



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 export와
관련된 *nab2* 유전자와 합성치사를
보이는 돌연변이의 선별

2011

성신여자대학교 교육대학원
교육학과 생물교육전공
박윤선

분열효모에서 mRNA export와
관련된 *nab2* 유전자와 합성치사를
보이는 돌연변이의 선별

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2011년 5월

성신여자대학교 교육대학원

교육학과 생물교육전공

박윤선

인 준 서

박윤선의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 _____(인)

심사위원 _____(인)

심사위원 _____(인)

성신여자대학교 교육대학원

논문개요

진핵생물의 생명현상을 이해하는데 기초가 되는 mRNA의 핵(nucleus)에서 세포질로의 이동 (mRNA export) 기작을 밝히기 위해서는 mRNA export에 관여하는 인자(factor)들의 연구가 필요하다.

가장 간단한 형태의 진핵생물인 효모(yeast)는 연구에 많이 이용되는 모델생물로서 mRNA export 연구에도 많은 성과를 내고 있다. mRNA export에 관여하는 인자들 중의 하나인 수송운반체(transport receptor)는 mRNA에 결합을 하여 성숙한(mature) mRNA만을 핵에서 세포질로 이동시키는 역할을 한다. 하지만 수송운반체가 mRNA에 결합하기 위해서는 여러 어댑터(adaptor) 단백질들의 도움을 필요로 하며, 이번 연구에서는 어댑터 단백질로 추정되는 Nab2 단백질과 기능적으로 관련이 있는 새로운 인자들을 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)에서 유전학적인 방법으로 찾고자 하였다.

우선 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)의 Nab2와 유사한 단백질을 암호화하는 분열효모 *S. pombe* 유전자 (SPAC14C4.06c, *spnab2*로 명명)의 결실돌연변이(knockout mutant) 균주를 제작한 결과, *nab2* 유전자는 생장에 필수적이지는 않았다. 또한 *nmt* 프로모터(promoter)에 의해 발현이 조절되는 벡터(vector)인 pREP3X, pREP41X, pREP81X를 이용하여 *spnab2* 유전자가 과발현(over-expression) 될수록 느린 성장속도를 보인다는 것을 알았다.

따라서 *spnab2* 유전자와 관련이 있는 유전자들을 찾기 위한 유전학적 방법인 합성치사 돌연변이 선별 (synthetic lethal mutant screen)을 수행하였다. 이를 위해 *nmt* 프로모터에 의해 발현이 조절되는 *spnab2* 유전자를 염색체에 삽입한 균주를 제작한 후, 돌연변이 유발물질인 3%

Ethyl methansulfonate (EMS)를 이용하여 *spnab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체를 선별하였다. 선별한 돌연변이체들을 각각 SLnab1 ~ 5로 명명하고 특성을 조사한 결과, mRNA export에 관여하는 것으로 사료된다.

목 차

논문개요

목차

그림목차

도표목차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험재료	
1) 균주(strains)	5
2) 플라스미드(plasmids)	5
3) 배지 및 배양조건	5
4) 프라이머(primer) 및 염기서열 분석	6
5) 효소	7
6) 시약 및 재료	7
2. 실험방법	
1) 효모 유전체(genomic) DNA 분리	13
2) 효모 cDNA 분리	
① Total RNA 분리	14
② RT-PCR	14
3) <i>E. coli</i> 의 형질전환(transformation)	15
4) <i>S. pombe</i> 의 형질전환(transformation)	15
5) 돌연변이 유발 (mutagenesis)	16
6) 무작위 포자 분석 (Random spore analysis)	17
7) Spot assay for growth	17
8) <i>In situ</i> Hybridization	17

III. 결과

1. *nab2* 결실돌연변이주의 제작 및 분석19
2. *nab2* 유전자의 과발현(over-expression)21
3. 합성치사 돌연변이체 선별을 위한 모균주 제작24
4. *nab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체 선별 및 분석29
5. 선별한 돌연변이체의 mRNA export 결합 조사32

IV. 토의34

참고문헌

영문초록

그림 목 차

Figure 1. Construction of <i>nab2</i> deletion mutants	20
Figure 2. Growth test for <i>nab2</i> over-expression strains	23
Figure 3. Schematic diagram of synthetic lethality	26
Figure 4. Construction of 81X-Nab2 Integration	27
Figure 5. Growth test for 81X-Nab2 integrated strains	28
Figure 6. Growth test for synthetic lethal mutants	31
Figure 7. Poly(A) ⁺ RNA localization of synthetic lethal mutants	33

도 표 목 차

Table 1. <i>S. pombe</i> strains used in this study	8
Table 2. <i>E. coli</i> strains used in this study	8
Table 3. Medium composition for <i>S. pombe</i>	9
Table 4. Medium composition for <i>E. coli</i>	11
Table 5. Oligonucleotide primer used in this study	12

I. 서 론

진핵생물은 핵막(nuclear envelope)에 의해 핵(nucleus)과 세포질로 구획화 되어있어서 원핵생물에 비해 다소 복잡한 구조를 가지고 있지만 유전정보를 안정하게 저장하고 유전자의 발현을 조절하는데 있어서 유리하다. 이러한 핵과 세포질 사이의 구획화는 단백질이나 RNA 같은 거대분자들이 끊임없이 이동해야 하는 다소 복잡하고 역동적인 구조라고 할 수 있다(Köhler and Hurt, 2007; Luna *et al.*, 2005).

핵 안에서 전사된 mRNA는 해독 과정을 거쳐 단백질로 합성되기 위해서 세포질로의 이동이 필수적이며, 이러한 물질의 이동은 핵막에 존재하는 유일한 이동통로인 핵공(Nuclear pore)을 통해서 이뤄진다. 핵공은 핵막에 존재하는 단순한 구멍이 아니라, 약 30 종류의 핵공단백질(Nucleoporin, Nup)들로 이루어진 거대한 단백질체인 핵공복합체(Nuclear pore complex, NPC)를 이루고 있다. 핵공복합체의 분자량은 효모의 경우 50 MDa 정도에서부터 포유류의 125 MDa 정도에 이르기까지 다양하지만 전체적인 핵공복합체의 구조는 모든 진핵생물에서 비슷한 양상을 보이고 있다. 그 구조를 크게 세 가지 주요 부분으로 나눌 수 있는데, 먼저 핵 쪽의 nuclear basket 부분과 8개의 spoke-ring이 대칭적으로 중앙통로를 둘러싸고 있는 구조의 nuclear body, 마지막으로 세포질 쪽으로 cytoplasmic filament가 존재한다(Rodriguez *et al.*, 2004). 이 중 핵공복합체의 nuclear body의 중앙통로 부분 안쪽에는 페닐알라닌-글리신(FG)이 반복된 아미노산 서열을 가진 핵공단백질이 배열되어 있는데, 이러한 FG repeat 도메인은 일정한 3차 구조를 가지지 않고 핵공복합체의 중앙통로에 길게 늘어진 형태로 존재한다. 이와 같은 형태는 거대분자들이 단순확산으로 핵공복합체를 통과하는 것을 막아주는

역할을 하고, 수송운반체(transport receptor)와는 약한 상호작용을 함으로써 수송운반체와 결합한 물질들이 선택적으로 핵공복합체를 통과할 수 있게 하는 구조이다(Tran and Wente, 2006).

단백질이나 다른 RNA(tRNA, rRNA, snRNA, miRNA 등)의 이동과는 다르게, mRNA의 핵에서 세포질로의 이동 (mRNA export)은 전사단계부터 mRNA 가공과정 {5'-캡핑(capping), 스플라이싱(splicing), 3'-말단 폴리아데닐화(polyadenylation), 질적 조절(quality control, 잘못 가공된 mRNA의 제거)}에 이르는 모든 과정들이 mRNA 중에서도 성숙한(mature) mRNA만을 이동시키기 위해 서로 긴밀하게 연결되어 있어서 복잡하고 독특한 기작이라 할 수 있다(Fasken *et al.*, 2009; Moore, 2005). 전사가 진행되는 동안 RNA 중합효소II로 부터 만들어져 나오는 pre-mRNA는 핵 안에서 5'-말단의 캡핑과 인트론 제거를 위한 스플라이싱, 3'-말단의 절단과 폴리아데닐화 등의 복잡한 가공과정을 거쳐 완성된 성숙한 mRNA만이 수많은 단백질들과 결합하여 mRNP 복합체 구조를 이루어 세포질로 나갈 수 있게 된다(Casolari *et al.*, 2004; Erkmann *et al.*, 2004; Iglesias and Stutz, 2008).

mRNA 수송운반체인 Mex67-Mtr2(heterodimer)은 가공이 끝나고 적절한 mRNP 복합체로 포장된 mRNA에 결합하여, 이것을 핵공복합체로 인도하고 핵공복합체 중앙통로의 FG repeat 도메인과 직접 상호작용함으로써 mRNA가 핵공복합체를 통과하여 세포질로 나갈 수 있게 한다. mRNP가 세포질로 나오면 Mex67-Mtr2는 mRNP에서 떨어져 나와 다시 핵 안으로 재순환된다(Yoon *et al.*, 2000). 이러한 수송운반체는 mRNA에 비특이적으로 결합할 수 있지만 그 수준이 낮기 때문에 결합력을 높이기 위한 어댑터(adaptor) 단백질과의 결합을 필요로 한다(Köhler and Hurt, 2007).

mRNA의 전사 및 가공과정에 관여하면서 mRNA export를 조절하는 mRNA export 인자에는 다양한 어댑터 단백질과 RNA 헬리카제 (helicases), NPC 결합 단백질 등이 존재한다. 효모의 경우에는 어댑터 단백질 중 가장 잘 알려진 Yra1 단백질 (RNA-결합 단백질)은 mRNA의 전사와 관련된 THO 복합체 (Hpr1, Mft1, Thp2, Tho2), Sub2 단백질 (mRNP 구조의 리모델링에 관여하는 RNA 헬리카제)과 함께 TREX(Transcription /Export) 복합체를 이루고, mRNA가 수송운반체와 결합할 수 있도록 매개하는 역할을 한다. Yra1과 유전적 연관관계로 선별된 Sac3 단백질도 수송운반체인 Mex67과 직접 결합할 수 있는 어댑터 단백질로 여겨지고 있으며, Sac3 단백질은 Thp1, Cdc31, Sus1과 함께 TREX-2 복합체를 이룬다. 이 중 Sus1은 전사개시 복합체인 SAGA의 구성요소로도 역할을 수행하는 단백질이기 때문에, 전사와 mRNA export 과정을 서로 연결하는 역할을 하는 것으로 추정된다(Fischer *et al.*, 2002; Serpeloni *et al.*, 2011).

mRNA export에 관여하는 Yra1 단백질과 수송운반체인 Mex67은 핵 안에서 또 다른 어댑터 단백질인 Nab2와 함께 삼중(trimeric) 복합체를 이루고 있다. mRNP가 핵공복합체로 이동하게 되면 세포질로 빠져나가기 전에 Nup60에 의존적으로 Yra1은 먼저 분리되어 핵에 남겨진다. mRNP가 세포질로 이동한 뒤에는 핵공복합체 표면에 존재하는 Gle1 단백질과 IP₆(inositol hexakisphosphate)에 의해 활성화된 Dbp5가 mRNP의 구조를 변화시키고, 이 결과 mRNP로부터 Mex67과 Nab2가 분리된다. Mex67과 Nab2는 재순환되기 위해서 다시 핵 안으로 이동된다(Iglesias and Stutz, 2008).

mRNA export에서 어댑터 단백질로 작용하는 Nab2 단백질은 효모에서 각각의 mRNP에 약 10개 정도가 결합하는 것으로 추정된다

(Stewart, 2010). 분열효모 *S. pombe*의 I 번 염색체 상에 위치하는 *spnab2* (*n*uclear *a*bundant polyA RNA *b*inding protein 2) 유전자는 2개의 인트론을 포함하고 307개의 아미노산을 암호화하고 있으며, spNab2 단백질의 예상 분자량은 33.9 kDa이다. *S. cerevisiae*의 Nab2 단백질은 생장에 필수적인 반면, 이와 65.5%의 유사함을 보이는 단백질을 암호화하는 분열효모 *S. pombe*의 spNab2 단백질은 생장에 필수적이지 않다. mRNA의 poly(A) 꼬리에 결합하는 Nab2는 핵과 세포질 사이를 왕복하는 단백질이며 mRNA export를 비롯하여 poly(A) 꼬리의 길이 조절, mRNA의 질적 관리 등에 관여하는 단백질로써 mRNA export에 있어서도 필수적이다(Viphakone *et al.*, 2008). 수송운반체인 Mex67과 핵 안에서 상호작용하는 Npl3 단백질과 마찬가지로, Nab2 단백질은 3'-말단 가공과정과 mRNA export를 연결하는 역할을 하고 있지만 기능적으로 Npl3와 중복되지 않는다(Iglesias and Stutz, 2008).

