

초병렬시퀀싱 방법을 이용한 인간 별아교세포의 MicroRNA 프로파일링

김대용¹ · 안성민²

고신대학교 의과대학 신경외과학교실¹
이길여 암·당뇨연구원 유전체학 연구실²

MicroRNA Profiling of Human Primary Astrocytes using Massively Parallel Sequencing

Dae-Yong Kim¹ · Sung-Min Ahn²

Department of Neurosurgery, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea¹
Department of Genomics, Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Incheon, Korea²

Abstract

Background : Astrocytes have multifunctional properties including structural support for nervous tissue and maintaining metabolic environment. Most primary brain tumors such as astrocytomas and glioblastoma originate from astrocytes. MicroRNAs, a class of non-protein-coding RNAs that are ~22 nucleotides in length, have been implicated in the regulation of various biological processes including apoptosis, animal development, physiological functions such as insulin secretion, and differentiation. Recently, miRNAs have been implicated in cancer as important regulators of tumour suppressor genes and proto-oncogenes. The purpose of this study was to provide the fundamental data for molecular-biological understanding and development of novel diagnosis and therapies of diseases involved with astrocytes by profiling microRNAs of human primary astrocytes.

Methods : Human primary astrocytes were prepared from human fetal brains of 12-15 weeks gestation. Astrocytes were purified from other brain cells containing neurons, microglia and oligodendrocytes. Unlike hybridization-based methods, sequencing-based methods allow for direct discovery of novel microRNAs and detection of variations in mature microRNAs. In this study, massively parallel sequencing (MPS) was applied to microRNA profiling in primary human astrocytes.

Results : In total, genomic alignments from 32378 sequence reads were annotated as miRNA, piRNA, snRNA, snoRNA, scRNA, scaRNA, tRNA, rRNA, mRNA or unknown based on their genomic position. Among the 721 known human miRNAs registered in miRBase, 260 miRNAs were recovered in primary human astrocytes libraries. In addition, 27 novel miRNA candidates were identified from unknown clusters of mapped sequence reads. The total set of novel miRNA candidates comprises 27 unique miRNA sequences from introns (12 sequences), intergenic regions (8 sequences), 5' UTR of protein-coding genes (2 sequences), and 3' UTR of protein-coding genes (5 sequence).

Conclusion : To the best of our knowledge, this presented work is the first to describe a miRNA profiling in human primary astrocytes using massively parallel sequencing. Our study might be fundamental for the comprehension of the molecular basis of the pathogenesis of such an aggressive tumor as glioblastoma, and give new clues to develop targeted therapies against this still untreatable cancer. Additional studies are now obviously needed to experimentally identify the targets of modulated miRNAs and to correlate them with brain tumor oncogenesis.

Key words : astrocytes, glioblastoma, microRNA

서 론

뇌를 구성하는 세포는 크게 신경세포(neuron)와 신경

아교세포(neuroglia)로 구분된다. 신경아교세포(neuroglia)에는 서로 다른 형태와 기능을 가진 별아교세포(astrocyte), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte), 미세아교세포(microglial cell) 그리고 뇌실막세포(ependymal cell)가 있다. 신경세포(neuron)는 신경자극의 형태를 전기적 변화로 발생시키고 전도하며 정보를 처리하는 기능을 수행하는 고도로 분화된 활동성 세포로써 신경계에서

교신저자 : 김 대 용
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 신경외과학교실
Tel : +82-51-990-6705 Fax : +82-51-990-3042
E-mail : ykimdy@hanmail.net

중추적 역할을 한다. 그리고 신경아교세포(neuroglia)는 신경세포(neuron)의 주위에 위치하여 신경세포(neuron)를 구조적으로 또는 기능적으로 지원하는 역할을 한다. 이 신경아교세포(neuroglia)의 부피는 뇌와 척수의 전체 부피 가운데 대략 절반 정도를 차지하며, 수는 신경세포(neuron)와 비교하여 거의 10배에 이른다.

별아교세포(astrocyte)는 세포체가 작고, 수십 개의 가느다란 방사상의 돌기를 가지고 있으며, 섬유질의 별아교세포(fibrous astrocyte)와 원형질의 별아교세포(protoplasmic astrocyte)의 두 종류가 존재한다. 중추신경계에서 여러 중요한 기능을 수행하고(Table 1), 정상 혹은 병적인 상황에서 여러 결정적인 과정에 관여할 것으로 생각되고 있다.¹⁾

별아교세포(astrocyte)는 세포외의 과도한 glutamate를 흡수하는 중요한 기능을 수행한다. glutamate는 포유동물의 중추신경계에 존재하는 주요 활동성 신경전달물질로서 여러가지 필수적인 생리적 기능을 수행한다. 별아교세포(astrocyte)에서 sodium dependent glutamate transport가 glutamate의 전달 조절 및 신경독성 수치 밑으로 세포외 glutamate의 농도를 유지하는데 깊은 관련이 있다고 한다.²⁾ 외상, 허혈 및 다른 병적인 상황에서는 산소의 결핍(oxidative stress)으로 별아교세포(astrocyte)가 팽창하게 되고 활동독성 수준까지 세포의 glutamate의 농도가 증가하게 되는데^{3,4)}, 이때는 volume sensitive organic anion channels(VSOAC; also named volume expansion-sensing outward rectifier anion channels)이 활성화되고 glutamate가 방출된다고 한다.⁵⁾ 이와 같이 신경세포(neuron)와 별아교세포(astrocyte)가 긴밀하게 상호작용한다는 여러 근거가 제시되면서 간질(epilepsy)을 포함한 여러 신경계 질환의 개념이 변하고 있다.⁶⁾

신경세포(neuron)는 일생동안 세포 분열이 이루어지지 않는 반면 별아교세포(astrocyte)를 포함한 신경아교세포(neuroglia)는 경우에 따라 평생에 걸쳐 분화를 지속하며 기능을 수행한다. 이 때문에 대부분의 일차성 뇌종양은 신경아교세포(neuroglia)로부터 기원하게 된다. 많은 연구자들이 별아교세포(astrocyte)의 증식에 관심을 가지고 이와 관련된 신호 경로와 분자들을 연구하고 있다. S100B는 별아교세포(astrocyte)에서 만들어지고 분비되는 calcium 결합 단백질로서 세포외 S100B는 별아교세포(astrocyte)의 증식을 유도하며 C6 glioma cell의 증식도 유도한다고 한다.³⁾ 또한 일차 신경세포(neuron)의 배양에서 신경돌기의 확장 및 생존에도 영향을 끼치는 것으

로 보고된다. 이 단백질은 Alzheimer's disease 환자의 뇌에도 증가되어 있어 신경퇴행성 질환의 병리에도 S100B이 관련이 있을 것으로 추측된다.^{4,7)} 최근에는 protein tyrosine phosphorylation이 별아교세포의 증식과 분화에 밀접히 연관이 있을 것이라는 보고도 있다.⁸⁾ 이와 같은 별아교세포(astrocyte)의 증식기능은 종양 발생과 밀접한 관련이 있다. 신경아교세포(neuroglia)에서 기원하는 종양이 전체 두개강내 종양의 40~45% 정도이며, 이중 대부분이 astrocytoma나 glioblastoma와 같은 별아교세포(astrocyte)에서 기원하는 종양이다.

microRNA는 평균 길이가 24 nucleotide 정도인 일종의 RNA로 너무 작아서 어떤 단백질도 암호화할 수는 없지만 번역(translation)을 억제하거나 mRNA를 분해하여 유전자 발현의 조절에 중요한 역할을 한다. 21-22 nucleotide 길이의 mature microRNA는 70-100 nucleotide 길이의 pre-microRNA로 부터 만들어지는데 이는 헤어핀(hairpin) 모양의 구조로 되어있고, 각각의 arm에 mature microRNA가 존재한다. pre-microRNA는 RanGTP/exportin 5에 의해 세포의 핵에서 세포질로 운반되고, 세포질에서 ribonuclease III-like nuclease에 의해 분해되어 mature microRNA가 된다. 이 mature microRNA는 RNA-induced silencing complex(RISC)라 불리는 ribonucleoprotein complex와 결합하며,⁹⁾ 이 RISC complex는 microRNA와 상보적인 혹은 부분적으로 상보적인 target mRNA로 유도되어 결합하게 되고 RISC는 mRNA를 분해하거나 translation을 억제하여 microRNA가 유전자 발현을 조절하게 된다.¹⁰⁾ 이렇게 microRNA는 mRNA의 분해 혹은 유전정보의 translation의 억제에 관여하여 유전자 발현을 조절하는 기능을 함으로써, 세포의 자연사(apoptosis), 지방 대사, 세포 분화, 심장 형성 등의 생물학적 과정 및 종양 형성 등의 질병에 관계된 중요한 과정에 연관되어 지는 것으로 생각되고 있다.

교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같이 아직도 미지인 뇌질환의 근본적인 병인을 이해하기 위해서는 신경아교세포(neuroglia) 중에서 별아교세포(astrocyte)에 보다 더 많은 관심과 연구가 이루어져야 할 필요성이 있다. 최근 유전자 발현의 조절에 결정적인 역할을 하는 microRNA가 발견되어 생물학 전반에 걸쳐 획기적인 변화가 일어나고 있다. 현재 많은 인간의 microRNA가 규명되고 있는 중이며, 또한 인간의 조직, 세포, 발달 단계에 특이적인 microRNA를 규명하여 질병의 병인을 찾아내어 치료에 적용하고자 한다. 그러나 아직도 인간의 별아

Table 1. Functions of astrocytes

중추신경계의 골격 제공	수많은 방사상의 돌기를 가지고 있어 신경세포(neuron)와 신경섬유에 골격을 제공한다.
혈관-뇌 장벽의 형성	종말판(end-feet)은 뇌에 있는 혈관을 촘촘히 감싸 혈관-뇌 장벽(blood-brain barrier)을 형성하며, 혈관에 구조적으로 안정성을 준다. ³¹⁾ 전자 현미경을 이용한 연구에 의하면 성인 뇌혈관은 별아교세포(astrocyte)의 종말판(end feet)에 의해 약 80% 정도가 덮여져 있다고 한다. ³²⁾
아교경계막(glia limiting membrain)의 형성	많은 수의 별아교세포(astrocyte) 돌기들은 뇌의 바깥면의 연막 아래에서 outer glial limiting membrane을 형성하며, 안쪽에서는 뇌실과 척수 중심관의 뇌실막 세포 아래에서 inner glial limiting membrane을 형성한다.
비계(scaffolding)의 기능	태아시기에 미성숙 신경세포(neuron)의 이동에 발판으로서의 역할을 한다.
절연체 기능	별아교세포(astrocyte)의 일부 돌기는 서로 다른 신경세포 연결부(synapse)의 접촉면을 감싸주어 전기 절연체로써 기능을 하여, 주위의 관련없는 신경세포(neuron)에 영향을 주는 것을 막아준다.
과도한 세포의 glutamate의 흡수	세포의 환경의 과도한 신경전달 물질을 흡수하여 일정한 환경을 유지하도록 한다. ³³⁾ 이와 같은 신경전달물질 제거 기전은 정상적인 glutamate의 전달과 신경세포(neuron)를 과도한 신경전달물질에 의한 독성으로부터 보호하는데 필수적이다. ^{6,34)} 이 glutamatergic system의 과자극은 활동 독성(excitotoxicity)을 야기하여 다양한 급만성 중추신경계 질환의 병인에 연관되어질 수 있다고 추정되고 있다. ³⁵⁾
과도한 세포의 K ⁺ 이온	세포의 공간에서 과도한 K ⁺ 이온을 흡수한다.
당원의 저장 및 방출	세포질내에 당원(glycogen)을 저장하였다가 norepinephrine의 자극에 반응하여 glucose로 분해하여 주위 신경세포(neuron)에 방출 한다.
상처 조직의 치유	질병에 의하여 신경세포(neuron)가 죽게 되면 별아교세포(astrocyte)가 증식하여 이전 신경세포가(neuron)가 차지하고 있던 공간을 채우는데 이를 치밀아교반흔조직(gliosis)이라고 한다. 이러한 별아교세포(astrocyte)의 증식은 뇌손상 및 뇌질환의 병적-생리적인 현상으로 상처 치유 과정의 일부이며 뇌경색, 다발성 경화증, Alzheimer's disease 등에서 일어난다. ^{7,8)}
이동 통로의 역할	별아교세포(astrocyte)의 혈관돌기를 통하여 미세혈관으로부터 신경세포(neuron)까지 대사산물 및 원료가 이동한다. 별아교세포(astrocyte)는 상호 협간극 결합(gap junction)으로 연결되어 있어 세포외로의 출입이 없이 다른 별아교세포(astrocyte)로의 이동이 가능하다.
탐식 작용	별아교세포(astrocyte)는 퇴화된 신경축삭 말단을 섭취하는 등의 탐식세포로도 작용할 수 있다.
성장인자의 분비 기능	여러 성장인자를 분비하여 신경세포(neuron)의 성장과 분화에 관여한다. ³⁶⁾

교세포(astrocyte)의 microRNA의 profiling에 대한 연구는 전무한 상태이다.

이에 본 저자는 Massively parallel sequencing (MPS) 방법을 이용한 human primary astrocytes의 microRNA profiling을 시행하여 교모세포종(glioblastoma multiforme) 등의 별아교세포(astrocyte) 관련 뇌질환의 분자 생물학적 연구에 기초를 마련하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 세포배양 : Primary human astrocytes

본 연구에 사용된 Human primary astrocytes는 임신 12-15주의 인간 태아의 뇌에서 얻어졌으며¹¹⁾ 영국 Columbia 대학의 임상 선별 위원회에서 승인을 받았다. 이 조직을 0.25% trypsin과 40 μ g ml⁻¹ DNase를 함유한 phosphate-buffered saline (PBS)에 37 ° C의 온도에서 30 분간 배양하였고, 조심스럽게 pipet을 사용하여 단일 세포들로 분리하였다. 이렇게 분리된 세포들을 10% fetal bovine serum, 20 μ g ml⁻¹ gentamicin, 2.5 μ g ml⁻¹

amphotericine B를 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with high glucose에 부유시켰고, 그리고 나서 poly-lysine-coated T75 flasks (18 ml at 10^6 cells ml^{-1} cell density)에 평판 배양하였다. 24-36시간 후에 DMEM으로 2번에 걸쳐 부착된 세포들을 씻어낸 후 새 배지에 옮겼다. 신경세포(neuron), 미세아교세포(microglia), 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)가 없는 순수한 별아교세포(astrocyte)를 동정하기 위해 일주일 동안 매일 이 단계의 작업을 반복 수행하였다. 이렇게 얻은 세포들의 98% 이상에서 별아교세포(astrocyte)의 표지자인 GFAP에 양성으로 확인되었다.

2. RNA 분리

먼저 Primary human astrocytes를 phosphate buffered saline에 두번 세척하였으며, Qiazol (Qiagen, Germany)을 사용하였다. Qiazol 1ml를 각각의 dish ($\sim 10^7$ cells)에 떨어뜨린 후, 고무 포리스텐을 사용하여 세포들을 제거하고 부유물들을 새로운 시험관에 옮겼다. 이 부유물을 30초간 vortexing 한 후 4°C 에서 10분간 $12,000 \times g$ 의 속도로 원심분리하여 상층액을 새로운 시험관에 옮기고 실내 온도에서 10분간 배양하였다. 0.2 mL chloroform / 1 mL Qiazol을 첨가하고 손으로 강력하게 섞은 후, 실내 온도에서 3분간 배양하여 4°C 에서 15분간 $12,000 \times g$ 의 속도로 원심분리 하였다. 상층부를 새로운 시험관에 옮긴 후 0.5 volume isopropanol을 첨가하여 침전시켰다. 이 혼합물을 실내온도에서 10분간 인큐베이션한 후 4°C 에서 10분간 $12,000 \times g$ 의 속도로 원심분리하였다. 냉각 75% ethanol 0.5 mL로 RNA pellet을 세척한 후 4°C 에서 5분간 $12,000 \times g$ 의 속도로 원심분리 하였다. ethanol을 제거한 후 RNA pellet을 5분간 실내온도에서 건조시켰으며, 20 μL 의 nuclease-free water에 다시 부유시켰다.

3. small RNA library의 준비(Fig. 1)

small RNA library는 small RNA preparation kit (Illumina, U.S.A.)를 사용하여 준비하였다. Total RNA 중에서 10 μg (in 10 μL)이 Novex 15% TBE-Urea PAGE gel (Invitrogen, U.S.A.)에서 크기에 따라 분류되었고, 18-30 nucleotides (nt) band가 제거되어 걸죽하게 되었다. 이를 회전관에 있는 SRA 0.3 M NaCl 300 μL 에 넣어 실내온도에서 4시간 동안 희석하였다. 이 현탁액을 spin-x cellulose acetate filter에 거른 후, glycogen 3 μL 와 실내 온도의

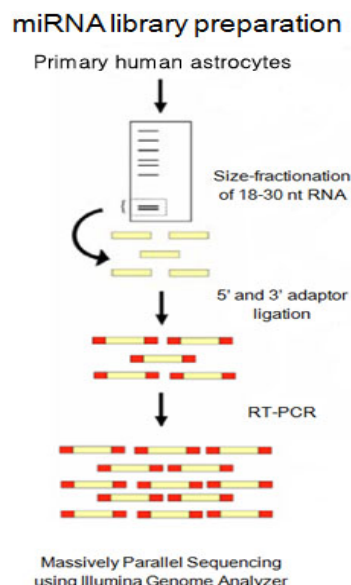


Fig. 1. microRNA library preparation

Small RNAs are size-fractionated using a TBE-Urea PAGE gel. RNA is recovered from 18-30 nt fraction and then ligated with 5' and 3' adaptors. After RT-PCR, the miRNA library was subject to MPS, which includes cluster generation on a flow cell and sequencing. Adapted from Ahn.

100% ethanol 750 μL 을 첨가하여 침전시켰다. RNA pellet을 75% ethanol 750 μL 로 세척하여 실내 온도에서 건조시켰고 초순수(ultra pure water) 5.7 μL 에 재부유시켰다. T4 RNA ligase를 사용하여 SRA 5' adaptor (GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC)를 small RNA에 20°C 에서 6시간 동안 부착하였고 4°C 의 온도에서 밤동안 유지되었다. 이 반응은 SRA gel loading dye 10 μL 를 첨가하여 중단 되어졌다.

이 ligated RNA는 Novex 15% TBE-Urea PAGE gel (Invitrogen, U.S.A.)에서 크기에 따라 분류가 되었고 40-60nt band는 제거되어졌다. 그 RNA는 희석된 후 같은 방법으로 침전되어져 초순수(ultra pure water) 6.4 μL 에 재부유 되었다. T4 RNA ligase를 사용하여 SRA 3' adaptors (UCGUAUGCCGUCUUCUGCUUGUIdT)를 small RNA에 20°C 에서 6시간 동안 부착하였고 4°C 의 온도에서 밤동안 유지되었다. 이 반응은 SRA gel loading dye 10 μL 를 첨가하여 중단 되어졌다. ligated 3' adaptor RNA는 10% TBE-Urea gel (Invitrogen, U.S.A.)에서 크기에 따라 분류되었고, 70-90nt band는 제거되어졌다. 이 RNA는 같은 방법으로 희석, 침전, 재부유 되었다.

small RNA는 superscript II (Invitrogen, U.S.A.)와 SRA RT primer (CAAGCAGAAGACGGCATACGA)에 의하여

single-strand cDNA로 전환된 후 Illumina's PCR primer set (CAAGCAGAAGACGGCATACGA ; AATGATACGGCGACCACCGACAGTTCAGAGTTCTA CAGTCCGA)를 사용하여 증폭되어 졌다. PCR 반응은 98°C에서 30초, 98°C에서 10초 18회, 60°C에서 30초, 72°C에서 15초, 72°C에서 10분 동안 이루어졌다. single-strand cDNA는 6% TBE gel (Invitrogen, U.S.A.)에서 크기에 따라 분류되었고, 대략 92bp band는 제거되어 졌고, 실내온도에서 2시간 동안 1 x gel elution buffer 100 µL에서 배양 되었다. 이 현탁액은 spin-X filter에 의해 걸러진 후 cDNA는 glycogen 1 µL, 3M NaOAc 10 µL과 -20°C 100% ethanol 325 uL를 첨가하여 침전되어 졌다. pellet은 실내온도의 70% ethanol 500 uL로 세척된 후, 실내 온도에서 건조되었다. 드디어 cDNA는 resuspension buffer (Illumina, U.S.A.) 10 µL에 재부유 되어 졌다. 이 library를 평가하기 위하여 Nanodrop spectrophotometer (Thermo, U.S.A)를 사용하여 cDNA 농도와 260/280 nm ratio를 측정하였다.

4. Massively parallel sequencing (MPS)

Illumina 1G genome analyzer를 사용하여 small RNA library의 염기서열을 확인하였다. MSP method¹²⁾의 개요는 Fig. 2와 같다.

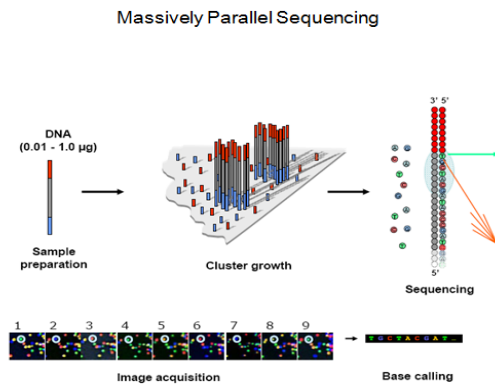


Fig. 2. Massively Parallel Sequencing

After library preparation, miRNAs are hybridized, linearized, and amplified on a flow cell. A flow cell has eight channels, each of which has 330 tiles. Each tile is a basic unit for image acquisition and analysis, and the optimal number of clusters in each tile is ~20,000. As shown in B, ~20,000 clusters in one tile are sequenced simultaneously using image analysis in the Genome Analyzer (Illumina). After each sequencing cycle, clusters with either A, G, T, or C were identified and ~20,000 clusters in each tile were sequenced simultaneously by aligning images as illustrated in the bottom panel of B. Adapted from Illumina (www.illumina.com).

결 과

human primary astrocytes의 small RNA libraries에서 얻어진 모든 염기서열 중에서 조건을 만족하는 genome의 배열을 위치의 중복에 따라 cluster로 분류하였으며, 각각의 cluster의 길이는 30 base pairs 이하로 제한되었다. 총 32378개의 염기서열이 genome의 위치에 기초하여 miRNA(microRNA), piRNA(Piwi-interacting RNA), snRNA(small nuclear RNA), snoRNA(small nucleolar RNA), scRNA(small cytoplasmic RNA), scaRNA(small Cajal body-specific RNA), tRNA(transfer RNA), rRNA(ribosomal RNA), mRNA(messenger RNA), unknown으로 분류되었다. 총 32378개의 small RNA의 염기서열 해독 중에서 85%는 known miRNA였으며, unknown miRNA는 1%이었다(Fig. 3).

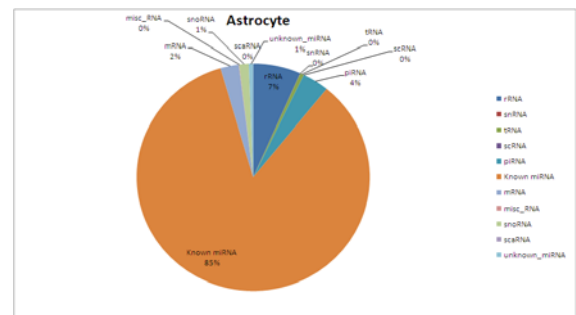


Fig. 3. Distribution of sequence counts for the different classes of small RNAs

miRBase¹³⁾에 등록된 721개의 known human miRNA 중에서 260개의 miRNA가 본 연구의 human primary astrocytes의 small RNA libraries에서 확인되었다(Table 2). 그리고 본 연구에서 721개의 known human miRNA에 포함되어 있지 않는 27개의 novel miRNA candidates가 확인되었다(Table 4).

본 연구에서 확인된 known miRNAs의 genome 위치는 87종류의 miRNA가 intron, 169종류가 intergenic, 3종류가 5' UTR, 1종류가 exon으로 다양하였다. unknown miRNAs의 genome 위치 또한 12종류가 intron, 8종류가 intergenic, 2종류가 5' UTR, 5종류가 3' UTR으로 다양하였다. intron에 위치하는 known miRNAs와 인접한 유전자가 coding한 protein을 살펴보면 Table 3와 같다. 그리고 27개의 novel miRNA candidates 중에서 sequence count가 171로 월등히 많은 unk-23이 가장 신뢰할 만한 novel miRNA candidate로 생각된다(Table 4).

