



2021. 1. 11.(월)

문의 : 담당자 연락처 (02-880-2699)
생명과학부 김종서 교수 (02-880-2698) / 공동교신저자
IBS RNA연구단장, 생명과학부 김빛내리 교수 (02-880-9120) / 공동 교신저자
자연과학대학 생명과학부 나용우 연구원 (02-880-2699) / 제1저자

다세포 조직체 내의 mRNA결합단백질 분석방법 찾았다
-세포주를 넘어서 고등세포 조직체의 RNA결합단백질 프로파일링 되다 -

□ 내용 1

- 우리 몸의 DNA에서 전사되거나 혹은 mRNA 백신 등 외부에서 전달되는 mRNA에서 단백질이 발현되는 과정을 이해하기 위해서는 이를 조절하는 RNA결합단백질들의 종류와 결합하는 방식 등을 이해하는 것이 필수적이다. 현재 활용되는 분석방법론은 자외선 교차결합에 기반을 두고 있기 때문에 세포주 수준에서는 문제가 없지만, 두껍거나 빛이 투과하기 어려운 다세포 조직체, 즉 인간의 장기나 생물조직체 시료 등에서는 적용이 어렵다는 뚜렷한 한계점이 있다.
- 본 연구진은 포르말데히드에 기반한 화학적 교차결합법을 이용하여 생물체내 mRNA와 상호작용하는 단백질을 높은 정확도와 효율로 동정 및 정량할 수 있는 새로운 방법론 (FAX-RIC) 을 개발하였다. 본 방법론을 적용하였을 때 기존 자외선조사법으로는 프로파일링 할 수 없었던 발생초기 생물체와 쥐의 간 등의 장기조직체에서 RNA결합단백질 및 결합자리를 효과적으로 동정할 수 있을 뿐 아니라 정량적 변화를 추적할 수 있다는 것을 세계 최초로 확인하고 보고하였다.

□ 내용 2

- 아프리카 발톱개구리 (학명: *X. laevis*) 는 초기 배아 발생 연구에 널리 사용되어온 실험생물체로, 특히 인간 태아의 발생 및 뇌세포 내의 전령 RNA 번역 조절 등에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려진 CPEB1 단백질의 중요성은 아프리카 발톱개구리의 난자를 이용하여 처음으로 밝혀지고 보고가 되었다. 연구진은 새롭게 개발된 방법론을 발톱개구리의 난자가 배아로 성장하는 시스템에 적용하여 CPEB1 단백질을 비롯한 수백 개의 RNA결합단백질들을 동정하였는데, 이 연구에서 관찰된 RNA와 단백질간 상호작용이 역동적으로 변화할 수 있다는 현상은 앞으로 생명체 발생과정에서의 RNA결합단백질의 숨은 기작들을 연구하는데 단초 역할을 할 것으로 기대된다.
- 나아가 연구진은 쥐의 간 조직체 내에서 아데닌꼬리를 가지는 mRNA, 그리고 아데닌꼬리가 없는 전체RNA와 결합하는 단백질들을 각각 프로파일링할 수 있음을 최초로 보고하였다. 그 결과를 통하여 연구진은 이 방법론이 인간의 장기조직체 시료를 비롯한 모든 조직체 시료에 널리 사용될 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라 아데닌 꼬리가 없는 세균이나 바이러스의 RNA 등에 결합하는 단백질들을 동정하는 데에도 이 방법론이 널리 사용될 수 있음을 시사했다.

[붙임] 1. 연구결과 2. 용어설명 3. 그림설명

연구결과

FAX-RIC enables robust profiling of dynamic RNP complex formation in multicellular organisms *in vivo*

YongwooNa^{1,2}, Hyunjoon Kim^{1,2}, Yeon Choi^{1,2}, SangheeShin^{1,2}, Jae Hun Jung³, S. Chul Kwon^{1,2}, V.Narry Kim^{1,2,*}, and Jong-Seo Kim^{1,2,*}

(출간저널: Nucleic Acids Research)

생성부터 분해에 이르기까지 mRNA는 수십 개 이상의 RNA결합단백질과 상호작용하며 mRNA-단백질 복합체 형태로 존재한다. 그와 같은 복합체 안에서 역동적으로 변화하고 긴밀하게 조절되는 RNA결합단백질의 구성은 mRNA의 전사와 번역 그리고 분해에 이르는 모든 단계를 조절한다. 그러므로 RNA와 단백질간의 상호작용의 조절은 전사 후 유전자 발현 조절에 필수 요소로 작용한다. 최근에 개발되고 소개된 RNA 결합 단백질 프로파일링 방법들은 생물체내에서의 교차결합의 생성을 통해 가능하게 되었다. 자외선 빛 조사에 기반한 생물체 내에서의 RNA와 단백질간의 교차결합은 현재 RNA 생물학 전반에서 가장 널리 쓰이는 방법이지만 조직이나 다세포생물체 안으로 침투하는 깊이가 얕아 그와 같은 실험 환경에 대한 연구에서는 효과적이지 않다는 뚜렷한 한계점이 있다.

이 연구는 포르말데히드 기반의 생물체 내 교차결합 방법을 이용하여 RNA결합단백질 구성요소를 프로파일링 하는 방법론을 개발하고 그 방법의 효용성을 확인하였다. 먼저 새롭게 개발된 방법론은 배양된 세포 내에서 RNA와 직접 결합하는 것으로 알려져 있는 인간 단백질에 높은 특이성을 가짐을 확인할 수 있었다. 나아가서 자외선 조사 기법 또는 포르말데히드에 기반한 방법에 의해 비교적 높은 효율로 분석된 RNA결합단백질들의 확인을 통해서 두 방법론의 특이점을 확인할 수 있었다.

