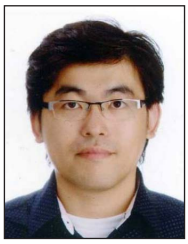
유전체 교정을 위한 유전자가위 (engineered nuclease)의 개발과 활용

위갑인

서울대학교 유전체공학 창의연구단
E-mail: kapdoli@hanmail.net



김진수

서울대학교 유전체공학 창의연구단
E-mail: jskim01@snu.ac.kr

서론

인간 유전체 프로젝트(Human Genome Project, HGP)에 의한 인간의 게놈 지도 규명과 더불어 발전한 차세대 염기서열 분석방법은 인간을 비롯한 미생물, 동식물의 방대한 유전정보를 빠르고 정확하게 규명하는데 널리 활용되고 있다. 그 결과 기능이 밝혀지지 않은 수많은 유전자들의 염기서열은 물론이고 개인들 사이의 단일염기변이(Single nucleotide polymorphism, SNP)와 특정 염기서열의 삽입(Insertion), 결실(Deletion), 중복(Duplication), 역위(Inversion), 그리고 전좌(Translocation) 등과 같은 구조적 변이가 무수히 발견됨으로써 이러한 각 개체 별 염기서열의 변이가 왜 발생하고 그로 인해 특정 질병 및 형질 발현에 어떠한 영향을 주는지에 대한 새로운 의문이 제기 되었다. 또한 인간 유전체에 있어 30억 쌍의 DNA 염기서열을 분석한 결과, 전체 유전체의 약 2%에 해당하는 약 20,000여 개 정도의 유전자가 단백질로 발현될 수 있고, 나머지 약 98% 유전체는 non-coding DNA로서 그 대부분의 역할과 기능은 미지의 영역으로 남아 있다.

이들 유전정보의 기능과 역할을 규명할 수 있는 가장 최선의 방법은 유전체에서 이들 각각을 제거하고 그 결과를 관찰하는 것이다. 이를 위해 상동재조합(Homologous recombination)을 통한 유전자 녹아웃(Knock-out) 방법(Capecchi 2005)과 RNAi를 이용한 유전자 녹다운(Knock-down) 방법(McManus and Sharp 2002)이 주로 사용되어 왔으나, 녹아웃 방법은 gene targeting vector를 제작해야 하는 번거로움, 백만분의 일에 불과한 극히 낮은 상동재조합 효율, 그리고 동물실험에 있어 배아줄기세포가 필요하다는 제약으로 인해 널리 활용되지 못 하고 있다. siRNA는 저렴한 비용으로 빠르고 쉽게 유전자의 발현을 억제할 수 있는 방법이나 표적 이외의 수백 개 off-target 유전자 발현도 함께 억제하는 문제가 있고, 표적 유전자의 발현을 완전히 차단하지 못한다는 단점이 있다.

최근 새로운 생명공학 기술로 큰 주목을 받고 있는 유전자가위(Engineered nuclease)를 이용한 유전체 재설계 기법은 인간을 포함한 모든 동물, 식물의 유전정보를 연구자가 원하는 데로 교정, 편집하는데 널리 활용될 수 있다. 이에 본 논단에서는 유전자가위의 작용기작과 서로 다른 유전자가위들을 비교 설명한 후, 이들이 생명과학 연구에 어떻게 활용되어 왔으며 앞으로 어떤 응용 가능성이 있는지에 대해서 살펴보고자 한다.

유전자가위(Engineered nuclease)의 작용기작

인공 제한효소(Engineered nuclease)를 의미하는 유전자가위는 18~40개로 구성된 염기서열을 특이적으로 인식하여 DNA 두 가닥을 절단하도록 고안된 효소이다. 유전자가위를 이용하면 동식물 세포 내에 존재하는 특정 유전자에 이중나선손상(Double strand break)을 도입할 수 있다. 모든 세포에는 이를 효과적으로 복구하는 두 가지 수선체계가 존재하는데, 그 하나는 비상동재접합(Non-homologous end joining, NHEJ)이고, 다른 하나는 상동재조합(Homologous recombination, HR)이다(그림1B). 비상동재접합은 절단 부위를 그대로 이어주는 효과적인 복구 시스템이지만 이 과정에서 종종 몇 개의 염기쌍이 삽입 또는 제거(Small insertion and deletion; indel)된다. 이를 이용하면 유전자가위를 도입한 세포에서 1~90%의 높은 비율로 돌연변이를 유도할 수 있다. 즉 특정 유전자의 단백질 암호화 서열(protein coding sequence)에 frameshift를 야기하여 그 유전자의 기능이 녹아웃된 세포주나 동·식물체를 제작할 수 있다(Santiago et al. 2008). 또한 두 쌍의 유전자 가위를 동시에 세포 내로 도입하여 두 군데의 DNA를 절단하면 수천~수백만 단위의 DNA 단편(DNA fragment)이 만들어지고 이들이 다시 수선되는 과정에서 중복, 결실, 역위, 전좌 등의 구조적 변이가 발생하는데, 이를 통해 특정 유전체를 원하는 데로 편집하여 재배열할 수 있다(Brunet et al. 2009; Lee et al. 2010; Lee et al. 2012).

상동재조합은 비상동재접합과는 달리 indel을 수반하지 않는 정교한 DNA 수선체계이다. 일반적으로 절단된 이중나선 DNA의 수선은 다른 한쪽의 염색분체(Chromatid)와 같이 동일한 염기서열을 가진 DNA 부위를 주형으로 하여 그 유전정보를 복사하여 절단된 부분을 복구하는 것으로 염기서열의 삽입이나 제거 등과 같은 에러가 발생하지 않는다(error-free DSB repair mechanism). 이러한 원리를 이용하여 절단된 DNA 주변과 동일한 염기서열(homologues arm)을 포함하는 targeting vector를 유전자가위와 함께 세포에 도입하면, 원하는 위치에서 손쉽게 특정 유전자의 발현을 유도 또는 제어 할 수 있어 녹인(Knock-in)된 세포주나 동·식물체를 제작할 수 있다. targeting vector 대신에 50mer에서 120mer에 해당하는 single-strand oligonucleotide를 주형으로 사용하여 SNP 등을 도입하는 방법도 개발되었다(Chen et al. 2011).

