

다양한 유전자 발현 조절의 증추: Non-coding RNA 분석 기술소개

Non-coding RNA 는 miRNA, siRNA, piRNA 등을 포함하며, 유전자 발현과 유전자 안정성의 중요한 조절인자 역할을 하는 인자로 점점 더 많은 연구자들이 이에 주목하고 있다. ncRNA 는 일반적으로 20~200bp 의 길이의 small ncRNA 부터 long ncRNA(lncRNA)의 경우 수 백에서 수천 bp 의 길이를 보인다. NGS 기술이 발달하여 생명체의 ncRNA 집단의 광범위한 다양성과 복잡성이 있음이 밝혀졌다. 특히 ncRNA 는 발달, 면역반응, 스트레스 적응 및 노화에 이르기까지 다양한 생리적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. [1,2] 역사적으로 유전자 발현 분석이 mRNA 에 초점을 맞춰왔다면, Arraystar 는 Long non-coding RNA (LncRNA), Downstream-of-Gene Transcripts(DoG RNA), circular RNA, GlycoRNA, microRNA, tRNA 등을 포함한 이전에 탐구되지 않았던 non-coding RNA 영역에서 선구적인 연구를 수행하고 있다. 본 글에서는 이런 ncRNA 를 분석할 수 있는 이바이오젠과 Arraystar 사에서 제공하는 분석서비스와 해당 기술을 이용한 논문을 몇 가지 소개하고자 한다.

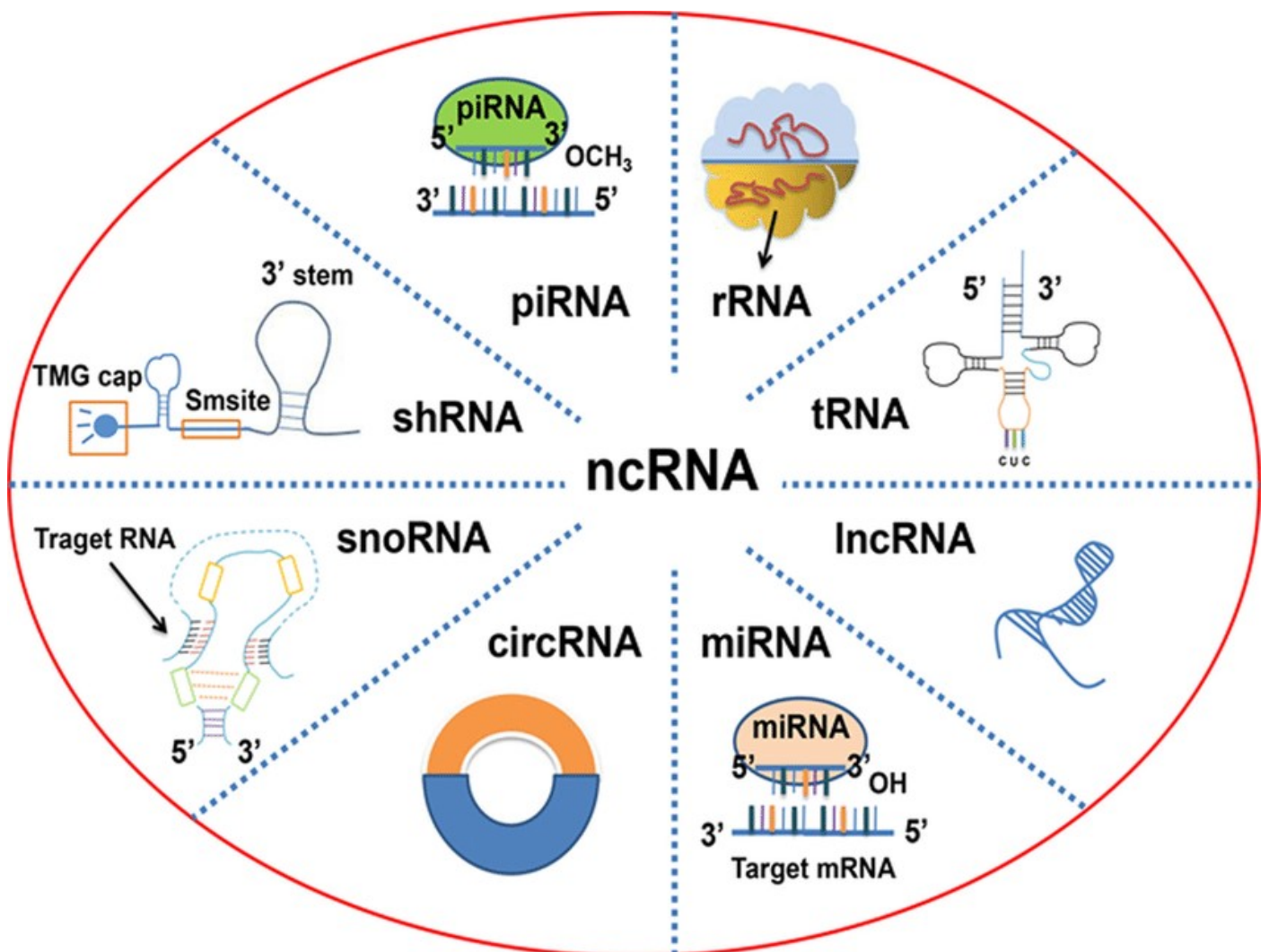


그림 1. ncRNA structures [10]

Non-coding RNA Microarray 분석 소개

Microarray 서비스는 기존 chip 에 부착된 probe 와 형광물질이 labeling 된 시료의 hybridization 즉, 상보적 결합 과정에서 나타나는 형광 밝기를 스캔하여 RNA 발현 패턴을 분석한다. Arraystar 사에서는 다양한 biology 분야에서 전문적인 데이터를 기반으로 다양한 ncRNA 를 볼 수 있는 microarray 서비스를 제공하고 있다.

