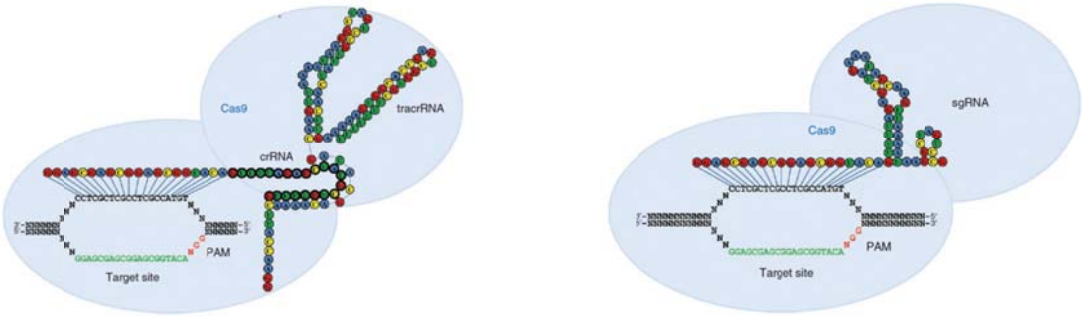
RNA guided genome engineering 연구의 최신 동향

이남일, 조병관

한국과학기술원 생명과학과

인간을 포함한 다양한 생명체의 게놈서열이 빠르게 밝혀지고 있음에 따라 서열의 기능을 분석하는 것만이 아닌 직접적으로 editing하려는 연구들이 진행되고 있다. 게놈을 editing하는 방법 중 지금까지 대표적으로 많이 쓰이고 있는 기술로는 ZFN(Zinc finger nuclease), TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nucleases)이 있다. 이 두 가지는 단백질을 이용하여 게놈상의 특정 DNA 서열을 인식하고 그 부분을 잘라내는 기술로써 특정 서열에 mutation을 일으키거나 homologous recombination을 이용하여 원하는 서열을 게놈에 insertion하는 형태로 쓰여왔다. 두 가지 기술 모두 게놈상의 specific한 site를 target할 수 있다는 큰 장점을 가지고 있으나 두 단백질 모두 크기가 커서 합성하는데 돈과 시간이 많이 든다는 단점을 가지고 있다.

ZFN과 TALEN을 대체할 수 있는 기술로써 RNA를 이용하여 게놈을 editing하는 기술인 CRISPR (Clustered, Regularly Interspaced, Short Palindromic Repeats) – Cas(CRISPR associated protein) system이 최근 제시되었다. CRISPR-Cas system은 본래 archaea와 bacteria의 adaptive immunity system으로 알려져 있다. Virus나 plasmid가 침입하였을 때 archaea나 bacteria는 crRNA와 tracrRNA라고 불리는 짧은 RNA를 만들어 내고 이 RNA는 침투한 DNA에 결합한다. 이 구조를 Cas 단백질이 인식하고 DNA를 잘라 분해시키며 자신을 외부의 DNA 침입으로부터 보호한다. 특정 서열을 인식하여 그 부분을 잘라내는 system이 ZFN과 TALEN과 유사하여 이를 응용하여 게놈 editing에 사용하려는 연구들이 활발히 진행되었다.



종 마다 다양하게 존재하는 CRISPR-Cas system에는 크게 세가지 타입이 존재한다. 이 중 Cas9 단백질과 crRNA, tracrRNA가 관여하는 typeII가 대표적이며 가장 잘 알려져 있다. crRNA와 tracrRNA의 구조와 유사한 형태를 가지는 single guide RNA를 합성한 뒤 Cas9 단백질과 함께 이용하여 여러 organism의 genome을 editing하려는 연구들이 진행되고 있다. (Kira S Makarova et al. (2011))

2013년도 nature와 cell에 CRISPR-Cas system을 이용하여 mamalian cell의 게놈 editing에 성공한 사례들이 보고되었다. Cas9 단백질을 vector형태로 human cell내에서 직접 발현시키고, single guide RNA를 in vitro에서 합성하여 human cell에 주입시킨 결과 target site에 mutation을 만들 수 있다는 것이 확인되었으며 기존의 ZFN이나 TALEN과는 다르게 off target effect가 없음이 증명되었다. (Seung Woo Cho et al. (2013)) 또한 Cas9 단백질과 synthetic single guide RNA를 모두 human cell내에 vector의 형태로 넣고 발현시켜 게놈을 editing한 결과도 보고되었다. (Prashant Mali et al. (2013))

Human cell 뿐 아니라 CRISPR-Cas system type II를 이용하여 zebrafish embryo genome 상의 11개 target site에 mutation을 일으킬 수 있다는 것이 확인되었다. Cas9 단백질을 mRNA형태로 합성한 뒤 single guide RNA와 함께 microinjection을 통해 cell 내로 주입시켜 CRISPR-Cas system을 구현한 결과 기존 ZFN이나 TALEN으로는 editing 할 수 없었던 부분의 editing이 가능함이 보고되었다. (Woong Y Hwang et al. (2013)) 기존의 ZFN과 TALEN처럼 한 곳의 target site를 정하여 mutation을 일으킨 것 외에 두 종류의 single guide RNA를 이용하여 CRISPR-Cas system으로 multiplex genome engineering을 가능하게 한 기술도 개발되었다. (Le cong et al. (2013))

Genome을 editing할 때 ZFN이나 TALEN과 같은 경우엔 다른 site를 detection하려면 새로운 protein을 design해야 했다. 하지만 CRISPR-Cas system을 이용할 경우 같은 protein (Cas9)을 사용하면서 target하는 sequence에 따라 crRNA의 sequence만 바꿔주면 되기 때문에 ZFN이나 TALEN에 비해 가격적이나 시간적인 면에서 많은 단축을 할 수 있다. 하지만 아직까지 이 system은 몇 가지 단점을 가지고 있다. 첫째로 Cas9 protein이 인식하는 PAM sequence(NGG)가 target genome site에 존재해야 한다는 한계점이 존재한다. 하지만 이는 Cas9 단백질 engineering으로 해소될 수 있는 한계점이라 생각된다. 또한 chromatin의 구조와 epigenetic state가 eukaryotic cell의 게놈 editing에 영향을 줄 수 있는 요소로 지목 받고 있다. 이 분야에 대한 연구가 더 이루어진다면 CRISPR-Cas system은 게놈의 모든 특정 site를 쉽고 빠르게 심지어 multiplex engineering으로까지 사용 될 수 있는 가능성을 가지고 있다고 보여진다.

2011, Kira S Makarova et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas system Nature review June 2011 volume9 467-477

2013 Seung Woo Cho et al. Nature Biotechnology 29 January 2013; doi:10.1038/nbt.2507 Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease

Prashant Mali et al. Science vol339 15 February 2013 RNA-guided human genome engineering via Cas9

2013 Woong Y Hwang et al. Nature Biotechnology 29 January 2013; doi:10.1038/nbt.2501 Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system

Le cong et al. Science vol339 15 February 2013 Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems