

논문개요

진핵생물에서 핵과 세포질 사이의 거대분자들의 이동은 세포들이 정상적인 기능을 하는데 매우 중요하다. 이러한 이동은 핵막에 존재하는 핵공복합체 (Nuclear Pore Complex, NPC)를 통해 이루어지는데, 이동할 거대분자들을 특이적으로 인식하는 수송운반체 (transport receptors)와 수송인자 (soluble transport factors)들이 관여한다. 단백질이나 다른 RNA의 이동과는 달리, mRNA의 핵에서의 세포질로의 이동 (mRNA export)은 훨씬 복잡한데, mRNA 수송운반체와 수많은 수송인자가 상호작용을 한다.

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)에서 *nup211* 유전자는 핵공단백질 (nucleoporin) 결합단백질인 척추동물의 *TPR* 유전자, 발아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 *Mlp1* 유전자와 유사성을 보인다. 이 유전자는 인트론이 없으며 1873개의 아미노산으로 이루어진 분자량 211.4 kDa으로 예측되는 단백질을 암호화하고 있다. 이배체인 *S. pombe* 균주에 하나의 *nup211* 유전자만을 결실시킨 후 4분체분석 (tetrad analysis)을 수행한 결과, 이 유전자가 결실된 반수체 균주는 성장하지 못했다. mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 있어서 *nup211*의 역할을 알아보기 위해, *nup211*의 발현이 티아민에 의해 조절되는 균주를 제작하여 *in situ* hybridization 을 통해 세포 내의 poly(A)⁺ RNA 분포를 살펴보았다. *nup211* 유전자가 과발현되거나 억제되면, poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되고 세포질에서는 줄어들었다. 또한 정상적인 기능을 가진 *nup211*-GFP를 이용하여 세포 내 위치를 확인해 본 결과, 핵공복합체에 위치함을 볼 수 있었다.

이러한 결과들은 *nup211* 유전자가 세포생장에 중요하고, mRNA export에 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

목 차

논문개요	
목차	
그림목차	
도표목차	
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험재료	
1) 균주.....	5
2) Plasmid.....	5
3) 배지 및 배양조건.....	5
4) 효소 및 시약.....	6
5) Primer 및 sequence analysis.....	6
6) 완충용액 및 반응용액.....	6
2. 실험방법	
1) Construction of plasmid	
① pREP series <i>nup211</i> subcloning	13
② GFP- <i>nup211</i> plasmid.....	13
③ Integration vector 제조.....	14
2) Cracking of <i>E. coli</i>	14
3) Transformations.....	15
4) <i>nup211</i> knockout	16
5) Yeast genomic DNA isolation	18

6) Southern Blotting.....	18
7) <i>In situ</i> hybridization.....	19
8) Spot assay for growth.....	20
III. 결과	
1) <i>nup211</i> 결실돌연변이주 (Knockout mutants) 제조 및 분석.....	21
2) <i>nup211</i> 유전자의 과발현 (overexpression).....	23
3) <i>nup211</i> 유전자의 발현 억제 (repression)와 mRNA export 결합.....	26
4) <i>nup211</i> 단백질의 세포 내 위치.....	31
IV. 토의.....	35
참고문헌	
영문초록	

그림 목 차

Figure 1. <i>nup211</i> gene deletion by DJ-PCR.....	17
Figure 2. Construction of <i>nup211</i> deletion mutants.....	22
Figure 3. Growth of <i>nup211</i> over expression strain was monitored by growth...	24
Figure 4. Growth of <i>nup211</i> over expression strain was monitored by mRNA export	25
Figure 5. Schematic diagram of synthetic lethality.....	28
Figure 6. Southern hybridization analysis for disruption of the <i>nup211</i>	29
Figure 7. $\Delta nup211$ mutants showed the defect of growth.....	30
Figure 8. Localization of Nup211p fused to GFP.....	32
Figure 9. Construction of Nup211-GFP.....	33
Figure 10. Southern hybridization analysis for Nup211-GFP.....	34

도 표 목 차

Table 1. Strains used in this study.....	8
Table 2. <i>S.pombe</i> medium composition.....	9
Table 3. <i>E.coli</i> medium composition.....	11
Table 4. PCR primer used in this study.....	12

