

Genome-wide 유전자 적중 분열효모 균주를 이용한 기초 및 응용 연구

김동욱, 허광래(센터장, 오믹스융합연구센터, 한국생명공학연구원(KRIBB))

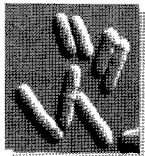


김동욱
Email: kimdongu@kribb.re.kr



허광래 센터장
오믹스융합연구센터,
한국생명공학연구원(KRIBB)
Email: kwanghoe@kribb.re.kr

I. 서론



미국 NIH에서 제시한 14개 모델생명체 중의 하나인 분열효모 (*Shizosaccharomyces pombe*, fission yeast)는 micro-mammal의 별명을 가지고 있으며, 자낭을 가지는 *Ascomycetes* 문에 속하는 균류(fungus)이다. 특이한 점은 분열효모와 출아효모 (*Saccharomyces cerevisiae*, budding yeast) 2종이 모델생명체에 등록이 되어 있다는 것이다(<http://www.nih.gov/science/models/>). 이러한 이유는 분열효모와 출아효모 간에 synteny(염색체 상에서 복수유전자의 배열순서)가 없는 것에서 알 수 있듯이, 두 종의 유전적 연관성이 사람과 먼 것만큼 멀기 때문이다. 세포주기 연구로 2001년 노벨상 공동수상자인 Sir Paul Nurse 박사와 영국의 The Sanger Centre의 바이오인포매틱스 연구자인 Val Wood 박사에 의하여 2002년 출아효모에 뒤이어 6번째로 유전체 구조가 해석되었다. 3개의 염색체와 13.8 M 크기의 유전체를 가지고 있으며 약 5,000개의 유전자를 가지고 있다. 따라서 현재까지는 가장 작은 유전체를 가지는 진핵생명체로 알려져 있다. 분열효모는 출아효모에 비해 RNAi, cell cycle, chromosome dynamics, epigenetic, DNA repair, meiosis, mRNA processing 분야에서 연구 강점을 가지고 있다.



Genome-wide knock-out deletion은 고전적

인 유전학 연구의 단점을 극복할 수 있는 유전자 기능연구의 연구수단이다. 임의의 단백질 발현양을 knock-down 시키는 RNAi에 방법에 비해, 단백질 발현양을 knock-out 상태로 만드는 deletion은 많은 장점을 가지고 있다. 유전체 적중 (targeted genome deletion) 연구는 다음의 근본적인 생물학적인 질문에 해답을 줄 수 있다: 1) 'Natural selection theory'에 의하면 자연선택에서 살아남은 생명체의 모든 유전자가 생명체의 생사에 중요한 필수 유전자여야 하는데, 안 그런 이유는 무엇일까? 2) 생명체의 필수 유전자의 갯수는 과연 몇 개인가? 3) 어떠한 자극이나 환경에서 발현이 유도되는 유전자 중에서 반드시 생존에 필요한 유전자의 비율은 얼마나 될까? 4) 기능을 추정할 수 없는 약 50%에 가까운 유전자들의 존재 이유는 과연 무엇일까? 출아효모를 이용한 선행의 체계적 유전체 적중 프로젝트를 통하여 유전자의 발현 프로파일을 관찰함으로써, 이러한 질문에 대한 답을 얻을 수 있었다³⁴. 또한 유전체 적중 균주는 응용의 측면에서는 drug-induced haploinsufficiency라는 원리로 약물작용점을 탐색하는 수단으로 사용될 수도 있다³⁴.

