



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

윤진호 교수지도
석사학위 청구논문

분열효모에서 mRNA export에
관여하는 단백질 복합체에
대한 연구

2016

성신여자대학교 대학원

생물학과

고은진

분열효모에서 mRNA export에
관여하는 단백질 복합체에
대한 연구

윤진호 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2015년 11월

성신여자대학교 대학원

생물학과

고은진

인 준 서

고은진의 석사학위 논문으로 인준함

2015년 11월

심사위원장 _____ (인)

심 사 위 원 _____ (인)

심 사 위 원 _____ (인)

성신여자대학교 대학원

논문개요

TREX (*TR*anscription and *E*xport)와 TREX-2는 전사 신장(elongation), mRNA 가공(processing) 및 핵에서 세포질로의 mRNA 방출(mRNA export)에 관여하는 단백질 복합체로 진핵세포에 진화적으로 잘 보존되어 있다. 본 논문에서는 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 TREX와 TREX-2의 구성인자에 대한 실험을 수행하였다. TREX의 구성요소 중 하나인 *tho7* 유전자를 결실(deletion)시킨 균주(Δ *tho7*)는 성장과 mRNA 방출에 결함을 나타내었다. 그러나, *tho7* 유전자를 과발현(over-expression)시킨 균주는 성장 및 mRNA 방출이 정상적이었다. 또한, 살아있는 세포에서 Tho7-GFP 단백질이 주로 핵 내에 존재하는 것을 확인하였다. 한편 TREX-2의 구성요소 중 하나인 *cdc31* 유전자는 성장에 필수적인 유전자이기 때문에, 티아민(thiamine)으로 발현 조절이 가능한 *nmt1* 프러모터에 *cdc31* ORF를 클로닝하여 형질전환시킨 균주에 *cdc31* 유전자를 결실(deletion)시켜 결실돌연변이 균주(Δ *cdc31*)를 제작하였다. 티아민을 첨가하여 *cdc31*의 발현을 억제하면 성장과 mRNA 방출에 결함을 보였고, 티아민을 첨가하지 않아 *cdc31*의 발현을 유도한 경우에는 성장과 mRNA 방출에 결함을 나타내지 않았다. 또한, *cdc31*도 과발현시킨 균주에서는 성장 및 mRNA 방출이 정상적이었다.

두 복합체를 구성할 것으로 여겨지는 *S. pombe*의 이종상동체(ortholog)들 (TREX: Tho1, Tho2, Tex1, Tho5, Tho7, Uap56, Mlo3 등과 TREX-2: Sac3, Thp1, Pci2 (Thp1 paralog), Sus1, Cdc31, Rpn15 등)과 mRNA 방출에 관여하는 세 가지 단백질(Mex67, Rael, Rmr1) 사이의 물리적 상호작용을 알아보기 위하여 yeast two-hybrid (Y2H)와 co-immunoprecipitation

(Co-IP)실험을 진행하였다. Y2H 실험 결과 TREX 복합체의 경우 Uap56(AD)-Mlo3(BD), Mlo3(AD)-Uap56(BD), Tex1(AD)-Tho2(BD), Tho2(AD)-Tex1(BD), Tho1(AD)-Tex1(BD) 등이 양성 반응을 보였으며, TREX-2 복합체의 경우 Sus1(AD)-Sac3(BD), Rpn15(AD)-Pci2(BD), Cdc31(AD)-Pci2(BD), Sac3(AD)-Pci2(BD) 등이 양성 반응을 보였다. 또한, Co-IP 실험을 통해 TREX의 경우 Tho1-Tho5, Tho1-Tex1, Tho1-Tho2 등의 물리적 상호작용을 확인하였으며, TREX-2의 경우 Rmr1-Thp1의 물리적 상호작용을 확인하였다.

이와 같은 실험결과들은 TREX와 TREX-2 구성인자들의 분열효모 *S. pombe*의 이중상동체들도 단백질 복합체를 형성하여 mRNA 방출에 관여하고 있음을 시사한다.

목 차

논문개요	i
목차	iii
도표목차	v
그림목차	vi
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	
1. 실험재료	
1.1 균주 및 배지	4
1.2 플라스미드	5
1.3 재료 및 시약	6
1.4 프라이머	7
2. 실험방법	
2.1 대장균의 형질전환 (<i>E.coli</i> transformation)	7
2.2 효모의 형질전환 (Yeast transformation)	8
2.3 <i>S. pombe</i> 유전체 DNA 분리	8
2.4 <i>S. pombe</i> RNA 분리	9
2.5 Spot assay	10
2.6 <i>In-Situ</i> 혼성화(hybridization)	10
2.7 Yeast two-hybrid (Y2H)	11
2.8 Western blot	12

2.9 Co-Immunoprecipitation (Co-IP)	13
2.10 균주 제작	
2.10.1 과발현 돌연변이	14
2.10.2 결실 돌연변이	15
2.10.3 GFP tagging	16
2.10.4 TAP tagging	16
2.10.5 HA tagging	17

III. 결과

1. <i>tho7</i> 결실 돌연변이 균주 분석	32
2. <i>tho7</i> 과발현 돌연변이 균주 분석	35
3. Tho7 단백질의 위치 추적	37
4. <i>cdc31</i> 결실 돌연변이 균주 분석	39
5. <i>cdc31</i> 과발현 돌연변이 균주 분석	42
6. Yeast two-hybrid (Y2H)	44
7. Co-Immunoprecipitation (Co-IP)	59

IV. 토의	61
--------------	----

참고문헌

ABSTRACT (영문초록)

도 표 목 차

표 1. 균주	18
표 2. <i>S. pombe</i> 배지 조성	21
표 3. <i>S. cerevisiae</i> 배지 조성	23
표 4. <i>E. coli</i> 배지 조성	25
표 5. 프라이머	26
표 6. 버퍼	30
표 7. mRNA 방출에 관여하는 단백질	46
표 8. Yeast two-hybrid 조합	47

그림 목 차

그림 1. 결실 돌연변이 $\Delta tho7::ura4$ 균주의 제작과 분석	33
그림 2. <i>tho7</i> 과발현 돌연변이 분석	36
그림 3. Tho7 단백질의 위치 추적(localization)	38
그림 4. 결실 돌연변이 $\Delta cdc31::kan^r$ 균주의 제작과 분석	39
그림 5. <i>cdc31</i> 과발현 돌연변이 분석	43
그림 6. Yeast two-hybrid (Y2H)	50
그림 7. Co-Immunoprecipitation (Co-IP)	60

I. 서론

진핵생물에서 유전자 발현은 핵 내에서 일어나는 전사(transcription)와 RNA 가공(processing), 핵에서 세포질로의 mRNA 방출, 그리고 세포질 내에서 일어나는 번역(translation)과 같은 여러 과정이 연결되어 일어난다 (Komili and Silver, 2008). 핵 안에서 일어나는 유전자 발현의 초기 단계에는 SAGA (Spt-Ada-Gcn5 Acetyl-transferase), TREX (TRanscription EXport), TREX-2 (TRanscription EXport 2), NPC (Nuclear Pore Complex, 핵공 복합체) 등과 같은 단백질 복합체와 그 밖의 여러 단백질들이 관여한다.

진핵세포의 핵막(nuclear envelope)은 핵과 세포질 사이의 장벽 역할을 하므로, 이를 통해 핵과 세포질에서의 분자적 메커니즘을 물리적, 기능적으로 분리시킨다. 핵 내에서 TFIIID (Transcription Factor IID, 전체 유전자의 90%에 관여)와 SAGA (전체 유전자의 10%에 관여)에 의해 전사가 활성화되고 RNAPII (RNA Polymerase II)에 의해 mRNA 생합성이 이루어진다(Garcia *et al.*, 2012). SAGA는 4개의 모듈(HAT, DUB, TAF, SPT)과 21개의 단백질로 이루어진 단백질 복합체이다. HAT 모듈과 DUB 모듈은 각각 HAT (Histone Acetyl Transferase) 활성화와 histone H2B deubiquitylation 활성을 갖는다. 이러한 촉매 활성은 전사 후 가공 및 변형 과정에 중요한 기능을 한다(Pascual *et al.*, 2008). 또한, SAGA는 개시 전 복합체(pre-initiation complex, PIC)를 형성하고 TREX-2와 상호작용을 한다(Garcia *et al.*, 2012).

초기에 만들어진 mRNA는 가공과 방출에 관여하는 mRNA 결합 단백질의 도움으로 성숙되어 mRNP (mRNA particle)를 형성한다(Tutucci and

Stutz, 2011; Klass *et al.*, 2013). 전사가 진행되는 동안 전사 신장 (transcription elongation)과 mRNA 방출에 관여하는 THO 복합체가 염색질로 모여든다. 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 THO 복합체는 Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2, Tex1 단백질로 구성되어 있으며, mRNA 방출 인자인 Sub2와 Yra1와 함께 TREX로 명명된 복합체를 형성한다(Chavez *et al.*, 2000; Strasser *et al.*, 2002). Pre-mRNA에 THO 복합체와 Sub2가 먼저 결합한 후 Yra1이 붙는다(Zenklusen *et al.*, 2002; Abruzzi *et al.*, 2004). 그 이후, Sub2가 Yra1으로부터 분리되고 그 자리에 Mex67이 결합한다(Masuda *et al.*, 2005; Zenklusen *et al.*, 2001; Strasser *et al.*, 2001; Strasser *et al.*, 2000). mRNA 수송 단백질인 Mex67은 adapter 단백질인 Yra1을 통해, 또는 THO의 구성요소인 Hpr1을 통해 mRNA에 결합한다. Mex67은 핵공 단백질과의 직접적인 상호작용을 함으로써, 핵공 복합체를 통해 mRNA를 세포질로 이동시킨다(Gwizdek *et al.*, 2006; Gwizdek *et al.*, 2005). 이 때 비정상적인 mRNP는 세포질로 방출되지 않고, 궁극적으로 엑소좀(exosome)에 의하여 분해된다(Ana *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2011).

TREX-2는 핵공 복합체의 핵 안쪽 면에 위치하며, Thp1, Sac3, Cdc31, Sus1 그리고 Dss1/Sem1으로 구성되어 있다(Gallardo *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004). TREX-2도 mRNA 방출에 관여하며 핵공과 직접적으로 상호작용을 한다(Lei *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2002). 또한, SAGA와 TREX-2에 공통적으로 존재하는 단백질인 Sus1을 통해 두 단백질 복합체의 상호작용이 이루어진다(Rodriguez *et al.*, 2004). 이러한 상호작용은 전사 활성을 증진시키고 효율적인 mRNA의 신장과 방출을 유도한다(Govind *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2008).

본 연구에서는, 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 mRNA 신장

과 방출에 관여하는 TREX 및 TREX-2 단백질 복합체와 mRNA 방출 인자에 대해 알아보고자 하였다. *S. cerevisiae*에서 TREX의 구성요소인 Mft1과 상동체(homologue)인 Tho7와 TREX-2의 구성요소인 Cdc31 단백질을 암호화하는 유전자의 결실 또는 과발현 시켰을 때, 성장 및 mRNA 방출에 어떠한 영향을 미치는지 연구하였으며 살아있는 세포 내의 Tho7 단백질 위치를 확인하였다. 또한, *S. pombe*의 TREX 구성 단백질(Tho1, Tho2, Tho5, Tho7, Tex1, Mlo3, Uap56 등), TREX-2 구성 단백질(Sac3, Thp1, Pci2, Cdc31, Sus1, Rpn15 등), mRNA 방출인자(Mex67, Rael, Rmr1)들 사이의 물리적 상호작용을 알아보기 위한 연구를 추가적으로 진행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 분열 효모인 *S. pombe*와 출아 효모인 *S. cerevisiae*이다. 재조합 플라스미드 증폭을 위한 *E. coli*는 Top10을 이용하였다. 자세한 균주 목록은 표 1.에 정리하였다.

세포 배양 기술과 유전학적 방법은 *S. pombe* 표준 방법을 참고하였다 (Alfa *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1991). *S. pombe*는 YES (Yeast Extract with Supplements)배지와 EMM (Edinburgh Minimal Medium)배지를 기본으로 사용하였으며, 형질전환 된 *S. pombe*를 선별하기 위하여 아데닌, 류신, 유라실 (225mg/L) 등의 첨가물을 필요에 따라 각각 첨가하였다. pREP 벡터의 발현 억제를 위하여 EMM배지에 15 μ M 티아민(Sigma, U.S.A.)를 첨가하였고 카나마이신 저항성 유전자를 가진 돌연변이 선별을 위하여 YES 배지에 100 μ g/ml G418 (Duchefa, Netherlands)을 첨가하였다.

*S. cerevisiae*는 YPAD (Yeast extract peptone dextrose)배지를 기본으로 사용하였으며, 형질전환 된 *S. cerevisiae*를 선별하기 위해 YNB (Yeast Nitrogen Base)에 luecine, tryptophane을 제외한 아미노산들을 첨가하여 제조한 배지를 사용하였다.

*E. coli*는 LB (Luria-Bertani)배지를 기본으로 사용하였으며, LB배지에

100 µg/ml 농도의 앰피실린(Duchefa, Netherlands) 또는 200 µg/ml 농도의 제오신(Invitrogen, U.S.A.)을 첨가한 배지에서 형질전환 된 *E. coli*를 선별하였다. 배지의 자세한 조성은 표 2-4에 나타내었다.

1.2 플라스미드

과발현 균주를 제작하기 위하여 pREP 벡터(Maundrell, 1993)를 사용하였다. pREP 벡터는 티아민으로 발현 조절이 가능한 *nmt1* 프로모터, 그리고 류신을 선택 표지자 (selective marker)로 가지고 있다. 가장 강력한 세기의 야생형 *nmt1* 프로모터를 갖는 pREP3X와 순서대로 약한 세기의 돌연변이 *nmt1* 프로모터를 갖는 pREP41X, pREP81X 벡터를 본 실험에 사용하였다.

Mft1-GFP 키메라 단백질(chimeric protein)을 제작하기 위하여 GFP와 Kan^r 단백질을 암호화하는 서열을 지닌 pFA6a-GFP(S65T)-kan-MX6 벡터(Bahler *et al.*, 1998)를 사용하였다.

Co-Immunoprecipitation 실험을 위한 TAP (Tandem Affinity Purification) tag를 붙이기 위해 Calmodulin binding peptides, TEV protease 절단 부위, Protein A, Kan^r를 암호화하는 서열을 순서대로 지닌 pFA6a-CBP 4.5X protein A (TEV)-kanMX6 벡터를 사용하였다. HA tagging에는 3개의 HA epitope tag와 *ura4* 선택 표지자를 지닌 pSLF273 벡터(Forsburg, 1997)를 사용하였다.

Yeast two-hybrid 실험을 위하여 pBluescript SK-, pGAD424/S, pTLexA4/S 등의 세 가지 벡터를 사용하였다. pBluescript SK- 벡터는 발현이 아닌 단순 클로닝을 위한 벡터로서 프로모터를 가지고 있지 않으며 작

은 크기(3.0 kb)의 특성을 갖는다. 전사 활성 도메인을 갖고 있는 pGAD424/S 벡터는 번역틀(frame)을 맞추기 위해 기존의 pGAD424 벡터의 MCS (Multi Cloning Site)를 변형하여 사용하였으며, *LEU2* 선택 표지자를 갖고 있다. DNA 결합 도메인을 갖고 있는 pTLexA4/S 벡터는 번역틀을 맞추기 위해 기존의 pTLexA4 벡터의 MCS를 변형하여 사용하였으며 *TRP1* 선택 표지자를 갖고 있다.

pTLexA4/S 벡터는 제오신 저항성 유전자를 가지고 있으며, 나머지 모든 벡터는 공통적으로 암피실린 저항성 유전자를 지니고 있다.

