

RNAi법 기초지식 - 원리와 메커니즘 1

서론: RNAi란 무엇인가?

1998년 최초로 선충(線蟲)에서 보고된 RNA interference (RNAi, RNA 간섭)는 double-stranded RNA (dsRNA)에 의해 서열 특이적으로 mRNA가 분해되어, 그 결과 유전자 발현이 억제되는 현상이다 (그림 1)¹⁾. 그 후 RNAi는 선충을 포함해 곤충, 식물, 균류 등의 다양한 생물종간에 보존되어 있는 현상임이 밝혀졌으며, 생물에서 공통적인 핵산 차원에서의 방어 시스템임이 밝혀졌다²⁾. RNAi를 이용한 knock-down법은 간편하면서 유전자의 발현 억제에 큰 효과를 기대할 수 있어 많은 관심이 모아지고 있으며, 최근 다수의 문헌에 보고되고 있다. 초기에는 포유동물 세포에 응용이 어려울 것으로 생각하였으나, 최근 포유동물 세포에 대한 응용방법이 확립되어 의료분야에서도 크게 기대하고 있다³⁾. 본 고에서는 이 RNAi라고 불리는 흥미로운 현상에 대해 그 원리와 생물학적 역할, 응용에 대해 알아본다.

RNAi법을 이용하여 무엇을 할 수 있는가?

- | | |
|----|---------------------------------|
| 기초 | · 유전자 발현 억제에 의한 유전자 기능 해석 |
| ↓ | · 생물학적 의의 해명 → 유전자 발현 억제기구 해석 |
| ↓ | · High throughput화에 의한 게놈 기능 해석 |
| ↓ | · RNAi를 이용한 유전자 치료 |
| 응용 | · 농작물의 품종 개량 |

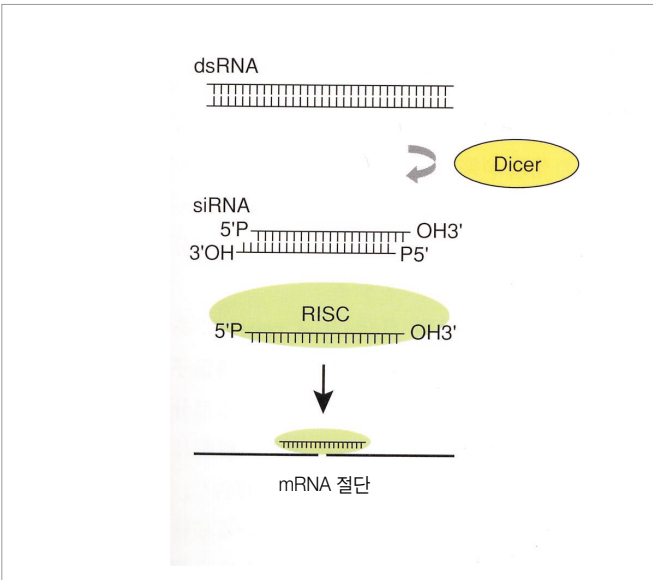


그림 1 dsRNA는 RNaseIII family에 속하는 Dicer에 의해 3' 말단에 2염기의 overhang을 지닌 21염기의 siRNA로 processing 된다. siRNA는 RISC라고 불리는 siRNA-단백질 복합체를 형성하여 서열특이적으로 mRNA를 분해한다.

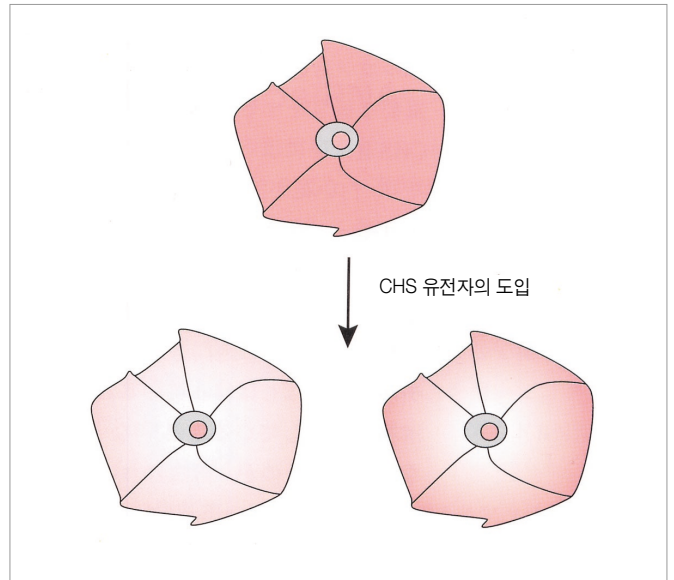


그림 2 CHS 유전자의 co-suppression에 의한 꽃색깔 퇴색
Sense CHS 유전자를 도입하면 외래 CHS 유전자의 기능상실 뿐만 아니라 내부에 존재하는 CHS 유전자도 co-suppression에 의해 억제되어 꽃색깔이 퇴색한다. CHS 유전자 transcription은 정상적으로 이루어지고 있지만, mRNA 축적은 볼 수 없었다. 따라서 외래 유전자에 대응하는 mRNA만 transcription 후 어떠한 작용에 의해 선택적으로 분해됨을 알 수 있다.

RNA를 통한 silencing

유전자 발현이 다양한 형태로 억제되는 것을 유전자의 silencing이라고 한다. Silencing은 transcription 시의 silencing (transcriptional gene silencing: TGS)과 transcription 후의 silencing (post-transcriptional gene silencing: PTGS)으로 크게 2종류로 나뉜다. TGS는 DNA로부터 mRNA가 transcription 되지 않음으로써 silencing을 일으키는 현상으로, 유전자의 methylation이나 chromatin의 구조변화 등이 관여하기 때문이다. PTGS경우 transcription은 평소처럼 이루어지지만, mRNA가 어떠한 원인에 의해 분해되거나 또는 translation이 저해됨으로써 유전자 발현이 억제되는 현상이다.

유전자의 silencing은 연구배경의 차이와 생물종에 따라 각기 다른 이름으로 불려져왔다. 식물, 선충, 초파리에서 내재 유전자와 상동성이 있는 유전자 또는 그 유전자의 일부를 도입하여 발현이 억제되는 것은 co-suppression이라고 불린다. Co-suppression은 상동 서열이 promoter 또는 transcription 조절 서열일 때는 TGS, transcription 영역일 때는 PTGS 단계에서 일어난다. Quelling은 균류에서 일어나는 동일 현상으로, PTGS 단계에서 일어난다.