1. Circular RNA Array Service

Circular RNA 는 linear RNA 와 달리 특이적인 원형구조를 띄고 있어 닫힌 연속 루프를 형성하는 RNA 로 진핵생물 전사체에서 매우 잘 나타나는 형태이다. Circular RNA 의 대부분은 exonic 혹은 intronic sequences 에서 생성되며 종별로 보존되어 발달단계별 특이적인 발현을 보이게 된다. Circular RNA 는 안정적인 구조로 linear RNA 보다 임상관점에서 새로운 바이오마커로서 엄청난 이점을 제공한다. 최근 논문에서 보고된 바론 다양한 종에서 ceRNAs(Competing Endogenous RNAs)라고 불리는 miRNA sponge transcripts 의 기능을 하는 것으로 알려졌다. 이는 Circular RNA 가 miRNA 와 상호작용하여 질병조절에 관여한다는 중요한 단서가 되었다.[5]

Arraystar 에서 제공하는 circular RNA array 은 junction-specific probes 로 정확하고 특이적으로 circRNA 를 labeling 하여 circRNA 발현을 프로파일링할 수 있다. 또한 결과로 miRNA 결합 위치, miRSVR scores, conservation status, miRNA sponges's unravel functional roles 등의 annotation 정보도 제공하고 있다.[5]

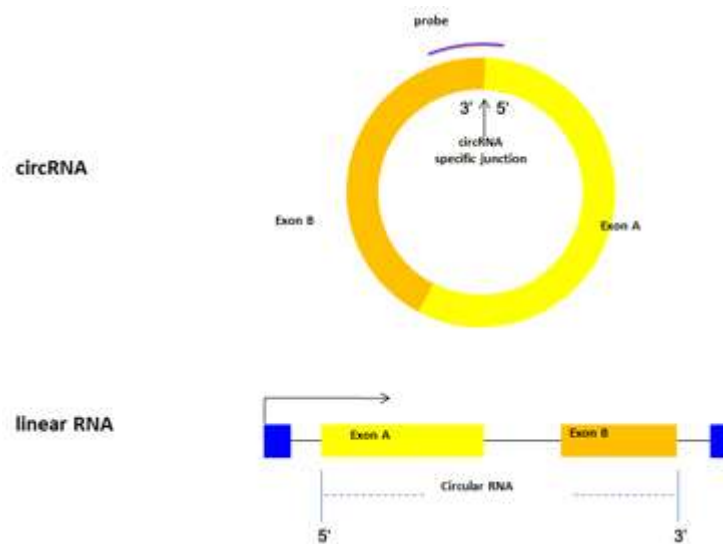


그림 2. CircRNA, linear RNA feature [5]

2. Small RNA Array Service

Small RNA는 약 20~30개 염기로 구성된 짧은 non-coding RNA로, 주로 유전자 발현 조절에 관여한다. microRNA(miRNA), small interfering RNA(siRNA), piwi-interacting RNA(piRNA), tRNA 등이 있으며, 이들은 전사 후 조절(post-transcriptional regulation)부터 유전체 안정성 유지 등 다양한 생물학적 과정에서 핵심적인 기능을 한다. 최근 small RNA 연구는 암, 신경질환 등 다양한 질환에서의 바이오마커로서의 활용되고 있는데, 예를 들어 extracellular vesicle(EV)이나 혈액과 같은 체액에서 small RNA를 분석해 비침습적 진단 기술로 발전시키는 연구가 활발하다. 더불어, CRISPR 기술과 결합해 small RNA의 기능을 정밀하게 조절하거나 표적 유전자 발현을 조절하는 새로운 치료 전략이 개발되고 있다.[3] MicroRNA를 분석하는 방법중에 small RNA-seq이 있다. Exosomal RNA와 같은 극소량 샘플은 microarray 방법으로는 한계가 있는데, Small RNA Seq은 일반적인 샘플뿐만 아니라 극소량의 샘플로도 NGS 기반으로 microRNA의 expression을 분석할 수 있다.

Arraystar에서 제공하는 Small RNA Array Service는 miRNA, pre-miRNA, tRNA, tsRNA, snoRNA에 대한 프로파일링이 가능하다. 이 서비스는 4가지 특징을 가지고 있고 그 특징은 아래와 같다.

- 3' 말단의 인산그룹을 제거하고 Cy3 라벨링하는 "Direct end labeling" 방식을 사용한다.
- 자체 디자인한 2 차구조와 C-Cy3 라벨에 고정된 "G"를 가진 구조를 사용해 probe의 민감도와 결합 후 안정성을 높였다
- 각 small RNA에 특이적으로 제작된 probe는 small RNA에 대한 높은 민감도와 특이성을 가진다
- 손상된 RNA, serum/plasma/body fluid RNA, FFPE RNA 등도 분석할 수 있다.