1.3. 재료 및 시약

균주를 배양하기 위한 배지 제작에 Invitrogen (U.S.A.), Gold bio (U.S.A.), Sigma (U.S.A.), MP (Germany), BD (U.S.A.), Clontech (U.S.A.) 제품을 사용하였다. 염색체 DNA 추출, PCR 정제, Gel elution kit는 QIAGEN (Germany) 제품을 사용하였고 plasmid DNA miniprep kit는 GeneAll (Korea) 제품을 사용하였다. RNA 추출에는 life technology (U.S.A.), Sigma (U.S.A.) 제품을 사용하였다. 유전체 DNA 증폭과 cDNA 합성을 위하여 TAKARA (Japan)의 Taq DNA polymerase, RTase (Reverse Transcriptase)를 사용하였다. DNA, RNA 전기영동에 필요한 Agarose는 MP (Germany) 제품을 사용하였고 클로닝을 위한 제한 효소와 T4 ligase는 NEB (U.K.) 제품을 사용하였다. 그 외 실험에 사용한 시약은 실험방법에 기술하였다.

1.4. 프라이머

일반적으로 PCR 반응에 사용한 프라이머의 GC 비율은 40-60%였으며 AT 서열의 반복을 피하였다. 18-20 mer의 길이와 최소 단위 (0.02-0.025 μ M)로 Xenotech (Korea)에 주문 제작하여 사용하였다. 프라이머는 50 μ M 농도로 녹여 저장하였으며 PCR 반응 시 10 μ M로 희석하여 사용하였다. 실험에 사용한 프라이머는 표 5.에 정리하였다.

2. 실험방법

2.1. 대장균의 형질전환 (*E. coli* transformation)

대장균의 형질전환 실험은 CaCl_2 방법을 사용하였다(Sambrook and Russell, 2001). *E. coli* competent cell 100 μ l와 재조합 벡터 1 μ l를 섞은 후 얼음에 30분 동안 보관한 뒤 42°C에서 1분 heat shock, 얼음에서 1 분 cold shock을 가하였다. Competent cell 부피의 10배에 해당하는 1 ml의 LB 액체배지를 넣고 37°C에서 1시간 동안 regeneration을 시킨 후 LA 고체배지에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 배양하였다.

2.2. 효모의 형질전환 (Yeast transformation)

분열효모 *S. pombe*와 출아효모 *S. cerevisiae*의 형질전환은 Lithium acetate 방법을 사용하였다(Warbrick *et al.*, 1993). 새로 키운 콜로니를 액체 배지에 접종하여 29°C에서 진탕배양하여 키운 배양액을 새 액체 배지에 적당량 옮겨 4-5번 이상 doubling을 할 수 있도록 균주를 배양하였다. *S. pombe*는 doubling time이 4시간이므로 16-20시간을 배양하였고, *S. cerevisiae*는 doubling time이 30분이므로 4시간 동안 50 ml의 액체 배지에서 배양하여 $7-8 \times 10^6$ cell/ml에 도달하였을 때 실험을 진행하였다. 배양한 세포를 원심 분리하여 배지성분을 제거하고 멸균한 증류수로 세척한 뒤 LiAc/TE (100 mM LiAc pH7.5, 10 mM Tris-Cl pH7.0, 1 mM EDTA pH8.0) 버퍼에 cell을 풀어 competent cell을 제작하였다. competent cell 100 μ l에 형질전환 시킬 DNA 1 μ g, Salmon sperm DNA 2.5 μ l (10 mg/ml, Invitrogen), 50% PEG 300 μ l를 넣고 섞은 후 29°C에서 30분 동안 배양하였다. 42°C에서 10분 동안 heat shock을 가한 뒤 실온에서 5분 동안 보관 후 원심 분리하여 PEG성분을 제거하였다. cell을 TE (10 mM Tris-Cl pH7.0, 1 mM EDTA pH8.0) 버퍼 100 μ l에 풀고 적정 고체배지에 도말하여 29°C에서 5일 동안 배양하였다.

2.3 *S. pombe* Genomic DNA isolation

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 *S. pombe*의 chromosomal

DNA를 추출하였다. 세포벽을 제거하기 위한 시약은 본 kit에 포함되어 있지 않아 SCE buffer (50 mM Citrate/Phosphate pH 5.6, 40 mM EDTA, 1.2 M Sorbitol)로 세척을 한 뒤 Spheroplast buffer (Zymolase 20T 2.5 mg/ml in SCE buffer) 1 ml을 처리하여 37°C에서 배양하였다. 30분 동안 배양한 뒤 10% SDS를 처리하여 세포벽의 제거를 확인한 후 kit의 protocol을 수행하였다.

2.4 *S. pombe* RNA isolation

Yeast two hybridization 실험 시 필요한 cDNA 클로닝을 위하여 RNA isolation을 하였다. 29°C에서 16-20시간 동안 50 ml의 액체 배지에서 *S. pombe*를 배양하여 $7-8 \times 10^6$ cell/ml에 도달하였을 때 실험을 진행하였다. 배양한 세포를 원심 분리하여 배지성분을 제거하고 멸균한 증류수로 세척한 뒤 멸균한 증류수 1 ml에 cell을 풀어 미리 cooling한 1.5 ml tube에 160 μ l씩 분주하였다. 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 Trizol 1 ml에 cell을 풀어 beads가 담긴 tube로 옮겼다. Mini-beadbeater (BioSpec)를 이용하여 30 초씩 3 번 반복하여 cell을 터뜨렸다. 원심 분리하여 상층액을 취해 새 1.5 ml tube로 옮겼다. Chloroform 200 μ l를 첨가하고 흔들어 섞어준 뒤 3분 간 상온에 보관하였다. 원심 분리 후 RNA, 단백질, DNA의 3개의 층으로 나뉜 튜브에서 맨 위의 RNA가 포함된 상층액을 취해 새 1.5 ml tube로 옮겼다. Isopropyl alcohol 500 μ l를 첨가하여 상온에서 10분 동안 보관한 후 원심 분리하여 상층액을 버리고 RNA pellet을 75% 에탄올로 세척을 하였다. 세척을 한 뒤 DEPC 처리 된 RNase free water 15 μ l를 넣고 RNA pellet을

풀어 RNA를 isolation하였다.

2.5 Spot assay

형질전환된 들연변이 균주의 성장 속도를 야생형과 비교하기 위한 방법으로 사용하였다. 29°C에서 1-2일 동안 5 ml의 YES 액체 배지에서 배양하여 실험에 사용할 모든 균주의 세포 수를 2×10^7 cell/ml 농도로 맞추었다. 농도를 같게 맞춘 세포들을 멸균한 증류수로 세척한 뒤 1/10씩 희석하여 성장 속도를 확인하기 위한 적정 고체 배지에 일정한 간격으로 5 μ l씩 떨어뜨렸다. 22°C, 28°C, 34°C의 온도에서 4-5일 동안 배양하여 성장 속도를 관찰하였다.

2.6 *In-Situ* hybridization

29°C에서 16-20시간 동안 50ml의 EMM 액체 배지에서 *S. pombe*를 배양하여 $7-8 \times 10^6$ cell/ml에 도달하였을 때 실험을 진행하였다. 30% formaldehyde 6 ml을 첨가하여 29°C 인큐베이터에서 45분간 고정(fixation)시켰다. 원심분리 후 배지 성분과 formaldehyde를 제거하고 0.3 M 글리신이 첨가된 PBS 버퍼로 세척하였다. Spheroplast 버퍼 1 ml을 첨가한 뒤 37°C 인큐베이터에 45분 동안 배양하였다. 10% SDS를 처리하여 세포벽의 제거를 확인한 후 SCE 버퍼로 세척하였다. 500 μ l의 SCE 버퍼로 cell을 풀어

poly-D-리신으로 코팅된 슬라이드 위에 올려놓았다. Cell을 슬라이드에 고정시키기 위해 4°C에서 2시간 동안 보관한 뒤 메탄올에 담가 -20°C에서 2시간 이상 보관하였다. 메탄올에서 슬라이드를 꺼내어 말린 후 2X SSC 버퍼로 세척하였다. 10 µl의 hybridization solution을 첨가한 뒤 커버글라스를 덮어 37°C에서 overnight하였다. 상온에서 슬라이드를 2X SSC에 5분 이상 담가 커버글라스를 제거한 후 2X SSC에 20분 동안 담가 세척하였고 37°C에서 20분 동안 2회 세척한 후 0.1% tritonX-100이 첨가된 2X SSC 버퍼로 5분 간 세척하였다. 상온에서 슬라이드를 말린 뒤 fluorescein antidigoxigenin antibody solution 10 µl를 첨가하고 커버글라스를 덮어 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 상온에서 2X SSC로 15분간 2회 세척하고 말린 후 DAPI mounting medium 12 µl를 첨가하여 커버글라스를 덮고 밀봉하였다.

2.7 Yeast two hybridization

DNA 결합 도메인을 갖는 pGAD424/S 벡터와 전사 활성 도메인을 갖는 pTLexA4/S 벡터에 상호작용을 보고자 하는 유전자의 cDNA를 클로닝 한 후 염기서열 결정 (DNA sequencing)을 통해 이상 유무를 확인을 하였다. 두 벡터를 형질전환시킬 *S. cerevisiae* L40 균주는 인트론이 거의 없기 때문에 스플라이싱 기작이 활성화되어있지 않아 *S. pombe*에서 RNA를 추출한 뒤 역전사 과정을 통하여 cDNA 클로닝을 하였다. *S. cerevisiae* L40 균주에 클로닝 된 두 벡터를 동시에 형질전환시킨 후 류신과 트립토판이 없는 SD - LW 고체배지에서 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 류신, 트립토판, 히스티딘이 없는 SD - LWH와 X-gal 고체배지에서 각각 배양하여 두 단백

질의 상호작용을 확인하였다.

2.8 Western blot

29°C에서 16-20시간 동안 50 ml의 EMM 액체 배지에서 *S. pombe*를 배양하여 $7-8 \times 10^6$ cell/ml에 도달하였을 때 실험을 진행하였다. 원심 분리하여 배지 성분을 제거한 뒤 stop 버퍼와 lysis 버퍼를 각각 5 ml씩 차례대로 처리하여 2회 세척하였다. Protease inhibitor가 첨가된 lysis 버퍼 30 μ l로 cell을 풀어 beads가 담긴 튜브로 옮겼다. Mini-bead beater (BioSpec)을 이용하여 30초 동안 cell을 터뜨린 뒤 protease inhibitor가 첨가된 lysis 버퍼 1 ml을 넣고 vortexing하였다. 4°C에서 1분 동안 원심 분리한 후 새 1.5 ml 튜브로 옮긴 뒤 4°C에서 10분 동안 원심 분리를 추가적으로 하여 깨끗한 cell lysate를 얻었다. 단백질이 녹아있는 cell lysate와 베타 머캅토 에탄올이 첨가된 2X Laemmli sample 버퍼(Bio-Rad)를 1:1 비율로 섞고 10분 동안 100°C에서 끓였다. 4°C에서 10분 동안 원심 분리를 하여 상층액을 SDS-Polyacrylamide gel (6%, 12%, 15%)에 loading하였다. 40V에서 40분 동안 전기영동을 하여 단백질이 일직선상에 오도록 하고 추가적으로 120V에서 1시간 동안 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 뒤 100V에서 1시간 동안 transfer를 하여 겔의 단백질과 사이즈 마커가 PVDF membrane (GE healthcare)으로 이동하도록 하였다. 상온에서 blocking 버퍼를 1시간 동안 처리한 뒤 blocking 버퍼로 희석한 1차 항체를 처리하여 overnight하였다. 본 실험에 사용한 1차 항체는 Rabbit anti ProtA antibody (SIGMA)의 경우 1:20,000, Mouse anti HA antibody (Cell signaling)의 경우 1:1000의 비율로

처리하였다. TNTX 버퍼로 5분씩 3회 세척을 한 뒤 두 종류의 2차 항체를 모두 1:3000로 희석하여 50분 동안 처리하였다. TNTX 버퍼로 5분씩 3회 세척을 하고 ECL western blotting detection reagent (GE healthcare)를 처리하여 Kodak image station 4000 MM PRO (U.S.A.)로 단백질 밴드를 감지하였다.

2.9 Co-Immunoprecipitation

서로 다른 두 가지 단백질에 각각 Protein A와 HA를 tagging하여 제작한 균주를 29℃에서 16-20시간 동안 50 ml의 EMM 액체 배지에서 배양하여 $7-8 \times 10^6$ cell/ml에 도달하였을 때 실험을 진행하였다. Western blot과 동일한 방법을 이용하여 단백질이 녹아있는 cell lysate를 얻었으며 본 실험에 쓰인 두 가지 beads는 protease inhibitor가 포함된 lysis 버퍼로 3회 세척을 한 뒤 사용하였다. HA를 tagging한 단백질이 agarose beads에 비특이적으로 결합하는 background를 제거하기 위한 방법으로 Protein A/G PLUS-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) 30 μ l를 넣고 rotator에 끼운 채 4℃에서 1시간 동안 보관하였다. 원심분리 후 상층액을 취해 IgG Sepharose 6 Fast Flow beads (GE healthcare) 50 μ l를 섞어 rotator에 끼운 채 4℃에서 3시간 동안 보관하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 beads를 lysis 버퍼로 3회 세척하였다. 베타 머캅토에탄올이 첨가된 2X Laemmli sample 버퍼 (Bio-Rad)를 50 μ l넣고 10분 동안 100℃에서 끓였다. 이후 모든 과정은 Western blot과 동일하게 진행하였다.

2.10 균주 제작

2.10.1 과발현 들연변이

*tho7*과 *cdc31*의 과발현 들연변이를 제작하기 위하여 티아민으로 발현 조절이 가능한 pREP 벡터를 이용하였으며 pREP 벡터에 대한 자세한 내용은 '1.2 플라스미드'에 기술하였다. 유전체 DNA를 추출하여 *tho7*과 *cdc31*의 ORF (Open Reading Frame)를 암호화하는 서열을 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 증폭하였다. 이 때, 유전체 DNA에 존재하는 개시 코돈을 포함한 5' → 3' 방향의 프라이머와 종결 코돈을 포함한 3' → 5' 방향의 프라이머에 각각 *Xho* I, *Bam*H I의 제한효소(restriction enzyme) 서열을 삽입하였다. PCR 산물과 pREP3X, 41X, 81X 벡터를 *Xho* I과 *Bam*H I으로 자르고 정제한 뒤 연결(ligation)시켜 재조합 벡터를 제작하였고 *E. coli* transformation을 통하여 재조합 벡터의 선별 및 증폭을 하였다. 앰피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 자란 콜로니에서 플라스미드 벡터를 추출하였다. 클로닝에 사용한 제한효소를 이용해 절단하여 *tho7*과 *cdc31*의 유전자 길이에 해당하는 DNA 조각을 확인한 후 AY217 균주에 형질전환하였다. 류신이 없는 EMM 배지에서 배양하여 *LEU2*를 선택표지자로 갖고 있는 pREP 벡터가 형질전환된 형질 전환체를 선별하였다.

