

분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에서 *spThp1* 유전자 결실돌연변이의 제조와 특성 조사

윤진호*

성신여자대학교 생물학과 및 기초과학연구소

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 관여할 것으로 여겨지는 *spThp1* 유전자의 결실돌연변이주(deletion mutant)를 제조하여 그 특성을 조사하였다. 이배체(diploid) 균주의 한 *spThp1* 유전자를 결실시킨 후 4분체분석(tetrad analysis)을 수행한 결과, 이 유전자는 생장에 필수적이지 않았다. 또한 결실돌연변이주는 mRNA 수송도 큰 결함을 보이지 않았다. 하지만 *spThp1*은 mRNA의 운반체를 암호화하고 있는 *spMex67*와 합성치사(synthetic lethality)를 보였다. 이 결과는 분열효모의 *spThp1*도 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 역할을 하고 있음을 암시한다.

Key words □ deletion mutant, mRNA export, *S. pombe*, *spThp1*, synthetic lethality

진핵세포가 정상적인 생명현상을 영위하기 위해서는 핵과 세포질 사이의 물질이동이 필수적이다. 모든 거대분자들(단백질, RNA 등)의 핵과 세포질 사이의 이동(Nucleocytoplasmic transport)은 핵과 세포질을 구분하는 핵막의 유일한 통로인 핵공중합체(nuclear pore complex)를 통해 이루어지는데, 핵공중합체는 핵공 단백질(nucleoporin)이라 불리는 30여 종류의 단백질들로 이루어진 60 MDa 이상의 거대 복합체이다(3, 15). 이러한 이동 기작은 수송운반체를 필요로 하며 에너지가 소모되는 선택적인 능동수송이다. 하지만 단백질과 다른 RNA (tRNA, rRNA, snRNA 등)와는 다르게, mRNA의 핵에서 세포질로의 이동은 훨씬 복잡하며 전혀 다른 기작에 의해 일어나는 것으로 여겨지고 있다(13). Importin- β type family에 속하는 수송 운반체가 관여하지 않고, non- β type의 운반체인 heterodimeric NXF-NXT 단백질과 수많은 수용성 수송인자, 그리고 몇몇 핵공단백질(nucleoporin) 등이 관여하고 있다(4, 6). mRNP (mRNA와 결합단백질)의 운반체로 여겨지는 heterodimeric NXF-NXT 단백질은 하등진핵세포인 효모(*Mex67p-Mtr2* in *S. cerevisiae*, *Mex67p-Nxt1* in *S. pombe*)에서부터 사람(TAP-p15)에 이르기까지 잘 보존되어 있는데(8, 16, 19), 성숙된 mRNP 복합체를 핵공중합체(NPC)까지 연결시키는 역할을 하는 것으로 사료된다(2, 4; 6). 수용성 수송인자들로는 RNA 결합단백질(Npl3p, Nab2p, Yra2p, Hrp1p 등), 전사인자(TREX complex, Sus1p 등), 핵공단백질 또는 핵공중합체 결합단백질(Gle1p, Rae1p, Nup116p, Nup159p, Nup84 complex, Nup184p, Sac3p-Thp1p, Ipk1p 등), RNA helicase (Sub2p, Dbp5p 등), ATPase (Elf1p 등) 등이 있다. 고등생물에서도 이 단

백질들의 상동단백질(homolog)들이 mRNA 수송에 관여하며 효모의 돌연변이들을 complementation하는 것으로 보아, mRNA export의 기본적인 기작은 진화적으로 잘 보존되어 있는 것으로 여겨진다(4, 9).

mRNA export의 작용기작은 아직 확실하지 않지만, 전사 시작 단계부터 성숙한 mRNA로의 가공과정에 이르기까지 유전자 발현의 모든 단계들이 mRNA export와 밀접하게 연계되어 있음이 최근의 연구를 통해 밝혀지고 있다(5, 17). 특히 mRNA 수송인자인 Yra2p과 Sub2p는 전사 신장에 관여하는 THO 복합체와 결합하여 TREX 복합체를 형성하는 것이 밝혀졌고(18, 20), 또 다른 mRNA 수송인자인 Sac3p는 전사 신장인자인 Thp1p와 결합하는 것이 보고되었다(7, 10). 더욱이 Sac3-Thp1 복합체와 결합하는 또 다른 mRNA 수송인자인 Sus1은 전사의 조절 및 SAGA histon acetylase 복합체와 결합이 밝혀졌다(14). 본 연구는 분열효모인 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에서 *THP1* 유전자와 유사한 open reading frame (ORF)인 SPAC1B3.08 (*spThp1*로 명명)도 mRNA의 핵 밖으로 수송에 관여하는지를 알아보고자 *spThp1* 결실 돌연변이주를 제작하여 특성을 연구하였다.

