

유전체 및 거대 DNA의 엔지니어링을 위한 기술 - Recombinogenic Engineering

고 민 수 (솔젠트(주) 분자유전연구소 연구소장)

인간유전체분석 (Human genome project) 등의 DNA 염기서열분석이 대량으로 완성되면서 방대한 양의 염기서열 정보가 쏟아지고 있다. 이러한 다량의 유전자 정보는 이른바 기능유전체학 (functional genomics) 연구과정에 의해 이들의 생명체에서의 기능을 규명해야 한다.

이러한 과정에서 BAC (bacterial artificial chromosome), P1 vectors, PAC (P1 artificial chromosome) 등과 같은 거대한 유전자를 실을 수 있는 vector들이 유용하게 사용된다. 이들은 여러 유전자로 구성된 eukaryotic gene cluster, prokaryotic regulons, 많은 바이러스 게놈 전체, 그리고 모든 cis-acting 조절인자들을 포함하는 충분한 크기의 진핵세포 유전자를 모두 하나의 분자내에 실을 수 있는 특성이 있다.

하지만 제한효소 사용과 *in vitro*에서의 정제과정이 필수적인 전통적인 클로닝에는 거대한 크기의 유전자를 다루기에는 많은 문제점들에 봉착하게 되어 이와 같은 거대 클론들을 제작하거나 사용되는 데에는 많은 제약이 있다.

최근에는 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 한가지 방안으로 대장균 (*E. coli*) 내에서 상동성재조합 (homologous recombination)을 이용한 *in vivo* manipulation 방법이 개발되고 있다. 여기에서는 이러한 기술에 대한 내용과 최근까지 개발되고 있는 기술들과 이들의 응용 분야 및 그 파급기술들에 대해 논의하고자 한다.

상동성재조합을 이용한 엔지니어링

상동성재조합은 2개의 DNA 분자간에 매우 정확하

고, 특이적으로 유전정보를 교환하도록 한다. 이러한 특성 때문에 DNA의 크기에 상관없이 엔지니어링 할 수 있게 된다. 이러한 현상은 전통적인 미생물유전학 분야에서 많이 다루어져 왔다. 특히 대장균의 유전학 tool로서 conjugation 및 generalized transduction 과정 등은 이와 같은 상동성 재조합 현상을 이용하여 개체가 유전자의 교환을 유도한 것들이다.

이러한 *in vivo* 반응의 원리를 *in vitro* 재조합 기술과 접목하여 현재는 거대한 크기의 유전자나 복잡한 구조의 재조합 DNA를 구성하는 기술로 발전하고 있다. 특히 염기서열과 상관없이 target을 선정할 수 있다는 장점 때문에 그 활용도는 매우 높게 평가되고 있다.

일반적으로 상동성재조합을 이용한 engineering 과정에서 재조합 클론을 선택할 수 있는 방법으로 선택표시자 (selection marker, SM)와 역선택표시자 (counterselection marker, CSM)를 사용하게 된다. 이는 [그림 1]에 나타난 바와 같이 재조합과정에 의해 바꾸고자 하는 위치 (target site)에 SM 유전자 또는 이와 함께 CSM 유전자를 넣어주게 된다. 이 과정도 역시 상동성재조합을 이용하여 SM (예, 항생제 내성유전자)을 지니는 클론을 선별함으로써 손쉽게 수행할 수 있다. SM을 지니는 재조합체의 양쪽 말단 염기서열 (flanking sequence)과 동일한 서열을 갖는 목적유전자 (gene of interest)와 다시 상동성재조합 반응을 일으켜 CSM이 없어지는 클론을 선별함으로써 재조합 클론을 얻게 된다. 이때 CSM으로는 *rpsL*, *tetR*, *sacB* 등의 conditional lethal 유전자를 사용할 수 있다. 이렇게 만들어진 재조합 DNA는 후속과정에서 문제가 될 수 있

