

크리스퍼 카스 스페이서 획득의 분자적인 메커니즘

김 승 진

포항공과대학교 화학공학과
E-mail: kk1085@postech.ac.kr

요약문

많은 박테리아와 고세균은 외래 DNA의 작은 조각을 그들의 크리스퍼 좌위(loci)에 포함시키는 능력을 가지고 있고 해당 DNA 조각을 '스페이서'라고 부른다. 이들이 크리스퍼 RNA (crRNAs)로 전사되면 카스 핵산 분해효소가 상보적인 핵산을 분해하도록 안내하는 역할을 하고 이러한 과정을 '크리스퍼-카스 면역 반응'이라 한다. 이 논문에서는 스페이서를 획득하는 분자적인 메커니즘의 진보된 연구와 새롭게 얻은 스페이서로부터 최적의 면역까지의 연결을 밝혀낸 연구를 소개한다. 마지막으로 스페이서 획득 연구의 잠재적인 중요성과 응용의 효과를 논의한다.

Key Words: CRISPR

본 자료는 Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 7-12 (2019)의 논문을 한글로 번역, 요약한 자료입니다.

목 차

1. 도입
2. 본문
 - 2.1. 새로운 스페이서의 연결
 - 2.1.1. 카스1-카스2 인테그레이즈(integrase)
 - 2.1.2. 새로운 스페이서의 위치 특이적인 연결
 - 2.2. 프로토스페이서 포획
 - 2.2.1. 외래 핵산의 식별
 - 2.2.2. 기능적 표적의 선택
 - 2.2.3. 프라임드(primed) 스페이서 획득
3. 결론 및 전망

1. 도입

박테리아와 고세균은 외래 핵산에 자주 노출된다. 이것은 항생제 저항성 유전자를 가지는 플라스미드나 용원성 파지(Temperate phage)의 병독성 인자처럼 그들에게 유익한 유전 물질을 얻을 수 있게도 할 수 있지만, 트랜스포존이나 독성 파지처럼 그들에게 해로운 유전 물질을 얻게 할 수도 있다. 이러한 이득과 위험 사이의 균형을 맞추기 위하여 박테리아와 고세균은 세포로 들어오는 핵산을 점검하는 여러 경로를 진화 시켜 왔다.

크리스퍼와 카스 유전자는 들어오는 핵산을 제한하는 하나의 메커니즘이다. 크리스퍼-카스 시스템은 크리스퍼 좌위의 리핏(Repeat) 서열 사이에 외래 유전자의 작은 조각을 포함시킨다 (그림 1a). 약 45%의 박테리아와 85%의 고세균에서 발견되는 크리스퍼 시스템은 카스 유전자에 따라 2가지 클래스, 6가지 타입, 20가지 서브타입으로 분류된다. 6가지 타입은 각각 다른 외래 핵산 분해 복합체를 사용한다. 타입 I, II, V 시스템은 DNA를, 타입 VI 시스템은 RNA를, 타입 III 시스템은 RNA와 DNA 모두를 표적으로 한다(타입 IV 시스템은 아직 실험적으로 특정화되지 않았다). 이와는 다르게 스페이서 획득에 사용되는 카스1과 카스2는 각각의 타입 내에서 보존된다. 스페이서 획득에는 외래 유전자에서 스페이서를 포획하는 단계('프로토스페이서'라고 불림)와 스페이서를 크리스퍼 좌위에 연결시키는 단계로 나눌 수 있다. 첫 번째 단계에서는 외래 유전자에서 프로토스페이서를 선택하고, 두 번째 단계에서 몇 가지 과정을 거쳐 스페이서를 크리스퍼 좌위로 연결한다. 최근 연구에서 스페이서 획득의 분자적 메커니즘과 서로 다른 크리스퍼 타입의 표적화 메커니즘의 관계를 밝혔다. 이 논문은 현재 스페이서 획득 모델을 검토하고, 기본적인 과학 연구와 응용 측면에서의 미래에 대한 논의를 담았다.

