



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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 export 와  
연관된 *rsm1* 유전자와 synthetic  
lethality 를 보이는 돌연변이의 선별

2010년

성신여자대학교 대학원

생물학과

문 동 그 라 미

분열효모에서 mRNA export 와  
연관된 *rsm1* 유전자와 synthetic  
lethality 를 보이는 돌연변이의 선별

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2009년 11월

성신여자대학교 일반대학원

생물학과

문 동 그 라 미

## 논문개요

분열효모에서 mRNA export에 관여하는 새로운 export 인자들을 찾기 위해, 결실돌연변이인 *Arsm1* 대립유전자와 합성치사(synthetic lethality)를 보이거나 생장에 결함을 보이는 돌연변이들을 선별하여 이들의 특성을 살펴보았다.

이를 위해, *rsm1* 유전자의 발현이 티아민에 의해 조절되는 균주를 돌연변이원인 EMS(Ethyl methanesulfonate)로 처리하여 약 32만 개의 콜로니를 분석하였다. 먼저 *rsm1* 유전자의 발현이 억제되는 조건에서 생장에 결함을 보이는 돌연변이 균주 25개를 1차로 선별하였다. 1차로 선별된 균주 중에서 spot assay와 streaking의 방법을 사용하여 합성치사 조건에서 (티아민이 들어있는 배지) 생장이 억제되는 14개를 2차로 선별하여 SLrsm1~14로 명명하였다. 이렇게 선별한 돌연변이들을 *rsm1*과 mRNA export에 관여한다고 알려진 다른 유전자인 *sub2*, *pabp*, *mlo3*, *snz1*, *dbp5*, *gle1*, *nup97*, *mex67*, *nup184*, *rae1* 등을 형질전환시켜 상보관계(complementation)를 확인하였다. 그 결과 야생형 *rsm1*이 SLrsm2~9, 11, 13, 14의 생장결함을 상보하였고, 대체로 *gle1*, *mex67*, *rae1*, *snz1*도 상보하였다. mRNA export의 결함을 보이는 것은 SLrsm1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13이었다. 이 중에서 표현형이 뚜렷한 돌연변이인 SLrsm2, 6, 11, 13을  $h^+$  *rsm1* 결실돌연변이 균주와 다시 교배하여 관련이 없는 돌연변이를 제거하였다. 이렇게 정제된 균주들을 spot assay와 streaking을 이용한 합성치사 조건에서 생장 정도, *rsm1*과 mRNA export에 관여한다고 알려진 다른 유전자의 형질전환을 이용한 상보관계, mRNA export의 결함을 다시 확인한 결과, 이들은 정제 이전의 모균주들보다 더욱 뚜렷한 표현형을 보였다.

# 목 차

논문개요

목차

그림목차

도표목차

I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험재료	
1-1. 균주 .....	6
1-2. 플라스미드 .....	6
1-3. 배지 .....	6
1-4. 재료 및 시약 .....	7
1-5. primer 및 sequence analysis .....	8
1-6. 반응 용액 .....	9
2. 방법	
2-1. Mutagenesis .....	17
2-2. <i>E.coli</i> 의 형질전환 .....	17
2-3. <i>S.pombe</i> 의 형질전환 .....	17
2-4. <i>S.pombe</i> Genomic DNA isolation .....	18
2-5. Spot assay for Growth .....	18
2-6. Random spore analysis .....	19
2-7. Southern Blotting .....	19
2-8. <i>In situ</i> Hybridization .....	20

III. 결과

1. 합성치사 돌연변이 선별을 위한 모균주 제작 ..... 22
2. *rsm1* 돌연변이와 합성치사를 보이는 돌연변이의 선별 ..... 24
3. 선별한 돌연변이 균주의 상보 확인 ..... 29
4. 선별한 돌연변이 균주의 mRNA export 결함 조사 ..... 32
5. 선별한 돌연변이 균주의 확인 ..... 36

IV. 토의 ..... 41

참고문헌

영문초록

## 도 표 목 차

Table 1. Strains used in this study .....	11
Table 2. Composition of Medium for <i>S. pombe</i> .....	13
Table 3. Composition of Medium for <i>E.coli</i> .....	15
Table 4. PCR primer used in this study .....	16
Table 5. Results of mRNA export factors genes complementation ....	31
Table 6. Summary of mRNA export factors genes complementation .	40

## 그림 목 차

Figure 1. Schematic diagram representing synthetic lethal screen	23
Figure 2. Cell viability of mutants	24
Figure 3. Growth test of synthetic lethal mutants	26
Figure 4. Poly(A) <sup>+</sup> RNA localization of synthetic lethal mutants	33
Figure 5. Growth test of synthetic lethal mutants	36
Figure 6. Results of mRNA export factors genes complementation	38
Figure 7. Poly(A) <sup>+</sup> RNA localization of synthetic lethal mutants	39

## I. 서론

진핵생물(eukaryote)은 핵과 세포질의 구분이 모호한 원핵생물과 달리 막 구조를 가지고 있어서 구획화 된다. 진핵생물은 구획화(compartmentation)를 통한 세포 내 기작의 단계화와 복잡성으로 원핵생물과는 분명히 다른 차이를 보여준다. 이러한 분리는 유전자의 안정적 저장과 발현조절에 유리하지만, 거대분자들이 끊임없이 핵과 세포질을 이동해야 한다. 유전정보는 핵막(nuclear membrane)을 경계로 핵 안에서 전사(transcription)를 통해 RNA로 전해지고 핵 밖에서 해독(translation)을 통해 단백질로 이어진다. 이러한 진핵생물의 핵막은 공간적인 분리의 역할 뿐만 아니라 기능면에서도 중요한 역할을 한다.

핵막에는 물질이 이동할 수 있는 핵공(nuclear pore)이 존재하고, 이것은 단순한 구멍이 아니라 핵막을 가로지르는 거대한 분자구조로 되어 있는데 이것을 핵공복합체(Nuclear Pore Complex, NPC)라고 한다. 이러한 NPC를 통해 핵과 세포질 사이에 물질교환이 이루어진다. 이 NPC는 약 30종류의 핵공단백질(nucleoporin, Nup)로 이루어진 40MDa 이상의 거대한 복합체로 하등 진핵생물로부터 사람에 이르기까지 진화적으로 잘 보존되어 있다(Cronshaw *et al.*, 2002; Rout *et al.*, 2000). 25~40kDa 이하의 작은 물질들은 NPC를 단순확산으로 이동할 수 있지만, 그 이상의 큰 물질은 오직 선택적인 능동수송을 통해 NPC를 통과할 수 있으며 NPC의 역동적인 변화에 의해 조절된다(Tran and Wente, 2006). NPC는 핵과 세포질 사이의 이동을 필요로 하는 신호전달, 성장, 유전자 발현 등 모든 세포의 생리작용에 영향을 미친다. 전자현미경을 이용한 연구 결과, NPC는 8개의 단위체(spoke)로 이루어져 있으며 이 구조는 핵막을 중심으로 비대칭적인 모양을 하고 있음이 밝혀졌다(Tran and Wente, 2006). 즉, 핵막과 연결되어 있는 NPC body,

세포질 쪽으로 길게 뻗어있는 cytoplasmic filaments, 그리고 핵막 안쪽으로 nuclear basket의 세 부분으로 구별할 수 있다. NPC를 이루는 핵공단백질들은 대개 각 단위체에 다수(multicopy)로 존재하며 하나의 핵공단백질은 핵막을 중심으로 대칭 혹은 비대칭의 다양한 분포를 가진다(Tran and Wentz, 2006). NPC의 직경은 약 25~30nm인 것으로 알려져 있으며, NPC의 중앙 통로 쪽에는 페닐알라닌과 글리신 아미노산 잔기가 반복되는 FG(Phe-Gly) 도메인을 형성하는 핵공단백질이 자리하고 있다. 이러한 FG 도메인은 특별한 3차 구조를 가지지 않고 실 모양으로 길게 늘어진 형태를 띄고 있으며 NPC의 중앙 통로를 가득 채우고 있어, 거대분자들이 단순확산에 의해 NPC를 통과하는 것을 막는 투과장벽의 역할을 할 뿐만 아니라 수송운반체(transport receptor)와 약한 상호작용을 통해 수송복합체의 투과성을 유지한다(Tran and Wentz, 2006).

핵과 세포질 사이의 이동 기작은 단백질과 많은 RNA (tRNA, rRNA, miRNA, snRNA 등) 종류에서 유사하다. 단백질과 이러한 RNA의 이동에는  $\beta$ -karyopherin 패밀리에 속하는 수송운반체가 관여하는데, 이러한 수송운반체는 이동할 표적 단백질의 특정 아미노산 서열[NLS 혹은 NES, Nuclear Localization (or Export) Sequence]을 인식하거나 표적 RNA의 뉴클레오티드 모티프 또는 RNA와 결합하고 있는 단백질을 인식한다. 이러한 거대분자들의 수송에 있어서 방향성, 즉 수송운반체가 어느 곳에서 표적 단백질 또는 RNA와 결합하고 분리되는지는 Ran 단백질의 형태에 따라 결정된다. Ran (Ras-like GTPase) 단백질은 핵막을 중심으로 세포질에서는 RanGAP (Ran GTPase Activation Protein)에 의해 주로 RanGDP의 상태로 존재하며, 핵 안에서는 RanGEF(Ran Guanine nucleotide-Exchange Factor)에 의해 RanGTP 형태로 존재한다(Köhler and Hurt, 2007; Stewart, 2007).

하지만, mRNA의 핵에서 세포질로의 이동 (mRNA export)은 위에서 언급한 단백질이나 다른 RNA의 이동과는 많은 점에서 다른 것으로 알려져 있다. 대부분의 mRNA export에는  $\beta$ -karyopherin 패밀리에 속하는 수송운반체가 직접적으로 관여하지 않으며 Ran 단백질의 영향도 받지 않는다. 효모에서 알려진 mRNA 수송단백질은 Mex67/Mtr2 복합체이며, 이 단백질은 그 자체로 mRNA와 결합하는 힘이 약하나 Yra1 단백질과 같은 어댑터 단백질을 매개로 mRNA에 결합한다(Köhler and Hurt, 2007). Mex67p는 NPC의 핵공단백질과 상호작용을 통해 핵과 세포질 사이를 이동하는 것으로 알려져 있다.

mRNA는 전사 직후부터 소멸될 때까지 여러 단백질이 결합한 거대한 mRNP 복합체로 존재하는데, mRNP 복합체는 mRNA 대사 단계마다 역동적으로 단백질의 구성과 구조가 변하는 것으로 여겨진다. mRNA는 핵 안에서 전사 후 가공과정 (mRNA maturation: 5'capping, 3'polyadenylation, splicing)을 거쳐, 성숙한 mRNA (mature mRNA)만이 핵막을 통과하여 세포질로 이동할 수 있다(Köhler and Hurt, 2007). mRNP 복합체는 NPC의 세포질 쪽에 도달하면 ATP-dependent RNA helicase인 Dbp5에 의해 리모델링된다. Dbp5는 cytoplasmic filaments에 존재하는 필수적인 mRNA export 인자인 Gle1에 의해 활성이 커지고  $IP_6$ (Inositol hexakisphosphate)가 Dbp5와 Gle1 사이의 상호작용을 조절한다. 이러한 과정은 mRNP가 핵 안쪽으로 다시 유입되는 것을 막는 기능을 한다(Cole and Scarcelli, 2006; Guo and Wentz, 2006; Weirich and Weis, 2006; Stewart, 2007).

