenous genome are now easily edited or modulated in virtually any organism of choice. In this review, we first briefly summarize the development and applications of ZFN, TALENs and CRISPR/Cas9-mediated genome editing technologies; compare the advantages and constraints of each method, particularly, discuss the expected applications of CRISPR/Cas9 techniques in the field of site-specific genome modification, crop improvement and gene therapy; finally, propose the future directions and perspectives for readers to make the choices. Derived from a remarkable microbial defense system, CRISPR/Cas9 is driving innovative applications from basic biology to biotechnology and medicine.

Key words: genome, genome editing, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9, Cpf1, Cas13