2. 본문

2.1. 새로운 스페이서의 연결

2.1.1. 카스1-카스2 인테그레이즈(integrase)

카스1은 6가지 크리스퍼 타입들에서 보존되는 단백질이다. 카스1은 트랜스포존 클래스의 핵심 효소로 진화하여 크리스퍼-카스 면역 시스템의 기초를 형성하게 된 것으로 보고 있다. 카스1은 카스2와 상호작용하여 스페이서 인테그레이즈의 역할을 하는 복합체를 형성한다. 이중 육합체 $[(\text{카스1}_2\text{-카스2})_2]$ 는 2개의 분리된 DNA에 결합하는 영역, 1개의 프로토스페이서에 결합하는 영역과 1개의 크리스퍼 어레이(CRISPR array)에 결합하는 영역이 있다. 카스1-카스2 복합체에 스페이서가 붙으면 2 번의 핵산 절단-연결 반응을 수행한다. 처음에는 크리스퍼 어레이의 첫 번째 리핏(Repeat)의 리더(Leader)끝에서 진행되고 다음으로는 리핏의 스페이서 끝에서 진행된다 (그림 1a). 이 반응에서 프로토스페이서의 각 3'-OH 말단은 리핏 DNA의 끝에 친핵성 공격을 수행한다. 이 반응의 생성물은 이중 가닥 DNA인 프로토스페이서와 단일 가닥 DNA인 리핏 서열이 연결된 중간체가 생성된다. 단일 가닥 DNA의 틈은 DNA 중합 효소로 채워지고 연결되는 것으로 예상된다. 이를 통해 스페이서의 삽입과 리핏의 복제가 동시에 일어난다.

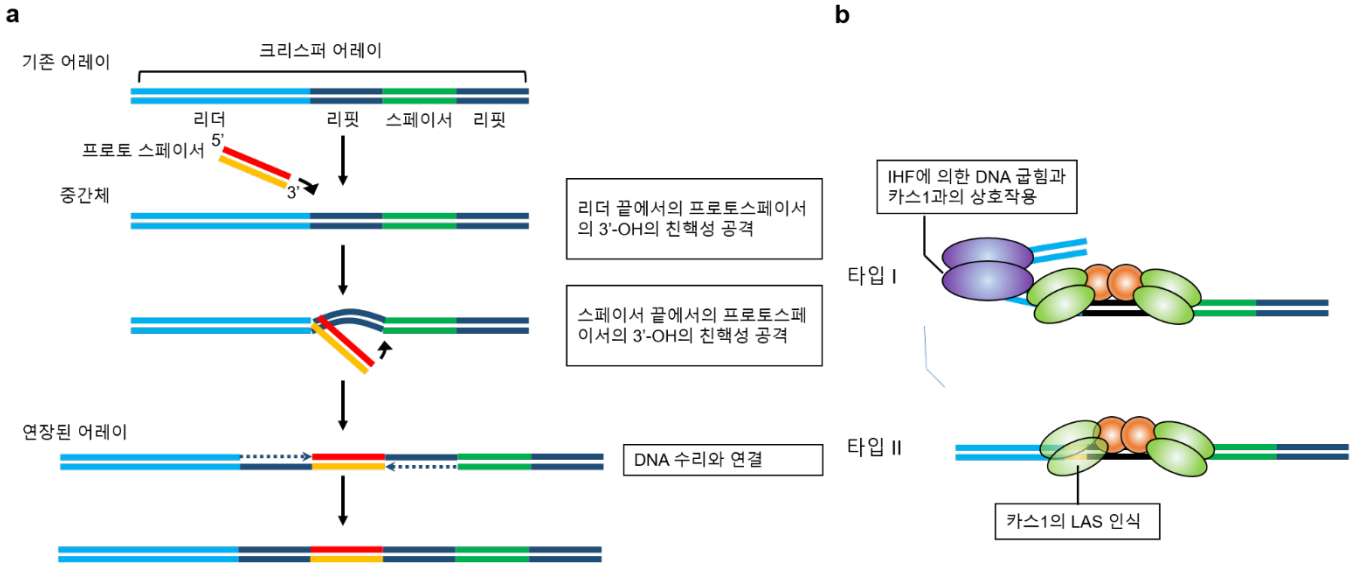


그림 1. 크리스퍼 좌위에 새로운 스페이서의 연결.

