(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0092153
(43) 공개일자 2019년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/07 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0601 (2013.01)
C12N 2501/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0011593
(22) 출원일자 2018년01월30일
심사청구일자 2019년03월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이영식
서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가)
홍재상
서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **초파리 성장-성숙 동안 세포 주기 조절 조성물**

(57) 요 약

초파리에서 ecdysone 반응성 miR의 선별 및 ecdysone 반응성 miR-mRNA 조절 네트워크 구축한다.

초파리에서 ecdysone 반응성 miR 및 이의 표적 유전자에 대한 연구를 수행한 결과, miR-252 및 Abi 유전자를 조절하여 세포 주기를 조절할 수 있는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

(52) CPC특허분류
C12N 2501/65 (2013.01)
(72) 발명자
최민석
서울특별시 은평구 진관4로 78-8(진관동, 은평뉴타운상림마을)
이승재
서울특별시 용산구 이촌로69길 30, 209동 706호(이촌동, 한가람아파트)
한지연
서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 501동 2107호(서초동, 우성아파트)
임도환
서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 501동 2107호(서초동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016024242
부처명 한국연구재단
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원-기본연구
연구과제명 HITS-CLIP을 이용한 성장-성숙 변환에서의 스테로이드 호르몬-microRNA-표적유전자 조절 네트워크 확립 및 기능적 보존 규명
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

Ecdysone 반응성 microRNA-252-5p를 포함하는 초파리 세포 주기 조절 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 microRNA-252-5p는 세포주기의 G2/M기에서 Abi 단백질 발현을 억제시키고 cyclins A 및 B의 발현을 억제하여 세포의 증식을 억제하는 것인 초파리 세포 주기 조절 조성물.

청구항 3

microRNA-252-5p의 결합 부위를 가지고 있는 sponge transcript를 포함하는 초파리 세포 주기 조절 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

microRNA-252 sponge transcript은 microRNA-252-5p 활성을 낮추어 Abi 단백질 발현 및 cyclins A 및 B 단백질 발현을 증가시켜 세포의 증식을 촉진하는 초파리 세포 주기 조절 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초파리 성장-성숙 동안 세포 주기 조절물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] Steroid hormone은 다양한 생물의 발달, 생리, 행동에 영향을 끼치지는 것으로 알려져 있다. 초파리와 다른 완전 변태 곤충에서 주된 steroid hormone은 Ecdysone이다. 이 호르몬이 대사되어 활성형인 20E(20-hydroxyecdysone)로 변하게 되면 유충의 탈피와 유충에서 성체로의 변태와 같은 발달적 변이를 유도하는 중요한 역할을 한다. Ecdysone의 양이 증가하게 되면 세포 성장과 분열이 일어나게 되어 유충의 몸 크기가 증가하게 되고, 또한 성체 조직으로의 분화 및 변태와 더불어 더 이상 쓸모 없는 유충 조직의 분해를 조절한다.

[0003] 20E는 세포의 ecdysone receptor와 결합하여 complex를 형성 한 후 핵으로 이동하여 우선적으로 1차 반응 유전자(primary response gene)이자 전사인자(transcription factor) or 매개체(mediator)인 borad (Broad-Complex 또는 BR-C), E74, 그리고 E75 활성화시킨다. 이후 활성화 된 전사인자들은 다른 유전자의 발현을 전사수준에서 조절하며, 더나아가 microRNA(miRNA) 유전자들의 발현도 직·간접적으로 영향을 끼치지는 것으로 알려져 있다.

[0005] MicroRNA(이하 'miR'라 한다.)는 약 22 nucleotide로 이루어진 non-coding RNA로 염기서열 상보적인 mRNA를 분해하거나 단백질로의 번역을 억제함으로써 유전자 발현을 조절하는 역할을 한다. miR은 핵 내에서 RNA polymerase II에 의해 primary transcripts(pri-miR)로 전사되고, pri-miR는 RNase III 인 Drosha를 포함하는 microprocessor complex에 의해 precursor miR(pre-miR)로 1차 변형(processing)된다. 이후 pre-miR은 세포질로 이동하여 RNase III인 Dicer에 의해 2차 변형이 진행되어 double stranded RNA(miR-miR* duplex)가 만들어진다. 이후 RNA duplex는 Argonaute(Ago) 단백질과 결합하여 이중가닥 중 한 가닥(passenger strand)을 떨어뜨림으로써 RNA-induced silencing complex(RISC)를 이루게 된다. RISC에 loading된 miR(guide strand)는 guider의 역할하여 염기서열 상보적인 표적 mRNA와 직접 결합으로써 해당 유전자를 분해하거나 번역을 억제함으로써 gene silencing을 진행한다.

[0007] 대게 miR는 표적 mRNA의 3’ UTR(Untranslated region)상의 상보적인 염기서열에 결합한다고 보고되고 있다. 이 때 miR는 표적 mRNA 염기서열을 인지하는 데에는 자신의 염기서열 전체를 이용하지 않는다. 바로 seed region으로 불리는 miR의 5’ end의 2~8번째에 위치한 염기서열을 이용하게 된다. 그로 인하여 대부분의 표적 염기서열은 miR 염기서열과 일부분만 상보적이게 되고, 이에 따라 1개의 miR가 여러 개의 다른 표적 mRNA를 조절 할 수 있다. 이 점을 이용하여 miR의 표적 mRNA를 예측하는 알고리즘을 만들었지만, 높은 false-positive rate(위양성율)와 false-negative rate(위음성율)을 보인다. 그로 인하여 최근에 표적 특이적인 단백질과 RNA의 상호작용을 보기 위한 CLIP (Cross-linking immunoprecipitation) 방법을 사용한다. 즉, CLIP 방법을 이용하여 miR가 결합한 Ago 단백질과 상호작용하는 mRNA를 알아내는 것이다. 이를 통하여 Ago 단백질에 결합한 miR가 표적으로 하는 mRNA를 알 수 가 있다.

