



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 방출과 연관된  
유전자 *rnr1*의 선별 및  
기능에 대한 연구

2015

성신여자대학교 대학원

생물학과

이현주

분열효모에서 mRNA 방출과 연관된  
유전자 *rnr1*의 선별 및  
기능에 대한 연구

윤진호 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2014년 11월

성신여자대학교 대학원

생물학과

이현주

# 인 준 서

이현주의 석사학위 논문으로 인준함

2014년 11월

심사위원장 \_\_\_\_\_ (인)

심 사 위 원 \_\_\_\_\_ (인)

심 사 위 원 \_\_\_\_\_ (인)

성신여자대학교 대학원

## 논문개요

분열효모에서 *nab2* 유전자와 합성치사(synthetic lethal)를 보이는 두 종류의 돌연변이체 SLN2와 SLN4 균주를 이용하여 *nab2*와 연관된 새로운 유전자를 탐색하는 실험을 수행하였다. SLN2와 SLN4 균주에 분열효모의 Genomic DNA library를 형질전환(transformation)시켜 합성치사 조건에서도 성장하는 형질전환체를 각각 117개, 213개 얻었고, 이로부터 각각 37개와 87개의 플라스미드를 추출하여 플라스미드에 존재하는 유전자들의 DNA 서열을 분석하였다. 이렇게 SLN2와 SLN4의 합성치사를 상보(complementation)하는 세 종류의 유전자 *rmr1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c* (*rmr1*으로 명명)을 최종적으로 선별하였다. 이 중에서 아직 연구되지 않은 유전자 *rmr1*의 기능을 알아보려고 하였다.

*rmr1* 유전자를 결실(deletion)시킨 균주( $\Delta rmr1$ )는 성장과 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출 (mRNA export)이 정상적이었다. 그러나, *rmr1* 유전자를 과발현(over-expression)시키면 성장 및 mRNA 방출에 결함을 나타내었으며, 살아있는 세포에서 Rmr1 단백질은 핵 안에 존재하는 것을 확인하였다. mRNA 방출에 중요한 유전자들과 *rmr1* 유전자와의 유전적 연관성을 알아보려고  $\Delta rmr1$ 과 함께  $\Delta nab2$ ,  $\Delta mex67$ , *rae1-167*, *sac3-3*,  $\Delta mlo3$ ,  $\Delta dss1$ 를 각각 가진 이중돌연변이 균주들을 제작하여 성장속도를 관찰하였다. 그 결과 최소배지에서  $\Delta nab2$ ,  $\Delta mex67$ , *rae1-167* 등의 성장 결함을  $\Delta rmr1$ 가 상보하는 것을 관찰하였다. 또한 완전배지에서  $\Delta mlo3$ 의 성장결함을  $\Delta rmr1$ 가 상보하였다. 하지만 Rmr1 단백질과 Nab2, Mex67, Rae1, Mlo3 등과의 *in-vivo*에서 물리적 상호작용을 co-immunoprecipitation 실험을 통해 확인할 수 없었다. 이러한 실험 결과들은 *rmr1*이 mRNA 방출에 있어

중요한 역할을 하는 *nab2*, *mex67*, *rae1*, *mlo3* 등의 기능을 음성적으로 조절하는 것으로 추측된다.

# 목 차

논문개요

목차

도표목차

그림목차

I. 서론 .....	1
II. 실험재료 및 방법	
1. 실험재료	
1.1 균주 및 배지 .....	4
1.2 플라스미드 .....	4
1.3 재료 및 시약 .....	5
1.4 프라이머 .....	6
2. 실험방법	
2.1 <i>E.coli</i> 의 형질전환 .....	6
2.2 <i>S.pombe</i> 의 형질전환 .....	6
2.3 Spot assay .....	7
2.4 <i>In-situ</i> hybridization .....	7
2.5 Western blot .....	8
2.6 Immunoprecipitation .....	9
2.7 합성치사 돌연변이체를 이용한 유전자 탐색 과정 및 방법 .....	10
2.8 DJ-PCR을 이용한 결실돌연변이 균주의 제작 .....	11
2.9 재조합 벡터와 과발현 균주의 제작 .....	12
2.10 <i>rmr1</i> -GFP 균주제작 및 위치관찰 .....	12

2.11. RSA를 이용한 이중돌연변이 제작 .....	13
2.12. <i>rmr1</i> -TAP 균주의 제작 .....	13
2.13. Western blot 실험을 위한 재조합 벡터의 제작 .....	14
III. 결과	
1. 합성치사 돌연변이체를 이용한 <i>nab2</i> 유전자와 연관성 있는 유전자 탐색 .....	26
2. <i>rmr1</i> 결실돌연변이 균주의 제작과 분석 .....	31
3. <i>rmr1</i> 유전자의 과발현 돌연변이 균주의 제작과 분석 .....	34
4. <i>rmr1</i> 유전자의 위치추적 .....	38
5. 이중 돌연변이 균주의 제작과 분석 .....	40
6. 세포 내 <i>rmr1</i> 단백질의 상호작용 분석 .....	44
IV. 토의 .....	46

참고문헌

ABSTRACT(영문초록)

## 도 표 목 차

표 1. 실험에 사용한 균주 .....	15
표 2. <i>S. pombe</i> 의 배지조성 .....	18
표 3. <i>E.coli</i> 의 배지조성 .....	20
표 4. 실험에 사용한 프라이머 .....	21
표 5. 실험에 사용한 버퍼 .....	24

## 그림 목 차

그림 1. 합성치사 돌연변이체 및 유전자 탐색과정 .....	28
그림 2. 합성치사 돌연변이체의 상보성 확인 .....	30
그림 3. 결실돌연변이 $\Delta rmr1::ura4$ 균주의 제작과 분석 .....	32
그림 4. <i>rmr1</i> 과발현 돌연변이의 분석 .....	36
그림 5. <i>rmr1</i> 유전자의 위치추적 .....	39
그림 6. 이중돌연변이의 Spot assay 성장비교 .....	42
그림 7. <i>rmr1</i> -TAP을 이용한 co-immunoprecipitation 실험 .....	45

## I. 서론

진핵세포에서 유전자의 발현은 여러 단계의 과정을 거친다. 핵 안에서 전사(transcription)와 mRNA가공 그리고 mRNA export가 이루어지고 세포질로 빠져나와 번역(translation)을 통해 단백질이 합성된다. 진핵세포는 핵막(nuclear envelope)에 의해 핵과 세포질의 공간이 분리되어 있기 때문에 핵에서 세포질로 mRNA를 이동시키는 mRNA export 과정이 유전자 발현의 중요한 역할을 담당한다(Kohler and Hurt, 2007).

진핵세포에서 단백질을 암호화한 유전자는 RNA polymerase II (RNAPII)에 의해 전사가 이루어진다. RNAPII에 의한 전사과정과 동시에, pre-mRNA는 5'-capping, splicing, 3'-end cleavage와 poly-adenylation의 가공을 거치며 성숙한 mRNA가 된다. 이 과정은 다양한 RNA binding protein(RBP)의 도움으로 이루어진다(Tutucci and Stutz, 2011; Klss et al., 2013).

TREX(transcription/export complex)는 정상적인 mRNP(mRNA ribonucleo protein complex)형성과 mRNA의 전사신장(transcription elongation)과정 및 mRNA export를 위해 필요한 단백질 복합체이다(Luna et al., 2012).

출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 TREX 복합체는 소단위체인 THO와 mRNA export 연관 단백질인 Yra1, Sub2 그리고 Tex1으로 구성되어 있다. TREX의 중심적 역할을 하는 소단위체 THO는 Hpr1, Tho2, Thp2, Mft1으로 이루어져 있다(Chavez et al., 2000; Fischer et al., 2002; Strasser et al., 2002). THO 복합체에 돌연변이가 발생하면 주형 DNA와 pre-mRNA 사이에 DNA:RNA hybrid가 형성되어 정상적인 전사신장을 방해하고, DNA 구조의 불안정성(instability)으로 인한 과도한 재조합(hyper recombination)이 발생하게 된다(Huertas and Aguilera, 2003). THO의 한 구성요소인 Hpr1은 mRNA export 단백질인 Yra1 및 Sub2와 직접 상호작용하며 전사

과정 중인 pre-mRNA로 Yra1과 Sub2를 불러온다(Zenklusen et al., 2002). 핵공 단백질과의 직접적인 상호작용으로 mRNA를 핵에서 세포질로 통과시키는 리셉터(receptor) 단백질인 Mex67:Mtr2은 어댑터(adapter) 단백질인 Yra1의 도움을 받아 mRNA에 결합한다(Strasser and Hurt, 2000). Nab2 단백질 또한 Yra1 및 Mex67과 직접 상호작용하며 이 과정에 보조적인 역할을 한다(Lelesias et al., 2010). Nab2는 Poly-(A)<sup>+</sup> tail 부분에 결합하는 Zinc finger 단백질로서, Poly-(A)<sup>+</sup> tail 길이조절과 mRNA export 과정에 참여한다(Kelly et al., 2007; Hector et al., 2002).

SAGA(Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase complex)는 21개의 단백질로 이루어진 큰 단백질 복합체로 전사보조인자(transcriptional coactivator)로서 다음과 같은 다양한 역할을 수행한다(Samara and Wolberger, 2011). 히스톤 아세틸화(histone acetylation), pre-initiation complex(PIC) 형성, 히스톤 H2B-Ub의 유비퀴틴 분해(deubiquitylation)를 통한 전사개시(transcription initiation) 활성화 및 전사신장의 촉진, 그리고 TREX-2와의 상호작용이다(Grant et al., 1998; Shukla et al., 2006; Daniel et al., 2003; Goivind et al., 2007; Garcia-Oiver et al., 2013).

TREX-2(transcription export complex-2)는 핵공 복합체(nuclear pore complex, NPC) 내부에 위치하며, mRNA export 과정에 참여한다(Rondon et al., 2010). 또한 다섯 종류의 단백질 Sac3, Thp1, Cdc31, Sus1, Sem1/Dss1으로 구성되어있다(Fischer et al., 2004; Rodriguez-Navarro et al., 2004; Gallardo et al., 2003; Garcia-Oiver et al., 2013). SAGA와 TREX-2의 상호작용은 이 두 복합체의 공통적 구성 단백질인 Sus1을 매개로 하며, 상호작용을 통해 DNA 구조 및 전사단계의 진행성(transcription processivity)이 안정적으로 유지되어, 효율적인 전사와 mRNA export가 이루어지게 한다(Rodriguez-Navarro et al., 2004; Chekanova et al., 2008;

Gonzalez-Aguilera et al., 2008).

분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에서 Mex67 단백질은 핵공 단백질과 직접 상호작용하지만, mRNA export 과정에 필수적이지는 않다(Yoon et al., 2000; Thakurta et al., 2004). 반면에 *S. cerevisiae*의 Gle2와 homologue인 Rae1이 mRNA export에 필수적인 단백질이다(Murphy et al., 1996; Brown et al., 1995). *S. pombe*의 UAP56과 Mlo3는 각각 *S. cerevisiae*의 Sub2와 Yra1의 homologue이다(Javerzat et al., 1996). *S. pombe*에서 UAP56은 Dss1과 함께 어댑터 단백질인 Mlo3와 결합하며, Rae1과도 상호작용하여 mRNA export 과정에 참여한다(Thakurta et al., 2005).

*S. cerevisiae*의 Poly-(A)<sup>+</sup> tail 결합 단백질인 nab2의 homologue 또한 *S. pombe*에 존재한다. *S. pombe*의 nab2 단백질은 poly-(A) 결합부위가 잘 보존되어있고, 생장에 필수적이지 않으나 과발현시 mRNA export 과정의 심한 결함을 나타내기 때문에 *S. cerevisiae*와 유사하게 핵과 세포질 사이를 왕복하는 단백질로서 mRNA export와 poly(A)<sup>+</sup> 길이조절, mRNA export의 질적 관리(quality control) 등에 관여할 가능성이 있다(Park and Yoon 2012).

본 연구에서는 분열효모에서 *nab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이를 이용하여 mRNA export 과정과 연관 있는 새로운 유전자를 탐색하고자 하였다. 분열효모의 Genomic DNA library를 이용한 형질전환 실험방법으로 *nab2*의 기능을 상보하는 세 종류의 유전자 *rml1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c*를 선별하였다. 이 중에서 아직 자세한 기능이 알려지지 않은 *SPCC1442.04c* (이하 *rml1* 으로 명명) 유전자에 대하여 추가적인 연구를 수행하였다. 그 결과 *rml1* 유전자의 결실은 생장에 필수적이지 않지만, 과발현시 생장 및 mRNA export 결함을 나타내었으며, 살아있는 세포에서 Rml1 단백질은 핵 안에 존재하는 것을 확인하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1.1. 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 분열 효모인 *Schizosaccharomyces pombe*이다. 또한 재조합 플라스미드의 증폭을 위해 *E.coli Top 10* 을 사용하였다. 실험에 사용된 *S. pombe*의 목록은 표 1.에 정리하였다.