지난 20여 년에 걸쳐 유전자가위는 특정 DNA 염기서열을 인식하고 자르는 방식에 따라 아래와 같이 zinc finger nuclease(ZFN), Transcription activator-like effector nuclease(TALEN), 그리고 CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonuclease(RGEN)의 세 형태로 각각 개발되었다.

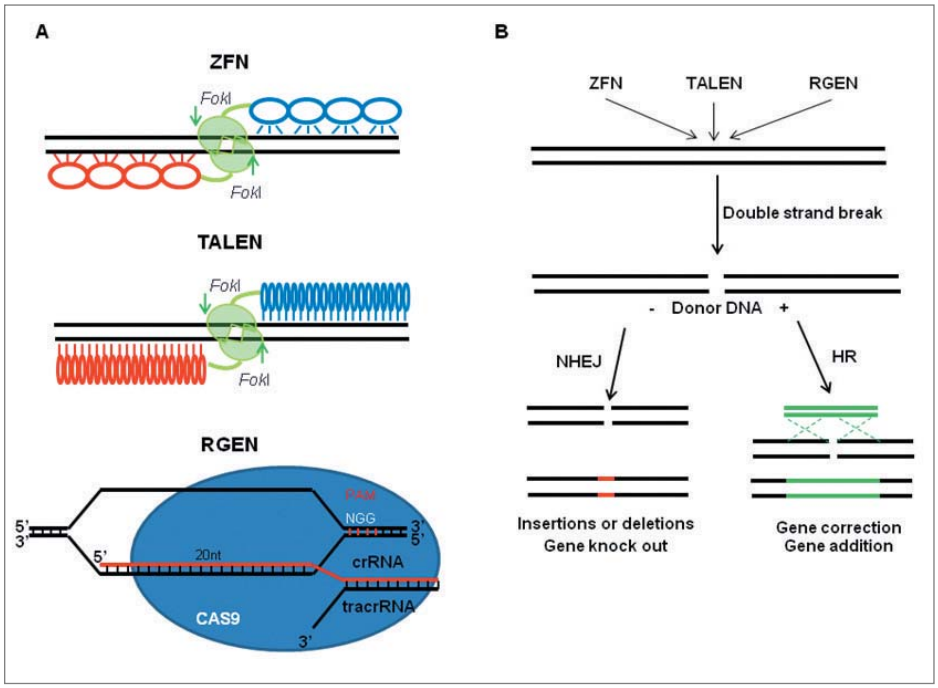


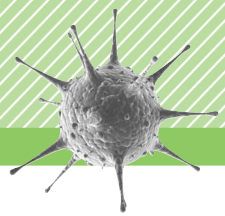
그림 1. 유전자가위와 유전자 변이의 원리

유전자가위의 종류

ZFN: 가장 먼저 제작된 유전자가위로서 특정 DNA 염기서열을 인식하여 결합할 수 있는 Zinc finger protein과 DNA를 절단할 수 있는 FokI restriction endonuclease 도메인으로 구성된다(Kim et al. 1996; Bibikova et al. 2003). FokI은 Type II 제한효소의 하나로 대부분의 다른 제한효소들과는 달리 DNA와 결합하는 부위와 DNA를 자르는 효소 부위가 별개의 도메인으로 구성되어 있다. ZFN은 FokI의 DNA 결합 부위를 zinc finger protein으로 교체한 것이다. Zinc finger protein은 각각 3bp DNA를 독립적으로 인식하는 zinc finger들 몇 개를 나란히 연결하여 만든다. 유전자 적중(gene targeting)을 위한 ZFN은 최소 3개에서 최대 6개의 zinc finger들로 구성된 zinc finger protein이 9~18bp DNA를 인식할 수 있도록 고안된 것이다. FokI nuclease domain 자체는 DNA를 인식하거나 자르지 못하고 반드시 DNA 상에서 이합체(dimer)를 이루어야 작용하기 때문에 ZFN의 표적 염기서열은 각각의 monomer가 인식하는 9~18bp의 염기서열이 5~6bp 간격을 두고 반대방향으로 배치된 형태이다. FokI nuclease는 zinc finger protein이 결합하지 않는 이 간격(spacer라고 함) 부위에 작용하여 DNA를 자른다. 그 결과 ZFN은 18~36bp의 염기서열을 인식하여 DNA를 자르기 때문에 유전체 내에서 매우 특이적으로 결합하여 작동하게 된다.

ZFN을 빠르고 손쉽게 제작하기 위해 지난 20여 년 동안 다양한 방법이 개발 되어왔다(Kim et al. 2009; Gonzalez et al. 2010; Kim et al. 2011; Bhakta et al. 2013). 가장 많이 사용하는 방법은 조립식 재조합 방법이다. 즉 DNA 3bp 염기서열 64개 각각을 특이적으로 인식하는 최대 64개의 zinc finger domain을 미리 선별하여 직렬로 연결함으로써 타켓 유전자 염기서열에 결합할 수 있는 DNA binding domain을 단기간에 제작할 수 있는 방법이 개발되었다. 또한 Zinc finger protein library로부터 특정 염기서열에 결합력이 강한 Zinc finger protein 만을 선별하여 ZFN 제작에 이용하는 Oligomerized Pool Engineering(OPEN) 방법(Maeder et al. 2008)이 고안되었다. 미국 생명공학회사 Sangamo Biosciences, Inc.는 개선된 조립식 방법으로 ZFN을 만들어 유전자/세포치료제 개발에 활용하고 있다. 대표적으로 미국 FDA의 승인 하에 환자의 T cell에서 ZFN을 이용해 HIV co-receptor인 CCR5 유전자를 제거함으로써 AIDS를 치료하는 임상시험이 진행 중에 있다. Sigma-Alrich는 Sangmo가 개발한 ZFN 제조 방법을 라이선스 받아 연구자들에게 ZFN을 맞춤 제작해 공급하고 있다.