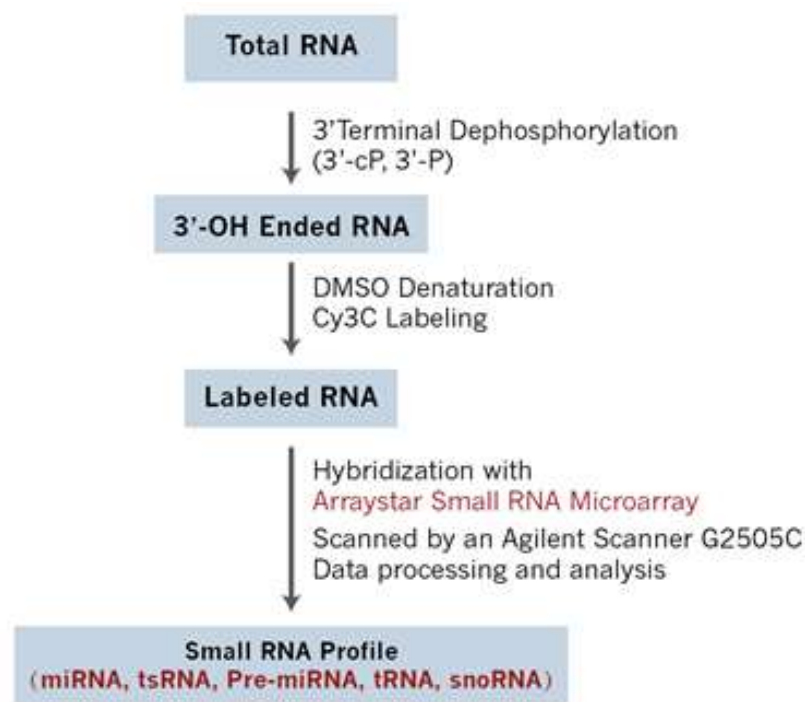


그림 3. Arraystar Small RNA Array Profiling workflow[5]

3. LncRNA Array Service

LncRNA 는 200bp 이상의 길이의 RNA 로, mRNA 와 달리 단백질을 암호화하지 않고 RNA 자체가 기능적으로 작용한다는 특징이 있다. 낮은 발현량으로 존재하며, 단백질 암호화하는 mRNA 와 달리 splicing 이나 connectivity 에 대한 정보가 부족해 프로파일링에 한계가 있다.[5] LncRNA 연구는 암, 세포 노화, 바이러스 감염과 같은 다양한 질환의 기전을 이해하고 치료법을 개발하는 데 중요한 역할을 한다.

Arraystar LncRNA Arrays 는 mRNA 분석에 초점이 맞춰진 RNA-seq 의 단점을 보완하여 LncRNA 를 정밀하게 분석할 수 있는 도구로, 최신 데이터베이스와 논문에서 수집한 39,000 개 이상의 LncRNA 를 포함하고 있다. 이 microarrays 는 유전체 정보, 세포내 위치, miRNA 인식 등 체계적인 주석과 분석을 제공하여 보다 넓은 생물학적 기능과 질병 연관성을 탐구하는 데 도움을 준다.

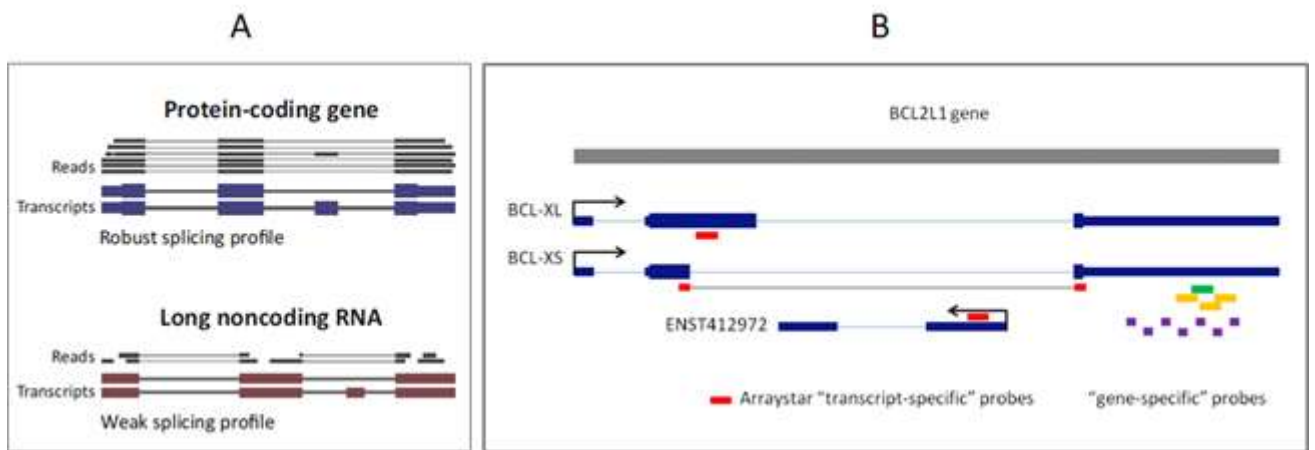


그림 4. (A) Compared with better expressed mRNAs, lowly expressed lncRNA (B) Arraystar LncRNA Microarray transcript-specific probes for BCL-XL, BCL-XS [5]

