

2016 January | vol.2 | no.1

ISSN. 2465-8456

CRISPR/Cas9 Genome editing System
CLARITY

융합연구리뷰

Convergence Research Review



인간, 신의 영역에 도전하다
CRISPR/Cas9 유전자 가위 시스템
—
투명한 뇌, 뇌를 더 깊이 이해하다
CLARITY

목차

융합연구리뷰 | Convergence Research Review
2016 January vol.2 no.1

03 편집자주

인간, 신의 영역에 도전하다 CRISPR/Cas9 유전자 가위 시스템

04 (리뷰) 크리스퍼 유전자 가위에 의한 생명과학 혁명

26 (국가 R&D 사업 분석) 유전자 가위 시스템

투명한 뇌, 뇌를 더 깊이 이해하다 CLARITY

30 (리뷰) 삼차원 조직 변화 및 이미징

52 (국가 R&D 사업 분석) 3차원 생체 조직 이미징

자동차의 개념을 변화시키다 자율주행자동차와 스마트자동차

56 (위클리팁) 자율주행자동차 동향과 전망

68 (위클리팁) 5G가 적용된 스마트자동차의 동향 및 기술



발행일 2016년 1월 6일

발행인 하성도

발행처 한국과학기술연구원 융합연구정책센터
02792 서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
tel. 02-958-4984 | <http://crpc.kist.re.kr>

편집 (주)디자인플럼 tel. 051-202-9201

| 편집자주 |

인간, 신의 영역에 도전하다

CRISPR/Cas9 유전자 가위 시스템

DNA에 유전정보가 담겨 있다는 사실이 밝혀진 이래로 인간은 유전정보가 담긴 유전자를 원하는 형태로 바꿀 수 있는 유전자 재프로그래밍 방법인 유전자 가위에 대해 많은 관심을 가져왔다. 2013년 범용성이 크게 증가된 제3세대 유전자 가위인 CRISPR/Cas9가 개발되면서 유전자 재프로그래밍은 새로운 국면을 맞고 있다. 대다수가 불치병으로 분류되어 있는 유전 질병을 치료하거나 안전한 유전자 변형 식물 생산을 가능하게 하는 긍정적인 기대와 함께 인간 배아로의 적용할 경우 발생할 수 있는 윤리적인 문제 등도 야기되고 있다.

이에 이번 호의 1부에서는 그 유전자에 관계없이 활용할 수 있는 3세대 유전자 가위 CRISPR/Cas9 시스템의 최신 연구 동향 및 연구 방향, 이를 통한 활용 분야 등을 소개함으로써, 향후 유전자 가위가 실질적으로 활용될 때 발생할 수 있는 문제들을 미연에 방지할 수 있는 인문사회-과학기술의 융합연구들이 활발히 이루어져 유전자 재프로그래밍의 긍정적인 효과가 사회적 가치로 이어지기를 기대해 본다.

투명한 뇌, 뇌를 더 깊이 이해하게 만들다

CLARITY

생체의 원리를 파악하고 이해하는데 있어 필수적인 3차원 생체 조직을 이미징 기술은 물리, 화학, 기계, 전자 등 다양한 분야의 활발한 융합연구를 바탕으로 현재는 질병 진단에도 활용할 정도로 많은 발전을 거듭하였다. 하지만 뇌 조직을 연구하는 데에는 큰 어려움을 겪고 있던 상황에서 최근 조직을 투명하게 만들어 관찰을 가능하게 하는 CLARITY라는 기술이 개발되며, 뇌과학 연구는 새로운 국면을 맞이하고 있다.

이에 이번 호의 2부에서는 3차원 생체 조직 이미징 기술의 혁신을 가져왔다는 평가를 받고 있는 CLARITY 기술과 관련된 최신 연구 동향 및 연구 내용, 방향을 살펴보고, 활발한 융합연구가 이미 이루어지고 있는 생체 조직 이미징 분야의 연구가 향후 대표적인 융합연구 분야로 자리 잡기를 기대해 본다.

자동차의 개념을 변화시키다 자율주행자동차와 스마트자동차

자율주행자동차 동향과 전망 / 5G가 적용된 스마트자동차의 동향 및 기술

CES라는 세계 최대의 가전 전시 행사가 매년 1월 미국 라스베이거스에서 열리고 있다. 그런데 2011년, 가전업계 중심의 이 행사에 자동차 회사들이 등장하기 시작하였다. 초기 CES에 등장한 자동차 업체들은 인포테인먼트와 자동차의 융합기술을 기반으로 한 스마트 자동차들을 선보이며 많은 사람들의 이목을 집중시켰다. 그리고 이제는 스마트 자동차와 함께 자율주행자동차를 선보이며 자동차의 개념을 변모시켜나가고 있는 상황이다.

이에 이번 호의 3부에서는 2016년 CES 행사를 통해 많은 관심을 모으고 있는 자율주행자동차와 스마트자동차에 대한 이해를 바탕으로 향후 관련 융합연구가 활발히 이루어지기를 기대하며, 전세계 자동차 업계가 앞다투어 구현하고자 하는 자율주행자동차의 개발동향 및 전망과 함께 차세대 통신 시스템인 5G와 스마트 자동차의 연계 개발 동향과 관련 기술을 간략히 소개하고자 한다.

크리스퍼 유전자 가위에 의한 생명과학 혁명

▣ 서울대학교 화학부, 기초과학연구원 유전체교정 연구단 김다은(dekim1991@snu.ac.kr), 임가영(limka@snu.ac.kr), 김진수(jskim01@snu.ac.kr)





■ 서론 ■

인간을 비롯한 지구상의 모든 생명체 유전정보는 DNA에 기술되어 있다. DNA는 부모세대에서 자식세대로 충실히 전달되는 유전물질로서 A, C, G, T로 표기되는 네 종류의 염기로 암호화되어 있다. 유전자는 DNA 염기서열로 기술된 일종의 프로그램이라고 볼 수 있다. 사람마다 조금씩 서로 다른 유전자를 가지고 있어서 어떤 사람들은 특정 질병에 취약하기도 하고 반대로 남들보다 건강하기도 하다. 개인별 차이의 상당 부분은 유전자의 차이에 있다고 볼 수 있고 인간과 침팬지, 동물과 식물의 차이도 염기서열 차이에 기인한다.

생명체마다 유전자가 서로 다른 이유는 유전자에 자연발생적인 변이가 생기기 때문이다. 한 개체 내에서도 다양한 원인에 의해 유전자에 무작위적인 변이가 발생한다. 대부분의 변이는 무해하지만 특정 유전자에 변이가 생기면 유전병, 암과 같은 질병이 생기기도 한다. 자연 발생적 유전자 변이는 비가역적이다. 즉 한 번 발생한 변이는 절대로 저절로 원상복구 되지 않는다. 그러나 최근 유전자가위라는 인공 제한효소가 개발되면서 의도적으로 표적지향적 변이를 도입할 수 있게 되었고 이미 자연 발생한 돌연변이를 원상 복구할 수 있게 되었다.

유전자 가위는 DNA를 잘라 염기서열을 교정하는 실험도구로서 유전자를 재프로그래밍하는 데 사용된다. 이 강력한 도구를 사용하면 인간을 포함한 모든 생명체의 DNA 염기서열을 고쳐 쓸 수 있다. 유전자 가위를 이용해 유전학자들은 유전자의 기능을 연구할 수 있고 생명공학자들은 가축, 농작물을 개량해 고부가가치 동물, 식물을 만들 수 있다. 의과학자들은 질병의 원인이 되는 유전자 변이를 교정해 유전병, 암 등 난치성 질환을 원천적으로 치료하는 방법을 활발히 개발하고 있다. 영겁의 세월을 거쳐 진화한 인간이 이제 생명체 진화의 방향을 결정하는 프로그래머가 된 것이다.

본 리뷰를 통해 유전자 가위의 종류와 작동원리에 대해 살펴보고 특히 가장 최근에 개발되어 널리 사용되고 있는 CRISPR-Cas9 유전자 가위의 연구동향에 대해 설명하고자 한다.



■ 본론

유전자 가위 기술이란?

유전자 가위 기술의 정의 및 특징

인간과 동물, 식물을 포함한 모든 생물체 정보는 DNA에 저장되어 있다. 당과 염기, 인산으로 구성되어 있는 DNA는 염기의 종류에 따라서 A(adenine, 아데닌), T(thymine, 티민), G(guanine, 구아닌), C(cytosine, 시토신)로 나뉘게 되고 일정한 규칙하에 염기가 쌍을 이루어 결합하는 이중나선 구조를 이루고 있다. 인간의 경우, 약 30억쌍의 염기로 구성된 DNA를 갖고 있고 이 DNA에는 약 2만 여 개의 유전자 정보가 담겨 있다. 1990년 이전에는 인간의 염기서열 정보가 알려져 있지 않아 유전 정보를 해석하는 데 어려움이 있었지만 1990년부터 2001년까지 시퀀싱 기술의 발달과 함께 이루어진 인간게놈프로젝트(human genome project)에 의해서 인간의 유전체 지도가 완성되었다. 하지만 아직까지도 많은 유전자의 역할이 밝혀지지 않았고 유전병을 일으키는 돌연변이 서열에 대한 정보 또한 모두 알려지지 않은 상태이다.

일반적으로 유전자의 기능이나 특정 돌연변이 염기서열의 역할을 밝혀내기 위해서는 정상 유전자를 망가트리거나 특정 돌연변이를 도입하여 겉으로 드러나는 형질을 분석하는 방법을 이용한다. 유전자에 이러한 변이를 도입하기 위해 이전에는 방사선 또는 UV를 조사하는 물리적 방법이나 DNA 구조를 불안정하게 만드는 화학적 방법 등을 이용해 왔다. 하지만 이 방법들은 무작위로 수 많은 유전자에 변이가 도입된다는 단점이 있다. 이와 달리 유전자 가위 (programmable nuclease)는 연구자가 목표로 정한 유전자에만 변이를 도입하는데 사용할 수 있는 강력한 도구이다. 유전자 가위란 DNA를 자를 수 있는 기능을 가진 핵산가수분해효소(nuclease)를 쓰임에 맞게 변형(program)해서 표적 DNA 염기서열을 인식하여 DNA를 특이적으로 자를 수 있도록 구성된 인공 효소를 뜻한다. 유전자 가위는 원래 박테리아가 외부에서 유래한 DNA를 제거하기 위해 사용하는 제한효소를 변형한 것이다. 대부분의 제한효소는 DNA 염기서열을 인식하고 특정 서열만 자를 수 있기 때문에 DNA 재조합 기술에 널리 이용되어 왔지만, 짧은 염기서열만을 인식하여 잘라낸다는 단점이 있다. 약 6개의 염기쌍을 인식하는 제한효소의 경우에는 인간의 30억 염기쌍에 수많은 표적이 존재하므로 원하는 유전자의 특정 부분만을 자를 수 없게 된다. 반면에 유전자 가위는 상대적으로 긴 염기서열(최소 20쌍부터 최대 40쌍)을 인식하기 때문에 더 특이적으로 작용할 수 있으므로 다양한 생물체에서 맞춤형 변이를 만들어내기 위해 사용되고 있다.



그림 1. 유전자 가위 개념도

유전자 가위를 세포에 도입하여 DNA를 특이적으로 자르게 되면 이중가닥절단(double strand break, DSB)이 생기게 된다. 이중가닥절단은 모든 세포에서 유전자 가위 없이도 방사선 노출이 등의 이유로 수시로 발생하는 문제이다. DNA가 끊어져 이중가닥절단이 형성되면, 세포는 피해를 최소화하기 위해 내제적 수선 기작을 이용하여 잘린 DNA를 붙이는 시도를 한다. 잘린 DNA는 크게 두 가지 경로에 의해서 수선되는데 첫 번째 방법은 비상동성 말단 접합(non-homologous end joining, NHEJ)으로 오류가 일어나기 쉬운 방법이고 두 번째 방법은 상동 재조합(homologous recombination, HR)으로 비교적 정교하게 수선되는 방법이다.

비상동성 말단 접합은 주형이 되는 DNA 없이 잘린 이중가닥을 그대로 이어 붙이는 효율적인 수선 기작이지만 DNA를 완벽히 이어 붙이지 못하고 종종 절단 부위에 몇 개의 염기쌍을 추가하거나 일부를 제거하여 변이를 수반한다. 그 결과 유전자가 온전히 번역되지 못하여 그 기능을 상실할 수 있다. 따라서 이 방법은 특정 유전자의 기능을 연구하는 데 있어 매우 좋은 방법이다. 또한 어떤 유전자는 그 존재로 인해 질병의 매개체가 되거나 원인이 되기도 한다. 이 경우 유전자가위를 이용해 이중가닥절단을 일으키고 비상동성 말단 접합에 의해 유전자가 망가져 발현되지 않는 경우에는 질병에 대한 치료 효과를 기대할 수도 있다.



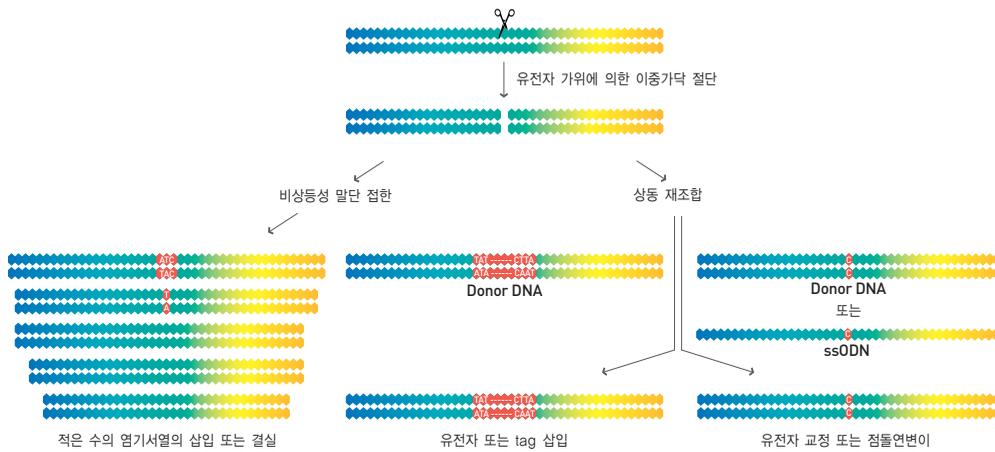


그림 2. 이중가닥절단 복구 기작 유전자 가위에 의해 이중가닥 절단이 일어나게 되면 두 가지 경로에 의해 복구된다. 첫번째는 비상동성 말단 접합으로 외부 DNA 없이 잘라진 DNA를 이어 붙이는 방법으로 이 과정에서 적은 수의 염기서열이 삽입되거나 결실이 일어난다. 두번째 방법은 상동 재조합 방법으로 넣어준 DNA를 바탕으로 복구가 일어나 유전자나 태그가 삽입되거나 유전자 교정, 점돌연변이도 만들어 낼 수 있는 방법이다.

두 번째 복구 방법인 상동 재조합은 세포 내에 있는 상동염색체나 유사한 염기서열을 갖고 있는 외부 DNA를 주형으로 이용하여 이중가닥절단을 복구하는 정교한 방법이다. 이 기작을 이용하면 세포에 인위적으로 넣어준 DNA를 조절하여 점 돌연변이(point mutation)를 유도할 수도 있고 치료용 유전자를 원하는 위치에 삽입할 수도 있다. 따라서 유전자 가위를 유전병 치료를 하는데 사용하기 위해서는 상동 재조합 기작이 높은 효율로 일어나는 것이 유리하다. 하지만 대다수의 동물, 식물 세포 내에서는 비상동성 말단 접합의 효율이 더 높기 때문에 상대적으로 상동 재조합이 잘 일어나지 않는데, 이로 인해 이를 보완하기 위한 여러 연구가 진행되고 있다.

유전자 가위의 종류

지금까지 개발된 유전자 가위는 그 순서에 따라 3세대로 나눌 수 있다. 1세대 유전자 가위는 ZFN(Zinc Finger Nuclease), 2세대 유전자 가위는 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease), 가장 최근에 연구된 CRISPR(크리스퍼, Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas(CRISPR-associated)9은 3세대 유전자 가위다.

1세대 유전자 가위와 2세대 유전자 가위는 원하는 염기서열을 인식하는 단백질과 자르는 활성을 가진 단백질을 인위적으로 연결하여 만든 재조합 단백질이라는 공통점이 있다. 한 단위체가 염기서열을 인식하면 제한효소 FokI을 변형한 단위체가 DNA 이중가닥을 자르는 역할을 한다. FokI은 이량체를 이루었을 때 자르는 활성을 가지기 때문에 1세대 유전자 가위와 2세대 유전자 가위는 한 쌍을 함께 사용하여야 이중가닥절단을 일으킬 수 있다.

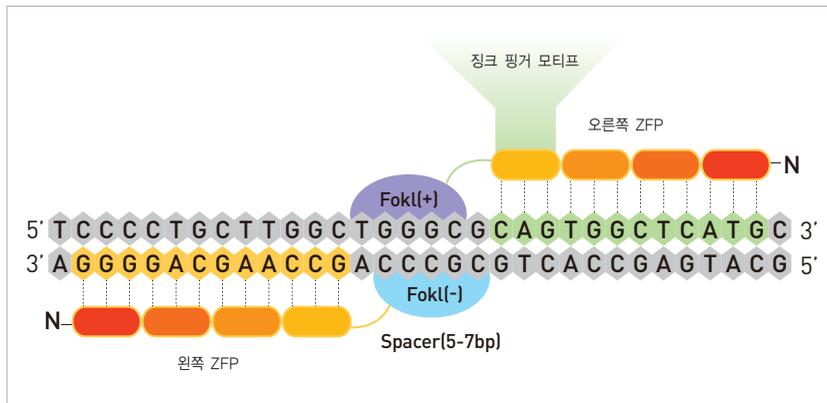


그림 3. ZFN(Zinc Finger Nuclease) 작동원리 ZFN은 징크 핑거 모티프 4개가 12쌍의 염기서열을 인식하고 함께 연결된 FokI 단백질 단위체가 DNA를 자르는 역할을 한다. ZFN은 쌍을 이루어 작용하므로 두 개의 ZFN이 필요하다.

1세대 유전자 가위는 생물체에 흔히 존재하는 징크 핑거 모티프(zinc finger motif)를 표적 DNA와 결합하는 도메인으로 사용한다. 징크 핑거 모티프는 아연 이온(Zn^{2+})과 상호작용하여 손가락(finger) 모양의 구조를 하고 있으며, 한 모티프 당 3쌍의 염기서열과 결합할 수 있다. 9쌍 또는 12쌍의 염기서열을 인식할 수 있도록 3개 또는 4개의 징크 핑거 모티프를 연결하고, 그 뒤에 FokI의 자르는 도메인을 붙여 유전자 가위로 사용할 수 있다. FokI의 자르는 도메인이 이량체로 작용해야 한다는 것을 감안했을 때 총 18쌍 또는 24쌍의 염기서열을 인식하고, 자르는 도메인이 그 사이에 있는 이중가닥 DNA를

자르게 된다. 이론적으로 3쌍의 염기서열에 결합할 수 있는 모티프 64(4x4x4) 개를 갖고 있으면 자르는 도메인을 가진 단백질 단위체와 조합을 통해서 원하는 모든 표적 DNA에 대해 유전자 가위를 제작할 수 있다.

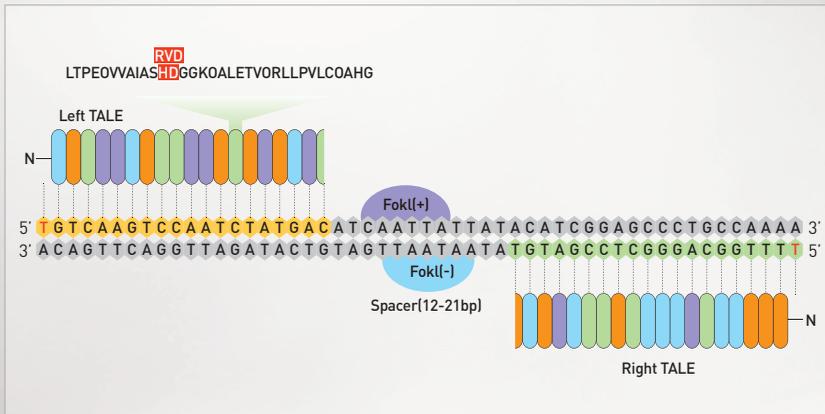


그림 4. TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease) 작동원리 TALEN은 TAL effector 와 FokI의 단위체로 이루어져 있다. 한 쌍의 탈 이펙터가 DNA 염기서열을 각각 인식하면 쌍을 이룬 FokI 단위체가 DNA를 자르는 역할을 한다.

1세대 유전자 가위인 ZFN이 징크 핑거 모티프를 DNA 결합 도메인으로 사용했다면 2세대 유전자 가위인 TALEN은 식물을 감염시키는 병원체의 단백질인 탈 이펙터(TAL effector)를 DNA 결합 도메인으로 사용한다. Xanthomonas라는 병원체가 식물을 감염시킬 때 탈 이펙터가 식물의 DNA에 결합하여 감염성을 증가시키는데 이를 2세대 유전자 가위의 DNA 인식 도메인으로 사용할 수 있다². 2세대 유전자 가위는 1세대 유전자 가위와 비교했을 때 한 모듈이 3쌍의 염기쌍이 아니라 1쌍의 염기쌍에만 결합하기 때문에 최소 필요 모듈 수가 적다는 장점이 있다. 이론적으로 4가지 종류의 모듈이 있다면 대략 18개의 모듈과 FokI의 자르는 역할을 가진 도메인의 조합을 통하여 원하는 DNA를 자를 수 있게 된다. TALEN은 ZFN과 마찬가지로 이량체로 작용해야 하기 때문에 약 36쌍의 핵산과 결합을 하게 된다.

1세대 유전자 가위와 2세대 유전자 가위는 기존의 유전자 변이를 일으키는 방법에 비해 특이성과 효율성에서 장점이 있어 세포 수준뿐만 아니라 다양한 동식물의 DNA 변이를 일으키는데 이용되었지만 표적 DNA가 달라질 때마다 단백질을 변형시켜야 하는 어려움이 있다. 이와 달리 3세대 유전자 가위는 단백질 변형이 필요하지 않아 제작이 용이하기 때문에 더욱 주목을 받고 있다.



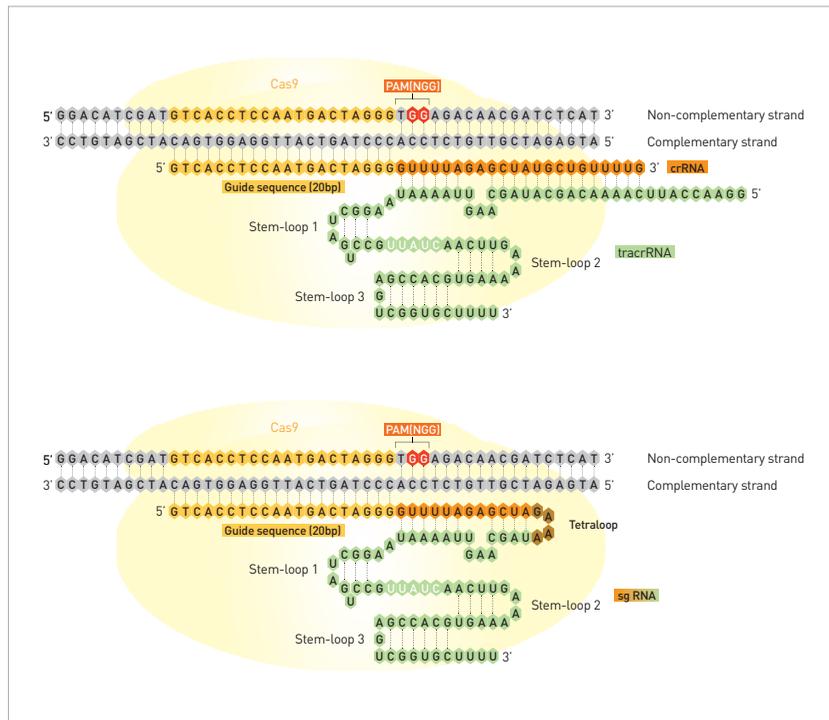


그림 5. CRISPR-Cas9의 작동원리 CRISPR-Cas9은 크게 두 가지 구성요소로 이루어져 있다. 하나는 DNA와 상보적 염기쌍을 이루어 표적 DNA를 정해주는 역할을 하는 RNA이고 다른 하나는 PAM을 인식하고 DNA를 자르는 역할을 하는 Cas9 단백질이다. RNA는 crRNA와 tracrRNA로 이루어져 있는데 crRNA는 DNA와 염기쌍을 이루는 역할을 하고 tracrRNA는 crRNA와 염기쌍을 이루며 Cas9의 구조를 변화시키는 역할을 한다. 이를 대신하여 crRNA와 tracrRNA를 인위적으로 하나의 가닥으로 연결한 sgRNA (single guide RNA)를 사용할 수도 있다.

