

마이크로 RNA (microRNA) 생성 조절 및 세포 내 다른 경로와의 연계

이 재 욱

(주)로제타엑소좀

E-mail: jaewook8@postech.ac.kr

요약문

마이크로 RNA (microRNA, miRNA)는 짧은 non-coding RNA로서 표적 유전자의 mRNA에 직접 붙어 그 유전자의 발현을 억제한다. miRNA는 전구체로 전사되었다가 Drosha와 Dicer의 작용으로 잘린다. 이어서 miRNA는 Argonaute (AGO)에 붙어 RNA-induced silencing complex (RISC)를 형성하는데 이 과정을 "RISC 로딩"이라고 한다. miRNA의 전사, Drosha 및 Dicer의 작용, RISC 로딩은 miRNA 생성에 있어 중요한 과정이고, 추가로 다양한 인자들이 이러한 과정을 촉진하거나, 돕거나, 억제한다. 최근의 연구를 통해 조절 인자들이 개별 miRNA가 처리되는 과정뿐만 아니라 miRNA 생성과 세포 내 다른 경로를 연결함이 밝혀졌다. 예를 들어 단백질 인산화는 miRNA 생성과 다양한 신호 전달 경로를 연결하고, 이러한 변화는 대개 질병과 연관된다. 더 나아가, 모든 miRNA가 전형적인 처리 경로를 거치는 것은 아니며, 비전형적인 miRNA 처리 경로들이 최근 많이 밝혀지고 있다.

Key Words: miRNA, Drosha/Dicer, RISC 로딩, 신호 전달 경로

본 자료는 Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 5-20 (2019). 의 논문을 한글로 번역, 요약한 자료입니다.

목 차

1. 서론
2. 전형적인 miRNA 생성 개괄
3. miRNA 처리의 분자적 기반
 - 3.1. Pri-miRNA의 서열 및 구조적 특징
 - 3.2. 마이크로 처리기
 - 3.3. Dicer와 결합
 - 3.4. RISC 로딩

4. 전형적인 생성 인자의 번역 후 수정
 - 4.1. 인산화
 - 4.2. 유비퀴틴화와 SUMO화
5. 전사 중 및 전사 후 조절
 - 5.1. LIN28 매개 조절
 - 5.2. RNA 결합 단백질 및 non-coding RNA 매개 조절
6. 비전형적인 miRNA 생성
 - 6.1. 마이크로 처리기와 독립적인 miRNA 생성
 - 6.2. Dicer와 독립적인 miRNA 생성
7. 잘못된 miRNA 생성의 여파
8. 결론 및 전망

1. 서론

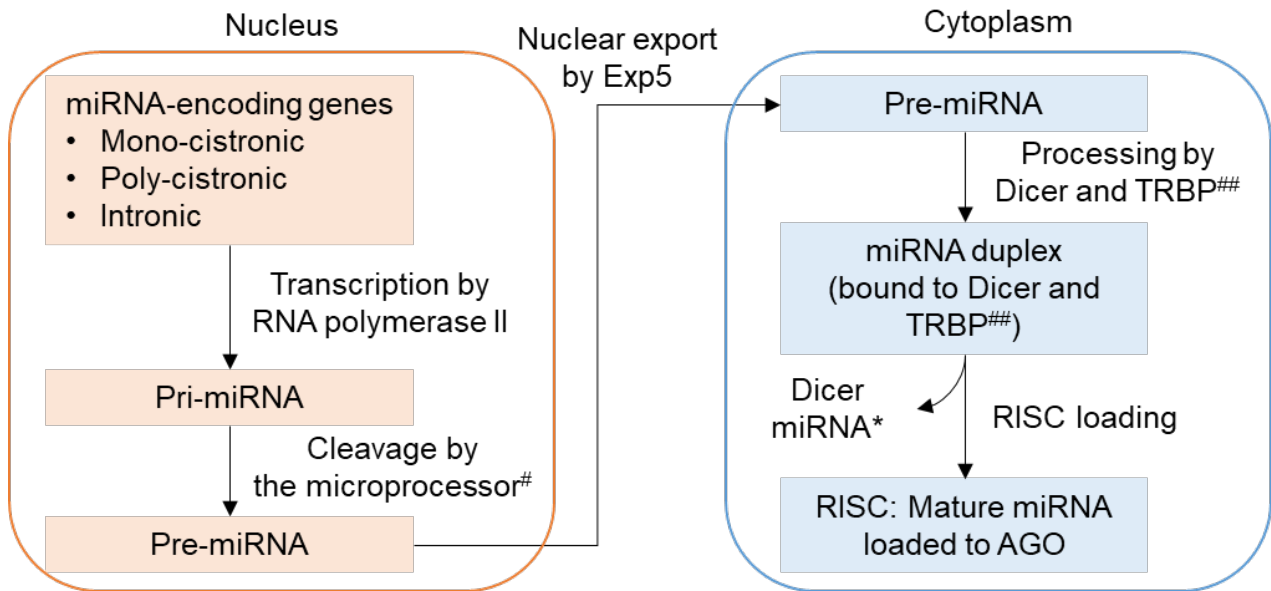
마이크로 RNA (microRNA, miRNA)는 1990년대 초반에 발견되었지만 유전자 조절에 있어 근본적인 역할을 담당한다는 사실이 인지되기까지 거의 10년이 걸렸다. 현재는 거의 모든 진핵 생물이 miRNA를 발현하며, miRNA의 기능과 생성에 대해서 많은 부분이 규명되었다. miRNA 발현에 문제가 생기는 것은 암과 신경 질환을 비롯한 여러 질환과 관련이 있음이 입증되었고, miRNA 저해제를 이용한 치료제도 개발되고 있다.