TALEN: ZFN과 마찬가지로 TALEN은 DNA binding domain과 FokI nuclease domain로 구성된다. DNA-binding domain으로 이용되는 transcription activator-like effector(TALE) protein은 식물 병원균의 일종인 Xanthomonas 에서 유래한 것이다. Xanthomonas가 숙주 세포에 투여하는 TALE은 전사인자로 작용하여 숙주 세포의 특정 유전자 프로모터 부위에 특이적으로 결합하여 그 유전자의 발현을 조절한다. TALE DNA-binding domain은 zinc finger protein과 유사하게 조립식으로 DNA 염기서열을 인식한다. 다만 3bp를 인식하는 zinc finger와는 달리 33~35개의 아미노산 잔기로 구성된 TALE domain은 하나의 단위가 하나의 염기를 인식한다. TALE의 특이성은 repeat-variable di-residues(RVDs)로 알려진 12번째와 13번째 아미노산 잔기에 의해 결정된다(Boch et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009). 즉 RVD가 NG일 때는 "T", NI는 "A", HD는 "C", 그리고 NN, HN, NK는 "G" 염기를 인식할 수 있다. 따라서 기본적으로 4개의 TALE module 만 있으면 어떤 DNA 염기서열에 대해서도 결합할 수 있는 TALE의 제작이 가능하다. ZFN과 마찬가지로 TALEN 역시 dimer로 작용하는데 보통 하나의 monomer가 14~20bp를 인식할 수 있도록 설계한다. 이때 표적 염기서열은 "T"로 시작하는 것이 바람직하고 spacer의 길이는 12~19bp가 되어야 한다(Miller et al. 2011; Reyon et al. 2012; Joung and Sander 2013; Kim et al. 2013). 하나의 module이 3개 염기를 인식하는 zinc finger와 다르게 TALE을 구성하는 RVD 각각은 단지 하나의 염기만을 인식함으로써 매우 단순화되었다는 장점이 있으나 특정 유전자에 변이를 도입하기 위해 14~20개의 RVD를 연결하는 작업은 그리 간단하지 않으며 여러 단계의 sub-cloning 과정이 필요하다. 이러한 단점을 극복하기 위해



Golden Gate cloning(Cermak et al. 2011), High-throughput solid-phase assembly(Briggs et al. 2012; Reyon et al. 2012), Ligation-independent cloning 방법(Schmid-Burgk et al. 2013) 등이 개발되었다. 우리는 Golden Gate cloning 방법을 더욱 개선하여 PCR 증폭 없이 단 한 번의 subcloning으로 TALEN plasmid를 합성하는 방법을 개발 하였고 이를 이용해 18,740개의 인간 protein-coding 유전자에 각각에 대해 특이적으로 작용하는 TALEN library를 구축하였다(Kim et al. 2013). 이는 현재까지 한 생명체의 모든 유전자에 대해 만들어진 유일한 TALEN library로서 개별 유전자의 기능연구, genome-scale knockout screen 등에 활용될 수 있다. TALEN은 생쥐를 비롯해(Sung et al. 2013) 다양한 동 · 식물체에서 성공적으로 활용되고 있고 기존 ZFN에 비해 유전자 적중 효율, 타겟 유전자에 대한 specificity, 그리고 제작을 위한 생산성 측면에서 좀 더 진보한 유전자가위라고 할 수 있다. 연구자들에게 TALEN을 제작 판매하는 회사들로는 미국의 Life Technologies, Inc. 프랑스의 Cellectis, 한국의 ㈜툴젠(ToolGen, Inc.) 등이 있다.

RGEN: RNA-guided endonuclease(RGEN)은 가장 최근에 개발된 제3세대 유전자가위로서 ZFN, TALEN과는 달리 RNA에 의해 DNA 염기서열 특이성이 유도된다. RGEN은 고세균과 세균에 광범위하게 존재하는 Type II CRISPR/Cas system에서 유래한 것이다. 미생물에 plasmid DNA, phage와 같은 외부 DNA가 침입하게 되면, 이에 대한 방어기작으로 세포는 외부 DNA의 일부 조각을 자신의 유전체에 차곡차곡 삽입하게 된다. 그 결과 반복된 서열 사이에 외부 DNA에 해당하는 작은 spacer sequence들이 수십, 수백 개 존재하는 cluster가 형성되는 데 이를 Clusters of Regularly Interspaced Palindromic Repeat(CRISPR)라고 한다. CRISPR locus로부터 긴 RNA가 전사된 후 processing 되어 spacer에 해당하는 염기서열을 갖는 CRISPR RNA(crRNA)와 sequence-invariant trans-activating crRNA (tracrRNA)가 만들어진다. 이들 RNA는 Cas9(CRISPR-associated protein 9)이라는 단백질과 결합하여 염기서열 특이적인 endonuclease를 형성한다. 외부에서 crRNA sequence가 일치하는 서열을 갖는 phage, plasmid가 재차 침입하면 crRNA/tracrRNA/Cas9 complex는 이를 특이적으로 절단하여 제거한다. 이처럼 CRISPR/Cas system은 외부에서 침입한 DNA를 기억해 두었다가 다시 같은 DNA가 침투하면 이를 제거하는 adaptive immunity라고 볼 수 있다. 반면 제한효소는 그 특이성이 정해져 있어 innate immunity라고 볼 수 있다.

