



조선대학교 단백질소 재연구센터 (RCPM) 유전자 손상 복구 제어 연구실

유호진 교수, 김미화 연구교수/9766m@hanmail.net

본 연구실은 문화예술과 첨단산업의 메카, 광주 광역시에 위치해 있는, 조선대학교 의과대학내 유전자 손상 복구 제어 연구실이다. 태고의 신비가 고요하게 숨쉬는 무등산 자락에 위치해 있는 조선대학교 내의 본 연구실은 유호진 교수를 중심으로 9명의 교실원들이 밤낮으로 연구에 몰두하고 있다.

본 연구실은 유전자 손상 후 이를 정상화 시키는 유전자 복구 시스템에 대한 연구를 수행하고 있다. 이를 위하여 유전자 손상 후 이를 인지하는 유전자 인지 시스템, 이를 정상화 시키는 유전자 복구 시스템, 복구가 정상적으로 이루어 지지 않았을 때 발생하는 돌연변이 단백질 생성 경로에 관한 연구를 수행하고 있다. 또한 최근에 유전자 손상 복구 단백질들이 유전자 손상 이외에 다양한 세포 내 역할 (apoptosis, adhesion, inflammation, development, etc)을 수행하고 있음을 관찰하여 이 분야에 대한 연구를 또한 본 연구실의 중요한 연구 테마의 하나로 수행되고 있다.

유전자 손상 복구 시스템

유전자의 물리·화학적 구조는 일생 동안의 안정적이나 크게 다음과 같은 세 가지 원인에 의하여 유전자 손상이 초래된다. 첫째, 환경적 요인, 자외선, 이온화 방사선, 수많은 유전적 독성을 가진 화학물질들이 DNA 구조에 변화를 일으키고 이것이 복구되지 않으면 발암 위험성을 높이는 돌연변이를 일으킨다. 둘째, 세포 대사산물. 정상 세포의 대사산물이 내부에서부터 DNA의 영구적 파괴물질을 생성한다. 이는 산소호흡과 지질 대사의 생성물로부터 파생된 활성 산소를 포함한다. 진화과정에서 이를 견제하기 위한 저 분자량의 효소적 분해자로 구성된 항산화 방어 시스템을 구축하였다. 마지막으로 몇몇 화학결합은 물리적 상태 하에서 자연적으로 분리되려는 경향이 있다. 예를 들어 뉴클레오티드의 탈 아민화 반응결과 잘못된 염기가 복제 과정 중에 삽입될 수 있다.

유전자 손상의 결과는 다양하고 주로 세포에 안 좋은 영향을 준다 (그림 1). 단기적으로 대사의 방해나 세포주기의 정지 또는 세포 사멸을 유발하고, 장기적으로는 회복 불가능한 돌연변이를 유발하여 암 발

병 및 노화 촉진을 초래한다. 대다수의 유전자 손상은 전사를 차단하여 전사되는 가닥 중 손상을 가진 모든 유전자를 불활성화 시킨다. 전자가 중단되면 전사-연계 복구 (TCR; transcriptional coupled repair)라는 특정 목적의 복구 시스템이 이를 복구 시키려는 시도를 한다. 지속적인 RNA 합성의 차단으로 인한 전사적 압박 (스트레스)은 항종양 메카니즘인 p53-의존 세포 사멸사를 활성화시켜 세포를 체내에서 제거 시킨다. 세포주기에 관련된 시스템들은 유전자 손상을 인지하여 세포를 G1, S, G2에 정지시켜 그들이 영구적인 돌연변이로 바뀌기 전에 유전자 손상의 회복을 유도한다. 손상은 차단된 전사, 복제 또는 특수화된 센서에 의해 발견된다. 손상이 심하면 세포는 최후의 수단으로 세포 사멸사 프로그램을 개시하여 세포를 희생 시킨다.

