

## 뉴트라슈티칼과 식품안전분야에서 DNA microarray기술의 응용

김순희, 김현애, 김명선

식품기능연구본부

### I. 서론

우리 몸의 건강과 질병에 있어 식사의 질과 양은 주요한 결정인자이다. 유전자 변형식품(GMO, genetically modified organism), 식품유래 병원균, 새로운 뉴트라슈티칼에 대한 분자 수준의 진단은 안전 식품에 꼭 필요한 요소이다. 대부분 DNA microarray 기술은 많은 유전자를 동시에 분자적 진단이 가능하기 때문에 새로운 차원의 강점이 있다. 또한 분석의 자동화와 새로운 생물정보학 기술은 DNA microarray를 강력한 진단기술로 탄생시켰다. 몇 년 전까지만 해도 이 기술은 독성유전체(toxicogenomics), 약물유전체(pharmacogenomics), 세포생물학, 그리고 질병의 예방을 위한 임상 등에 적용되어 왔다. 그러나 식품안전에서 이러한 분자적 수준의 진단기술 적용은 중요한 기술 자원이 될 것이다.

### II. 본 론

유전체학에서의 현재 발전과 유전적 기술에서의

DNA microarrays 같은 기술의 새로운 개발은 영양학적 연구분야를 역학과 생리학 개념에서 분자생물학과 유전학 개념으로 이동시키고 있다(IHGSC, 2001; Venter et al., 2001; Waterston et al., 2002). 이러한 기술이 영양유전체학 분야로의 응용이 되는 새로운 과정이기도 하다. 영양유전체학(nutrigenomics)은 영양체의 효과를 보는 대상을 전사적 수준에서 전체 계층으로 넓혔다. 과거에 건강과 질병측면에서 식이 요소들의 기전과 효과연구는 단일유전자 혹은 측정하고자 하는 단일 생리학적 현상 상에서 기능적 assay 또는 연구를 하여 왔다. 그러나 건강과 질병에서 영양체의 효과를 이해하는데 있어서 분자적 연구방법이 필수적임은 명백해지고 있다(Muller and Kersten, 2003).

수 백 혹은 수 천의 유전자, 단백질 그리고 대사체들이 참여하는 많은 대사적 과정의 조화는 대부분의 생물학적 기능을 조절한다. 예를 들면 지질 항상성은 수백개의 유전자와 많은 신호전달 과정 그리고 전사인자, 수용체들, 호르몬, apolipoprotein, 그리고 효소들을 포함하는 다수의 분자들이 참여하

는 다수의 기관들의 복잡한 공동작용에 의하여 수행되어진다. 단일 유전자와 단일 생리학적 파라미터상에서 수행되는 효능평가는 식이 영양체 또는 구성체의 유의한 효과 또는 악영향을 주는 기전을 밝히기 위한 충분하고 면밀한 정보를 제공하는데 바람직하진 못하다.

DNA microarrays 같은 새로운 유전체학 기술의 힘은 단일 assay 방법으로 다량의 게놈(genome) 분석을 빠르게 할 수 있게 된 기술력으로 큰 관심을 받고 있다. 대부분의 발굴 기술처럼 DNA microarray 분석법은 그 기술을 최대한 활용할 수 있는 연구자들에게 무한한 힘을 발휘하게 할 수 있다. 예를 들어 DNA microarray 기술을 프로테오믹스(proteome)를 예견하기 위한 기술로 사용하는 것은 성공적이지 못할 수도 있다. 모든 mRNA들이 단백질로 해독이 되지 않을 수도 있기 때문이다(Gygi et al., 1999). 단백질의 번역과 전사 후 변형(post-translational modification)의 연구는 프로테오믹스(proteomics)와 연관된 또 다른 기술력 즉, 대사체학, 세포나 조직의 대사체 프로파일링의 방법에 의해서 설명되어질 수 있다. 이들 접근법은 각각의 특이적 장점과 제한성이 있으며 연구자의 필요내용에 따라 사용되어져야 한다. 미지의 후보단백질을 확인하는데 있어서 프로테오믹스에 의한 방법은 아주 광범위한 일이 될 수 있으나, 특정 후보유전자를 찾을 경우에 microarray방법을 사용하는 것은 빠르게 연구를 수행할 수 있는 과정이 될 것이다.

영양유전체, 영양 관련 프로테오믹스, 영양-상관성 대사체 생산 (metabolomics) 그리고 적절한 생물정보학(bioinformatics)을 이용하여 종합적으로 얻어진 정보만이 영양체에 의해 조절되어지는 체내의 항상성과 독성을 진정으로 설명할 수 있을 것이다. 영양유전체학의 도전 목표는 섭취한 영양체 또는 영양요소의 유의한 효과 내지는 악효과를 예견할 수 있는 바이오마커 계를 분별해 내는 것이며 이들

바이오마커들은 건강 증진과 질병 예방을 설명하기 위한 예견이나 스크리닝 기술로서 사용되어 질 수 있다. 식이 영양체 또는 영양요소들은 생물계에서 영양 센서에 의해 받아지는 신호로 받아들여 질 수 있다. 영양체에 반응하는 전사인자들은 영양체 센서로 가정할 수 있다. 영양체 신호를 받은 후에 전사인자는 특정 유전자의 DNA 전사를 조절하고 영양체에 반응하는 유전자 발현의 패턴을 조절하게 된다. 어떤 식이 영양체 또는 영양요소에 의해 조절되어지는 유전자, 단백질발현, 그리고 대사체 생산의 패턴은 "dietary signatures"로서 생각할 수 있을 것이다(Muller와 Kersten, 2003). 프로테오믹스 대사체(metabolome)는 이 논고의 범위를 벗어나므로 본문에서는 DNA microarray 기술에서 집중조명을 받고 있는 유전자 발현 분석의 다양한 기술을 비교하고자 한다. DNA microarray 기술은 응용되는 연구 분야에 맞춰 다양한 변형이 가능하다. 효능평가 과정이 자동화되고 속도가 빨라지면서 DNA microarray는 진단에 있어서 상당한 유망기술로 떠오르고 있다.