[0009] 최근 들어 ecdysone 반응성 miR(ecdysone-responsive miR)와 이것의 역할에 대해서 보고 되고 있다. 예를 들면 Ecdysone은 let-7-Complex miRNA(miR-100-5p, let-7-5p, and miR-125-5p)을 활성화 시켜 표적 mRNA인 *abrupt*와 *chinmo*의 양을 표적 함으로써 변태 과정을 조절한다고 보고 되었다. 이와 반대로 Ecdysone이 miR-8-3p를 억제시킴으로써 인슐린 signaling의 negative regulator를 encoding하고 있는 ush을 miR-8-3p가 표적 하지 못하도록 함으로써 생물의 성장 속도를 조절한다고 보고 되었다. 이러한 예들이 존재하지만, ecdysone 반응성 miR과 그 들의 표적 mRNA에 대한 총체적인 연구는 여전히 전무한 상황이다.

[0011] 세포는 세포주기(cell cycle)에 의해서 번식한다. 세포주기는 DNA 복제기(Synthesis, S), 유사분열기(Mitosis, M) 그리고 간극기(Gap, G)로 구성된다. 핵 DNA는 S기에 복제되며, 복제된 유전체는 M기에 서로 분리된다. M기에는 핵분열(Karyokinesis)와 세포질분열(Cytokinesis)가 일어나게 된다. M기가 마무리되면 2개의 독립적인 세포가 만들어진다. 대부분의 세포의 S기와 M기는 G기로 분리되는데, 한 세포주기가 마무리 되는 M기와 다음 주기의 S기 사이에 G1기가, 그리고 S기와 곧이어 일어나는 M기 사이에 G2기가 존재한다.

[0012] 세포주기 진행은 세포주기 조절체계를 형성하는 일련의 단백질에 의해 조절된다. 이 조절체계의 핵심 단백질은 CDK(cyclin-dependent kinase, 사이클린 의존성 인산화효소)로 Kinase(인산화효소)과 phosphatase(인산분해효소)의 작용과 cyclin(사이클린)의 결합에 의하여 활성을 갖게된다. 하지만 CDK는 cyclin 단백질과 복합체를 형성한 후 kinase와 phosphatase가 작용하여야 kinase(인산화효소)로서 활성을 갖게 된다. 즉, CDK의 주된 활성은 cyclin 결합에 의존한다. CDK-cyclin 복합체는 세포주기의 특정 단계에서만 활성화 상태이며, 나머지 기간에는 불활성화 상태이다. 활성화 된 CDK-cyclin 복합체는 수많은 단백질을 인산화시켜 세포주기의 주요 과정을 실행하도록 활성화시키거나 또는 세포주기의 선행 과정을 반복하지 못하도록 억제시킨다.

[0013] 대부분의 생물들은 다수의 cyclin이 세포주기의 도중에 작용한다. 즉, 세포주기의 각 단계마다 여러 종류의 cyclin이 출현하고 사라진다. cyclin은 세포주기의 단계에 따라 크게 세가지 유형이 존재한다. G1 cyclin은 G1기를 거쳐 S기로 세포주기의 이동을 책임지고, S기 cyclin은 DNA 복제의 시작에 필요하며, 그리고 Mitotic cyclin(cyclin A와 B)은 유사분열을 시작하게 한다. G2기와 M기에서 주요한 CDK는 CDK1이다. 이는 cyclin A 및 B와 결합한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 초파리에서 ecdysone 반응성 miR의 선별 및 ecdysone 반응성 miR-mRNA 조절 네트워크 구축한다.

[0015] 초파리에서 ecdysone 반응성 miR 및 이의 표적 유전자에 대한 연구를 수행한 결과, miR-252 및 Abi 유전자를 조절하여 세포 주기를 조절할 수 있는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0016] 초파리에서 ecdysone 반응성 miR의 선별 및 ecdysone 반응성 miR-mRNA 조절 네트워크 구축한다.

발명의 효과

[0017] ecdysone 반응성 miR-252 및 Abi 유전자를 조절함으로써 세포 주기를 조절할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

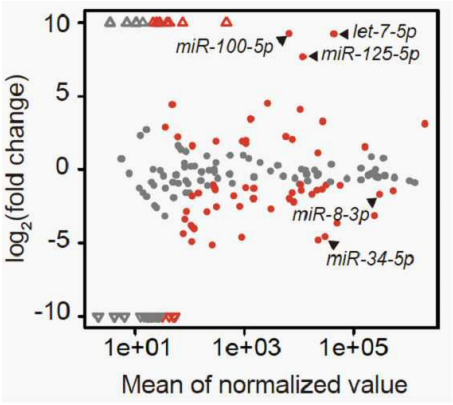
[0018] ◎ 탈피호르몬(Ecdysone)에 의해 유도되는 Ago1 단백질과의 결합 miR 수준 변화 분석

[0019] miR(micro RNA)는 Ago(Argonaute) 단백질과 결합하여 RISC(RNA-induced silencing complex)를 형성한 후, 표적 mRNA와 직접 결합함으로써 유전자의 발현을 억제한다. 초파리 S2 세포에서 탈피 호르몬의 존재에 따라 Ago1과의 결합 수준의 차이를 보이는 miR를 동정하기 위하여 CLIP-seq를 수행하였다.

[0020] 간단히 살펴보면 다음과 같다. 초파리 S2 세포에 mock(ethanol)을 처리한 대조군과 20E(ecdysone)을 처리한 실험군으로 나누었다. 각각에 초파리 S2 세포에 자외선(Ultraviolet)을 조사하여 세포 안에서 Ago1 단백질과 RNA를 결합을 시킨다. 세포를 용해시킨 후 RNase I를 처리하여 RNA를 잘게 쪼갠다. 그 다음에 Ago1 단백질을 항체를 이용하여 면역침강(immunoprecipitation) 시킨다. 마지막으로 Ago1에 결합하고 있는 RNA를 정제하여 대규모 서열분석기를 이용하여 Ago1 CLIP Library를 구축한다.

[0021] Ago1 CLIP-seq을 통하여 Ago1에 결합된 RNA 염기서열을 생물 정보학 기법을 이용하여 유전체상의 유래 부위를 확인하였으며, 그 중 초파리 miRNA에 해당하는 서열을 분리하였다. 그 결과 20E를 처리한 경우 165종의 miR가, mock을 처리한 경우 171종의 miR가 Ago1에 결합하고 있음 확인하였다.

[0022] 탈피 호르몬 유무에 따라 Ago1 단백질과의 결합 수준의 차이(20E/mock)를 보이는 miR에 대한 그래프를 그림1에 나타내었다. miR를 삼각형과 점으로 표현하였고, miR 중 탈피 호르몬 유무에 따라 Ago1 단백질과 결합 수준이 2배 이상 차이를 보이는 miR를 빨간색으로 표시하였다($p < 0.001$). 삼각형으로 표현한 miR는 탈피 호르몬 유무 중 한쪽에서만 확인된 miR이다.

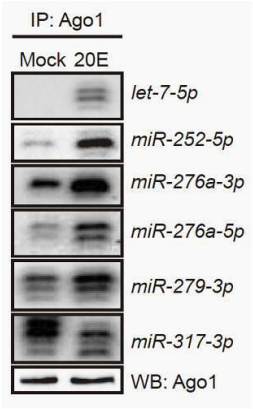


[0024]

[0025] 그림 1. 탈피 호르몬 유무에 따라 Ago1과의 결합 수준의 차이를 보이는 miR

[0027] 그림 1에 나타낸 바와 같이, 통계적($p < 0.001$)으로 유의하게 탈피 호르몬 유무에 따라 Ago1 단백질과의 결합 수준의 차이를 보이는 miR(탈피 호르몬 반응성 miR, ecdysone-responsive miR)은 총 72종이다. 이러한 72종의 miR 중 탈피 호르몬 신호 전달에 따라 30종은 증가, 42종은 감소함을 확인하였다.

[0029] 대량 염기서열 분석 결과를 토대로 탈피 호르몬 반응성 miR를 재검증하기 하기 위해서 Ago1-RNA 면역침강(RNA immunoprecipitation, RIP)을 진행하였다. 간단히 살펴보면 다음과 같다. mock을 처리한 S2 세포와 20E를 처리한 S2 세포를 분쇄한 후 각각 Ago1 항체를 이용하여 Ago1 단백질을 침전시켜 Ago1 단백질에 결합된 miR를 분리하였다. 이 후 탈피 호르몬 유무에 따라 Ago1과의 결합 수준의 차이를 보인 72종의 miR 중 6종을 선별하여 노던 블록(Northern blot)으로 그 결합 수준을 비교 분석하였다. 비교 분석 결과를 그림 2에 나타내었으며, 침전된 Ago1 단백질의 양은 웨스턴 블록(Western blot, WB)으로 확인하였다.



[0031]

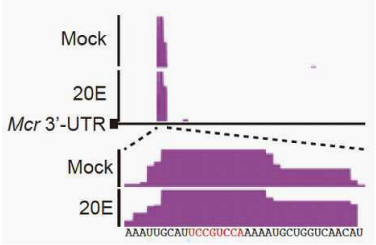
[0032] 그림 2. 탈피 호르몬 유무에 따라 Ago1과의 결합 수준의 차이를 보이는 miR의 노던 블록

[0034] 그림 2에 나타낸 바와 같이, 확인한 6종의 miR가 대량 염기 서열 분석과 유사하게 Ago1과 결합된 miR 수준 차이를 나타냄을 확인하였다.

[0036] ◎ Ago1 CLIP에 의해서 규정된 탈피 호르몬 반응성 miR의 표적 mRNA 분석

[0037] 탈피 호르몬 반응성 miR의 표적 mRNA 분석을 위하여, Ago1 CLIP-seq에서 얻은 데이터를 바탕으로 탈피 호르몬 유무에 따라 Ago1 단백질과의 결합 수준의 차이를 보이는 miR의 전체 표적 유전자를 분석하였다. 우선 Ago1 CLIP을 진행하게 되면 Ago1 단백질에 결합된 miR 뿐만 아니라 miR과 결합한 표적 유전자의 mRNA까지 함께 추출이 가능하다. 그 후 대량 염기서열 분석을 진행하고 생물정보학적 기술을 이용하게 되면 해당 miRNA와 결합 중요한 seed region를 가지고 있는 유전자를 분석 할 수 있다.

