

미토콘드리아 유전자 치료

인제대학교 의과대학 내과학교실

고경수

Mitochondrial Gene Therapy

Kyung Soo Ko

Mitochondrial Research Group, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Inje University

Abstract

Mitochondrial dysfunction contributes to a large variety of human disorders, ranging from neurodegenerative and neuromuscular diseases, obesity, and diabetes to ischemia-reperfusion injury and cancer. Increasing pharmacological efforts toward therapeutic interventions have been made leading to the emergence of 'Mitochondrial Medicine' as a new field of biomedical research. The identification of molecular mitochondrial drugs targets in combination with the development of methods for selectively delivering biologically active molecules to the site of mitochondria will eventually launch a multitude of new therapies for the treatment of mitochondria-related diseases, which are based either on the selective protection, repair, or eradication of cells. Yet, while tremendous efforts are being undertaken to identify new mitochondrial drugs and drug targets, the development of mitochondria-specific drug carrier systems is lagging behind. To ensure a high efficiency of current and future mitochondrial therapeutics, delivery systems need to be developed, which are able to selectively transport biologically active molecules to and into mitochondria within living cells. (J Kor Diabetes Assoc 31:187~192, 2007)

Key Words: DNA delivery, gene carrier, Mitochondria, Mitochondrial leader peptide

서 론

미토콘드리아는 생명현상의 중심기관으로서 인간 질병과의 관련성이 최초로 밝혀진 세포 내 기관이다¹⁾. 미토콘드리아가 고유의 자체 유전물질(mitochondrial DNA, mtDNA)을 가지고 있음이 1963년 밝혀진 이후²⁾ 1981년 인간 미토콘드리아 DNA의 염기서열이 보고되었다³⁾. 이후 1980년 대 후반부터 mtDNA의 점 돌연변이가 드문 질환들을 유발한다는 사실이 보고되었으며^{4,5)}, 최근에는 우리가 흔히 접할 수 있는 질환들도 미토콘드리아 기능장애와 관련 있다는 연구결과들이 보고되고 있다.

현재까지 특정 조직이나 세포를 목표로 하는 약물 또는 유전자치료를 위한 연구는 많이 이루어진 상태이며, 이를 바탕으로 앞으로는 특정 세포 내 소기관을 목표로 하는 치료가 활발해질 것으로 예상되며, 미토콘드리아는 이러한 추

세를 반영하는 대표적인 세포 내 소기관이다. 따라서 미토콘드리아를 목표로 하는 약물이나 유전자치료 분야가 점점 활성화될 것이라는 것은 자명한 사실이지만, 아직까지 그에 대한 연구결과가 많지는 않은 실정이다. 본 글에서는 미토콘드리아 유전자의 특성과 현재까지 이루어진 미토콘드리아를 목표로 하는 유전자 치료의 현황과 앞으로의 전망에 관하여 살펴보고자 한다.

미토콘드리아 DNA의 특성

인간 미토콘드리아 유전자는 double-stranded 16,569 bp 분자로써³⁾ 미토콘드리아 기질 내에서 복제와 전사가 이루어진다⁶⁾. 미토콘드리아 DNA는 37종류의 유전자를 가지고 있는데, 이 중 24개는 단백질 합성에 필요한 RNA를 encoding하며(22 tRNA, 2 rRNA), 나머지 13개는 산화인산

* 본 논문은 2002년도 인제대학교 학술연구조성비의 일부 지원으로 이루어짐.

화 조절에 중요한 역할을 하는 호흡사슬의 주요 단백질을 encoding한다³⁾. 미토콘드리아 유전자는 핵 유전자와 구분되는 특이점이 있는데, 우선 포유류의 mtDNA는 인트론을 가지고 있지 않으며, 일부 미토콘드리아 유전 코돈은 universal nuclear genetic code와 다르다. 또한 유전양상의 특성이 모계유전을 나타내며⁷⁾, 돌연변이가 고정될 확률이 핵 유전자의 돌연변이 고정률보다 10배 이상 높은 것으로 알려져 있다⁸⁾.

