

## mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 관여하는 *spSac3* 유전자의 결실돌연변이 제조와 특성 조사

강속희 · 윤진호\*

성신여자대학교 생물학과 및 기초과학 연구소

mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 관여하는 발아효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 *SAC3* 유전자와 유사한 분열 효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 유전자 (*spSac3*로 명명)의 결실돌연변이주 (knockout mutant)를 제조하여 그 특성을 조사하였다. *S. pombe*의 이배체 (diploid) 균주에서 한 *spSac3* 유전자만을 결실시킨 후 4분체분석 (tetrad analysis)을 수행한 결과, 이 유전자는 생장에 필수적이었다. 또한 *in situ* hybridization을 통해 세포 내의 poly(A)<sup>+</sup> RNA 분포를 살펴본 결과, *spSac3* 유전자의 결실돌연변이주는 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 이상이 있었다. 이와 같은 결과들은 *spSac3* 유전자 역시 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 매우 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

**Keywords** □ deletion mutant, mRNA export, *Schizosaccharomyces pombe*, *spSac3*

진핵생물에서는 유전정보가 핵 안에 저장되어 있는 반면, 단백질의 합성은 세포질에서 일어난다. 이러한 분리는 유전자의 안정적 저장 및 발현조절에 유리하지만, RNA와 단백질 같은 거대분자들이 핵과 세포질을 끊임없이 이동하여야만 한다. 대부분의 단백질과 다른 RNA (rRNA, tRNA, snRNA 등)와는 달리, mRNA는 전사되는 순간부터 수많은 단백질과 결합하여 커다란 mRNP 중합체를 이루며, 이러한 mRNP 중합체는 mRNA가 생성되는 순간부터 소멸할 때까지 (전사, 가공과정, 이동, 해독, 분해 등) 시간적, 공간적으로 결합단백질이 달라지는 역동적인 구조를 이루고 있다(3). 핵 안에서 전사되는 pre-mRNA는 가공과정(5' 말단의 capping, 인트론이 제거되는 splicing, 3' 말단의 polyadenylation 등)을 거쳐 성숙된 mRNA가 되는데, 오직 성숙된 mRNA로 완벽하게 가공된 mRNP 중합체만이 핵막에 존재하는 핵공 복합체(nuclear pore complex)를 통해 핵 밖으로 수송될 수 있고 불완전하게 가공된 mRNA와 인트론 RNA는 세포질로 나오지 못하거나 핵 안에서 분해된다(11). 이와 같이 mRNA 수송을 유전자 발현조절에 있어 또 다른 차원의 조절기작으로 작용하며, 잘못된 단백질로 해독될 수 있는 비정상 mRNA들이 세포질로 나가는 것을 막기 위해 전사단계부터 가공과정에 이르기까지 유전자 발현의 모든 단계들이 mRNA 수송과 밀접하게 연계되어 있음이 최근의 연구를 통해 밝혀지고 있다(4, 10). 이렇게 복잡한 mRNA의 핵 밖으로 수송은 핵공복합체를 구성하는 핵공 단백질(nucleoporin) 중 일부와 수많은 가용성 수송인자들(soluble export factors)이 관여하고 있다(2). 발아효모인

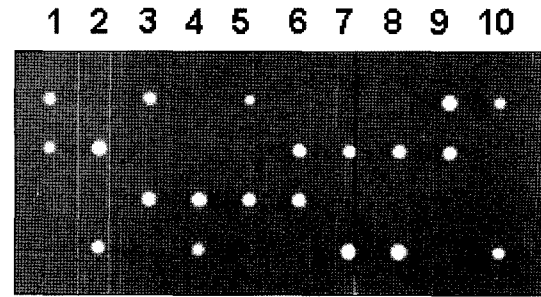
*Saccharomyces cerevisiae*에서 중요한 mRNA 수송인자 중의 하나인 Sac3 단백질은 전사 신장인자인 Thp1p와 중합체를 형성하여 mRNP 중합체를 핵공복합체의 핵질 쪽에 연결시키는 역할을 하는 것으로 추측된다(5, 6).