I. 서론

진핵생물은 전사와 번역이 시간적, 공간적으로 분리되어 있어 유전자 발현을 조절할 수 있는 단계가 원핵생물에 비해 더 존재한다. 그러나 각각의 구별된 구성물질을 유지하기 위해 핵과 세포질 사이를 구획화하여 선택적으로 물질을 이동시킨다. 결과적으로, 핵막을 경계로 단백질과 RNA가 운반되고 조절된다. 핵막에 존재하는 통로인 핵공복합체(NPC, Nuclear pore complex)는 이중막으로 된 핵막 사이에 거대한 분자구조로 이루어져 있으며, 이러한 핵공복합체는 단백질과 RNA와 같은 거대분자들이 핵과 세포질 사이로 이동할 수 있는 유일한 통로이다(Görllich and Kutay, 1999; Fahrenkrog and Aebi, 2003). 핵공복합체는 yeast에서 40MDa, mammalian cell에서 60MDa로 구성되어 있고, 폭이 120nm, 높이가 70nm인 도넛 모양과 같은 핵공복합체 body가 핵막을 관통하고 있다. 그리고 세포질쪽으로는 8개의 기둥으로 이루어져있는 cytoplasmic filament가 핵공복합체 body에서 돌출되어 있으며, 핵 안쪽으로는 Nuclear basket을 형성하고 있다(Feldherr and Cohen, 2001).

이러한 핵공복합체는 nucleoporin(nups)이라 불리는 30종류의 단백질들로 구성되어 있다(Rout and Wente, 1994; Rout, M. P. *et al.*, 2000; Cronshaw and Matunis, 2002). 대부분의 nucleoporin은 핵공복합체의 body를 구성하고 있으며, 핵과 세포질 쪽에 대칭적으로 위치하고 있다. Nucleoporin들은 코일처럼 꼬여있는 구조를 형성하는 도메인과 같은 몇 종류의 특징적인 도메인들로 구성되어 있다. 특히 핵공복합체의 중앙통로를 둘러싸고 있는 많은 nucleoporin들은 페닐알라닌-글라이신(FG)이 반복되는 FG 도메인을 가지고 있는데, 이 도메인은 일정한 구조를 형성하지 않고 핵공복합체의 중앙통로를 국수가락처럼 채우고 있다. 이러한 FG 도메인은 핵공복합체를 통해 거대분자가 비특이적으로 확산되는 것을 막고, 수송운반체(transport receptor)들과 일시적인 결합을 함으로써 수송운

반체와 결합하고 있는 거대분자들의 이동이 이루어지게 한다(Cronshaw, J. M. *et al.*, 2002; Tran and Wentz, 2006). 또한, 수송반체의 N-말단 도메인은 Ras-family GTPase인 Ran 단백질과 결합하는데, 핵에는 Ran-GTP가, 세포질에는 Ran-GDP가 분포하여 농도 구배에 따라 거대분자들의 이동 방향성을 결정한다 (Weis, 2003; Lei and Silver, 2002). 따라서 ~40kD 보다 큰 거대한 분자들과 mRNA를 제외한 RNA (rRNA, tRNA, snRNA, miRNA 등)의 핵과 세포질 사이의 이동은 importin- β type family에 속하는 수송반체들을 사용하여 핵공복합체를 통해서 운반된다 (Köhler and Hurt, 2007).

유전자 발현의 변화는 일반적으로 분자적 신호가 핵 안으로 유입됨으로써 조절된다(Stewart, 2007). 이러한 신호서열은 핵 위치 신호(nuclear localization signal)라 불리며 통상 몇 개의 양전하를 띤 리신이나 아르기닌을 갖고 있는 짧은 아미노산 서열로 구성되어 있다.

유전자 발현은 mature mRNA 전사체들의 생산에 의존하는데, mRNA가 번역되기 위해서는 핵 안에서 합성된 mRNA가 세포질로 빠져나가야만 한다. 이렇게 복잡하고 다양한 과정들은 3단계로 구분할 수 있다(Moore, 2005; Köhler and Hurt, 2007; Cole and Scarcelli, 2006; Tran and Wentz, 2006; Stewart, 2007). 첫 번째, 핵 안에서 mature mRNA가 export에 적합한 복합체를 형성하는 것과 두 번째, 핵에서 세포질로 나가기 위해 핵공복합체를 통과하기 적합한 복합체의 형성, 세 번째로 세포질에서 핵 안으로 다시 유입되는 것을 막는 복합체의 형성이다. 대부분의 export competent mRNPs는 nuclear export를 위해 필요하고, 전사체에 5'-capping을 하고, splicing에 의해서 인트론을 제거하고, 3'-end 절단 및 polyadenylation화 함으로써, 성숙한 mRNP를 완성한다(Moore, 2005; Köhler and Hurt, 2007). 따라서 processing step은 성숙한 전사체가 핵에서 세포질 사이의 경계면으로 이동되면서 종료된다.

