

인간 배아줄기세포의 줄기세포 특성을 조절하는 인자 : 인간 배아줄기세포 특이적 miRNAs의 다양한 암세포주에서의 발현

한양대학교 의과대학 해부세포생물학교실

김 계 성

Factors Regulating the ‘Stemness’ of Human Embryonic Stem Cells : Expression Profiling of hESC Specific MicroRNAs in Various Human Cancer Cell Lines

Kye-Seong Kim, D.V.M., Ph.D.

Department of Anatomy and Cell Biology, Hanyang University College of Medicine

〈요 약〉

miRNAs는 새로운 형태의 유전자 발현 조절물질로서 다양하고도 필수적인 기능을 가질 것으로 추측되고 있다. 그 기능에 관한 연구는 진핵생물의 유전자발현조절을 이해하는데 있어 새로운 획기적인 돌파구를 이룰 것으로 기대된다. 이와 같은 학문적 중요성 이외에도 miRNAs의 연구는 의학, 산업적인 측면에서 중요성을 갖는다. miRNAs의 대사나 기능의 결함으로 인해 발생하는 암 등의 질병의 연구나 miRNAs의 조작을 통한 유전자 발현의 조절은 향후 신약 개발을 위한 기반적 기술을 제공해 줄 것이다.

인간 배아줄기세포의 줄기세포 특성, 즉 전분화능 및 자가재생산에 관여하는 많은 인자들에 관한 연구가 줄기세포의 특성을 이해하여 이를 치료에 이용하고자 하는 이유에서 진행되고 있으며, 이런 인자들 중 하나로 최근에는 단백질을 코딩하지 않는 non-coding RNA (ncRNA)의 중요성이 보고되고 있다. 그 동안 RNA는 유전정보를 단백질로 변환시키는 과정에서 단순히 전달자로서 알려져 있으며, DNA와 단백질 중심의 생명과학 연구에서 그 역할에 대한 중요성이 인식되지 않았다. 그러나 1990년대 초반부터 새로운 class의 small RNA인 microRNA (miRNA)가 발견되면서 주목을 받기 시작했으며, 현재 이 분야 연구는 발생과 질병 발생, 특히 암에 있어 매우 중요한 것으로 인식되어 광범위한 연구가 전 세계적으로 진행되고 있다. miRNA는 유전자 발현 과정에 직접 관여하고 세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 글에서는 miRNA의 기본적인 특성과 세포 내

조직 특이적으로 발현되는 miRNA의 종류를 알아보고, 배아줄기세포에서 특이적으로 발현되고 있는 miRNA의 역할을 중심으로 그 중요성에 관하여 기술하고자 한다.

본 론

1. miRNAs 개요

miRNAs는 small RNA로서 20-25개의 nucleotides로 이루어져 있으며 mRNA (messenger RNA)의 발현을 조절하여 유전자 발현 조절 시스템에 관여하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 수백개 이상의 miRNA가 식물과 동물에서 발견되었으며 동물의 발달과 분화과정에서 그리고 동물의 조직에서 특이적으로 발현되고 있다. 그러나 miRNA의 표적 물질 및 기능은 대부분 알려져 있지 않다. 그럼에도 불구하고 현재 예상되는 miRNA의 기능은 더욱 확대되어 동물

의 발달시기 (developmental timing), 세포의 사멸 (cell death), 세포의 증식 (cell proliferation) 등과 같은 여러 생명현상에 관여하고 있는 유전자들을 조절하는 조절인자로서 역할을 수행하는 것으로 판단된다¹⁾.

miRNA는 1993년 Victor Ambros 연구팀에 의해서 최초로 알려지기 시작했다. 이들은 선충류 (*Caenorhabditis elegans*)로부터 발생시기를 조절하는 유전자들 중 단백질을 합성하지 않는 lin-4와 let-7이라는 noncoding RNA를 발견하였다. 이들 noncoding RNA는 특정 시기에 발현되어 발생단계를 조절하는 것으로 보고되었다^{2,3)}. 그 후 선충류 뿐 만이 아니라 초파리 (*Drosophila melanogaster*), 생쥐 (*Mus musculus*), 인간(*Homo sapiens*)에 이르기까지 150