mRNA 수송에 관여하는 인자들의 연구에는 유전학적, 분자/세포생물학적 연구방법이 잘 확립되어 있는 효모가 좋은 model system으로 이용되어 많은 성과를 나타내고 있다. 하지만 하등진핵생물로서 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*와 발아효모인 *S. cerevisiae*는 전체유전자의 30% 정도가 서로 다를 만큼 여러 면에서 많은 차이점을 보이고 있다. mRNA 수송기작에 있어서도 두 효모는 상당한 차이점을 보인다. mRNA 수송의 운반체로 여겨지는 NXF-NXT인 *S. cerevisiae*의 Mex67p-Mtr2는 mRNA 수송에 필수적이거나, *S. pombe*의 Mex67p-Nxt1는 필수적이지 않다. 오히려 *S. cerevisiae*에서는 mRNA 수송에 필수적이지 않은 Rael 단백질이 *S. pombe*에서는 필수적이다(9, 13). 실제로 분열효모와 고등생물의 Rael 단백질은 mRNA 수송 운반체인 NXF-NXT heterodimers와 유사한 성질을 보임으로써, 비슷한 역할을 담당하는 것으로 추측된다. 서로 다른 두 종류의 효모에서 보이는 이러한 차이는 mRNA export에 중요한 두 단백질(Mex67p와 Rael1p)이 중복된 기능을 수행하거나, 또는 다르게 조절되는 여러 mRNA 수송 경로의 존재 가능성을 암시한다. 본 연구는 분열효모인 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에서 *SAC3* 유전자와 유사한 open reading frame (ORF)인 SPCC576.05 (*spSac3*로 명명)도 mRNA의 핵 밖으로 수송에 관여하는지를 알아보고자 *spSac3* 결실돌연변이주를 제작하여 특성을 연구하였다.

본 실험에서는 이전에 기술된 분열효모의 유전학적 방법과 배양 방법을 사용하였으며(1, 8), 항균제인 G418에 내성을 주는

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

*kar<sup>+</sup>* 유전자로 치환된 *spSac3* 결실돌연변이주를 만들기 위해서 이배체 균주인 SP286 (*h<sup>+</sup>/h<sup>+</sup> leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-210/ade6-216*)에 one-step gene disruption 방법을 사용하였다. 먼저 *spSac3* 유전자 부위를 pBluescript SK(+) 벡터 (Stratagene, USA)에 클로닝한 다음, PCR 돌연변이 방법을 사용하여 *spSac3* 유전자의 전체 ORF를 제거하고 그 자리에 제한효소 *NotI*의 염기서열을 집어넣었다. *kar<sup>+</sup>* 유전자를 포함하는 *NotI* DNA 절편을 그 자리에 삽입한 후, 완성된 플라스미드를 제한효소 *EcoRI*과 *HindIII*로 잘라내어 이배체 균주인 SP286에 형질전환 시켜 G418에 내성을 갖는 형질전환체를 얻었다(Fig. 1A). 이 중에서 *spSac3* 유전자가 하나만 *kar<sup>+</sup>* 유전자로 치환된 형질전환체 (*spSac3<sup>+</sup>/ΔspSac3::kar<sup>+</sup>*)를 PCR을 통해 확인하였다 (Fig 1B). 이렇게 얻은 이배체에서 유성생식에 의해 포자형성 (sporulation)을 할 수 있는 *h<sup>+</sup>/h<sup>90</sup>* 이배체를 선별한 다음, 4분체분석 (tetrad analysis)을 수행하였다. 10개의 4분체를 각각 분리하여 배양한 결과, 하나의 자낭에 있는 4개의 자낭포자 중 2개만 콜로니로 성장하고 2개는 성장하지 못하는 2:2 분리양상을 보였다 (Fig. 2). 콜로니를 형성한 포자는 모두 G418에 민감한 표현형을 보이는 것으로 보아 *spSac3* 유전자가 야생형인 반수체이고, 성장하지