생물학적 활성분자의 미토콘드리아 전달

미토콘드리아는 세포의 에너지 대사와 세포자멸사 (apoptosis) 조절에 중요한 역할을 하므로 여러 종류의 약물 치료의 주된 목표가 된다. 또한 미토콘드리아는 세포 내 칼슘 농도 조절에 관여할 뿐 아니라 미토콘드리아 호흡사슬은 활성 산소를 무력화시킨다. 결과적으로 미토콘드리아 기능 이상은 당뇨병, 심근병증, 불임, 실명, 신장/간 질환, 뇌졸중 등의 성인 질병과 밀접한 관계가 있으며⁹⁾, 미토콘드리아 유전자의 돌연변이는 노화, 퇴행성 신경질환, 암 질환 등의 발병에 관여할 가능성이 제기되고 있다.

이러한 미토콘드리아 이상과 연관된 질환의 특성을 고려하면 대사의 최종경로인 호흡사슬 이상과 연관되어 있어서 기존의 생화학적 접근법으로는 치료가 어려운 측면이 있어서 아래와 같은 방법들을 이용하여 치료하고자 하는 시도가 있다.

- 1) 미토콘드리아의 유전자 이상을 교정하기 위한 치료 목적의 DNA, RNA의 전달
- 2) 산화 스트레스로 인한 미토콘드리아의 손상을 보호하기 위한 항산화물질의 전달

- 3) 항암치료를 위한 미토콘드리아 특이적 독소 또는 세포자멸사 유도물질의 전달
- 4) 비만 치료를 위한 미토콘드리아 uncoupling protein 타겟 약물의 전달
- 5) 단백질이나 펩티드의 미토콘드리아로의 전달

미토콘드리아 유전자 치료의 접근법

미토콘드리아 유전자 치료의 접근법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다¹⁰⁾(Fig. 1). 첫 번째 방법은 DNA를 직접 미토콘드리아로 전달하고 미토콘드리아 내에서 전사, 암호해독 과정을 거쳐 단백질로 발현시키는 것이며, 두 번째 방법은 미토콘드리아 이상을 초래한 유전자를 핵으로 전달하여 세포질에서 발현(allotopic expression)하게끔 한 후 미토콘드리아 leader peptide를 이용하여 미토콘드리아로 이동시키는 방법이다.

현재까지 이루어지고 있는 유전자 치료의 대부분은 세포핵을 타겟으로 하기 때문에 이를 위한 유전자 전달물질의 개발은 이미 광범위하게 이루어지고 있다. 그러나 핵을 통한 간접적인 미토콘드리아 targeting은 몇 가지 문제점을 내포하고 있다.

우선 미토콘드리아의 유전 code가 universal code와 다른 부분이 있으며¹¹⁾, 미토콘드리아의 heavy-strand promoter가 핵 DNA의 promoter로서 기능하지 않아 사람의 핵과 미토콘드리아의 전사 시스템이 기능적으로 서로 독립되어 있다는 가설을 뒷받침하는 것이다¹²⁾.

두 번째 문제점은 대부분의 mtDNA 결함은 tRNA를 포함하는데, 아직까지 사람의 경우 세포질 tRNA가 미토콘드리아로 이동한다는 확실한 증거가 없는 실정이다.