이 리뷰에서는 miRNA 생성에 대해 현재까지 알려진 것을 요약하고, 새롭게 알려진 사실과 아직까지 남아있는 의문들을 강조할 것이다. 우선 효율적인 miRNA 처리를 위해 중요한 miRNA의 서열 특징과 miRNA를 생성하는 기작에 대한 구조적 통찰에 집중할 것이다. 그 다음, miRNA와 세포 신호 전달 경로를 연결하는 miRNA 생성 인자들의 번역 후 수정(post-translational modifications)에 대해 논의할 것이다. 또한 RNA 결합 단백질과 miRNA 처리 중간체와의 상호 작용에 대해 논의할 것이다. 마지막으로 비전형적인 miRNA 생성 경로와 miRNA 처리 인자에 생긴 돌연변이와 관련된 질병들에 대해 이야기할 것이다.

2. 전형적인 miRNA 생성 개괄

동물에서 miRNA는 전형적으로, 다음과 같이 생성된다 (**그림 1**). 동물의 miRNA는 개별 유전자, 유전자 클러스터 또는 인트론에 암호화되어 있다. RNA 중합효소 II(RNA polymerase II)가 1차 miRNA (primary miRNA, pri-miRNA)를 합성하며, pri-miRNA는 헤어핀(hairpin) 구조와 5'-말단과 3'-말단에 측면 서열(flanking sequences)을 갖고 있다. "마이크로 처리기(microprocessor)"라는 핵 단백질 복합체가 pri-miRNA를 헤어핀 형태의 miRNA 전구체(precursor miRNA, pre-miRNA)로 처리한다.

마이크로 처리기는 RNase III 활성이 있는 Drosha와 이중 가닥 RNA (dsRNA) 결합 단백질인 DiGeorge critical region 8 (DGCR8)과 여러 보조 인자들로 구성되어 있다. 그 다음 pre-miRNA는 exportin 5 (Exp5)에 붙어 세포질(cytoplasm)로 이동하며, 세포질에서 RNase III 류 효소인 Dicer가 pre-miRNA를 처리하여 pre-miRNA의 줄기 부분을 절단해 miRNA 이합체(miRNA duplex)를 만든다. 마지막으로 Dicer에 붙은 miRNA duplex는 Argonaute (AGO)와 상호작용하는데, 이러한 과정을 "RNA-induced silencing complex (RISC) 로딩"이라고 한다. RISC 로딩 과정에서 AGO는 miRNA duplex 중 하나의 가닥을 선택해 최종 miRNA (mature miRNA, guide strand)로 처리하고, 다른 가닥 (miRNA*, passenger strand)은 사용하지 않는다. Mature miRNA가 로딩된 AGO는 Dicer에서 떨어지며 RISC를 형성한다. 한편 최근에는 miRNA 생성에서 Drosha, Dicer, Exp5의 역할이 재조명받고 있는데, 이들 각각을 비활성화해도 miRNA가 완전히 사라지지 않는다는 점에서 miRNA 생성이 생각보다 매우 복잡한 과정이라는 것을 알 수 있다.



#The microprocessor consists of a DiGeorge critical region 8 (DGCR8) dimer and of Drosha.
 ##TRBP: *trans*-activation-responsive *RNA*-binding protein

그림 1. 전형적인 miRNA 생성 과정.

RNA 중합 효소 II(RNA polymerase II)가 1차 miRNA (pri-miRNA)를 합성하면, 핵 내에서 "마이크로 처리기 (microprocessor)"라는 핵 단백질 복합체(Drosha, DiGeorge critical region 8 (DGCR8) 등으로 구성)가 pri-miRNA를 miRNA 전구체(precursor miRNA, pre-miRNA)로 처리한다. 그 다음 pre-miRNA는 exportin 5 (Exp5)에 붙어 세포질로 이동하고, 세포질에서 Dicer가 pre-miRNA를 절단하여 miRNA 이합체(miRNA duplex)로 만든다. 그 다음 RNA-induced silencing complex (RISC) 로딩 과정을 통해 Argonaute (AGO)와 상호작용하여 최종 miRNA (mature miRNA)가 선택되고 mature miRNA는 AGO에 로딩되고 Dicer에서 떨어지고, mature RNA가 아닌 다른 가닥(miRNA*)도 떨어지면서 RISC를 형성한다.

3. miRNA 처리의 분자적 기반

앞서 언급했듯이, miRNA는 전구체 내부의 헤어핀으로부터 처리된다. 효율적인 처리는 서열 요소(sequence elements)와 국지적 RNA 구조에도 영향을 받는다. 이 부분에서는 pri-miRNA와 pre-miRNA가 인지되고 절단하고 RISC 로딩되는 과정의 분자 기반에 대해 논의할 것이다.

3.1. Pri-miRNA의 서열 및 구조적 특징

Pri-miRNA의 줄기-고리 구조(stem-loop structure) 외에도 miRNA 처리에 관여하는 다양한 서열 특징들이 규명되었다. 우선 양 옆에 적어도 9개의 짝지어지지 않는 뉴클레오타이드가 있는 줄기 부분의 11개 염기쌍(basepair)은 마이크로 처리기가 pri-miRNA를 처리하는데 중요하다. 더 나아가, Drosha와 serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3)는 줄기 부분 끝 주변의 UG 모티프(motif)와 3'-방향 서열의 CNNC 모티프에 붙어 마이크로 처리기가 pri-miRNA를 절단하는 것을 촉진한다. 또한 인간 miRNA의 고리 부분에 있는 UGUG 또한 pri-miRNA 처리를 촉진한다. 이 과정에서 줄기가 35개의 뉴클레오타이드로 이뤄진 것이 이상적이며, 짝이 맞지 않는 GHG 모티프(H = A, C 또는 U)도 pri-miRNA를 효율적으로 처리하기 위해 중요한 서열 특징이다.

