

6

유전정보의 변경 및 그 응용

유전공학이 하나의 학문으로서 인정받게 된 것은 1970년대에 들어와서의 일이다. 그러나 이 학문은 이미 오래 전부터 분자유전학, 조직배양학, 세포유전학, 분자생물학 등 여러 가지 형태의 학문으로 연구가 수행되어 왔다. 좁은 의미에서의 유전공학은 유전자의 조작 기술을 이용하여 세포외에서 핵산 분자를 바이러스 또는 박테리아의 플라스미드 등에 삽입시킨 다음, 숙주 생체에 넣어 계속 전파시켜 새로운 재조합의 유전 물질을 생성하는 학문이라고 할 수 있다. 1980년 유전학자들은 처음으로 인터페론(interferon)을 생성하는 유전자를 박테리아에 넣을 수 있었고 이로 인해 바이러스 감염이나 암의 치료에 유용한 이 물질을 대량 생산하는 길을 열었다.

넓은 의미에서 유전공학은 1982년 과학기술처에 모인 국내 학자들에 의해 다음과 같이 정의되었다. “유전공학이란 유전자를 인공 조작하여 새로이 유용한 생명체를 개조 또는 창조하는 공학 기술을 말한다. 조작된 유전자가 고유의 기능을 발휘하기 위해서는 여러 가지 기법이 도입되지 않으면 안 되기 때문에 넓은 의미로 해석하여 유전자 조작, 염색체 조작, 게놈(genome) 조작, 세포융합, 핵 및 세포 기관의 치환, 조직배양에 의하여 새로운 생명체를 개조 또는 창조하는 공학 기술을 가리키는 것이다”.

한 세대에서 다음 세대로의 유전정보 전달은 생물체의 기본적인 생명 현상의 핵심이다. 이것은 자연발생적이지만 인공적인 방법에 의해서도 가능하며 한 세포 안에서도 유전정보가 재배열 또는 개조될 수 있다. 이번 장은 이와 관련된 여러 가지 메커니즘 및 그 응용에 대한 것이다.

6.1 돌연변이

돌연변이란 세포의 DNA가 화학약품, 자외선, 세포자체의 이상 등 다양한 원인에 의하여 원래의 정보와는 다른 정보를 지니는 DNA로 복제되는 현상이다. 돌연변이는 유전형과 표현형이 있다.

- 1) 유전형(genotype) : 유전자형이라고도 하며, 유전자를 구성하는 DNA 염기서열에 생기는 돌연변이이다.
- 2) 표현형(phenotype) : 돌연변이의 결과가 외부에 나타난 경우이다.

6.1.1 돌연변이 과정

돌연변이는 대부분 DNA를 합성할 때 발생한다. 점 돌연변이(point mutation)는 DNA상의 염기서열 중 한 개의 염기가 다른 염기로 변해서 발생한다. 그림 6.1에서 야생형(wild type) DNA에 점 돌연변이가 생겨서 염기 A가 염기 T로 바뀌었다. 또한 TCGTG가 없어진 삭제(deletion) 과정을 보여주고 있다.

침묵 돌연변이(silent mutation)는 점 돌연변이 현상이 발생하여 DNA 염기서열이 바뀌었지만 여전히 같은 정보를 지니므로써 겉으로는 돌연변이가 발생하지 않은 것과 같아 보이는 경우이다. 이렇게 되는 이유는 하나의 아미노산에 해당하는 codon이 한 개가 아니라 여러 개(대개 2~6개)이기 때문이다. 점 돌연변이 중에서 활성부위의 아미노산 서열이 바뀐 경우는 단백질의 활성이 크게 변한다. 예를 들어, 점 돌연변이의 한 형태는 무의미(nonsense) 또는 정지(stop) 코드를 형성하여 단백질을 불완전하게 만든다. 무의미(nonsense) 코드란 유전암호 중에서 어떤 아미노산에도 대응하지 않는 암호로서 UAG,

