

특강 2

Oct 3/4 siRNA가 마우스 수정란의 발달 및 유전자 발현에 미치는 영향

최향순

충북대학교

"Science"에서는 2002년을 small RNA를 'molecule of the year'에 선정되었다. 이어서 2003년에는 전 과학분야를 대상으로 10대 중요 과학적 성과를 발표하였는데 그 중에 siRNA (small interfering RNA)는 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 기술로 선정되었으며 그 이후로 많은 과학자들의 관심을 끌게 되었다.

siRNA에 의한 RNAi 현상의 발견과 작용 원리

Dr. Fire 그룹은 antisense RNA와 sense RNA를 각각 RNA polymerase를 이용해 시험관 속에서 합성한 후, 소량의 dsRNA가 생성된다는 사실을 관찰했으며 특정 유전자의 염기서열에 해당하는 double strand RNA (dsRNA)를 선충 *Caenorhabditis elegans*의 체내에 넣으면, 그에 대응하는 mRNA가 특이적으로 분해되어 유전자 기능을 상실하며 또한 투여하는 dsRNA는 분해될 mRNA에 비하여 극히 소량이어도 가능하다는 실험 결과(RNA interference, RNAi)를 관찰하였다

Dr. Tuschl 그룹은 초파리에서 dsRNA 주입에 의한 target mRNA 분해되는데 이는 Long dsRNA가 21~23 염기의 dsRNA로 절단되며 절단된 짧은 dsRNA에 의해 target mRNA가 degradation된다는 사실이 증명되었다 (그림 1).

즉 RNAi는 21~25 nt의 small-size RNA에 의해 상보적인 염기서열을 갖는 mRNA가 선택적으로 분해되거나 translation이 억제되는 현상이다. 100% 상보적인 경우는 mRNA 분해를, 약 90% 상보적인 경우는 mRNA의 분해 없이 translation inhibition을 유도한다고 알려지고 있다 (그림 2).

siRNA의 제조 방법

1. RNA oligonucleotide의 화학적 합성
2. *In vitro* transcription을 이용한 small RNA의 합성
3. *In vitro* transcription에 의해 합성된 long dsRNA의 Rnase III family enzyme (e.g. Dicer, Rnase III)을 이용한 절단

본 연구팀은 이상의 5가지 방법 중에서 1번 즉 RNA oligonucleotide의 화학적 합성 방법으로 Oct 3/4 siRNA를 제작하였다.

4. siRNA expression plasmid나 viral vector의 세포 내 전달을 통한 발현
5. PCR-derived siRNA expression cassette의 세포 내 전달을 통한 발현

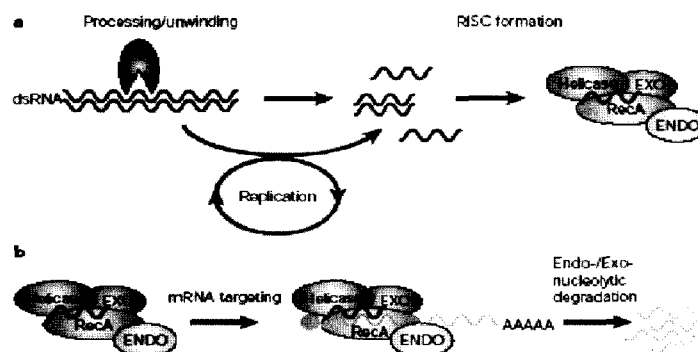


그림 1. 선충과 초파리에서 연구된 RNAi 작용기전 (Nature Rev. Genet.에서).