이번 연구에서는 mRNA export 기작에 대한 전반적인 흐름을 밝히기 위해서 어댑터 단백질로 작용하는 Nab2와 기능적으로 관련이 있는 새로운 인자들을 찾고자 하였다. 이를 위해 유전학적 방법인 합성치사 돌연변이 (synthetic lethal mutants)를 선별하였다. *nab2* 유전자의 발현이 억제되는 조건에서 합성치사를 보이는 돌연변이체들을 선별하고 특성을 관찰하여 mRNA export 기작과 상관관계에 있는지 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 균주(strains)

본 실험에는 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe* 균주가 사용되었으며, 야생형(wild type, WT)인 AY217과 SP286을 비롯한 효모 균주에 관한 목록을 Table 1에 제시하였다.

실험에 사용된 벡터와 재조합 플라스미드의 증폭을 위한 형질 전환용 균주로는 *E. coli* Top10' (Invitrogen, USA)을 사용하였고, 이것의 유전자형에 대해 Table 2에 제시하였다.

2) 플라스미드(plasmids)

nmt 프로모터(Basi *et al.*, 1993; Maundrell, 1993)에 의해 발현이 조절되는 *nab2* 유전자를 subcloning하기 위해서 발현벡터인 pREP series(3X, 41X, 81X) 플라스미드를 사용하였고, 합성치사 돌연변이체 선별을 위한 모균주 제작에는 tagging 벡터인 pFA6a-3HA-kanMX6 플라스미드를 사용하였다.

3) 배지 및 배양조건

효모 균주의 배양을 위해서 EMM(Edinburgh minimal medium)과 PMG(Pombe Glutamate medium), YES(Yeast extract with supplements) 배지를 기본으로 사용하였으며, 고체배지에는 2% Bacto agar (BD, USA)를 첨가하였다(Table 3).

nmt 프로모터의 억제를 조절하기 위해 EMM과 PMG 배지에 15 μ M

thiamine(Sigma, USA)을 첨가하였고(Forsburg, 1993), *kan^r*(kanamycin 저항성) 유전자가 삽입된 균주를 선별하기 위해서는 YES 고체배지에 항진균제인 G418(Duchefa, Netherlands)을 100~200 mg/ℓ 첨가하였다. *nab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체의 선별을 위해서 PMG 고체배지에 5 mg/ℓ PhloxineB(Sigma, USA)와 15 μM thiamine을 첨가하였다. 균주들의 유전적 교배를 위해서 ME(Malt extract)와 SPAS 교배배지를 사용하였다.

실험에서 사용한 *S. pombe*의 유전학적 방법 및 세포배양 기술은 *S. pombe* 표준 방법 (Moreno *et al.*, 1991; Alfa *et al.*, 1993)에 기초하였으며 균주의 배양온도는 27°C를 유지하였다.

E. coli 배양에는 LB(Luria-Bertani) 배지에 항생제인 엠피실린(ampicillin)을 100 mg/ml 첨가하여 사용하였고 37°C에서 배양하였다 (Table 4).

4) 프라이머(primer) 및 염기서열 분석 (sequence analysis)

프라이머는 GC 비율을 40~60%로 맞추고 반복적인 AT 염기서열을 피해서, 0.02 μmol로 18~20 mer를 Genotech(대전, Korea)과 Sigma-Proligo(MO, USA)에 주문·제작하였다. 클로닝을 위한 제한효소 절단 부위가 삽입된 프라이머와 DNA의 삽입위치를 확인하기 위해서 사용한 프라이머들을 Table 5에 제시하였다.

Subcloning에 사용된 플라스미드 DNA의 염기서열을 확인하기 위한 sequencing은 Genotech(대전, Korea)에 의뢰하였다. Sequencing 결과는 European Bioinformatics Institute의 소프트웨어인 ClustalW2를 이용하여 Sanger Center (영국)의 *S. pombe* DNA 염기서열 데이터와 비교·분석하였다.

5) 효소

Subcloning 과정에서 제한효소 부위를 절단하기 위해 사용한 각종 제한효소들과 ligation에 사용된 T4 DNA ligase는 New England Biolabs (Hitchin, UK) 제품을 사용하였고, PCR을 통한 DNA 증폭에 이용한 Taq DNA polymerase는 TAKARA(Shiga, Japan) 제품인 pyrobest와 PrimeSTARTM HS DNA polymerase를 사용하였다.

6) 시약 및 재료

효모 배양에 사용된 시약 대부분은 BD(NJ, USA), Sigma(MO, USA), MP(Eschwege, Germany)의 제품이고, 전기영동을 위한 아가로스(agarose)는 BioRad(CA, USA)의 제품을 사용하였다.

합성치사 돌연변이 선별에 사용한 Nitrocellulose(NC) 필터(pore size : 0.45 μ m)는 Whatman(Kent, UK)과 BioRad(CA, USA) 제품을, Ethyl methanesulfonate (EMS)는 Sigma(MO, USA) 제품을 사용하였다.

유전체 DNA 분리와 PCR 산물 정제, Gel extraction을 위한 kit는 QIAGEN(Hilden, Germany) 제품을, 플라스미드 DNA preparation kit는 GeneAll(서울, Korea) 제품을 사용하였다.

cDNA 분리에 사용된 TRizol reagent는 Invitrogen(CA, USA), Reverse Transcription-PCR kit는 TAKARA(Shiga, Japan) 제품이다.

In situ Hybridization의 실험과정에 사용된 oligonucleotide(T₅₀)는 Genotech(대전, Korea)에서 주문·제작하였고, Anti-digoxigenin-fluorescein과 Dig oligonucleotide Tailing kit는 Roche(Mannheim, Germany) 제품을, 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)는 Sigma(MO, USA) 제품을 사용하였다.

Table 1. *S. pombe* strains used in this study

Strains	Genotype	Source
972	<i>h⁻</i>	P. Munz
AY217	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18</i>	Yoon <i>et al.</i> , (2000)
SP286	<i>h⁺/h⁺ leu1-32/leu-32 ura4-d18</i> <i>/ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216</i>	Matsumoto and Beach (1991)
Δ nab2	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnab2::kan^r</i>	This study
Δ nab2	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δnab2::ura4⁺</i>	Yoon (2009)
AY217/81X-Nab2	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18/pREP81X-Nab2</i>	This study
Δ nab2/3X-Nab2	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnab2::kan^r/pREP3X-Nab2</i>	This study
Δ nab2/41X-Nab2	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnab2::kan^r/pREP41X-Nab2</i>	This study
Δ nab2/81X-Nab2	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnab2::kan^r/pREP81X-Nab2</i>	This study
81X-Nab2(Integrated)	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 81X-Nab2::kan^r</i>	This study
81X-Nab2(Integrated)	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 81X-Nab2::kan^r</i>	This study

Table 2. *E. coli* Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
<i>E. coli</i> Top10'	F ⁻ ,mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC), 80lacZM15, lacX74, deoR, recA1, araD139, (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG	Invitrogen (USA)

Table 3. Medium composition for *S. pombe*

YES(Yeast Extract) Medium	
Yeast Extract (0.5%)	5 g/l
Supplements : 50 mg/l adenine, leucine, uracil	

ME(Malt Extract) Medium	
Malt Extract (3%)	30 g/l

SPAS mating Medium	
Glucose (1%)	10 g/l
KH ₂ PO ₄ (7.3mM)	1 g/l
Vitamins (1000×)	1 ml/l
* Agar : 3%	

EMM(Edinburgh Minimal Medium)	
Potassium hydrogen phthalate (14.7 mM)	3 g/l
Sodium phosphate dibasic (15.5 mM)	2.2 g/l
Ammonium chloride (93.5 mM)	5 g/l
Glucose (2%)	20 g/l
Salt (50×)	20 ml/l
Vitamins (1000×)	1 ml/l
Minerals (10,000×)	0.1 ml/l
Supplements : 255 mg/l adenine, leucine, uracil	

Table 3. Medium composition for *S. pombe* (continued)

PMG(Pombe Glutamate medium)	
Potassium hydrogen phthalate (14.7 mM)	3 g/ℓ
Sodium phosphate dibasic (15.5 mM)	2.2 g/ℓ
L-glutamic acid, monosodium salt	3.75 g/ℓ
Glucose (2%)	20 g/ℓ
Salt (50×)	20 ml/ℓ
Vitamins (1000×)	1 ml/ℓ
Minerals (10,000×)	0.1 ml/ℓ
Supplements : 255 mg/ℓ adenine, leucine, uracil	
* PhloxineB (Sigma, USA) : 5 mg/ ℓ	

50× Salt stock	
MgCl ₂ .6H ₂ O (0.26 M)	52.5 g/ℓ
CaCl ₂ .2H ₂ O (4.99 mM)	0.735 g/ℓ
KCl (0.67 M)	50 g/ℓ
Na ₂ SO ₄ (14.1 mM)	2 g/ℓ

1000× Vitamin stock	
Pantothenic acid (4.20 mM)	1 g/ℓ
Nicotinic acid (81.2 mM)	10 g/ℓ
Inositol (55.5 mM)	10 g/ℓ
Biotin (40.8 μM)	10 mg/ℓ

Table 3. Medium composition for *S. pombe* (continued)

10,000× Mineral stock	
Boric acid (80.9 mM)	5 g/ℓ
MnSO ₄ (23.7 mM)	4 g/ℓ
ZnSO ₄ .7H ₂ O (13.9 mM)	4 g/ℓ
FeCl ₂ .6H ₂ O (7.40 mM)	2 g/ℓ
Molybdic acid (2.47 mM)	0.4 g/ℓ
KI (6.02 mM)	1 g/ℓ
CuSO ₄ .5H ₂ O (1.60 mM)	0.4 g/ℓ
Citric acid (47.6 mM)	10 g/ℓ

Table 4. Medium composition for *E. coli*

LB(Luria-Bertani) Medium	
NaCl (1%)	10 g/ℓ
Tryptone (1%)	10 g/ℓ
Yeast extract (0.5%)	5 g/ℓ