3세대 유전자 가위인 CRISPR-Cas9은 박테리아의 면역체계에서 유래하였다. 박테리아는 바이러스에 감염됐을 때 대부분 죽지만 일부는 살아 남으면서 그 바이러스 DNA의 일부를 자신의 유전체에 저장해 놓는다. 그 후 재감염이 일어나면 저장해 놓은 정보를 바탕으로 작은 가이드 RNA를 만들어낸 후 Cas9이라는 단백질과 함께 결합하여 외부 DNA를 자른다. 이때 가이드 RNA는 원하는 표적유전자에 상보적 염기쌍을 이루어 결합하여 특이성을 결정하고 Cas9 단백질은 표적유전자를 자르는 핵산가수분해효소로서의 역할을 수행한다. 즉, RNA 염기서열만 바꾸면 어떤 DNA 염기서열도 자를 수 있기 때문에 사용하기 쉽고 비용이 낮아 CRISPR-Cas9 유전자 가위를 이용한 활발한 연구가 진행되고 있다.

CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술의 역사

CRISPR 시스템의 발견

가장 처음 CRISPR 시스템이 학계에 등장한 것은 1987년 일본 연구진에 의해서였다. 당시 연구진은 대장균의 특정 유전자 염기서열을 분석하는 연구를 진행하던 도중 박테리아의 유전체에 29쌍의 염기서열이 일정 간격을 두고 5번 반복되는 것을 발견하였다³. 2000년에는 대장균뿐만 아니라 다른 원핵생물에도 이러한 짧은 반복 염기서열(repeat)이 유사하게 존재하는 것을 확인하였고⁴, 2002년에는 반복 염기서열이 규칙적으로 모여있다는 점에 착안하여 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats(CRISPR)이라고 명명하였다⁵. 또한 CRISPR과 관련된 단백질은 Cas(CRISPR-associated)라고 이름을 붙이게 된다. 2005년 프랑스 연구진은 24개 균주의 염기서열을 분석한 결과 25-50쌍의 반복되는 염기쌍 사이에 존재하는 비슷한 길이의 스페이서(spacer) 염기서열이 외부 DNA 염기서열과 동일하다는 것을 발견하였다⁶. 당시 연구진은 이를 근거로 박테리아가 외부 침입에 대한 면역체계로 CRISPR을 갖고 있는 것이라고 추정하였다. 2007년에는 실제로 박테리오파지에 감염된 후 새로운 스페이서가 생겨난다는 사실과 스페이서를 인위적으로 추가하거나 제거하였을 때 다음 박테리오파지의 감염률이 달라진다는 실험적 증거를 제시함으로써 실제로 CRISPR 시스템이 외부 감염에 대한 면역체계로 작동한다는 것을 입증하였다⁷.

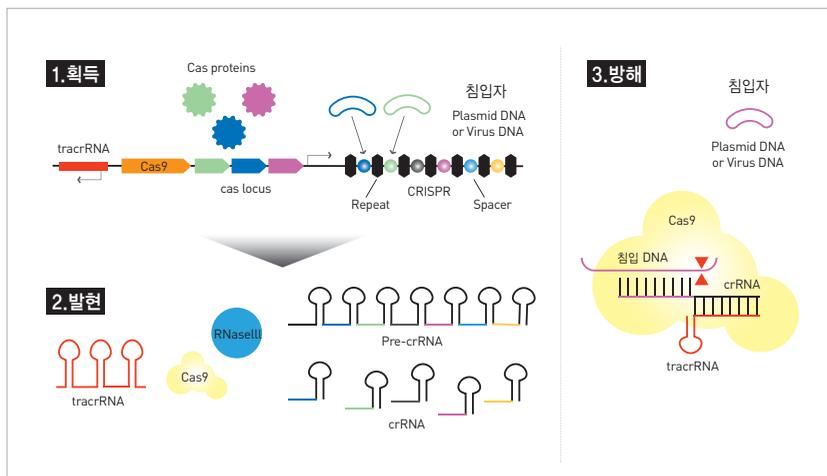


그림 6. CRISPR 면역 시스템. 박테리아에 외부 DNA가 침입하면 외부 DNA 중 일부를 CRISPR 위치에 저장해 놓는다. 이 후 재침입이 일어나면 Cas9과 tracrRNA, crRNA가 함께 발현되고 침입 DNA에 이중가닥절단을 일으켜 면역 시스템으로 작용할 수 있다.

이후 박테리아가 어떻게 외부 DNA를 자신의 유전체의 반복되는 서열 사이에 넣는지, 그 결과 무엇이 발현되는지, 마지막으로는 침입한 외부 DNA를 어떻게 자르는지에 대한 연구가 활발히 수행되었다. 또한 계통, 위치, 발현되는 단백질의 수 및 종류, 반복 서열 등에 따라 CRISPR 시스템을 분류할 수 있게 되었다⁸. 이 중 유전자 가위로 가장 많이 사용되는 것은 type II CRISPR 시스템이다. Type II CRISPR 시스템은 이중가닥 DNA를 자르는 데 있어 하나의 단백질(Cas9)과 두 종류의 RNA를 필요로 한다. 그 중 한 종류의 RNA는 CRISPR RNA(crRNA)로 외부 DNA 염기서열인 스페이서를 획득한 DNA에서 만들어져 표적 DNA와 결합한다. 다른 RNA인 trans-activating CRISPR RNA(tracrRNA)는 crRNA의 일부 염기서열과 상보적으로 결합하여 Cas9이 DNA의 절단을 일으킬 수 있게 만드는 역할을 한다. *S. pyogenes*라는 세균에서 유래한 Cas9 단백질은 표적 DNA에 3쌍의 염기서열(5' -NGG-3')이 있을 때 이중가닥 DNA를 자를 수 있다. 이 염기서열을 protospacer adjacent motif(PAM)이라 하며, Cas9 단백질이 외부 DNA와 자신의 DNA를 구분 짓기 위해 필요한 염기서열이다. 외부 DNA 중 PAM이 있는 염기서열만 스페이서로 획득할 수 있고, 후에 발현된 crRNA가 표적 DNA와 결합하여 PAM 염기서열이 있는 DNA만 선택적으로 자를 수 있다. 즉, crRNA는 20개의 DNA와 결합하고 Cas9은 2개의 핵산을 인식하므로 총 22개의 일치하는 DNA가 있을 때만 자를 수 있다.

3세대 유전자 가위, CRISPR-Cas9

앞선 연구가 박테리아의 면역체계에 대해 밝혔다면 2012년 6월에는 이 시스템이 유전자 가위로 사용될 수 있음을 시사하는 연구가 발표되었다⁹. Jinek을 포함한 연구진은 in vitro에서 Cas9 단백질과 crRNA, tracrRNA가 있다면 crRNA에 상보적인 표적염기서열과 PAM 염기서열을 가진 DNA의 이중가닥을 자를 수 있다는 사실을 보고하였다. 또한 이와 동시에 crRNA와 tracrRNA에 변형을 가하는 연구도 진행하였다. crRNA와 tracrRNA에서 필수적인 염기서열을 찾아내어 이를 하나의 가닥으로 연결한 RNA를 만들었고 이 또한 표적 DNA를 자를 수 있다는 것을 확인하였다.

2013년 1월, 국내외 연구진은 이 도구를 세포에 도입하여 실제로 유전자 염기서열의 변이를 유도할 수 있음을 최초로 보고하였다¹⁰⁻¹³. 이를 계기로 수많은 생명과학자들이 CRISPR 유전자 가위에 관심을 가지게 되었고 이를 이용해 다양한 인간배양세포와 동물, 식물의 유전자를 교정할 수 있음이 잇달아 입증되었다. 과학학술지 사이언스에서는 이를 크리스퍼 혁명이라고 표현하였다¹⁴.

기술개발동향

유전자 가위 기술은 원하는 DNA 서열을 인식하여 자르는 기술이므로 유전자의 기능을 없애는 knock out 연구 수단으로 주로 사용된다. 유전자의 기능을 연구하는 도구로서의 유전자 가위 기술은 DNA 염기서열에 변이를 도입하여 유전자 코드(genetic code) 자체를 바꾸는 것으로 RNAi(RNA interference)를 이용해 RNA를 표적으로 하는 knock down과는 다르다. RNAi 기술에서 사용되는 miRNA, siRNA 또는 shRNA는 전사된 mRNA와 결합하여 분해하거나 번역을 저해함으로써 유전자 발현량을 감소시킨다¹⁵. 반면, 유전자 가위 기술은 DNA 염기 서열에 직접적인 변이를 도입하여 knock out시키는 기술로 knock down으로는 보기 어려웠던 부분까지도 확인할 수 있다. 그리고 RNAi 기술은 RNA가 전사되는 부분(Coding DNA Sequences; CDS)에 대해서만 적용이 가능하지만, 유전자 가위 기술은 표적 가능한 영역에 대한 제약이 적기 때문에 CDS 이외의 부분에 대한 연구에도 사용할 수 있다.

유전자 가위가 개발되던 초기단계에는 원하는 특정 유전자의 DNA에 이중가닥절단을 일으켜 변이를 도입하고 이로 인해 나타나는 특정 유전자의 기능 손실을 확인하는 것만으로도 주목을 받아왔다. 하지만 지금은 특정 유전자에 관하여 새로 밝혀진 메커니즘을 확인하기 위해 손쉽게 사용할 수 있는 기술로도 사용되고 있다.

질병 연구모델 제작 및 동식물 개량

CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술은 인간이나 동식물 등 다양한 개체의 유전자에 변이를 도입할 수 있고, 이를 통해 유전자의 기능을 밝히는 연구 방법으로 사용되고 있다. 세포 수준을 넘어 다양한 동물에 적용하게 되면서, 유전자 가위 기술을 이용해 원하는 유전자에만 변이를 주어 질병모델 동물을 제작하고 유전 질환을 연구하는 도구로 사용할 수 있다. 나아가 유전자 가위 기술을 이용해서 특정 유전자에 맞춤형 변이를 도입하여 유전 질환을 치료하는 기술을 개발하려는 시도들도 있어왔다. 예를 들어, 혈우병은 X염색체에 있는 유전자의 돌연변이로 인해 혈액 내 응고인자가 부족하여 지혈이 잘 되지 않는 질환이다. 혈우병 환자 중에 일부는 혈액응고인자를 발현하는 F8(Factor VIII) 유전자가 비정상적으로 뒤집어져 있어서 정상적인 혈액응고인자를 형성하지 못하는 문제를 갖고 있다. 이러한 혈우병 환자의 역분화줄기세포(iPS cell)에서 비정상적으로 뒤집어진 F8 유전자를 CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술로 자른 후 뒤집어 정상적으로 만들 수 있음을 보였다¹⁶. 그리고 F8 유전자를 교정한 역분화줄기세포를 혈관내피세포로 분화시킨 후 혈우병 모델 생쥐에 이식했을 때, 혈액응고인자가 정상적으로 발현되면서 생쥐의 출혈 증상이 완화되는 것을 볼 수 있었다. CRISPR-Cas9 유전자 가위를 사용하여 혈우병의 증상을 완화시킬 수 있는 가능성을 보여주면서 혈우병 같은 유전질환 이외에도 후천성 면역 결핍증(AIDS) 등 다양한 질환의 치료 수단으로도 적용이 가능할 것이라 기대하고 있다.

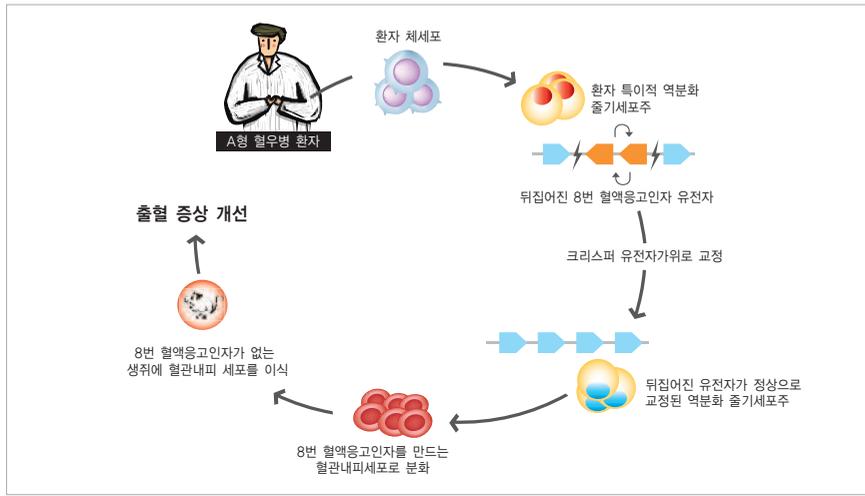


그림 7. 혈우병 치료를 위한 유전자 가위 기술의 개발 환자의 비정상적으로 뒤집어진 F8 유전자를 CRISPR-Cas9 유전자 가위로 교정하여 혈액응고인자 결핍 생쥐에서 출혈성 증상이 완화됨을 보였다.

CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술을 동식물에 적용하면 가축의 개량이나 작물의 육종에도 이용할 수 있다. 그 예로, 상추의 성장과 발달을 조절할 수 있는 유전자인 BIN2 유전자에 CRISPR-Cas9 유전자 가위로 변이를 도입할 수 있음을 보인 연구가 있다¹⁷. 작물의 육종 측면에서 유전자 가위 기술이 더욱 주목 받고 있는 이유는 외부의 유전자를 삽입하지 않고도 사용 가능한 기술이기 때문이다. 오래 전부터 사람들은 인위적으로 품종을 교배하여 원하는 형질을 갖도록 만들거나 식물체 외부의 유전자를 삽입하는 유전자 변형 기술을 통해 농작물의 육종을 시도해왔다. 교배를 통해 육종을 하는 기존의 방식은 도입할 수 있는 형질의 제약이 있을 뿐만 아니라 생식을 통해 이루어지기 때문에 오랜 시간이 걸린다는 단점이 있다. 이러한 점을 극복하고 단시간에 원하는 형질을 넣을 수 있는 유전자 조작 방법이 사용되고 있지만 식물체에 존재하지 않는 외부 DNA를 삽입하기 때문에 유전자 변형 생물(Genetically Modified Organism)의 안전성에 대한 논란과 우려가 존재하고 있다. 그런데 CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술은 이미 번역된 Cas9 단백질과 전사된 sgRNA 형태로 전달하는 방법을 통해 성공적으로 원하는 유전자에 변이를 도입할 수 있으므로 외부 DNA를 전혀 사용하지 않았다는 점에서 유전자 변형 식물과는 다르다고 할 수 있다. 이런 점에서 동식물의 육종과 개량에도 CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술을 사용한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

이렇듯 유전자 가위 기술은 암세포나 줄기세포 등 다양한 세포 수준뿐 아니라 동물, 식물, 미생물 등 다양한 개체 수준에 원하는 변이를 도입하여 생물체의 DNA에 담겨있는 유전 정보와 그 생명현상을 이해하기 위한 도구로써 널리 사용되고 있다.

knock-in 기술 및 효율성

CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술은 유전자의 기능을 망가뜨리는 knock out 연구 이외에 원하는 염기서열을 넣는 기술(knock-in)로도 사용 가능하다. 인간의 질병 중에는 단일 염기의 변이로 인해 나타나는 경우도 있는데, 이를 치료하기 위해서는 다시 단일 염기의 변이를 주어 정상적으로 바뀌도록 유도해야 한다. CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술에서 sgRNA와 Cas9 단백질을 넣어주면 DNA에 이중가닥 절단이 일어나고 주로 비상동성 말단 접합 과정을 통해 염기가 제거되거나 삽입되면서 도입된 변이로 인해 유전자의 기능이 상실된다. 이때 삽입하고자 하는 염기서열을 갖는 외부 DNA를 함께 넣어주면, 일부는 상동 재조합 경로를 통해서 단일 염기 변이를 도입하거나 원하는 유전자를 삽입할 수 있다. knock-in은 상동 재조합 과정을 통해 일어나므로 최근의 연구에서는 비상동성 말단 접합 경로에 대한 여러 가지 저해제를 이용하여 유전자의 knock-in 효율을 높일 수 있음을 보였다^{18, 19}. 이를 통해 유전자 가위 기술을 원하는 방향으로 유전자를 교정하는 데에도 사용할 수 있다.

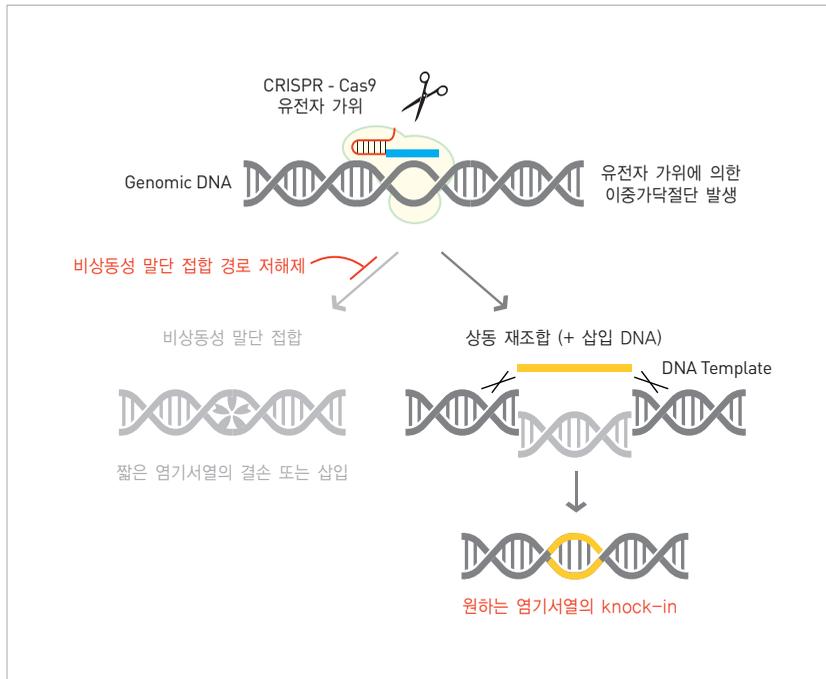


그림 8. knock-in 기술의 효율성 증진 방법 원하는 염기 서열을 삽입하기 위해 상동 재조합 경로와 경쟁관계에 있는 비상동성 말단 접합 경로를 저해함으로써 knock-in 기술의 효율성을 올리려는 연구가 진행되고 있다.

유전자 가위의 변형과 응용

CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술에서 필요한 두 가지 구성요소인 Cas9 단백질이나 sgRNA를 변형시키면 더욱 다양한 연구에 이용할 수 있다. Cas9 단백질은 서로 다른 두 곳에 자르는 활성을 갖고 있는데, 이 중 하나의 활성을 없애 위 또는 아래의 한쪽 가닥만을 자르는 nickase 형태로 사용할 수 있다. Cas9 nickase는 두 개가 함께 작동해야 이중가닥절단이 일어나 유전자 변이를 도입할 수 있다.

그리고 Cas9 단백질의 자르는 활성을 모두 없앤 dCas9(dead Cas9)은 DNA를 자르는 활성은 완전히 잃어버렸지만 sgRNA와 함께 복합체를 이뤘을 때 표적 DNA에 결합하는 특성을 그대로 갖고 있다. 이러한 특성을 이용하여 dCas9 단백질에 다양한 기능을 갖는 단백질 도메인을 융합시켜 사용하면, 표적 DNA에 dCas9 융합 단백질이 붙어 다양한 기능을 유도 할 수 있다. 예를 들어 dCas9에 유전자의 과발현(activation)이나 억제(repression)를 유도 할 수 있는 단백질 도메인을 융합시키면, 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다²⁰.

이뿐 아니라 sgRNA에서 Cas9과 복합체를 이루는데 영향을 주지 않는 부분을 변형하여 특정 단백질과 결합할 수 있는 염기서열로 RNA를 연장시켜주면, 이와 결합하는 단백질의 기능에 따라 특정 유전자의 과발현이나 억제를 유도할 수 있다²¹. 즉, CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술의 부품인 Cas9 단백질과 sgRNA에 변형을 주면 유전자 발현의 조절을 가능케 하는 후성게놈 편집(epigenome editing)기술로도 사용할 수 있다.

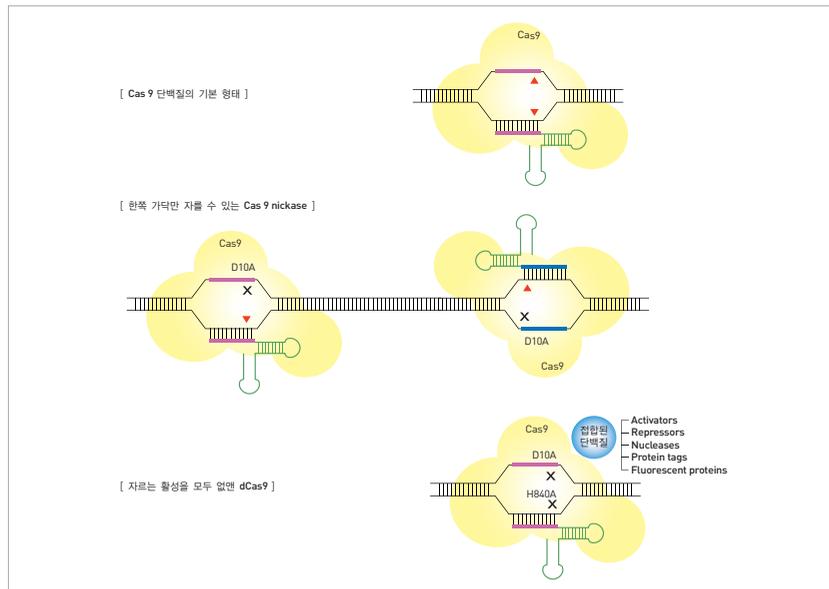


그림 9. Cas9 단백질과 그 변형체 Cas9 단백질의 자르는 활성 부분을 변형시킨 변형체를 이용하여 다양한 응용이 가능하다.

유전자 가위 오작동 (Off target)의 예측, 확인 및 제어

CRISPR-Cas9 유전자 가위에서 sgRNA는 표적 DNA와 상보적으로 결합하여 자르는 위치를 지정한다. 이때, 표적 DNA와 유사한 염기서열을 갖는 다른 위치도 자르는 오작동(off-target)이 일어날 수 있고, 이를 줄이는 것이 중요하다. 전체 유전체에서 유사한 염기서열이 적은 sgRNA를 사용하면 오작동의 가능성을 줄일 수 있다. 이러한 원리에 따라 전체 유전체의 염기서열과 비교하여 오작동이 일어날 수 있는 위치를 찾아주고, 유사한 염기서열이 적은 sgRNA를 제작 가능하도록 도와주는 프로그램이 개발되었다²². 이를 이용하여 오작동이 적을 것이라고 기대되는 CRISPR-Cas9 유전자 가위를 선별하여 사용할 수 있게 되었다.