본문에서 영양유전체학, 독성학, 그리고 유전자변형식품과 식품유래 병원체의 검출을 포함하는 식품안전 분야에 있어서 DNA microarray기술의 응용에 대해서 고찰하고자 한다.

## 1. 유전자 발현 분석의 소개

Northern blotting은 단일유전자 발현 정량적 분석의 표준 연구방법으로 수십년동안 이용되어져 왔으나 정량적 real-time PCR 방법으로 점차적으로 대체되어가고 있다(Alwine et al., 1977; Buttitta et al., 2003; Depreter et al., 2002; Oberst et al., 1998). 유전자 특이성을 갖는 형광물질을 부착시킨 probe 기술과 PCR을 접목시킴으로서 10개 혹은 더 작은 카피의 타겟유전자나 0.1 pg 수준의 적은 양의 총 RNA일 경우에조차도 검출할 수 있다. 유전

자 발현의 정량결과는 2-3시간 이내에 얻을 수 있으나 다수의 유전자를 분석하기에는 제한적이다.

Differential display 같은 최근 발달된 방법은 mRNA poly-A tail에 고착시키는 oligonucleotide primer(T12NN, anchored primer)와 앞 primer와 상대적으로 다른 위치에서 annealing하는 arbitrary primer를 사용한다. 이렇게 찾아진 일부 mRNA는 역전사 PCR에 의해 증폭되어지고 DNA sequencing gel상에서 증폭된 cDNA를 분리하여 염기서열을 분석한다(Gohil et al., 1999). 다수의 프라이머를 사용하여 얻어진 증폭된 상보적 DNA의 결과에 대한 재현성은 각 primer의 특이성에 의존적이다. 따라서 이 기술은 미리 결정된 유전자를 보는 것이 아니고 생물학적 견지에서 새로운 유전자를 확인하는데 더 잠재적으로 사용할 수 있으며 정량적 assay 방법으로서 적합하지 못하다.

Serial analysis of gene expression (SAGE)는 유전자패턴의 포괄적 분석을 할 수 있는 강력한 분석방법이다(Velculescu et al., 1995). SAGE 방법에서는 조직으로부터 필수적으로 mRNA를 분리하고 다시 cDNA로 합성을 한다. 각 cDNA로부터 얻어진 작은 14개 뉴클레오타이드의 tag를 잘라내어 tag끼리 연결시켜 concatemer라 불리는 긴 분자를 만든다. 수 만개 유전자의 단일 tag를 염기서열 분석기에서 읽어내는데는 너무 긴 시간이 필요하므로 concatemer를 염기서열분석기에서 서열분석하게 되고 염기서열분석결과로부터 이 concatemer가 속해 있는 유전자의 리스트를 얻게 된다. 이들 기술의 상업적 응용은 125,000 이상의 특이 전사체를 대표하는 7 백개 이상의 SAGE tags의 전매특허 데이터베이스를 가진 Genzyme Molecular Oncology (<http://www.genzymemolecularoncology.com/>)사에서 상업권을 가졌다. 상대적으로 복잡한 시료 준비 과정과 광범위한 DNA 염기 서열분석 때문에 SAGE는 아직 인기가 있지 못하다. 발현이 증가하

는 유전자의 정량적 측정에 적합하긴 하나 노동력과 기술 집약적인 방법이라 하겠다.

DNA microarray 기술은 전사체의 genome-wide analysis에 대한 기대되는 기술로 성장하고 있다. 과거 몇 년동안 macroarray, cDNA microarray, 고밀도 oligonucleotide microarrays, 그리고 microelectronic arrays (Roy et al., 2002; Roy et al., 2002) 기술 등 몇몇 형태의 DNA microarray기술이 개발되었다. cDNA inserts 또는 genomic fragments가 로봇에 의해 점찍혀 있는 Nylon membranes은 대부분의 macroarrays를 대표한다. 탐침의 밀도는 1-2mm 점사이의 공간으로 적다. 검출방법은 동위원소나 chemiluminescent 표지방법을 사용한다. 이런 형태의 array는 수 천개 유전자의 동시분석을 위해 적합하다. cDNA microarrays는 지지 재질로서 유리나 플라스틱 슬라이드를 사용한다. 직경 50 - 150  $\mu$ m인 50,000개 이상의 DNA spots을 3.6  $\text{cm}^2$  면적위에 일반적으로 300  $\mu\text{m}$ 이하의 간격으로 spotting한다. 점 찍히는 DNA는 PCR fragments (200 - 2400 bp) 또는 oligonucleotides (20 - 35 bp)이다. 이런 형태의 microarray는 또한 spotted DNA microarray로 알려졌고 처음 스탠포드 대학에서 개발되었다(Schena et al., 1995; Shalon et al., 1996). 보통 2개의 RNA 샘플을 cDNA 합성동안 2개의 다른 cyanine fluorescent dyes (green Cy3 and red Cy5)로 레이블하고 양 시료는 spotted array에 경쟁적으로 중합시킨다. 2개의 color scanner를 이용하여 시료의 2개의 형광값을 정량하여 유전자 발현을 측정한다. 양 dye(예로 Cy3/Cy5)의 감도의 비율은 양 시료에 대한 상대적 발현 수준을 반영해준다.

고밀도 oligonucleotide array는 반도체 chip을 제작하는 방식에서 유래된 사진식판(photolithography) 기술을 이용하여 기판위에서 직접 25-mer oligonucleotide probe를 합성하는 방식과 solid-phase DNA합성기술이 있다(Chee et al., 1996; Fodor et

al., 1991). Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>)사에서 생산하고 있는 GeneChip™은 가장 많이 팔리고 있는 장치이다. 그러한 microarray 제작과정은 수만의 유전자와 EST를 동시분석이 가능하게 만들었다. 그러므로 이런 형의 microarray는 genome-wide 유전자 발현 분석의 강력한 힘을 가졌다(Roy et al., 2002; Roy et al., 2002).