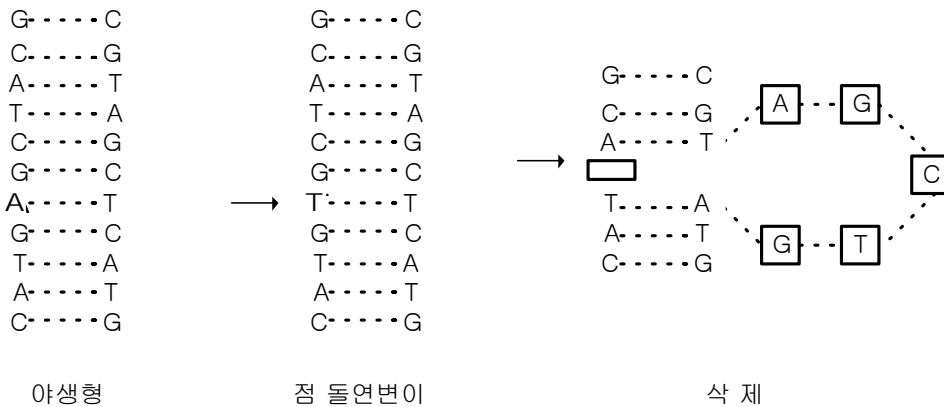


그림 6.1 점 돌연변이(point mutation)와 삭제(deletion)에 의하여 야생형의 DNA 염기서열이 바뀌는 예

UAA, UGA의 3가지가 있다.

삭제 돌연변이(deletion mutation)는 DNA상의 한 가닥에 있는 염기가 하나 또는 그 이상이 제거되어 아미노산 서열에 변화를 주게되는 것으로 결과적으로 DNA 번역과정에서 판독틀(reading frame)이 이동되어 단백질 전체조성이 변하게 된다.

역 돌연변이(reverse mutation) 또는 복귀(reversion) 현상도 발생하는데 복귀주(revertant)란 돌연변이가 발생한 세포에 다시 한번 돌연변이가 발생하여 원래 야생형이 갖는 표현형으로 되돌아 간 세포를 말한다.

6.1.2 원하는 돌연변이주(mutant)의 선별

수많은 세포 중에서 특정한 형태의 돌연변이 세포만을 효과적으로 선별함으로써 이를 원하는 목적에 적합하게 이용할 수 있다. 자연상태에서 세포가 10^6 회 분열시 한 유전자에서 1회 정도의 돌연변이가 발생할 확률이 있다. 이 돌연변이 발생 빈도를 증가시키기 위하여 돌연변이 유도물질(mutagen)로서 화학약품 또는 자외선이 이용된다.

돌연변이주의 직접선별은 항생제 또는 독성화합물에 대해 내성을 갖는 돌연변이주를 찾는 것이다. 즉, 고체배지 위에 항생제를 고루 바른 후 미생물을 배양하면 해당 항생제에 대해 내성을 갖는 세포만이 성장하여 군락체(colony)를 이루며 이 군락체는 동일한 미생물의 집합체이다.

간접선별은 생장에 반드시 필요로 하는 특정 성장인자를 만드는 능력이 부족하거나 없는 돌연변이를 분리하기 위해 사용된다. 야생형 대장균은 포도당과 무기염만을 이용하여 성장할 수 있으나 영양요구성 돌연변이(auxotroph)는 성장인자를 보충하지 않는 한 자랄 수 없다. 한편 이와 반대로 포도당과 무기염 등 최소영양분이 첨가된 배지에서 성장 가능한 세포주를 프로토티로프(prototroph)라 한다.

이러한 영양요구성 돌연변이 세포주를 구별하는 방법을 판 복제법(replica plating)이라 한다. 이 방법에는 완전한 고체배지 plate에서 키운 모든 군락체를 벨벳 형겅 위에 눌러서 묻힌 후 성장인자가 빠진 고체배지 plate를 준비하여 동일한 벨벳 형겅을 누르면 모든 군락체가 옮겨오기는 하지만 야생형만 자랄 수 있다. 완전한 배지로 만든 plate와 성장인자가 빠진 plate상의 군락체의 위치를 겹쳐서 비교해 보면 영양요구성 돌연변이 군락체의 위치를 확인하여 분리할 수 있다(그림 6.2).