Table 5. Oligonucleotide primer used in this study

Oligo Name	Sequence (5' → 3')
Nab2-1	GAT CAT CAT CGT GTG AAG AC
Nab2-2	ACA TAT AGC CAG TGG GAT TTG TAG CTA GTC ATG TTG TTG GTT TAC AGT CA
Nab2-3	GGT GTT GGA ACA GAA TAA ATT AGA TGA ACA ACT TCA TGT TCC TTC TGT GT
Nab2-4	CTG TAT CAT TAG CCT CGT CA
Nab2-5	CTA CGA GGA CTA CGA GAA GA
Nab2-6	AAC TCG TTG CCC TCA AAC TG
Nab2-7	GCA CTC GAG ATG ACT ACA TTA CTG GAA AC
Nab2-8	GCT GGA TCC TTA CAC AGA AGG AAC ATG AA
Nab2-9	ATT GAG CTC GAA GAG ACG AAG GAT CA
Nab2-10	GTG CTC GAG ATA ATT AGA AGA CTT TAG
Nab2-11	TCG TAC AGC TGA TTT AGG TG
Nab2-12	GCA GTC GAC CAA CTT CAT GTT CCT TCT G
Nab2-13	CCT CTG CAG TCA TGT TGT TGG TTT ACA G
Nab2-14	CAC GAA TTC CTT GCA CCT ATA TCC
Nab2-15	GTG AGA AGC TAG TAT CAA
Nab2-16	TGC TCA TCC GAC ACC AGC
Nab2-17	TCA GTC GAC GAA TTC AAC GAC GAC TTG AT
Nab2-18	GCG TTA ATT AAC AAC TTC ATG TTC CTT CTG
Nab2-19	TAC TGG ATG GTT CAG TCA
Nab2-20	ATC GTA ATA TGC AGC TTG
Kan-2	CGC ACG TCA AGA CTG TCA AGG AG
Kan-4	GCA GTT TCA TTT GAT GCT CGA TG

2. 실험방법

1) 효모 유전체(genomic) DNA 분리

효모를 적정 액체배지 10 ml에서 정체기까지 배양하였다(27℃, 1~2일). 배양액을 3,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 효모 세포를 수확하고, 등장액인 SCE(1.2 M Sorbitol, 50 mM Citrate phosphate, 40 mM EDTA, pH5.6)로 세척한 후 1.5 ml micro tube로 옮겼다. 화학적 방법으로 세포벽을 파괴하기 위해서 Spheroplast buffer (2.5 mg Zymolase-20T/ml, in SCE)를 37℃에서 30~60분간 처리하였다. Zymolase의 처리로 인해서 세포벽이 파괴되었는지 확인하기 위해 슬라이드 위에 Spheroplast buffer를 처리한 배양액과 10% SDS를 섞어 현미경 관찰을 하였다.

세포가 터진 것이 확인되면 원심분리하여 상층액을 제거하고 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 염색체 DNA를 분리하였다. 효모 세포에 buffer AP1(1.0~2.5% edetic acid, 1.0~2.5% sodium dodecyl sulphate)과 RNase A(100 mg/ml)를 65℃에서 10분간 처리한 후, buffer AP2(10~25% acetic acid)를 첨가하여 4℃ 이하에서 5분간 보관하였다. 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액만을 QIAshredder Mini Spin Columns에 옮기고, 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 columns에서 걸러진 액체 (여과액)을 buffer AP3(50 ~ 100% guanidinium chloride), 에탄올과 혼합하여 DNeasy Mini Spin Columns에 옮긴 다음 8,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. Buffer AW(Ethanol)를 첨가하여 8,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 DNeasy Mini Spin Columns을 2회 세척하고 buffer AE로 elution하였다(8,000 rpm, 1분).

2) 효모 cDNA 분리

① Total RNA 분리

야생형인 972(h^-), 975(h^+) 균주들을 10 ml의 액체배지에서 접종하여 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ cell/ml로 배양한 다음, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 에서 6,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 수확하고 멸균된 증류수로 세척하였다. 멸균된 증류수 1 ml로 세포를 풀어 1.5 ml micro tube로 옮기고 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 1 ml의 TRizol reagent (phenol + guanidine isothiocyanate)를 200 μl 씩 첨가하면서 멸균된 막대로 갈아준다. $15 \sim 30^\circ\text{C}$ (상온)에서 5분간 보관하고 단백질을 제거를 위해 200 μl 의 chloroform (TRizol의 20% volume)을 첨가하였다. 15초간 vortexing하여 상온에서 2~3분간 보관하고, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 RNA를 포함한 수용액 층만을 새로운 micro tube에 옮겼다. Isopropyl alcohol 500 μl (TRizol 50% volume)를 첨가하여 섞은 다음 상온에서 10분간 보관하였다. $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 75% 에탄올(in DEPC-treated water) 1 ml(TRizol과 동량)을 첨가하고 vortexing한 다음 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 에서 7,500 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 RNA pellet을 5~10분간 건조시킨 후 DEPC-treated water (RNase-free)에 녹인 다음 전기영동으로 확인하였다.

② RT-PCR

Total RNA 분리를 통해 얻은 RNA를 주형으로 사용하여 Reverse Transcription (RT) - PCR을 수행하였다(TaKaRa, Japan). RT를 위해서 RNA 주형 ($\leq 1 \mu\text{g}$, 8 μl 이하)과 10 mM dNTP mixture, 2.5 μM Oligo

dT 프라이머를 혼합하여 65℃에서 5분, 4℃에서 2분 이상 반응시켰다. 반응 효율을 높이기 위해 5× RT 버퍼 용액과 RNase Inhibitor, RTase를 첨가하고 30℃에서 10분, 50℃에서 30분, 95℃에서 5분간을 반응시킨 다음 4℃에서 보관하였다.

Reverse Transcription을 수행한 결과 1st strand cDNA가 합성되었고, 인트론이 제거된 cDNA 형태인 *nab2*의 ORF를 증폭하여 얻기 위해서 일반적인 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) 과정을 수행하였다.

3) *E. coli*의 형질전환(transformation)

*E. coli*의 형질전환은 CaCl₂ 방법(Sambrook and Russell, 2001)을 사용하였다. *E. coli* competent 세포를 재조합 플라스미드 (competent 세포의 10% 이하의 volume)와 혼합하여 4℃ 이하에서 30분간 보관하였다. 42℃에서 40초간 heat shock을 준 다음 4℃ 이하에서 1분간 cold shock을 주었다. 재생을 위해 competent 세포액의 10배에 해당하는 LB 액체배지를 첨가하였고, 37℃에서 30~60분간 보관하였다. *E. coli* 세포를 LA 고체배지에 평판하여 37℃에서 20시간 정도를 배양하였다.

4) *S. pombe*의 형질전환(transformation)

*S. pombe*의 형질전환은 Lithium Acetate 방법 (Warbrick *at al*, 1993)을 이용하여 수행하였다. 효모 세포를 10 ml의 적정 액체배지에 접종하고, 50 ml 액체배지에 계대배양하여 0.5~1×10⁷ cell/ml가 되도록 27℃를 유지하여 16~20시간 배양하였다. 배양액을 수확하여 10 ml의 멸균된 증류수로 세척하고, 1.5 ml micro tube에 옮겨서 1 ml의

1×TE/LiAc(0.1 M Lithium Acetate, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)로 세척한 뒤 다시 1×TE/LiAc로 $1\sim 2\times 10^9$ cell/ml이 되도록 4℃ 이하에서 세포를 풀어주었다. Competent 세포를 100 μ l 분주하여 100 ng 이상의 형질전환용 DNA (백터 DNA 3 μ l, knock out된 DNA 조각 5 μ l 정도 사용)와 같은 양의 carrier DNA (10 mg/ml salmon sperm DNA)를 첨가하고, 마지막으로 50% PEG (50% Polyethylene glycol4000 in TE-LiAc)를 competent 세포액 양의 3배만큼 첨가하였다.

Shaking incubator에서 27℃를 유지하여 30분간 배양하고 42℃에서 10분간 heat shock을 준 다음 수확하여 PEG를 비롯한 상층액을 제거하였다. 선별배지에 멸균된 bead로 평판하여 27℃에서 배양하였다(PMG 배지의 경우 4일간).

5) 돌연변이 유발 (mutagenesis)

효모를 10 ml의 적정 액체배지에 접종하고 50 ml에 계대배양하여 5×10^6 cell/ml이 되도록 27℃에서 20시간 배양하였다. 배양액을 3,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 수확하고, 8×10^7 cell/ml가 되도록 액체배지로 풀어주었다. 30~40%의 생존율을 보이는 돌연변이원인 Ethyl methanesulfonate (EMS)의 농도와 처리시간에 대한 조건을 파악하고, 실험을 수행한 뒤 shaking incubator에서 27℃를 유지하여 배양하였다.

멸균된 증류수로 3회 세척하여 돌연변이원을 제거한 다음 1,500 cell/plate로 적정배지에 평판하였다. 콜로니가 1~2 mm 정도의 크기로 자라면 합성치사를 보이는 돌연변이체를 찾기 위해 phloxineB와 thiamine(비타민B₁)을 첨가한 배지에 replica plating 하였다. 다시 5~6시간을 배양한 후 thiamine을 첨가하지 않은 배지에 한번 더 replica plating하였다.

6) 무작위 포자 분석 (Random spore analysis)

h^- 균주를 얻어서 유전적 교배를 시킬 수 있도록, 합성치사 돌연변이 선별에 사용한 모균주(h^+ 균주)와 AY217(h^- 균주)을 ME 배지에서 멸균된 증류수로 섞어서 27°C에서 2~3일간 배양하였다. 멸균된 증류수 1 ml에 glucosylase 5 μ l(10,000 units/ml)를 첨가하여 포자가 형성된 세포를 풀어준 다음, 27°C에서 6시간 이상을 배양하였다. 멸균된 증류수로 3회 세척한 후 포자 수를 $10^2 \sim 10^3$ 개로 맞추어 선택배지에 평판하고 27°C에서 5일간 배양하였다.

7) Spot assay for growth

효모를 10 ml 적정 액체배지에서 정체기까지 배양한 다음, 10배 간격으로 연속희석(serial dilution, $2.4 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^7$ cell/ml) 하였다. 적정 고체배지 위에 각 농도마다 4 μ l씩 따서 일정한 간격으로 spotting하고, 27°C에서 4~5일간 배양하였다.

8) *In situ* Hybridization

효모를 50 ml 액체배지에서 $2 \sim 4 \times 10^6$ cell/ml로 배양하여 30% formaldehyde(30% Paraformaldehyde, 10 N NaOH, PBS, pH7.5) 6 ml을 처리하여 27°C에서 45분간 고정시킨다. 0.3 M Glycine + PBS로 3회 세척하고 1×10^7 cell/ml이 되도록 spheroplast buffer로 세포를 풀어준 다음, 37°C에서 45~60분간 배양하였다. 현미경 관찰을 통해서 세포가 잘 깨졌는지를 확인하고, 4°C에 보관한 SCE(2 M Sorbitol, 1 M EDTA, 2 M NaH_2PO_4 , 2 M Sodium citrate) 20 ml로 세척한 후 poly-lysine이 처리된 슬라이드에 SCE로 풀어준 세포를 4°C에서 2시간 동안 가라앉게 하였다. 슬라이드를 메탄올에 담가두고 -20°C를 유지하여 2시간 보관한 다음,

메탄올이 제거되도록 상온에 보관하였다. 2×SSC (20×SSC : 0.3M Na₃citrate, 3 M NaCl, pH7.0)로 세척하고 10 μl의 hybridization solution(20×SSC, 50% Dextran sulfate, 2% BSA, 20 mM vanadyl complex, 1mg/ml tRNA, oligo dT50-dig)을 첨가하여 coverglass를 덮은 다음, 37℃에서 7시간 이상 보관하였다. 슬라이드를 2×SSC에 담귀서 5분간 상온에 보관하고, 2×SSC로 20분간 세척한 다음 또 다시 37℃에서 20분씩 2회 세척하였다. Fluorescine-Antidigoxigenin Antibody solution (1 M Tris pH7.5, 5 M NaCl, 2% BSA, 200 μg/ml Anti-digoxigenin-fluorescein, 10% Triton X-100)을 10 μl 처리하여 coverglass를 덮은 후 37℃에서 1시간 배양하였다. 2×SSC로 15분씩 2회 세척하고 상온에서 말린 다음 DAPI mounting medium (1 mg/ml DAPI, 10 mg/ml Antifade, PBS, glycerol)을 12 μl 첨가하여 coverglass를 덮고 밀봉한 다음 형광현미경으로 signal을 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. *nab2* 결실돌연변이주의 제작 및 분석

*S. pombe*에서 *nab2* 유전자를 *kan^r*으로 결실시킨 결실돌연변이균주 (deletion mutant)를 제작하였고, 다음 실험과정에 사용하기 위해 그 특성을 분석하였다.