세포 배양 기술과 유전학적 방법은 *S. pombe* standard method를 참고하였다(Alfa et al., 1993; Moreno et al., 1991). YES(Yeast Extract with Supplements)배지와 EMM(Edinburgh Minimal Medium)배지를 기본으로 사용하였으며, 자세한 조성은 표 2.와 표 3.에 나타내었다.

형질전환된 *S. pombe*의 선별은 배지 첨가물 (supplements, 225 mg/l adenine, luecine, uracil)의 조합을 달리하여 사용하였다. pREP 재조합 벡터의 유전자 발현 억제는 적정 EMM 배지에 15  $\mu$ M thiamine (Sigma, U.S.A)을 첨가하여 사용하였다. 카나마이신 저항 유전자(Kanamycin resistant gene, kan<sup>r</sup>)를 지닌 돌연변이 선별은 YES 배지에 100  $\mu$ g/ml G418 (Duchefa, Netherlands)을 첨가하여 사용하였다.

*E. coli*는 LB(Luria-Bartani)배지에서 배양하였으며, 형질전환된 *E.coli*는 LB배지에 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Duchefa, Netherlands)을 첨가하여 선별하였다.

#### 1.2. 플라스미드

합성치사 돌연변이의 상보성 확인을 위한 형질전환 실험에서 대조군으로 pDW232 벡터(invitrogen)를 사용하였다. 과발현 균주를 제작하기 위해서 pREP 벡터(Maundrell, 1993)를 사용하였다. pREP 벡터는 multi cloning sites(MCS)의 5'-end 위치에 Thiamine으로 발현조절이 가능한 *nmt* 프로모터가 존재하며, 본 실험에서는 가장 강력한 발현을 보이는 pREP3X부터 순서대로 약한 발현을 보이는 pREP41X, pREP81X까지 세 종류의 벡터를 사용하였다. Rmr1-GFP 키메라 단백질(chimeric protein)조합을 위해서 GFP와 *kan<sup>r</sup>* 유전자를 지니고 있는 pFA6a-FGP(S65T)-kan-MX6 벡터(Bahler et al., 1998)를 사용하였다. Co-immunoprecipitation 실험을 위해서는 N-termination 위치에 triple HA epitope tag을 지닌 pSLF273 벡터(Forsburg, 1997)를 사용하였다. 모든 벡터는 공통적으로 항생제 ampicillin을 표지로 지니고 있다.

### 1.3. 재료 및 시약

효모를 배양하기 위한 배지는 BD(U.S.A), Q-Bio(U.S.A), Sigma(U.S.A) 그리고 MP(Germany) 제품을 사용하였다. 전기영동에 필요한 Agarose는 MP(Germany) 제품을 사용하였다. DNA 증폭을 위한 Taq DNA polymerase는 TAKARA(Japan)를 사용하였으며, 클로닝을 위한 제한효소와 T4 Ligase는 NEB(U.K) 제품을 사용하였다. Chromosomal DNA 추출, PCR purification, Gel elution Kit는 QIAGEN(Germany)을 사용하였고 plasmid DNA minipreparation kit는 GeneAll(Korea) 제품을 사용하였다. 그 외 실험에 사용한 시약은 각각의 실험방법에 기술하였다.

#### 1.4. 프라이머

일반적으로 PCR에 사용한 프라이머는 GC 비율을 40-60%로 맞추고 반복적인 AT 염기서열을 피하였으며, 18-20mer의 길이와 최소 Scale (0.02-0.025 $\mu$ M)으로 Xenotech(Korea) 또는 Sigma(U.S.A)에 주문 제작하였다. 장기 보관은 50 $\mu$ M 농도로 하였으며, 총 50 $\mu$ l의 PCR 반응 당 최종농도 0.2 $\mu$ M을 맞추기 위해, 프라이머를 10 $\mu$ M으로 희석하여 0.5 $\mu$ l씩 사용하였다. 실험에 사용한 프라이머는 표 4.에 정리하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. *E.coli*의 형질전환

*E. coli* 형질전환 실험은  $CaCl_2$  방법을 사용하였다(Sambrook and Russell, 2001). *E. coli* competent cell과 재조합 벡터를 섞어 얼음에 30분 동안 보관한 후 42 $^{\circ}$ C에서 10초간 heat shock 처리를 하고, 바로 얼음에서 1분간 cold shock을 가하였다. competent cell 부피의 10배에 해당하는 적정량의 LB배지를 넣고 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 regeneration 시간을 제공한 후 LA 고체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 배양하였다.

### 2.2. *S.pombe*의 형질전환

*S.pombe*의 형질전환 실험은 Lithium acetate 방법을 사용하였다(Warbrick et al., 1993). 실험에 사용한 버퍼는 표 5.에 정리하였다. 균주를 적정 배지 50ml에서 16-20시간 동안 7-8 $\times 10^6$  cell/ml에 도달할 때까지 배양 후 실험을

진행하였다. 세포를 원심분리하여 배지를 제거하고 멸균한 증류수로 세척한 뒤 1×LiAc/TE(100mM LiAc pH7.5, 10mM Tris-cl pH7.0, 1mM EDTA pH8.0) 버퍼로 세포 수  $1 \times 10^9$  cell/ml으로 맞춰 풀어주었다. 이렇게 제작한 competent cell 100 $\mu$ l에 형질전환용 DNA 1 $\mu$ g, Salmon sperm DNA 4 $\mu$ l(10 mg/ml), 50% PEG 300 $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후 29 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 이후 42 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 heat shock을 처리하고, 실온에서 5분 동안 보관 후 적정 고체배지에 접종하여 29 $^{\circ}$ C에서 5일 동안 배양하였다.

### 2.3. Spot assay

균주의 성장속도를 측정하기 위한 간접적인 방법으로 사용하였다. 균주를 적정배지에 접종한 후 29 $^{\circ}$ C에서 1-2일 동안 배양하였다. hemocytometer를 이용하여 세포수를 세고 모든 세포수를  $2 \times 10^7$  cell/ml 농도로 균일하게 맞추었다. 순차적으로 1/10씩 희석하여 고체배지에 일정간격으로 5 $\mu$ l씩 물방울 모양으로 떨어뜨려 말린 후 28 $^{\circ}$ C에서 4-9일 동안 배양하여 관찰하였다. 이미지는 Kodak image station 4000 MM PRO(U.S.A)로 촬영하였다.

### 2.4. *In situ* hybridization

*In situ* hybridization 실험에 사용한 버퍼는 표 5.에 정리하였다. 효모를 적정 배지 50ml에서 16시간 동안  $7-8 \times 10^6$  cell/ml에 도달할 때까지 배양한 후 실험을 진행하였다. 원심분리로 배지성분을 제거하고 30% formaldehyde 6 ml을 넣고 29 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 처리하였다. PBS에 0.3M glycine이 첨가되어있는 버퍼로 세척 후, spheroplast buffer 1ml을 풀어 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 이후 SCE로 세척하고, 적정량의 SCE 버퍼(300-500 $\mu$ l)로 세포

농도를 조절하며 풀었다. poly-D-lysine (10mg/10ml)으로 코팅된 슬라이드에 세포를 올리고 4°C에서 2시간 동안 둔 뒤 다시 -20°C에서 메탄올에 2시간 동안 보관하였다. 메탄올에서 꺼내어 2×SSC로 세척하고 말린 뒤, hybridization solution 10 $\mu$ l를 위에 올리고 커버슬라이드를 덮어 37°C에서 8시간 이상 배양하였다. 2×SSC로 상온에서 5분, 상온에서 20분 각 한 번씩 세척하고 37°C에서 20분동안 2번 반복 세척 후 2×SSC에 0.1% tritonX-100이 첨가된 버퍼로 37°C에서 5분간 한번 세척하고 슬라이드를 꺼내어 말렸다. Fluorescein anti-digoxigenin antibody solution 10 $\mu$ l를 올리고 커버슬라이드를 덮어 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 상온에서 2×SSC로 15분씩 2번 반복 세척하고 말린 후 DAPI mounting medium 12 $\mu$ l를 올리고 커버슬라이드를 덮어 밀봉하였다.

## 2.5. Western blot

Western blot 실험에 사용한 버퍼는 표 5에 정리하였다. 효모를 적정 배지 50ml에서 16시간 동안 7-8 $\times 10^6$  cell/ml에 도달할 때까지 배양한 후 실험을 진행하였다. 원심분리로 배지성분을 제거하고 Stop buffer 5ml과 Lysis buffer 5ml으로 각각 한 번씩 세척하였다. Protease inhibitor가 첨가된 Lysis buffer 30 $\mu$ l를 넣고 mini-beadbeater (BioSpec)를 이용하여 30초씩 네 번 반복하여 세포를 터뜨렸다. Protease inhibitor가 첨가된 Lysis buffer 400 $\mu$ l를 추가로 첨가하여 새 튜브로 옮기고 4°C에서 10분간 원심분리하여 단백질이 녹아있는 상층액을 얻었다. 상층액과 2X Laemmli Sample buffer (Bio-Rad)를 1:1 비율로 섞고 10분 동안 끓인 후 또 다시 10분간 4°C에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이후 7.5% SDS-Polyacrylamide Gel에 loading하여 40V에서 40분, 120V에서 1시간 동안 전기영동을 하였다. Transfer는 PVDF

membrane(GE Healthcare)을 사용하여 40V에서 2시간 동안 진행하였다. 5% skimmed milk(Scharlau)를 blocking buffer로 사용하여 1시간 동안 처리하였고 primary antibody를 적정비율로 희석하여 첨가한 후 overnight하였다. Mouse anti HA antibody (Cell Signaling)의 경우 1:1000의 비율로, Rabbit anti ProtA antibody (SIGMA)의 경우 1:200,000의 비율로 처리하였다. TNTX buffer를 이용하여 10분 동안 4번 반복하여 세척한 후 secondary antibody를 1:3000으로 희석하여 1시간 동안 처리하고 다시 한번 TNTX buffer를 이용하여 10분 동안 4번 반복하여 세척하였다. 결과가 ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)을 사용하여 Kodak image station 4000 MM PRO(U.S.A)으로 촬영하였다.

## 2.6. Immunoprecipitation

Immunoprecipitation 실험은 많은 단백질을 농축하기 위해 효모를 적정 배지 300ml에서 16시간 동안  $7-8 \times 10^6$  cell/ml에 도달할 때까지 배양한 후 실험을 진행하였다. Western blot 실험과 동일한 방법으로 세포를 터뜨려 단백질이 녹아있는 상층액을 얻은 후, 상층액 1.5ml과 미리 Protease inhibitor가 첨가된 Lysis buffer 500 $\mu$ l으로 세 번 반복 세척한 IgG Sepharose 6 Fast Flow beads (GE Healthcare) 30 $\mu$ l를 섞어 4 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양하였다. 원심분리로 상층액을 제거한 다음 IgG beads를 Protease inhibitor가 첨가된 Lysis buffer 500 $\mu$ l으로 세 번 반복 세척하고 Protease inhibitor가 첨가된 Lysis buffer 50 $\mu$ l와 2X Laemmli Sample buffer 50 $\mu$ l를 넣고 10분 동안 끓인 후 또 다시 10분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이하 모든 과정은 Western blot 실험과 동일한 방법으로 진행하였다.

## 2.7. 합성치사 돌연변이체를 이용한 유전자 탐색 과정 및 방법

*nab2*와 연관성 있는 새로운 유전자를 찾기 위해 thiamine이 들어있는 적정 배지에 형질전환체(transformants)를 접종한 후 28°C에서 7일간 배양하였다. 합성치사 돌연변이체 SLnN2와 SLN4를 모균주로 사용하여 각각 117개, 213개의 형질전환체를 얻었다. 형질전환체에서 *nab2*와 상보성을 보이는 유전자가 무엇인지 알아보기 위해, 페놀추출법(phenol extraction method)으로 세포의 DNA를 추출하여 *E.coli*에 형질전환하는 Vector rescue 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 버퍼는 표 5에 정리하였다. 페놀추출법은 플라스미드를 포함한 전체 DNA를 대장균에 형질전환하여 선형(linear form)인 염색체(chromosome DNA)는 대장균 안에 있는 핵산가수분해효소(nuclease)에 의해 모두 분해되고 원형(circular form)인 플라스미드만 보존되어 *E.coli*에 의해 복제 및 증폭되는 원리이다.