Multiple GeneChip™ array는 큰 유리 wafer상에서 동시에 합성한다. 이 병렬 과정은 array의 재생산을 증강시킨다. Affymetrix 사에 의해 최근 개발된 사람 게놈분석(U133)용 two-array set는 33,000개의 밝혀진 사람유전자를 대표하는 1,000,000이상의 18 μm oligonucleotide를 담고 있다. 마침내 microelectronic array 기술은 최근 시장에 선보였고 최종사용자에 의하여 테스트되고 있다.

NanoChip™ array (<http://www.nanogen.com>)기술은 99개 위치의 전자적 힘을 가진 microarray 기술이다. 각 테스트 위치는 platinum wires로 컴퓨터와 전자적으로 연결되어 있다. 염기서열 특이적 oligonucleotide probe는 전자적으로 특정위치로 연결되어진다. DNA와 RNA는 원래 음과 양의 전하를 가지고 있기 때문에 바이오틴 표지된 RNA샘플은 전자적으로 전하를 생산시킨 NanoChip™ array 상의 테스트 위치와 빠르게 상보적 결합을 하게 된다. 앞에서 언급한 3가지 형태의 DNA array에서 요구되어지는 probe 결합이 이루어지는데는 수 시간이 걸리는 반면 NanoChip™ array상의 중합반응은 수 분만에 이루어진다.

## 2. DNA microarray의 비교

DNA microarray를 이용한 분석은 감도가 높고 어느 정도 정량도 가능하다. 전사 분석을 위해서는 cDNA microarray와 oligonucleotide microarray가 가장 널리 이용되고 있다 (Fig.1).

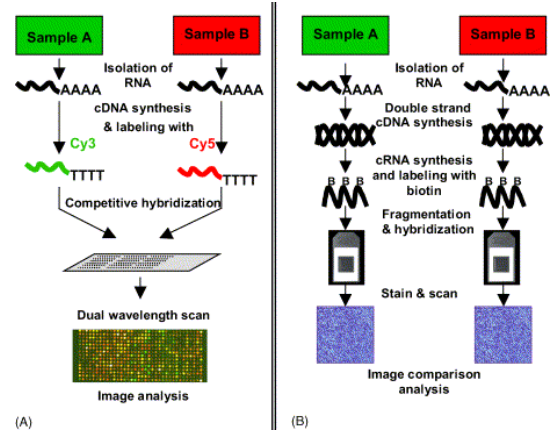


Fig. 1. Outline of approach for spotted microarray (A) vs. high-density oligonucleotide microarray (B). Sample A: control; sample B: test.

자동화된 기기를 이용하면 수작업에서 파생되는 오차를 최소화하고 재현성도 높일 수 있다(Call et al., 2001; Chee et al., 1996; Fodor et al., 1991; Schena et al., 1995 and Shalon et al., 1996). 단, 전체 유전자가 밝혀지지 않은 생물의 경우, DNA microarray는 비효율적일 수도 있다. Array는 전체 유전자의 발현 정도를 분석할 수 있는데 반해, 유전자의 염기 서열을 모를 경우, array의 잠재능력을 십분 발휘하지 못하기 때문이다. 1993년에 시작된 'Integrated Molecular Analysis of Genome and their Expression (IMAGE)' 협회는 사람의 유전자 연구를 지원해주고 있다. 이곳은 세계에서 가장 많은 유전자를 확보한 곳 중 하나이며, 양질의 cDNA library array 뿐 아니라, 각 클론에 해당하는 염기서열과 유전자 지도, 발현 데이터를 특허권없이 나눠주고 있다. 최근에는 인간과 mouse 유전자 외에 rat, zebrafish, xenopus, rhesus macaques의 유전자도 확보된 상태이다. 모든 유전자는 특허권 사용료 없이 이용할 수 있으며, 미국 세포주은행(ATCC)나 Research Genetics and Genome System

같은 대리점에서 cDNA 클론을 분양받을 수 있다. 고밀도 oligonucleotide microarray를 제작하기 위해서는 oligonucleotide를 사진식판기술로 in situ 합성해야 하는데, 이를 상업적으로 생산하기는 아직 어려운 상태이다. 일반 실험실에서 요청대로 제작하려면, 비용면에서 효율적이지 않기 때문이다. 그러나 spotted DNA microarray는 학교나 정부, 민간 연구실에서 널리 발전되어 왔다.

Spotted array는 GeneChip™ high-density oligonucleotide microarray 보다 초기 setup 시간이 훨씬 많이 소요되는 단점이 있다. GeneChip™ array의 경우, hardware나 software, 최적화된 실험 방법, 시약조건, 분석방법 등 표준화된 작동 시스템을 보유하고 있다. 그러나 spotted DNA microarray를 사용하려면, cDNA probe를 디자인하고 만들거나 oligonucleotide를 구입하고, probe가 정확한지 확인해야 하며, arraying할 로봇장치를 선정해야 한다. 또 여러 가지 protocol ([http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/4\\_human\\_RNA.html](http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/4_human_RNA.html); <http://www.microarrays.org/pdfs/HumanRNALabel.pdf>; <http://sequence.aecom.yu.edu/bioinf/microarray/protocol4.html>) 중에 적합한 것을 택해 최적조건을 잡아야 하고, 적당한 이미지 분석용 소프트웨어도 선정해야 한다. 이러한 일들은 보통의 실험실에서 하기에는 너무나 방대한 양이다. Spotted DNA microarray를 사용할 경우, 많은 유전자 클론들을 탐지하고 다루어야 하며, quality control도 해야 하기 때문에 특정 유전자 군을 대상으로 연구할 때는 유용하지만, 대규모로 전체 유전자 발현 profile을 조사할 경우에는 적합하지 않을 것이다(Finkelstein et al., 2002). 주문 제작형이나 specialty microarray를 만들기 위해서는 상당히 광범위한 기술들이 필요하다. Redundancy나 alternative splicing, 교차중합(cross-hybridization)은 전사량의 차이분석을 방해하기 때문에, specialty microarray를 사용하고자 할 때, 이런 현상이 생기

지 않도록 유전자 선택에 신중을 기해야 한다. 유전자를 선택할 때는 관심있는 특정 유전자보다 많은 수의 유전자를 선정해야 하며, 선정 범위는 관심분야의 폭에 따라 조절할 수 있을 것이다. 경로를 예측하여 만들어주는 소프트웨어를 사용하면 도움이 된다. 마지막으로 실험용 시료에는 존재하지 않아서 어느 클론에도 교차중합되지 않는 음성대조군 DNA를 포함시켜야 한다. 이 외에도 특이적으로 필요한 것은 무엇인지, 어느 부분에서 조절이 필요한지 알려 줄 수 있는 다른 생물정보학 도구를 함께 사용해야 한다.