Table 2. Known miRNA expressed in astrocytes

chromosome	miRNA ID	genomic location	adjoining gene	Sequence count
chr1	hsa-miR-34a*	intergenic	no	4
chr1	hsa-miR-214	intron	NM_015569;	10
chr1	hsa-miR-30e*	intron	NM_014223;	33
chr1	hsa-miR-181a*	intergenic	no	18
chr1	hsa-miR-664*	intron	NM_012414;	4
chr1	hsa-miR-320b	intergenic	NM_001007237;NM_001542;	7
chr1	hsa-miR-30c	intron	NM_014223;	10
chr1	hsa-miR-181b	intergenic	no	62
chr1	hsa-miR-186	intron	NM_203350;	24
chr1	hsa-miR-30e	intron	NM_014223;	14
chr1	hsa-miR-92b*	intergenic	NM_001018016;NM_001018017;NM_002456;NM_001044392;NM_001044393;NM_001044390;NM_001044391;NM_007112;	2
chr1	hsa-miR-30c-1*	intron	NM_014223;	1
chr1	hsa-miR-29b	intergenic	no	4
chr1	hsa-miR-320b	intergenic	NM_001007237;NM_001542;	7
chr1	hsa-miR-137	intergenic	no	2
chr1	hsa-miR-760	intergenic	no	2
chr1	hsa-miR-181a	intergenic	no	288
chr1	hsa-miR-92b	intergenic	NM_001018016;NM_001018017;NM_002456;NM_001044392;NM_001044393;NM_001044390;NM_001044391;NM_007112;	68
chr1	hsa-miR-29c	intergenic	no	7
chr1	hsa-miR-101	intron	NM_005772;	627
chr10	hsa-miR-107	intron	NM_148978;	159
chr10	hsa-miR-1254	intron	NM_018237;	0
chr10	hsa-miR-1307	5UTR	NM_032747;	6
chr10	hsa-miR-146b-5p	intergenic	NM_024040	5
chr11	hsa-miR-129-3p	intergenic	no	11
chr11	hsa-let-7a	intergenic	no	60
chr11	hsa-miR-130a	intergenic	NM_145008	125
chr11	hsa-miR-125b-1*	intergenic	no	9
chr11	hsa-miR-125b	intergenic	no	188
chr11	hsa-miR-210	intergenic	NM_003475	22
chr11	hsa-miR-708*	intergenic	no	14
chr11	hsa-miR-130a*	intergenic	NM_145008	3
chr11	hsa-miR-192	intergenic	NM_015104	51
chr11	hsa-miR-34c-5p	intergenic	NM_017589;NM_001100388;NM_207430;	267
chr11	hsa-miR-100	intergenic	no	165
chr11	hsa-miR-129-5p	intergenic	no	4
chr11	hsa-miR-708	intergenic	no	29
chr12	hsa-let-7i*	intergenic	NM_175895	2
chr12	hsa-let-7i	intergenic	NM_175895	304
chr12	hsa-miR-26a	intron	NM_005808;	46
chr12	hsa-miR-331-3p	intergenic	no	6
chr12	hsa-miR-148b	intron	NM_016057;	16
chr13	hsa-miR-92a	intergenic	no	31
chr13	hsa-miR-92a-1*	intergenic	no	2
chr13	hsa-miR-17	intergenic	no	28
chr13	hsa-miR-20a	intergenic	no	3
chr13	hsa-miR-15a	intergenic	no	4
chr13	hsa-miR-16	intergenic	no	11
chr13	hsa-miR-17*	intergenic	no	24
chr13	hsa-miR-18a	intergenic	no	2
chr14	hsa-miR-654-5p	intergenic	no	2
chr14	hsa-miR-409-3p	intergenic	no	144
chr14	hsa-miR-625	intron	NM_178156;	0
chr14	hsa-miR-154*	intergenic	no	14
chr14	hsa-miR-329	intergenic	no	4
chr14	hsa-miR-127-5p	intergenic	no	20
chr14	hsa-miR-494	intergenic	no	13
chr14	hsa-miR-485-5p	intergenic	no	28
chr14	hsa-miR-432	intergenic	no	9
chr14	hsa-miR-493*	intergenic	no	22
chr14	hsa-miR-625*	intron	NM_178156;	0
chr14	hsa-miR-376b	intergenic	no	4
chr14	hsa-miR-487b	intergenic	no	17
chr14	hsa-miR-1185	intergenic	no	2
chr14	hsa-miR-411	intergenic	no	65
chr14	hsa-miR-1185	intergenic	no	2
chr14	hsa-miR-433	intergenic	no	116
chr14	hsa-miR-329	intergenic	no	4
chr14	hsa-miR-342-3p	intron	NM_016337;	12
chr14	hsa-miR-409-5p	intergenic	no	17
chr14	hsa-miR-369-5p	intergenic	no	13
chr14	hsa-miR-654-3p	intergenic	no	5
chr14	hsa-miR-377	intergenic	no	5
chr14	hsa-miR-379	intergenic	no	55
chr14	hsa-miR-382	intergenic	no	127
chr14	hsa-miR-431*	intergenic	no	1

초병렬시퀀싱 방법을 이용한 인간 별아교세포의 MicroRNA 프로파일링

chr14	hsa-miR-1197	intergenic	no	1
chr14	hsa-miR-889	intergenic	no	43
chr14	hsa-miR-376a	intergenic	no	2
chr14	hsa-miR-127-3p	intergenic	no	162
chr14	hsa-miR-369-3p	intergenic	no	21
chr14	hsa-miR-345	intergenic	NM_001039355	7
chr14	hsa-miR-376c	intergenic	no	28
chr14	hsa-miR-380*	intergenic	no	3
chr14	hsa-miR-665	intergenic	no	5
chr14	hsa-miR-655	intergenic	no	4
chr14	hsa-miR-323-5p	intergenic	no	0
chr14	hsa-miR-136	intergenic	no	7
chr14	hsa-miR-377*	intergenic	no	2
chr14	hsa-miR-376a	intergenic	no	2
chr14	hsa-miR-410	intergenic	no	17
chr14	hsa-miR-134	intergenic	no	13
chr14	hsa-miR-323-3p	intergenic	no	183
chr14	hsa-miR-299-3p	intergenic	no	1
chr14	hsa-miR-136*	intergenic	no	5
chr14	hsa-miR-370	intergenic	no	9
chr14	hsa-miR-485-3p	intergenic	no	156
chr14	hsa-miR-299-5p	intergenic	no	4
chr14	hsa-miR-543	intergenic	no	409
chr14	hsa-miR-381	intergenic	no	1
chr14	hsa-miR-495	intergenic	no	42
chr16	hsa-miR-193b*	intergenic	no	2
chr16	hsa-miR-193b	intergenic	no	8
chr16	hsa-miR-1826	intergenic	no	14
chr16	hsa-miR-140-3p	intron	NM_199424;	1202
chr17	hsa-miR-22	5UTR	NM_032895;	223
chr17	hsa-miR-132	intergenic	no	0
chr17	hsa-miR-152	intron	NM_016429;	321
chr17	hsa-miR-193a-3p	intergenic	no	26
chr17	hsa-miR-21*	intergenic	NM_030938	12
chr17	hsa-miR-22*	5UTR	NM_032895;	28
chr17	hsa-miR-744	intron	NM_003010;	37
chr17	hsa-miR-21	intergenic	NM_030938	3561
chr17	hsa-miR-10a	intergenic	NM_024015	11
chr17	hsa-miR-193a-5p	intergenic	no	2
chr17	hsa-miR-423-5p	intron	NM_032141;	90
chr17	hsa-miR-497	intergenic	NM_001004333;NM_174893;	5
chr17	hsa-miR-324-5p	intron	NM_001033859;	4
chr17	hsa-miR-423-3p	intron	NM_032141;	80
chr17	hsa-miR-365*	intergenic	no	8
chr17	hsa-miR-195	intergenic	NM_001004333;NM_174893;	5
chr18	hsa-miR-320c	intron	NM_080597;	5
chr18	hsa-miR-320c	intron	NM_080597;	5
chr18	hsa-miR-1	intron	NM_020774;	159
chr18	hsa-miR-187	intergenic	no	2
chr19	hsa-miR-181c*	intergenic	NM_001098622	6
chr19	hsa-miR-27a	intergenic	NM_023072	62
chr19	hsa-miR-27a*	intergenic	NM_023072	3
chr19	hsa-miR-181d	intergenic	NM_001098622	15
chr19	hsa-miR-181c	intergenic	NM_001098622	5
chr19	hsa-miR-330-3p	intron	NM_012155;	24
chr19	hsa-let-7e	intergenic	no	88
chr19	hsa-miR-23a	intergenic	NM_023072	84
chr19	hsa-miR-24-2*	intergenic	NM_023072	12
chr19	hsa-miR-99b*	intergenic	no	31
chr19	hsa-let-7e*	intergenic	no	1
chr19	hsa-miR-24	intergenic	NM_023072	349
chr19	hsa-miR-99b	intergenic	no	102
chr2	hsa-miR-26b	intron	NM_182642;	26
chr2	hsa-miR-1246	intergenic	no	4
chr2	hsa-miR-217	intergenic	no	9
chr2	hsa-miR-128	intron	NM_015361;	98
chr20	hsa-miR-1292	intron	NM_006392;	0
chr20	hsa-miR-1	intron	NM_020774;	24
chr20	hsa-miR-103	intron	NM_153640;	803
chr21	hsa-miR-125b	intergenic	no	39
chr21	hsa-miR-125b-2*	intron	NM_001005734;	1
chr21	hsa-miR-99a	intron	NM_001005734;	236
chr21	hsa-let-7c	intron	NM_001005734;	202
chr22	hsa-miR-185	intron	NM_152906;	48
chr22	hsa-miR-130b*	intergenic	no	6
chr22	hsa-let-7b*	intergenic	no	4
chr22	hsa-miR-33a	intron	NM_004599;	79
chr22	hsa-let-7b	intergenic	no	558
chr22	hsa-miR-130b	intergenic	no	83
chr22	hsa-let-7a	intergenic	no	9
chr22	hsa-let-7a*	intergenic	no	8
chr22	hsa-miR-1306	exon	NM_022720;	9