페놀 추출법은 다음과 같은 방법으로 수행하였으며, 실험에 사용한 버퍼는 표 5에 정리하였다. 세포를 적정배지 10ml에 접종하여 정체기에 도달할 때까지 29°C에서 3일 동안 배양하였다. 원심분리로 배지를 제거하고 spheroplast buffer 1ml을 풀어 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 원심분리로 버퍼를 제거한 다음, 5×TE 300 $\mu$ l와 RNase (0.5 $\mu$ g/100 $\mu$ l)를 넣어 섞고 10% SDS를 35 $\mu$ l 첨가하여 65°C에서 5분 동안 배양하였다. 여기에 5M potassium acetate 100 $\mu$ l를 넣고 얼음에서 30분간 보관한 후 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 상층액만을 분리하였다. 상층액과 phenolchloroformisoamyl을 1:1 비율로 섞고 강하게 vortexing한 다음 5분간 원심분리한 후 다시 깨끗한 상층액을 얻는 과정을 세 번 반복하였다. 총 부피의 2.5배에 해당하는 에탄올을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하여 DNA 침전물을 얻었고, 이를 70% 에탄올로 세척 후 멸균한 증류수 10 $\mu$ l에 녹였다. 이렇게 얻은 chromosome DNA

3 $\mu$ l를 *E. coli*에 형질전환하여 효모에 있던 플라스미드 DNA를 증폭 및 추출하는 Vector rescue 실험을 수행하였다.

이 방법을 통해 SLN2와 SLN4에서 각각 37개와 87개의 플라스미드를 얻었으며, 플라스미드 안에 삽입된 유전자 정보는 DNA서열분석 (DNA sequencing)으로 마크로젠사에 의뢰하여 분석하였다.

## 2.8. DJ-PCR을 이용한 결실돌연변이 균주의 제작

DJ-PCR (Double Joint PCR, Yu et al., 2004)으로 *rmr1* 유전자 ORF의 5'-flanking region과 3'-flanking region 서열사이에 *rmr1* 유전자 대신 *ura4* 유전자를 삽입한 구조(construction)를 제작하여 상동재조합(homologue recombination)으로 AY217 균주에서 *rmr1* 유전자가 knock-out이 일어나게 하였다.

AY217 균주는 성장에 필요한 영양소 *ura4*와 *leu2*의 합성이 저해되어 있기 때문에 *ura4*가 없는 배지에서 성장할 수 없다. 하지만 상동재조합으로 *rmr1* 유전자가 결실되고 대신 그 위치에 *ura4* 유전자가 삽입되면 *ura4* 영양소가 없는 배지에서도 성장할 수 있게 된다. 이 원리를 이용하여 *ura4*가 없는 적정배지에서 결실돌연변이(deletion mutant) 균주를 선별하였다. *rmr1* 유전자의 결실 여부를 추가 확인하기 위해 chromosomal DNA를 추출하여 PCR을 진행하였다. 5'-flanking region 또는 3'-flanking region과 *ura4* ORF 사이를 증폭하는 프라이머를 이용하여 야생형 AY217 균주는 증폭되지 않고 결실돌연변이 균주만이 예측한 길이로 증폭되는 것을 최종 확인하였다. *kan<sup>r</sup>* 유전자가 삽입된 결실돌연변이의 제작은 항진균제 G418이 첨가된 배지로 선별한 점만 다르며, 그 외에는 위와 동일한 방법으로 제작하였다.

## 2.9. 재조합 벡터와 과발현 균주의 제작

*rmr1* 유전자의 과발현 균주를 제작하기 위해 thiamine에 의해 발현 조절이 가능한 세 종류의 pREP 벡터 3X, 41X, 81X를 이용하였다. 벡터의 multi cloning site(MCS)에 존재하는 제한효소(restriction enzyme)중에서 *rmr1* 유전자 클로닝에 적합한 Xho I, BamH I 을 선택하여 사용하였다. Xho I, BamH I 제한효소 인식부위를 *rmr1* 유전자의 ORF를 증폭하는 프라이머의 양쪽 끝 5'과 3' 부분에 첨가하여 PCR을 하였다. 증폭한 DNA 조각(fragment)과 세 종류의 벡터를 각각 Xho I, BamH I 으로 절단한 후 접합(ligation)하였으며, pREPs-*rmr1* 재조합 벡터를 선별 및 증폭하기 위해 *E. coli* 형질전환을 하여 벡터를 추출하였다. 재조합 벡터를 다시 Xho I, BamH I 으로 절단하여 정확한 클로닝 여부를 확인한 후 AY217 균주에 형질전환 하였다. pREP 벡터안에는 *Leu2* 유전자가 삽입되어 있기 때문에, *Leu2* 영양소가 없는 배지에서도 성장할 수 있게 된다. 이 원리를 이용하여 *Leu2*이 없는 적정배지에 형질전환체를 접종하여 과발현 돌연변이 균주를 선별하였다.

## 2.10. *rmr1*-GFP 균주제작 및 위치관찰 (localization)

DJ-PCR방법을 이용하여 *rmr1* 유전자 ORF와 3'-flanking region 서열사이에 *GFP-kan<sup>r</sup>* 유전자를 삽입한 구조(construction)를 제작하여 상동재조합과정으로 AY217 균주에서 *rmr1* 유전자 위치에 삽입(integration)하여 항진균제 G418이 첨가된 배지로 선별하였다. 형광 이미지는 CLSM(LSM700, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany)를 사용하였다.

## 2.11. Random spore analysis (RSA)을 이용한 이중돌연변이 제작

이중 돌연변이의 제작을 위해 무작위 포자 분석(random spore analysis; RSA) 방법을 이용하였다.  $\Delta rmr1::ura4^+$  균주와  $\Delta nab2::kan^r$ ,  $\Delta mex67::kan^r$ ,  $rae1-167$ ,  $\Delta mlo3::kan^r$ ,  $sac3-3$ ,  $\Delta dss1::kan^r$ /81X-*dss1*를 각각 교배하여 여섯 종류의 이중돌연변이를 제작하였다. RSA 실험은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, 접합형(mating type)이 서로 다른 두 종류의 균주를 멸균된 증류수를 이용하여 ME 배지에서 교배하고 29°C에서 3일간 배양하였다. 포자가 생성되었는지 확인한 뒤, 적당량의 세포와 멸균된 증류수 1ml 그리고 glucylase 10 $\mu$ l를 처리하여 29°C에서 overnight 하였다. 이후 멸균된 증류수 1ml로 세 번 반복 세척하여 hemocytometer로 정확한 포자 개수를 세고 적정배지에 200-300개의 콜로니가 자랄 수 있도록 접종하여 29°C에서 배양하였다. 각각 모균주의 표현형에 적합한 선택배지(selective media)인 *ura4*가 없는 배지와 G418이 첨가된 배지로 1차 선별한 후 chromosome DNA를 추출하여 PCR 방법으로 이중돌연변이 여부를 최종 확인하였다.

## 2.12. rmr1-TAP 균주의 제작

Western blot 실험을 위한 rmr1-TAP 균주의 제작은 Gould Lab.에서 제공한 pFA6a-CBP 4.5Xprotein A(TEV)-kanMX6 벡터를 이용하여 클로닝 방법으로 진행하였다. TAP은 Calmodulin binding peptide (CBP)와 TEV protease cleavage site 그리고 Protein A 순으로 구성되어있다. CBP의 N-termination의 위치에 제한효소 BamH I 과 Pac I 으로 rmr1 ORF 조각을 삽입하고 C-termination의 Protein A와 *kan<sup>r</sup>* 유전자 다음의 위치에 rmr1 3'-flanking region 조각을 제한효소 Sac I 과 Sac II로 삽입하여

*rmr1*-CBP-TEV-ProtA::kan<sup>r</sup> 구조를 제작하였다. 이 구조를 벡터로부터 제한효소 BsaA I 으로 잘라내어 AY217균주에 상동재조합과정을 통해 삽입하였다. 이후 PCR 방법과 DNA 서열분석으로 정확한 서열로 삽입된 돌연변이 균주를 선별하였다.

### 2.13. Western blot 실험을 위한 재조합 벡터의 제작

Western blot 실험을 위해 N-termination 위치에 triple HA epitope tag을 지닌 pSLF273 벡터를 사용하여 *mex67*, *rae1*, *mlo3* 유전자를 클로닝하였다. *nab2* 유전자는 기존에 클로닝 되어있던 벡터를 Western blot으로 확인한 후 실험에 바로 사용하였다. pSLF273 벡터는 pREP41X 벡터와 동일한 중간 세기의 *nmt* 프로모터를 갖고 있으며, *ura4* 유전자로 인해 이 벡터를 지닌 균주는 uracil이 없는 배지에서 성장 가능하다. 벡터의 MCS와 유전자의 ORF 서열을 확인하여 클로닝에 적합한 제한효소 Not I, Sal I 을 선택하여 사용하였으며, 모든 유전자의 ORF는 start codon (ATG) 다음 서열부터 삽입하였다. 이하 모든 실험방법은 재조합 벡터 제작과 동일하게 진행하였다.

표 1. 실험에 사용한 균주

Strains	Genotype	Source
AY217	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
SLN2	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 81X-nab2::kan<sup>r</sup></i>	Park and Yoon (2012)
SLN4	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 81X-nab2::kan<sup>r</sup></i>	Park and Yoon (2012)
Δnab2	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 ura4-d18 Δnab2::kan<sup>r</sup></i>	Park and Yoon (2012)
Δmex67	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 ura4-d18 Δmex67::kan<sup>r</sup></i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
rae1-167	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 ura4-d18 rae1-167</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
sac3-3	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 ura4-d18 sac3-3</i>	Yoon <i>et al</i> (2000)
Δmlo3	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 ura4-d18 Δmlo3::kan<sup>r</sup></i>	Thakurta <i>et al</i> (2005)
Δdss1	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 Δdss1::ura4<sup>+</sup>/pREP81X-dss1</i>	This study

(continued)

표 1. 실험에 사용한 균주 (continued)

217/3X-rmr1	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18/pREP3X-rmr1</i>	This study
217/41X-rmr1	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18/pREP41X-rmr1</i>	This study
217/81X-rmr1	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18/pREP81X-rmr1</i>	This study
Δrmr1	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 Δrmr1::ura4<sup>+</sup></i>	This study
Δrmr1	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 ura4-d18 Δrmr1::kan<sup>r</sup></i>	This study
Rmr1-GFP	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 rmr1-gfp::kan<sup>r</sup></i>	This study
Δrmr1 Δnab2	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 Δrmr1::ura4<sup>+</sup> Δnab2::kan<sup>r</sup></i>	This study
Δrmr1 Δmex67	<i>h<sup>+</sup> leu1-32 ura4-d18 Δrmr1::ura4<sup>+</sup> Δmex67::kan<sup>r</sup></i>	This study
Δrmr1 rae1-167	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 Δrmr1::ura4<sup>+</sup> rae1-167</i>	This study
Δrmr1 sac3-3	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18 Δrmr1::ura4<sup>+</sup> sac3-3</i>	This study

(continued)

표 1. 실험에 사용한 균주 (continued)

$\Delta$ rmr1 $\Delta$ mlo3	$h^+$ <i>leu1-32 ura4-d18 <math>\Delta</math>rmr1::ura4<sup>+</sup> <math>\Delta</math>mlo3::kan<sup>r</sup></i>	This study
$\Delta$ rmr1 $\Delta$ dss1	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18 <math>\Delta</math>rmr1::kan<sup>r</sup> <math>\Delta</math>dss1::ura4<sup>+</sup></i>	This study
217/273-nab2	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18/pSLF273-nab2</i>	This study
217/273-mex67	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18/pSLF273-mex67</i>	This study
217/273-rae1	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18/pSLF273-rae1</i>	This study
217/273-mlo3	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18/pSLF273-mlo3</i>	This study
rmr1-TAP/273-nab2	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18 Rmr1-TAP::kan<sup>r</sup>/pSLF273-nab2</i>	This study
rmr1-TAP/273-mex67	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18 Rmr1-TAP::kan<sup>r</sup>/pSLF273-mex67</i>	This study
rmr1-TAP/273-rae1	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18 Rmr1-TAP::kan<sup>r</sup>/pSLF273-rae1</i>	This study
rmr1-TAP/273-mlo3	$h^-$ <i>leu1-32 ura4-d18 Rmr1-TAP::kan<sup>r</sup>/pSLF273-mlo3</i>	This study
E. coli Top10'	F-,mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139 galU galK</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>rpsL(StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen(U.S.A)

표 2. *S.pombe*의 배지조성

<b>YES (Yeast extract) Medium</b>	
YE extract	5 g/ℓ
Dextrose	30 g/ℓ
Agar	20 g/ℓ
Supplements : 56.25mg/ℓ (Adenine, Leucine, Uracil)	
<b>EMM (Edinburgh Minimal Medium)</b>	
Potassium hydrogen Pthallate	3 g/ℓ
$Na_2HPO_4$	2.2 g/ℓ
Ammonium chloride	5 g/ℓ
Dextrose	20 g/ℓ
50×salt	20 ml/ℓ
1000×Vitamins	1 ml/ℓ
10000×Minerals	0.1 ml/ℓ
Supplements : 225mg/ℓ (Adenine, Leucine, Uracil)	
<b>ME (Malt Extract) Medium</b>	
ME extract	30 g/ℓ
Agar	20 g/ℓ