*spnab2*의 open reading frame (ORF) 부분을 선택 표지자 (selectable marker)인 *kan^r* 유전자로 대체시키기 위해서 Double Joint PCR (DJ-PCR) 방법을 사용하였다(Yu *et al.*, 2004). *spnab2*를 대체시킬 표지자를 포함한 construct를 만들기 위해 3번의 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하는데, 첫 번째 PCR에서는 *spnab2*의 5' flanking과 3' flanking 부위, 그리고 표지자인 *kan^r* 유전자를 각각 증폭시켰다. 5' flanking과 3' flanking 부위는 *spnab2* ORF의 앞·뒤로 1 kb 정도를 표지자의 말단이 포함된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 전기영동을 통해 PCR 생성물을 확인하고 DNA를 정제하였다. 두 번째 PCR은 첫 번째 PCR에서 얻은 생성물인 5' flanking 부위, 표지자, 3' flanking 부위의 DNA 농도 비율을 1 : 3 : 1로 혼합하여 수행하였다. 세 번째 PCR은 두 번째 PCR 생성물을 주형으로 사용하여 5' flanking 부위와 표지자(*kan^r*), 3' flanking 부위가 융합된 knockout construct를 증폭하여 얻었다. 이렇게 제작한 DNA 단편(Fig. 1A)을 반수체인 AY217과 이배체인 SP286 균주에 형질전환시킨 후, 항진균제인 G418을 첨가한 배지에서 자라는 형질전환체를 얻었다. 이렇게 얻은 형질전환체 중에서 상동재조합(homologous recombination)에 의해 *spnab2* 유전자만이 결실된 균주를 PCR로 확인하여 선별하였다.

선행연구에서 이미 이배체인 SP286에서 하나의 *spnab2* 유전자를 *ura4⁺*로 결실시켜 사분체 분석 (tetrad analysis)를 수행한 결과 생장에 필수적이지 않음을 밝힌바 있다.

본 연구에서는 반수체인 AY217에서 1.0 kb의 *spnab2* 유전자를 1.6 kb인 *kan^r*으로 결실시킨 돌연변이균주의 성장속도는 예상대로 야생형(WT)인 AY217과 거의 차이가 없었다(Fig. 1B).

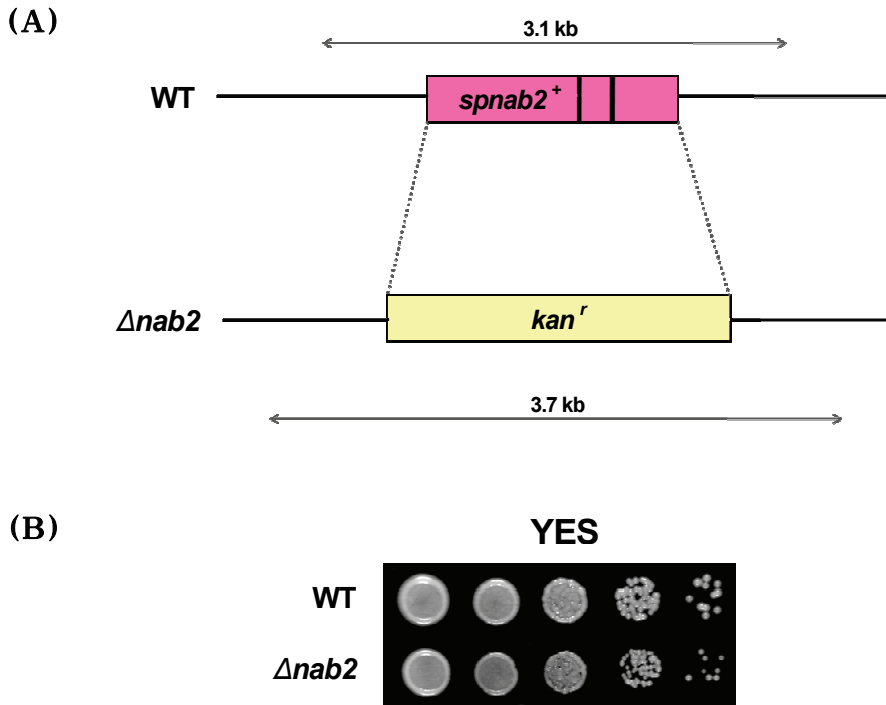


Fig. 1. Construction of *nab2* deletion mutants.

(A) Schematic diagram representing construct of *spnab2* null allele in *S. pombe*. Most of *spnab2* open reading frame (ORF) region was substituted with maker gene, *kan^r*, by one-step disruption method. *spnab2* ORF is represented by open box and two introns are denoted by thick lines.

(B) Growth of $\Delta nab2$ knockout mutant and wild type. Wild type and *spnab2* disrupted cells were spotted in 10-fold serial dilutions onto YES plate and incubated for 5 days at 27°C.

2. *nab2* 유전자의 과발현(over-expression)

spnab2 유전자가 없어도 *S. pombe*의 성장에는 영향을 미치지 않았으므로, *spnab2*의 발현양이 증가하면 성장속도에는 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. *spnab2* 유전자의 발현을 조절하기 위해서 thiamine(비타민B₁)에 의해 발현이 조절되는 *nmt(no message in thiamine)* 프로모터를 가진 발현벡터인 pREP81X를 이용하였다. 이 벡터에는 *nmt* 프로모터의 TATA box에 돌연변이를 일으켜 야생형의 *nmt* 프로모터보다 약한 프로모터를 가지고 있다.

야생형인 AY217과 결실돌연변이주인 $\Delta nab2::kan^r$ 에 형질전환시키기 위한 재조합 플라스미드를 제작하였다. PCR을 통해 Nab2 단백질을 암호화하는 *spnab2* 유전자의 ORF를 증폭하기 위해서 *Xho*I 인식부위를 첨가한 프라이머와 *Bam*H I 인식부위를 첨가한 프라이머를 사용하였다. 증폭한 DNA 단편과 pREP81X를 제한효소인 *Xho*I 과 *Bam*H I 으로 절단한 뒤 ligation하였다. 이렇게 제작한 pREP81X-Nab2 재조합 플라스미드를 얻기 위해 *E. coli*에 형질전환하였고, 플라스미드를 분리하여 제한효소 절단 분석과 DNA 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

이렇게 제작한 pREP81X-Nab2 플라스미드를 야생형인 AY217과 결실돌연변이주인 $\Delta nab2::kan^r$ 에 각각 형질전환하였다. *spnab2* 유전자의 ORF는 유전체 DNA와 cDNA를 모두 사용하였으며 그에 따른 성장속도 차이를 알아보았다.

돌연변이주의 성장속도를 야생형과 비교하기 위해 spot assay를 수행하였으며, 그 결과 AY217에 pREP81X-Nab2으로 *spnab2* 유전자를 과발현시킨 균주는 대조균으로 사용한 균주인 AY217/pREP81X(empty vector)보다 *spnab2* 유전자가 유전체 DNA인 경우에 10²~10³배 정도

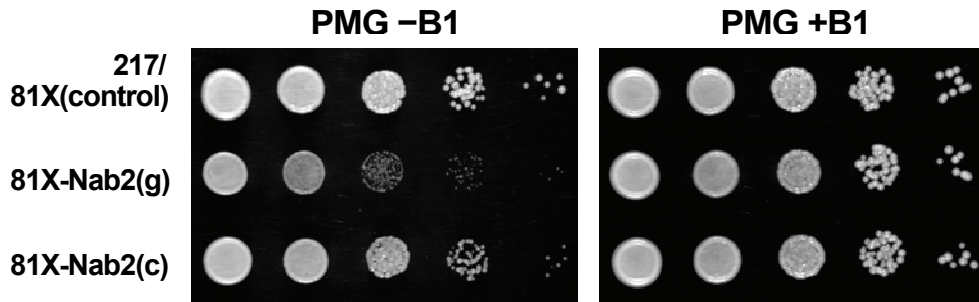
생장속도가 느렸으며 cDNA일 경우에는 1~10배 정도 성장속도가 느렸다. 하지만 thiamine으로 *spnab2* 유전자의 발현을 억제시켰을 경우에는 유전체 DNA와 cDNA 모두에서 대조군과 비슷한 성장속도를 보였다(Fig. 2A).

결실돌연변이주인 $\Delta nab2::kan^r$ 에 pREP81X-Nab2를 형질전환시킨 균주에서는 대조군인 $\Delta nab2::kan^r$ /pREP81X(empty vector)와 같은 성장속도를 보였는데 thiamine으로 억제시켰을 때보다 *spnab2* 유전자를 과발현시켰을 때 10배 정도 느린 성장속도를 나타내었다(Fig. 2B).

이러한 실험결과를 분석하였을 때 *spnab2* 유전자를 과발현시킬수록 생장이 느려진다는 것을 알 수 있었다. 실험에 사용한 균주의 *spnab2* 유전자 발현양은 AY217/pREP81X-Nab2 > $\Delta nab2::kan^r$ /pREP81X-Nab2 > AY217 > $\Delta nab2::kan^r$ 의 순서로 볼 수 있으며 가장 많이 과발현시킨 AY217/pREP81X-Nab2의 성장속도가 가장 느렸다. 흥미로운 것은 인트론이 제거된 cDNA의 *spnab2* 유전자는 유전체 DNA에 비해 과발현에 대한 영향이 상대적으로 적게 나타난 것이다. 그리고 Fig. 2B에서 대조군으로 사용한 $\Delta nab2::kan^r$ /pREP81X(empty vector)은 *spnab2* 유전자가 발현되지 않는데, PMG -B₁과 PMG + B₁에서 성장속도 차이를 보이는 것은 thiamine이 없는 배지에서는 생장에 필요한 thiamine을 자체적으로 합성해야 하기 때문이다.

spnab2 유전자가 과발현된 균주의 성장속도가 느리다는 사실을 통해서 *spnab2* 유전자가 야생형에 비해 조금이라도 과발현되면 생장이 억제된다는 것을 알 수 있었다.

(A)



(B)

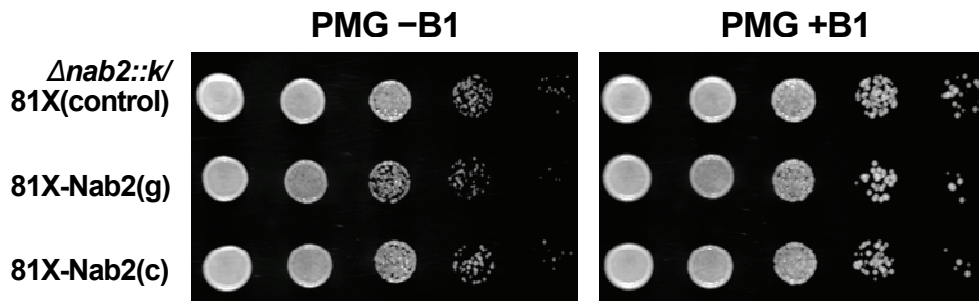


Fig. 2. Growth test for *nab2* over-expression strains.