또한 mRNA 대사(metabolism)의 모든 단계(전사, mRNA 가공과정, export, 해독 등)에서 발생할 수 있는 실수를 탐지할 수 있도록 엄격한 quality control이 관여하고 있다(Fasken and Corbett, 2005). 한 예로

발아효모에서 Mlp1 (Myosin-like protein 1)은 unspliced transcripts를 빠져나가지 못하게 막는 역할을 한다(Fasken and Corbett, 2005).

mRNA와 수송운반체를 연결하는 어댑터에는 Yra1이외에 Sub2/REF, Npl3, Nab2, SR 단백질들, TREX-1, TREX-2 복합체 등이 알려져 있다. 이들은 mRNA export뿐만 아니라 mRNA의 전사, 가공과정, 해독과정에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 보아 mRNA export와 이러한 단계들은 분리되어 있는 것이 아니라 서로 연관되어 있음을 시사하고 있다. 이외에도 mRNA export에 관여하는 중요한 인자들에는 핵공단백질, NPC-결합단백질 (Rae1p 등), RNA 결합단백질, ATPase(Elf1p 등)들이 알려져 있다(Kang *et al.*, 2008)

NPC는 핵과 세포질 사이에 위치하는 단순한 물질교환의 통로라고 여겨져 왔지만 최근의 연구결과 NPC는 핵과 세포질 사이의 물질이동에 능동적인 개입을 하고 있을 가능성이 높음이 알려졌다(Tran and Wentz, 2006). 특정 핵공단백질(Gle2/Rae1, Nup98)이 인산화되어 이로 인해 NPC의 구조가 변화하고 물질을 통과시키는 투과성(permeability)이 변화되어 핵과 세포질 사이를 오가는 물질들의 조절이 가능하게 된다(Tran and Wentz, 2006). 또한 NPC는 그 자체로 역동적인 구조를 가지고 있다는 연구결과도 나오고 있다. 세포주기의 특정시기 뿐만 아니라 물질이 NPC를 통과하는 순간에도 그 구조가 변화하며, 이동하는 물질의 종류나 조건에 따라 핵공단백질의 구성도 변화한다는 보고도 있다(Fahrenkrog *et al.*, 2002; Paulillo *et al.*, 2005).

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 *rsm1*은 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 *pml39*와 homolog이다. *pml39*는 *Mlp1*, *Mlp2*와 상호작용하여 improper mRNA의 retention에 관여한다 (Palancade *et al.*, 2005). 분열효모에서 *rsm1* 유전자는 mRNA export 수송단백질로 여겨지는 *mex67*의 결실돌연변이인  $\Delta$ *mex67* 대립유전자와 합성치사

(synthetic lethality)를 보이는 돌연변이 균주에서 클로닝 하였다(Yoon *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2004). *rsm1* 유전자는 인트론이 없고 296개의 아미노산을 암호화하고 있으며, Rsm1 단백질의 예상 분자량은 34.6 KDa이다. *rsm1* 유전자는 생장에 필수적이지는 않으나 이 유전자가 결실된 균주의 성장 속도는 야생형에 비해 느렸고, 결실돌연변이는 mRNA export에 결함을 보인다(Kang *et al.*, 2008).

본 연구에서는 mRNA export에 관여하는 새로운 export 인자들을 찾기 위해 *rsm1* 결실돌연변이 균주를 돌연변이원(EMS)으로 처리하여  $\Delta rsm1$  대립유전자와 합성치사를 보이거나 생장에 결함을 보이는 돌연변이들을 선별하였다. 이렇게 선별한 돌연변이를 mRNA export에 관여한다고 알려진 다른 유전자인 *sub2*, *pabp*, *mlo3*, *snz1*, *dbp5*, *gle1*, *nup97*, *mex67*, *nup184*, *rae1* 등을 형질전환시켜 상보관계를 확인하였고, mRNA export의 결함을 조사하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1-1 균주

본 실험에 사용된 균주는 분열 효모인 *Schizosaccharomyces pombe* 이며, 재조합 플라스미드의 증폭과 선택을 위한 균주는 *E.coli* Top 10'을 사용하였다. 사용된 효모 균주는 Table 1 에 정리하였다.

#### 1-2 플라스미드

*rsm1* 결실 돌연변이와 합성치사인 돌연변이들을 선별하는 과정에서, 가짜를 제외시키기 위해 negative control로 empty vector인 pDW232를 사용하였고, positive control로는 *rsm1* 유전자가 들어있는 81X-*rsm1*, pDW232-*rsm1*를 사용하였다. mRNA export와 관련된 다른 유전자와 상보 (complementation) 하는지 확인하기 위해서 pDW-dbp5, pDW-mlo3, pDW-sub2, pDW-snz1, pDW-pabp, p-gle1, p-mex67, p-nup97, p-nup184 (Puz188), p-rae1을 사용하였다(p-는 plasmid의 약자이다).

#### 1-3 배지

효모 배양에는 EMM(Edinburgh minimal medium)과 YES(Yeast extract with supplements: 0.5% yeast, 3% glucose, supplements: 225 mg/l adenine, leucine, uracil)을 기본으로 사용하였으며 Table 2 에 그 조성을 나타내었다. *S. pombe* 의 세포배양 기술과 유전학적 방법은 *S. pombe*

standard method 를 사용하였다(Alfa et al., 1993; Moreno et al.,1991).  
형질전환된 균주의 선별은 배지의 첨가물 (supplements: 225 mg/l, adenine,  
leucine, uracil) 조합을 이용하였다. 또한 *nmt* 프로모터의 억제를 위하여  
EMM 과 PMG 배지에 15  $\mu$ M 농도로 티아민(thiamin, B<sub>1</sub>)을 첨가하였다.  
G418 에 내성을 갖는 유전자(*kan<sup>r</sup>*)로 치환된 결실 돌연변이 균주의 선별과  
유지를 위해 YES 배지의 경우, 첨가한 항진균제인 G418 농도를 100 mg/l로  
하였으며 PMG 배지의 경우 각각 200 과 400 mg/l 로 농도를 단계별로  
조절하였고 배지의 첨가물의 양을 1/5 정도로 줄였다. 배양 온도는 28℃를  
유지하였으며 액체배지는 진탕배양 하였고 고형배지는 2% Bacto-Agar 를  
첨가하였다.

Mutagenesis screening 하여 고른 mutants 를 선별하기 위해서 EMM  
배지에 PhloxineB 를 넣었으며, synthetic lethality 를 보이는 균주를 찾기  
위해서 15  $\mu$ M 농도로 티아민을 첨가하였고 균주의 유전적 교배를 위해 ME  
배지를 사용하였다.

*E.coli* 배양에는 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하였으며, 항생제  
(ampicillin)의 농도를 100 mg/ml로 첨가하여 37℃에서 배양하였다(Table 3).

#### 1-4. 재료 및 시약

Taq polymerase 는 Nova Taq(제넨메드), TaKaRa pyrobest,  $\alpha$  Taq  
(진을)을 사용하였다. 제한효소와 T4 DNA ligase 는 New England  
Biolabs(NEB)와 Promega 의 버퍼를 사용하였다. 효모 배양에 사용한  
배지는 Difco, MP, Sigma 제품을 사용하였고 첨가된 Chemical 들은 Sigma 와  
MP 제품을 사용하였다. Mutagenesis screening 에 사용된 Chemical 은

Sigma 제품을 사용하였고 replica 에 사용된 membrane 은 Whatman 과 Schleicher & Schuell 의 제품을 사용하였다.

Southern blotting 에 사용된 ECL(Enhanced Chemi-luminescence labeling and detection)kit 는 Amersham Life Science 의 제품을 사용하였고, *In situ* hybridization 에 사용된 Anti-digoxigenin-fluorescein, Anti-digoxigenin-rhodamine, dig oligo DT 는 Roche 제품을 사용하였다.

PCR purification kit 와 Gel extraction kit, genomic DNA isolation kit 는 QIAGEN 과 진올 제품을 사용하였고 전기영동에 필요한 agarose 는 Bio rad 와 Q-biogen 제품을 사용하였다.

### 1-5. primer 및 sequence analysis

PCR에 사용된 프라이머는 GC 비율을 40~60%로 맞추고 반복적인 AT 염기서열을 피했다. 농도는  $0.02\mu\text{mol}$  로 하여 18~20mer 의 길이로 제노텍과 Sigma-Proligo에 주문하였다. 본 실험에 사용된 프라이머는 Table 4에 정리하였다.

Mutagenesis를 하기 전에 plasmid DNA를 확인하기 위해서 바이오닉스에 sequencing을 의뢰하여 sequence analysis를 하였다. Sequencing에 사용된 primer는 rsm-11, rsm-12, rsm-13 이고 18mer이다. Sequencing한 data는 Europea Bioinformatics Institute에서 ClustalW를 통해 sequence alignment하였다.

## 1-6. 반응 용액

### 1) *S. pombe* Transformation : Lithium Acetate 방법

LiAc-TE solution	0.1M Lithium Acetate 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA
50%PEG4000	50 % Polyethylene glycol in LiAc-TE solution

### 2) Yeast Genomic DNA isolation

CSE buffer	50mM Citrate/Phosphate pH 5.6 40mM EDTA, 1.2M Sorbitol
Spheroplast buffer	Zymolase 20T 2.5mg/ml in CSE buffer

### 3) In Situ Hybridization

30% formaldehyde	Paraformaldehyde, 10 N NaOH, PBS
SCE buffer	1M Sorbitol, 0.5M EDTA 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1M Sodium Citrate
Spheroplast buffer	Zymolase 100T in SCE
Hybridization buffer	20×SSC, 50% Dextran sulfate, 2% BSA, Vanadyl complex, tRNA(1 mg/ml), oligo dT50
Fluorescin-Antidigoxigenin solution	1 M Tris pH 7.5, 5 M NaCl, Antidioxigenin (200 μg/ml),

DAPI mounting medium 10% Triton X-100, 2% BSA  
DAPI(1 mg/ml), PBS,  
Antifade (10 mg/ml), Glycerol

#### 4) Mutagenesis

EMS 3% Ethyl MethaneSulfonate

#### 5) Southern Blotting

20XSSC 0.3 M Na<sub>3</sub>citrate, 3 M NaCl  
Primary wash buffer 6 M urea, 0.4% SDS, 0.5xSSC  
Secondary wash buffer 2xSSC  
Hybridization buffer 0.5 M NaCl, 5% blocking agent to  
ECL gold hybridization buffer

Table 1. Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
AY 217	$h^-$ leu1-32 ura4-d18	Yoon et al., (2000)
216	$h^+$ leu1-32 ura4-d18	Yoon et al., (2000)
$\Delta rsm1::kan^r$	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$	Kang et al., (2008)
$\Delta rsm1::kan^r$	$h^+$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / 81X-rsm1	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pREP 81X-rsm1	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / 81X-rsm1	$h^+$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pREP 81X-rsm1	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / pDW-rsm1	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232- rsm1	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / pDW-dbp5	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232- dbp5	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / pDW-mlo3	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232- mlo3	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / pDW-pabp	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232- pabp	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / pDW-snz1	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232- snz1	This study
$\Delta rsm1::kan^r$ / pDW-sub2	$h^-$ leu1-32 ura4-d18 $\Delta rsm1::kan^r$ / pDW 232- sub2	This study

Table 1. Strains used in this study (continued)

Strains	Genotype	Source
$\Delta rsm1::kan^r / p\text{-gle1}$	$h^- leu1-32 ura4-d18 \Delta rsm1::kan^r / p\text{-gle1}$	This study
$\Delta rsm1::kan^r / p\text{-mex67}$	$h^- leu1-32 ura4-d18 \Delta rsm1::kan^r / p\text{-mex67}$	This study
$\Delta rsm1::kan^r / p\text{-nup97}$	$h^- leu1-32 ura4-d18 \Delta rsm1::kan^r / p\text{-nup97}$	This study
$\Delta rsm1::kan^r / p\text{-nup184}$	$h^- leu1-32 ura4-d18 \Delta rsm1::kan^r / p\text{-nup184}$	This study
$\Delta rsm1::kan^r / p\text{-rae1}$	$h^- leu1-32 ura4-d18 \Delta rsm1::kan^r / p\text{-rae1}$	This study
<i>E.coli</i> Top 10'	F <sup>-</sup> ,mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC),80lacZM15,lacX74, deoR,recA1,araD139,(ara-leu)7697,galU,galK,rpsL,endA1, nupG	Invitrogen

Table 2. Composition of Medium for *S. pombe*

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

Table 2. Composition of Medium for *S. pombe* (continued)

PMG (Pombe Glutamate medium)	
Potassium hydrogen phthalate	3g/ ℓ
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2g/ ℓ
L-glutamic acid, monosodium salt	3.75g/ ℓ
Glucose	20 g/ ℓ
50X Salts	20 ml/ ℓ
1000X Vitamins	1 ml/ ℓ
10000X Minerals	0.1 ml/ ℓ
Supplements: 225mg/ ℓ (Adenine, Leucine, Uracil)	
50X Salt Stock	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	52.5 g/ ℓ
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.735 g/ ℓ
KCl	50 g/ ℓ
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/ ℓ
1000X Vitamin Stock	
Pantothenic acid	1 g/ ℓ
Nicotinic acid	10 g/ ℓ
Inositol	10 g/ ℓ
Biotin	10 mg/ ℓ

