

Application of RNAi Technology

인제대학교 분자생물학연구소 임상병리학과
김연수 ● kimys@inje.ac.kr

▶ RNA interference(RNAi)의 정의

RNAi(RNA 간섭 or RNA silencing)은 쉽게 말해 유전정보의 흐름과정(유전자 발현)에서 DNA와 함께 중요한 기능을 담당하고 있는 또 한 종류의 유전물질인 small RNA(sRNAs)가 mRNA를 방해하거나 안정성을 저하시키며, 경우에 따라서는 파괴하여 단백질 합성정보가 중간에서 전달되지 못하게 함으로써 유전정보의 발현을 제어하는 새로운 생명현상 조절 기전을 말한다.

생체에서 DNA로부터 전사되어 합성되는 small RNA 중에는 자신의 염기서열과 상동성을 가지고 있는 유전자로부터의 단백질 합성을 저해하는 종류가 있다. 이러한 현상은 DNA로부터 전사된 단백질 합성 유전정보를 가지고 있는 RNA가 염기서열 상보성을 가지고 있는 small RNA에 의해 인식되어 단백질 합성과정이 저해되어 일어나게 된다. 이렇게 염기서열상의 상동성을 가지고 있는 유전자로부터 단백질 합성을 저해하는 small RNA를 miRNA(microRNA)라고 명명하였으며, RNA에 의해 유전자 발현이

간섭을 받아 저해된다는 의미에서 이러한 현상을 RNAi라고 부른다. 1993년 미국 다스머스대학의 암브로스 박사 연구팀은 하등생명의 일종인 꼬마선충의 발생과정을 조절하는 일련의 유전자들을 찾아내었는데, 이 중 일부는 단백질을 합성하는 유전정보를 가지고 있지 않은 small RNA로 밝혀져 stRNA(small temporal RNA)라고 명명하였다. 이어 2001년과 2002년에도 여러 연구팀에 의해서 150여 개에 이르는 기준에 알려진 mRNA 염기서열과 80~90%의 상보성을 나타내는 새로운 small size RNA의 유전자들을 발견하였고 stRNA를 포함해 이 RNA들을 miRNA라고 명명하였다(현재 4,000 종 이상의 miRNA가 primates, rodents, birds, fish, worms, flies, plants and viruses에서 발견되었음. <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>). 또한 최근에는 이러한 miRNA가 인간을 포함한 영장류에서도 발견되었으며, 이러한 결과들로부터 miRNA가 진화적으로 보존된 새로운 종류의 유전자 발현 조절기전에 관여한다는 사실이 입증되어

관심을 모으게 되었고, 지난 수 년 간의 연구 결과 miRNA가 세포질에 존재하면서 진핵생물의 유전자발현을 단백질합성 단계에서 RNA 간섭을 통해 제어하는 것으로 알려지게 되었다(그림 1). 사실 단백질 합성단계에서의 유전자발현 조절현상의 증거는 1990년대 초 식물세포에서 먼저 발견되었다. 그러나 그러한 RNA를 매개로 한 유전자 발현 조절 현상은 1990년대 중반 이 후까지 식물학자들 이외의 연구자들의 관심은 끌지 못하였다.

이러한 일련의 연구와 독립적으로 지난 10여 년 간 많은 연구자와 제약회사 연구진은 유전자로부터 전사된 mRNA와 상보적인 염기서열을 포함하는 작은 DNA 조각(anti-sense oligonucleotide) 또는 anti-sense RNA의 발현을 이용한 유전자의 기능 규명 및 새로운 신약의 개발을 위해 각고의 노력으로 경주해 왔다. 이러한 개발과정 중에 1998년 미국 카네기 연구소의 파이어 박사와 메사추세츠 의과대학의 델로 박사 연구팀은 우연히 antisense RNA 및 sense RNA는 유전자 발현을 효율적으로 억제하지 못하는

반면, antisense RNA와 sense RNA를 분리하지 않고 동시에 합쳐서 형성된 두 가닥의 RNA(double-strand RNA : dsRNA)를 꼬마선충과 같은 하등생명체의 세포 안으로 도입시키면 표적 RNA만을 특이적으로 파괴하여 매우 효율적으로 유전자 발현을 억제한다는 사실을 밝혀내었다(그림 1, 2).

이러한 현상을 RNAi라 명명하였으며, 이 후 수년간 꼬마선충과 초파리를 연구재료로 한 발생유전학 연구에 매우 중요한 연구도구로 사용되어 왔다. 그러나 안타깝게도 그 당시에는 이러한 RNAi 현상을 고등생명체에서는 유도할 수가 없었다. 이렇게 하등생명체에서 관찰되는 RNAi 현상을 포유동물과 같은 고등생명체에서 유도할 수 있다면 계몽연구 및 의약품개발 분야에 획기적 전기를 이룰 수 있으리라는 생각에 많은 과학자들이 연구에 매진하였다. 그 결과 2001년 막스프랑크 연구소의 투셀 박사(현재 미국 록펠러대학교 교수)는 인간을 비롯한 포유동물에서도 RNAi 현상을 효율적이고 특이적으로 유도할 수 있는 siRNA(small interfering RNA)의 개발을 발표하는 쾌거를 이루어 냈으며, 여러 연구그룹에 의해 long dsRNA가 Dicer라는 효소에 의해 절단되어 siRNA(21~23nt)가 만들어지며, 이 siRNA는 RISC(RNA-induced Silencing Complex)라는 단백질 복합체(여러 종류의 RISC가 존재한다는 사실이 보고됨)와 결합하여 target mRNA에 작용한다는 기전이 규명되었다.