2.1.2. 새로운 스페이서의 위치 특이적인 연결

카스1-카스2 복합체는 크리스퍼 어레이의 리더 끝에만 새로운 스페이서를 연결한다. 따라서 크리스퍼 좌위는 과거의 감염에 대한 분자적인 화석 기록에 비유될 수 있다. 가장 최신의 기록은 리더 끝에 위치하고, 가장 예전의 기록은 트레일러 끝에 위치한다. 크리스퍼 시스템은 스페이서를 연대 순서로 기록하기 때문에 리더 쪽의 스페이서를 하류의 스페이서보다 더 활성화하는 것으로 가장 최근의 침입자에 대한 면역 반응을 최적화할 수 있다. 이 현상은 여러 크리스퍼 타입에서 공통적으로 확인되는데, 크리스퍼 어레이 내의 여러 스페이서에 대하여 크리스퍼 RNA 발현양이 서로 다른 것을 통해 알 수 있다. 화농성연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*) 타입 II-A 시스템에 대한 한 연구에서는 같은 서열의 스페이서가 어레이 내에서 첫 번째인지 다섯 번째인지 그 위치에 따라 2 배의 크리스퍼 RNA 양의 차이가 관찰되었다.

몇 가지 메커니즘들은 크리스퍼 어레이 하류의 예전의 기록을 재활성화하기도 한다. 스페이서의 결실은 연구실이나 자연에서 자주 관찰되어왔다. 화농성연쇄상구균에 대한 연구에서는 파지 감염 중에 4개의 스페이서가 결실되며 다섯 번째의 스페이서가 첫 번째 위치로 이동하는 일이 높은 확률로 선택되었다. 다른 연구는 스페이서 서열 내부의 프로모터로 인해 하류의 크리스퍼 RNA의 발현을 높일 수 있다고 밝혔다. 하류의 크리스퍼 RNA는 완전한 면역은 제공할 수 없지만, primed immune response는 가능할 수 있다.

크리스퍼 타입에 따라 새로운 스페이서를 얻는 방식이 다르다 (그림 1b). 타입 I 크리스퍼 시스템은 카스1의 알파 나선은 리더 서열의 3' 말단의 minor groove에 서열 특이적인 접촉을 하도록 하지만, 이것은 리더 끝에만 특이적으로 스페이서를 추가하기에 충분하지 않다. 숙주 유전체에 암호화된 다른 인자가 위치 특이적인 연결을 위해 필요할 수 있다. 타입 I-E와 타입 I-F 시스템에서는 세포 외 한 방향으로(polarized)의 스페이서 연결과 세포 내 스페이서 획득에 IHF

(integration host factor)가 필요하다. 타입 I 리더들은 보존되는 IHF 결합 부위를 포함하고 이 결합은 크리스퍼 어레이 DNA의 꺾임(distortion)을 유발한다 (그림 1b). 이것은 특히 첫 번째 리핏이 카스1-카스2 인테그레이즈의 이상적인 기질이 되도록 만들어준다. 추가적으로 카스1-카스2 인테그레이즈는 IHF가 유도한 DNA 굽힘으로 인해서 IHF와 리더의 상류 서열과 접촉한다. 이러한 메커니즘은 IHF와 유사한 것이 없는 그람 양성세균에서 발견되는 타입 I 크리스퍼 시스템에 대한 의문을 남긴다. HU나 H-NS와 같은 다른 DNA를 굽히는 단백질이 이 역할을 대신 수행할 수도 있다. 실제로 IHF가 없는 고세균 타입 I-A 시스템은 아직 밝혀지지 않은 숙주의 인자들을 통해 리더 특이적인 스페이서 연결을 나타낸다.

그람 양성 균에서 주로 발견되는 타입 II 크리스퍼 시스템도 한 방향으로 스페이서 연결한다. 타입 I 시스템과 다르게 타입 II 카스1-카스2 복합체는 추가적인 숙주의 인자가 없이도 가능하다 (그림 1b). 타입 I 시스템과 유사하게 타입 II 카스1의 알파 나선은 리더 DNA의 minor groove에 서열 특이적 접촉을 한다(타입 II의 경우 '리더 고정 서열(leader anchoring sequence (LAS))'라고 부른다). 리더 고정 서열과 카스1 사이의 추가적인 안정화된 접촉으로 인해 리더 반복 접합에 절단-연결 반응의 동역학이 개선되었기 때문에 숙주의 인자가 없어도 가능하다. 두 번째 절단-연결 반응이 스페이서 반복 접합에서 일어나기 때문에, 목표 기질은 다양하며, 반응을 촉매하는 카스1의 LAS와 작용하는 도메인이 유연해야 한다. 대부분은 이 유연성 때문에 적절한 LAS가 없으면 타입 II 크리스퍼 시스템에서는 어레이 중간에 새로운 스페이서가 연결되기도 한다(ectopic spacer integration).

