

[에세이 본문]

응모 분야	노벨생리의학상
추천 대상자	Jennifer A. Doudna

(유전학과 유전자 편집의 역사)

1865년 유전학의 선구자인 멘델이 완두콩을 이용한 실험을 통해 유전의 법칙을 확립한 이래로 William Bateson이 1905년 “유전학”이란 용어를 만들면서 본격적인 유전학의 시대가 도래하였다. 이후 MacLeol와 McCarty가 1944년 DNA를 입증하였고 1953년 Watson과 Crick이 DNA의 이중나선 구조를 밝히면서 본격적인 유전학의 시대가 개막이 되었고 유전학연구는 박차를 가하게 되었다.

1970년 Hamilton Smiths 연구실에서는 DNA의 특정 염기서열을 절단할 수 있는 제한효소를 발견하면서 유전자 편집까지 가능하게 되었다. 그러나 이 제한효소의 경우 6개의 염기서열만 인식할 수 있었기 때문에 자를 수 있는 염기는 ‘A, G, C, T’ 이 네 염기의 6제곱으로서 4096개의 염기서열뿐이었고 인간의 DNA가 32억 개인 반면 이들이 인지할 수 있는 염기서열은 극히 일부였기 때문에 정확성에서 굉장히 떨어져 고작 수천개 내외의 염기서열에서만 사용이 되었다. 물론 이후 DNA를 더 정교하게 편집하기 위한 도구들이 발견되지 않았던 것은 아니다. 제한효소의 발견이후 1985년 제 1세대 유전자 가위라고 불리는 ZFN(Zinc Finger Nuclease)가 발견이 되었고 이후 2009년 제 2세대 유전자 가위라고 불리는 TALEN(Transcription Activator Like Effector Nuclease)이 발견이 되었다. 그러나 이들이 인식할 수 있는 서열도 10개 내외의 염기였기 때문에 확률적으로 제한효소에 비해 그 정확성이 크게 증가하기는 하였으나 인간의 DNA를 감당하기에는 부족하였다. 인간의 DNA를 절단하기 위해 수천 개가 넘는 유전자 가위를 사용해야 했던 그때 비로소 2012년에 이르러서야 그 해결책이 등장하게 된다. 바로 CRISPR라는 제 3세대 유전자 가위의 등장이다.

CRISPR, 그 위대한 발견

CRISPR는 원래부터 유전자 가위로 발견된 것은 아니었다. 1987년 일본 연구진에 의해 대장균의 유전체에서 palindromic(헤어핀 구조를 형성할 수 있는)한 반복서열이 존재한다는 사실이 확인되었다[1]. 이는 발견 당시에는 그 기능을 알지 못하는 정체불명의 서열로서 크게 주목 받지 못하였다. 1994년 최초의 세균 유전체지도가 나온 뒤 과학자들은 여러 세균에서 공통적으로 이러한 반복서열을 발견하면서 이에 주목하기 시작했다. 2002년에 이르러서는 대장균의 경우 유전체의 약 50%가 이러한 반복서열로 구성되어 있으며, 고세균의 경우 종에 따라 유전체의 최대 90% 가량을 차지하는 경우도 존재한다는 것이 밝혀졌다[2]. 하지만 당시 과학자들은 이 반복된 서열의 기능은 몰랐지만 이들이 유전체 상에서 특정한 군집을 이룬다는 사실에 착안하여 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)라고 명명하였고, 이와 관련된 유전자들을 Cas(CRISPR-associated genes)라고 부르기 시작했다. 이후 2005년에는 반복적인 염기서열(repeat) 사이의 중간 염기서열(spacer)들이 바이러스의 유전자들과 상당 부분 일치한다는 것이 3개의 그룹에 의해 독립적으로 발견되었는데, 이를 근거로 CRISPR/Cas 시스템이 면역과 관련되어 있을 가능성이 제시되었다[3].