여 개의 새로운 small RNAs를 동정하였으며, stRNAs을 포함하여 이러한 RNA를 miRNA라 명명하게 되었다⁴⁻⁹⁾.

miRNA는 세포 내에서 두 단계의 과정을 거쳐 만들어지게 된다 (Fig. 1). 먼저 다수 miRNAs (polycistronic miRNA) 유전자와 단일 miRNAs (monocistronic miRNA) 유전자 형태로부터 최초의 miRNA 전사체 (primary miRNA; pri-miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNaseIII type 효소에 의해 약 70-90 nucleotides로 구성된 stem-loop 구조의 precursor miRNA (pre-miRNA)를 형성한다. 그런 다음, pre-miRNA는 Exportin 5라는 단백질에 의해서 세포질로 이동하게 되고 RNaseIII type 효소 중 하나인 Dicer에 의해 21-25-nucleotides 정도로 절단되어 miRNA

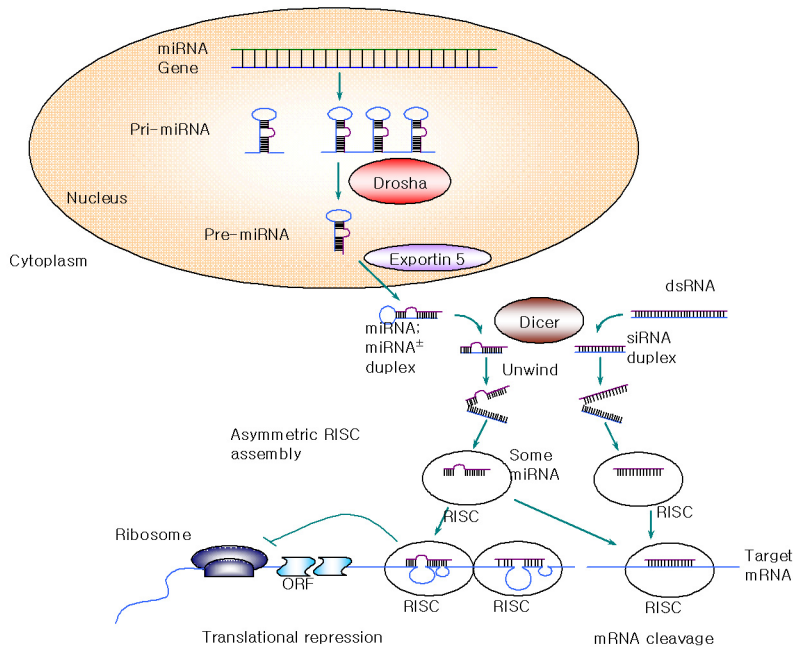


Fig. 1. The current model for the biogenesis and post-transcriptional suppression of miRNAs and small interfering RNAs. The nascent pri-miRNA (pri-miRNA) transcripts are first processed into ~70-nucleotided pre-miRNAs by Drosha inside the nucleus. Pre-miRNAs are transported to the cytoplasm by Exportin 5 and are processed into miRNA:miRNA duplexes by Dicer. Dicer also processes long dsRNA molecules into small interfering RNA (siRNA) duplexes. Only one strand of the miRNA:miRNA duplex or the siRNA duplex is preferentially assembled into the RNA-induced silencing complex (RISC), which subsequently acts on its target by translational repression or miRNA cleavage, depending, at least in part, on the level of complementarity between the small RNA and its target. ORF, open reading frame (Cited from 11).

로 된다. 이렇게 만들어진 mature miRNA는 RISC (RNA-induced silencing complex)의 도움으로 target mRNA의 3'-untranslated region (3'-UTR)부분에 완전한 상보적인 결합 또는 부분적으로 여러 개의 염기가 mismatch된 불완전한 형태로 결합하게 되면서 mRNA의 cleavage 또는 translational inhibition을 통해 단백질 합성을 억제하게 된다 (Fig. 1)¹⁰⁻¹⁹⁾