Table 2. Composition of Medium for *S. pombe* (continued)

10000X Mineral Stock	
Boric acid	5 g/ ℓ
MnSO <sub>4</sub>	4 g/ ℓ
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4 g/ ℓ
FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2 g/ ℓ
Molybdic acid	0.4 g/ ℓ
KI	1 g/ ℓ
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.4 g/ ℓ
Citric acid	10 g/ ℓ

Table 3. Composition of Medium for *E. coli*

LB (Luria–Birtani) Medium	
NaCl (1%)	10g/ ℓ
Tryptone (1%)	10g/ ℓ
Yeast extract (0.5%)	5g/ ℓ
Agar (2%)	20g/ ℓ

Table 4. PCR Primer used in this study

Name	Sequence (5' → 3' )
Rsm-1	CTTGTCGACATGTCATTCCTACCGATAT
Rsm-2	ATAGGATCCCCGAAGTCCTTGGAGCAAAC
Rsm-3	CTTGTCGACTCATTTCCTACCGATATGGA
Rsm-4	ATAGGATCCCTACCGAAGTCCTTGGAGCA
Rsm-c1	GTGGACTTTGGATCCCATTG
Rsm-c2	TTAACTCGAGCGCATTCTCA
Rsm-c3	AATGCGGCCGCCAGCAGGAATCAAGGTAGC
Rsm-c4	AATGCGGCCGCTTAGCAATGACTGCTACGC
Rsm-11	CCAGGGCTTATATGTGCA
Rsm-12	ATGTCATTCCTACCGAT
Rsm-13	TATCTGCCGAACTGGTTC
Rsm-pdw1	GAAGCTACTGCAGCTGTAAC
Rsm-pdw2	ATACCTAGGAGACAATTAGTAACGGAC
Kan-2R	CGCACGTCAAGACTGTCAAGGAG
Kan-4F	GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG

## 2. 방 법

### 2-1. Mutagenesis

효모를 적정배지에 접종하여 약 12 시간 배양한 다음 50 ml에 계대배양하여  $0.5-1 \times 10^7$  cell/ml ( $OD_{595} = 0.2 \sim 0.5$ ) 되도록 배양한다. 24 시간 배양 후 다시 50 ml에 계대배양하고 4 시간 후 세포를 원심분리 하여 멸균된 배지로 세척한 뒤  $1 \times 10^8$  cell/ml 이 되도록 멸균된 배지로 풀어서 50 ml-tube 에 옮겨준다. 후드에서 EMS(Ethyl MethaneSulfonate) 3%를 처리하고 room temperature(24℃)인 shaking incubator 에서 3 시간 배양하였다. 이후 멸균된 배지로 3 번 세척한 뒤 적정 세포수가 배양되도록 희석해서 최소배지에 접종하였다. 27℃에서 EMM 의 경우 약 4 일 정도 배양한 뒤 colony 가 작게 보이면 phloxineB 가 들어있고 thiamine 이 들어 있는 배지에 먼저 replica 를 뜬다. 다시 27℃ 에서 약 6 시간 배양한 뒤에 phloxineB 가 들어있고 thiamine 이 없는 배지에 replica 를 뜬다.

### 2-2. *E.coli*의 형질전환

*E.coli*의 형질전환은  $CaCl_2$  방법(Sambrook and Russell, 2001)을 사용하였다.

### 2-3. *S. pombe*의 형질전환

*S. pombe*의 형질전환은 Lithium Acetate 방법(Warbrick at al, 1993)으로 수행하였다. 효모를 적정배지에 접종하여 약 12시간 배양한 다음 50 ml에

계대배양하여  $0.5-1 \times 10^7$  cell/ml ( $OD_{595} = 0.2 \sim 0.5$ ) 되도록 배양한다. 세포를 원심분리 하여 10ml의 멸균된 증류수로 세척한 뒤  $1 \times 10^9$  cell/ml 이 되도록 LiAc/TE(0.1M LiAc, 1X TE)로 풀어준다. 분주한 세포 100 $\mu$ l에 형질전환용 DNA 1 $\mu$ g, Salmon sperm DNA 4 $\mu$ l(10mg/ml)를 섞고 50% PEG 용액 300 $\mu$ l을 첨가하여 28 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 이후 42 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 heat shock을 준 후 세포를 선택배지에 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 EMM의 경우 약 4일~5일, YES의 경우 약 2일간 배양하였다.

#### 2-4. *S.pombe* Genomic DNA isolation

효모의 chromosomal DNA의 추출은 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)을 사용하였다. 효모의 세포벽을 파괴시키는 시약은 Kit에 제공되지 않았으므로 다음과 같이 수행하였다.

효모를 stationary phase로 배양해서 수확한 후 CSE buffer로 세척하여 세포에 남아있는 배지성분을 버퍼로 바꿔준다. Spheroplast buffer 1ml로 cell을 잘 풀어준 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하여 세포벽에 구멍이 뚫리도록 한다. 30분 후 5 $\mu$ l의 cell과 10% SDS 5 $\mu$ l를 섞어 cell이 터지는 것을 확인한다. 세포벽에 구멍이 잘 뚫어졌음이 확인되면 Kit에 동봉된 버퍼를 사용하여 실험을 진행하였다.

#### 2-5. Spot Assay for Growth

형질전환된 효모의 분열속도를 측정하기 위한 간접적인 방법으로, 효모를 선택배지에 stationary phase로 키운 뒤  $2 \times 10^7$  cell/ml 이 되도록 농도를 맞춘다. 농도를 맞춘 cell들은  $10^3$  cell/ml 부터  $10^7$  cell/ml까지 순차적으로

희석하였고 고형배지에 3 $\mu$ l씩 loop를 사용하여 일정간격을 유지하며 동그라미를 그려준 뒤 약 4~5일간 배양한다.

## 2-6. Random Spore analysis

Random spore analysis는 다른 phenotype을 보이는 strain과 cross시켜 spore를 얻어내는 방법으로, *rsm1* 결실돌연변이의 *h+* strain을 제조를 위해  $\Delta rsm1::kan^r$  *h-* strain과 216을 cross시켜 random spore analysis를 수행하였다. 또한 screening을 통해 얻은 돌연변이 균주를 *rsm1* 결실돌연변이의 *h+* strain과 cross시켜 random spore analysis를 수행하여 합성치사를 보이는 형질을 더 뚜렷하게 하였다. Random spore analysis는 *h-* strain과 *h+* strain을 ME plate에서 멸균된 증류수로 섞은 다음, 2~3일간 28 $^{\circ}$ C에 배양하여 cell을 교배시켜, 이배체가 된 세포들이 감수분열 하여 sporulation되게 한다. cell을 1ml의 증류수에 풀어주고 여기에 glucylase를 5~7  $\mu$ l 첨가한 후 6시간 더 배양하여 형성된 유성포자를 제외한 영양세포를 lysis시킨다. 이후 증류수로 세척한 후 적당한 수의 spores를 (EMM: 1000 spores/plate, YES: 100 spores/plate) 적정배지에 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

## 2-7. Southern Blotting

*rsm1* 유전자가 정확히 disruption 되었는지 확인하기 위해 Amershams ECL nonisotopic method 를 사용하여 Southern blotting 을 수행하였다. Genomic DNA 의 *rsm1* 유전자를 *kan^r* marker 로 치환시킨 DNA 를 *Pst*I 과 *Bgl*II 제한효소로 잘랐다. 그리고 DNA 절편을 size marker 와 같이 1 % low EEO agarose gel 에 전기영동 하여 분리한 후, depurination 용액에서 15 분 , denaturation 용액에서 45 분, 그리고 neutralization 용액에서

45 분간 처리하였다. 이어 gel 상의 DNA 단편들을 reverse transfer 방법으로 20x SSC solution 을 이용하여 Hybond-N+ membrane 으로 Schleicher & schuell 용기를 사용하여 4 시간 동안 transfer 하였다. 그 다음 DNA 단편들을 transfer 시킨 Hybond-N+ membrane 을 UV 로 cross-link( $0.15\text{J}/\text{cm}^2$ )하여 DNA 를 membrane 에 고정시켰다.

Pre-hybridization은 42°C에서 1시간 동안 ECL hybridization solution으로 하였고, Probe labeling은 100ng/ $\mu\text{l}$ 의 probe DNA 1.5 $\mu\text{l}$ 에 TDW 8.5 $\mu\text{l}$ 를 섞어 준 후, 5분 동안 끓여 denaturation 시킨 다음 ice에 재빨리 넣어주었다. Labeling reagent와 glutaraldehyde를 10 $\mu\text{l}$ 씩 넣고 잘 섞어 준 후 37°C에서 10분간 incubation 한 다음 Prehybridization한 solution과 잘 섞어 주고 Hybridization은 42°C에서 16시간 동안 진행하였다. Primary Wash Buffer로 membrane을 wash하고 2x SSC로 다시 wash한 뒤, ECL DNA detection reagent를 이용하여 detection을 수행하였다. 그 다음 Kodak image program을 이용하여 signal을 확인하였다.

## 2-8. *In situ* hybridization

효모를  $2-4 \times 10^6$  cell/ml의 농도로 배양한 후 30% formaldehyde를 6 ml 첨가하여 45분간 고정시킨다. 이를 0.3M PBS+Glycine 용액으로 워싱 후 spheroplast buffer 에  $1 \times 10^7$  cell/ml되게 풀어주어 37°C에서 1시간 배양하였다. Poly-lysine으로 코팅된 슬라이드에 SCE 버퍼로 풀어준 cell을 올려놓아 cell이 슬라이드에 고정되게 하기 위해 4°C에서 2시간 둔 뒤 -20°C 메탄올에 슬라이드를 2시간 이상 넣어두었다. 메탄올을 완전히 말린 후 2×SSC로 워싱하고 10 $\mu\text{l}$ 의 hybridization solution을 첨가하여 커버글라스를 덮어 37°C에서 overnight(7시간 이상)하였다. 2×SSC로 상온에서 5분, 이후 상온에서 20분간 워싱하고 37°C에서 20분간 2회 워싱한 후 Fluorescine-

Antidigoxigenin Antibody solution을 처리하거나 rhodamine(사용된 균주에 GFP가 들어있는 경우)을 10  $\mu$ l 첨가하여 커버글라스를 덮어 37°C에서 1시간 배양하였다. 이를 2×SSC로 상온에서 15분간 2번씩 워싱하여 말린 후 DAPI mounting medium을 12  $\mu$ l 첨가하여 커버글라스를 덮고 밀봉하였다. 이를 형광현미경으로 관찰하였다.

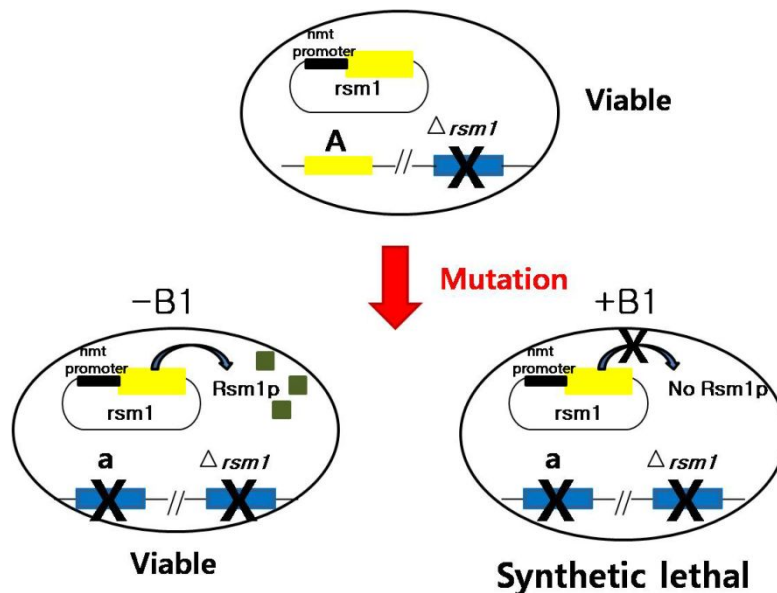
### Ⅲ. 결과

#### 1. 합성치사 돌연변이 선별을 위한 모균주 제작

진핵생물에서 mRNA가 핵에서 세포질로의 이동(mRNA export)하는데 필요한 운반체(carrier)로 여겨지는 Mex67 단백질은 분열효모인 *S. pombe*에서도 mRNA export에 관여하지만 생장에 필수적이지는 않다 (Yoon *et al.*, 2000). *S. pombe*에서 결실돌연변이인  $\Delta mex67$  대립유전자를 이용하여 합성치사(synthetic lethality)를 보이는 돌연변이 균주들을 선별하였다 (Yoon *et al.*, 2003). 이렇게 선별한 합성치사 돌연변이 균주를 상보(complementation)하는 *rsm1* 유전자를 클로닝 하였다(Yoon *et al.*, 2004). *rsm1* 유전자는 인트론이 없고 296개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하고 있었으며, Rsm1 단백질의 예상 분자량은 34.6 kDa이었다. *rsm1* 유전자는 생장에 필수적이지는 않으나 *rsm1* 결실돌연변이 균주의 생장은 야생형에 비해 조금 느렸고, 결실돌연변이는 전체적인 mRNA export에 약간의 결함을 보였다(Kang *et al.*, 2008). 본 연구에서는 mRNA export에서 Rsm1 단백질의 역할을 구체적으로 알아보고 mRNA export에 관여하는 새로운 export 인자들을 찾기 위해, *rsm1* 결실돌연변이 대립유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이를 선별하고자 하였다.