CRISPR와 Cas 단백질이 박테리아의 후천적 면역 시스템(adaptive immune system)과 관련이 있다는 것은 2007년에 와서야 실험적으로 증명되었다[4]. 이 실험은 농업 회사에서 요거트나 치즈를 만드는데 사용하는 streptococcus thermophilus 균의 면역을 증진시키려는 목적으로 진행되었다. 먼저 S. thermophilus 균을 잘 감염시키는 박테리오파지를 균에 감염시키고 시간이 지나도 죽지 않고 살아있는 균들을 골라내 그들의 DNA 서열을 분석해 보았더니, CRISPR 부분에서 파지의 DNA 염기서열이 검출되었다. 또한 CRISPR에 들어간 파지의 염기서열에 따라, 면역성을 가지는 파지의 종류도 달라진다는 것 또한 밝혀졌다. 즉, CRISPR의 spacer에 특정 파지의 DNA가 들어가면 박테리아가 그 파지에 대해 면역성을 가지게 된다는 사실이 실험적으로 증명된 것이다[5]. 그러나 이때까지도 CRISPR가 유전자 가위로 쓰이던 것은 아니었다. CRISPR가 본격적으로 유전자 가위로 쓰이게 된 것은 3년 전 캘리포니아 Berkeley 대학의 한 여성 생화학자의 발견 덕분이었고 그녀의 이름이 바로 Jennifer A. Doudna이다

Jennifer A. Doudna : 차세대 유전자 편집 기술인 CRISPR/Cas9 시스템을 규명한 과학자

Jennifer는 7살에 아버지와 어머니를 따라 하와이의 hilo로 이주를 갔고 그곳에서 유년시절을 보냈다. 그녀는 그곳에 사는 다른 아시아인들과는 달리 금발에 푸른 눈을 가지고 있었고 다른 아이들보다 키가 컸다. 이에 남들과 다르다는 생각을 가지게 된 그녀는 그녀 스스로가 괴물 같다고 느끼며 다른 아이들과 쉽게 어울리지 못하였다. 그녀는 아이들과 노는 대신 책을 많이 읽게 되었고 이렇게 책을 좋아하게 된 그녀는 과학과 가까워지게 되었다. 그러던 중 그녀는 우연히 정상세포에서 암세포로의 변이를 연구한 어떤 여성과학자의 강의를 듣게 되었다. 이 강의에 큰 충격을 받은 Jennifer는 그녀와 같은 과학자가 되기로 마음을 먹는다. 이후 캘리포니아 Pomona 대학에서 생화학을 전공하고 Havard 대학원으로 진학하게 된다.

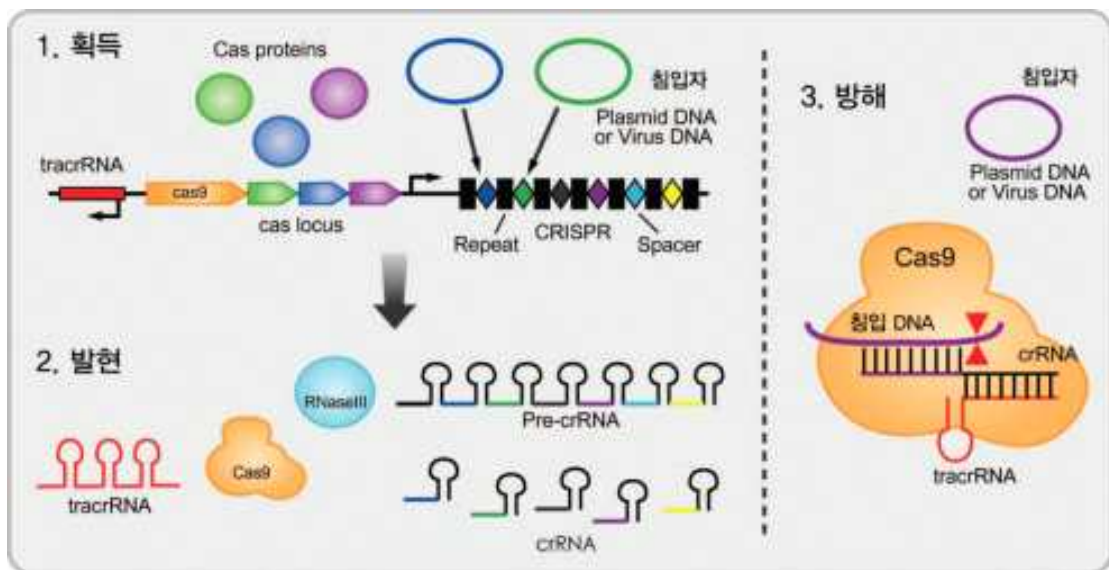
대학원에서의 그녀의 스승은 RNA에 대한 연구를 진행하고 있었다. 당시 일부 과학자들은 DNA가 아닌 RNA가 초기 생명체의 근원이라고 생각하였다. 그래서 그녀는 이것을 연구하게 되었고 이 이론에 대한 증거를 제시하면서 자가 복제가 가능한 효소활성을 나타내는 RNA를 연구하여 박사 학위를 받게 된다. 이후 그녀는 Colorado의 연구원으로서 X-선 회절을 이용하여 RNA의 3차원 구조를 밝히는 연구를 하며 이를 성공적으로 이끌고 이후 RNA의 구조적이고 생화학적인 연구는 그녀의 주 종목이 되었다. 2000년 예일대학의 교수로 있다가 2002년 Berkeley 대학으로 이동하게 되면서 2005년 당시 Berkeley에서 산성폐광에 사는 특이한 미생물의 DNA를 sequencing하는 환경 연구원과 만나게 된다. 그러면서 이러한 미생물의 유전자에 특이한 반복서열이 있음을 발견하게 되는데 이것이 바로 그녀와 CRISPR의 첫 만남이었다.

