

CRISPR 이후 개발되는 염기 편집 도구들

한 승 엽

Baylor College of Medicine
E-mail: seungyeop84@gmail.com

요약문

CRISPR-Cas9의 등장은 생명과학 연구와 의학뿐만 아니라, 유전공학에 이르기까지 많은 변화들을 가져왔다. 단순한 유전자 편집 도구로서의 기능뿐만 아니라, 다양한 활용으로 많은 연구들이 진행되고 있다. 현재 활발하게 이루어지고 있는 CRISPR-Cas9의 정확도와 활용도를 높이기 위한 노력과 CRISPR-Cas9를 대체 혹은 보완하기 위한 연구들에 대해 알아보고, 앞으로 염기편집 도구가 발전해야 할 방향에 대해서 알아보하고자 한다.

Key Words: CRISPR, CAS9, sgRNA, 염기 편집, 유전자 조작

목 차

1. 서론
2. 본론
 - 2.1. 유전자 조작의 기본 원리
 - 2.1.1. DSB 이후 HDR 과 NHEJ
 - 2.2. CRISPR 이전의 유전자 조작법과 CRISPR 의 등장
 - 2.2.1. ZFNs, TALENs attach Fok I 그리고 Meganucleases
 - 2.2.2. CRISPR 의 원리와 한계
 - 2.3. CRISPR 이후의 개발되는 염기 편집 도구들
 - 2.3.1 CRISPR 의 재설계
 - 2.3.2. 발전된 형태의 CRISPR 의 응용
 - 2.3.3. CRISPR 이후 개발되는 염기 편집 도구들-CRISPR 를 넘어서려는 시도들
3. 결론
4. 참고문헌

1. 서론

바이러스의 침입에 대한 박테리아의 면역 시스템으로 알려져 있던 CRISPR-Cas9 시스템은 빠른 속도로, 여러 분야에 걸쳐 없어서는 안 될 도구가 되었다 [1]. Cas9이라는 뉴클리아제에 의한 염기 편집 도구 시스템인 CRISPR-Cas9은 현재 의학 연구 및 치료 [2, 3], 유전 공학 및 농업의 다양한 분야에서 중요한 역할을 수행하고 있다 [4, 5]. 특히나, CRISPR-Cas9은 더 이상 단순한 유전자 편집 도구를 넘어서, 변형된 Cas9들을 이용한 응용은 유전자 발현의 조절, 유전체의 후성유전학적 편집, 염색체 분석 및 이미징과 같은 유전 공학에까지 이뤄지고 있다 [6]. 이 동향리포트에서는 CRISPR-Cas9 이전의 유전자 편집 도구의 간략한 역사와 기작을 제시하고, 두 부분으로 나누어 CRISPR-Cas9을 업그레이드한 유전체 도구들의 현황 및 CRISPR 이후에 개발되고 있는 염기 편집 도구들에 대해 설명한다.

2. 본론

2.1. 유전자 조작의 기본 원리

진핵생물의 유전체는 수십억 개의 DNA 염기로 이루어진 유전정보로 구성되어 있다. 이러한 유전정보의 인위적인 편집은 오랫동안 분자생물학에서 추구해온 목표 중 하나이다. 정확하게 우리가 원하는 위치에서 DNA 염기를 변경하는 것은 분자생물학의 연구에서만 아니라 의학 및 생명 공학에서의 응용에 있어서도 중요한 역할을 한다. 유전자 변이-절삭, 삽입에 관한 연구는 유전학 연구에서 많은 진전이 이루어져 있지만, 정교한 염기 서열 단위의 편집은 현재까지도 진행 중에 있다. 현재까지 주로 사용되는 염기 서열의 편집은 진화적으로 잘 보존이 되어 있는 상동 재조합(homologous recombination)이라는 과정을 통해 이루어진다 [7, 8]. 그러나, 상동 재조합 방법의 경우 낮은 유전체 통합 속도와 효율성, 세포에 따른 특이성이 존재하고, 특히 무작위적으로 표적 염기 서열 이외에 다른 유전체가 통합되는 것과 같은 여러 한계가 있다.

2.1.1. DSB 이후 HDR과 NHEJ

이러한 상동재조합에 의존한 게놈 편집의 한계는 표적 염기 부위에 이중 가닥 파손(DSB)을 의도적으로 도입하면 표적 유전자 통합의 빈도가 수십 배 증가한다는 점이 연구되었고, 편집 효율성을 늘릴 수 있는 길이 열리게 되었다 [9]. 또한 메가뉴클레아제(Meganuclease)라 불리는 14-40bp의 DNA의 긴 특정 염기서열을 인식하는 엔도뉴클레아제(endonuclease)의 발견과 더불어 유전자 편집 효율을 증가시킬 수 있었다 [10]. 여러 생명체에서 발견된 다양한 염기 서열을 인식하는 여러 가지 메가뉴클레아제의 등장에도 불구하고, 각각의 메가뉴클레아제는 고유한 인식 서열이 있기 때문에, 원하는 특정 유전자 위치를 표적으로 하는 메가뉴클레아제를 찾을 확률은 아주 낮았다 [9, 11, 12]. 또한, 엔도뉴클레아제로 유도된 DSB의 경우 오류가 발생하기 쉬운 비상동 말단

연결(NHEJ, Non-homologous end joining) DNA 복구 메커니즘을 통해 복구가 된다는 점 역시 염기서열 편집에 제한을 주게 된다 (그림 1). 이로 인하여, 도입하려 하는 DNA 주형이 DSB에 효과적으로 통합되지 않을 뿐만 아니라, 비상동 말단 접합복구 메커니즘이 파손 부위에서 예상치 못한 DNA 조각을 무작위로 삽입하거나 삭제하는 경우가 빈번한 문제점이 존재하였다.

2.2. CRISPR 이전의 유전자 조작법과 CRISPR의 등장

2.2.1. ZFNs, TALENs attach Fok I 그리고 Meganucleases

초기 유전자 편집 연구에서 대부분의 실험 목표는 효과적인 DSB를 위한 도구 및 전략 개발에 많은 부분을 두고 있었다. 먼저 연구자들은 메가뉴클레아제의 DNA 염기 서열 표적 특이성을 변화시켜 염기 표적 특이성을 증가하고 활용가능성을 크게 향상시키려고 노력했다. 하지만, 여전히 메가뉴클레아제에 의한 유전자 편집은 그 염기서열 특이성으로 인하여 전체 유전체에서 아주 작은 부분만 구체적으로 표적화하여 편집할 수 있었다.