DNA microarray는 신기술이므로, 이를 뒷받침해주는 생물정보학은 아직 갓난아이 수준에 불과하다. DNA microarray를 통해 얻은 많은 결과로부터 생물학적 의미를 도출하기 위해서는 통계 기법을 차용해야 하기 때문에, 앞으로 이 두 분야의 긴밀한 연관이 이루어져야 할 것이다. 다행히도 생물학자들과 통계학자들이 협력해서 차이를 극복하고자 노력하고 있다. 데이터를 정규화(normalization)하는 기술이나, 다양한 유전자 발현을 분석하는 방법, 발현 데이터를 통계적으로 배열하고 분류하는 분야도 계속 발전되고 있다(Pan, 2002; Yang et al., 2002; Xu et al., 2002).

Microarray 실험결과와 주석과 데이터 해석을 위한 기준을 마련하고자 'Microarray Gene Expression Data Group (MGED)'이 1999년 11월 설립되었다(<http://www.mged.org>). 다른 실험자들이 재현하고 검증하기 위해서는 microarray 실험 디자인과 데이터 표현방식이 일관적이어야 하므로, 이에 필요한 최소한의 정보를 제공하는 지침 (Minimum Information About a Microarray Experiment; MIAME)을 제정하였다. MIAME는 microarray 데이터베이스와 데이터 분석 도구를 만드는데 도움이 될 것이다. 이 외에도 National Center for Biotechnology information에서 운영하는 Gene Expression Omnibus (GEO)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), 펜실베이니아 대학의 RNA Abundance Database (RAD) (<http://www.cbil.upenn.edu/RAD2/about.html>), National Center for Genome Resources의 GeneX (<http://www.ncgr.org/genex/>), European Bioinformatics Institute의 ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/microarray/ArrayExpress/>)에서 유전자 발현 데이터베이스를 자유롭게 이용할 수 있다.

### 3. 게놈(Genome) 안정성과 유전자 발현 조절

돌연변이 유발물질이나 발암물질같은 외인성 요인이나, 자유라디칼과 같은 내인성 요인에 의해 게놈은 불안정해지고, 암이나 심혈관질환, 알츠하이머 병과 같은 여러 퇴행성 질환이 생긴다고 알려져 있다. 염색체 이상이나 DNA 손상이 자주 일어나면 암화과정이 시작될 수 있기 때문에 그만큼 암에 걸릴 위험성도 커진다(Bonassi et al., 2000). 3대 영양소나 미량영양소를 비롯한 식이성분들은 게놈 안정화에 중요한 역할을 하며, 내외적 독성 물질이 야기하는 유전독성을 예방하는데도 중요하다(Fenech, 2001; Tsuda et al., 2000 and Chatterjee, 2001). 어떤 미량영양소들은 DNA 합성이나 복구과정에서 기질이나 보조인자로 작용하기도 한다. 이런 영양소가 결핍되면 게놈 안정(integrity)에 이상이 생기거나 유전자 발현에 문제를 일으키는 DNA methylation과 같은 DNA 변형이 일어날 수 있다.

비타민 C와 E는 훌륭한 항산화제이다. 이들 두 영양소가 모두 결핍되면 DNA가 산화되고 염색체에 손상이 생긴다고 알려져 있다(Halliwell, 200; Claycombe and Meydani, 2001 and Frage et al., 1991). 예를 들어, 비타민 C는 guanosine 염기가 산화되어 변형되는 것을 방지한다(Frage et al., 1991). 비타민 E는 지질이 과산화될 때 발생하는 라디칼을 소거해 줌으로써 활성산소(ROS)에 의한 DNA 단일가닥 절단(single strand break)을 막아준다

(Tsuda et al., 2000). 이는 비타민 E가,  $Fe^{2+}$ 와 같은 금속이온과 과산화수소가 반응하여 생성되는 hydroxyl radical ( $HO\cdot$ )의 생성을 억제하고, DNA 손상을 야기하는 과산화수소에도 직접 작용하기 때문이다(Machlin, 1991). 비타민 D도 항산화능이 있으며, 염색체의 구조를 안정화시키고, 리포솜에서 철이온에 의한 지질 과산화를 억제함으로써 DNA 양가닥 절단을 방지한다(Chatterjee, 2001 and Wiseman, 1993). 비타민 D 보충제를 복용할 경우, 랫트의 간세포에서 diethylnitrosamine에 의한 염색체 변이율을 감소시켰다고 한다(Chatterjee, 2001). Niacin이라는 영양소도 DNA 회복과 세포사멸에서 중요한 역할을 한다. Niacin은 poly(ADP-ribose)-polymerase-1 (PARP)의 기질인  $NAD^+$ 의 전구체이다. DNA 가닥에 절단이 생기면 PARP는 DNA가 손상되었다는 신호와 함께 세포가 이에 대응하도록 하는 신호를 보낸다(Hageman and Stierum, 2001). 따라서 niacin은 게놈의 안정성을 유지하고 세포 사멸을 방지하는데 매우 중요하다. 엽산(folate)은 deoxynucleotide triphosphate가 새로 합성될 때, dUMP가 dTMP로 전환되는 과정과 비타민  $B_{12}$  존재하에서 homocysteine이 methionine으로 전환되는 과정에서 methyl기를 제공하는 역할을 한다. 그러므로 엽산이나 비타민  $B_{12}$  중 하나만 부족해도 염색체 손상과 다핵형성을 초래할 수 있다(Fenech, 2001).