Pri-miRNA 전사체는 3차 구조(tertiary structure)를 형성할 수 있다. 이러한 3차 구조는 동적 이어서 예측과 분석이 어렵지만, 구조 탐색(structure probing)의 발전으로 일부 pri-miRNA의 3차 구조 형성을 확인할 수 있었다. Pri-miR-17-92 (6개의 miRNA를 형성하는 기반이 됨)는 조밀한 구형 구조를 형성하여 용매에 노출되는 부분과 노출되지 않는 부분을 가질 수 있는데, 결과적으로 각각의 miRNA들이 마이크로 처리기에 대한 접근성에 따라 차례로 처리될 수 있게 된다. 또한 카포시 육종 헤르페스 바이러스(Kaposi's sarcoma herpesvirus)의 pri-miRNA 전사체는 12개의 바이러스 miRNA를 암호화하는데, 복잡한 3차 구조를 형성하고 마이크로 처리기에 대한 접근성이 각각의 miRNA의 발현 정도와 관련이 있다.

마이크로 처리기의 처리에 영향을 주는 또 다른 구조는 G-사합체(G-quadruplexes)로, G-사합체는 4벌의 구아닌 염기들로 이뤄진 나선 구조이다. G-사합체를 형성하는 서열에서 하나의 점 돌연변이(single point mutation)가 발생하면 pri-miRNA의 국소 구조에 변화가 생겨 처리 효율에 영향을 준다. Pri-miRNA의 3차 구조의 동역학을 체계적으로 분석하는 것은 miRNA 생성과 발현의 새로운 특징들을 규명하게 할 것이다.

3.2. 마이크로 처리기

초기에 Drosha-DGCR8 복합체의 구조에 대한 연구는 'DGCR8 단일체(monomer)가 pri-miRNA에 붙어서 분자 지지대(molecular anchor)로 기능하며, pri-miRNA 줄기부터 절단 위치의 길이를 측정하는 것'이라고 제안하였다. 하지만, 최근의 연구에는 이러한 시각을 수정하게 했다. 우선 DGCR8은 이중체(dimer)로 작용하며, 이중체의 형성은 헴(haem)이 붙으면서 촉진된다. DGCR8에 있는 헴 결합 도메인은 RNA와 상호 작용하며, 마이크로 처리기가 완전히 기능하기 위해 필요하다. 마

이므로 처리기에서의 험 보조 인자의 기능은 명확하지 않지만, 구조 요소로 작용하여 DGCR8이 활성 있는 형태를 취하게 할 가능성이 있다. 한편 인간 마이크로 처리기에 대한 분석을 통해 활성 있는 마이크로 처리기는 하나의 Drosha와 두 개의 DGCR8로 이뤄진 364 kDa의 복합체인 것이 규명되었다. 마이크로 처리기에서 Drosha는 pri-miRNA의 UG 모티프를 인정한 뒤 단일 가닥 RNA-이중 가닥 RNA의 교차점(기저 위치)에 붙어서, pri-miRNA 말단을 결정하는데 중요한 pri-miRNA 절단 위치의 길이를 측정한다. DGCR8은 효율적이고 정확한 pri-miRNA 절단에 필요한 UGU 모티프를 인정한 뒤 pri-miRNA 헤어핀의 고리 부분에 붙는다.

이 모델은 최근에 DGCR8에서 유래한 2개의 알파 나선과 Drosha의 복합체에 대한 구조 규명으로 확인되었다. Drosha에는 N-말단에 프롤린(proline)과 아르기닌(arginine)이 많은 별다른 구조를 형성하지 않는 부분이 있고, 이어서 중앙 도메인(플랫폼 도메인과 P element-induced wimpy testes (PIWI)-Argonaute-Zwille (PAZ) 유사 도메인으로 구성)과 2개의 RNase III 도메인이 있으며, C-말단에는 이중 나선 RNA와 결합하는 도메인이 있다. 구조 규명을 통해 2개의 RNase III 도메인이 분자 내 이중체(intramolecular dimer)로서 촉매 중심(catalytic centre)을 형성하며, 각각의 RNase III 도메인은 DGCR8에서 유래한 알파 나선 각각과 결합하여 Drosha 하나가 DGCR8 2개와 결합한다는 것이 입증되었다. 한편 구조 규명을 통해 pri-miRNA에서 기저 위치부터 절단 위치까지의 길이를 측정하는 모델이 제안되었다. Drosha가 가지고 있는 Bump 나선은 pri-miRNA 줄기의 기저 위치에 붙어 기저 위치에서 절단 위치 사이의 이중 나선 RNA의 길이를 11 bp로 제한함으로써 분자 줄자(molecular ruler)로 기능하여 Drosha가 절단하는 위치를 규정한다.

3.3. Dicer와 결합

Dicer의 주요 기능은 pre-miRNA를 짧은 이중 나선 miRNA 중간체로 처리하는 것이다. Dicer에는 N-말단에 RNA helicase 도메인이 있고, 이중 나선 RNA 결합 도메인, 플랫폼 도메인, PAZ 도메인이 있으며, 뒤이어 2개의 RNase III 도메인과 C-말단의 이중 나선 RNA 결합 도메인이 있다. Dicer의 촉매 기능은 2개의 RNase III 도메인이 담당하는데 이들은 분자 내 이중체를 형성하여 각 RNase III 도메인이 이중 나선 RNA를 한 가닥씩 잘라낸다.

Dicer를 전자 현미경으로 관찰한 결과, 전체적으로 L자 형태를 갖고 있으며, PAZ 도메인-플랫폼 도메인-2개의 RNase III 도메인이 한 줄로 늘어선 RNA helicase 도메인이 가지처럼 뻗어 나간다는 것을 알 수 있었다. Dicer가 pre-miRNA에 붙으면 구조 재정렬이 일어나 비생산적 형태에서 생산적 형태로 변화한다. Dicer의 RNA helicase 도메인은 pre-miRNA의 고리 구조에 붙고, PAZ 유사 도메인은 pre-miRNA의 3'-말단에 붙는다. PAZ 유사 도메인 내에는 주머니 구조가 있어서 pre-miRNA의 3'-말단에 돌출된 2개의 뉴클레오타이드가 들어갈 수 있고(3'-말단 주머니), 플랫폼 도메인에도 주머니 구조가 있어서 5'-인산이 들어갈 수 있다(5'-말단 주머니). 재미있게도 Dicer는 2가지 크리스탈 구조를 가지고 있는데, 하나는 pre-miRNA의 양 끝이 각각의 주머니 구조에 들어가는 것이고, 다른 하나는 Dicer 특이적 고리가 5'-말단 주머니로의 접근을 막아 miRNA의 나선을 Dicer로부터 멀어지게 하는 구조이다. 앞서 말한 첫 번째 구조는 pre-miRNA가 절단되기 쉽게 고리 구조가 RNase III 도메인으로 가까워지는 구조이며, 두 번째 구조는 절단 후 나온 결과물이 떨어져 나오기 쉬운 구조이다.