각각의 유전자 하나에만 돌연변이가 따로 일어났을 때는 생장에 영향을 미치지 않지만, 두 유전자 모두에 돌연변이가 생기면 세포가 죽어 버리는 것을 합성치사라 한다. 이렇게 유전적으로 합성치사를 보이는 두 유전자는 기능적으로 연관되어 있다. 분열효모에서 합성치사 돌연변이들을 선별하기 위해 억제 가능한 프로모터(repressible promoter)인 *nmt1*(no message in thiamine) 프로모터를 사용하였다(Maundrell, 1993). 이 프로모터는

티아민이 첨가되었을 때 유전자 발현이 억제된다. pREP81X 플라스미드는 *nmt1* 프로모터의 TATA box 에 돌연변이를 일으켜 야생형에 비해 세기가 가장 약한 *nmt1* 프로모터를 가지고 있다(Forsburg, 1993). pREP81X 플라스미드에 *rsm1* 유전자의 ORF 를 클로닝하여 pREP81X-*rsm1* 플라스미드를 제작하였다(Kang *et al.*, 2008). *rsm1* 유전자의 전사는 *nmt1* 프로모터에 의해 조절을 받으므로 티아민이 첨가된 배지에서는 이들의 발현이 억제된다(Fig. 1). 돌연변이 유발 (mutagenesis)에 사용할 모균주는 염색체 상의 *rsm1* 유전자가 결실되어 있고, *rsm1* 이 들어있는 pREP81X-*rsm1* 플라스미드를 가지고 있다. 모균주의 *rsm1* 결실돌연변이는 서던블롯을 통해 확인하였고, pREP81X-*rsm1* 플라스미드는 DNA sequencing 을 통해 확인하였다(자료 미제시).



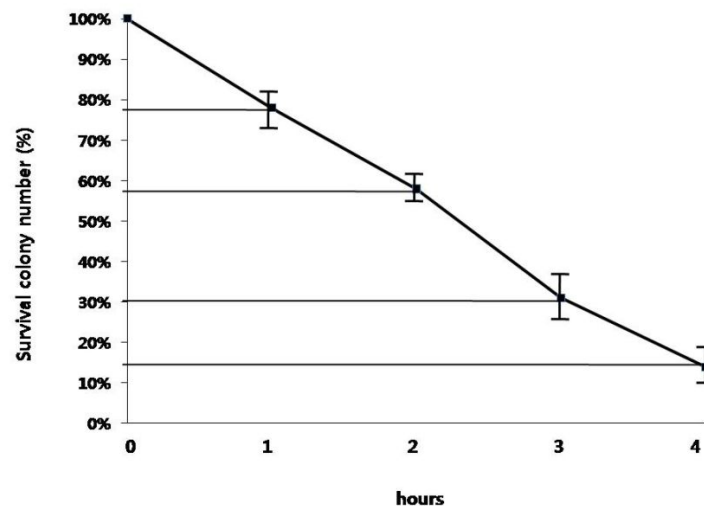
**Figure 1. Schematic diagram representing synthetic lethal screen**

Synthetic lethal mutants is kept viable by expression of *rsm1* gene from repressible *nmt* promoter in the plasmids in the absence of thiamine (-B1), though mutations of two genes are synthetic lethal. In the presence of thiamine (+B1), the expression of *rsm1* gene is repressed, resulting in inhibition of growth (Lethal) if unknown synthetic

lethal gene is mutated.

## 2. *rsm1* 돌연변이와 합성치사를 보이는 돌연변이의 선별.

먼저 3%의 EMS(Ethyl methanesulfonate)를 돌연변이원(mutagen)으로 사용하여 처리시간에 따른 모균주의 생존율을 조사하였다. 0시간은 돌연변이원을 처리하자마자 바로 세척하였으며, 이 때의 생존율을 기준(100%)으로 1시간을 처리하였을 때는 평균 약 78%의 생존율을 보였고 2시간은 약 58%, 3시간은 약 31%, 4시간은 약 14%의 생존율을 보였다(Fig. 2). 생존율이 약 30%정도가 되었을 때 돌연변이 균주를 선별할 확률이 높다는 선행 연구를 근거로, 평균 약 31% (대체로 20%~40%)의 생존율을 보인 3시간을 합성치사 돌연변이 선별을 위한 돌연변이원이 처리시간으로 결정했다(Fig. 2).



**Figure 2. Cell viability of mutants**

Cell viability when they were incubated at 24°C for the indicated time points at the restrictive condition (3% EMS).

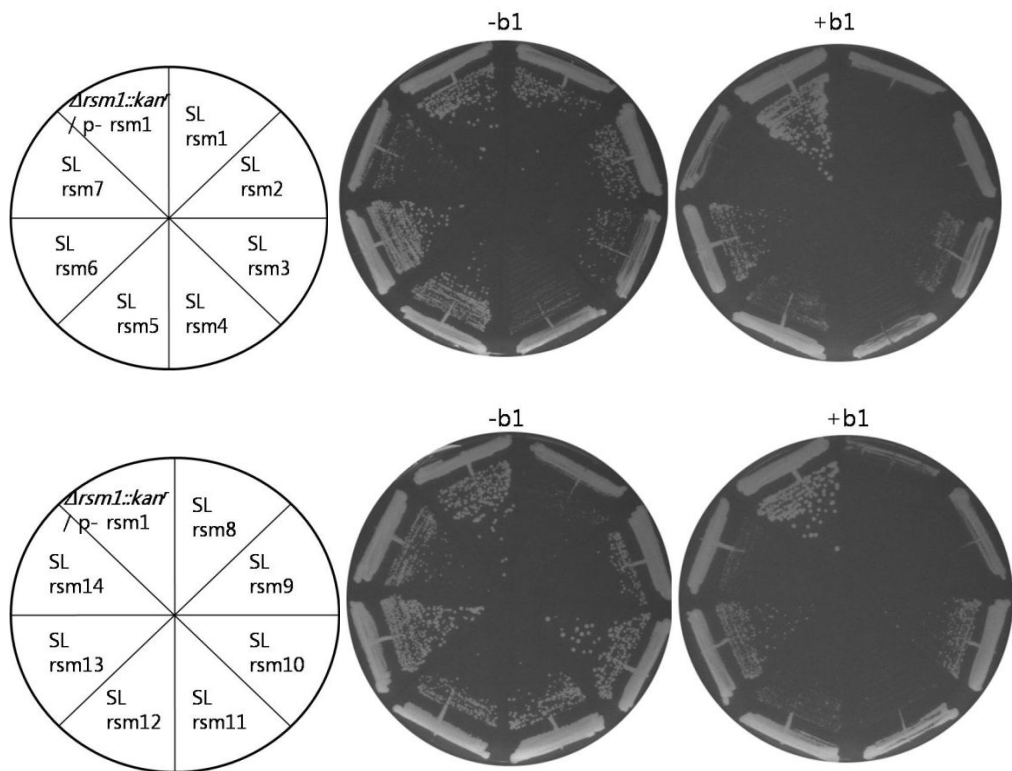
합성치사 돌연변이 선별을 위한 돌연변이 유발 실험을 위해, 먼저 모균주를 3% EMS로 3시간 동안 처리하여 적정 배지에 접종한 후 27°C에서 배양하였다. 약 4일 후에 콜로니(colony)가 작게 보이면, 티아민이 들어있는 배지와 티아민이 없는 배지에 각각 replica를 떠서 27°C에서 배양하였다. 합성치사 돌연변이의 선별을 쉽게 하기 위해 배지에 phloxineB를 첨가하였다. 살아있는 세포들은 phloxineB를 세포 밖으로 배출하므로 색깔이 연한 분홍색을 띠지만, 죽은 세포들은 진한 붉은색을 띤다. 7일간 배양한 후, 티아민이 들어있지 않은 배지에서는 콜로니 크기가 정상적인 것과 비슷하고 색깔이 연한 분홍색을 띠지만, 티아민이 들어있는 배지에서는 콜로니 크기가 작고 진한 붉은색 띠는 것들을 선별하였다. 총 320,000여 개의 콜로니를 분석하여 1차로 25개를 선별하였다(자료 미제시).

이렇게 선별한 균주들은 티아민이 들어있거나 또는 없는 배지에 다시 streaking하여 27°C에서의 성장 정도를 확인하였다. 대조균인 모균주는 티아민의 존재 유무에 상관없이 잘 성장하지만, *rsm1*의 발현이 억제되는 (티아민이 들어있는) 배지에서의 생장이 *rsm1*이 발현되는 (티아민이 없는) 배지에 비해 느린 균주 14개를 2차로 선별하여 SLrsm1~14로 명명하였다 (Fig. 3A). Figure 3A에서 보듯이, SLrsm1, 2, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14이 다른 균주에 비해서 티아민에 의한 성장 속도 차이가 많이 나는 것을 볼 수 있었다. 이 균주들의 성장속도의 차이를 명확하게 보기 위해 spot assay를 실시하였다(Fig. 3B). 일반적으로 티아민이 들어있는 배지에서의 성장속도가 조금 더 빠르기 때문에 티아민이 들어있지 않는 배지를 1일 더 배양하여 두 배지에서의 차이를 보정하였다. Figure 3B의 spot assay를 통해서 확인해 봤을 때는 10배에서 1000배 정도의 차이를 보였다. 티아민의 유무에 따라 100배 이상으로 차이가 나는 균주는 SLrsm5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14이다.

또한 현미경으로 각 균주들을 관찰하였을 때 정상적인 형태를 보이는

균주가 대부분이었으나, 모균주에 비해 비정상적인 세포의 비율이 높은 균주들도 있었다. 특히, SLrsm3 균주는 긴 것, 구부러진 것, 동그란 것, 부푼 것, 세포분열에 이상이 있는 것 등의 전반적으로 비정상적인 형태를 보였다.

(A)



(B)



**(B) continued.**

- B<sub>1</sub>

+ B<sub>1</sub>



**Figure 3. Growth test for synthetic lethal mutants**

(A) Growth of synthetic lethal mutants. *Δrsm1::kan<sup>r</sup>* – pREP81x-rsm1 is control. Cells were streaked onto EMM medium with and without thiamine. The plates were incubated by 5days minimal medium(EMM) with thiamine(B<sub>1</sub>) presence condition and 6days minimal medium(EMM) with thiamine(B<sub>1</sub>) absence condition at 28°.

(B) The plates were incubated by 5days minimal medium(EMM) with thiamine(B<sub>1</sub>) presence condition and 6days minimal medium(EMM) with thiamine(B<sub>1</sub>) absence condition at 28°. *Δrsm1::kan<sup>r</sup>* – pREP81x-rsm1 is control. *Δrsm1::kan<sup>r</sup>* – pREP81x-rsm1 and synthetic lethal mutants were spotted in 10-fold serial dilutions onto EMM plates in the absence of thiamine(B<sub>1</sub>) or in the presence thiamine(B<sub>1</sub>). Synthetic lethal mutants seen growth defect on minimal medium(EMM) with thiamine(B<sub>1</sub>) presence condition.