이러한 RNA 간섭에 의한 새로운 유전자 발현조절기전의 규명은 기존 많은 연구그룹에서 관찰하였지만 이론적으로 설명할 수 없었던 여러 가지 유전자발현 조절과 관련된 실험결과를 설명할 수 있게 되었으며, 하등생명체에서 바이러스 감염에 대한 방어기전, 유전체의 안정성을 유지하는 기전 등에 대해 설명할 수 있게 되었고, 보다 중요한 점은

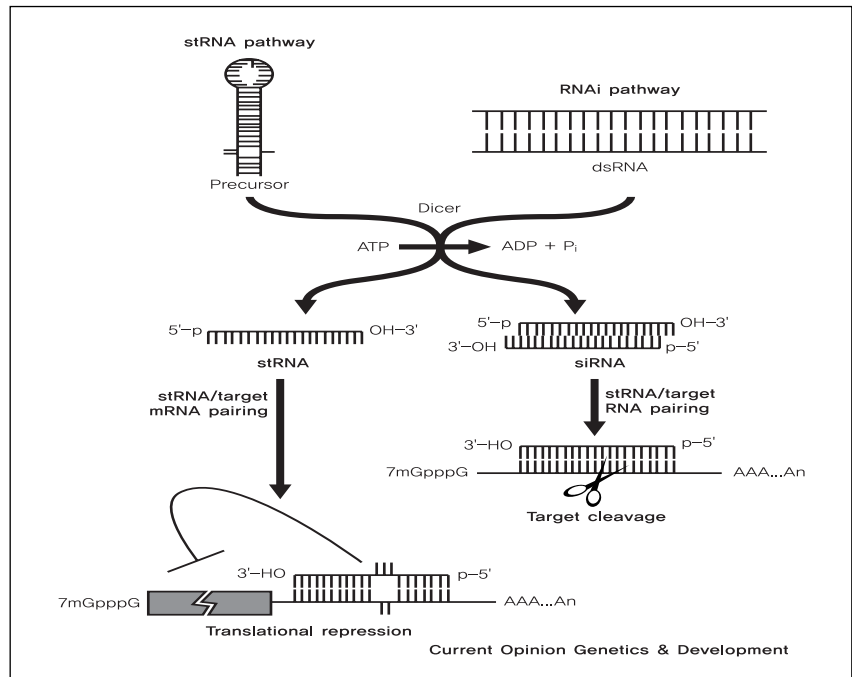


그림 1. The RNAi and stRNA(miRNA) pathways intersect. In both pathways, Dicer acts to generate the active small RNA regulator : siRNAs from dsRNA and miRNAs from ~ 70 nt stRNA precursors. siRNAs trigger destruction of a perfectly complementary target RNA; miRNAs repress the translation of targets with which they pair imperfectly(adapted from *CurrentOpinioninGenetics & Development* 2002, 12:225232)

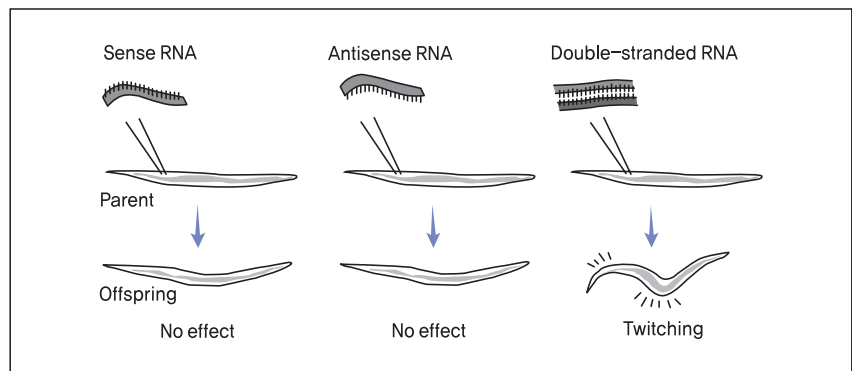


그림 2. 파이어 박사와 멜로 박사의 RNA 간섭 효과 실험. 꼬마 선충의 근섬유 단백질 정보를 담고 있는 mRNA를 타겟으로 하는 상보적 두 가닥 RNA(dsRNA)를 주입하였을 때 자손 꼬마선충에서 근섬유단백질의 양이 감소하였고 그 결과 근육경련에 의한 몸체의 뒤틀림이 관찰되었다. 그러나 타겟 mRNA와 동일하거나 상보적인 한 가닥의 RNA를 주입하였을 때는 아무런 변화가 관찰되지 않았다. (출처 : 노벨위원회 홈페이지)

고등생명체의 정상적인 생명현상 유지에 필요한 수 만개의 유전자발현의 정밀한 조절 기전을 발견하게 된 것이다. 예를 들면 약 3만여 개의 유전자를 가지고 있는 인간의 경우도 분화발생단계에 따라 필요한 일부의 유전자만이 엄격한 통제 하에 발현되고 다수의 유전자는 발현이 억제되고 있어야 한다.