한편 Dicer는 이중 나선 RNA 결합 단백질인 trans-activation-responsive RNA-binding protein (TRBP)과 함께 pre-miRNA를 처리하는데, TRBP는 세 개의 이중 나선 RNA 결합 도메인을 가지고 있다. 두 개의 이중 나선 RNA 결합 도메인은 이중 나선 pre-miRNA와 결합하고, 나머지 하나는 Dicer의 RNA helicase 도메인과 직접 상호 작용하는데 그 결과 TRBP가 Dicer에 고정된다. 한편 또 다른 이중 나선 RNA 결합 단백질인 adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1)은 Dicer와 상호 작용하여 Dicer의 절단 활성을 촉진하고 miRNA가 RISC 로딩되는 것을 용이하게 한다.

3.4. RISC 로딩

Dicer가 pre-miRNA를 절단하여 만든 짧은 이중 나선 RNA는 RISC 로딩을 통해 AGO로 이동한다. AGO는 N-말단 도메인, PAZ 도메인, MID 도메인 그리고 PIWI 도메인으로 구성되어 있다. Dicer가 처리한 결과물이 AGO로 전달된다는 직접적인 증거는 Dicer, TRBP, AGO가 안정적인 복합체를 구성하여 pre-miRNA 처리와 AGO 로딩을 가능하게 한다는 것을 발견하면서 확보하게 되었다. 이후 이 복합체는 "RISC 로딩 복합체(RISC loading complex, RLC)"로 명명되었고, TRBP가 절단된 이중 나선 RNA에 유연하게 붙어 AGO로 전달하는 것을 돕는다는 것이 밝혀졌다.

전자 현미경 밀도 지도(electron microscopy density maps)로 확인해보면 AGO는 pre-miRNA가 절단되기 이전의 위치와 비슷한 위치를 차지하는데, 이는 이중 나선 miRNA가 Dicer에서 AGO 단백질로 직접 옮겨진다는 것을 뒷받침한다. AGO의 PAZ 도메인은 새로 형성된 3'-말단 돌출부와 가까워지고, Dicer의 PAZ 도메인은 이중 나선 RNA의 반대편에 있는, 2개의 뉴클레오타이드로 구성된 3'-말단 돌출부에 붙는다. 이후 mature miRNA가 되는 가닥의 5'-말단은 AGO의 MID 도메인에 붙고, miRNA*는 제거된다. 일반적으로 5'-말단이 덜 안정적으로 쌍을 이루고 있는 가닥이 mature miRNA로 선택되는데, 이러한 사실은 가닥 선택에 있어 온도가 중요한 역할을 한다는 것과 일맥상통한다. 따라서 열역학적으로 덜 안정적인 말단은 이미 생리학적 온도에서 부분적으로 열려있고, AGO의 N-말단 도메인은 이러한 열린 부분을 안정화시킬 수 있다. 따라서 MID 도메인은 mature miRNA의 5'-말단을 고정할 수 있다. 이 모델에서 AGO는 자체적으로 miRNA 이합체의 비대칭성을 인식할 수 있다.

miRNA가 로딩될 때 AGO는 여러 종류의 형태로 변화한다: 1) miRNA가 없는 'apo' 상태; 2) 이중 나선 miRNA 중간체가 붙어 있는 pre-RISC 상태; 3) RISC의 일부로서 mature miRNA가 안정적으로 붙어 있는 상태. AGO가 'apo' 상태에 있을 때는 heat shock protein 90과 co-chaperone이 붙어서 안정화시킨다. AGO가 'apo' 상태일 때는 에너지 준위가 높고, mature miRNA가 붙을 때는 에너지 준위가 낮는데 이러한 에너지 준위 변화가 AGO에 mature miRNA가 로딩되는데 필요한 에너지를 제공할 것이다.

이전의 처리 과정과 마찬가지로 효율적인 RISC 로딩은 RNA의 여러 특성에 따라 영향을 받는다. 일반적으로 염기쌍 상태, 5'-말단 인산기의 존재 여부, 5'-말단의 뉴클레오타이드의 종류는 miRNA가 RISC 로딩될 때 품질 관리 확인점이 될 수 있다. 추가로, pre-miRNA의 줄기 구조도 Dicer에서 AGO로 넘어가는 과정에 영향을 준다. 짝이 맞지 않는 줄기는 Dicer에서 AGO로 넘어가는 효율이 떨어지는데, 특정 위치에서 짝이 맞지 않는 것은 다른 효과를 보여 RISC 로딩을 촉진할 수도 있다. 기작은 명확하게 규명되지 않았으나, 원치 않는 줄기 구조가 Dicer에서 AGO로 넘어갈 때 필요한 단백질 간 접촉을 저해할 가능성이 있다.

4. 전형적인 생성 인자의 번역 후 수정

다양한 종류의 miRNA는 세포 종류 및 세포 상태에 특이적으로 유전자 발현 패턴을 갖추는데 도움을 준다. 결과적으로 세포 외부 자극에 따른 전사체(transcriptome)를 바꾸기 위해서 miRNA 활성을 조절하는 것이 필요하다. 번역 후 수정을 통한 miRNA 처리 기작을 조절하는 방법으로 miRNA 활성을 조절할 수 있다.