발견당시만 해도 CRISPR의 기능을 알 수 없었으나 이후 몇 년 사이 CRISPR이 박테리아의 면역시스템이라는 것이 밝혀지게 된다. 이후 그녀는 2011년 초 학회에서 스웨덴의 Umea대학의 미생물학자를 만나게 되는데 이 과학자가 어떤 박테리아 종의 간단한 CRISPR 시스템을 기반으로 새로이 발견한 것을 보고 박테리아 전문가들과 함께 일하게 된다. 이 전문가들과 일하면서 그들은 놀라운 사실을 알아낸다. 박테리아에 의해 만들어진 Cas9이라고 불리는 단백질이 두 조각의 RNA와 일하며 DNA의 특정한 장소를 절단한다는 것과 이 두 조각의 RNA가 하나로 연결되어도 여전히 그 기능을 할 수 있다는 것을 밝혔다. 이들은 이

세포의 면역체계가(즉 CRISPR가) 단순히 바이러스를 죽이는 것뿐만 아니라 이전의 다른 기술들보다 훨씬 쉽게 유전자를 편집할 수 있다는 것을 깨달았다. 이것이 2012년의 일이었으며 불과 3년 전의 발견으로 그녀는 유명인사가 된다. 그녀가 발견한 것은 마치 컴퓨터의 사용자가 단어를 마음대로 편집할 수 있는 것처럼 아주 쉽게 생물의 DNA를 바꾸는 기술이었다. CRISPR/Cas9 시스템이라고 불리는 이 유전자 편집 기술은 이미 많은 실험실에서 널리 연구되고 있으며 과학자들은 이 기술로 인해 언젠가는 결함이 있는 인간의 DNA를 편집하여 현재 기술로는 치료하기 힘든 유전적 질병을 치료하는 가능성의 시대가 열릴 것이라고 기대하고 있다[6].

Jennifer가 주목한 CRISPR/Cas 시스템 Type II

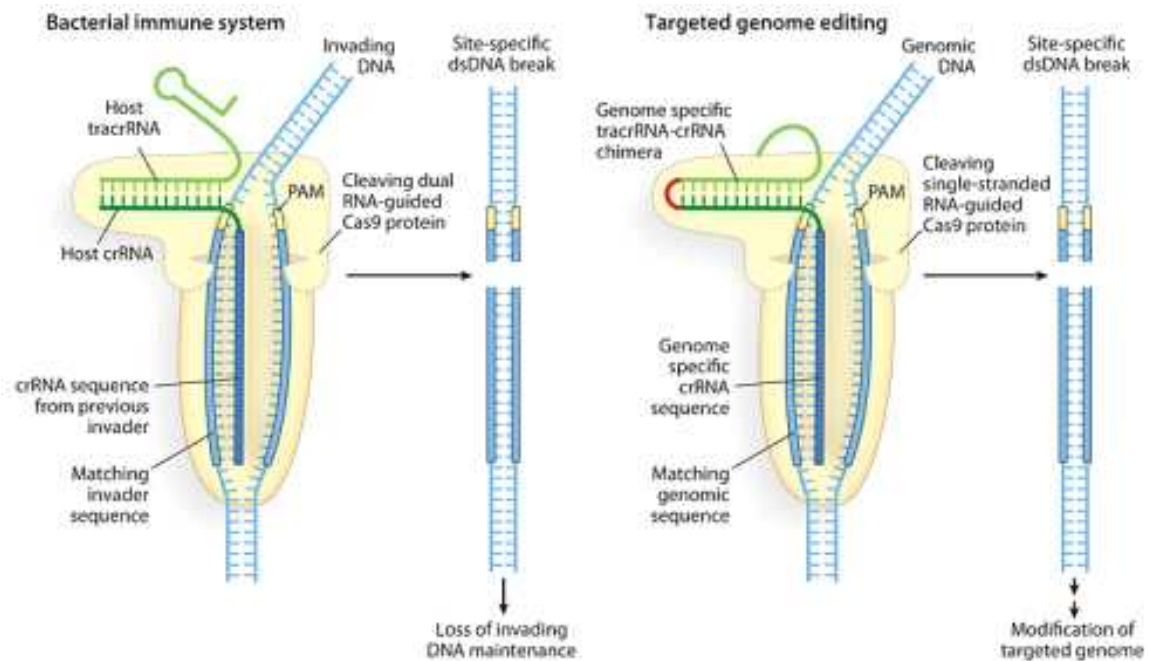
지금까지 여러 가지 타입의 CRISPR/Cas 시스템 작동원리가 규명되었다. 이러한 CRISPR 시스템은 계통발생(phylogeny), 염기서열(sequence), 위치(locus), 내용물(content) 등에 따라서 크게 Type I, II, III 세 가지의 분류로 나뉘어진다. Jennifer는 그중에서 Cas9 단백질만이 관여하여 DNA를 절단하게 되는 Type II CRISPR/Cas 시스템에 주목했다. Type II 시스템은 아래의 그림에서 보이는 것과 같이 세 단계로 구성된다.