RNA를 통한 silencing 현상으로서 최초로 보고된 것은 1990년 식물의 culcon 합성효소(CHS) 유전자의 co-suppression으로 생각된다 (그림 2)⁵⁾. Culcon 합성효소는 꽃 색깔의 주요 성분인 안토시아닌을 합성하는데 있어 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있다. 짙은 꽃 색깔을 만들어내기 위해 도입한 CHS 유전자에 의해 내부에 존재하는 CHS 유전자 발현이 억제되어 오히려 듬성듬성 색이 빠지거나 흰색의 꽃이 만들어지는 이상한 현상은 오랜 동안 그 메커니즘을 알 수 없었다. 그렇다면 어떻게 silencing되는 유전자와 silencing되지 않는 유전자를 구별하는 것일까? 도입한 유전자를 자세히 해석한 결과, 회문배열 (inverted repeat)이 관계가 있다는 점⁶⁾, 유전자의 methylation이 종종 수반되는 점⁷⁾, CHS mRNA 내부의 double strand를 형성하는 부분의 분해물이 관여하는 점⁸⁾ 등이 밝혀졌다. 이러한 현상 해명에 중요한 힌트를 준 것은 선충에서의 double strand RNA(dsRNA)에 의한 RNAi 보고¹⁾ 및 1999년 Baulcombe group에 의한 co-suppression을 일으키는 식물에만 25염기 전후의 작은 sense 및 antisense RNA가 포함되어 있다는 보고⁹⁾였다. Co-suppression으로 보고된 것 중에는 RNAi에서 볼 수 있는 현상과 매우 유사한 것이 다수 관찰되어 공통의 인자가 관여하고 있음이 밝혀지고 있다.

RNAi의 발견

RNAi는 dsRNA에 의해 서열 특이적으로 mRNA가 분해되며, 그 결과 유전자 발현이 억제되는 현상이다. dsRNA에 의해 유전자가 silencing 된다는 사실을 처음 알게 된 발단은 선충에서의 antisense를 이용한 연구에서였다. 1995년 Guo와 Kemphues는 par-1이라고 불리는 유전자를 antisense RNA로 억제하는 실험을 실시했다¹⁰⁾. Antisense RNA를 주입하자 예상대로 par-1 발현을 억제했지만 놀랍게도 대조군으로서 이용한 sense RNA도 마찬가지로 par-1 발현이 억제되어 par-1 변이주의 표현형을 나타내었다. 많은 연구자들이 이 모순에 관심을 나타내기 시작했다.

1998년 Fire 연구진에 의해 그 수수께끼가 풀리게 되었다¹¹⁾. Antisense RNA와 sense RNA를 각각 RNA polymerase를 이용해 시험관 속에서 합성하자 아주 소량이지만 비특이적으로 반대 방향의 RNA가 생겨났다. 그 contamination에 의해 생겨난 dsRNA가 유전자 silencing의 본체였

던 것이다. Fire 연구진은 gel 전기영동으로 정제한 antisense RNA 및 sense RNA는 유전자 발현을 억제하지 못한다는 것과 antisense RNA와 sense RNA를 annealing된 dsRNA가 매우 효율적으로 유전자 발현을 억제한다는 사실을 밝혀냈다.

그 후, RNAi는 선충을 비롯해 trypanosoma, 히드라, 플라나리아, 균류, 초파리, 식물 등의 다양한 생물·세포종에서 효과적인 유전자 발현을 knockout법으로서 이용되어 왔으며, 그 상세한 메커니즘이 최근 1, 2년에 걸쳐 밝혀지고 있다¹¹⁾. 지금까지 관찰된 RNAi의 일반적인 성질로서, 유전자 억제효과는 double strand 영역의 길이에 의존한다는 것이다¹²⁾. 100 bp 이하의 dsRNA는 효과가 낮으며, 500 bp 정도 이상이면 90% 정도 target 유전자 발현을 억제한다. 서열 특이성이 거의 일치하며¹³⁾, 상동성이 높고 같은 서열의 mRNA는 물론 분해된다.

RNAi의 메커니즘 해명을 위해

- RNAi의 서열특이성을 담당하는 siRNA

Tuschl 연구진은 초파리 추출물을 이용해 *in vitro*계를 구축하고¹⁴⁾, RNAi의 메커니즘 해명과 관련된 매우 중요한 일련의 실험을 실시했다. Long dsRNA가 21~23염기의 RNA로 분해 되는 것을 관찰하고, 그 분해된 RNA에 의해 target mRNA가 21~23염기 간격으로 절단되었다¹⁵⁾. 이 RNA의 길이는 18~24염기에 걸쳐져 있었으나, 거의 80%가 21~23염기였다. 이 사실은 21~23염기의 RNA가 target 서열 인식을 위한 guide RNA로 기능하고 있음을 시사하며, 그것은 실제로 화학적으로 합성된 21~22 bp의 dsRNA를 이용해 target mRNA가 절단됨에 따라 명백히 밝혀졌다¹⁵⁾. 그 guide RNA는 Tuschl 연구진에 의해 siRNA (short interfering RNA)라고 명명되었다. siRNA는 서열특이성이 매우 높아, 21염기 중 불과 몇 개 서열의 mismatch에 의해 효과는 거의 볼 수 없게 되었다. siRNA의 길이는 21염기, overhang은 2염기가 가장 효과가 높으며, 4염기 이상의 overhang은 효과가 거의 없었다. Target mRNA의 절단 부위는 siRNA의 guide RNA부분의 5' 말단측으로부터 정확히 10~11염기 부분이며, siRNA에 의해 정확히 제어되고 있다¹⁶⁾.

생성된 siRNA에는 5' 말단측에 5' monophosphate와 3' OH기가 존재했다. 화학적으로 합성된 siRNA는 보통 5' 말단, 3' 말단 모두 OH기이다. 이렇게 5' 말단이 OH기인 siRNA에서도 효과가 있으나, 5' 말단 인산기의 siRNA에서 효과가 약간 높거나 비슷한 정도였다^{16,17)}. 실제 합성 siRNA의 5' 말단 OH기는 배아 추출물에서 빠르게 인산화 되었다. 인산화를 방지하기 위해 5' 말단을 메칠기 (CH₃)로 변형시켜본 결과 RNAi 효과를 전혀 찾아볼 수 없었다. 이 5' 인산화는 RNAi 경로에 들어가기 위해 반드시 필요하며, ATP 의존적인 아직까지 동정되지 않은 kinase에 의한 것이라고 밝혀졌다. 3' 말단에 대해서는 2' OH기를 2'-deoxy, 2'-O-methyl, biotin, 2', 3'-dideoxycytosine, aminopropylphosphoester로 바꿔도 siRNA 활성화에는 영향이 없었다^{16,19)}.

초파리의 배아에서 검증된 siRNA의 구조 요구성은 포유동물 세포인 사람의 자궁암 유래 HeLa S3 세포 추출물을 이용하여 *in vitro*계에서 재검토되었다. HeLa S3 세포에서는 siRNA 길이의 제약이 적어 20~29염기까지는 높은 절단 활성이 나타난 점과, 3' 말단의 overhang의 경우 4염기까지는 활성에 영향이 없다는 것 이외는 거의 초파리의 경우와 같았다²⁰⁻²²⁾.