(A) Growth of wild type (AY217) transformed with empty vector, 81X-Nab2(genomic DNA), and 81X-Nab2(cDNA). Strains were monitored by spot assay for 5 days in repressed(+B₁) or over-expressed(-B₁) conditions.

(B) $\Delta nab2$ knockout mutants transformed with empty vector, 81X-Nab2(genomic DNA), and 81X-Nab2(cDNA) were spotted in 10-fold serial dilutions onto PMG plate in the absence of thiamine (-B₁) or in the presence of thiamine (+B₁) and incubated for 5 days at 27°C.

3. 합성치사 돌연변이체 선별을 위한 모균주 제작

mRNA export에 어댑터 단백질로써 작용하는 Nab2와 기능적으로 관련이 있는 새로운 인자, 즉 기능을 알고 있는 *spnab2* 유전자로부터 기능이 아직 밝혀지지 않은 새로운 유전자를 찾기 위해 유전학적 방법인 합성치사 돌연변이체 (synthetic lethal mutant) 선별을 수행하기로 하였다.

기능적으로 관련된 두 유전자 중에서 하나에만 돌연변이가 일어났을 때는 생장에 영향이 없지만, 두 유전자 모두에 돌연변이가 일어나면 세포가 죽어버리는 것을 합성치사(synthetic lethality)라고 한다(Fig. 3). 이처럼 두 유전자 모두에 돌연변이가 일어나면 세포가 죽기 때문에 돌연변이체를 얻을 수 없으므로, *spnab2* 유전자의 발현을 조절할 수 있는 *nmt* 프로모터를 이용하여 thiamine이 첨가된 배지에서는 *spnab2*의 발현이 억제된 상태에서 합성치사를 보이는 돌연변이체를 찾고자 하였다.

합성치사 돌연변이체를 선별하기 위해서는 모균주가 필요한데, 앞에서 제작한 재조합 플라스미드인 pREP81X-Nab2를 AY217 또는 $\Delta nab2::kan^r$ 균주에 형질전환시켜, 플라스미드에서 *spnab2* 유전자가 발현되는 균주는 과발현의 영향으로 이미 생장에 문제가 있으므로 합성치사 돌연변이체를 선별하는데 혼동을 줄 수 있다. 즉, AY217/pREP81X-Nab2 또는 $\Delta nab2::kan^r$ /pREP81X-Nab2 균주는 합성치사 돌연변이 선별을 위한 모균주로 사용하기에는 적합하지 않았다.

따라서 *spnab2* 유전자의 발현 수준을 낮추면서 thiamine으로 발현을 억제할 수 있는 *nmt* 프로모터를 가진 균주를 제작하게 되었다. 염색체 DNA의 *spnab2* 유전자가 *nmt* 프로모터에 의해 발현이 조절되는 균주 즉, *Pnmt-nab2* 형태로 삽입된 균주를 제작하였다. 먼저 pREP81X에 *nab2*의

ORF를 클로닝한 재조합 플라스미드인 pREP81X-Nab2를 제한효소 *Sac*I 과 *Pst*I 으로 절단하였다. 염색체에 상동재조합(Homologous recombination)에 의해 *Pnmt-nab2*를 삽입하기 위해, *Pst*I 과 *Eco*R I 의 인식부위를 첨가한 5' flanking 부위 (0.9 kb)를 PCR로 증폭시킨 후 *Pst*I 과 *Eco*R I 으로 제한효소 처리하였다. Tagging 벡터인 pFA6a-3HA-kanMX6를 *Sac*I 과 *Eco*R I 으로 절단하여 *Pnmt-nab2* 단편과 5' flanking 부위를 클로닝 하였다. 이렇게 얻은 재조합 플라스미드를 제한효소 *Pvu*II와 *Sal*I 으로 절단하여 *Pvu*II와 *Sal*I 의 인식부위를 첨가한 3' flanking 부위 (1.56 kb)를 클로닝하였다. 최종적으로 얻은 재조합 플라스미드를 *Eco*R I 으로 절단하여 염색체에 삽입할 DNA 절편 (7.2 kb)만을 아가로즈 젤에서 분리하여 AY217 또는 $\Delta nab2::ura^+$ 균주에 형질전환하였다(Fig. 4).

이렇게 제작한 81X-Nab2 삽입 균주의 성장속도를 AY217과 $\Delta nab2::kan^r$ 를 대조균으로 사용하여 YES 배지에서 spot assay를 통해 관찰하였다(Fig. 5A). 그 결과 야생형인 AY217과 $\Delta nab2::kan^r$ 그리고 81X-Nab2 삽입 균주의 성장속도에는 거의 차이가 없는 것을 확인하였다.

Thiamine으로 *nmt* 프로모터를 억제하여 *nab2* 유전자의 발현을 억제하였을 때는 성장속도에 어떠한 영향이 있는지 PMG 배지에서 spot assay를 통해 관찰하였다(Fig. 5B). 대조균으로 사용한 $\Delta nab2::kan^r$ 과 81X-Nab2의 형태로 삽입된 균주의 성장속도에는 차이가 없다는 것을 알 수 있었다.

따라서 81X-Nab2 삽입 균주를 합성치사 돌연변이 선별을 위한 모균주로 선택하였다.

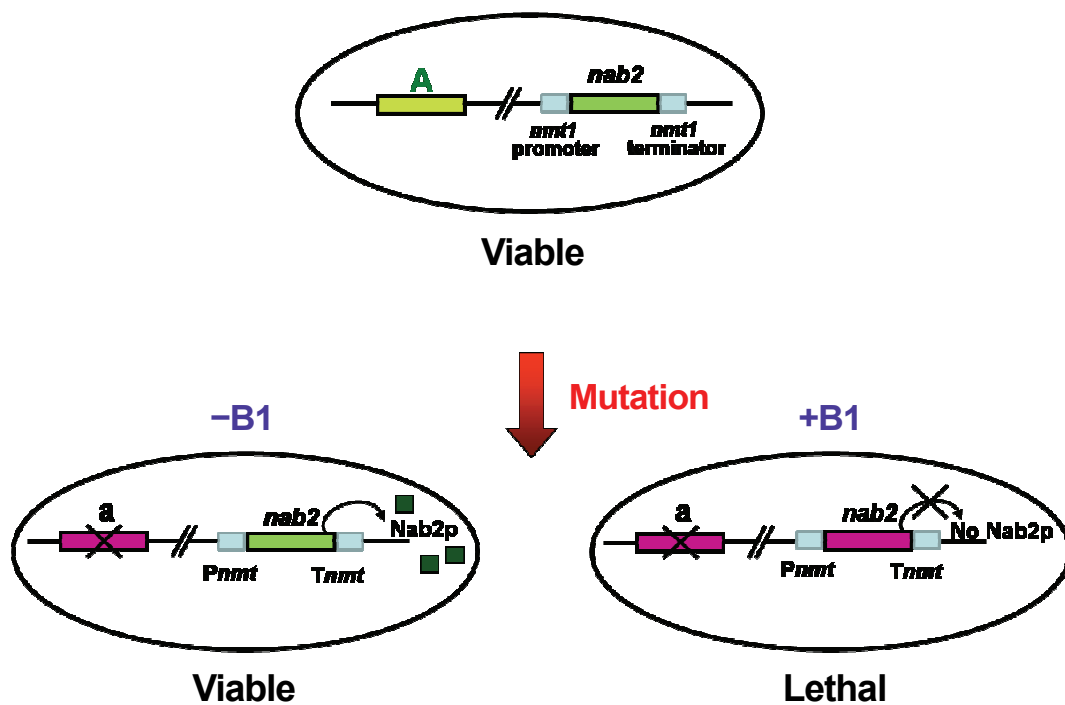


Fig. 3. Schematic diagram of synthetic lethality.

Schematic diagram representing synthetic lethal screening with *nab2* null allele in *S. pombe*. Synthetic lethal mutants were kept viable by the expression of the *nab2* gene from a 81X-Nab2 integrated chromosomal DNA under the control of a weak, thiamine-repressible, *nmt* promoter (*Pnmt*) in the absence of thiamine (-B₁). In the presence of thiamine (+B₁), the expression of *nab2* is repressed, resulting in an inhibition of growth (Lethal).

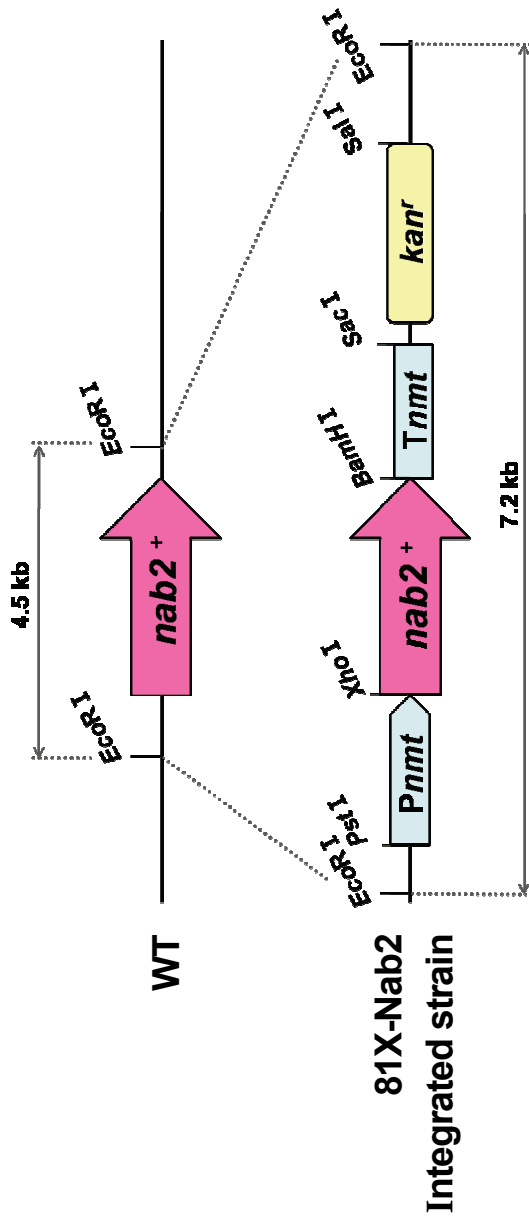
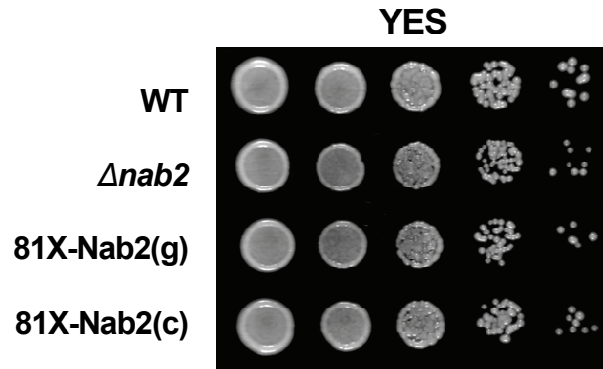


Fig. 4. Construction of 81X-Nab2 Integration.

