



NMR hydrogen exchange study of miR156:miR156* duplexes

Na-Hyun Kim, Seo-Ree Choi, Ho-Seong Jin, Yeo-Jin Seo, and Joon-Hwa Lee*

Department of Chemistry and RINS, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Republic Korea

Received Aug 13, 2019; Revised Sep 10, 2019; Accepted Sep 15, 2019

Abstract RNAs exhibit distinct structural and dynamic features required for proper function. The hydrogen-bonded imino protons of RNAs are a probe of the conformational transition and dynamic feature. MicroRNAs originate from primary transcripts containing hairpin structures. The levels of mature miR156 influence the flowering time of plants. To understand the molecular mechanism of biological function of miR156:miR156* duplex, we performed hydrogen exchange study on the model RNAs mimicking two phenotypes of miR156:miR156*, miR156a:miR156a* (m-miR156a) and miR156g:miR156g* (m-miR156g) duplexes. This study found that the internal bulge of m-miR156a destabilized the neighboring base-pairs, whereas the bulge structure of m-miR156g did not affect the thermal stabilities of the neighboring base-pairs.

Keywords microRNA, miRNA156, flowering time, hydrogen exchange, NMR

서문

일반적으로 RNA가 생물학적으로 중요한 역할을 수행하기 위해서는 독특한 구조적 변형과 동력학적 특성을 가지게 된다. 수소결합을 하고 있는 이미노 수소는 RNA의 염기쌍의 동력학적 특성변화를 관찰하는 주요한 자료로 이용되고 있다. 이미노 수소의 용매인 물과의 교환

과정은 염기쌍의 2-상태 (열림/닫힘) 모델에 의해 설명되는데 이 모델에 따르면 이미노 수소의 교환은 염기쌍이 열림 상태일 경우에만 일어나게 된다.^{1,2} 이러한 이미노 수소의 교환 속도 연구는 많은 DNA 이중나선, RNA 이중나선, DNA-단백질 복합체 등에서 계속해서 수행되고 있음을 최근 리뷰에서 보고되었다.³ 특히, RNA의 이미노 수소의 교환속도 연구는 RNA가 ribozyme이나 RNA 절단효소에 의해 절단되는 과정이 RNA의 특정 위치에 돌연변이의 도입에 의해 조절되는 기작을 설명하였다.⁴⁻⁶

MicroRNA (miRNA)는 단백질로 발현되지 않는 작은 RNA로 표적 유전자의 mRNA를 분해하거나 번역과정을 저해하는 기작을 통해 유전자 발현을 조절하는 기능을 하고 있다.⁷ MiRNA는 primary miRNA (pri-miRNA)라 불리는 기다란 전사 물질에서 생성되는데, 이 pri-miRNA는 upper stem, miRNA:miRNA* 이중나선, 그리고 lower stem으로 구성되어 있다 (그림 1(A),(B) 참조). 온도에 반응하는 식물의 miRNA는 개화시기에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.⁸ 애기장대 (Arabidopsis) miR156은 개화시기에 영향을 주는 대표적인 miRNA로 SPL3 단백질의 mRNA에 영향을 주어 개화시기를 delay 시킨다.⁹ miR156의 생

* Address correspondence to: Joon-Hwa Lee, Department of Chemistry and RINS, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Republic of Korea, Tel: 82-55-772-1490; E-mail: joonhwa@gnu.ac.kr