1. 획득 : 외부로부터 들어온 침입자의 DNA 염기서열의 일부가 CRISPR 부분의 spacer에 삽입된다.
2. 발현 : CRISPR 부분으로부터 전사되어 만들어진 전사체인 pre-crRNA가 *tracrRNA*(trans-activating crRNA)와 Cas단백질, RNase III에 의해 절단되어 crRNA(CRISPR RNA)가 생성된다.
3. 방해 : Cas9, *tracrRNA*, crRNA가 복합체를 이루어, crRNA와 상보적인 염기서열을 가진 침입자의 DNA를 잘라 침입을 방지한다.

이러한 Type II 시스템은 DNA를 절단하는데 있어서, Cas9 하나의 단백질만을 필요로 하고, 정확한 위치에서 절단을 일으킨다는 점에서 유전자 가위 기술에 가장 적합한 것으로 보인다[7].

Jennifer는 이러한 박테리아의 면역체계인 Type II CRISPR 시스템의 Cas9 단백질을 이용하여 차세대 유전자 가위 기술을 개발하였다. 아래의 그림을 보면 왼쪽은 박테리아의 면역 체계인 Type II 시스템을 보여주며, 오른쪽은 Jennifer의 연구팀이 이를 응용하며 만들어 낸 유전자 조작 시스템을 보여준다. 이는 박테리아의 면역 체계에서 DNA가 절단되는 과정을 변형시켜, 유전체상의 절단하고자 하는 표적서열에 특이적인 서열을 갖는 crRNA와 tracrRNA를 한가닥의 RNA로 연결한 것이 특징이다. 이 연결된 한가닥 RNA는 Cas9과 함께 작용하여 유전체 상의 절단하고자 하는 서열만을 특이적으로 정확히 절단하게 된다. 이것이 Jennifer의 연구팀이 개발해 낸 유전자 가위 기술이다.



이러한 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자 가위 기술은 위의 그림에서 보이는 것과 같이 작은 한가닥 RNA와 Cas9 단백질을 이용하여 손쉽게 유전자를 편집할 수 있으며, 또한 RNA 조각을 이루는 염기서열의 조합에 따라 절단하고자 하는 위치의 서열만을 특이적으로 인식하여 정확히 절단한다는 점에서 기술의 정확성이 매우 높다는 것이 특징이다.

이전까지의 유전자 가위 기술들은 유전체상의 표적 염기서열에 따라 해당 단백질을 각각 만들어야 하지만 Jennifer의 연구팀이 개발한 유전자 가위 기술은 Cas9 단백질은 고정되어 있고, 작은 RNA만 교체하면 새로운 유전자 가위를 쉽고 빠르게 만들 수 있다. 기존에 있던 1세대 유전자 가위인 ZFN나 2세대 유전자 가위인 TALEN의 경우, 유전체에 존재하는 2만여 개의 유전자 각각을 타겟으로 할 수 있는 라이브러리를 구축하려면 각각의 단백질을 전부 따로 클로닝 해야 하기 때문에 시간과 노력, 비용이 많이 들어가게 된다[8]. 반면 CRISPR를 이용할 경우 훨씬 적은 노력과 비용으로 라이브러리를 구축할 수 있다.