(A)



(B)

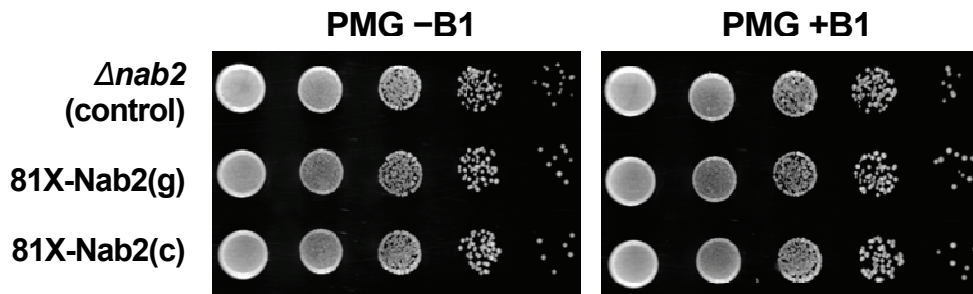


Fig. 5. Growth test for 81X-Nab2 integrated strains.

(A) Growth of wild type (AY217) and $\Delta nab2$ knockout mutant, 81X-Nab2(genomic DNA) integrated strain, and 81X-Nab2(cDNA) integrated strain. Control and 81X-Nab2 integrated strains were spotted in 10-fold serial dilutions onto YES plate and incubated for 5 days at 27°C. (Control: AY217, $\Delta nab2$)

(B) Control($\Delta nab2$ knockout mutant) and 81X-Nab2 integrated strains were spotted in 10-fold serial dilutions onto PMG plate in the absence of thiamine (-B₁) or in the presence of thiamine (+B₁) and incubated for 5 days at 27°C.

4. *nab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체 선별 및 분석

합성치사를 보이는 돌연변이체를 선별하기 위해서 돌연변이원 (mutagen)인 Ethyl methanesulfonate (EMS)로 돌연변이 유발 (mutagenesis) 실험을 수행하였다. 돌연변이원을 처리하였을 때 30~40%의 생존율을 보일 때가 돌연변이 균주를 선별할 확률이 높다는 선행 연구를 근거로 EMS 농도와 처리시간에 따라 생존율을 조사하였다.

모균주인 81X-Nab2 삽입 균주를 3% EMS로 처리하여 0~4시간 까지 1시간 단위로 생존율을 파악하였다. 그 결과 3% EMS로 1시간 처리하였을 경우에는 평균 72%의 생존율을 보였고, 2시간은 평균 34%, 3시간은 평균 25%, 4시간은 평균 12%의 생존율을 나타내었다.

따라서 3% EMS로 돌연변이 유발을 실시하였고, 27°C의 진탕 배양기에서 2시간 처리한 뒤 PMG 배지에 멸균된 bead를 이용해서 평판(spreading)하였다. 배양기에서 27°C로 4일간 배양한 뒤 콜로니가 1~2 mm 정도로 자라면, 합성치사를 보이는 돌연변이체를 찾기 위해 먼저 thiamine(비타민B₁)을 첨가한 PMG 배지에 NC필터를 이용하여 replica plating하였다. 그리고 다시 5~6시간을 배양한 후 thiamine을 첨가하지 않은 PMG 배지에 한번 더 replica plating하였다. 합성치사를 보이는 돌연변이 균주를 좀 더 쉽게 선별하기 위해 죽은 세포에 축적되는 염료인 phloxineB를 배지에 첨가하여 5일간 배양하였다. PhloxineB와 thiamine을 모두 첨가한 배지(PMG+ B₁+ PhloxineB)에서 *nmt* 프로모터에 의해 조절되는 *spnab2* 유전자는 thiamine에 의해서 발현이 억제된다. 그러므로 *spnab2* 유전자와 관련된 어떤 유전자에 합성치사 돌연변이가 일어났다면, 세포는 생장을 멈추게 되고(콜로니 크기는 1mm보다 작음), phloxineB가 축적되어 진한 붉은색을 나타낸다.

하지만 thiamine이 없는 배지에서는 *spnab2*와 관련된 유전자에 합성치사 돌연변이가 생겼더라도 *spnab2* 유전자가 발현되므로 세포는 정상적으로 성장하여 콜로니 크기는 커지며, 정상적으로 phloxineB를 배출하여 연한 분홍색을 나타내게 된다.

이러한 방법으로 693,000개의 콜로니를 분석하여 가능성을 보이는 64개의 콜로니를 1차적으로 선별하였다. 이 중 모균주로 81X-Nab2 (유전체 DNA) 삽입 균주를 이용한 경우에는 42개, 81X-Nab2(cDNA) 삽입 균주인 경우에는 22개였다. 이렇게 선별된 균주들을 thiamine이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에 다시 한 번 각각 streaking하여 성장을 확인한 결과 2차로 유력한 균주를 5개 선별하였다. 2차로 선별한 균주는 SLnab1 ~ 5로 명명하였으며 보다 정확한 성장속도를 확인하기 위해 spot assay를 수행하였다.

Spot assay는 모균주인 81X-Nab2(유전체 DNA) 삽입 균주를 대조군으로 사용하였으며, 2차로 선별한 SLnab1 ~ 5 돌연변이체와 성장속도를 비교하였다(Fig. 6). PMG 배지에서 5일간 배양한 결과 thiamine으로 *spnab2* 유전자 발현을 억제하였을 때 성장에 문제가 있는 균주는 SLnab1, SLnab2, SLnab3이었으며 특히 SLnab2는 가장 심한 성장결함을 보였다. 즉, *spnab2* 유전자의 발현이 억제되었을 때 SLnab2는 $10^3 \sim 10^4$ 배 정도 생장이 느렸고 SLnab1과 SLnab3은 $10^2 \sim 10^3$ 배 느리게 나타났다. *spnab2* 유전자를 억제했을 때 모균주와 같은 성장속도를 보인 SLnab4, SLnab5는 합성치사 돌연변이체로 보기 어려웠다.

한편, 광학현미경으로 SLnab1 ~ 3 세포들의 형태학적 특징을 살펴보았을 때, SLnab1은 모균주와 비교해서 그 길이가 비정상적으로 길었다. SLnab2와 SLnab3는 정상에 비해서 약간 길쭉한 형태를

나타내었고, SLnab1은 배양하는 과정 중에 역돌연변이(revertant)가 많이 관찰되었으며 SLnab2는 정상적인 세포와는 다르게 세포들끼리 뭉쳐진 형태를 보였다.

이렇게 *spnab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체로 3개의 균주 (SLnab1 ~3)를 최종적으로 선별하였다.

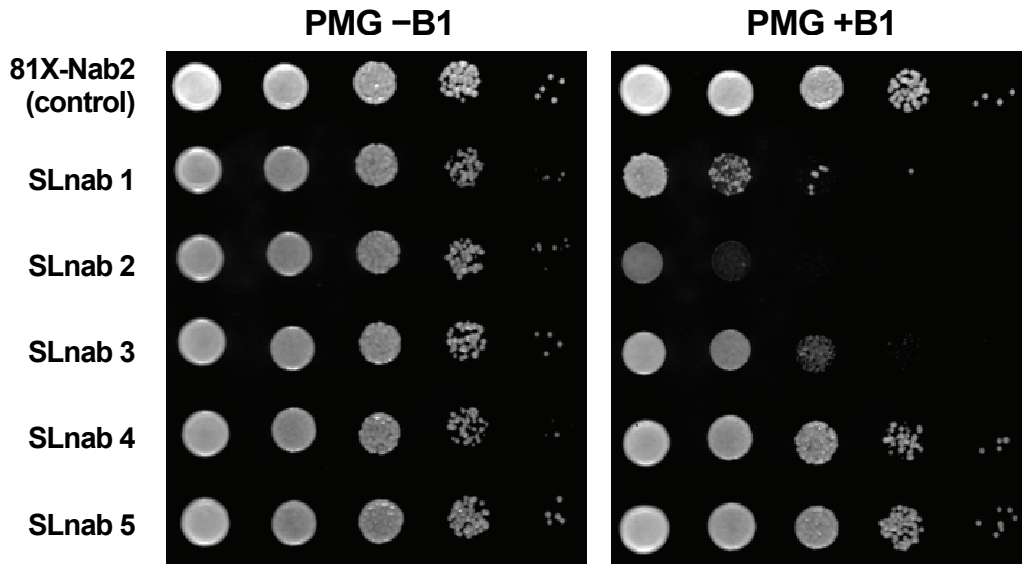


Fig. 6. Growth test for synthetic lethal mutants.

Control (81X-Nab2 integrated strain) and synthetic lethal mutants were spotted in 10-fold serial dilutions onto PMG plates in the absence of thiamine (-B₁) or in the presence of thiamine (+B₁) and incubated for 5days at 27°C. Synthetic lethal mutants showed growth defect on PMG medium with thiamine (+B₁).

5. 선별한 돌연변이체의 mRNA export 결함 조사

합성치사 돌연변이체로 가장 유력해 보이는 3개의 균주 SLnab1 ~ 3에 대한 poly(A)⁺ RNA의 분포를 조사하여 선별한 돌연변이체들이 mRNA export에 관여하는지를 알아보았다. 즉, *In situ* Hybridization을 통해 mRNA의 분포를 확인함으로써 mRNA export가 정상적인지 아닌지를 분석하였다(Fig. 7).

mRNA export가 정상적인 세포에서는 mRNA가 단백질로 발현되기 위해 세포질로 이동하므로 poly(A)⁺ RNA의 분포는 세포 전체에 균일하게 나타난다. 하지만 mRNA export가 정상적이지 않은 세포에서는 mRNA가 세포질로 빠져나가지 못하고 핵 안에 축적되기 때문에 핵 안의 집중적인 poly(A)⁺ RNA의 분포를 볼 수 있다.

In situ Hybridization을 수행한 결과, 모균주인 81X-Nab2 삽입 균주를 대조군으로 사용하여 정상적으로 *spnab2* 유전자가 발현되는 상황(-B₁)에서 모균주의 mRNA export 결함을 관찰하였다. 이는 생장에는 문제가 없지만 야생형에 비해 *spnab2* 유전자가 과발현되어 세포질로의 이동에 결함이 존재할 가능성이 있다. *spnab2* 유전자를 thiamine으로 억제시킨 경우(+B₁)에는 모균주의 mRNA export가 정상이었다. 이와 다르게 합성치사를 보이는 SLnab1과 SLnab2, SLnab3 모든 균주에서는 thiamine을 첨가한 상황에서도 핵 안에 poly(A)⁺ RNA의 분포가 집중된 사실을 알 수 있었다.

따라서 모균주의 경우 thiamine으로 *spnab2* 유전자의 발현을 억제하였지만 *spnab2* 유전자와 중복된 기능을 하는 유전자가 정상적으로 발현하여 mRNA export에 문제가 발생하지 않았지만, 선별한 돌연변이체의 경우에는 thiamine으로 *spnab2* 유전자의 발현이 억제된

상태에서 mRNA export에 결함을 보이므로 *spnab2* 유전자의 기능을 상보적으로 수행하는 유전자에 돌연변이가 일어났다는 가능성을 암시한다.