세 번째는 mtDNA에 의해 합성되는 단백질은 hydrophobicity

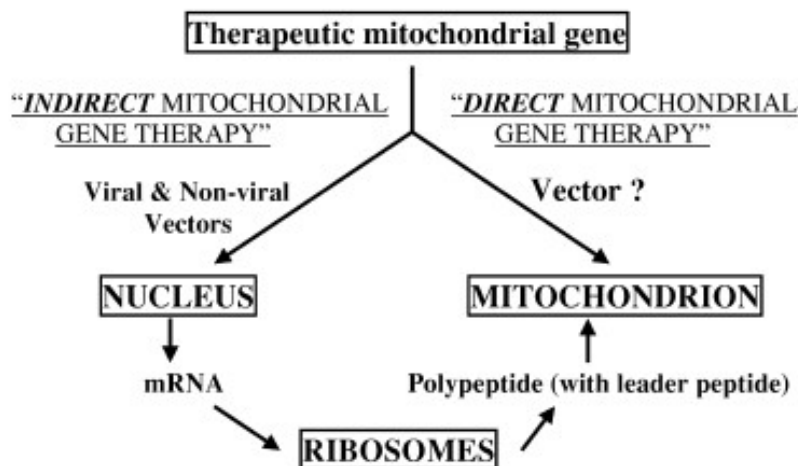


Fig. 1. Schematic illustration of the two principal strategies for mitochondrial gene therapy.

가 높아서 미토콘드리아의 protein import machinery를 통하여 이동하기 어렵다는 점이다. 최근에는 이를 극복하기 위하여 protein-splicing element를 삽입하여 hydrophobicity를 줄이고자 하는 노력이 있다.

마지막으로 미토콘드리아에서 발현되는 단백질 중 일부는 세포질에서 발현될 경우 독성을 나타낼 가능성이 제기되고 있다.

유전물질을 미토콘드리아로 직접 전달하는 방법은 여러

종류의 유전자 전달 물질을 이용한 보고가 있으나 아직까지 외부에서 투여한 유전물질을 미토콘드리아에서 기능적 발현을 시켰다는 보고는 없다. 기능성 단백질을 미토콘드리아에서 발현시키기 위해서는 우선 미토콘드리아에 특이성을 가진 regulator sequence를 포함하는 적절한 플라스미드의 제작이 필요한데, 현실적으로는 플라스미드 DNA를 미토콘드리아 간질 내로 효과적으로 전달하는 방법을 모색하는 것이 급선무이다.

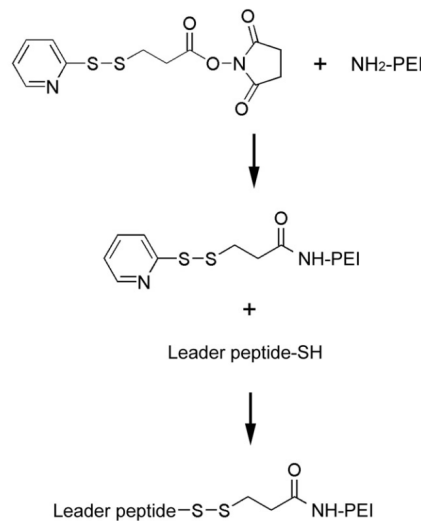


Fig. 2. Synthetic scheme of PEI-LP.