2.10.2 결실 돌연변이

tho7 유전자가 *ura4* 유전자로 치환된 결실돌연변이 균주를 얻기 위하여 DJ-PCR (Double Joint PCR, Yu *et al.*, 2004) 기법을 사용하였다. 첫 번째 PCR 반응에서 세 개의 DNA 조각을 증폭하였다. *ura4* 유전자와 *tho7* 유전자의 5' flanking region 1 kb에 *ura4* 유전자의 5' 부근의 서열이 포함되게 하여 증폭한 DNA 조각, 그리고 *tho7* 유전자의 3' flanking region 1 kb에 *ura4* 유전자의 3' 부근의 서열이 포함되게 하여 증폭한 DNA 조각을 증폭한 후 정제하였다. 각각의 조각을 3 : 1 : 1 (*ura4* 유전자 : 5' flanking region : 3' flanking region)의 비율로 혼합하여 두 번째 PCR 반응을 하였고 *tho7*의 5', 3' flanking region 사이에 *ura4* 유전자가 치환된 linear DNA 조각의 결과물을 얻었다. 세 번째 PCR 반응은 두 번째 반응에서 만들어진 결과물의 증폭을 위하여 진행하였다. 이렇게 만들어진 linear DNA 조각을 AY217에 형질전환시켜, 유라실이 빠진 EMM 고체 배지에서 형질전환체를 얻었다. 이 형질전환체 중에서 상동재조합(homologous recombination) 기작을 통해 *tho7* 유전자의 knock-out이 일어난 것을 PCR을 통해 선별하였다.

cdc31 유전자의 결실 돌연변이의 경우, *cdc31*은 생장에 필수적인 유전자(essential gene)임이 알려져 있었기 때문에 중간 정도의 발현을 나타내는 pREP41X 벡터에 *cdc31* 유전자를 재조합시킨 벡터를 먼저 AY217 균주에 형질전환한 다음 결실돌연변이를 제작하였다. *ura4* 유전자 대신 *kan^r* 유전자로 치환하였으므로, 형질전환체를 얻기 위한 선택 배지로 항진균제인 G418이 첨가된 고체 배지를 사용한 것을 제외하면 나머지 과정은 위의 방법과 동일하게 진행하여 결실돌연변이를 제작하였다.

2.10.3 GFP tagging

DJ PCR 기법을 이용하여 *tho7* 유전자의 종결 코돈과 3' flanking region 사이에 *GFP-kan^r* 유전자 서열을 삽입한 linear DNA 조각을 제작하였다. *GFP-kan^r* 유전자는 pFA6a-FGP(S65T)-kan-MX6 벡터(Bahler *et al.*, 1998)로부터 증폭하여 사용하였다. 제작한 linear DNA 조각을 AY217 균주에 형질전환하였고 상동재조합 기작을 통해 *tho7* 유전자 위치로 Tho7 단백질의 C말단에 GFP를 접합 키메라 단백질을 암호화하는 유전자를 치환하였다. 항진균제 G418이 첨가된 고체 배지에서 형질전환체를 선별하였다.

2.10.4 TAP tagging

Co-IP 실험을 위해, 원하는 단백질의 C-말단에 TAP tag을 붙인 키메라 단백질을 발현하는 균주를 제작하였다. Gould Lab.에서 제공한 pFA6a-CBP 4.5X protein A (TEV)-kanMX6 벡터를 이용한 클로닝 방법으로 균주를 제작하였다. 벡터에 대한 자세한 내용은 '1.2 플라스미드'에 기술하였다. *tho1*의 3' 쪽 ORF 부위 약 1 kb와 *tho1* 유전자의 3' flanking region 부위의 약 1 kb를 PCR 증폭하여 pFA6a-CBP 4.5X protein A (TEV)-kanMX6 벡터에 클로닝하였다. 두 번에 걸친 클로닝을 통하여 제작한 재조합 벡터에서 *tho1* 유전자의 3' 쪽 ORF-CBP-TEV-ProtA::Kan^r::*tho1* 유전자의 3' flanking region으로 이루어진 linear DNA 조각을 잘라내어 AY217 균주의 *tho1* 유전자 부위로 상동재조합 기작을 통해 치환하였다. *Sac3* 단백질의

TAP tagging도 위의 과정과 동일하게 이루어졌으며 본 실험에 쓰인 Rmr1-CTAP 균주는 기존에 제작 되어있던 균주를 사용하였다.

2.10.5 HA tagging

Co-IP 실험에 필요한 균주를 제작하기 위하여 원하는 단백질의 N-말단에 triple HA를 tagging하였다. 재조합 벡터 제작과 동일한 방법으로 Triple HA epitope tag를 지닌 각 유전자의 ORF들을 pSLF273 벡터에 클로닝을 한 후, Tho1-CTAP, Sac3-CTAP, Rmr1-CTAP 균주에 형질전환하였다. 유라실이 없는 EMM 배지에서 형질전환체를 선별하여 Co-IP에 필요한 균주 제작을 하였다.

표 1. 균주

Strains	Genotype	Source
972	<i>h</i> ⁻ (wild type)	Leupold (1970)
AY217	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18</i>	Yoon <i>et al.</i> (2000)
Δ <i>mft1</i> :: <i>ura4</i>	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18 Δmft1::ura4</i> ⁺	This study
217/3X- <i>mft1</i>	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP3X-mft1</i>	This study
217/41X- <i>mft1</i>	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP41X-mft1</i>	This study
217/81X- <i>mft1</i>	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP81X-mft1</i>	This study
217/3X	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP3X</i>	This study
217/41X	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP41X</i>	This study
Mft1-GFP	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18 mft1-gfp::kan</i> ^r	This study
Δ <i>cdc31</i> :: <i>kan</i> ^r	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18 Δcdc31::kan</i> ^r / <i>pREP41X-cdc31</i>	This study
217/3X- <i>cdc31</i>	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP3X-cdc31</i>	This study
217/41X- <i>cdc31</i>	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP41X-cdc31</i>	This study
217/81X- <i>cdc31</i>	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18/pREP81X-cdc31</i>	This study
Hpr1-CTAP/TeX1-HA	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan</i> ^r / <i>pSLF273-tex1</i>	This study
Hpr1-CTAP/Tho2-HA	<i>h</i> ⁻ <i>leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan</i> ^r / <i>pSLF273-tho2</i>	This study

표 1. 균주 (continued)

Strains	Genotype	Source
Hpr1-CTAP/Thoc4-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan^r/pSLF273-thoc4</i>	This study
Hpr1-CTAP/Thoc5-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan^r/pSLF273-thoc5</i>	This study
Hpr1-CTAP/Mft1-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan^r/pSLF273-mft1</i>	This study
Hpr1-CTAP/Mex67-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan^r/pSLF273-mex67</i>	This study
Hpr1-CTAP/Rae1-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan^r/pSLF273-rae1</i>	This study
Hpr1-CTAP/Mlo3-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan^r/pSLF273-mlo3</i>	This study
Hpr1-CTAP/Uap56-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 hpr1-TAP::kan^r/pSLF273-uap56</i>	This study
Sac3-CTAP/Sus1-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 sac3-TAP::kan^r/pSLF273-sus1</i>	This study
Sac3-CTAP/Thp1-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 sac3-TAP::kan^r/pSLF273-thp1</i>	This study
Sac3-CTAP/Pci2-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 sac3-TAP::kan^r/pSLF273-pci2</i>	This study
Sac3-CTAP/Mex67-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 sac3-TAP::kan^r/pSLF273-mex67</i>	This study
Sac3-CTAP/Rae1-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 sac3-TAP::kan^r/pSLF273-rae1</i>	This study
Sac3-CTAP/Mlo3-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 sac3-TAP::kan^r/pSLF273-mlo3</i>	This study
Sac3-CTAP/Uap56-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 sac3-TAP::kan^r/pSLF273-uap56</i>	This study
Rmr1-CTAP/pci2-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 rmr1-TAP::kan^r/pSLF273-pci2</i>	This study

표 1. 균주 (continued)

Strains	Genotype	Source
217/Tex1-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18/pSLF273-tex1</i>	This study
217/Tho2-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18/pSLF273-tho2</i>	This study
217/Thoc5-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18/pSLF273-thoc5</i>	This study
217/Thp1-HA	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18/pSLF273-thp1</i>	This study
L40	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS::(4lexAop-HIS3) URA3::(8lexAop-LacZ) GAL4</i>	Vojtek <i>et al.</i> (1993)
<i>E. coli</i> Top10'	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1</i>	Invitrogen(U.S.A)

표 2. *S. pombe* 배지 조성

YE (Yeast Extract) Medium	
Yeast extract	5 g/ℓ
Dextrose	30 g/ℓ
Agar	20 g/ℓ
YES (Yeast Extract + Supplements) Medium	
Yeast extract	5 g/ℓ
Dextrose	30 g/ℓ
Supplements (Adenine, Leucine, Uracil)	56.25 mg/ℓ
Agar	20 g/ℓ
EMM (Edinburgh Minimal Medium)	
Potassium hydrogen Phthalate	3 g/ℓ
Na ₂ HPO ₄	2.2 g/ℓ
Ammonium chloride	5 g/ℓ
Dextrose	20 g/ℓ
50X Salt	20 ml/ℓ
1000X Vitamins	1 ml/ℓ
10000X Minerals	0.1 ml/ℓ
Supplements (Adenine, Leucine, Uracil)	225 mg/ℓ
Agar	20 g/ℓ
ME (Malt Extract) Medium	
Malt Extract	30 g / ℓ
Agar	20 g / ℓ

표 2. *S. pombe* 배지 조성 (continued)

50X Salt	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	52.5 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.735 g/l
Na ₂ SO ₄	2 g/l
KCl	50 g/l
1000X Vitamin	
Pantothenic acid	1 g/l
Nicotinic acid	10 g/l
Inositol	10 g/l
Biotin	10 mg/l
10000X Mineral	
Boric acid	5 g/l
MnSO ₄	4 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4 g/l
FeCl ₂ ·6H ₂ O	2 g/l
Molybdcic acid	0.4 g/l
Citric acid	10 g/l
KI	1 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.4 g/l

표 3. *S. cerevisiae* 배지 조성

YPAD	
Yeast extract	10 g/ℓ
Peptone	20 g/ℓ
Glucose	20 g/ℓ
4X Adenine (3.6 g / ℓ)	62.5 ml/ℓ
Agar	20 g/ℓ
SD-LW /-LWH	
Yeast Nitrogen Base (Without Aminoacids)	6.7 g/ℓ
20X Dropout powder (-L,W / -L,W,H)	0.64 / 0.62 g/ℓ
4X Adenine (3.6 g / ℓ)	125 ml/ℓ
40% Glucose (200 g /350 ml)	50 ml/ℓ
Agar	20 g/ℓ

표 3. *S. cerevisiae* 배지 조성 (continued)

X-gal	
Yeast Nitrogen Base (Without Aminoacids)	6.7 g/ℓ
20X Dropout powder (-L,W)	0.64 g/ℓ
4X Adenine (3.6 g / ℓ)	125 ml/ℓ
40% Glucose	50 ml/ℓ
10X BU salt solution (pH 7.0)	100 ml/ℓ
X-gal stock solution	4 ml/ℓ
Agar	20 g/ℓ
10X BU salt solution (pH 7.0)	
Na ₂ HPO ₄	70 g/ℓ
NaH ₂ PO ₄	30 g/ℓ
X-gal stock solution	
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside (X-gal)	20 mg
N,N-dimethyl-formamide (DMF)	1 ml

표 4. *E. coli* 배지 조성

LB (Luria-Bertani) Medium	
NaCl	10 g/ℓ
Tryptone	10 g/ℓ
Yeast extract	5 g/ℓ
Agar	20 g/ℓ

표 5. 프라이머

Primer name	Sequence (5' → 3')
Ura-5DJ	AGCTACAAATCCCCTGGCT
Ura-3DJ	CATCTAATTTATTCTGTTCC
Kan-5DJ	ACCCGGCCAGCGACATGG
Kan-3DJ	AGTATCGAATCGACAGCAGT
GFP-5DJ	AGTAAAGGAGAAGAACTTTT
Mft1-1 (tho7)	GAAGAATCCACACAACGTTCCA
Mft1-2 (tho7)	ACATATAGCCAGTGGGATTTGTAGCTAGTTA AGCGCGATCGAATCGCCGT
Mft1-3 (tho7)	GGTGTGGAACAGAATAAATTAGATGAAGT TCGACTCAATACAAGGCCAA
Mft1-4 (tho7)	AGCTGATTAACATGTTTCATCCA
Mft1-5 (tho7)	CCACGTAGAGCTATCGAAGA
Mft1-6 (tho7)	TGGGTAGAACGAGCTGTGAT
Mft1-7 (tho7)	GCACTCGAGATGGAGGGTATGCTATAAAT
Mft1-8 (tho7)	GCTGGATCCTTATTTGGCCTTGTATTGAG
Mft1-11 (tho7)	CTACTGACTTAGCGCCCAACTA
Mft1-12 (tho7)	GTTAATTAACCCGGGGATCCGTCGACCTTTG GCCTTGTATTGAGTCGAACT
Mft1-13 (tho7)	CGCTATACTGCTGCTGATTCGATACTATGTT AAACAGTGAGTCCCCTGG
Mft1-14 (tho7)	TATGTCAGAGACGGCGATTC
Mft1-15 (tho7)	CCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTTTTGG CCTTGTATTGAGTCGAACT

표 5. 프라이머 (Continued)

Cdc31-1	CTAGGAATAGTCCATACGAC
Cdc31-2	CTGGGCCTCCATGTTCGCTGGCCGGGTAAATGT GGTGGTAAACAGAACGTC
Cdc31-3	CGCTATACTGCTGTTCGATTCGATACTATGGA TGAAGCATAATGGAGAACA
Cdc31-4	GATGCTTACCAGGCACAGGA
Cdc31-5	CGAATCCGTCCTTAGCGAGT
Cdc31-6	GTCTTGCGATGTGTGTACGA
Cdc31-7	ACTCTCGAGATGTTTGCTAACGCACGGGCT
Cdc31-8	ACTGGATCCTTATGCTTCATCCATCATAAT
Sac3-7	ATCCTCGAGATGGAAAAGCGGAATGAGACT
Sac3-8	CGTTAGTGGATCCATTTGGT

Primers for cDNA cloning

Sac3-mid5For	ACCAAATGGATCCACTAACG
Sac3-3Rev	ACTGTGCGACTTAATAAAAAGTTTCAACCTT
Tho2-For	ACTGAGCTCATGACTTCGTTGCCAGAAAAG
Tho2-Rev	ACTGTGCGACTCATTGAATTTTTCTTCTTTT
cMft1-7 (ctho7)	ACTCTCGAGATGGAGGAGACGGCGATTTCG
cMft1-8 (ctho7)	GCTGGATCCTTATTTGGCCTTGTATTGAG
Sub2-For (uap56)	ACTGAGCTCATGGCATCTGCTCAGGAGGAT
Sub2-Rev (uap56)	ACTGTGCGACTTATGCATTCATGTATGAGCC
Thp1 Y2H For	GTCGGATCCATGAACGACATTGAGACG

표 5. 프라이머 (Continued)