II. 본론

2.1. 기능 유전체 기초 연구

유전자 적중을 이용한 가장 손쉬운 기초연구는 특정 자극에 반드시 필요한 유전자를 선별하는 것이다. 화학유전체

연구의 대가인 Ronald David 그룹에 의한 출아효모를 이용한 선행연구에 의하면, 어떤 자극에 의하여 전사가 유도되는 유전자의 수는 100~1,000종류 정도로 많지만 실제로 그 자극에 반드시 필요한 유전자의 비율은 높아야 7% 통상적으로 1% 근처였다. mRNA의 발현양을 살펴 볼 수 있는 microarray chip을 이용하여 자극에 반응하여 전사가 유도되는 유전자를 먼저 파악한 후, 전사가 유도되는 유전자 중에서 유전자 적중(gene deletion)시 생존 할 수 없는 유전자를 선별하였다. 이러한 연구는 오직 유전자 적중을 통하여서만 알 수 있는 방법론인 것이었다. 또 다른 손쉬운 기초연구는 필수유전자가 아닌 균주의 경우 포자발아(spore germination)법을 이용 배체를 제조하여, 유전자가 적중되었을 시 나타나는 세포의 모양 변화를 현미경으로 관찰하는 것이다. 이러한 연구를 통하여 약 ~1,000여종의 유전자가 모양의 변화에 관련이 있음을 규명하였다. 출아효모 유전자 6,000종 중에서 20%인 1,200종이 필수 유전자이고 약 1,000여종이 모양과 관련이 되어 있다면, 나머지 3,800종의 유전자는 어떠한 기능을 하는 것일까? 이 질문에 대답하기 위해서는 조금 복잡한 실험을 고안하여야 하였다. 실험의 가정은 두 종류의 유전자 기능이 중복되어 있어서 한 개의 유전자가 적중되어도 또 다른 유전자가 그 기능을 대체한다는 것이다. 따라서 중복 기능의 2개 유전자를 동시에 적중시켜 세포가 죽게 하는 '인위적 치사'(synthetic lethal)를 유도하여야만 하였다. 또 다른 방법은 세포가 죽지만 않을 정도의 극한 자극을 가하고, 필수유전자가 아닌 것들이 적중되었을 때 어떠한 영향을 받는지 관찰하는 것이다.

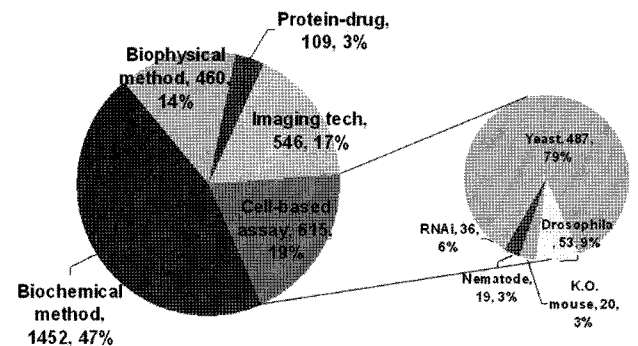
마지막으로 유전자 적중 균주를 체계적으로 이용하면, 유전자 상호간의 interaction 혹은 pathway를 체계적으로 규명하는 연구를 수행할 수 있다. 가장 최근의 분열효모를 이용한 연구에 의하면, 계통학적으로 상관관계가 먼 두 효모에 있어서 단백질복합체 module은 변하지 않지만 단백질복합체 module 상호 간의 연결회로 즉 wiring이 서로 달라 두 종의 효모가 서로 달리 진화를 했음을 규명할 수 있었다. 이러한 체계적인 연구를 위해서, UCSF의 Nevan Krogan 박사팀은 유전자 상호 간의 연관관계를 digital 값으로 측정할 수 있는 visual deciphering 특수 장비와 프로그램을 개발하여 epistasis 연구를 수행하였다.

2.2. 응용 연구: 약물작용점 탐색

유기 저분자화합물의 작용기전을 명쾌히 규명하는 것은 약리기전을 파악하는 첫 시발점이며 동시에 최종 목적지이기도하다. 약물의 작용기전의 파악 없이도 약효가 있는 물질을 개발하고 사용할 수 있기는 하지만, 약물의 작용점을 명쾌히 규명할 수만 있다면, 안전성과 효능을 증대시킬 수 있는 더 좋은 약을 개발할 수 있는 유리한 위치에 서게 될 수 있는 것이다.

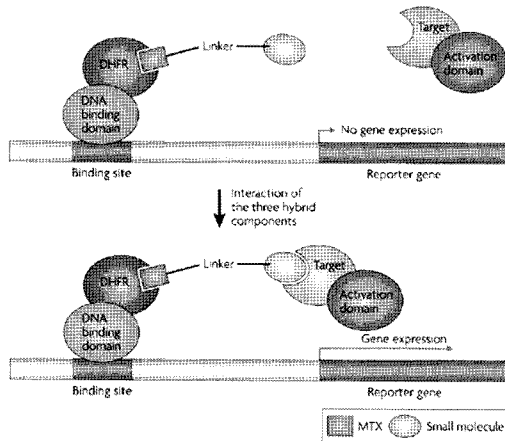
기존의 약물작용점 탐색 방법은 주로 *in vitro* 결합력 탐색(affinity binding) 방법을 사용하여 왔다. 기존의 약물작용점 탐색방법을 현재까지 등록된 약 3,000건의 국제 특허에서 찾아보면 다음의 도표와 같다.