### 3. 선별한 돌연변이 균주의 상보(complementation) 확인.

선별한 돌연변이 균주들 중에서 잘못된 균주를 찾기 위해서 *nmt1* 프로모터에 조절 받지 않는 플라스미드인 pDW232에 *rsm1*을 넣어서 제조한 pDW232-*rsm1*를 선별한 돌연변이 균주들에 형질전환하여 티아민이 들어있는 배지에서도 잘 자라는지를 확인하였다(Table 5). 확인에 사용한 모든 플라스미드에는 uracil 합성유전자가 들어있기 때문에 EMM-U 배지에서 배양하였으며, 티아민을 첨가한 것과 첨가하지 않은 배지에 나누어 접종하였다. 티아민에 조절 받지 않는 플라스미드는 티아민의 유무에 상관없이 발현되고, 성장 정도가 티아민과 상관없이 비슷하다면, 이는 *rsm1* 유전자가 상보(complementation)하고, 즉 *rsm1*에 대한 합성치사가 맞고 유전적, 기능적으로 관여한다는 가능성을 암시한다. 이외에도 보유하고 있는 다른 유전자들과 상보하는 것을 찾기 위해서 *sub2*, *pabp*, *mlo3*, *snz1*, *dbp5*가 들어있는 pDW 232 와 *gle1*, *nup97*, *mex67*, *nup184*, *rae1*이 들어있는 플라스미드를 형질전환하였고 대조군으로는 빈 pDW 232 를 사용하였다. 이 유전자들은 mRNA export에 관여되어있다고 알려진 유전자로서 이를 이용하여 *rsm1*의 합성치사로서 찾아낸 돌연변이 균주와 상보하는 유전자를 확인하였고, 이는 추후에 관련된 기능을 찾을 수 있기 때문이다. 대조군과 비교했을 때 *rsm1*과 상보를 보이는 것은 SL *rsm2*~9, SL *rsm11*, SL *rsm13*, SL *rsm14*이다(자료 미제시). 다른 유전자와의 상보관계를 보았을 때 대체로 대조군에 비해 *mex67*, *rae1*, *gle1*에 강한 상보성을 보였다. SL *rsm1*은 대조군과 비교했을 때 *gle1*이 다른 유전자에 비해서 강한 상보성을 보였고, 티아민을 첨가한 배지에서 잘 자라지 못했다. SL *rsm2*~6, SL *rsm8*~14는 대조군과 비교했을 때 *mex67*, *gle1*, *rae1*에 강한 상보성을 보였다. *mex67*, *gle1*에 비해서 *rae1*이 그 정도가 약했다. SL *rsm7*은 모든 유전자에 약한 상보를 보였고 *mex67*, *gle1*, *rae1*, *pabp*,

*mlo3*가 다른 유전자에 비해서 약간의 관련이 있는 것으로 보인다. SL rsm5의 경우 *mlo3*에 상보를 보이는데, *mlo3*는 다른 균주에서 상보가 약하다. 이는 SL rsm5는 *mlo3* 유전자와 연관이 있을 가능성을 보인다. SL rsm4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14는 *snz1*와 상보를 보인다. 대체로 *pabp*, *dbp5*, *sub2*, *nup184*, *nup97*은 다른 유전자에 비해 상보가 약하고 유전적으로 관련이 적다고 사료된다(자료 미제시). *rsm1*에 상보를 보이는 균주가 다른 균주에 비해서 *mex67*, *rae1*, *gle1* 유전자에 대해서 상보를 더 강하게 보였고, *snz1*와도 다른 균주에 비해서 더 강한 상보를 보인 것으로 보아 연관이 있다고 사료된다.

Table 5. Results of mRNA export factors genes complementation.

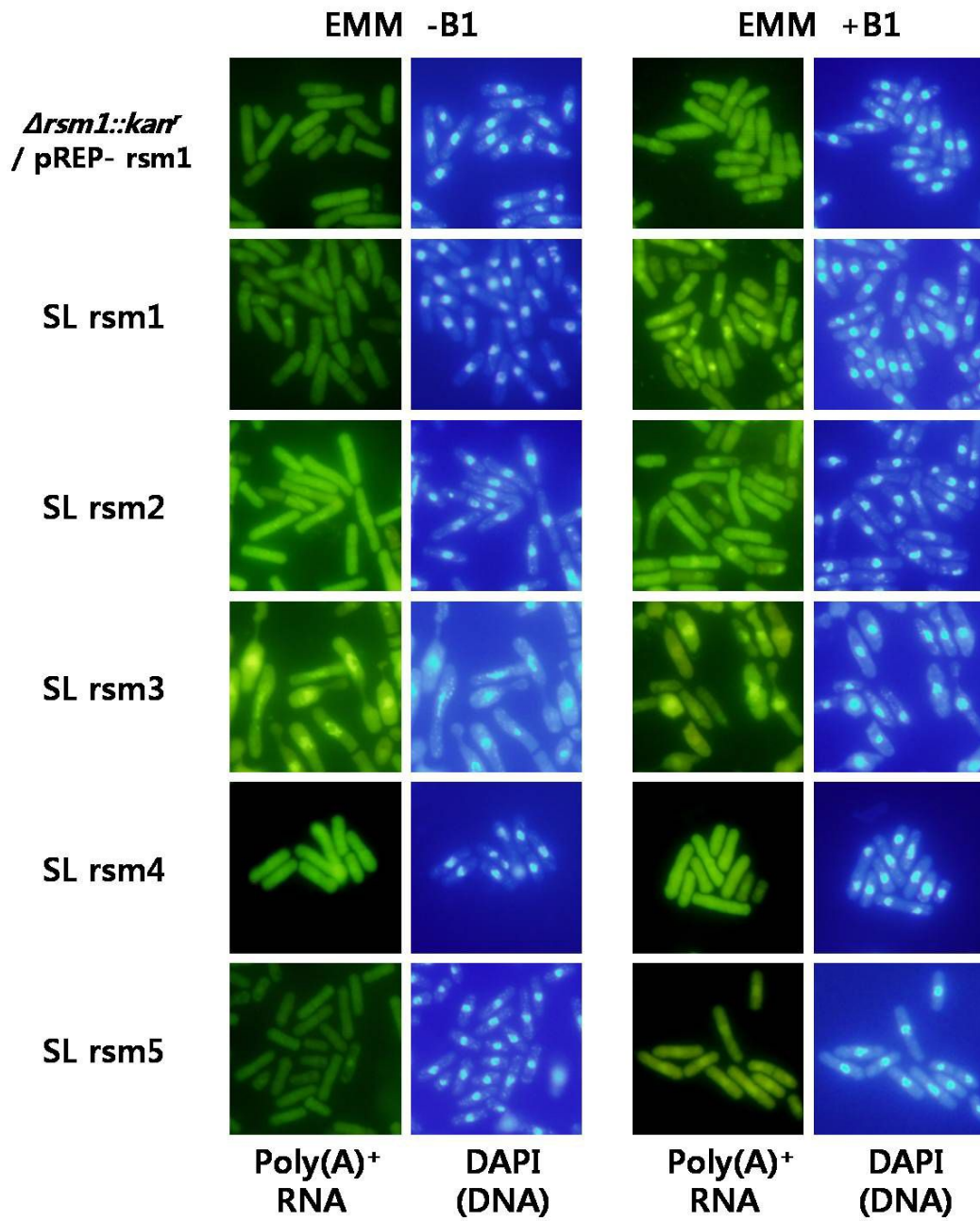
	pDW	Mex67	Rae1	Gle1	Snz1
<i>Δrsm1::kan<sup>r</sup></i> /81X-Rsm1	+++	+++	+++	+++	++
SL rsm1	-	+	+	+	+
SL rsm2	-	+	+	+	+
SL rsm3	-	+	+	+	+
SL rsm4	-	++	+	+	+
SL rsm5	-	+++	+++	+++	++
SL rsm6	+	+++	+	+++	++
SL rsm7	-	+	+	+	-
SL rsm8	-	+	+	+	+
SL rsm9	-	++	+++	+++	++
SL rsm10	-	+++	++	+++	++
SL rsm11	-	++	+	+	+
SL rsm12	-	+++	++	+++	++
SL rsm13	+	++	+	+++	++
SL rsm14	-	+++	++	+++	++

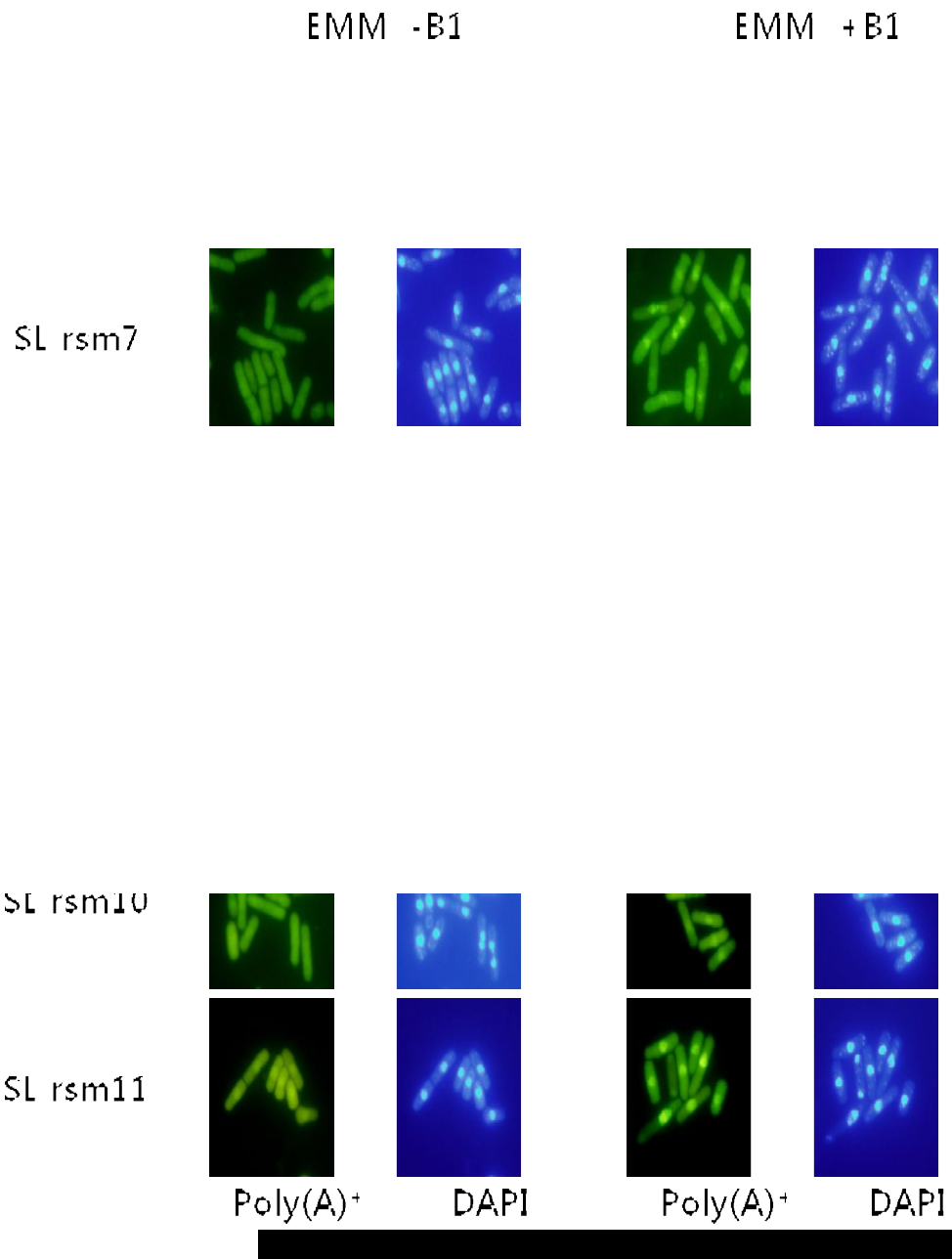
#### 4. 선별한 돌연변이 균주의 mRNA export 결함 조사.