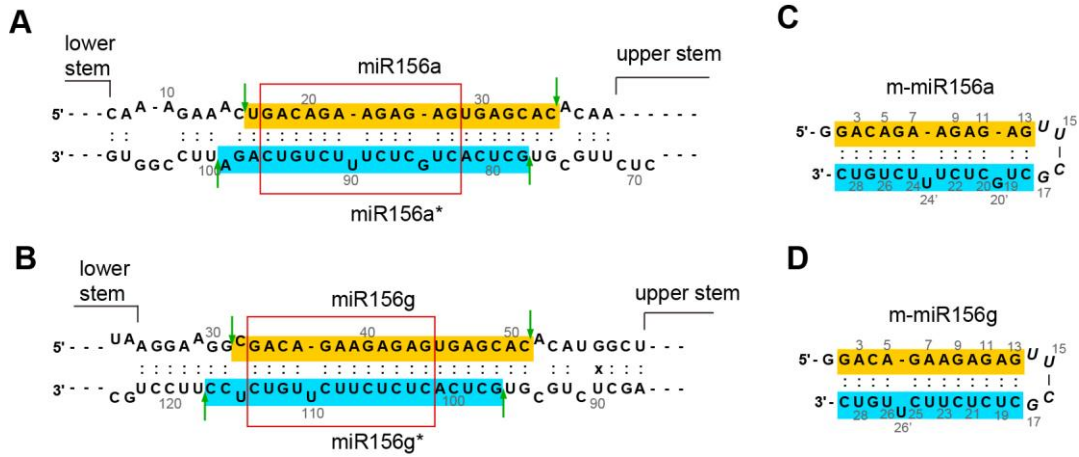


Figure 1. Secondary structures of (A) pri-miR156a and (B) pri-miR156g. Mature miR156 and miR156a*/miR156g* sequences are highlighted in gold and cyan, respectively. Green vertical arrows indicate the cleavage sites of pri-miR156a and pri-miR156g by DCL1. Secondary structures of model RNAs, (C) m-miR156a and (D) m-miR156g, mimicking the miR156a:miR156a* and miR156g:miR156g* duplexes, respectively.

합성 과정에서 생성된 miR156:miR156* duplex는 RISC 복합체 내에서 이중나선이 풀린 후 miR156 가닥만이 선택적으로 표적 유전자 (*SPL3* gene)을 인식하여 *SPL3* mRNA를 절단하는 역할을 한다. miR156를 발현하는데 지금까지 여러가지 phenotype (miR156a to miR156g)이 발견되었지만 아직까지 그 기능의 차이는 아직 밝혀지지 않았다. 최근에는 NMR 수소교환속도 연구를 통해 pri-miR156a의 lower stem의 bulge의 구조가 miR156a의 생합성에 중요한 역할을 하는 것으로 발표되었다.⁴ 본 연구에서는 miR156을 생성하는 대표적인 두 가지 phenotype인 miR156a와 miR156g의 구조적 안정성 차이를 비교하기 위해 miR156a:miR156a* 이중나선과 miR156g:miR156g* 이중나선의 모델 RNA (그림 1(C),(D) 참조)를 만들고 이에 대해 NMR을 이용한 수소교환속도 연구를 수행하였다.

실험방법

RNA 시료의 준비— miR156a:miR156a*과 miR156g:miR156g* 이중나선의 모델 RNA인 m-miR156a (그림 1C)와 m-miR156g (그림 1D)를 T7 polymerase를 이용한 *in vitro* transcription 방법으로 합성하였다. T7 RNA polymerase promoter sequence를 5' 말단에 넣어 DNA template를 디자인하여 준비하고 PAGE (전기영동)으로 정제하였다. 정제된 DNA template는 4종류의 4 mM rNTP와 25 mM MgCl₂을 포함한 10 mL 용액에서 37 °C에서 6시간 동안 transcription 반응을 수행하였다. 합성된 RNA는 에탄올 침전으로 농축한 후, PAGE로 정제하였다. 원하는 RNA의 크기에 맞는 gel band를 오려낸 후, electroelution을 통하여 RNA를 추출하고 다시 한번 에탄올 침전으로 농축한 후, NMR 실험 조건에 맞는 buffer (10 mM sodium phosphate (pH=6.0), 100 mM NaCl)로 dialysis를 한 후, 0.5 mM 농도로 농축하였다.

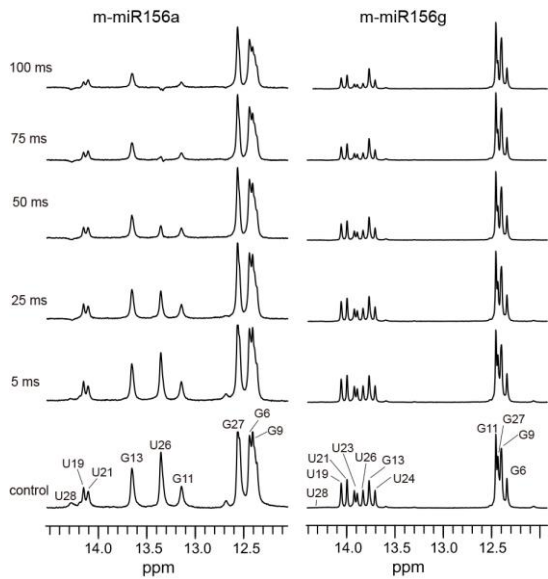


Figure 2. 1D imino proton spectra of the water magnetization transfer experiments for the m-miR156a (left) and m-miR156g (right) in 90% H₂O/10% D₂O solution containing 10 mM sodium phosphate (pH 6.0) and 10 mM NaCl at 5 °C. The delay times between the selective water inversion and acquisition pulse are indicated on the left of spectra.