2. 확대되고 있는 miRNAs의 유전자 발현 조절 기능

miRNAs는 유전자 발현을 조절하는 조절자로서 그 기본적인 성질은 단백질의 조절 factor와 유사하며, 여러 가지 기능적인 면에서 효과적으로 작용하여 세포의 특정한 기전을 조절한다. 이와 같은 조절작용을 간단히 설명하면, 첫째, 핵으로부터 나온 pre-miRNA는 Dicer에 의하여 mature한 miRNA를 형성한 후 RISC와 complex를 이루어 target mRNA의 3'-UTR부분을 인지하여 결합한다. 이 때 대부분의 경우 한 두개의 염기가 일치하지 않는 불완전한 형태로 결합이 일어나서 mRNA의 translation을 억제하여 단백질합성을 저해한다. 둘째, 조직이나 세포에서 특정 miRNA의 발현이 요구될 때 신속히 만들어진다. 위에서 언급된 것처럼, translation 이나 post-translation modification의 과정을 거치지 않고 바로 합성이 일어나기 때문이다. 또한 miRNA의 생성이나 분해는 RNA, DNA, 그리고 단백질 보다 매우 cost-efficient 하게 일어난다. 셋째, miRNAs는 알려져 있지 않은 수많은 target molecules들을 가질 수 있다. 이와 같은 특성은 유전자 조절에 보다 많은 가능성과 유연성을 제공해 준다. 마지막으로, miRNA는 그 수적으로나 효과적으로 보아 훨씬 더 scale-up될 것이며, 많은 방법적 수단으로서 유전자조절을 위해 요구되는 가장 단순한 molecule이 될 지도 모른다²⁰⁾. 그러므로 miRNA는 stage-specific 또는 tissue-specific한 발현 pattern을 보일 수 있으며, 수백 개의 miRNA는 세포 분열, 세포 생리 등 세포 내 기전을 풀어 나가는데 실마리를 제공해 줄 것이다. 그리고 miRNA의 예상되는 target과 genomic 상의 위치는 매우 다양하며 흥미롭다. 가장 중요한 것은 miRNA가 chromatin remodeling, gene transcription, RNA processing과 location, translation efficiency, RNA transport, 그리고 RNA stability의 거의 모든 수준에서 유전자 발현을 조절하기 위해

RNA, DNA 그리고 단백질과 상호 작용을 할 수 잠재력을 지니고 있다는 것이다.

3. 다양한 조직에서 특이적으로 발현하는 miRNAs

많은 miRNAs의 발현은 조직 특이적이며 발생/발달단계에서 특이적으로 나타난다. 이들의 조절 기전은 아직 많이 알려져 있지 않다. 조직특이적으로 발현하는 miRNA를 분류해보면, 생쥐의 뇌에서 7개의 miRNAs (miR-9, -124a, -124b, -135, -153, -183, -219), 폐에서 6개의 miRNAs (miR-18, -19a, -24, -32, -130, -213), 비장에서는 miR-189와 miR-212, 간에서는 miR-122a, 심장에서는 miR-208이 각각 존재하는 것으로 보고 되어있다²¹⁻²⁷⁾. 이들은 조직 특이적으로 발현되는 수준이 각각 다를 수 있는데, 생쥐의 뇌, 근육, 신장 그리고 비장에서 풍부하게 발현되는 miRNA는 다른 조직과 비교했을 때 두 배 이상 높은 수준으로 발현되는 것으로 보고되고 있다. 생쥐의 뇌와 근육에 있는 miRNA는 인간의 뇌와 근육에 유사하게 보존되어 있다. 더욱이 그 발현 양상도 매우 유사하게 나타나는데, 예를 들면, 특정 miRNA의 발현이 생쥐 조직에서 높게 나타나는 것은 인간의 조직에서도 그 발현이 높게 나타나고 있어 발현의 양상도 보존성을 가지고 있음을 알 수 있다. 이처럼 동물기관의 조직이나 또는 세포에 존재하는 miRNAs는 발생과정의 조절을 밝히는데 그 가능성을 제공해 준다^{28, 29)}. 뿐만 아니라, 뇌에서 발현되는 특정 miRNAs (miR-7, -124a, -124b, -125a, -125b, -128, -135, -137, -139, -153, -149, -190, -219)는 생쥐와 인간의 다른 조직에서도 발현되고 있다. 이것은 한 개의 miRNA가 여러 기관이나 조직에서 발현 되고 있음을 알 수 있다. 그러나 기능이 같은지는 알려져 있지 않다. miRNAs의 조직 특이적 발현에 따른 이들의 기능이 밝혀진다면 포유동물에서 신경세포의 발달과 분화에 관여하는 조절 기전을 이해하는데 도움이 될 것이다.