(continued)

표 2. *S.pombe*의 배지조성 (continued)

50× Salt Stock	
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	52.5 g/ℓ
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.735 g/ℓ
<i>KCl</i>	50 g/ℓ
$Na_2SO_4$	2 g/ℓ
1000× Vitamin Stock	
Pantothenic acid	1 g/ℓ
Nicotinic acid	10 g/ℓ
Inositol	10 g/ℓ
Biotin	10 mg/ℓ
10000× Mineral Stock	
Boric acid	5 g/ℓ
$MnSO_4$	4 g/ℓ
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4 g/ℓ
$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	2 g/ℓ
Molybdic acid	0.4 g/ℓ
KI	1 g/ℓ
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.4 g/ℓ
Citric acid	10 g/ℓ

표3. *E.coli*의 배지 조성

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

표 4. 실험에 사용한 프라이머

Primer	Sequence (5'→3')
Ura-5DJ	AGCTACAAATCCCCTGGCT
Ura-3DJ	CATCTAATTTATTCTGTTCC
Kan-5DJ	ACCCGGCCAGCGACATGG
Kan-3DJ	AGTATCGAATCGACAGCAGT
GFP-5DJ	AGTAAAGGAGAAGAAGCTTTT
<b>Primers for DJ-PCR</b>	
Rmr1-1	GCGGAATCAAATCGCCGGTTTA
Rmr1-2	ACATATAGCCAGTGGGATTTGTAGCTAGCTGGTTCCATA CCTAGTTCGAT
Rmr1-3	GGTGTTGGAACAGAATAAATTAGATGAGCGATTGTC GGTTACCACAGATA
Rmr1-4	CCCTCTCTTGTCATCTAGACT
Rmr1-5	GCACCATAACCTTGAAGGTA
Rmr1-6	CGTGGTTAGTCTTGCGATTA
Rmr1-7	CTGGGCCTCCATGTCGCTGGCCGGGTAATTGTGCTACGT AGGAGATGTTG
Rmr1-8	CGCTATACTGCTGTCGATTCGATACTATTGTCGGTTACC ACAGATACAGA

(continued)

표 4. 실험에 사용한 프라이머 (continued)

Rmr1-9	CCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTATCATCAGAAGGC ATTAATTTT	
Rmr1-10	CCAAACTCTTCGGAATGTGC	
Dss1-1	GGTACCTTCAGCTGTGCATT	
Dss1-2	ACATATAGCCAGTGGGATTTGTAGCTACGTACTTTCTAA GCTTGGTAAGG	
Dss1-3	GGTGTTGGAACAGAATAAATTAGATGAAGATATTGC TTCTGCCAGAGTGT	
Dss1-4	CCAGACATAGTTGTATCCGC	
Dss1-5	GCTTTACGTGAGCATCACCA	
Dss1-6	GCCTATGGAAGTGCCTATTC	
<b>Primers for sub-cloning</b>		<b>Restriction site</b>
Rmr1-11	GCACTCGAGATGGCCGGAGTGAGTCCTGT	Xho I
Rmr1-12	GCTGGATCCTTAATCATCAGAAGGCATTA	BamH I
Rmr1-13	GCAGGATCCCCATAAACGGATCGCCAGAT	BamH I
Rmr1-14	GTCTTAATTAAATCATCAGAAGGCATTAATT	Pac I
Rmr1-15	GCTGAGCTCGTGTTC AACGTGTACAGGCT	Sac I
Rmr1-16	GTCCCGCGGCTCTTAACACTCTCTTCTCC	Sac II
Dss1-7	AACTCGAGATGTCTCGTGCGCCTTACC	Xho I
Dss1-8	TCAGGATCCTTAATTGGCGGCAACACCCT	BamH I

(continued)

표 4. 실험에 사용한 프라이머 (continued)

Primers for sub-cloning		Restriction site
mex67-1	GAGCGGCCGCATGTTGCGTAGAAAGCGGGA	Not I
mex67-2	CAGGTCGACTCATGAAAATGCTTCGGCTG	Sal I
rae1-1	GAGCGGCCGCTCACTTTTTGGACAGGCTAC	Not I
rae1-2	CAGGTCGACTTACCTTCCTTTCTTAGGTC	Sal I
mlo3-1	GAGCGGCCGCTCTATGGAATTAGATCAGTC	Not I
mlo3-2	CAGGTCGACTTACTCCTTCTCATTTGATC	Sal I

표 5. 실험에 사용한 버퍼

<b><i>S.pombe</i> transformation: Lithium acetate (LiAc) method</b>	
10× LiAc	1M Lithium Acetate pH7.5
10× TE	0.1M Tris-cl pH7.0, 0.01M EDTA pH8.0
50% PEG	50% polyethylene glycol in 1×TE/LiAc
<b>Phenol extraction</b>	
SCE (pH5.6)	50mM Citrate acid, 50mM $Na_2HPO_4$ , 1.2M Sorbitol ,40mM EDTA
Spheroplast buffer	Zymolase 20T(2.5mg/ml) in SCE buffer
5× TE	50mM Tris-cl pH7.5, 5mM EDTA pH8.0
5M potassium acetate	3M potassium acetate, 11.5% glacial acetic acid
<b><i>In situ</i> hybridization</b>	
30% formaldehyde	30% Paraformaldehyde, 0.5mM NaOH in 1×PBS
Spheroplast buffer	Zymolase 100T(4mg/100ml) in SCE buffer
Hybridization solution	20×SSC, 50% dextran sulfate, 2% BSA, Vanadyl complex, tRNA(1mg/ml). Oligo dT50
Fluorescin	0.1mM Tris-cl pH7.5, 3mM NaCl,
Antidioxigenin	Antidioxigenin(200 $\mu$ g/ml), 2% BSA, 0.3% TritionX-100
DAPI mounting medium	DAPI(1mg/ml) in Glycerol

표 5. 실험에 사용한 버퍼 (continued)

<b>Western Blot</b>	
Stop buffer	50mM NaF, 10mM $NaN_3$ in PBS
Lysis buffer	6mM $Na_2HPO_4$ , 4mM $NaH_2PO_4$ , 1% NP-40, 150mM NaCl, 50mM NaF
Protease inhibitors in 50mℓ lysis buffer	4μg/ml leupeptin, 0.1mM $Na_3VO_4$ , 1.3mM benzamidine, 1mM PMSF
10× electrophoresis buffer pH 8.3	250mM Tris base, 1.92mM Glycine, 1% SDS
Transfer buffer	48mM Tris base, 39mM Glycine, 20% Methanol, 0.0375% SDS
TNTX	50mM Tris base pH 7.5, 200mM NaCl, 0.2% TritonX-100

### Ⅲ. 결과

#### 1. 합성치사 돌연변이체를 이용한 *nab2* 유전자와 연관성 있는 유전자 탐색

합성치사(synthetic lethal)란 세포내 유전적 혹은 기능적으로 연관된 두 개의 유전자 중 각각 하나의 돌연변이만 일어났을 때에는 생장에 영향을 미치지 않지만, 두 개의 유전자 모두 돌연변이가 발생했을 시 세포가 죽어버리는 현상을 뜻한다. 이 현상을 이용하면 기능이 잘 알려진 유전자로부터 유전적 또는 기능적으로 연관된 새로운 유전자를 찾아낼 수 있다.

분열효모에서 *nab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체는 선행연구 Park and Yoon(2012)에서 제작한 두 종류의 합성치사 돌연변이체 2번과 4번 (synthetic lethal *nab2* 2번과 4번의 약자로 이하 SLN2와 SLN4으로 명명)을 사용하였고, 본 연구에서는 새로운 유전자를 탐색하는 실험을 진행하였다. 돌연변이체 SLN2와 SLN4의 *nab2* 유전자는 *nmt* 프로모터에 의해 발현이 조절되므로, thiamine이 없는 배지에서 정상적으로 성장하며 thiamine이 있는 배지에서 합성치사로 인해 죽게 되는 표현형을 지니고 있다(그림 1 A). 분열효모의 DNA library로 형질전환된 세포가 합성치사 돌연변이체인 모균주와 다르게 thiamine이 있는 배지에서 자란다면, 플라스미드에서 발현되는 유전자가 *nab2*의 기능을 상보(complementation)하는 것을 의미한다(그림 1 B). 이 원리를 토대로 *nab2*와 연관성 있는 새로운 유전자를 탐색하였고, 그 결과 세 종류의 유전자 *rmn1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c*를 선별하였다.

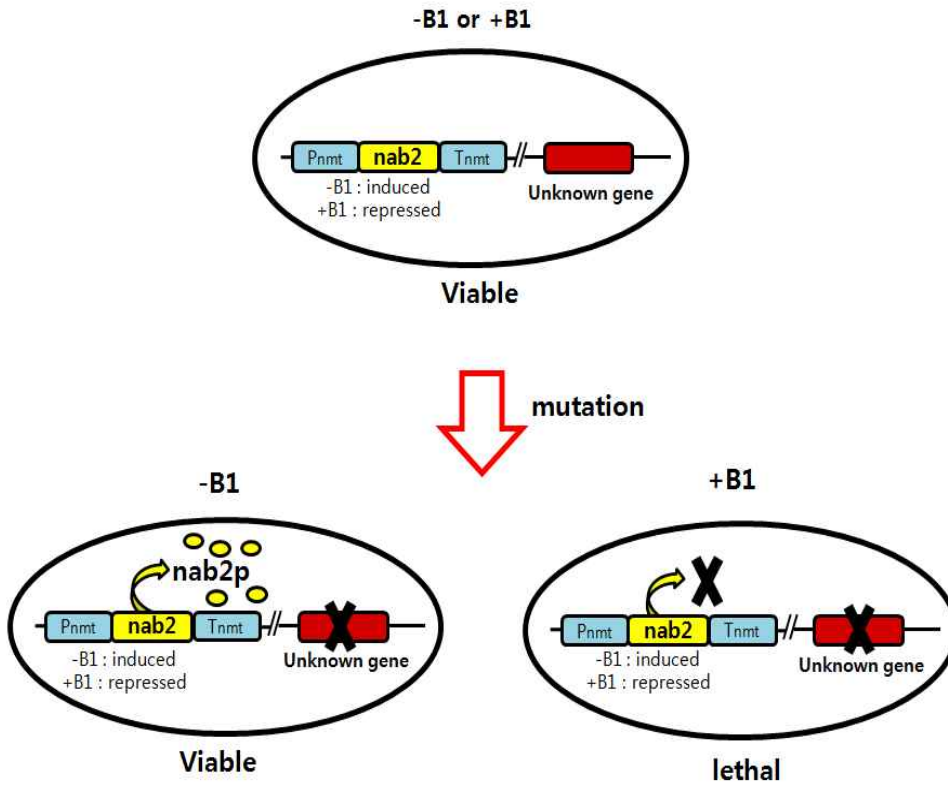
DNA 서열분석으로 세 종류의 유전자 *rmn1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c*가 삽입되어있는 것을 확인한 벡터를 다시 돌연변이체 SLN2와 SLN4에 형질전환 하여, thiamine이 포함되지 않은 배지와 thiamine이 포함된 배지에 배양하고 상보성을 확인하였다(그림 2). 양성 대조군(positive control)으로 *nab2*

유전자 재조합 벡터를 사용하였고 음성 대조군(negative control)으로 빈 벡터(empty vector)를 사용하였다.

돌연변이체 SLN2의 상보성 확인결과(그림2 A), -B1배지에서는 대조군을 포함하여 모든 균주들이 정상적인 성장을 보여주었다. 하지만 +B1배지에서는 *nab2* 유전자 발현 억제로 인한 합성치사의 결과로 빈 벡터가 들어간 음성대조군의 경우 전혀 성장하지 않았으나, *nab2* 유전자가 들어간 양성대조군의 경우 완전한 상보성(full complementation)을 나타내었다. +B1배지에서 *rmn1*과 *UAP56* 유전자는 음성대조군과 비교한다면 성장하였지만, 양성대조군과 비교하였을 때 콜로니의 크기가 절반 이하로 작은 부분적 상보성(partial complementation)을 보였다. *SPCC1442.04c* 유전자는 +B1배지에서 양성대조군과 비교하였을 때 콜로니의 크기에 차이가 없는 완전한 상보성을 보였다.

