미토콘드리아 DNA 합성생물학 연구 동향

중원대학교 의생명과학과 윤영걸

1. 개요

미토콘드리아는 진핵세포의 세포질 내에 뚜렷한 두 개의 막으로 둘러싸여 있는 세포 내 소 기관이다. 두 개의 막 중에서 외막은 5kDa 이하 크기의 분자들은 잘 투과할 수 있으나 내막은 그것의 독특한 지질 조성 때문에 세포 내 물질들이 자유로이 왕래할 수 없다. 이러한 내막의 불투과성으로 인하여 미토콘드리아 매트릭스(matrix)와 막 간 공간(intermembrane space) 사이에 수소이온(H^+) 농도의 불균형이 발생하고 이러한 화학적 불균형이 생체 에너지 합성의 원동력으로 이용되어 ATP를 생산한다.

미토콘드리아는 독특하게도 핵에 존재하는 염색체 DNA와는 별도로 자기 자신의 DNA를 보유하고 있으며, 그 기원은 외부로부터 유래한 원시 박테리아로 인식되고 있다(Poole & Penny, 2007). 원시 박테리아와 초기 진핵세포 사이의 공생관계가 진화와 함께 지속되면서 대부분의 원시 박테리아의 DNA들은 초기 진핵세포의 핵으로 이전되었고, 현재는 핵으로 이전되지 못한 일부 DNA들이 남아 미토콘드리아 내에 미토콘드리아 DNA(mtDNA)로 남겨지게 되었다(Brandvain et al., 2007; Tsaousis et al., 2008).

인간의 mtDNA는 원형의 이중나선 DNA로서 크기는 16,569 bp 이다(Fig. 1). 이 mtDNA는 인트론이 없고 37개의 전자전달계와 산화적인산화 반응에 필요한 유전자(13 proteins, 22 tRNAs 그리고 2 rRNAs)가 촘촘하게 배열되어 있다. 주요 비전이 서열은 mtDNA의 전사와 복제에 관련되어 있는 D-loop과 O_L (the origin of L-strand replication) 서열이며, 13개의 protein-coding 유전자 중에서 ND1~ND6와 ND4L는 complex I을, cytochrome b는 complex Ⅲ를, COXI~COXⅢ는 complex IV를, ATP6와 ATP8은 ATP synthase를 암호화하고 있다(Scheffler, 2001). 나머지 24개의 유전자(22 tRNAs와 2 rRNAs)들은 mtDNA의 전이를 위한 machinery들을 암호화하고 있다. 그 외의 미토콘드리아의 생성, 유지 및 조절에 관련된 유전자들은 대부분 핵에 위치해 있다. 포유류 진핵세포에는 세포당 약 1,000개의 미토콘드리아를 함유하고 있으며 각각의 미토콘드리아는 2~10개의 mtDNA를 지니고 있다고 알려져 있다(Wiesner et al., 1992).

MtDNA는 ATP 생성과정 중에 발생하는 세포 내의 활성산소에 직접 노출되어 있고, 또한 손상된 DNA의 복구 능력이 취약하여 핵 DNA에 비하여 10~20 배 정도 돌연변이의 빈도가 높으며 이러한 돌연변이로 인하여 다양한 인체 질환이 야기되는 것으로 알려져 있다. 1988년 Wallace 등은 mtDNA에 위치한 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) 유전자의 염기서열 변이로 인해 신경성 질환인 Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)가 발생함을 보여주었고, 또한 Holt 등도 미토콘드리아 근병증(mitochondrial myopathy)의 질환을 가진 환자의 근육세포에서 유전자의 일부가 제거된 mtDNA deletion mutant를 발견하였다(Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988). 이후로 현재까지 mtDNA에 위치한 각각의 유전자들의 돌연변이에 의해 다양한 질환이 발생한다는 것이 밝혀졌다(Lightowlers et al., 2015).

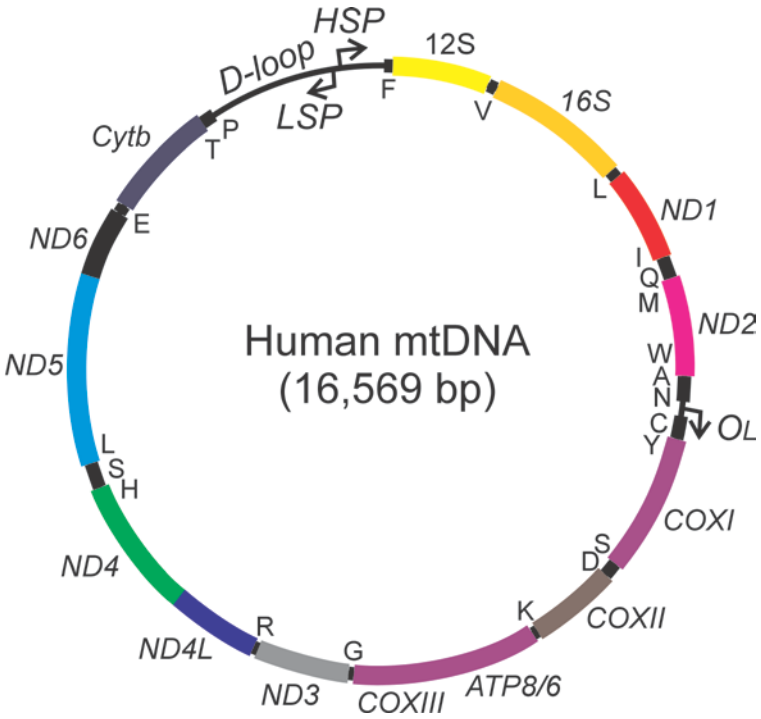

Figure 1. 인체 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 구조와 유전자의 배열 (Yoon et al., 2010)

위와 같은 mtDNA 돌연변이의 작용 기작과 치료 그리고 mtDNA 유전학 등의 연구를 위해서는 세포핵의 유전체 DNA의 조작과 같이 미토콘드리아에 외래의 DNA나 염기서열의 변이를 도입하거나 mtDNA 상의 타겟 유전자의 제거 등 자유로운 mtDNA 유전체 재조합 기술과 같은 합성생물학적 기법이 필요하다. 비록 mtDNA를 박테리아 내에서 클로닝

하고 재조합하는 기술은 확립되었으나 이렇게 변형시킨 재조합 mtDNA를 세포 내의 미토콘드리아로 재도입시키는 기술은 아직도 개발이 진행 중이다(Yoon & Koob, 2003). 본 논고에서는 mtDNA 유전체의 직접적인 조작을 위해 DNA를 세포 내 핵이 아닌 미토콘드리아에 도입하려는 최근의 시도에 대해 살펴보고자 한다.