실제로 인간 유전체 전체를 타겟으로 하여 라이브러리를 만들어 Knock-out screening을 수행한 연구가 성공적으로 진행되었다. 이전에는 제약회사를 비롯한 다수의 연구진들이 신약 개발의 타겟 선정을 위해 siRNA 라이브러리를 이용한 Knock-out screening 방법을 주로 활용하였는데, 그 결과 siRNA의 오작동 효과와 다수의 위양성, 위음성 결과들이 보고된 바 있다[9].

CRISPR/Cas9를 이용한 차세대 유전자 가위 기술의 응용분야

CRISPR/Cas9시스템이 2012년 첫 등장을 한 이후 유전자의 선택적인 편집이 가능하게 되었고[10] 세포나 유기체를 활용한 CRISPR/Cas9시스템 실험은 체내실험과 체외실험 모두 성공적으로 그 시스템이 증명이 되었다. 무엇보다 ZFN와 TALEN보다 그 효율성은 높으면서 비용은 절감할 수 있다는 것이 CRISPR의 최대 장점이다. 따라서 CRISPR는 앞으로 많은 분야에서 활용될 것으로 기대가 되는데, CRISPR가 실제로 활용된 그 예들을 설명해보려 한다.

1. 치료목적의 사용

현재 Editas라는 벤처 기업은 2013년 4300만 달러 규모에 설립이 되었고 이 기업의 목표는 CRISPR/Cas9을 이용하여 DNA의 단일 염기쌍이상을 편집하여 치료법을 개발하는 것을 목표로 하고 있다. 이들은 환자의 골수에서 채취한 조혈 모세포를 harvest하여 CRISPR/Cas9을 이용해 결함이 있는 유전자를 수정한 뒤 그것을 다시 환자의 골수에 넣어 정상적이고 건강한 적혈구를 생산할 수 있도록 하는 계획을 하고 있다. 이것의 목표는 단일 염기쌍 돌연변이로 인한 문제인 낭포성 섬유증이나 낫세포 빈혈증 등을 단순히 치료하는 것뿐만 아니라 DNA 자체를 수정하기 때문에 후대의 유전으로 인한 질병도 막을 수 있을 것이라 기대된다[11].

2. 동물을 이용한 연구

CRISPR는 다양한 연구목적의 동물 실험군을 만드는 과정을 단순화시킬 수 있다. 유전자가 knock-down 되거나 돌연변이가 일어날 경우 그 개체가 보여주는 질병이나 증상을 확인함으로써 새로운 사실들을 발견하거나 유전병의 원인을 알아내어 치료가 가능하게 할 수 있다[12]. 또한 CRISPR는 생식단계에서부터 유전자의 어느 곳이든 타겟으로 하여 조작을 하는 것이 가능하기 때문에 새로운 동물을 만들어낼 수 있다.

3. 농작물

2014년엔 중국의 연구원인 Gao Caixia 흰가루병에 저항이 있는 밀의 품종을 개발해 특허를 낸 바 있다. 이 품종은 흰가루병을 막는 것을 억압하는 단백질을 암호화한 유전자를 없앤 것이다. 또한 이 품종은 살충제의 과도한 사용을 줄일 수 있기 때문에 더 유용하게 사용될 수 있다. Gao는 TALEN과 CRISPR 유전자 조작기술을 사용하여 다른 유전자는 바꾸지 않고 표적 유전자만 편집할 수 있었다[13].

2015년 노벨상 그 영광의 수상자는?

현재 CRISPR가 주로 사용되고 있는 곳은 연구실이며 2014년 말까지 CRISPR와 관련된 논문이 약 600여개 가량 발표되었다. 위에 열거된 예시들 외에도 이 기술은 광범위하게 응용될 수 있다. CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 신약개발로 기능적으로 인간의 세포를 비활성화 시킬 뿐만 아니라 조절할 수 있기 때문에 다양한 질병 치료에 사용될 수 있다. 그 외 candida albicans나 효모를 활용하여 바이오 연료를 만드는 등 차세대 친환경연료의 개발에 이용될 수 있으며, 이전까지 사용되어왔던 방법들보다 쉽고 다양하게 유전적으로 조작된 농작물을 만들 수 있고 더 나아가 멸종된 동물의 복원에도 사용될 수 있을 것이다.[14].