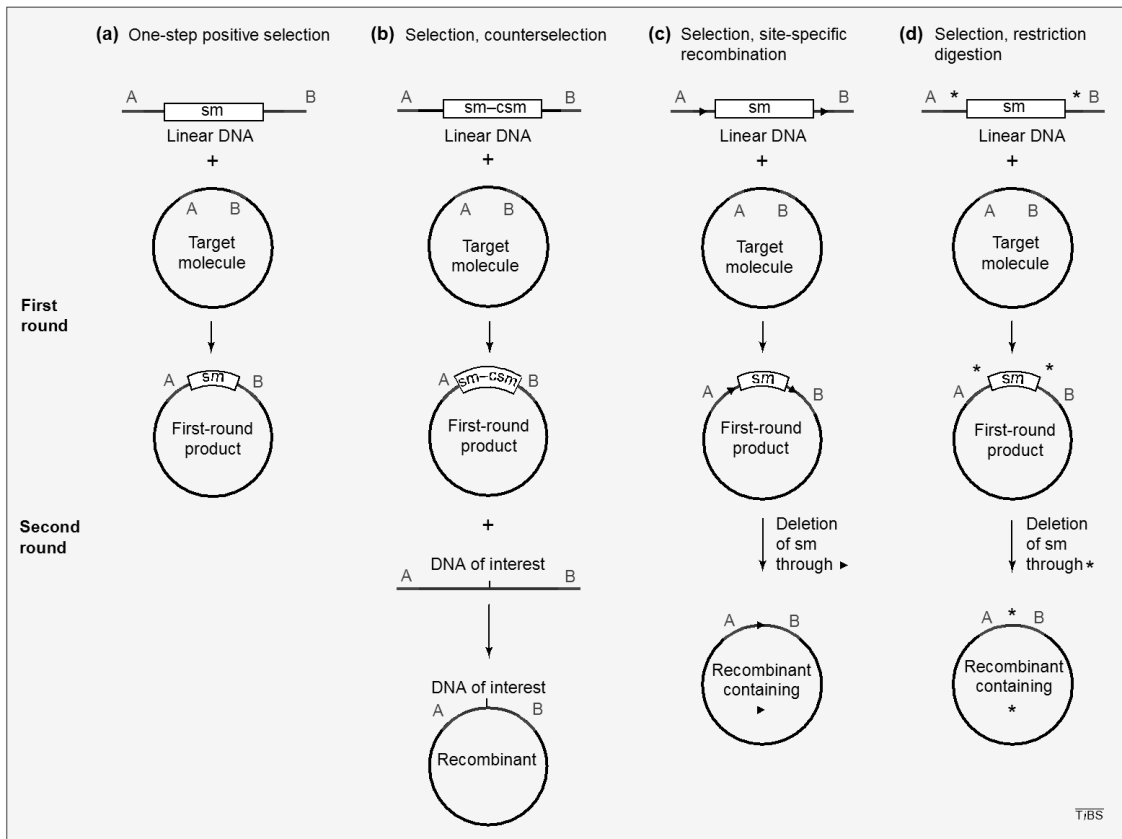


그림 1 Four basic variations for recombinogenic engineering. In all four variations, the target molecule is intact and could be an episome (e.g. plasmid, bacterial artificial chromosome) or the *Escherichia coli* chromosome.

는 항생제 내성유전자와 같은 SM가 전혀 남지 않게 되는 특성이 있다. 이는 재조합 생물체 (GMO)의 문제 중 하나인 항생제 내성 유전자의 환경유출에 따른 위험성을 제거할 수 있다는 장점이 있다. 경우에 따라서 Cre 또는 FRP 와 같은 site-specific recombination system을 접목시켜 marker를 제거하기도 한다.

대장균에서의 상동성재조합을 이용한 엔지니어링

대장균이 DNA 조작을 위한 host로 가장 많이 사용되지만, 재조합 엔지니어링에는 *Saccharomyces cerevisiae*가 더욱 선호되어 왔다. 이는 *S. cerevisiae*의 재조합

활성도가 대장균에 비해 월등히 높기 때문이다. 양쪽 끝에 짧은 상동성 염기서열을 포함하는 선형 DNA를 *S. cerevisiae*에 넣어주면 목적하는 위치에서 상동성재조합이 쉽게 일어난다. 더욱이 필요한 상동성 염기서열의 길이는 42bp이상이면 가능하다. 하지만 *S. cerevisiae*는 대장균에 비해 유전적 불안정성이 크며, DNA 정제효율이 낮으며, DNA 정제 등의 과정에 많은 노동력과 비용이 필요하다는 단점이 있다.

대장균의 상동성재조합은 RecA 단백질과 RecBCD 복합체의 작용에 의해 이루어진다. RecBCD가 상동성재조합에 필요하지만 이 복합체는 exonuclease활성을 나타내기 때문에 선형 DNA를 빠르게 분해하여



그림 2 RecA-mediated single-strand invasion and Beta-mediated single-strand annealing

이를 활용한 재조합은 비효율적이다. 또한 RecA에 의한 상동성 재조합은 비교적 긴 길이의 상동성 염기서열 (수백 bp~1kb)이 필요하다는 단점이 있다.