진핵생물에서 징크 핑거 뉴클레아제(Zinc finger nucleases, ZFN)의 발견은 유전자 편집의 정확성과 접근성에 있어 새로운 시대를 열었다. 징크 핑거 뉴클레아제는 염기 서열 특이적 방식으로 DNA에 결합하며 아연 이온 특이적으로 조절되는 작은 단백질 모티프이다 [13]. 하나의 ZFN은 3bp의 특이적인 DNA 서열을 인식하며, 더 큰 ZFN 복합체로 조립되어 더 높은 DNA 결합 특이성을 유도할 수 있는 장점이 있다. ZFN의 단백질 구조가 밝혀진 이후, ZFN 단백질을 Fok I이라는 엔도뉴클레아제의 DNA 절단 도메인과 융합하여, 특정 염기서열로 유도가 가능한 합성 뉴클레아제 단백질을 만들었다. Fok I의 경우, 기존의 DNA 염기 인식 특이성을 가지고 있는데, Fok I에서 서열 인식 부분을 제거하고, DNA 절단 부분의 도메인을 이용하여 이를 ZFN에 융합시켰다 [14]. 이를 이용하여, ZFN로 하여금 표적 염기 서열을 인식하게 하고, Fok I부분으로 DNA의 DSB를 유도하는 방식이 사용되었다 [15] (그림 2).

ZFN의 발견 및 개발과 함께, 3개의 염기 대신 하나의 단일 염기를 특이적으로 인식할 수 있는 Xanthomonadales 박테리아의 TALE (transcription activator-like effector) 단백질이 발견됨에 따라, 더 정교한 유전자 편집에 대한 기대가 증가하였다 [16]. ZFN에서의 방법과 마찬가지로, TALE 단백질과 Fok I DNA 절단 도메인의 융합은 TALEN (Transcription activator-like effector nucleases)이라고 하는 단일 염기 단위의 편집이 가능한 효과적인 시스템을 개발하였다 (그림 2).

게놈 편집 기술로서 CRISPR 이전에 ZFN 및 TALEN의 개발과 추가적으로 진보된 메가뉴클레아제의 발견으로 게놈 편집 효율이 증가했지만, 이 두 가지 시스템의 경우 유전자 표적에 따라, 완전히 새로운 뉴클레아제 단백질 세트의 재설계가 필요했고, ZFN 및 TALEN의 복제 및 단백질 자체의 엔지니어링의 어려움으로 인하여 이러한 도구가 염기 편집 도구로서 널리 사용되지 못하였다.

2.2.2. CRISPR의 원리와 한계

CRISPR의 경우 이러한 기존의 편집도구의 한계점을 극복함으로써, 염기 서열 편집 도구에 있어서 혁명적인 영향을 미치게 되었다. 무엇보다도 CRISPR의 경우 기존의 방법보다 훨씬 더 방법적으로 간단하고, 특정 염기 서열을 지정할 수 있음에 따라 그 사용 범위가 넓은 장점이 있다. CRISPR-Cas9 시스템의 경우 단순한 원핵생물에서의 면역 시스템으로 사용되어 진다고 알려지게 되었다. 현재 사용되는 CRISPR 매개의 유전자 편집 기술은 짧은 단일 가이드 Sg (Single guided) RNA를 이용하여 타겟 염기 서열을 특이적으로 인식하도록 하고, DNA 절단 활성이 조절 가능한 엔도뉴클레아제 Cas9으로 구성되어 있다 [6]. Cas9 단백질의 경우, 유전적으로 재설계가 용이하여 현재 활발히 다양한 버전의 Cas9이 개발되어 사용되고 있다 [17].

CRISPR의 약자 clustered regularly interspaced short palindromic repeats는 '규칙적인 간격을 갖고 나타나는 짧은 회문 구조의 (DNA의) 반복 서열'로서 다른 생명의 유전체에서의 일반적인 직렬 반복과 달리, CRISPR 반복 클러스터는 스페이서라고 불리는 반복되지 않는 DNA 서열을 가지고 있다. 이 CRISPR 서열은 대부분의 박테리아와 세균에서 발견되며, 이는 CRISPR 관련 단백질(CRISPR associated protein)에 의해 조절됨이 밝혀졌다 [18]. 또한 이 비반복 스페이서 DNA 서열은 바이러스 및 기타 이동성 유전 요소에 속하는 것으로 알려져 있었다 [19]. 여기에서의 Cas 효소의 활성은 스페이서 서열에서 전사된 짧은 CRISPR RNA (crRNA)에 의해 유도되며, 스페이서 서열이 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)라고 불리는 영역에서 서로 매우 유사함에 따라, 이 서열이 CRISPR 시스템에 의한 염기의 절삭에 있어 중요한 역할을 하게 된다. crRNA는 guiding sequence 역할을 하는 부분, 즉 타겟 DNA와 결합하는데 필요한 부분과 trans-activating crispr RNA (tracrRNA)와 염기쌍을 이루는 부분으로 구성되어 있는데, crRNA와 tracrRNA 모두 표적 부위에서 DSB로 타겟 DNA 염기 부위를 절단하는 Cas9 단백질-RNA 복합체를 형성하는 데 필요하다 (그림 3). 이후의 추가적인 연구에 의해 CRISPR와 Cas9의 결합과 유도가 single guided RNA (sgRNA)라고 불리는 tracrRNA와 crRNA의 융합에 의해 형성된 단일 RNA에 의해 유도될 수 있음을 보여주었고, 이는 CRISPR가 진핵세포의 생체 내 게놈 편집에 더욱더 쉽게 적용될 수 있음을 보여주는 획기적인 발견이었다 (그림 1).

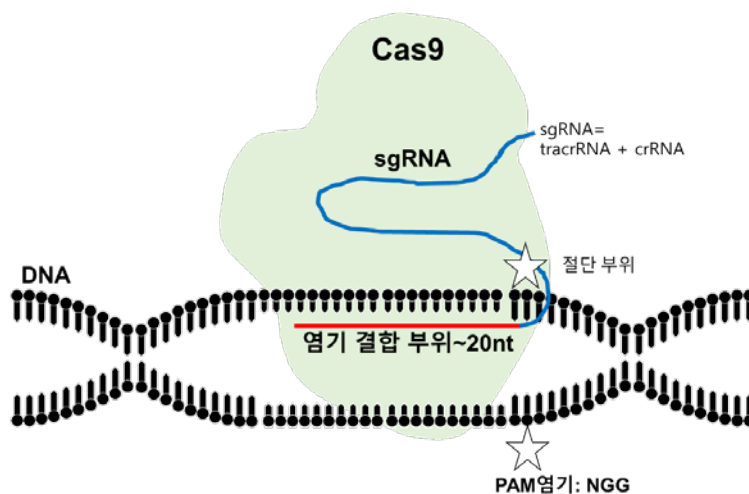


그림 1. CRISPR-Cas9의 기본적인 원리, 참고문헌: [5]

이로 인하여, 연구자로 하여금 자신이 편집을 원하는 부분에 대한 짧은 sgRNA를 설계하는 것만으로, 유전체의 거의 모든 위치에 대해 쉽게 편집할 수 있는 도구를 갖게 되었다 [20]. 또한 높은 편집 효율성과 무엇보다 사용 편의성으로 인해 다양한 분야의 연구자들이 CRISPR 기술을 빠르게 채택했으며, CRISPR에 대한 수요와 다양한 연구 결과는 매년 지속적으로 증가하였다 (그림 2).