RNA 간섭현상이 밝혀지기 전에는 고등 생명체에서 요구되는 복잡하고 정교한 유전자 발현 조절기전을 설명하는데 부족함이 있었지만 지금은 후속연구를 통한 생체 내 마이크로 RNA(miRNA : miRNA)에 의해 매개되는 RNA 간섭현상도 규명되어 앞서 언급하였던 정밀하고 복잡한 고등생명체의 유전자 발현 조절을 관장하는 새로운 중요한 기전으로 자리매김 한 것이다. 이러한 기술은 포유동물에서도 RNA 간섭을 유도할 수 있는 짧은 길이의 dsRNA를 세포 내외에서 합성할 수 있는 기술들이 개발되어 원하는 유전자만을 타겟으로 RNA 간섭을 일으킬 수 있는 방법이 개발되어 가능하게 되었다.

➔ RNAi 기술의 중요성

이 글을 쓰기 정확히 약 1년 반 전, 필자는 RNA 간섭을 이용한 신약개발에 관한 원고를 한 과학 잡지에 게재하면서 RNA 간섭의 중요성과 무한한 이용가능성에 대해 소개한 바 있다. 또한 불과 반 년 전에는 신문사 과학담당기자와 이른 아침 서울교육문화회관에서 RNA 간섭에 대한 인터뷰를 진행하면서 1998년 과학잡지 Nature에 투고된 논문을 통해 RNA 간섭 현상을 과학적으로 처음 규명한 파이어 박사와 멜로 박사가 노벨상을 예약해 두었으며, 적어도 10년 이내에 틀림없이 노벨상을 수상할 것이라는 생각을 피력하였다.

그 인터뷰 후, 채 한 달이 지나기도 전인 지난 2006년 10월 2일 새벽 2시(미국 태평양

현재 생명과학연구자들은 RNA 간섭 기술에 열광하고 있다. RNA 간섭 기술을 유전자 기능규명에 활용할 수 있기 때문이다. 게놈프로젝트 등을 통해 수많은 질병관련 유전자, 신약개발 관련 유전자, 발생과 분화, 노화 등 생명현상과 관련된 유전자 등 실제로 현재의 기술로는 감당할 수 없을 정도로 많은 유전자들이 밝혀졌다. 하지만 이전에는 이렇게 쏟아져 나오는 유전자들의 기능과 응용가능성을 쉽고 빠르게 규명할 수 있는 방법이 없었다.

연안지역 시간대), 미국 스탠퍼드대 의대 앤드류 파이어 박사는 새벽 단잠을 깨우는 전화벨 소리에 잠이 깨었고, 스웨덴에서 걸려온 그 전화는 2006년도 노벨 생리의학상 수상자로 자신과 함께 공동연구자로 RNA 간섭에 대한 연구를 진행하였던 미국 메사추세츠의대 크레이그 멜로 박사가 결정되었다는 소식을 전하였다. 이제 겨우 40대 중반이 갓 넘어 자신들이 불과 8년 전에 발표하였던 RNA 간섭에 관한 후속연구를 활발히 진행하고 있던 연구자들이며, 보통 학설이 발표되고도 10~15년 정도 여러 연구자들에게 검증 받은 후나 결정되어왔던 노벨상 수상의 전례로 보았을 때 파격적이며 의외의 결정으로 받아들여지고 있는 이번 노벨생리의학상 수상 발표는 그 만큼 RNA 간섭원리의 중요성과 파급효과가 얼마나 대단하게 평가되고 있는지를 증명해 주었으며, 이미 수 년 전부터 이 기술에 대한 과학계 및 의학계의 기대가 아래와 같은 일련의 발표를 통해 표출되어 왔다.

2002년 세계적 과학잡지 “사이언스”는 small RNA를 ‘올해 최고의 과학업적’에 선정하였다. 연이어 지난 2003년 12월에는 과학 전 분야를 대상으로 10대 중요 과학적 성과를 발표하였는데 그 중에 RNAi(RNA interference : RNA 간섭) 현상을 유도할 수 있는 siRNA(small interfering RNA) 기술이

선정되었다. 이러한 RNAi 열풍은 계속 이어져 지난 2004년 2월 미국 MIT 대학에서 발행하는 기술정보잡지인 “Technology Review”는 21세기 세상을 변화시킬 10대 기술을 선정하면서 ‘RNAi 기술을 이용한 질병치료 기술’을 그 리스트에 포함시켰다. 이러한 RNAi 기술에 대한 학술적 가치와 산업적 가치가 어떻게 평가 받고 있는지는 전문학술잡지에 출판되는 RNAi 관련 논문수의 높은 증가율과 RNAi 기술을 이용한 치료제 개발 제약기업이 짧은 기간 동안 수 십 개가 설립되었다는 사실에서도 쉽게 찾아볼 수 있다. 그리고 이러한 열광적 반응의 정점에서 RNAi 현상 규명은 노벨상 수상의 영예를 얻게 된 것이다.

➔ Post-Genome

연구에서의 RNAi 기술의 이용

현재 생명과학연구자들은 RNA 간섭 기술에 열광하고 있다. RNA 간섭 기술을 유전자 기능규명에 활용할 수 있기 때문이다. 게놈프로젝트 등을 통해 수많은 질병관련 유전자, 신약개발 관련 유전자, 발생과 분화, 노화 등 생명현상과 관련된 유전자 등 실제로 현재의 기술로는 감당할 수 없을 정도로 많은 유전자들이 밝혀졌다. 하지만 이전에는 이렇게 쏟아져 나오는 유전자들의 기능과 응용가능성을 쉽고 빠르게 규명할 수 있는 방법이 없었다. 예를 들어 불과 2~3년 전까지만

하더라도 유전자 하나의 기능을 알아보기 위해 적게는 1년, 많게는 3년이라는 긴 시간과 엄청난 연구비가 필요했다. 그런데 만약 여기에 RNA 간섭 기술을 이용한다면 어떻게 될까? RNA 간섭 기술을 활용하면 수개월 내에 유전자 기능을 쉽게 규명할 수 있다.