ET-recombination system 의 활용

Bacteriophage의 단백질인 RecE/RecT (Rac phage) 또는 Red α /Red β (Lambda phage)를 이용한 대장균 내에서 상동성재조합 엔지니어링 기술이 개발되었다. ET-recombination으로 알려져 있는 이 기술은 재조합에 필요한 상동성 염기서열의 길이가 35-60bp로 매우 짧으며 선형DNA를 사용한다는 특징이 있다. RecA에 의한 재조합과정과 ET-recombination과정의 차이점은 상동성 서열간의 paring과 사슬의 교환방식에 있다. [그림 2]에 도식화했듯이 RecA에 의한 재조합은 RecA

와 결합한 DNA와 동일한 서열의 DNA부분을 만나면 그들간에 strand 교환이 일어나는 이른 바 ‘strand invasion’ 반응이라면, ET-recombination은 exonuclease에 의해 형성된 single-strand 사이의 ‘strand annealing’이라 할 수 있다.

RecE와 Red α (Exo)는 5’-3’ exonuclease 활성을 나타내며, RecT 와 Red β (Beta)는 DNA annealing을 촉진하는 역할을 한다. 또한 Lambda phage의 Red γ 는 대장균 RecBCD 단백질의 exonuclease활성을 억제함으로써 선형 DNA를 보호하여 재조합 효율을 증가시키는 효과를 나타낸다. ET-recombination의 작용 기작은 [그림 3]과 같이 도식화할 수 있다.

ET-recombination은 그 효율이 매우 높아 형성되는 클론 중 약 80%이상의 확률로 원하는 재조합DNA를 얻을 수 있다. 필요한 상동성 염기서열이 짧기 때문

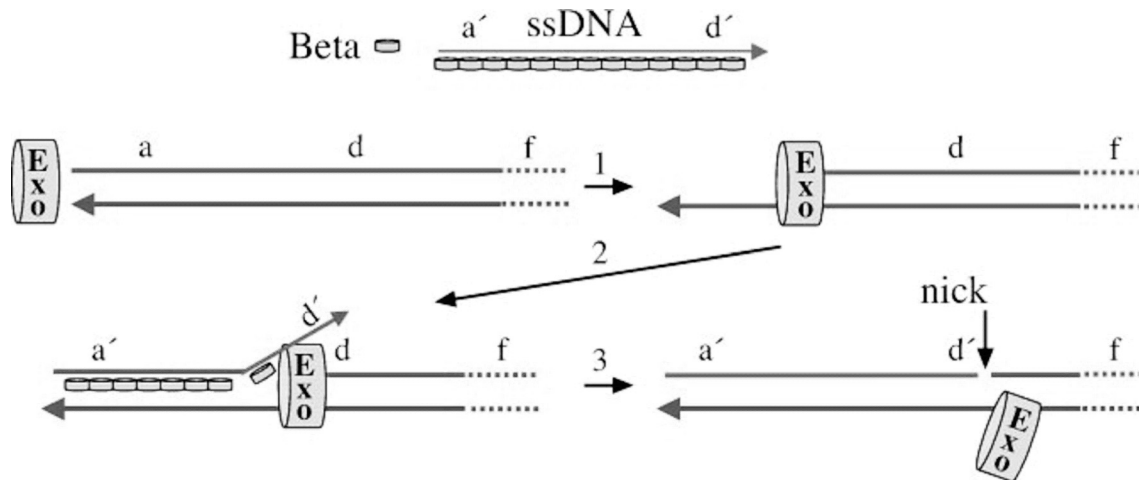


그림 3 Single-strand annealing and assimilation by Exo and Beta. Exo is shown loading at the end of a DNA molecule. Arrows labeled 1, 2, 3 represent the progression of events. A ssDNA is shown bound with Beta protein before annealing and as it anneals to a ssDNA overhang. Exo falls off as annealing is completed to generate a nick in the DNA.

에 이를 포함하는 oligonucleotides를 이용하여 얻은 PCR산물을 바로 사용할 수 있다.