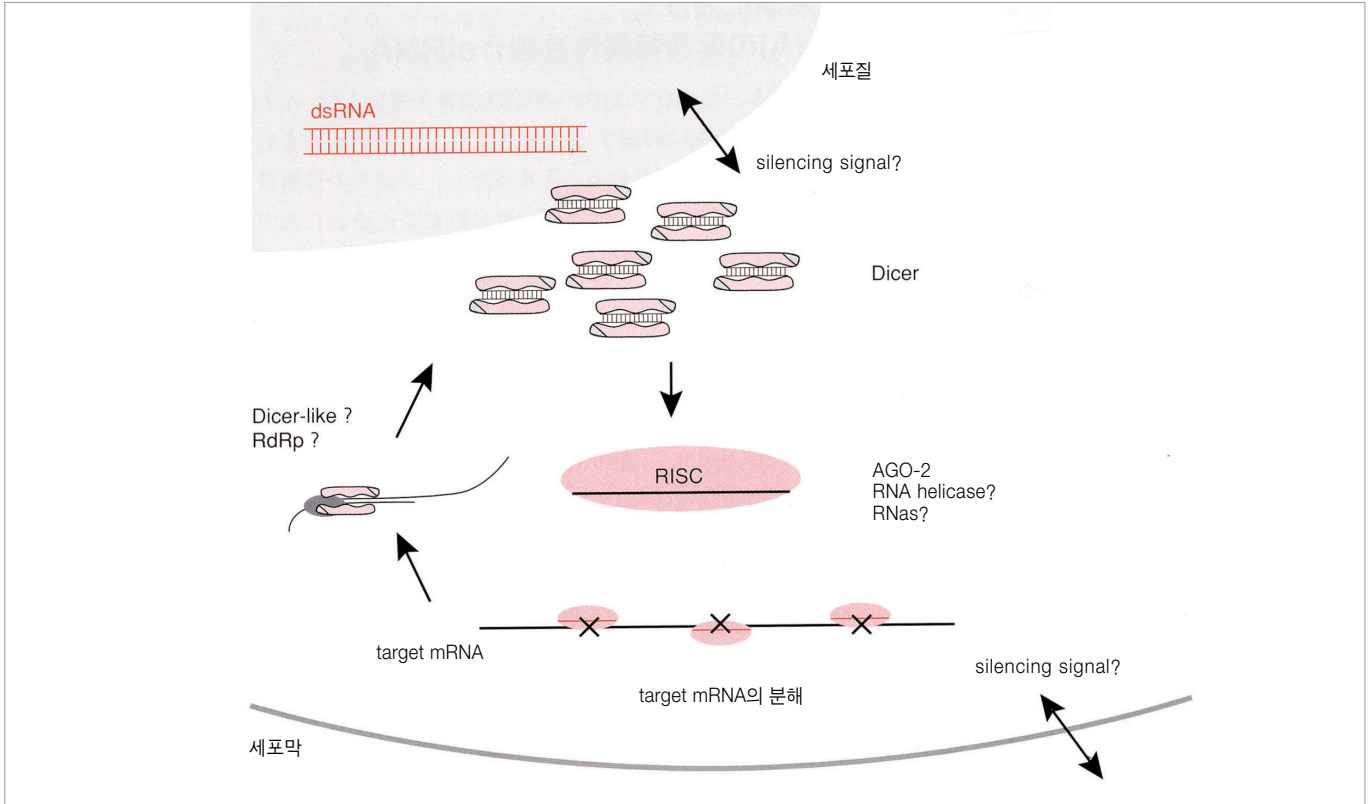


그림 3 RNAi의 경로와 관련된 단백질 모델

세포 외부에서 들어오거나 세포 안에서 transcription된 dsRNA 서열 특이적으로 mRNA가 분해된다. siRNA 서열 특이적인 정보, 세포 내의 세포질에서 핵으로의 전달 기구, 또는 세포간의 전달 기구는 아직 확실하지 않다.

dsRNA를 siRNAs로 processing하는 효소: Dicer

생성된 siRNAs에는 5' monophosphate와 3' OH기가 존재하는 것과 3' 측에 2염기의 overhang이 있는 점으로 미루어 RNaseIII가 그 processing을 담당하고 있음을 암시했다¹³⁾. 나중에 이 절단효소는 초파리 세포에서 관찰되어, Dicer라고 명명되었다²³⁾. Dicer에 대해 siRNA를 이용하면 Dicer를 80% 정도 knock down 할 수 있으며, 그 결과 다른 dsRNA에 의해 RNAi의 효과가 억제되어 실제로 Dicer가 RNAi에 직접 관여하고 있음이 밝혀졌다. 선충²⁴⁾, 사람²⁵⁾에서도 Dicer의 homologue는 dsRNA를 processing하는 효소로 관찰되었다. Dicer는 RNaseIII family에 속하며 진화적으로 선충, 초파리, 식물, 균류, 포유동물 등 다양한 종간에 보존되어 있어, 생물 공통의 어떠한 중요한 기구를 담당하고 있음을 시사한다²³⁾. 예를 들면, 식물 *Arabidopsis thaliana*에 있는 초파리 Dicer homologue인 DCL-1 (DICER-LIKE)/EMB76/SINI/SUSI/CAF의 변이주는 잎이나 꽃 형성에 이상을 나타내는 것을 볼때 정상적인 발생 단계에도 필수 불가결함을 시사하고 있다²⁶⁾.

Dicer는 아직 기능이 잘 알려지지 않은 PAZ (PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE) 영역을 가지고 있다²³⁾²⁷⁾. PAZ 영역을 통해 다른 PAZ 영역을 가지는 단백질 (ARGONAUTE과)과 상호작용하여 nuclease complex (RNA-induced silencing complex: RISC) 형성을 유도하는 것으로 생각된다²⁸⁾ (그림 3). 최근 초파리에서 PAZ 영역을 가진 단백질이 RISC에 포함되는 것으로 관찰되어 ARGONAUTE-2로 명명되었다²⁹⁾. 초파리는 AGO-1 (ARGONAUTE), AGO-2, PIWI, STING 등 적어도 4개의 ARGONAUTE family에 속하는 단백질을 가지고 있으며, 각 발생 단계에 있어 매우 중요한 역할을 한다.

AGO-2의 homologue는 *Arabidopsis thaliana*에서는 AGO-1, *Neurospora crassa* (붉은빵 곰팡이)에서는 QDE-2 (QUELLING DEFECT), 선충에서는 RDE-1 (RNAi DEFECTIVE)이며, 각각의 knockout 개체는 RNAi를 나타내지 않음을 알 수 있다³⁰⁾. AGO는 종(種)마다 명명이 달라 혼란스러울 수 있지만, 종이 다르면 명칭이 같아도 별개이다.

RNAi에 관련된 그 밖의 유전자

Dicer에 의한 dsRNA 분해 전후의 경로는 아직 명확하지 않지만, 주로 붉은빵 곰팡이(*Neurospora crassa*), 선충(*Caenorhabditis elegans*), *Arabidopsis thaliana*에서 RNAi 효과를 볼 수 없는 knockout 개체가 발견되었으며, 관련 유전자도 여러개 관찰되고 있다. RNAi에 관련된 유전자에는 종을 초월하여 공통성을 찾아볼 수 있으며, 현재 RNA 의존적 RNA polymerase (RdRp), RNA helicase, 3', 5'-exonuclease, RNaseIII, PAZ 영역을 가지는 단백질 등이 관찰되고 있다³¹⁾.