DNA methylation 반응 중 하나는 cytosine-guanine (GpG)<sub>4</sub> dinucleotide 중 cytosine의 5' 탄소에 methyl기를 붙이는 것이다(Razin and Riggs, 1980). 일반적으로 DNA methylation은 "CpG islands"라 불리는 CpG-dinucleotide가 많이 존재하는 부위에서 일어나며, CpG island는 유전자의 프로모터 부분이나 첫 exon 부분에 주로 위치한다(Rovertson and Wolffe, 2000). CpG island는 보통 methylation 되지 않은 상태로 있지만, 만약 어떤

유전자의 CpG island가 methylation 되면 그 유전자의 발현은 억제된다. 그러므로 DNA methylation 패턴은 전체 유전자 발현 프로파일에 영향을 미칠 수 있다. 엽산은 주로 5-methyltetrahydrofolate 형태로 존재하기 때문에 methyl기 제공자로서 역할을 하며, 따라서 DNA methylation에 직접적인 영향을 준다(Friso and Choi, 2002). 엽산이 부족할 경우, DNA의 methylation이 감소한다. Pogribny 등(1995)은 만성적인 엽산 결핍 환자의 간암발생 과정에서 DNA methylation 변화를 관찰한 결과, pre-neoplastic 조직에서 p53 유전자 발현이 증가하고 유전자의 암호부분이 hypomethylation 되는 것을 발견했다. 그러나 일단 암이 생성된 후에는 p53 유전자 암호부분이 다시 methylation 되며, mRNA도 감소하였다. 엽산 결핍은 p53 유전자 암호부분의 methylation에 영향을 미치고, 이에 따라 p53의 발현이 변화됨으로써 간암발생이 시작될 것이다. 아연이 결핍되면 S-adenosylmethionine (SAM)으로부터 methyl기를 제공받기 어려워지며, 쥐의 간에서 DNA methylation 감소현상이 관찰된다(Wallwork and Duerre, 1985). 한편 폐암세포에서는 비타민 C 결핍과 DNA 과다 methylation이 서로 관계가 있다고 밝혀졌다(Piyathilake et al., 2000). Niacin은 DNA methylation을 저해하여 CpG dinucleotide가 methylation 되지 않은 상태로 존재하도록 만든다(Zardo and Caiafa, 1998). 비타민 D의 활성 형태인 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]도 장관 내 칼슘 전달과 DNA 복제에 관련된 유전자들이나, 피부나 면역계에서 세포의 증식과 분화에 관련된 유전자 등 많은 유전자들을 조절한다. 예를 들어, 비타민 D는 T 세포의 증식과, 인터루킨-2나 인터페론- $\gamma$ 와 같은 사이토카인의 발현을 억제한다(Bhalla et al., 1986). 또한 proto-oncogene인 *c-myc*의 발현을 감소시키고, *c-fos*와 *c-jun*의 발현을 증

가시킴으로써 암억제 효과를 나타낸다(Brelvi and Studzinski, 1986). 비타민 D 뿐 아니라 비타민 E도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 UV 조사에 의해 DNA가 손상된 경우, *c-fos*와 *c-jun*의 발현을 증가시키고, 활성화된 전사인자가 전사조절 부위인 AP-1 위치에 많이 결합되게 함으로써, DNA 손상을 방지한다(Claycombe and Meydani, 2001). 비타민 D는 유방, 대장, 신경교종(glioma) 세포주에서, caspase나 death receptor, p53과 관계없이(Mathiasen et al., 1999), bcl-2와 bax에 의해 조절되는 경로를 통해 세포사멸을 유도하기도 한다(Ashkenazi and Dixit, 1998). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 세포 사멸을 촉진하는 Bax 단백질을 증가시키고, bcl-2의 발현을 억제한다(Mathiasen et al., 1999). 이러한 방식으로, 비타민 D는 암세포 사멸을 유도하며 암조직이 줄어드는 효과를 나타낸다.

이상에서 언급한 많은 결과들은 Northern blot이나 역전사 PCR, 정량적인 실시간 PCR과 같은 전통적인 유전자 발현 분석방법을 통해 얻은 것들이다. 최근까지 대부분의 연구가 가설로부터 출발하여 결론을 이끌어내는 방식 (hypothesis-driven approach)으로 이루어지고 있다. 이러한 방식은 영양소나 식이성분에 의해 영향을 받는 대사작용이나 신호전달 등 알려진 정보만을 기초로 하기 때문에, 분석할 유전자들의 범위가 제한적이며 편중될 가능성이 크다. DNA microarray 기술은 식이로 섭취한 뒤, 유전자 전체의 발현 패턴을 연구하기 때문에 한쪽으로 치우치지 않고 골고루 접근할 수 있다. 이것은 가설을 창출하는 강력한 접근법(hypothesis-generating approach)이라 할 수 있다. 대부분의 영양학자나 생물학자들은 가설에 기초하여 연구를 수행하도록 훈련을 받는다. 처음에는 전통적인 방식에서 탈피하는 것을 반대하기도 하겠지만, 머지않아 많은 과학자들이 사고의 전환이라는 모험을 통해 얻는 유익함으로 기뻐하게 될 것이다.