4. piRNA Array Service

piRNA(piwi-interacting RNA)는 26~32bp 사이즈로, 동물세포에서 발현되는 small ncRNA 중에서 가장 큰 범위를 차지하고 있다. piRNA 는 Argonaute 단백질의 Piwi(P-element Induced Wimpy Testis) 서브 패밀리와 복합체를 이루고 있는데, 이러한 복합체는 생식세포에서 유전자 침묵 (특히 레트로 트랜스포존에 대한) 기능을 통해 정자형성 과정에 필수적인 것으로 밝혀졌다. Piwi 하위 그룹은 파리의 Piwi, Aubergine 및 AGO3, 쥐의 MILI, MIWI 및 MIWI2, 인간의 HILI, HIWI1, HIWI2 및 HIWI3 로 구성된다. piRNA 들은 그 종류가 수만개로 다양하며 중간 보존이 되지 않는 특징이 있고 그 길이와 발현 패턴, 유전자 조작방식 생합성 과정 등에서 miRNA 와 현저히 다른 특징을 보이고 있다.[3]

Arraystar 에서는 human, mouse, rat 에 대한 piRNA arrays 를 개발하여 제공하고 있다. 각 probe 는 NCBI DB 인 HG19(human), MM9(mouse), RN4(rat)을 기반으로 디자인하였다. 개발된 probe 는 이중설계를 이용하여 60-mer 로 probe 제작되어 높은 민감도와 정확도를 제공하고 있다.[5]

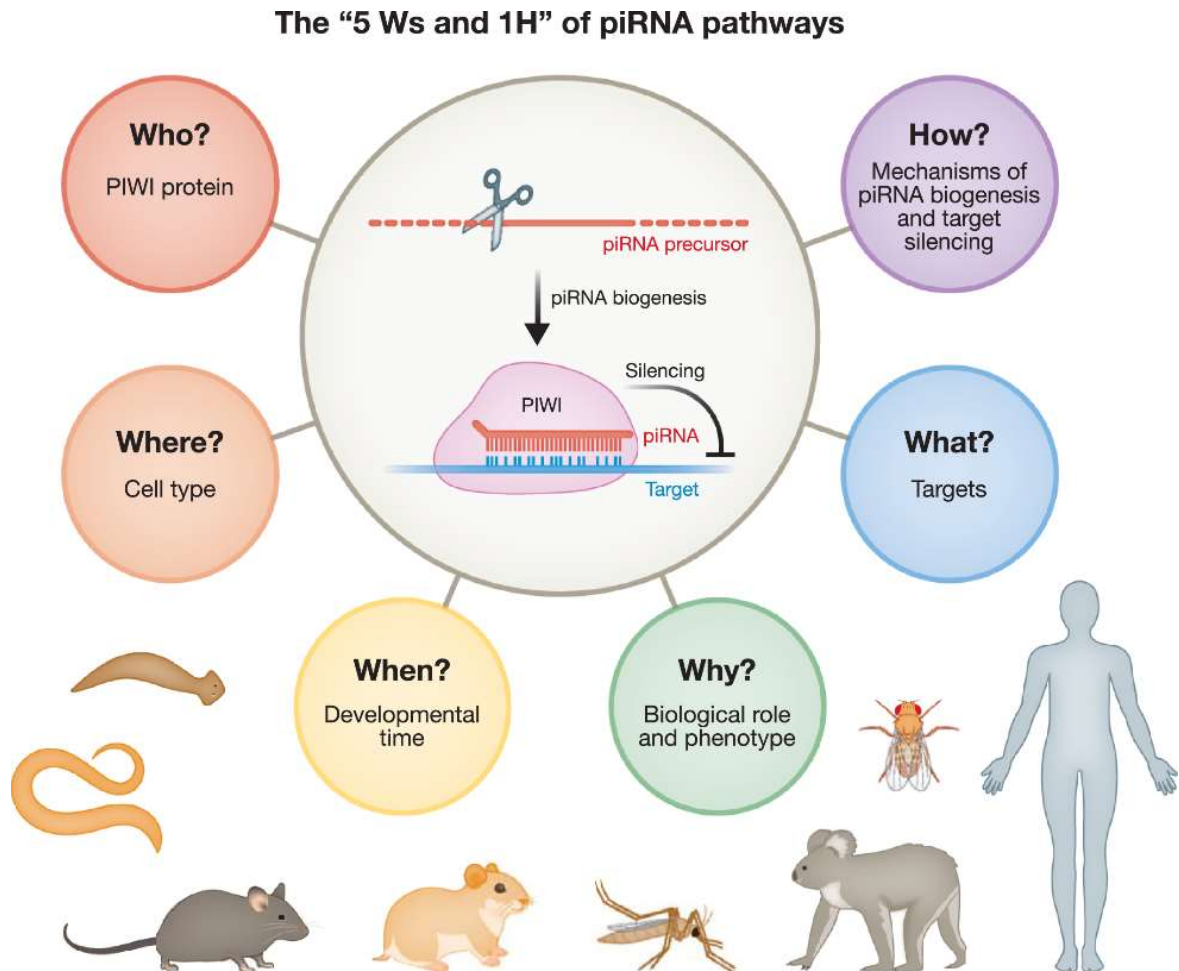


그림 5. The 'Ws and H' guidelines for piRNA biology in animals. [6]