NMR experiments— 모든 NMR 실험은 Agilent DD2 700 MHz NMR (경상대학교, 진주)을 이용하여 수행하였다. 1차원 (1D) NMR 데이터는 FELIX2004 (FELIXNMR, CA, USA) 프로그램을, 2D 데이터는 NMRPIPE¹⁰와 Sparky¹¹ 프로그램을 이용하여 분석하였다. M-miR156a와 m-miR156g의 이미노 수소 피크를 분석하기 위해 2D watergate-NOESY 실험 (mixing time: 120과 250 ms)을 수행하였다.

수소교환속도 측정— 이미노 수소의 교환속도 측정방법은 선행연구에서 자세히 설명되어 있다.^{4,12,13} 먼저, 선택적인 inversion recovery 실험을 수행하여 각 이미노 수소의 T1 relaxation 속도 상수 (R_{1a})를 측정하였다. 이때 delay 시간은 0.001초에서 2초 사이에서

30개의 데이터가 사용되었다. R_{1a} 값은 자기장에 의한 T1 relaxation 속도 상수 (R_1)과 물과의 교환속도 상수 k_{ex} 의 합이다. 측정된 R_{1a} 값을 기반으로 하여 water magnetization transfer (WMT) 실험결과를 분석하면 순수한 k_{ex} 값을 얻을 수 있다. WMT 실험은 0.005초에서 0.1초사이의 20개의 delay 시간을 사용하였다. 이미노 수소의 교환속도는 다음의 식을 이용하여 측정하였다.

$$\frac{I(t)}{I_0} = 1 - 2 \frac{k_{ex}}{(R_{1w} - R_{1a})} (e^{-R_{1a}t} - e^{-R_{1w}t}) \quad (1)$$

이 식에서 I_0 와 $I(t)$ 는 delay 시간 0과 t 에서 측정된 이미노 수소의 peak intensity를 의미하고, R_{1a} 와 R_{1w} 는 각각 이미노 수소와 물의 T1 relaxation 속도상수를 의미한다.

실험결과 및 고찰

Resonance assignments— 2D NOESY 스펙트럼을 얻고 이를 분석하여 RNA의 이미노 수소 resonance를 assign 하였다. 이미노 피크의 sequential connectivity를 통해 이중나선에서의 순서를 확인하였다. U의 이미노 피크는 염기쌍을 이루는 A의 H2와 G의 이미노 피크는 염기쌍을 이루는 C의 두 개의 아미노 피크와 특징적인 강한 NOE를 보이는 데, 이를 통해 각 이미노 피크를 검증하였다. 그림 2는 assign된 각 염기쌍의 이미노 수소를 1D spectrum에 표시하였다.

5 °C 에서 수소교환속도 측정— microRNA 염기쌍의 opening 능력에 대해 정성적으로 알아보기 위해서 용매인 물과의 교환속도를 5 °C에서 측정하였다 (표 1). 물의 magnetization을 선택적으로 180° 뒤집고 일정시간 후 NMR 스펙트럼을 얻으면 그림 2와 같은 결과를 얻을 수 있다. m-miR156g의 거의 모든 이미노 수소는 100ms에서 peak 높이는 줄어들었지만 신호의 위상은 뒤집어 지지 않았음을 확인할 수 있다. 이들 스펙트럼에서의 peak 높이를

Table 1. Hydrogen exchange rate constants (k_{ex} , s^{-1}) of the imino protons of the m-miR156a and m-miR156g determined at 5, 15 and 25 °C.

