

## 혁신적인 등온 유전자 증폭법(ICAN)의 개발

TaKaRa Shuzo Co., Ltd.(대표 : Ohmiya Hisashi)의 바이오사업부문은 혁신적인 유전자 증폭방법인 ICAN™(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids)을 개발하였다. ICAN법은 초미량으로 존재하는 DNA를 PCR법과 동등이상의 감도로, 또한 등온에서 증폭·검출할 수 있다. 종래 PCR법으로 실시해 왔던 에이즈 등의 감염증의 유전자 진단 등에 응용할 수 있을 뿐만 아니라, 반응시스템을 대량화 할 수 있는 잇점이 있어 DNA단편을 공업적인 규모로 대량생산 등에 응용할 수 있다.

ICAN법은, 길이가 4 kb 정도까지의 DNA의 일정영역을 50°C ~65°C의 일정온도에서 증폭할 수 있다. 증폭반응에는 네 가지 성분 ①RNA(3' 측)와 DNA(5' 측)으로 이루어지는 Chimera Primer, ②가닥 치환형 DNA합성효소(BcaBEST™ DNA Polymerase), ③DNA-RNA hybrid부위를 절단하는 Ribonuclease(RNase H) ④DNA 합성의 기질인 dNTP를 이용하고 있다.

ICAN법을 이용한 사업전개는 크게 나누어 두 분야에서의 응용을 생각할 수 있다.

하나는 PCR법과 같은 감염증 진단영역이다. 당사 바이오사업부문에서는 대장균 0-157 verocytotoxin 유전자, botulinus 균 독소유전자, Human K-ras 유전자, adenovirus, C형 간염 virus, papilloma virus, cysanthemum stunt viroid 등 각종 target에 대하여 PCR법과 달리 일정한 온도에서 반응할 수 있어 고가의 장치가 필요 없이 다수의 검체를 신속하게 유전자 진단할 수 있는 시스템을 구축하기 쉽다. 또한 이러한 진단목적 이외에도 유전자 변형식품 검사 등에 응용이 가능하다.

ICAN 법의 다른 하나의 응용분야는 공업수준에서의 DNA단편의 제조이다. ICAN법은 일정온도에서 반응하므로 단순히 반응조를 대형화 하는 것만으로 쉽게 생산량을 scale up 할 수 있다. 또한 ICAN법으로 얻은 증폭산물의 회수량도 PCR법을 이용한 경우보다 5~100배 높다. 본 바이오사업부문에서는 ICAN법을 이용하는 것으로 현시점에서 약 600 bp 길이의 DNA 단편을 0.3 mg/ml의 농도까지 증폭할 수 있음을 확인하였다. 당사는 Affymetrix사로부터 spot형 DNA chip에 관한 전 세계에서 제조·판매권을 가지고 있으므로 앞으로 DNA chip용의 DNA 단편 제조에 대해서도 이 기술을 응용하여 저가의 고품질 DNA chip을 전세계에 공급할 예정이다.

### Step 1. (가닥신장반응)

염기서열의 정보를 기반으로 합성된 일대의 chimeric primer가 주형 DNA의 특정부분에 annealing하여 그 3' 말단에서 DNA 가닥이 신장한다.

### Step 2. (주형교환반응)

상류측과 하류측에서 신장한 두 가닥이 어떤 비율로 원래의 주형에서 떨어져 그 3' 부분에서 신장가닥끼리 annealing한다. 이 annealing한 신장가닥끼리 다시 신장하여 이중가닥 반응 중간물 A가 형성된다.