본 실험에서는 이전에 기술된 분열효모의 유전학적 방법과 배양 방법을 사용하였으며(1, 12), 항균제인 G418에 내성을 주는 *kanr* 유전자로 치환된 *spThp1* 결실 돌연변이주를 만들기 위해서 이배체 균주인 SP286 (*h⁺h⁺ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-210/ade6-216*)에 one-step gene disruption 방법을 사용하였다. 먼저 *spThp1* 유전자 부위를 pBluescript SK(+) 벡터(Stratagene, USA)에 클로닝한 다음, PCR 돌연변이 방법을 사용하여 *spThp1* 유전자의 전체 ORF를 제거하고 그 자리에 제한효소 *NotI*의 염기서열을 집어넣었다. *kanr* 유전자를 포함하는 *NotI*

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-920-7675, Fax: 82-2-920-7675
E-mail: jhoyoon@sungshin.ac.kr

DNA 절편을 그 자리에 삽입한 후, 완성된 플라스미드를 제한효소 *XbaI*과 *XhoI*로 잘라내어 이배체 균주인 SP286에 형질전환시켜 G418에 내성을 갖는 형질전환체를 얻었다(Fig. 1A). 이 중에서 *spThp1* 유전자가 하나만 *kan^r* 유전자로 치환된 형질전환체 (*spThp1⁺/ΔspThp1::kan^r*)를 PCR을 통해 확인하였다(Fig 1B). 이렇게 얻은 이배체에서 유성생식에 의해 포자형성(sporulation)을 할 수 있는 *h⁺/h⁹⁰* 이배체를 선별하였다. 교배형이 *h⁺/h⁹⁰*인 분열효모는 감수분열에 의해 하나의 자낭 안에 반수체인 4개의 자낭포자를 형성하는데(tetrad), 각각의 자낭 안에 있는 자낭포자들을 분리하여 배양하는 4분체 분석(tetrad analysis)을 수행하였다. 분석한 10개의 사분체 모두에서 4개의 자낭포자들이 모두 콜로니로 성장하였다(Fig. 2). 콜로니를 형성한 4개의 포자 중 2개는 G418에 민감한 표현형을 보이는 야생형 *spThp1* 유전자를 가진 반수체이고, 나머지 2개의 포자는 G418에 저항성을 보이는 *spThp1* 유전자가 결실된 *ΔspThp1::kan^r* 유전자형을 갖는 반수체 포자였다. 이렇게 만들어진 *spThp1* 결실돌연변이 균주는 야생형 균주와 거의 유사한 성장 유형을 보여주었다. 이 실험 결과는 발아효모의 *THP1* 유전자와 유사하게 분열효모의 *spThp1* 유전자도

생장에 필수적이지 않다는 것을 의미한다.

spThp1 결실 돌연변이주(*ΔspThp1::kan^r*)가 mRNA의 수송에 결합을 보이는지를 알아보기 위해, 야생형(*spThp1⁺*) 균주와 *spThp1* 결실 돌연변이주에서 poly(A)⁺의 분포를 *in situ* hybridization을 통해 조사하였다. 혼성화 탐침으로 3' 끝에 α-digoxigenin이 결합된 oligo(dT)₅₀을 사용하였으며, FITC-anti-digoxigenin Fab 항체(Roche, Germany)를 사용하여 poly(A)⁺와 혼성화된 α-digoxigenin이 결합된 oligo(dT)₅₀을 형광현미경에서 관찰하였다. 세포내 핵의 위치는 4', 6'-diamidino-2'-phenylindole (DAPI)로 DNA를 염색하여 관찰하였다. *spThp1* 결실 돌연변이주도 야생형 균주와 비슷한 poly(A)⁺의 분포를 보이는 것으로 보아(Fig. 3), mRNA의 대량수송에는 큰 결함이 없는 것으로 사료된다.

spThp1 유전자가 mRNA 운반체를 암호화하고 있는 *spMex67* 유전자와 유전적인 연관성이 있는지를 알아보기 위해, *ΔspThp1* 균주와 *ΔspMex67* 균주를 교배하였다. 각각의 돌연변이가 하나씩만 존재할 때는 세포가 성장할 수 있지만, 두 돌연변이가 모두 존재하면 성장할 수 없는 것을 합성치사(synthetic lethality)라고 한다. 이러한 합성치사를 보이는 두 유전자들은 기능적으로 연관되어 있음을 의미한다. 합성치사를 보이는 균주가 성장할 수 있도록, 약한 *nmt1* 프로모터에 의해 *spMex67*의 발현이 조절되는 pREP81X-Mex67 플라스미드를 제작하여 *ΔspMex67* 균주에 형질

