

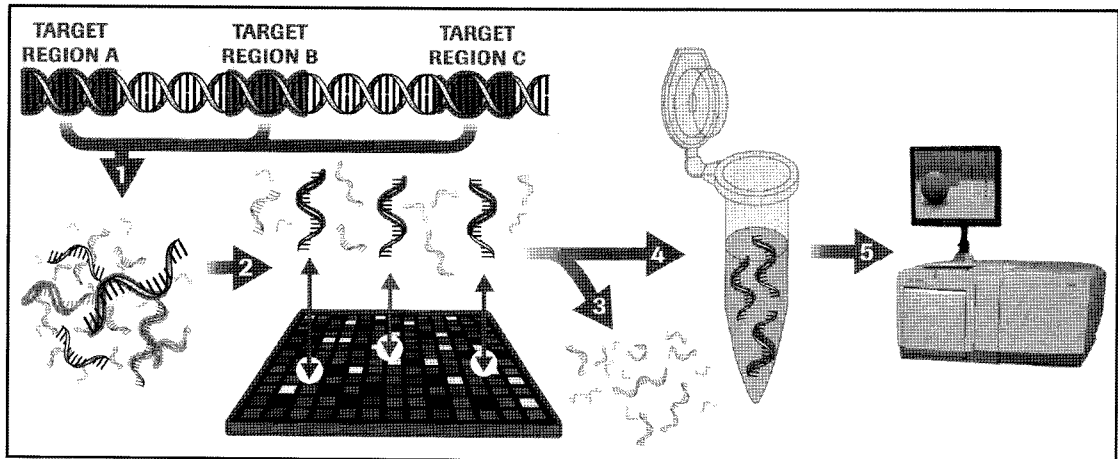
맞춤의학 시대를 앞당기는 혁신 기술-Roche NimbleGen Sequence Capture  
최혁진(Roche Applied Science Korea)

● Targeted resequencing에 꼭 필요한 기술

2005년 말, GS-20이 출시되면서 시작된 Next Generation Sequencing(이하 NGS)의 흐름은 이제 큰 강이 되어 유전체 연구의 밑바탕이 되고 있다. 수백 mega base에서 수giga base에 이르기 까지 엄청난 양의 염기서열분석을 수행해내는 NGS기술은 유전체 연구뿐만 아니라 다양한 생명과학 연구에도 큰 영향을 끼쳤으며, 연구기술의 판도에도 큰 변화를 가져오고 있다.

기존 Sanger Sequencing의 작업량을 훨씬 능가하는 NGS기술의 출현으로 인해 여러 연구분야에서 새로운 기술이 출현하고 있다. 특히 최근의 염기서열 분석이 전체 유전체의 염기서열 분석에만 치중하지 않고, 관심이 있는 특정 유전체의 일부분을 염기서열 분석하고자 하는 경향을 보이고 있다. 이러한 Targeted Resequencing은 NGS를 이용한 염기서열 분석에서 중요한 부분을 차지하게 되었다.

기존에는 유전체의 특정부분을 염기서열 분석하고자 할 때, 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR)을 이용하여 DNA절편을 얻고 이를 Sanger Sequencing으로 읽어내는 전략이 주를 이루었다. 이 경우, PCR을 이용한 DNA 절편의 준비와 Sanger Sequencing의 작업량이 유사하여 연구의 진행에 큰 문제가 없었다. 그러나 NGS가 출현하면서 염기서열 분석의 작업량이 증가하자 PCR을 이용한 DNA 절편의 준비가 Targeted Resequencing에서 병목현상을 일으키기 시작했다. 이 문제를 해결하기 위해 최근 몇 년 전부터 여러 연구 그룹들에 의해 'Capture' 또는 'Enrichment'라 부르는 기술이 개발되어 오고 있었다. Capture/Enrichment 기술은 Targeted Resequencing에 반드시 필요한 기술로 Roche NimbleGen의 Sequence Capture는 그 선두주자이며 가장 처음 상용화된 기술이다.



【그림 1】 Sequence Capture의 순서

1. 유전체를 무작위적으로 잘라 DNA 절편을 만든다.
2. 얻고자 하는 유전체의 각 부위와 상보적으로 결합하도록 디자인된 탐침이 올려져 있는 DNA마이크로어레이와 혼성화 반응을 진행한다.
3. DNA마이크로어레이와 비특이적으로 결합한 DNA절편들을 제거한다.
4. DNA마이크로어레이와 특이적으로 결합한 DNA절편들을 추출한다.
5. Roche Genome Sequence를 이용하여 Enrich된 DNA절편들의 염기서열 분석을 진행한다.