핵공복합체를 통한 mature mRNPs의 export는 yeast에서 mRNA export receptor로 Mex67:Mtr2라 불리는 heterodimer에 의해서 첫 번째로 전달되어진다. 이것

은 FG nucleoprotein이라 불리는 nuclear pore의 단백질과 함께 일시적으로 상호 작용한다(Moore, 2005; Köhler and Hurt, 2007; Cole and Scarcelli, 2006; Stewart, 2007).

Export 복합체가 세포질에 도달하게 되면, RNA helicase인 Dbp5와 NPC결합 단백질인 Gle1이 즉시 분해가 된다. 이러한 과정은 mRNP가 핵 안쪽으로 다시 유입되는 것을 막는 분자적 제동기로써의 기능을 한다(Cole and Scarcelli, 2006; Guo and Wentz, 2006; Weirich and Weis, 2006; Stewart, 2007).

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 *Nup211*은 발아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서의 *Mlp1*, Vertebrate에서의 *TPR*과 homologe이다 (Cordes et al, 1997; Zimowska et al, 1997; Strambiode-Castillia et al, 1999). *Mlp1*과 *TPR*은 N-terminal domain이 coiled-coil 형태로 존재하고, NPC 결합부위를 포함하고 있다(Bangs et al, 1998; Cordes et al, 1998; Strambiode-Castillia et al, 1999).

*Saccharomyces cerevisiae*에서의 Myosin-like protein 1(*Mlp1*)은 NPC의 inner nuclear basket에 존재하고, nucleoplasmic 표면에 부착되어 있으며, 전사체의 nuclear export에 영향을 미친다. 예를 들어, 만약 전사체가 intron을 보유하고 있다면, 핵 안에서 전사체가 세포질로 빠져나가지 못하도록 *Mlp1*과 splicing factor 사이에 상호작용이 일어난다(Galy and Nehrbass, 2004). 이렇게 splicing이 제대로 이루어지지 않은 전사체들은 exosome에 의해서 degradation 되거나, spliceosome이 다시 붙어서 intron을 제거한다. 따라서 Poly(A) tail과 상호작용하는 *Mlp1*은 핵 안에서 유전자 발현의 마지막 단계에 관여한다.

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 *nup211* 유전자는 인트론이 없는 1873개의 amino acid를 encode하고 있고, systematic name이 SPCC 162. 08c이며, 분자량이 211.4kDa이라서 이 유전자의 이름을 *nup211*이라고 명명되었다.

본 연구에서는 *nup211* 유전자가 결실(deletion)된 돌연변이주(mutant)를 제조하고, *nup211* 유전자가 과발현(over expression) 되었을 때와 발현이 억제(repression) 되었을 때의 형질을 조사하였으며, *in situ* hybridization을 통하여 mRNA export의 결함을 조사하였다. 그리고 *Nup211* 단백질의 N말단과 C말단에

GFP 단백질을 붙인 constructs를 제조하여 Nup211 단백질의 세포 내 위치를 조사하고, Endogenous level로 nup211-GFP 단백질을 발현시켜 nup211 단백질의 세포 내 위치를 정확히 알아보기 위하여 세포 염색체(chromosome)에 위치하는 *nup211* 유전자에 제조한 Integration vector를 삽입하여 형광현미경하에서 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 균주

재조합 plasmids의 propagation과 selection을 위한 형질전환용 균주로 *E.coli* Top10'을 사용하였다.

본 실험에 사용된 효모 *Schizosaccharomyces pombe* 효모균주 목록은 Table.1에 제시하였다.

2) Plasmids

PCR products와 DNA를 subcloning하기 위한 vectors로 pDW234, pREP series (3X, 41X, 81X)를 사용하였고, GFP-vector에 DNA를 subcloning 하기 위해서 pZA69U, pREP81-EGFPc를 사용하였다.