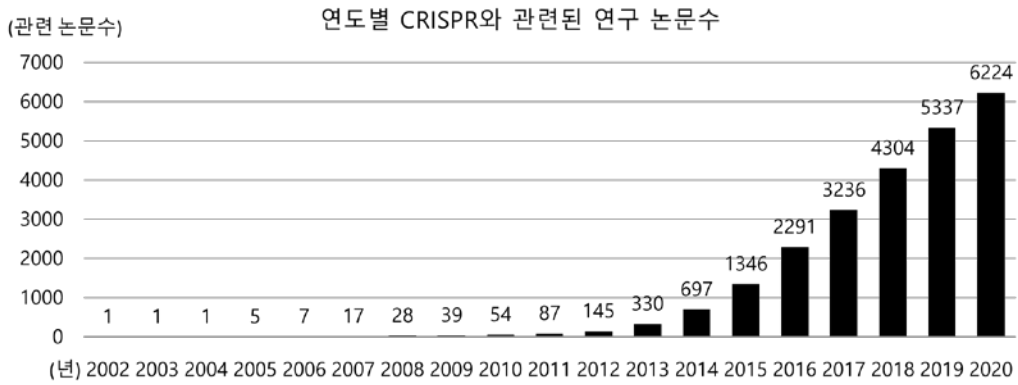


그림 2. 연도별 CRISPR와 관련된 연구 논문수, 참고문헌: PubMed search engine

하지만, 이러한 CRISPR의 강력한 장점과 편의성에도 불구하고, 추가적인 연구들을 통해 그 한계점 또한 드러났다. 이는 CRISPR 자체의 오프 타겟 이펙트, 표적 염기 이외에 다른 곳을 표적화한 경우와 함께 정말로 CRISPR가 전체 유전체 내에서 표적화한 염기서열만 제거했는가를 확인해야 하는 기술적 문제에 봉착하게 되었다 [21-23]. 이러한 단점들의 경우 여러 가지 동물실험에서 발견 및 보고가 되고 있으며, 특히나 이러한 불안정성은 윤리적 문제를 차치하고서라도, 인간에 적용할 경우 치명적인 단점으로 고려되어 그 응용에 한계를 드러내게 되었다.

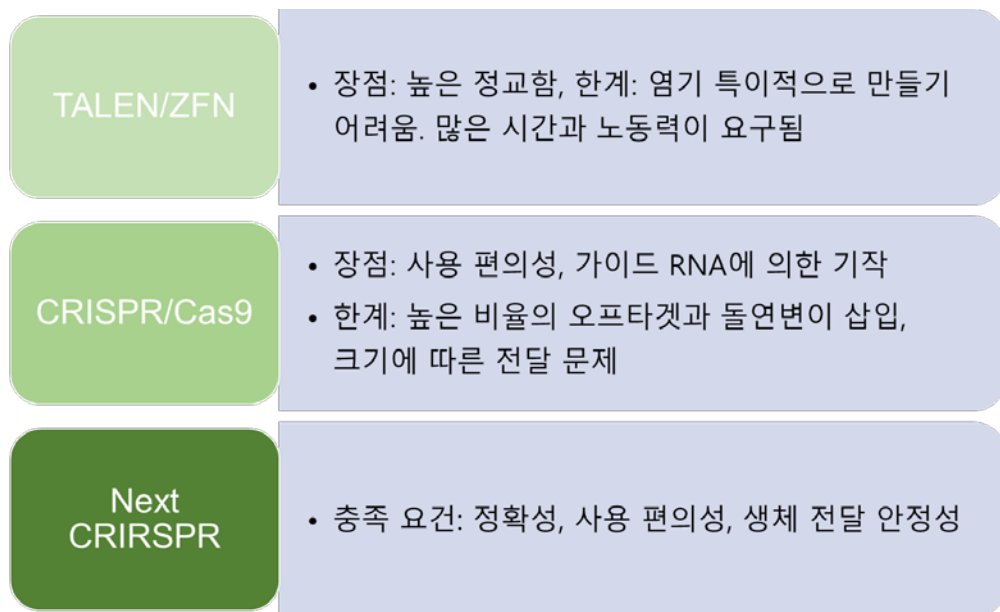


그림 3. CRISPR의 발전과 이후 개발되는 염기 편집도구

2.3. CRISPR 이후의 개발되는 염기 편집 도구들

2.3.1. CRISPR의 재설계

CRISPR 시스템의 경우, 위와 같은 한계점에도 불구하고, 염기 편집 도구로서의 강력한 능력으로 인해, 지속적으로 CRISPR 시스템에 대한 발전 및 특성화가 이뤄지고 있다. 특히, 정확성을 높이기 위한 일환으로 Cas9 단백질의 특성을 규명하고, 이를 재설계하려는 노력이 증가하고 있으며, 보다 더 정확하고 오프 타겟 이펙트가 적은 가이드 RNA에 대한 실험이 이뤄지고 있다. 또한, Cas9 단백질의 경우 비교적 큰 사이즈로 AAV를 매개로 한 전달에 있어서 제한이 있어 단백질 크기를 줄이려는 노력이 진행 중에 있다 [24, 25]. 또한 PAM 서열을 인식하는 Cas9의 특이성이 다른 변이체를 찾아 활용을 늘리려는 노력이 이어지고 있다. 기존 CRISPR의 가장 큰 문제점인 오프 타겟 이펙트를 줄이기 위하여, Cas9-sgRNA 복합체의 전달 방법 또한 고려되고 있는 방법 중 하나이다. 이와 관련하여, 두 개의 독립적인 플라스미드 기반 전달과 달리 Cas9-sgRNA를 리보뉴클레오타이드 단백질(RNP) 복합체로 한 번에 전달하면 일시적으로 Cas9 활성이 높아지고 표적 외 효과가 줄어든다는 보고가 있다 [26]. 이러한 방법과 함께, Cas9과 sgRNA 복합체의 시간적 및 공간적 활성을 제어하기 위해 소분자 화합물, 빛 촉매 및 리간드 의존적 알로스테릭 조절을 이용한 유도성 Cas9과 같은 방법들에 대한 연구도 진행 중이다. sgRNA의 경우, 그 길이와 특정 염기 서열에 따라 CRISPR의 효율에 영향을 미치는 요인에 대한 연구가 진행 중이다. 이와 관련하여, sgRNA 가이드 서열의 길이를 의도적으로 조절할 경우 표적화 특이성이 향상되는 것으로 보고되었다. 하지만 이 역시 종에 따른 차이와 타겟 염기의 염색체 내 위치에 따라 영향을 받음에 따라 추가적인 연구가 지속적으로 필요하다.