chr3	hsa-miR-28-3p	intron	NM_005578;	20
chr3	hsa-miR-191	intron	NM_199074;	268
chr3	hsa-miR-128	intron	NM_016300;	10
chr3	hsa-let-7g	intron	NM_025222;	1164
chr3	hsa-miR-138	intergenic	no	7
chr3	hsa-miR-28-5p	intron	NM_005578;	6
chr3	hsa-miR-15b	intron	NM_005496;	7
chr3	hsa-miR-425	intron	NM_018114;	2
chr3	hsa-miR-16	intron	NM_005496;	7
chr3	hsa-miR-26a	intron	NM_005808;	47
chr3	hsa-miR-425*	intron	NM_018114;	0
chr3	hsa-miR-16-2*	intron	NM_005496;	2
chr4	hsa-miR-367	intron	NM_016648;	2
chr4	hsa-miR-574-3p	intron	NM_138389;	5
chr5	hsa-miR-103	intron	NM_024594;	800
chr5	hsa-miR-1974	intron	NM_173665;	5
chr5	hsa-miR-340	intron	NM_018434;	157
chr5	hsa-miR-886-5p	intergenic	no	177
chr5	hsa-miR-143*	intergenic	no	63
chr5	hsa-miR-378	intron	NM_133263;	172
chr5	hsa-miR-145	intergenic	no	2
chr5	hsa-miR-1271	intron	NM_173664;	16
chr5	hsa-miR-887	intron	NM_012304;	5
chr5	hsa-miR-145*	intergenic	no	4
chr5	hsa-miR-886-3p	intergenic	no	2
chr5	hsa-miR-143	intergenic	no	949
chr6	hsa-miR-30a*	intergenic	no	97
chr6	hsa-miR-30c-2*	intergenic	no	7
chr6	hsa-miR-30a	intergenic	no	348
chr6	hsa-miR-877	intron	NM_001090;	5
chr6	hsa-miR-30c	intron	NM_014223;	10
chr6	hsa-miR-219-5p	intergenic	NM_006979;NM_001077516;NM_014234;NM_002931;	2
chr7	hsa-miR-106b	intron	NM_182776;	30
chr7	hsa-miR-183	intergenic	no	4
chr7	hsa-miR-25*	intron	NM_182776;	61
chr7	hsa-miR-106b*	intron	NM_182776;	21
chr7	hsa-miR-129-5p	intergenic	no	4
chr7	hsa-miR-148a	intergenic	no	20
chr7	hsa-miR-25	intron	NM_182776;	908
chr7	hsa-miR-29b-1*	intergenic	no	2
chr7	hsa-miR-335	intron	NM_177525;	7
chr7	hsa-miR-93	intron	NM_182776;	49
chr7	hsa-miR-29a	intergenic	no	1689
chr7	hsa-miR-182	intergenic	no	7
chr7	hsa-miR-589	intron	NM_024963;	2
chr7	hsa-miR-339-3p	intron	NM_032350;	1
chr8	hsa-miR-151-3p	intron	NM_153831;	84
chr8	hsa-miR-151-5p	intron	NM_153831;	5
chr8	hsa-miR-320a	intergenic	NM_001722	272
chr8	hsa-miR-486-5p	intron	NM_020480;	6
chr8	hsa-miR-486-3p	intron	NM_020480;	2
chr8	hsa-miR-486-3p	intron	NM_020480;	7
chr8	hsa-miR-486-5p	intron	NM_020480;	2
chr8	hsa-miR-598	intron	NM_173683;	7
chr8	hsa-miR-30d	intergenic	no	22
chr9	hsa-miR-27b	intron	NM_032823;	120
chr9	hsa-miR-181b	intergenic	no	192
chr9	hsa-miR-24	intergenic	NM_023072	349
chr9	hsa-miR-101	intron	NM_005772;	629
chr9	hsa-let-7f	intergenic	no	406
chr9	hsa-miR-7	intron	NM_031263;	2
chr9	hsa-let-7a*	intergenic	no	7
chr9	hsa-miR-455-5p	intron	NM_032888;	3
chr9	hsa-miR-23b*	intron	NM_032823;	35
chr9	hsa-miR-455-3p	intron	NM_032888;	6
chr9	hsa-miR-873	intergenic	no	15
chr9	hsa-miR-181a-2*	intron	NM_033334;	26
chr9	hsa-miR-23b	intron	NM_032823;	48
chr9	hsa-let-7a	intergenic	no	50
chr9	hsa-let-7d	intergenic	no	113
chr9	hsa-miR-31	intergenic	no	185
chrX	hsa-miR-424*	intergenic	no	1
chrX	hsa-miR-421	intergenic	no	4
chrX	hsa-miR-98	intron	NM_031407;	14
chrX	hsa-miR-532-5p	intergenic	no	12
chrX	hsa-miR-374a	intergenic	no	10
chrX	hsa-miR-504	intron	NM_033642;	2
chrX	hsa-miR-374a*	intergenic	no	5
chrX	hsa-miR-652	intron	NM_032227;	1
chrX	hsa-miR-224	intron	NM_021990;	6
chrX	hsa-miR-363	intergenic	no	50
chrX	hsa-miR-532-3p	intergenic	no	3

chrX	hsa-miR-501-3p	intergenic	no	2
chrX	hsa-miR-221	intergenic	no	869
chrX	hsa-miR-222	intergenic	no	1001
chrX	hsa-miR-505	intergenic	no	0
chrX	hsa-let-7f	intron	NM_031407;	2793
chrX	hsa-miR-19b	intergenic	no	1
chrX	hsa-miR-500*	intergenic	no	2
chrX	hsa-miR-1277	intron	NM_019045;	4
chrX	hsa-miR-450a	intergenic	no	4
chrX	hsa-miR-221*	intergenic	no	948
chrX	hsa-miR-452	intron	NM_021990;	18
chrX	hsa-miR-450a	intergenic	no	4
chrX	hsa-miR-374b	intergenic	no	10
chrX	hsa-miR-20b	intergenic	no	15
chrX	hsa-miR-503	intergenic	no	3
chrX	hsa-miR-542-3p	intergenic	no	4
chrX	hsa-miR-502-3p	intergenic	no	2
chrX	hsa-miR-92a	intergenic	no	13
chrX	hsa-miR-424	intergenic	no	3
chrX	hsa-miR-361-5p	intron	NM_000390;	2