● Capture/Enrichment의 해결책 - Sequence Capture

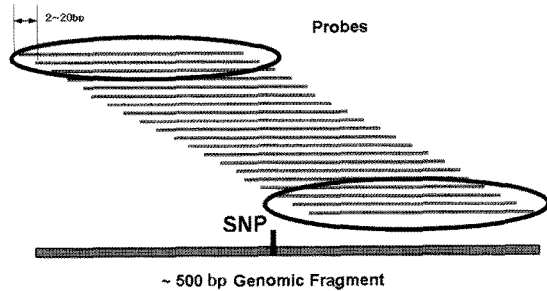
Roche NimbleGen에 의해 개발된 Sequence Capture는 위에서 기술한 Targeted Resequencing을 위해 특정 유전체 일부분만을 선택적으로 얻기 위한 기술이다.

먼저, 염기서열분석을 진행하고자 하는 유전체의 일부분을 선정하고, 그 위치와 상보적으로 결합할 수 있는 DNA탐침 (probe)을 디자인한다. 이 DNA탐침을 DNA마이크로어레이(DNA Microarray) 위에 위치시킨다. 준비한 Genomic DNA를 물리적인 처리를 통해 절편으로 만들고, DNA절편들과 준비한 마이크로 어레이로 혼성화 반응을 진행한다. 아무리 특이적으로 결합하는 DNA탐침과 혼성화 반응을 진행하더라도 비 특이적인 결합이 일어날 수 있으므로 혼성화 반응 후 비특이적으로 결합된 DNA절편들을 제거한 뒤 원하는 DNA절편들만을 선택적으로 추출해낸다. 이렇게 얻어진 DNA절편들은 로슈의 Genome Sequencer-FLX를 이용하여 염기서열분석을 진행하게 된다(그림 1).

최근 Genome Sequencer-FLX가 titanium kit으로 업그레이드 되면서 1회 실험당 염기서열 분석량이 최대 500 mega base까지 늘어났는데, 이로 인해 Sequence Capture의 target coverage도 눈에 띄게 향상되었다. standard kit으로 진행할 경우, 10 fold coverage 이상 읽혀지는 read가 74.8%지만, titanium kit은 94.4%의 coverage를 보여준다. 또한, 염기서열 분석에 Genome Sequencer-FLX 이외의 현존하는 NGS 기술들을 이용하는 것도 가능하다.

현재 개발된 Sequence Capture Array는 탐침의 수에 따라 385,000, 2.1 Mega 포맷이 있으며, 각각 5 mega base, 30 mega base에 달하는 유전체를 포착할 수 있다. Sequence Capture Array는 연구자가 연구하고자 하는 염기서열을 포착해야 하므로 customizing이 용이해야 하는데, Roche NimbleGen은 디지털미세거울장치(Digital Micro-mirror Device)와 광식각 기술(photolithography)을 이용하여 다양한 염기서열의 DNA탐침을 손쉽게 제작할 수 있다.

Roche NimbleGen의 Sequence Capture가 효율적으로 원하는 유전체를 포착할 수 있는 이유는 탐침의 디자인 방법 때문이다.

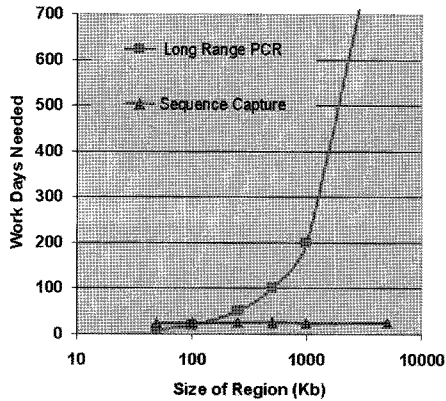


【그림 2】 Sequence Capture Array의 탐침 디자인

그림 2에서와 같이 DNA절편을 잡아내는 탐침은 매우 조밀하게 겹쳐지도록 tiling되어 있으며, 앞의 탐침과 뒤의 탐침 간의 거리는 가장 앞에 있는 Nucleotide간의 거리를 기준으로 2~20 bp의 간격을 가지고 있다. Targeted Resequencing을 하는 가장 큰 목적은 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)나 단일염기돌연변이 등을 검출하기 위한 것이므로, 목표로 하는 DNA절편에 SNP나 돌연변이가 존재하면 reference 염기서열을 기준으로 디자인된 탐침들은 효과적으로 목표 DNA절편을 잡아내기 어렵다. 이때, 해당 SNP이나 돌연변이가 존재하지 않는 위치의 탐침들 (그림 2의 원내)을 사용하면 SNP이나 돌연변이가 존재하는 DNA 절편이라도 효율적으로 포착을 진행할 수 있게 된다. 이와 같이 겹쳐지도록 tiling되는 탐침의 디자인은 Sequence Capture의 주요 강점이다.