포르말데히드에 의해서 생성된 교차결합은 높은 온도에서는 빠르게 역반응을 일으키고 없어진다는 특징을 가지고 있다. 이와 같은 성

질을 이용하여 펩타이드 수준에서의 RNA결합 단백질 동정 방법론이 개발되었고 포르말데히드에 의해서 RNA와 교차결합 되는 부근의 단백질 서열을 확인하는 것 또한 가능하게 하였다. 펩타이드 수준에서의 RNA결합 단백질 동정 방법론은 또한 포유류의 조직 내에서의 RNA결합단백질 동정 방법을 개발하는데 사용이 되었다. 새롭게 개발된 방법은 쥐의 간에 적용되어 아데닌 꼬리를 가진 RNA와 전체 RNA에 특이적인 RNA결합단백질을 확인하는 것을 가능케 하였다.

포르말데히드에 기반한 RNA결합단백질 동정 방법은 *Xenopus laevis* 의 난자와 배아에도 적용되었고 그 결과는 자외선 조사 기반의 방법을 통하여 얻은 결과와 비교되었다. 새로운 방법론이 훨씬 더 포괄적이고 정확한 RNA결합단백질 동정을 가능하게 함이 그 비교 실험결과를 통하여 확인되었다. 나아가서 두 개의 다른 발생단계에서 동정된 단백질들의 양적 비교를 통하여 난소에서 초기 배아발생 과정에서 동적으로 변화된 RNA와 단백질간의 상호작용을 확인 할 수 있었다. 그 중 특히 주목할 만한 결과는 중요한 단백질 번역 개시 인자인 eIF4E 와 eIF4E3 의 변화 등이었다.

용 어 설 명

1. 전령RNA (messenger RNA 혹은 mRNA)

- 전령RNA는 DNA에 보관되어 있는 유전 정보를 단백질로 전달해주는 매개체로, 모든 생명 활동에 핵심인 물질이다. 전령RNA는 염기서열로 암호화되어 있는 유전 정보를 포함하고 있으며 조절 및 보호를 위해 성숙 과정 중에 뒤쪽 말단에 긴 아데닌 꼬리를 가진다.

2. RNA결합단백질 (RNA-binding protein)

- RNA 서열 또는 구조를 인지하여 특이적으로 결합하는 단백질.

3. 질량분석 (mass spectrometry)

- 전체 분자의 질량을 측정한 뒤, 이를 쪼갠 분자 질량을 각각 측정해 분자를 동정하고 정량하는 기술.

4. 펩타이드 (peptide)

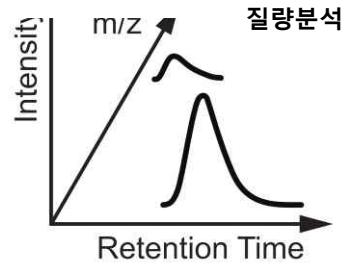
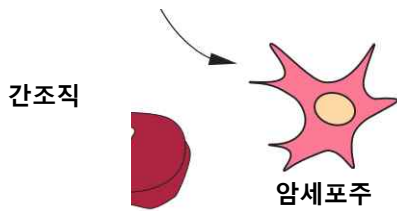
- 단백질의 조각으로, 여러 개의 아미노산이 연결돼 이루어진 분자.

그림 설명

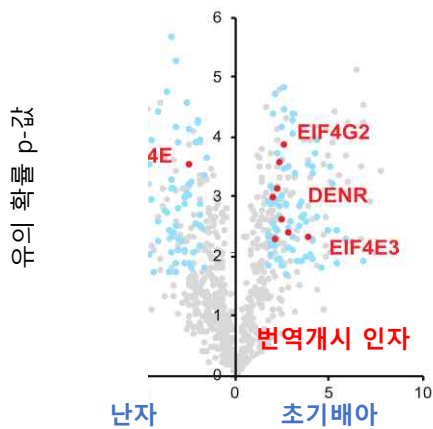
포름알데히드 교차결합

mRNA결합 단백질 프로파일링

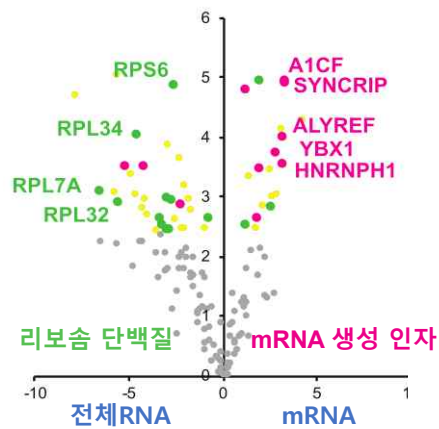
발생 초기 생물체



개구리 발생 초기 mRNA결합 단백질



간조직 RNA 결합 단백질



생물조직체 내에서의 RNA결합단백질 분석방법에 대한 모식도

인간의 장기나 생물체의 조직과 같은 비교적 큰 크기의 시료를 일정 크기로 분해하여 준비한 뒤 포름알데히드에 담금으로서 RNA결합단백질과 mRNA를 포함한 전체RNA 사이의 교차결합을 유도하게 된다. 그리고 이와 같은 RNA결합단백질들을 단백분해효소 처리를 통해서 RNA결합 부위만 남기게 되고 그러한 시료들을 mRNA 혹은 전체RNA 등 목표로 하는 RNA 특이적으로 모은 뒤, 질량분석을 통하여 RNA결합단백질 동정 및 결합부위의 확인을 가능케 한다.