ET-recombination은 선형DNA와 선형DNA 사이의 재조합, 선형DNA와 환형DNA 사이의 재조합이 모두 가능하며, *in vitro* 와 *in vivo* 반응이 모두 응용될 수 있다. 따라서 간단한 PCR을 통하여 얻은 선형DNA를 target vector (선형 또는 환형) DNA와 *in vitro*에서 ET-recombination 반응 후 대장균에 transformation하여 이들의 재조합DNA를 얻을 수 있다 [그림 4]. 이때, 환형 DNA vector를 사용할 경우에는 CSM (counterselection marker)가 vector에 포함되어 있는 것을 사용하는 것이 일반적이다. ET-recombinase를 발현하는 대장균 숙주에 vector DNA로 형질전환한 균주를 이용하면, PCR산물을 직접 이 균주 내로 도입하여 재조합 DNA를 얻는 것도 가능하다 [그림 4].

또한 대장균 염색체상의 특정 유전자를 변형, 결손시키거나, 원하는 외래 유전자를 대장균 염색체의 특정 위치에 삽입시키는 것도 효율적으로 일어날 수 있다. 이는 대장균의 functional genomics 뿐만이 아니라 산업적으로 유용한 물질 또는 단백질들을 생산하는 미생물 균주를 개발하며, 보다 안정적인 발효시스템 구축, 항생제가 필요 없는 재조합 미생물체 제조에

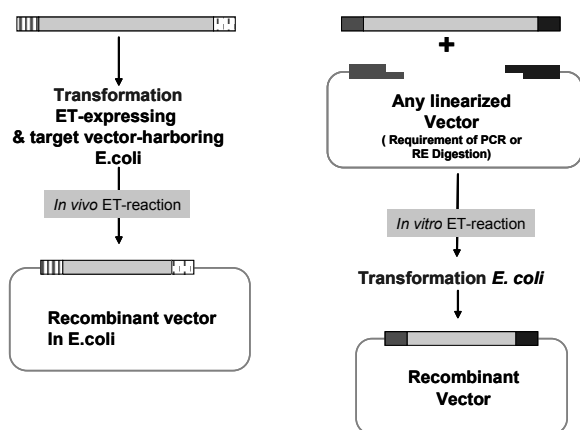


그림 4 Diagram for *in vivo* and *in vitro* cloning procedure using ET-recombination

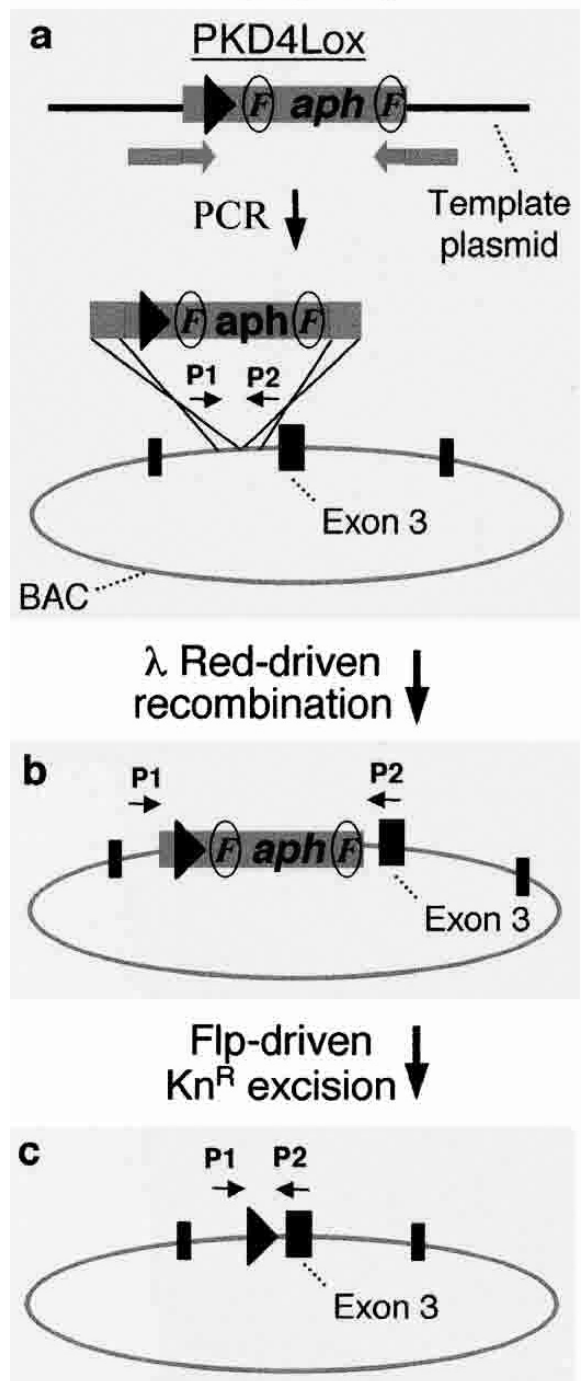


그림 5 A schematic representation of producing a deletion derivative in BAC clone DNA using ET-recombination and site-specific recombination