[0039] 그 결과 탈피 호르몬 반응성 miR인 miR-184-3p의 새로운 표적인 *Macroglobulin complement-related(Mcr)* 유전자를 발견하였다. Ago1 CLIP-seq 데이터를 통하여 *Mcr* mRNA의 3' 비번역부위에 Ago1 단백질이 결합하는 부분이 존재하며, 이 부분에는 miR-183-3p seed region과 상보적인 서열이 존재함을 확인하였다. 이와 같은 결과를 그림 3에 나타내었다. *Mcr* mRNA의 3' 비번역부위에 Ago1 단백질이 결합함을 보라색으로 표현하였고, miR-183-3p seed region과 상보적인 서열을 빨간색으로 표현하였다.

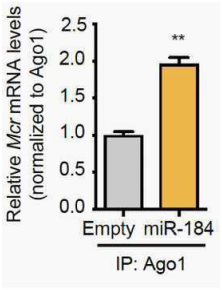


[0041]

[0042] 그림 3. 탈피 호르몬 반응성 miR-184-3p의 새로운 표적 *Mcr* 유전자

[0044] miR-184-3p가 guider로 작용하여 Mcr 3' 비번역부위에 Ago1 단백질이 결합되는 것을 검증하기 위해서 Ago1-RNA 면역침강을 진행하였다. 간단히 살펴보면 다음과 같다. 대조군 S2 세포(empty)와 miR-184 과발현 S2 세포(miR-184)를 분쇄한 후 각각 Ago1 항체를 이용하여 Ago1 단백질을 침전시켜 Ago1 단백질에 결합된 mRNA를 분리하는 방법이다. 이 후 역전사 PCR(Reverse transcription polymerase chain reation, RT-PCR)을 진행하여 *Mcr* mRNA 수준을 비교 분석하였다. 비교 분석 결과를 그림 4에 나타내었으며, 침전된 Ago1 단백질의 양은 웨스턴 블록

(Western blot, WB)으로 확인하였다.



[0046]

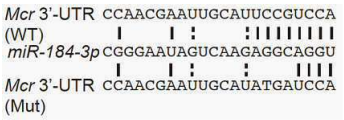
[0047] 그림 4. miR-184 과발현 S2 세포(miR-184)에서 Ago1에 결합된 *Mcr* mRNA의 level

[0049] 그림 4에 나타낸 바와 같이, miR-184 과발현 S2 세포(miR-184)에서 Ago1에 결합된 *Mcr* mRNA의 수준이 대조군보다 2배정도 관찰되었다.

[0050]

[0051] miR-184-3p의 새로운 표적 유전자로 발견된 Mcr 유전자의 발현이 직접적으로 miR-184-3p에 의해 조절되는지 확인하기 위해서, 루시퍼라제 리포터 분석법(Luciferase reporter assay)을 진행하였다.

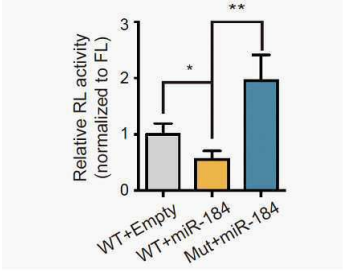
[0052] 레닐라 루시퍼라제(Renilla luciferase, RL)와 반딧불이 루시퍼라제(Firefly luciferase, FL)를 동시에 발현시킬 수 있는 psiCHEK2 벡터(vector)의 RL 하위 부위에 표적 유전자 *Mcr* 3' 비번역부위 부분을 삽입(Wildtype, WT)하여 리포터(reporter)를 제작하였다. 또한 표적 유전자 *Mcr* 3' 비번역부위 부분 중 miR-183-3p seed region과 상보적인 염기 서열을 치환함으로써 결합이 억제되는 돌변변이(Mutant, Mut) 리포터도 함께 제작하였다. 그림 5는 *Mcr* 3' 비번역부위에 위치한 miR-183-3p의 결합 부위를 나타낸 것이다.



[0054]

[0055] 그림 5. *Mcr* 3' 비번역부위에 위치한 miR-183-3p의 결합 부위

[0057] 제작한 리포터를 이용하여 루시퍼라제 리포터 분석법을 수행한 결과를 그림 6에 나타내었다. 통계처리는 ANOVA와 다중 검정으로 던네트 검증(Dunnett's test)을 진행하였다. 그림 6에 나타낸 바와 같이, 대조군(WT+Empty)과 비교시 표적 유전자 *Mcr* 3' 비번역부위이 삽입된 리포터(WT+miR-184)의 경우, miR-184를 과발현시 리포터 유전자의 발현 수준이 감소하는 것을 확인하였다. 이와 반대로 seed region과 상보적인 염기 서열을 치환한 돌연변이 리포터(Mut+miR-184)는 miR-184에 의한 억제를 받지 못하고 발현 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 *Mcr* 유전자가 miR-184에 의해서 발현이 조절 되는 것을 확인하였다.