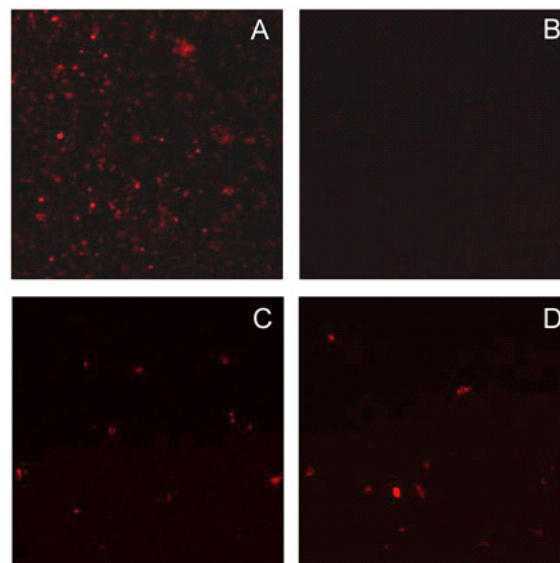


Fig. 3. Cell free assay with isolated mitochondria. Mitochondria were isolated from A7R5 cells. The RITC-labeled pDNA was complexed with PEI-LP at a 0.4/1 or 0.8/1 weight ratio. Naked pDNA or PEI-LP/pDNA complex was incubated with isolated mitochondria. After washing, the mitochondria were observed on a confocal microscopy. (A) Rhodamin-123 as a positive control, (B) Naked pDNA, (C) PEI-LP/pDNA complex at a 0.4/1 weight ratio, (D) PEI-LP/pDNA complex at a 0.8/1 weight ratio.

현재 미토콘드리아 유전자 치료의 전달물질로의 가능성이 거론되고 있는 것은 기존의 유전자 치료 전달물질로 널리 알려진 리포솜이나 합성 고분자 물질이다. 이 두 가지 물질 모두 양전하를 띠고 있어서 세포막의 음전하와 상호 작용하여 세포질로의 이동을 촉진시키는 작용을 한다. 또한 음전하를 띤 DNA를 효율적으로 condense시켜 최소의 부피로 최대의 전달 효율을 기대할 수 있으며 세포 내외의 핵산 분해효소에 의한 파괴로부터 DNA를 보호하는 작용을 나타낸다. 그러나 현재까지 이루어진 연구결과를 보면 이러한 기존의 유전자 전달물질을 사용할 경우 대부분의 DNA가 주로 핵 주변으로 전달되기 때문에 실제 미토콘드리아로 전달되는 양은 대단히 적은 것으로 알려져 있다.

이를 극복하기 위한 방안으로 현재 미토콘드리아에 특이적인 친화성을 가진 유전자 전달물질에 관한 연구가 활발한

데, 이는 유전자 전달뿐 아니라 미토콘드리아와 여러 질환들과의 관련성을 생각한다면 치료용 약물이나 단백질의 미토콘드리아로의 전달 또한 대단히 중요한 임상적 의미를 가지기 때문이다. 그러나 유전자 전달물질을 약물이나 단백질 전달물질로 바로 이용하기에는 약물이나 단백질의 물리화학적 성질이 유전자와 다르기 때문에 전달물질의 또 다른 화학적 변형이 필요할 것으로 생각된다. 미토콘드리아 친화성 전달물질의 개발 중 가장 주목할만한 것은 미토콘드리아막의 전위차나 막내외의 pH 차이로 인해 발생하는 transmembrane electrochemical gradient를 이용하는 것으로서, 세포 내 다른 소기관과 미토콘드리아와의 이러한 차이점을 응용하는 새로운 전달 물질이 개발된다면 현재보다 더 효율적인 미토콘드리아 targeting이 가능해질 것으로 생각된다.

유전물질을 미토콘드리아로 보낼 수 있는 또 다른 가능

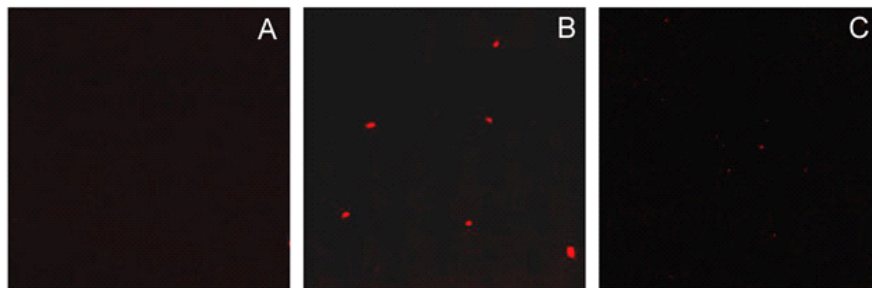


Fig. 4. Comparison of PEI-LP with PEI in cell free assay. Mitochondria were isolated from A7R5 cells. PEI-LP/pDNA and PEI/pDNA complexes were prepared as described in Materials and methods. Naked pDNA or polymer/pDNA complex was incubated with isolated mitochondria. After washing, the mitochondria were observed on a confocal microscopy. (A) Naked pDNA (B) PEI-LP/pDNA complex, (C) PEI/pDNA complex.