돌연변이체 SLN4의 상보성 확인결과(그림2 B), 위의 결과와 마찬가지로 -B1배지에서는 대조군을 포함한 모든 균주들이 정상적인 성장을 보여주었다. 하지만 SLN2 균주와 다르게 SLN4 균주는 +B1배지의 음성대조군에서 완전한 성장저해를 보이지 않으며, 세포가 일정수준 성장하는 차이점을 보였다. 또한 세 종류의 유전자 *rmn1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c* 모두 양성 대조군과 비교하였을 때 콜로니 크기에 차이가 없는 완전한 상보성을 나타내는 것을 확인하였다.

(A)



(B)

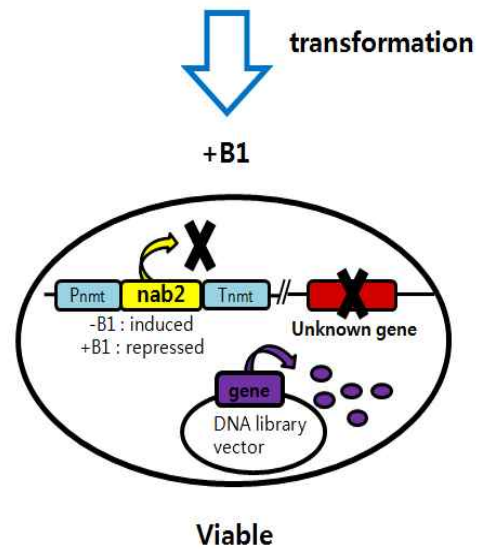
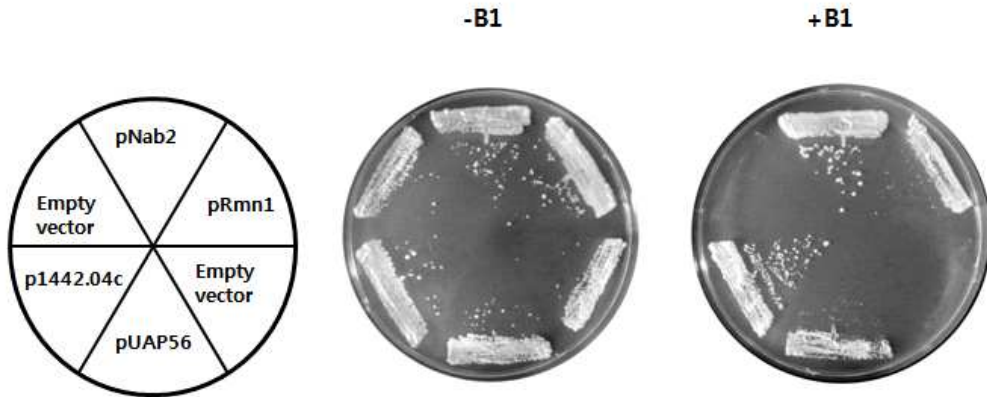


그림 1. 합성치사 돌연변이체 및 유전자 탐색과정

(A) 합성치사 돌연변이체의 제작과정. 합성치사 돌연변이체를 만들기 위해 *nab2* 유전자 본연의 프로모터를 *nmt* 프로모터로 치환하였다. *nmt* 프로모터는 -B1 배지에서 유전자 발현을 활성화 하며, 반대로 +B1 배지에서 유전자 발현을 억제한다. 돌연변이원을 처리하기 전에는 ±B1 배지에서 모두 성장 가능하다. 하지만 돌연변이원 처리 후 *nab2*와 합성치사를 보이는 유전자위에 돌연변이가 발생하면, -B1 배지에서는 *nab2* 유전자 발현으로 생존 가능하지만 +B1 배지에서는 *nab2* 유전자 발현억제로 합성치사를 보인다.

(B) *nab2* 기능을 상보하는 유전자 탐색과정. 분열효모의 Genomic DNA library를 사용하여 형질전환 하였을 때, 벡터에 삽입되어 있는 유전자가 *nab2* 유전자의 기능을 상보한다면 +B1 배지에서도 성장 가능하며, 이 벡터를 추출하여 분석하면 상보하는 유전자가 무엇인지 알아낼 수 있다.

(A)



(B)

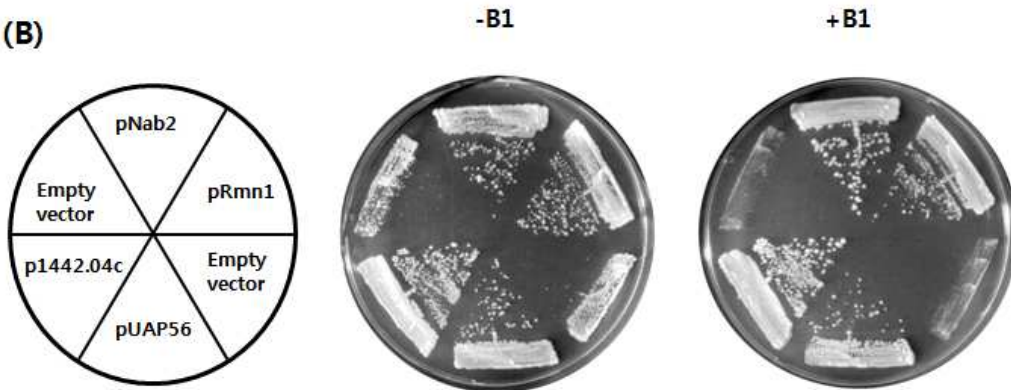


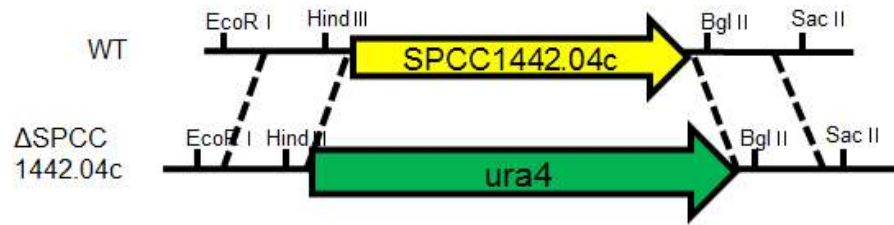
그림 2. 합성치사 돌연변이체의 상보성 확인

(A) SLN2 돌연변이체의 상보성 확인결과. (B) SLN4 돌연변이체의 상보성 확인결과. 유전자 탐색결과로 얻은 세 종류의 유전자 *rmn1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c*가 *nab2* 유전자의 기능을 상보하는지 다시 한 번 확인하기 위해 DNA 서열분석방법으로 확인된 각각의 재조합 벡터를 이용하여 형질 전환하였다. empty vector는 음성대조군, pNab2는 양성대조군으로 사용하였다.

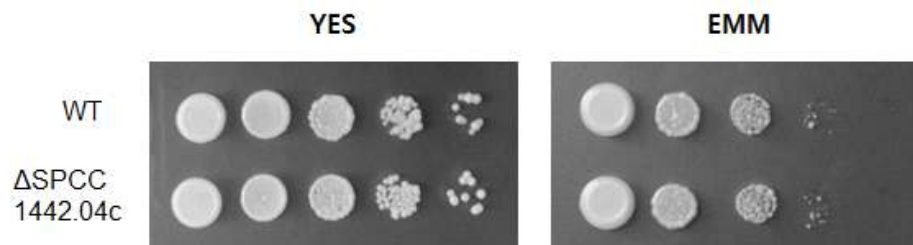
## 2. SPCC1442.04c(*rmr1*) 결실돌연변이 균주의 제작과 분석

합성치사 돌연변이체를 이용한 유전자 탐색으로 얻은 세 종류의 유전자 *rmn1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c* 중에서 아직 자세한 기능이 연구되지 않은 *SPCC1442.04c* (*rmr1* 으로 명명) 유전자의 기능을 알아보고자 결실돌연변이 (deletion mutant)를 제작하였다(그림3 A). Spot-Assay 방법을 통해 동일한 세포 수와 동일한 배지 및 온도에서 *rmr1* 유전자 결실돌연변이  $\Delta$  *rmr1::ura4*의 성장속도를 관찰한 결과 YES배지와 EMM배지 모두에서 야생형 균주와 성장 속도에 차이가 없는 것을 확인하였다(그림3 B). 결실돌연변이  $\Delta$  *rmr1::ura4*의 mRNA export 결함 여부를 알아보기 위해 *In situ* Hybridization 실험을 진행하였다. *In situ* Hybridization 실험은 mRNA poly(A)<sup>+</sup> tail 부분에 항체(antibody)를 결합시키고 항체가 띠는 녹색 형광 물질인 FITC (fluorescein isothiocyanate)를 형광현미경으로 관찰하여 세포 내 mRNA 분포를 확인하는 실험방법이다. 균주를 EMM 배지에서 20시간 동안 배양하여 진행하였다. 그 결과 야생형과 마찬가지로 결실돌연변이  $\Delta$  *rmr1::ura4* 또한 mRNA가 세포 전체에 고르게 분포하며 정상적인 mRNA export 과정을 보이는 것을 확인하였다(그림 3 C).

(A)



(B)



(C)

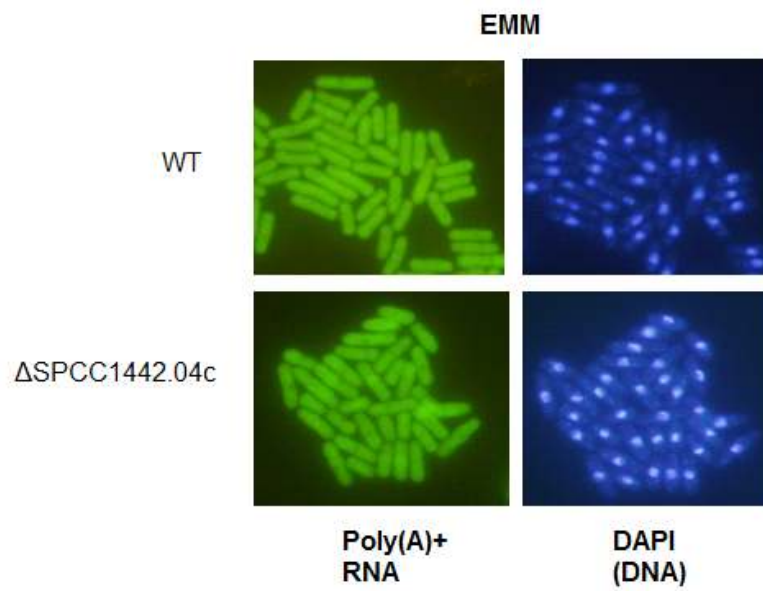


그림 3. 결실돌연변이  $\Delta rmr1::ura4$  균주의 제작과 분석

(A) DJ-PCR을 이용한 결실돌연변이 제작. *rmr1* 유전자 ORF 양쪽의 flanking region은 야생형과 동일하게 하고, *ura4* 유전자를 선택표지(selective marker)로 사용하여 상동재조합 과정을 통해 결실돌연변이를 제작하였다.

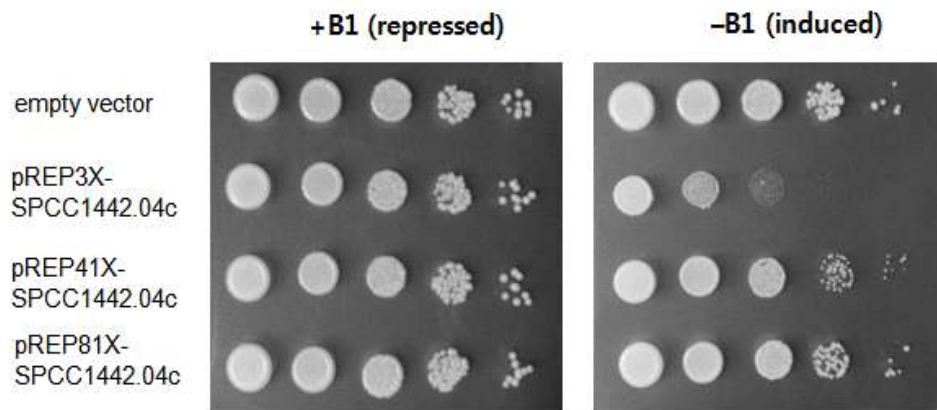
(B) 결실돌연변이 균주의 Spot assay 결과. 야생형 균주 AY217를 대조군으로 사용하여 결실돌연변이 균주  $\Delta rmr1::ura4$ 의 성장속도를 비교하였다. YES 배지는 28°C에서 4일 동안 배양하였으며, EMM 배지는 28°C에서 7일 동안 배양한 결과이다. (C) 결실돌연변이 균주의 *In situ* Hybridization 결과. 위의 실험과 동일하게 야생형 균주를 대조군으로 사용하였으며 28°C EMM 배지에서 20시간 동안 배양한 후 실험을 진행하였다.