2.2. 프로토스페이서 포획

2.2.1. 외래 핵산의 식별

크리스퍼 시스템은 숙주 자신의 유전체를 표적으로 하는 스페이서를 모을 수도 있다. 그렇게 되면 자가면역과 세포 사멸이 일어날 수 있다. 이러한 일을 막기 위하여, 크리스퍼 시스템은 외래 유전 요소에 대해 편향된 스페이서 획득의 다양한 메커니즘이 있다.

크리스퍼 시스템들은 DNA 복구에 사용되는 도구를 사용한다(그람음성 유기체는 RecBCD, 그람양성 유기체는 AddAB). RecBCD는 이중 가닥 DNA의 끝에 붙어 상동 재조합을 하는 중에, 스페이서를 획득을 활발하게 한다. 8개의 뉴클레오타이드 서열인 *chi* 구역은 RecBCD의 활성을 늦추는데, 숙주의 유전체에는 이러한 *chi* 구역이 파지나 플라스미드의 유전체보다 14배 많아 숙주 자신의 유전체를 스페이서로 획득하는 것을 제한한다. 또한 숙주의 유전체는 원형으로 DNA의 말단이 없으므로 이중 가닥 DNA 말단에 붙는 RecBCD에 의한 스페이서 획득이 제한된다 (그림 2a). RecBCD가 효율적인 스페이서 획득에 중요하지만, 분해 산물은 단일 가닥 DNA 조각인 것으로 보고된다. *In vitro* 스페이서 연결 연구에서 이중가닥 DNA 프로토스페이서가 단일가닥 DNA 보다 크게 선호되는 것을 보였다. RecBCD의 분해 산물이 스페이서 연결에 어떻게 사용되는지는 아직 알려지지 않았다. 카스1-카스2가 물리적으로 RecBCD와 접촉하여 분해산물을 받을 수도 있다. RecBCD나 AddAB 없이도 스페이서 획득이 일어나기 때문에, 스페이서를 만드는 다른 대안적인 방법이 있을 수 있다.

크리스퍼 시스템이 자가면역을 피하기 위하여 스페이서 획득의 속도를 제한하는 쪽으로 진화되었다는 증거도 있다. 실험실 내에서 새로운 스페이서의 성공적인 획득은 굉장히 드물다 (10⁷ 개의 세포 중에 1 개). 스페이서 획득이 세포에게 주는 비용도 적다. 그러나 스페이서 획득 속도를 높은 돌연변이는 높은 독성을 가지는 것을 확인하였고, 이는 스페이서 획득이 진화적으로 자가면역으로부터의 보호와 균형을 이루도록 조정되었음을 시사한다. 실제로 퀴럼센싱으로 크리스퍼의 활성이 조절되는 박테리아가 최소 2 종이 있다.