Thp1 Rev HA	GTCGTCGACTTAGACTGCATGTTTCAC
Mlo3-For	ACTGGATCCATGTCTATGGAATTAGATCAG
Mlo3-Rev	ACTGTCGACTTACTCCTTCTCATTTGATCC
Tex1-For	ACTGAGCTCATGTGTGCTTCAGTTACAGAA
Tex1-Rev	ACTGTCGACTTATAGCCCAAATATCTTAAG
Thp1-5For (pci2)	ACTGTCGACATGAACGACATTGAGACGAGA
Thp1-3Rev (pci2)	ACTGGATCCTTAGACTGCATGTTTCACTAT
Hpr1-7 (tho1)	GCACTCGAGATGGAGGTGCAAAAGGGTTT
Hpr1-8 (tho1)	GCTGGATCCTTATAATACAATTTCTCCAT
Primers for CTAP integration	
Sac3 CTAP1	AATGGATCCACTAACGGTAC
Sac3 CTAP2	GTCTTAATTAATAAAAAGTTTCAACCTTT T
Sac3 CTAP3	GTCGATATCTAATCCTTTTTTACGATTACA
Sac3 CTAP4	GTCCCGCGGCTTGCTAGCAATGTGGTACG
Hpr1 CTAP1 (tho1)	ATGCAGCTGGTTCTGCAATAC
Hpr1 CTAP2 (tho1)	GTCTTAATTAATAATACAATTTCTCCATCC
Hpr1 CTAP3 (tho1)	GTCGAGCTCTAATCATTAATCAATTACAC
Hpr1 CTAP4 (tho1)	ATTCCGCGGTGAAGTCAGTTG

표 5. 프라이머 (Continued)

Primers for HA integration	
Thoc5 HA 1	GTCGCGGCCGCATGACAGAAAATGCAATATC
Thoc5 HA 2	GTCGTCGACTTACATGGAGGTAATGTTAT
Tex1 HA 1	GTCGCGGCCGCATGTGTGCTTCAGTTACAGA
Tex1 HA 2	GTCGTCGACTTATAGCCCAAATATCTTAA
Hpr1 HA 1 (tho1)	GTCGCGGCCGCATGGAGGTGCAAAAGGGTTT
Hpr1 HA 2 (tho1)	GTCGTCGACTTATAATACAATTTCTCCAT
Mft1 HA 1 (tho7)	GTCGCGGCCGCATGGAGGGTATGCTATAAAT
Mft1 HA 2 (tho7)	GTCGTCGACTTATTTGGCCTTGTATTGAG
Tho2 HA 1	GTCGCGGCCGCATGACTTCGTTGCCAGAAAA
Tho2-8	TGAGCTATACTAGTTCCATC
Tho2-10	CTGATGGAACTAGTATAGCT
Tho2 HA 2	GTCGTCGACTCATTGAATTTTCTTCTTT
Cdc31 For HA	GTCGCGGCCGCATGTTTGCTAACGCACGGG
Cdc31 Rev HA	GTCGTCGACTTATGCTTCATCCATCAT
Sus1 For HA	GTCGCGGCCGCATGTACGACCTCATATTTT
Sus1 Rev HA	GTCGTCGACTTACATTTTATTCCCTCC
Thp1 For HA	GTCGCGGCCGCATGAACGACATTGAGACGA
Thp1 Rev HA	GTCGTCGACTTAGACTGCATGTTTCAC
Pci2 For HA	GTCGCGGCCGCATGTCCTTAAATGACTTTC
Pci2 Rev HA	GTCGTCGACTTATGCGTTAGCATGAAA

표 6. 버퍼

Chromosomal DNA isolation	
SCE (pH 5.6)	50 mM Citrate acid, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.2 M Sorbitol, 40 mM EDTA
Spheroplast buffer	Zymolase 20T (2.5 mg/ml) in SCE

Yeast transformation : Lithium acetate (LiAc) method	
10X LiAc	1 M Lithium Acetate pH 7.5
10X TE	0.1 M Tris-Cl pH 7.0, 0.01 M EDTA pH 8.0
50% PEG	50% Polyethylene glycol in 1X TE/LiAc

<i>In situ</i> hybridization	
30% Formaldehyde	30% Paraformaldehyde, 0.5 mM NaOH in 1X PBS
Spheroplast buffer	Zymolase 100T (4 mg/100 ml) in SCE
Hybridization solution	20X SSC, 50% Dextran sulfate, 2% BSA, Vanadyl complex, tRNA (1 mg/ml), Oligo dT50
Fluorescin Antidioxigenin	0.1 mM Tris pH 7.5, 3 mM NaCl, 2% BSA, Antidioxigenin (200 µg/ml), 0.3% Triton X-100
DAPI mounting medium	DAPI (1 mg/ml) in Glycerol

표 6. 버퍼 (Continued)

<i>E. coli</i> Cracking	
2X Cracking buffer	0.2 M NaOH, 0.5% SDS, 20% Sucrose

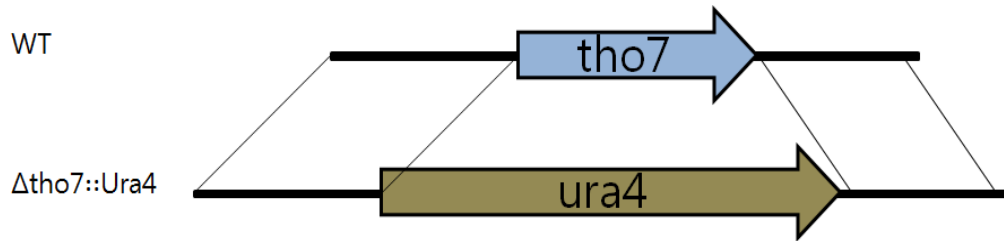
Western blot analysis	
Stop buffer	50 mM NaF, 10 mM NaN ₃ in PBS
Lysis buffer	6 mM Na ₂ HPO ₄ , 4 mM NaH ₂ PO ₄ , 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM NaF
Protease inhibitors	Leupeptin (4 μg/ml), 1 mM PMSF 0.1 mM Na ₃ VO ₄ , 1.3 mM benzamidine
Running buffer	25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 1% SDS
Transfer buffer	25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 20% MeOH
TNTX	50 mM Tris base pH7.5, 200 mM NaCl, 0.2% TritonX-100
Blocking buffer	5% Skimmed milk in TNTX

III. 결과

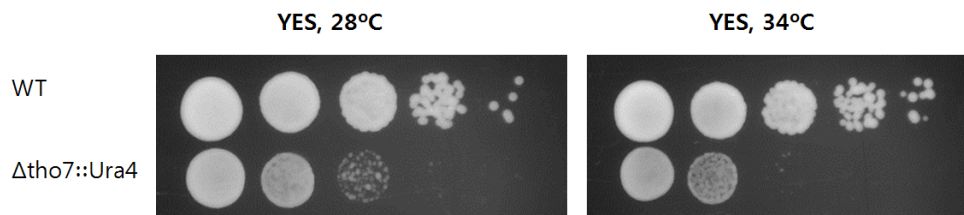
1. *tho7* 결실 돌연변이 균주 분석

TREX의 구성요소 중 하나인 *tho7* 유전자의 기능을 알아보고자 결실돌연변이(deletion mutant)를 제작하였다. DJ-PCR 기법을 이용하여 *tho7* 유전자 위치에 *ura4* 유전자를 치환하였다(그림 1A). 결실 돌연변이 균주와 야생형 균주의 성장 속도를 비교한 결과 두 가지 배양 온도(28℃, 34℃)에서 모두 결실돌연변이 균주의 성장 속도가 야생형 균주보다 느렸다. 또한 결실 돌연변이의 경우 고온에서 성장 속도가 더욱 느림을 확인하였다(그림 1B). *tho7* 유전자가 결실 되었을 때 성장 뿐 아니라 mRNA 방출에 영향을 미치는지 알아보기 위해 *In situ* hybridization 실험을 수행하였다. oligo(dT)₅₀-digoxigenin을 이용하여 mRNA의 poly(A)⁺ 꼬리에 혼성화를 시킨 다음, anti-digoxigenin 1차 항체와 녹색 형광 물질인 FITC (Fluorescein isothiocyanate)이 tagging된 2차 항체를 결합시켜 형광현미경으로 mRNA의 위치를 확인하였다. 야생형 균주는 mRNA가 세포 전체(핵, 세포질)에 고르게 분포되어 있는 반면, 결실 돌연변이는 mRNA가 대부분 세포질로 빠져나가지 못하고 핵 내에 주로 존재하는 것을 관찰하였다(그림 1C). Spot assay 와 *In situ* hybridization 실험 결과 *tho7* 유전자가 결실된 균주에서 성장 및 mRNA export 결함을 확인하였다.

(A)



(B)



(C)

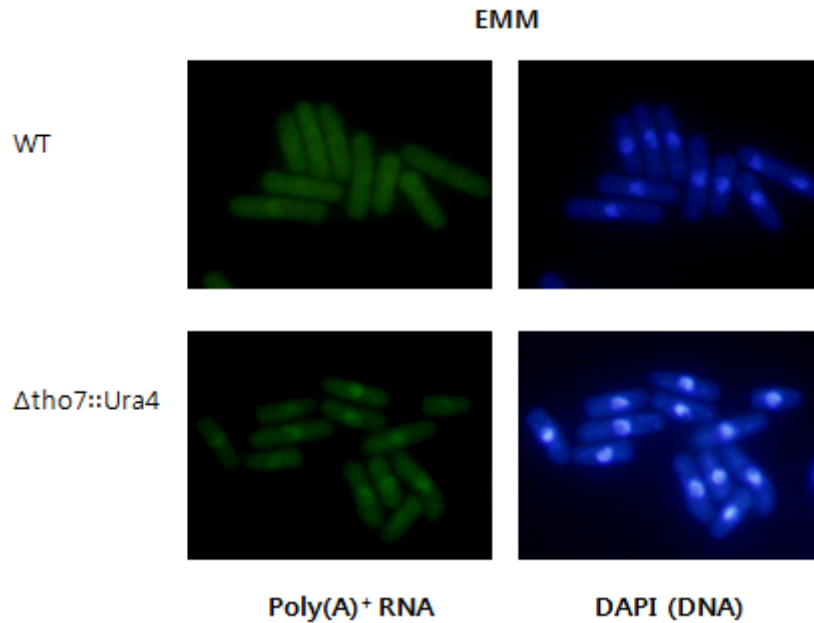


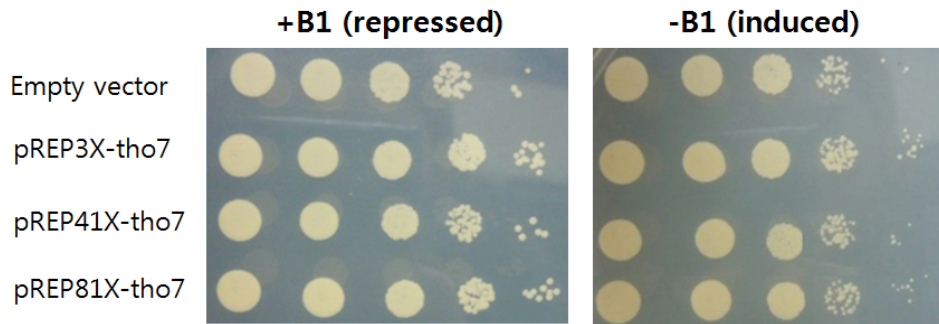
그림 1. 결실 돌연변이 $\Delta tho7::ura4$ 균주의 제작과 분석

(A) DJ PCR을 이용한 결실 돌연변이 제작. 상동재조합 과정을 통해 *tho7* 유전자 자리에 *ura4* 유전자를 치환하였으며 *tho7* 유전자의 5', 3' flanking region은 그대로 유지하였다. (B) *tho7* 결실 돌연변이와 야생형 균주 AY217의 성장 속도를 비교하기 위한 spot assay 결과. 각 균주를 YES 배지에서 이틀 동안 배양 하였으며 28°C(좌)와 34°C(우)에서 배양하였다. (C) *tho7* 결실 돌연변이와 야생형 균주 AY217의 *In situ* hybridization 결과. 각 균주를 EMM 배지에서 16시간 동안 배양한 후 실험을 진행하였다.

2. *tho7* 과발현 돌연변이 균주 분석

tho7 유전자가 과발현 되었을 때 성장과 mRNA export에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위한 균주를 제작하였다. 티아민에 의해 발현 조절이 가능한 *nmt1* 프로모터를 갖고 있는 pREP 벡터에 *tho7* 유전자를 클로닝하였다. pREP 벡터의 *nmt1* 프로모터의 세기는 3X, 41X, 81X 순으로 감소한다. 클로닝을 한 3가지의 pREP 벡터를 야생형 균주 AY217에 형질전환 하여 균주를 제작하였으며 대조군과 함께 티아민이 첨가된(+B1) 배지와 첨가되지 않은(-B1) 배지에 spot assay를 진행하였다(그림 2A). Spot assay 결과, 염색체의 *tho7* 유전자 발현이외에 벡터 내의 *tho7* 유전자가 과발현되더라도 대조군 균주의 성장속도와 동일하였다. 이와 같이 *tho7* 유전자의 과발현이 성장에 영향을 미치지 않았지만 mRNA 방출에는 영향을 미치는지 알아보기 위해 *In situ* hybridization 실험을 하였다(그림 2B). 실험 결과, 티아민 처리와 무관하게 대조군을 포함한 모든 실험균주에서 mRNA 방출이 정상적으로 일어나 mRNA가 세포 전체에 고르게 분포되어있는 것을 확인하였다.

(A)



(B)

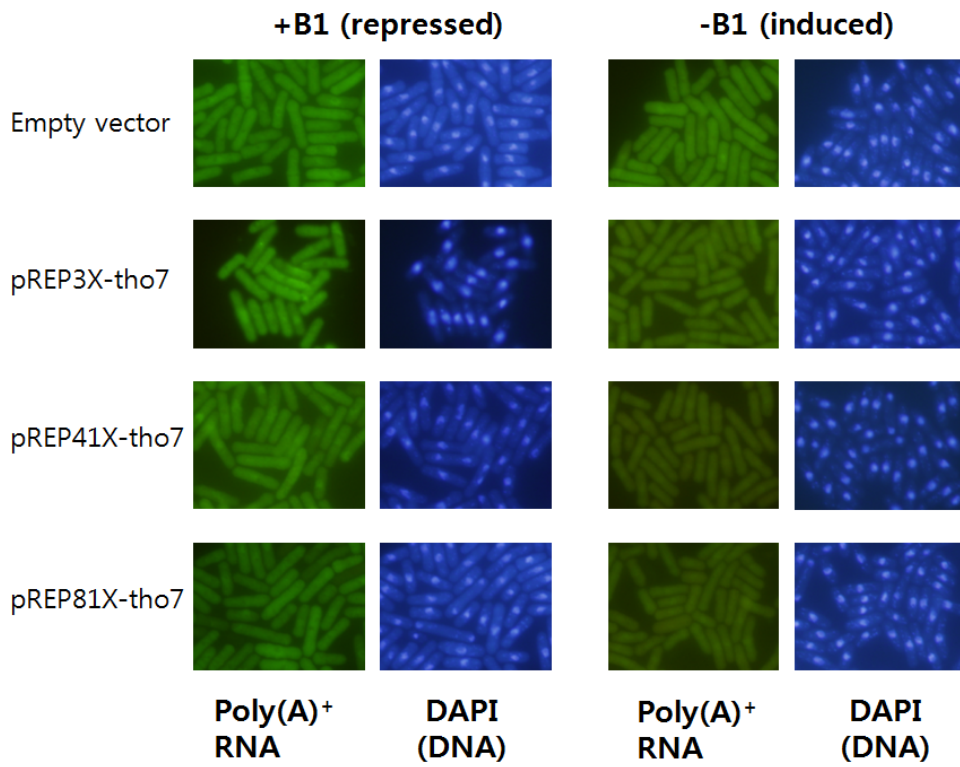


그림 2. *tho7* 과발현 돌연변이 분석

(A) *tho7* 과발현 돌연변이의 성장 속도를 비교하기 위한 Spot assay 결과. 각 균주를 EMM ±B1 배지에서 배양하였다. 5일 동안 28°C에서 배양한 결과를 나타내었다. 야생형 균주 AY217에 빈 pREP3X 벡터를 형질전환한 균주를 대조군으로 사용하였다. (B) *tho7* 과발현 돌연변이의 *In situ* hybridization 결과. 각 균주를 EMM ±B1 배지에서 16시간 동안 배양한 후 실험을 진행하였다. 대조군은 Spot assay에 사용한 것과 동일하다.