RNA 간섭기술은 세포수준 뿐 아니라 동물 모델 및 인체를 대상으로도 다른 방법들에 비해 상대적으로 효율적이며 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 억제할 수가 있어 기존 분자 및 세포생물학 연구를 포함해 모델동물을 이용한 기초/응용연구의 패러다임을 변화시키고 있다고 해도 과언이 아닐 정도이다.

예를 들어 암과 관련된 유전자를 DNA 칩을 이용하여 스크리닝하고 암세포에서 과발현되는 유전자를 확보하였을 때, 손쉽게 그 유전자를 타겟으로 RNA 간섭을 유도하는 작은 조각의 dsRNA(siRNA : small interfering RNA; ~ 21nt RNA)를 암세포에 주입하거나 암세포에서 생산하게 만들었을 때 암세포의 특징이 일부 사라진다면 그 유전자의 기능 중 일부가 암의 발생 및 또는 암세포 유지에 관여하는 것이라고 쉽게 결론지을 수 있어(그림 3) 그 후속 연구를 진행할 수 있게 된다. 이러한 연구는 암 분야 뿐 아니라 생명과학 전반에 걸쳐 사용될 수 있다는 것이 이 기술의 잠재력을 높이 평가하고 있는 이유이다.

더군다나 최근에는 그동안 포유동물에서는 불가능하다고 알려졌던 전체 게놈을 타겟으로 한 유전자결핍 라이브러리(knock-out library)를 대치할 수 있는 RNA 간섭을 유도하는 genome scale knock-down library가 다양한 형태로 구축되어(합성 RNA, shRNA cassette in plasmid, retroviral vector, and lentiviral vector) 유전자의 기능을 전체 게놈을 대상으로 스크리닝(genome-wide knockdown

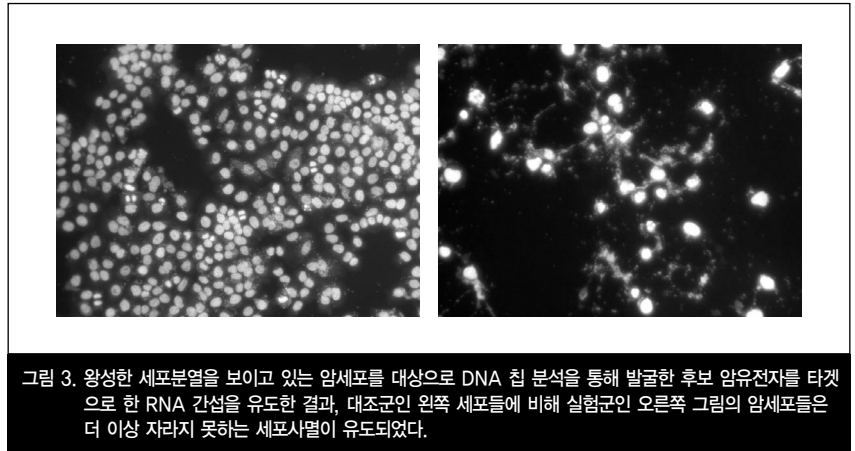


그림 3. 왕성한 세포분열을 보이고 있는 암세포를 대상으로 DNA 칩 분석을 통해 발굴한 후보 암유전자를 타겟으로 한 RNA 간섭을 유도한 결과, 대조군인 왼쪽 세포들에 비해 실험군인 오른쪽 그림의 암세포들은 더 이상 자라지 못하는 세포사멸이 유도되었다.

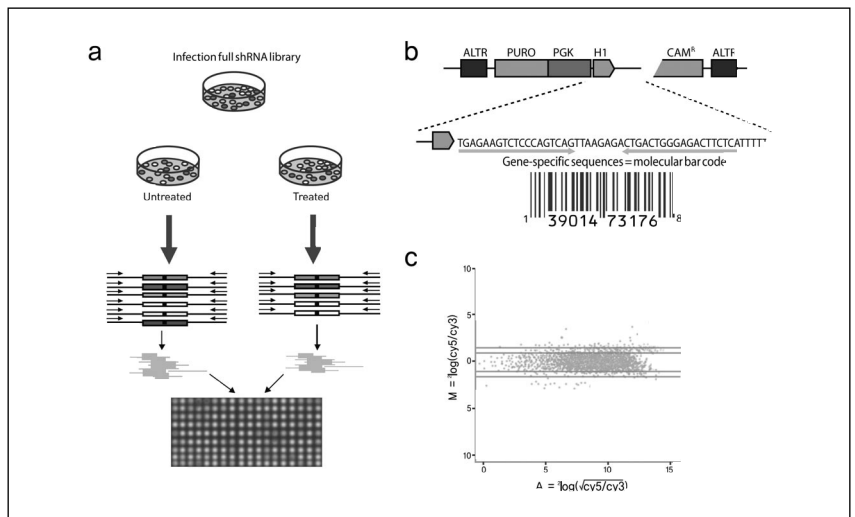


그림 4. siRNA library bar-code screens. (a) Schematic outline of the bar-code technology. A large population of cells is infected with the NKL shRNA library and divided into two populations. One is treated (or selected), whereas the other population serves as a reference for the hybridization. From each population, genomic DNA is isolated and shRNA cassettes are recovered by PCR. The PCR products are used as templates for an invitrolinear amplification reaction to generate RNA probes that are subsequently labeled with fluorescent dyes. The probes from the selected cells and reference population are hybridized to a DNA microarray containing the complementary sequences from the complete NKL shRNA library. (b) An integrated shRNA vector also delivers a gene-specific identifier in the form of a unique 19-mer 'molecular bar code' that can be used to identify which cell carries any given knockdown allele in a large population of cells. (c) An example of the result of a bar-code hybridization. The graph depicts the log2 of the average intensity versus the log2 of the fluorescence intensity ratio. shRNA vectors that are enriched by the selection method are represented by spots with an increased ratio (adapted from *Nat.Chem.Biol.*, 202-206, 2006).