RdRp는 single-stranded로 된 RNA에서 dsRNA를 만드는데 필요한 효소로 선충 EGO-1, *Neurospora crassa* QDE-1, *Arabidopsis thaliana* SGS-2 (SUPPRESSOR of GENE SILENCING)/SDE-1(SILENCING DEFECTIVE)가 발견되었다. RNAi에서는 RNA로부터 신규 RNA 합성이 필요하다는 것을 알 수 있으며, silencing의 시작과 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다³²⁾. 선충, 식물에서 RdRp에 의해 siRNA를 primer로서 target mRNA에 대한 antisense RNA가 새로이 합성되며, 그 결과 새로운 siRNA가 증폭된다고 보고되고 있다 (그림 3)³³⁻³⁶⁾. 한편, 초파리, 포유동물 세포에서는 RdRp homologue는 계놈에 존재하지 않는 점³⁷⁾, RdRp의 primer가 되기

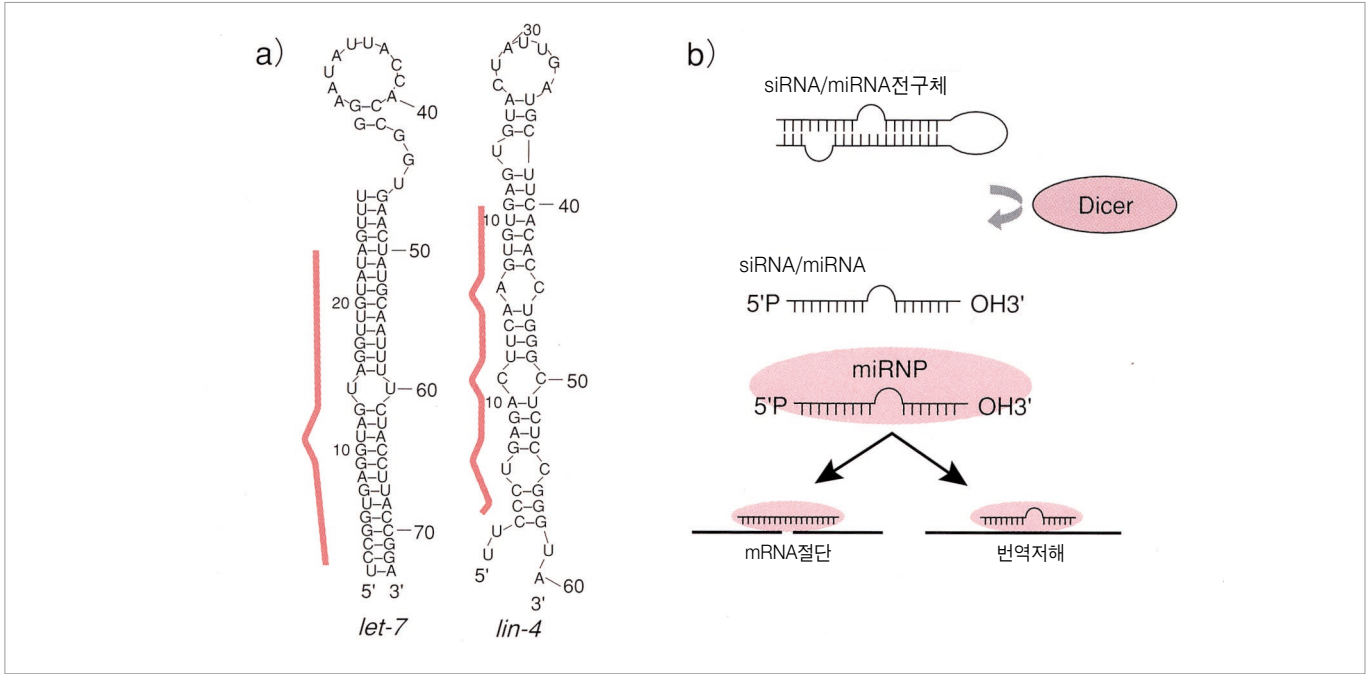


그림 4 stRNA/miRNA 경로 모델도

a) let-7, lin-4 RNA stRNA 전구체, let-7, lin-4 stRNA 부분을 적색으로 나타냈다. RNA의 2차구조는 RNA structure 3.7 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/~zukerm/>)을 이용해 예측하였다. b) 70염기 정도의 dsRNA 영역을 포함하는 stRNA/miRNA 전구체로부터 Dicer에 의해 single strand의 stRNA/miRNA로 processing 된다. stRNA/miRNA 이의 부분은 신속히 분해된다. miRNA는 RISC처럼 miRNP로 들어가는 것으로 생각되지만, 자세한 메커니즘은 아직 명확하지 않다.

위해서는 3' 말단의 OH기가 필요하지만 siRNA의 3' 말단 modification은 RNAi에 영향이 없다는 점^{20)~22)}, 세포 추출물 중 또는 세포 중에서 siRNA에 의한 target mRNA의 절단 부분은 한곳이라는 점^{20)~22)38)}으로 미루어 아마도 증폭기구는 존재하지 않을 것으로 생각된다.

RNA helicase는 RNA 고차 구조를 푸는 효소로서, dsRNA를 특정 단계에서 ssRNA로 만드는데 필요하다고 생각되지만 실제로 어느 단계에서 작용하는지는 명확하지 않다³⁹⁾. 선충 DRH-1 (DICER RELATED HELICASE), DRH-240), MUT-14 (MUTATOR)³⁵⁾, SMG-2, *Arabidopsis thaliana* SDE-3, *Neurospora crassa* QDE-3, 단세포 녹조류 *Chlamydomonas reinhardtii* MUT-6, 초파리 Dmp6841)이 발견되었다. MUT-6 결손주에서는 transposon 유래의 이상 RNA 축적을 보여, MUT-6이 RNA 분해에 어떠한 형태로든 관여하고 있는 것으로 생각된다.

RNAi의 생물학적 역할은 transposon, virse, virosoid로부터의 핵산 차원의 방어기구라고 한다²⁾⁴²⁾. 위의 유전자는 RNAi, transposon의 침정화(沈靜化), 또는 그 양쪽 모두에 필요하지만 현재로서는 어느 생물에서도 이와 같은 유전자, 자세한 단백질간 상호작용 등의 데이터가 없어 확실한 모델은 제시되어 있지 않다.

RISC 활성을 지닌 복합체와 siRNA

RISC는 RNAi의 절단 활성을 담당하는 siRNA-단백질 복합체이며, Hannon 연구진에 의해 최초로 초파리 S2 (Schneider 2) 세포 추출물로부터 정제되었다²⁶⁾. 최근 초파리와 사람의 세포에서 RISC 구성 단백질, 또는 RISC와 상호작용하는 단백질이 여러 연구진에 의해 보고되고 있다. 아래에서는 siRNA의 서열특이적인 절단활성을 RISC 활성, RISC 활성을 지닌 복합체를 RISC라고 한다.

Hannon 연구진은 약 500 kDa의 RISC로부터 SDS-PAGE로 단백질 밴드를

추출해 질량분석기로 측정하여 RISC 구성 단백질로서 130 kDa의 AGO-2, 80 kDa의 dFMR1 (FRAGILE X MENTAL RETARDATION), 및 60 kDa의 VIG (VASA INTRONIC GENE)를 관찰하였다²⁹⁾⁴³⁾. 이상하게도 배아에서 RNAi에 필요하다고 보고된 초파리 AGO-1은⁴⁴⁾ RISC 활성을 나타내지 않는 250 kDa의 복합체 부분에 존재했다⁴⁵⁾. 일본 鹽尾 연구진에서도 S2 세포 추출물 중의 dFMR1과 복합체를 형성하는 단백질에 AGO-2, Dmp68 helicase가 들어 있다고 보고하였다⁴¹⁾. 이 중 Dmp68은 RNAi 경로에 직접 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, dFMR1은 RNAi에는 필요하지 않지만 AGO-2, Dicer와 상호작용하는 것으로 밝혀졌다⁴¹⁾⁴³⁾.