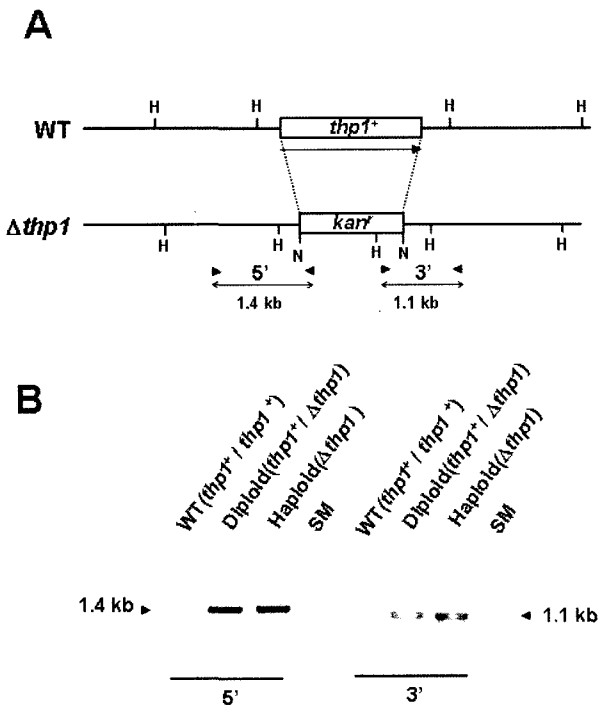


Fig. 1. Construction of *spThp1* mutants. (A) Schematic diagram representing construct of *spThp1* null allele in *S. pombe*. Most of *spThp1* ORF region was replaced by marker gene, *Kan^r*. The positions of PCR primers for confirmation of wild type and null alleles are indicated by arrowheads. H, *HindIII*; N, *NotI*. (B) Confirmation of disruption of the *spThp1* locus. PCR was performed with primers denoted in (A), using genomic DNAs from wild type (WT), diploid disrupted one of the *spThp1* locus (*spThp1⁺/ΔspThp1::kan^r*), and haploid disrupted *spThp1* locus (*ΔspThp1::kan^r*). SM represents DNA size markers.

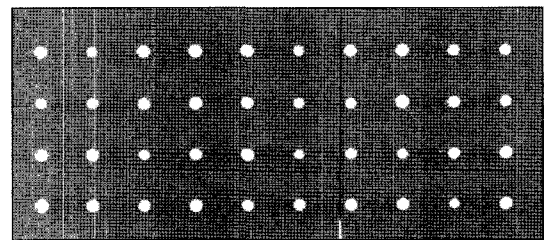


Fig. 2. Tetrad analysis. Diploid cells disrupted one of the *spThp1* locus were sporulated, and 10 tetrads were dissected on YES plate and incubated for 3 days at 28°C.

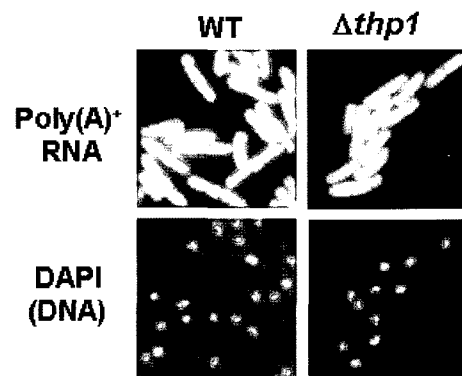


Fig. 3. Poly(A)⁺ RNA localization in *ΔspThp1* mutants and wild type cells. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium. Coincident DAPI staining is shown in the bottom panels.

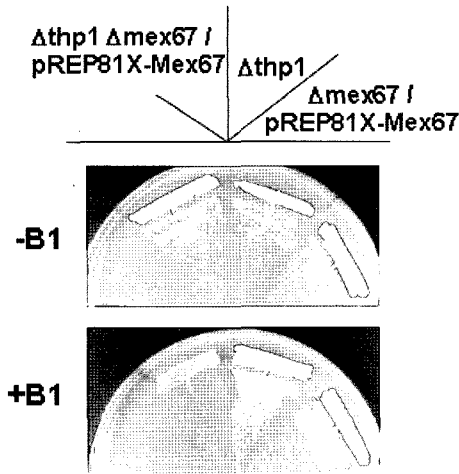


Fig. 4. *spThp1* null allele is synthetic lethal with the *spMex67* null allele. Growth of $\Delta spThp1$ mutant and $\Delta spMex67$ mutant were compared to that of $\Delta spThp1 \Delta spMex67$ synthetic lethal mutant carrying pREP81X-Mex67 as indicated. Cells were streaked onto EMM agar in the absence of thiamine (-B1) and presence of thiamine (+B1), and were incubated for 3 days at 28°C.