RGEN은 genome editing에 사용되는 인공 효소를 의미하는 것으로 표적 유전자에 해당하는 crRNA와 tracrRNA, Cas9 단백질로 구성된다. crRNA와 tracrRNA의 필수적인 부분을 연결하여 single guide RNA(sgRNA)를 만들어 사용할 수도 있다. Streptococcus pyogenes 에서 유래한 Cas9은 crRNA의 spacer에 해당하는 20-bp 염기서열 바로 뒤에 존재하 protospacer adjacent motif (PAM) 염기서열을 인식하여 그로부터 3 bp 앞을 절단함으로써 침입한 외래 DNA 를 제거하게 된다(Jinek et al. 2012). PAM은 Cas9이 유래한 세균에 따라 다르게 되는데 S. pyogenes에서 유래한 Cas9은 5′-NGG-3′를 인식한다. 이러한 원리에 의해서 제작되는 RGEN은 Cas9 유전자가 발현될 수 있는 plasmid DNA와 crRNA와 tracrRNA가 따로 발현하거나 하나로 융합된 sgRNA를 U6 promotor 하에서 발현되도록 하는 plasmid로 이루어져 있다(Cho et al. 2013a; Cong et al. 2013; Jinek et al. 2013; Mali et al. 2013b). 또한 우리는 sgRNA를 in vitro transcription 해서 만들고 대장균에서 발현하여 정제한 Cas9과 complex를 만든 후 동물 수정란에 주입하여 돌연변이 개체를 만드는 방법을 개발하였다(Cho et al. 2013b; Cho et al. 2013c). Plasmid를 사용하는 방법에 비해 Cas9 protein, in vitro transcribed sgRNA를 사용하면 transcription, translation 과정이 생략되기 때문에 보다 빠른 시간 내에 돌연변이가 유도되고 단 시간 동안에만 유전체가 RGEN에 노출되기 때문에 off-target effect가 줄어 드는 경향이 있다. 또한 시스템에 따라 promoter, codon 최적화를 해야 할 필요가 없다는 장점도 있다. RGEN의 가장 큰 장점은 ZFN이나 TALEN 처럼 DNA-binding domain을 매번 새로 만들 필요가 없이 RNA만 교체하여 손쉽게 활용할 수 있다는 데에 있다. 지난 1월, 본 연구진을 포

표 1. ZFN, TALEN과 RGEN의 비교분석

	ZFN	TALEN	RGEN
DNA recognition	Protein–DNA interaction	Protein–DNA interaction	Watson–Crick base pairing
Components	Zinc finger–FokI	TALE–FokI fusion	Guided RNA and Cas9
Efficiency	Low and variable	High and variable	High and variable
Off–target effects	severe	moderate	Severe?
Targetable site	Guanine–rich	No limitation	PAM (NGG) recognition
Work in pair/dimer	Yes	Yes	No
Target DNA length	2 X 9~18 bp+ spacer (5~6 bp)	2 X 14~20 bp+ spacer (12~19 bp)	~23 bp
Origen of discovery	Eukaryotes (zinc finger)	Plant pathogen	prokaryotes

함한 6개 연구진이 동시에 RGEN을 소개한 이후(Cho et al. 2013a; Cong et al. 2013; Hwang et al. 2013; Jiang et al. 2013; Jinek et al. 2013; Mali et al. 2013b), 수개월 만에 인간배아줄기세포 비롯하여 mouse, zebrafish, drosophila, c. elegans, rice, Arabidopsis에 이르기까지 다양한 시스템에서 원하는 유전자를 제거하거나 외부 유전자를 원하는 위치에 삽입할 수 있음이 입증되었다. RGEN을 만드는데 필요한 plasmid들은 Addgene, System Biosciences, Inc에서 구매하여 연구자가 직접 제작할 수 있다. ㈜툴젠은 recombinant Cas9 protein, 연구자가 원하는 유전자를 녹아웃 하기에 최적화한 sgRNA와 이를 지정하는 plasmid를 제공한다.

유전자가위의 문제점과 개선 방법

Off–target effect: 유전자가위는 원하는 DNA 염기서열뿐만 아니라 이와 유사한 염기서열을 지닌 위치에 작동함으로써 예상했던 곳과 전혀 다른 위치에 유전자 변이를 유발하기도 한다(Bibikova et al. 2002; Olsen et al. 2009). 이는 유전자가위에 의해서 유도된 DSB foci (genotoxicity assay)와 유전자가위 작동 후 cell survival rate (cytotoxicity assay)을 관찰함으로써 측정이 가능하다(Cornu et al. 2008). Off–target effect는 낮은 DNA binding specificity로 인해 타겟 염기서열과 비슷한 염기서열을 구분하지 못하기 때문으로, ZFN에 의한 cytotoxicity의 주된 원인이 되기도 한다. 이를 제어하기 위해 DNA binding affinity, 세포 내에서 발현 정도, 그리고 유전체 내에 존재하는 유사 염기서열과 최소한 3bp 이상 차이를 보이는 타겟 염기서열 선정 등이 고려되어야 한다(Pattanayak et al. 2011). TALEN은 ZFN에 비해 낮은 off–target effect와 적은 cell toxicity 가 보고 되었는데 이는 TALE protein이 DNA를 인식하는 방식이 ZFN과 다르기 때문이다(Moscou and Bogdanove 2009; Morbitzer et al. 2010). Dimer로만 작용하는 ZFN, TALEN과는 달리 RGEN은 monomer로 작동하기 때문에 off–target effect가 더욱 문제될 수 있다. 최근 연구결과에 의하면 RGEN은 23–bp 염기서열에서 최대 5개의 염기가 다른 off–target에서도 변이를 일으켰다(Fu et al. 2013; Hsu et al. 2013). 본 연구진은 최근 sgRNA를 개선하여 off–target effect를 현저히 줄일 수 있음을 증명하였다(Cho et al. 2013c)