3) 배지 및 배양조건

E. coli Top10'의 배양을 위해서는 일반적으로 사용되고 있는 Luria-Bertani (LB : 0.5% yeast extract, 1% bacto-tryptone, 1% NaCl) 액체배지를 사용하였고 (Table. 3), 필요 시에는 LA 액체배지(LB 액체배지에 ampicillin 100 μ g/ml 첨가)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 그리고 고형배지는 2% Bacto-agar를 첨가하였다.

효모 균주의 배양을 위한 배지는 EMM(Edinburgh minimal medium)과 YES(Yeast extract with supplements : 0.5% yeast, 3% glucose, supplements : 225mg/l adenine, leucine, uracil) 배지를 사용하였고, 돌연변이주의 분리를 위해서는 EMM(Edinburgh minimal medium)배지에 15 μ M Thiamin을 첨가하여 사용하였으며, 고형배지는 2% Bacto-agar를 첨가하여 28 $^{\circ}$ C에서 배양하였다(Table. 2).

4) 효소 및 시약

각종 제한 효소들과 T4 DNA ligase는 New England Biolabs.(Hitchin, UK)에서 구입하였고, Taq DNA polymerase는 제넨메드(서울, 대한민국)에서, Pyrobest DNA polymerase는 Takara(Shiga, Japan)에서, Expand Long Range Enzyme mix는 Roche(Mannheim, Germany)에서 구입하였다. 그리고 대부분의 시약은 Sigma Chemical Co.(Louis, USA)와 MP(Eschwege, Germany)에서 구입하였다. DNA isolation과 PCR purification, Gel extraction Kit는 QIAGEN(Hilden, Germany)에서 구입하였고, Southern blotting을 위한 ECL (Enhanced Chemiluminescence labeling and detection) kit는 Amersham Life Science(Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. 또한 *In Situ* Hybridization을 위한 Fluorescin-Antidig-oxigenin Ab는 Roche(Mannheim, Germany)에서 구입하였다.

5) primer 및 sequence analysis

Primer는 GC함량을 40%-60%로 맞추고 반복적인 염기서열을 피해 20mer 정도를 0.02 μ mol scale로 제노텍(대전, 대한민국)과 SIGMA(Louis, USA)에서 구입하였다. 본 실험에 사용된 primer는 table. 4에 제시하였다.

6) 완충용액 및 반응용액

(1) 완충용액

DNA 전기영동에 사용된 완충용액은 기본적으로 (Sambrook and Russell, 2001)를 따랐다.

(2) *S. Pombe* 형질전환 : Lithium Acetate 방법

10x LiAc : 1 M Lithium Acetate pH 7.5

10xTE : 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 0.01M EDTA

1xTE/LiAc : 1.0 mM TE/LiAc

50% PEG4000 : 50% Polyethylene glycol 4000 in 1xTE/LiAc

(3) *S. Pombe* DNA isolation 시약

CSE Buffer : 50 mM Citrate/phosphate pH5.6, 1.2 M sorbitol,
40 mM EDTA pH 8.0

Spheroplast buffer : zymolase 20T(2.5 mg/ml) in CSE buffer

(4) Southern blotting용 용액

20xSSC : 0.3 M Na3citrate, 3 M NaCl, pH 7.0

Primary wash buffer : 6 M urea, 0.4% SDS, 0.5xSSC

Second wash buffer : 2xSSC

Hybridization buffer : 0.5 M NaCl, 5% blocking agent to
ECL gold hybridization buffer

(5) *In Situ* Hybridization용 용액

30% formaldehyde : paraformaldehyde, 10 N NaOH, PBS

Spheroplast buffer :

SCE (1 M sorbitol, 0.5 M EDTA, Citrate phosphate)

Hybridization buffer : 20xSSC, 50% Detran sulfate, 2% BSA,
vanadyl complex, tRNA(1 mg/ml), olgo dT50

Fluorescin-Antidigoxigenin solution : 1 M Tris pH 7.5,
5 M NaCl, 2% BSA, Antidioxigenin(200µg/ml),
10% Triton X-100

DAPI mounting medium :