[0059]

[0060] 그림 6. miR-184이 표적 유전자인 *Mcr*를 조절하는지 여부를 확인하기 위한 루시퍼라제 리포터 분석법의 수행 결

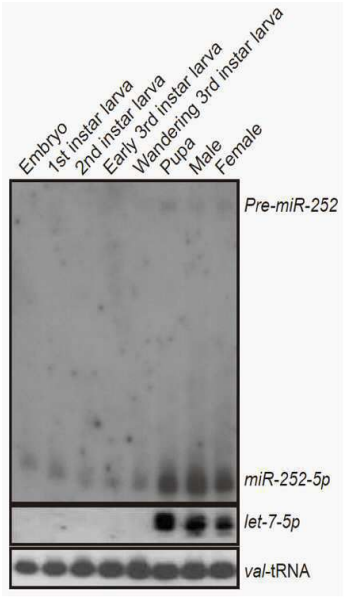
과

[0062] ◎ 전형적인 탈피 호르몬 신호전달에 의해 조절되는 miR-252-5p 발현의 활성 확인

[0063] 탈피 호르몬 반응성 miR의 생물학적 기능을 확인하기 위해서 초파리를 포함한 탈피과정을 겪는 탈피동물에서 잘 보전되어있는 miR인 miR-252-5p를 선별하였다.

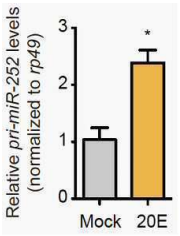
[0065] 노던 블록을 통하여 생체 내(in vivo)에서 mature miR-252-5p가 모든 발달단계에서 발현된다는 확인한 결과를 그림 7에 나타내었다. 그림 7에 나타낸 바와 같이, 번데기(pupa)와 성체(Male, Female) 단계에서 전구체 miR-252(pre-miR-252)의 발현이 증가하고 이에 따라 mature miR-252-5p가 증가됨을 확인하였다.

[0067] 생체 내(in vivo)에서 유충에서 성체로의 변태가 진행되는 동안 탈피 호르몬 농도가 높은 상태로 유지되며 miR-252-5p의 발현이 상향 조절된다.

[0068] 

[0069] 그림 7. 생체 내(in vivo)에서 발달단계에 따른 mature miR-252-5p의 노던 블록

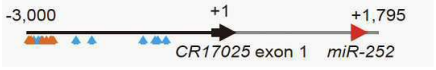
[0070] 탈피 호르몬 신호전달에 의해서 miR-252의 전사가 촉진되는지를 확인하기 위해서 RT-qPCR(Reverse transcription-quantitative PCR)를 진행하였다. 20E를 처리한 S2 세포에서 mock를 처리한 S2 세포에 비해 2배 이상의 일차 miR-252 전사물(primary miR-252)가 측정된 결과를 그림 8에 나타내었다. 이를 통하여 miR-252-5p는 ecdysone 신호전달에 의해서 전사적 수준에서 조절됨을 알 수 있었다.

[0072] 

[0073] 그림 8. 탈피 호르몬에 따른 일차 miR-252 전사물의 level

[0075] miR-252 유전자는 비암화 유전자(non-protein-coding gene)인 CR17025에 존재하며, CR17025 유전자의 프로모터(promoter)와 전사인자(transcriptional factor)에 의해서 전사된다. 전사 인자 결합 부위 예측 프로그램(P-

Match and Math program)을 통하여 CR17025 유전자의 전사 시작 위치의 상단부에 탈피 호르몬 신호전달의 1차 매개체인 BR-C와 E74A가 결합 할 수 있는 부위가 다양하게 존재함을 예측되었다. 이를 그림 9에 나타내었다. CR17025 유전자의 전사 시작 위치의 상단부, 즉 miR-252 근거리 프로모터(proximal promoter)에 BR-C와 E74A가 결합 할 수 있는 것으로 예측된 부위를 각각 파란색 수직 화살표와 주황색 수직 화살표로 나타내었다.

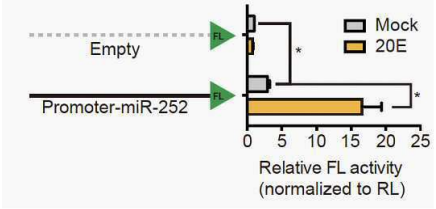
[0077] 

[0078] 그림 9. miR-252 프로모터

[0080] miR-252 프로모터(promoter)의 발현이 탈피 호르몬 신호전달에 의해 조절되는지 확인하기 위해서, 루시퍼라제 리포터 분석법을 진행하였다. 반딧불이 루시퍼라제(Firefly luciferase, FL)를 발현시킬 수 있는 pGL3-Basic 벡터(vector)의 FL 상위 부위에 miR-252 근거리 프로모터(proximal promoter)를 삽입하여 리포터(reporter)를 제작하였다.

[0081] 제작한 리포터와 보정(normalization)을 위한 레닐라 루시퍼라제(Renilla luciferase, RL)를 발현시킬 수 있는 pRL-TK 벡터(vector)를 co-transfection 시켜 miR-252 프로모터(promoter)의 활성을 측정하였다.

[0082] 루시퍼라제 리포터 분석법을 수행한 결과를 그림 10에 나타내었다. 20E 처리 시 miR-252 근거리 프로모터(proximal promoter)를 포함하고 있는 리포터의 반딧불이 루시퍼라제 활성이 mock 처리 시보다 6배 정도 증가됨을 확인하였다. 이를 통하여 ecdysone 신호전달에 반응하여 miR-252 promoter가 활성됨을 알게 되었다.