2. 효모의 mtDNA manipulation

현재까지 재조합 DNA를 이용하여 미토콘드리아를 형질전환(transformation)시킬 수 있는 방법을 확립한 종은 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*와 녹색 조류인 *Chlamydomonas reinhardtii* 두 가지 종만이 알려져 있다. 여기에서는 효모 미토콘드리아의 형질전환에 대해서 알아보겠다. 효모 미토콘드리아의 형질전환은 1988년 Fox 등에 의해서 최초로 개발되었다(Fox et al., 1988). 이들은 biolistic microprojectile bombardment 방법을 이용하여 초미세 금속입자에 각각 nuclear transformant와 mitochondrial transformant를 선택할 수 있는 두 가지 종류의 DNA를 코팅하여 세포 내 소기관인 미토콘드리아에 유전자를 도입시키는 방법을 확립하였다.

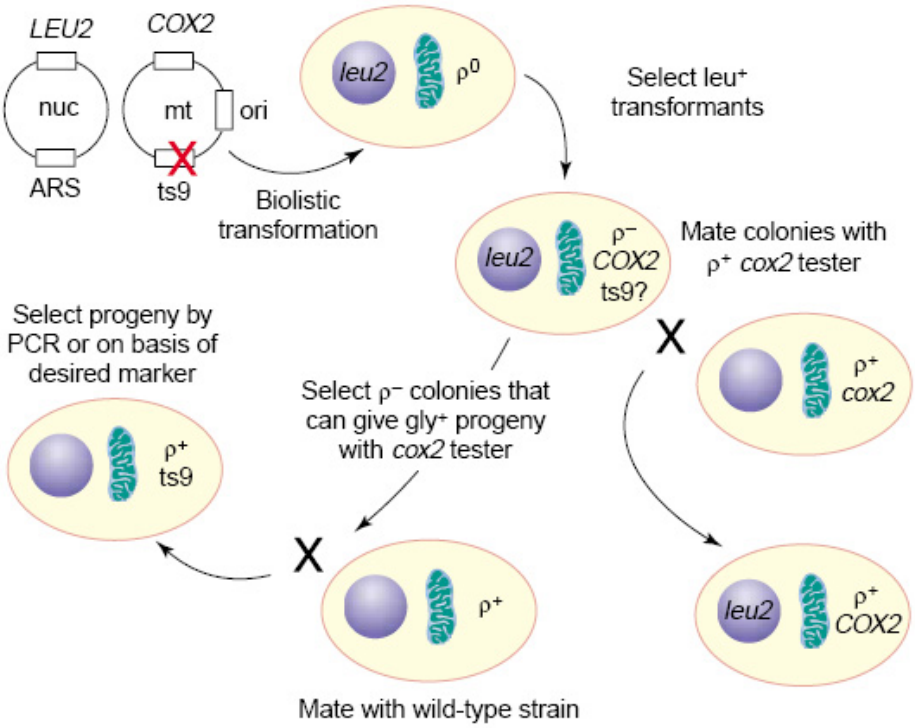

Figure 2. 효모 mtDNA transformation 전략(Jacob, 2001).

Figure 2는 $tRNA^{gly}$ (ts9) 돌연변이를 효모의 mtDNA에 도입시켜 형질전환한 실험의 개요도이다(Rohou et al., 2001; Jacobs HT, 2001). 두 개의 plasmid constructs 중 하나는 nuclear transformant를 얻기 위한 selection marker (*LEU2*)를 포함하고 있고, 다른 하나는 mitochondrial transformant를 얻기 위한 selection marker (*COX2*)와 도입시키고자 하는 돌연변이(빨간색 X의 ts9) 유전자를 포함하고 있다. *LEU2* selection marker는 핵 DNA의 *leu2* mutant를 보상하여 *leu2*-background에서 선택될 수 있게 하고, *COX2* selection marker는 미토콘드리아의 mtDNA 상의 *cox2* mutant를 보상하여 손상된 미토콘드리아 기능을 다시 활성화 시킬 수 있게 한다.

Figure 2에서 보는 바와 같이 먼저 leu^+ transformant (*leu2*가 *LEU2*로 형질전환)를 얻고 이 transformant들을 ρ^+ cox2 tester yeast strain과 접합(mating)시켜 미토콘드리아 활성을 필요로 하는 non-fermentable carbon source인 에탄올과 글리세롤만을 포함하는 선택배지에서 배양한다. 이 때 mating된 diploid strain의 미토콘드리아에 mitochondrial fusion에 의해 *COX2* 유전자가 진입하게 되면 이 diploid strain에서는 정상적인 *COX2* 유전자가 발현되게 되어 미토콘드리아의 산화적인산화(OXPHOS) 기능이 회복되고 따라서 non-fermentable selection media인 에탄올과 글리세롤 선택배지에서 자랄 수 있게 된다. 즉, *leu2*가 *LEU2*로 형질전환된 leu^+ transformant 중에서 미토콘드리아에 *COX2* 유전자가 들어가 있는 콜로니를 찾을 수 있는 것이다. 또한 *COX2* 유전자가 들어가 있는 콜로니는 *COX2*와 함께 ts9 유전자도 도입되어 있을 것이며 이 ts9 유전자는 wild-type yeast strain과 mating시켜 mtDNA 상으로 ts9 유전자가 도입된 ρ^+ ts9 strain을 제작할 수 있게 된다.

Figure 3은 biolistic transformation을 통해 nuclear와 mitochondrial transformant를 얻은 plate들을 직접 보여주고 있다. 이 그림에서는 rho^0 (mtDNA-less)와 rho^+ (mtDNA present) *cox2-60*의 mitochondrial genotype을 지니는 효모를 이용하였는데 위에서 언급한 바와 같이 먼저 *LEU2* plasmid 인 Yep35을 이용하여 nuclear transformant를 얻고, 이 transformant들 중에서 *COX2* plasmid인 pNB69를 포함하는 지를 non-fermentable selection media에서 선택하여 mitochondrial transformant를 찾아 내게 된다.

따라서 현재 효모는 효모 mtDNA에 위치하는 유전자 변이의 도입과 제거 그리고 다른 외래 종에서 유래한 유전자의 도입 등을 자유롭게 수행할 수 있으며 이를 통해 효모 미토콘드리아 유전학 그리고 나아가서 미토콘드리아 변이에 의해 발생하는 인체 질환을 연

구하는 주요 모델로서 역할을 수행하고 있다. 그러나 biolistic bombardment 방법에 의한 미토콘드리아 형질전환은 효모 이외에 동물과 식물세포에서는 아직 보고된 바가 없다.