응용될 수 있으며, 복잡하고 다단계로 진행되는 대사 과정에 필요한 수 많은 외래 유전자를 안정적으로 포함하는 대장균을 만드는 시스템으로 최적이다. 이는 기존의 일반적인 plasmid를 사용하는 전통적 유전자 조작방법 및 시스템으로는 매우 어려운 문제였다. 플라스미드를 사용하여 제한효소 및 DNA 연결효소 등을 이용한 유전자조작은 많은 DNA를 넣을수록 사용 가능한 제한효소 작용 부위가 없어지며, 크기가 클수록 세포내 안정성이 떨어져 쉽게 변형되며, 많은

copy number에 의한 숙주에 생리적 부담감을 주게 되어 숙주의 변형도 유도한다. 하지만 상동성 재조합에 의한 숙주 염색체 (또는 BAC)로의 클로닝은 이러한 기술적, 생리적, 구조적 문제들을 모두 해소할 수 있는 기술이다.

같은 방식으로 그 응용성을 넓히면 대장균의 염색체를 변형시키는 대신에 수 백 kb 크기의 BAC clone로 원하는 대로 변형시킬 수 있다 [그림 5]. Mouse genome의 일부를 포함하는 BAC clone을 대장균에

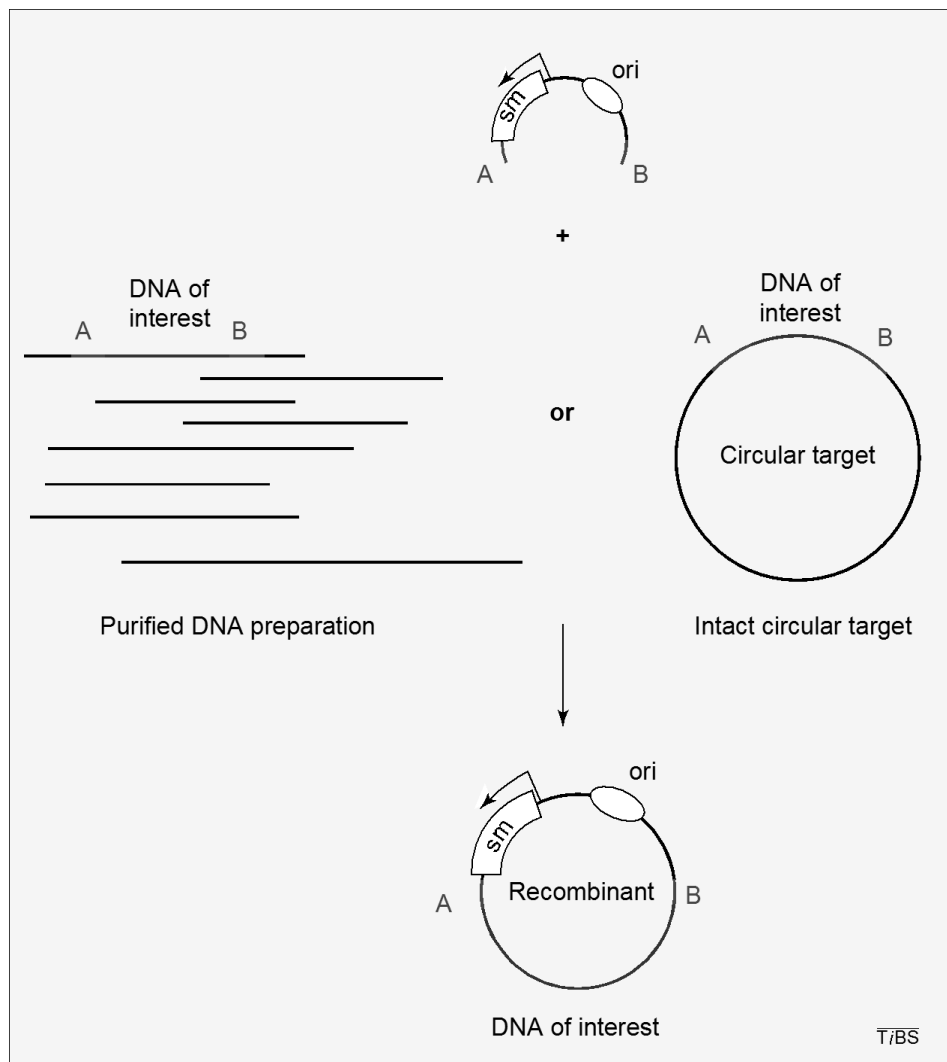


그림 6 The selective cloning of DNA using ET-recombination

형질전환 후 이를 *in vivo* recombination으로 변형시키고 변형된 BAC DNA를 mouse ES cell로 도입하여 특정 mouse 유전자의 knock-out 또는 modification 실험을 수행할 수 있어 고등생물의 functional genomics를 원활히 수행할 수 있다.

이와 같이 특정 염기서열이 필요치 않고 상동성만 있으면 재조합반응이 일어나는 것을 이용하여 genomic DNA의 매우 긴 특정 부분을 클로닝 할 수 있다. 이는 [그림 6]에 나타낸 바와 같이 클로닝 하고자 하는 부분의 말단 염기서열과 동일한 서열을 양쪽 끝에 포함하는 선형화된 vector DNA (selectable marker와 replication origin을 포함)를 정제된 genomic DNA와 ET-recombination반응을 한 후 이를 대장균에 형질전환하면, 목적하는 유전자 부위와 재조합이 일어나 환형으로 된 재조합DNA 만이 얻어질 수 있다.

이는 마치 PCR에서 증폭하고자 하는 유전자의 양쪽 말단 부위의 염기서열을 이용하여 primer를 제작하고 그 사이를 증폭하는 것과 같은 개념이다. 하지만, PCR의 경우에는 현재까지의 기술로는 증폭되는 길이의 제한 (30kb 이하)이 있으며, 이보다 더욱 심각한 것은 변이의 발생율이 너무 높다는 것이다. 이에 비해 상동성재조합을 이용한 클로닝은 사이즈의 제한을 많이 완화하며, 변이 발생율이 *in vivo* 에서의 수준으로 매우 낮다는 것이다.

기술에 대한 전망