표적 DNA와 유사한 서열이 실제로 CRISPR-Cas9 유전자 가위에 의해 잘리는지 확인하는 것 또한 중요하다. In vitro 또는 in vivo에서 유전자 가위가 작동했을 때 잘린 부분을 확인하는 방법(Digenome-seq²³, Guide-seq²⁴ 등)이 개발되었고 이 방법을 이용하면 제작한 CRISPR-Cas9 유전자 가위의 안전성을 확인할 수 있다. 다양한 질환을 치료하는 목적으로 CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술을 사용할 때, 제작한 유전자 가위가 오작동을 일으킬 수 있는지를 확인해야 안전성이 보장된 치료 방법으로 응용 가능할 것이다.

오작동을 예측하고 확인하는 방법이 개발되었고, 최종적으로 오작동의 발생을 줄일 수 있는 유전자 가위를 개발하기 위한 연구도 있다. Cas9의 두 개의 활성 중 하나를 불활성화 시킨 Cas9 nickase를 사용하는 방법이 오작동을 줄일 수 있다고 보고된 바 있다^{25, 26}. 앞서 언급했듯이 Cas9 nickase는 두 개가 함께 작동할 때에 유전자 변이를 도입할 수 있기 때문에 전체 유전체 상에서 한 유전자를 동시에 표적으로 할 가능성이 더 줄어들게 된다. 같은 맥락에서 Cas9의 활성을 모두 없애고 dCas9에 다른 종류의 핵산가수분해효소 단위체를 달아 두 개가 함께 작동할 때에만 DNA의 이중가닥 절단이 일어날 수 있도록 바꾸어 사용한 연구도 있다²⁷.

또 다른 방법은 전달하는 Cas9과 sgRNA의 형태를 바꿈으로써 오작동의 확률을 줄이는 것이다. CRISPR-Cas9 유전자 가위 기술은 작동하는 시간에 비례하여 변이가 축적되는데 Cas9과 sgRNA를 플라스미드 형태로 전달하면 약 1주일까지 없어지지 않고 발현되면서 유전자 변이를 일으킨다. 반면 이미 번역된 Cas9 단백질과 전사된 sgRNA를 함께 전달하면 바로 작동 가능한 상태이기 때문에 더 빨리 변이를 도입할 수 있고, 전달한 단백질과 RNA는 DNA보다 빨리 분해되기 때문에 오작동에 의한

변이가 축적되는 시간을 줄일 수 있다. 따라서 대장균에서 발현시킨 Cas9 단백질을 정제하여 사용함으로써 오작동이 일어나는 것을 줄일 수 있음을 보였고²⁸, 이러한 전달 방법은 앞서 식물에 적용할 때처럼 DNA를 사용하지 않기 때문에 외부 DNA가 유전자에 끼어들어갈 수 있는 가능성도 배제할 수 있다는 장점을 갖는다.

새로운 유전자 가위의 개발

현재 활발하게 연구되고 있는 CRISPR-Cas9 유전자 가위는 *Streptococcus pyogenes*에서 유래한 Cas9으로 DNA 서열의 5'-NGG-3'를 PAM으로 갖는 부분을 인식하기 때문에 표적 유전자에 NGG코드가 있는 경우에만 유전자 가위를 제작할 수 있다. 유전자 가위의 제작에 있어서의 제약을 해소하고자 Cas9 단백질의 PAM을 엔지니어링 하려는 시도가 있었고, 그 결과 표적 DNA 서열의 5'-NGA-3' 또는 5'-NGCG-3'를 인식하는 Cas9 변형체 단백질을 만들었다²⁹. 앞으로 이러한 연구를 통해 더 다양한 종류의 PAM을 갖는 CRISPR-Cas9 유전자 가위를 개발함으로써 DNA 염기 하나하나를 조절하여 원하는 위치에 더욱 정교하게 변이를 넣거나 교정할 수 있는 일이 가능해질 것으로 기대된다.

또한 최근에 새로운 단백질인 Cpf1 단백질을 이용하여 유전자 가위로 사용할 수 있음을 보인 연구도 있었다³⁰. Cpf1 단백질은 Type V CRISPR 시스템에 속하는 단백질로 tracrRNA가 없이 crRNA로만 작동한다는 특징을 갖고 있다. 비교적 짧은 crRNA 하나로 작동할 수 있기 때문에 RNA 제작에 있어서 더 용이한 측면이 있다. 그리고 Cas9과 달리 5'-TTN-3'을 PAM으로 갖기 때문에 티민(T)이 많은 서열을 표적으로 유전자 가위를 제작할 수 있게 하여 유전자 가위의 선택의 폭을 넓혀 줄 수 있다. 새로 발견된 단백질인 Cpf1 유전자 가위를 이용하여 세포 수준에서 성공적으로 유전자 변이를 도입할 수 있었으며, 이를 통해 Cas9처럼 Cpf1 단백질도 유전자 가위로 활용할 수 있는 가능성을 보여 주었다.

이렇듯 자연에 존재하는 박테리아로부터 유래한 단백질들을 찾아 새로운 유전자 가위를 개발하거나 기존의 유전자 가위를 발전시켜 원하는 용도에 따라 더욱 효율적이고 특이적으로 작동할 수 있는 시스템을 구축하고자 많은 연구들이 계속되고 있다.

사회적 논의

CRISPR 유전자 가위가 널리 보급되어 활발히 사용되면서 다양한 법적, 윤리적, 사회적 논의가 시작되고 있다.

첫째, 유전자 가위를 질병 치료의 목적으로 사용할 수 있음이 입증되면서 새로운 치료법의 안정성과 효과를 평가하기 위한 규제의 필요성이 제기되고 있다. 인간 DNA를 교정해서 질병을 치료하는 개념은 기존 약제와 근본적으로 다른 치료 방식이기 때문이다. 예를 들어 유전자가위 치료제를 신약으로 구분할 수도 있지만 유전자 수술을 위한 의료기기(device)로 구분해 규제하는 것도 가능하다.

둘째, 인간의 체세포에 유전자가위를 도입해 유전자를 수술할 수도 있지만 인간 배아에 적용해 질병 유발 유전자를 원천적으로 제거할 수도 있고 건강과 장수에 도움이 되는 변이를 도입할 수도 있다. 문제는 인간 배아에 도입된 변이는 그 다음 세대로 그대로 유전된다는 데 있다. 또한 질병 치료가 아닌 외모, 성격, 지능 등의 강화에 이 기술이 사용될 우려도 있다.

셋째, 유전자 가위 기술은 고부가가치의 농작물, 가축을 만드는데 사용될 수 있다. 특히 외부 유전자를 도입하지 않고 동식물의 자체 유전자에 맞춤 변이를 도입한 경우, 기존 육종법에 의해 만들어진 동식물과 구별이 되지 않아 유전자변형생물체(GMO)로 분류하여 규제하는 것은 불합리하다. 아직 전세계 어디에서도 유전자 교정 농작물과 가축의 판매가 허용된 사례가 없으나 유전자 가위 기술은 인류의 미래 먹거리를 만드는데 필수적이고 보편적으로 활용될 가능성이 높다.

넷째, 유전자 가위 기술은 모기와 같은 해충을 박멸하는데 활용될 수 있다. 불임을 초래하는 유전자를 삽입한 모기를 방출하여 말라리아의 매개체인 모기를 박멸하는 가능성이 연구되고 있다. 그러나 모기가 사라졌을 때 생태계에 어떤 변화가 초래될지 알 수 없기 때문에 이에 반대하는 목소리도 높은 상황이다.

이와 같이 유전자 가위 기술은 다양한 분야에 걸쳐 큰 파급효과가 있기 때문에 의생명과학자, 정책당국자, 법학자, 생명윤리학자 등 다양한 분야의 전문가들은 물론이고 일반 시민과 언론이 함께 참여하는 토론과 학습의 기회가 지속적으로 마련될 필요가 있다.

결론

이상 유전자 가위 기술의 작용 원리와 활용 분야, 최신 연구동향과 사회적 논란에 대해서 살펴 보았다. 3세대 유전자가위인 CRISPR-Cas9는 원래 미생물의 면역체계에서 비롯된 것이나 이전의 1세대, 2세대 유전자가위에 비해 손쉽게 만들 수 있고 저렴한 비용에 구매할 수 있어 유전자 교정의 도구로 널리 쓰이게 되었다. 유전자가위는 인간을 비롯한 다양한 동식물의 유전자를 마음대로 고치고 수술하는 강력한 도구로서 21세기 인류의 삶에 근본적인 변화를 초래할 것으로 기대된다. 연구자들은 이 기술을 이용해 원하는 유전자에 변이를 도입하거나, 미리 정한 유전체 위치에 외부 유전자를 안전하고 효과적으로 삽입 할 수 있게 되었다. 이 기술은 유전자 기능 연구를 위한 모델 동식물은 물론이고 농작물, 가축의 개량에도 사용될 수 있다. 또한 다양한 질환을 유전자 수준에서 근본적으로 치료할 수 있는 기회를 제공하여 인류의 건강과 복지에 큰 기여를 할 수 있게 되었다. 한편 이 기술은 미래 인류의 유전자를 바꾸는데 남용될 수 있다는 염려와 함께 동식물 생태계에 비가역적 변화를 초래할 수 있다는 우려가 제기되고 있다. 생명체의 유전자를 마음대로 재프로그래밍할 수 있게 된 인류는 이제 새로운 도전에 직면한 것이다. 향후 지속적인 연구개발을 통해 유전자 가위 기술의 혜택을 온 인류가 공유할 수 있게 됨과 동시에 사회적 함의를 통해 기술의 오남용으로 우려되는 부작용을 미연에 방지할 수 있게 되기를 기대한다.

김진수

학 력

- University of Wisconsin-Madison 생화학 박사
- 서울대학교 화학부 석사
- 서울대학교 화학부 학사

경 력

- 現) 기초과학연구원 유전체교정 연구단 단장
- 現) 서울대학교 화학부 교수
- 前) ㈜틀젠 대표이사
- 前) 삼성생명과학연구소 책임연구원
- 前) Howard Hughes Medical Institute/MIT 연구원

김다은

학 력

- 서울대학교 화학부 박사과정
- 서울대학교 화학부 학사

임가영

학 력

- 서울대학교 화학부 박사과정
- 서울대학교 화학교육과 학사

참고문헌

1. Kim, H. & Kim, J.S. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature reviews. Genetics* 15, 321–334 (2014).
 2. Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509–1512 (2009).
 3. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology* 169, 5429–5433 (1987).
 4. Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Soria, E. & Juez, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology* 36, 244–246 (2000).
 5. Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W. & Schouls, L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology* 43, 1565–1575 (2002).
 6. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551–2561 (2005).
 7. Barrangou, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712 (2007).
 8. Makarova, K.S. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature reviews. Microbiology* 9, 467–477 (2011).
 9. Jinek, M. et al. A programmable dual–RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821 (2012).
 10. Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M. & Kim, J.S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA–guided endonuclease. *Nature biotechnology* 31, 230–232 (2013).
 11. Hwang, W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR–Cas system. *Nature biotechnology* 31, 227–229 (2013).
 12. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823 (2013).
 13. Mali, P. et al. RNA–guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826 (2013).
 14. Barrangou, R. RNA events. Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science* 344, 707–708 (2014).
 15. Shalem, O., Sanjana, N.E. & Zhang, F. High–throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. *Nature reviews. Genetics* 16, 299–311 (2015).
 16. Perez–Pinera, P., Ousterout, D.G. & Gersbach, C.A. Advances in targeted genome editing. *Current opinion in chemical biology* 16, 268–277 (2012).
-

참고문헌

17. Woo, J.W. et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature biotechnology* 33, 1162-1164 (2015).
18. Chu, V.T. et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature biotechnology* 33, 543-548 (2015).
19. Maruyama, T. et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature biotechnology* 33, 538-542 (2015).
20. Gilbert, L.A. et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442-451 (2013).
21. Zalatan, J.G. et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell* 160, 339-350 (2015).
22. Bae, S., Park, J. & Kim, J.S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *bioinformatics* (2014).
23. Kim, D. et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nature methods* 12, 237-243, 231 p following 243 (2015).
24. Tsai, S.Q. et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature biotechnology* 33, 187-197 (2015).
25. Cho, S.W. et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research* 24, 132-141 (2014).
26. Shen, B. et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature methods* 11, 399-402 (2014).
27. Tsai, S.Q. et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology* 32, 569-576 (2014).
28. Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J. & Kim, J.S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome research* 24, 1012-1019 (2014).
29. Kleinstiver, B.P. et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523, 481-485 (2015).
30. Zetsche, B. et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* 163, 759-771 (2015).

국가 R&D 현황 분석

최근 3년간(2011~2013년) 유전자 가위와 관련된 연구개발사업을 분석해보았다.

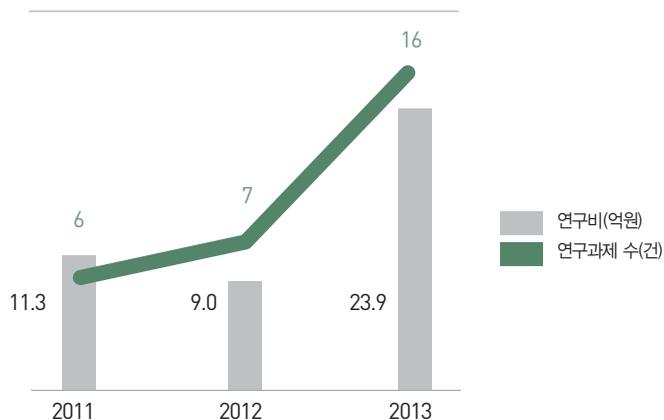
| 과제 선별 기준 |

연구요약문 내 아래 키워드를 포함하고 있는 과제를 선별한 후 연구내용을 바탕으로 분석 대상 선정 (유전자) and (가위)

분석 결과 최근 3년간 총 29건의 과제에 44.3억원의 연구비가 투자됨

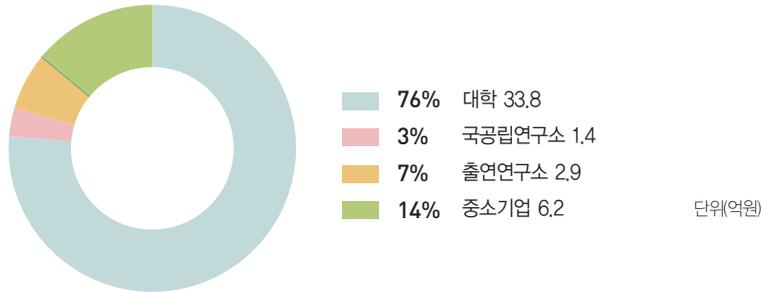
- 연구과제 수는 계속 증가하고 있으나, 연구비는 2012년 소폭 감소하였다가 2013년 다시 크게 증가하는 것으로 나타남

연도별 연구비와 연구과제 건수



연구수행주체 대학(76%) 을 중심으로 연구가 이루어지고 있음.

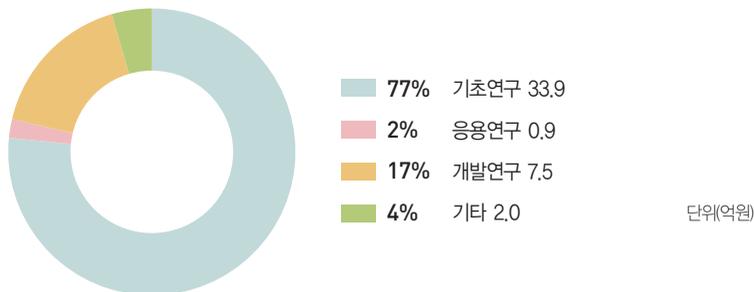
- 대학이 20건(33.8억원)의 연구를 수행하며, 유전자 가위 연구를 주도해 나가고 있음
 - 출연연구소의 연구는 단 4건으로, 국내에서의 연구 수준은 아직 학문적인 수준인 것으로 보여지나,
 - 중소기업에서 3건의 연구를 6.2억원의 연구비가 투자되어 이루어지고 있는 것으로 보아, 일부 분야에 한해서는 유전자 가위를 실용화하는 연구도 시작되고 있는 것으로 사료됨



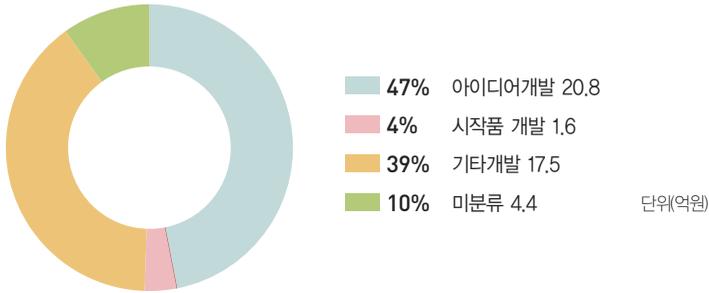
연구수준 기초연구단계(77%), 도입기(60%)의 아이디어개발(47%) 연구가 주로 이루어지는 것으로 나타남

- 유전자 가위를 활용하는 기초연구단계의 연구가 총 24건(33.9억원)으로 주를 이루어지고 있으며, 일부 유전자 가위의 개선(3건, 7.5억원)/활용 분야 모색(2건, 2.9억원) 등의 연구가 개발연구 및 응용연구/기타 단계에서 이루어지고 있음
- 아이디어 개발 및 기타 개발이 각각 12건(20.8억원), 10건(17.5억원)으로 연구의 대다수를 이루고 있음
- 기술수명주기적 측면에서도 아직 연구가 시작단계에 지나지 않기 때문에 도입기로 보는 연구들이 14건(26.6억원)으로 가장 많았고,
 - 유전자 가위를 실제 연구에 활용하고 있는 연구들이 상당수이기 때문에 성장기라고 본 연구들도 8건(8.6억원) 정도 존재함

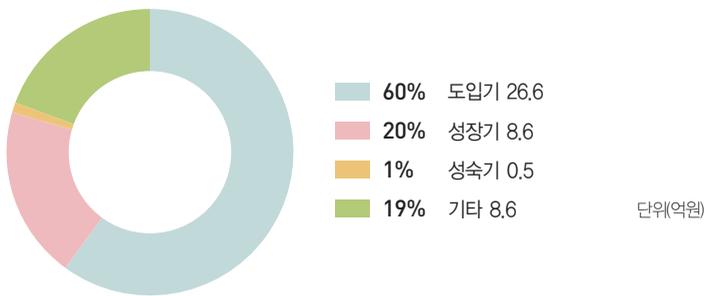
연구개발단계



연구개발성격

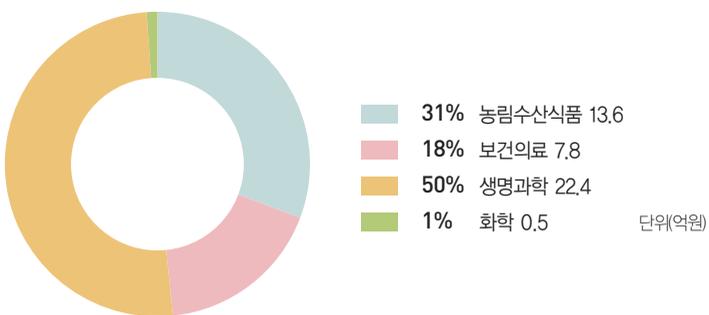


기술수명주기

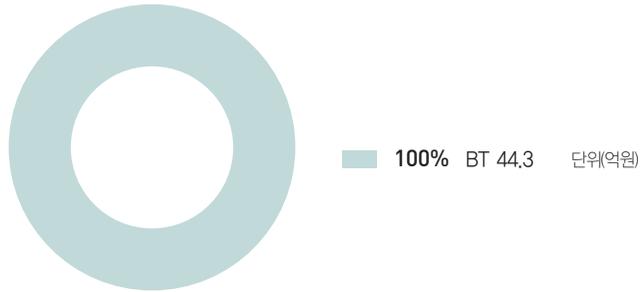


연구분야 국가과학기술표준분류와 미래유망 신기술분류(6T), 국가기술지도분류(NTRM)를 분석한 결과 생명과학 중심의 BT 위주의 연구임을 알 수 있음

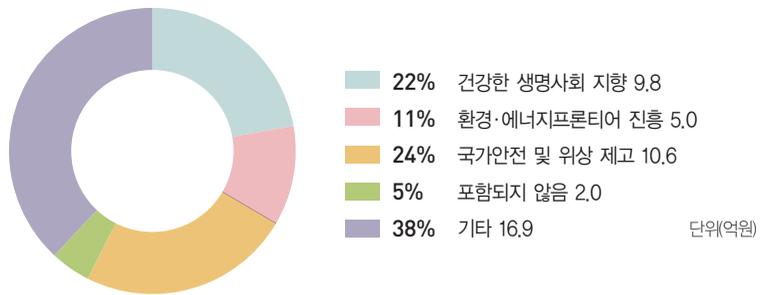
연구분야 [국가과학기술표준분류]



연구분야 [6T]



연구분야 [NTRM]



- 생명과학(10건, 13.6억원)과 보건의료(9건, 7.8억원), 농림수산식품(9건, 13.6억원) 분야를 중심으로 연구가 이루어짐
 - 흥미로운 점은 농림수산식품 분야에 유전자 가위 관련 연구가 많이 이루어지고 있는 점인데, 이는 유전자 가위를 직접적으로 활용하기 위한 연구가 기초 연구단계 수준이기는 하지만 실질적으로 이루어지고 있음을 의미함
- 유전자 가위 관련 연구는 6T 기준으로는 모두 BT인 것으로 나타남
- NTRM 분석 결과는 국가안전 및 위상제고가 9건(10.6억원), 건강한 생명사회 지향이 9건(9.8억원), 기타가 9건(16.9억원)으로 높은 비율을 차지함
 - 국가안전 및 위상제고가 높은 비율로 나타난 것은 유전자 가위 기술을 활용한 식물육종기술 개발 및 종자유전자원 보존 관리 기술들이 이에 해당되는 것으로 나타났기 때문임

3D TISSUE TRANSFORMATION AND IMAGING

3차원 조직 변환 및 이미징

MIT 화학공학과 정광훈(khchung@mit.edu)

우리안의 우주를 들여다 보다.

3차원 조직 변환 및 이미징 기술은 생체 조직이 가지고 있는 구조 및 화학적 정보는 보존하면서 조직의 물리적 성질을 변화시켜 조직 내의 3차원 정보를 추출할 수 있게 하는 차세대 기술이다. 투명한 조직 안에 보존되어 있는 세포 내 생화학 분자정보 (e.g., 단백질) 부터 장 기 수준의 거시적 조직 구조까지 포괄적으로 이미징 할

수 있는 기술로 복잡한 생체 시스템을 연구하는데 있어 혁신적인 접근법을 가능하게 한다. 본 리뷰에서는 3차원 조직 변환 및 이미징 기술의 필요성과 역사, 최근 연구 동향과 극복해야 할 문제점, 그리고 미래의 잠재성에 대해서 살펴본다.



3차원적이고 전체론적인(holistic)의 조직 연구의 필요성과 역사

인간의 신체, 특히 뇌는 귀 사이의 우주라 불릴만큼 복잡하다. 우주의 별만큼이나 많은 수의 세포들이 각각 특징적인 구조와 분자적 특성을 가지고 세분화된 역할을 수행하고 있으며 서로 복잡하게 연결되어 다양한 기능을 하는 네트워크를 형성하고 있다. 뇌에는 수천 종류 이상의 세포가 존재한다고 알려져 있으며 같은 종류의 세포도 그 세포를 둘러싼 주변 환경과 세포 간의 연결 상태에 따라 그 성질과 역할이 다르다. 신경 신호를 전달하는 신경 세포의 경우에는 시냅스라고 불리는 작은 연결 구조를 통해 다른 신경세포와 신호를 주고 받는데 각각의 세포가 무려 1만개 이상의 시냅스를 가지고 있다고 알려져 있다. 다른 장기나 생명체도 정도의 차이는 있지만 인간이 창조해낸 어떤 인공적인 시스템보다도 더 복잡하다고 해도 과언이 아닐 것이다.

