

분열효모에서 *spTho1* 유전자의 결실과 과발현이 생장 및 mRNA Export에 미치는 영향

조예슬 · 윤진호*

성신여자대학교 자연과학대학 생명과학 · 화학부 및 기초과학연구소

Effects of *spTho1* Deletion and Over-Expression on mRNA Export in Fission Yeast

Ye-Seul Cho and Jin Ho Yoon*

Basic Science Research Institute, School of Biological Science and Chemistry, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Republic of Korea

(Received November 29, 2010/Accepted December 17, 2010)

Tho1 is a RNA-binding protein that assembles co-transcriptionally onto the nascent mRNA and is thought to be involved in mRNP biogenesis and mature mRNA export to cytoplasm in budding yeast. In fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of *THO1* (*spTho1*) was identified based on sequence alignment. A deletion mutant in a diploid strain was constructed by replacing one of *spTho1*-coding region with an *ura4⁺* gene using one-step gene disruption method. Tetrad analysis showed that the *spTho1* was not essential for growth. The *spTho1* null mutant did not show any defects of bulk mRNA export. However, over-expression of *spTho1* from strong *nmt1* promoter caused the growth defects and accumulation of poly(A)⁺ RNA in the nucleus. These results suggest that *spTho1* is involved in mRNA export from the nucleus to cytoplasm though it is not essential.

Keywords: knock-out mutant, mRNA export, over-expression, *S. pombe*, *spThp1* gene

진핵생물의 핵 안에서 일어나는 mRNA 전사는 여러 가공과정(5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 폴리아데닐화 등) 및 세포질로의 방출과정(mRNA export)과 밀접히 연관되어 있다. RNA 중합효소 II에 의해 전사되는 순간부터 mRNA는 여러 단백질과 결합하여 mRNA-단백질 (mRNP) 중합체를 형성하며, 가공이 완성된 성숙한 mRNP 중합체만이 세포질로 방출되어 단백질 합성에 이용된다. 잘못 가공되거나 적절히 포장되지 못한 mRNP 중합체는 핵에서 방출되지 못하며, 결국 exosome에 의해 분해된다(5, 10, 16). 세포질로 방출될 수 있는 성숙한 mRNP 중합체의 조립을 위해서는 효모에서 사람까지 진화적으로 잘 보존된 mRNP 조립인자들이 전사과정 동안 전사체에 유인되어 결합한다(15). THO는 전사를 하는 동안 mRNP 생성에 관여하는 복합체로서, 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서는 4개의 소단위(Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2)로 구성되어 있으며(3), 이 중에서 주요 소단위인 Hpr1과 Tho2는 연구된 모든 진핵생물에 존재한다. THO 소단위를 제거한 결실 돌연변이들을 만들면, 이 돌연변이들은 모두 전사의 결함, 전사와 연관된 DNA 재조

합의 빈도 증가, RNA 방출의 결함, exosome과 관련된 mRNA의 불안정성 증가 등의 표현형을 보인다(2, 3, 9, 11, 17). 또한, THO 복합체는 mRNA 방출인자인 Sub2/UAP56, Yra1/Aly, Tex1 등과 함께 TREX (transcription/export)라는 커다란 복합체를 형성한다(10, 17). Tho1은 출아효모에서 THO 복합체의 돌연변이가 보이는 결함을 상보하는 multicopy suppressor로 동정되었으며(14), THO-의존적으로 mRNA에 결합하여 mRNP 생성과 mRNA 방출에 관여하는 것으로 여겨진다(8).

출아효모인 *S. cerevisiae*와 분열효모인 *S. pombe*는 10억년 전에 진화적으로 갈라져 전체 유전자의 약 25%가 서로 이종상동체(ortholog)가 존재하지 않을 정도로 생물학적으로 많은 차이점을 보인다(7). 그러므로 진핵생물의 전체적인 mRNA export 기작을 이해하기 위해 두 효모에서 관련 유전자들을 비교 분석하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 분열효모인 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에서 *S. cerevisiae*의 Tho1 단백질과 유사한 *S. pombe*의 단백질을 암호화하는 open reading frame (ORF)인 SPCC31H12.03c를 찾아 mRNA 방출에 관여하는지를 알아보고자 하였다. 이 ORF에는 인트론이 없으며 245개 아미노산으로 이루어진 예상 분자량 26.7 kDa의

* For correspondence. E-mail: jhoyoon@sungshin.ac.kr; Tel: +82-2-920-7675; Fax: +82-2-920-7675

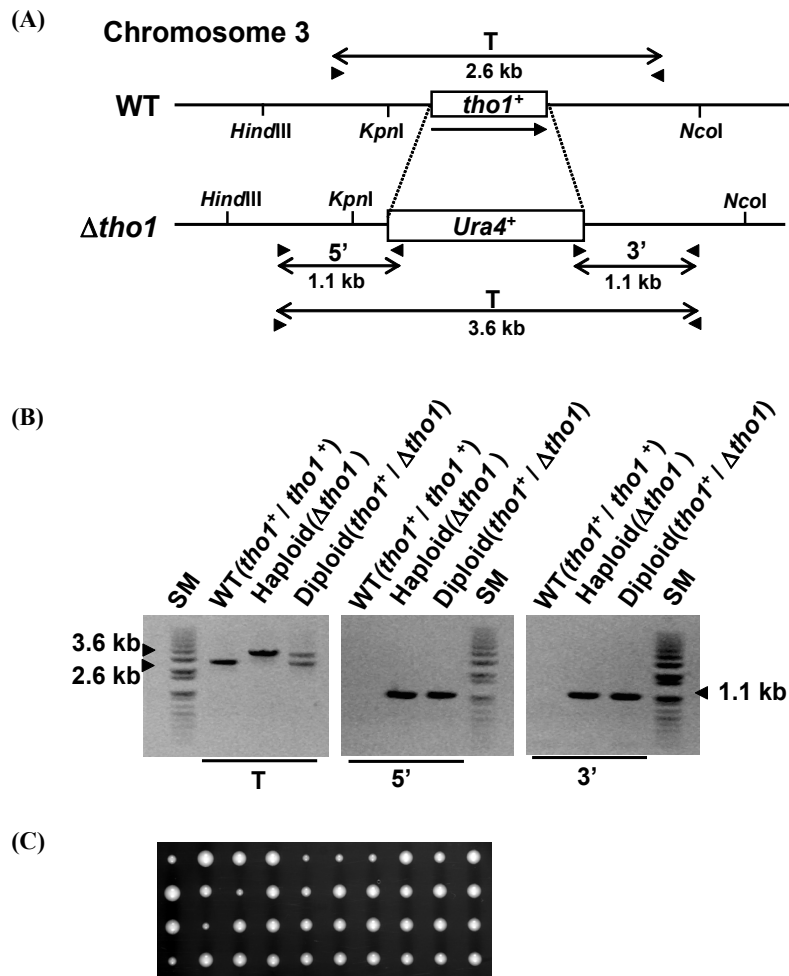


Fig. 1. *S. pombe* *spTho1* gene is not essential for growth. (A) A schematic representing the construct of $\Delta spTho1$ null allele in *S. pombe*. The *spTho1* open reading frame region was replaced by the marker gene, *ura4⁺*, by one-step gene disruption method. The *spTho1* ORF is represented by open boxes and the direction of transcription is shown by arrow under the ORF. The positions of PCR primers for confirmation of wild type and null alleles are indicated by arrowheads, and the expected size of PCR products is also shown. (B) Confirmation of the disruption of the *spTho1* locus by PCR. Genomic DNAs isolated from wild type (WT), Diploid disrupted one of the *spTho1* locus (*tho1⁺/Δtho1*), and haploid knock-out ($\Delta tho1$) strains. SM represents DNA size markers. (C) Tetrad analysis. Diploid cells disrupted one of the *spTho1* locus were sporulated, and 10 tetrads were dissected on YES plate and incubated for 3 days at 28°C.

단백질을 암호화하고 있다. 218개의 아미노산으로 이루어진 *S. cerevisiae* Tho1 단백질에 비해 다소 길지만, Tho1과 마찬가지로 N-말단 영역에 SAP 도메인이 존재하고 RNA-결합에 관여하는 C-말단 영역을 포함하여 전체적으로 68.2%의 유사성을 보이므로 이 유전자를 *spTho1*로 명명하였다.