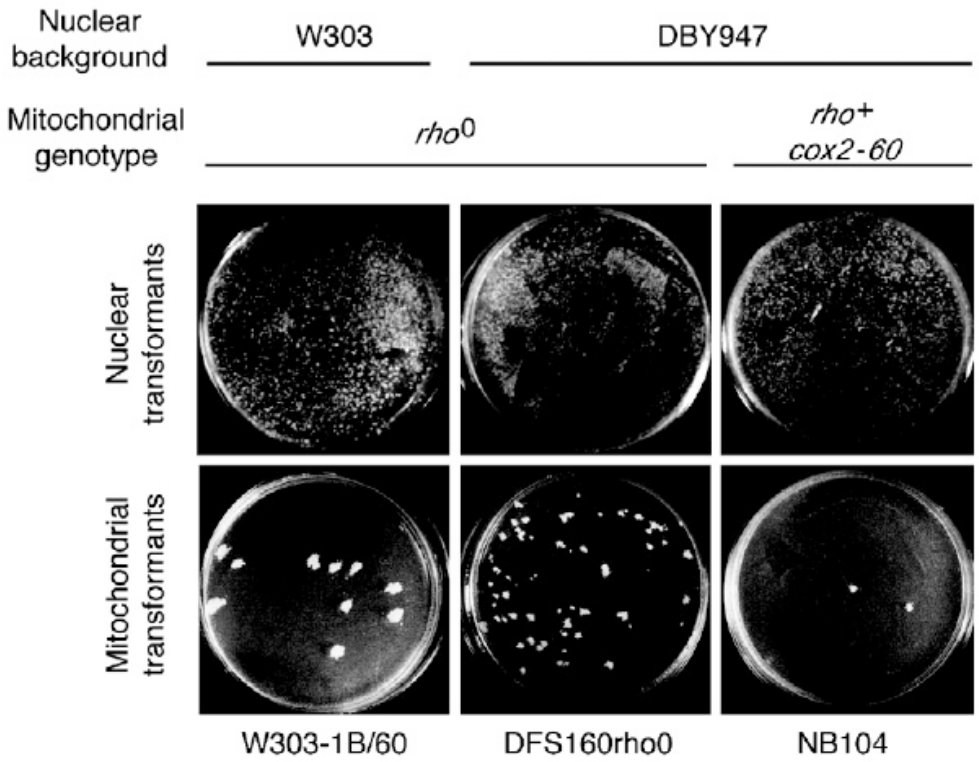

Figure 3. Biolistic bombardment를 이용한 mitochondria와 nucleus의 동반 형질전환 (Bonnefoy et al., 2007).

3. 포유동물세포의 mtDNA manipulation

3.1 미토콘드리아로의 재조합 DNA의 전기천공(electroporation)과 자연도입(natural import competence)

외래 재조합 plasmid DNA를 미토콘드리아로 도입하기 위해 시도한 최초의 방법은 전기천공법(electroporation)이었다(Collombet et al., 1997). 이들은 세포로부터 분리한 미토콘드리아에 7.2 kb 크기의 plasmid DNA를 전기천공법으로 도입하였을 때 미토콘드리아의 활성이 여전히 유지되고 있음을 입증하였다(Fig. 4). 이 후로 분리한 미토콘드리아에 17.8 kb 크기의 재조합 mtDNA를 전달하여 도입된 재조합 mtDNA가 미토콘드리아에서 발현되고 있음이 또한 증명되었다(Yoon & Koob, 2003). 이들은 재조합 mtDNA가 도입된 미

토콘드리아를 microinjection 방법으로 mtDNA가 제거된 rho^0 세포에 도입하고자 시도하였으나 재조합 mtDNA를 획득하여 정상세포((rho$^+$)로의 전환된 세포는 발견하지 못하였다. 이러한 결과는 전기천공법의 가혹한 조건이 미토콘드리아의 활성과 구조에 회복할 수 없는 어떤 영향을 주었을 때문인 것으로 사료된다.

전기천공법의 대안으로 시도된 방법이 자연도입법(natural import competence)이다. Koulintchenko 등은 순수한 DNA를 분리한 미토콘드리아와 혼합하였을 때 DNA가 미토콘드리아로 자연적으로 도입됨을 알아냈다(Koulintchenko et al., 2006) (Fig. 4). 또한 도입된 mtDNA의 promoter로부터 전사가 이루어지고 더불어 전사된 polycistronic RNA가 mt-tRNA로 까지 프로세스될 수 있음을 보여주었다. 이들은 자연도입법을 아래에 기술되어 있는 nanocarrier를 이용하는 방법과 결합하여 mtDNA를 미토콘드리아로 전달하는 전략도 제안하였다. 즉, nanocarrier로 mtDNA를 세포질까지 운반하고 미토콘드리아 근처에서 nanocarrier로부터 mtDNA를 방출하게 하면 방출된 mtDNA가 자연적으로 미토콘드리아로 도입되는 방법을 제안하였다.

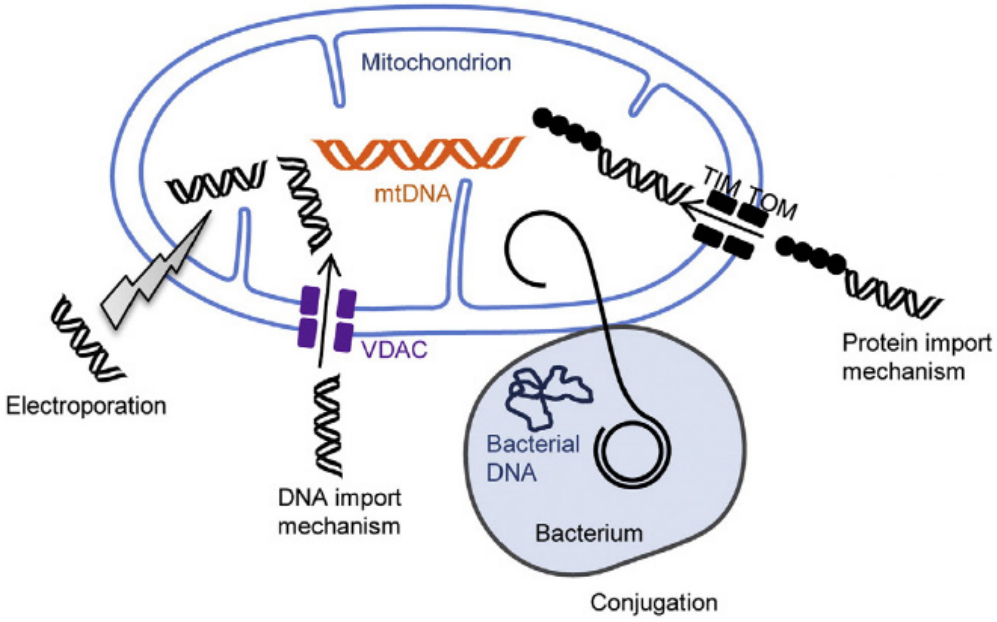

Figure 4. 외래 DNA의 미토콘드리아로의 도입방법(Niazi et al., 2013). 전기천공법(electroporation), 자연도입법(DNA import mechanism), 박테리아 접합(bacterium conjugation), protein import pathway를 이용하여 미토콘드리아로 DNA의 전달을 도식화하였다.