대분류	중분류	소분류	
약물작용점 탐색기술	1) Biochemical method	1) Metabolic enzyme assay	2) Immunoprecipitation
		3) Calcium assay	4) Kinase assay
		5) Phosphatase assay	
	2) Cell-based assay	1) Yeast model	2) RNAi
		3) Drosophila	4) KO mouse
		5) Nematode	
	3) Biophysical method	1) Mass spectroscopy	2) Biacore
		3) NMR	4) Proteomics
	4) Computer predicted protein-drug interaction	1) Virtual drug	2) Statistical algorithm
		3) Prediction method	
	5) Imaging technology	1) FRET	2) Fluorescence
		3) Real time monitoring	

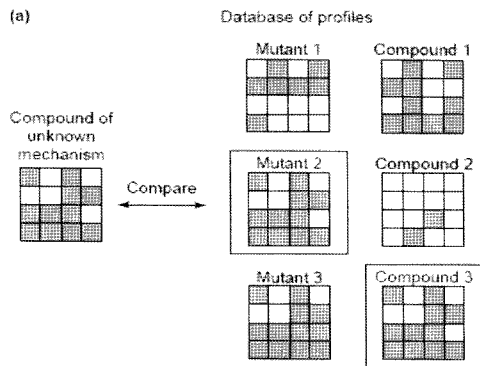


위 도표에서 보듯이, 모델생명체를 이용하는 *in vivo* cell-based assay의 약 80%는 효모가 차지한다. 이러한 이유로서는 효모가 1) 진핵세포이면서 단세포배양이 가능하고, 2) 유전체 프로젝트가 완료되었으며, 3) 유전학적 연구가 잘 되어 있으며, 4) microarray chip 이용이 가능하다는 등의 장점을 지니고 있기 때문이다. 이러한 효모를 이용한

신개념의 *in vivo* cell-based 약물작용점 탐색 방법은 크게 1) small-molecule three-hybrid, 2) microarray pattern matching 3) drug-induced haploinsufficiency의 3가지로 분류되는데, 현재 가장 많이 사용되는 방법은 세 번째 방법이다.



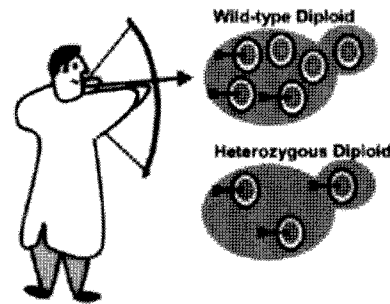
첫 번째 방법인 small molecule three-hybrid는 yeast two-hybrid의 개념을 이론적으로 확장시킨 개념이다. 그동안 시도는 되어 왔으나 false-positive가 많은 단점을 가지고 있다고 보고되었다. 또한 이 방법을 통한 후속 성공사례가 보고된 적이 없으므로, 이론적으로는 가능하나 현실적으로 불가능한 방법으로 추정된다.



두 번째 방법은 2001년 Merck MSD 제약회사의 자회사로 흡수된 Rosetta Inpharmatics 회사에서 개발되었는데, microarray 기법이 보편화 되면서 시작된 첨단 방법이다.

다. 기존의 약물작용점을 알고 있는 화합물에 대한 microarray profile과 유전자가 적중된 돌연변이 세포주에 대한 microarray profile을 reference로 미리 얻어 놓고, 약물작용점을 모르는 약물에 대한 microarray profile의 결과를 상호 비교하여 가장 pattern이 유사한 것을 찾아서 그 약물에 대한 약물작용점을 추정하는 방법이다. 이런 방법으로 약물작용점을 검증한 실례는 단일 의약품으로 금세기 최고의 매출을 기록한 statin 계열의 고지혈 치료제, 항진균제 fluconazole, 천연물질에서 개발한 결핵 치료제 ascididemin, 효모의 HDAC 억제제 splitomycin 등의 개발을 들 수 있다. 하지만 생물의 생리학적 상태에 따라서 같은 약물의 microarray profile이 달라지는 단점과 수많은 경우를 대비한 기존 reference microarray profile 데이터베이스 구축에 막대한 자금이 소요된다는 단점을 지니고 있다.