이렇게 복잡한 생체 시스템을 이해하기 위해서는 어떤 정보들이 필요할까? 우선 시스템을 이루고 있는 부품(building block)들의 상세한 목록이 필요할 것이다. 즉 장기나 생명체를 이루는 기본 단위인 세포들의 세세한 특징과 기능을 알아야 한다. 이를 위해서는 세포의 종류, 형태, 세포를 구성하고 있는 생화학 분자들에 관한 폭넓은 정보가 필요하다. 이런 부품 목록이 갖추어지면 다음으로 부품들이 어떻게 배열되어 있고 서로 어떻게 연결되어 있는지를 파악해야 한다. 즉 세포들의 주변 환경과 세포들의 연결 구조를 보여주는 3차원 지도가 필요한 것이다. 세포와 분자 수준의 해상도를 가진 인체 설계도를 확립할 수 있다면 생체 기관의 기본 작동 원리를 이해하는데 크게 도움이 될 뿐만 아니라, 시스템이 오작동을 하는 경우에는 어떤 분자가, 세포가, 더 나아가 세포 간 네트워크가 문제가 있는지를 파악할 수 있을 것이다.

고해상도 3차원 인체 설계도가 바이오와 의학 연구 전반을 획기적으로 가속화 시키리라는 점에는 의문의 여지가 없음에도 불구하고 과학자들에게 이런 종합적인 지도를 만드는 것은 아직 꿈으로 남아 있다. 기술적 한계 때문이다.

CT(Computed Tomography, 컴퓨터단층촬영)나 MRI(Magnetic Resonance Imaging, 자기공명영상)를 이용할 수는 없는 것일까? CT와 MRI 같은 이미징 기술들은 의학 연구 및 진단에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 특별한 염색 없이도 살아 있는 조직을 이미징 할 수 있기 때문이다. 이 기술들은 살아있는 인체의 거시적인 구조를 3차원적으로 구현할 수 있을 뿐만 아니라 뇌 같은 기관의 활성화도 측정할 수 있다. 한편

우리에게는 덜 친숙하지만 학계에서는 널리 쓰이는 OCT (Optical Coherent Tomography, 광학단층촬영)와 같은 기술은 CT나 MRI에 비해 보다 높은 해상도의 3차원 이미지를 제공할 수 있어 살아있는 생체 내 암의 형태를 파악하거나 암조직의 혈관 구성을 연구하는데 폭넓게 사용된다¹(UNIST의 정웅규 교수 연구팀이 선도 연도 그룹임). 하지만 이 기술들은 해상도가 충분히 높지 못해 세포 각각의 특징이나 연결성을 보여주지는 못할 뿐만 아니라, 분자 정보를 얻어내기가 매우 힘들다는 점에서 한계를 가지고 있다².

현재 3차원 인체 지도를 만드는데 있어 가장 진보된 방법은 고해상도 현미경을 이용하는 것이다. 고해상도 현미경은 생체 조직안의 작은 세포들과 그 안의 분자들을 들여다 볼 수 있게 한다. 그럼 어떻게 하면 뇌와 같이 크고 불투명한 장기를 현미경으로 이미징 할 수 있을까? 대답은 조직을 아주 얇게 자르는 것이다.

1980년 Sydney Brenner가 이끄는 연구팀에 의해 생명체의 고해상도 3차원 지도가 처음으로 만들어 졌다³. 연구팀은 *C.elegans* 라는 작은 벌레가 가지고 있는 302개의 신경 세포가 어떻게 연결되어 있는지를 파악하기 위해 이 벌레를 50nm 두께의 아주 얇은 절편으로 자른 다음 전자 현미경을 이용해서 수천장의 절편을 각각 이미징을 하고 얻어진 이미지들을 수작업으로 연결해 신경세포들의 연결망을 완벽하게 재구성 했다. 무려 십년이상 걸린 대작업이었다. 현재 보다 발전한 전자 현미경 기술은 최근 쥐 눈의 망막과 뇌의 작은 부분에서 신경세포의 연결망을 재구성하는데 이용되는 등 바이오와 의학 연구 전반에 널리 쓰이고 있다⁴⁻⁶(그림 1a).

전자 현미경을 이용한 3차원 조직 맵핑법은 *C. elegans*와 같이 아주 작은 샘플을 연구하는데에는 효과적인 방법이지만 큰 샘플을 이미징 하기에는 너무 느리다는 문제가 있다. 따라서 인간의 뇌, 장기와 같은 큰 생체 조직을 맵핑하기 위해 과학자들은 형광 현미경을 이용한 방법으로 눈을 돌려야했다. 형광 현미경을 이용한 이미징 기술은 전자 현미경 처럼 나노 수준의 해상도는 제공하지 못하지만 세포안의 작은 구조까지(sub-micron) 볼 수 있는 충분한 해상도를 제공하고 이미징 속도가 훨씬 빨라 큰 조직을 이미징 하는데 적합하다. 하지만 빛이 투과할 수 없는 생체 조직을 이미징하기 위해서는 전자 현미경과 마찬가지로 조직을 얇은 절편으로 먼저 잘라야하는 문제점이 있다.

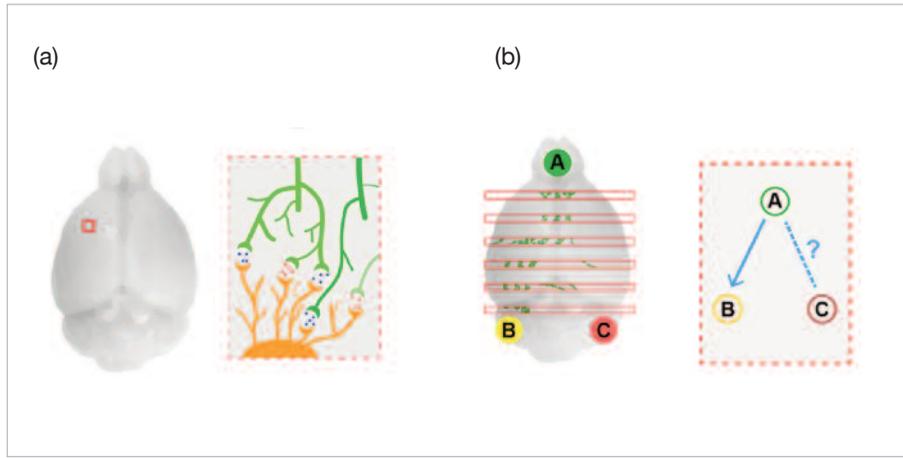


그림 1. 고해상도 현미경을 이용한 기존의 3차원 조직 이미징 기술들. (a) 전자 현미경은 조직을 나노수준의 고해상도로 이미징 할 수 있어 뇌세포간의 연결을 시냅스 수준에서 맵핑할 수 있지만 작은 조직에만 적용 가능하다는 단점이 있다. (b) 형광 현미경과 자동화된 vibratome을 이용하면 빠른 시간에 쥐 뇌 전체를 이미징하여 뇌의 거시적인 연결구조를 재구성 할 수 있지만 해상도가 낮아 세포 수준에서의 연결망을 분석하기는 힘들다.

알렌 뇌과학연구소(Allen Institute for Brain Science)에 있는 과학자들은 최근 형광 현미경을 이용하여 처음으로 쥐 뇌에서 뇌의 다른 부분들이 서로 어떻게 연결되어 있는지를 보여주는 “projectome”을 완성하였다⁷. 이 프로젝트를 위해 과학자들은 자동화된 vibratome⁹과 투 포톤(two-photon) 현미경이 결합된 장비를 이용하여 쥐의 뇌를 0.1mm 간격으로 잘라 이미징을 수행하였다⁸. 하지만 0.1mm라는 큰 간격으로 이미징을 했기 때문에 각각의 뇌세포들을 재구성 하는 것은 불가능 했을 뿐만 아니라 각각의 세포들의 기능을 유추하는데 핵심이 되는 분자 정보를 얻어 낼 수가 없었다(그림 1b). 이렇듯 기존의 조직을 자르고 형광 현미경을 이용해서 이미징하는 기법은 생체 조직이 가지고 있는 많은 구조적 그리고 분자 정보를 추출하기에 명백한 한계를 가지고 있다.

1) 진동방식의 조직 미세절단기(microtome), 유연조직을 얼리지 않고 절단할 때 이용

조직 투명화 기술의 역사 및 CLARITY의 탄생

생체 조직에서 고해상도의 정보를 얻어내기가 힘든 근본적인 이유는 무엇일까? 수많은 세포들이 아주 높은 밀도로 얽혀서 일종의 장벽을 형성하여 빛과 화학물질이 들어올 수 없도록 막기 때문이다⁹. 조직으로부터 분자 정보를 얻기 위해서는 항체와 같은 분자 표지자(molecular probe)들이 조직 안으로 들어가 목표 분자와 결합해야 하는데 이 장벽에 막혀서 샘플 깊숙히 들어갈 수가 없는 것이다. 또한 이 장벽은 빛을 산란시켜서 빛이 조직 안으로 투과하는 것을 막는다. 이러한 한계 때문에 생체 샘플을 먼저 얇게 자른 다음에 각각의 절편을 염색하고 이미징을 해야 하는 것이다. 하지만 앞에서 살펴 보았듯이 조직을 자르게 되면 많은 정보를 잃게 되고 2차원 이미지들을 3차원으로 연결하는 과정에서 전체적인 효율이 떨어지게 된다.

이러한 문제를 부분적으로 해결하기 위하여 조직 투명하게 만들 수 있는 기술들이 개발 되어왔다. 이 기술들은 조직 세포와 굴절률(refractive index)이 동일한 용액을 이용하여 샘플을 투명하게 만드는데 이 과정을 거치고 나면 조직 내부에서 일어나는 빛의 산란이 줄어 형광 현미경을 이용하여 샘플 깊숙이 이미징을 할 수 있게 된다. 벤질알콜(benzyl alcohol) 벤질벤조 에이트(benzyl benzoate) 같은 지용성 용액을 이용한 방법이나 당분자(sugar molecule)이 포함된 수용성 용액을 이용한 방법들이 그 예이다⁹⁻¹². 이 조직 투명화 기술들을 이용하면 보다 두꺼운 샘플을 이미징 할 수 있으나 염색 기법을 이용하여 생분자 정보를 조직에서 추출해내는 데에는 적합하지 않다. 세포벽이 아직 남아있어서 염색을 위한 화학물질의 침투를 막기 때문이다.

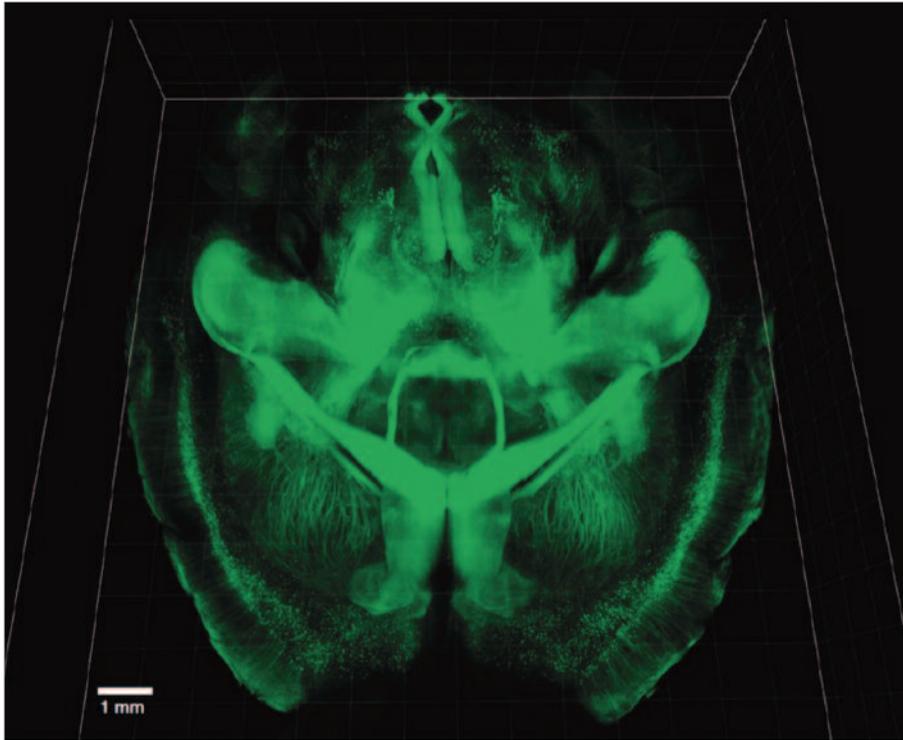


그림 2. CLARITY를 이용하여 구현한 쥐 뇌의 신경망 . CLARITY 처리로 쥐 뇌를 투명하게 만든 후 컨포컬(confocal, 1-photon) 현미경을 이용하여 yellow fluorescent protein(YFP)을 발현하는 뇌세포들을 이미징 하였다. CLARITY 를 이용하면 조직이 매우 투명해져 조직을 자르지 않고 3차원적으로 이미징 할 수 있다³.

이러한 한계를 극복하기 위하여 필자는 CLARITY라는 새로운 기술을 스탠포드 대학의 Karl Deisseroth 교수 연구팀에 의해 개발되었다¹⁴(그림 2). 이 기술은 하이드로젤이라는 투명하고 다공질의 폴리머 그물망을 조직 안에서 합성하여 조직 구조와 분자들을 3차원적으로 보존하면서 조직을 불투명하게 만드는 지질을 완전하게 제거할 수 있게 할 수 있는 기술이다(그림 3). CLARITY는 조직을 매우 투명하게 만들 뿐 아니라 분자 표지자의 투과를 막는 장벽도 완전히 제거해 빛과 분자 표지자가 쉽게 조직을 투과해 들어갈 수 있게 한다. 또한 하이드로젤이 분자 수준에서 조직의 3차원 정보를 보존하기 때문에 세포벽이 완전히 제거가 되었음에도 불구하고 세포들의 세밀한 형태와 세포들 간의 연결 정보 그리고 세포 내 단백질과 RNA 같은 분자 정보가 잘 보존된다.

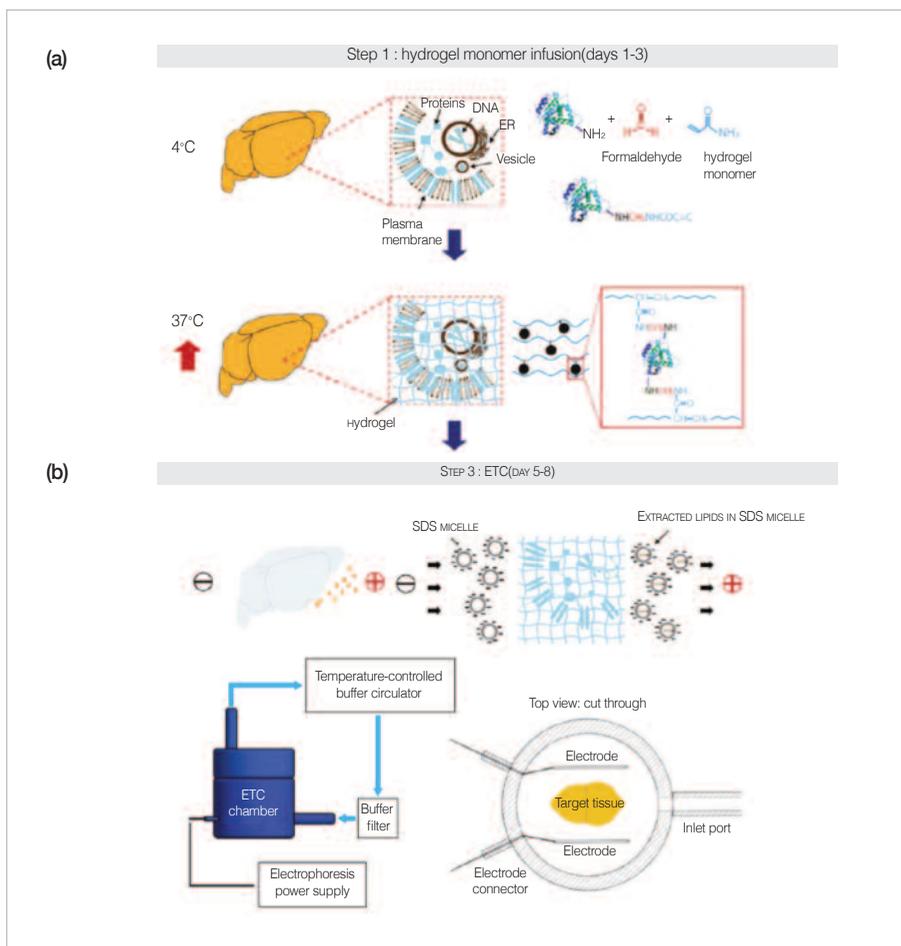


그림 3. CLARITY 기술의 개념과 샘플 처리과정. 먼저 하이드로젤의 형성에 필요한 모노머와 개시제 그리고 포름알데히드 (formaldehyde)를 혈관을 통해 조직 전체로 전달한다. 전달된 화학물질들은 조직내의 생화학물질들과 공유결합을 형성한다(step #1). 다음으로 온도를 4도에서 37로 높여 조직 내부에서 하이드로젤을 합성한다(step #2). 마지막으로 전기 영동으로 음전하를 띤 세제(SDS micelle)를 조직내부로 통과시켜 지질을 제거하면 조직의 세포막이 제거되어 빛과 화학물질의 투과성이 높아지게 된다(step #3)¹⁴.

CLARITY 처리된 조직은 여러 종류의 현미경을 이용하여 이미징이 가능하다. CLARITY 샘플은 광학적으로 매우 투명하기 때문에 빛이 아주 깊숙이 투과해 들어갈 수 있어 기존의 컨포칼이나 멀티 포톤(multi-photon) 현미경 같은 레이저 스캐닝 방법들을 이용하면 조직을 자르지 않고도 수 mm깊이를 이미징 할 수 있다. 필자는 2013년에 Nature에 출판된 논문에서 컨포칼 현미경(1-photon)으로 3.6mm까지 이

미징 할 수 있는 렌즈를 이용하여 쥐의 뇌를 이미징 할 수 있음을 보였다. 최근에는 8mm까지 이미징 할 수 있는 렌즈가 개발되어 더 두꺼운 샘플도 이미징이 가능하게 되었다. 이러한 장초점거리(long-working distance)렌즈들을 빛의 산란의 영향을 적게 받는 투 포톤 이미징 기술과 함께 사용하면 해상도의 잃지 않으면서 아주 두꺼운 조직을 이미징 할 수 있다. CLARITY는 뇌조직 뿐만 아니라 대부분의 장기들도 투명하게 만들어서 이 장기들을 자르지 않고도 3차원 이미징을 가능하게 한다(그림 2).

CLARITY처리된 조직은 나노레벨의 구조 또한 제한적으로 보존하기 때문에 전자 현미경을 이용해서 나노 구조를 이미징 하는데도 사용될 수 있다. 예를 들어 형광 현미경 이용하여 먼저 뇌 전체의 연결 구조를 이미징한 다음 원하는 뇌 부위를 잘라내어 그 부분의 시냅스의 구조를 전자 현미경을 이용하여 이미징하는 것이 가능하다. 이러

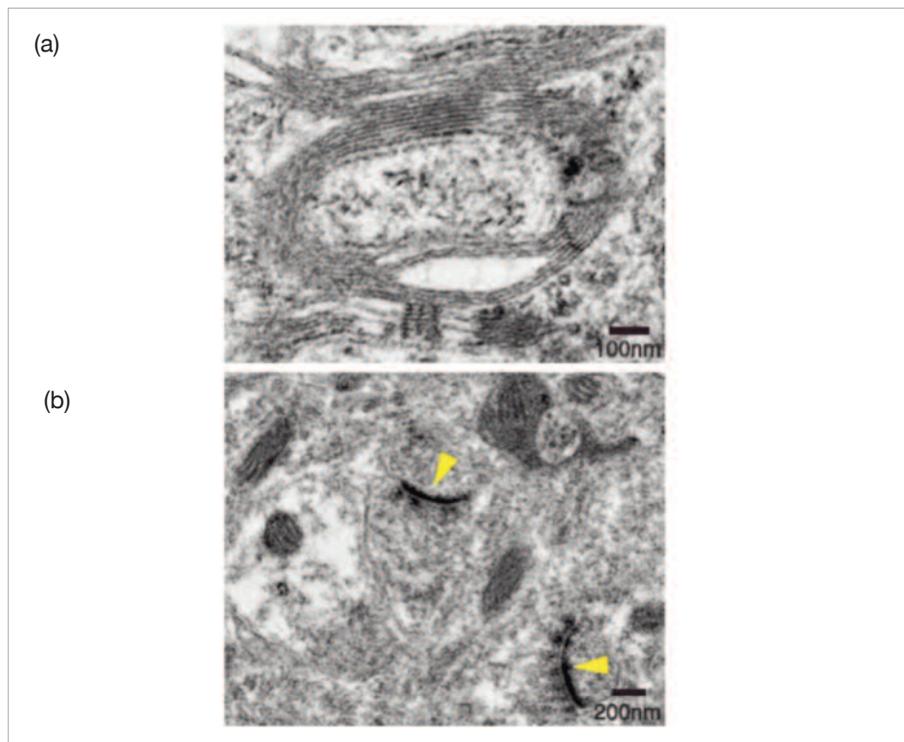


그림 4. CLARITY는 조직 내 나노레벨의 정보 또한 제한적으로 보존하기 때문에 전자 현미경을 이용하면 myelinated 구조 (a)나 synaptic density(b) 같은 세포내부의 구조를 이미징 할 수 있다⁴⁴.

한 방법을 이용한다면 하나의 샘플에서 시스템 레벨의 정보 뿐만 아니라 나노레벨의 정보까지 추출이 가능해지는 것이다. 또한 STORM(Stochastic Optical Resolution Microscope)이나 STED(Stimulated Emission Microscope)와 같은 초고해상도 현미경을 이용해서 나노 구조나 분자들을 이미징 하는 것도 가능하다(그림 4). KIST 김진현 박사 연구팀의 바이러스를 이용한 염색기법(Viral labeling)을 이용하면 일반 형광 현미경을 통한 시냅스와 같은 아주 작은 연결구조의 이미징도 가능하다¹⁵.

CLARITY의 또 다른 장점은 다양한 분자 표현형의 분석(molecular phenotyping)이 가능하다는 점이다. 하이드로젤에 공유 결합으로 연결되어 있는 조직 내 분자들을 항체나 DNA 표지자(probe), 혹은 유기염료(organic dye)를 이용하여 염색함으로써 대상 분자들의 3차원 분포를 이미징 할 수 있다. 또한 조직의 구조나 분자들을 파괴하지 않고 이미징한 표지자들을 제거할 수 있기 때문에 반복적인 분자 표현형의 분석이 가능하다. 따라서 CLARITY를 이용하면 세포나 조직의 3차원 구조, 세포간의 연결성을 맵핑할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 분자 정보까지도 추출해 낼 수 있다(그림 5).