본 실험에서는 이전에 기술된 분열효모의 유전학적 방법과 배양 방법을 사용하였다(1, 13). *ura4⁺*로 치환된 $\Delta spTho1$ 결실 돌연변이 균주를 만들기 위해서 double-joint PCR 방법으로 DNA 절편을 제작한 후, 야생형 균주에 형질전환하는 one-step gene disruption 방법을 사용하였다. $\Delta spTho1::ura4⁺$ DNA 절편을 이배체 균주인 SP286 (*h⁺/h⁹⁰ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-210/ade6-216*)에 형질전환시켜 유라실이 없는 배지에서 자라는 형질전환체를 얻었다(Fig. 1A). 이 형질전환체들로부터 2개의 *spTho1* 유전자 중 하나만 *ura4⁺* 유전자로

치환된 형질전환체($\Delta spTho1::ura4⁺/spTho1⁺$)를 선별하기 위해, 형질전환체의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 대조균으로 사용한 야생형인 균주에서는 2.6 kb의 DNA만이 증폭되는 것에 비해 3.6 kb도 증폭되는 결실 돌연변이를 선별하였으며, 대조균에서는 아무것도 증폭되지 않는 *ura4⁺*에 존재하는 프라이머와 5' 쪽 또는 3' 쪽 프라이머를 사용하여 결실 돌연변이에서는 각각 1.1 kb의 DNA가 증폭되는 것도 확인하였다(Fig. 1B). 이렇게 얻은 SP286($\Delta spTho1$) 균주로부터 포자형성을 할 수 있는 *h⁺/h⁹⁰* 이배체를 선별한 다음 4분체 분석을 수행하였다. 하나의 이배체 세포는 감수분열에 의해 4개의 반수체 포자(4분체)를 형성하므로, 10개의 4분체를 미세조작기(micromanipulator)로 각각 분리하여 완전배지에서 배양하였다. 분석한 10개의 사분체에서 모든 포자들이 콜로니를 형성하였다(Fig. 1C). 콜로니를 형성한 4개의 포자 중 2개는 유라실-영양

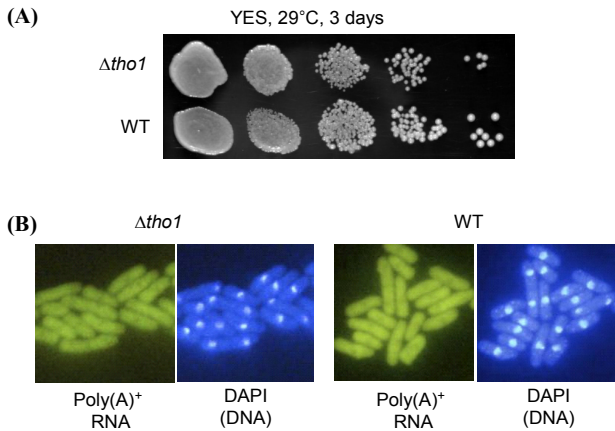


Fig. 2. Growth and mRNA export of $\Delta spTho1$ knock-out mutants. (A) Growth of $\Delta spTho1$ knock-out mutant and wild type (WT). Wild type and $spTho1$ disrupted cells were spotted in 10-fold serial dilutions onto YES plate and incubated for 3 days at 29°C. (B) Poly(A)⁺ RNA localization in $\Delta spTho1$ mutants and wild type cells. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium at 28°C. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