3. Tho7 단백질의 위치 추적(localization)

Tho7 단백질의 세포 내 위치 추적을 위하여 GFP (Green Fluorescent Protein) tagging을 하였다. GFP는 녹색 형광을 띠는 해파리 *Aequorea victoria*에서 추출한 단백질로서 238개의 아미노산으로 구성되며 분자량은 26.9 kDa이다. 균류에서부터 식물, 곤충, 포유류에 이르는 다양한 세포에서 발현이 가능해 세포학, 분자 생물학 분야에서 많이 이용되며 주로 단백질의 위치 추적이나 유전자의 발현 정도를 연구하는 데 쓰인다. 또한 생체 내에서 발현 시 독성이 없는 장점이 있다(Phillips, 2001).

DJ PCR 기법을 이용하여 *tho7* 유전자의 3' -말단에 *GFP-kan^r* 유전자 서열을 연결시킨 linear DNA를 제작한 후(그림 3A), 야생형 균주 AY217에 형질전환하였다. 상동재조합 과정을 통하여 형질전환된 균주의 *tho7* 단백질에 GFP가 결합된 키메라 단백질이 발현되었다. 형광현미경으로 관찰한 결과, *tho7* 단백질이 주로 핵 내에 위치하는 것을 확인하였다(그림 3B).

(A)



(B)

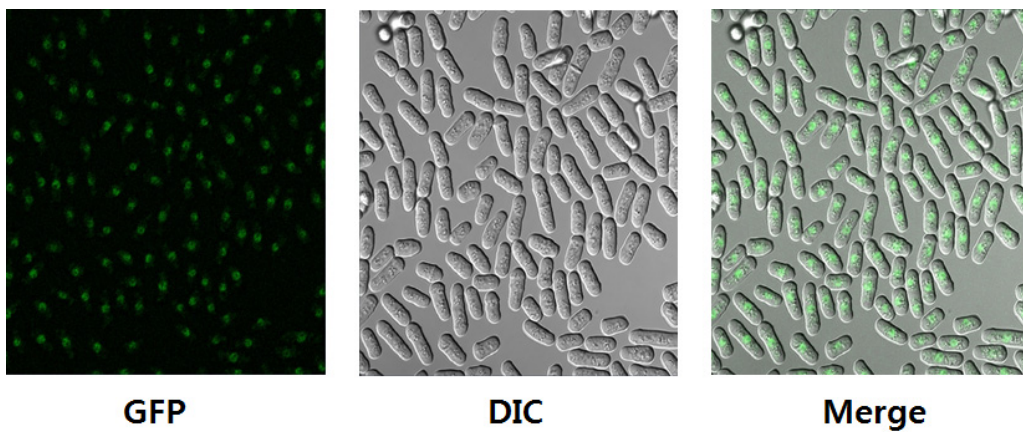


그림 3. Tho7 단백질의 위치 추적(localization)

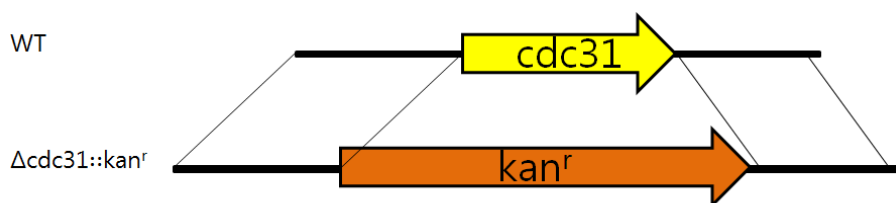
(A) Tho7-GFP construct 제작. DJ PCR을 이용하여 *tho7* 유전자의 3' - 말단에 GFP를 tagging하였다. 이 때 선택표지로 *kan^r* 유전자를 사용하였다.

(B) Tho7-GFP 위치 추적. 형광현미경(X600)으로 관찰하였다. 형광-GFP (좌), 광학-DIC(중앙), 통합(우).

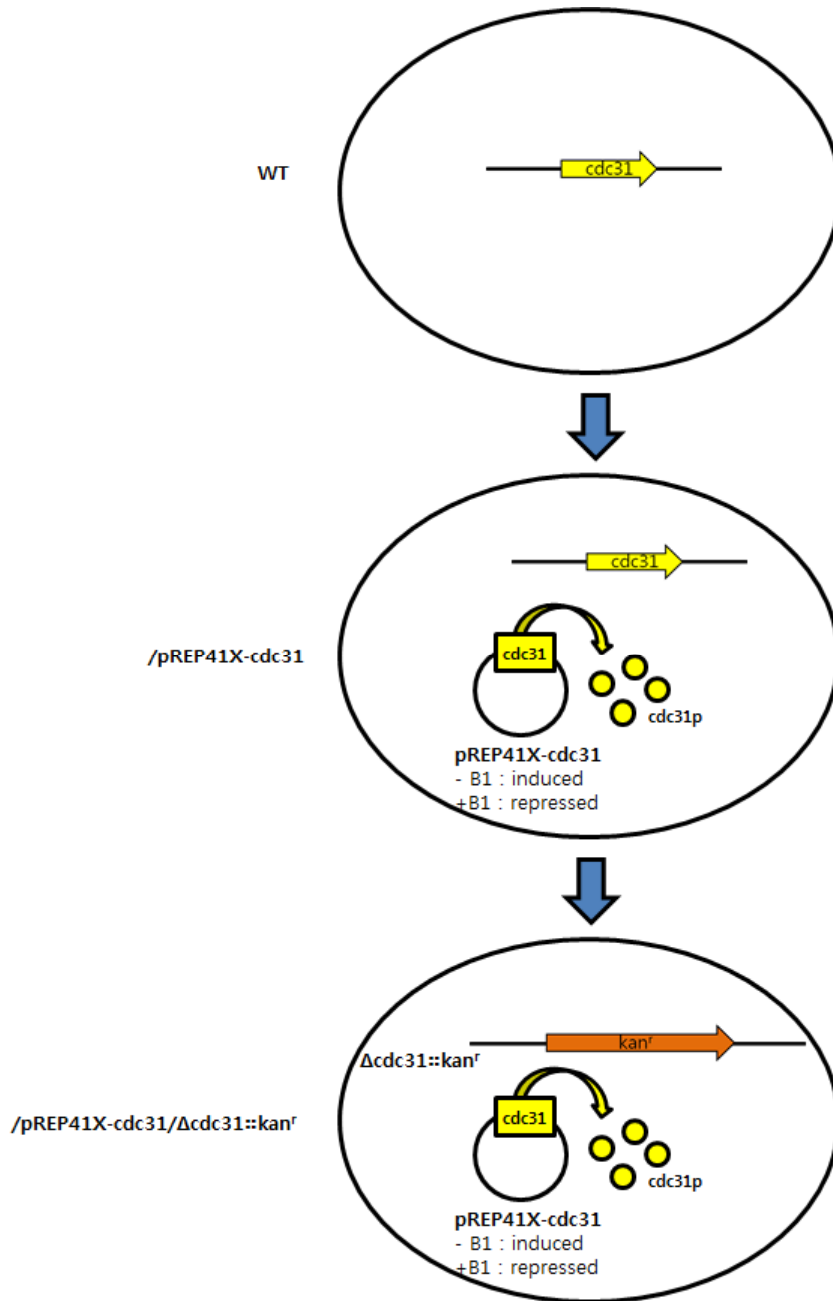
4. *cdc31* 결실 돌연변이 균주 분석

TREX-2의 구성요소 중 하나인 *cdc31* 유전자의 기능을 알아보기 위하여 결실 돌연변이를 제작하였다. *cdc31* 유전자는 생장에 필수적인 유전자이기 때문에 티아민에 의해 발현이 조절되는 *nmt1* 프러모터를 가진 벡터인 pREP41X에 *cdc31* ORF를 클로닝하여 형질전환시킨 균주에서 염색체의 *cdc31* 유전자를 결실시켜 돌연변이 균주($\Delta cdc31$)를 제작하였다. DJ-PCR 기법을 이용하여 *cdc31* 유전자 위치에 *kan^r* 유전자를 치환하였다(그림 4A). Spot assay 실험 결과, 티아민을 첨가하여 벡터의 *cdc31* 유전자 발현을 억제한 경우 성장 속도가 대조군에 비해 느려졌으며, 티아민을 첨가하지 않아 *cdc31* 유전자 발현을 유도한 경우에는 생장에 결함을 나타내지 않았다(그림 4B). *cdc31* 유전자가 결실되었을 때 성장 뿐 아니라 mRNA 방출에도 영향을 미치는지 알아보기 위해 *In situ* hybridization 실험을 수행하였다(그림 4C). 티아민을 첨가하여 *cdc31*의 발현을 억제하여 배양한 경우에는 mRNA 방출에 결함을 나타내고 세포의 길이가 대조군에 비해 길어진 것을 관찰하였다. 티아민을 첨가하지 않아 *cdc31*의 발현을 유도한 경우 mRNA 방출에 결함을 나타내지 않았다.

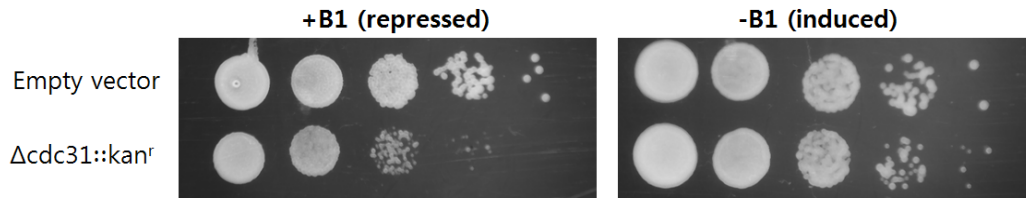
(A)



(B)



(C)



(D)

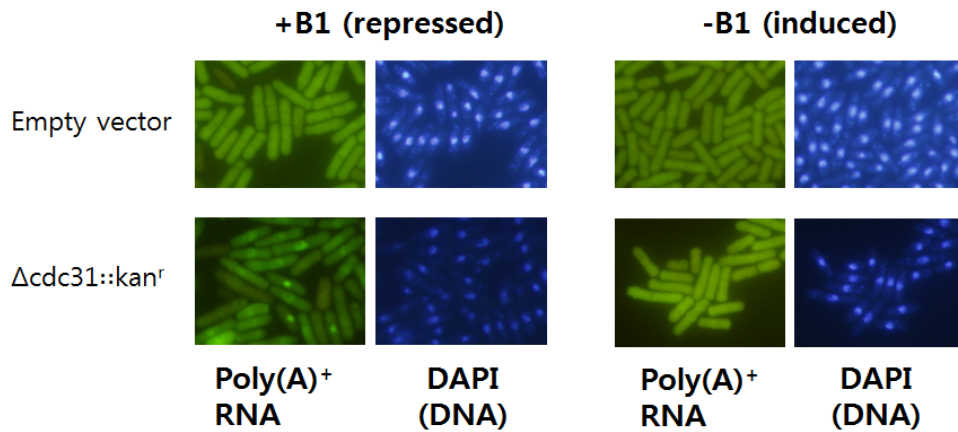


그림 4. 결실 돌연변이 $\Delta cdc31::kan^r$ 균주의 제작과 분석

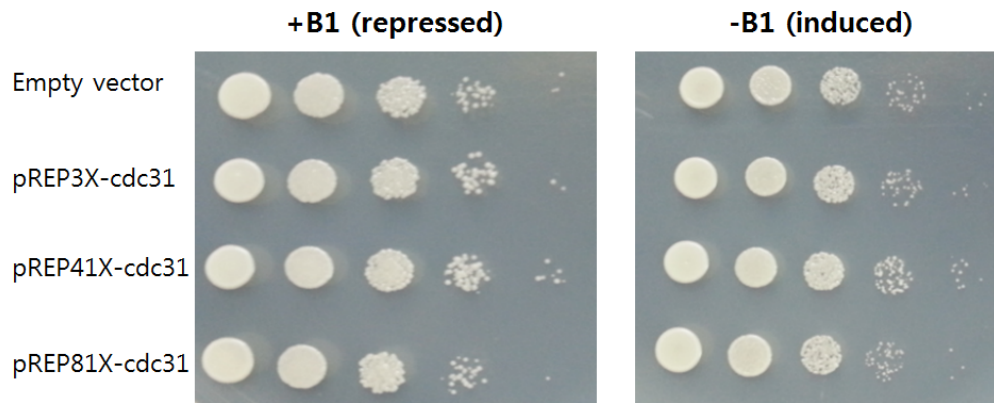
(A), (B) DJ PCR을 이용한 결실 돌연변이 제작. pREP41X-*cdc31* 클로닝 벡터를 야생형 균주에 형질전환 시킨 후 상동재조합 과정을 통해 염색체의 *cdc31* 유전자는 *kan^r* 유전자로 치환하였다. *cdc31* 유전자의 5', 3' flanking 부위는 그대로 유지하였다. (C) *cdc31* 결실돌연변이의 성장 속도를 비교하기 위한 Spot assay 결과. EMM ±B1 배지에서 배양하였다. 5일

동안 28°C에서 배양한 결과를 나타내었다. 야생형 균주 AY217에 pREP41X 벡터를 형질전환시킨 균주를 대조군으로 사용하였다. (D) *cdc31* 결실돌연변이의 *In situ* hybridization 결과. EMM 배지에서 16시간 동안 배양한 후 실험을 진행하였다. 대조군은 Spot assay에 사용한 것과 동일하였다.

5. *cdc31* 과발현 돌연변이 균주 분석

cdc31 유전자가 과발현 되었을 때 성장과 mRNA 방출에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위한 균주를 제작하였다. 티아민에 의해 발현 조절이 가능한 *nmt1* 프로모터를 갖고 있는 pREP 벡터에 *cdc31* 유전자를 클로닝하였다. 이렇게 제작한 pREP- *cdc31* 벡터들을 야생형 균주 AY217에 형질전환하였다. 대조군과 함께 +B1 배지와 -B1 배지에 Spot-assay를 진행하였다(그림 5A). Spot assay 결과, 티아민에 의한 벡터 내의 *cdc31* 유전자의 발현 유무와 관계없이 모든 실험군 균주와 대조군 균주의 성장속도는 동일하였다. 즉, *cdc31* 유전자의 과발현이 성장에는 영향을 미치지 않았다. Spot-assay 실험에서 *nmt1* 프로모터의 세기와 무관하게 *cdc31* 유전자의 과발현이 성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였기 때문에 가장 강력한 세기의 프로모터를 갖는 pREP3X 벡터에서 *cdc31*을 과발현시킨 균주만을 사용하여 *In situ* hybridization 실험을 하였다(그림 5B). 대조군과 실험 균주 모두 mRNA 방출이 정상적으로 일어나 mRNA가 세포 전체에 고르게 분포되어있는 것을 확인하였다. 그러나, 티아민을 처리하지 않아 벡터의 *cdc31* 유전자 발현을 유도한 경우 세포의 길이가 대조군에 비하여 길어진 것을 관찰하였다.