Nickase: 유전자가위에 의해 발생하는 off–target mutation을 제어하기 위한 한 방법으로 DNA 두 가닥 중 한쪽 가닥만 절단하여 Single–strand break(SSB) 또는 nick을 일으키는 방법이 고안되었다. Dimer로 작동하는 ZFN의 경우에는 한쪽 monomer의 FokI domain 을 불활성화시켜 ZF nickase를 만들 수 있다. DSB는 주로 비상동재접합 기전에 의해 수선이 되는 데, 이 과정 동안에 발생하는 에러로 인해 절단된 DNA 부위에 small indel이 야기되어 유전자 변이가 발생한다. ZF nickase는 ZFN과는 달리 비상동재접합을 일으키지 않아 off–target site에 변이를 도입하지 않으면서 상동재조합에 의해 표적 장소에 유전자교정을 유도할 수 있다(Kim et al. 2012). 그러나 nickase는 DSB를 생성하는 nuclease에 비해 전반적으로 돌연변이 효율이 낮은 문제가 있다. RGEN의 경우에는 Cas9 단백질 내부에 존재하는 active site 두 곳이 각각 서로 다른

DNA 가닥을 자르게 되는데 이 중 한 active site을 불활성화시키면 nickase가 만들어진다. Nickase 두 개를 사용하여 DNA 두 가닥 각각에 nick을 유도하여 높은 효율로 돌연변이를 도입하는 방법도 개발되었다(Kim et al. 2012; Cho et al. 2013c; Mali et al. 2013a; Ran et al. 2013)

유전자가위의 활용

유전학 연구: 유전자가위는 특정 유정자의 정확한 위치를 타겟 함으로써 model organism, cell line에서 유전자 변이를 유도하여 그 기능을 연구하는데 사용된다. 즉 모델 동물로 널리 활용되는 zebrafish(Doyon et al. 2008; Meng et al. 2008; Sander et al. 2011), rat, mouse (Geurts et al. 2009; Tesson et al. 2011; Sung et al. 2013), Drosaphila(Bibikova et al. 2002; Bibikova et al. 2003), C. elegans(Morton et al. 2006) 등에서 유전자가위를 이용한 녹아웃 동물이 생산되었다. 최근에는 monarch butterfly(Merlin et al. 2013), 귀뚜라미, 개구리(Young et al. 2011), 모기와 같이 전통적으로 모델 동물로 사용되지 않았던 동물들에서도 유전자가위가 사용되고 있다. 또한 유전자의 원하는 위치에 외래 유전자가 삽입된 개체를 만들기 위해 수정란에 TALEN mRNA와 더불어 single strand oligonucleotides(Bedell et al. 2012) 또는 donor plasmid(Zu et al. 2013)를 동시에 미세 주입하여 loxP가 특정