전환시킨 다음, 이 균주($\Delta spMex67/pREP81X-Mex67$)를 $\Delta spThp1$ 균주와 교배하여 유전자형이 $\Delta spThp1 \Delta spMex67/pREP81X-Mex67$ 인 균주를 얻었다. *nmt1* 프로모터는 배지에 thiamine이 없으면 전사가 유도되고, thiamine이 존재하면 전사가 억제되는 프로모터이다(11). 이렇게 얻은 균주는 thiamine이 없는 배지에서는 pREP81X-Mex67로부터 *spMex67p*이 발현되어 생장할 수 있지만, thiamine을 넣어준 배지(합성치사를 보이는 상황)에서는 정상적으로 자라지 못했다(Fig. 4). 이것은 $\Delta spThp1::kar1$ 와 $\Delta spMex67::ura4^+$ 를 모두 가지고 있는 균주는 합성치사를 보이는 것을 의미한다. 이와같이 *spThp1*이 *spMex67*과 유전적 연관성을 갖고 있는 것으로 보아, 분열효모의 *spThp1*도 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 역할을 하고 있음을 암시한다.

참고문헌

- Alfa, C., P. Fantes, J. Hyams, M. Mcleod, and E. Warbrick. 1993. Experiments with Fission Yeast. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
- Aguilera, A. 2005. Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 242-250.
- Cronshaw, J.M., A.N. Krutchinsky, W. Zhang, B.T. Chait, and M.J. Matunis. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158, 915-927.
- Cullen, B.R. 2003. Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* 116, 587-597.
- Dreyfuss, G., V.N. Kim, and N. Kataoka. 2002. Messenger-RNA-

- binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 195-205.
- Erkmann, J.A. and U. Kutay. 2004. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 296, 12-20.
- Fischer, T., K. Strasser, A. Racz, S. Rodriguez-Navarro, M. Oppizzi, P. Ihrig, J. Lechner, and E. Hurt. 2002. The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *EMBO J.* 21, 5843-5852.
- Kang, Y. and B.R. Cullen. 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev.* 13(9); 1126-1139.
- Lei, E.P. and P.A. Silver. 2002. Protein and RNA export from the nucleus. *Dev. Cell.* 2, 261-272.
- Lei, E.P., C.A. Stern, B. Fahrenkrog, H. Krebber, T.I. Moy, U. Aebi, and P.A. Silver. 2003. Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell.* 14, 836-847.
- Maudrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123, 127-130
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795-823
- Reed, R. and E. Hurt. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell.* 108, 523-531.
- Rodriguez-Navarro, S., T. Fischer, M. J. Luo, O. Antunez, S. Brettschneider, J. Lechner, J.E. Perez-Ortin, R. Reed, and E. Hurt. 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell.* 116, 75-86.
- Rout, M.P., A.D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148, 635-651.
- Segref, A., K. Sharma, V. Doye, A. Hellwig, J. Huber, R. Luhrmann, and E. Hurt. 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J.* 16, 3256-3271.
- Sommer, P. and U. Nehrass. 2005. Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 294-301.
- Strasser, K., S. Masuda, P. Mason, J. Pfannstiel, M. Oppizzi, S. Rodriguez-Navarro, A.G. Rondon, A. Aguilera, K. Struhl, R. Reed, and E. Hurt. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature.* 417, 304-308.
- Yoon, J.H. 2003. Synthetic lethal mutations with *spMex67* of *Schizosaccharomyces pombe* in the mediation of mRNA export. *J. Microbiol.* 41, 115-120
- Zenklusen, D., P. Vinciguerra, J.C. Wyss, and F. Stutz. 2002. Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell Biol.* 22, 8241-8253.

(Received May 9, 2006/Accepted June 16, 2006)

ABSTRACT: Construction of *Schizosaccharomyces pombe* *spThp1* Null Mutants and its Characterization

Jin Ho Yoon* (Department of Biology and Institute of Basic Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea)

The *spThp1* null mutant was constructed to study the function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *spThp1*, which is homologous to budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* *THP1*. Tetrad analysis showed that the *spThp1* is not essential for vegetative growth. The *spThp1* null mutant also showed no massive poly(A)⁺ RNA export defect. However, *spThp1* null is genetically associated with *spMex67* null. These results suggest that *spThp1* is involved in mRNA export out of the nucleus.