요구 표현형을 보이므로 야생형 $spTho1^+$ 유전자를 가진 반수체이고, 나머지 2개의 포자는 유라실이 없는 배지에서도 생장하므로 $spTho1$ 유전자가 결실된($\Delta spTho1::ura4^+$ 유전자형을 갖는) 것이었다. 이렇게 만들어진 반수체 $\Delta spTho1$ 결실 돌연변이 균주는 야생형 균주와 거의 유사한 생장 속도를 보였다 (Fig. 2A). 이러한 결과는 출아효모의 $THO1$ 유전자와 마찬가지로 분열효모의 $spTho1$ 유전자도 생장에 필수적이지 않다는 것을 의미한다. 결실 돌연변이주($\Delta spTho1$)가 mRNA 방출에 결함을 보이는지를 알아보기 위해, 야생형($spTho1^+$) 균주와 결실 돌연변이주에서 poly(A)⁺ RNA의 분포를 *in situ* hybridization을 통해 조사하였다. 혼성화 탐침으로 3' 끝에 α -digoxigenin이 결합된 oligo-(dT)₅₀을 사용하였으며, FITC-antidigoxigenin Fab 항체(Roche, Germany)를 사용하여 poly(A)⁺와 혼성화된 a-digoxigenin이 결합된 oligo-(dT)₅₀을 형광현미경에서 관찰하였다. 핵의 위치는 4', 6'-diamidino-2'-phenylindole (DAPI)로 DNA를 염색하여 관찰하였다. $spTho1$ 결실 돌연변이주도 야생형 균주와 비슷한 poly(A)⁺ RNA의 분포를 보이므로(Fig. 2B), mRNA의 방출에는 큰 결함이 없는 것으로 사료된다. $spTho1$ 유전자도 역시 생장에 필수적이지 않고 결실되더라도 mRNA 방출에 큰 결함을 보이지 않으므로, 이 유전자의 기능을 알아보기 위하여 $spTho1$ 유전자를 과발현(over-expression) 할 수 있는 균주를 제작하였다. 먼저 $spTho1$ 유전자의 ORF만을 *nmt1* 프로모터에 붙여서, $spTho1$ 의 전사가 티아민(비타민 B1)에 의해 조절되는 3X- $Tho1$ 과 81X- $Tho1$ 플라스미드를 제작하였다. *nmt1* 프로모터는 배지에 티아민이 존재하면 전사가 억제되는 프로모터이다(12). pREP3X 플라스미드에 있는 야생형 *nmt1* 프로모터는 강력한 프로모터로 티아민이 없는 배지에서 발현 정도가 매우 높으며, pREP81X 플라스미드에 존재하는 돌연변이 *nmt1* 프로모터는 발현정도가 야생형에 비해 훨씬 약

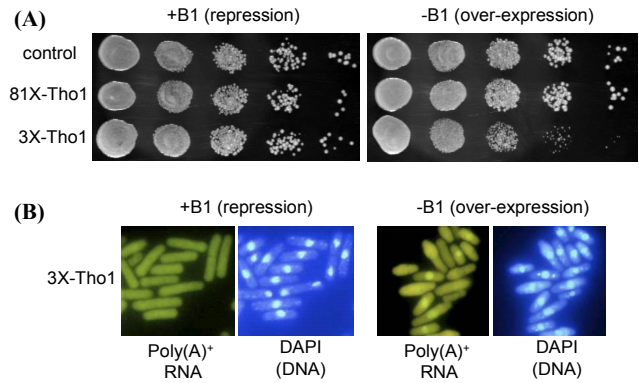


Fig. 3. Over-expression of $spTho1$ causes the defects of cell growth and mRNA export. (A) Growth of wild type (AY217) transformed with empty vector, 81X- $Tho1$, and 3X- $Tho1$. Strains were monitored by spot assay after incubation for 4 days in repressed or over-expressed conditions. (B) Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine (+B1) at 28°C. The cells were then washed and shifted to EMM medium without (-B1) or with thiamine (+B1), and were grown for 18 h. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

하다(6). 이렇게 제작된 플라스미드들을 형질전환하여 얻은 AY217 (3X- $Tho1$ 또는 81X- $Tho1$) 균주는 티아민이 있는 배지(+B1)에서는 플라스미드의 $spTho1$ 유전자의 발현이 억제되므로, 빈 플라스미드가 형질전환된 대조군과 마찬가지로 정상적인 생장을 보였다(Fig. 3A). 하지만 티아민이 없는 경우(-B1), 3X- $Tho1$ 플라스미드에서 $spTho1$ 유전자가 과발현되면 흥미롭게도 생장이 느려졌다. 발현이 적은 81X- $Tho1$ 은 대조군과 같이 정상적인 생장을 보였다(Fig. 3A). $spTho1$ 유전자의 과발현이 생장을 저해하므로, 이러한 성장억제가 mRNA 방출과 관련이 있는지 알아보기 위해 poly(A)⁺ RNA의 분포를 조사하였다. 대조군인 빈 플라스미드를 가지고 있는 균주와 3X- $Tho1$ 또는 81X- $Tho1$ 를 가지고 있는 균주들을 티아민이 있는 배지에서 키우다가 둘로 나누어 하나는 티아민이 없는, 그리고 나머지는 티아민을 첨가한 배지에서 18시간 더 키웠다. 빈 플라스미드를 가지고 있는 대조군과 81X- $Tho1$ 를 가진 균주는 티아민의 유무에 상관없이 poly(A)⁺ RNA가 세포질 전체에 정상적으로 퍼져있었다(자료 미제시). 하지만 3X- $Tho1$ 를 가지고 있는 균주는 $spTho1$ 유전자가 과발현되는 조건(-B1)에서는 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되었다(Fig. 3B). 이것은 $spTho1$ 유전자가 과발현되는 경우 세포질의 mRNA 방출에 이상이 생긴다는 것을 의미한다. 이와 같은 결과들은 $spTho1$ 유전자도 필수적이지는 않지만 mRNA의 핵에서 세포질의 방출에 관여하고 있음을 시사한다. $Tho1$ 의 ortholog인 사람의 CIP29 단백질은 UAP56과 직접적인 결합을 통해 Aly와 함께 THO 에 결합함으로써 TREX 복합체를 형성한다는 것이 최근에 밝혀졌다(4). 그러므로 $spTho1$ 의 과발현은 $spTho1$ 과 결합하는 단백질들을 제거함으로써 적절한 mRNP 형성을 방해하기 때문에 mRNA 방출이 영향을 받는 것으로 추측된다.