3.2. 박테리아 접합(bacterial conjugation)에 의한 외래 DNA의 전달

미토콘드리아의 내막과 외막의 구조는 일반적으로 알려진 박테리아의 막 구조와 매우 유사하고 또한 미토콘드리아는 초기 진핵 세포와 공생관계에 있었던 원시 박테리아로부터 유래했기 때문에 bacterial conjugation을 통해서도 외래의 DNA가 미토콘드리아로 전달될 수 있다는 아이디어는 그리 놀랍지는 않다(Fig. 4). Yoon과 Koob은 plasmid DNA에 T7 promoter와 *ori*T 서열를 삽입하고 미토콘드리아에는 T7 polymerase를 타겟팅하여 bacterial conjugation을 통해 plasmid DNA가 미토콘드리아로 전달되는 지를 확인하였다(Yoon & Koob, 2005). *Ori*T 서열은 bacterial conjugation에서 DNA 전달 원점으로서 *ori*T 서열이 있을 경우에만 DNA가 전달되어 미토콘드리아 내의 T7 polymerase에 의해 유전자의 전사가 일어날 수 있었고, *ori*T가 없는 경우에는 DNA가 전달되지 않아서 전사는 일어나지 않았다.

또한 이들은 세포 내에서도 미토콘드리아와 conjugation을 일으키기 위해 동물세포에 침입할 수 있는 enteroinvasive *E. coli* (EIEC) strain에 bacterial conjugation에 필요한 유전자 부품을 도입하였다(Yoon et al., 2010). 더불어 침입한 EIEC의 과도한 복제를 억제하기 위해 non-replicating EIEC strain을 제조하여 이들이 동물세포에 침투하여도 동물세포의 성장에는 큰 영향이 없음을 확인하였다(Yoon & Koob, 2012).

Bacterial conjugation은 전기천공법과 같은 가혹한 방법에 비해 매우 부드러운 방법으로서 미토콘드리아의 구조와 활성에 큰 영향을 미치지 않는다. 또한 DNA의 전달은 전적으로 conjugative donor bacteria에 의존하므로 bacteria의 변형만으로도 비교적 쉽게 다양한 DNA construct를 도입시킬 수 있는 장점이 있으므로 동물세포에서 미토콘드리아 유전자 발현 연구에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 다만 bacterial conjugation에 의해 도입되는 DNA는 single strand DNA (ssDNA)이므로 미토콘드리아에 도입된 후 다시 double strand DNA (dsDNA)로 전환시킬 수 있는 방법에 대한 보완이 필요하다.

3.3 Protein import pathway를 이용한 DNA의 전달

Mitochondrial targeting sequence (MTS)의 이용은 Vestweber와 Schatz에 의해서 최초로 시도되었다(Vestweber & Schatz, 1989). 그들은 24bp의 ssDNA 또는 dsDNA를

mitochondrial precursor protein의 C-terminus에 융합하여 분리한 효모 미토콘드리아에 도입시킬 수 있음을 발견하였다. 이후로 N-terminal MTS를 이용하여서도 DNA를 미토콘드리아에 도입시킬 수 있고 더불어 DNA-peptide의 도입 후에 혹시 모를 DNA의 기능 저하를 우려하여 MTS를 제거하는 방법도 또한 고안되었다(Seibel et al., 1995; Seibel et al., 1999). 더욱 섬세한 방법으로 MTS와 peptide nucleic acid (PNA)를 결합시키고 여기에 DNA 또는 RNA oliginucleotide를 base-pairing하였을 때 이 복합체가 분리한 미토콘드리아 뿐만 아니라 배양된 세포의 미토콘드리아에도 성공적으로 도입됨을 확인하였다(Flierl et al., 2003). Polyethylenimine (PEI)를 이용한 방법도 또한 제시되었다(Lee et al., 2007). PEI는 매우 큰 positive charge를 지니고 있으므로 DNA가 결합한 복합체를 구성할 수가 있으며 현재 동물 세포의 유전자 치료에 다양하게 이용되고 있다(Wang et al., 2015). PEI에 MTS를 접합한 DNA 복합체를 배양 세포에 적용하였을 때 세포 내의 미토콘드리아 근처로 DNA 복합체를 타겟팅 시킴을 확인할 수 있었다(Lee et al., 2007). 그러나 MTS-PEI 복합체로부터 DNA가 쉽게 방출되는 지 그리고 이 복합체가 직접 미토콘드리아로 진입하는 지의 여부는 아직까지 불분명하다.