4.1. 인산화

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호 전달은 miRNA 생성에 영향을 준다. DGCR8은 상당 부분 인산화(phosphorylation)되어 있는데, 이러한 인산화는 마이크로 처리기의 활성과 miRNA 농도를 증가시킨다. 또한 MAPK extracellular signal-related kinase (ERK)는 TRBP를 인산화 시켜 Dicer-TRBP 복합체를 안정화시키고 miRNA 생성을 촉진한다. 한편, ERK와 mammalian target of rapamycin (mTOR)는 ribosomal protein S6 kinase를 활성화시켜 TRBP를 인산화하기도 하는데, 여러 신호 전달 경로에서 신호 입력이 통합되는 것을 알 수 있다.

스트레스 유도 경로들은 MAPK p38을 활성화시킬 수 있다. 스트레스 상황에서 p38은 Drosha를 인산화하여 Drosha가 DGCR8과 상호 작용하는 것을 저해하고, Drosha가 핵에서 빠져나와 분해되도록 하여 세포 사멸을 증가시킨다. 또한 p38이 활성화시키는 MAPK-activated protein kinase 2는 마이크로 처리기의 보조 요소인 p68을 인산화하여 특정 pri-miRNA의 처리를 증가시킨다. 한편 tyrosine-protein kinase인 Abelson murine leukemia viral oncogene kinase (ABL)는 DGCR8을 인산화 시키고 miRNA 처리를 증가시키는데, 이는 DNA 손상 반응의 일부에 속한다.

Drosha에 영향을 주는 또 다른 신호 전달 경로로 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)가 있다. GSK3 β 는 글리코겐 대사와 관련 있고, 세포 주기 진행, 세포 분열, 염증을 촉진한다. GSK3 β 는 Drosha의 세린(serine) 300번과 302번을 인산화하여 Drosha의 활성을 증가시킨다.

RISC 로딩 과정에서 특정한 종류의 miRNA가 AGO와 붙는 것도 인산화의 영향을 받는다. 저 산소(hypoxic) 조건에서 epidermal growth factor receptor (EGFR)은 AGO 중 하나인 Ago2의 티로신(tyrosine) 393번을 인산화시켜 Ago2가 RISC 로딩 과정에서 Dicer와 상호작용하는 것을 억제하고, 결과적으로 특정 miRNA의 생성을 억제한다. 한편 큰 고리 구조를 가진 pre-miRNA가 이러한 영향을 더 많이 받는데, 이들 대부분이 암 억제 기능을 가진 걸 보면 EGFR이 암 유발 효과를 가짐이 뒷받침된다. 실제로, Ago2의 티로신 393번이 인산화되는 것은 유방암 환자의 낮은 생존율과도 관련이 있다.

4.2. 유비퀴틴화와 SUMO화

miRNA 생성 경로와 mammalian target of rapamycin (mTOR) 간의 연계는 최근에 보고되었다. mTOR는 세포 내 에너지 상태를 인지하여 환경 변화에 반응해 세포 대사를 조절하며, 암에서 활성이 증가하는 경우가 많다. mTOR는 p53 저해제인 E3 유비퀴틴-단백질 연결 효소(ubiquitin-protein

ligase) mouse double minute 2 homologue (MDM2)의 농도를 높이는데, MDM2는 Drosha의 E3 유비퀴틴 연결 효소(ubiquitin ligase)로 작용하여 프로테아좀(proteasome)이 Drosha를 분해하여 miRNA 처리를 줄이게 한다. 결과적으로 암에서는 miRNA 농도가 저하된 경우가 많다.

SUMO화(SUMOylation)도 miRNA 생성 인자의 조절과 관련 있다. DGCR8은 특정 라이신(lysine)에서 SUMO화되는데, 이러한 SUMO화는 DGCR8의 유비퀴틴화와 분해를 막는다. ERK 매개 인산화는 DGCR8이 SUMO화되고 안정화되는 것을 촉진할 수 있다. TRBP에서 확인되는 SUMO화는 TRBP가 AGO에 붙는 것을 촉진해 RISC 로딩을 증가시킨다.

5. 전사 중 및 전사 후 조절

RNA 결합 단백질은 광범위한 전사 후 조절을 매개하며, miRNA 처리 및 처리된 miRNA가 RISC 로딩되는 데에도 영향을 준다. 더 나아가, RNA 결합 단백질은 다양한 RNA 경로 간의 연계를 촉진하여, miRNA 처리를 전사와 함께 조절될 수 있게 한다.

5.1. LIN28 매개 조절

miRNA 생성을 조절하는 RNA 결합 단백질 중 대표적인 것이 lin-28 homologue A (LIN28A)이다. LIN28A는 줄기세포에서 분화를 유도하는 let-7 miRNA의 발현을 억제한다. LIN28A는 하나의 cold shock domain과 2개의 zinc-finger domain을 가지고 있고, 이들 도메인은 pre-let-7-miRNA의 말단 고리의 서열이나 2차 구조에 붙는다. LIN28A는 세포질에서 pre-let-7-miRNA에 붙어서 terminal uridyl transferase (TUT) 중 하나(TUT4 또는 TUT7)를 불러와 let-7 miRNA이 발현을 효율적으로 억제한다. TUT4나 TUT7은 pre-let-7-miRNA의 3'-말단에 여러 개의 우라실(uracil)을 붙여(oligo(U)를 붙임) Dicer가 pre-let-7-miRNA를 처리할 때 Drosha가 생성한 3'-말단에 돌출된 2개의 뉴클레오타이드를 인지하는 것을 저해한다. Oligo (U)가 pre-let-7-miRNA의 3'-말단에 붙으면 DIS3-like exonuclease 2(DIS3L2)가 oligo(U)가 붙은 pre-let-7-miRNA를 분해한다. DIS3L2는 깔때기 같은 구조를 형성하여 oligo(U)가 붙은 pre-let-7-miRNA가 축대 중심으로 이동하게 하고, 해당 구조는 oligo (U)를 특이적으로 인지한다. 대략 12개의 우라실이 붙어야 활성 부분(active site)에 도달하는데, 이는 TUT4나 TUT7이 pre-let-7-miRNA의 3'-말단에 붙이는 우라실의 개수와 비슷하다.