Zamore 연구진이 초파리 배아 추출물로부터 정제한 RISC는 Hannon 연구진의 것보다 작은 것이었다. siRNA는 처음에 dsRNA 상태로 360 kDa의 불활성 RISC에 존재하며, siRNA가 double strand로부터 single strand로 해리됨에 따라 230 kDa 이하의 활성형 RISC가 생성된다고 보고되고 있다¹⁸⁾. 포유동물 세포에서도 Tuschl 연구진에 의해 이와 동일한 생화학적 방법에 의한 RISC 정제가 이루어졌다. HeLa S3 세포 추출물에서 siRNA의 3' 말단을 biotin으로 label하고, streptavidin column으로 siRNA가 상호작용하는 복합체를 회수하여 glycerol 구배원심분리로 정제한 결과, RISC는 90~160 kDa의 부분에 존재하였다. Glycerol 구배원심분리는 단백질 복합체의 형상에 따라 침강 정수가 변하기 때문에 RISC의 정확한 크기가 반영되지 않을 가능성은 있다. 그 RISC 구성 단백질 일부가 관찰되었으며, 모두 약 100 kDa의 eIF2C1 (EUKARYOTIC INITIATION FACTOR), eIF2C2/GERp95 (GOLGI ENDOPLASMIC RETICULUM)이었다²¹⁾. eIF2C2, eIF2C1은 초파리 AGO-2 homologue이며, 모두 PPD (Paz and Piwi domain) 단백질 family에 속한다³⁰⁾. Translation 개시 인자라는 명칭과는 달리, 이 단백질에 의해 translation이 촉진되지 않는 것으로 생각된다⁴⁵⁾⁴⁶⁾. 이 밖에 Tuschl 연구진에 의해 single strand로 된 5' 말단이 인산화

된 19~29염기의 antisense RNA는 그 자체로 RISC에 들어가, 내부에 존재하는 Lamin A/C에 대해 고농도에서는 siRNA와 동등한 효과를 얻는 것으로 밝혀졌다²¹⁾.

RISC와 구성 단백질 관찰에 대해서는 아직까지 견해가 통일되어 있지 않다. 또한 이상하게도 어느 보고에서도 절단활성 본체는 관찰되지 않아 앞으로 풀어야 할 과제로 남아있다. RISC는 1종류가 아니며 들어온 siRNA를 핵으로 한 RISC 활성을 지닌 최소 component와 세포 내에서 다양한 활성을 부여하기 위한 액세서리 단백질로 이루어져 있는지도 모르겠다.

stRNA-발생 과정을 제어하는 작은 RNA

RNAi의 중심적 역할을 하는 효소 Dicer로부터 siRNA가 생성되며, 그것이 mRNA를 서열특이적으로 분해하는 것을 살펴보았다. 이와 같은 Dicer는 생물 발생과정에도 밀접하게 관여하고 있다⁴⁷⁾.

이전부터 선충에서 *lin-4*, *let-7*이라고 하는 작은 RNA가 알려져 왔다 (그림 4a)⁴⁸⁾⁴⁹⁾. *lin-4*, *let-7*은 발생 시기를 제어하는 heterochronic gene이며, heterochronic gene 경로는 적어도 12개의 유전자로 이루어져 있으며, 그 번이주에는 발생단계를 늦추는 것과 앞당기는 것이 있다. *lin-4*는 유생(幼生) 제1기에서 제2기로의 이행에 필요하며, 3' 말단 비translation 영역(UTR)에 상보적이다. heterochronic gene *lin-4*는 *lin-28* RNA와 결합함으로써 발현을 translation 단계에서 억제한다 (그림 4b). 유생 후기부터 성체 세포로의 이행에서는 21염기의 *let-7* RNA가 필요하다. *let-7* RNA는 *lin-4*와 마찬가지로 *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42*, *daf-12*와 같은 일련의 heterochronic gene의 발현을 제어한다. *let-7* 유전자 번이주는 성충기에도 유충기 상태이며, *let-7*을 과잉 발현시키면 유충기에 성충기 유전자가 조기 발현된다⁵⁰⁾. *let-7*과 그 시간적 제어는 척추동물, 명게류, 반색(半索)동물, 연체동물, 환형동물, 절족동물 등의 광범위한 종에 보존되어 있지만, 몇몇 종류의 자포(刺胞)동물이나 해면동물, 효모, 대장균, *Arabidopsis thaliana*에서는 볼 수 없다⁵¹⁾.

lin-4, *let-7*은 단백질이 암호화되지 않은 21~22염기의 RNA로, 유생의 특정 시기에 발현되며, 3' 말단이 상보적인 일련의 mRNA에 작용하여 translation 단계에서 그것들을 저해해 발생 시기를 결정하는 역할을 하는 것으로 small temporal RNA(stRNA)라고 명명되었다⁵¹⁾. stRNA 경로는 몇 가지 현상에 따라 RNAi 경로와의 관련이 암시되었다. *lin-4*, *let-7*이 siRNA와 거의 같은 염기 길이인 점, dsRNA 영역을 포함한 70염기 정도의 stem-loop 구조로부터 짧은 RNA로 processing 되는 점⁵⁴⁾⁵⁵⁾, Dicer homologue인 DCR-1 knockout 개체가 *lin-4*, *let-7*의 knockout 개체와 비슷한 표현형을 나타내는 점 등이다⁵²⁾. 그 후 *lin-4*, *let-7*의 processing을 DCR-1가 담당하고 있음이 밝혀졌다⁵³⁾.

앞에서 언급했듯이 선충에서 RDE-1은 RISC의 구성요소임을 알 수 있으며, 그 번이주는 RNAi를 일으키지 않는 것으로 알려져 있다⁵⁴⁾. *rde-1*의 homologue는 선충에서 23개로, 그 발현을 RNAi로 억제하자 *alg-1*, *alg-2* (Argonaute like genes)는 발생에 관련된 표현형을 나타냈다. *alg-1*, *alg-2*의 RNAi 주에서는 *lin-4* mRNA가 70염기의 전구체 상태로 축적되어 *let-7* stRNA 양이 감소된 것으로 미루어 stRNA의 processing 또는 안정성에 관여하는 인자임을 나타내주었다. 그러나 어느 유전자도 RNAi에는 영향을 미치지 않았다⁵⁵⁾. RNAi의 경로와 stRNA의 생성과정 경로에서 Dicer와 같이 공통된 인자와 *ALG-1*, *ALG-2*와 같이 stRNA의 경로를 특이적으로 관여하는 인자가 존재하는 것은 매우 흥미롭다. 현재로서는 *lin-4*, *let-7* 이외의 작은 RNA에 의한 발생경로 제어는 명확히 밝혀지지 않은 상태로, 앞으로의 연구 과제로 남아 있다.