4. 인간과 생쥐의 배아줄기세포에서 특이적으로 발현하는 miRNAs

Small RNA연구의 진보에 따라 miRNAs가 발달과 분화에 중요한 조절인자로서 작용하고 있다는 것을 알게 되었으며, miRNAs 기능에 대한 우리의 이해는 이미 선충류에서 발견된 miRNA인 *lin-4*³⁰⁻³³⁾와 *let-7*³³⁾의 발생 조절에 대한 연구로부터 시작되었다. 초파리

참 고 문 헌

- 1) Ambros V : The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**:350-355, 2004
- 2) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V : The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**:843-854, 1993
- 3) Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V : Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Developmental Biology* **259**: 9-18, 2003
- 4) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, and Tuschl T : Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**:853-858, 2001
- 5) Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP : An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**:858-862, 2001
- 6) Lee RC, Ambros V : An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**: 862-864, 2001
- 7) Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G : miRNPs : a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & Development* **16**:720-728, 2002
- 8) Sempere LF, EB Dubrovsky, Berger EM, Ambros V : The expression of the *let-7* small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **244**:170-179, 2002
- 9) Tuschl T : RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* **2**:239-245, 2001
- 10) Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D : MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* **13**:807-818, 2003
- 11) He L, Hannon GJ : MicroRNAs : small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews* **5**:522-531, 2004
- 12) Hutvagner G, Zamore PD : A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**:2056-2060, 2002
- 13) Lai EC : microRNAs : runts of the genome assert themselves. *Curr Biol* **13**:R925-936, 2003
- 14) Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN : MicroRNA maturation : stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* **21**: 4663-4670, 2002
- 15) Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN : The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**:415-419, 2003
- 16) Guttinger LE, Calado SA, Dahlberg JE, Kutay U : Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**:95-98, 2004
- 17) Ma ZL, Yang HY, Tien P : [Progress of miRNA and its functions in eukaryotes]. *Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica* **30**:693-696, 2003
- 18) McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, Sharp PA : Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* **8**:842-850, 2002
- 19) Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD : Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**:199-208, 2003
- 20) Ke XS, Liu CM, Liu DP, Liang CC : MicroRNAs : key participants in gene regulatory networks. *Curr Biol* **7**:516-523, 2003
- 21) Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP : MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**:83-86, 2004
- 22) Houbaviv HB, Murray MF, Sharp PA : Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Developmental Cell* **5**:351-358, 2003
- 23) Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS : A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* **9**:1274-1281, 2003
- 24) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T : Identification of tissue-specific miRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**:735-739, 2002
- 25) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T : New microRNAs from mouse and human. *RNA* **9**:175-179, 2003
- 26) Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V : Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology* **5**:R13, 2004
- 27) Smalheiser NR : EST analyses predict the existence of a population of chimeric miRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. *Genome Biology* **4**: 403, 2003
- 28) Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, Rougvie AE : The

- Caenorhabditis elegans hunchback-like gene lin-57/hbl-1 controls developmental time and is regulated by miRNAs. *Developmental Cell* **4**: 625-637, 2003
- 29) Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T: The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental Cell* **5**:337-350, 2003
- 30) Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology* **227**:271-278, 2000
- 31) Olsen PH, Ambros V: The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology* **216**:671-680, 1999
- 32) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**:843-854, 1993
- 33) Wightman B, Ha I, Ruvkun G: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**:855-862, 1993
- 34) Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM: Bantam encodes a developmentally regulated miRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* **113**:25-36, 2003
- 35) Aukerman MJ, Sakai H: Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell* **15**:2730-2741, 2003
- 36) Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MiRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**:83-86, 2003
- 37) Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC: Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell* **14**:1605-1619, 2002
- 38) Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D: Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257-263, 2003
- 39) Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP: Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**:513-520, 2002
- 40) Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T: The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Developmental Cell* **5**:337-350, 2003
- 41) Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G: Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* **9**:180-186, 2003
- 42) Grad Y, Aach J, Hayes GD, Reinhart BJ, Church GM, Ruvkun G, Kim J: Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Molecular Cell* **11**:1253-1263, 2003
- 43) Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X: CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **12**: 1484-1495, 2002
- 44) Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim KS: Human developmental cell embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental Cell Biology* **270**:488-498, 2004