### Step 3. (절달부 도입반응)

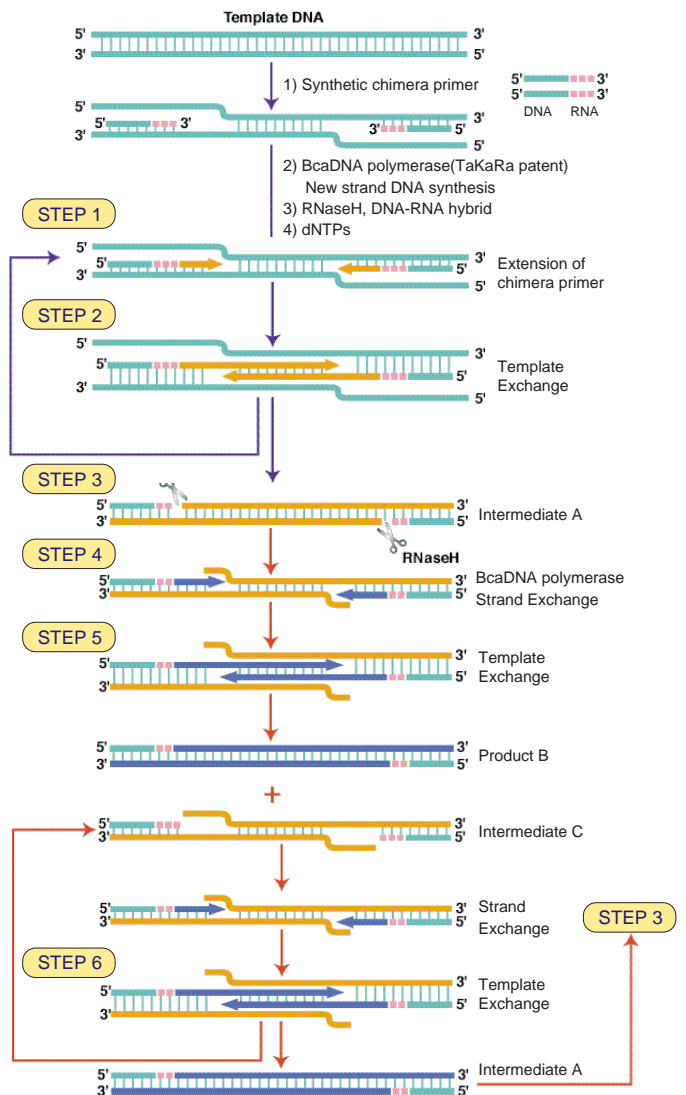
반응 중간물 A의 chimera primer에서 유래하는 DNA/RNA hybrid의 RNA 부분에 RNaseH가 작용하여 즉 RNA를 포함하는 한쪽 방향의 가닥만을 절단하여 절단 부분을 도입한다.

### Step 4. (가닥치환반응)

이 절단부분에서 가닥치환반응이 일어난다

### Step 5. (주형교환반응)

또한 Step 2 및 Step 5와 같은 주형교환반응이 어떤 비율로 일어난다. 그리고 반응 중간물 A와 반응 중간물 C의 생성이 거듭되는 연속반응이 일어나 결과적으로 두 개의 chimera primer에 의하여 끼워진 영역이 특이적으로 증폭되는 것이 된다.



## 세포 의료 관련제품 판매회사 설립

TaKaRa Shuzo Co., Ltd.(대표: Ohmiya Hisashi) 바이오사업부 문은 세포의료 관련제품 판매회사로 Takara Kohden Cell Therapeutics Co., Ltd.(약칭: TKCT)를 2000년 8월 29일 설립하였다. 자본금은 4억 9500만엔으로 출자비율은 TaKaRa Shuzo Co., Ltd.: 51%, Nihon Kohden Corp.: 40%, Wakenyaku Co., Ltd.: 9%이다.

이는 TaKaRa가 보유하고 있는 유전자치료와 말초혈모세포 이식 등의 세포의료에 관련된 기술력과 Nihon Kohden Co. 및 Wakenyaku Co., Ltd.의 영업력을 결합하여 기존에 가지고 있던 Nexell Therapeutics Inc.(Nexell사) 제품의 일본내에서의 사업전개를 가속화함과 동시에 한국, 중국, 대만에서의 판매에 주력한다는 의미이다.

### Nexell사에서 제조한 혈액세포분리 시스템인 Isolex® 시리즈를 주력제품으로서 판매

「Isolex®」 시리즈는 monoclonal antibody를 고정화한 전자기 beads로 CD34 양성세포를 특이적으로 선별하여 많은 조혈모세포를 고순도로 분리 농축할 수 있다. 조혈모세포 이식은 많은 암 화학치료 등에서 파괴된 혈액, 면역계의 재생, 골수 성백혈병, 재생불량성빈혈, 면역부전증 등에 뛰어난 효과를 갖고 있는 치료법으로 기대된다. 또 특정 세포를 선택, 증식하여 환자의 체내로 돌려보내는 새로운 체외세포치료법으로 연구되고 있다.

이외에 Nexell사 제품인 제대혈보존에 유용한 혈액성분동결 보존용 Cryocyte™ Freezing Container시리즈, 세포배양용 Lifecell™ Tissue Culture Flask 시리즈 등도 판매한다.

### 유전자치료에 응용 가능한 신제품 Lifecell X-Fold®

유전자 치료는 선택 분리한 목적 세포를 특정 유전자에 도입하여 환자의 체내로 돌려보내는 것이다. 혈액세포의 원천인 조혈모세포에 retrovirus vector로 유전자를 도입하기 위해서는 우선 조혈모세포를 선택적으로 분리하여야 한다. Isolex® 시리즈를 사용하여 세포를 선택적으로 분리하고 TaKaRa에서 개발한 RetroNectin법으로 유전자를 도입하는 방법이 전 세계적으로 유전자 치료기술의 표준이 되어 가고 있다.