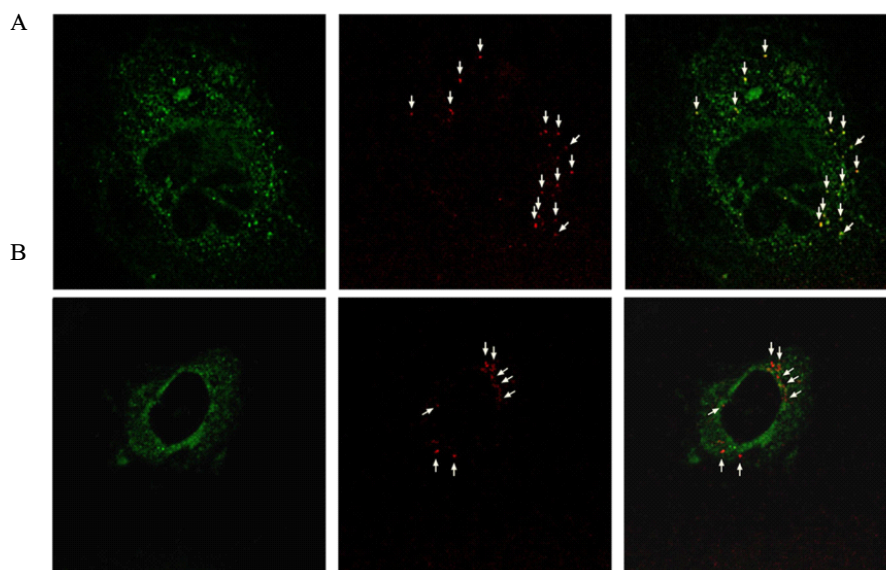


Fig. 5. In vitro pDNA delivery to mitochondria sites in a living cell. PEI-LP/pDNA and PEI/pDNA complexes were prepared as described in Materials and methods. Polymer/pDNA complexes were transfected to A7R5 cells. The locations of mitochondria were detected using Mitotracker green. The cells were fixed and visualized on a confocal microscope. (A) PEI-LP/pDNA complex, (B) PEI/pDNA complex.

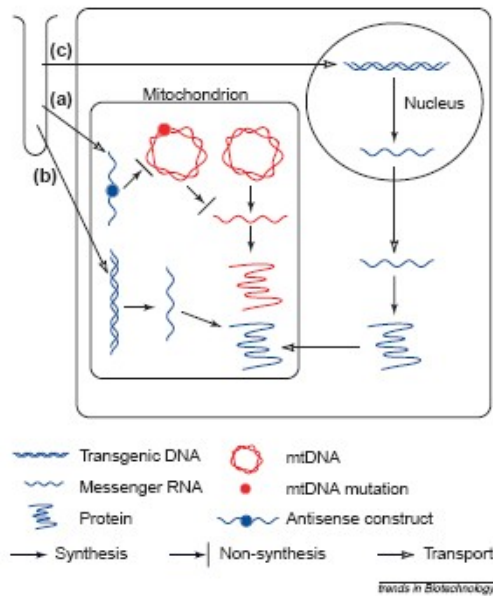


Fig. 6. Three approaches to mitochondrial gene therapy. (a) antisense-mediated inhibition of the replication of mutant mitochondrial(mt) DNA, (b) introduction of replacement mtDNA into the mitochondria, (c) introduction of modified replacement DNA into the nucleus. Red represents endogenous molecules and blue represents transgenic constructs and their products.