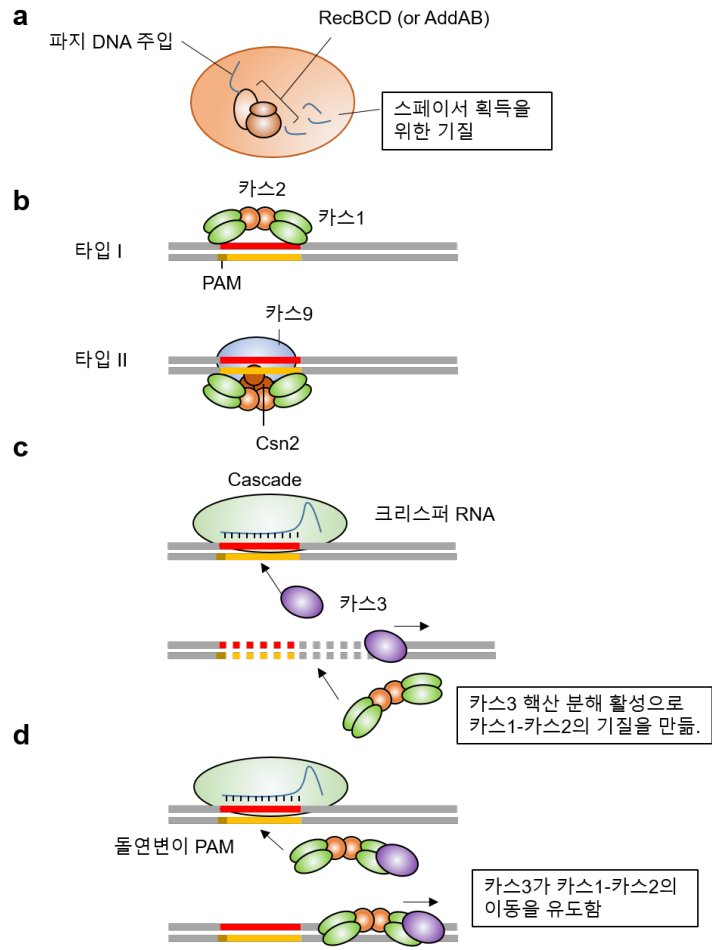


그림 2. 프로토스페이서의 선택.

2.2.2. 기능적 표적의 선택

타입에 따른 특정 표적의 요구사항 때문에, 외래 유전체의 일부 서열만이 기능적인 스페이서가 될 수 있다. 타입 I, II에서는 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)는 타겟의 절단과 크리스퍼 어레이 내에서 스페이서 서열의 절단 방지를 위해 필요하다. 타입 III는 주변 서열 요구사항은 더 유연하지만, 전사가 되어야만 한다. 기능적인 면역 반응을 하기 위해, 크리스퍼 시스템은 알맞은 PAM 옆이거나 잘 전사되는 프로토스페이서를 골라야 한다.

타입 I, II에서는 스페이서 획득 도구가 기능적인 PAMs를 우선적으로 샘플링한다 (그림 2b). 타입 I-E에서는 카스1-카스2 복합체가 PAM에 직접적이고 서열 특이적으로 상호작용하여 PAM 주변의 프로토스페이서를 획득하는 성향이 있다. 대조적으로, 타입 II 카스1-카스2 복합체는 PAM에 대한 선택성을 보이지 않는다. 대신에 PAM에 작용하는 카스9에 의해 PAM 특이적인 스페이서 획득이 이루어진다. 최근 카스4가 다른 타입 I 시스템에서 PAM 편향적인 프로토스페이서 획득에 관여하는 것이 밝혀졌다. 전사 의존적인 타입 III 크리스퍼 시스템은 실험적으로 스페이서 획득이 관찰되지 않았다. 타입 III 시스템의 일부는 역전사효소-카스1의 융합 단백질이 나타났다. 실제로 유전체의 전사된 부분을 주로 스페이서로 획득함이 관찰되었다. 정확한 메커니즘은 명확하지 않지만, 역전사효소-카스1 융합 단백질이 RNA 전사체로부터 직접적으로 새로운 스페이서를 획득하는 것을 입증하였다.

2.2.3. 프라임드(primed) 스페이서 획득

이미 존재하는 스페이서는 서열 의존적인 방식으로 스페이서 획득의 속도를 향상시킬 수 있다. 이는 돌연변이된 파지나, 스페이서나 PAM에 점 돌연변이가 생긴 관련된 파지처럼 완벽하게 일치하는 스페이서나 일부 일치하는 스페이서에 대한 스페이서 획득을 빠르게 한다. 따라서 한 번 숙주가 한 파지에 대해 스페이서를 획득하면 파지 유전체의 표적 근처에서 추가로 스페이서를 획득할 가능성을 높인다.

이는 아직까지 가장 연구된 타입 I 크리스퍼-카스 시스템에서만 관찰되었다. 스페이서 획득 도구와 간섭(interference) 도구의 밀접한 연관성과 상호작용이 이러한 피드포워드를 만든다. 이 연관성은 타입 I-F 시스템에서 카스2-카스3 융합 단백질처럼 간섭 유전자들과 스페이서 획득 유전자들의 융합 단백질의 존재에 의해 더 강조된다. 타입 I-E 표적화 중에, 크리스퍼 RNA에 의해 유도된 크리스퍼 복합체(Cascade)는 PAM 의존적인 방식으로 외래 표적을 붙고, 핵산 분해효소인 카스3을 모집하여 표적을 분해한다. 이러한 카스3의 핵산 분해와 헬리케이스(helicase) 활성화는 스페이서 후보들을 생성하는 역할도 한다 (그림 2c). 적절한 PAM이 없어도 Cascade은 표적에 붙고, 카스1-카스2 의존적인 방식으로 카스3를 불러올 수 있다. 이러한 맥락에서 카스3의 핵산 분해 도메인은 비활성이고, 헬리케이스 활성이 주변 DNA를 따라 카스1-카스2를 움직여 인테그레이즈 복합체에 의한 프라임드 스페이서 획득을 유도하는 것으로 보인다 (그림 2d).