### 3. SPCC1442.04c(*rnr1*) 유전자의 과발현 돌연변이 균주의 제작과 분석

앞선 실험결과에서 *rnr1* 유전자가 결실되었어도 세포의 성장에는 아무런 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 따라서 이번에는 *rnr1* 유전자의 발현 양이 증가하면 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 과발현 균주를 제작하였다. Thiamine에 의한 발현조절이 가능한 *nmt* 프로모터가 들어 있는 pREP3X, pREP41X, pREP81X 세 종류의 벡터(vector)를 과발현 실험에 사용하였다. pREP3X는 가장 강력한 발현을 보이는 야생형 프로모터를 지니고 있으며, 이 *nmt* 프로모터의 TATA box에 돌연변이를 일으켜 pREP41X, pREP81X 순으로 약한 발현을 나타낸다. 이 세 종류의 벡터 안에 *rnr1* 유전자를 클로닝(cloning)하고, 클로닝 벡터를 야생형 균주에 형질 전환하는 방법으로 과발현 돌연변이 균주를 제작하였다. 이후 성장속도를 확인하기 위해 대조군과 함께 +B1 배지와 -B1 배지에 Spot-Assay를 진행하였다(그림 4 A). 그 결과 *nmt* 프로모터의 활성억제로 정상적인 세포와 유사한 조건인 +B1 배지에서는 대조군과 비교하였을 때 모든 실험균주가 동일한 성장속도를 보였다. 하지만 *nmt* 프로모터 활성으로 재조합 벡터내의 유전자의 발현이 일어나는 -B1 배지에서는 가장 강력한 프로모터를 지닌 pREP3X 재조합 벡터에서 가장 심한 성장 결함을 보였으며, pREP41X 재조합 벡터와 pREP81X 재조합 벡터 순으로 점차 약한 성장 결함을 보였다. 이후 과발현에 의한 성장 결함이 mRNA export 과정에도 영향을 미치는지 알아보기 위해 In situ hybridization 실험을 진행하였다(그림 4B). 그 결과 +B1 배지에서는 대조군을 포함한 모든 실험균주의 세포 내 mRNA가 고르게 분포하며 정상적인 mRNA export 과정이 이루어지는 것을 확인하였다. -B1 배지에서는 mRNA가 고르게 분포하고 있는 대조군을 제외한 나머지 모든 실험균에서 세포질보다 핵 안에 mRNA가 밀집되어 있는 mRNA

export 결함을 확인하였다. 프로모터의 세기가 가장 강한 pREP3X 재조합 벡터에서 가장 심한 mRNA export 결함이 보였으며, 중간세기 프로모터를 지닌 pREP41X 재조합 벡터와 가장 약한 세기 프로모터를 지닌 pREP81X 재조합 벡터 순으로 점차 약한 결함이 관찰되었다.

**(A)**



**(B)**

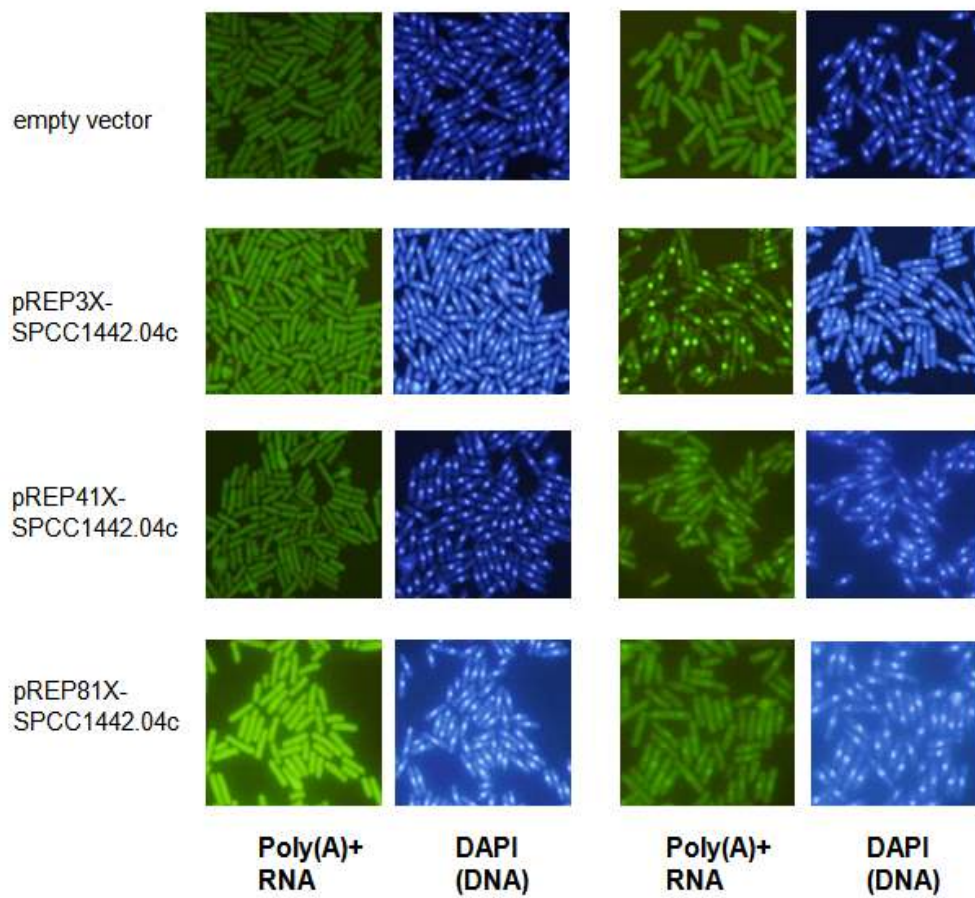


그림 4. SPCC1442.04c(*rmr1*) 과발현 돌연변이의 분석

(A) Spot assay 결과. 과발현 실험을 위해 세 종류의 벡터 pREP3X, pREP41X, pREP81X를 사용하였다. 이 벡터들은 *nmt* 프로모터로 인해, +B1 배지에서는 유전자 발현이 억제되며 -B1 배지에서는 유전자 발현이 촉진된다. 또한 pREP3X 벡터의 프로모터의 세기가 가장 강력하며 pREP41X, pREP81X 순으로 세기가 약해진다. 과발현 대조군으로는 빈 벡터를 사용하였으며 ±B1 배지 모두 28℃에서 6일 동안 배양 후 관찰하였다. (B) *In situ* Hybridization 결과. 위의 실험과 동일하게 빈 벡터를 대조군으로 사용하였으며 ±B1 배지 모두 28℃에서 20시간 동안 배양한 후 실험을 진행하였다.

#### 4. SPCC1442.04c(*rnr1*) 유전자의 위치추적(localization)

결실돌연변이는 생명활동에 아무런 영향을 미치지 않지만, 과발현시 생장 및 mRNA export 결함을 나타내는 *rnr1* 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 이를 위해서 GFP(green fluorescent protein)를 사용하였다. GFP는 해파리 *Aequorea victoria* 에서 추출한 단백질로 238 개의 아미노산으로 이루어진 분자량 26.9 kDa 크기의 녹색의 띠는 형광 단백질이다. 세포나 조직을 파괴하지 않고 유전자 발현 및 단백질 위치추적의 표지(marker)로 활용할 수 있다는 장점 때문에 생물학의 다양한 분야에서 널리 사용되고 있는 유용한 단백질이다(Tsien RY. 1998).

DJ-PCR 방법으로 *rnr1* 유전자의 C-말단에 *GFP-kan<sup>r</sup>* 유전자를 삽입한 구조를 제작하고, 상동재조합과정으로 야생형AY217균주에서 *rnr1* 유전자 위치에 삽입하였다(그림5 A). 이후 *rnr1*-GFP 키메라 단백질의 정상발현 및 *rnr1*의 세포 내 위치를 형광현미경을 통해 관찰한 결과, 핵 안에 위치하는 것을 확인하였다(그림5 B).

(A)

SPCC1442.04c-GFP



(B)

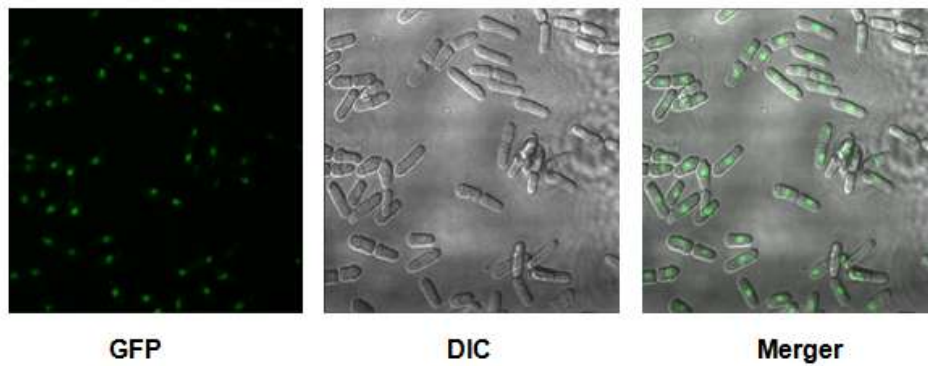


그림 5. SPCC1442.04c(*rnr1*) 유전자의 위치추적

(A) *rnr1*-GFP::*kan<sup>r</sup>* 구조 제작. DJ-PCR 방법을 이용하여 *rnr1*-GFP 구조를 제작하였으며, 돌연변이의 선택표지로 *kan<sup>r</sup>* 유전자를 사용하였다. *kan<sup>r</sup>* 은 항진균제인 G418을 첨가한 배지에서 성장할 수 있는 형질을 띤다. (B) 형광 현미경 관찰결과. 600배 렌즈로 형광(GFP)과 광학(DIC)을 각각 촬영하여 통합(Merger)한 결과이다.

## 5. 이중 돌연변이 균주의 제작과 분석

*rmr1* 유전자에 대하여 *nab2* 유전자 및 mRNA export 과정에 참여하는 것으로 알려진 *mex67*, *rae1*, *sac3*, *mlo3*, *dss1* 유전자와의 유전적 연관성이 있는지 알아보기 위해 이중 돌연변이(double mutant)를 제작하였다. 이중 돌연변이는 무작위 포자 분석(random spore analysis; RSA) 방법을 사용하여 제작하였다. 총 일곱 가지의 모균주( $\Delta rmr1$ ,  $\Delta nab2$ ,  $\Delta mex67$ , *rae1-167*, *sac3-3*,  $\Delta mlo3$ ,  $\Delta dss1$ )와 여섯 가지의 이중돌연변이를 제작하여 이에 대한 Spot assay를 진행하였다(그림 6).

그 결과 이중 돌연변이균주  $\Delta rmr1\Delta nab2$ 는 YES배지에서 모균주와 성장속도 차이가 보이지 않았으나, EMM배지에서  $\Delta rmr1$  모균주보다 3배 빠르며,  $\Delta nab2$  모균주 보다 4배 빠른 성장속도를 보였다.  $\Delta rmr1\Delta mex67$  이중 돌연변이균주는 YES배지에서 모균주  $\Delta rmr1$ 과  $\Delta mex67$ 와 같은 성장속도를 보였으나, EMM배지에서는  $\Delta mex67$  모균주보다 2배 빠르며  $\Delta rmr1$  모균주와는 같은 성장속도를 보였다. 이중 돌연변이  $\Delta rmr1rae1-167$  균주는 YES배지에서 두 종류의 모균주와 모두 동일한 성장속도를 보였으나, EMM배지에서 모균주 *rae1-167* 보다 2.5배 빠르며, 모균주  $\Delta rmr1$  보다 1.5배 빠른 성장속도를 나타내었다.

$\Delta rmr1sac3-3$  이중 돌연변이균주는 YES배지에서 모균주  $\Delta rmr1$ 보다 4.5배 느리며, 모균주 *sac3-3*보다도 2배 느린 성장속도를 보였지만 EMM배지에서는 두 가지 모균주와의 뚜렷한 성장차이가 관찰되지 않았다.  $\Delta rmr1\Delta mlo3$  이중돌연변이 균주는 YES배지에서 모균주  $\Delta rmr1$  보다 3배 느리지만 모균주  $\Delta mlo3$  보다는 2배 빠른 성장속도를 보였나, EMM배지에서는  $\Delta mlo3$  모균주 보다 2배 느린 성장속도를 나타내었다.  $\Delta rmr1\Delta dss1$  균주는 YES배지에서 모균주  $\Delta rmr1$  보다 3배 느리지만 모균주  $\Delta dss1$ 와는 같은 성장속도를

보였으며, EMM배지에서는  $\Delta dssI$  모균주보다 약간 빠른 성장을 나타내었다.