#### 4. 유전의 개인차

특정 영양소에 관련된 유전자에서 단일염기변이(SNP)를 가지고 있는 사람들은 그 영양소에 대한 필요량이 다를 수 있다. 이런 사람들은 그 영양소에 대해 더 혹은 덜 민감하며, 특정 질병에 걸릴 가능성도 더 크거나 혹은 적을 유전적 소인을 가지고 있다. 가령, methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)는 5,10-methylenetetrahydrofolate를 methyl-THF로 전환시킨다. MTHFR의 677번 염기인 cytosine이 thymine으로 변하여 mis-sense mutation이 일어나면, 이 효소는 활성이 감소하여 methyl-THF의 이용률이 떨어지게 된다. MTHFR에 동형접합 돌연변이(homozygous mutation ; TT genotype)가 있고 엽산이 부족한 사람은 homocysteine 양이 증가하는데, 이것은 심혈관질환을 일으키는 독립적인 위험인자이다. 만일 유전형이 TT인 사람은 CC인 사람보다 엽산을 많이 섭취해야 할 것이다. MTHFR의 유전형이 TT인 경우, 직결장암의 발생률은 더 낮는데(Jacques et al., 1996), 이러한 보호 효과는 엽산을 충분히 섭취하는 사람에게서만 나타난다고 한다(Ueland et al., 2000). 엽산 섭취가 부족한 사람들에게서 직결장암이 더 많이 발생한다는 보고가 있다(Ulrich et al., 2000).

영양유전체학에서는 영양소가 유전체에 미치는 영향에 초점을 두는 반면, 영양유전학(Nutrigenetics)에서는 개인간 유전차와 영양소와의 상관관계나 그것들이 건강과 질병에 미치는 영향을 연구한다. 이러한 목적으로 제작하여 시판되는 high-density oligonucleotide microarray를 이용하면, 수만개의 SNP를 동시에 찾아낼 수 있다. SNP array는 개인의 유전적 소인이나, SNP와 발병율과의 관계를 규명하는데 도움이 될 것이다. 이렇게 개인의 유전적 특성을 안다면, 그 사람에게 맞게 영양권장량을 조정할 수 있을 것이다.

#### 5. 식이성분과 독성

생명과 건강은 식이의 양과 질을 통해 크게 영향을 받는다. 식이는 외부의 스트레스원이나 독성물질이 발병에 미치는 영향을 막거나 줄이는데 중요한 역할을 한다. 식이에 존재하는 많은 성분들은 유독 혹은 해독작용을 하는 효소들의 기질로, 또는 저해제, 촉진제, 유도제 등으로 작용하여 독성물질들의 최종적인 영향을 조절하고 있다. Cytochrome P450 효소들은 약물과 xenobiotics, 발암물질, 스테로이드, 살충제, 탄화수소류, 천연물 등의 대사에 관련된 헴단백질들(hemeproteins)이다. 이 효소들은 1950년대 발견된 이래로, 계속하여 집중적으로 연구되고 있다(Coon et al., 1992; Poulos and Raag, 1992). 식이성분들은 cytochrome P450 유전자들의 발현을 조절하거나, mRNA 분해를, P450 단백질의 번역과정과 분해를 조절한다(Yang et al., 1992). 가령, 단백질의 양이 적거나 질이 낮은 단백질을 섭취할 경우, 사람과 동물에서 xenobiotics의 대사가 저해된다고 하며(Anderson et al., 1985; Birt et al., 1983), 이는 단백질 부족으로 인해 P450의 합성이 감소하였기 때문일 것으로 추정된다. 지질 특히 다가불포화 지방산의 섭취도 P450 유전자 발현에 관여하며, 영양소는 아니지만 식이에 함유된 여러 성분들도 P450 효소에 영향을 준다(Su고 and Rerguson, 2003; Yang et al., 1992). 적포도주에 존재하는 resveratrol은 P450 1B1을 강하게 저해한다(Guengerich et al., 2003). P450 1B1은 에스트로겐에 작용하여 4-hydroxylation 시키며, 이는 활성종(reactive species)들을 만드는데 이용되므로, resveratrol이 이 효소를 억제해 준다면 유방암 예방에 도움이 될 것이다(Damianaki et al., 2000; Hayes et al., 1996; Li and Li, 1987; Liehr et al., 1986). 양배추나 순무, 콜리플라워, 브로콜리와 같은 십자화과 식물에서 발견되는 indole-3-carbinol, indole-3-acetonitrile, indole-3-carboxyaldehyde와 같은 성분들은 장과



간에서 P450 1A1과 1A2의 발현을 증가시켜 bezo(a)pyrene (BP) hydroxylase를 자극한다(Vang et al., 1990). 위의 화합물, 특히 indole-3-carbinol은 mouse의 다중 장내 종양형성 모델에서 대장암 발생을 억제하는 것으로 나타났다(Kim et al., 2003). 이 외에도 glutathione S-transferase나 UDP-glucuronosyltransferase, N-acetyltransferase, sulfotransferase와 같은 해독 효소들이 고유의 혹은 중복된 기능을 통해 식품과 함께 섭취된 독소들(예, 살충제)이 체내에 축적되는 것을 방지해 준다. 결국은 독소와 해독작용을 하는 효소나 조절자들간의 균형 문제이다(Guengerich, 2000; Kassie et al., 2003).

## 6. 식이 보조제(Dietary supplement)의 안전성

특정 수준의 미량영양소, 단일 또는 다양한 영양소 형태의 식이 보조제의 섭취가 증가함에 따라 여러 사례에서 보조제의 안전성과 효능, 적절한 투약량이 알려지고 있다. 이 중 몇몇 보조제는 퇴행성 질병, 노화 등의 예방법으로 사용되고, 특히 비타민 A, C, E, 베타카로틴 등의 항산화제는 암 예방을 위해 사용되고 있다. 한편으로는 이러한 보조제의 효능과 함께 부작용들이 나타나고 있는데(Chang et al., 1979; Olson, 1993; Woutersen et al., 1999), 예를 들어 채소와 과일을 통해 섭취된 베타카로틴은 동물실험에서 피부암 발생을 억제한 반면(Snatamaria et al., 1988; Olson, 1993), 흡연자들을 대상으로 한 실험에서는 오히려 폐암의 발생률을 높이는 결과가 보고되었다(Albanes et al., 1996; Mayne et al., 1996; Omenn et al., 1996). 항산화능을 통해 항암 효과를 가지는 비타민 C (Chan and Reade, 1998)의 경우 생체내에서 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상은 비타민 C가 부족하지 않은 사람에게는 효과가 약하게 나타난다. 게다가 일부 보고에서는 이들 비타민이 생체내에서 산화적 스트레스 유발을