내부에 존재하는 siRNA/miRNA family

2001년 10월, 3그룹이 동시에 초파리, 선충, 사람에서 총 100여 종류의 21~22염기의 작은 RNA family가 존재한다고 보고했다. 그 작은 RNA는 stRNA와 같은 종류의 RNA이지만, 모두가 발생의 시기 특이적인 RNA는 아닌 것으로 생각되어, microRNA (miRNA)라고 명명되었다⁵⁶⁾⁵⁸⁾. 이 밖에 쥐, 식물에서도 새로운 miRNA의 존재가 보고되어, 현재 관찰된 miRNA 서열은 200개 이상에 이르고 있다⁵⁹⁾⁶³⁾. miRNA에서 특징적인 것은, 전구체 RNA로 여겨지는 서열의 2차구조를 예측하면 모두 dsRNA 영역을 포함한 stem-loop 구조를 하고 있다는 점이다 (그림 4a). miRNA는 아마도 dsRNA에 유도되는 다양한 유전자 발현을 막기 위해 염기쌍의 mismatch를 포함한 bulge 구조의 수직에서 수백 염기의 긴 전구체 RNA로서 transcription되며, Dicer에 의해 processing 된다. 이들 miRNA는 *lin-4*, *let-7*처럼 발생시기 특이적으로 발현될 뿐만 아니라 조직 특이적으로 발현되며 항상 발현되는 등 다양한 발현 양상을 보여 광범위한 생명현상에 관여하고 있는 것으로 생각되고 있다.

Dreyfuss 연구진에 의해 HeLa S3 세포 추출물로부터 miRNA를 포함한 단백질 복합체가 관찰되어 miRNP라고 명명되었다 (그림 4b). miRNP는 상당히 여러 종류의 miRNA를 포함하며, 그 중 40종류의 서열이 관찰되었다. 또한 miRNP의 구성 단백질로서 95 kDa의 eIF2C, 105 kDa의 GEMIN3, 120 kDa의 GEMIN4가 관찰되었다⁶¹⁾. GEMIN3, GEMIN4는 GEMIN2, 4, 5와 함께 척수성 근위축증의 원인 단백질 SMN (SURVIVAL OF MOTOR NEURON)과 SMN 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다⁶⁴⁾ 그 후 RISC가 eIF2C, GEMIN3, GEMIN4와 동시에 침전한다고 보고되었다⁶⁵⁾. RISC와 miRNP가 동일 물질인가는 아직 확실하지 않지만, 적어도 몇몇 component는 공유하고 있는 것으로 생각된다.

식물의 miRNA 중에는 특정 mRNA 서열과 완전히 상보적으로 siRNA를 연상시키는 것도 존재했다⁶⁶⁾. 최근에 translation 저해가 아닌 siRNA와 비슷한 형식으로 target mRNA 서열을 서열 특이적으로 절단하는 miRNA가 보고되었다 (그림 4b)⁶⁷⁾. 이것은 miRNA가 RISC, 또는 RISC 모양의 복합체에 유입됨을 나타내준다⁶⁵⁾.

최근 작은 RNA를 통하지만, mRNA를 절단하거나 translation 저해를 하지 않는 새로운 현상이 분열효모, *tetrahymena*로부터 보고되었다.

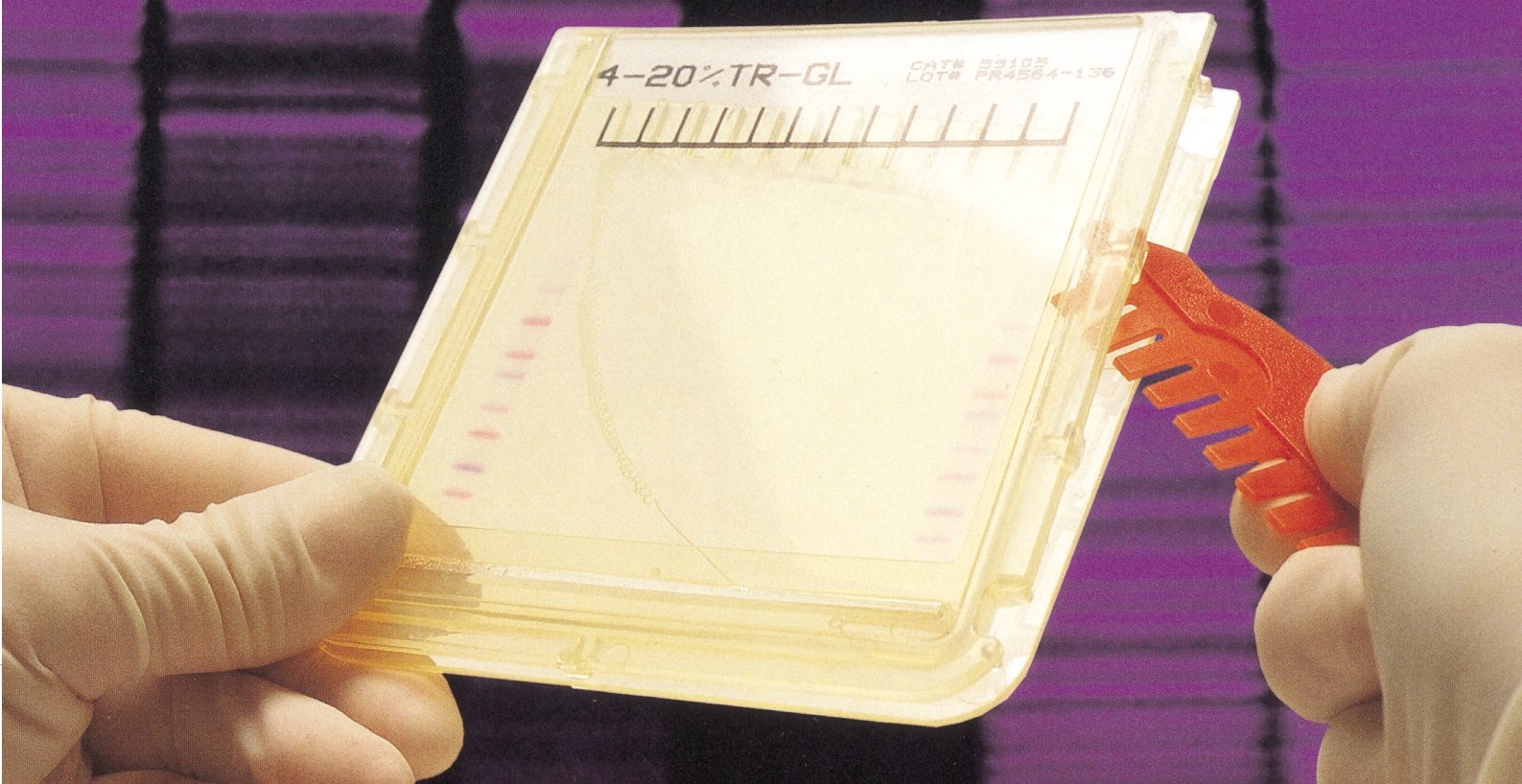
참고문헌

- 1) Fire, A. et al: *Nature* (1998), **391**: 806-811
- 2) Waterhouse, P. M. et al: *Nature* (2001), **411**: 834-842
- 3) Elbashir, S. M. et al: *Nature* (2001), **411**: 494-498
- 4) Napoli, C. et al: *Plant Cell* (1990), **2**: 279-289
- 5) Van Der Krol, A. R. et al: *Plant Cell* (1990), **2**: 291-299
- 6) Muskens, M. W. et al: *Plant Mol. Biol.*, (2000), **43**: 243-260
- 7) Wassenegger, M.: *Plant Mol. Biol.*, (2000), **43**: 203-220
- 8) Metzlauff, M. et al: *Cell* (1997), **88**: 845-854
- 9) Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C.: *Science* (1999), **286**: 950-952
- 10) Guo, S., & Kemphues, K. J.: *Cell* (1995), **81**: 611-620
- 11) Cogoni, C., & Macino, G.: *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2000), **10**: 638-643
- 12) Yang, D. et al: *Curr. Biol.* (2000), **10**: 1191-1200
- 13) Elbashir, S. M. et al: *Genes Dev.* (2001), **15**: 188-200
- 14) Tuschl, T. et al: *Genes Dev.* (1999), **13**: 3191-3197
- 15) Zamore, P. D. et al: *Cell* (2000), **101**: 25-33
- 16) Elbashir, S. M. et al: *EMBO J.* (2001), **20**: 6877-6888