실제로 프랑스의 국립위생연구소(INSERM)에서 세계 최초로 성공한 유전자치료의 예(면역부전증 SCID-X1 : Science 4월 28일호에 게재)는 TaKaRa가 개발한 RetroNectin을 Nexell사가 개발한 기체 투과성이 높은 플라스틱 세포배양팩 「Lifecell X-Fold®」의 내면에 코팅한 상태로 조혈모세포에 유전자를 도입하였다. 이는 기존의 방법에 비해 유전자 도입효율을 비약적으로 상승시킨 중대한 요인으로 평가받고 있다.

앞으로도 유전자치료와 말초혈간 세포이식 등의 세포의료의 접점 다양해질 것이며, 「Isolex®」 시리즈 같은 혈액세포 분리 시스템의 수요도 증가할 것이다. TaKaRa에서는 향후 5년간 30억엔 정도의 세포의료 관련제품의 매출신장을 기대하고 있다.

### <신설회사의 개요>

회사명 : TaKaRa Kohden Cell Therapeutics Co., Ltd.  
대표자명 : Koichi Nakao  
자본금 : 4억 9500만엔  
출자비율 : TaKaRa Shuzo Co., Ltd. : 51%  
Nihon Kohden Corp. : 40%  
Wakenyaku Co., Ltd. : 9%  
소재지 : 일본 시가현 쿠사츠키 노지초-수나이케 2257  
종업원 : 6명  
사업개요 : 세포의료관련제품 판매

### <Nexell사의 개요>

회사명 : Nexell Therapeutics Inc.  
대표자명 : Richard Dunning  
설립 : 1997년  
소재지 : 9 Parker, Irvine, CA 92618-1605, USA  
종업원수 : 약 120명  
사업개요 : 세포의료용 장치 및 소모품 등의 제조판매

## DNA Chip 개발·제조·판매에 대한 권리를 미국 Affymetrix사로부터 취득

TaKaRa Shuzo Co., Ltd.(대표 : Ohmiya Hisashi)의 바이오사업부문은 2000년 9월 5일자로 미국 Affymetrix사(미국 캘리포니아주)로부터 spotting법에 의한 연구용 DNA chip을 전세계에서 개발·제조·판매하는 권리를 취득하였다.

이로써 본사가 1999년 9월이래 일본 국내에서 판매해 오던 DNA chip상품 "IntelliGene™"을 아시아 뿐만 아니라 미국, 유럽을 포함한 전세계에 판매할 수 있게 되었다. 또한 Affymetrix사의 DNA chip 해석시스템(428 Array Scanner)을 전세계에 판매하는 권리도 취득하였다. TaKaRa Shuzo 바이오 사업부문은 일본 최초의 본격적인 DNA chip 개발 회사로서 제약업계를 시작으로 다양한 수요에 대응할 수 있는 다양한 종류의 DNA chip을 개발·판매하여 왔다.

또한 TaKaRa는 1998년 8월에 Genetic Micro System사(GMS 사 : 미국 메사추세츠주)로부터 DNA chip 제작장치와 DNA chip 해석장치의 일본, 한국, 중국 및 타이완에서의 독점적인 판매권을 취득하였다. GMS사는 2000년 2월에 Affymetrix사에 의해 합병되었지만, TaKaRa와의 계약은 Affymetrix사로 이전되어 계속하여 일본, 한국, 중국, 대만에서는 독점적으로 판매하게 된다.

Affymetrix사는 photolithography법이라는 반도체 제조에 이용되는 기술을 기반으로 chip상에서 oligo DNA를 합성하는 방법을 세계에서 처음으로 개발하였다. Affymetrix사는 현재 그 방법으로 제조한 DNA chip 「GeneChip」과 DNA chip 해석시스템을 전세계적으로 판매하고 있는 것으로 유명하다. 한편

당사가 제조 판매하고 있는 DNA chip은 glass 등의 평면기반 상에 여러 종류의 DNA 단편을 다수 spot하여 제조하는 소위, spotting법에 의한 DNA chip이다. 이것은 photolithography법에 의한 DNA chip과는 상이한 chip이다.

그러나 Affymetrix사는 spotting법에 의한 DNA chip 분야를 cover하는 광범한 세계특허권을 보유하고 있다. 당사는 post genome 시대의 유전자 기능해석에 필수적인 기술인 DNA chip사업을 세계적인 규모로 전개하기 위해서는 Affymetrix사의 특허를 받는 것이 불가결하다고 판단하였고 그 결과 세계의 DNA chip업계의 리더인 Affymetrix사와 포괄적인 협력관계를 구축하는 데 이르렀다. 또한 당사의 바이오 그룹이 개발한 획기적인 등온 DNA 증폭법 「ICAN법」과 새로운 DNA chip 제작법을 구사하여 DNA chip 사업을 비약적으로 확대하여, 세계의 DNA chip 산업을 리드하고 있다.