한다고 주장하기도 한다(Podmore et al., 1998). 건강인에게 6주 동안 500mg의 비타민C를 공급한 결과 DNA의 산화적 손상시 보이는 바이오마커인 8-oxoadenin은 증가하였고, 8-oxoguanine은 감소를 보였다(Podmore et al., 1998). Claycombe와 Meydani 등(2001)은 유전자 독성으로 인한 DNA의 손상을 경고하였다. 즉, 비타민 C와 E가 함께 공급 되었을 때, 두 개의 비타민 보충제가 결합된 처방은 사람 lymphoblastoid cell에서 방사선조사에 의한 DNA의 손상을 증가시키는 것이 관찰되었다(Sweetman et al., 1997). 이러한 예들은 모든 식품 보충제, 특히 새로운 뉴트라슈티칼의 잠재적 위험성에 대한 주의 깊은 조사가 필요함을 보여준다.

DNA microarray 기술의 사용은 생체 이물의 대사(xenobiotic metabolism), DNA 치료, 세포성장과 스트레스 반응의 원인이 되는 독소 반응 유전자의 동시 연구를 가능하게 하였다. 간 같은 조직은 사람의 경우 접근하기 어려운 반면, 순환하는 면역세포와 근육 생검법 등은 접근할 수 있는 방법이다. 또한 DNA microarray기술은 알려진 식품섭취에 의한 독성과 섭취량을 정하는데 필요로 하는 biomarker가 되는 유전자조합을 결정하는데 이용될 것이다. 일단 그러한 범주의 유전자가 확인되어지면 맞춤형 진단 array를 만드는 노력은 유용성이 입증되는 것이다.

## 7. 유전자변형식품(Genetically modified food)

1998년 유전자 변형 담배가 처음 소개된 이후로 유전자변형체(GMO, Genetically modified organisms)로 만들어진 식품의 안전성은 큰 관심사가 되었다. 10 여 년 전, International Food Biotechnology Council (IFBC)에서 유전자 변형 식품에 대한 보고 이후 FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations), WHO(World Health Organization),

OECD(Organization for Economic Cooperation and Development), ILSI(International Life Sciences Institute)를 포함한 몇몇 기구에서 유전자 변형 식품의 안전성 평가를 위한 특별한 지침서를 발표하였다.

유전자 변형 식품을 평가하는데 비교대상인 자연 식품의 개념은 오랫동안 사용되어져 오면서 안전하다고 밝혀진 전통식품의 개념을 바탕으로 두고 있다. 이 자연식품은 전통식품과 유전자변형식품 사이의 유사성과 차이를 확인하는데 도움을 줄 뿐 안전성 평가인 유전자 변형 식품의 부작용 또는 잠재적인 유용성을 보이기 위한 것은 아니다. 유전자 변형이 되지 않은 자연식품의 비교분석 결과는 후에 독성학과 생화학적 분석을 이용한 안전성 평가를 위한 가이드로서 제공될 수 있다.

일부 곡물의 경우에는 자연적 변이에 대한 연구 정보가 부족하여 앞에서 언급한 자연식품의 개념을 적용시키는데는 한계점이 있다. 현재의 방법으로는 유사한 유전형질을 가진 동일개체의 모체로부터 나온 경우 유전자 변형 식품과 자연식품의 차이를 평가하기 어렵고, 유전자 변형 식품의 효과 또는 부작용 등을 찾아내기 어려운 실정이다(Kuiper et al., 2002).

유전자 변형 식품의 안전성 논란은 유전자 변형의 과정, 새로운 단백질 합성의 안전성, 새 단백질의 잠재된 알러지 또는 독성, 실제 식단에서 식품으로서의 역할과 식품제조시 생길 수 있는 부작용 등으로 인해 계속될 것이다(Kuiper et al., 2001). 새로운 유전자의 주입은 유전자간 결합에 의해 유전자 발현, 효소적인 대사과정, 수용체 세포의 표현형에 영향을 미치게 될 수 있고, 잠재적인 독성, 알러지성 또는 발암성의 새로운 물질을 생산 할 수 있을 것이다. 유전자 변형 식품의 부작용(Murrey et al., 1999; Shewmaker et al., 1999)의 예를 들면, 유전자 변형된 쌀은 프로비타민 A의 생합성과정을

촉진시키기 위하여 만들어졌으나 예상하지 못했던  $\beta$ -carotene, lutein, Zeaxanthin 등의 카로티 노이드 유도체들을 생산하였다. 포도당 산화효소의 발현을 유전자변형을 통해 증가시킨 경우, 식물체 독성을 낳기도 하였다(Ye et al., 2000, Murry et al., 1999).

근거보다는 주요 특징에 관점을 두는 연구에서는 유전자 변형 식품과 그것에 상응하는 자연식품의 비교를 위한 특정 방법을 사용한다.

익히 알려진 유전자들의 역할을 살펴보면, 활동하는 유전자를 활동하지 않게 하거나 유전자-유전자 사이의 상호작용, 유전자 조절, 유전자로부터의 단백질 생산의 결과를 변화시키고 대사물질 생산 관련 유전자들을 분열시키거나 변화 시킬 수 있다고 한다. 이러한 유전자들은 안전성 평가를 위한 기준인 자연 식품에 상응하는 식품을 섭취한 사람과 동물로부터의 조직에서 알아보는 것과 마찬가지로 유전자 발현의 특성, 단백질 특성, 유전자 변형 식품의 대사적인 특성에 대한 연구가 될 것이다. 유전자 변형 토마토의 유전자 발현 패턴 비교를 위한 spotted DNA microarray 선행연구결과에서 자연적 변이의 범위를 벗어나는 곡물 발달 시기별 차이에 의해 생식 이상에 의한 변화를 보이기도 하였다(Kuiper et al., 2001). 다행히도 유전자변형 식물체의 유전자가 이를 섭취한 사람이나 동물에게 전달되는 경우에 관한 보고는 아직 없다(Kuiper et al., 2001; Einspanier et al., 2001; Chambers et al., 2002).