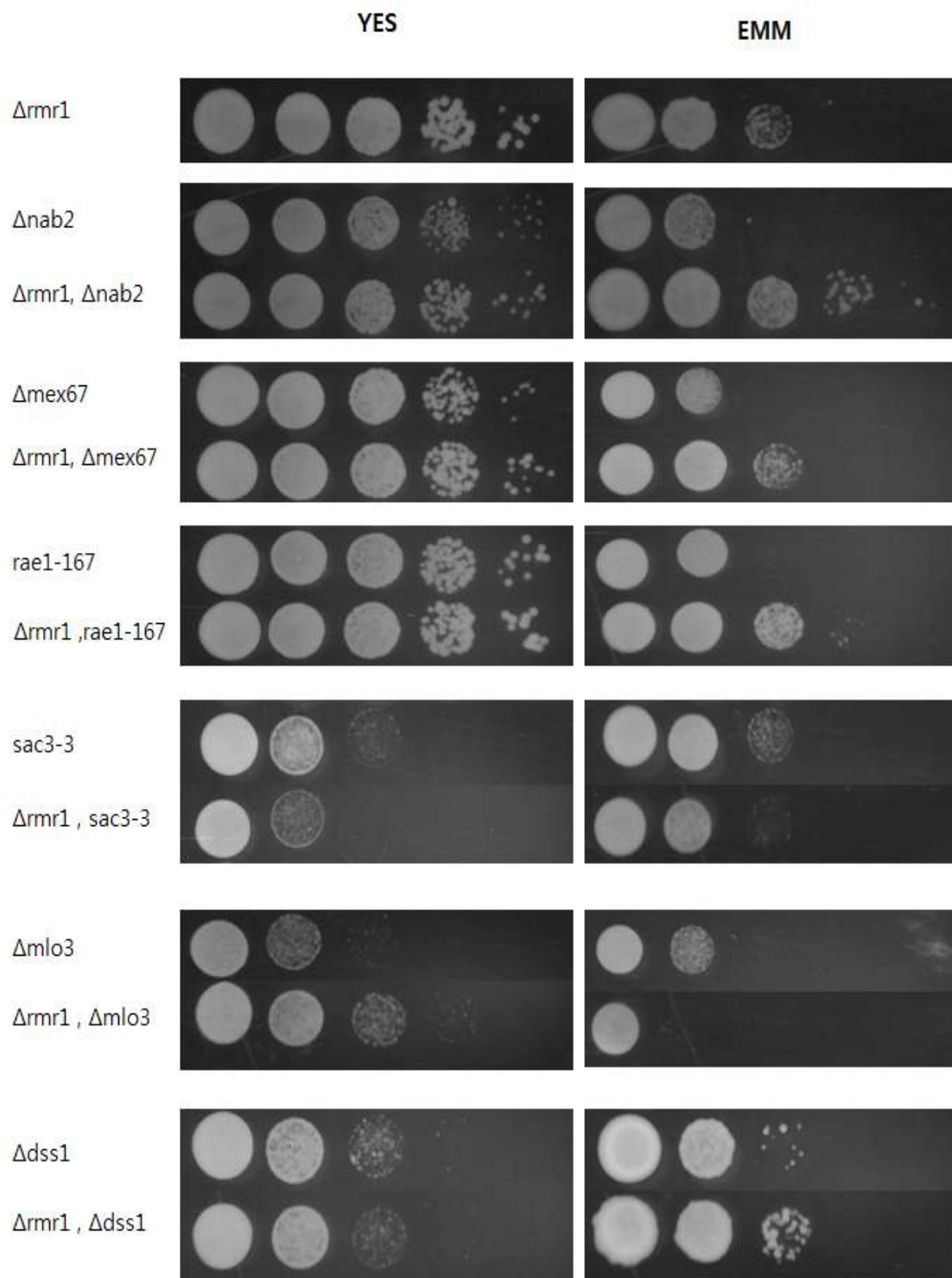


그림 6. 이중돌연변이의 Spot assay 생장비교.

합성치사 돌연변이체를 이용한 유전자 탐색결과로 얻은 *rmr1* 유전자에 대하여, 다른 유전자들과의 유전적 연관성을 알아보기 위하여 mRNA export 과정에 관여하는 것으로 잘 알려진 여섯 종류의 유전자 *nab2*, *mex67*, *rae1*, *sac3*, *mlo3*, *dss1*와 이중 돌연변이를 제작하였다. 총 일곱 가지의 모균주  $\Delta rmr1$ ,  $\Delta nab2$ ,  $\Delta mex67$ , *rae1-167*, *sac3-3*,  $\Delta mlo3$ ,  $\Delta dss1$ 와 여섯 가지의 이중돌연변이  $\Delta rmr1\Delta nab2$ ,  $\Delta rmr1\Delta mex67$ ,  $\Delta rmr1rae1-167$ ,  $\Delta rmr1sac3-3$ ,  $\Delta rmr1\Delta mlo3$ ,  $\Delta rmr1\Delta dss1$ 에 대한 Spot assay를 진행하였다.  $10^5$  cells 부터  $10^1$  cell까지 1/10씩 연속 희석하여 총 5-fold로 구성하였고, YES 배지와 EMM 배지에 28°C에서 4-9일 동안 배양한 후 관찰하였다.

## 6. 세포 내 Rmr1 단백질의 상호작용 분석

세포 내에서 Rmr1 단백질과 mRNA export에 관여하는 단백질 Nab2, Mex67, Rae1, Mlo3가 서로 상호작용하는지 알아보기 위해 co-immunoprecipitation 실험을 진행하였다. 이를 위해 Rmr1 단백질은 C-termination 위치에 TAP(Tandem Affinity Purification)을 tagging하였다. TAP 구조는 Calmodulin binding peptides와 TEV Protease 그리고 Protein A 순으로 구성되어있으며 가장 바깥쪽으로 Protein A가 노출되어있기 때문에 Protein A 항체로 rmr1 단백질을 감지하였다. nab2, mex67, rae1, mlo3 단백질은 N-termination 위치에 Triple-HA를 tagging하여 HA 항체로 감지하였다. 자세한 균주제작과 실험방법은 II. 실험재료 및 방법에 기술하였다.

야생형에서 Nab2, Mex67, Rae1, Mlo3 단백질을 발현시킨 균주를 대조군으로 사용하여 실험을 진행하였다(그림 7). 그 결과 Nab2, Mex67, Rae1, Mlo3 단백질 모두 Whole cell extract (WCE)에서는 HA 항체를 통해 감지되었다(그림7. 1-4번, 9-12번). Rmr1 단백질 또한 Protein A 항체를 통해 감지되며(그림7. 짝수번호), Protein A 항체가 야생형인 대조군(그림7. 홀수번호)에서는 감지되지 않는 것으로 미루어 모든 항체가 정상적인 활성을 나타낸 것을 알 수 있었다. 하지만 IP 이후에는 대조군과 비교하였을 때 모든 실험군에서 Background 밴드만이 감지된 것을 확인하였으며(그림7. 5-8번, 13-16번), 결과적으로 *In-vivo*에서 Rmr1과 상호작용하는 단백질은 확인할 수 없었다.

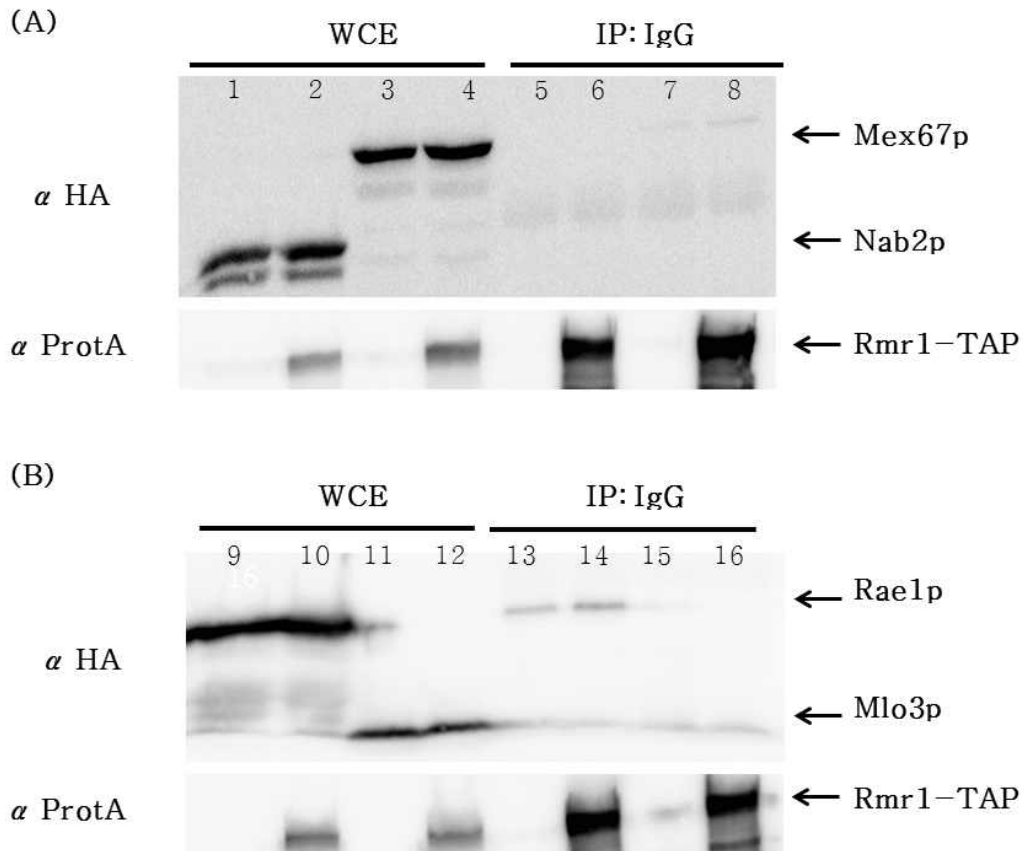


그림 7. rmr1-TAP을 이용한 co-immunoprecipitation 실험.

(A) rmr1과 nab2 또는 rmr1과 mex67 단백질의 immunoprecipitation 실험 결과. (B) rmr1과 rael1 또는 rmr1과 mlo3 단백질의 immunoprecipitation 실험 결과. 야생형에서 nab2, mex67, rael1, mlo3 각각의 단백질을 발현시킨 균주가 대조군이며(홀수번호), rmr1-TAP에서 각각의 단백질을 발현시킨 균주가 실험군이다(짝수번호). 단백질 nab2, mex67, rael1, mlo3은 HA 항체를 이용하여 감지하였으며, 단백질 rmr1은 Protein A 항체를 이용하여 감지하였다.

## IV. 토의

본 연구에서는 분열효모에서 *nab2* 유전자와 합성치사(synthetic lethal)를 보이는, 두 종류의 돌연변이체 SLN2와 SLN4(Park and Yoon, 2012)를 이용하여 *nab2*와 관련된 새로운 유전자를 탐색하는 실험을 수행하였다. 그 결과 *nab2*의 기능을 상보하는 유전자 *rmn1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c*를 선별하였다. 이 세 종류의 유전자들이 돌연변이체의 합성치사 표현형을 억제하며, *nab2*의 기능을 상보하는지 다시 한 번 확인한 결과(그림 2) 유전자 *rmn1*과 *SPCC1442.04c*은 완전한 상보성을 나타내었으며 *UAP56*은 부분적 상보성을 나타내었다. 이에 따라 합성치사 돌연변이체 내에 무작위로 망가진 유전자가 완전한 상보성을 보여준 유전자 *rmn1*과 *SPCC1442.04c*인지 알아보기 위해 돌연변이체 SLN2와 SLN4의 *rmn1*과 *SPCC1442.04c*의 유전자 ORF를 서열분석 하였다. 그 결과 SLN2와 SLN4 돌연변이체에서 *rmn1*과 *SPCC1442.04c*의 유전자 모두 돌연변이는 발견되지 않았으며, 유전자 탐색을 통해 얻은 세 종류의 유전자 *rmn1*, *UAP56*, *SPCC1442.04c*은 *nab2* 기능을 상보하는 multi-copy suppressor인 것으로 밝혀졌다.

*rmn1*은 RNA-binding protein로서 생장에 필수적인 유전자는 아니지만 과발현시 mRNA export 결함을 나타내며, mRNA export factor인 *rae1*과 상호작용(interaction)하는 것으로 알려져 있다(Ye-Seul Cho et al. 2012). *UAP56*은 ATP-dependent RNA helicase이며 생장에 필수적인 유전자(essential gene)이고 (Kim DU et al. 2010), mRNA export factor인 *rae1*과 RNA-binding protein인 *mlo3*와 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Thakurta AG et al. 2005). *SPCC1442.04c*은 감수분열 재조합 단백질(meiotic recombination protein)으로 추정되며 아직까지 자세한 기능이나 상호작용하는 단백질은 밝혀진바 없다. 하지만 mRNA export 과정에 관여하

는 *rmr1* 및 *UAP56* 유전자와 함께 유전자 탐색과정으로 발견하였기 때문에 그 성질이 서로 유사할 것으로 추정되며, 이에 따라 *SPCC1442.04c* 또한 mRNA export 과정에 참여할 가능성이 있기 때문에 *SPCC1442.04c(rmr1)*에 대해 좀 더 알아보려고 실험을 진행하였다.