screening) 할 수 있게 되었으며(그림 4), 이를 사용하여(여러 Biotech company에서 구입할 수 있음) 생명현상의 규명 뿐 아니라 신약개발의 새로운 패러다임을 도출시켜 이전보다 부작용이 적은 신약후보물질을 발굴하는데 이용되고 있다.

▶ RNA drug, 새로운 유전자치료의 가능성

지난 2005년 9월 7일 미 생명공학기업인 시르나(Sirna)는 생명공학계를 한바탕 떠들썩하게 만들었다. 퇴행성 각막질환(황반변성 : AMD) 치료를 위해 개발한 신약의 임상시험 허가를 미 식약청(FDA)에 요청했기 때문이다.

신약을 상용화시키려면 임상시험 허가는 당연히 거쳐야할 일반적인 과정이다. 그런데 유독 시르나사의 신약이 화제가 된 건 왜일까? 바로 신약이 알약이나 가루약이 아닌 RNA 간섭을 유도하는 siRNA였기 때문이다. 그로부터 약 1년 후인 지난 2006년 8월 Sirna사는 임상시험이 일부 성공했다고 발표했다. Sirna사는 황반변성을 일으키는 단백질의 발현을 억제하는 'SiRNA-027' 을 26명의 환자 눈에 넣은 결과 8주 후 19%에 해당하는 5명의 환자에게서 시력이 월등히 향상되는 실험 결과가 나왔다고 보고했다. 만약 이 siRNA가 임상 시험에 성공하고 시판허가를 받으면 RNA 자체가 질병을 치료하는 첫 번째 신약이 되는 것이다. 현재 폐렴에 관한 siRNA 임상 시험이 진행되고 있으며, 이 외에도 HIV, HCV와 같은 바이러스성 질환, 심혈관질환, 암, 그리고 내부비계 질환 등 다양한 질환을 치료하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 지금까지 알려진 수많은 질환이 감염성 병원체 및 세포 내 유전자발현과 관련되어 있어 RNA 간섭을 이용한 유전자 발현의 제어기술의 개발은 앞으로 중요한 신약개발의 일환으로 진행되고 있지만 새로운 유전자치료 방법으로

자리매김 하기 위해서는 다음과 같은 hurdle의 극복이 과제로 남아 있다.

치료제 개발에 있어 RNAi 기술을 target validation부터 functional genomics 까지 적용함으로써 매우 성공적인 결과를 이루어 내고 있다. RNAi에 의해 knock-down 되는 target gene의 발굴은 RNAi 치료제 개발의 첫 걸음이다. 하지만, 성공적인 RNAi 치료제의 개발에는 아직 여러 가지 난관이 존재한다. RNAi-based drug의 개발 방향은 (1)target validation (2)in vitro 상에서 효과적인 drug candidate 발굴 (3)in vivo 상에서 약효를 향상시키기 위해 (2)에서 개발 검증된 drug candidate의 최적화 (4), (3)에서 가장 유력한 candidate를 사용한 임상 적용의 순이다. 분명한 것은, 개발될 drug은 제조

단계에서 경제적이어야 하며, 복용하기 간편하고 안전하여야 하고, 어떠한 독성도 유발해서는 안 된다는 점이다. 그러나 RNAi 역시, 다른 RNA-based drug의 실패 원인이 되는 4가지 문제점(stability(안정성), delivery(전달), pharmacokinetics(약물의 체내 흡수), potency(효능))이 향상되어야 한다 (serum stability : 17일 이상의 half-life, circulation time : 4일 이상, tissue targeting : liver & endothelium, cellular stability : 21일 이상). RNAi-based drug을 개발하는 기업들은 위에서 언급한 난제를 극복하기 위한 기술적 진보를 거듭하고 있으며, 더구나 RNAi-based 치료제가 기존의 antisense RNA나 ribozyme과 같이 cellular process를 이용하지 않는 RNA-derived 치료제와