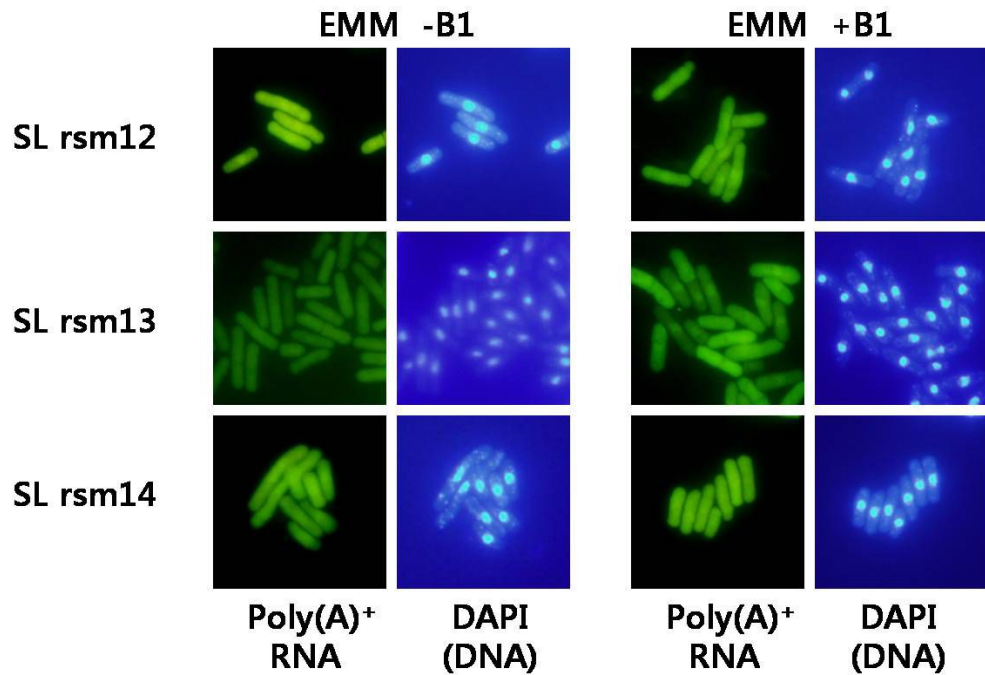
선별한 돌연변이 균주들이 mRNA export에 관여하는지를 알아보하고자 *in situ* hybridization을 통해 돌연변이 균주의 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 분포를 조사하였다(Fig. 4). mRNA export에 결함이 없는 정상 세포에서는 mRNA가 단백질로 발현되기 위하여 세포질로 이동하게 되므로, Poly(A)<sup>+</sup>RNA 분포가 세포 전체에 균일하게 나타난다. 하지만 mRNA export에 결함을 보이는 돌연변이 균주에서는 mRNA가 세포질로 빠져나가지 못하고 핵 안에 축적된다.

선별한 돌연변이 균주들 중에 SL rsm1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13은 티아민이 존재하지 않을 때는 결함이 보이지 않거나 약한 결함만을 보였으나, 티아민이 존재할 때 Poly(A)<sup>+</sup>RNA가 핵 내에 머물러 있는 mRNA export defect를 보였다. 이 중에서 SL rsm8, 12는 티아민이 존재할 때 결함을 보이는 다른 균주들보다 mRNA export defect가 약했다. 또한 SL rsm3은 티아민의 존재와 상관없이 mRNA export defect를 보였고 세포 모양이 비정상적이었다. 그러나 SL rsm4, 14는 티아민이 존재할 때 mRNA export defect를 보이지 않았는데, mRNA export에 관여하지 않지만 생장에 영향을 끼치는 유전자에 돌연변이가 일어났을 것이라고 사료된다. SL rsm11의 경우 티아민이 없는 배지에서도 결함을 보였으나 티아민이 있는 배지에서 강한 결함을 보여 *rsm1*뿐만 아니라 mRNA export에 관련된 다른 중요한 유전자에 돌연변이가 일어났을 가능성이 있다.

14개의 균주들 중에서 mRNA export에 관여하고 *rsm1*에 합성치사를 보이는 유력한 돌연변이 균주 4개를 선별하였고 이는 SL rsm2, SL rsm6, SL rsm11, SL rsm13이다.







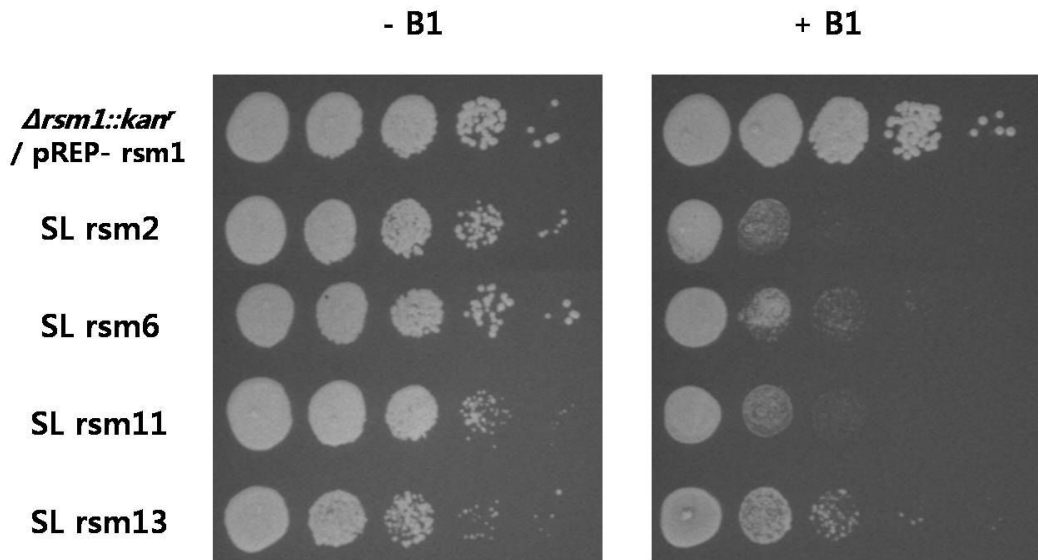
**Figure 4. Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization of synthetic lethal mutants**

Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization by In situ hybridization. Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization in synthetic lethal mutants. Mutants were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) or in the presence of thiamine (+B1) for 18h. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

5. 선별한 돌연변이 균주의 확인.

36

14개의 균주들 중에서 mRNA export에 관여하고 합성치사 조건에서 성장 억제가 유력해 보이는 돌연변이 균주 4개, SLrsm2, SLrsm6, SLrsm11, SLrsm13를 골라  $h^+$   $\Delta rsm1::kan^r$ /pREP81X-rsm1 균주와 교배시켜 관련이 없는 돌연변이를 제거하고자 하였다. 교배하여 얻은 포자 중에서 여전히 합성치사 조건에서만 생장이 억제되는 균주들을 선별하여 조건(티아민이 들어있는 배지)에서 억제되는 성장 정도를 확인한 결과, 모균주인 SLrsm 균주들보다 더 뚜렷한 생장의 차이를 보였다(Fig. 5, Fig. 3과 비교). *rsm1* 유전자와 관련이 없는 돌연변이를 제거함으로써, 티아민이 없는 배지에서 잘 자라고, 티아민이 들어있는 배지에서 모균주보다 성장 정도가 더 느려졌다.



**Figure 5. Growth test for synthetic lethal mutants**

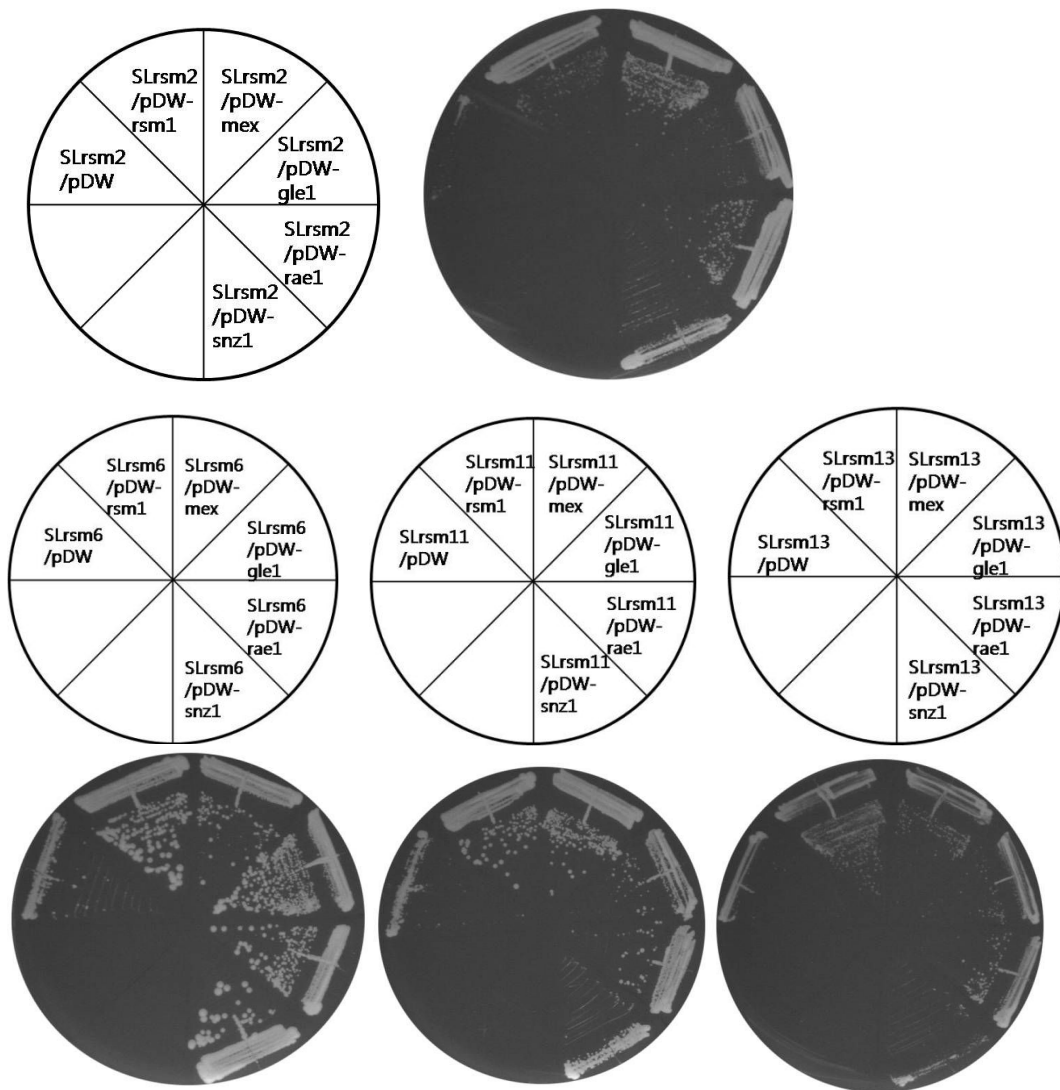
The plates were incubated by 5days minimal medium(EMM) with thiamine( $B_1$ ) presence condition and 6days minimal medium(EMM) with thiamine( $B_1$ ) absence condition at 28°.  $\Delta rsm1::kan^r$  - pREP81x-rsm1 is control.

이렇게 정제된 돌연변이 균주들도 *rsm1* 결실대립유전자와 여전히 관련이 있는지를 확인하기 위해, pDW232-rsm1을 형질전환하여 티아민이 들어있는

배지에서도 잘 자라는지를 확인하였다(Fig. 6). 또한 mRNA export에 관여한다고 알려진 유전자들 중에서 *mex67*, *rae1*, *gle1*, *snz1*을 형질전환하여 상보성을 확인하였다(Fig. 6). SLrsm2의 경우는 대부분 약한 상보성을 보였고, 대조군보다 *rsm1*, *mex67*, *rae1*이 상보적이었다. SLrsm6의 경우는 대조군(빈 pDW232)보다 *rsm1*, *mex67*, *rae1*, *gle1*, *snz1*이 상보하였는데, 다른 균주에 비해서 강하게 상보하였다. SLrsm11의 경우는 대조군에 비해서 *rsm1*, *mex67*, *rae1*, *gle1*에 상보를 보이고, *snz1*는 상보를 보이지 않았다. SLrsm13의 경우는 대부분 약한 상보성을 보였으나, *rsm1*, *mex67*, *rae1*이 상보하였다. 원래의 돌연변이 균주들은 *rsm1*에 약하게 상보하였으나 교배 후의 돌연변이 균주들은 더 강하게 상보하였다.