- 17) Boutla, A. *et al: Curr. Biol.* (2001), **11**: 1776-1780
 18) Nykanen, A. *et al: Cell* (2001), **107**: 309-321
 19) Schwarz, D. S. *et al: Mol. Cell* (2002), **10**: 537-548
 20) Chiu, Y. -L., & Rana, T. M.: *Mol. Cell* (2002), **10**: 549-561
 21) Martinez, J. *et al: Cell* (2002), **110**: 563-574
 22) Miyagishi, M., & Taira, K.: *Nat. Biotechnol.* (2002), **20**: 497-500
 23) Bernstein, E. *et al: Nature* (2001), **409**: 363-366
 24) Grishok, A. *et al: Cell* (2001), **106**: 23-34
 25) Hutvagner, G. *et al: Science* (2001), **293**: 834-838
 26) Schauer, S. E. *et al: Trends Plant Sci.* (2002), **7**: 487-491
 27) Cerutti, L. *et al: Trends Biochem. Sci.* (2000), **25**: 481-482
 28) Hammond, S. M. *et al: Nature* (2000), **404**: 293-296
 29) Hammond, S. M. *et al: Science* (2001), **293**: 1146-1150
 30) Carmell, M. A. *et al: Genes Dev.* (2002), **16**: 2733-2742
 31) Matzke, M. *et al: Science* (2001), **293**: 1080-1083
 32) Tuschl, T.: *Chembiochem* (2001), **2**: 239-245
 33) Ahlquist, P.: *Science* (2002), **296**: 1270-1273
 34) Sijen, T. *et al: Cell* (2001), **107**: 465-476
 35) Tijsterman, M. *et al: Science* (2002), **295**: 694-697
 36) Voinnet, O. *et al: Cell* (1998), **95**: 177-187
 37) Zamore, P. D.: *Science* (2002), **296**: 1265-1269
 38) Holen, T. *et al: Nucleic Acids Res.* (2002), **30**: 1757-1766
 39) Sharp, P. A.: *Genes Dev.* (2001), **15**: 485-490
 40) Tabara, H. *et al: Cell* (2002), **109**: 861-871
 41) Ishizuka, A. *et al: Genes Dev.* (2002), **16**: 2497-2508
 42) Voinnet, O.: *Trends Genet.* (2001), **17**: 449-459
 43) Caudy, A. A *et al: Genes Dev.* (2002), **16**: 2491-2496
 44) Williams, R. W., & Rubin, G. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002), **99**: 6889-6894
 45) Cikaluk, D. E. *et al: Mol. Biol. Cell* (1999), **10**: 3357-3372
 46) Tahbaz, N. *et al: J. Biol. Chem.* (2001), **276**: 43294-43299
 47) Moss, E. G.: *Curr. Biol.* (2001), **11**: R772-R775
 48) Reinhart, B. J. *et al: Nature* (2000), **403**: 901-906
 49) Lee, R. C. *et al: Cell* (1993), **75**: 843-854
 50) Moss, E. G.: *Curr. Biol.* (2000), **10**: R436-R439
 51) Pasquinelli, A. E. *et al: Nature*, **408**: 86-89
 52) Banerjee, D., & Slack, F.: *Bioessays* (2002), **24**: 119-129
 53) Hutvagner, G. *et al: Science* (2001), **293**: 834-838
 54) Tabara, H. *et al: Cell* (1999), **99**: 123-132
 55) Grishok, A. *et al: Cell* (2001), **106**: 23-34
 56) Lagos-Quintana, M. *et al: Science* (2001), **294**: 853-858
 57) Lau, N. C. *et al: Science* (2001), **294**: 858-862
 58) Lee, R. C., & Ambros, V.: *Science* (2001), **294**: 862-864
 59) Llave, C. *et al: Plant Cell* (2002), **14**: 1605-1619
 60) Lagos-Quintana, M. *et al: Curr. Biol.* (2002), **12**: 735-739
 61) Mourelatos, Z. *et al: Genes Dev.* (2002), **16**: 720-728
 62) Park, W. *et al: Curr. Biol.* (2002), **12**: 1484-1495
 63) Reinhart, B. J. *et al: Genes Dev.* (2002), **16**: 1616-1626
 64) Paushkin, S. *et al: Curr. Opin. Cell Biol.* (2002), **14**: 305-312
 65) Hutvagner, G. & Zamore, P. D.: *Science* (2002), **297**: 2056-2060
 66) Rhoades, M. W. *et al: Cell* (2002), **110**: 513-520
 67) Llave, C. *et al: Science* (2002), **297**: 2053-2056