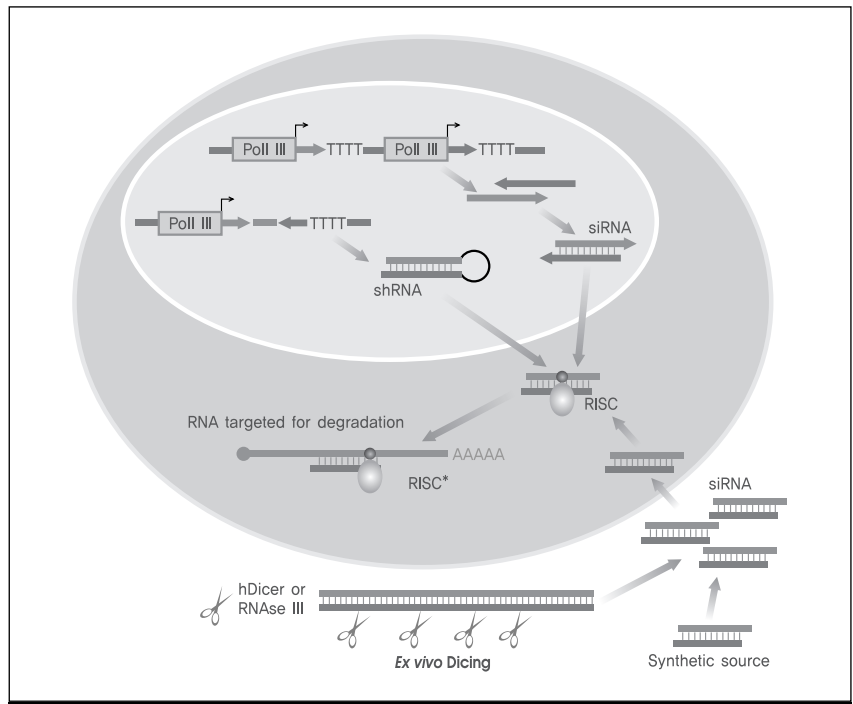


그림 5. siRNA 제조 방법. (출처 : Nature Biotech. 2003)

신약을 상용화시키려면 임상시험 허가는 당연히 거쳐야할 일반적인 과정이다. 그런데 유독 시르나사의 신약이 화제가 된 건 왜일까? 바로 신약이 알약이나 가루약이 아닌 RNA 간섭을 유도하는 siRNA였기 때문이다. 그로부터 약 1년 후인 지난 2006년 8월 Sirna사는 임상시험이 일부 성공했다고 발표했다. Sirna사는 황반변성을 일으키는 단백질의 발현을 억제하는 'SiRNA-027'을 26명의 환자 눈에 넣은 결과 8주 후 19%에 해당하는 5명의 환자에서 시력이 월등히 향상되는 실험 결과가 나왔다고 보고했다. 만약 이 siRNA가 임상시험에 성공하고 시판허가를 받으면 RNA 자체가 질병을 치료하는 첫 번째 신약이 되는 것이다.

구별되는 특징인 siRNA biogenesis가 대부분 인체 세포 안에서 수행된다는 사실은 RNAi-based drug 개발에 매우 유리한 장점으로 평가되고 있다. 그러나 세포 안으로 도입된 shRNA 발현벡터에 의해 장기간 shRNA가 발현되면 miRNA에 의한 유전자 발현조절에 perturbation이 유발되어 예측하지 못하는 부작용이 일어날 수 있다는 사실도 실험적으로 보고되고 있어 이 현상에 대한 대비책도 중요한 문제로 부각되고 있다.

▶ **siRNA의 제조 방법과 knock-down 효과의 불확실성**

siRNA를 이용한 RNAi 유도가 mammalian cell에서도 가능하다는 사실이 확인된 지 5년이 지난 현재 많은 연구자들이 이 방법을 다양한 세포 뿐 아니라 동물모델에도 적용하는 단계에 이르렀다. 현재 동물세포에서 사용될 siRNA를 제조하는 방법은 크게 *in vitro*에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, transfection 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법(*in vitro* preparation of siRNA)과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 shRNA(short hairpin RNA) 발현 벡터 (플라스미드벡터 및

다양한 바이러스벡터) 또는 PCR-derived siRNA expression cassette를 세포 안으로 transfection 또는 infection 시키는 방법 (*in vivo* expression of shRNA), 두 가지로 나누어 질 수 있다. 이들 방법들은 각자 나름 대로의 장단점을 가지고 있으며 연구자가 어떤 방법으로 siRNA를 제조하고 세포 또는 동물모델로 도입하느냐 하는 결정은 실험의 목적 및 표적 유전자 산물의 세포생물학적 기능에 따라 달라질 수 있는데, 지금까지 RNAi를 유도하기 위해 사용되었던 siRNA 제조 방법은 다음 5 가지로 정리할 수 있다 (현재는 주로 1번과 4번이 사용되어지고 있음).

- (1) RNA oligonucleotide의 화학적 합성 : 연구자들에게 가장 쉬운 siRNA 제조 방안이지만 적용할 수 있는 세포 및 모델에 한계가 많으며, RNAi 효과를 2~3일간만 유지할 수 있으므로 long-term study를 위한 실험에는 적합하지 않다. Dharmacon, Ambion, 바이오니아와 같은 바이오컴퍼니에서 합성 주문 서비스를 실시하고 있다.
- (2) *in vitro* transcription을 이용한 small

RNA의 합성

(3) *in vitro* transcription에 의해 합성된 long dsRNA의 Rnase III family enzyme (e.g. Dicer, Rnase III)을 이용한 절단 : 위에서 이미 언급한 바와 같이 하등생명체를 대상으로 할 때는 long dsRNA를 직접 주입해도 RNAi 현상을 효과적으로 유도할 수 있지만, 포유 동물세포를 대상으로 하면 PKR 활성화에 따른 비특이적 단백질합성 저해가 유발되어, 필히 도입하기 전에 인터페론 발현을 유도하지 못하는 작은 크기의 siRNA로 절단하여야 한다. 이를 위하여 실제 세포 내에서 long dsRNA를 siRNA로 processing 하는 효소인 RNase III(or Dicer)를 이용하여 다양한 염기서열을 갖는 siRNA를 생산하는 방법이다. 이 방법은 기존의 *in vitro* transcription kit와 동일한 방법으로 비교적 긴 sense 및 anti-sense RNA를 합성하여 annealing 시킨 뒤, RNase III를 반응시켜 시험관 내에서 siRNA 제조하기 때문에 표적 유전자의 대한 다양한 염기서열을 갖는 siRNA가 만들어져 한 종류의 siRNA 만으로 유전자 발현을 억제하려는 시도 보다는 보다 높은 확률로 gene silencing을 유도할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 이 방법 역시 위에서 언급한 다른 방법과 마찬가지로 일시적인 유전자발현 억제 만을 유도할 수 있으며, 또 하나의 내포된 문제점은 다양한 heterogenous siRNA의 사용으로 인한 non-specific gene silencing의 가능성이 존재한다는 점이다.