다양한 종류의 손상의 관점에서 보면, 단일 복구 과정으로는 모든 종류의 손상에 대처할 수 없다. 대신 진화과정을 통하여 여러 DNA 복구 시스템을 조합하여 세포의 생존에 필수적인 유전적 정보 변화의 대부분을 관리하게 하였다. 이들 경로에 어느 하나라도 유전된 장애가 생기면 악성종양으로 발전하는 경향이 많다. 포유류에서 작동하는 적어도 4가지의 주된 복구 시스템이 있다. 뉴클레오티드 절제 복구 (nucleotide excision repair, NER)는 염기쌍 짝지음을 방해하고 전사와 복제를 차단하는 넓은 범위의 뒤틀린 나선 손상과 관련이 있다. 적은 염기쌍의 화학적 변화는 염기 절제 복구 (base excision repair, BER)에 의하여 복구된다. 따라서 BER은 특히 돌연변이가 발생을 예방하는데 관련이 있다. 대부분의 NER관련 손상은 유전자 밖 (exogenous) 원인에 의해, BER 관련 손상은 유전자 내 (endogenous) 원인에 의해 발생한다. 이들 두 복구 시스템은 하나의 DNA 사슬에 문제가 생기는 경우 이를 복구시키는데, 두 사슬이 영향을 받은 이중 사슬 DNA의 절단 (DSB)은 문제가 더 심각하다. 절단부위를 적절하게 치료하기 위해서 세포는 어떤 말단 부위들이 연결될 부위인지를 알아야 한다. 게놈의 크기가 포유류 정도로 크면 이러한 작업은 더욱 더 어려워진다. DSB를 해결하기 위한 두 가지 방법으로 동형 재조합 (homologous recombination) 과 말단 부착 (end joining)이 있다. 동형 재조합은 S와 G2기를 지배하여 염기서열의 새로운 두 번째 복제

사슬을 만들어내 절단 부위를 연결시킨다. 반면에 말단 부착은 주로 이차 복제가 가능하지 않을 때 G1기와 관련되어 일어난다. 마지막으로 유전자 염기의 mismatch를 정상화 시키는 mismatch repair (MMR)는 DNA중합효소에 의해 잘못 짝지어진 뉴클레오타이드와 복제 또는 재조합 동안 반복되는 염기서열의 미끄러짐 (slippage)에 의한 삽입/제거된 고리를 제거한다. MMR의 결함은 돌연변이 발생률을 급격히 증가시켜 발암과정을 촉진시킨다. MMR의 주요단계는; ① mismatch 염기 부분의 인지 ② 추가적인MMR 요소들의 증가 ③ 오류가 있는 가닥을 찾아내는 신호의 포착 ④ 잘려진 부분의 재형성 등으로 나누어진다.

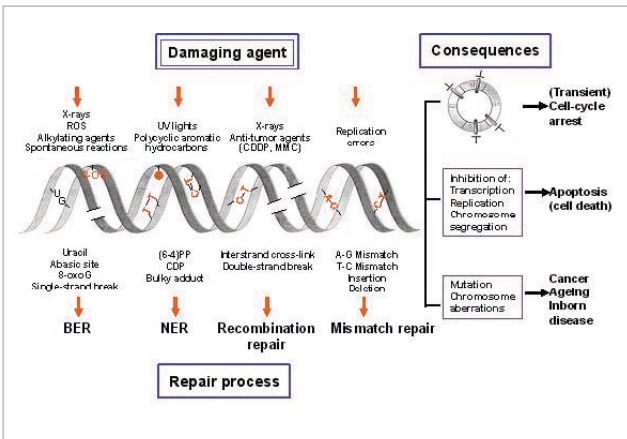


그림 1 유전자 손상, 유전자 복구 시스템, 유전자 손상 후 결과

유전자 손상 복구 시스템과 암 (그림 2)