5. Downstream-of-Gene Transcript (DoG RNA) Array Service

Downstream-of-Gene Transcript (DoG RNA)는 host genes 의 downstream 에 10% 정도에 연속적으로 생성된 서열이다. DoG RNA 은 일반적으로 mRNA 의 3'-말단 종결이 비효율적으로 작용하여 정상적인 종결 지점을 지나 전사가 일어나는 read-through 전사로 인해 생성된다. 따라서 DoG RNA 는 전사의 시작이 프로모터에서 시작하지 않는 특징을 가지며, 전사 종결 부위(transcription end site, TES)의 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal, PAS)를 기준으로 최소 5 kb 이상의 길이이고, 포유류에서는 최대 200kb 에 이르는 것으로 밝혀졌다. 이러한 확장된 길이로 인해, DoG RNA 는 종종 downstream 의 다른 전사 서열과 겹친다는 특징을 보인다. DoG RNA 를 생성하는 유전자들은 전형적으로 read-through 전사에 취약한 **독특한 크로마틴 특징**을 가지는데, 예를 들어, 전사 신장을 유도하는 히스톤 마커(H3K36me3 및 H3K79me2)가 풍부하거나, 전사 종결 역할을 하는 폴리아데닐화 신호(PAS)를 더 약하다. 이러한 조절 메커니즘은 기존 유전자의 활성화와 별개로 나타나기 때문에 유전자 발현의 다양성을 나타낼 수 있으며 이는 생리학적, 병리학적으로 중요한 연구지표로 여겨진다. [7]

Arraystar 에서 제공하는 DoG RNA Array Service 는 DoG RNA 뿐아니라 호스트 유전자의 pre-mRNA, 그리고 잠재적인 조절 타겟인 downstream 의 겹치는 전사체에 대한 13000 개 이상의 probe 로 구성되어 있어 높은 민감도와 정확도로 프로파일링할 수 있다. [5]

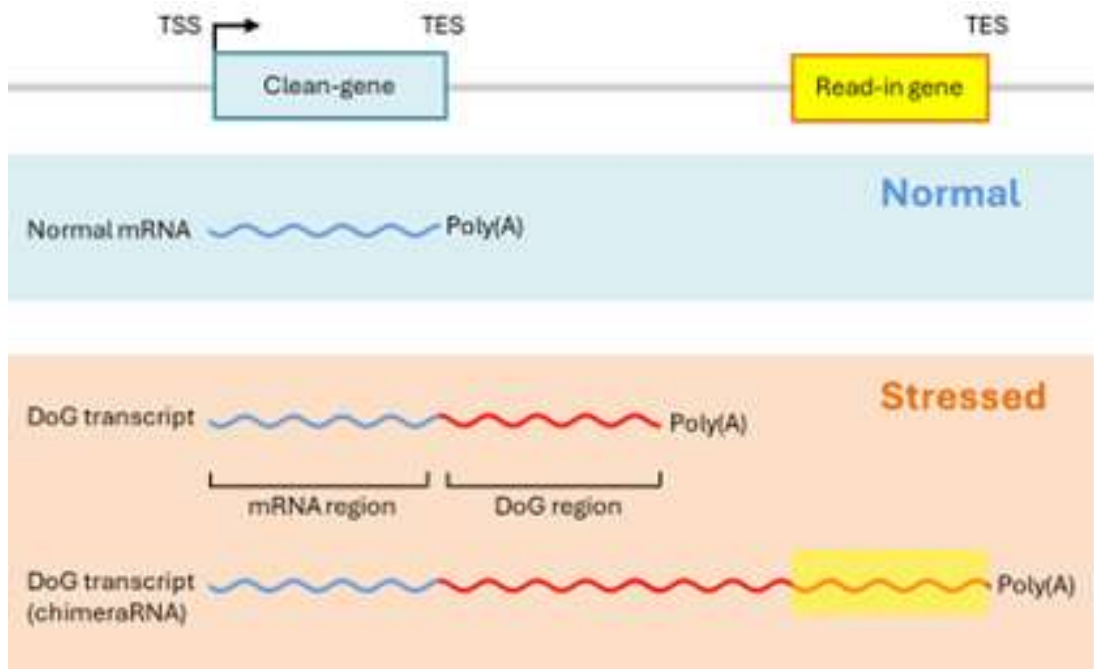


그림 6. Normal mRNA and DoG RNA [5]

6. GlycoRNA Array Service

GlycoRNA 는 glycosylation 되어 있는 non-coding RNA 로 small nuclear RNAs (snRNAs), ribosomal RNAs (rRNAs), small nucleolar RNAs (snoRNAs), transfer RNAs (tRNAs), Y-RNAs, microRNAs 등이 포함되어 있다. 최초 GlycoRNA 는 2021 년에 노벨상을 받은 Bertozzi 연구실에서 글리칸 전구체의 metabolic tagging 을 통해 포유류의 소형 non-coding RNA 가 **시아릴화 글리칸**과 결합할 수 있음을 발견하면서 알려졌다. GlycoRNA 는 세포 표면에 존재하며, RNA 와 글리칸의 결합을 통해 세포 간 신호 전달, 면역 조절, 및 RNA 안정성 조절에 기여한다고 알려져다. [5] GlycoRNA 는 그림 7 과 같이 면역 반응 조절에 중요한 시아알산 결합 면역글로불린 유형 렉틴(Siglec) 수용체와 결합할 수 있다.