(4) shRNA expression plasmid나 viral vector의 세포 내 전달을 통한 발현 : 위에서 언급한 방법들은 모두 transient gene silencing만을 유도할 수 있기 때문에 phenotypic change를 보기 위한 실험, 또는 gene silencing에 의한 effect가 수 일 이후에

나타나는 경우에는 사용에 제한이 따른다.

이러한 문제점을 해결하는 방법으로 siRNA를 장기간 동안 세포 내에서 발현시킬 수 있는 벡터시스템이 개발되기 시작하였다. 이를 위한 벡터의 디자인은 대부분 짧은 RNA transcript를 전사하는 RNA polymerase III (pol III) promoter를 이용하는데(대표적인 pol III promoter로는 U6 promoter와 H1 promoter가 사용되고 있음. 필자 연구실에서 비교한 바에 의하면 두 promoter 사이에 큰 차이는 없는 것으로 평가되었음), 이들 promoter로부터 siRNA target sequence의 sense 및 anti-sense sequence가 적당한 개수의(4~11nt) loop를 사이에 두고 위치하며 발현되면 small hairpin 구조의 RNA (shRNA)가 합성되게 된다. 이렇게 합성된 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA processing enzyme(Dicer or Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 target gene의 silencing을 유도하게 된다.

이 방법에 이용되는 벡터시스템으로는 플라스미드, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 벡터 등이 보고되고 있다. 최근에는 miRNA 구조를 이용하면서 polII promoter system을 사용하는 shRNA 발현 벡터도 개발되어 사용되고 있다.

(5) PCR-derived siRNA expression cassette의 세포 내 전달을 통한 발현

위 5가지 방법 중, 3번 방법을 제외한 4가지 방법을 사용하여 siRNA를 제조하려면 먼저 knock-down을 유도하려는 유전자의 mRNA 염기서열에서 siRNA에 상보적인 21~23nt의 target sequence를 결정 (design)해야 한다. 이 target sequence에 따라서 RNAi 효과의 효율성이 결정되는데 지난 수년간, 많은 siRNA의 염기서열과 그에

특히 RNA 간섭기술이 이렇게까지 각광을 받을 수 있게 한 결정적 연구는 인체세포를 비롯한 포유동물 세포에서도 인위적인 RNA 간섭기술을 적용할 수 있게 한 투술 박사를 비롯한 일부 연구자들에 의해 진행되었다. 그럼에도 불구하고 노벨상 선정위원회는 수상자로 파이어 박사와 멜로 박사만을 선정 발표하였다. 비록 꼬마선충이라는 하등생물체를 대상으로 한 연구결과이지만 기존의 분자생물학적 지식으로는 설명할 수 없는 현상을 규명하기 위해 창의적인 시도와 해석을 통해 꾸준한 연구로 생명현상의 중심인 유전정보 흐름 및 제어작용에 새로운 지평을 여는 조절기전을 밝혀낸 것이 인정을 받은 것이다.

따른 RNAi 효율을 조사한 data base (secondary structure, GC contents, cis-acting sequences binding to proteins, asymmetry of 5' and 3' sequences, and experimental education with siRNA library...등을 참고하여 결정됨)를 기초로 functional siRNA를 디자인 할 수 있는 알고리즘이 개발되어 몇 군데 web site를 통해 서비스 되고 있다(<http://www.dharmacon.com>, <https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>, <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA>, <http://side.bioinfo.ochoa.fib.es>, <http://sisearch.cgb.ki.se/>, <http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>, <http://www.cs.hku.hk/~sirna>). 그러나 이렇게 서비스 되고 있는 알고리즘을 이용하여 결정된 모든 siRNA가 꼭 target mRNA를 효과적으로 degradation시킬 수 있다고는 말할 수 없다. 그러므로 한 유전자 당 3~4 군데의 target site를 선정하여 siRNA를 제조하는 것이 유전자 억제 실험의 성공 확률을 높일 수 있다. 이러한 현상이 관찰되는 이유는 siRNA들에게 요구되는 사항들이 충족된다 하더라도, 그와는 다른 여러 가지 factor들이

RNAi 효율을 결정하는데 관여하기 때문이라고 해석된다. mRNA와 단백질의 안정성 및 세포 내 위치, RNAi machinery protein들의 상태, 다양한 genetic compensation mechanisms 등, 이 밖에도 아직 설명할 수 없는 여러 요소들에 의해 RNAi 효율이 결정된다고 알려져 있다. 이러한 이유 때문에 동일한 세포를 대상으로 합성 siRNA와 shRNA 발현 벡터를 적용하였을 때, consistent result가 관찰되지 않는 경우가 발생할 수 있으며, 동일한 RNAi 방법을 다른 세포에 적용하였을 때도 상이한 결과를 관찰할 수 있다. 더 나아가, RNAi 적용 초기에는 높은 knock-down 효율을 보이던 세포가 더 이상 동일한 방법 및 siRNA에 의한 RNAi 효과를 나타내지 못하는 경우도 일어날 수 있다.