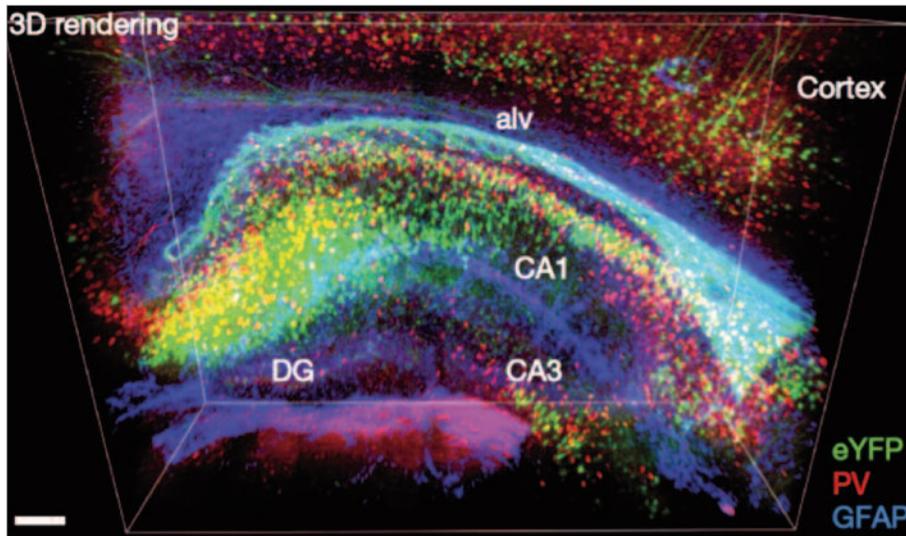


그림 5. CLARITY를 이용하여 구현한 쥐 뇌 해마 부위의 3차원 구조. 항체를 이용하여 parvalbumin(빨간색)을 발현하는 세포와 glial fibrillary acidic protein(파란색)을 발현하는 세포를 염색하고 이미징 하였다. 초록색은 YFP를 발현하는 뇌세포¹⁴.

3차원 조직 변환 및 이미징 기술의 현재와 발전 방향

CLARITY를 비롯한 다른 조직 투명화 기술들은 아직 초기 개발 단계임에도 불구하고 현재 뇌과학 뿐만 아니라 3차원 조직 검사, 암진단, 발생학, 다른 장기들의 질환 연구 등 다양한 분야에서 활용되고 있으며 그 범위가 점점 넓어져가고 있다. 그러나 이 기술들이 보다 널리 쓰이고 바이오와 의학 발전에 기여하기 위해서는 많은 문제점들이 해결되어야 한다. 지금부터 3차원 조직 변환 및 이미징 기술의 현 주소와 향후 발전 방향에 대해 논의해보자.

3차원 조직 변환 기술의 첫번째 문제는 속도이다. 단일 세포나 얇은 조직 절편보다 수백 수천배 큰 샘플을 처리하는 데는 아주 오랜 시간이 소요된다. 조직의 보존, 투명화, 염색에 필요한 화학 물질들을 조직 깊숙히 전달하고 지질과 같은 조직을 구성하고 있는 분자들을 밖으로 추출하는 과정이 매우 느리기 때문이다. 예를 들어 하나의 세포를 항체(antibody)로 염색하는 데는 반나절이면 충분하지만, 쥐의 뇌 전체를 염색하는 데는 무려 한달 이상이 소요 된다. 거기다 염색된 샘플을 이미징 하고 얻어진 데이터를 분석하는데 걸리는 시간까지 고려한다면 샘플 처리부터 의미 있는 결과를 얻는데까지 수개월 이상 걸린다는 얘기가.

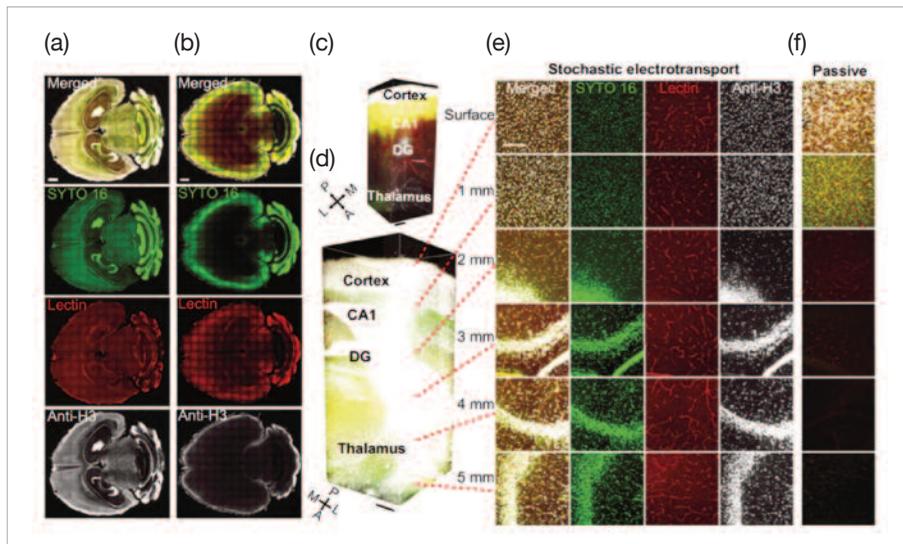


그림 5. Stochastic electrotransport²⁾를 이용하면 조직 염색에 필요한 시간을 10배 이상 단축할 수 있다. (a, d, e) Stochastic electrotransport를 이용한 쥐뇌 염색. 하루만에 뇌를 균일하게 염색할 수 있다. (b, c, f) 기존의 수동적 염색법을 이용하여 하루동안 쥐뇌를 염색한 결과. 조직의 표면만 염색되었다*.

2) 회전전지장을 이용하여 전기영동이동성(electrophoretic mobility)이 높은 물질만을 빠르게 다공성 조직 내에 침투시키는 방법.

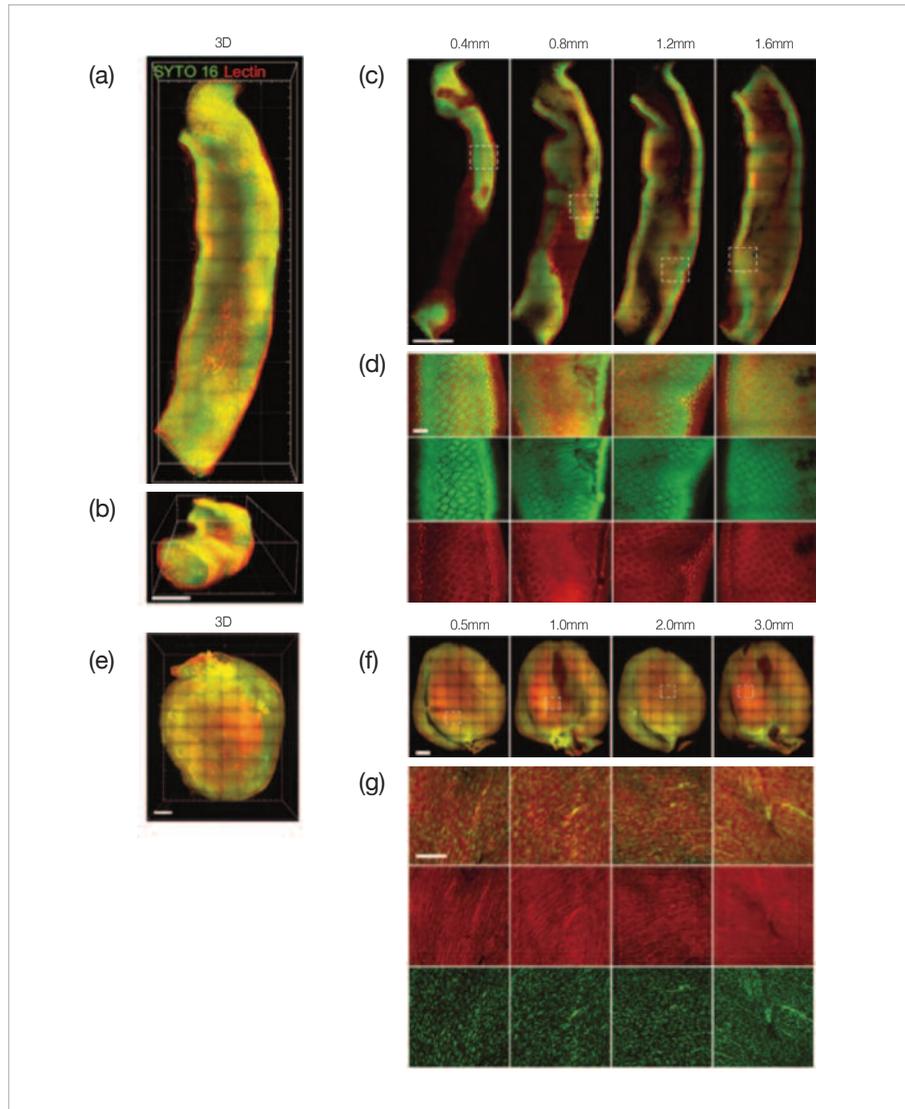


그림 6. Stochastic electrotransport를 이용하여 고속으로 염색하고 라이트 시트 현미경을 이용하여 고속으로 이미징한 쥐의 창자와 심장.

필자가 이끄는 연구팀은 조직 변환 속도를 향상시키기 위해 최근 Stochastic electrotransport라는 새로운 기술을 개발하였다¹⁵. 이 기술은 조직과 같은 다공성 샘플 안에서 화학 물질의 움직임을 수십배에서 수백배 빠르게 할 수 있는 혁신적인 방법으로 역동적으로 바뀌는 전기장을 이용하여 조직을 손상시키지 않고 원하는 화학 물질만 빠르게 이동시킬 수 있다. 이 기술을 이용하여 본 연구진은 조직의 투명화와 염색에 필요한 시간을 한달에서 하루로 크게 단축시킬 수 있었으며, 현재 이 기술이 보다 광범위하게 적용될 수 있도록 후속 연구를 진행하고 있다.

이미징 속도를 향상시키는 것 또한 중요한데, 이를 위해 많은 연구 그룹들이 새로운 고속 이미징 기술들을 속속 발표하고 있다. 그 중 가장 각광 받고 있는 기술은 라이트시트 현미경(Light-sheet microscopy)로 기존의 이미징 기법보다 수십 수백배 빨라 이미징 시간을 크게 단축시킬 수 있다¹⁷. 본 연구진도 라이트 시트 현미경을 개발하고 이를 이용하여 쥐의 뇌를 비롯한 여러 장기를 몇 시간 안에 성공적으로 이미징 할 수 있음을 증명하였다^{16,18}. 하지만 이 기술은 이미징 할 수 있는 샘플의 크기가 제한되고 해상도에 한계가 있어 이를 해결하기 위해서는 보다 많은 기술들이 개발되어야 될 것이다.

또 다른 해결해야 하는 과제는 고비용 문제이다. 큰 샘플에서 고해상도의 3차원 정보를 추출하는데는 많은 비용이 요구된다. 조직의 부피가 커질수록 투명화하는데 더 많은 화학물이 필요할 뿐만 아니라 분자 정보를 얻어내는데 핵심적으로 필요한 분자 표지자의 양도 샘플의 부피에 비례하여 늘어나기 때문이다. 특히 항체와 올리고 뉴클레오타이드(oligonucleotide)같은 생화학 표지자를 이용하여 조직 전체를 염색하기 위해서는 천문학적 비용이 소요될 수 있다. 거기다 이미징 시간과 데이터 양도 더불어 늘어나게 되어 전체적 비용을 높이게 된다. 이런 저속도 고비용의 문제는 3차원 조직 변환기술의 광범위한 이용을 저해할 뿐 아니라 향후 잠재적 발전 가능성도 제한하게 된다.

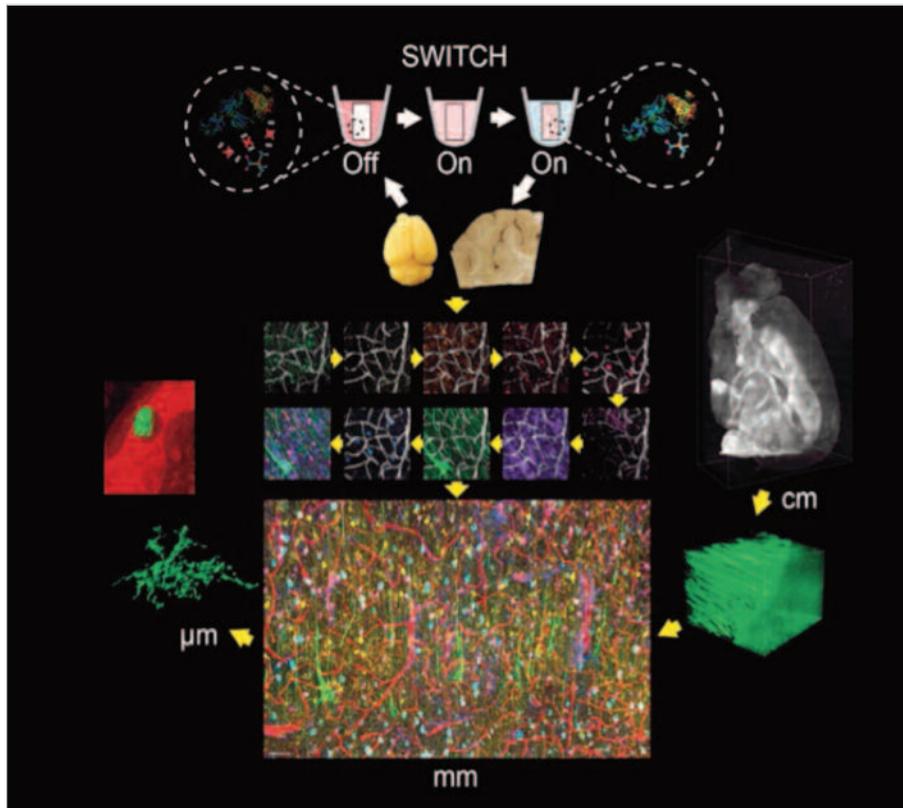


그림 7. SWITCH기술은 조직준해에서 화학물들의 반응 시간과 속도를 조절함으로써 조직의 크기에 상관없이 하이드로젤 형성 및 염색이 동일한 조건에서 일어날 수 있도록 한다. 이 새로운 기술은 무제한적으로 많은 횡수의 염색과 이미징을 가능하게 하여 같은 조직에서 아주 다양한 분자적·구조적 정보를 얻을 수 있게 한다⁸.

마지막으로 확장성의 문제가 해결되어야 할 것이다. 지금까지 3차원 조직 변환 및 이미징 기술은 주로 제브라 피시(zebra fish), 초파리 배아(fruit fly embryo), 그리고 쥐(mouse) 같은 작은 동물 모델에 많이 사용되어 왔다. 이 기술들이 원숭이 같은 보다 고등한 동물 모델이나 인간의 장기를 이해하는데 쓰이기 위해서는 기술들의 많은 부분들이 근본적으로 바뀌어야 한다. 예를 들어서 동물 모델의 경우에는 심장과 혈관을 통해 필요한 화학물질을 장기 전체로 쉽게 보낼 수 있는데 인간의 장거나 조직의 경우 이미 혈관이 손상된 상태이기 때문에 같은 방법을 사용해서는 화학물질을 전달할 수 없다. 따라서 장기를 보존하고 하이드로젤을 만드는데 필요한 화학물질들을 다

른 방법을 통해 전달해야 한다. 뿐만 아니라 인간의 조직은 그 물리적 화학적 특성이 쥐와는 매우 다르다. 예를 들어 인간의 뇌는 쥐의 뇌보다 지질의 양이 5배 이상 많기 때문에 투명화하는 것이 훨씬 힘들다. 이런 종간의 차이나 장기간의 차이를 극복하고 확장성의 문제가 해결될 때 비로소 3차원 조직 변환 및 이미징 기술들의 잠재성이 발휘될 수 있을 것이다.

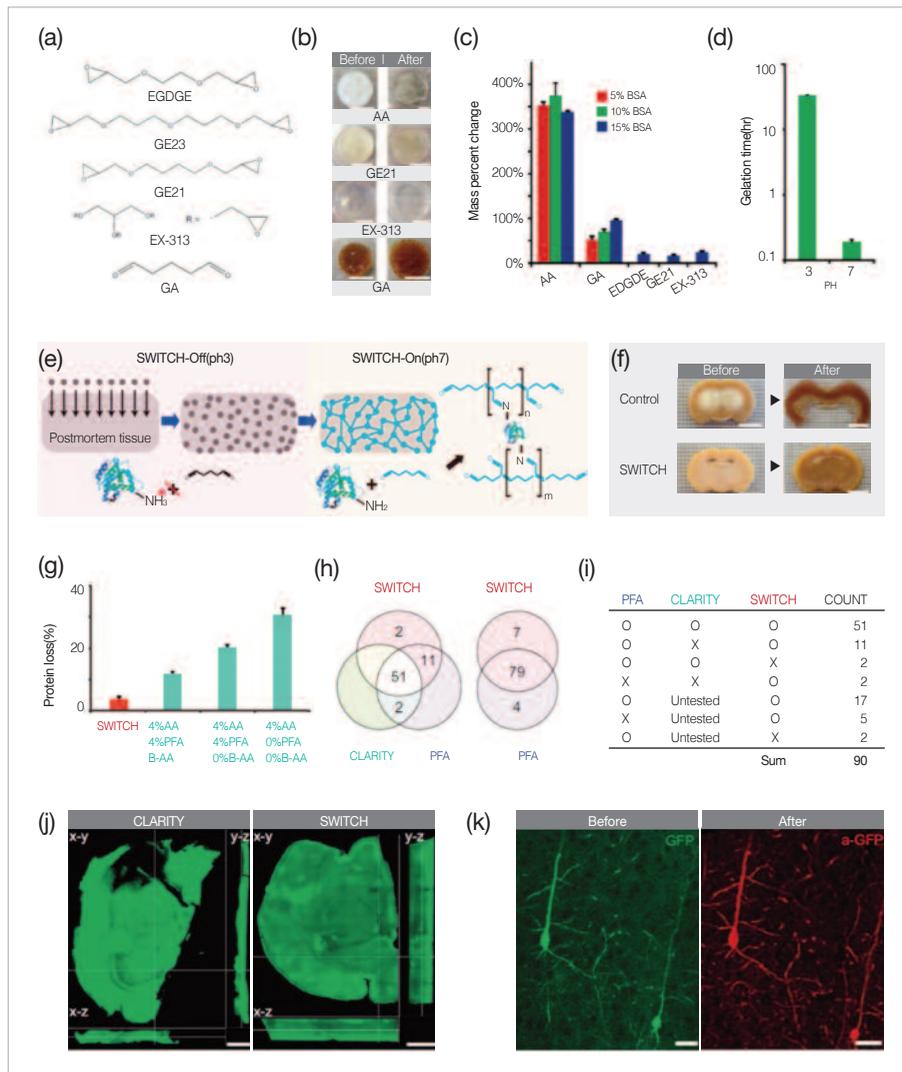


그림 8. SWITCH를 이용하면 혈관을 통해 화학물질들을 전달하지 않고 간단히 다기능 고정제(multifunctional fixative)를 함유하고 있는 용액에 조직을 보관함으로써 조직안에 균일한 젤을 만들 수 있다. SWITCH는 어떤 종류나 크기의 조직에도 적용 가능하며 조직의 구조적 분자적 정보의 보존을 극대화 한다⁸⁾.

확장성 문제를 해결하기 위한 노력의 일환으로 필자가 이끄는 연구진은 최근 SWITCH (System-Wide control of Interaction Time and kinetics of Chemicals) 라는 새로운 기술을 개발하였다¹⁸(그림 7,8). 이 기술은 모든 조직 처리에 있어 가장 기본이 되는 화학 반응의 속도를 원하는대로 조절하여 조직의 크기에 상관없이 조직 내 모든 세포들에 있는 분자들이 동일한 반응 조건(반응물의 농도와 반응 시간)에 노출 될 수 있도록 하는 획기적인 기술이다. 이 기술을 이용하면 어떤 크기의 샘플도 처리할 수 있고 인간의 조직에도 적용이 가능해 확장성의 문제를 크게 개선했다고 볼 수 있다.

뿐만 아니라 이 기술을 이용하면 하나의 샘플에서 무제한적으로 많은 양의 정보를 얻어낼 수 있어 다양한 세포간 혹은 분자간의 복잡한 상호 관계를 이해하는데 필요한 핵심적인 정보를 얻어낼 수 있다(그림 9). 최근 Cell에 게재된 논문에서 필자가 이끄는 팀은 SWITCH 기술을 이용하여 인간의 뇌 조직을 열과 화학처리에 저항력을 가지는 젤로 변환할 수 있다는 것을 보였다. 그리고 이렇게 변환된 뇌 조직에서 22번 이상의 분자 표현형 분석이 가능함을 보였다. SWITCH를 이용하면 사실상 무제한적인 분자 및 구조 정보를 동일한 조직에서 얻어낼 수 있는 것이다. 또한 프린스턴 대학의 Sebastian Seung 교수가 이끄는 연구팀과의 협업을 통해 이미지 프로세싱 알고리즘을 개발하여 많은 3차원 데이터들을 세포수준에서 연결분석(co-registration)하는 것이 가능하게 되었다. 이 기술을 이용하여 본 연구진은 인간 뇌 조직을 구성하고 있는 다양한 세포들을 3차원적으로 맵핑하고 그 세포들의 분자적 특성 또한 추출할 수 있다는 것을 보임으로써 앞으로 이 기술이 인간 뇌를 분자 및 세포 수준에서 재구성하는데 쓰일 수 있다는 가능성을 증명하였다(그림 9).

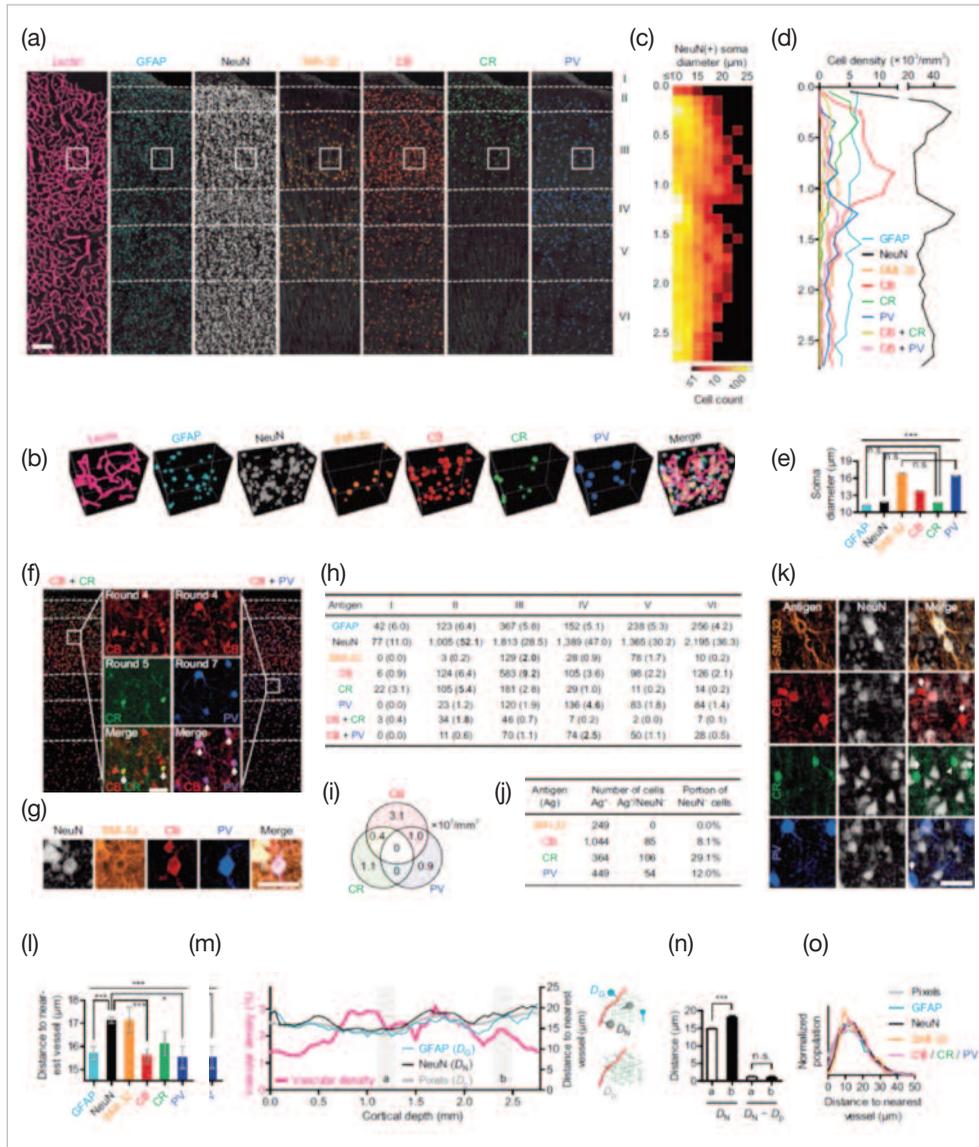


그림 9. SWITCH는 인간 뇌조직에서 매우 다양하고 정량적인 3차원 정보를 추출할 수 있게 한다¹⁷.

