

박테리아에서 인공 ncRNA의 설계



한국과학기술원 화학과 이영훈 교수

1. 개요

분자생물학의 발전과 함께, 모든 생물의 활동과 생존에 필수적인 유전정보를 저장하는 DNA 이외에도 다양한 구성과 기능을 보유한 RNA 또한 주목받기 시작했다. 초기에 RNA 연구는 DNA에 저장된 정보로부터 전사되어 단백질로 번역되는 역할을 하는 messenger RNA(mRNA) 위주로 연구가 진행되었으나, 최근에 단백질로 번역이 되지 않는 noncoding RNA(ncRNA)에도 연구자들이 많은 관심을 갖게 되었다. 그 이유는 ncRNA가 RNA, 단백질, 또는 DNA와 상호작용을 함으로써 세포내에서 다양한 대사조절에 참여한다는 것이 밝혀졌기 때문이다.

이러한 ncRNA의 기능의 다양성을 이용하여 세포 내의 특정 생체반응을 원하는 방향으로 조절하기 위한 인공 ncRNA의 설계 및 활용법은 꾸준히 연구되고 있다. 본 글에서는 박테리아의 목표 유전자의 발현을 조절할 수 있는 인공 ncRNA의 설계와 활용법의 최근 연구 동향을 기술하였다.

2. 본론

대장균을 비롯한 박테리아에서 ncRNA는 일반적으로 크기가 작기 때문에 small ncRNA 또는 간단히 sRNA라고도 한다. 또한 ncRNA가 작용할 때 대부분 타겟 mRNA와 상보적인 염기서열을 통해서 작용하기 때문에 이러한 방식으로 설계된 ncRNA를 antisense sRNA라고도 부른다. 이러한 점에서 본 글에서 인용된 그림에는 sRNA, antisense sRNA, antisense RNA 등으로 ncRNA를 표시하고 있다. ncRNA가 목표 mRNA에 작용을 할 때 일반적으로 리보솜이 결합하는 위치에 먼저 결합하여 리보솜에 의한 번역을 막거나, mRNA 분해를 유도하여 목표 유전자의 발현을 저해할 수 있고, 또는 RNA 분해 효소의 mRNA 분해를 막고 mRNA에 리보솜이 결합할 수 있도록 리보솜 결합 위치의 구조를 변형시켜 유전자 발현을 촉진할 수 있다 [1] (그림 1).