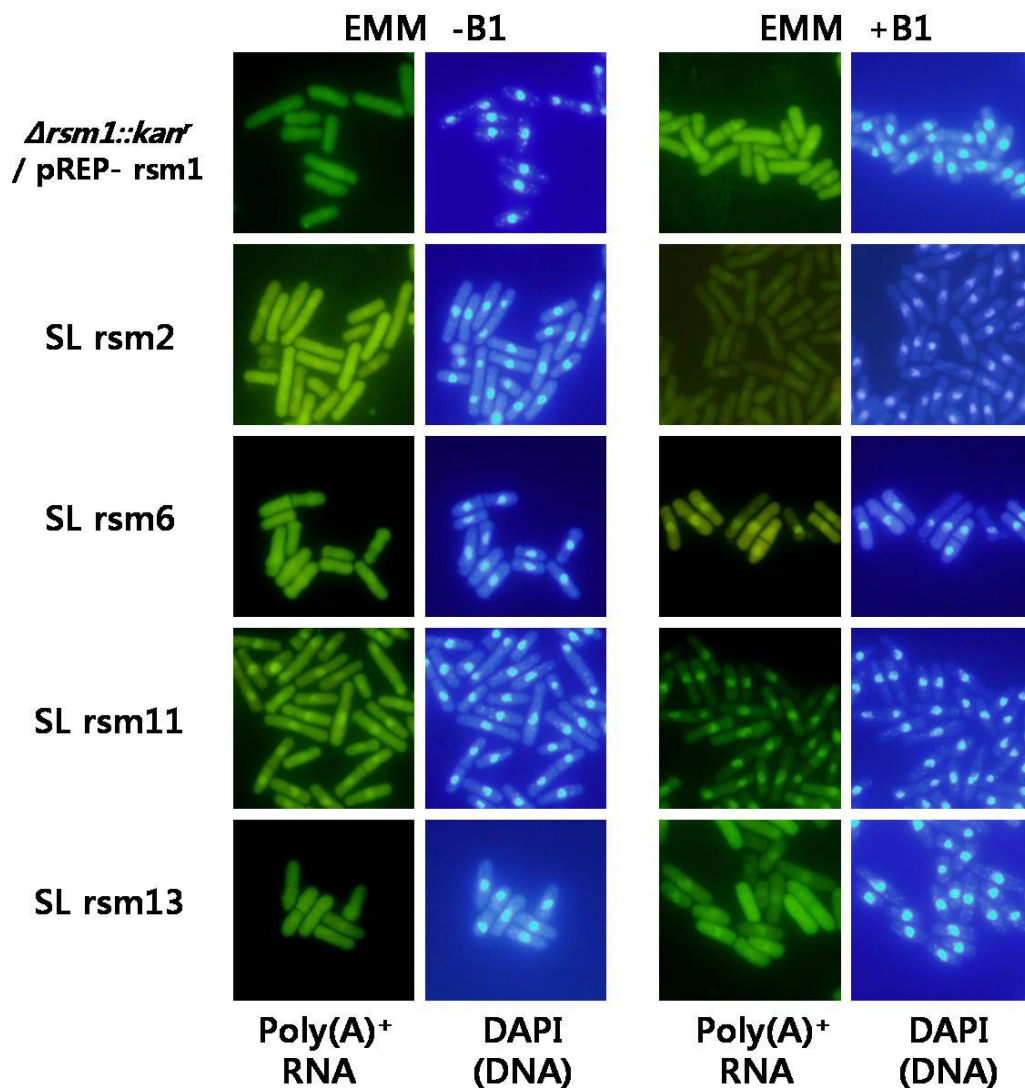
선별한 돌연변이 균주들이 mRNA export에 관여하는지를 알아보하고자 *in situ* hybridization을 통해 돌연변이 균주의 poly(A)<sup>+</sup> RNA의 분포를 조사하였다(Fig. 7). SLrsm2, SLrsm6, SLrsm11는 정제 전 보다 mRNA export 결함이 더 뚜렷하게 보였지만 SLrsm13은 전과 비슷하였다.

spot assay와 streaking을 이용한 합성치사 조건에서 성장 정도(Fig. 5), *rsm1*과 mRNA export에 관여한다고 알려진 다른 유전자의 형질전환을 이용한 상보관계(Fig. 6), mRNA export의 결함(Fig. 7)을 확인한 결과, SLrsm2, 6, 11, 13의 돌연변이 대립유전자들이 각각 *rsm1* 결실대립유전자와 합성치사를 보이고 mRNA export에 관여할 가능성이 높은 유력한 균주들이다 (Table 6).



**Figure 6. Results of mRNA export factors genes complementation.**

Cells were streaked onto EMM medium with thiamine. The plates were incubated by 6days minimal medium(EMM) with thiamine(B1) presence condition at 28°. pDW232 is control.



**Figure 7. Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization of synthetic lethal mutants**

Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization by In situ hybridization. Poly(A)<sup>+</sup> RNA localization in synthetic lethal mutants. Mutants were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine or in the presence of thiamine for 18h. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

Table 6. Summary of mRNA export factors genes complementation.

	SL rsm2	SL rsm6	SL rsm11	SL rsm13
Growth Rate	+++	+++	+++	++
pDW	-	-	-	+
Rsm1	+	+++	++	++
Mex67	+++	+++	++	++
Rae1	+++	+++	++	++
Gle1	+	+++	+	++
Snz1	+	+++	-	+
mRNA export defect	+	++	+++	+

## IV. 토의

분열효모에서 mRNA export 운반체(carrier)로 여겨지는 *mex67*의 결실돌연변이인  $\Delta mex67$  대립유전자와 합성치사(synthetic lethality)를 보이는 돌연변이 균주들을 선별하였으며, 이렇게 선별한 합성치사 돌연변이를 이용하여 *rsm1* 유전자를 클로닝 하였다(Yoon *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2004). *rsm1* 유전자는 인트론이 없고 296개의 아미노산을 암호화하고 있으며, Rsm1 단백질의 예상 분자량은 34.6 kDa이다. *rsm1* 유전자는 생장에 필수적이지는 않으나 이 유전자가 결실된 균주의 성장 속도는 야생형에 비해 느렸고, 결실돌연변이는 mRNA export에 결함을 보인다(Kang *et al.*, 2008).

본 연구에서는 mRNA export에 관여하는 새로운 export 인자들을 찾기 위해 *rsm1* 결실돌연변이 균주를 돌연변이원(EMS)으로 처리하여  $\Delta rsm1$  대립유전자와 합성치사를 보이거나 생장에 결함을 보이는 돌연변이들을 선별하였다.

각각의 유전자 하나에만 돌연변이가 따로 일어났을 때는 생장에 영향을 미치지 않지만, 두 유전자 모두에 돌연변이가 생기면 cell이 죽어 버리는 것을 합성치사라고 한다. 이렇게 합성치사를 보이는 두 유전자는 기능적으로 연관되어 있다. 합성치사 돌연변이의 선별을 쉽게 하기 위해 배지에 phloxineB을 첨가하였고, 티아민을 첨가한 배지와 없는 배지를 이용하였다. 약 32만 개의 콜로니를 분석하여 생장에 결함을 보이는 돌연변이 균주 25개를 1차로 선별하였다. 합성치사 조건에서(티아민이 들어있는 배지) streaking했을 때 생장이 억제되는 14개를 2차로 선별하였다. spot assay를 통해서 확인해 봤을 때는 SLrsm5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14이 10배에서 1000배 정도의 차이를 보였다.

선행 연구에서 티아민을 넣어 플라스미드의 *rsm1*의 발현을 억제하더라도

*rsm1* 결실 돌연변이의 성장 정도는 야생형과 비슷하였다. 이 결과는 티아민에 의해 *rsm1*의 발현이 억제되어 basal level로 *rsm1*이 발현되더라도 성장 속도를 회복하는 데는 지장이 없음을 의미하며, 세포 안에서 Rsm1은 소량만으로도 성장에는 충분한 기능을 하는 것으로 사료된다(Kang et al.,2008). 돌연변이 유발을 하기 전에 확인하였을 때도 위의 내용과 같은 형태를 보였고 선별한 돌연변이 균주도 티아민에 의한 차이가 10배~1000배 정도의 차이를 보일 뿐 티아민이 들어있는 배지에서 죽지 않았다.

또한 현미경으로 각 균주들을 관찰하였을 때 정상적인 형태를 보이는 균주가 대부분이었으나, 모균주에 비해 비정상적인 세포의 비율이 높은 균주들도 있었다. 특히, SLrsm3 균주는 긴 것, 구부러진 것, 동그란 것, 부푼 것, 세포분열에 이상이 있는 것 등의 전반적으로 비정상적인 형태를 보였다. 이러한 결과는 돌연변이가 많은 부분에 일어나 전반적인 단백질의 합성이 감소하고, mRNA export에 결함이 생겨서 세포주기, 형태 등 여러 가지 결함이 발생하는 빈도가 증가하여 전반적인 생장이 느려지는 것으로 사료된다.

이렇게 선별한 돌연변이 균주를 *rsm1*과 mRNA export에 관여한다고 알려진 다른 유전자인 *sub2*, *pabp*, *mlo3*, *snz1*, *dbp5*, *gle1*, *nup97*, *mex67*, *nup184*, *rae1*을 형질전환하여 상보관계를 확인하였다(Table 5). 그 결과 SLrsm2~9, 11, 13, 14가 *rsm1*과 상보하고, 대체로 *gle1*, *mex67*, *rae1*과 상보하였다. *rsm1*에 상보를 보이는 균주가 다른 균주에 비해서 *mex67*, *rae1*, *gle1* 유전자에 대해서 상보를 더 강하게 보였고, *snz1*과도 다른 균주에 비해서 더 강한 상보를 보인 것으로 보아 multicopy suppressor로서 작용할 가능성이 있고 돌연변이 된 유전자가 이들 유전자와 연관되어 있다고 사료된다.

선별한 돌연변이 균주들 중에 mRNA export에 관여하는지를 알아보하고자 *in situ* hybridization을 통해 돌연변이 균주의 Poly(A)<sup>+</sup>RNA 분포를

조사하였다(Fig. 4). mRNA export의 결함을 보이는 것은 SLrsm1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13이다. 그러나 SLrsm4, 14는 티아민이 존재할 때 mRNA export defect를 보이지 않았는데, mRNA export에 관여하지 않지만 생장에 영향을 끼치는 유전자에 돌연변이가 일어났을 것이라고 사료된다. SLrsm3은 티아민의 존재와 상관없이 mRNA export 결함을 보였고 세포 모양이 비정상적이었다. 이는 mRNA export에 관여하는 유전자뿐 아니라 세포구조나 분열에 관여하는 유전자의 많은 부분에 돌연변이가 일어났을 가능성이 있다. SLrsm11의 경우 티아민이 없는 배지에서도 결함을 보였으나 티아민이 있는 배지에서 더 강한 결함을 보여 *rsm1*뿐만 아니라 mRNA export에 관련된 다른 중요한 유전자에 돌연변이가 일어났을 가능성이 있다. 앞서 수행한 실험에서 상보관계를 봤을 때, *rsm1*과 상보하지 않았던 SLrsm1, 10, 12는 mRNA export의 결함을 보이는 것으로 보아 mRNA export와 관련된 다른 유전자에 연관되어 있을 가능성을 암시한다.

14개의 균주들 중에서 유력한 돌연변이인 SL *rsm2*, 6, 11, 13을 *rsm1* 결실돌연변이의  $h^+$  strain과 유전적 교배를 통해서 합성치사를 보이는 형질을 더 뚜렷하게 하였다. 교배한 균주를 이용하여 spot assay와 streaking을 이용한 합성치사 조건에서 성장 정도(Fig. 5), *rsm1*과 mRNA export에 관여한다고 알려진 다른 유전자의 형질전환을 이용한 상보관계(Fig. 6), mRNA export의 결함(Fig. 7)을 확인한 결과, SLrsm2, 6, 11, 13이 *rsm1*과 합성치사를 보이고 mRNA export에 관여하는 유력한 돌연변이로 여겨진다. SLrsm13의 경우는 다른 균주에 비해서 그 정도가 약했다. 이는 mRNA export에 관련이 있지만 생장에 필수적이지 않은 유전자에 돌연변이가 일어났을 가능성이 있다.