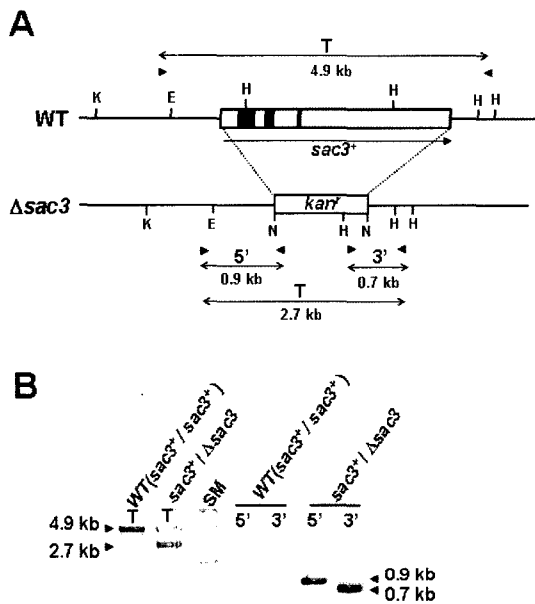


**Fig. 2.** Tetrad analysis. Diploid cells disrupted one of the *spSac3* locus were sporulated, and 10 tetrads (lane 1 through 10) were dissected on YES plate and incubated for 3 days at 28°C.

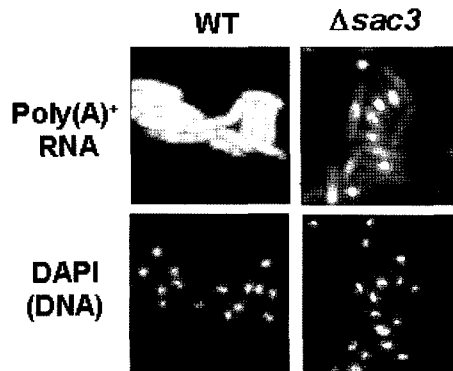
못한 포자는 *spSac3* 유전자가 결실된 *ΔspSac3::kar<sup>+</sup>* 유전자형을 갖는 반수체 포자이다. 이 실험 결과는 생장에 필수적이지는 않은 발아효모의 *SAC3* 유전자와는 달리, 분열효모의 *spSac3* 유전자는 생장에 필수적임을 의미한다.

*spSac3* 유전자는 생장에 필수적이므로 *ΔspSac3::kar<sup>+</sup>* 유전자형을 갖는 반수체 균주를 얻기 위해, 먼저 *spSac3* 유전자의 단백질을 암호화하는 부분만을 *nmt1* 프로모터에 붙여서 *spSac3*의 전사가 thiamine에 의해 조절되도록 하는 pREP81X-*spSac3* 플라스미드를 제작하였다. *nmt1* 프로모터는 배지에 thiamine이 없으면 전사가 유도되고, thiamine이 존재하면 전사가 억제되는 프로모터이다(7). 위에서 얻은 *spSac3* 유전자가 하나만 *kar<sup>+</sup>* 유전자로 치환된 이배체 (*spSac3<sup>+</sup>/ΔspSac3::kar<sup>+</sup>*)에 pREP81X-*spSac3* 플라스미드를 형질전환시킨 후, 무작위 포자분석방법 (random spore analysis)을 통해 *ΔspSac3::kar<sup>+</sup>* 유전자형을 가진 반수체 균주를 얻었다. 이 균주는 pREP81X-*spSac3* 플라스미드를 가지고 있으므로 thiamine이 없는 배지에서 자랄 수 있다.