TUT4와 TUT7은 pre-let-7-miRNA를 비롯해 여러 pre-miRNA의 3'-말단에 우라실 하나만을 붙일 수도 있다. 체세포(somatic cell)처럼 LIN28A가 없는 경우 여러 pre-miRNA에서 3'-말단에 돌출된 뉴클레오타이드가 1개뿐인 경우도 있다. Pre-miRNA의 3'-말단 돌출부에 1개의 뉴클레오타이드만 있는 것은 Dicer의 이상적인 기질이 아니기 때문에 TUT4, TUT7, TUT2가 pre-miRNA의 3'-말단 돌출부에 우라실 하나를 덧붙여 Dicer가 처리하는데 이상적인 형태로 만들어준다. 더 나아가, TUT4와 TUT7은 원래 LIN28A interacting module (LIM)을 갖고 있어 LIN28A가 있을 때 TUT-LIN28A-pre-let-7-miRNA 복합체를 안정적으로 형성해 여러 개의 우라실을 붙이는데, LIN28A가 없으면 하나의 우라실만 붙이고 pre-let-7-miRNA가 TUT4나 TUT7에서 떨어져 나간다.

한편 LIN28A와 달리 LIN28B는 체세포에서 발현하며 핵 내부에 존재한다. LIN28B는 pri-let-7-miRNA를 인지해 마이크로 처리기에 들어가지 못하게 한다. 따라서 LIN28A와 LIN28B는 let-7 miRNA의 발현을 다른 방법으로 억제한다.

5.2. RNA 결합 단백질 및 non-coding RNA 매개 조절

Pri-miRNA와 pre-miRNA가 전사 후 조절되는 것은 일반 조직과 질병에서 광범위하게 일어난다. RNA 결합 단백질은 miRNA 발현을 조절하여, 증가시키거나 감소시킬 수 있으며, miRNA 생성의 모든 과정에 관여한다. RNA 결합 단백질 중 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1(hnRNPA1)은 miR-18a와 특이적으로 상호 작용하여 pri-miR-18a의 구조를 변화 시켜 Drosha의 접근성을 높이는 방법으로 마이크로 처리기를 통한 처리를 촉진한다. 한편 hnRNPA1은 말단 고리에 붙는 방법으로 let-7a-1의 발현을 저해하는데, 해당 말단 고리는 hnRNPA1이 없을 때는 KH-type splicing regulatory protein이 인지하여 let-7a의 처리를 촉진한다. Pri-miRNA나 pre-miRNA에 결합하는 다른 단백질로는 Y-box-binding protein 1, TAR DNA-binding protein 43, RNA-binding protein Musashi homologue 2 등이 있다.

최근에는 70개 이상의 pri-miRNA 헤어핀을 분석하여 RNA 결합 단백질과의 잠재적 상호 작용을 분석한 연구가 있다. Pri-miRNA 헤어핀에 붙는 단백질을 분리하여 질량분석기로 분석한 결과 180개의 잠재적 RNA 결합 단백질이 발견되었고 이들 중 상당수는 헤어핀의 단일 가닥 영역과 결합한다고 알려진 모티프를 갖고 있었다. 또한, 기능 검증 실험에서 여러 zinc-finger protein과 CUGBP Elav-like family member 1, Pumilio homologue 1 등 스플라이싱(splicing) 조절인자들의 조절 역할이 규명되었다. 이러한 발견들은 많은 RNA 결합 단백질들이 miRNA 처리 중간체와 상호 작용할 잠재성이 있다는 것을 보여주며, miRNA 양과 기능을 광범위하게 조절할 수 있다는 것을 보여준다.

일련의 연구에서 밝혀진 재미있는 사실은 mRNA 처리와 관련된 여러 필수 RNA 결합 단백질들이 miRNA 처리 중간체와도 상호 작용한다는 것이다. 이는 mRNA와 miRNA의 생성이 연계되어 있고 RNA 결합 단백질들이 '전사체 연결 허브'로 작용한다는 것을 의미한다. 전사체 연결 허브는 유전자 클러스터에서 유래하는 특정 miRNA가 발현할 때 필수적일 수 있는데, 이 경우에는 전사와 관련된 RNA 결합 단백질들이 마이크로 처리기의 활성을 촉진 또는 저해할 수 있다. 또한 인트론에서 유래하는 miRNA를 처리하는 것도 pre-mRNA 스플라이싱과 관련 있을 수 있다. 따라서 miRNA가 전사될 때 연관된 mRNA의 전사는 필요 없을 수 있고, mRNA가 전사될 때 연관된 miRNA의 전사가 필요 없을 수도 있지만, 전사체 연결 허브가 이러한 작용을 조절할 수 있다. miRNA 처리는 전사와 함께 일어나고 스플라이싱과 밀접하게 연관되어 있다. 또한 Drosha가 pri-miRNA를 절단하는 것은 pri-miRNA의 전사 종료와 연관되어 있는데 pri-miRNA 전사와 처리의 연계를 알 수 있다.

RNA 결합 단백질들은 RISC 로딩을 조절하기도 한다. 예를 들어 TAR DNA-binding protein 43(TDP43)은 선택적으로 근육 특이적 miR-1과 miR-206이 RISC 로딩되는 것을 억제한다. TDP43은 근위 축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)과 연관되어 있기 때문에, RISC 로딩의 결함은 이 질병의 발병에 기여할 수도 있다. 한편, hnRNP D0은 let-7b와 강하게 결합하여 RISC 로딩되는 것을 돕기도 한다. 이러한 예시들은 RISC 로딩 단계에서 miRNA 생성에 영향을 주는 광범위한 조절 네트워크의 존재를 시사한다.

RNA 결합 단백질에 덧붙여, long non-coding RNA도 miRNA 생성을 조절한다. 예를 들어 retinal non-coding RNA 4는 생쥐의 망막 발달에 있어 miR-183-92-182 클러스터의 발현을 촉진한다.