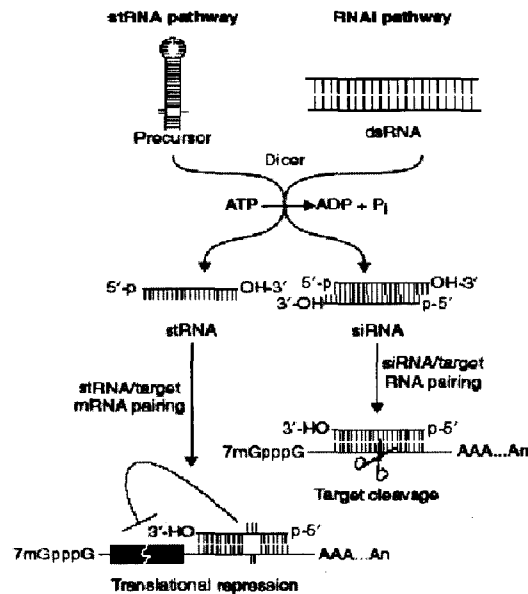


그림 2. The RNAi and stRNA pathways intersect. In both pathways, Dicer acts to generate the active small RNA regulator: siRNAs from dsRNA and stRNAs from ~70 nt stRNA precursors. siRNAs trigger destruction of a perfectly complementary target RNA; stRNAs are thought to repress the translation of targets with which they pair imperfectly (출처: Current Opinion in Genetics & Development 2002, 12:225232).

Oct 3/4는 POU protein의 V class에 속하는 단백질로서 transcription factor로 널리 알려져 있다. Oct 3/4는 blastomere, blastocyst의 ICM, epiblasts, primordial germ cell 및 대부분의 germ cell과 같은 pluripotent embryonic cell에서 발현이 되는데 이러한 세포들이 분화하면 Oct 3/4는 빠른 속도로 down regulation 되거나 소실된다. 그러므로 Oct 3/4 유전자는 toti/pluripotent 세포를 유지시키는데 필수적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

siRNA를 난자나 혹은 수정란에 미세주입을 하면 해당한 유전자의 발현이 억제되면서 그에 따라 다른 유전자들의 발현도 영향을 받을 것으로 가설이 된다. 본 연구팀은 21-nt의 Oct 3/4 siRNA를 제작한 것으로서 수정된 마우스의 zygote를 회수하여 미세주입을 하였다. 대조군은 siRNA의 제작에 사용된 buffer를 미세주입하였다. siRNA 혹은 buffer가 주입된 수정란은 M16 배양액에서 배양하면서 발달을 조사하였는데 처리군과 대조군은 morula (92% vs. 95%) 및 blastocyst (83 vs. 89%)까지의 발달에서 차이가 없는 것으로 나타났다. Single morula 및 blastocyst를 회수하여 RT-PCR 방법으로 Oct 3/4 유전자의 발현상태를 조사해 본 결과 morula나 blastocyst 단계에서 모두 Oct 3/4 유전자가 현저하게 발현이 억제되는 것을 관찰할 수가 있었다. 또 RT-PCR 방법으로 다른 몇 개의 유전자를 조사하였는데 Nanog mRNA도 Oct 3/4의 영향으로 발현이 억제되는 것을 발견하였다. 그러나 heat shock protein 70 이나 E-cadherin 같은 경우는 영향을 받지 않았다.

Oct 3/4 siRNA를 미세주입 후 수정란을 각 발달단계별로 회수하여 면역형광염색을 실시하였다. 대조군에서는 8-cell, morula 및 blastocyst에서 Oct 3/4 단백질이 강하게 염색되었으나 Oct 3/4 injection 군에서는 아주 약하게 염색되었거나 거의 염색되지 않은 것으로 나타났다. 이로부터 Oct 3/4 siRNA는 mRNA의 발현에 영향을 줄 뿐 아니라 단백질의 합성도 억제함을 알 수 있었다.

또 annealing control primer (ACP)를 사용하여 GeneFishing 방법으로 Oct 3/4 injection (처리)군에서 buffer injection (대조)군보다 down-regulation 되어서 발현하는 DEGs를 조사하였다. 결과 10개 유전자의 발현이 Oct 3/4 siRNA의 injection에 의해서 영향을 받았다. 이 유전자들을 다시 real-time PCR를 사용하여 확인을 하였는데 그중 ATPase, H⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2 (Atp6ap2); GK003; damage specific DNA binding protein 1 (Ddb1); hypothetical RNI-like structure containing protein (hRscp); developmental pluripotency associated 1 (Dppa1); dipeptidylpeptidase 3 (Dpp3); Sin3-associated polypeptide 18 (Sap18); regulator of nonsense transcripts 1 (Rent1) 등 8개 유전자는 Oct 3/4에 의해서 down-regulation 되었음이 확인되었고 ribosomal protein S14, eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 (alpha) 등 2개의 유전자는 오히려 up-regulation된 것으로 나타났다.