

原核微生物의 遺傳子操作技術



李世永
〈高大農大教授〉

異種의 DNA를 實驗管內에서 再組合하여 이것을 이용하는 遺傳子研究가 근래 미국을 중심으로 해서 여러 선진國에서 大盛況을 이루고 있는데, DNA의 斷片을 「박테리아」세포에 寄生하는 「플라스미드」나 「파아지」와 같은 自己增殖因子에 삽입하여 이 再組合된 DNA분자를 「박테리아」세포에 되돌려 增殖시키고 그 遺傳情報를 發現시키는 이 再組合 DNA技術은 지난 30년간 꾸준히 쌓아온 核酸生化學과 微生物遺傳學 지식의 종합적인 結실이다. 어느 生體에서 분리된 DNA斷片을 다른 生體의 DNA에 삽입시킴으로써 遺傳情報를 한種에서 다른種으로 이식시킬 수 있는 이 再組合 DNA 기술은 生體의 “種”의 壁을 무너뜨리고 實驗管內에서 자유롭게 再組合시키는 遺傳操作을 가능하게 하므로써 菌株開發의 개념에 革新을 가져왔으며 여러 生體로부터 유용한 遺傳의特性을 한곳으로 모아 생산성 높은 菌株를 얻어내는 새로운 방법으로 오늘날 각광을 받고 있다.

이 再組合 DNA의 利用研究는 遺傳工學 또는 遺傳子操作등으로 불리어 比 産業微生物의 개발에서 뿐만아니라 生物學의 基礎研究, 醫學, 農學 및 産業의 諸分野에서 새로운 영역을 개척하고 있다.

그런데 지금까지의 再組合 DNA의 利用研究는 주로 大腸菌(E. coli)의 遺傳子가 대상이 되었으며 再組合 DNA의 宿主細胞도 주로 大腸菌이 사용되어 왔다. 그 이유는 再組合 DNA를 만들고 그것을 이용하기 위해서는 對象細胞의 遺傳子가 어떻게 組織되어 있고 어떤 기능을 가지며 그것이 어떤때에 어떻게 制御되는 지를 정확히 이해해야 되는데 지금까지의 分子遺傳學的 연구가 주로 大腸菌을 중심으로 수행되어 왔으므로 아직까지는 정확한 遺傳子操作은 거의 大腸菌에서만 가능하기 때문이다.

또한 大腸菌과 같은 原核生物(Prokaryote)은 高等細胞인 真核生物(Eukaryote)보다 遺傳子의 크기가 훨씬 작으며 그 조직이나 複製 및 發現機構도 훨씬 덜복잡할뿐만 아니라 原核細胞의 遺傳子는 真核細胞의 遺傳子처럼 蛋白質로 표현

되지 않는 Intron을 가지고 있지 않아 그 DNA를 직접 다른 세포에 이식하여 發現시킬 수 있기 때문에 遺伝子操作이 眞核細胞에서 보다 비교적 간단하다. 그리고 原核細胞는 眞核細胞와는 달리 遺伝子の 複製와 發現이 같은 곳에서 일어난다는 것도 遺伝子操作을 하는데 利點이 된다.

本考에서는 再組合 DNA技術의 가장 기초가 되는 原核細胞 遺伝因子的 Cloning, 즉 목적하는 遺伝子 DNA斷片을 「플라스미드」 혹은 「파아지」 같은 遺伝子運搬體(Cloning Vector)에 연결하여 「박테리아」宿主細胞에 도입하여 發現시키는 기술에 局限하여 概說하고자 한다.

再組合 DNA技術은 두 기본적인 과정, 즉 첫째로 도입하고자 하는 DNA斷片을 獨自的複製能力이 있는 적당한 遺伝子運搬體에 in vitro에서 연결하는 過程과, 둘째로 이 再組合된 DNA를 宿主細胞에 도입하여 複製 및 遺伝情報을 發現시키는 過程으로 나누어 진다.