[0084] 

[0085] 그림 10. miR-252 프로모터의 발현이 탈피 호르몬에 의해 조절되는지 확인하기 위한 루시퍼라제 리포터 분석법의 수행 결과

[0087] 초파리 S2 cell에 각각 탈피 호르몬 수용체 EcR(ecdysone receptor)과 전사 인자 BR-C의 dsRNA를 transfection 시켜 RNAi-mediated knockdown 유도한 후, 20E에 대한 miR-252-5p 발현을 확인하였다. dsRNA에 의해서 각각 EcR과 BR-C mRNA 발현이 낮아진 초파리 S2 cell의 경우 20E에 의한 miR-252-5p 발현 수준이 감소됨을 확인하였다. 또한 보고된 바와 같이 20E 반응성 miR인 lep-7-5p가 EcR 및 BR-C 의존적인 상향 조절이 관찰되었다. 이러한 결과는 EcR 및 BR-C에 의한 전형적인 ecdysone 신호전달이 miR-252-5p의 발현을 촉진시킨다는 것을 말한다.

[0088] in vivo에서도 ecdysone 신호전달에 의해 miR-252-5p의 상향 조절을 확인하기 위해서 유충에게 20E를 먹였다. 그 후 RT-qPCR과 splinted ligation analysis를 통하여 각각 pri-miR-252와 mature miR-252-5p의 수준이 증가됨을 확인하였다. 역으로 ecdysone의 주요한 표적 기관인 fat body에서 ecdysone 신호전달을 차단하였더니 splinted ligation analysis를 통하여 fat body에서 miR-252-5p 수준이 각각 유충에서 30%, 번데기에서 43% 감소됨을 확인하였다.

[0089] 이로써 in vitro와 in vivo 둘 다 EcR를 통한 전형적인 ecdysone 신호전달이 miR-252-5p의 발현을 상향 조절됨을 밝혔다.

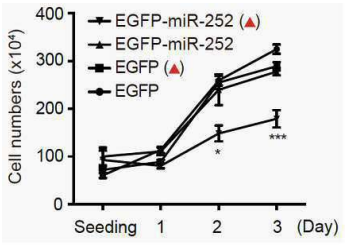
[0091] ◎ cell proliferation과 cell cycle에서 miR-252-5p의 역할

[0092] miR-252-5p가 세포 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해, $CuSO_4$에 의해 각각 EGFP만 발현 되는 stable cell line(EGFP S2 cell)과 EGFP와 pre-miR-252가 동시에 발현되는 stable cell line(EGFP-pre-miR-252 S2 cell)을 구축하였다.

[0093] EGFP S2 cell와 EGFP-pre-miR-252 S2 cell은 다음과 같은 방법으로 구축되었다. Metallothionein promoter를 가진 plasmid(pMT-V5-His A vector)에 cloning 통해 reporter gene인 EGFP을 삽입하여 pMT-EGFP plasmid를 만들었다. 그 후 pMT-EGFP plasmid에 pre-miR-252를 encoding(암호화)하는 DNA 조각을 EGFP gene 하단부(downstream)에 삽입하여 pMT-EGFP-pre-miR-252 plamid를 만들었다. 그 다음은 stable cell line으로 만들기 위하여, S2 cell에 pMT-EGFP plasmid 또는 pMT-EGFP-pre-miR-252 plamid를 selection을 위한 hygromycin 저항 plasmid와 함께 co-transfection 한 후, hygromycin B를 이용하여 2주동안 selection을 진행하였다. 그 결과 $CuSO_4$에 의해 각각 EGFP만 발현 되는 stable cell line(EGFP S2 cell)과 EGFP와 pre-miR-252가 동시에 발현되는 stable cell line(EGFP-pre-miR-252 S2 cell)을 구축하게 되었다.

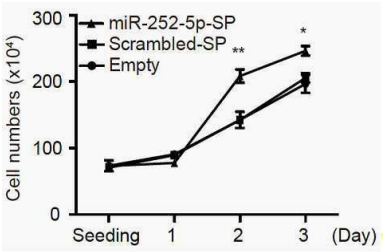
[0094] EGFP-pre-miR-252 S2 cell가 $CuSO_4$에 의해서 pre-miR-252를 발현하게 되면, miR-252-5p가 주되게 생성 된다. 이는 이전 보고와 Ago1 CLIP-seq 데이터를 통해 알 수 있었다.

[0095] 그 결과 seeding후 $CuSO_4$에 의해 pre-miR-252가 발현되는 S2 cell의 경우, 대조군에 비해 총 세포 수가 2일차와 3일차에 각각 41.8%, 38.1% 감소 됨을 확인되었다. 이러한 결과는 그림 11에 나타내었다.

[0097] 

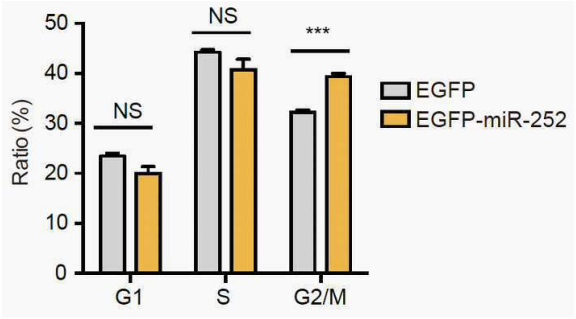
[0098] 그림 11. miR-252 과발현에 따른 세포 증식 변화

[0100] 또한 EGFP-pre-miR-252 S2 cell에서 pre-miR-252에 의해서 주되게 생성되는 miR-252-5p의 결합 부위를 가지고 있는 sponge transcript를 발현시킴으로써 miR-252-5p의 활동을 억제하였다. 그 결과 대조군들에 비해 총 세포 수가 2일차와 3일차에 각각 46.4%, 19.8% 증가 됨을 확인되었다. 이러한 결과는 그림 12에 나타내었다.