SWITCH 기술의 또 다른 중요한 장점은 특별한 장비를 쓰지 않고도 큰 조직을 균일하게 염색할 수 있다는 점이다(그림10). 이는 염색 과정에서 분자 표지자와 조직 내 목표 분자 사이의 반응을 조절할 수 있기 때문에 가능한데 이 기술을 이용하여 쥐 뇌의 유수축색(myelinated axon)들을 모두 균일하게 염색할 수 있었고 얻어진 데이터로 부터 뇌세포의 복잡한 연결 구조가 무작위가 아니라 3차원 격자구조를 띄고 있음을 처음으로 발견하였다.

필자가 이끄는 연구팀 외에도 스텐포드 대학의 Karl Deisseroth 연구팀, 하버드 대학의 Mitsuko Watabe-Uchida 연구팀 등이 CLARITY를 비롯한 3차원 조직 변환 및 이미징 기술을 이용하여 얻은 연구 결과를 속속 발표 하고 있다^{19,20}. 뿐만 아니라 많은 그룹들이 경쟁적으로 조직 투명화 기술을 개발하고 이를 이용하여 뇌 뿐만 아니라 척수²¹, 배아^{10,22}, 피부²³, 골수²⁴, 식물²⁵, 임상조직²⁶을 연구하고 있다.

지금까지 살펴봐왔듯이 3차원 조직 변환 및 이미징 기술은 아직 많은 한계점이 있음에도 불구하고 바이오와 의학 관련 연구에 있어 새로운 접근법을 가능하게 해 많은 분야의 연구를 가속화 시키고 있다. 하지만 지금까지 살펴온 속도, 비용, 확장성 문제 외에도 빅데이터의 저장과 분석 그리고 공유 플랫폼 개발 등 많은 과제들이 산재해 있다. 이런 문제들을 해결하기 위해서는 재료, 공정, 이미징, 컴퓨팅 등 많은 분야에서 새로운 기술들이 개발되어야 하며 연구자간 그리고 연구기관 간의 긴밀한 공동 연구를 통해 방법론과 표준이 제시되어야 할 것이다. 이러한 과정은 우리가 이미 많은 다른 분야에서 보아 왔듯이 오랜 시간과 인내를 필요로 할지도 모른다.

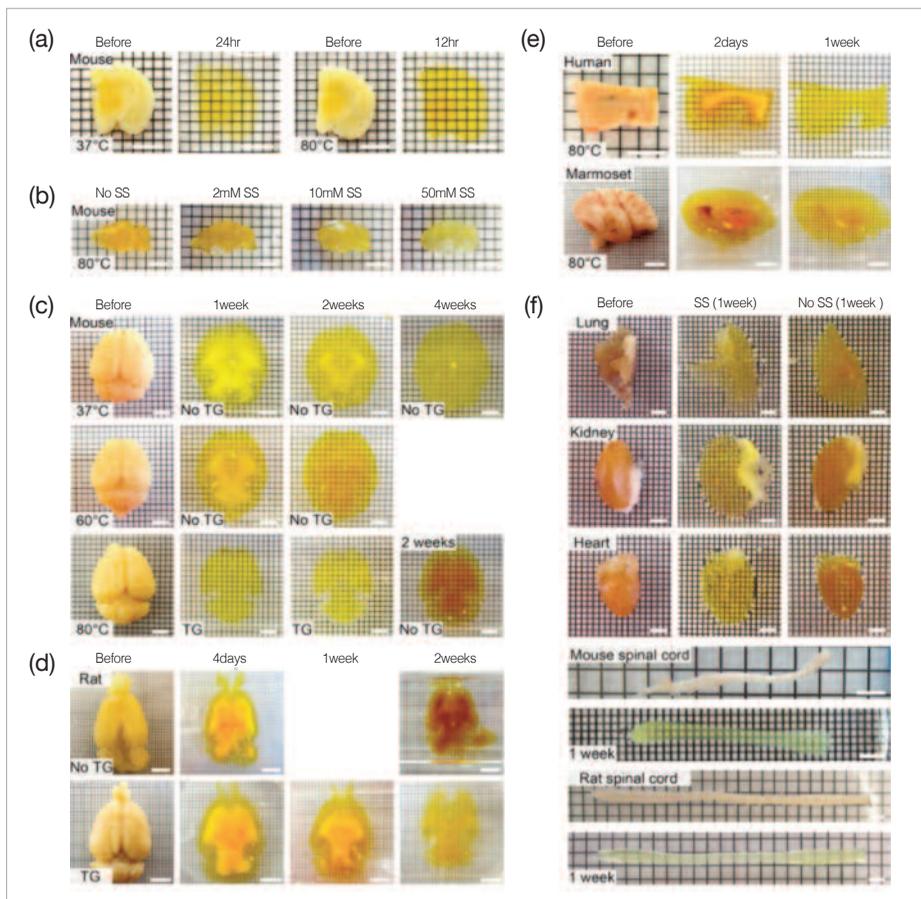


그림 10. 투명화된 샘플 모습. SWITCH는 많은 종류의 장기와 동물들 그리고 임상조직에 적용가능하다.

3차원 조직 변환 및 이미징 기술이 밝히는 미래

그렇다면 이런 문제들이 해결된 미래는 어떤 모습일까? 어떻게 이 새로운 기술이 다른 혁신적인 기술들과 함께 바이오 메디컬 연구 뿐만 아니라 우리의 삶을 변화시키고 있을까? 필자는 우리가 그 해답을 인간 유전자 연구의 과거와 현재에서 찾아볼 수 있다고 생각한다.

우리 인체의 설명서(the book of life)라고 불리는 인간 유전자 지도를 만들자는 원대한 프로젝트는 1990년 시작되었다. 그 당시 유전자 염기서열 분석(genome sequencing) 기술은 지금의 3차원 조직변환 기술과 마찬가지로 매우 느리고 높은 비용을 요구해서 게놈 지도를 완성하는데 무려 10년이 넘는 시간과 천문학적인 돈이 들 것으로 예상되었다. 이 프로젝트에 대한 회의적인 시각과 반대가 많았음은 당연한 일이었다. 많은 반대를 무릅쓰고, 결국 미국의 주도로 프로젝트가 시작되었고 무려 13년동안 총 30억달러의 비용을 들여 2003년에 유전자 지도가 완성되었다.

그러나 이 프로젝트를 통해 인류가 얻은 것은 한 인간의 유전자 지도 그 이상이 었다. 이 과정을 거치며 비약적인 기술 개발이 일어났고 유전자 염기서열 분석에 걸리는 시간과 비용이 획기적으로 단축되어 현재 1만달러로 8일이면 인간 유전자 염기서열 분석이 가능하게 되었다. 25년 만에 유전자 염기서열 분석 비용이 무려 수십만분의 1로 떨어진 것이다. 이게 끝이 아니다. 캘리포니아에서 차세대 염기서열 분석 기술을 개발하고 있는 바이오 회사들은 15분안에 1천달러 미만의 비용으로 인간 게놈 염기서열 분석이 가능한 기술을 3년 안에 개발할 수 있을 것이라고 내다보고 있다. 25년전 존재하지 않았던 유전자 염기서열 분석 시장은 곧 20조원을 넘어설 것으로 예상되며 그 시장을 지배하고 있는 illumina 사의 시장가치는 2015년 현재 28조원을 넘어섰다.

비약적인 염기서열 분석 비용 감소 및 속도의 증가는 바이오와 의학 분야에 혁명을 불러 일으켰다. 거의 모든 제약회사와 병원, 바이오텍 회사들이 환자의 유전자 염기서열 분석을 통해 얻은 정보를 신약과 치료법을 개발하는데 사용하고 있으며, 맞춤형 의료(personalized medicine)이라는 새로운 패러다임이 빠른 속도로 확장되어 가고 있다. 큰 제약회사나 의료기관들 뿐만 아니라 학계의 소규모 연구진들도 각자의 샘플을 유전자 염기서열 분석하고 그 정보를 이용하여 생명의 신비를 파헤쳐가고 있다. 25년 전 인간게놈프로젝트가 시작 되었을 때에는 상상할 수 없는 일이다.

필자는 이러한 변화가 3차원 조직 변환 및 이미징 분야에도 일어나리라 확신한다. 인체의 신비를 푸는데 있어 유전자 지도가 인체의 설명서라면 그 설명서를 따라 어떻게 세포와 같은 부품들이 만들어지고 그 수많은 부품들이 어떻게 연결되어 장기들과 신체를 형성하고 작동하는지를 이해하는 것이 그 다음 단계라 할 수 있을 것이다. 이를 위해서는 phenomic 정보가 필요한데 그 중 핵심이 되는 단백질형(proteomic), 연결형(connectomic), 그리고 광범위한 해부학적 표현형(anatomic) 정보를 3차원 조직변환 및 이미징 기술이 제공할 수 있기 때문이다.

앞으로 상호 경쟁과 공동연구를 통해 비약적인 기술의 발전이 일어난다면, 인간 게놈 시퀀싱에서 우리가 경험한 것과 같은 비용 감소, 속도의 증가, 방법론의 제시, 인프라의 확충이 3차원 조직변환 및 이미징 분야에서도 일어날 것이다. 이러한 변화는 바이오 및 의학 전 분야에서 보다 많은 연구 단체와 과학자들이 전조직적이고(system-wide) 전체론적인(holistic) 접근법을 통해 생명의 신비를 연구할 수 있도록 도울 것이다.

인간 게놈 프로젝트의 성공이 많은 반대와 회의적인 시선을 극복한 정부와 과학자들 그리고 산업계의 끈질긴 협업과 노력에 의해서 이루어진 것임을 기억하자. 하나의 분자, 세포가 아닌 수많은 생체 단위체(building block)들이 유기적으로 결합하여 우리의 인체를 형성하듯이 이 사회의 많은 “building block”들이 장기적인 안목과 열린 마음으로 함께 노력한다면 지금은 상상하기 힘든 미래가 멀지 않은 현실이 될 수 있을 것이라 필자는 믿는다. 유전자 지도가 그랬듯이 3차원 인체지도가 “the book of life”의 또 다른 장(chapter)을 열어 생명을 이해하고 질병의 치료법을 개발하고자 하는 우리를 새로운 길로 안내할 것이다. 어쩌면 우주보다도 더 복잡하고 신비로운 우리의 인체를 자세히 들여다 볼 수 있는 날이 멀지 않았다.

정 광 훈

- 학 력** · Georgia Institute of Technology Chemical&biomolecular Engineering 박사
· 서울대학교 화학공학과 학사
- 경 력** · 現) MIT 화학공학과 교수
· 前) Stanford University 연구원
· 前) Georgia Institute of Technology 박사후 연구원

참고문헌

1. Vakoc, B. J. et al. Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging. *Nat. Med.* 15, 1219-23 (2009).
 2. Kasthuri, N. & Lichtman, J. W. The rise of the 'projectome'. *Nat. Methods* 4, 307-8 (2007).
 3. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. The Mind of a Worm. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 314, 1-340 (1986).
 4. Briggman, K. L., Helmstaedter, M. & Denk, W. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature* 471, 183-188 (2011).
 5. Kim, J. S. et al. Space-time wiring specificity supports direction selectivity in the retina. *Nature* 509, 331-6 (2014).
 6. Bock, D. D. et al. Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature* 471, 177-182 (2011).
 7. Oh, S. W. et al. A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* 508, 207-214 (2014).
 8. Ragan, T. et al. Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging. *Nat. Methods* 9, 255-8 (2012).
 9. Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 162, 246-257 (2015).
 10. Renier, N. et al. iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell Im*, 1-15 (2014).
 11. Hama, H. et al. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 14, 1481-8 (2011).
 12. Mauch, C. P. et al. Ultramicroscopy : three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. 4, 331-336 (2007).
 13. Chung, K. & Deisseroth, K. CLARITY for mapping the nervous system. *Nat. Methods* 10, 508-13 (2013).
 14. Chung, K. et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332-7 (2013).
 15. Kim, J. et al. mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat. Methods* 9, 96-102 (2012).
-

-
16. Kim, S.-Y. et al. Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electro-mobile molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201510133 (2015). doi:10.1073/pnas.1510133112
 17. Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B. & Deisseroth, K. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat. Protoc.* 9, 1682-97 (2014).
 18. Murray, E. et al. Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. *Cell* 163, 1500-1514 (2015).
 19. Rajasethupathy, P. et al. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* (2015).
 20. Tritsch, N. X., Ding, J. B. & Sabatini, B. L. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490, 262-6 (2012).
 21. Ertürk, A. et al. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat. Med.* 18, 166-71 (2012).
 22. Kuwajima, T. et al. ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* 140, 1364-8 (2013).
 23. Song, E. et al. Optical clearing assisted confocal microscopy of ex vivo transgenic mouse skin. *Opt. Laser Technol.* 73, 69-76 (2015).
 24. Acar, M. et al. Deep imaging of bonemarrowshows non-dividing stem cells aremainly perisinusoidal. *Nature* 526, (2015).
 25. Palmer, W. M. et al. PEA-CLARITY: 3D molecular imaging of whole plant organs. *Sci. Rep.* 1-6 (2015).
 26. Liu, A. K. L. et al. Bringing CLARITY to the human brain: visualisation of Lewy pathology in three-dimensions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* n/a-n/a (2015).
-

국가 R&D 현황 분석

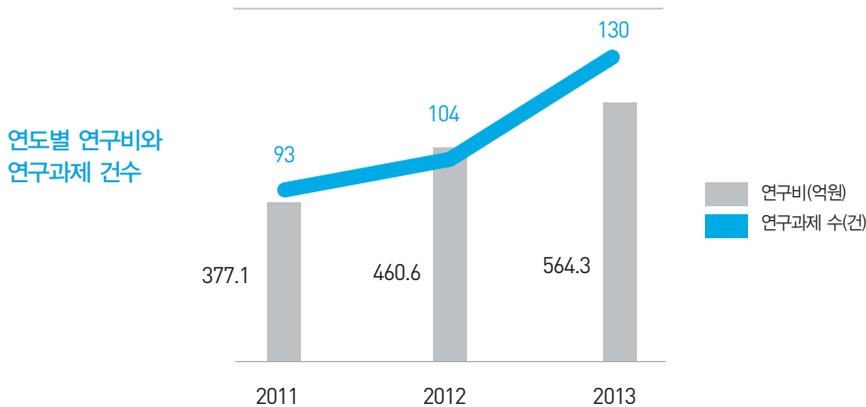
CLARITY는 3차원 생체 조직 이미징을 위한 최선의 기술 중 하나이기에 최근 3년간(2011~2013년)의 3차원 생체 조직 이미징과 관련된 연구개발사업에 대해 분석해보았다

과제 선별 기준

연구요약문 내 아래 키워드를 포함하고 있는 과제를 선별한 후 연구내용을 바탕으로 분석 대상 선정 ((3차원) and (이미징)) or ((조직) and (이미징)) or ((생체) and (이미징))

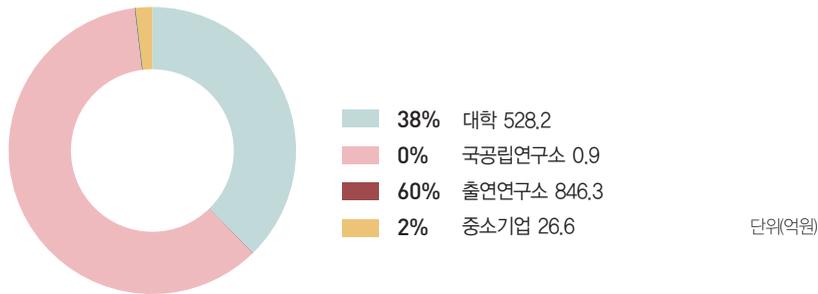
분석 결과 최근 3년간 총 327건의 과제에 1,402.0억원의 연구비가 투자됨

- 3차원 생체 조직 이미징과 관련하여서는 지속적으로 연구과제 수 및 연구비가 꾸준히 증가하고 있는 것으로 나타남



연구수행주체 출연연구소(60%)를 중심으로 연구가 이루어지고 있음

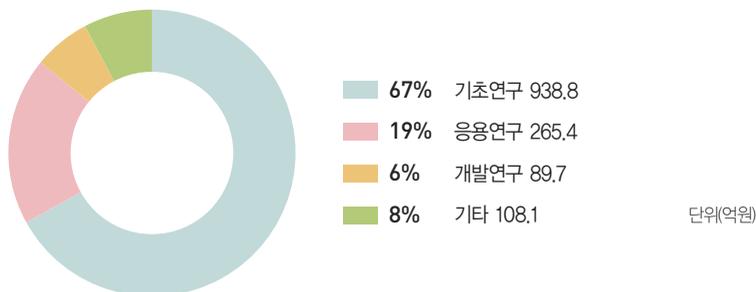
- 연구 규모는 학문적인 연구보다는 실용적인 연구를 중심으로 하는 출연연구소(78건, 846억원)가 높게 나타났으나,
- 연구과제 수는 기초 학문을 중심으로 하는 대학이 241건(528억원)으로 높은 비율을 보임
- 생체 조직 이미징에 투자되고 있는 전체 연구비 규모 대비 기업을 중심으로 한 연구는 굉장히 미진한 것으로 나타남
 - 중소기업에서 수행하고 있는 7건(26.6억원)의 연구가 전부인 것으로 나타남



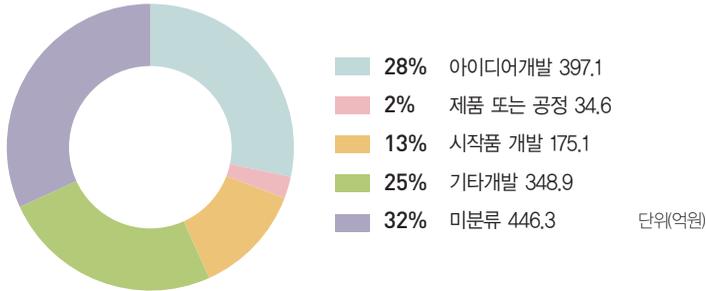
연구수준 기초연구단계(67%) 위주의 연구가 이루어지는 것으로 나타남

- 대학과 출연연구소 중심의 기초연구단계 연구가 251건(938.8억원)으로 대다수를 차지하고 있으나,
 - 이를 기반으로, 응용/개발 연구도 각각 47건(265.4억원), 21건(89.7억원)으로 꾸준히 이루어지고 있는 것으로 나타남
- 아이디어 개발(135건, 397.1억원) 및 기타 개발(77건, 348.9억원), 시작품개발(65건, 175.1억원)이 연구의 대다수를 이루고 있는 것으로 나타남
 - 이는 생체 조직 이미징 기술의 원리를 연구(아이디어 개발)하는 것부터 이를 활용한 제품 개발(기타 개발 및 시작품 제작)에까지 골고루 연구가 이루어지고 있음을 의미함
- 기술수명주기적 측면에서는 도입기로 보는 연구들이 158건(673.7억원)으로 가장 많은 것으로 나타났으나, 성장기와 성숙기에 접어들었다고 본 연구도 각각 54건(373.4억원), 7건(23.4억원)이 존재함
 - 이는 CLARITY와 같이 새로운 기술부터 이전에 연구된 기술들을 활용/응용/개발하는 연구까지 다양한 방식의 생체 조직 이미징 연구가 동시에 이루어지고 있음을 간접적으로 시사함

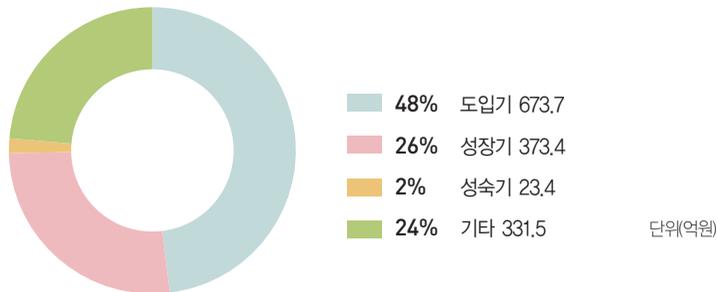
연구개발단계



연구개발성격

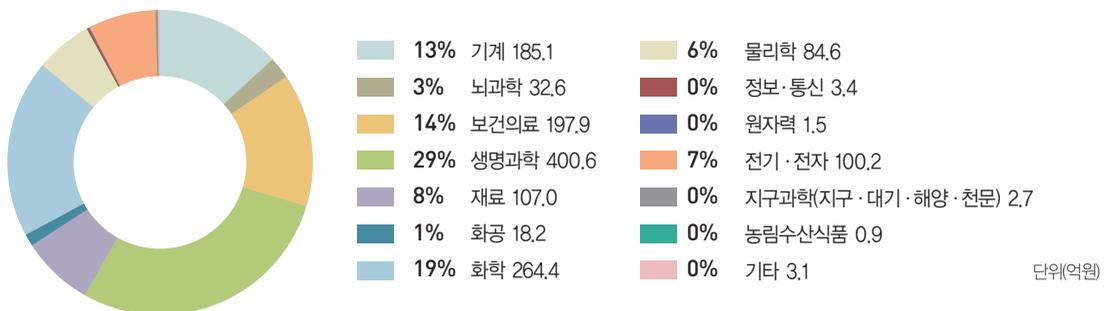


기술수명주기

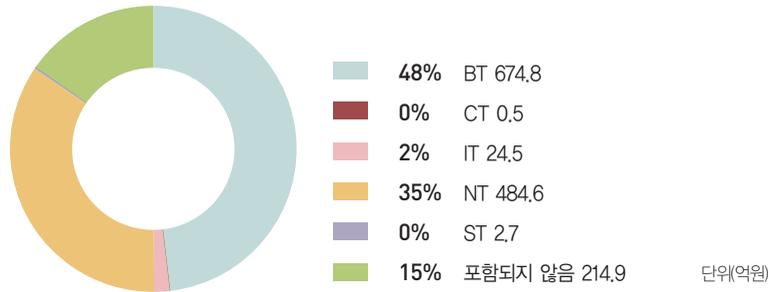


연구분야 국가과학기술표준분류와 미래유망 신기술분류(6T), 국가기술지도분류(NTRM)를 분석한 결과 BT(48%)와 건강한 생명사회 지향(39%) 위주의 연구임을 알 수 있음

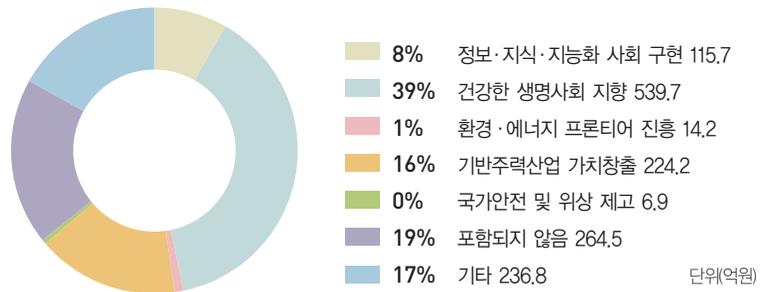
연구분야 [국가과학기술표준분류]



연구분야 [6T]



연구분야 [NTRM]