2.3.2. 발전된 형태의 CRISPR의 응용-더 나은 CRISPR/Cas9 시스템 dCas9을 이용한 CRISPR의 응용: CRISPR 매개 유전자 발현 조절, CRISPR 이미징, 대규모 유전 및 후성 CRISPR 스크리닝

Cas9이 특정 염기 서열을 인식하고 결합하며, 이 결합은 내인성 전사 인자 및 RNA 중합효소 II와 같은 다른 DNA 결합 단백질의 활성을 방해한다는 사실이 알려진 이후, 연구자들은 유전자 발현을 특이적으로 조절하기 위해 Cas9의 절삭 기능이 제거된 dead Cas9 (dCas9)를 활용하기 시작하였다. 이러한 성질은 dCas9 결합 활성이 전사 과정을 차단하여 타겟 유전자 발현을 저하시키는 CRISPR 간섭(CRISPRi)을 개발하는 데에 이용되었다 [27, 28]. 이와 유사하게, dCas9을 다른 형광 단백질과 결합하여, 염색질 내에 텔로미어의 위치와 중심체의 반복적인 서열의 위치를 표지하는 데 사용되고 있다. 이 방법은, 세포 주기 전반에 걸쳐 세포 핵 내에서의 염색질 유전자 위치를 추적하고, 3D 공간에서 유전자 전사 활성 및 비활성 영역의 차이를 시각적으로 확인할 수 있게 하였다 [29, 30]. 또한, 여러 개의 세포 소기관에 특이적인 마커 유전자에 CRISPR를 이용하여 각각의 형광 단백질을 표기한 후, 다양한 상황 및 발생 과정 중의 상호작용과 위치 추적에 사용되고 있다 [31, 32]. 또한, 최근 CRISPR의 간단하고 효율적인 유전자 표적화 능력을 이용하여 대규모 기능 스크리닝에 사용되고 있다. 이를 위하여, 다양한 sgRNA로 이루어진 라이브러리를 사용하여 dCas9

단백질로 하여금 수천 개의 개별 sgRNA와 결합되어 발현양을 줄이게 되어 보다 효과적으로 고배능, 고성능의 스크리닝을 효율적으로 수행할 수 있게 되었다 [33-36].

2.3.3. CRISPR 이후 개발되는 염기 편집 도구들-CRISPR를 넘어서려는 시도들

CRISPR를 이용한 응용과 효율을 높이려는 노력과 동시에, 연구자들은 엔도뉴클레아제의 크기, PAM 요구 사항 및 선호도에 차이가 있을 수 있는 Cas9과 유사한 단백질들을 찾기 위하여 다양한 종에서 활발히 찾고 있다. 여기서는 CRISPR 이후에 개발되고 있는 염기 편집 도구들에 대해 정리해 보고자 한다. 지난 몇 년 동안 10개 이상의 서로 다른 CRISPR/Cas 단백질 또는 비슷한 기능을 하는 엔도뉴클레아제들이 게놈 편집을 위해 발견되었고, 현재 활발하게 이들에 대한 연구가 진행되고 있다.

1) 진화한 ZFN과 TALEN [37-39]

CRISPR 이전에 각광 받던 염기 편집 도구인 ZFN과 TALEN에 대한 활용은 아직까지도 지속되면서 CRISPR의 아성에 도전하고 있다. TALEN과 ZFN의 경우, 기존의 단점에도 불구하고 단백질의 크기가 Cas9보다 작아서 생체 내 전달에 있어 유리한 점을 가지고 있기 때문이다. 기존 ZFN의 장점을 최대화하고, 단점을 줄이기 위하여 Fok I 도메인을 징크 핑거 어레이의 N 또는 C 말단에 부착하고, 징크 핑거 사이에 염기 건너뛰기 링커를 삽입하는 것을 통하여 정확성을 증가시키려는 노력을 하고 있다. TALEN의 경우에는 각각 단일 염기쌍을 표적으로 하는 다양한 식물 병원체에서 유래한 DNA 결합 모듈 어레이에 Fok I를 부착하는 방식으로 기존에 가지고 있던 한계를 극복하고자 한다. TALEN을 이용한 임상 연구 모델 및 농업용 동물 및 세포주를 생성하기 위한 연구는 현재 지놈의 거의 모든 부위를 표적으로 삼을 수 있으나, 여전히 비교적 큰 비용과 소요시간이 단점으로 지적되고 있다.

2) DSB 없는 CRISPR

DSB는 유전자 편집에 있어서 그 효율성을 증가시키는 중요한 발견이지만, 편집을 위해 DSB 이후에 복구 기작인 HDR에 의존하면 삽입 결실 또는 염색체 전위가 발생할 위험이 높은 것으로 알려져 있다. DSB에 이은 HDR의 예측 불가능성을 줄이는 방법으로 편집하기 위하여 SSR (site-specific recombinases)에 대한 연구가 진행 중이다 [40]. SSR은 DNA 이중 가닥 중 한 가닥만을 끊고 다시 결합한다. HDR이 낮거나 없는 세포에서도 SSR은 표적 부위에 외인성 DNA를 통합할 수 있다. 또한, SSR은 DNA 염기서열의 부분적인 방향을 바꾸는 것과 같은 스위치와 같은 변화를 만들 수 있다. 그러나 SSR 기작은 상대적으로 복잡하고, 현재까지 약 30~50개의 염기쌍 표적 부위만이 알려져 있다. SSR을 이용한 광범위한 게놈 편집을 위해 SSR의 새로운 표적 특이성을 찾는 방법의 개발 및 유도가 가능한 융합 단백질 만들기가 필요하다. 이후에 최종적으로 DSB가 없는 게놈 편집을 위해 여전히 gRNA에 의해 지시되지만 DNA 두 가닥 모두를 절단하지 않는 Cas9을 사용할 계획이다.