## 미국 Lynx Therapeutics사 와 DNA Microbead Array 기술 제휴

TaKaRa Shuzo Co., Ltd.(사장: Omiya Hisashi)의 바이오사업 부문은 11월 8일(수) Lynx Therapeutics사(미국 캘리포니아주)의 DNA Microbead Array(DMA)와 그와 관련한 기술의 아시아 지역(일본, 중국, 대만, 한국)에 독점 판매하기로 합의하였다. 또 DMA를 응용한 DNA chip의 세계 판매권도 획득하였다. DMA는 기존의 DNA chip인 고정적인 array와 달리 유동적인 각 bead에 DNA가 고정화 된 "DNA 액체 array"로 유전자 발현기능을 분석할 수 있으며 그 외 다양한 기능을 갖는 차세대 DNA array이다.

### Lynx사의 기술

#### Megaclone 기술

미세한 bead(직경 5 $\mu$ m)상에 세포내에서 발현되는 total mRNA와 반응하는 oligonucleotide를 결합하여 각 bead의 표면에 약 10만 copy의 특정 cDNA를 cloning할 수 있다.

#### Megasort 기술

유래가 다른 조직에서 mRNA를 각각 추출하여 형광 표시 cDNA probe를 제조하여 bead상에서 competitive hybridization으로 그 발현량을 flow cytometry를 이용하여 유전자를 분리할 수 있다.

#### MPSS(Massively Parallel Signature Sequence) 기술

Megaclone기술로 제작한 cDNA bead를 평면적으로 충전하여 약 25만개의 bead에 포획된 각 cDNA의 20 염기 정도의 서열을 한번에 결정할 수 있다.

### DNA Chip과 Lynx기술의 관계

일반적인 DNA chip은 기능이나 염기서열이 이미 밝혀진 유전자를 슬라이드에 spotting하거나 결합시켜 만든다. 그러나 Lynx사의 Megaclone기술을 이용하여 cDNA를 포획한 bead를

사용하면 유래가 다른 세포(예를들면, 암세포와 정상세포)간에서 발현량에 영향을 미치는 유전자 즉 암에 관계하는 유전자를 분리할 수 있다. 암 이외의 질병에서도 마찬가지로 각각의 질병에 고유한 유전자를 쉽게 분리할 수 있다.

이와 같이 분리된 유전자군만을 spot하여 실제 암이나 다른 질병을 특이적으로 검출할 수 있어 경제적인 DNA chip을 제작할 수 있다.

### Dragon Genomics의 Genome해석과 Lynx기술

Dragon Genomics는 여러 생물종의 genome을 해석할 계획이지만 생물종간 특히 근연관계에 있는 생물종간의 유전자 비교에 Lynx기술은 유용하여 인간과 침팬지, 벼와 보리, 여러 축산동물간의 비교가 이루어질 것으로 생각된다.

또, MPSS기술을 이용하면 cDNA를 포획한 약 25만개의 bead를 평면상에 충전하여 Microbead array를 만든 후 각 bead의 DNA염기 약 20 염기정도의 서열(Signature Sequence)을 한번에 해독할 수 있다. Genome해석으로 결정된 genome 염기배열 중 유전자를 쉽게 선택 지정할 수 있다.

### Post genome의 기능해석 경쟁과 Lynx기술

DNA chip은 기능과 무관하게 DNA 단편이 "총체적"으로 고정되어 있어, 즉, 그 분석목적에 관계없는 유전자까지 고정되어 있어 기능과약을 목적으로 한 실험에는 사용할 수 없었다. 그러나 Lynx기술은 목적에 맞는 유전자만을 선택할 수 있어 이 기술과 기존의 DNA chip 기술을 같이 사용할 경우 유전자 기능해석에 많은 도움이 될 것이다.

Lynx사는 세계에서는 처음으로 TaKaRa 바이오사업부문에 독점기술을 제공하였으며, 이는 TaKaRa가 미국 Affymetrix사의 DNA chip 세계판매권의 취득, 세계적인 대규모 genome 해석 센터인 Dragon Genomics사 소유 등 차세대 functional genomics에서 TaKaRa의 역할을 인정했기 때문이다. 양사의 제휴는 최적 최강의 고부가가치 DNA chip을 세계에 판매하여 앞으로 유전자 기능해석 경쟁에 있어서 중심적인 역할을 하리라 생각한다.

### 금후계획

Lynx사 서비스 제공과 이용은 2001년 봄으로 예정하고 있다. Lynx사와 제휴는 당사의 유전자 기능해석을 비약적으로 향상시킬 수 있는 계기로 Dragon Genomics Co., Ltd는 유전자 서열해석사업과 DNA chip을 중심으로 하는 발현해석사업의 종합적인 서비스를 제공할 수 있어 향후 고부가가치 DNA chip의 판매는 3년 후 100억원, 5년 후 200억 원의 매출을 기대하고 있다.