- 생체 조직 이미징의 기술 특성상 다양한 분야에서 연구가 이루어지고 있는 것으로 나타남
 - 실질적으로 생체 조직 이미징을 활용하는 생명과학(99건, 400.6억원), 보건의료(68건, 197.9억원) 분야의 비율이 여전히 높기는 하지만
 - 이를 구현하기 위해 필요한 화학(64건, 264.4억원), 기계(17건, 185.1억원), 전기/전자(18건, 100.2억원), 물리학(30건, 84.6억원) 등의 분야의 비율도 상당히 높은 것으로 나타남
 - 이는 생체 조직 이미징 기술 연구가 여러 학문의 융합을 통해서만 제대로 연구가 이루어질 수 있음을 반증하는 간접적인 증거라 사료됨
- 6T 기준에서도 BT가 185건(674.8억원)으로 전체 연구의 48%를 차지하고 있으나, 생체 조직 이미징 구현을 위해 필요한 기술 개발을 목적의 NT 분야 또한 88건(484.6억원)으로 높은 비율을 차지하고 있는 것으로 나타남
- NTRM 분석 결과 또한 건강한 생명사회 지향이 39%(152건, 539.7억원)으로 가장 높게 나타남
 - 이어 기반주력산업 가치 창출이 16건(224.2억원)으로 전체 연구의 16%로 나타난 것으로 보아 생체 조직 이미징 관련 기술의 산업화 가능성에 대해 기대가 높은 것으로 사료됨



01 선정사유

◦ (사회 이슈) 사회와 공존하는 이동성에 대한 새로운 패러다임으로의 전환과 급속한 고령화에 따른 노인 운전자를 위한 안전대책 요구

- 미래사회 이동성 키워드는 고안전, 친환경, 친인간, 사회공존, 융합으로서 미래사회에 필요한 패러다임 전환 및 신기술 Seed 선제 확보 필요
- 국내 전체 교통사고 대비 65세 이상 노인운전자의 교통사고 점유율은 1.4%(2001년) → 3.3%(2006년) → 6.8%(2012년)으로 증가 추세

* (출처) 2012년 노인 교통사고 특성분석, 도로교통공단, 2013

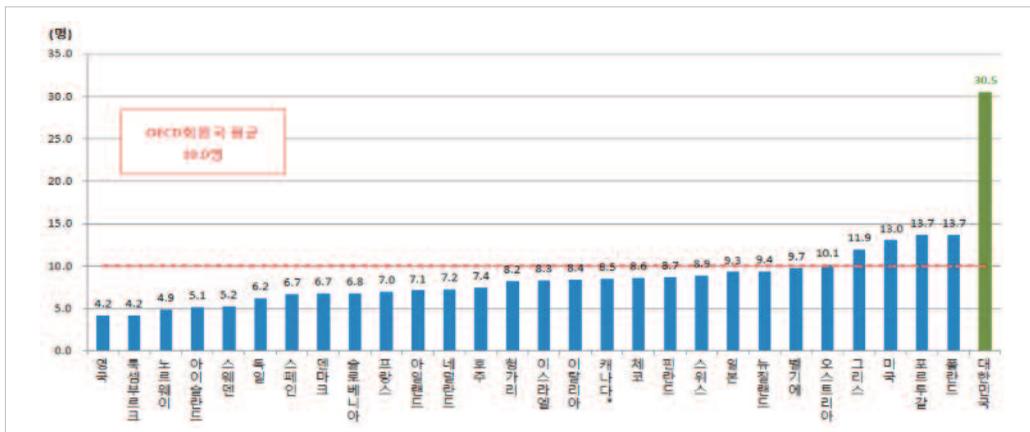


그림1. 65세 이상 노인인구 10만명 당 교통사고 사망자수 2011년 (출처: OECD 회원국 교통사고 비교, 도로교통공단, 2013)



●● (규제 이슈) 글로벌시장에서 자동차 관련 안전규제* 강화에 능동적으로 대처 가능한 정부정책 및 추진전략 수립 요구

* '소비자 안전' 명목 하에 의무장착, 신차안전도평가 등 안전규제가 새로운 기술장벽으로 등장

- 차량자세제어(ESC), 타이어공기압경보(TPMS), 자동긴급제동(AEB), 차선이탈경보(LDWS) 등 안전운전 지원부품의 장착 법제화 추진

* 미국, 유럽, 한국 모두 '13년부터 시작, 단계적으로 항목 확대 예정

** (예, 한국) 총 1점 가점 - 전방충돌경보장치 0.4점, 차선이탈경보장치 0.3점, 안전띠미착용경보장치 0.3점 (Korea-NCAP 총 100점 만점)

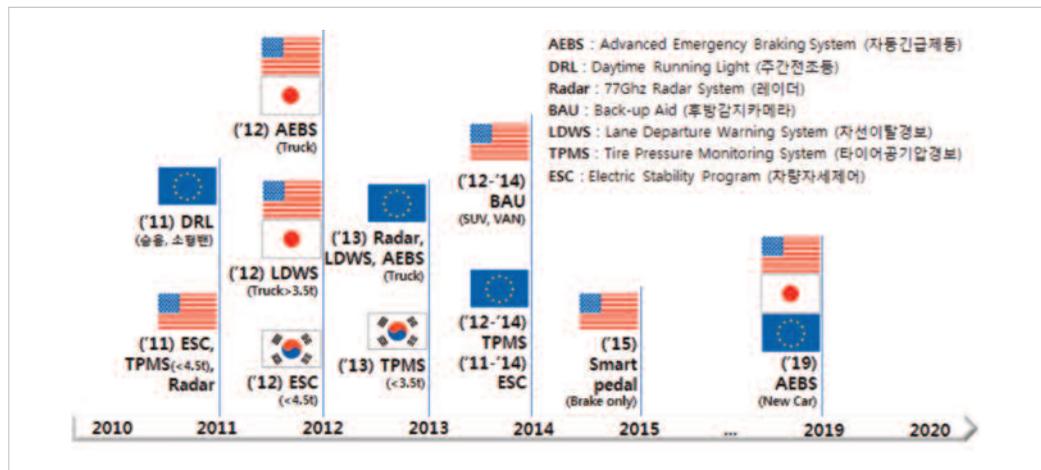


그림2. 주요국의 안전부품 의무장착 로드맵

●● (경제 이슈) 자동차, 정보통신, 첨단교통, 서비스 회사 등 이종 업종간의 연계 가속화로 인해 서비스 중심의 **신사업모델** 출현 가시화

- 자동차업체가 아닌 서비스 중심의 new players로 변화할 가능성도 존재

●● (기술 이슈) 자동차와 ICT 기술의 융합 가속화 및 자동차의 전자화 확대로 미래 선도기술에 대한 체계적인 확보전략 준비

- 해외 선진업체는 글로벌 시장을 선도하고 브랜드 이미지 강화를 위해 자율주행자동차의 핵심기술 육성 중

02 기술개요

- (정의) 자율주행자동차는 자동차 스스로 주변환경을 인지하여 위험을 판단하고, 주행경로를 계획하는 등 운전자의 주행조작을 최소화하며 스스로 안전주행이 가능한 자동차
 - 해외 선진업체는 글로벌 시장을 선도하고 브랜드 이미지 강화를 위해 자율주행자동차의 핵심

그림3. 자율주행자동차의 개념

출처: (산업부) 자율주행자동차 산업생태계 활성화를 위한 국가자원의 통합자원 활용방안, 2014



- (구분) 美 도로교통안전국(NHTSA)은 자율주행자동차를 운전자의 주행조작 개입 정도에 따라 다음과 같이 5단계(레벨0~레벨4)로 구분

표1. 자율주행자동차 단계 구분

수 준	정 의	개 요
Level 0	비자동 (No Automation)	- 운전자가 항상 브레이크, 속도조절, 조향 등 안전에 민감한 기능을 제어하고 교통 모니터링 등 안전 조작에 책임
Level 1	기능 특화 자동 (Function-specific Automation)	- 운전자가 정상적인 주행 혹은 충돌 임박 상황에서의 일부 기능을 제외한 자동차 제어권을 소유. 예) 스마트크루즈컨트롤, 차량자세제어, 자동브레이킹
Level 2	조합 기능 자동 (Combined Function Automation)	- 어떤 주행 환경에서 두 개 이상의 제어 기능이 조화롭게 작동. 단, 운전자가 여전히 모니터링 및 안전에 책임을 지고 자동차 제어권을 소유(예) 스마트크루즈컨트롤과 차선중앙유지, 핸들과 페달 제어
Level 3	제한된 자율주행 (Limited Self-Driving Automation)	- 특정 교통 환경에서 자동차가 모든 안전 기능을 제어 - 자동차가 모니터링 권한을 갖되 운전자가 제어가 필요한 경우 경보신호 제공 - 운전자는 간헐적으로 제어
Level 4	완전 자율주행 (Full Self-Driving Automation)	- 자동차가 모든 안전 기능을 제어하고 상태를 모니터링 - 운전자는 목적지 혹은 운행을 입력 - 자율주행시스템이 안전 운행에 대해 책임

(출처: 미교통국 도로교통안전국(NHTSA), 2013)



03 시장전망

- (자율주행자동차) 자율주행 기술을 탑재한 양산형 자동차는 '20년경 시장에 출시될 것으로 예상되며' 20년에서 '35년까지 북미, 서유럽, 아시아태평양 3개 지역의 자율주행자동차 시장 연평균성장률은 85%에 이를 것으로 전망

- 전세계 자동차시장에서 해당년도에 새로 출시되는 자동차 중 자율주행 기술을 탑재한 자동차의 비중은 '25년 4.4% → '30년 40.5% → '35년 75.1%에 이를 것으로 전망

표2. 자율주행자동차 시장전망 (단위 : 천대, %)

구분		2015	2020	2025	2030	2035
자동차 전체		88,534	98,103	106,917	116,221	127,170
자율주행자동차	완전 대수	-	7.3	4,756	47,113	95,444
	비율	0.0%	0.01%	4.4%	40.5%	75.1%

※ 출처 : Autonomous Vehicles (Navigant Research, Q3 2013)

- (부분시스템) 완전 자율주행자동차 보급 이전에는 일반차량에 특정 기능의 자율주행 시스템 장착되어 시장을 형성할 것으로 예측

- 다차로차선변경, 교통체증저속구간 자동운전지원, 자동주차, 합류로 및 분기로 주행지원 기능을 장착한 쉐어자율주행자동차 시장 성장

표3. 자율주행시스템 시장전망 (단위 : 천대, %)

구분		2015	2015	2020	2025	2030	2035
다차로차선변경	수량		18	9,700	68,458	105,570	119,491
	장착율		0.0%	9.9%	64.0%	90.8%	94.0%
교통체증저속구간 자동운전지원	수량		225	33,113	92,527	108,193	121,204
	장착율		0.3%	33.8%	86.5%	93.1%	95.3%
자동주차	수량		15	11,116	66,372	95,404	110,843
	장착율		0.0%	11.3%	62.1%	82.1%	87.2%
합류로 및 분기로 주행지원	수량		0.6	1,419	27,438	76,804	108,999
	장착율		0.0%	1.4%	25.7%	66.1%	85.7%

※ 출처 : Autonomous Vehicles (Navigant Research, Q3 2013)

04 도입의 주요 정책

① 법·제도 측면

●●(법적 책임) 공공도로에서의 자율주행자동차 운행으로 인한 사고 발생시 보험 및 법적 책임 이슈에 직면

- 자율주행자동차는 센서, 소프트웨어 등을 통해 사람보다 정보에 의한 결정을 하고 있으므로 기술적 과실 여부 판단의 논쟁 발생
- 기술적으로 과실이 없더라도 충돌 사고시 안전 우선순위를 자기차량과 상대차량 중 어디에 우선 할 것인지와 이러한 설정을 소유자가 임의 변경 가능토록 허락할 것인지 등 문제 발생

●●(운전 면허) 자율주행자동차 도입을 위한 면허 발급 등 법적 근거 마련 지연

- 미국은 각 주별로 자율주행자동차 도입을 위한 법률개정이 이루어지고 있으나 일관된 면허 발급 기준이나 표준화된 안전기준 없이 각 주마다 상이한 기준 적용으로 업체의 기술개발에 혼란 가중

미국 사례

네바다州*를 시작으로 하여, 현재 3개주가 법안 제정을 완료하였으며 추가적으로 9개주가 법안 심사단계임

* (법안내용) 운전자 1인과 동승자 1인 탑승, 자율주행 중이라는 표식 의무, 운전자가 원할 때는 언제든지 제어권 변경, 블랙박스장치 필수 탑재 등

법안 완료	네바다(' 11.6), 플로리다(' 12.4), 캘리포니아(' 12.9), 워싱턴 DC(' 13.1), 미시건(' 13.12)
법안 심사 중	하와이, 뉴햄프셔, 오레곤, 텍사스, 워싱턴, 오클라호마, 콜로라도 (이상 7개주)



② 사회적 측면

❖ (보안 이슈) 해커, 테러조직, 적대국가 등에 의한 고의적 차량충돌, 교통혼란 등의 보안 이슈 발생 우려

- 보안 측면에서 완벽하게 안전한 시스템을 만드는 것이 현실적으로 불가능한 상황에서 해킹에 의한 악의적인 차량충돌과 교통혼란이 발생할 가능성이 있음

❖ (사생활 침해 우려) 사생활 보호에 반하는 데이터 관리 우려

- 자율주행자동차 운행으로 생성되는 데이터의 건전한 활용은 교통시스템의 효율성 제고와 미래 교통체계에 대한 효율적 투자 우선순위 및 정책 수립 등에 유익한 기초 자료를 제공 가능
- 그러나, 생성되는 데이터의 공유는 프라이버시 침해와 공공의 이익 사이에서 트레이드오프 상황에 처함

③ 기술적 측면

❖ (기술 개발) 자율주행자동차가 아직 개발되지 않은 상황으로 인해 향후 기술 개발의 방향성에 대한 불확실성이 높음

- 완전 자율주행자동차의 운행 시나리오 및 시스템 요구사항이 체계적으로 정립되어있지 않아 차량 인증체계 등이 완비되지 못하고 있어 기술의 발전속도가 더딤
- 기술표준 및 차량인증 등에 대한 전체적인 프레임워크가 없이 업체별로 개별적인 기술개발을 추진 중

(자동차 가격) 자율주행자동차 도입의 가장 큰 장벽은 자율운전 기능을 탑재하기 위한 추가비용 부담

- 現 개발중인 자율주행자동차를 위한 추가 비용이 10만 달러 이상으로 추정, 대량생산이 이뤄질 경우 추가비용은 2.5~5만달러로 하락 전망이나 단기 달성은 어려울 것으로 예측 (Del-lenback)

05 자율주행 자동차 산업생태계

① 사용자

- 자율주행자동차 사업자(자동차, ICT업체 등)가 제공하는 상품과 서비스를 직·간접으로 사용하는 사람(직접 : 운전자/탑승자, 간접 : 보행자)

- (자동차업체) 부품 → 시스템 → 완성차로 이어지는 협력체계를 구축
- (전기전자업체) 임베디드 SW, 스마트 센서, 반도체(SoC) 등 제공
- (ICT업체) 빅데이터, 통신·보안, 디지털 맵, 인포테인먼트 콘텐츠 등 제공
- (ITS업체) V2I 통신·보안, 노변장치, 관제 등 제공

② 정부

- 자율주행자동차 기술이 안정적으로 정착, 확산될 수 있도록 법·제도 및 표준·인증, 인프라를 포함하는 산업생태계의 밑바탕 구축

- (법·제도) 도로교통협약 또는 도로교통법, NCAP 등 안전규제
- (표준) 해외 : ISO, IEEE 등, 국내 : KS, TTA 등, (인증) 안전도평가기준 등
- (인프라) 도로시설물, 평가장비, 인력 등의 유형물과 주파수 등의 무형물

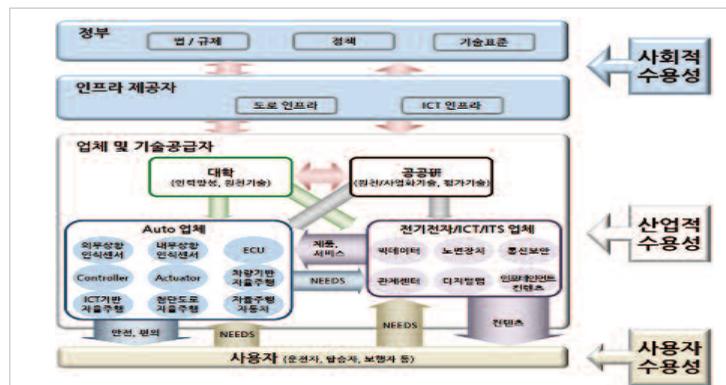
③ 조력자

- 기술개발, 인력양성 등을 통해 산업생태계를 지원하는 연구기관(대학, 공공연구소)과 도로 및 통신 인프라를 제공하는 사업자

타 산업과의 융합 혹은 신규 아이디어를 바탕으로 자율주행자동차에 특화된 새로운 서비스를 제공하는 잠재적 제공자

* Virtual Driver Service (New Contents 등), Shared Mobility 등

그림4. 자율주행차 산업생태계





06 개발동향

❖ (미국) 원천기술 개발에서 안전기준 등 규제 보완에 이르기까지 자율주행자동차 관련 생태계 활성화를 위한 후방 지원 수행에 초점

- 자율주행자동차와 관련 미국은 인적요인에 관한 연구(Human Factor Research), 전자제어시스템 안전성(Electronic Control System Safety)에 관한 연구, 개발시스템의 성능요건(Develop System Performance Requirements) 연구 등 3가지 영역에 주안점을 두고 기술연구를 추진 중
- 인적요인에 관한 연구는 자율주행모드에서 운전자모드로의 원활한 전환, 자율주행 관련 각 기능의 적절한 배치, 기타 시스템 검증을 위한 도구 등 운전자와 차량간의 인터페이스 개발에 초점
- 전자제어시스템 안전성 영역은 오류 발생 가능성 평가 등 자율 주행기능 구동에 대한 안전성 연구와 차량 내 탑재된 각종 시스템의 사이버보안에 관한 연구 포함
- 개발시스템의 성능요건 연구는 자율주행자동차 구현을 위해 필요한 잠재적인 기술요건의 개발 및 제약요건에 대한 평가 등이 포함
- 향후 본격적인 자율주행자동차 실용화 단계에 대비해 관련 정책 및 규제 권고 사안도 개발 중

❖ (영국) '14년 7월 기술전략위원회(Technology Strategy Board)를 통해 자율주행자동차 시범운영 프로젝트의 본격적인 추진계획을 발표

- 해당 프로젝트는 기술전략위원회와 영국 기업혁신기술부(Department for Business, Innovation & Skills, BIS) 및 영국 교통부의 공조 아래 진행
- 프로젝트 추진을 위해 영국 내각은 총 1,000만 파운드의 예산을 배정했으며 프로젝트 참여를 위해서는 반드시 민간 공동 컨소시엄이 구성되어야 하며 선정된 컨소시엄에 대해서는 프로젝트 추진 자금의 최대 50%를 지원

❖ (EU) 첨단안전시스템 분야 우위를 이어가기 위해 기술개발 지원 본격화

- 폭스바겐 연구소 등 총 29개 기관이 참여하는 3년 반 동안의 자율주행 기술개발 사업에 2,500만 유로 전액 지원 중

❖ (일본) '13년 일본재흥전략에서 안전운전지원시스템, 자동주행 시스템을 핵심전략으로 지정하고 산학연관 협력 프로젝트 전개

- 가상주행상황에서 신기술 성능을 검증하기 위한 영상 DB를 '18년까지 구축 예정
- 자율주행 기술개발 지원방안 중 하나로 첨단안전장치 탑재 트럭과 버스 보조금 지원 확대

●● **국내 주요기업은 자율주행 1단계(美 NHTSA 자동화 레벨* 기준) 수준의 운전자 보조시스템 기술력은 확보하고 있는 상황**

– 스마트자동차 기술력은 세계 4위 수준*으로, 완성차업체의 신기술 적용능력은 선진국과 유사하나 핵심부품 수입 의존도가 높은 것으로 조사

* 기술수준(산업기술평가관리원) : 유럽 100, 미국·일본 97.6, 한국 83.8, 중국 67.1

– 자동차산업 역량 외에 자율주행 실현을 위한 ICT·SW 융합, 도로 인프라 지능화 등 자동차-ICT-도로가 연계된 기술개발 전략도 필요

07 핵심부품 기술

●● **레이더(라이더) 기반 정보융합형 주행상황인지 기술**

– 주행환경 상의 다양한 대상물체(또는, 주행상 장애물)의 거리 및 부피(volume)를 측정하여 대상물체의 정확한 거리와 공간정보를 인식하는 레이더 및 라이더 센서 기반의 인식 및 검출 기술

●● **영상센서 기반 정보융합형 주행상황인지 기술**

– 주행차로 유지 및 다차선 변경, 합류로 및 분기로 합류 지원, 주차유도 및 자동주차 등을 위해 영상센서 기반의 차선, 표지판, 차량, 이륜차 등의 형상정보와 거리정보에 대한 인식 및 검출 기술

●● **확장성, 범용성, 보안성을 확보한 V2X(V2V & V2I) 통신 기술**

– 다종의 V2V(Vehicle to Vehicle), V2I(Vehicle to Infrastructure) 등 V2X 통신 기술을 사용하여 인프라 및 차량 센서정보를 융합하여 차량의 주변상황을 인지할 수 있는 신뢰성 있는 V2X 통신모듈 설계 기술

●● **자율주행용 도로 및 지형 속성정보를 포함한 디지털맵 기술**

– 주행차로 전방 1Km 이상구간에 대한 차선, 도로형상, 구배정보 등을 활용한 차선유지 및 주행도로 예측 향상이 가능한 자율주행용 도로 및 지형 속성정보를 갖는 ADAS(Advanced Driver Assistance Systems)용 디지털맵 생성 기술



●● 보급형 고정밀 복합 측위 기술

- DGPS, 디지털맵, 차량 상태정보와 서라운드 센서정보를 융합하여 자율주행환경에서 저가형 DGPS로 차량의 위치, 주행방향, 속도를 추정할 수 있는 기술

●● Fail Safety를 고려한 스마트 액츄에이터 기술

- 시스템 위험분석 및 고장분석을 통하여 자율주행자동차의 안전한 제어를 위한 중복안전(redundancy) 및 fail safety가 반영된 고신뢰성 스마트 액츄에이터 설계 기술

●● 운전자 수용성을 고려한 자율주행 HVI(Human Vehicle Interface) 기술

- 실도로 자율주행 환경에서 운전자(교통약자 포함)의 특성, 성향, 운전자상태 및 차량의 내/외부 상황정보를 종합적으로 분석/판단하여 운전자의 성별/연령별 UX 시나리오 도출 및 최적 UI 개발을 통한 자율주행자동차의 주행안전성, 편의성, 수용성(불안감 해소)을 향상시킬 수 있는 차세대 HVI 기술

* UX(User eXperience), UI(User Interface), HVI(Human Vehicle Interface)

●● 안전한 자율주행을 위한 운전자 모니터링 기술

- 차량환경에서의 시각, 청각, 햅틱(촉각) 등 다양한 인터페이스를 통하여 운전자의 상태(부하 및 피로도 등) 및 감성, 성향, 의도 파악과 차량 주변상황을 종합적으로 처리하여 자율주행 제어전략 수립을 위한 운전자 모니터링 기술

●● 차세대 IVN(In Vehicle Network) 플랫폼 및 통합 제어기 기술

- 자동차의 원활한 자율주행과 운전자의 안전을 보장하기 위해 redundancy 개념을 포함하고 신개념 E/E 아키텍처를 수용하는 차세대 IVN 플랫폼과 IVN 기반의 통합 제어기 설계 기술

●● 자율주행중 사고원인 규명을 위한 EDR(Event Data Recorder) 기술

- 자율주행자동차의 안전한 조작과 사고시 사고원인 규명을 위한 자율주행자동차의 내외부 영상정보 및 서라운드 센서정보, 차량 상태정보(IVN)를 실시간으로 저장, 보호, 전송하는 기술