◇ DNA運搬體(Cloning vehicles)

도입하고자 하는 遺伝因자를 가지고 있는 DNA斷片은 일반적으로 自己複製能力을 지니고 있지 않으므로 새 宿主細胞에 들어가서 遺伝子로서 존속하기 위해서는 Replicator를 가지고 있는 DNA 즉, Vector에 연결시켜 그 宿主細胞에서 自己複製할 수 있게 해주어야 하는데 「박테리아」 宿主에서는 주로 「플라스미드」나 「파아지」로부터 개발된 Vector들이 사용된다. 실험에 따라 ① 필요한 Vector의 量 ② 精製의 難易度 ③ 制限酵素의 切断位置 ④ 導入 DNA의 크기 ⑤ 導入 DNA와의 連結方法 ⑥ 再組合體 選別을 위한 Vector上的 遺伝因子標識 ⑦ 導入 遺伝子の 發現에 필요한 調節因자의 존재 ⑧ 위험성을 방지하기 위한 生物的 障壁(Biological containability)의 有無등에 의해서 그 選擇基準이 결정된다.

지금까지 개발된 Vector들의 대부분은 大腸菌 Vector들이지만 *Bacillus subtilis*, 放線菌等 産業的으로 유용한 微生物에서 이용할 수 있는 Vector도 이미 개발되어 있고 앞으로 계속해서

産業微生物 또는 農業微生物들의 Vector가 개발될 것으로 기대 된다.

◇ 導入 DNA의 준비

개발된 Vector에 따라 삽입되는 DNA는 精製된 DNA로 부터 制限酵素(Restriction enzyme)나 機械的剪斷(Mechanical shearing)으로 切断하여 얻든가 혹은 직접 DNA의 化學的合成에 의하여 얻는다. 이들 DNA斷片들은 單離된 순수한 것을 사용하기도 하지만 斷片들의 混合物를 사용하여 宿主에 도입한 후 특정한 遺伝因子가 삽입된 再組合體를 선별하기도 하는데 이러한 방법을 散彈實驗(Shot-gun 실험) 이라고 한다.

◇ 再組合 DNA의 合成

◎ DNA의 切断

가장 많이 사용하는 방법은 制限酵素를 이용하는 방법이다. DNA의 塩基配列을 認知하여 DNA의 특정한 部位를 切断할 수 있는 制限酵素가 各種의 微生物로부터 100種 이상이 分離, 精製되었고 이들중 特異性이 다른 數十種類가 生化學試藥으로 현재 市販되고 있다.

制限酵素를 이용하여 DNA를 特異的으로 切断하는 방법 이외에 無作爲로 DNA를 切断하는 여러가지 非特異的의 切断方法도 사용되고 있다. 이러한 방법들은 대개 특정한 遺伝因子에 사용할 수 있는 마땅한 制限酵素가 없거나 어떤 制限酵素를 사용할 수 있는지 모를 경우 사용되는데 non-specific endonuclease의 이용, Chemical degradation, ultrasound sonication, mechanical shearing등의 방법이 있지만 잘 조절된 Mechanical Shearing法만이 실제로 활용되고 있다.

◎ DNA斷片의 連結

DNA斷片을 연결하는 방법에는 ① 制限酵素에 의해서 형성된 相補的 一本鎖의 末斷을 이용하는 法 ② Blunt end-joining法 ③ Homopolymer tailing法 ④ 合成 Homopolymer를 linker로 사용하는法 등이 이용되고 있다.

制限酵素에 의하여 형성된 Cohesive ends를

이용하여 DNA切片을 連結하여 再組合體를 만드는 방법은 가장 간단한 방법으로 특히 DNA斷片을 Cloning한 후 그 斷片을 만들기 위하여 사용했던 制限酵素를 다시 사용함으로써 元來의 것과 꼭 같은 DNA斷片을 回收할 수 있다는 利點이 있어 Cloning된 DNA의 확인과 精製를 용이하게 하기때문에 遺傳因자의 塩基配列을 결정하기 위한 DNA Cloning에 자주 사용되는 방법이다.