6. 비전형적인 miRNA 생성

앞서 언급된 전형적인 miRNA 생성 기작과 더불어, 비전형적인 miRNA 생성의 여러 기작도 알려져 있다 (그림 2).

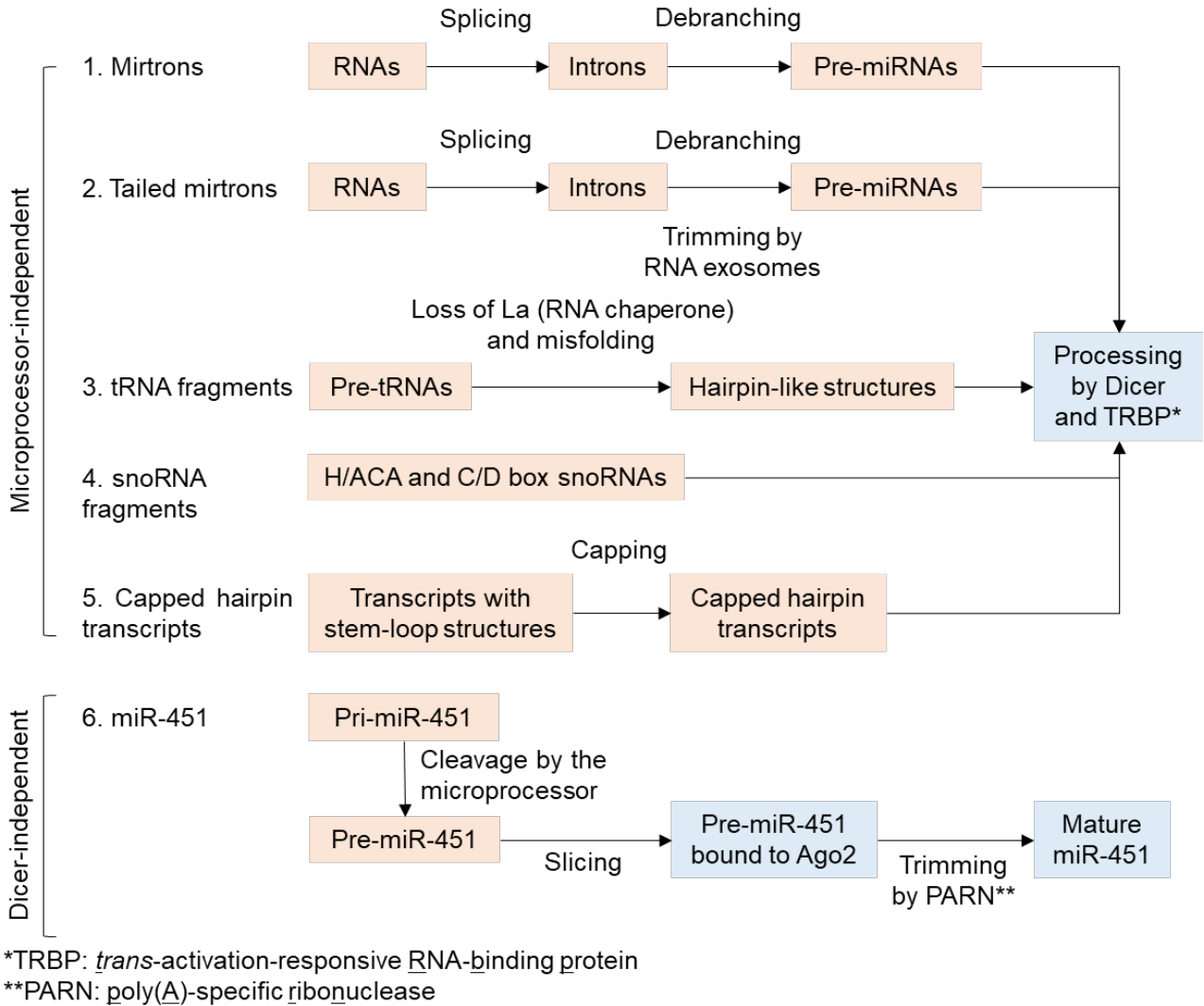


그림 2. 비전형적인 miRNA 생성 과정.

우선 마이크로 처리기와 독립적으로 생성되는 과정으로, 미르트론(mirtrons)과 늘어진 미르트론(tailed mirtrons)이 있는데, 이들은 스플라이싱으로 생성된 인트론이 탈가지화(debranching) 과정을 통해 열린 구조가 되며 세포질로 이동하여 Dicer를 통해 처리된다. 늘어진 미르트론은 세포질로 이동하기 전에 늘어진 말단이 잘린다. 일부 tRNA는 RNA chaperone인 La가 없는 경우 연장된 헤어핀 구조를 형성하여 Dicer를 통해 처리될 수 있다. 일부 small nucleolar RNA (snoRNA)와, 특정 전사 시작 부분에서 RNA 중합효소 II가 형성한 헤어핀 구조도 Dicer를 통해 처리될 수 있다. 한편 miR-451의 경우 Dicer 없이 Ago2에 붙고(slicing), poly(A)-specific ribonuclease가 늘어진 부분을 잘라 mature form이 될 수 있다.

6.1. 마이크로 처리기와 독립적인 miRNA 생성

마이크로 처리기와 독립적으로 생성되는 miRNA로 미르트론(mirtrons)이 있다. 이들은 인트론에서 생성되며, 스플라이싱으로 생성된 인트론이 pre-miRNA로 기능하여 마이크로 처리기를 통한 절단이 필요하지 않으며, 세포질로 바로 이동한 뒤 Dicer를 통해 처리된다. 인트론이 pre-miRNA 구조를 갖추기 전에 탈가지화(debranching) 과정을 통해 인트론 걸개(intron lariat)의 2'-5' 연결이 열린다. 한편, 미르트론 중에서는 5'-말단이나 3'-말단, 또는 양쪽에 늘어진 영역이 존재하기도 하는데(늘어진 미르트론(tailed mirtrons)), 이들은 세포질로 이동하기 전에 늘어진 부분이 절단된다. 미르트론의 경우 전형적인 pre-miRNA와 다른 여러 구조를 가지고 있는데, 헤어핀이 매우 길고, 3'-말단에 우라실(U)이 있는 경우가 많으며, 말단 뉴클레오타이드가 전형적인 pre-miRNA보다 다양하게 나타난다. 미르트론의 생성을 억제하는 효소로는 uridyl transferase인 Tailor가 있는데, Tailor는 미르트론에서 자주 나타나는 3'-말단의 구아닌(guanine)을 인식하여 미르트론을 변경하고 발현을 억제한다.