앞으로 이렇게 선별한 돌연변이 균주에 cognate 유전자와 multicopy suppressor 유전자들을 클로닝하여 분석하고 결실돌연변이를 제조하여

표현형을 관찰하고 등, 이러한 유전자들의 기능을 알아내기 위한 기본적인 기능분석을 통해 새로운 mRNA export 인자들을 밝혀내는 연구가 진행되어야 한다.

분열효모인 *S. pombe*에서 Rsm1 단백질은 출아효모인 *S. cerevisiae*의 Pml39 단백질과 유사성을 갖는다. Pml39는 Mlp1, Mlp2와 상호작용하여 improper mRNA 의 retention에 관여한다고 알려져 있다(Palancade et al., 2005). 분열효모에서 Nup211 단백질은 출아효모의 Mlp1 단백질과 유사성을 보인다. 또한 출아효모에서 Mlp1과 Nab2의 상호작용은 mRNA의 nuclear export에 매우 중요한 역할을 하고 있다. *rsm1*과 관련된 SLrsm2, SLrsm6, SLrsm11, SLrsm13이 분석을 통해 새로운 유전자들이 밝혀지면, 추후에 분열효모에서도 Nup211, Nab2와 상호작용을 하는지에 대한 내용과 Rsm1의 새로운 기능과 연관성, improper mRNA의 retention에 관여하는지에 관한 연구가 진행되어야 한다.

## 참 고 문 헌

- Alcazar-Roman, AR., Tran, EJ., 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.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, K., Mcleod, M., and Warbrick, E. 1993. Experiments with fission yeast. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY, USA.
- Bae, J.A., Cho, H.J., and Yoon, J.H. 2008. Construction of spDbp5 Null mutants defective in mRNA export. *J Microbiol.* 44, 80-84.
- Bae, J.A., Moon, D., and Yoon, J.H. 2009. Nup211, the fission yeast homolog of Mlp1/Tpr, is involved in mRNA export. *J Microbiol.* 47, 337-343.
- Carmody, S.R., and Wentz, S.R. 2009. mRNA nuclear export at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 1933-1937
- Casolari, JM., Brown, CR., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., Silver, P. 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell.* 117, 427-439.
- Casolari, JM., and Silver, PA. 2004. Guardian at the gate: preventing unspliced pre-mRNA export. *Trends Cell Biol.* 14, 222-5.
- Caspari, T., Dahlen, M., Kanter-Smoler, G., Lindsay, H.D., Hofmann, K., Papadimitriou, K., Sunnerhagen, P., and Carr, A.M. 2000. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-Related Protein That Associates with Rad1 and Rad9. *Mol. Cell Biol.* 20, 1254-1262.
- Chen, XQ., Du, X., Liu, J., Balasubramanian, MK., Balasundaram, D. 2004. Identification of genes encoding putative nucleoporins and transport factors in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a deletion analysis. *Yeast.* 6, 495-509.

- Cole, C.N., and Scarcelli, J.J. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Cell Biol.* 18, 299–306.
- Cole, C.N., and Scarcelli, J.J. 2006. Unravelling mRNA export. *Nature Cell Biol.* 8, 645–647.
- Cronshwa, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., and Matunis, M.J. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158, 915–927.
- Davis, L.I. 1995. The nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem.* 64, 865–896.
- Fahrenkrog, B., Maco, B., Fager, A.M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K.S., and Aebi, U. 2002. Domain-specific antibodies reveal multiple site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* 140, 254–267.
- Fasken, M.B., and Corbett, A.H. 2005. Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nature Struct Mol. Biol.* 12, 482–488.
- Forsburg, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21, 2955–2966.
- Fried, H., and Kutay, U. 2003. Nucleocytoplasmic transport: Taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1659–1688.
- Kang, S.K., and Yoon, J.H. 2008. Genetic analysis of fission yeast *rsm1* which is involved in mRNA export. *J Microbiol.* 44, 98–104.
- Köhler, A., and Hurt, E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 761–773.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *GENE.* 123, 127–130.
- Michael, P. Rout., and John, D. Aitchison. 2001. The Nuclear Pore Complex as a Transport Machine. *Mol Cell Biol.* 276, 16593–16596

- Moon, D., Bae, J.A., Cho, H.J., and Yoon, J.H. 2008. The fission yeast homologue of Gle1 is essential for growth and involved in mRNA export. *J Microbiol.* 46, 422–428.
- Moore, M.J. 2005. From birth to death: the complex life of mRNAs. *Science.* 309, 1514–1518.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. 1991. Molecular genetics analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795–823.
- Palancade, B., Zuccolo, M., Loeillet, S., Nicolas, A., and Doye, V. 2005. Pml39, a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoparticles. *Mol. Biol. Cell.* 16, 5258–52
- Paulillo, S.M., Phillips, E.M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K.S., Powers, M.A., and Fahrenkrog, B. 2005. Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J. Mol. Biol.* 351, 784–798.
- Rachel, A.C., Dominic, J.F.G., Katherine, S.S., Richard, E.R., Iain, M.H., and Antony, M.C. 1998. Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *GENE.* 221, 59–68.
- Reed, R., Hurt E. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell.* 108, 523–531.
- Robert, F. Service. 2008. NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY : Three Scientists Bask in Prize's Fluorescent Glow. *Science.* 322, 361.
- Rout, M.P., and Wentz, S.R. 1994. Pores for thought: Nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4, 357–365.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison., A. Suprapto., K. Hjertaas., Y. Zhao., and B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148, 635–651.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, New

York, N. Y., USA.

Stewart, M. 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 195–208

Tran, E.J., and Wente, S.R. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell.* 125, 1041–53.

Weirich, C.S., Erzberger, J.P., Flick, J.S., Berger, J.M., Thorner, J., Weis, K. 2006. Activation of the DExD/ H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nature Cell Biol.* 8, 668–676.

Weis, K. 2002. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking cross the border. *Curr Opin Cell Biol.* 14, 328–335.

Whalen, W.A., Yoon, J.H., Shen, R., and Dhar, R. 1999. Regulation of mRNA export by nutritional status in fission yeast. *Genetics.* 152, 827–838.

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

Yoon, J.H. 2004. Schizosaccharomyces pombe rsm1 genetically interacts with spmex67, which is involved in mRNA export. *J Microbiol.* 42, 32–36.

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

Yoon, J.H., Whalen, W.A., Bharathi, A., Shen, R., Dhar, R. 1997. Npp106p, a Schizosaccharomyces pombe nucleoporin similar to Saccharomyces cerevisiae Nic96p, functionally interacts with the Rae1p in mRNA export. *Mol Cell Biol.* 17, 7047–7060.

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

## Abstract

### Screening of synthetic lethal mutants with *rsm1* null allele involved in mRNA export in fission yeast.

Moon Dong Ge Ra Mi

Department of Biology

Graduate School

Sungshin Women's University

In order to identify the genes in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that are functionally involved in mRNA export, mutants that showed growth retardation or synthetic lethality with the *rsm1* null allele were isolated and characterized.

For this screening, we used the  $\Delta rsm1$  null mutant harboring the pREP81X-*rsm1* vector, where the expression of *rsm1* is repressed in the presence of thiamine. This strain was mutagenized with EMS and approximately 320,000 colonies were analyzed. The dye phloxineB was added into media to easily identify the synthetic lethal mutants. The mutant colonies that showed growth defects only in the presence of thiamine were screened at 27°C. Fourteen mutant cells were finally isolated in this screening and tentatively named as SL*rsm1* through SL*rsm14*. Vectors containing the genes known to be involved in mRNA export were transformed into these SL*rsm* mutant cells and checked whether these genes could complement the growth defects of these

mutants in the presence of thiamine. Among these mutants, SLrsm2~9, 11, 13, 14 were complemented by *rsm1*, *gle1*, *mex67*, *rae1*, *snz1* genes. The accumulation of poly(A)<sup>+</sup> RNA in the nucleus is exhibited in SLrsm1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13.

Four mutants (SLrsm2, 6, 11, 13) that showed better synthetic lethal phenotype and more severe defects in mRNA export were selected, and mated with the original *h<sup>+</sup> Δrsm1* null strain to clear up the background mutation. Through random spore analysis, the resulting colonies with synthetic lethal phenotype were selected and characterized once more.

These results suggest that SLrsm2, 6, 11, 13 isolated in fission yeast interacted genetically with *rsm1* and were defective in mRNA export.

## 감사의 글

대학원에 입학한 날이 엇그제 같은데 벌써 졸업을 한다니 2년의 시간이 빨리 지나간 것 같습니다. 2년 동안의 대학원 생활은 많은 경험을 얻을 수 있는 값진 시간이었습니다.

먼저 석사학위논문을 마칠 수 있도록 도와주신 분들께 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 항상 관심을 갖고 저에게 많은 가르침을 주시고 지도해 주시는 윤진호 교수님께 감사 드립니다. 부족한 저를 이끌어 주신 점, 많은 가르침을 잊지 않고 앞으로 나아가는데 좋은 밑거름이 되도록 노력하겠습니다. 그리고 논문심사를 해주신 박성순 교수님, 고려대 윤철원 교수님께 감사 드립니다.

학부시절에 많은 가르침을 주신 배인하 교수님, 오용자 교수님, 김진일 교수님, 지금까지도 항상 관심 가져 주시고 좋은 말씀해주신 박경숙 교수님, 강혜순 교수님, 전용필 교수님, 김인순 교수님께도 감사 드립니다. 그리고 켈 형광분석기 사용에 도움을 주신 김상태 교수님 감사합니다. 학부시절 연수생으로 있으면서 많은 가르침을 주시고 도움을 주신 KIST 류재천 박사님, 김연정 박사님께 감사 드립니다. 또한 대학원 강의를 해주신 김정훈 교수님 감사합니다. 김아영 선생님께도 감사 드립니다.

저를 뒤에서 응원해주신 부모님께 감사 드립니다. 부족한 큰딸이지만 앞으로 더 열심히 노력해서 멋진 딸이 될게요. 제가 무뚝뚝해서 표현을 잘 못하지만 진심으로 사랑하고 존경합니다. 그리고 힘들 때 나 기쁠 때나 항상 옆에 있어준 동생들, 한소리, 푸름이 정말 고맙고 힘들 때 많이 도와주고 기쁠 때 더 기뻐해주는 든든한 언니가 될게. 그리고 엄마같이 생각하는 둘째 이모, 어렸을 때부터 많은 사랑과 관심을 주신 점 정말 감사 드리고 앞으로 더 잘하는 착한 딸 될게요.

지금은 졸업했지만 대학원 1학기를 함께 보낸 덕경언니, 1년 동안 함께 지내면서 많은 실험을 가르쳐준 진아언니, 현진언니 고맙고, 특히 많이 힘들었을 텐데 항상 걱정해준 현진언니..언니 사랑 잊지 못할 거예요. 그리고 사랑스런 후배 윤선이..1년 동안 함께 하면서 정말 즐거웠고 많이 도와주고 잘 따라준 점 고마워, 더 잘해주고 싶은데 그러지 못한 점 미안하고 항상 고맙게 생각하고 있어. 또한 많은 도움을 준 지혜, 애리. 근로가 끝났는데도 와서 많이 도와주고 힘이 되어준 점, 힘들 때 옆에 있어준 점, 정말 고맙고 동생이지만 많이 의지했던 것 같아. 그리고 잊지 않고 와준 으뜸이, 지은이, 작년 여름에 함께 했던 보영이, 윤혜, 은서, 주영이, 근로였던 혜경이와 소영이, 혜지, 수현언니, 작년 겨울부터 함께한 혜성이, 슬아, 미생물학 실험에 함께 했던 후배들, 다른 연구실 식구들. 대학원 생활을 즐겁게 보낼 수 있게 도와줘서 고맙고 잊지 않을 게요.

힘들 때마다 옆에서 응원해준 내가 가장 사랑하는 보애언니, 윤지야. 바쁘다는 핑계로 잘 해주지도 못하는데 신경 써주고 힘이 되어줘서 고마워. 언니랑 윤지 덕분에 막막했던 일도 잘 해결할 수 있었던 것 같아. 사랑해. 그리고 나의 버팀목이 되어준 영태, 가끔씩 연락해서 힘을 준 지현, 선일, 아름, 구지, 은지, 혜인, 정아, 리영, 04학번 동기들, KIST 동기들. 고마워.

이 논문이 나오기까지 많은 도움을 주신 모든 분들께 감사하다는 말씀 전하고 싶습니다.