[0102] 

[0103] 그림 12. miR-252 과발현 세포에서 miR-252-5p sponge transcript 발현에 따른 세포 증식 변화

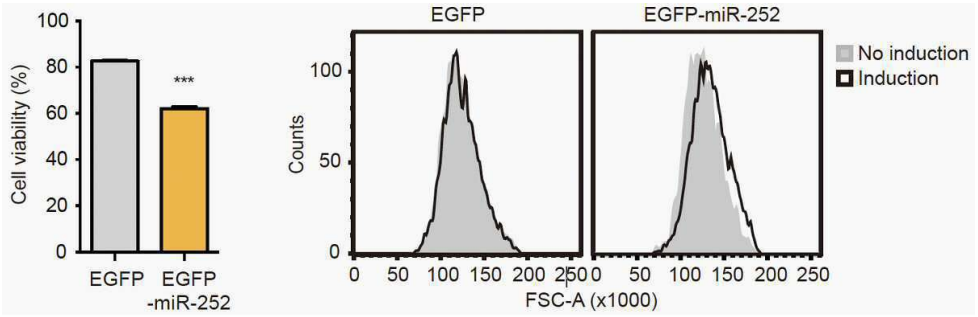
[0105] 다음으로 miR-252-5p 과발현으로 인한 세포 수의 감소가 cell cycle 진행과 관련있는지 Flow cytometry analysis를 통하여 확인하였다. 그 결과 miR-252-5p 과발현시 cell의 G2/M-phase의 부분이 대조군에 비해 22% 증가 하였다. 이러한 결과는 그림 13에 나타내었다.



[0107]

[0108] 그림 13. miR-252 과발현 세포의 세포 주기 분석

[0110] 또한 G2/M cell cycle arrest로 인해 발생한 apoptosis로 세포 생존력(cell viability)가 대조군에 비해 28.2% 감소하였고, 세포 크기도 감소하였다. 이러한 결과는 그림 14에 나타내었다.



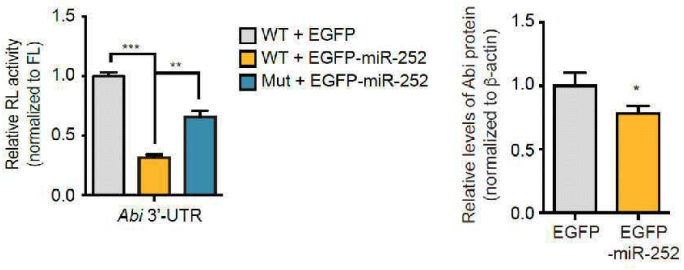
[0112]

[0113] 그림 14. miR-252 과발현 세포의 세포 생존력(cell viability) 및 세포 크기

[0115] ◎ miR-252-5p의 직접적인 표적인 *Abi*가 cell proliferation과 cell cycle 조절

[0116] Ago1 CLIP data를 통해서 miR-252-5p 표적 유전자를 5개 선별(Abi, fray, mbt, mmy, Slik)하였고, miR-252-5p 과발현시 선별된 유전자들의 mRNA 수준을 보았다. 그 결과 fray를 제외하고 모두 miR-252-5p 과발현시 mRNA 수준이 상당히 감소되었다. 그 다음은 해당 유전자의 dsRNA를 이용해 RNAi-mediated knockdown을 유도한 후, cell proliferation을 확인하였다. 그 결과 5개 유전자의 발현이 각각 knockdown 되자 cell proliferation이 감소됨을 확인하였다.

[0117] 선별된 5개의 유전자 중 하나인 Abi를 선택하여 실험을 더 진행하였다. Luciferase assay를 진행하여 Abi와 miR-252-5p의 상호 작용을 확인하였고, miR-252-5p 과발현 cell에서 Abi 단백질 양이 감소됨을 통해서 Abi가 miR-252-5p의 표적임을 확인하였다. 이는 그림 15에 나타내었다.

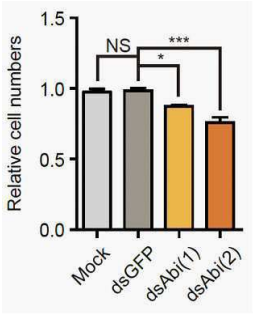


[0119]

[0120] 그림 15. 루시퍼라제 리포터 분석법을 통한 miR-252와 Abi의 상호 작용 확인 및 miR-252 과발현 세포에서의 Abi

단백질의 양

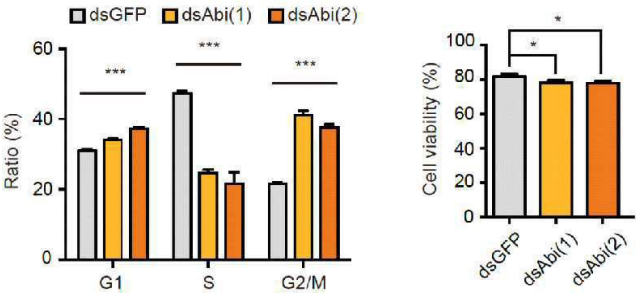
[0122] 그 다음은 miR-252-5p에 의해서 조절되는 Abi 유전자가 cell proliferation과 관련성 있는지를 확인하기 위해서, Abi mRNA의 서로 다른 곳을 표적으로 하는 2개의 dsRNA를 이용하여 RNAi-mediated knockdown을 유도하였다. 그 결과 Abi dsRNA를 처리한 2개의 sample은 모두 cell proliferation이 감소됨을 확인 하였다. 이는 그림 16에 나타내었다.