1. NER 과 암

적어도 3가지 증후군이 신생아의 NER 결함과 관련이 있다. 모두 햇빛에 민감함을 특징으로 하는 색소성 건피증 (XP), 코케인 증후군 (CS), trichothiodystrophy (TTD) 등이 있다. 색소성 건피증은 1000명당 1명 이상 (1000-fold)의 확률로 암이 유발된다. 내부 종양의 빈도가 서서히 증가되면서 신경의 퇴화가 종종 관찰된다. 이러한 이상은 XPA에서 XPG까지의 일곱가지 유전자 중 하나의 돌연변이에 의해 발생한다. CSA나 CSB 유전자의 돌연변이로 인한 코케인 증후군은 TCR-특이 이상으로 색소성 건피증과는 확연한 차이점을 나타낸다. 코케인 증후군은 물리적, 신경학적 발달이 저하되어 난쟁이증과 비미엘린화 (dysmyelination)를 초래한다. 이 증후군은 유전자내 손상과 TCR 손상의 복합적인 작용으로 전사 억제를 초래하여 세포 사멸사가 증가한 것과 관련 있는 특성을 지닌다. TTD는 코케인 증후군과 비슷한 증상을 보이나 그에 더불어 깨지기 쉬운 머리카락, 손·발톱 그리고 비늘같은 피부의 특징을 나타낸다. XPD나 XPB 유전자의 돌연변이는 위 세가지 질병 모두를 일으킬 수 있다. 이러한 조합은

TFIIH의 소단위인 XPB와 XPD가 NER과 전사의 개시라는 두가지 기능을 가지고 있다는 사실로 설명할 수 있다. 거의 모든 NER 요소들은 돌연변이 발생과 밀접한 관련이 있고, 이들 요소가 결핍된 생쥐에서 암 발생 경향은 더욱 두드러지고 심한 노화 촉진 현상이 보인다.

2. BER과 암

유전된 BER 손상으로 인한 인간의 질병은 밝혀지지 않았다. 쥐를 이용한 모델에서 각각의 glycosylase를 차단시킨 것으로는 심한 변화가 발견되지 않았다. 이것은 다른 glycosylase 및 TCR과의 역할 중복 때문으로 생각된다. 그러나 BER 핵심 단백질의 불활성화는 배아의 사망을 유도한다. 이는 BER 과정이 세포 생존 및 발달에 중요한 역할을 수행하고 있음을 시사한다.

3. DSB 수복과 암

모세혈관확장 기능장애 (ataxia telangiectasia)에 덧붙여서 MRE11의 돌연변이는 ataxia telangiectasia-유사 결함을 일으킨다. NBS1의 손상은 Nijmegen breakage syndrome (NBS)와 관련이 있다. 이들 모두에서 암의 전조징후, 면역결핍, 엑스레이에 대한 과민감성과 염색체의 불안정성을 나타낸다. 또한 BRCA1과 BRCA2 결함의 유전은 유방암에 쉽게 걸리게 하는 경향이 크다.

4. Mismatch와 암

비폴립성 대장-직장암 (HNPCC)과 다양한 산발적인 암에서의 mismatch repair (MMR) 결함에 원인이 있다. MMR은 DNA중합효소에 의해 잘못 짝지어진 뉴클레오타이드와 복제 또는 재조합 동안 반복되는 염기서열의 slippage에 의한 삽입/제거된 고리를 제거한다. 이러한 시스템의 결함은 돌연변이 발생률을 급격히 증가시켜 발암과정을 촉진시킨다. hMLH1과 hMSH2의 생식세포 돌연변이는 전체 HNPCC환자의 약 절반을 차지한다.