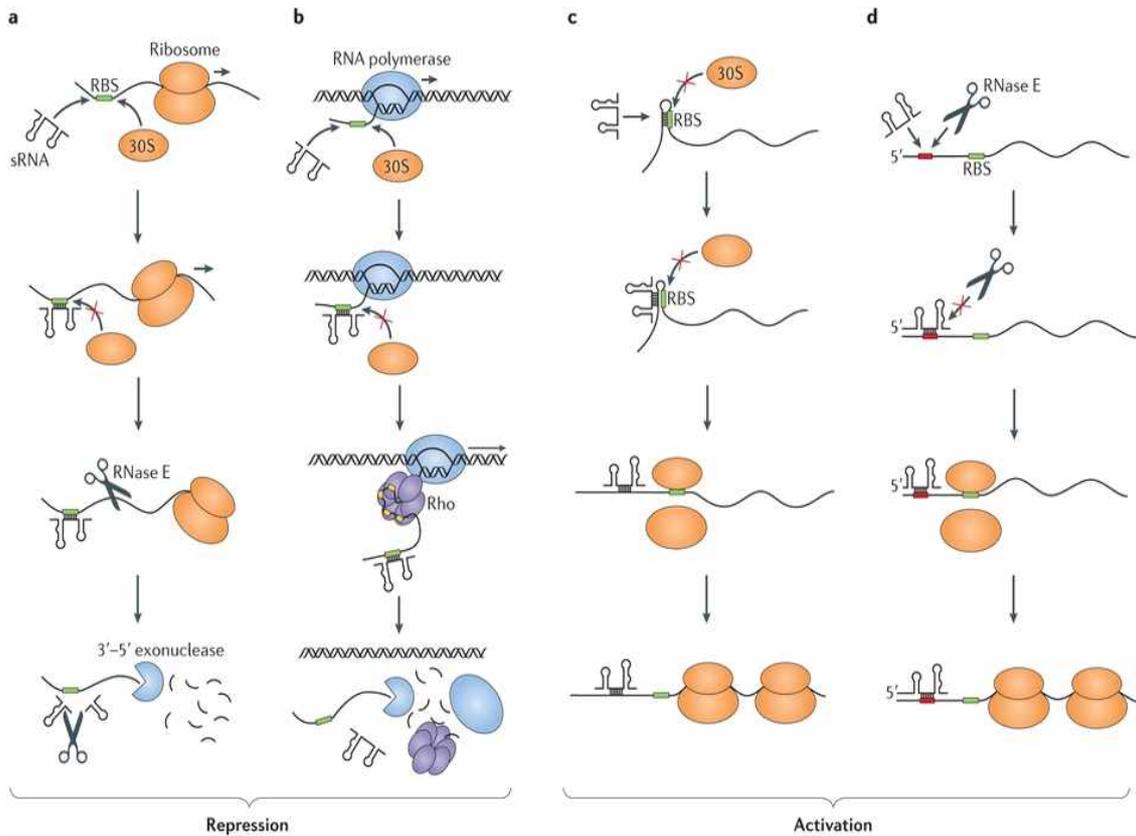


그림 1. 그람-음성 박테리아에서 ncRNA에 의한 유전자 발현 조절 메커니즘 [참고문헌 1에서].

이러한 ncRNA를 통한 세포 대사과정 조절은 모든 박테리아에서 일어날 수 있기 때문에, ncRNA의 염기서열 또는 구조를 조정하면 원하는 유전자의 발현을 인공적으로 억제하거나 증진시킬 수 있는 인공 ncRNA를 설계할 수 있다.

예를 들어 Chappel 등은 [2] 목표 유전자의 전사 개시부에 mRNA 전사를 조절할 수 있는 attenuator 또는 terminator 구조가 있는 mRNA와 결합하도록 고안된 인공 ncRNA를 설계하고, 인공 ncRNA를 발현시켰을 때, mRNA의 전사 개시부에 있는 영역에 결합하면 mRNA 전사가 중단 또는 유지될 수 있도록 유전자 발현 스위치를 제작하였다 (그림 2). 이 시스템은 기본적으로 목표 유전자를 발현할 수 있는 플라스미드와 인공 ncRNA 발현 플라스미드 한 쌍으로 구성되어 있지만, 대장균에서 riboswitch를 가지고 있는 *pbuE* 유전자에서 적용하였을 때 이 유전자 발현을 약 5.4 배 증가시킨다는 것을 보였기 때문에 유사한 구조를 가지는 자연적 유전자에도 적용할 수 있을 것으로 보인다 [3].

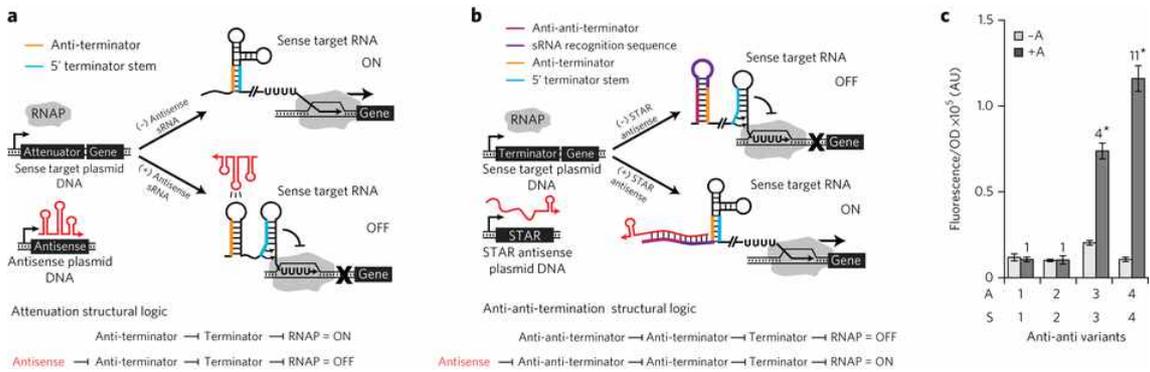


그림 2. 목표 유전자 구조를 변화시켜 전사를 조절하는 인공 sRNA [참고문헌 2에서].