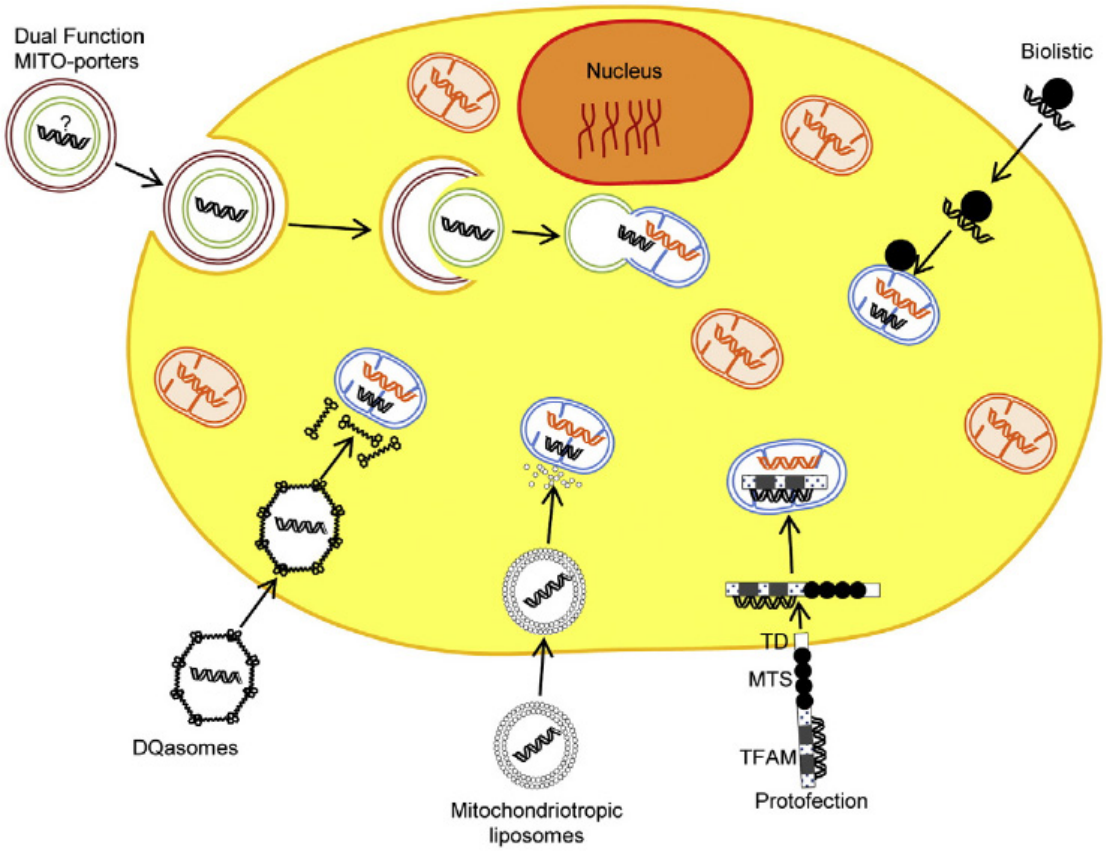

Figure 5. 포유동물 세포 내 미토콘드리아로의 외래 DNA의 도입(Niazi et al., 2013).

지금까지는 논의한 방법은 주로 미토콘드리아에 DNA를 전달하기 위해 시도한 방법으로서 세포로는 어떻게 도입시킬 수 있는 지에 대해서는 한계가 있다. 이러한 한계를 극복하기 위한 전략으로서 미토콘드리아 타겟팅 DNA 복합체에 protein transduction domain (PTD)을 결합시키는 시도가 있었다(Iyer et al., 2009; Keeney et al., 2009) (Fig. 5). 이들은 세포 내 미토콘드리아로 DNA를 직접 타겟팅하기 위해 mitochondrial transcription factor A (TFAM)와 MTD를 결합시키고 여기에 PTD를 첨가하여 recombinant MTD–TFAM을 제조하였다. 여기에 mtDNA를 결합시켜 만든 MTD–TFAM-mtDNA complex를 미토콘드리아 기능이 결여된 Parkinson's disease (PD) cybrid cell에 도입하였을 때 mtDNA의 카피 수와 미토콘드리아의 기능이 정상적으로 회복됨을 관찰하였다. 그러나 mtDNA 없이 MTD–TFAM complex 만으로도 어느 정도 세포의 미토콘드리아 기능을 촉진하는 것으로 나타났으며 이와 같은 방법을 통해 외부의 mtDNA가 직접적으로 미토콘드리아로 전달되는지의 여부는 아직까지 불확실하다.

3.4. Nanocarrier를 이용한 mtDNA의 전달

Mitochondriotropic amphiphile carrier: 세포 내 소기관인 미토콘드리아는 높은 음(negative) 막 전위를 지니고 있으므로 몇몇 양의 전하를 띤 lipophilic cationic compound들이 미토콘드리아로 타겟팅시키는 전달체(mitochondriotropic carrier)로서 개발되었다. 그 중 하나로서 triphenylphosphonium (TPP)은 미토콘드리아 막의 지질 이중층을 통과할 수 있는 양쪽성(amphiphile) 물질로서 항산화제나 ubiquinone 등을 미토콘드리아로 전달하는데 이용되었다(Smith et al., 2003). 더불어 TPP가 PNA와 결합하였을 때도 성공적으로 배양세포의 미토콘드리아로 수송시킴을 밝혔다(Muratovska et al., 2001). 그러나 DNA 자체의 수송에 대한 연구결과는 아직 제시되지 못했다.

최근에 gemini surfactant를 이용한 mitochondrial gene delivery 방법도 개발되었다(Cardoso et al., 2015) (Fig. 6). Gemini surfactant는 친수성과 소수성 그룹을 가지는 두 개의 hydrocarbone이 spacer에 의해 연결된 형태로서 양전하를 띠고 있어 낮은 농도의 DNA와도 결합하여 gemini surfactant-DNA 복합체를 구성할 수 있는 구조를 가지고 있으며 실제로 오랫동안 nuclear transfection에 이용되고 있다(Kirby et al., 2003). 미토콘드리아에서만 발현될 수 있게 염기서열을 변형시킨 GFP plasmid를 이용하여 gemini

surfactant와 복합체를 제조한 후 HeLa cell에 투여하였을 때 미토콘드리아로 DNA가 전달되어 GFP가 발현됨을 확인하였다(Lyrawati et al., 2011; Cardoso et al., 2015). 이들은 RT-PCR assay를 통해 전사된 GFP RNA를 또한 확인하였으며 gemini surfactant-based DNA complexes는 endocytic 또는 nonendocytic (direct membrane translocation) pathway 등 다양한 경로를 통해 미토콘드리아로 DNA를 전달시킬 수 있음을 제시하였다.

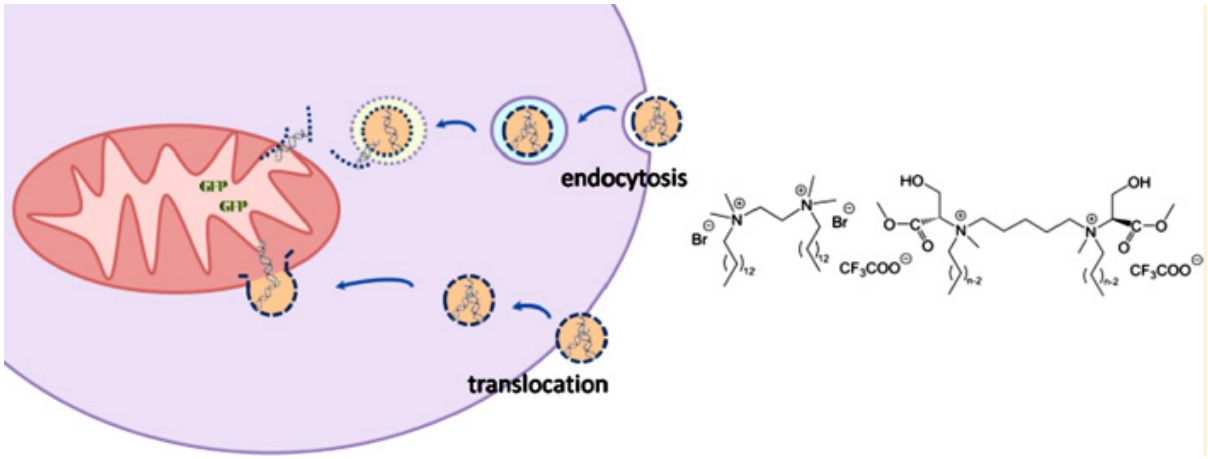

Figure 6. Gemini surfactant를 이용한 외래 DNA의 미토콘드리아 도입(Cardoso et al., 2015).