*spSac3* 유전자가 분열효모에서 mRNA의 수송에 관여하는지를 알아보기 위해, 야생형 (*spSac3<sup>+</sup>*) 균주와 *spSac3* 결실 돌연변이주 (*ΔspSac3::kar<sup>+</sup>/pREP81X-spSac3*)에서 poly(A)<sup>+</sup>의 분포를 *in situ* hybridization을 통해 조사하였다. *In situ* hybridization은 전에 기술된 방법을 사용하였다(11). 혼성화탐침으로 3' 끝에 α-digoxigenin이 결합된 oligo-(dT)<sub>50</sub>을 사용하였으며, FITC-anti-digoxigenin Fab 항체 (Roche, Germany)를 이용하여 형광현미경에서 관찰하였다. 세포내 핵의 위치는 4', 6'-diamidino-2'-phenylindole (DAPI)로 DNA를 염색하여 관찰하였다. pREP81X-*spSac3* 플라스미드를 갖고 있는 *spSac3* 결실 돌연변이주 (*ΔspSac3::kar<sup>+</sup>/pREP81X-Sac3*)는 thiamine이 없는 배지에서 키우다가 thiamine을 첨가한 후 18시간 동안 *spSac3*의 발현을 억제 한 후 관찰하였다. 야생형 균주의 FITC 형광은 세포질 전체에 퍼져있고 오히려 핵 안이 조금 적어보이는 정상적인 poly(A)<sup>+</sup>의 분포를 보이는 데 비해서, *spSac3* 결실 돌연변이주는 형광이 핵 안에 매우 강하고 세포질에는 약하였다 (Fig. 3). 이 실험 결과는 분열효모에서도 *spSac3* 유전자가 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 매우 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.



**Fig. 1.** Construction of *spSac3* mutants. (A) Schematic diagram representing construct of *spSac3* null allele in *S. pombe*. Most of *spSac3* open reading frame region was substituted with marker gene, *Kar1*. The *spSac3* open reading frame is denoted by open boxes and the introns are shown by shaded boxes. The positions of PCR primers for confirmation of wild type and null alleles are indicated by arrowheads. K, *KpnI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; N, *NotI*. (B) Confirmation of disruption of the *spSac3* locus. PCR was performed with primers denoted in (A), using genomic DNAs from wild type (WT) and diploid disrupted one of the *spSac3* locus (*spSac3<sup>+</sup>/ΔspSac3::kar<sup>+</sup>*). SM represents DNA size markers.



**Fig. 3.** Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization in  $\Delta spSac3$  mutants and wild type cells. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) at 28 °C. Cells were then shifted to EMM medium containing thiamine (+B1) and grown for 18 hr. Coincident DAPI staining is shown in the bottom panels.

### 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.
- Darzacq, X., R.H. Singer, and Y. Shav-Tal. 2005. Dynamics of transcription and mRNA export. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 332-339.
- 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.
- 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.
- 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.
- Maundrell, 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.
- 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)<sup>+</sup> 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.
- Vinciguerra, P. and F. Stutz. 2004. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 285-292.
- Yoon, J.H. 2003. Synthetic lethal mutations with *spmex67* of *Schizosaccharomyces pombe* in the mediation of mRNA export. *J. Microbiol.* 41, 115-120.
- Yoon, J.H., D. Love, A. Guhathakurta, J.A. Hanover, and R. Dhar. 2000. Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8767-8782.

(Received May 11, 2006/Accepted June 12, 2006)

### ABSTRACT: Construction of *spSac3* Null Mutants Defective in mRNA Export

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

We constructed the null mutants of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *spSac3* gene that is homologous to budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* *SAC3* involved in mRNA export out of nucleus. Tetrad analysis showed that the *spSac3* is essential for vegetative growth. The *spSac3* mutants harboring pREP81X-*spSac3* plasmid showed poly(A)<sup>+</sup> RNA export defect in the presence of thiamine. These results suggest that *spSac3* is also involved in mRNA export from the nucleus.