08 시사점

❖ (산업생태계) 부품업체들이 자동차산업을 견인할 수 있도록 중소중견기업 중심으로 개방과 협력의 새로운 산업생태계 구축 필요

- 우리나라도 자동차산업 성장을 부품업체가 견인해야 하는 시기가 도래, 완성차 주도 산업생태계로부터의 변화가 필요
- 중소중견기업 주도의 사업 아이템을 발굴하고 국내외 복수의 수요기업에 납품 가능한 새로운 R&D 협력모델이 요구 (즉, 취약한 중소기업 생태계 육성을 위하여 중소기업간 협동조합 방식의 다양한 스마트자동차 서비스 사업모델 발굴도 필요)
- 수요자의 다양성에 기반한 ICT 기반 자율주행자동차 플랫폼의 다양화를 추진, 가격 경쟁이 치열한 ICT 시장에서 고전 중인 ICT 중소기업의 자동차시장 진입 활성화 및 자생적인 산업생태계 조성을 위한 지원 필요

❖ (산업융합) 자동차-ICT 산업간의 문화적, 기술적 장벽을 완화하여 융합이 활발히 이루어지는 부품산업 활성화 전략이 필요

- 양 산업간 산업특성에 대한 상호이해가 부족하며 자동차산업은 ICT 산업에 비해 상대적으로 진입장벽*이 높음
 - * 제품 출시를 위한 개발기간(ICT : 2년, 자동차 : 5년)이 서로 다르며 자동차산업의 기존 수직계열화 체계에 소규모 새로운 ICT 업체가 참여하는 것은 어려움
- 업체의 사업 아이디어 발굴부터 성과 창출까지 체계화된 육성방안과 자동차산업으로의 진출지원이 필요 (즉, 기술력을 갖춘 ICT 업체가 진출 가능한 자동차부품분야를 발굴하고 자동차부품업체와의 협업이 가능토록 지원)

❖ (특허) 자동차와 전기전자, 정보통신의 기술융합에 따라 융합 기술에 대한 특허를 기초로 완성차와 관련 ICT 업체에 동일한 특허로 동시에 침해소송이 제기되는 경우가 늘어나고 있음

- 핵심 및 융합 기술에 대한 특허 확보방안, 관련특허 포트폴리오 구축전략 등의 제시가 필요
- 국내 ICT 지적재산권을 활용하여 ICT 기반 자율주행자동차 분야의 지적재산권 선점을 통한 국내 중소중견기업의 기술경쟁력 유지 필요



❖ (기술) 민간과 정부역할 분담 필요

- (민간 주도) 세계 최고 수준과 기술격차가 크지 않고 시장이 성숙되어 있는 분야 (즉, 운전지원단말기, 자동차상태모니터링 등은 비즈니스 아이디어, 서비스 차별화 등이 시장의 주된 요인으로 정부투자 보다는 시장흐름에 따라 민간의 자체적인 기술 확보를 유도)
- (정부 주도) 안전규제 등에 따라 시장 확대가 예상되지만 핵심부품 및 요소 기술의 국내 기반이 부족한 분야 (즉, 국내 기반이 취약한 센서, 사고예방/회피, HVI 등의 분야는 정부지원 하에 관련 생태계 조성 및 기술 내재화를 위한 자동차용 SoC 등을 포함하는 핵심 및 요소부품의 병행 개발 필요)

❖ (도로환경) 자동차수 증가와 도로투자 한계로 모든 도로체계에서 지속적인 교통정체가 발생하고 있으며 자율주행을 수용하기 어려운 도로환경임

- 자율주행자동차의 주행을 지원하기 위하여 기존 도로체계 개선뿐만 아니라 미래형 도로체계 구축전략 마련 필요

❖ (법·제도) 새로운 패러다임의 자율주행자동차 개발에 따른 안전기준 등 법·제도 정비, 사회적 수용성 검토 및 보급 활성화

- 자율주행자동차의 실용화/상용화 지원을 위한 법·제도 개정 및 제정방안 마련 등

❖ (ICT 기반의 교통서비스) 교통약자의 권익 보호와 이용편의성 제공을 위한 자율주행자동차 및 도로인프라(교통정책) 기반의 소비자 중심 교통서비스 모델 발굴을 통한 새로운 산업생태계 창출

- 자율주행자동차 서비스 공간 확대 및 플랫폼 다양화를 추진, 고령자·장애인 등 교통약자의 이동권익 보장과 이용자 중심 교통서비스시장 확대 정책 추진 필요
- 초기시장 발굴을 위하여 지자체, 대형 공익시설, 캠퍼스 등의 보급 확산을 위한 세제·금융지원 및 법제도 정비 필요

5G가 적용된 스마트자동차의 동향 및 기술

▣ 융합연구정책센터 송기은 (gaeunsong@kist.re.kr)

01 선정 배경

- 5G시장이 2021년부터 상용화 될 것으로, 이에 따라 약 6,7년 안에 생활에 큰 변화가 있을 전망

- 주요 서비스 제공업체들은 러시아에서 개최되는 2018년 피파월드컵에서 파일럿 프로젝트를 시행할 예정
- 에릭슨, 화웨이, NTT 도코모, SKT, 메가폰이 5G네트워크기술의 선도 기업으로, 국내에서 가장 빨리 기술도입이 이루어질 전망

5G는 기존 통신기술에서 속도를 높이고 지연시간을 낮추는 것에 불과하지만, 무인자동차와 IoT 현실화의 열쇠로 스마트 자동차 구현에 가장 중요한 기술

- 5G로 인해 자동차 분야에서 자율주행/커넥티드 차량기술, 온라인 업데이트, 증강현실, 차량 내 웨어러블 기기사용 등이 가능해짐



- 5G는 기존 네트워크보다 다양한 측면에서 기술적으로 발전되어 기존 기술에 비해 많은 시장에 무한한 가능성을 가져옴
 - 기존 4G에 비해 66배나 빠른 전송 속도(Speed)를 갖으며, 지연속도(Latency)를 기존보다 1/3로 줄일 수 있음
 - 5G의 대역폭은 6-30GHZ로 기존네트워크보다 훨씬 안정적으로 운영이 가능함
 - 통신망 커버리지 100%가 가능해져 어느 지역에서도 서비스 이용이 가능함
- 이로 인해 기존에 불가능했던 펌웨어 업데이트, 차량 내 증강현실 서비스 등이 가능해지며, 다소 불안정하게 시도되었던 자율주행/커넥티드 자동차기술서비스들도 안정적인 운영이 가능해짐

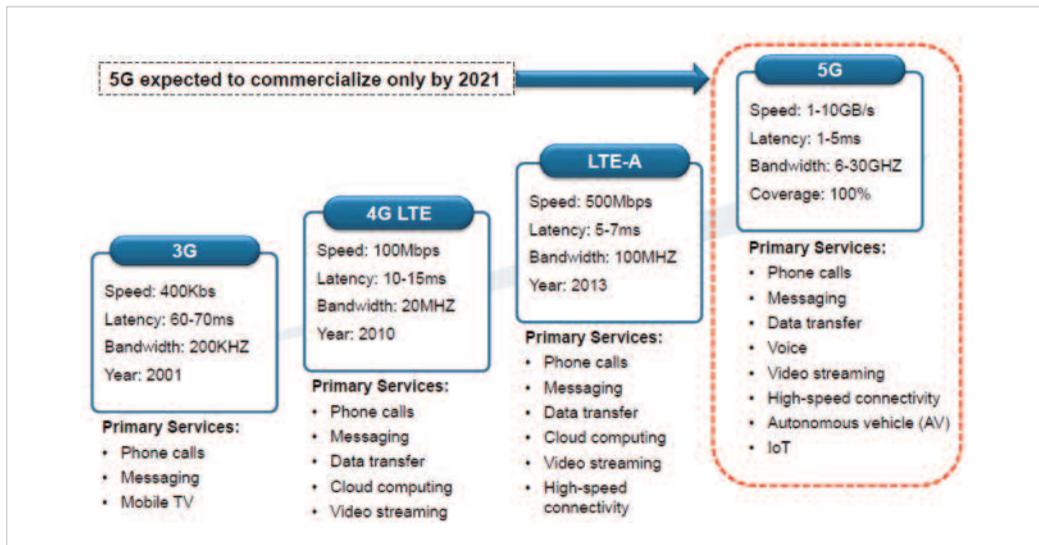


그림 1. 5G와 기존 네트워크 기술 비교 (출처 : Frost&Sullivan)

- 한국, 중국, 일본을 비롯한 아시아 지역에서는 미국과 유럽보다 먼저 기술을 선점하기 위해 해당 기술개발에 주력 중임
 - 한국에서는 5G기술을 2020년에 상용화하기 위해 14억달러를 투자할 예정이며, SKT, LGU+, KT는 협력하여 기술개발을 추진 중
 - ※ 특히, SK텔레콤은 지난 3월 스페인 바르셀로나에서 열린 모바일월드콩그레스(MWC 2015)에서 5G 핵심기술을 통해 '밀리미터파' 대역에서 7.55Gbps의 세계 최고 속도 시연
 - 일본은 2020년 도쿄올림픽에 5G를 사용하여 진행하는 것을 목표로 하여, 2020년에서 2025년 기술 상용화를 목표로 하는 유럽과 미국과는 다른 모습

02 시장예측

⦿ 5G기술은 IoT의 중추와 같은 역할을 함으로써, 모바일 디바이스와 교통수단 등을 서로 연결하여 새로운 산업 및 경제혁명을 수립할 것

- 시장조사기관 Frost&Sullivan에서는 5G기술의 도입으로 2021년 미국에서의 자동차 판매량이 2천1백만 대로, 유럽에서는 2천4백만 대로 늘어날 것으로 전망함
- 네트워크 속도의 증가와, 지연시간의 단축으로 다양한 서비스가 도입되며, 이 중 특히 무인 자율주행차, 양방향 인터넷, 모바일 서비스 등이 가능한 커넥티드 카, 차량 내 증강현실 도입이 가능해져 인간생활에 큰 변화를 가져오게 됨

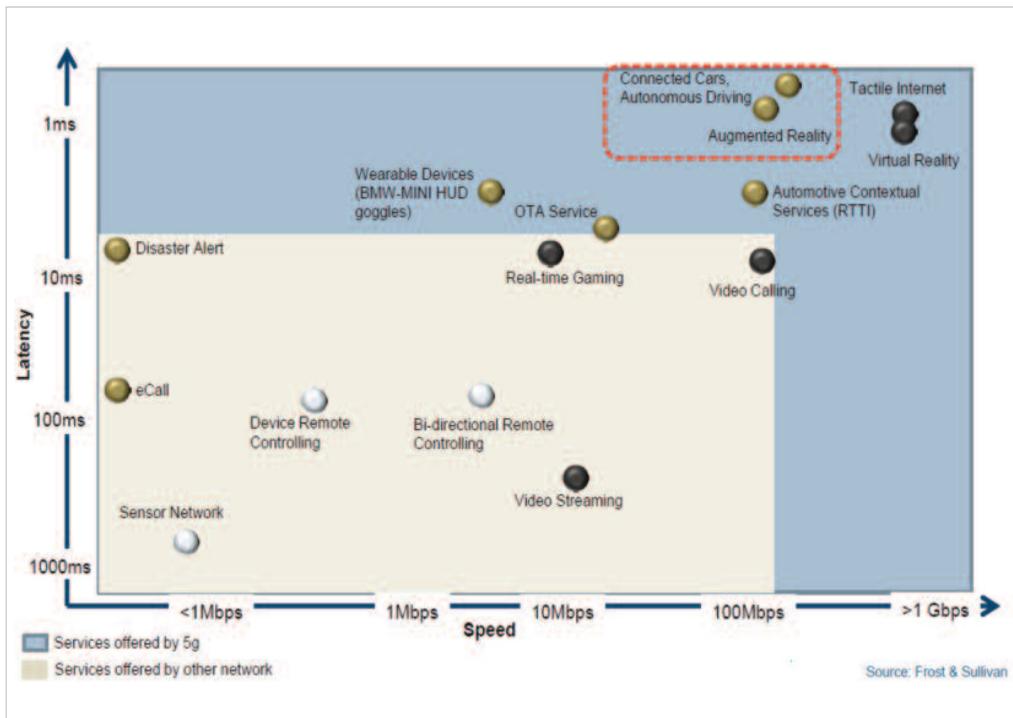


그림 2. 5G의 도입으로 차량 내 가능한 서비스의 확장 (출처 : Frost&Sullivan)



❖ 초기 5G의 프론티어들은 앞서 상용화될 아시아 시장을 선점하려 치열하게 경쟁 중

- 국토면적이 작아 전 국토에 네트워크 망이 설치되기 수월한 동아시아의 한국, 일본 두 국가에 우선적으로 5G의 인프라가 구축될 것
- 혼다, 도요타 등의 아시아 국가의 자동차 제조사는 상대적으로 5G를 선점하기 유리함
- BMW는 화웨이와 5G MOU를 맺어 아시아 시장에서 무인자동차 진입에 수월해졌으며, 테슬라를 비롯한 자동차 제조사들도 아시아 시장에 진입하려 다양한 시도 중

표1. 주요 통신사업자의 5G구축 계획

국가	통신사	계획	비고
대한민국	SKT	2020년까지 상용화 목표, Nokia와 미리미 티파장 기술 연구 중	2018년 평창 동계올림픽에서 5G네트워크 기술을 선보이려고 계획 중
	LGU+	2020년까지 상용화 목표	
	KT	2020년까지 상용화 목표	
미국	AT&T	2025년 상용화 목표	뉴욕대와 버클리 등 다수의 대학에서 대규모 연구 진행 중
	Verizon	LTE 유지(LTE로 음성기능 추가)	
	T-Mobile USA	LTE 유지	
러시아	Yota (MegaFon)	2020년까지 상용화 목표로 Huawei와 협력함	뉴욕대와 버클리 등 다수의 대학에서 대규모 연구 진행 중
일본	NTT DoCoMo	도쿄올림픽에서 2020년 상용화하려는 목표, 다양한 bandwidth로 운영하기 위해 다수의 파트너를 두고 진행 중	2020년 도쿄올림픽에서 가능한 5G서비스 <ul style="list-style-type: none"> • Alcatel-Lucent(3-6 GHz) • Fujitsu(3-6 GHz) • NEC(5 GHz) • Ericsson(15 GHz), 4.5Gbs/s • Samsung (28 GHz) • Nokia(70 GHz), 2Gbs/s
싱가포르	SingTel	싱가폴을 지원하기 위한 서비스들을 유효화하는 중	
스웨덴	Ericsson	스마트시티와 IoT지원 2020년까지 목표로 함	Scania, Volov, KTH, Chalmers, Linkoping, Lund대학과 파트너십 체결

03 주요기술

❖ 자율주행/커넥티드 자동차기술, OTA(Over-the-air) 업데이트 등의 기술이 가능해지면 서 다음과 같은 서비스제공이 가능해 짐

- 자율주행/커넥티드 자동차기술 : 실시간 센서 퓨전, 차량 내 엔터테인먼트서비스, 3rd-party 앱 통합기능
- OTA 업데이트기술 : 펌웨어 업데이트, 소프트웨어 업데이트, 차량상태 업데이트
- 증강/가상현실기술 : 실시간 트래픽 증강현실, 실시간 주차공간 알림, ADAS정보
- 개인화 서비스기술 : 운전자 맞춤형 서비스
- 웨어러블 기술 : 차량 내부 파라미터 설정, 가정용 기기와 연결

❖ (OTA업데이트) 5년 내에는 세그먼트에 관계없이 모든 차량에 FOTA*(firmware over the air) 업그레이드가 가능해 질 것

*펌웨어가 새로 나왔을 때, 사용자가 홈페이지나 앱에서 확인할 필요 없이 자동으로 업데이트해주는 기술

- 5G네트워크의 커버리지 정도가 100%이기 때문에 언제 어디서나 펌웨어 업데이트가 끊기지 않고 가능하지만, 펌웨어 업데이트 다운로드 시간이 단축되어야 함
- 5G는 동시에 최소 100개의 장치들을 잇고 서비스할 수 있는 수용력이 있지만, 네트워크 트래픽을 생성하면서는 10개에서 50개 기기밖에 잇지 못함
- 테슬라는 현재 FOTA 업데이트 서비스를 제공하고 있으며, 타 전통적인 자동차 제조사들은 2018년에 시작할 계획임
- 기존 자동차 제조사들은 소프트웨어로 OTA만을 사용하길 원하며 ECU(electronic control unit)펌웨어는 원하지 않아 영향력이 초반에는 제한될 것
- 하지만, 미래에는 ECU펌웨어 업데이트와 인포테인먼트, 안전패치 업데이트가 가능할 전망

❖ (자율주행/커넥티드 자동차기술) 고도화된 자율주행자동차는 여전히 개발 중이며, 상용화단계는 2020년이 되어야 가능할 전망이며, 5G는 높은 속도와 커버리지로 이에 중심이 되는 역할을 할 것

- 5G네트워크로 인해 자율주행 및 커넥티드 자동차에 필수적인 머신러닝, 브레이크/운전대 ECU 통합, 초정밀 GPS, 센서 융합이 가능해 짐



- 통일된 프레임워크 없으며, 네트워크의 매끄러운 연결은 아직 개발 단계
- V2V(Vehicle-to-vehicle)통신은 신뢰성 있고 빠른 네트워크를 요구함
- 기술이 더 발전되면 대용량 데이터의 업로드와 다운로드가 실시간으로 진행되며, 자동차와 보행자간의 통신 뿐 아니라 V2V, V2I(Vehicle-to-infrastructure)가 자유자재로 이루어짐

●● (웨어러블 기술) 스마트글래스나 스마트워치와 같은 웨어러블 디바이스들은 2018년 6배로 증가할 전망

- 5G는 10-100Ghz에서 작동하여 애플워치, 구글 글래스와 같은 웨어러블 사이의 데이터트래픽을 감당할 수 있음
- 하지만, 현재는 끊김을 개선해야 하고, 더 높은 대역폭을 구축해야하며, 더 많은 수의 디바이스를 감당하도록 개발해야 함
- 대부분의 커넥티드 리빙, 커넥티드 자동차는 컨셉 구상 단계에 있으며, 상용화 되려면 3-5년이 소요될 전망
- 대부분 커넥티드의 개념이 IoT 루프를 이용하여 정보전달과 컨트롤하는 범위를 사용자의 집과 차까지로 놓고 있어, 생활에는 큰 영향을 미칠 것으로 예상함

●● (증강 현실) 증강현실과 가상현실 기능은 5G가 도입된 자동차의 가장 중심이 되는 특징일 것

- 높은 대역폭과 커버리지로 차량이 외부와 소통이 가능해져 증강/가상현실 기능이 가능해짐
- 집된 정보를 주고받으며 창에 이미지를 투사하는 것은 5G네트워크로 인해 정보전달이 밀리초(millisecond) 단위로도 지연되지 않아 가능해 지는 기술임
- 끊김 없이 자동차와 도로 인프라 간의 소통이 가능해야 함
- 발표되는 증강현실 기술의 해법들은 아직도 초기단계이며, 2020년이 되어야 상용화 될 예정임
- 해당 기술은 운전자의 부주의를 줄여주고, 안전을 도모하기 때문에 사회에 큰 영향력을 가져올 것으로 예상됨

04 주요기업의 R&D현황

❦ (에릭슨과 볼보)통신업체와 자동차 제조사가 함께('15년도 5월) 스웨덴에서 6억유로를 투자하여 5G를 이용한 스마트자동차 실험을 실시함

- 학계에서는 The Royal Institute of Technology(KTH), Chalmers University, Lund University, Linkoping University가 참여했으며, 기업에서는 ABB, 스카니아, 볼보 CE, 볼라이덴이 후원하여 진행함
- 에릭슨은 볼보사의 트럭이 스웨덴 탄광에서 움직이면서 트럭 밖의 송신기와 5G로 정보를 주고 받음
- 2GBps의 속력으로 끊김 없이 송·수신이 가능함

❦ (아우디) R8 e트론 자율주행 버전과 Q7 e트론 콰트로를 발표하여 스마트카 전략을 소개하고, 및 중국 통신업체들과의 파트너십 확대를 발표(CES 아시아, '15년 5월)

- R8 e트론 자율주행 컨셉카는 신형 R8 e트론에 새로 개발한 레이저 스캐너, 비디오 카메라, 레이더 센서 등을 탑재하여 자율운전을 구현한 차량
- 지난 해 10월 독일 호켄하임 서킷을 자율주행으로 고속 질주했던 RS7 스포트백이 이번에는 상하이 시내와 고속도로를 자율주행으로 통과함
- 중국 최대 검색 포털 바이두와 인포테인먼트 시스템용 내비게이션 개발 추진 중이며, 안드로이드와 iOS를 모두 지원하는 바이두 카라이프*(CarLife)를 아우디 차량에 적용하기로 함
*안드로이드 오토, 애플 카플레이처럼 스마트폰을 기반으로 한 자동차 인포테인먼트 시스템으로, 스마트폰 콘텐츠를 WiFi나 USB를 통해 차와 연계되도록 함
- 통신장비업체 화웨이와는 LTE모듈을 공동 개발하여 MMI(Multi-media Interface)에 탑재할 예정으로, 일본 및 한국 시장에도 적용될 전망



05 결론 및 전망

❖ 자동차 제조사들은 아시아 국가의 통신사들과 협력 체결을 통해 5G네트워크와 연동된 스마트자동차의 개발과 시장선점을 추진 중

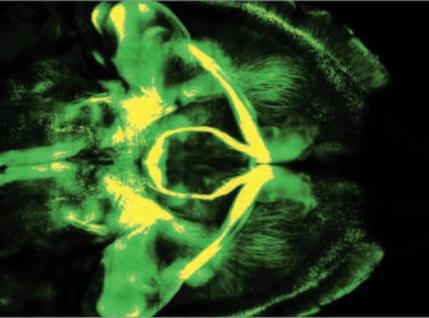
- 스마트 자동차는 5G네트워크와의 연동이 필수적인 관계로, 인프라 유치에 유리한 조건과 선도적 통신기술을 보유한 아시아에서 첫 상용화가 이루어질 것임
- 이에 따른 무인자율 주행차 지원도 이루어져 자동차 제조사(특히 OTA에 집중하고 있는 혼다, 테슬라, 도요타, 볼보, 아우디, 메르세데스벤츠 등)들은 아시아의 통신사들 간 파트너십을 체결하여 활발히 연구를 진행 중

❖ 제조업과 정보통신기술(ICT)을 융합해 작업 경쟁력을 제고하는 차세대 시대의 도래에 앞서 스마트카와 관련 인프라의 역량을 확충하여 미래를 위한 나침반을 만들어야 함

- 화웨이는 2020년까지 사물 혹은 기기 간 300억 커넥션이 이루어 질 것으로 예상하며, 해당 수요를 수용할 수 있는 국가 혹은 기업만이 새로운 경제 패러다임을 이끌어 갈 수 있을 것으로 전망함
- 국내에서는 올해 9월 '2015 스마트국토엑스포'를 개최하여 무인항공기, 자율주행자동차, 스마트하이웨이, 신도시 3D 구축영상 등 스마트자동차와 관련되어 펼쳐질 미래 기술과 서비스를 첨단 전시기법으로 보여 가능성과 필요한 인프라 등을 알릴 예정

참고자료

1. 'The Global Advent of 5G in Cars', Frost&Sullivan, 2015.6
2. 'CES ASIA 2015', Motor magazine, 2015.7
3. 'Global Automotive Market Awaits 5G to Leverage Higher Network Coverage, Availability and Density', PR Newswire, 2015.7.21.
4. 'Understanding 5G: Perspectives on future technological advancements in mobile', GSMA Intelligence, 2014.12
5. '5G: A Technology Vision', Hwawei, 2013



 **융합연구정책센터**
Convergence Research Policy Center

(02792) 서울특별시 성북구 화랑로 14길 5 t. 02-958-4984