(A)



(B)

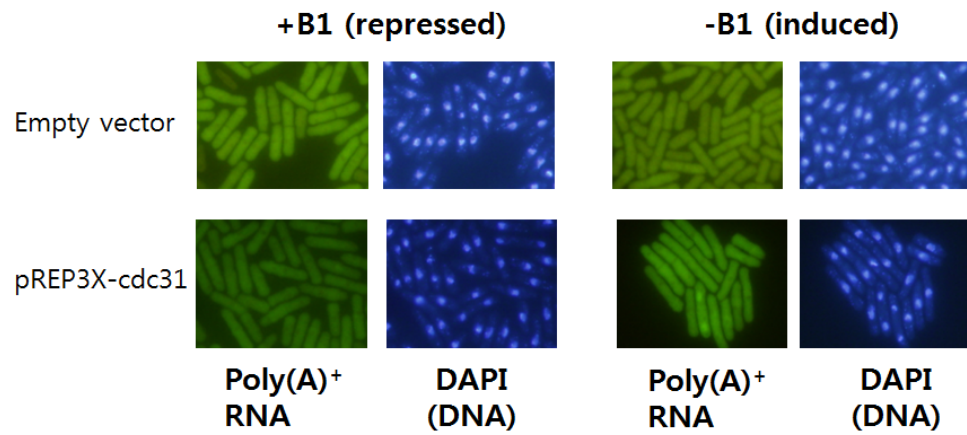


그림 5. *cdc31* 과발현 돌연변이 분석

(A) *cdc31* 과발현 돌연변이의 성장 속도를 비교하기 위한 spot assay 결과. 균주를 EMM ±B1 배지에서 배양하였다. 4일 동안 28°C에서 배양한 결과

를 나타내었으며 야생형 균주 AY217에 pREP41X 벡터를 형질전환 시킨 균주를 대조군으로 사용하였다. (B) *cdc31* 과발현 돌연변이의 *In situ* hybridization 결과. 균주를 EMM ±B1 배지에서 16시간 동안 배양한 후 실험을 진행하였다. 대조군은 spot assay에 사용한 것과 동일하였다.

6. Yeast two-hybrid (Y2H)

mRNA 방출에 관여하는 TREX와 TREX-2 복합체의 구성인자들과 mRNA 방출 인자들 사이의 상호작용을 알아보기 위해 yeast two-hybrid 실험을 진행하였다. 두 가지 복합체를 구성하는 단백질들과 mRNA 방출 인자들에 대한 자세한 내용은 표 7에 정리하였다. 상호작용을 확인하고자 하는 단백질을 암호화하고 있는 유전자의 cDNA를 DNA 결합 도메인(BD)을 갖는 pGAD424/S 벡터와 전사 활성 도메인(AD)을 갖는 pTLexA4/S 벡터에 각각 클로닝하고, 이들의 이상여부를 DNA sequencing으로 확인을 하였다. 제작한 벡터들과 대조군인 빈 벡터를 *S. cerevisiae* L40 균주에 형질전환하였다(표 8). 두 벡터의 선별표지인 류신과 트립토판이 없는 SD-LW 고체배지에서 형질전환된 균주를 선별하였고, 선별한 균주를 류신, 트립토판, 히스티딘이 없는 SD-LWH와 X-gal 고체배지에서 각각 배양하여 두 단백질의 상호작용 여부를 확인하였다. TREX 구성요소의 경우 Uap56(AD)-Mlo3(BD), Mlo3(AD)-Uap56(BD), Tex1(AD)-Tho2(BD), Tho2(AD)-Tex1(BD), Tho1(AD)-Tex1(BD), TREX-2 구성요소의 경우 Sus1(AD)-Sac3(BD), Rpn15(AD)-Pci2(BD), Cdc31(AD)-Pci2(BD), Sac3(AD)-Pci2(BD)의 조합이 양성반응을 보였다. 한편, 대조군 실험에서 Tho7(BD), Sus1(BD),

Rae1(BD), Rpn15(BD)와 빈 벡터(AD)의 조합이 히스티딘이 없는 배지에서 성장하고, X-gal 배지에서 푸른색을 띠는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 이 4가지 단백질들이 스스로 전사활성을 유도할 수 있다는 것을 암시한다. Cdc31(BD)와 빈 벡터(AD)의 조합인 경우는 히스티딘이 없는 배지에서는 성장하지 않았지만 X-gal 배지에서 푸른색을 띠는 것을 관찰하였다.

표 7. mRNA 방출에 관여하는 단백질

		<i>S. cerevisiae</i>	Human	<i>S. pombe</i>
TREX	THO	Hpr1	THOC1	Tho1
		Tho2	THOC2	Tho2
		Mft1	THOC7	Tho7
		Thp2	-	-
		-	THOC5	SPBC577.04 (Tho5)
		-	THOC6	-
		Tex1	THOC3	SPCC18B5.10c (Tex1)
		Yra1	ALY/REF	Mlo3
Sub2	UAP56	Uap56		
TREX-2	Sac3	GANP	Sac3	
	Thp1	PCID2	Thp1 Pci2	
	Cdc31	centrin 2	Cdc31	
	Sus1	ENY2	Sus1	
	Dss1/Sem1	DSS1	Rpn15	
mRNA 방출인자	Mex67	NXF1	Mex67	
	Gle2	Gle2	Rae1	
	Rmr1	Rmr1	SPCC1442.04c (Rmr1)	

표 8. Yeast two-hybrid 조합

	AD-	BD-	Inter- action		AD-	BD-	Inter- action
1	Tho5	Tho2		38	Tho4	Tho1	
2	Tho4	Tho2		39	Tho7	Tho1	
3	Tho1	Tho2		40	Mlo3	Tho1	
4	Tho7	Tho2		41	Uap56	Tho1	
5	Mlo3	Tho2		42	Tex1	Tho1	
6	Uap56	Tho2		43	Pci2	Sac3	
7	Tex1	Tho2	O	44	Cdc31	Sac3	
8	Tho1	Tho5		45	Sus1	Sac3	O
9	Tho1	Tho4	O	46	Tho5	Tho7	O
10	Tho1	Tho7	O	47	Tho4	Tho7	O
11	Tho1	Mlo3		48	Mlo3	Tho7	O
12	Tho1	Uap56		49	Uap56	Tho7	O
13	Tho1	Tex1	O	50	Tex1	Tho7	O
14	Sac3	Tho1	O	51	Tho5	Tho4	O
15	Sac3	Cdc31	O	52	Tho5	Mlo3	
16	Sac3	Sus1	O	53	Tho5	Uap56	
17	Tho7	Tho5		54	Tho5	Tex1	
18	Tho7	Tho4	O	55	Uap56	Mlo3	O
19	Tho7	Mlo3		56	Pci2	Sus1	O
20	Tho7	Uap56		57	Cdc31	Sus1	O
21	Tho7	Tex1		58	Cdc31	Pci2	O
22	Tho4	Tho5		59	Tho4	Mlo3	
23	Mlo3	Tho5		60	Tho4	Uap56	
24	Uap56	Tho5		61	Tho4	Tex1	
25	Tex1	Tho5		62	Tex1	Mlo3	
26	Mlo3	Uap56	O	63	Tex1	Uap56	
27	Sus1	Thp1		64	Mlo3	Tho4	O
28	Sus1	Cdc31	O	65	Uap56	Tho4	O
29	Pci2	Cdc31	O	66	Tex1	Tho4	O
30	Tho2	Tho5		67	Mlo3	Tex1	
31	Tho2	Tho4	O	68	Uap56	Tex1	
32	Tho2	Tho1		69	Rpn15	Sus1	O
33	Tho2	Tho7	O	70	Rpn15	Sac3	
34	Tho2	Mlo3		71	Rpn15	Pci2	O
35	Tho2	Uap56		72	Rpn15	Cdc31	O
36	Tho2	Tex1	O	73	Sus1	Rpn15	O
37	Tho5	Tho1		74	Sac3	Rpn15	O

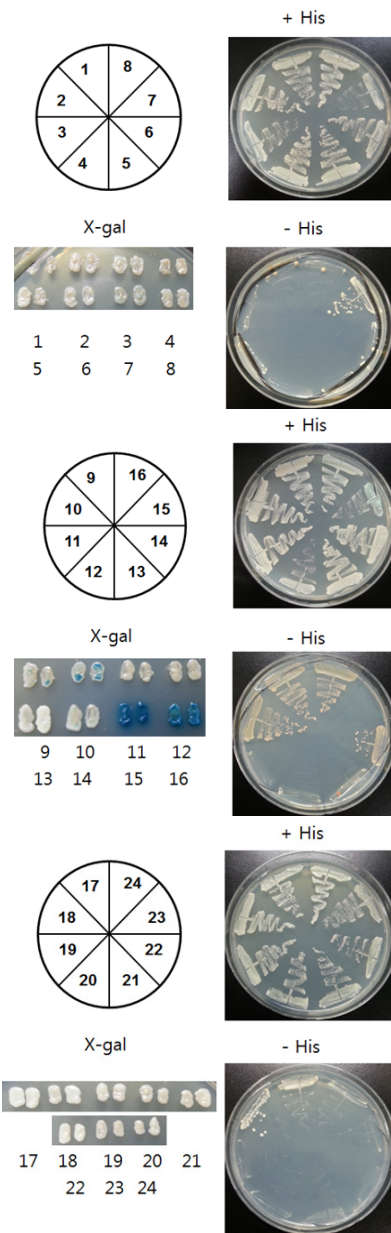
표 8. Yeast two-hybrid 조합 (Continued)

	AD-	BD-	Inter- action		AD-	BD-	Inter- action
75	Pci2	Rpn15	O	112	Tho5	Mex67	
76	Cdc31	Rpn15	O	113	Tho4	Mex67	
77	Rae1	Tho2		114	Tho1	Mex67	
78	Rae1	Tho5		115	Tho7	Mex67	
79	Rae1	Tho4	O	116	Mlo3	Mex67	
80	Rae1	Tho1		117	Uap56	Mex67	
81	Rae1	Tho7	O	118	Tex1	Mex67	
82	Rae1	Mlo3		119	Sus1	Mex67	
83	Rae1	Uap56		120	Sac3	Mex67	
84	Rae1	Tex1		121	Pci2	Mex67	
85	Mex67	Tho2		122	Cdc31	Mex67	
86	Mex67	Tho5		123	Rpn15	Mex67	
87	Mex67	Tho4	O	124	Rmr1	Mex67	
88	Mex67	Tho1		125	Rmn1	Mex67	
89	Mex67	Tho7	O	126	Nab2	Mex67	
90	Mex67	Mlo3		127	Rae1	Mex67	
91	Mex67	Uap56		128	Mex67	Mex67	
92	Mex67	Tex1		129	Thp1	Sus1	O
93	Tho2	Rae1	O	130	Thp1	Sac3	
94	Tho5	Rae1	O	131	Thp1	Cdc31	O
95	Tho4	Rae1	O	132	Thp1	Rpn15	O
96	Tho1	Rae1	O	133	Sus1	Thp1	
97	Tho7	Rae1	O	134	Sac3	Thp1	
98	Mlo3	Rae1	O	135	Cdc31	Thp1	
99	Uap56	Rae1	O	136	Rpn15	Thp1	
100	Tex1	Rae1	O	137	Tho1	x	
101	Sus1	Rae1	O	138	Sac3	x	
102	Sac3	Rae1	O	139	Mlo3	x	
103	Pci2	Rae1	O	140	Pci2	x	
104	Cdc31	Rae1	O	141	Sus1	x	
105	Rpn15	Rae1	O	142	Tho4	x	
106	Rmr1	Rae1	O	143	Tho5	x	
107	Rmn1	Rae1	O	144	Uap56	x	
108	Nab2	Rae1	O	145	Tex1	x	
109	Rae1	Rae1	O	146	Cdc31	x	
110	Mex67	Rae1	O	147	Rpn15	x	
111	Tho2	Mex67		148	x	Tho4	O

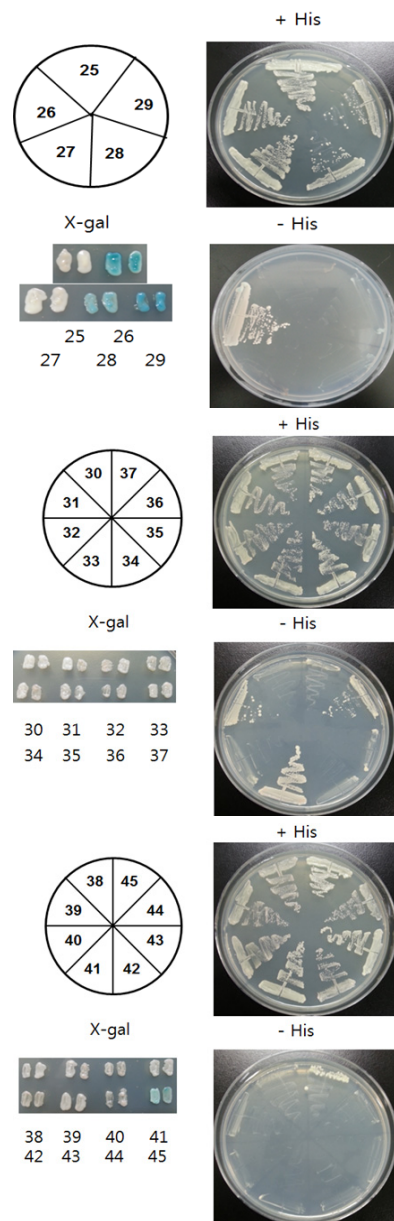
표 8. Yeast two-hybrid 조합 (Continued)

	AD-	BD-	Inter- action
149	x	Tho7	O
150	x	Sus1	O
151	x	Uap56	
152	x	Cdc31	O
153	x	Sac3	
154	x	Mlo3	
155	x	Pci2	
156	x	Rae1	O
157	x	Mex67	

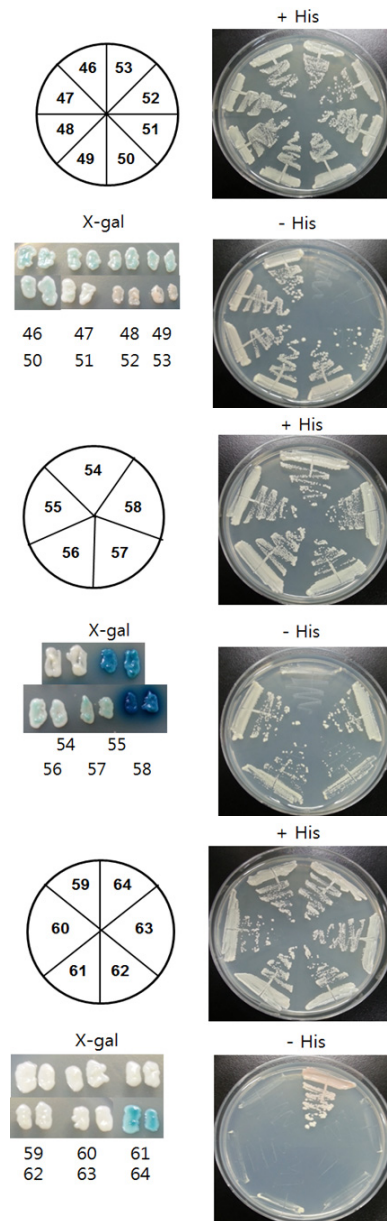
	AD-	BD-	Inter-action
1	Tho5	Tho2	
2	Tho4	Tho2	
3	Tho1	Tho2	
4	Tho7	Tho2	
5	Mlo3	Tho2	
6	Uap56	Tho2	
7	Tex1	Tho2	O
8	Tho1	Tho5	
9	Tho1	Tho4	O
10	Tho1	Tho7	O
11	Tho1	Mlo3	
12	Tho1	Uap56	
13	Tho1	Tex1	O
14	Sac3	Tho1	O
15	Sac3	Cdc31	O
16	Sac3	Sus1	O
17	Tho7	Tho5	
18	Tho7	Tho4	O
19	Tho7	Mlo3	
20	Tho7	Uap56	
21	Tho7	Tex1	
22	Tho4	Tho5	
23	Mlo3	Tho5	
24	Uap56	Tho5	