한 방법은 미토콘드리아의 protein import 경로를 따라 가는 것이다. 미토콘드리아 단백질 중 oxidative phosphorylation에 관여하는 단백질을 제외한 대부분은 세포질에서 합성되어 미토콘드리아로 이동하게 된다. 이를 위하여 미토콘드리아의 막, 간질, 막간 등에 단백질 이동을 위한 복잡한 기전이 작동하는 것으로 알려져 있으며, 특정한 미토콘드리아 leader sequence를 가진 단백질의 경우 미토콘드리아 내의 간질까지 이동한 후 leader sequence가 분해되는 것으로 알려져 있다.

이러한 단백질 이동 경로를 이끄는 leader peptide를 DNA에 결합시켜 미토콘드리아로 직접 보내는 시도들이 비교적 성공적으로 보고된 바 있다.

저자들의 경우 효과적인 유전자 전달물질로 이미 알려진 polyethyleneimine에 leader peptide를 접합시킨 후(Fig. 2), reporter gene (Luciferase)를 포함한 플라스미드를 투여한 결과 in vitro 실험에서 미토콘드리아 targeting이 가능함을 보고한 바 있다(Fig. 3, 4, 5)¹³⁾.

유전자를 미토콘드리아로 보내는 방법 중 또 다른 가능성은 mtDNA의 돌연변이 sequence에 특이적으로 결합하는 antisense oligonucleotide를 투여하는 것이다(Fig. 6a). 이 치료의 목적은 변종의 복제를 억제함으로써 wild-type mtDNA의 복제수를 늘려나가는 것이지만 노화와 같이 여러 종류의 다른 세포에서 다양한 돌연변이가 생기는 경우 적용하기 어려우며, mtDNA의 결손을 초래할 위험성이 있다.

결론

최근 과학기술의 발달과 함께 미토콘드리아와 질병과의 관계가 밝혀진 이후 미토콘드리아를 타겟으로 하는 유전자를 포함하는 여러 가지 약물 개발이 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 미토콘드리아 고유의 구조적, 기능적 특성은 여러 가지 약물들을 미토콘드리아로 보내기 어려운 점이 있으나 현재까지 미토콘드리아를 효율적으로 targeting하는 전달 물질의 개발은 이루어지지 않고 있다.

또한 효율적으로 미토콘드리아를 targeting 하는 전달물질의 개발과 함께, 미토콘드리아 기능장애가 있는 특정 조직, 특정 세포를 target으로 하는 연구와 세포질에서 미토콘드리아로 전달되는 여러 단계의 세포 내 전달 과정을 조절할 수 있는 기능적 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B: A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41:1776-804, 1962
2. Nass MMK, Nass S: Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining

- reactions. J Cell Biol* 19:593-611, 1963
3. Anderson S, Bankier AT, Barell BG: *Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature* 290:457-65, 1981
4. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: *Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature* 331:717-9, 1988
5. Wallace DC, Singh G, Lott MT: *Mitochondrial DNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science* 242:1427-30, 1988
6. Clayton DA: *Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. Annu Rev Cell Biol* 7:453-78, 1991
7. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC: *Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA* 77:6715-9, 1980
8. Wallace DC: *Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative disease? Science* 256:628-32, 1992
9. Modica-Napolitano JS, Singh KK: *April mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. Expert Rev Mol Med* 11:1-19, 2002
10. Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Lightowlers RN, Turnbull DM: *Gene therapy for mitochondrial DNA defects: is it possible? Gene Ther* 2:311-6, 1995
11. Barell G, Bankier AT, Drouin J: *Different genetic code in human mitochondria. Nature* 282:189-94, 1979
12. Sowards R, Wiseman B, Jacobs HT: *Apparent functional independence of the mitochondrial and nuclear transcription systems in cultured human cells. Mol Gen Genet* 245:760-8, 1994
13. Lee M, Choi JS, Choi MJ, Kim-Pak Y, Rhee BD, Ko KS: *DNA delivery to the mitochondrial sites using mitochondrial leader peptide conjugated polyethylenimine. J Drug Targeting* 15:115-22, 2007