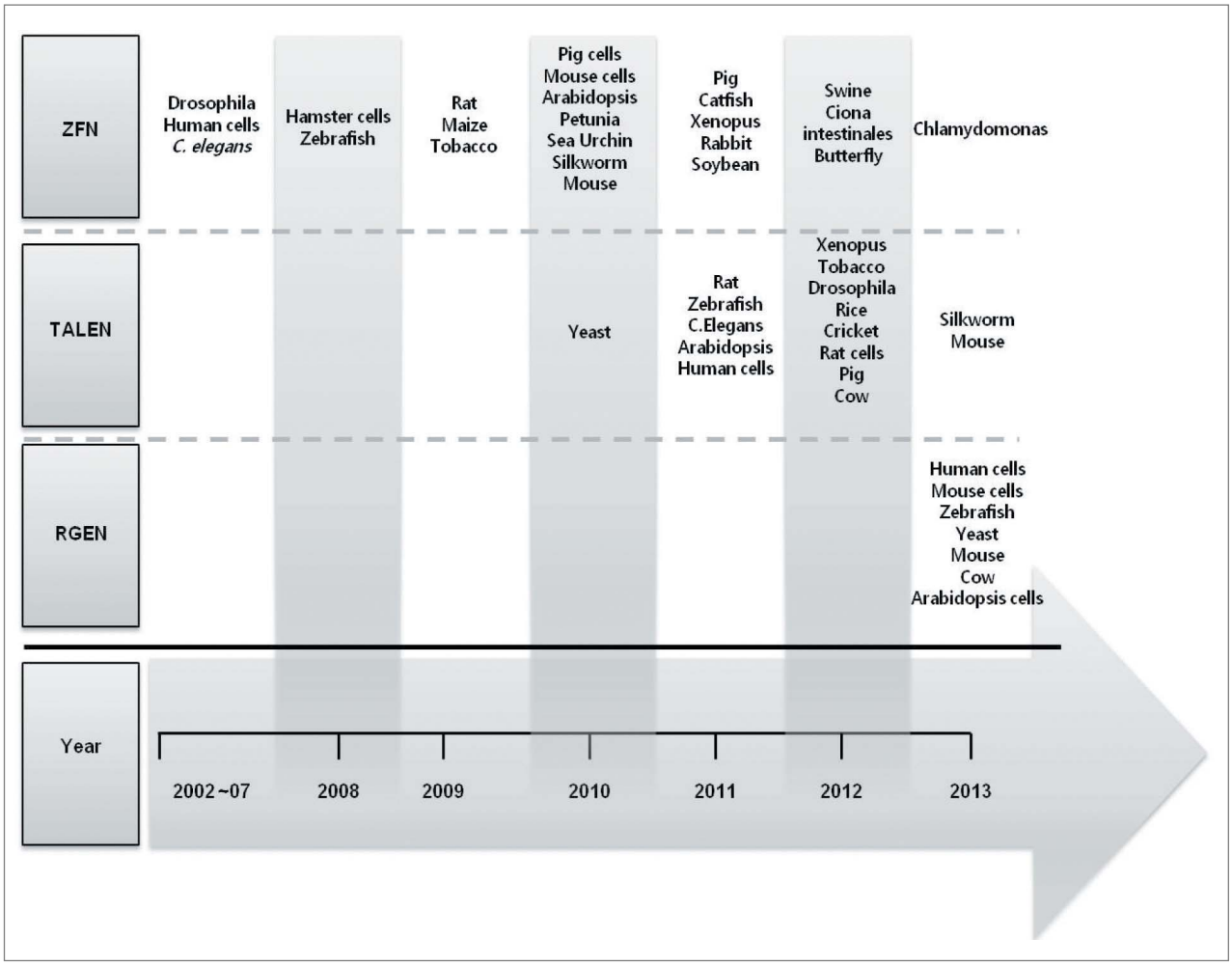


그림 2. 유전자가위 기술이 적용된 생물

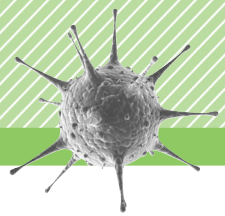
위치에 삽입된 zebrafish를 만든 사례도 발표 되었다. 식물에서도 ZFN과 TALEN을 사용하여 Arabidopsis(Zhang et al. 2010)와 여러 농작물에서 특정 질병(Li et al. 2012) 및 제초제에 저항성(Shukla et al. 2009; Townsend et al. 2009)을 지닌 개체가 만들어 졌으며, RGEN에 의해서도 식물세포에서 유전적 변이를 일으킬 수 있다는 사실이 최근 보고되었다(Li et al. 2013; Nekrasov et al. 2013; Shan et al. 2013). 이처럼 다양한 생명체에서 유전자가위를 이용하여 유전 형질이 변화된 새로운 개체 모델을 만들려는 시도는 지속적으로 증가하고 있으며, 이를 통해 유전자의 기능을 규명하고 이에 따른 새로운 이론을 정립함으로써 생명과학의 발전을 도모할 수 있을 것으로 기대된다.

생명공학: 유전자가위 기술은 돼지, 소 등과 같은 가축에도 활용되고 있다(Hauschild et al. 2011; Carlson et al. 2012). 예를 들어 돼지의 장기와 세포를 사람에 이식할 때 초급성 거부반응을 일으키는 glycoantigen을 제거하기 위해 돼지 유전자 GGTA1, CMAH 등이 녹아웃된 돼지를 생산한 사례가 보고 되었다(Hauschild et al. 2011; Kwon et al. 2013). 또한 우유에 존재하는 대표적 단백질 allegen인 beta-lactoglobulin의 생성을 억제하기 위해서 젖소의 BLG 유전자를 녹아웃 하려는 시도도 보고 되었다(Yu et al. 2011). 또한 항체와 같은 단백질 약제를 생산하기 위해 사용되는 CHO cell의 유전자를 녹아웃하거나 교정하여 약효를 높이거나 생산성을 높이려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

Therapeutic application: 유전자가위는 질병의 근본적인 원인을 정확하게 교정하여 치료한다는 점에서 치료용 유전자를 무작위적으로 도입하는 기존 유전자치료 방식에 비해 진일보한 기술이라고 할 수 있다. 지난 수년 동안, 유전자가위를 이용해 X-linked servere combined immune deficiency (SKID) (Urnov et al. 2005), hemophilia B(Li et al. 2011), hemophilia A(Lee et al. 2012), sickle-cell disease(Zou et al. 2011), α_1-anti-trypsin deficiency(Yusa et al. 2011) 등 다양한 유전질환의 변이를 교정한 사례가 보고 되었고, 특히 parkinson's diease의 경우 환자에서 세포를 채취 후 건립된 iPS cell에서 유전자 교정을 유도하는데 성공하였다(Soldner et al. 2011). 유전자가위는 유전질환 이외에도 AIDS와 같은 감염성 질환에도 활용되고 있다. 즉 질병 발생의 원인이 되는 유전자를 제거함으로써 치료에 활용하는 것이다. AIDS는 그 원인 바이러스인 HIV가 co-receptor인 C-C chemokine receptor type 5(CCR5)를 통해 T-cell에 들어가 면역작용을 파괴하여 초래되는 질병으로, 자연적으로 CCR5에 변이가 생긴 사람들은 AIDS에 걸리지 않는다는 사실이 잘 알려져 있다. 이에 착안하여 Sangamo Biosciences, Inc.는 인간의 primary T-cell(Perez et al. 2008)과 hematopoietic stem/progenitor cell (Holt et al. 2010)에서 ZFN을 이용해 CCR5 유전자를 녹아웃 할 수 있음을 보였고, 현재 미국에서 이 방법을 이용한 임상시험이 진행 중이다. 또한 ZFN을 사용하여 CCR5 위치에 anti-HIV restriction factor를 삽입하였을 때 HIV의 R5-와 X4-tropic strain의 감염을 거의 완벽히 차단함을 볼 수 있었다(Voit et al. 2013). ZFN은 암세포 특이적으로 작동하는 engineered T-cell을 만들기 위해 T-cell receptor 유전자를 녹아웃 하는 데에도 활용되었다(Provasi et al. 2012; Torikai et al. 2012). ZFN에 비해 진보한 TALEN, RGEN의 개발 이후 유전자가위를 이용한 줄기세포, 체세포의 유전자 교정을 통한 치료법 개발은 더욱 활발히 수행될 것으로 예상된다.