이 외에도, 연구자들은 가장 효과적인 유전자 발현 조절 패턴을 알아내기 위해 다양한 접근법을 시도하였다. ncRNA의 안정성을 높이는 Hfq 단백질의 결합자리와 30개의 무작위 염기서열을 가지고 있는 인공 ncRNA 발현 플라스미드 라이브러리를 대장균에 적용하여, 대장균의 성장을 저해하는 ncRNA를 선별한 후, 해당 ncRNA의 무작위 염기서열과 각 ncRNA에 의한 유전자의 발현 변화의 양상을 분석하여 인공 ncRNA의 작동 메커니즘을 유추하는 연구가 시도되었다 [4].

또한, Hfq 단백질과의 결합자리, 목표 유전자 또는 mRNA의 위치, 염기서열의 길이, 목표 서열과 인공 sRNA와의 결합 구조, 리보솜과의 상호작용 등 많은 구조적 요소를 감안한 열역학적 설계를 통해 최적의 인공 sRNA 주형을 제작하려는 시도가 있었다. Hoynes-O'Connor와 Moon은 [5] 여러 종류의 유전자 회로에서 다양한 구조와 서열을 지닌 인공 sRNA들을 설계하기 위하여 규칙을 고안하고 이 규칙에 따라 인공 ncRNA들을 제작하고 효율을 검증하였다 (그림 3). 이러한 시도를 통하여 넓은 범위의 유전자를 제어할 수 있는 포괄적 인공 ncRNA를 제작이 가능해 질 수 있을 것으로 보인다.

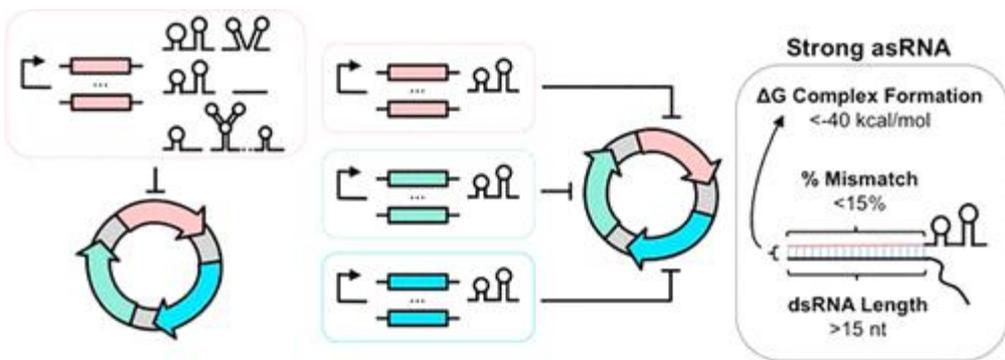


그림 3. Antisense RNA 제작을 위한 설계 규칙 고안 [참고문헌 5에서].

3. 고찰

RNA가 단백질처럼 세포내에서 다양한 세포대사 조절에 관여한다는 것이 알려지면서, 합성생물학 분야에서도 자유자재로 목표 유전자의 발현을 조절할 수 있는 RNA의 설계가 체계적으로 연구되고 있다. 이러한 합성생물학 분야에서 ncRNA의 광범위한 적용 연구가 차차 성과를

보임에 따라, DNA 수정을 통한 유전자 발현 조절 방법보다 더 간편하고 범용적으로 유전자 발현 조절 체제를 구축할 수 있는 인공 ncRNA의 응용 가능성은 매우 높을 것으로 예상된다.

4. 참고문헌

- [1] Bossi, L. and Figueroa-Bossi, N. (2016) Competing endogenous RNAs: a target-centric view of small RNA regulation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 775-784.
- [2] Chappell, J., Takahashi, M. K., and Lucks, J. B. (2015) Creating small transcription activating RNAs. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 214-220 .
- [3] Meyer, S., Chappell, J., Sankar, S., Chew, R., and Lucks, J. B. (2016) Improving fold activation of small transcription activating RNAs (STARs) with rational RNA engineering strategies. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 216-225.
- [4] Noro, E., Mori, M., Makino, G., Takai, Y., Ohnuma, S., Sato, A., Tomita, M., Nakahigashi, K., and Kanai, A. (2017) Systematic characterization of artificial small RNA-mediated inhibition of Escherichia coli growth, *RNA Biol.* **14**, 206-218
- [5] Hoynes-O'Connor, A and Moon, T. S. (2016) Development of design rules for reliable antisense RNA behavior in *E. coli*. *ACS Synth. Biol.* **5**, 1441-1454.