6.1.3 Replica-plating법에 의한 영양요구성 돌연변이주(auxotroph)의 분리

라이신(lysine)을 생산할 수 없는 돌연변이 대장균을 일반 대장균으로부터 분리하기 위해서는 우선 라이신이 첨가된 고체배지와 첨가되지 않은 고체배지를 준비한다. 라이신이

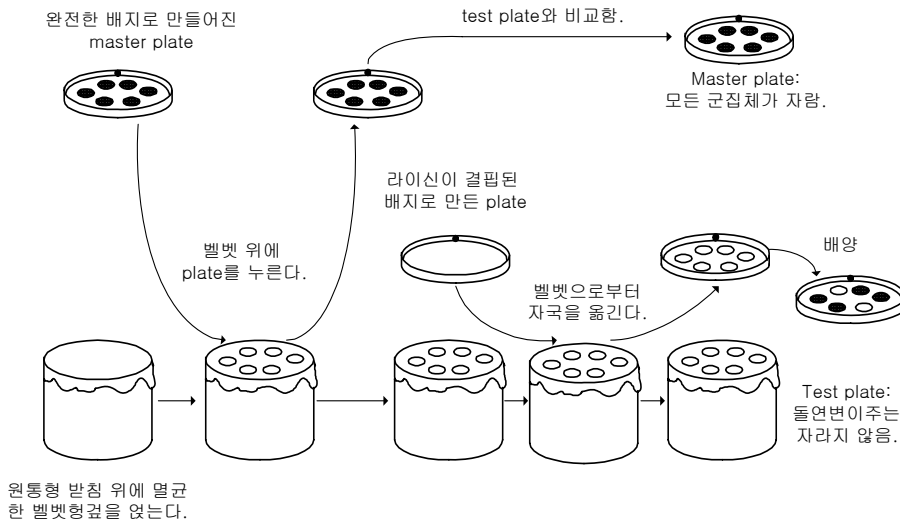


그림 6.2 영양요구성 돌연변이(nutritional mutants)를 찾아내기 위한 replica plating법

첨가된 배지에 리신 요구주와 일반대장균이 혼합된 상태의 대장균을 희석하여 배양한다. 이 배지에서는 리신 요구주도 별 무리 없이 성장하여 균락체를 형성한다. 그런 다음 충분히 성장하면 멸균된 벨벳(velvet) 천을 대장균이 성장 중인 고체배지 위에 접촉시켜 대장균 균락체를 묻힌다. 이 벨벳 천을 그대로 리신이 첨가되지 않은 고체배지 위에 얹어 벨벳에 묻은 균집을 배지에 묻힌다. 이렇게 함으로써 리신이 첨가된 고체배지와 첨가되지 않은 고체배지에는 상응하는 위치에 균락체가 옮겨진다. 이 배지를 약 24시간 동안 배양실에 두면 리신이 첨가되지 않은 고체배지에서 일반 대장균은 성장하지만 리신 요구주는 성장할 수 없다. 따라서 두 배지에 형성된 균락체의 위치를 비교하면 리신이 첨가된 배지에서만 성장한 균락체의 위치를 파악할 수 있으며 이 균락체는 순수한 리신 요구주만으로 형성되어 있다.

이러한 돌연변이 선별기법을 통하여 유용산물 생산균주의 개량이 실현되었으며 페니실린 생산균주 개량의 경우 생산수율이 1939년 배양액 중 0.001 g/L에서 현재 약 50 g/L로 무려 50,000배 증가하였다.

6.2 유전자 전달 및 재배열 메커니즘

6.2.1 유전자 재조합

유전자 재조합(genetic recombination)이란 두 개의 서로 다른 게놈(genome)으로부터 취한 유전요소(genetic element)들을 한 단위로 접합시켜서 돌연변이 없이도 새로운 유전형

을 만드는 과정이다. 유전자 재조합법에는 형질변환(transformation), 형질도입(transduction), 그리고 접합(conjugation)이 있다.

- 1) 형질변환 : 한 균주의 DNA 추출물을 다른 균주에 인공적으로 집어넣어 박테리아의 형질을 바꾸는 방법.
- 2) 형질도입 : 박테리오파지(bacteriophage)에 의해 파지의 유전형질이 숙주세포에 전달되는 방법.
- 3) 접합 : 세포간 직접 접촉에 의해 DNA가 전달되는 현상.

DNA 일부가 세포 내부로 들어오면 어떤 과정으로 유입되었는지에 상관없이 대부분 재조합 과정을 거친다. 일반적인 재조합 과정은 그림 6.3과 같다.