Table 3. List of protein-coding genes of miRNA origin in astrocytes

miRNA ID	InputID	Gene Name
hsa-miR-214	NM_000390	CHOROIDEEMIA (RAB ESCORT PROTEIN 1)
hsa-miR-30e*	NM_000393	COLLAGEN, TYPE V, ALPHA 2
hsa-miR-664*	NM_001005734	CHROMOSOME 21 OPEN READING FRAME 34
hsa-miR-30c	NM_001033859	ACYL-COENZYME A DEHYDROGENASE, VERY LONG CHAIN
hsa-miR-186	NM_001090	ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY F (GCN20), MEMBER 1
hsa-miR-30e	NM_001271	CHROMODOMAIN HELICASE DNA BINDING PROTEIN 2
hsa-miR-30c-1*	NM_003010	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 4
hsa-miR-101	NM_003134	SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 14KDA (HOMOLOGOUS ALU RNA BINDING PROTEIN)
hsa-miR-107	NM_004599	STEROL REGULATORY ELEMENT BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 2
hsa-miR-1254	NM_005496	SMC4 STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 4-LIKE 1 (YEAST)
hsa-miR-26a	NM_005578	LIM DOMAIN CONTAINING PREFERRED TRANSLOCATION PARTNER IN LIPOMA
hsa-miR-148b	NM_005772	RNA TERMINAL PHOSPHATE CYCLASE-LIKE 1
hsa-miR-625	NM_005808	CTD (CARBOXY-TERMINAL DOMAIN, RNA POLYMERASE II, POLYPEPTIDE A) SMALL PHOSPHATASE-LIKE
hsa-miR-625*	NM_006392	NUCLEOLAR PROTEIN 5A (56KDA WITH KKE/D REPEAT)
hsa-miR-342-3p	NM_012155	ECHINODERM MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN LIKE 2
hsa-miR-140-3p	NM_012304	F-BOX AND LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN 7
hsa-miR-152	NM_012414	RAB3 GTPASE ACTIVATING PROTEIN SUBUNIT 2 (NON-CATALYTIC)
hsa-miR-744	NM_014223	NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR Y, GAMMA
hsa-miR-423-5p	NM_014929	KIAA0971
hsa-miR-324-5p	NM_015361	R3H DOMAIN CONTAINING 1
hsa-miR-423-3p	NM_015448	DELETED IN A MOUSE MODEL OF PRIMARY CILIARY DYSPKINESIA
hsa-miR-320c	NM_015569	DYNAMIN 3
hsa-miR-320c	NM_016057	COATOMER PROTEIN COMPLEX, SUBUNIT ZETA 1
hsa-miR-1	NM_016300	CYCLIC AMP-REGULATED PHOSPHOPROTEIN, 21 KD
hsa-miR-330-3p	NM_016337	ENAH/VASP-LIKE
hsa-miR-26b	NM_016429	COATOMER PROTEIN COMPLEX, SUBUNIT ZETA 2
hsa-miR-128	NM_016648	DKFZP564K112 PROTEIN
hsa-miR-1292	NM_018114	DALR ANTICODON BINDING DOMAIN CONTAINING 3
hsa-miR-1	NM_018237	CELL DIVISION CYCLE AND APOPTOSIS REGULATOR 1
hsa-miR-103	NM_018434	RING FINGER PROTEIN 130
hsa-miR-125b-2*	NM_019045	WD REPEAT DOMAIN 44
hsa-miR-99a	NM_020480	ANKYRIN 1, ERYTHROCYTIC
hsa-let-7c	NM_020774	MINDBOMB HOMOLOG 1 (DROSOPHILA)
hsa-miR-185	NM_020995	HAPTOGLOBIN-RELATED PROTEIN
hsa-miR-33a	NM_021990	GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA) A RECEPTOR, EPSILON
hsa-miR-28-3p	NM_024594	PANTOTHENATE KINASE 3
hsa-miR-191	NM_024963	F-BOX AND LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN 18
hsa-miR-128	NM_025222	TRANSMEMBRANE PROTEIN 113
hsa-let-7g	NM_030955	ADAM METALLOPEPTIDASE WITH THROMBOSPONDIN TYPE 1 MOTIF, 12
hsa-miR-28-5p	NM_031263	HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN K
hsa-miR-15b	NM_031407	HECT, UBA AND WWE DOMAIN CONTAINING 1
hsa-miR-425	NM_032141	COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 55
hsa-miR-16	NM_032227	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ20173
hsa-miR-26a	NM_032350	HYPOTHETICAL PROTEIN MGC11257
hsa-miR-425*	NM_032823	CHROMOSOME 9 OPEN READING FRAME 3
hsa-miR-16-2*	NM_032888	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ11895
hsa-miR-367	NM_033334	NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 6, GROUP A, MEMBER 1
hsa-miR-574-3p	NM_033642	FIBROBLAST GROWTH FACTOR 13
hsa-miR-103	NM_080597	OXYSTEROL-BINDING PROTEIN-RELATED PROTEIN 1
hsa-miR-1974	NM_080656	SIMILAR TO RIKEN CDNA A430101B06 GENE
hsa-miR-340	NM_133263	PEROXISOME PROLIFERATIVE ACTIVATED RECEPTOR, GAMMA, COACTIVATOR 1, BETA
hsa-miR-378	NM_138389	HYPOTHETICAL PROTEIN BC001096
hsa-miR-1271	NM_138783	ZINC FINGER PROTEIN 653
hsa-miR-887	NM_148978	PANTOTHENATE KINASE 1
hsa-miR-877	NM_152906	CHROMOSOME 22 OPEN READING FRAME 25
hsa-miR-30c	NM_153640	PANTOTHENATE KINASE 2 (HALLERVORDEN-SPATZ SYNDROME)

hsa-miR-106b	NM_153831	PTK2 PROTEIN TYROSINE KINASE 2
hsa-miR-25*	NM_173664	ADP-RIBOSYLATION FACTOR-LIKE 10
hsa-miR-106b*	NM_173665	HYPOTHETICAL PROTEIN MGC34713
hsa-miR-25	NM_173683	CHROMOSOME 8 OPEN READING FRAME 7
hsa-miR-335	NM_177525	MESODERM SPECIFIC TRANSCRIPT HOMOLOG (MOUSE)
hsa-miR-93	NM_178156	FUCOSYLTRANSFERASE 8 (ALPHA (1,6) FUCOSYLTRANSFERASE)
hsa-miR-589	NM_182642	CTD (CARBOXY-TERMINAL DOMAIN, RNA POLYMERASE II, POLYPEPTIDE A) SMALL PHOSPHATASE 1
hsa-miR-339-3p	NM_182776	MCM7 MINICHROMOSOME MAINTENANCE DEFICIENT 7 (S. CEREVISIAE)
hsa-miR-151-3p	NM_198040	POLYHOMEOTIC-LIKE 2 (DROSOPHILA)
hsa-miR-151-5p	NM_199074	CHROMOSOME 3 OPEN READING FRAME 60
hsa-miR-486-5p	NM_199424	WW DOMAIN CONTAINING E3 UBIQUITIN PROTEIN LIGASE 2
hsa-miR-486-3p	NM_203350	ZINC FINGER PROTEIN 265

Table 4. Putative novel miRNA expressed in astrocytes

chromosome	miRNA ID	genomic location	adjoininggene	Sequence count
chr1	unk-1	intergenic	no	4
chr1	unk-2	5UTR	NM_006004;	1
chr1	unk-3	intron	NM_198040;	2
chr10	unk-4	intron	NM_015448;	1
chr10	unk-5	intron	NM_015448;	1
chr14	unk-6	intergenic	no	0
chr15	unk-7	intron	NM_003134;	1
chr15	unk-8	intron	NM_001271;	0
chr16	unk-9	intron	NM_020995;	2
chr19	unk-10	intron	NM_138783;	0
chr19	unk-11	3UTR	NM_001961;	2
chr19	unk-12	5UTR	NM_000146;	0
chr2	unk-13	intron	NM_014929;	1
chr2	unk-14	intron	NM_000393;	2
chr2	unk-15	intron	NM_014929;	1
chr20	unk-16	intergenic	no	0
chr20	unk-17	intergenic	no	2
chr22	unk-18	intergenic	NM_152267	15
chr22	unk-19	intergenic	no	0
chr3	unk-20	intergenic	NM_003907	4
chr5	unk-22	3UTR	NM_017838;	0
chr5	unk-23	intron	NM_030955;	171
chr5	unk-24	intron	NM_080656;	0
chr5	unk-25	3UTR	NM_032042;	1
chr7	unk-26	3UTR	NM_020119;	0
chr9	unk-27	3UTR	NM_013438;	0
chrM	unk-28	intergenic	no	2

고찰

22nt 크기의 noncoding RNA인 microRNA는 유전자 발현의 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 유전자 발현의 조절을 통해 microRNA는 세포의 자연사(apoptosis), 지방 대사, 세포 분화, 심장 형성 등의 생물학적 과정 및 종양 형성 등의 질병에 관계된 중요한 과정에 관여하는 것으로 생각되고 있으며, 현재 이에 대한 많은 연구가 생물학 전분야에 걸쳐 활발히 진행 중이다.