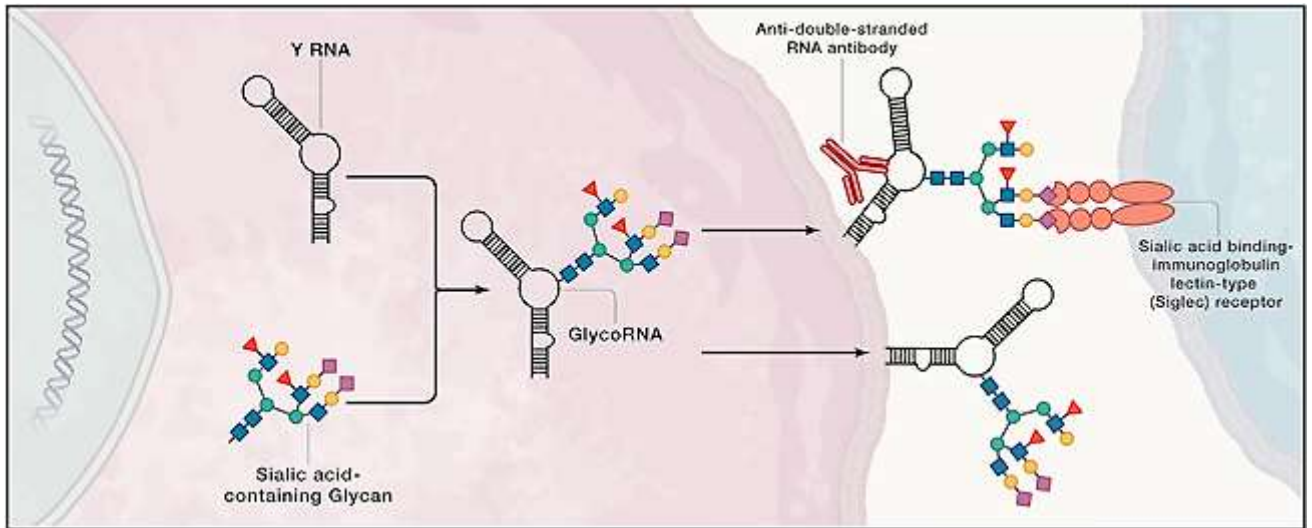


그림 7. RNA glycosylation with sialylated glycan on cell membrane[11]

Arraystar 에서 제공하는 GlycoRNA array 는 glycosylation 되어 있는 non-coding RNA 분석을 목적으로 small nuclear RNAs(snRNAs), ribosomal RNAs(rRNAs), small nucleolar RNAs(snoRNAs), transfer RNAs(tRNAs), Y-RNAs, miRNAs, pre-miRNAs 등의 probe 정보가 포함되어 있어 NGS 방식과 다르게 단 한번으로 다양한 RNA 를 종합적인 분석이 가능하고, 렉틴 결합을 통한 enrichment 와 실험분석의 정확도를 높여 새로운 바이오마커 발굴 등에 용이하다.

1. circRNA array

위 기술들을 활용한 연구 논문을 몇 가지 소개하고자 한다. 첫번째는 circRNA 관련 논문으로 이 논문은 circPHLPP2 가 결장직장암(CRC)에서 Anti-PD-1 치료 저항성을 촉진하는 메커니즘을 탐구했다. circPHLPP2 는 CRC 환자에서 발현이 증가하며, 높은 발현은 더 나쁜 예후 및 낮은 생존율과 관련이 있었다. circPHLPP2 는 ILF3 와 상호작용하여 IL36 γ 의 전사를 활성화시키고, 이를 통해 NK 세포의 종양 침투를 억제했다. 이는 granzyme B 와 IFN- γ 의 발현을 감소시켜 종양의 면역회피를 유도하는 주요 기전으로 작용했다. circPHLPP2 의 발현을 억제하면 NK 세포의 침투와 기능이 회복되어 항-PD-1 치료의 효과가 증가했다. 이로 인해 circPHLPP2 는 CRC 치료에서 중요한 바이오마커 및 치료 타겟으로 제안된다. 또한, circPHLPP2 억제 전략은 면역치료와 병용할시 치료 효능을 크게 강화할 가능성을 보였다. 결론적으로, circPHLPP2 는 CRC 의 종양 미세환경 조절 및 면역치료 반응성에 중요한 역할을 하며, 새로운 치료법 개발에 있어 중요한 분자적 표지가 될 수 있음을 시사한다. [8]