제한효소와 DNA ligase의 개발 및 활용으로 지금까지 많은 분자생물학의 성과를 이루어 왔다. 하지만 인간유전체의 완전한 서열분석을 대표로 하는 엄청난 양의 유전자 및 유전체정보에 대한 해석을 위해서는 점점 더 복잡하고 거대한 구조의 DNA를 다룰 수 있는 기술들이 요구되고 있는 상황에서 기존의 방법들은 그 한계를 극복하기 어렵다. 이는 새로운 유전체 조작의 기술이 요구되고 그 해결방안으로서 상동

성재조합을 활용하는 방식이 대두되고 있다. 아직까지는 이러한 기술이 도입된 상용화된 제품이 많지 않고 그 특성에 대한 이해가 부족하여 광범위하게 사용되고 있지는 않지만 현재 여러 리딩 그룹 및 기업체에서는 기술의 개발과 제품 출시를 서두르고 있다.

이 기술이 보다 광범위하게 사용되기 위해서는 recombination 효소의 개량을 통한 효율증대, 재조합에 필요한 상동성 염기서열의 축소, 거대한 DNA의 형질전환 효율 증대, 대장균 이외의 다른 미생물 및 진핵세포들에서 작용할 수 있는 시스템의 개발 등이 필요할 것으로 보인다. PCR 기술과 다양한 대량/초고속 클로닝 기술들이 상품화되면서 그 응용성과 기술이 엄청난 속도로 증가된 것과 마찬가지로 상동성 재조합 기술은 향후 수 년 내에 그 자리매김을 할 것으로 기대된다.

참고문헌

- Gail Dutton (2005) Cloning without restriction. *The Scientist*. 19:32
- Li M. Z. and Elledge, S. J. (2005) MAGIC, an *in vivo* genetic method for the rapid construction of recombinant DNA molecules. *Nat. Genetics*. 37:311-319
- Cotta-de-Almeida, V., et al. (2003) A new method for rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res*. 13:2190- 2194
- Court, D. L., et al. (2002) Genetic engineering using homologous recombination. *Annu. Rev. Genet*. 36: 361-388
- Mureres, J. P.P., et al. (2001) Recombinogenic engineering- new options for cloning and manipulating DNA. *Trends in Biochem. Sci*. 26(5):325-331
- Zhang, Y. et al. (2000) DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol*. 18:1314-1317