| Base-pair | imino | 5 °C | | 15 °C | | 25 °C | |
|-----------|-------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|--|
| | | m-miR156g | m-miR156a | m-miR156g | m-miR156a | m-miR156g | |
| G2·C29 | G2 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| A3·U28 | U28 | n.d. | 18.8±0.6 ^b | 31.8±1.3 | 69.8±4.0 | 67.7±1.3 | |
| C4·G27 | G27 | n.d. | n.d. | 1.0±0.2 | 2.7±0.1 | 2.3±0.7 | |
| A5·U26 | U26 | 0.8±0.1 | 5.8±0.2 | 2.4±0.1 | 13.0±0.2 | 5.3±0.1 | |
| G6·C25 | G6 | 0.5±0.1 | 2.8±0.6 | 1.1±0.1 | 3.0±0.2 | 1.9±0.1 | |
| A7·U24 | U24 | 0.5±0.1 | n.d. | 1.5±0.1 | n.d. | 3.3±0.1 | |
| A8·U23 | U23 | 0.8±0.1 | n.d. | 2.5±0.1 | n.d. | 5.7±0.1 | |
| G9·C22 | G9 | 0.5±0.1 | 3.1±0.6 | 1.1±0.1 | 3.9±0.2 | 1.3±0.5 | |
| A10·U21 | U21 | 0.5±0.1 | 2.9±0.3 | 1.6±0.1 | 4.5±0.4 | 3.7±0.1 | |
| G11·C20 | G11 | 0.6±0.1 | 5.5±1.0 | n.d. | 8.5±0.3 | 1.0±0.4 | |
| A12·U19 | U19 | 0.6±0.1 | 3.0±0.3 | 1.6±0.1 | 6.6±0.2 | 4.0±0.1 | |
| G13·C18 | G13 | 0.4±0.1 | 5.8±0.5 | 0.9±0.1 | 6.3±0.2 | 1.8±0.1 | |
| | U14 | 42.2±0.3 | 49.0±1.4 | 123±3 | 123±6 | n.d. | |
| | G17 | 5.2±0.1 | n.d. | 22.2±0.1 | n.d. | 74.7±0.5 | |

^an.d.: not determined.

^bError represents curve fitting errors during the determination of k_{ex} from WMT data.

delay 시간에 따라 나타내고 이를 식 (1)로 fitting 하면 각 이미노 수소의 k_{ex} 값을 얻을 수 있다. 5 °C 에서 측정된 m-miRNA156g 의 stem 부분의 모든 이미노 수소의 교환속도가 $1 s^{-1}$ 보다 작게 관찰되었다 (표 1). 이는 stem 부분은 5 °C 에서 매우 안정하여 이미노 수소의 수소교환이 아주 느리게 진행되고 있음을 의미한다. M-miR156a 의 경우, WMT 실험을 수행하였으나, G 의 이미노 수소 피크의 중첩이 심해서 정확한 k_{ex} 값을 측정할 수 없었다 (그림 2).

25 °C 에서 수소교환속도 측정- 5 °C 에서 측정된 결과보다 유용한 염기쌍의 안정성 정보를 얻기 위해 m-miR156a 와 m-miR156g 의 이미노 수소의 교환속도를 15 와 25 °C 에서 WMT 방법으로 측정하였다 (표 1). 25 °C 에서 측정된 k_{ex} 값을 살펴보면 먼저, 불안정한 terminal 부분의 G2 의 이미노 수소 교환속도는 측정할 수 없었고, 이웃한 U28 의 이미노 수소의 교환속도는 $68 \sim 70 s^{-1}$ 이었다. m-miR156g 의 불안정한 UUCG loop 의 U14 이미노 수소는 너무나 exchange 가 빨라 측정할 수 없었다. 반면 G17 의 이미노 수소의 교환속도는 m-miR156g 는 $75 s^{-1}$ 로 5 °C 의

경우에 비해 15 배 정도 빠르게 exchange 를 하고 있다. 그런데 놀랍게도 m-miR156a 의 경우, G17 의 이미노 수소가 U14 의 이미노 수소 보다 물과의 exchange 가 아주 빨라 정확히 측정하기 힘든 반면 U14 의 이미노 수소는 $123 s^{-1}$ 으로 m-miRNA156g 에 비해 작은 값을 가진다. 이 결과는 m-miR156g 의 UUCG loop 는 G17 이미노 수소의 수소결합이 U14 이미노 수소의 수소결합보다 강한 geometry 를 가지고 있지만 m-miR156a 의 UUCG loop 에서는 반대로 U14 이미노 수소가 강한 수소결합을 하는 geometry 를 가지고 있음을 의미한다.

m-miR156g 의 stem 부분은 25 °C 에서도 모두 안정한 구조를 하고 있는데 U 의 이미노 수소는 $3 \sim 6 s^{-1}$ 의 교환속도를 G 의 이미노 수소는 $1 \sim 3 s^{-1}$ 의 교환속도를 보인다. 반면 m-miR156a 는 stem 의 일부분이 아주 불안정한 구조를 보이고 있다. m-miR156a 는 G20'과 U23'의 두 개의 bulge 를 가지고 있다. G20'의 영향으로 G11 이미노 수소는 m-miR156g 에 8 배 빠르게 물과 exchange 하게 된다. U23'의 영향으로 염기쌍을 이루는 U23 과 U24 의 이미노 수소교환속도는 측정하기 힘들었고 주위의 G6 와 G9 이미노

수소도 2 ~ 3 배 정도 큰 교환속도를 가지고 있다. 이러한 결과를 토대로 G6·C25 에서 G13·C18 까지 8 개의 염기쌍 영역에서 m-miR156g 는 아주 안정한 stem 구조를 가지고 있지만 m-miR156a 는 상대적으로 불안정한 염기쌍을 이루고 있고 큰 수소교환속도 값을 보인다.