일부의 microRNA는 조직, 기관 혹은 발달 단계에 특이적으로 발현되는 것이 확인되었다.¹⁴⁾ 흥미롭게도 이 특이적인 microRNA의 약 절반 정도가 뇌에 특이적이거나 의미있게 증가되어 발현된다. 그러나 척추동물의 중추신경계에서는 조직의 위치, 세포 종류, 발달 단계에 따라 microRNA의 발현은 매우 복잡하면서도 다양한 양상을 보인다. 예를 들면 miR-124, miR-128는 신경세포(neuron)에서 발견되는 반면 miR-23, miR-26, miR-29는

별아교세포(astrocyte)에서 발견된다. 그리고 miR-9, miR-125와 같은 것들은 뇌의 전반에 걸쳐 발견이 된다.¹⁵⁾ 이와 같이 별아교세포(astrocyte)와 신경세포(neuron)에서 다양하면서 특이성이 있는 microRNA가 존재하기 때문에 이 두 세포계열에서 다양한 특이적인 단백질이 만들어 진다고 추측된다.

교모세포종(glioblastoma multiforme)은 가장 치명적인 암의 하나로 모든 두개강내 종양의 12%~15%, 모든 별아교세포 종양(astrocytic tumor)의 50~60%를 차지하는 성인에서 가장 흔한 뇌종양이다.¹⁶⁾ 이 종양은 미분화된 신생의 별아교세포(astrocyte)로 구성되며 대뇌반구의 피질 하 백질에 호발하여 발생한다. 낮은 단계의 별아교세포 종양(low-grade astrocytic tumor)으로부터 발생하기도 하고(secondary GBM), 급격하게 처음부터 발생하기도 한다(primary GBM).¹⁷⁾ 이 고도의 악성 종양인 교모세포종(glioblastoma multiforme)의 형태 및 행태의 이질성 때문에 기원을 결정하기는 쉽지 않지만 별아교세포(astrocyte) 혹은 별아교세포의 전구체(astrocyte precursor)로부터 기원하는 것으로 생각되고 있다.¹⁷⁾ 수

Table 5. MicroRNAs up- or downregulated in glioblastomas and gliomas

Up-/Downregulation	miRNA	Materials	Reference
upregulation	miR-21	in human glioblastoma tumor tissues, early-passage glioblastoma cultures, and in six established glioblastoma cell lines	Chan et al. ³⁷⁾ , 2005
		in gliomas	Conti et al. ³⁸⁾ , 2009
		in glioblastomas	Gabriely et al. ³⁹⁾ , 2008
		in glioblastomas	Papagiannakopoulos et al. ⁴⁰⁾ , 2008
	miR-221/222	in glioblastoma tissue samples and in many glioblastoma cell lines	Ciafrè et al. ¹⁹⁾ , 2005
		in high grade gliomas	Conti et al. ³⁸⁾ , 2009
		in six ATCC glioma and GBM cell lines and in 14 glioma and GBM samples	Lukiw et al. ⁴¹⁾ , 2009
	miR-451	in glioblastomas	Gal et al. ⁴²⁾ , 2008
	miR-10b	in glioblastomas	Ciafrè et al. ¹⁹⁾ , 2005
		in glioblastomas	Silber et al. ⁴³⁾ , 2008
downregulation		in 43 glioma samples and 6 glioma cell lines	Sasayama et al. ⁴⁴⁾ , 2009
	miR-9	in glioma tissues and cell lines	Chao et al. ⁴⁵⁾ , 2008
	miR-26a	in human glioma	Huse et al. ⁴⁶⁾ , 2009
	miR-181a and miR-181b	in human gliomas and glioma cell lines	Shi et al. ⁴⁷⁾ , 2008
		in glioblastomas	Ciafrè et al. ¹⁹⁾ , 2005
	miR-7	in glioblastomas	Kefas et al. ⁴⁸⁾ , 2008
	miR-128	in glioblastomas	Ciafrè et al. ¹⁹⁾ , 2005
		in glioblastomas	Godlewski et al. ⁴⁹⁾ , 2008
		in glioma tissues and cell lines	Zhang et al. ⁵⁰⁾ , 2008
		in glioblastoma and in GBM cell lines	Cui et al. ⁵¹⁾ , 2009
	miR-124	in glioblastomas and anaplastic astrocytomas	Silber et al. ⁴³⁾ , 2008
	miR-137	in glioblastomas and anaplastic astrocytomas	Silber et al. ⁴³⁾ , 2008
	miR-129	in glioblastomas and anaplastic astrocytomas	Silber et al. ⁴³⁾ , 2008
	miR-139a	in glioblastomas and anaplastic astrocytomas	Silber et al. ⁴³⁾ , 2008
	miR-218	in glioblastomas and anaplastic astrocytomas	Silber et al. ⁴³⁾ , 2008
	miR-34a	in glioblastomas	Li et al. ⁵²⁾ , 2009
	miR-326	in gliomas	Kefas et al. ⁵³⁾ , 2009

술, 방사선치료, 화학치료 등이 지속적으로 발전하고 있으나 이 뇌종양의 평균 생존 기간은 진단으로부터 약 1년 정도로 아직 암담한 실정이며, 이 종양에 대한 분자생물학적 종양발생 과정이 아직도 미궁에 빠져 있는 상태이다.

최근 종양과 microRNA와의 연관성이 보고되고 있다. 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)에서 제일 흔한 단일 유전자 이상은 chromosome 13q14의 결손인데 최근의 연구에 의하면 서로 다른 두개의 microRNA인 miR-15과 miR-16의 유전자가 이 결손부위의 39 kb 내에 위치하며, 대부분에서 이 microRNA가 의미 있게 감소되어 있다고 한다.¹⁸⁾

인간의 신경계에서도 많은 microRNA가 발현되고, 세포 종류 및 시기에 따라 특이성을 가진 microRNA가 존재할 것이다. 이 특이성을 가진 microRNA를 이해하게 된다면 신경계를 분자 생물학적으로 이해할 수 있을 것이며, 교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같은 신경계 종양의 발생기전도 이해할 수 있을 것이다. Ciafrè는 교모세포종(glioblastoma multiforme)과 정상 뇌조직의 microRNA를 비교 분석하였는데, miR-10b과 miR-221이 종양 표본에서 의미있게 상승되어 있고, miR-128와 miR-181는 감소되어 있다고 보고하였다.¹⁹⁾ 그리고 의미 있게 증가한 microRNA가 정상적인 별아교세포의 분화와 자연사를 유도하는 유전자의 발현을 방해하는 것으로 추측하였다. 그외에도 여러 연구자들이 교모세포종

(glioblastoma multiforme)과 교종(glioma)의 specific miRNA candidates에 대하여 연구하였다(Table 5). 그러나 이 연구들은 교모세포종(glioblastoma multiforme)의 대조군을 신경세포(neuron)와 여러 신경아교세포(neuroglia)들을 포함한 정상 뇌조직으로 하였다라는 단점이 있다.