이처럼 과거에는 생각하지도 못했던 기술이 불과 3년 전 등장한 이후 유전자 편집 기술을 이용해 상상가능한 모든 일이 실현되는 것이 머지않은 미래의 일이 되었다. 2012년의 우연한 발견이후 유전공학이 더욱 성장할 수 있는 계기가 마련되었고 현재의 생명분야의 과학자들뿐만 아니라 미래의 생명 과학자를 꿈꾸는 이들도 더 간편하고 정확하게 실험을 할 수 있게 되었다.

현재 Jennifer의 연구팀에서는 실제 인간의 세포를 CRISPR/Cas9을 이용하여 어떻게 질병 치료에 사용할 수 있을지 연구하고 있고 가장 최근의 논문이 올해 7월 27일 Proc Natl Acad Sci USA에 발표된 논문이다. 이 논문에서 그녀는 인간의 면역에 담당하는 T-cell을 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 Knock-in하는 연구를 하여 암, HIV, 선천적인 면역결핍이나 자가면역증을 치료할 수 있는 방법을 찾는 도전을 하고 있다고 말하고 있다.[15] Jennifer의 연구팀이 하는 실험 외에도 2015년 현재 수많은 과학자들에 의해 CRISPR/Cas9을 응용한 다양하고 새로운 연구결과가 나오고 있다. 한 순간의 발견은 다른 발견을 이끌어내었고 이 발견들이 다시 새로운 발견을 낳은 것을 지난 3년간의 논문들을 통해 확인할 수 있었다. 그래서 우리는 이 3세대 유전자 가위 CRISPR의 지속적인 발전이 거듭될수록 궁극적으로는 인류의 복지에 기여할 수 있게 될 것임을 확신한다. 그리고 그 발견의 선구자는 Jennifer A. Doudna이며, 그녀가 있음으로서 유전공학이 한층 더 성장했고 앞으로 더 나아갈 수 있는 발판이 마련되었기 때문에 2015년 노벨상, 그 영광의 수상자로 Jennifer A. Doudna를 추천하는 바이다.

[참고 및 인용]

1. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology* 169, 5429-5433.
2. Brock의 핵심미생물학 13판, Madigen, Martinko, Stahl, Clark, 바이오사이언스, 2013, p.263, 38-41
3. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. and Ehrlich, S. D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551-2561.
4. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712.
5. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
6. The New York Times 2015년 5월 11일 기사 'Jennifer Doudna, a Pioneer Who Helped Simplify Genome Editing' (http://www.nytimes.com/2015/05/12/science/jennifer-doudna-crispr-cas9-genetic-engineering.html?_r=0)
7. 생화학분자생물학회소식(KSBMB NEWS) 6월호, 유전체교정 기법의 민주화 : Cas9 RNA-guided engineered nuclease의 작동원리와 응용 및 전망, 배상수, 김현석, 김진수, 2014, p.69, 18-34
8. Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., Chon, J. K., Yoo, J. Y., Kim, H. J., Kim, S., Lee, C., Jeong, E., Chung, E., Kim, D., Lee, M. S., Go, E. M., Song, H. J., Kim, H., Cho, N., Bang, D., Kim, S. and Kim, J. S. (2013) A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature biotechnology* 31, 251-258.
9. Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G. and Zhang, F. (2014) Genome-scale CRISPR Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84-87.
10. Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P (Mar 2008). "CRISPR--a widespread system that

provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea". *Nature Reviews. Microbiology* 6 (3): 181–186. doi:10.1038/nrmicro1793. PMID 18157154.

11. Young, Susan (2014-02-11). "CRISPR and Other Genome Editing Tools Boost Medical Research and Gene Therapy's Reach | MIT Technology Review". *Technologyreview.com*. Retrieved 2014-04-13.

12. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R (May 2013). "One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering". *Cell* 153 (4): 910–918. doi:10.1016/j.cell.2013.04.025. PMID 23643243.

13. Talbot, David (2014-07-19). "Beijing Researchers Use Gene Editing to Create Disease-Resistant Wheat | MIT Technology Review". *Technologyreview.com*. Retrieved 2014-07-23.

14. Ledford H (2015). "CRISPR, the disruptor". *Nature* 522 (7554): 20–4. doi:10.1038/522020a. PMID 260408

15. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, Haliburton GE, Ye CJ, Bluestone JA, Doudna JA, Marson A. "Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 27. pii: 201512503. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26216948.