3) Cpf1-sticky end digestion

비교적 최근에 발견된 엔도뉴클레아제 Cpf1의 경우, Acidaminococcus sp (AsCpf1)와 Lachnospiraceae bacterium (LbCpf1) 두 가지가 현재까지 동정되었으며, Cas9보다 단백질 크기가 작으며 요구되는 염기서열 또한 Cas9과는 다르다고 알려져 있다 [41]. Cpf1의 경우, 두 개의 개별 짧은 RNA가 필요한 기본 Cas9와 달리 Cpf1은 자연적으로 하나의 sgRNA를 필요로 한다 [42]. 또한 PAM 서열이 인식하는 표적 부위의 DNA를 Cas9과는 다른 방식으로 절단하여 Cas9과 같은 blunt end를 생성하기보다는 sticky end를 생성한다 [43]. 또한, Cpf1의 경우 Cpf1 단백질과 타겟을 지정해주는 역할을 하는 RNA를 혼합한 형태를 직접 세포에 전달하는 방법에 대한 연구가 진행 중에 있다 [44-46].

4) Base Editor-염기 C 한 개만을 염기 T 로 치환 [47, 48]

Cas9 단백질을 변형시켜, 염기교정 단백질이 타겟 DNA 염기서열에서 C 사이토신 염기를 T 티민 염기 한 개로 치환할 수 있는 기술이 개발되고 있다. 현재 SKIP [49]과 APOBEC3A 두 가지 모델이 이용되고 있으며, 이들은 편집 시스템의 효율성을 증가시킴과 동시에 국소 돌연변이를 유도하거나, 특정 유전자 시작 부분에 STOP 코돈 DNA 서열(TAA, TGA, TAG)을 도입하여 발현을 억제하는 데 성공하였다. APOBEC3A [50]의 경우 nickase Cas9을 이용하여 DNA DSB를 유발하지 않고 단일 염기를 다른 염기로 정확하게 변환할 수 있는 도구로서, nickase Cas9의 경우 APOBEC1 deaminase 효소와 Uracyl Glycosylase inhibitor (UGI) 단백질에 융합된 Cas9으로 타겟 사이트에서 C에서 T 또는 A에서 G로 직접 염기를 변환할 수 있게 한다. 또한, 프라임 Cas9이라 명명된 시스템의 경우 역시 정확성을 높이고 오작동을 줄이기 위해 DNA에서 한 가닥만 잘라낸 후, 세포 내의 RNA 정보를 이용해 다시 DNA를 합성하는 기작을 이용한다고 알려져 있다 [17].

5) 작은 크기의 Cas9들의 발견- NmCas9, CjCas9, SaCas9, SpCas9 [35, 51]

Streptococcus pyogenes에서 동정되어 가장 널리 사용되는 SpCas9의 경우, 160kDa (1,366 aa) 으로서 세포 내 전달 시에 그 크기로 인해 효율성과 안정성이 떨어진다. 따라서 이를 개선하기 위한 방법으로, 다른 종에서 Lenti 또는 Adeno Associated Virus (AAV)을 통한 다른 세포 유형으로의 패키징 및 전달과 관련하여 유리한 Cas9에 대해 연구가 진행 중이다. 현재 Neisseria meningitidis (NmCas9)에서 1082 aa 크기의 Cas9이 Staphylococcus aureus (SaCas9)에서 1053 aa 크기의 Cas9, Campylobacter jejuni (CjCas9)에서 984 aa Cas9이 발견되었다. 이러한 작은 Cas9 단백질은 전달 효율성 증가에 긍정적인 요소로 작용하지만, 기존 SpCas9에 비해 더 복잡한 PAM 서열이 필요하다는 단점이 있다. 또한, 아직까지 연구된 부분이 적음에 따라 게놈 표적화에서 상대적으로 제한된 표적화 범위 및 유연성을 갖는다고 할 수 있다.

6) 캐스케이드 및 Cas3

캐스케이드(Cascade)라는 다중의 DNA 표적 복합체와 엔도뉴클레아제 Cas3으로 구성되어 있는 편집 도구에 대한 연구도 활발하게 진행 중이다 [52]. Cas3를 표적 DNA 서열에 유도하기 전에 Cascade는 먼저 PAM 및 스페이서 인식을 통해 DNA에 결합하는데, Cascade는 PAM 서열을

무차별적인 인식함으로써, 더 큰 표적 부위와 표적 부위 유연성을 제공하게 된다. Cas3는 결합부위에서 helicase 기능을 이용해 DNA를 풀고, Nickase를 이용해 단일 가닥 Nick을 생성한 다음 3'에서 5'로의 엑소뉴클레아제 활성을 통해 표적 DNA를 분해한다. Cas3의 nickase, helicase 및 exonuclease 활성을 용도 변경하고, 염기 편집에 효과적으로 응용하기 위한 연구들이 진행 중에 있다 [53].

7) Cas12- Cas12a, Cas12b, Cas12f1 [54]

미국의 에너지 연구부의 Joint Genome Institute에서 다양한 장소에서 수집한 미생물들의 유전자 서열을 조사한 후, Cas12라고 불리는 이전에 발견되지 않은 3개의 뉴클레아제를 발견했다. 이들은 Cas9에 비해 단백질 크기가 작아 세포로 전달하기 용이할 것으로 예상되고, Cas9와 관련이 없는 것으로 보여 Cas9에서 문제점으로 보고되는 과면역 반응을 유발할 가능성이 적을 것으로 예상된다. Cas12a의 경우 DNA 표적 부위에서 5' 돌출부가 있는 sticky end를 생성하고 전사 활성화 crRNA를 사용하지 않는다. Cas9에 의한 무딘 말단 생성과 대조적으로 Cas12a에 의한 엇갈린 말단 생성은 DNA 서열을 정확한 방향으로 통합하는 것과 같은 응용 분야에 유리할 수 있다. 또한 Cas12a는 crRNA 어레이를 절단하여 자체 crRNA를 생성할 수 있다. Acidaminococcus spp.의 Cas12a (AsCas12a) 및 Lachnospiraceae spp.의 Cas12a. (LbCas12a) 포유류 세포에서 활성이 있는 것으로 나타난 최초의 Cas12a는 표적 서열의 상류에 있는 PAM 서열을 인식한다 [54]. 최근 진행된 연구에 의하여 Cas12의 경우 인간 면역 편집에 최적화되었을 것으로 예상되며, Cas12a의 간소화된 버전인 Cas12b이 보고되었다. 이 Cas12b의 경우 Cas9보다 약 20% 더 작으며 표적을 벗어난 스니핑(off-target snipping) 경향이 훨씬 적음을 보여주었다. Cas12f의 경우 단백질 크기가 Cas9과 비교했을 때 약 1/3로 작아 AAV 바이러스를 이용한 유전자 편집 도구로 매력적이긴 하지만, 유전자 교정 효율이 없어 실제적인 치료제로서의 역할을 수행하지 못할 것으로 예상된다.