Blunt end-Joining法은 특히 化學的으로 合成한 DNA斷片들을 불필요한 餘分の 塩基雙들을 첨가함이 없이 연결할 수 있기 때문에 再組合 DNA에 새로운 Promoter나 制限酵素 切断點을 삽입하는 데 대단히 유용하다. 그리고 DNA 斷片들을 특정한 塩基配列을 가진 linker DNA에 의해서 연결할때 자주 사용된다. 이 방법은二本鎖 DNA斷片들을 그들의 末端塩基配列과는 관계없이 연결시킬 수 있다는 것이 이점이다.

Homopolymer tailing法은 DNA斷片들을 連接하기 위한 가장 일반적으로 적용할 수 있는 방법으로 DNA斷片的 양쪽 末端에 合成으로 一本鎖의 Homopolymer 꼬리를 달아 相補의 塩基雙의 형성으로 Vector DNA에 연결한다. 이 방법의 결점은 制限酵素 切断點이 없기 때문에 Cloning 후 元來의 DNA斷片을 쉽게 회수할 수 없는 점이다.

合成 Oligonucleotide linker法은 化學的으로 合成된 linker들이 이미 商業的으로 發售되고 있어(Collaborative Research Inc.) 점차 이용이 늘고 있으며 새로운 Promoter, Operator, Ribosome binding site등 遺傳子 發現에 필요한 情報를 連接하는데 자주 이용되고 있다.

◇ 再組合 DNA의 宿主細胞에로의 導入

原核細胞에 DNA의 도입은 Transformation 現象을 이용하는데 Transformation은 正常的인 培養條件에서는 Streptococcus Pneumoniae, Bacillus, Hemophilus, Neisseria Acinetobacter 등에 局限하여 일어나는 현상이지만 특수한 조건에서는 다른 「박테리아」에도 Transformation

이 가능하다.

◇ 宿主細胞의 개발

遺傳子操作을 論議할때 가장 중요한 것이면서 看過되기 쉬운 부분이 宿主의 개발이다. 宿主細胞는 再組合 DNA를 받아 들일 수 있고, 도입된 再組合 DNA를 안전하게 複製를 해야하며, 또 목적에 따라서는 再組合遺傳子の 遺傳情報를 發現시킬 수 있어야 하기 때문에 이 宿主開發에는 아주 광범위한 分子生物學 및 微生物遺傳學的 기초지식이 요구된다.

도입된 再組合 DNA가 항상 宿主細胞 내에서 안정한 것은 아니다. 특히 도입되는 DNA가 異種 DNA인 경우에는 宿主의 制限酵素系에 의해서 파괴를 받을 수 있기 때문에 制限酵素 缺如株를 宿主로 사용해야 한다. 宿主 내에서 再組合 DNA의 구조가 宿主細胞의 DNA復舊系 酵素들에 의하여 변할 수도 있다는 보고도 있다.

도입된 再組合 DNA의 안정성은 再組合 遺傳子가 發現해서 그 產物을 얻을려고 할때는 특히 중요하다. 그 產物이 宿主細胞에 의해서 파괴가 되어서도 안되지만 再組合 DNA나 그 遺傳子產物이 宿主細胞의 生長을 저해하거나 宿主細胞에 毒性을 나타낼 경우가 자주 있으며 宿主細胞에 아주 높은 突然變異率(Mutation rate)이나 遺傳子 再組合率(Recombination rate)을 나타낼 경우도 있다.

再組合 DNA도입된 Transformant의 선별을 도우기 위하여도 宿主에 遺傳的 標識(Selectable genetic markers)을 할 필요가 있으며 再組合 DNA의 遺傳因자의 發現을 極大化 하든가 조절하기 위하여도 宿主細胞에 필요한 遺傳的 變化를 도입할 필요가 있다.