적요

출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 RNA-binding 단백질인 Tho1은 mRNA가 전사되는 동안 초기 mRNA에 결합하여 mRNP 생성과 성숙한 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출에 관여하는 것으로 여겨진다. 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에서도 Tho1과 유사한 단백질을 암호화하는 유전자 (*spTho1*로 명명)를 찾아 그 특성을 조사하였다. 이배체 *S. pombe* 균주에 하나의 *spTho1* 유전자만을 결실시킨 후 4분체 분석을 수행한 결과, 이 유전자는 생장에 반드시 필요하지 않았다. 또한 *spTho1* 결실 돌연변이는 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출도 정상적으로 보였다. 그러나 티아민에 의해 발현이 조절되는 강력한 프로모터를 이용하여 *spTho1*를 과발현시키면, 세포의 생장이 억제되었으며 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되었다. 이와 같은 결과들은 *spTho1* 유전자가 필수적이지는 않지만 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출에 관여하고 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Alfa, C., P. Fantes, J. Hyams, M. Mcleod, and E. Warbrick. 1993. Experiments with Fission Yeast. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Chávez, S. and A. Aguilera. 1997. The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev.* 11, 3459-3470.
- Chávez, S., T. Beilharz, A.G. Rondón, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J.Q. Svejstrup, T. Lithgow, and A. Aguilera. 2000. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19, 5824-5834.
- Dufu, K., M.J. Livingstone, J. Seebacher, S.P. Gygi, S.A. Wilson, and R. Reed. 2010. ATP is required for interactions between UAP56 and two conserved mRNA export proteins, Aly and CIP29, to assemble the TREX complex. *Genes Dev.* 24, 2043-2053.
- Fasken, M.B. and A.H. Corbett. 2009. Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol.* 6, 237-241.
- Forsburg, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21, 2955-2956.
- Hedges, S.B. 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nat. Rev. Genet.* 3, 838-849.
- Jimeno, S., R. Luna, M. García-Rubio, and A. Aguilera. 2006. Tho1, a novel hnRNP, and Sub2 provide alternative pathways for mRNP biogenesis in yeast THO mutants. *Mol. Cell Biol.* 26, 4387-4398.
- Jimeno, S., A.G. Rondón, R. Luna, and A. Aguilera. 2002. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J.* 21, 3526-3355.
- Köhler, A. and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 761-773.
- Libri, D., K. Dower, J. Boulay, R. Thomsen, M. Rosbash, and T.H. Jensen. 2002. Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol. Cell Biol.* 22, 8254-8266.
- 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.
- Piruat, J.I. and A. Aguilera. 1998. A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination. *EMBO J.* 17, 4859-4872.
- Rondón, A.G., S. Jimeno, and A. Aguilera. 2010. The interface between transcription and mRNP export: From THO to THSC/TREX-2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1799, 533-538.
- Saguez, C., J.R. Olesen, and T.H. Jensen. 2005. Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 287-293.
- Strasser, K., S. Masuda, P. Mason, J. Pfannstiel, M. Oppizzi, S. Rodríguez-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.