8) Cas13-RNA를 표적

여러 종류의 Cas 유형의 단백질 효소가 다른 PAM 서열 또는 활성으로 기능이 조절된다는 사실이 알려지고 있다. 예를 들어, Cas13의 경우 기존의 DNA를 타겟으로 하는 것이 아니라, 전사물인 RNA를 표적으로 하는 RNA 염기 편집의 가능성을 제시하고 있다. RNA 편집의 경우, 타겟 특이성과 효율에 대한 개선이 필요하지만, 영구적인 DNA 편집이 아니라는 점에서 오히려 그 장점을 가질 수 있다. 이 역시 미생물 세계에서 발견된 효소로서 이와 비슷한 RNA 편집이 가능한 뉴클레아제를 찾기 위한 노력이 계속되고 있다 [55-58]. C2c2라고 하는 또 다른 절단 기능이 있는 효소는 DNA가 아닌 RNA를 표적으로 한다 [59, 60].

9) 미니미-미니 Cas9

CRISPR-Cas9 시스템은 여전히 유전 질환을 담당하는 유전자를 수정 및 편집하는 데 있어서 매력적인 모델이다. 그러나 시스템의 구성 요소(Cas9이라는 효소와 효소를 원하는 서열로 지시하는 RNA 가닥)는 너무 커서 외래 유전 물질을 인간 세포로 이동시키기 위해 유전자 치료에 가장 일반적으로 사용되는 바이러스로 전달하는 데 문제가 있다. 최근 황색포도상구균(*Staphylococcus*

aureus)에서 추출한 미니 Cas9 형태의 경우, 현재 시장에 나와 있는 유전자 치료법 중 하나에 사용되는 바이러스에 들어갈 만큼 작다 [61]. 특히나, 두 연구 그룹에서 현재 Duchenne 근이영양증을 담당하는 유전자를 수정하기 위해 마우스에서 이 mini-Cas9을 사용해 성공적으로 유전자 치료를 했다 [62-64].

10) NgAgo-가이드 RNA나 특정 인접 게놈 서열 없이

최근에 NgAgo라는 염기 편집 도구에 대한 의견이 분분하다 [65]. 이는 CRISPR-Cas9의 대안에 대한 가능성과 더불어 재현가능성에 있어 좌절감을 주고 있는 시스템이다. 처음 연구를 발표한 NgAgo라는 Argonaute 계열의 단백질을 사용하여 가이드 RNA나 특정 인접 게놈 서열 없이도 미리 결정된 위치에서 DNA를 절단할 수 있다고 주장했을 때, 이는 유전자 편집에 있어 엄청난 관심을 받았다 [66]. 그러나, 다른 실험실에서 같은 방법으로 지금까지 그 결과를 재현하는데 실패하고 있다 [66-68].

11) 핵산가교(BNA)를 활용한 CRISPR

CRISPR의 정확성을 높이고 오프 타겟 이펙트를 비롯한 오작동을 줄이기 위한 노력은 Cas9 단백질의 변형 이외에도 가이드 RNA의 길이와 특정 염기 서열에 대한 연구도 활발히 되고 있다. 특히 최근에 핵산가교라는 물질을 인공적으로 합성한 뒤 가이드 RNA 속 염기 일부를 대체한 경우, RNA의 구조적 변화를 일으켜 타겟 DNA와 완벽하게 일치할 경우에만 결합하게 되는 특성을 보이게 됨을 보여주었다 [69, 70]. 또한 타겟 DNA와 유사한 오프 타겟에 결합한 경우에도, Cas9에 의한 절단을 방해함을 보여주었다. 이를 통해 가이드 RNA의 조절 역시 Cas9이 가지고 있는 한계를 극복할 수 있는 열쇠임을 보여주었다.

12) Cas-CLOVER (<https://demeetra.com/cas-clover/>)

Cas-CLOVER은 다른 CRISPR/Cas9 기술과 기능적으로 유사하지만 Clo51이라는 다른 뉴클레아제 단백질을 사용한다. 이와 같은 시도들은 여러 기업들에 의해 활발히 진행되고 있으며, 이에 대해 CRISPR/Cas9 기술과 구별되는 일련의 특허를 가지고 있다. Cas-CLOVER의 경우 Clo51 endonuclease Cas-CLOVER는 각 가이드 RNA와 관련된 부분의 이량체화를 필요로 하는 뉴클레아제 자체의 활성화와 두 개의 가이드 RNA의 활용하여 특이성을 높이는 전략을 사용하고 있다. Cas-CLOVER는 표적 유전자 Cas-CLOVER가 요구하는 2개의 가이드 RNA에 대한 요구 사항과 상대적으로 엄격한 스페이서 길이에 의해 오프 타겟 효과가 적은 매우 높은 특정 게놈 편집 도구를 생성한다. 특히, Cas-CLOVER는 NGS에 의해 탐지된 표적 외 오프 타겟이 없음을 보여주었다.

13) IS200/IS605 transposon

가장 작은 DNA 전이효소로 알려진 IS200/IS605의 경우, 단백질과 DNA의 상호작용이 촉매 작용을 위해 헬리코박터 파일로리 IS608 전이효소인 TnpA를 활성화한다 [71]. 전이효소 말단 결합은 활성 부위 내에서 촉매적으로 중요한 단백질 잔기를 정렬하는 형태 변화를 일으키는데, 이 전이 기작의 경우, 부위 특이적 DNA 결합 도메인을 포함하지 않기 때문에 염기 편집도구로서의 가능성을

가지고 있다. 진화 분석적 기법과 RNA 시퀀싱 및 생화학적 실험을 사용하여 IS200/IS605 트랜스포존에서 CRISPR-Cas9 시스템과 유사한 시스템을 구성하여, 단일 비코딩 RNA를 이용하여 이중 가닥 DNA의 RNA 유도 절단을 성공하였다 [72-74]. 이 방법은 광범위한 종류의 트랜스포존 인코딩 RNA-유도 뉴클레아제가 유전자 편집 도구로 사용될 가능성을 보여주고 있다.