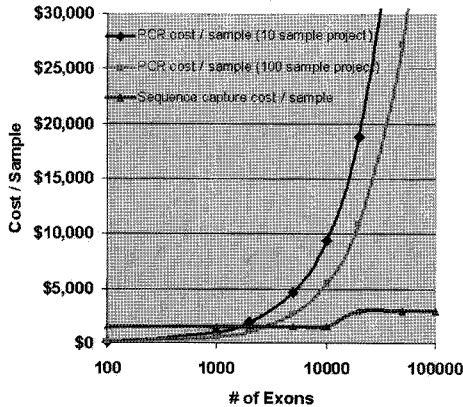
또한, 상대적으로 긴 길이의 유전체를 빠른 시간 내에 저렴한 가격으로 포착한다는 것도 또 다른 강점이다.

long-range PCR의 경험이 많은 한 연구자에 따르면, 3~5 mega base에 달하는 유전체를 10 kilo base내외의 절편으로 나누어 PCR 산물을 얻고자 하는 경우, 유경험자가 진행하면 약 3개월이 소요되며 목표 유전체 중 약 80% 정도에서만 PCR 산물을 얻을 수 있다고 한다. 비 경험자가 진행하면 시간은 6개월이 소요되며, 성공률도 낮아지는데, 이 과정에서 상당한 추가비용이 발생하게 된다. 이렇게 long-range PCR만으로 Targeted Resequencing을 위한 DNA절편을 준비하는 것은 많은 비용과 시간이 소요되는데, 이를 Sequence Capture와 비교한 도표를 그림 3과 4에 나타내었다.



【그림 3】 목표 유전체의 길이에 따른 long-range PCR과 Sequence Capture간 작업시간의 비교

위의 그림에서와 같이 포착하고자 하는 유전체의 길이가 길어질수록 long-range PCR의 작업시간은 급격히 증가한다.



【그림 4】 목표 Exon 수에 따른 PCR과 Sequence Capture 비용의 비교

또한, 위의 그림에서와 같이 포착하고자 하는 Exon의 수가 늘어날수록 소요되는 PCR 비용도 급격히 증가한다.

이상과 같이 Sequence Capture는 Targeted Resequencing을 진행함에 있어 기존의 PCR에 의한 DNA준비 방법보다 상대적으로 저렴하고 효율적이며, 시간을 절약할 수 있다.

● Sequence Capture와 맞춤형의학(Personalized Healthcare)

맞춤의학 시대를 선도하고자 하는 로슈는 이를 위한 모든 제품 군의 구성을 갖추고 있다. 이는 생명과학 분야의 연구용 제품이 주류를 이루는 Roche Applied Science에서도 예외는 아니다.

최근에 많은 이슈가 되고 있는 인간의 전체유전체를 대상으로 하는 연구들은 여전히 염기서열분석이 주류를 이루고 있다. 2008년 11월 Nature지에서 발표된 급성골수성백혈병 (Acute Myeloid Leukemia, AML) 환자의 전체유전체를 염기서열분석 한 연구나, 국내 여러 연구 그룹에서 이미 시도된 한국인 전체유전체의 염기서열 분석 등이 그 예이다. 위의 연구들은 염기서열분석이 단순한 연구용 도구로서뿐만 아니라 맞춤형의학의 첨병으로서 인식되게 한다. Sequence Capture는 인간 유전체의 다양한 변이를 관찰할 수 있는 유용한 기술이므로 이러한 유전체의 변이와 연관된 질병의 연구에도 유용하게 사용될 수 있고 맞춤형학과 예방의학의 발전에 한 축을 담당할 것이라 기대된다. 그리고 소수의 유전자 변이가 원인이 되는 희귀성 유전질환의 연구에도 이용 가치가 높다. 특히 2009년 1사분기에 출시될 예정인 Whole-Exome Capture Array는 인간유전체의 모든 Exon을 잡아내도록 디자인 된 도구이다. 이 도구는 암을 비롯한 유전체의 변이와 연관된 다양한 질병의 연구에 유용하게 사용될 것으로 예상되며 국내의 많은 연구자들도 출시를 기대하고 있다.

2000년대 초반 인간유전체의 정보가 공개되면서 대두된 맞춤형의학에 대한 꿈은 SNP에 대한 연구와 CNV (Copy Number Variation)에 대한 연구로 이어지면서 그 실현이 가시화되고 있다. 인간유전체의 변이와 이에 따른 질병과의 연관성에 대한 연구는 아직 현재진행형이지만, 정신분열증, 자폐증, 치매 등의 정신질환과 당뇨, 고혈압 등의 복합성 질환, 암 등에 이르기까지 다양한 연구성과들이 보고되고 있다. Sequence Capture는 이러한 연구에 가속도를 부여하여 맞춤형의학시대의 도래를 앞당기는데 일조할 것으로 전망된다.