[0124]

[0125] 그림 16. Abi dsRNA 처리에 따른 세포 증식 변화

[0127] 또한 Abi dsRNA를 처리한 2개의 sample은 모두 G2/M-phase arrest와 감소된 cell viability가 관찰 되었다. 이는 그림 17에 나타내었다.



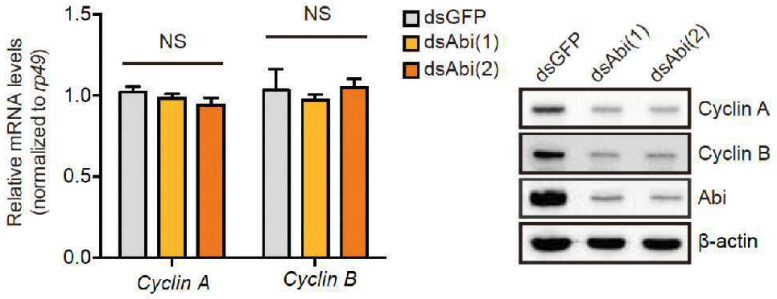
[0129]

[0130] 그림 17. Abi dsRNA 처리에 따른 세포 주기 및 세포 생존력 변화

[0132] miR-252-5p 과발현 cell에 Abi를 과발현 시키자 대조군에 비해서 총 세포수가 증가 됨을 확인하였다. 위와 같은 결과들을 통해서 miR-252-5p와 Abi의 상호 작용이 cell proliferation과 cell cycle 조절에 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

[0134] ◎ ecdysone/miR-252-5p/Abi 조절 축에 의해서 cyclins A와 B의 조절

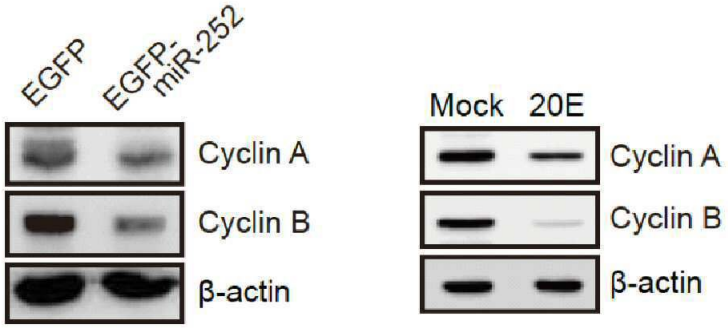
[0135] Cyclin family 단백질은 세포 주기 진행을 조절한다. Cyclins A와 B는 세포주기에서 G2기서 M기로 넘어가는 것을 조절하는 역할을 한다. 그렇다면 결과에서 봤듯이 miR-252-5p가 과발현 되게 되면 G2기에서 M기로 넘어가지 못하고 arrest가 발생한다. 우선 Abi가 depletion된 cell에서 Cyclins A와 B의 전사체의 양의 변화없이 대조군에 비해 해당 단백질의 양이 급격히 감소함을 확인하였다. 이는 그림 18에 나타내었다.



[0137]

[0138] 그림 18. Abi-depleted 초파리 세포에서 Cyclins A 및 B의 변화

[0140] 그리고 miR-252-5p가 과발현 세포 및 20E를 처리한 세포에서 Cyclins A와 B의 단백질의 양이 감소함을 확인하였다. miR-252-5p가 과발현 됨에 따라 감소한 Cyclins A와 B의 단백질 양은 Abi를 과발현 시켜주자 다시 증가함을 확인하였다. 이는 그림 19에 나타내었다.



[0141]

[0142] 그림 19. miR-252 과발현 세포 및 탈피 호르몬 처리시 Cyclins A 및 B 단백질의 변화

[0144] 또한 miR-252 sponge transcript를 이용하여 miR-252-5p 활성을 낮추자 Abi 단백질의 양과 함께 Cyclins A와 B 단백질 양이 증가함을 확인하였다. 더욱이 Cyclins A와 B 단백질 양은 20E 처리한 세포에서 Abi를 과발현 시켜주자 증가함을 확인되었다. 위와 같은 결과를 통하여 ecdysone/miR-252-5p/Abi 조절 축이 단백질 수준에서 Cyclins A와 B의 발현을 조절한다는 것과 Abi와 Cyclins A/B 단백질과의 양의 상관관계가 존재함을 알 수 있었다.

[0145] 이 연구는 초파리에서 miR-252-5P가 ecdysone 신호전달 과정을 통하여 유충에서 성체로 변태과정동안 상향 조절됨을 찾았다. 게다가 miR-252-5p가 Abi를 직접 표적하고 더욱이 cyclins A와 B 단백질의 수준을 하향 조절함으로써 cell cycle을 조절함을 찾았다. Ecdysone/miR-252-5p/Abi 조절 축에 의한 cyclins A와 B의 조절은 초파리에서 변태(탈바꿈)에 기여하는 것으로 생각된다.