Mitochondriotropic vesicles: 최초의 미토콘드리아의 형질전환 연구는 Clark와 Shay에 의해 시도되었다(Clark & Shay, 1982). 이들은 항생제 저항성의 mtDNA mutation을 지니는 세포로부터 미토콘드리아를 분리한 후 항생제에 민감한 세포에 첨가했을 때 첨가된 미토콘드리아가 식세포 작용(endocytosis)에 의해 세포 내로 들어가서 항생제에 대한 저항성을 획득하였다고 주장하였다. 이로부터 약 25년후에 mtDNA가 제거된 폐암세포인 A549 rho^0 세포에 murine mitochondria를 첨가했을 때 A549 rho^0 세포의 미토콘드리아 기능이 회복됨을 확인하였다(Katrangi et al., 2007). 이와 같은 식세포 작용에 의한 외부 미토콘드리아의 획득이 가능한지에 대해서는 여전히 논란이 되고 있으나 외래의 미토콘드리아를 직접 microinjection의 방법으로 주입했을 때 mtDNA-less rho^0 cell이 wild-type cell로 형질전환될 수 있음은 이미 증명되었다(King & Attardi, 1989). 이러한 결과를 배경으로 하여 미토콘드리아로 타겟팅되는 mitochondriotropic nanocarrier에 대한 연구가 시도되었다(Fig. 5).

DQAsome은 cationic compound인 dequalinium에서 유래한 carrier로서 DNA와 결합하여

식세포 작용을 통해 포유동물세포로 도입된 후 미토콘드리아에서 그 DNA를 방출시킨다고 알려졌다(D'Souza et al., 2003) (Fig. 5). 또한 DQAsome을 이용하여 미토콘드리아의 codon usage에 맞게 변형시킨 GFP 유전자가 미토콘드리아에 도입되어 GFP를 발현시켰다는 결과도 또한 보고되었다(Lyrawati et al., 2011). 그러나 낮은 transfection 효율(1~5%)과 DQAsome 자체의 세포독성으로 인해 본 결과는 여전히 논란이 되고 있다.

매우 높은 세포독성을 가지는 DQAsome의 대안으로서 낮은 세포독성을 나타내는 mitochondriotropic liposome이 개발되었는데 이것은 인지질과 amphiphilic cation 그리고 DNA와 결합하는 지질로 구성되어있으며 미토콘드리아로 타겟팅되어 DNA를 전달시킬 수 있음을 보고하였다(Boddapati et al., 2005; Weissig et al., 2006) (Fig. 5). 최근에는 mitochondriotropic liposome을 제조할 때 미토콘드리아에서 분리한 지질을 첨가하여 더욱 미토콘드리아의 막 성분과 유사하게 liposome을 제조하여 세포의 안정성을 증진시키고 더욱 효율적인 liposome을 제작하였다(Wagle et al., 2011). 그러나 이들의 실험에서도 이러한 liposome이 DNA를 직접 미토콘드리아에 도입하였는지의 여부에 대해서는 여전히 불분명하다.

Non-cationic liposome-based carrier: 먼저 미토콘드리아 막과의 융합을 통해 미토콘드리아로 propidium iodide와 같은 화학물질을 전달할 수 있는 liposome인 "mito-porter"가 개발되었다(Yamada et al., 2008). 이것의 업그레이드 버전인 dual function mito-porter (DF-Mito-Poters)는 mitochondria-fusogenic envelop과 endosome-fusogenic envelop으로 구성되어 liposome이 식세포 작용에 의해 세포 내로 도입되었을 때 세포 내 endosome과의 융합을 촉진하여 쉽게 liposome을 세포질로 배출될 수 있게 하였고 또한 미토콘드리아 막과의 융합도 촉진시켜 liposome 내의 화합물을 미토콘드리아 내로 효율적으로 수송할 수 있게 하였다(Yamada et al., 2011) (Fig. 5). Mito-porter는 효과적인 미토콘드리아 수송 carrier임에는 틀림없으나 주로 화합물과 단백질 등의 물질수송을 목적으로 개발되었고 DNA와 같은 핵산의 수송에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.

3.5. Adeno-associated virus를 이용한 DNA의 전달

최근 들어 최초로 외래 DNA를 포유동물세포의 미토콘드리아로 도입하여 mitochondrial dysfunction을 회복시켰다는 결과가 보고되었다(Yu et al., 2012). 이들은 adeno-associated

virus의 VP2 capsid의 N-terminal에 cytochrome oxidase subunit 8 (COX8)에서 유래한 23개 아미노산으로 이루어진 미토콘드리아 타겟팅 서열(COX8 MTS)을 결합시켜 virion이 미토콘드리아로 타겟팅될 수 있게 제조하였다(Fig. 7). 더불어 인체의 미토콘드리아 유전자인 *ND4*와 mtDNA promoter인 *HSP* 서열을 바이러스 벡터에 클로닝하여 위의 COX8 MTS AAV capsid에 packaging한 후 만들어진 바이러스를 *ND4* 유전자에 돌연변이를 지니는 세포에 도입하였다. 이들은 *ND4*의 돌연변이로 인해 미토콘드리아 기능이 저해된 세포에 제조한 adenoassociated virus를 공급하였을 때 *ND4* mutation으로 인한 ATP 합성저해가 회복됨을 확인하였다.

또한 이들은 Leber hereditary optic neuropathy (LHON)의 원인이 되는 human *ND4* mutant를 마우스에 도입하여 *ND4* mutant의 카피 수가 마우스 mtDNA의 20% 수준으로 증가시켰을 때 인간의 눈에서 나타나는 전형적인 LHON 증상이 마우스모델에서 나타남을 확인하였고 이 마우스모델에 다시 wild-type human *ND4*를 발현하는 MTS-AAV를 공급하였을 때 시력손상이 회복됨을 관찰하였다(Yu et al., 2015) (Fig. 7). 이와 같은 결과는 포유동물세포에서도 미토콘드리아 유전자 치료법이 가능하다는 것을 증명한 점에서 매우 획기적인 일이라고 사료된다. 앞으로 바이어스 벡터를 변형시키거나 이용하여 순수한 mtDNA 자체 또는 더 큰 사이즈의 DNA를 도입시킬 수 있는 방법의 개발도 또한 필요할 것으로 생각된다.