## < Sequence Capture 관련 기사 >

### 혈액 암에서 나타나는 복합 유전체 변이를 밝히는데 도움을 줄 Genome Sequencer FLX 시스템과 NimbleGen Sequence Capture Array

출처 : Business Wire, "enome Sequencer FLX System plus NimbleGen Sequence Capture Arrays Help Unravel the Cryptic Genetic Changes in Hematological Malignancies"(Nov. 4, 2008)

London Medical School과 Barts의 암 유전체 연구그룹은 Genome Sequencer FLX시스템과 Sequence Capture를 이용하여 백혈병연구를 진행하고 있다. Brian Young 교수를 비롯한 연구진들은 Roche의 454 Sequencing과 NimbleGen의 Sequence Capture Array를 조합한 기술을 백혈병의 발병과 연관된 유전체 변이의 규명을 위해 사용할 예정이다. 이 새 염기서열의 정보는 이 무서운 질병의 유전체 변이와 임상적 특징간의 상호관계를 찾아내기 위해 현존하는 다양한 임상, 세포유전학 정보의 데이터베이스와 연결될 것이다. 연구진들은 이 새로운 결과들이 앞으로 혈액 암의 치료와 임상증상의 해석에 대한 실마리를 줄 수 있을 것으로 기대한다.

암 유전체 연구그룹의 리더인 Young 교수는 다음과 같이 말한다.

"454 Sequencing은 암 연구를 위한 새롭고 흥미로운 접근방법을 제공합니다. 이미 암과 연관된 것으로 밝혀진 많은 유전자들이 있지만 아직도 더 많은 내용들이 밝혀질 수 있기에, London Medical School과 Barts의 암 유전체 연구그룹은 이 혁신적인 기술을 앞서서 채택하게 되었습니다. 우리는 백혈병을 유발하고 진행시키는 유전체 변이를 규명하기 위해 이 454 Sequencing의 대량 염기서열 분석법을 적용하려고 합니다."

이 연구계획에는 급성골수성백혈병과 연관된 주요 유전자와 유전체 들의 염기서열 분석과 microRNA의 발현양상의 분석, 그리고 미세결실(microdeletion) 현상에 대한 Paired-end 분석이 포함된다. 좀 더 자세히 말하자면, 연구진들은 Roche NimbleGen의 Sequence Capture Array를 이용하여 FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3)와 MLL (Mixed Lineage Leukemia)과 같은 급성 골수성 백혈병에서 알려진 돌연변이와 SNP 유전형 분석을 통한 잠재적인 돌연변

이 대상의 규명을 위해 일련의 유전자들을 포착할 계획이다. Genome Sequencer FLX시스템을 이용하여 Intron을 포함한 돌연변이가 나타난 유전자들을 모두 염기서열 분석하는 것은 백혈병의 발병과 진행을 유발하는 유전체 변이를 밝혀내려는 노력에 도움을 줄 것이다.

또한 암 유전체 연구그룹은 454 Sequencing기술을 급성 골수성 백혈병의 microRNA 전체 발현 양상에 대한 관찰과 다양한 종류의 백혈병에서 유전자의 알려진 발현양상과의 비교에 사용할 예정이다. 이러한 microRNA 발현양상의 분석은 백혈병의 병인을 규명하고 암을 분류하는 방법을 발전시키는 데에 도움을 줄 수 있을 것이다. 연구진들은 백혈병에서 일반적인 특징으로 나타나는 유전체 변이인 microdeletion에 대해서도 연구할 계획이다. 현재까지 microdeletion의 발굴은 SNP마커의 유용성으로 인해 활발하지 못했다. 독특한 454 Sequencing 기술은 전체 유전체에 대한 microdeletion의 분석을 가능하게 하였고 발견 가능한 모든 현상들을 놓치지 않을 수 있도록 할 것이다.

## < Roche NimbleGene은 >

미국 Madison에 위치한 NimbleGen은 Copy Number Variation 분석을 위한 aCGH (array Comparative Genomic Hybridization)를 생산, 판매하던 회사로 2007년 6월에 Roche Diagnostics와 합병되었다. 이보다 앞서 진행되었던 454 Life Science와의 합병까지 포함하여 Roche Diagnostics는 qPCR시스템, DNA 칩, 대용량 염기서열 장비를 갖추게 됨으로 유전체 연구를 위한 제품구성을 갖추게 되었다. Roche NimbleGen은 합병 후 대용량 염기서열 분석 장비인 GS-FLX와의 기술융합을 통해 2008년 봄에 Sequence Capture라는 신기술을 개발, 출시하였다. Sequence Capture는 향후 유용한 진단용 장비로서의 가능성을 인정받고 있는 GS-FLX와의 연계성으로 인해 많은 연구자들의 관심을 받고 있다.

KOGO NEWS JOURNAL | Vol. 9 No. 1 March 2009