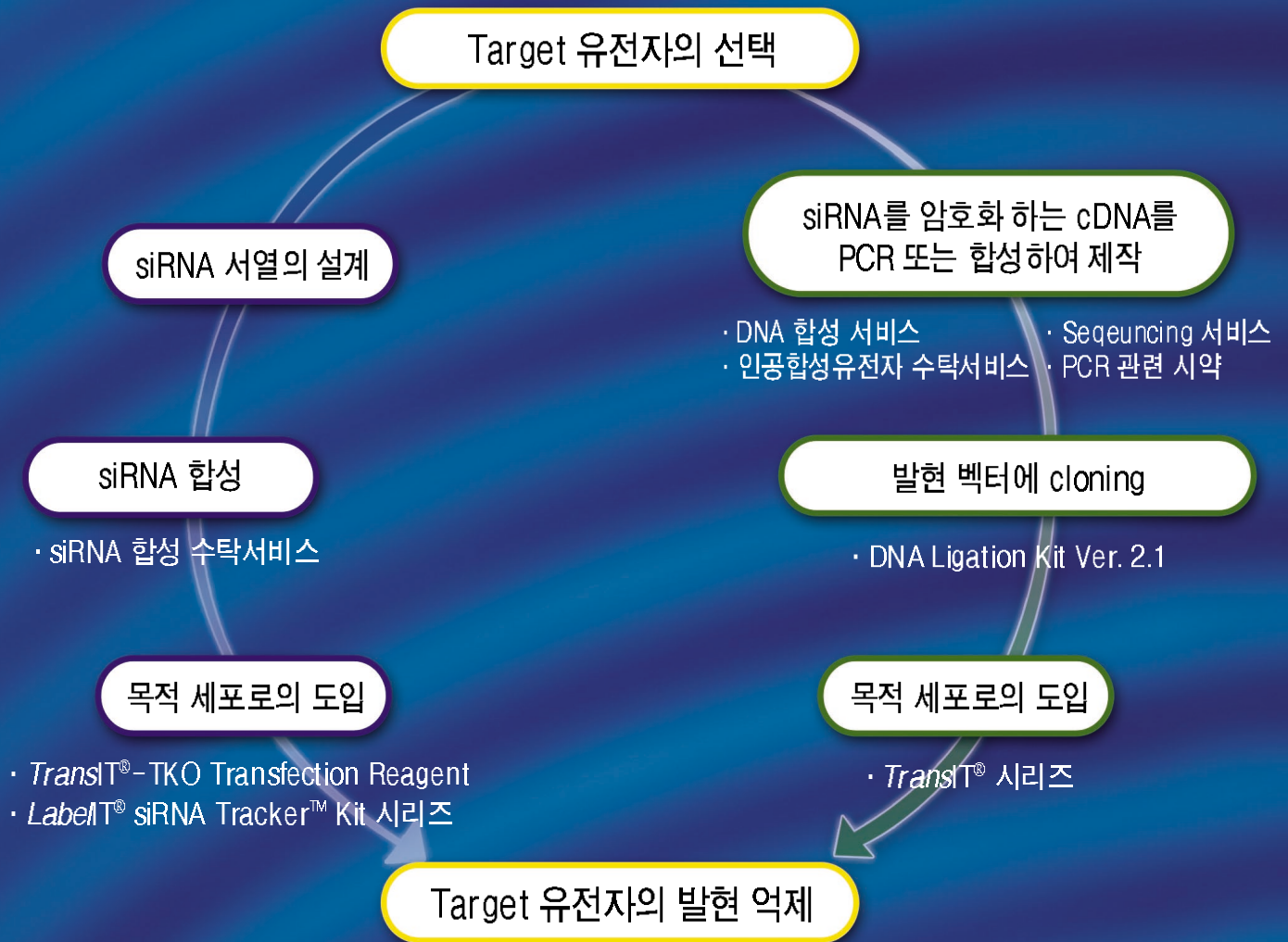
완벽한 전기영동 시스템

Cambrex Molecular Biology Products



Hot issue로 떠오르는 RNAi, 다카라코리아의 강력한 Support!

RNAi



Takara Korea Biomedical Inc

URL <http://www.takara.co.kr>

■ 관련 제품

제품명	Takara Code	용량
siRNA용 Transfection 시약		
<i>TransIT</i> [®] -TKO Transfection Reagent	V2150	~500 회 (24 well) 1 ml
<i>LabelIT</i>[®] siRNA Tracker[™] Intracellular Localization Kit		
<i>LabelIT</i> [®] siRNA Tracker [™] Cy [™] 3 Kit	V7200	Labels 50 µg
<i>LabelIT</i> [®] siRNA Tracker [™] Cy [™] 5 Kit	V7201	Labels 50 µg
<i>LabelIT</i> [®] siRNA Tracker [™] CX-Rhodamine Kit	V7202	Labels 50 µg
<i>LabelIT</i> [®] siRNA Tracker [™] TM-Rhodamine Kit	V7203	Labels 50 µg
<i>LabelIT</i> [®] siRNA Tracker [™] Biotin Kit	V7204	Labels 50 µg
<i>LabelIT</i> [®] siRNA Tracker [™] Fluorescein Kit	V7205	Labels 50 µg
<i>siXpress</i>[™] PCR Vector Systems		
<i>siXpress</i> [™] Human U6 PCR Vector System	V7300	20 반응분
<i>siXpress</i> [™] Human H1 PCR Vector System	V7301	20 반응분
<i>siXpress</i> [™] Mouse U6 PCR Vector System	V7302	20 반응분
유전자 도입 시약 · non-RI 핵산표식용 시약 시리즈		
Oligonucleotide Transfection		
<i>TransIT</i> [®] -Oligo Transfection Reagent	V2160	1 ml
Cell Line Specific Transfection		
<i>TransIT</i> [®] -LT1 Transfection Reagent	V2300	~500 회 (35 mm dish), 1 ml
<i>TransIT</i> [®] -LT2 Transfection Reagent	V2400	~500 회 (35 mm dish), 1 ml
<i>TransIT</i> [®] -293 Transfection Reagent	V2700	~500 회 (35 mm dish), 1 ml
<i>TransIT</i> [®] -Keratinocyte Transfection Reagent	V2750	~500 회 (35 mm dish), 1 ml
<i>TransIT</i> [®] -HeLaMONSTER [™] Transfection Reagent	V2900	~500 회 (35 mm dish), 1 ml
<i>TransIT</i> [®] -Express Transfection Reagent	V2000	~5000 회 (96 well plate), 1 ml
<i>TransIT</i> [®] -Insecta [™] Transfection Reagent	V2204	~100 회 (35 mm dish), 0.4 ml
<i>TransIT</i> [®] -CHO Transfection Reagent	V2170	1 ml
<i>TransIT</i> [®] -3T3 Transfection Reagent	V2180	1 ml
<i>TransIT</i> [®] -COS Transfection Reagent	VR2190	1 ml
<i>TransIT</i> [®] -Neural [™] Transfection Reagent	V2140	1 ml
Nucleic Acid Labeling and Tracking		
<i>LabelIT</i> [®] Tracker [™] Cy [™] 3 Intracellular Nucleic Acid Localization Kit	V7010	Labels 50~200 µg of plasmid DNA
<i>LabelIT</i> [®] Tracker [™] Cy [™] 5 Intracellular Nucleic Acid Localization Kit	V7011	Labels 50~200 µg of plasmid DNA
<i>LabelIT</i> [®] Tracker [™] CX-Rhodamine Intracellular Nucleic Acid Localization Kit	V7012	Labels 50~200 µg of plasmid DNA
<i>LabelIT</i> [®] Tracker [™] TM-Rhodamine Intracellular Nucleic Acid Localization Kit	V7013	Labels 50~200 µg of plasmid DNA
<i>LabelIT</i> [®] Tracker [™] Biotin Intracellular Nucleic Acid Localization Kit	V7014	Labels 50~200 µg of plasmid DNA
<i>LabelIT</i> [®] Tracker [™] Fluorescein Intracellular Nucleic Acid Localization Kit	V7015	Labels 50~200 µg of plasmid DNA
<i>LabelIT</i>[®] non-RI Labeling Kits		
<i>LabelIT</i> [®] CX-Rhodamine Labeling Kit	V3125	1 Kit (25 µg 용)
<i>LabelIT</i> [®] Fluorescein Labeling Kit	V3225	1 Kit (25 µg 용)
<i>LabelIT</i> [®] Digoxin Labeling Kit	V3325	1 Kit (25 µg 용)
<i>LabelIT</i> [®] Biotin Labeling Kit	V3425	1 Kit (25 µg 용)
<i>LabelIT</i> [®] Cy [™] 3 Labeling Kit	V3625	1 Kit (25 µg 용)
<i>LabelIT</i> [®] Cy [™] 5 Labeling Kit	V3725	1 Kit (25 µg 용)
<i>LabelIT</i> [®] DNP Labeling Kit	V3825	1 Kit (25 µg 용)
<i>LabelIT</i> [®] TM-Rhodamine Labeling Kit	V4125	1 Kit (25 µg 용)
Report 유전자 발현 측정		
β -Galactosidase Staining Kit	V2600	100 assays (35 mm dishes)