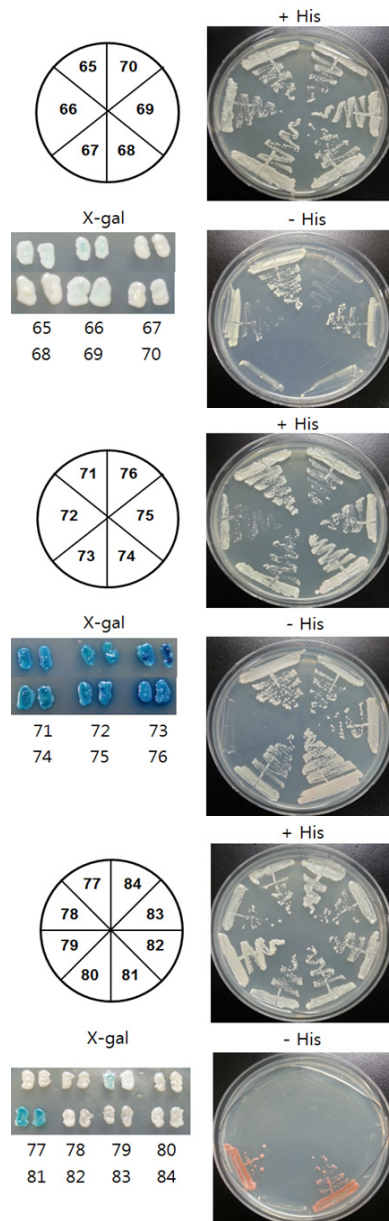
	AD-	BD-	Inter-action
25	Tex1	Tho5	
26	Mlo3	Uap56	O
27	Sus1	Thp1	
28	Sus1	Cdc31	O
29	Pci2	Cdc31	O
30	Tho2	Tho5	
31	Tho2	Tho4	O
32	Tho2	Tho1	
33	Tho2	Tho7	O
34	Tho2	Mlo3	
35	Tho2	Uap56	
36	Tho2	Tex1	O
37	Tho5	Tho1	
38	Tho4	Tho1	
39	Tho7	Tho1	
40	Mlo3	Tho1	
41	Uap56	Tho1	
42	Tex1	Tho1	
43	Pci2	Sac3	
44	Cdc31	Sac3	
45	Sus1	Sac3	O



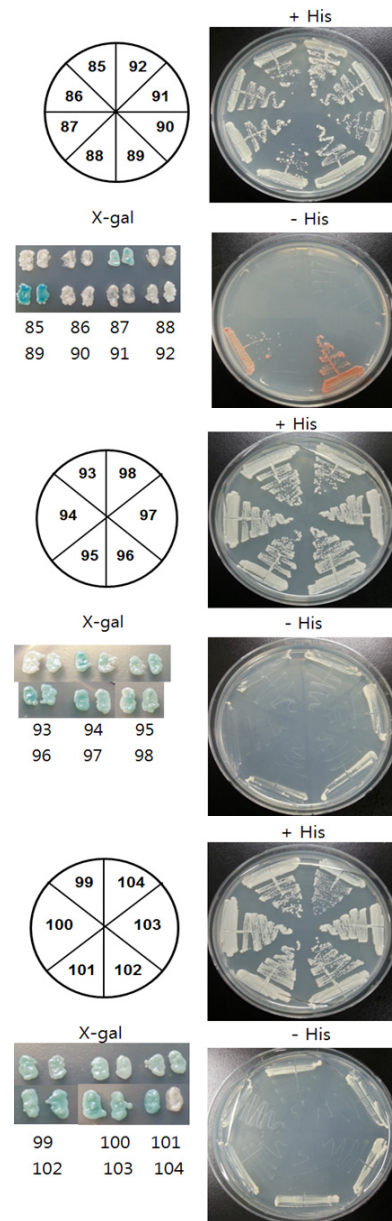
	AD-	BD-	Inter-action
46	Tho5	Tho7	O
47	Tho4	Tho7	O
48	Mlo3	Tho7	O
49	Uap56	Tho7	O
50	Tex1	Tho7	O
51	Tho5	Tho4	O
52	Tho5	Mlo3	
53	Tho5	Uap56	
54	Tho5	Tex1	
55	Uap56	Mlo3	O
56	Pci2	Sus1	O
57	Cdc31	Sus1	O
58	Cdc31	Pci2	O
59	Tho4	Mlo3	
60	Tho4	Uap56	
61	Tho4	Tex1	
62	Tex1	Mlo3	
63	Tex1	Uap56	
64	Mlo3	Tho4	O



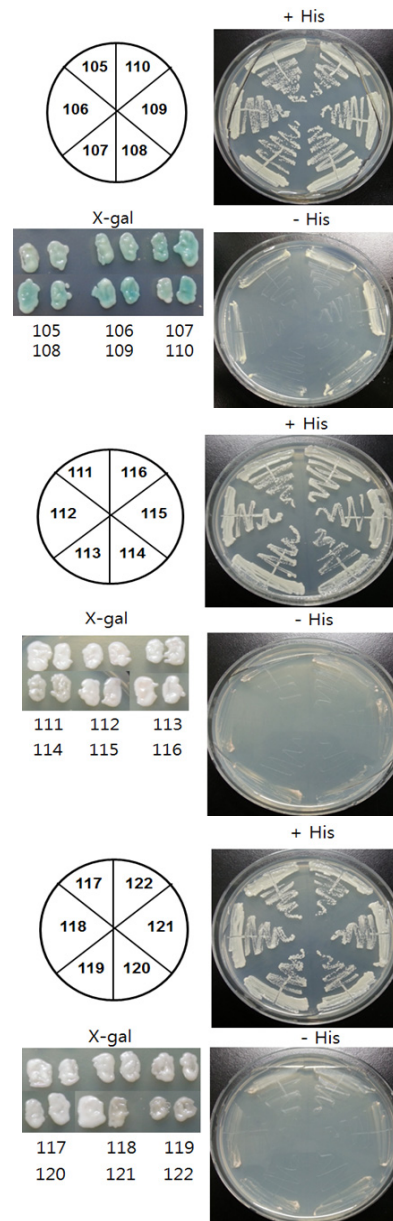
	AD-	BD-	Inter-action
65	Uap56	Tho4	O
66	Tex1	Tho4	O
67	Mlo3	Tex1	
68	Uap56	Tex1	
69	Rpn15	Sus1	O
70	Rpn15	Sac3	
71	Rpn15	Pci2	O
72	Rpn15	Cdc31	O
73	Sus1	Rpn15	O
74	Sac3	Rpn15	O
75	Pci2	Rpn15	O
76	Cdc31	Rpn15	O
77	Rae1	Tho2	
78	Rae1	Tho5	
79	Rae1	Tho4	O
80	Rae1	Tho1	
81	Rae1	Tho7	O
82	Rae1	Mlo3	
83	Rae1	Uap56	
84	Rae1	Tex1	



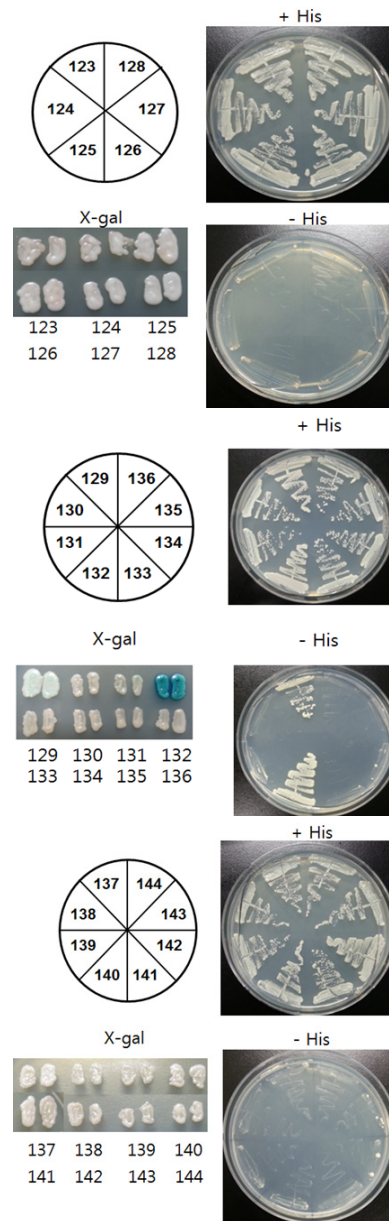
	AD-	BD-	Inter-action
85	Mex67	Tho2	
86	Mex67	Tho5	
87	Mex67	Tho4	O
88	Mex67	Tho1	
89	Mex67	Tho7	O
90	Mex67	Mlo3	
91	Mex67	Uap56	
92	Mex67	Tex1	
93	Tho2	Rae1	O
94	Tho5	Rae1	O
95	Tho4	Rae1	O
96	Tho1	Rae1	O
97	Tho7	Rae1	O
98	Mlo3	Rae1	O
99	Uap56	Rae1	O
100	Tex1	Rae1	O
101	Sus1	Rae1	O
102	Sac3	Rae1	O
103	Pci2	Rae1	O
104	Cdc31	Rae1	O



	AD-	BD-	Inter-action
105	Rpn15	Rae1	O
106	Rmr1	Rae1	O
107	Rmn1	Rae1	O
108	Nab2	Rae1	O
109	Rae1	Rae1	O
110	Mex67	Rae1	O
111	Tho2	Mex67	
112	Tho5	Mex67	
113	Tho4	Mex67	
114	Tho1	Mex67	
115	Tho7	Mex67	
116	Mlo3	Mex67	
117	Uap56	Mex67	
118	Tex1	Mex67	
119	Sus1	Mex67	
120	Sac3	Mex67	
121	Pci2	Mex67	
122	Cdc31	Mex67	



	AD-	BD-	Inter-action
123	Rpn15	Mex67	
124	Rmr1	Mex67	
125	Rmn1	Mex67	
126	Nab2	Mex67	
127	Rae1	Mex67	
128	Mex67	Mex67	
129	Thp1	Sus1	O
130	Thp1	Sac3	
131	Thp1	Cdc31	O
132	Thp1	Rpn15	O
133	Sus1	Thp1	
134	Sac3	Thp1	
135	Cdc31	Thp1	
136	Rpn15	Thp1	
137	Tho1	x	
138	Sac3	x	
139	Mlo3	x	
140	Pci2	x	
141	Sus1	x	
142	Tho4	x	
143	Tho5	x	
144	Uap56	x	



	AD-	BD-	Inter-action
145	Tex1	x	
146	Cdc31	x	
147	Rpn15	x	
148	x	Tho4	O
149	x	Tho7	O
150	x	Sus1	O
151	x	Uap56	
152	x	Cdc31	O
153	x	Sac3	
154	x	Mlo3	
155	x	Pci2	
156	x	Rae1	O
157	x	Mex67	

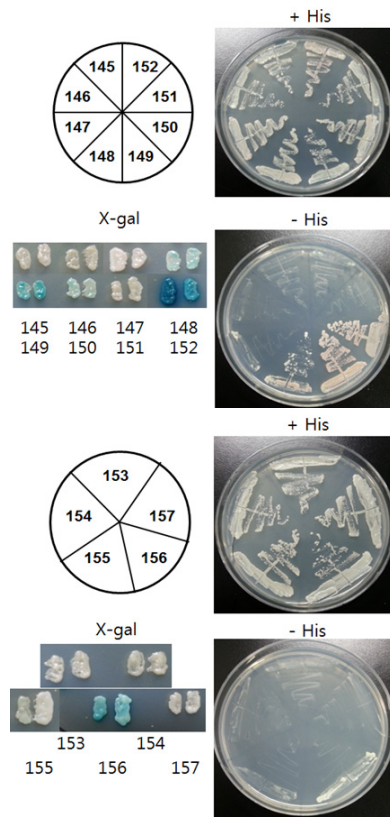


그림 6. Yeast two-hybrid (Y2H)

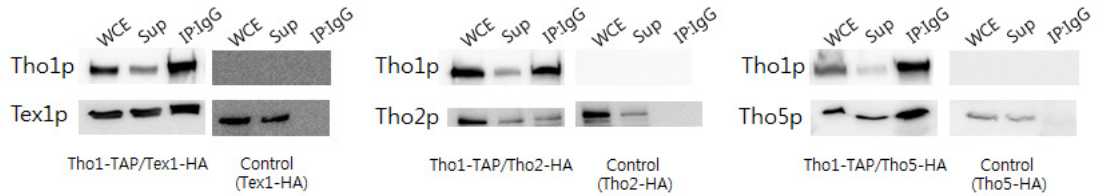
Yeast two-hybrid 실험 결과. 두 개의 단백질 사이의 물리적 상호작용을 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 표 8에 기술한 바와 같이 총 157가지의 조합으로 실험을 진행하였으며 1-136은 실험군, 137-157은 대조군에 해당한다. 전사 활성 도메인을 갖는 pGAD424/S 벡터와 DNA 결합 도메인을 갖는 pTLexA4/S 벡터를 동시에 L40 균주에 형질전환하여 SD-LT, SD-LTH, X-gal 고체 배지에서 배양한 결과를 나타내었다.

7. Co-Immunoprecipitation (Co-IP)

*In-vivo*에서 mRNA 방출에 관여하는 단백질 사이의 물리적 상호작용을 알아보기 위해 Co-IP 실험을 진행하였다. 이를 위해 TREX 복합체의 Tho1 단백질과 TREX-2 복합체의 Sac3 단백질, 그리고 mRNA 방출에 관여하는 것으로 추정되는 Rmr1 단백질의 C-말단 위치에 TAP (Tandem Affinity Purification) tag을 붙이고, TREX와 TREX-2의 구성 인자들과 mRNA 방출에 관여하는 여러 단백질의 N-말단 위치에 HA tag을 붙인 키메라 단백질들이 발현되는 균주를 제작하였다. 자세한 균주 제작 과정과 실험방법은 ‘II. 실험재료 및 방법’에 기술하였다.

그림 7에서 보이듯이, TREX의 Tho1 단백질과 물리적 상호작용을 하는 단백질은 Tho2, Tex1, Tho5로 확인되었다. TREX-2의 경우 Sac3 단백질과 물리적 상호작용을 하는 단백질은 Rael, Thp1로 확인되었으며 Thp1 단백질과 Rmr1 단백질의 물리적 상호작용 또한 확인되었다.

(A)



(B)

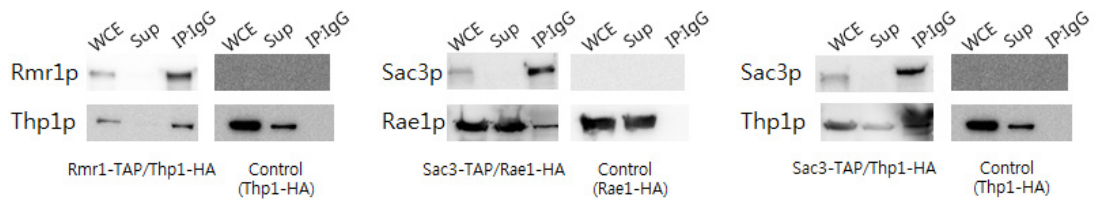


그림 7. Co-Immunoprecipitation

(A) TREX 구성 요소 사이의 물리적 상호작용을 나타낸 실험 결과. (B) TREX-2 구성 요소 사이의 상호작용을 나타낸 실험 결과. HA-tag을 붙인 Tex1, Tho2, Tho5, Thp1, Rae1 단백질만이 발현되는 균주를 대조군으로 사용하였다. WCE; whole cell extracts, Sup; supernatant, IP: IgG; eluents from IgG beads. Tho1-CTAP, Rmr1-CTAP, Sac3-CTAP 단백질은 anti-Protein A 항체를 이용하여 검출하였으며, Tex1-HA, Tho2-HA, Tho5-HA, Thp1-HA, Rae1-HA 단백질은 anti-HA 항체를 이용하여 검출하였다.