결 론

지난 20여 년 동안 국내외 여러 연구진의 노력에 의해 세 종류의 유전자가위가 개발되었고 이를 이용해 인간을 비롯한 다양한 동식물 세포에서 높은 효율로 연구자들이 원하는 DNA 위치에 돌연변이를 도입하거나 유전체를 편집하여 재배열 할 수 있게 되었다. 유전자가위는 DNA를 표적으로 한다는 점에서 RNA를 표적으로 하는 siRNA, 주로 단백질을 표적으로 하는 항체와 더불어 생명과학의 필수적인 연구수단으로 자리잡게 되었다. 하지만 유전자가위를 다양한 시스템에서 보다 안정적이고 효율적으로 이용하기 위해서는 다음과 같은 문제를 해결하기 위한 추가적인 연구가 수행되어야 한다. 첫째, 유전자가위의 off-target mutation을 손쉽게 확인 할 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 둘째, off-target mutation을 일으키지 않는 정



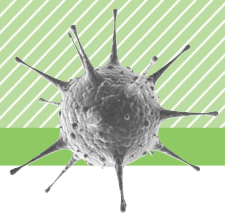
교한 유전자가위가 개발되어야 한다. 셋째, 유전자가위를 모든 세포 내로 골고루 전달할 수 있는 방법이 개발되면 유전자치료의 효율을 크게 높일 수 있다. 넷째, 비상동재접합을 억제하고 상동재조합을 활성화할 수 있는 약물이나 siRNA를 확보할 수 있으면 정교한 유전자 변이를 도입하는데 매우 유리하다. 다섯째, 유전자가위의 효과를 사전에 예측할 수 있으면 활성 높은 유전자가위를 제작하는데 매우 요긴할 것이다. RGEN의 경우 인간배양세포에서 평균적으로 20% 이상의 높은 돌연변이 효율을 나타내지만 그 분포는 0%에서 99%까지 극도로 다양하다. 여섯째, RGEN에 이은 제4세대 유전자가위의 개발이 가능한가?

향후 수십 년 동안 유전자가위는 농작물, 화훼, 삼림, 가축, 어류 등 우리 주변의 다양한 생명체의 유전체를 교정하는 수단으로 널리 활용될 것으로 예상된다. 또한 유전질환을 포함한 다양한 난치성 질환의 치료법으로 개발될 것으로 기대된다. 결론적으로 ZFN, TALEN, 그리고 RGEN은 21세기 생명과학, 생명공학, 분자의학의 필수적이고 강력한 도구가 될 것이다. C. elegans를 유전학 연구의 모델시스템으로 처음 도입한 업적을 인정 받아 노벨생리학 및 의학상을 수상한 Sydney Brenner 박사의 말씀을 인용하며 이 논단을 마무리하고자 한다. "Progress in science depends on new technologies, new discoveries, and new ideas, probably in that order."

참고문헌

1. Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG, 2nd, Tan W, Penheiter SG, Ma AC, Leung AY et al. 2012. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature 491(7422): 114-118.
2. Bhakta MS, Henry IM, Ousterout DG, Das KT, Lockwood SH, Meckler JF, Wallen MC, Zykovich A, Yu Y, Leo H et al. 2013. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. Genome Res 23(3): 530-538.
3. Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science 300(5620): 764.
4. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics 161(3): 1169-1175.
5. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 326(5959): 1509-1512.
6. Briggs AW, Rios X, Chari R, Yang L, Zhang F, Mali P, Church GM. 2012. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. Nucleic Acids Res 40(15): e117.
7. Brunet E, Simsek D, Tomishima M, DeKelver R, Choi VM, Gregory P, Urnov F, Weinstock DM, Jasin M. 2009. Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 106(26): 10620-10625.
8. Capecchi MR. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. Nat Rev Genet 6(6): 507-512.
9. Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. Proc Natl Acad Sci U S A 109(43): 17382-17387.
10. Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res 39(12): e82.
11. Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, Collingwood TN, Frodin M, Davis GD. 2011. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nat Methods 8(9): 753-755.
12. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. 2013a. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol 31(3): 230-

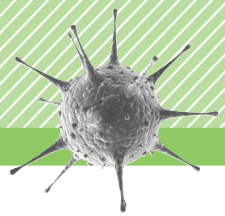
232.
13. Cho SW, Lee J, Carroll D, Kim JS, Lee J. 2013b. Heritable Gene Knockout in Caenorhabditis elegans by Direct Injection of Cas9-sgRNA Ribonucleoproteins. Genetics.
14. Cho SW, S. K, Kim Y, J. K, H.S. K, S. B, J.S. K. 2013c. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. Genome Res In press.
15. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA et al. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339(6121): 819-823.
16. Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Guhl E, Alwin S, Eichtinger M, Joung JK, Cathomen T. 2008. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. Mol Ther 16(2): 352-358.
17. Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ et al. 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 26(6): 702-708.
18. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X et al. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. Science 325(5939): 433.
19. Gonzalez B, Schwimmer LJ, Fuller RP, Ye Y, Asawapornmongkol L, Barbas CF, 3rd. 2010. Modular system for the construction of zinc-finger libraries and proteins. Nat Protoc 5(4): 791-810.
20. Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R et al. 2011. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. Proc Natl Acad Sci U S A 108(29): 12013-12017.
21. Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC et al. 2010. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. Nat Biotechnol 28(8): 839-847.
22. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol 31(3): 227-229.
23. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nat Biotechnol 31(3): 233-239.
24. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337(6096): 816-821.
25. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. Elife 2: e00471.
26. Joung JK, Sander JD. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nat Rev Mol Cell Biol 14(1): 49-55.
27. Kim E, Kim S, Kim DH, Choi BS, Choi IY, Kim JS. 2012. Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. Genome Res 22(7): 1327-1333.
28. Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS. 2009. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. Genome Res 19(7): 1279-1288.
29. Kim S, Lee MJ, Kim H, Kang M, Kim JS. 2011. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. Nat Methods 8(1): 7.
23. Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, Kim S, Lee C, Jeong E, Chung E et al. 2013. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. Nat Biotechnol 31(3): 251-258.
24. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci U S A 93(3): 1156-1160.
25. Kwon DN, Lee K, Kang MJ, Choi YJ, Park C, Whyte JJ, Brown AN, Kim JH, Samuel M, Mao J et al. 2013. Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. Sci Rep 3: 1981.