결실돌연변이를 이용한 실험결과 *rmr1* 유전자는 생장에 필수적이지 않으며, *rmr1* 유전자의 결실이 세포 형태, 성장, mRNA export 과정 등 생명활동에 아무런 영향을 미치지 않고 야생형 균주와 동일한 표현형을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(그림 3). 하지만 *rmr1* 유전자의 과발현 시 성장 및 mRNA export 결함을 동시에 발견하였다(그림 4). 가장 강력한 프로모터를 지닌 pREP3X 재조합 벡터에서 가장 심한 결함을 보였으며, pREP41X 재조합 벡터와 pREP81X 재조합 벡터 순으로 점차 약한 성장 결함을 보였는데, 이는 성장결함과 mRNA export의 결함 사이의 연관성이 존재한다는 근거가 되며, 본래 *rmr1* 유전자가 지니고 있는 프로모터에 의한 발현이 벡터 내의 가장 약한 세기의 *nmt* 프로모터에 의한 발현보다도 더 낮은 활성을 나타내어 적은 양으로도 충분한 기능을 수행할 수 있으며, 단백질의 양이 필요이상으로 점차 증가할수록 결함의 정도 또한 증가하는 것을 의미한다. 살아있는 세포에서 *rmr1* 단백질이 주로 핵 안에 위치하고 있는 것을 확인한 실험결과(그림 5)와 더불어 *rmr1* 단백질은 핵 안에서 mRNA export 과정과 관련된 기능을 수행할 가능성을 제시한다.

위의 가능성을 토대로 *nab2* 유전자를 포함하여 mRNA export 과정에 참여하는 것으로 잘 알려진 다섯 종류의 유전자 *mex67*, *rae1*, *sac3*, *mlo3*, *dss1*와 *rmr1* 유전자와의 이중 돌연변이를 제작하여 유전적 연관성을 확인하고자 하였다. Spot assay 결과 같은 균주이지만 배지에 따른 성장속도의 차이가 나타났다(그림 6). 이 결과는 이중돌연변이를 만든 *rmr1* 유전자와 각각의 *nab2*, *mex67*, *rae1*, *sac3*, *mlo3*, *dss1* 유전자와의 연관성이 존재하여

세포 내에 어떠한 영향을 미치는 것을 의미할 수 있다. 하지만 단일 돌연변이 균주를 제작할 때 사용한 야생형 균주 AY217가 본래 YES배지보다 EMM배지에서 느리게 자라는 표현형을 지니고 있어서, 균주 자체의 특징이 이중돌연변이에서도 배지에 따른 성장속도 차이로 나타난 것일 수 있다는 가능성 또한 존재한다.

*In-vivo*에서 Rmr1 단백질이 mRNA export 관련 Nab2, Mex67, Rael1, Mlo3 단백질과 상호작용하는지 알아보기 위해 co-immunoprecipitation 실험을 진행하였으나, 아무런 상호작용을 확인할 수 없었다(그림 7). Rmr1 단백질은 아직 기능이 알려진 바 없기 때문에 양성 대조군을 설정할 수가 없었다. 따라서 Immunoprecipitation 실험조건 자체의 문제로 결과가 나오지 않았을 가능성이 있다. 하지만 다른 논문에 기재된 TAP purify 방법을 살펴보면 이 실험에 사용한 버퍼와의 조성 차이가 크게 발견되지 않았으며, 실험방법 또한 차이가 없었다. 그렇다면 단백질을 감지하기 위해 사용한 항체 또는 epitope tag에 의한 단백질의 상호작용 방해 가능성을 제시할 수 있다. 만약 Rmr1 단백질이 상호작용하는데 C-termination 부위가 결정적 역할을 한다면 C-term에 TAP을 tagging한 Rmr1-TAP으로는 아무런 실험결과를 얻지 못할 것이다. 또한 다른 단백질과 상호작용하는 부위에 항체가 결합하는 경우에도 같은 결과를 얻는다. 따라서 이러한 문제점을 보완하고 정확한 실험결과를 얻기 위해 Yeast two hybrid, Bimolecular fluorescence complementation (Bifc), Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 등과 같이 단백질의 상호작용을 관찰할 수 있는 추가적인 실험을 진행할 필요성이 있다.

*rmr1* 유전자는 *nab2* 유전자와 합성치사를 보이는 돌연변이체를 이용하여 mRNA export에 관련되어 있는 다른 유전자 *rmn1*, *UAP56* 와 함께 발견하였지만, *nab2* 유전자를 포함하여 mRNA export에 관련되어있는 것으로 알

려진 다른 유전자들과 합성치사를 보이지는 않았으며, 그들과의 뚜렷한 연관성 또한 찾지 못했다. 하지만 *rmr1*은 과발현시 mRNA export의 결함을 나타내기 때문에 mRNA export 과정에 연관되어 있는 새로운 유전자로 추정되며 이에 대한 추가적인 연구의 필요성을 제시하는 바이다.

## 참고문헌

Alfa C., Fantes., Hyams K., Mcleod M., and Warbrick E. 1993. Experiments with fission yeast. Cold spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY, USA.

Brown Julie A., Anekella Bharathi., Anil Ghosh., William Whalen., Ellen Fitzgerald., and Ravi Dhar. 1995. A Mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* rael Gene Causes Defeccts in *Poly(A)*<sup>+</sup> RNA Export and in the Cytoskeleton. *J Biol Chem.* 270, 7411-7419.

Chavez S., Beilharz T., Rondon A.G., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Svejstrup Q.J., Lithgow T., Aguilera A. 2000. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO.* 19, 5824-5834.

Chekanova Julia A., Albruzzi Katharine C., Rosbash Michael Michael., and Belostotsky Dmitry A. 2008. Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP. *RNA.* 14, 66-77.

Cho Y.S., Jang S., Yoon JH. 2012. Isolation of a novel *rmn1* gene genetically linked to *spnab2* with respect to mRNA export in fission yeast. *Mol Cells.* 34, 315-321.

Daniel J.A., Torok M.S., Sun J.W., Schieltz D., Allis C.D., Yates J.R., and Grant P.A. 2004. Deubiquitination of Histone *H<sub>2</sub>B* by a Yeast Acetyltransferase Complex Regulates Transcription. *J Biol Chem.* 279, 1867-1871.

Fischer T., Strasser T., Racz 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.* 21, 5843-5852.

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

Gallardo M., Luna R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Aguilera A. 2003. Nap2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *J Biol Chem.* 278, 24225-24232.

Garcia-Olive E., Garcia-Molinero V., Rodriguez-Navarro S. 2012.. mRNA export and gene expression: The SAGA-TREX-2-connection. *ELSEVIER.* 1819, 555-565.

Grant P.A., Schieltz D., Pray-Grant M.G., Steger D.J., Reese J.C., Yates J.R., Workman J.L. 1998. A Subset of  $TAF_{II}$ s Are Integral Components of the SAGA Complex Required for Nucleosome Acetylation and Transcriptional Stimulation. *Cell.* 94, 45-53.

Gonzalez-Aguilera Cristina ., Cristina Tous., Belen Gomez-Gonzalez., Pablo Huertas., Rosa Luna., and Andres Aguilera. 2008. The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex Works in Transcription Elongation mRNA Export Preventing RNA-mediated Genome Instability. *Mol. Biol. Cell.* 19, 4310-4318.

Govind C.K., Zhang F., Qiu H., Hofmeyer K., Hinnebusch A.G. 2007. Gcn5 Promotes Acetylation, Eviction, and Methylation of Nucleosomes in Transcribed Coding Regions. *Molecular Cell.* 25, 31-42.

Hector R.E., Nykamp K.R., Dheur S., Anderson J.T., Non P.J., Urbinati C.R., Wilson S.M., Minvielle-Sebastia L., and Swanson M.S. 2002. Dual requirement for yeast hnRNP Nab2 in mRNA poly(A)tail length control and nuclear export. *EMBO.* 21, 1800-1810.

Huertas P. and Aguilera A. 2003. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription associated recombination. *Mol Cell.*

12, 711-721.

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

Javerzat Jean-Paul, Gwen Cranston and Robin C. Allshire. 1996. Fission yeast genes which disrupt mitotic chromosome segregation when overexpressed. *Nucleic Acids Research.* 24, 4676-4683.

Kelly S.M., Pabit S.A., Kitchen C.M., Guo P., Marfatia K.A., Murphy T.J., Corbett A.H., and Berland K.M. 2007. Recognition of polyadenosine RNA by zinc finger proteins. *PNAS.* 104, 12306-12311.

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

Kohler A., and Hurt E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Molecular Cell Biology.* 8, 761-773.

Murphy R., Watkins J.L., and Wentz S.R. 1996. GLE2, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor RAE1, is required for nuclear pore complex structure and function. *Molecular biology of the cell.* 7,1921-1937

Park Yun-sun and Jin Ho Yoon. 2012. Isolation of synthetic lethal mutations in combination with *spnab2* of fission yeast. *Genes&genomics.* 34, 275-281.

Pascual-Garcia P., Govind C.K., Queralt E., Cuenca-Bono E., Llopis A., Chavez S., Hinnebusch A.G., Rodriguez-Naverro S. 2008. Sus1 is recruited to coding regions and

functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev.* 22, 2811–2822.

Rodriguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.J., Antunez O., Brettschneider S., Lechner J., Perez-Ortin., Reed R., Hurt E. 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell.* 116, 75–86.

Rondo Ana G., Sonia Jimeno., Andres Aguilera. 2010. The interface between transcription and mRNP export: From THO to THSC/TREX-2. *ELSEVIER.* 1799, 533–538.

Samara Nadine L. and Cynthia Wolberger. 2011. A new chapter in the transcription SAGA. *ELSEVIER.* 21, 767–774.

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.

Shukla A., Bajwa P., and Bhaumik S.R. 2006. SAGA-associated Sgf73p facilitates formation of the preinitiation complex assembly at the promoters either in a HAT-dependent or independent manner in vivo. *Nucl. Acids Res.* 34, 6225–6232.

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

Thakurta Anjan G., Gopal Ganesh., Yoon Jin Ho., Kozak Libor., Dhar Ravi. 2005. Homolog of BRCA2 interacting Dss1p and Uap56p link Mlo3p and Rae1p for mRNA

export in fission yeast. *EMBO*. 24, 2512-2523

Thakurta Anjan G., Gopal Ganesh., Yoon Jin Ho., Saha Tapas., and Dhar Ravi. 2004. Conserved Nuclear Export Sequences in *Schizosaccharomyces pombe* Mex67p and Human TAP Function in mRNA Export by Direct Nuclear Pore Interactions. *J Biol Chem*. 279, 17434-17442.

Tutucci E. and Stutz F. 2011. Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export. *Nature Molecular Cell Biology*. 12, 377-384.

Yoon Jin Ho., Love Dona C., Thakurta Anjan G., Hanover John A., and Dhar Ravi . 2000. Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* Interacts with Rae1p in Mediating mRNA export. *Mol. Cell. Biol*. 20, 8767-8782.

Zenklusen D., Vinciguerra P., Wyss J.C., Stutz F. 2002. Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sun2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol*. 22, 8241-8253.

# Abstract

Isolation and analysis of a novel gene *rmr1*  
associated with mRNA export in fission yeast

Hyunjoo Lee

Department of Biology

Graduate School of

Sungshin Women's University

We have previously isolated SLN2 and SLN4 mutants that show synthetic lethality with the *nab2* which have growth retardation only in the presence of thiamine. By using these mutants, we have searched for genes that could potentially have overlapping or complementary function with *nab2*. From SLN2 and SLN4 transformants with DNA library on EMM (+) thiamine media, we selected plasmids that rescue the capacity to growth defect in the presence of thiamine. Isolation and sequence analysis of the plasmids revealed 3 genes that *rmr1*, *UAP56* and *SPCC 1442.04c(rmr1)*. From among these, we focused on *rmr1* gene. The *rmr1* null mutant showed ever no-growth defect but wild type strains transformed with plasmid DNAs had growth retardation and RNA accumulation phenotype in the nucleus according to the increase of gene expression levels. To further study if *rmr1* gene associates with other mRNA export genes genetically, we conducted growth test of double mutants but the obvious correlation between *rmr1* gene and other genes involved in mRNA export pathway did not found. And also Rmr1 protein localized in nucleus at steady state but Rmr1 protein did not interaction with mRNA export proteins *in vivo*.