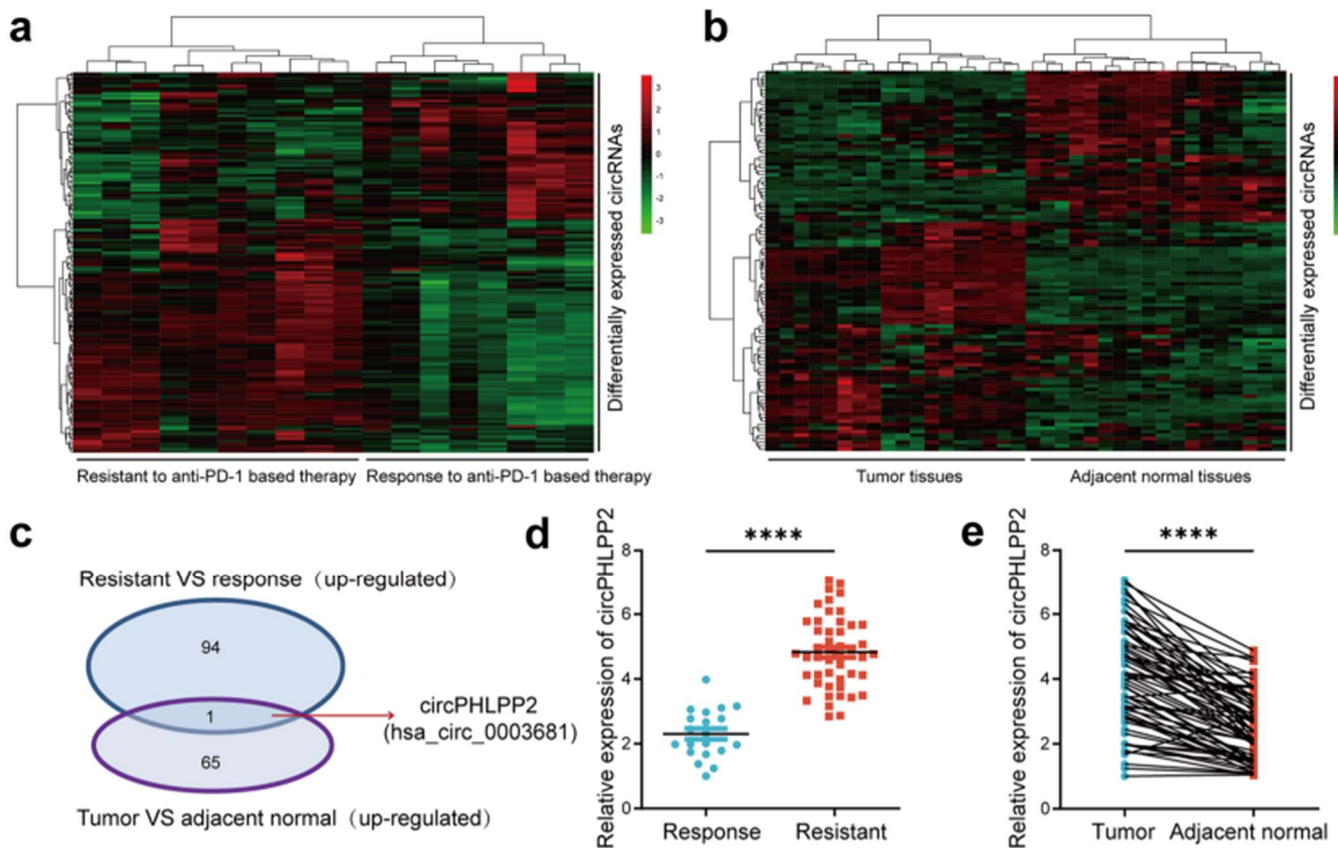


그림 9. Result of circRNA microarray [8]

2. small RNA array

이 논문은 폐동맥 고혈압(PAH)에서 tRNA 유래 소형 RNA(tsRNA)의 발현을 프로파일을 분석한 연구이다. 폐동맥고혈압(pulmonary arterial hypertension, PAH)는 폐동맥 압력이 상승하여 심부전을 초래하는 심각한 심폐 질환으로, 후성유전학적 메커니즘이 복잡하게 얽혀 있다. 연구팀은 PAH 환자의 혈장 샘플과 단일 모노크로탈린(MCT) 유도 쥐 모델의 폐 및 우심실 조직을 분석했다. Microarray 와 RNA 시퀀싱을 통해 인간에서 2,716 개, 쥐 조직에서 4,733 개의 tsRNA 를 확인하였고, 이 중 204 개는 보존된 패턴을 보였다. 발현이 증가한 tsRNA 는 **MAPK 신호 경로**와 연관이 있었고, 감소된 tsRNA 는 **암 신호 경로**에 연관성을 보였다. KEGG 경로 분석은 tsRNA 가 단백질 번역 및 세포 증식 등 다양한 생리학적 과정에 관여함을 시사했다. 이 연구는 PAH 의 발병 메커니즘에 대한 중요한 통찰을 제공하며, tsRNA 를 새로운 바이오마커 및 치료 타겟으로 제안했다. 또한, tsRNA 의 후성유전학적 역할과 다양한 조직 간 상호작용을 이해하는 데 기초 자료로 활용될 수 있다. PAH 치료법 개발과 tsRNA 기반 연구의 확장을 위한 중요한 연구자료를 제공한다.[9]