26. Lee HJ, Kim E, Kim JS. 2010. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. Genome Res 20(1): 81-89.
27. Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS. 2012. Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. Genome Res 22(3): 539-548.
28. Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L et al. 2011. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. Nature 475(7355): 217-221.
29. Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. Nat Biotechnol 31(8): 688-691.
30. Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nat Biotechnol 30(5): 390-392.
31. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichtinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA et al. 2008. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. Mol Cell 31(2): 294-301.
32. Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM. 2013a. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nat Biotechnol 31(9): 833-838.
33. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013b. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339(6121): 823-826.
34. McManus MT, Sharp PA. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet 3(10): 737-747.
35. Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. 2008. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 26(6): 695-701.
36. Merlin C, Beaver LE, Taylor OR, Wolfe SA, Reppert SM. 2013. Efficient targeted mutagenesis in the monarch butterfly using zinc-finger nucleases. Genome Res 23(1): 159-168.
37. Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ et al. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol 29(2): 143-148.
38. Morbitzer R, Romer P, Boch J, Lahaye T. 2010. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A 107(50): 21617-21622.
39. Morton J, Davis MW, Jorgensen EM, Carroll D. 2006. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in Caenorhabditis elegans somatic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 103(44): 16370-16375.
40. Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326(5959): 1501.
41. Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant Nicotiana benthamiana using Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol 31(8): 691-693.
42. Olsen PA, Solhaug A, Booth JA, Gelazauskaite M, Krauss S. 2009. Cellular responses to targeted genomic sequence modification using single-stranded oligonucleotides and zinc-finger nucleases. DNA Repair (Amst) 8(3): 298-308.
43. Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. 2011. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. Nat Methods 8(9): 765-770.
44. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL et al. 2008. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 26(7): 808-816.
45. Provasi E, Genovese P, Lombardo A, Magnani Z, Liu

PQ, Reik A, Chu V, Paschon DE, Zhang L, Kuball J et al. 2012. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. Nat Med 18(5): 807-815.

46. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y et al. 2013. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. Cell 154(6): 1380-1389.
47. Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 30(5): 460-465.
48. Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JR. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. Nat Biotechnol 29(8): 697-698.
49. Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC et al. 2008. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. Proc Natl Acad Sci U S A 105(15): 5809-5814.
50. Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Honing K, Hornung V. 2013. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. Nat Biotechnol 31(1): 76-81.
51. Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL et al. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol 31(8): 686-688.
52. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKelver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X et al. 2009. Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. Nature 459(7245): 437-441.
53. Soldner F, Laganiere J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, Khurana V, Golbe LI, Myers RH, Lindquist S et al. 2011. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. Cell 146(2): 318-331.
54. Sung YH, Baek IJ, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, Jeong D, Kim JS, Lee HW. 2013. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. Nat Biotechnol 31(1): 23-24.
55. Tesson L, Usal C, Menoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L et al. 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. Nat Biotechnol 29(8): 695-696.
56. Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, Huls H, Miller JC, Kebriaei P, Rabinovitch B et al. 2012. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. Blood 119(24): 5697-5705.
57. Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Nature 459(7245): 442-445.
58. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature 435(7042): 646-651.
59. Voit RA, McMahon MA, Sawyer SL, Porteus MH. 2013. Generation of an HIV resistant T-cell line by targeted "stacking" of restriction factors. Mol Ther 21(4): 786-795.
60. Young JJ, Cherone JM, Doyon Y, Ankoudinova I, Faraji FM, Lee AH, Ngo C, Guschin DY, Paschon DE, Miller JC et al. 2011. Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog Xenopus tropicalis using engineered zinc-finger nucleases. Proc Natl Acad Sci U S A 108(17): 7052-7057.
61. Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. 2011. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. Cell Res 21(11): 1638-1640.
62. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordonez A, Hannan NR, Rouhani FJ et al. 2011. Targeted gene correction of



alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. Nature 478(7369): 391-394.

63. Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T et al. 2010. High frequency targeted mutagenesis in Arabidopsis thaliana using zinc finger nucleases. Proc Natl Acad Sci U S A 107(26): 12028-12033.
64. Zou J, Mali P, Huang X, Dowey SN, Cheng L. 2011. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. Blood 118(17): 4599-4608.
65. Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, Hu Y, Luo Z, Huang P, Wu Q et al. 2013. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. Nat Methods 10(4): 329-331.
66. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD.2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat Biotechnol 31(9): 822-826.
67. Hsu PD, Scott DA,Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O et al. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol 31(9): 827-832.

저|자|약|력

위 갑 인

1993. 03 – 1999. 02	전남대학교 동물자원학과 학사
1999. 03 – 2001. 02	전남대학교 낙농학과 석사
2001. 03 – 2004. 08	전남대학교 동물산업학과 박사
2004. 09 – 2006. 09	한국생명공학연구원 박사후연구원
2006. 10 – 2008. 08	한국과학기술원 박사후연구원
2008. 08 – 2011. 09	미국 미시간주립대학교 박사후연구원
2011. 10 –	현재 서울대학교 유전체공학 창의연구단 연구교수

저|자|약|력

김 진 수

1983. 03 – 1987. 02	서울대학교 화학과 학사
1987. 03 – 1989. 02	서울대학교 화학과 석사
1990. 08 – 1994. 08	University of Wisconsin-Madiaon 생화학 박사
1994. 09 – 1997. 11	Howard Hughes Medical School/ MIT 박사후 연구원
1997. 12 – 1999. 08	삼성생명과학연구소 연구책임자
1999. 10 – 2005. 08	(주)툴젠 대표이사/연구소장
2005. 09 –	현재 서울대학교 화학부 조/부교수