또한 再組合 DNA實驗의 危險성과 관련하여 生物災害(Bio-hazard)를 미연에 방지하기 위한 生物的 対応策(Biological containment)도 宿主細胞가 담당하도록 되어 있다. 여러 先進國에서는 이미 再組合 DNA實驗에 대한 規制法規 혹은 指針이 마련되어 각종 실험에 사용할 수 있는 宿主細胞가 지정되어 있다.

◇ 再組合 DNA의 發現

再組合遺傳子가 異種의 宿主細胞에 도입되었을 때는 일반적으로 그 遺傳情報가 發現되기 어렵다. 같은 原核生物 일지라도 「박테리아」마다 그 遺傳子 發現에 관여하는 酵素나 蛋白質因子들의 特異性이 각기 다르기 때문이다. 예를들면, *Bacillus subtilis*의 遺傳子는 *E. coli* 宿主에 의해서 發現될 수 있지만 *E. coli*의 遺傳子는 *B. subtilis* 宿主에서 發現되지 않는다는 사실이 알려져 있다. 따라서 異種의 DNA를 이식해서 그 遺傳情報를 發現시키기 위해서는 그 遺傳子의 Promoter, Terminator, Ribosome binding site 등을 宿主에서 인식될 수 있는 것으로 交替시켜 주어야 하며 宿主의 Operator를 附着 시킴으로써 再組合遺傳子의 發現을 조절할 수도 있다.

◇ 再組合 DNA가 導入된 Clone의 選別 및 固定

再組合 DNA에 삽입된 遺傳因子가 宿主내에서 發現된다면 微生物遺傳學的인 방법으로 쉽게 檢出할 수 있는 방법이 많이 開發되어 있다. 再組合 DNA의 發現에 의하여 合成된 특정 蛋白質을 免疫化學的 방법으로 Clone을 檢索하는 방법도 開發되어 있는데 이것은 合成된 蛋白質이 活性을 갖지 않는 경우도 적용할 수 있기 때문에 광범위하게 이용되고 있다.

그러나 再組合 DNA에 삽입된 遺傳因子가 發現을 하지 않는 경우에는 願하는 Clone을 이리

한 방법들로는 선별할 수가 없고 再組合 DNA의 크기나 혹은 삽입된 DNA의 相補的 塩基序列을 가진 DNA 혹은 RNA probe를 이용하는 檢索法(*in situ* hybridization)을 사용해야 한다.

再組合 DNA를 가진 Clone이 확인되면 再組合 DNA를 分離, 精製하여 거기에 삽입된 DNA가 元來의 것과 동일한가를 DNA 塩基序列의 결정이나 Restriction mapping法 등으로 固定하여야 한다.

◇ 結 言

再組合 DNA技術은 한 種에서 다른 種으로 遺傳子의 이식을 가능하게 함으로써 菌株開發의 개념에 혁신을 가져왔다. 이 기술은 生命科學의 基礎研究에 기여함은 물론 農, 工, 醫學의 여러 분야에 걸쳐 광범위한 응용이 예상되므로 우리나라에서도 國家政策的 次元에서 遺傳子操作技術의 研究, 開發을 추진할 필요가 있다고 생각된다. 특히 原核微生物의 遺傳子操作은 技術面에서 비교적 쉽고 우리나라의 條件에 맞는 醱酵產業과 밀접한 관계를 갖고 있으므로 이것부터 시작하는 것이 우리나라의 실정에도 맞고 經濟發展에도 도움이 될 것으로 생각된다. 遺傳工學分野에서의 최근의 발전이 현재와 같은 속도로 계속된다면 앞으로 20年後에는 여기에 관련된 科學者들에게 뿐만 아니라 이러한 연구를 지원하는 社會에도 만족할만한 보상이 돌아 올 것이라고 確信하는 것이다.

손길마다 자연보호 마음마다 국토사랑