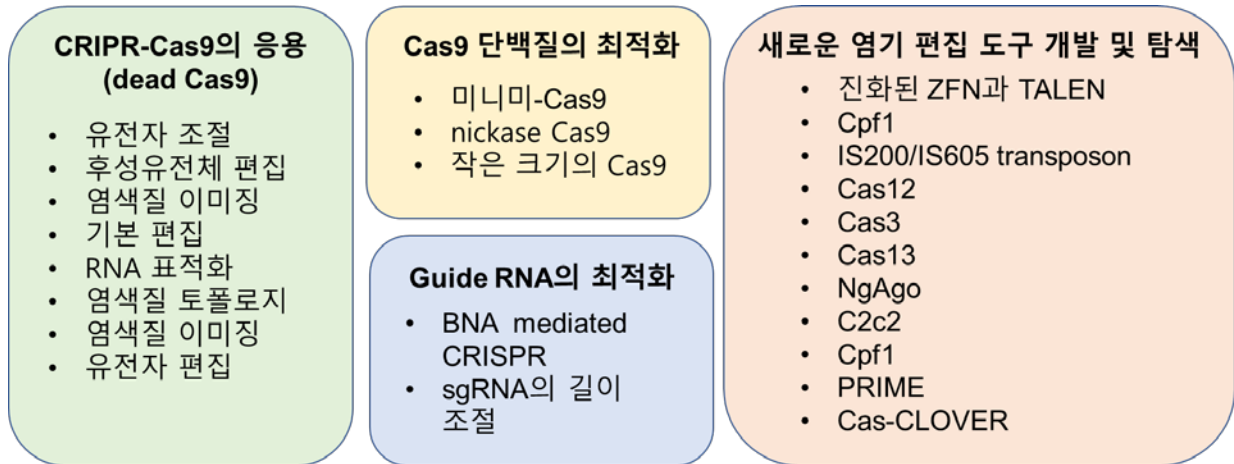


그림 4. CRISPR의 응용과 효율성을 위한 노력

3. 결론

원핵생물에서부터 발견된 CRISPR-Cas9 시스템은 다양한 종의 실제 세포에서 기존의 편집 도구보다 더 쉽고 빠르게 DNA 염기 편집을 가능케 하였다. 더 나아가 특정 DNA 및 RNA를 인지하게 하여 발현양을 조작, 감지, 이미지화하고, 주석을 달고, 스크리닝을 할 수 있는 도구를 제공하였다. 이러한 CRISPR-Cas9의 성공은 Cas12와 같은 새로운 유사 단백질 연구 탐색에 영향을 주었고, 다른 염기 편집 도구에 대한 연구에도 많은 영향을 주고 있다. 이러한 유전자 편집 도구들은 과학자들의 연구와 진단에 있어서 큰 발전을 가져왔으며, 궁극적으로 CRISPR-Cas를 포함한 유전자 편집 도구를 유전자 및 세포 치료에 임상적으로 사용하려 하고 있다. 특히나, 최근에 CRISPR-Cas 기반 치료제가 임상 테스트에 진입함에 따라, 여러 선천적 혹은 후천적 유전 질환을 교정하고 세포 치료를 향상시킬 수 있는 큰 잠재력을 여전히 보여주고 있다. 여러 연구 결과에 따르면, 임상 결과는 유망하지만 이러한 연구 동안 안전성과 효능을 면밀히 모니터링해야 할 것으로 생각된다. 특히나, 이러한 유전자 편집 방법 사용의 잠재적 위험은 우리가 편집하려는 서열에 외 오프 타겟 효과를 포함한 예상치 못한 유전체 변화이므로, 유전자 편집에 따른 유전체 내 다른 돌연변이의 검출 방법을 개선하고 잠재적 위험을 정량화하는 것이 향후 임상 발전에 중요할 것이다. 특히, 효율성과 안전성은 양날의 검과 같아서 최근에 개발되고 있는 새로운 염기 편집 도구의 경우, 대상 편집 염기를 식별할 때 대상 편집 대상이 아닌 편집 결과 및 부산물에 대한 요소를 모두 고려해야 한다. 최대의 효율적인 형성을 보장하고 잠재적으로 역효과를 낼 수 있는 비표적에 대한 오작동을 최소화하기 위해 시스템을 철저히 최적화해야 할 것이다. 또한, 가장 널리 사용되는 Cas9

단백질은 *S. aureus* 및 *S. pyogenes*에서 하는데, 이 박테리아는 높은 빈도로 인간에게 전염병을 유발하기 때문에, 인간에서 Cas9 단백질에 대한 체액성 및 세포 매개 적응 면역 반응을 이미 갖고 있을 수 있다는 보고가 존재한다. 이 역시 다양한 Cas 단백질의 특성화와 단백질 편집을 통해 해결해야 할 과제 중 하나이다. 염기 편집의 우수한 성능과 함께 적용 이후에 생길 수 있는 여러 가지 가능성에 대한 신중한 고려가 필요하다고 생각된다. 다른 한 가지 고려해야 할 문제는 CRISPR를 이용 또는 응용한 도구들이 전체 개체군이나 하나의 종을 대상으로 하여 진행되고 있는 유전자 드라이브에 관련된 문제이다. 이러한 응용법은 전체적인 생명체의 군집에 영향을 미칠 수 있는 문제이므로, 이에 대한 CRISPR의 지속성 및 안정성에 대한 고민이 필요하다.

실제로 이러한 시스템이 인간에게 적용하기 위한 분자 생물학적 면역학적인 과제와 더불어 실제 활용 시 생기는 기술적 과제 중 하나는, 이러한 도구를 살아있는 세포와 유기체에 안전하며 효율적으로 전달하는 것이다. 이를 위해 현재까지는 주로 낮은 면역원성을 가진 AAV 벡터를 이용하는데, Cas 단백질의 크기가 비교적 크기 때문에 AAV 벡터로 패키징하는데 어려움이 있다. 따라서 기존 Cas 단백질의 크기를 줄이는 방향으로 연구가 진행되고, 같은 성능의 다양한 Cas 단백질을 찾고 있다. 위의 리뷰에서 보는 것과 마찬가지로 유전자 편집의 정확성과 더불어 전달을 위한 최적화된 시스템 개발에도 많은 연구가 이루어지고 있다.

이러한 과제들에도 불구하고, CRISPR의 발견과 이후 개발 및 발견되는 염기 편집 도구들은 향후의 DNA 및 RNA 편집 기술을 이용한 유전자 및 세포 치료를 발전시킬 엄청난 잠재력을 가지고 있다.

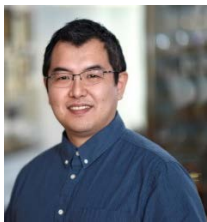
4. 참고문헌

- [1] Koonin, E.V., K.S. Makarova, and F. Zhang, Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2017. 37.
- [2] Naldini, L., Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 2015. 526.
- [3] Maeder, M.L. and C.A. Gersbach, Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol. Ther.*, 2016. 24.
- [4] Hsu, P.D., E.S. Lander, and F. Zhang, Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014. 157.
- [5] Adli, M., The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*, 2018. 9(1): p. 1911.
- [6] Pickar-Oliver, A. and C.A. Gersbach, The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019. 20(8): p. 490-507.
- [7] Capecchi, M.R., Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989. 244.
- [8] Smithies, O., et al., Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985. 317.
- [9] Bibikova, M., Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol. Cell. Biol.*, 2001. 21.
- [10] Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin, Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell. Biol.*, 1994. 14.
- [11] Porteus, M.H. and D. Baltimore, Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*, 2003.