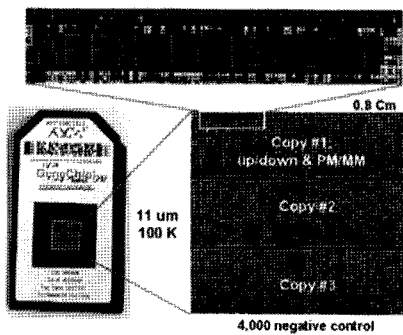
A Drug-Induced Haploinsufficiency



가장 효율적인 세 번째 방법은 미국 Stanford 대학교의 Ronald Davis박사에 의해서 고안되었으며, haploinsufficiency 원리와 개념은 1917년 초파리 연구의 대가인 Tomas Morgan 박사에 의하여 호시되었다. 그 후 1985년에 Davis 박사가 약물작용점을 규명하기 위해서 유전자 과발현 라이브러리를 형질전환 시킨 후에 항진균제인 Tunicamycin에 저항성을 보이는 유전자를 항진균제의 작용점으로 규명함으로써, 과발현 시 저항성을 보이는 유전자가 약물의 작용점임을 규명하였다. 하지만 이러한 과발현 스크리닝 시스템을 본격적으로 사용하려고 하자, 과발현은 세포에게 치명적임을 알게 되었다. "과발현 시 저항성인 유전자가 약물작용점"의 단점을 우회하고자 나온 개념이 "발현 감소 시 약물

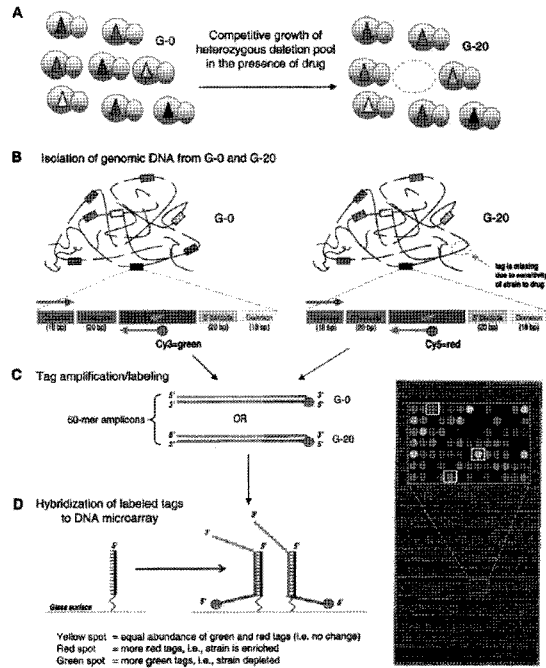
에 민감성을 보이는 유전자가 약물의 작용점"이라는 drug-induced haploinsufficiency이다. 이 기법은 유전자가 적중되었을 때 약물에 세포성장 민감성을 보이는 균주를 용이하게 탐색하기 위해서, 균주마다 특이적으로 표식된 DNA bar code를 검출할 수 있는 microarray 기술의 발달이 필요하였다. 따라서 drug-induced haploinsufficiency 개념을 이용한 *in vivo* cell-based 약물작용점 탐색방법은 가장 최첨단의 생명과학 기술을 집대성한 축소판인 것이다⁸.

Custom Chip: Affymetrix-KRIBB SP_1



Microarray에 의한 growth fitness의 선별은 다음과 같은 방법으로 수행한다. 아래 그림의 A)에서 보듯이 약물에 민감해서 사라진 균주는, B)에서 염색체를 뽑을 때 염색체가 사라지거나 양이 현저히 줄게 된다. C) 유전자 적중 마커의 좌/우로 삽입된 유전자 특이적 barcode를 공통 primer를 이용하여 biotin으로 표지하고 PCR 증폭한다. D) microarray를 수행하여 약물 처리 시 signal이 사라지는 균주를 선별한다.

이러한 방법의 장점은 적은 양의 화합물 혹은 천연물질을 이용하여 초고속/대용량으로 약물작용점을 탐색할 수 있다는 것이다. 우리나라는 한방에서 사용되는 여러 종류의 약리작용을 가지는 천연물질을 가지고 있으며, 이러한 천연물질의 분리 정제 분야에 강점을 가지고 있다. 따라서 microarray를 이용하는 초고속/대용량 약물작용점 탐색기술과 천연물질이 만나면, 약리작용은 있으나 약리작용을 모르는 많은 천연물질에 대한 과학적인 접근이 가능해져서 향후 신약의 개발로 이어질 수 있을 것이다.