복잡하게 수행된 실험에서 유전자 반응을 예견하는 것은 거의 불가능하므로 유전자 발현분석의 전체적 접근법은 특히 중요한 정보를 제공할 것이다. 특정 유전자 변형 식품에 반응하여 발현 변화를 일으키는 유전자뿐만 아니라 의문점으로 남아있는 변하지 않는 유전자 군을 확보하는 것도 중요한 의미가 있을 것이다.

## 8. 식품유래 병원체

식품 안전성에 있어서 식품공급시 발생하는 외부로부터의 오염은 중요한 인자이다. 식품의 오염은 식품의 수확, 제조공정, 저장과 조리 등의 과정 중에 일어날 수 있다.

식품유래 병원체의 감염에 대한 통제가 이루어지고 있을지라도 식품유래 질병의 발생은 여전히 존재한다. 미국에서는 이러한 질병 발생으로 인해 매년 7,600만건, 32,500명의 입원과 5000명이 죽고, 경제적으로도 90~320억 달러를 소모하였다(Mead et al., 1999). 이는 매년 미국인 4명중 1명이 식품으로 인한 병에 걸리고, 1,000명 중에 한 명 이상이 입원하고 있음을 보여준다. 식품 병원균의 범위는 매우 폭이 넓다. 이것은 장의 박테리아, 호기성균, 혐기성 세균, 바이러스성 세균, 기생충, 생선에서의 독을 생성하는 박테리아와 갑각류 등이 포함된다. 예를 들어, 식품 병원균 중 가장 중요한 것의 하나인 *E. coli* O157:H7은 출혈성 대장염의 원인이 되고 전 세계적으로 심각한 문제를 야기한다(Allerberger et al., 1996; Altekruse et al., 1997; Bell et al., 1994).

많은 식품 병원균이 밝혀졌음에도 불구하고 82% 식품유래질병을 일으키는 병원균은 아직도 밝혀지지 못하고 있다(Maslanka et al., 2001; Robert, 2002). 매년 알려진 병원균에 의해 죽는 1,500명 중 75%는 *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*와 *Toxoplasma*에 의해 발병된다(Maslanka et al., 2001). 또한 동시에 많은 종류의 식품 병원균이 계속해서 발견되고 있다. 그 예로, *Salmonella* *Enteritidis*의 신종이 1980년대에 세계의 대부분 나라에서 달걀과 고기를 굽는 기구에서 발견되었고(Rodriguez et al., 1990), 1990년에는 유럽과 북미에서 높은 저항성을 가진 *Salmonella* *Typhimurium*의 신종이 소와 다른 동물에게 감염되었다(Tauxe, 1990).

전통적으로 식품 병원균은 세균 배양법과 항원을 이용한 면역학적 방법을 통해 동정한다(March and Ratnam, 1986; Sandersom et al., 1995). 식품 병원균 분석의 중요점은 식품과 환경에서 매우 작은 수의 병원균을 찾아내는 일이다. 전통적인 방법에서는 시험분석 이전에 병원균을 찾아내기 위하여 pre-enrichment, enrichment 그리고 post-enrichment 등의 많은 시간을 소비해야 한다. 갑작스런 식품유래 병원균 발생의 경우 발생 가능한 병원균을 추정하고 특이적인 분석을 해야 하므로 많은 시간이 소모된다. DNA microarray 기술은 일부 오염에 특이적인 분자적 신호(molecular signature)를 확보하는데 기여하였다. 이와 같은 병원균 형태의 공식화는 유전자의 100개 또는 천개에 기초를 두고 있으며, 일부는 병원균을 그대로 반영한다. DNA microarray는 감염에 의한 조직에서의 연구가 주요하게 이루어지고 있으나 반면 병원균 자체 연구에도 사용되어질 수 있다. 이러한 연구는 병원체와 바이러스 인자와 연관된 박테리아 계통상의 유전적 마커를 심은 DNA microarray가 사용된다(Call et al., 2001; Chizhikov et al., 2001). Chizhikov 등은 PCR과 DNA microarray를 통해 15종의 병원균을 성공적으로 구별해내었다(Chizhikov et al., 2001). DNA microarray는 적절하게 디자인한 cDNA 또는 oligonucleotide probe를 이용하여 식품 병원체 감염의 기전과 병인학을 이해하고 다양한 병원균으로 인한 숙주의 유전자 발현의 특징을 밝히는데 사용되어질 수 있다. 이 기술은 또한 넓은 범위의 병원균분석을 위하여 많은 표본을 동시에 스크리닝 하기 위한 통합적인 진단 기술로 사용될 수 있을 것이다.

## III. 결론

식사의 질과 양은 인간의 건강과 질병을 결정짓는 요소이다. 많은 식사의 영양소와 구성요소, 식품

보조제등은 유전자의 표현형 단백질의 발현, 대사 과정에 있어서의 변화를 주는 역할을 할 수 있다. 또한 이러한 요소들은 환경이 주는 독성이나 식품으로부터의 독성을 강화시키거나, 억제하기도 한다. DNA microarray 기술은 식품의 안전성과 관련된 진단기술로 독성 유전의 효과, 약물유전학, 세포 생물학, 예방에 초점을 맞춘 임상 연구와 질병의 조정에 사용되고 있다. 영양 유전학과 식품 안전성에 특정적으로 초점을 맞추기 위한 이 기술의 최대한의 이용은 사용하지 않는 현존하는 자원을 사용할

수 있는 자원으로 만드는 것이다. 야생의 자원을 사용하기 위한 diagnostic custom array와 간편화된 생물정보학 기술 노력은 계속될 것이다.

#### IV. 참고문헌

1. Toxicology Letters 150: 29-42. 2004
2. DNA microarray technology in nutraceutical and food safety