Off-target RNAi effect

앞서 언급하였듯이 RISC 단백질체와 결합한 21~23nt의 RNA는 80~90%의 상동성을 보이는 mRNA를 targeting 할 수 있다 (miRNA action mechanism). 그러므로 도입한 siRNA에 의해 target mRNA가 아닌 다른 종류의 mRNA들이 대상이 되어 non-

specific knock-down 현상이 일어날 가능성이 존재하며, 이러한 현상을 off-target effect 라고 부른다. 이러한 off-target effect는 siRNA design algorithm의 발전과 사용하는 siRNA 양 및 구조의 변화를 통해 감소시키는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이 밖에도 연구자들이 세포를 대상으로 RNAi 효과를 유도하기 위해서는 RNA/DNA transfection 또는 viral infection 과정이 필수적으로 수행되어야 한다. 이러한 과정은 세포에 상당한 stress 및 damage를 유도할 수 있는 과정이므로 expression profile의 변화를 수반하게 된다. 이러한 현상은 연구자들이 misinterpretation을 할 수 있게 하는 중요한 요인으로 작용한다. 그러므로 RNAi를 이용하여 연구를 수행할 때는 off-target effect와 expression profile change를 최소화시킬 수 있도록 해야 하며, 이러한 현상의 가능성을 배제할 수 있는

증거가 되는 negative- 및 positive control을 사용하여 데이터를 분석해야 한다.

▶ 마치며

기대는 하고 있었지만 예상보다 이른 노벨상 수상소식을 접한 파이어 박사는 수상발표 직후 가진 인터뷰에서 “아직 RNA 간섭 생체 내 기전 및 역할에 대한 이론적 정립이 완성된 상태도 아니고, 지금까지의 RNA 간섭 기전 규명에 다른 연구자들의 기여가 매우 크기 때문에 자신들만 상을 수상하는 것이 믿기지 않으며, 떳떳하지 못한 마음과 죄송스러운 마음이 있다”고 털어놓았다. 파이어 박사의 말대로 록펠러대학의 필립 샤프 박사와 투솔 박사(독일 막스플랑크 연구소에서 RNA 간섭 연구 중 미국 록펠러 대학으로 옮김), 다스머스 대학의 암브로스 박사, 콜드스프링 연구소의 하노 박사 등, 많은 연구자들의 결과가 없었으면

불과 8년이라는 짧은 기간에 유전자 기능규명을 위한 기초연구부터 신약개발을 위한 응용 연구에 이르기까지 모든 생명과학분야의 핵심기술로 부상하지 못하였을 것이다. 특히 RNA 간섭기술이 이렇게까지 각광을 받을 수 있게 한 결정적 연구는 인체세포를 비롯한 포유동물 세포에서도 인위적인 RNA 간섭 기술을 적용할 수 있게 한 투솔 박사를 비롯한 일부 연구자들에 의해 진행되었다. 그럼에도 불구하고 노벨상 선정위원회는 수상자로 파이어 박사와 멜로 박사만을 선정 발표하였다.

비록 꼬마선충이라는 하등생물체를 대상으로 한 연구결과이지만 기존의 분자생물학적 지식으로는 설명할 수 없는 현상을 규명하기 위해 창의적인 시도와 해석을 통해 꾸준한 연구로 생명현상의 중심인 유전정보 흐름 및 제어작용에 새로운 지평을 여는 조절기전을 밝혀낸 것이 인정을 받은 것이다.

<참고문헌>

Birmingham, A. *et al.* 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods* **3**, 199-204 (2006).

Dorsett, Y. & Tuschl, T. siRNAs : applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 318-329 (2004).

Dykxhoorn, D.M., Palliser, D. & Lieberman, J. The silent treatment : siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther.* **13**, 541-552 (2006).

Echeverri, C.J. & Perrimon, N. High-throughput RNAi screening in cultured cells : a user's guide. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 373-384 (2006).

Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199-213 (2002).

Fedorov, Y. *et al.* Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* **12**, 1188-1196 (2006).

Fillipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A. & Pillai, R.S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 331-41 (2005).

Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene

silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349 (2004).

Harborth, J. *et al.* Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **13**, 83-105 (2003).

Holen, T., Amarzguoui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E. & Prydz, H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1757-1766 (2002).

Huesken, D. *et al.* Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* **23**, 995-1001 (2005).

Ito, M., Kawano, K., Miyagishi, M. & Taira, K. Genome-wide application of RNAi to the discovery of potential drug targets. *FEBS Lett.* **579**, 5988-5995 (2005).

Jackson, A.L. & Linsley, P.S. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* **20**, 521-24 (2004).

Jackson, A.L. *et al.* Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* **12**,

1179-1187 (2006).

Kasim, V., Taira, K. & Miyagishi, M. Screening of siRNA target sequences by using fragmented DNA. *J. Gene Med.* **8**, 782-91 (2006).

Lin, X. *et al.* siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4527-535 (2005).

Reynolds, A. *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**, 326-330 (2004).

Saetrom, P. & Snove, O., Jr. A comparison of siRNA efficacy predictors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 247-53 (2004).

Sontheimer, E.J. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 127-38 (2005).

Tomari, Y. & Zamore, P.D. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* **19**, 517-29 (2005).

Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J. & Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **20**, 515-24 (2006).

Zhao, H.F. *et al.* High-throughput screening of effective siRNAs from RNAi libraries delivered via bacterial invasion. *Nat. Methods* **2**, 967-73 (2005).