별아교세포(astrocyte) 기원인 교모세포종(glioblastoma multiforme)의 특이성을 갖는 microRNA의 정확한 규명을 위해서는 대조군으로 신경세포(neuron), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte), 미세아교세포(microglia) 등의 아교세포들이 없는 순수한 별아교세포(astrocyte) 및 이들의 microRNA profiling이 필요하다. 그러나 문헌조사에 의하면 순수한 인간 primary astrocytes의 microRNA profiling은 아직 보고가 되어 있지 않다. 따라서 본 연구자는 교모세포종(glioblastoma multiforme)의 특이성을 가진 microRNA 규명을 위하여, 별아교세포(astrocyte) 관련 질환의 분자생물학적 기초를 마련하고자 인간 primary astrocytes의 microRNA profiling을 시행하였다. 앞으로 이를 토대로 교모세포종(glioblastoma multiforme)의 microRNA profiling을 시행 후, 이와 비교 분석하여 특이성이 있는 microRNA를 보다 더 정확하게 규명할 수 있을 것이다.

microRNA profiling에 사용되는 방법은 크게 microarray와 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)의 2가지가 있다. microarray 방법은 유전체 전역(genome-wide)의 microRNA profiling이 가능하지만 발견

범위에 있어서는 제한적이다. 따라서 microRNA의 경우 숫자가 상대적으로 적기 때문에(several hundred per species)²⁰⁾, 유전자 발현 정량에 표준적인 방법²¹⁾인 qRT-PCR이 전체적인 microRNA profiling에 적용되고 있다.²²⁾ qRT-PCR를 이용하면 miRNA profiling의 발견범위가 ~7 orders of magnitude²³⁾이고 민감도가 매우 높아서 단일 세포일지라도 microRNA profiling이 가능하다.²⁴⁾ 더 나아가 stem-loop PCR 접근법은 microRNA의 전구체와 genomic DNA에 2000배 이상 민감도가 낮아 결과적으로 miRNA profiling에 특이도를 증가시킨다.²⁵⁾

이미 알려진 miRNA의 배열에 의존한 hybridization-based methods에 비하여 direct sequencing methods은 새로운 miRNA의 발견²⁵⁾, 성숙한 miRNA 길이의 다양성의 감지²⁶⁾, RNA editing²⁷⁾, 3' nucleotide의 부착²⁸⁾을 가능하게 하여 준다. sequencing-based methods은 hybridization-methods 보다 장점이 많음에도 불구하고 capillary DNA sequencing의 비용문제로 사용 하기가 어려웠다.²⁹⁾ 그러나 최근 massively parallel sequencing platforms(e.g., Illumina's Genome Analyzer and Roche's 454 system)이 개발되어 비용과 수고가 현저히 줄어들게 되었다.³⁰⁾

결 론

본 연구는 문헌 고찰 결과 human primary astrocytes에 대하여 massively parallel sequencing (MPS) 방법을 이용하여 microRNA profiling을 시행한 첫번째 연구로서 인간의 질병, 특히 별아교세포(astrocyte)와 관련된 신경계 질환의 분자 생물학적 병인의 연구에 기초가 되기를 기대한다. 더 나아가 microRNA와 관련된 유전자 발현의 이해를 바탕으로 아직도 불치인 질병들에 대하여 새로운 치료의 목표 치료법(target therapies)들이 개발되기를 기대한다. 그러나 아직은 microRNA에 의해 어떻게 유전자 발현이 조절되는지, 목표가 어디인지 그리고 범위에 대하여는 아직도 밝혀져 있지 않다. 따라서 먼저 이에 대하여 더 많은 연구가 있어야 할 것이다.

참고문헌

- 1) Vernadakis A: Neuron-glia interrelations. *Int Rev Neurobiol* 30:149-224, 1988
- 2) Anderson CM, Swanson RA: Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14, 2000
- 3) Conroy BP, Lin CY, Jenkins LW, DeWitt DS, Zornow MH, Uchida T, Johnston WE: Hypothermic modulation of cerebral ischemic injury during cardiopulmonary bypass in pigs. *Anesthesiology* 88:390-402, 1998
- 4) Huang FP, Zhou LF, Yang GY: The effect of extending mild hypothermia on focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurol Res* 20:57-62, 1998
- 5) Seki Y, Feustel PJ, Keller RW Jr, Tranmer BI, Kimelberg HK: Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke* 30:433-440, 1999
- 6) Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K: Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702, 1997
- 7) Whittaker-Azmitia PM, Wingate M, Borelia A, Gerlai R, Roder J, Azmitia EC: Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res* 776:51-60, 1997
- 8) Liao SL, Chen CJ: Tyrosine kinase signaling involved in glutamate-induced astrocyte proliferation. *Neuroreport* 12:3519-3522, 2001
- 9) Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208, 2003
- 10) Tijsterman M, Plasterk PH: Dicers at RISC: the mechanism of RNAi. *Cell* 117: 1-3, 2004
- 11) Nagai A, Nakagawa E, Hatori K, Choi HB, McLarnon JG, LEE MA, KIM SU: Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines. *Neurobiol Dis* 8:1057-1068, 2001
- 12) Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, Mccurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, Dubridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K: Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* 18:630-634, 2000
- 13) Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ: miRBase:tools for microRNA genomics. *NAR* 36(Database Issue):D154-D158, 2008
- 14) Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH: MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309:310-311, 2005
- 15) Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R,

- Wulczyn FG: Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 21:1469-1477, 2005
- 16) Hulleman E, Helin K: Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res* 94:1-27, 2005
- 17) Wechsler-Reya RJ, Scott MP: The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 24:385-428, 2001
- 18) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-15529, 2002
- 19) Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu C, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG: Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1351-1358, 2005
- 20) Griffiths-Jones S: The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32:109-111, 2004
- 21) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-694, 1996
- 22) Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, Davidson B, Shih IeM, Zhang Y, Wood W 3rd, Becker KG, Morin PJ: MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One* 3:e2436, 2008
- 23) Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ: Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179, 2005
- 24) Tang F, Hajkova P, Barton SC, Lao K, Surani MA: MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 34:e9, 2006
- 25) Glazov EA, Cottee PA, Barris WC, Moore RJ, Ddalrymple BP, Tizard ML: A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Res* 18:957-964, 2008
- 26) Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA: Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* 18:610-621, 2008
- 27) Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K: Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 315:1137-1140, 2007
- 28) Aravin A, Tuschl T: Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett* 579:5830-5840, 2005
- 29) Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3687-3692, 2006
- 30) Schuster SC: Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 5:16-18, 2008
- 31) Ballabh P, Braun A, Nedergaard M: The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13, 2004
- 32) Ambrosi G, Virgintino D, Benagiano V, Maiorano E, Bertossi M, Roncali L: Glial cells and blood-brain barrier in the human cerebral cortex. *Ital J Anat Embryol* 100:177-184, 1995
- 33) Mennerich S, Zorumski CF: Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature* 368:59-62, 1994
- 34) Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF: Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686, 1996
- 35) Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K: Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618, 1998
- 36) Hatten ME, Lynch M, Rydel RE, Sanchez J, Joseph-Silverstein J, Moscatelli D, Rifkin DB: In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev Biol* 125:280-289, 1988
- 37) Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65:6029-6033, 2005
- 38) Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri FF, Maio F, Cama A, Germano A, Vita G, Tomasello F: miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *J Neurooncol* 93:325-332, 2009
- 39) Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM: MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* 28:5369-5380, 2008
- 40) Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS: MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 68:8164-8172, 2008
- 41) Lukiw WJ, Cui JG, Li YY, Culicchia F: Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol* 91:27-32, 2009
- 42) Gal H, Pandi G, Kanner AA, Ram Z, Lithwick-Yanai G, Amariglio N, Rechavi G, Givol D: MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 376:86-90, 2008
- 43) Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG: miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 6:14, 2008
- 44) Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E: MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int J Cancer* 125:1407-1413, 2009
- 45) Chao TF, Zhang Y, Yan XQ, Yin B, Gong YH, Yuan JG,

- Qiang BQ, Peng XZ: MiR-9 regulates the expression of CBX7 in human glioma. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 30:268-274, 2008
- 46) Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland EC: The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev* 23:1327-1337, 2009
- 47) Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y: hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 1236:185-193, 2008
- 48) Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S, Purow B: MicroRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 68:3566-3572, 2008
- 49) Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S: Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 68:9125-9130, 2008
- 50) Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan X, Gong Y, Yin B, Liu W, Qiang B, Zhao J, Yuan J, Peng X: MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med* 87:43-51, 2009
- 51) Cui JG, Zhao Y, Sethi P, Li YY, Mahta A, Culicchia F, Lukiw WJ: Micro-RNA-128 (miRNA-128) down-regulation in glioblastoma targets ARP5 (ANGPTL6), Bmi-1 and E2F-3a, key regulators of brain cell proliferation. *J Neurooncol* 26:published online, 2009
- 52) Li Y, Guessous F, Zhang Y, DiPierro C, Kefas B, Johnson E, Marcinkiewicz L, Jiang J, Yang Y, Schmittgen TD, Lopes B, Schiff D, Purow B, Abounader R: MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res* 69:7569-7576, 2009.
- 53) Kefas B, Comeau L, Floyd DH, Seleverstov O, Godlewski J, Schmittgen T, Jiang J, diPierro CG, Li Y, Chiocca EA, Lee J, Fine H, Abounader R, Lawler S, Purow B: The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J Neurosci* 29:15161-15168, 2009