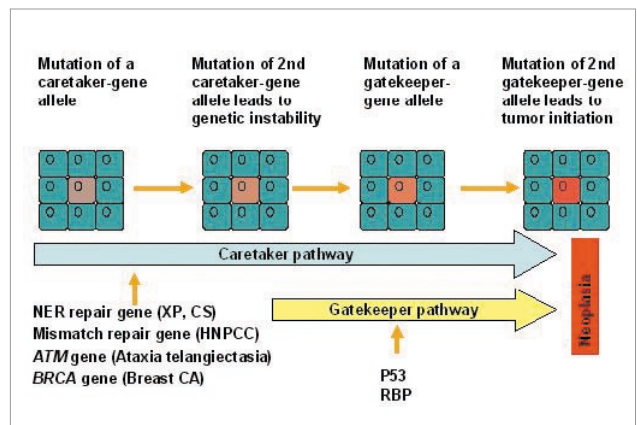


그림 2. 암 발생 과정에 관여하는 유전자 손상 복구 시스템

유전자 손상 복구 조절

최근 포유류의 유전자 손상에 대한 세포반응에는 세포주기 억제와 세포 사멸사 유발뿐만 아니라 유전자 손상 복구 조절이 매우 중요하다는 사실이 밝혀졌다. 유전자 복구 단백질들은 다양한 종류의 유전자 손상을 복구시키기 위한 복잡한 네트워크로 구성되어있다. 이들은 평소 세포 내에 항상 일정한 수준을 유지하지만 유전자 손상이 심한 경우 세포에 존재하는 유전자 복구 단백질만으로는 손상을 정상화하기가 어려우므로, 유전자 손상 감시 체계에 의한 유전자 복구 단백질들의 발현 증가가 요구된다. 예를 들어 p53의 기능이 상실된 세포와 대조세포를 유전자 손상 후 관찰하면, p53 기능상실 세포에서 유전자 손상 후 유전자 손상 복구 속도가 현저하게 감소되어있다. 이는 유전자 복구 단백질의 발현이 유전자 손상 후 유전자 감시 시스템에 의하여 조절된다는 사실을 뒷받침한다. 그러므로 유전자 복구 단백질들은 대부분 정상 상태에서도 어느 정도의 양을 유지하고 있으나 유전자 손상이 발생하면 유전자 손상 감시 시스템에 의하여 발현이 증가될 것으로 생각된다. 유전자 손상 감시 시스템의 가장 중요한 목적은 유전자 손상에 대한 최적의 유전자 복구활성을 유지하여 세포가 자신의 기능을 수행하고 최소한의 유전적인 변이를 지닌 생물체로서 오랫동안 생존할 수 있게 하는 것이다. 따라서 유전자 손상 발생 시 가장 중요한 점은 유전자 손상을 정상화 하기 위한 유전자 손상 감시 시스템에 의한 유전자 복구 단백질들의 조절이다. 그러나 유전자 손상 발생 후 유전자 손상 감시 시스템에 의한 유전자 복구 단백질 조절에 관한 연구는 p53 관련 연구를 제외하고 거의 밝혀진 바 없다. 왜 세포는 유전자 복구를 조절하는가? 유전자 복구 활성도가 항상 일정하다면 유전자 손상 유발물질에 의하여 증가된 유전자 손상은 복구할 수 없게 된다. 따라서 여러 종류의 유전자 손상에 대한 적절한 복구 활성은 세포의 돌연변이를 억제하고 세포 생존을 연장시키는데 필수적이다. 그러므로 유전자 손상이 과도하면 세포는 복구를 통한 세포 생존을 포기하고 세포 사멸을 통하여 부작용 없이 체내에서 제거되는 경로를 선택할 것이다. 과거 10년 동안 유전자 돌연변이를 막기 위하여 유전자 돌연변이 감시 시스템이 세포사멸 및 유전자 복구 시스템을 조절한다는 사실을 밝혀냈다면, 향후 10년은 유전자 손상 시 어떻게 유전자 복구 단백질들이 조절되고, 세포는 생존(유전자 복구 활성 증가 상황)에서 죽음으로 어떻게 변화하는지를 밝히는 일이 중요하다고 하겠다. 최근 본 연구실에서 Ras 발현 세포에서 유전자 복구 활성이 현저하게 증가됨을 관찰하여 유전자 손상 감시 체계에 관여하는 Ras 관련 신호 전달 체계를 규명하였다. 그리고 이후 실험에서 Ras에 의하여 조절되는 단백질을 발견하고 이 단백질이 유전자 손상 감시 체계에 의하여 조절된다는 사실과 이 단백질의 조절 메커니즘을 규명 하였다. 또한 활성산소에 의하여 가장 많이 생성되는 8-hydroxyguanine를 복구 시키는 단백질인 OGG1의 발현이 유전자 손상 물질인 MMS에 의하여 증가되고, 그 조절에 전

사인자인 NF-YA의 활성이 중요함을 규명하였다. 이상 연구 결과들은 유전자 손상에 대한 유전자 손상 복구 단백질들이 유전자 감시 체계에 의하여 조절되는 메커니즘을 규명하는 중요한 단서를 제공할 수 있을 것으로 여겨진다.