- 300.
- [12] Sussman, D., Isolation and characterization of new homing endonuclease specificities at individual target site positions. *J. Mol. Biol.*, 2004. 342.
- [13] Klug, A. and D. Rhodes, Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1987. 52.
- [14] Kim, Y.G., J. Cha, and S. Chandrasegaran, Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1996. 93.
- [15] Urnov, F.D., Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005. 435.
- [16] Miller, J.C., A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 2011. 29.
- [17] Zeballos, C.M. and T. Gaj, Next-Generation CRISPR Technologies and Their Applications in Gene and Cell Therapy. *Trends Biotechnol*, 2021. 39(7): p. 692-705.
- [18] Deveau, H., Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, 2008. 190.
- [19] Bolotin, A., et al., Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005. 151.
- [20] Cong, L., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013. 339.
- [21] Pattanayak, V., High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.*, 2013. 31.
- [22] Kuscu, C., et al., Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, 2014. 32.
- [23] Singh, R., et al., Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. *Nucleic Acids Res.*, 2015. 43.
- [24] Yu, W., Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice. *Nat. Commun.*, 2017. 8.
- [25] Hakim, C.H., AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice. *JCI Insight*, 2018. 3.
- [26] Rees, H.A., Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat. Commun.*, 2017. 8.
- [27] Larson, M.H., CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat. Protoc.*, 2013. 8.
- [28] Liu, S.J., CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science*, 2017. 355.
- [29] Ma, H., Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat. Biotechnol.*, 2016. 34.
- [30] Lei, Y., Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. *Nat. Commun.*, 2017. 8.
- [31] Tanenbaum, M.E., et al., A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014. 159.
- [32] Leonetti, M.D., et al., A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2016. 113.
- [33] Datlinger, P., Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat. Methods*, 2017. 14.
- [34] Joung, J., Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat. Protoc.*, 2017. 12.

- [35] Casini, A., A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nat. Biotechnol.*, 2018. 36.
- [36] Han, J., Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication. *Cell Rep.*, 2018. 23.
- [37] Urnov, F.D., et al., Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.*, 2010. 11.
- [38] Miller, J.C., An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 2007. 25.
- [39] Wang, J., Homology-driven genome editing in hematopoietic stem and progenitor cells using ZFN mRNA and AAV6 donors. *Nat. Biotechnol.*, 2015. 33.
- [40] Olorunniji, F.J., S.J. Rosser, and W.M. Stark, Site-specific recombinases: molecular machines for the genetic revolution. *Biochem. J.*, 2016. 473.
- [41] Fonfara, I., et al., The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016. 532.
- [42] Zetsche, B., Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015. 163.
- [43] Yamano, T., Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2016. 165.
- [44] Li, X., Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.*, 2018. 36.
- [45] Zetsche, B., Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat. Biotechnol.*, 2017. 35.
- [46] Gao, L., Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat. Biotechnol.*, 2017. 35.
- [47] Komor, A.C., Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci. Adv.*, 2017. 3.
- [48] Liang, P., Correction of beta-thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017. 8.
- [49] Gapinske, M., CRISPR-SKIP: programmable gene splicing with single base editors. *Genome Biol.*, 2018. 19.
- [50] Gehrke, J.M., An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat. Biotechnol.*, 2018. 36.
- [51] Chatterjee, P., N. Jakimo, and J.M. Jacobson, Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. *Sci. Adv.*, 2018. 4.
- [52] Westra, E.R., CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Mol. Cell*, 2012. 46.
- [53] Hochstrasser, M.L., CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2014. 111.
- [54] Chen, J.S., CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018. 360.
- [55] Gootenberg, J.S., Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018. 360.
- [56] Yan, W.X., Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol. Cell*, 2018. 70.
- [57] Cox, D.B.T., RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 2017. 358.
- [58] Abudayyeh, O.O., RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017. 550.
- [59] Gootenberg, J.S., Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017. 356.
- [60] Abudayyeh, O.O., C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016. 353.
- [61] Friedland, A.E., Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol.*, 2015. 16.
- [62] Nelson, C.E., In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular

- dystrophy. Science, 2016. 351.
- [63] Amoasii, L., Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. Science, 2018. 362.
- [64] Nelson, C.E., Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. Nat. Med., 2019. 25.
- [65] Lee, K.Z., et al., NgAgo possesses guided DNA nicking activity. Nucleic Acids Res, 2021. 49(17): p. 9926-9937.
- [66] Cyranoski, D., Replications, ridicule and a recluse: the controversy over NgAgo gene-editing intensifies. Nature, 2016. 536(7615): p. 136-7.
- [67] Zhang, X., NgAgo: a hope or a hype? Protein Cell, 2016. 7(12): p. 849.
- [68] Burgess, S., et al., Questions about NgAgo. Protein Cell, 2016. 7(12): p. 913-915.
- [69] Cromwell, C.R., et al., Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity. Nat Commun, 2018. 9(1): p. 1448.
- [70] Soler-Bistue, A., A. Zorreguieta, and M.E. Tolmasky, Bridged Nucleic Acids Reloaded. Molecules, 2019. 24(12).
- [71] Barabas, O., et al., Mechanism of IS200/IS605 family DNA transposases: activation and transposon-directed target site selection. Cell, 2008. 132(2): p. 208-20.
- [72] He, S., et al., The IS200/IS605 Family and "Peel and Paste" Single-strand Transposition Mechanism. Microbiol Spectr, 2015. 3(4).
- [73] Karvelis, T., et al., Transposon-associated TnpB is a programmable RNA-guided DNA endonuclease. Nature, 2021.
- [74] Altae-Tran, H., et al., The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. Science, 2021. 374(6563): p. 57-65.



저자 한승엽

저자 한승엽은 Deglycosylation enzyme인 NGLY1의 기능 연구로 미국 휴스턴에 베일러 의과대학에서 박사학위를 받았다. 현재 베일러 의과대학에서 포스닥으로 NGLY1에 대한 추가 연구를 진행 중이다.

약력

건국대학교 생명과학과 학사, 석사 졸업

베일러 의과대학 Dept. of Genomics and Genetics 박사 졸업

주 연구 분야

초파리 발생 유전학, Protein Glycosylation, AMPK pathway

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

한승엽(2021). CRISPR 이후 개발되는 염기 편집 도구들. BRIC View 2021-T38
Available from <https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=3943> (Dec 09, 2021)

Email: view@ibric.org