이 경우 공여체(donor) DNA와 수령체(recipient) DNA는 상호 동종성(homologous)이거나 매우 유사한 관계이어야 한다. 적당한 조건하에서는 세포 내 효소들이 수령체 DNA의 동종성 부분을 잘라내어 공여체 DNA가 삽입되게 한 후 이 DNA의 끝을 수령체 DNA에 연결하여 준다. 자연조건하에서 유전자 공여체 DNA가 같은 종(species)은 가까이 연관된 종으로부터 온 것일 때 효과가 있다. 이러한 과정은 세포 내에 존재하는 제한효소

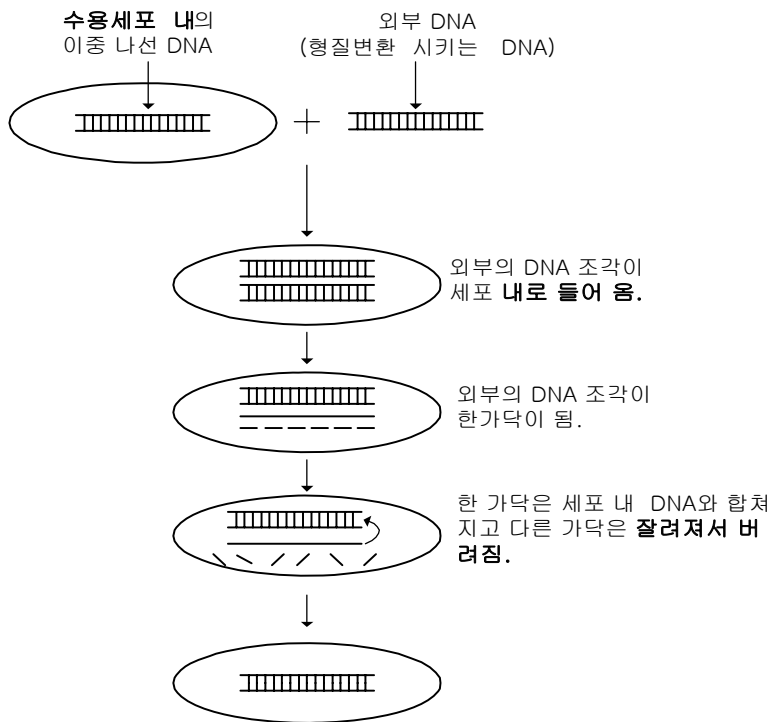


그림 6.3 형질변환 DNA와 수용세포(recipient cell)의 결합

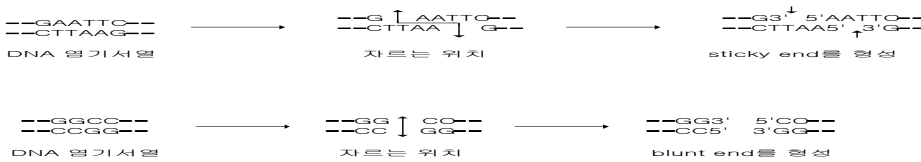
(restriction endonuclease)에 의하여 가능하다.

제한효소란 DNA상의 염기서열을 인식하고 특정 부위를 자르는 기능을 가진 효소이다. 제한효소는 수백 가지가 존재하는데 이들이 인식하는 DNA상의 염기서열은 4~6개의 뉴클레오티드로 형성된 것이 일반적이며 이 배열은 두겹 회전대칭(twofold rotational symmetry)이라는 대칭적 구조를 가지고 있다. 대표적인 제한 효소에는 EcoRI, HaeIII, PstI 등이 있다. 인식부위(recognition site)의 한쪽 끝과 다른 쪽 끝이 서로 상보적(complementary)이다.

제한효소로 절단된 후 각 조각들의 절단 부위가 HaeIII 처럼 뭉툭해지는 경우 (blunt ends)와 EcoRI이나 PstI처럼 절단 부위 끝에 단일가닥 부분이 있는 경우 (cohesive ends or sticky ends)가 있다. 이러한 조각들을 다시 연결하는 데에는 리가아제(ligase)라는 효소가 작용한다. 이 효소는 두 개의 DNA 조각에서 당과 인산 사이의 포스포디에스터 결합(phosphodiester bond)을 만들어 연결시켜 준다.

EcoRI과 HaeIII가 자르는 공여체 DNA와 수령체 DNA상의 특정 염기서열은 다음과 같다.

(예1) 제한효소 EcoRI의 작용



(예2) 제한효소 HaeIII의 작용