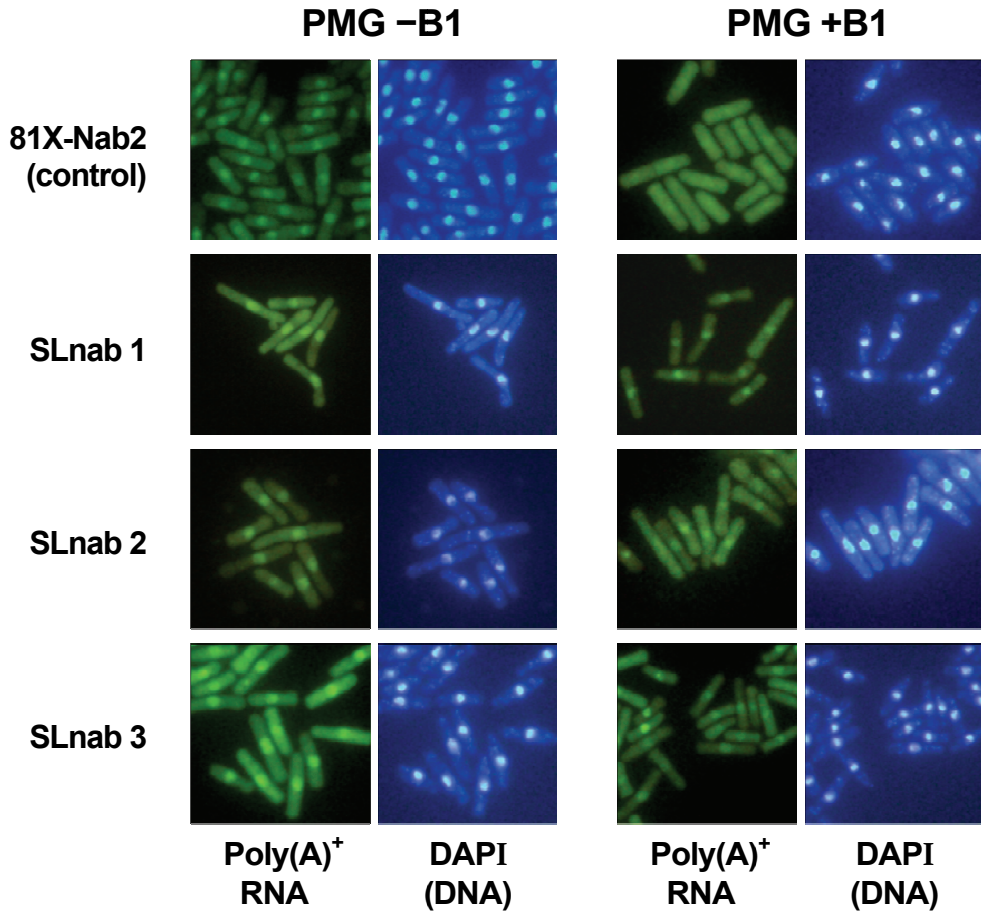


Fig. 7. Poly(A)⁺ RNA localization of synthetic lethal mutants.

The growth defect of the synthetic lethal mutations was associated with mRNA export defects, *in situ* hybridization for the poly(A)⁺ RNA was performed in control(original 81X-Nab2 integrated strain), SLnab1, SLnab2, and SLnab3 mutants grown under permissive and restrictive conditions. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

IV. 토 의

mRNA export 과정의 전반적인 흐름을 이해하기 위해서는 mRNA export 기작에 관여하는 인자들의 연구가 필요하다. mRNA export는 전사단계부터 mRNA 가공과정 (5'-캡핑, 스플라이싱, 3'-말단 폴리아데닐화, 질적 조절)에 이르는 모든 단계들이 서로 연관되어 있는 독특한 기작으로 여겨진다.

mRNA export에 관여하는 인자들 중 하나인 수송운반체는 mRNA에 결합하여 성숙한 mRNA만을 핵에서 세포질로 이동시키는 역할을 한다. 이 과정에서 mRNA와의 결합 친화력을 높이기 위해 어댑터 단백질과의 결합을 필요로 한다. 분열효모인 *S. cerevisiae*의 경우 수송운반체인 Mex67-Mtr2가 mRNP 복합체에 어댑터 단백질들의 도움을 받아서 결합을 하면 mRNP 복합체는 정상적으로 핵공복합체로 이동하게 된다. 효모에서 가장 잘 알려진 어댑터 단백질 중에 하나인 Yra1 단백질은 mRNA가 수송운반체와 결합할 수 있도록 도와주는 역할을 한다. 수송운반체인 Mex67과 Yra1 단백질은 또 다른 어댑터 단백질인 Nab2와 핵 안에서 삼중 복합체를 이루고 있다.

*S. cerevisiae*의 Nab2와 65.5%의 유사함을 보이는 *S. pombe*의 spNab2 단백질을 암호화하고 있는 *spnab2* 유전자는 I 번 염색체 상에 위치하고 있으며 2개의 인트론을 포함하고 307개의 아미노산을 암호화하고 있다. spNab2 단백질의 예상 분자량은 33.9 kDa이다. *S. cerevisiae*의 *nab2* 유전자는 생장에 필수적인 반면, *kan^r* 유전자로 치환한 결실돌연변이균주를 제작하여 야생형과 성장속도를 비교한 결과, *S. pombe*의 *spnab2* 유전자는 거의 차이가 없으므로 생장에 필수적이지 않다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 1B). 생장에는 필수적이지 않지만

spNab2 단백질은 mRNA의 poly(A) 꼬리에 결합하는 부위가 잘 보존되어 있고 과발현되는 경우 심한 mRNA export 결함을 보이기 때문에, *S. cerevisiae*의 Nab2와 같이 핵과 세포질 사이를 왕복하는 단백질로써 mRNA export와 poly(A) 꼬리의 길이 조절, mRNA export의 질적 관리 등에 관여할 가능성이 있다.

생장에 영향을 미치지 않는 *spnab2* 유전자의 발현양이 증가하면 성장 속도에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, thiamine에 의해 발현이 조절되는 *nmt* 프로모터를 가진 발현벡터인 pREP81X에 *spnab2* 유전자의 ORF를 클로닝한 재조합 플라스미드를 제작하여 AY217 또는 $\Delta nab2::kan^r$ 균주에 형질전환하였다. *spnab2* 유전자가 과발현될수록 느린 성장속도를 보이는 실험결과(Fig. 2)를 통해서, *spnab2* 유전자가 아생형에 비해 과발현되면 생장이 억제된다는 사실을 알았다. 인트론이 제거된 cDNA의 *spnab2* 유전자는 유전체 DNA에 비해 과발현에 대한 영향이 상대적으로 적게 나타난다. 이러한 실험 결과들은 spNab2 단백질의 발현량이 세포의 성장이나 mRNA export에 매우 중요함을 암시하며, 이 과정에서 스플라이싱 기작도 어느 정도 영향을 미치는 것으로 추정된다.

이러한 Nab2의 특징을 토대로 mRNA export에 어댑터 단백질로써 작용하는 Nab2와 기능적으로 관련이 있는 새로운 인자, 즉 기능을 알고 있는 *spnab2* 유전자로부터 기능이 아직 밝혀지지 않은 새로운 유전자를 찾기 위해 유전학적 방법인 합성치사 돌연변이 선별 (synthetic lethal screen)을 수행하였다. 하지만 앞에서 제작한 pREP81X-Nab2를 $\Delta nab2::kan^r$ 에 형질전환시킨 균주들은 생장에 결함이 존재하기 때문에 합성치사 돌연변이 선별에 혼동을 줄 수 있어서 적합하지 않았다. 따라서 *spnab2* 유전자의 발현 수준을 낮추기 위해 플라스미드의 형태가 아닌, *spnab2* 유전자의 발현이 *nmt* 프로모터를 통해 조절되는 *Pnmt-spnab2*

형태로 염색체에 직접 삽입한 균주를 제작하였다(Fig. 4). 이렇게 제작된 균주를 PMG, YES 배지에서 spot assay한 결과, 성장속도에는 거의 차이가 없다는 것을 확인하였다(Fig. 5). 하지만 이 균주도 *spnab2*의 발현이 억제되는 경우에는 poly(A)⁺ RNA의 분포가 정상이었으나, thiamine이 없는 배지에서는 약간의 mRNA export 결함을 보였다. 이러한 결과는 *spnab2* 유전자가 발현이 안 되는 경우에는 mRNA export에 별다른 이상이 없지만, 조금이라도 과발현되면 이상을 나타내는 실험결과와 일치한다.

Thiamine이 없는 배지에서 약간의 mRNA export 결함을 보이더라도 성장에는 거의 영향이 없으므로 81X-Nab2 삽입 균주를 모균주로 사용하여 돌연변이 유발 실험을 수행하였다. *spnab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체로 유력한 5개의 균주를 선별하여 SLnab1 ~ 5로 명명하였다. 선별한 돌연변이체들 중에서도 SLnab1, SLnab2, SLnab3은 *spnab2* 유전자의 발현을 억제하였을 때 모균주와 비교하여 성장속도가 평균 10³배 정도가 느려졌고, 정상세포에 비해 길이가 비정상적으로 길쭉한 형태를 보였다(Fig. 6). SLnab1은 배양하는 과정 중에 역돌연변이가 많이 관찰되었고, SLnab2는 정상적인 세포와는 다르게 세포끼리 뭉쳐진 형태를 보였다. 하지만 이러한 표현형들이 합성치사 돌연변이 때문인지 아니면 합성치사와 관련이 없는 또 다른 돌연변이 때문인지는 확실하지 않다. 모균주와 교배를 통해 background 돌연변이를 제거하는 실험이 진행되어야 하며, 이후 합성치사 돌연변이가 발생한 유전자를 클로닝하는 과정에서 이러한 표현형에 대한 좀 더 구체적인 원인을 밝힐 수 있을 것이다.

합성치사 돌연변이체로 가장 유력해 보이는 3개의 균주 SLnab1 ~ 3에 대한 poly(A)⁺ RNA의 분포를 조사하여 선별한 돌연변이체들이

mRNA export에 관여하는지를 알아보았다(Fig. 7). mRNA export가 정상적인 세포에서는 poly(A)⁺ RNA의 분포는 세포 전체에 균일하게 나타나지만, mRNA export가 정상적이지 않은 세포에서는 mRNA가 세포질로 빠져나가지 못하고 핵 안에 축적된다. *spnab2* 유전자를 thiamine으로 억제시킨 경우 (+B₁)에는 대조군의 mRNA export가 정상이었지만 합성치사를 보이는 SLnab1과 SLnab2, SLnab3 모든 균주에서는 thiamine을 첨가한 상황에서 핵 안에 poly(A)⁺ RNA의 분포가 집중된 사실을 알 수 있었다. 따라서 모균주의 경우 thiamine으로 *spnab2* 유전자 발현을 억제하였지만 *spnab2* 유전자와 중복된 기능을 하는 유전자가 정상적으로 발현하여 mRNA export에 문제가 발생하지 않았지만, 선별한 돌연변이체의 경우에는 thiamine으로 *spnab2* 유전자의 발현이 억제된 상태에서 mRNA export에 결함을 보이므로 *spnab2* 유전자의 기능을 상보적으로 수행하고 있는 연관된 다른 유전자에 돌연변이가 일어났다는 가능성을 암시한다.

결론적으로 *spnab2* 유전자가 결실되었을 때는 생장에 영향이 없지만 *nmt* 프로모터와 같이 자기 프로모터가 아닌 다른 프로모터를 사용하게 되면 세포는 생장에 결함을 보였다. 재조합 플라스미드를 통해서 *spnab2* 유전자가 과발현되었을 때도 생장에 결함을 나타내었다. 이러한 사실들은 야생형에 비해 소량만 과발현되어도 세포는 생장에 결함을 보이기 때문에, spNab2가 자가조절을 통해 자신의 mRNA의 발현을 조절한다고 가정하면 자가조절이 불가능한 상황에서는 생장에 결함을 보인다고 추측할 수도 있다. 또한 다른 유전자들에 비해 spNab2가 생장에 있어서 thiamine(B₁)에 대한 영향을 크게 받을 가능성과 thiamine 합성에 관여하는 유전자의 발현에 spNab2의 역할이 특별히 중요할 가능성도 있다.