IV. 토의

본 연구에서는 분열효모에서 mRNA export에 관여하는 단백질 복합체 TREX, TREX-2에 대한 실험을 수행하였다. TREX의 구성요소 중 하나인 *tho7* 유전자와 TREX-2의 구성요소 중 하나인 *cdc31* 유전자를 각각 결실 또는 과발현 시켜 성장과 mRNA 방출에 어떠한 영향을 미치는 지 확인하였다.

tho7 유전자는 인트론이 3개 있으며 202개 아미노산으로 이루어진 예상 분자량 23.28 kDa, 등전점(isoelectric point, pI)이 pH4.48인 단백질을 암호화하고 있다. 이것은 204개의 아미노산으로 이루어진 사람과 생쥐의 THOC7단백질과 아미노산 서열의 유사도(homology)는 61%, 동질도(identity)는 21% 정도이며, 유사 정도는 특정 영역에 국한되지 않고 단백질 전체에서 보였다. 사람(*Homo sapiens*), 생쥐(*Mus musculus*), 초파리(*Drosophila melanogaster*), 개구리(*Xenopus laevis*), 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*), 출아효모(*S. cerevisiae*), 그리고 분열효모(*S. pombe*)의 THOC7/Mft1 단백질을 MEGA 프로그램을 사용하여 (Tamura *et al.*, 2013), 계통수(neighbor-joining tree)를 그려보면, *S. pombe*의 Tho7 단백질은 초파리의 THOC7와 가장 유사하였으며, 출아효모의 Mft1보다 사람, 생쥐, 초파리의 THOC7과 더 유사하였다(Koh and Yoon, 2014). *tho7* 유전자의 과발현은 성장 및 mRNA 방출에 영향을 미치지 않았다. 하지만 *tho7* 유전자가 결실 된 경우, 성장과 mRNA 방출에 결함을 나타내었다. 또한, 살아있는 세포에서 Tho7 단백질이 핵 내에 위치하고 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 Tho7 단백질이 핵 안에서 mRNA 방출 과정에 관여한다는 것을 시사한다.

cdc31 유전자의 경우, 과발현 시 성장 및 mRNA 방출에 영향을 미치지

않았지만 세포의 분열이 정상적으로 일어나지 않아 야생형보다 세포 길이가 길어진 것을 관찰하였다. *cdc31*은 생장에 꼭 필요한 필수 유전자이기 때문에 티아민으로 발현 조절이 가능한 pREP 벡터 중 중간 세기의 프로모터를 갖는 pREP41X 벡터에 *cdc31* 유전자를 클로닝하여 형질전환을 시킨 균주의 염색체 DNA 상의 *cdc31* 유전자를 제거하여 결실돌연변이를 제작하였다. 이렇게 제작한 균주는 Cdc31 단백질이 발현되는 조건에서는 생장과 mRNA 방출에 결함을 나타내지 않았다. 하지만 Cdc31 단백질의 발현을 억제하는 조건에서는 생장과 mRNA 방출에 결함을 나타내었으며, 과발현 시와 유사하게 세포의 길이가 길어진 것을 관찰하였다. *cdc31*은 *S. cerevisiae*에서 centrin이며 세포 분열에 필수적인 유전자로 알려져 있다(Miron S. *et al.*, 2011). *S. pombe*의 *cdc31*을 과발현 또는 결실을 시킨 경우, 세포의 길이가 길어지는 현상을 통해 *S. cerevisiae*에서와 동일한 세포 분열 기능을 하는 것으로 추측된다. *tho7*과 *cdc31*을 결실, 과발현 시켜 실험을 수행한 결과, 생장과 mRNA 방출은 상호 연관이 있었다. 이러한 결과는 이 균주들에서 생장 결함과 mRNA 방출 사이의 연관성이 있음을 추측할 수 있다.

In-vivo에서 *S. pombe*의 TREX, TREX-2의 구성요소로 추정되는 단백질들이 서로 물리적으로 결합할 수 있는지, 그리고 이들과 mRNA 방출 인자 사이에 상호작용을 알아보기 위해 yeast two-hybrid와 co-immunoprecipitation 실험을 진행하였다. Y2H 실험 결과, TREX의 경우 Uap56(AD)-Mlo3(BD), Mlo3(AD)-Uap56(BD), Tex1(AD)-Tho2(BD), Tho2(AD)-Tex1(BD), Tho1(AD)-Tex1(BD), TREX-2의 경우 Sus1(AD)-Sac3(BD), Rpn15(AD)-Pci2(BD), Cdc31(AD)-Pci2(BD), Sac3(AD)-Pci2(BD)에서 양성반응을 보였다. 대조군 실험 결과에서 Tho7(BD), Sus1(BD), Rael1(BD), Rpn15(BD) 등의 네 단백질은 빈 벡터(AD)와의 조합에서도 리포터 유전자인 *HIS3*, *LacZ*의 발현을 유도하였다. 이러한 대조군 실험 결과는

TREX 구성요소인 Tho7 단백질과 TREX-2 구성요소인 Sus1, Rpn15 단백질, 그리고 mRNA 방출인자인 Rael 단백질이 전사를 활성화시킬 수 있는 기능을 자체적으로 갖고 있는 것을 암시한다. 반면에 Cdc31(BD)와 빈 벡터(AD)의 조합에서는 *HIS3* 유전자의 발현은 나타나지 않았지만 *LacZ* 유전자의 발현은 나타났다. 자세한 분자적인 메커니즘은 본 연구를 통해 알 수 없지만 *cdc31*도 프로모터 주변의 상황에 따라 전사를 활성화시킬 수 있는 가능성을 제시한다.

두 단백질 사이의 상호작용을 알아보는 co-immunoprecipitation 실험을 추가적으로 수행하였다. TREX의 backbone에 해당하는 Tho1과 TREX를 이루는 나머지 구성요소 사이의 상호작용과 Tho1과 mRNA 방출인자 사이의 상호작용을 알아본 결과, Tho1-Tho5, Tho1-TeX1, Tho1-Tho2의 물리적 상호작용을 확인하였다. TREX-2의 backbone에 해당하는 Sac3와 TREX-2를 이루는 나머지 구성요소 사이의 상호작용과 Sac3와 mRNA 방출인자 사이의 상호작용을 알아본 결과, Sac3-Rael, Sac3-Thp1의 물리적 상호작용을 확인하였다. 또한, 아직 많은 연구가 진행되지 않았으나 mRNA 방출에 관여하는 것으로 추정되는 Rmr1과 TREX, TREX-2, mRNA 방출인자 사이의 상호작용을 알아본 결과, TREX-2의 구성요소인 Thp1과 Rmr1 사이의 물리적 상호작용을 확인하였다. 이를 통하여 Rmr1이 *S. pombe*의 새로운 TREX-2 구성요소 또는 TREX-2의 Thp1과의 결합을 통해 mRNA 방출에 도움을 주는 인자일 두 가능성을 제시한다. TREX-2 구성요소인 Rpn15, Cdc31의 N-말단에 HA-tag을 붙인 경우 발현이 되지 않아 Sac3와의 상호작용을 확인할 수 없었다. 유전자 서열 분석 결과 tagging 과정에서는 문제가 없었다. 따라서 생체 내에서 일어난 발현 과정에서 folding 등에 문제를 일으켰을 가능성이 있다. 이러한 경우 Sac3와 두 단백질의 상호작용을 알아보기 위해서는 Rpn15, Cdc31의 C-말단에 HA-tag을 붙여 발현을 시킨 뒤

Co-IP 실험에 사용하는 방법을 통해 문제점을 보완할 수 있을 것이다. 두 단백질 사이의 상호작용을 알아보기 위한 Y2H와 Co-IP 실험을 통하여 밝힌 상호작용 중에서 지금까지 밝혀지지 않은 Tho1-Tho2, Tho1-Tho5, Sac3-Rae1, Sac3-Pci2, Rpn15-Pci2, Rmr1-Thp1, Cdc31-Pci2의 새로운 7가지 상호작용을 알아내었다.

참고문헌

Komili S. and Silver P.A. 2009. Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nat. Rev. Genet.* 9, 38-48.

García-Oliver E., García-Moliner V. and Rodríguez-Navarro S. 2012. mRNA export and gene expression: the SAGA-TREX-2 connection. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1819, 555-565.

Pascual-García P., Govind C.K., Queralt E., Cuenca-Bono B., Llopis A., Chavez S., Hinnebusch A.G. and Rodríguez-Navarro S. 2008. Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev.* 22, 2811-2822.

Tutucci E. and Stutz F. 2011. Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 377-384.

Klass D.M., Scheibe M., Butter F., Hogan G.J., Mann M. and Brown P.O. 2013. Quantitative proteomic analysis reveals concurrent RNA-protein interactions and identifies new RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res.* 23, 1028-1038.

Chávez S., Beilharz T., Rondón A.G., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup J.Q., Lithgow T. and Aguilera A. 2000. A protein complex

containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO*. 19, 5824-5834.

Strässer K., Masuda S., Mason P., Pfannstiel J., Oppizzi M., Rodriguez-Navarro S., Rondón A.G., Aguilera A., Struhl K., Reed R. and Hurt E. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*. 417, 304-308.

Zenklusen D., Vinciguerra P., Wyss J.C. and Stutz F. 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.

Abruzzi K.C., Lacadie S. and Rosbash M. 2004. Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *EMBO*. 23, 2620-2631.

Masuda S., Das R., Cheng H., Hurt E., Dorman N. and Reed R. 2005. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev*. 19, 1512 - 1517.

Zenklusen D., Vinciguerra P., Strahm Y. and Stutz F. 2001. The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Mol. Cell. Biol*. 21, 4219 - 4232.

Strasser K. and Hurt E. 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature*. 413, 648 - 652.

Strasser K. and Hurt E. 2000. Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *EMBO*. 19, 410 - 420.

Gwizdek C., Iglesias N., Rodriguez M.S., Ossareh-Nazari B., Hobeika M., Divita G., Stutz F. and Dargemont C. 2006. Ubiquitin-associated domain of Mex67 synchronizes recruitment of the mRNA export machinery with transcription. *PNAS*. 103, 16376 - 16381.

Gwizdek C., Hobeika M., Kus B., Ossareh-Nazari B., Dargemont C. and Rodriguez M.S. 2005. The mRNA nuclear export factor Hpr1 is regulated by Rsp5-mediated ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* 280, 13401 - 13405.

Rondón A.G., Jimeno S. and Aguilera A. 2010. The interface between transcription and mRNP export: From THO to THSC/TREX-2. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1799, 533-538.

Gallardo M., Luna R., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Aguilera A. 2003. Nab2p and the Thp1p - Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 24225 - 24232.

Fischer T., Rodríguez-Navarro S., Pereira G., Rácz A., Schiebel E. and Hurt E. 2004. Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nat. Cell. Biol.* 6, 840-848.

Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.J., Antúnez O., Brettschneider S., Lechner J., Pérez-Ortín J.E., Reed R. and Hurt E. 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell.* 9, 75-86.

Lei E.P., Stern C.A., Fahrenkrog B., Krebber H., Moy T.I., Aebi U. and Silver P.A. 2003. Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell.* 14, 836 - 847.

Fischer T., Strasser K., Racz A., Rodriguez-Navarro S., Oppizzi M., Ihrig P., Lechner J. and Hurt E. 2002. The mRNA export machinery requires the novel Sac3p - Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *EMBO.* 21, 5843 - 5852.

Govind C.K., Zhang F., Qiu H., Hofmeyer K. and Hinnebusch A.G. 2007. Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Mol Cell.* 12, 31-42.

González-Aguilera C., Tous C., Gómez-González B., Huertas P., Luna R. and Aguilera A. 2008. The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome

instability. *Mol Biol Cell.* 19, 4310-4318.

Alfa C., Fantes P., Hyams J.S., McLeod M. and Warbrick E. 1993. *Experiments with Fission Yeast : A Laboratory Course Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Moreno S., Klar A. and Nurse P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795-823.

Maundrell K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene.* 15, 127-30.

Bähler J., Wu J.Q., Longtine M.S., Shah N.G., McKenzie A., Steever A.B., Wach A., Philippsen P. and Pringle J.R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 14, 943 - 951.

Forsburg S.L. and Sherman D.A. 1997. General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene.* 191, 191-195.

Phillips G.J. 2001. Green fluorescent protein—a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS.* 204, 9-18.

Miron S., Durand D., Chilom C., Pérez J. and Craescu C.T. 2011. Binding of calcium, magnesium, and target peptides to Cdc31, the centrin of yeast

Saccharomyces cerevisiae. *Biochemistry*. 50, 6409-6422.

이현주. 2015. 분열효모에서 mRNA 방출과 연관된 유전자 *rmr1*의 선별 및 기능에 대한 연구. 성신여자대학교 일반대학원 석사학위 청구논문.

Eun-Jin Koh and Jin Ho Yoon. 2014. 분열효모에서 *spThoc7* 유전자의 결실이 성장 및 mRNA Export에 미치는 영향. *Korean Journal of Microbiology*. 50, 249-253.

ABSTRACT

Study of multiprotein complexes associated with mRNA export in fission yeast

Eunjin Koh

Department of Biology

Graduate School of Sungshin Women's University

TREX (*T*Ranscription and *E*xport) and TREX-2, evolutionally well conserved multi-protein complexes, are involved in transcription elongation, mRNA processing, and mRNA export out of the nucleus to the cytoplasm. TREX and TREX-2 complexes in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, are studied in this thesis. The Tho7 protein is one of the TREX components and the Cdc31 protein is one of the TREX-2 components. The *tho7* null mutant showed both growth and mRNA export defects. But *tho7* over-expression mutant exhibited no defects. And we found that Tho7-GFP localize mainly in the nucleus. On the other hand, because *cdc31* is an essential gene for viability, we constructed the *cdc31* null mutant transformed with pREP41X-*cdc31*, in which *cdc31* is expressed under the control of *nmt1* promoter. Expression of *cdc31* in the pREP41X-*cdc31* vector can be controlled by thiamine. This null mutant displayed defects of growth and mRNA export when

cells were incubated in the presence of thiamine (the repression of *cdc31* expression). However, this null mutant incubated in the absence of thiamine (the induction of *cdc31* expression) and over-expression mutant of *cdc31* indicated no defect of mRNA export.

To identify protein interaction, we conducted two experiments. Yeast two-hybrid (Y2H) and co-immunoprecipitation (Co-IP) showed 12 protein interactions: Uap56-Mlo3, Tex1-Tho2, Tho1-TeX1, Tho1-Tho5, Tho1-Tho2, Sac3-Sus1, Sac3-Thp1, Sac3-Rae1, Sac3-Pci2, Rpn15-Pci2, Cdc31-Pci2, Rmr1-Thp1. These results indicate that the *S. pombe* orthologs of the components in TREX and TREX2 are physically interacted with each others and also involved in mRNA export.