유전자 손상 인식 시스템

변형된 DNA 구조를 최초로 인식하는 센서 단백질은 현재까지 완전하게 규명되지 않았다. DNA 사슬이 깨지면 활성화되는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 와 DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)가 유전자 손상에 대한 센서 역할을 수행 할 것으로 오랫동안 생각되어 왔었다. 그러나 최근 연구에 의하면 PARP 와 DNA-PK는 전체적인 유전자 손상을 인식하는 센서의 역할을 수행하지 못하고 극히 일부에 대해서만 반응한다는 사실이 밝혀졌다. 한편 최근 센서 가능성이 있는 단백질이 효모에서 발견되었다. 이 단백질 중 Rad1 과 Rad2는 사람 PCNA, 또 다른 단백질인 Rad17은 RFC (replication factor C) 와 유사성을 지니고 있다. RFC는 복제가 진행되는 동안 DNA 사슬에 DNA 중합효소를 결합시키기 위하여 PCNA 와 복합체를 형성하고, 이 복합체는 유전자를 합성하는 동안 복제 체크시스템으로서의 기능을 수행하는데, 이 복합체가 형성되지 못하면 유전자복제 체크시스템의 심각한 결함이 초래된다. 하지만 이 복합체 역시 복제이외의 다양한 종류의 유전자 손상에 대한 센서 역할은 하지 못하는 것으로 밝혀졌다. 유전자 손상 센서 역할을 할 가능성이 있는 또 다른 단백질로는 유방암 단백질인 BRCA1이 있다. BRCA1의 기능이 사라질 경우 유전자 손상 체크 시스템에 문제를 유발하여 G2에서 세포주기가 정지되지 못한다. BRCA1은 ATM, RAD50 complex (Nbs1-MRE11-RAD50), mismatch 단백질 (MSH2/6 및 MLH2) 그리고 Bloom's hilicas (BLM)와 함께 거대한 BASC (BRCA-associated genome surveillance complex) 복합체를 형성한다. 만약 이 복합체가 유전자 손상을 인식하는 센서의 역할을 수행한다면 이들은 유전자 손상을 인식한 후 BASC복합체 내에 존재하는 유전자손상 전달자인 BRCA1 또는 ATM에 신호를 직접 전달할 것으로 생각된다. 하지만 이 거대한 복합체가 항상 핵 내에 존재하여 다양한 종류의 유전자 손상을 인지할 수 있는 능력이 있는지에 대해서 많은 의문점이 존재한다. 만약 위에서 언급한 단백질들이 실제 유전자 손상을 인식하는 센서가 아니라면 진정한 유전자 손상 센서는 무엇일까? 한가지 가능성은 유전자 복구를 담당하는 단백질이 유전자 손상을 감지하는 센서로 작용한다는 것이다. 본 실험실의 연구결과 유전자 염기의 비정상적인 쌍을 제거하는 유전자 손상 감시 체계의 활성이 저하된 경우 유전자 손상 유발물질에 의하여 c-Abi를 포함한 유전자손상 반응과 관련된 중요 단백질의 인산화가 억제된다는 사실을 관찰하였다. 또한 유전자내 비정상적인 염기를 정상화 시키는 hogg1 및 nth1의 발현에 의하여 유전자 손상 물질에 의한 세포손

상 반응 단백질들의 인산화가 대조군에 비하여 현저하게 억제된다는 사실을 관찰하였다. 이 같은 연구 결과는 유전자 손상을 억제하는 복구 단백질 자체가 유전자손상을 인식하여 일련의 유전자손상 반응을 개시하는 센서 역할을 할 가능성이 있음을 시사한다. 이 모델의 가장 큰 장점은 수많은 유전자 손상을 인식하는 센서 단백질이 따로 존재하지 않고 유전자 손상을 복구시키는 복구 단백질이 센서로 작용하기 때문에 비교적 단순한 시스템에 의하여 조절이 가능하다는 것이다. 하지만 유전자손상 물질이 다양한 종류의 유전자 손상을 유발하면 이를 복구시키는 다양한 종류의 유전자 복구 시스템이 센서로서 활성화 되어야 하는 아주 복잡한 상황이 초래될 수 있다. 결론적으로 유전자 손상을 인식하는 센서는 적어도 현재까지 생각한 것보다 훨씬 더 복잡하고 그 숫자도 훨씬 많을 것으로 생각된다. 본 연구실에서는 유전자 손상 감시 체계의 핵심이라 할 수 있는 유전자 손상 인지 센서를 찾기 위한 연구의 일환으로 유전자 손상에 대한 체내 복구시스템이 유전자 손상을 인식하는 센서 역할을 수행하는지를 규명하고 있다.