또한 이 방법은 기존 약물의 신규 약물작용점을 규명하여 repositioning하는 좋은 수단이 될 수 있다. 기존의 항암제로 사용되던 5-fluorouracil(5-FU)의 약물작용점의 경우 그 이름에서 알 수 있듯이, DNA 합성 시 유사체로 작용하여 암세포의 증식을 억제할 것이라 생각하였다. 하지만 효모를 이용한 약물작용점 탐색 결과, 이 약물의 작용점은 exosome에 특이적인 rRNA processing을 억제하는 RRP 단백질인 것이 규명되었다. 이러한 사실은 기존의 방법으로는 알지 못했던 것으로, 이러한 발견은 RRP 단백질이 항암제를 개발할 수 있는 좋은 작용점이라는 점을 규명한 획기적인 것이다.

부수적인 효과로는 기존약물의 부작용인 비특이적 작용점 규명에도 활용될 수 있다는 것이다. 기존 약물에 대하여 작용점을 분석하면, 어떠한 기전으로 약물의 효과가 다양한지, 얼마나 특이적으로 작용할 수 있는지, 약물의 원하지 않는 부작용은 왜 야기되는지에 대한 다양한 정보를 얻을 수 있다. 따라서 이러한 점을 잘 이용하면, 신규로 개발 화합물의 비특이적 약물작용점을 규명할 수 있다. 예를 들자면, 간독성 때문에 시장에서 철회당한 의약품인 당뇨병 치료제인 Troglitazone을 들 수 있다. Troglitazone은 PPAR

길항제로 이론상으로는 효모에서는 약물작용점이 나올 수 없지만, 현재 시판 중인 독성이 없는 것으로 알려진 Rosiglitazone에 비하면 상당히 많은 종류의 비특이적 작용점을 보여준다. 이러한 점은 신약연구 개발초기, 임상시험에 진입하는 결정을 내리는 순간에 "유전자 적중 분열효모를 이용한 약물작용점 탐색시스템"이 판단에 도움이 될 수 있다는 것을 시사한다.

III. 결론



인간유전체 프로젝트가 끝난 지 10년이 다 되었지만, 유전자의 기능연구는 이제 첫걸음을 땀었다고 할 수 있다. 유전체 기능연구

(functional genomics) 연구는 systematic한 연구로 1) 동시에 여러 유전자를 동시에 다루어야 하며, 2) 각각에 대한 유전학적 조작도 용이하여야 하며, 3) 변화하는 유전자를 검색할 수 있는 microarray같은 기술이 뒷받침되어야 한다. 이러한 모든 조건을 구비한 현재 이용 가능한 유일한 모델생명체가 효모이다.

"Genome-wide 분열효모 유전자 적중 프로젝트"는 한국생명공학연구원의 기술에 세계적인 올리고 제조 회사인 (주)바이오니아의 지원으로 8년에 걸쳐 구축된 유용한 결과물이며, 현재 세계의 25개 연구팀과 공동연구를 수행 중에 있다. 한국의 연구진과 제약회사가 이러한 결과물을 활용하여, 1) 한국의 강점 분야인 천연물질의 약물작용점을 과학화하여 신약을 개발할 수 있는 기회로 활용하고, 2) 세계적인 석학과의 공동연구를 통하여 한국을 분열효모를 이용한 유전체기능연구의 메카로 만들기를 기원한다.

[참고 문헌]

- [1] Sipiczki, M., Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* 1(2), REVIEWS 1011 (2000).
- [2] Wood, V. et al., The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415 (6874), 871-880 (2002).
- [3] Giaever, G. et al., Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418 (6896), 387-391 (2002).
- [4] Winzeler, E. A. et al., Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285 (5429), 901-906 (1999).
- [5] Jorgensen, P. et al., High-resolution genetic mapping with ordered arrays of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Genetics* 162(3), 1091-1099 (2002).
- [6] Hillenmeyer, M.E. et al., The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science* 320 (5874), 362-365 (2008).
- [7] Roguev, A. et al., Conservation and rewiring of functional modules revealed by an epistasis map in fission yeast. *Science* 322 (5900), 405-410 (2008).
- [8] Lum P. Y et al., Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 116, 121-137 (2004).