앞으로의 연구는 과발현 균주들에 대한 *spnab2* 유전자의 mRNA 발현양의 정량적인 분석을 노던블롯(northern blot)이나 정량적인 (quantitative) PCR을 통해서 보다 정확하게 분석할 필요가 있다.

또한 *spnab2* 유전자와 합성치사로 선별된 돌연변이체들에 대한 분석을 통해 어떤 부분에 돌연변이가 일어났는지를 확인하고, 클로닝된 유전자의 생장에 관한 필수 여부를 실험을 통해 확인해야 한다. mRNA export에 이러한 유전자들이 어떻게 관여하는지를 비롯한 기능에 대한 연구가 이루어져야 하며, 이러한 연구들을 통해서 spNab2와 클로닝된 새로운 유전자의 밝혀지지 않은 기능들을 밝혀나가고, mRNA export에 관여하는 다른 인자들과의 상호작용을 파악하여 mRNA export를 비롯한 전반적인 mRNA 대사과정을 이해할 수 있도록 추가적인 연구가 진행되어야 한다.

참 고 문 헌

- Alcazar-Roman, AR., Tran, E.J., Guo, S., Wentz, S.R. 2006. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nature Cell Biol.* 8, 711-716.
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., Pringle, J.R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 14, 943-51.
- Brown, J.A., Bharathi, A., Ghosh, A., Whalen, W., Fitzgerald, E., Dhar, R. 1995. A Mutation in the *Schizosaccharomyces pombe rael* Gene Causes Defects in Poly(A)⁺ RNA Export and in the Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 270, 7411-7419.
- Casolari, J.M., Silver, P.A. 2004. Guardian at the gate: preventing unspliced pre-mRNA export. *Trends Cell Biol.* 14, 222-225.
- Cho, H.J., Hwang, D.K., Jung, S.I., Yoon, J.H. 2007. *Schizosaccharomyces pombe nup97*, which Genetically Interacts with *mex67*, is essential for growth and involved in mRNA export. *J. Microbiol.* 45, 344-349.
- Cole, C.N., Scarcelli, J.J. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 299-306.
- Erkman, J.A., Kutay, U. 2004. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 1, 12-20.
- Fasken, M.B., Corbett, A.H. 2009. Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol.* 6, 237-241.

Fasken, M.B., Stewart, M., Corbett, A.H. 2008. Functional significance of the interaction between the mRNA-binding protein, Nab2, and the nuclear pore-associated protein, Mlp1, in mRNA export. *J. Biol. Chem.* 283, 27130-43.

Fischer, T., Strässer, K., Rácz, A., Rodriguez-Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J., Hurt, E. 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.

Forsburg, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21, 2955-2966.

Iglesias, N., Stutz, F. 2008. Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS Letters.* 582, 1987-1996.

Iglesias, N., Tutucci, E., Gwizdek, C., Vinciguerra, P., Dach, E.V., Corbett, A.H., Dargemont, C., Stutz, F. 2010. Ubiquitin-mediated mRNP dynamics and surveillance prior to budding yeast mRNA export. *Genes Dev.* 24, 1927-1938.

Köhler, A., Hurt, E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Mol. Cell Biol.* 8, 761-763.

Lee, D.C., Aitchison, J.D. 1999. Kap104p-mediated Nuclear Import. *J. Biol. Chem.* 274, 29031-7.

Lei, E.P., Stern, C.A., Fahrenkrog, B., Krebber, H., Moy, T.I., Aebi, U., Silver, P.A. 2003. Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell.* 3, 836-47.

Luna, R., Jimeno, S., Marín, M., Huertas, P., García-Rubio, M., Aguilera, A. 2005. Interdependence between transcription and mRNP processing and export, and its impact on genetic stability. *Mol. Cell.* 18, 711-22.

Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *GENE*. 123, 127-130.

Moon, D., Park, Y.S., Kim, C.Y., Yoon, J.H. 2010. Isolation of synthetic lethal mutations in the *rsm1*-null mutant of fission yeast. *J. Microbiol.* 48, 701-5.

Moore, M.J. 2005. From birth to death: the complex life of mRNAs. *Science*. 309, 1514-1518.

Partridge J.R., Schwartz, T.U. 2009. Crystallographic and biochemical analysis of the Ran-binding zinc finger domain. *J. Mol. Biol.* 391, 375-89.

Reed, R., Hurt, E. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*. 108, 523-531.

Rodriguez, M.S., Dargemont, C., Stutz, F. 2004. Nuclear export of RNA. *Biol. Cell*. 96, 639-655.

Serpeloni, M., Vida, N.M., Goldenberg, S., Ávila, A.R., Hoffmann, F.G. 2011. Comparative genomics of proteins involved in RNA nucleocytoplasmic export. *BMC Evol. Biol.* 11.

Stewart, M. 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 35, 609-17.

Stoffler, D., Fahrenkrog, B., Aebi, U. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 391-401.

Tran, E.J., Wentz, S.R. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*. 125, 1041-1053.

Vinciguerra, P., Stutz, F. 2004. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 285-92.

Viphakone, N., Voisinet-Hakil, F., Minvielle-Sebastia, L. 2008. Molecular dissection of mRNA poly(A) tail length control in yeast. *Nucleic Acids Res.* 36, 2418-33.

Whalen, W.A., Yoon, J.H., Shen, R., Dhar, R. 1999. Regulation of mRNA Export by Nutritional Status in Fission Yeast. *Genetics.* 152, 827-838.

Yoon, J.H. 2003. Synthetic Lethal Mutants with *spmex67* of *Schizosaccharomyces pombe* in the Mediation of mRNA export. *J. Microbiol.* 41, 115-120.

Yoon, J.H., Love, D.C., Guhathakurta, A., Hanover, J.A., Dhar, R. 2000. Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8767-8782.

Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 41, 973-981.

Zenklusen D, Stutz F. 2001. Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett.* 498, 150-6.

Abstract

Isolation of synthetic lethal mutations in the *spnab2* mutant that is involved in mRNA export in fission yeast

Park Yun-Sun

Department of Biology Education

Graduate School of Education

Sungshin Women's University

Mutants that showed synthetic lethality with the *spnab2* were isolated to identify the genes that are functionally involved in mRNA export in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

The *spnab2* gene contains 2 introns and encodes a 307 amino-acid protein with predicted molecular weight of 33.9 kDa. spNab2 protein shows the 65.5% similarity to the poly(A)⁺ binding protein, Nab2 of *S. cerevisiae*, which is involved in mRNA export and mRNA processing, 3'-end formation. The *spnab2* null mutant is not essential for growth and it did not show any accumulation of poly(A)⁺ RNA in the nucleus. However, over-expression of spNab2 cause the severe growth defects and intensive accumulation of poly(A)⁺ RNA in the nucleus, suggesting that spNab2 is also involved in mRNA export out of the nucleus.

To isolate the mutations in genes that are genetically linked to *spnab2*, synthetic lethal screen was performed using the 81X-Nab2 integrated strain as a parental

strain, in which the expression of *spnab2* gene is under the control of *nmt* promoter. The mutant cells that showed growth defects only in the presence of thiamine were screened at 27°C.

Five mutants were finally isolated in this screening and tentatively named as SLnab1 through SLnab5. These mutant cells showed mild mRNA export defect in synthetic lethal conditions.

감사의 글

행복한 시간은 순간처럼 짧게 느껴지듯이 길 것 같았던 2년 반의 대학원 생활을 마치고 어느새 졸업을 맞이하게 되었습니다. 석사학위 논문이 나오기까지 많은 도움을 주신 분들께 글로나마 감사한 마음을 전하고자 합니다.

먼저 최고의 환경에서 연구를 할 수 있는 기회를 주신 윤진호 교수님께 감사 드립니다. 항상 학생들 입장에서 먼저 생각해 주시고 많은 가르침 주신 교수님께 다시 한번 고개 숙여 감사 드립니다. 그리고 학문적으로 성장할 수 있도록 많은 가르침과 따뜻한 말씀해주신 박경숙 교수님, 강혜순 교수님, 전용필 교수님, 김상태 교수님, 김인순 교수님 감사합니다. 학부시절 많은 관심을 가지고 가르침 주신 제갈욱 교수님께도 감사 드립니다. 더불어 논문심사를 위해서 귀중한 시간을 내주신 서울대 이승복 교수님과 숙명여대 박수철 교수님께 감사 드립니다.

항상 아낌없는 사랑을 주시는 부모님께 감사 드립니다. 언제나 노력하는 모습을 보여주시는 멋진 엄마, 아빠 사랑합니다. 그리고 나의 동생 호진아, 고맙고 네가 바라는 꿈을 꼭 이루길 바란다. 사랑하는 할머니, 할아버지 항상 건강하세요.

많은 시간 함께 행복하고 고생한 미생물 연구실 식구들에게 감사의 말을 전합니다. 소중한 선배 동그라미언니.. 언니와 함께한 1년은 정말 최고였고, 언니에게 배운 실험 덕분에 논문실험 잘 마칠 수 있었어요. 그리고 가장 힘들 때 함께한 후배 애리.. 남은 석사생활 마무리 잘하고 항상 행복하길 바란다. 힘든 시간은 지나가기 마련이고, 그만큼 느 성장할거야, 힘내 애리야. 실험실에서 함께한 시간은 짧지만 많은 사랑을 준 숙희언니, 진아언니, 현진언니 고맙습니다. 꿈을 이야기 할 때 가장

멋진 수현언니, 야무진 슬아, 배지 많이 만들어준 지혜.. 그리고 함께 실험하면서 기운을 북돋아 준 진희, 다예, 예람이, 수연이, 귀여운 막내 수진이와 혜민이에게 고마움을 전합니다. 마지막으로 친구이자 조연자로서 마음을 나눠주고 말하지 않아도 이해해주는 혜성이.. 바쁜 스케줄 속에서도 실험 도와주고 함께해줘서 고맙고, 넌 최고의 친구야.

그리고 소중한 동기 윤주언니.. 언니와 함께여서 5학기를 잘 마칠 수 있었어요. 1학기부터 조교일로 도움 많이 준 은지언니, 후배 차연이, 성민 선생님, 아영 선생님께도 감사 드립니다.

이제는 가족 같은 내 친구들.. 엄마 같은 유경이, 항상 웃게 만들어주는 숙빈이, 멋진 내 친구 미나, 마음 편한 친구 연수, 열심히 노력하는 희은이, 귀여운 정민이, 오랜 친구 수진이에게도 감사의 마음을 전합니다. 일상의 아름다움을 알게 해준 친구와 오랫동안 만나지 못했지만 함께한 추억으로 인해 존재만으로 든든한 열분 모임의 영은, 장미, 지향, 미림, 효선, 혜진, 소영, 희연, 미혜.. 고마워. 또한 UNI에서 함께한 소중한 인연.. 사랑하는 다연언니, 정훈오빠, 다영이, 지영이, 하얀이를 비롯한 Piazza의 모든 분들께도 감사 드립니다.

교육실습 때 아낌없는 사랑을 나눠준 창현고등학교 1학년 17반 36명의 아이들과 함께했던 교생 선생님들 고마워요.. 지금 함께 열심히 공부하고 있는 봉원중학교의 현성이와 기혁이에게도 고마움을 전합니다.

더 나은 사람으로 성장할 수 있도록 함께해준 모든 분들께 다시 한번 감사하다는 말을 전하며 이 글을 마칩니다.