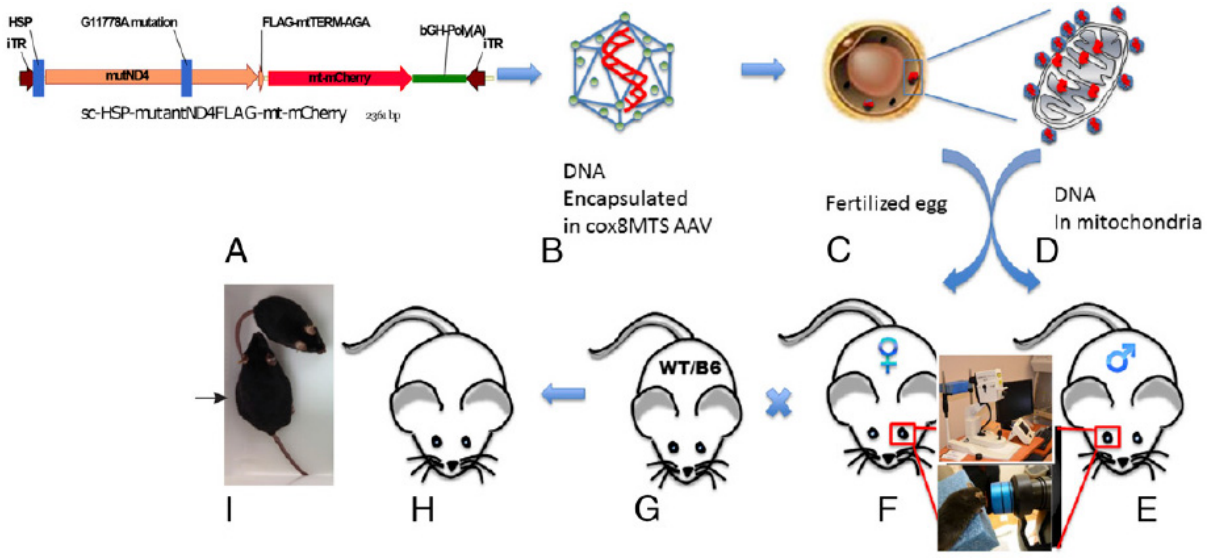

Figure 7. Adeno-associated virus (AAV)를 이용한 DNA의 미토콘드리아로의 전달 및 transgenic

mice의 제조. 도입시키고자하는 외래 DNA를 AAV 캡슐에 포집한 후 마우스 세포에 도입하여 미토콘드리아 형질전환 마우스 모델을 제조하였다(Yu et al., 2015).

3.6. 제한효소를 이용한 mtDNA copy number의 조절

MtDNA에 의해 유발되는 질환은 주로 mtDNA에 있는 유전자의 mutation에 의해 야기된다(Lightowlers et al., 2015). 즉, mutant mtDNA와 wild-type mtDNA가 서로 섞여 있는 heteroplasmy에서 mutant mtDNA의 양이 증가함으로써 mtDNA 질환이 발생하게 된다는 것이다. 이러한 mutated mtDNA의 카피 수를 제어하는 방법으로서 제한효소를 이용하는 기술이 개발되었다. PstI 또는 SmaI과 같은 제한효소에 MTS를 결합하여 이들을 미토콘드리아로 타겟팅시켰을 때 mutant mtDNA가 제거되고 대신에 wild-type mtDNA의 카피 수가 증가함을 확인하였다(Srivastava & Moraes, 2001; Tanaka et al., 2002). 실제로 미토콘드리아 질환인 neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP)와 maternally-inherited Leigh syndrome (MILS)을 유발하는 mtDNA T8993G mutation을 포함하는 세포에 R.XmaI 제한효소를 발현시켜 미토콘드리아로 타겟팅하였을 때 mutant mtDNA의 양은 감소하고 세포의 미토콘드리아 기능이 회복됨을 확인할 수 있었다(Alexeyev et al., 2008).

그러나 Alexeyev 등의 경우와는 다르게 모든 mtDNA mutation이 제한효소자리를 만들어 낼 수는 없으므로 제한효소를 이용한 mtDNA 카피 수의 조절에는 한계가 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 zinc-finger proteins (ZFNs)을 이용하는 방법이 제시되었다(Minczuk et al., 2008). Pathogenic point mutation 주위의 염기서열에 결합할 수 있는 ZFN을 디자인하고 제조하여 미토콘드리아로 타겟팅하면 어떤 mtDNA mutation이라도 제거할 수 있다는 장점이 있다. 따라서, ZFN 기술은 mtDNA point mutation에 의해 발생할 수 있는 미토콘드리아 질환을 제어할 수 있다는 점에서 매우 강력한 유전자 치료 도구라고 사료된다.

4. 고찰

효모와 *Chlamydomonas*를 제외한 다른 종에서 외래 DNA를 이용하여 미토콘드리아를 형질전환하는 방법의 개발은 여전히 진행 중이다. 현재 포유동물세포의 미토콘드리아로 DNA를 도입시키고자 위에서 제시된 몇 가지 방법들은 상당히 신뢰할 만한 수준에 도달해 있으며 가까운 미래에는 세포 내에서 mtDNA 자체의 재조합도 가능해질 것으로 기대

된다. 미토콘드리아 DNA 합성생물학은 앞으로 mtDNA 유전자의 transcription/translation/modification 등의 유전자 발현 및 미토콘드리아의 기능 연구와 더불어 다양한 mtDNA mutation에 의해 야기되는 미토콘드리아 질환의 추적과 치료를 가능하게 할 것이다.

참고문헌

Alexeyev MF, Venediktova N, Pastukh V, Shokolenko I, Bonilla G, Wilson GL (2008) Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes. Gene Ther 15: 516-523

Brandvain Y, Barker MS, Wade MJ (2007) Gene co-inheritance and gene transfer. Science 315: 1685.

Bonnefoy N, Remacle C, Fox TD (2007) Genetic transformation of Saccharomyces cerevisiae and Chlamydomonas reinhardtii mitochondria. Methods Cell Biol 80: 525-548.

Boddapati SV, Tongcharoensirikul P, Hanson RN, D'Souza GG, Torchilin VP, Weissig V. (2005) Mitochondriotropic liposomes. J Liposome Res 15: 49-58

Cardoso AM, Morais CM, Cruz AR, Cardoso AL, Silva SG, do Vale ML, Marques EF, Pedroso de Lima MC, Jurado AS (2015) Gemini surfactants mediate efficient mitochondrial gene delivery and expression. Mol Pharm 12: 716-730.

Clark MA, Shay JW (1982) Mitochondrial transformation of mammalian cells. Nature 295: 605–607.

Collombet JM, Wheeler VC, Vogel F, Coutelle C (1997) Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. A novel approach toward gene correction for mitochondrial disorders. J Biol Chem 272: 5342-5347.

D'Souza GG, Rammohan R, Cheng SM, Torchilin VP, Weissig V (2003) DQAsome-mediated delivery of plasmid DNA toward mitochondria in living cells. J Control Release 92: 189-197.

Flierl A, Jackson C, Cottrell B, Murdock D, Seibel P, Wallace DC (2003) Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment via import sequence conjugated peptide nucleic acid. Mol Ther 7: 550-557.