반면, m-miR156g 는 A5 위치에 U26'의 bulge 구조를 가지고 있지만 m-miR156a 는 연속적인 염기쌍을 가지고 있다. 앞서 관찰한 결과를 바탕으로 하면 염기쌍 사이의 bulge 는 주위 염기쌍의 안정성에 영향을 줄 수 있지만, 놀랍게도 m-miR156g 의 G27, U26, G6 모두 m-miR156a 와 비슷한 수소교환속도를 가지고 있다. 오히려 m-miR156g 의 U26 은 m-miR156a 보다 더 작은 수소교환속도 값을 가진다. 이러한 결과는 U26'의 bulge 가 m-miR156g 의 stem 의 안정성에 전혀 영향을 주지 않기 때문에 이 부분의 stem 구조의 안정성은 두 세 RNA 모두 비슷하다고 할 수 있다.

결론

본 연구에 이용된 micro RNA 는 공통적인 UUCG 를 가지고 있으며 거의 동일한 염기서열의 stem 구조를 가지고 있다. 다만 두 RNA 는 다른 형태의 bulge 구조를 가지고 있다. m-miR156a 는 이러한 bulge 구조 때문에 stem 구조의 일부분이 불안정한 염기쌍을 가지게 된다. 하지만 m-miR156g 는 역시 bulge 구조를 가지고 있지만 stem 의 안정성에 영향을 주지 않아 전체적으로 안정한 stem 을 가지고 있다. 이와 같은 stem 구조의 안정성 차이는 왜 miR156g:miR156g* duplex 와 miR156a:miR156a* duplex 가 miR156 으로 분리되어 SPL3 의 mRNA 를 인식하는 패턴이 서로 다를 수 있음을 예측할 수 있다. 이는 나아가 앞으로 밝혀질 두 miR156 의 phenotype 의 다른 생물학적 특징을 설명할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국연구재단 (과제번호: 2017R1A2B2A001832) 과 삼성미래기술육성재단 (과제번호: SSRF-BA1701-10) 의 지원에 의해 수행되었다.

References

1. J. L. Leroy, N. Bolo, N. Figueroa, P. Plateau, and M. Guéron, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2**, 915 (1985)
2. M. Guéron and J. L. Leroy, *Methods Enzymol.* **261**, 383 (1995)
3. S.-R. Choi, N.-H. Kim, H.-S. Jin, Y.-J. Seo, J. Lee, and J.-H. Lee, *Comp. Struct. Biotechnol. J.* **17**, 797 (2019)
4. J.-H. Lee and A. Pardi, *Nucleic Acids Res.* **35**, 2965 (2007)
5. W. Kim, H.-E. Kim, A.-R. Lee, A R. Jun, M. G. Jung, J. H. Ahn, and J.-H. Lee, *Nucleic Acids Res.* **45**, 875 (2017)
6. H.-E. Kim, W. Kim, A.-R. Lee, S. Jin, A R. Jun, N.-K. Kim, J.-H. Lee, and J. H. Ahn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **484**, 839 (2017)
7. J. C. Carrington and V. Ambros, *Science* **301**, 336 (2003)
8. H. Lee, S. J. Yoo, J. H. Lee, W. Kim, S. K. Yoo, H. Fitzgerald, J.C. Carrington, and J. H. Ahn, *Nucleic Acids Res.* **38**, 3081 (2010)
9. G. Wu and R. S. Poethig, *Development* **133**, 3539 (2006)
10. F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax, *A. J. Biomol. NMR* **6**, 277 (1995)

11. T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3. University of California, San Francisco, CA. (2003)
12. H.-E. Kim, Y.-G. Choi, A.-R. Lee, Y.-J. Seo, M.-Y. Kwon, and J.-H. Lee, *J. Korean Magn. Reson. Soc.* **18**, 52 (2014)
13. Y.-G. Choi, H.-E. Kim, and J.-H. Lee, *J. Korean Magn. Reson. Soc.* **17**, 76 (2013)