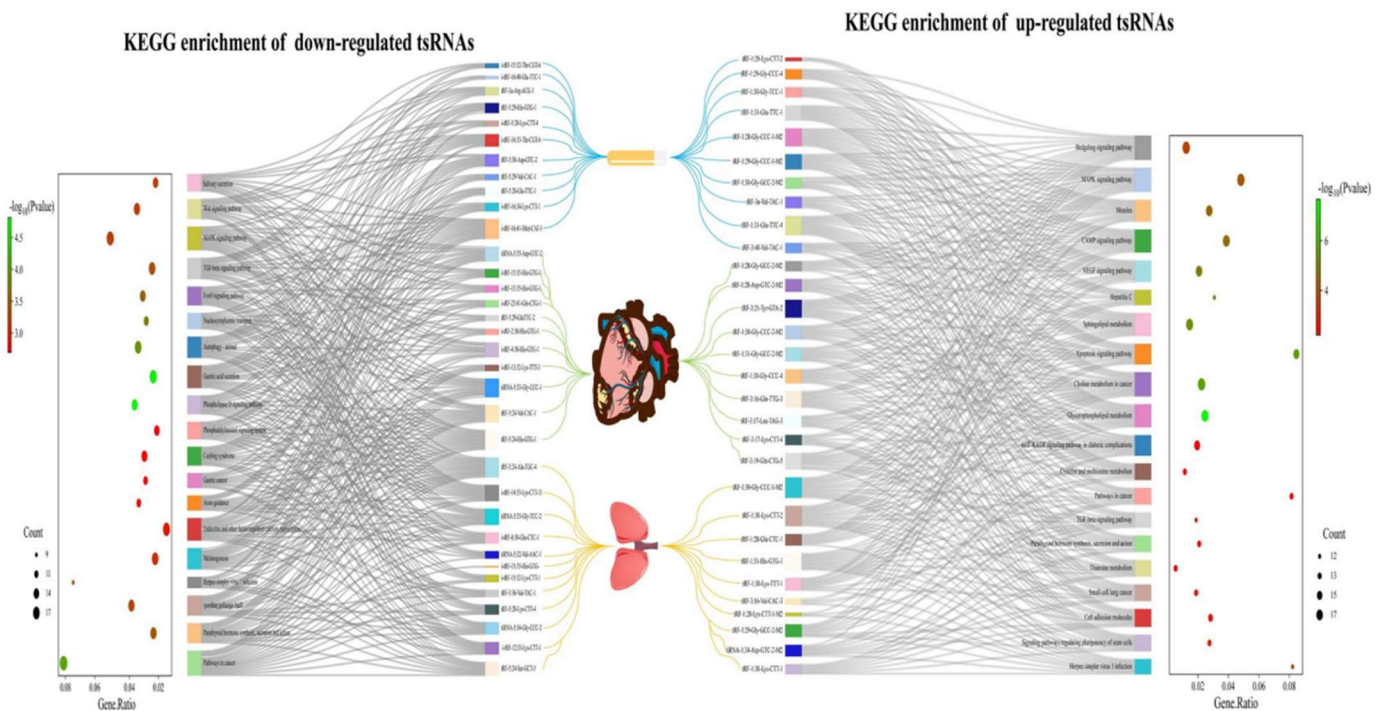


그림 10. KEGG Pathway Enrichment Analysis of Differentially Expressed tsRNAs [9]

Service Overview

1. Arraystar microarray

이바이오젠은 Arraystar 의 대리점으로 Arraystar 의 서비스를 제공하고 있다. 해당 서비스는 Arraystar 본사에서 직접 실험, 분석이 진행되며 이바이오젠을 통해 의뢰할 수 있다. 시료를 의뢰하면 국내에서 RNA QC 를 통해서 상태를 확인한 뒤 Arraystar 에 전달하여 실험, 분석이 진행된다. 서비스 정보는 이바이오젠과 Arraystar 홈페이지를 통해 확인할 수 있으며 이바이오젠에 문의하시면 자세한 상담이 가능하다.

	Species	Probe-binding sites	Array Format
Circular RNA Array	Human/Mouse/Rat	Targeting circular RNA Specific junctions	8x15
Small RNA Array Service	Human/Mouse/Rat	miRNA, pre-miRNA, tRNA, tsRNA, snoRNA	8x15
LncRNA Array Service	Human/Mouse/Rat	mRNA and lncRNA	4 x 44K
piRNA Array Service	Human/Mouse/Rat	piRNA	4 x 44K
Downstream-of-Gene Transcript (DoG RNA) Array	Human	Downstream-of-Gene Transcript (DoG RNA)	8 x 15K
GlycoRNA Array	Human/Mouse/Rat	miRNA/5'tsRNA: 3'tsRNA/ Y-RNA/ snRNA/ snoRNA/ rRNA-derived fragment, pre-miRNA, tRNA, Y-RNA/snoRNA/snRNA/rRNA	8 x 15K

2. Small RNA-seq

세포, 조직, exosome, body fluid 등에 존재하는 microRNA, piRNA 와 같은 small size 의 RNA 의 양을 NGS 시퀀싱을 통해 분석하고 해당 데이터베이스 기반으로 target gene 분석 및 다양한 데이터 분석을 수행한다.

Sample requirement	>2ug total RNA (Tissue, Cell) >20ng RNA (Exosome, Bodyfluid)
Library method	NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit
NGS run format	NextSeq 500/550, SE 75bp
Data yield	>20M read/sample
Turnaround time	~4 weeks after RNA QC
Sample type	Tissue, Cell, Whole Blood(Paxgene), Serum, Plasma, Urine, Exosome, etc.

< 참고 문헌 >

1. Jost, Daniel, Andrzej Nowojewski, and Erel Levine. "Small RNA biology is systems biology." *BMB reports* 44.1 (2011): 11-21.
2. Xiong, Qunli, and Yaguang Zhang. "Small RNA modifications: regulatory molecules and potential applications." *Journal of Hematology & Oncology* 16.1 (2023): 64.
3. Weiland, Matthew, et al. "Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases." *RNA biology* 9.6 (2012): 850-859.
4. Zhang, Y., et al. "P1. 02D. 02 Tumor-Derived Exosomal tsRNA 3'tiRNA-AlaCGC Promotes Immune Tolerance by Inducing Fibroblast Senescence in LUAD." *Journal of Thoracic Oncology* 19.10 (2024): S149.
5. <https://www.arraystar.com/>
6. <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44318-024-00253-8>
7. Rutkowski AJ et al: Widespread disruption of host transcription termination in HSV-1 infection. *Nat Commun* 2015, 6:7126.[PMID: 25989971]
8. Hu, Yan, et al. "Circular RNA circPHLPP2 promotes tumor growth and anti-PD-1 resistance through binding ILF3 to regulate IL36γ transcription in colorectal cancer." *Molecular Cancer* 23.1 (2024): 272.
9. Dynamic PAH-Related Changes: A Dataset of tRNA-Derived Small RNA Transcriptome Across Multiple Organs. Chen Y, et al. *Scientific Data*, 2024
10. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-different-ncRNA-structures-The-figure-shows-the-classification-of_fig1_360350811
11. Disney, Matthew D. "A glimpse at the glycoRNA world." *Cell* 184.12 (2021): 3080-3081.