Fox TD, Sanford JC, McMullin TW (1988) Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA. Proc Natl Acad Sci USA 85: 7288-7292.

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature 331: 717-719

Iyer S, Thomas RR, Portell FR, Dunham LD, Quigley CK, Bennett Jr JP (2009) Recombinant mitochondrial transcription factor A with N-terminal mitochondrial transduction domain increases respiration and mitochondrial gene expression. Mitochondrion 9: 196–203

Jacobs HT (2001) Making mitochondrial mutants. Trends Genet 17: 653-660

Katrangi E, D'Souza G, Boddapati SV, Kulawiec M, Singh KK, Bigger B, Weissig V (2007) Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human rho^0 cells can improve respiratory function. Rejuvenation Res. 10: 561–570.

Keeney PM, Quigley CK, Dunham LD, et al. (2009). Mitochondrial gene therapy augments mitochondrial physiology in a Parkinson's disease cell model. Hum Gene Ther 20: 897-907.

King MP, Attardi G (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. Science 246: 500-503

Kirby AJ, Camilleri P, Engberts JB, Feiters MC, Nolte RJ, Söderman O, Bergsma M, Bell PC, Fielden ML, García Rodríguez CL, Guédat P, Kremer A, McGregor C, Perrin C, Ronsin G,

van Eijk MC (2003) Gemini surfactants: new synthetic vectors for gene transfection. Angew Chem Int Ed Engl 42: 1448-1457.

Koulintchenko M, Temperley RJ, Mason PA, Dietrich A, Lightowlers RN (2006) Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. Hum Mol Genet 15: 143-154

Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM. (2015) Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? Science 349: 1494-1499.

Lee M, Choi JS, Choi MJ, Pak YK, Rhee BD, Ko KS. (2007) DNA delivery to the mitochondria sites using mitochondrial leader peptide conjugated polyethylenimine. J Drug Target 15: 115-122.

Lyrawati D, Trounson A, Cram D (2011) Expression of GFP in the mitochondrial compartment using DQAsome-mediated delivery of an artificial mini-mitochondrial genome. Pharm Res 28: 2848–2862.

Minczuk M, Papworth MA, Miller JC, Murphy MP, Klug A (2008) Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res 36: 3926-3938

Muratovska A, Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM, Smith RA, Wilce JA, Martin SW, Murphy MP (2001) Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations: implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease, Nucleic Acids Res 29: 1852-1863

Niazi AK, Mileshina D, Cosset A, Val R, Weber-Lotfi F, Dietrich A (2013) Targeting nucleic acids into mitochondria: progress and prospects. Mitochondrion 13: 548-558.

Poole A, Penny D (2007) Eukaryote evolution: engulfed by speculation. Nature 447: 913.

Rohou H, Francisci S, Rinaldi T, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M (2001) Reintroduction of a characterized Mit tRNA glycine mutation into yeast mitochondria provides a new tool for the study of human neurodegenerative diseases. Yeast 18: 219–227

Scheffler IE (2001) Mitochondria make a come back. Adv Drug Deliv Rev 49: 3-26

Seibel P, Trappe J, Villani G, Klopstock T, Papa S, Reichmann H (1995) Transfection of mitochondria: strategy towards a gene therapy of mitochondrial DNA diseases. Nucleic Acids Res 23: 10-17

Seibel M, Bachmann C, Schmiedel J, Wilken N, Wilde F, Reichmann H, Isaya G, Seibel P, Pfeiler D (1999) Processing of artificial peptide–DNA-conjugates by the mitochondrial intermediate peptidase (MIP). Biol Chem 380: 961–967.

Srivastava S, Moraes CT (2001) Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. Hum Mol Genet 10: 3093-3099

Smith RA, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP (2003) Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 100: 5407-5412

Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M, Maruyama W, Naoi M, Ibi T, Sahashi K, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, Nishizawa K, Akao Y, Ohishi N, Miyabayashi S, Umemoto H, Muramatsu T, Furukawa K, Kikuchi A, Nakano I, Ozawa K, Yagi K (2002) Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. J Biomed Sci 9: 534-541.

Tsaousis AD, Kunji ERS, Goldberg AV, Lucocq JM, Hirt RP, Embley TM (2008) A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of Encephalitozoon cuniculi. Nature 453: 553-556.

Vestweber D, Schatz G (1989) DNA–protein conjugates can enter mitochondria via the protein import pathway. Nature 338: 170–172.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd,

Nikoskelainen EK (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 242: 1427-1430.

Wagle MA, Martinville LE, D'Souza GG (2011) The utility of an isolated mitochondrial fraction in the preparation of liposomes for the specific delivery of bioactives to mitochondria in live mammalian cells. Pharm Res 28: 2790–2796.

Wang X, Niu D, Hu C, Li P (2015) Polyethyleneimine-based nanocarriers for gene delivery. Curr Pharm Des 21: 6140-6156.

Weissig V, Boddapati SV, Cheng SM, D'Souza GG (2006) Liposomes and liposome like vesicles for drug and DNA delivery to mitochondria. J Liposome Res 16: 249–264.

Wiesner RJ, Rüegg JC, Morano I (1992) Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. Biochem Biophys Res Commun 183: 553–559.

Yamada Y, Akita H, Kamiya H, Kogure K, Yamamoto T, Shinohara Y, Yamashita K, Kobayashi H, Kikuchi H, Harashima H (2008) MITO-Porter: a liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. Biochim Biophys Acta 1778: 423–432.

Yamada Y, Furukawa R, Yasuzaki Y, Harashima H (2011) Dual function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. Mol Ther 19: 1449–1456.

Yoon YG, Koob MD (2003) Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in Escherichia coli and transfer into transcriptionally active mitochondria. Nucleic Acids Res 31: 1407-1415.

Yoon YG, Koob MD (2005) Transformation of isolated mammalian mitochondria by bacterial conjugation. Nucleic Acids Res 33: e139

Yoon YG, Koob MD (2012) Nonreplicating intracellular bacterial vector for conjugative

DNA transfer into mitochondria. Pharm Res 29: 1040–1045.

Yoon YG, Koob MD, Yoo YH (2010) Re-engineering the mitochondrial genomes in mammalian cells. Anat Cell Biol 43: 97-109.

Yu H, Koilkonda RD, Chou TH, Porciatti V, Mehta A, Hentall ID, Chiodo VA, Boye SL, Hauswirth WW, Lewin AS, Guy J (2015) Consequences of zygote injection and germline transfer of mutant human mitochondrial DNA in mice. Proc Natl Acad Sci USA 112: E5689-5698.

Yu H, Koilkonda RD, Chou TH, Porciatti V, Ozdemir SS, Chiodo V, Boye SL, Boye SE, Hauswirth WW, Lewin AS, Guy J (2012) Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model. Proc Natl Acad Sci USA 109: E1238-1247.