한편, tRNA에서 유래하는 miRNA도 마이크로 처리기와 독립적으로 생성된다. 정상적인 조건에서 tRNA는 전사된 다음 RNA chaperone인 La가 있어야 제대로 구조를 형성할 수 있다. 하지만 서열에 따라 La가 없는 경우, 연장된 헤어핀 구조를 형성하여 Dicer를 통해 처리될 수 있다. Small nucleolar RNA(snoRNA)의 경우, Dicer가 H/ACA 및 C/D box snoRNA에 붙어 처리하는 경우도 있다.

마지막으로, 특정 전사 시작 부분에서 RNA 중합효소 II가 생성한 전사물이 줄기-고리 구조를 형성하고, 조기에 전사가 종료되면 헤어핀 구조가 빠져나와 Dicer를 통해 처리될 수 있다. RNA 중합효소 II가 형성한 만큼, 이렇게 형성된 헤어핀 구조는 5'-말단에 7-methylguanylate cap이 있으며, 이것은 마이크로 처리기로 처리될 수 없다. 또한 이 cap은 cap-binding complex-exportin 1 (Exp1) 경로를 통해 핵에서 빠져나올 수 있게 한다. Dicer로 잘린 다음, 이 cap은 5p 팔이 RISC 로딩되는 것을 억제하여 이러한 전구체로부터 생성되는 miRNA는 3p 팔에서 유래된 경로 한정된다.

6.2. Dicer와 독립적인 miRNA 생성

Dicer와 독립적으로 생성되는 miRNA는 매우 드물고, miR-451만 알려져 있다. Pre-miR-451은 Dicer로 절단하기에는 길이가 매우 짧지만 그럼에도 불구하고 결과물인 miR-451은 많이 생성되는데, 이는 pre-miR-451이 Ago2에 붙어 줄기 부분이 잘리기 때문이다. 이후 poly(A)-specific ribonuclease(PARN)가 3'-말단을 잘라주면 miR-451이 최종적으로 생성되어 기능할 수 있게 된다.

7. 잘못된 miRNA 생성의 여파

miRNA는 다양한 발달 과정에서 중요한 조절자이다. 이에 따라 대부분의 암에서 miRNA 발현이 바뀐다. 중요한 miRNA 생성 인자의 유전자 변형은 질병으로 이어질 수 있다. 윌름즈 종양(Wilms tumor)은 소아의 콩팥에서 발생하는 가장 흔한 악성 종양으로 많은 경우, Drosha의 RNase III 도메인에서 이형 접합 미스센스 돌연변이(heterozygous missense mutation)가 발생하여(E1147K)

miRNA 생성이 광범위하게 줄어든다. 또한, 같은 질병에서 DGCR8에서 발생하는 단일 미스센스 돌연변이(single missense mutation)이 발생하는(E518K) 빈도도 높은데, 첫 번째 이중 가닥 RNA 결합 도메인에 발생하여 miRNA 생성이 광범위하게 줄어든다. 이러한 예시들은 miRNA 생성 인자들의 이형 접합 돌연변이도 표현형으로 여파가 생긴다는 것을 보여주는데, 그만큼 잘 조절된 miRNA 발현의 중요성을 강조한다고 할 수 있다. 개인 맞춤형 의학의 도래에 따라 miRNA 생성을 조절하는 RNA 결합 단백질들에서도 이러한 돌연변이들이 발견될 것이다.

8. 결론 및 전망

지난 몇 년간의 연구는 miRNA 생성에 대한 새로운 기작에 대한 통찰을 제공했을 뿐만 아니라, 이 근본적인 유전자 조절 경로에 대한 새로운 원리를 발견하게 했다. 하지만 아직 알려지지 않은 것들도 많은데, miRNA를 생성하는 단백질 복합체에 대한 구조적 이해는 이러한 질문에 답하는데 필수적일 것이고, 초저온 전자현미경의 발달이 이러한 연구를 가속할 것이다. 마이크로 처리기, Dicer-TRBP, RLC가 기질 RNA와 복합체를 이룬 구조를 규명하는 것은 가능해질 것이고 중요한 연구 방향이 될 것이다. 또한 pri-miRNA의 복잡한 3차 구조 및 이러한 구조가 miRNA가 처리 조직, 처리 효율과 발현에 주는 영향도 잘 알려지지 않은 것이다.

한편, 다른 세포 내 경로와 miRNA 생성의 연계도 연구되었지만 많은 부분 알려져 있지 않다. 예를 들어, RNA 결합 단백질의 조절 잠재력은 miRNA 생성과 밀접한 관련이 있어서 RNA 결합 단백질이 miRNA를 광범위하게 조절할 것이라는 것은 예상할 수 있다. 더 나아가, miRNA 생성과 신호 전달 경로가 miRNA 처리 효소의 인산화를 통해 연계되는 것은 정상 및 암 조직에서 중요한 조절 기작으로 주목받고 있다. 가까운 미래에 새로운 발견들이 miRNA 생성이 암과 같은 질병에서 하는 역할을 이해하도록 도움을 줄 것이다.

The views and opinions expressed by its writers do not necessarily reflect those of the Biological Research Information Center.

이재욱(2021). 마이크로 RNA (microRNA) 생성 조절 및 세포 내 다른 경로와의 연계. BRIC View 2021-R05
Available from <https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=3703> (Feb. 18, 2021)

Email: member@ibric.org