전사돌연변이

지금까지 알려져 있는 DNA 변성에 의한 변성 단백질의 생성에 대한 일반적인 이론은 먼저 방사능 및 유해한 자극등에 의하여 DNA변성이 유발되고 이렇게 생성된 DNA 변성이 복제 과정 중에 잘못된 DNA를 만든 후 전사와 번역과정을 통하여 변성 단백질이 만들어지는 것이다. 예를 들어 guanine이 유해산소의 공격을 받아 8-oxoguanine으로 변한 후 복제가 발생하면 DNA 중합 효소는 8-oxoguanine과 쌍을 이루는 DNA에 cytosine대신 adenine을 첨가하여 결국 DNA는 GC에서 TA로 변화 된다. 그 후 이 부위에서 전사가 일어 나면 변성된 단백질이 생성된다. 이렇게 생성된 변성 단백질이 세포 내에서 여러 가지 해로운 작용을 할 수 있다. 하지만 이러한 경로를 통한 변성단백 생성과정으로는 설명하지 못하는 사실이 최근에 발표 되었다. 1998년 유럽 연구팀은 수년에 걸쳐 알츠하이머씨병 (Alzheimer's disease)과 다운신드롬 (down syndrom) 환자를 조사 한 결과 이 질환을 일으키는 것으로 생각되는 β -아밀로이드 전구물질과 ubiquitin-B의 변성 단백질을 가지고 있는 환자의 40% 에서 DNA유전자가 정상임을 발견하고 이를 발표 하였다. DNA 손상 후 DNA복제를 통하여 DNA 돌연변이가 초래되고 그 결과 돌연변이 단백질이 생성되는 경로는 유전질환을 발생시키는 매우 중요한 경로이지만 신경계와 같이 분열을 하지 못하거나 세포 분열이 왕성하지 않는 조직에서 암 발생을 설명하지 못한다 (그림 3 참조). 그러나 많은 종류의 암은 분열하지 않는 세포나 분열이 정지되어있는 세포에서 발생함. 따라서 암 발생을 유발하는 돌연변이 단백질 생성경로에 DNA 복제를 경유하지 않는 돌연변이 단백질 생성 경로가 존재 할 가능성이 있다. 새로운 돌연변이 단백질 생성경로를

찾고자 하는 연구의 일환으로 본 실험실에서는 손상된 DNA염기로부터 복제를 통하지 않고 전사과정을 통하여 직접 돌연변이 RNA가 발생하여 돌연변이 단백질이 생성 될 가능성에 대한 연구를 진행하고 있다.

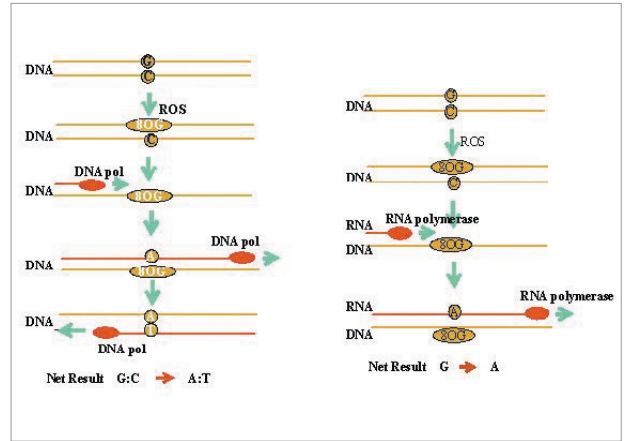


그림 3 산소 라디칼에 의한 8-oxoguanine 생성 후 복제 과정을 통한 돌연변이 단백질 (왼쪽)경로와 전사과정을 통한 돌연변이 단백질 생성 과정 (오른쪽) 비교