프라임드 스페이서 획득은 유기체가 빠르게 진화하는 파지 집단으로부터 스스로를 방어할 수 있게 한다. 또한 이는 숙주 자신의 DNA보다 외래 DNA 위주로 스페이서를 획득하는 메커니즘 일 수 있다. 그러나 만약 숙주 유전체에서 스페이서를 획득하면 자가 면역을 유발할 수 있다. 크리스퍼 시스템은 이러한 균형을 맞춰야 한다. 다른 크리스퍼 타입에서도 이러한 현상이 일어나는지 확인해야 한다. Cascade와 카스3 사이의 상호작용과 유사하게 카스9은 카스1-카스2 인테그레이즈와 작용하는 것을 확인하였고, 이는 타입 II에서도 프라임드 스페이서 획득이 일어날 수 있다는 근거가 될 수 있다. 이와 대조적으로 타입 III 시스템의 경우, 크리스퍼 RNA와 표적 서열 간의 불일치가 존재하더라도 면역이 사라지지 않으므로 유사한 프라임드 스페이서 획득은 발생하지 않을 것이다.

3. 결론 및 전망

박테리아와 고세균에서 적응 면역의 형태로 크리스퍼의 기능이 밝혀진 지 10년이 지나고, 우리는 분자적 메커니즘을 빠르게 알아가고 있다. 유전적, 생화학적, 구조적인 접근법을 통해 외래 유전체에서 스페이서를 선택하고 크리스퍼 어레이의 첫 리핏에 절단-연결되는 반응까지에 대한 통찰력을 얻었다. 그러나 프로토 스페이서를 붙잡고 스페이서 연결에 대해서는 아직 지식이 부족한 부분이 있다. RecBCD와 AddAB의 스페이서 획득을 위한 기질 생성 메커니즘은 대부분 알려지지 않았다. 또한 프로토 스페이서가 어떤 종류의 과정을 거치는지, 어떻게 스페이서 크기가 조절되는지도 알려지지 않았다.

스페이서 획득이 원핵 생물의 다른 측면에 어떻게 영향을 미치는지를 배우는 것도 흥미로운 것이다. 세포 생물학적 관점에서, 생태학적 관점에서 스페이서 획득이 서로 다른 환경에서 발생하는 정도의 차이는 탐구되어야 하며 이는 메타 유전체 연구는 스페이서 획득 및 크리스퍼 면역이 자연의 원핵 생물 집단의 진화에 어떻게 영향을 미치는 지 이해하는 데 도움이 될 것이다.

스페이서 획득 도구들은 기술적인 응용을 위해 용도가 변경되기 시작했다. 카스9은 직접 유전체 편집에 사용되지만, 카스1-카스2은 합성 분자 기록기로 용도가 변경되었다. 이것은 박테리아 집단의 유전체에 디지털 정보를 저장하는 데 사용될 수 있다. 또한 박테리아 집단이 처한 환경적 신호를 기록하는 대체 기술이 개발되었다. 그러나 이런 기술의 기능을 제한하는 몇 가지 요소가 있다. 스페이서 획득의 빈도가 낮아 단일 세포 내에서 믿을만한 기록을 할 수 없다. 따라서 지금의 기술은 많은 수의 세포에 대한 심층 시퀀싱을 사용한다. 하이퍼-카스9은 스페이서 획득이나 기술적 응용 분야에서 스페이서 획득의 속도를 높일 수 있다.

정보 저장은 모든 생물학적 시스템의 기본적인 것이다. 크리스퍼는 독특한 형태로 생물학적 기억을 구성하여 박테리아와 고세균에게 유전이 가능한 적응성 면역을 제공한다. 크리스퍼의 생물학과 스페이서 획득에 대한 연구는 이후에 생물학적 메모리, 원핵 진화 및 숙주와 병원체의 상호작용에 대한 이해를 향상시킬 것이다.

The views and opinions expressed by its writers do not necessarily reflect those of the Biological Research Information Center.

김승진(2020). 크리스퍼 카스 스페이서 획득의 분자적인 메커니즘. BRIC View 2020-R42
Available from <https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=3654> (Dec. 17, 2020)

Email: member@ibric.org