DAPI(1 mg/ml), Antifade(10 mg/ml), PBS, glycerol

(6) *E. Coli* Cracking용 용액

2x cracking buffer : 0.2M NaOH, 0.5% SDS, 20% sucrose

Table 1. Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
AY 217	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18</i>	Yoon <i>et al.</i> (2000)
SP 286	<i>h⁺/h⁺ leu1-32/leu-32 ura4-d18</i>	Matsumoto and Beach(1991)
SP 286(Δ Nup211)	<i>h⁺/h⁺ leu1-32/leu-32 ura4-d18/</i> <i>ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216,</i>	This study
Δ Nup211:: <i>ura4⁺</i> /3X	Δ <i>nup211::ura4⁺/ nup211⁺</i> <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18</i>	This study
Δ Nup211:: <i>ura4⁺</i> /41X	Δ <i>nup211:: ura4⁺/pREP3X-nup211</i> <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18</i>	This study
Δ Nup211:: <i>ura4⁺</i> /81X	Δ <i>nup211:: ura4⁺/pREP41X-nup211</i> <i>h⁻ leu1-32 ura4-d18</i> Δ <i>nup211:: ura4⁺/pREP81X-nup211</i>	This study

Table 1. Strains used in this study (continued)

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

Table 2. *S. pombe* medium composition (per liter)

YE(Yeast Extract) Medium	
Yeast Extract (0.5%)	5g/ℓ
Dextrose (Glucose, 3%)	30g/ℓ
Agar (2%)	20g/ℓ

YES(Yeast Extract) Medium	
YE + Supplements	
Supplements : 225mg/ℓ adenine, leucine, uracil and lysine hydrochloride	

EMM(Edinburgh Minimal Medium)	
potassium hydrogen phthalate(14.7mM)	3g/ℓ
sodium phosphate dibasic(15.5mM)	2.2g/ℓ
ammonium chloride(93.5mM)	5g/ℓ
dextrose(glucose, 111mM)	2%(w/v)
salt(stock x 50)	20 ml/ℓ
vitamins(stock x 1000)	1 ml/ℓ
minimal(stock x 10,000)	0.1 ml/ℓ

Table 2. S. pombe medium composition (continued)

PMG(Pombe Glutamate medium)	
potassium hydrogen phthalate(14.7mM)	3g/l
sodium phosphate dibasic(15.5mM)	2.2g/l
L-glutamic acid, monosodium salt	3.75g/l
dextrose(glucose, 111mM)	2%(w/v)
salt(stock x 50)	20 ml/l
vitamins(stock x 1000)	1 ml/l
minimal(stock x 10,000)	0.1 ml/l
50x Salt stock	
MgCl ₂ .6H ₂ O (0.26 M)	52.5 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O (4.99 mM)	0.735 g/l
KCl (0.67 M)	50 g/l
Na ₂ SO ₄ (14.1 mM)	2 g/l
1000x Vitamin stock	
pantothenic acid (4.20 mM)	1 g/l
nicotinic acid (81.2 mM)	10 g/l
inositol (55.5 mM)	10 g/l
biotin (40.8 μM)	10 mg/l

Table 2. S. pombe medium composition (continued)

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

Table 3. *E. coli* medium composition (per liter)

LB(Luria-Bertani) 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

Primer name	Primer sequence
Nup211-1	TTATTCCTGGTGATGCTGTC
Nup211-2	CATGCTGCTAACATTGTCAC
Nup211-3	CAAACACTACCGGCTATACAGG
Nup211-4	GTCACAATCGACTGGAATAC
Nup211-5	CTGGGCCTCCATGTCGCTGGCCGGGTA TCTGTCCAGGAAGAATCGTGCA
Nup211-6	CGCTATACTGCTGTCGATTCGATACTA ACGTGACGATGCGAACAAGGAG
Nup211-7	ACATATAGCCAGTGGGATTTGTAGCTA TCTGTCCAGGAAGAATCGTGCA
Nup211-8	GGTGTGGGAACAGAATAAATTAGATGA ACGTGACGATGCGAACAAGGAG
Nup211-9	TGTTGAGCATGCACTTGTAG
Nup211-10	CTCAGCCATTTGAGTCCAAC
Nup211-11	AGTCTCGAGATGCACGATTCTTCCTGGAC
Nup211-12	ACACAGGCAGAGACTGCAGA
Nup211-13	TTGAACAGCAGCACTCAGGA
Nup211-14	GCTAGATCTCTATTTTGCTTTCTTTTGGT
Nup211-15	ATCGTCGACATGCACGATTCTTCCTGGAC
Nup211-16	CTGAGATCTGTTTTGCTTTCTTTTGGTTTCG
Nup211-17	ATACATCCCGGGCTATTTTGCTTTCTTTTGGT
Nup211-18	ATCGTCGACAATGCACGATTCTTCCTGGAC
Nup211-19	GACGATATCTTTGCTTTCTTTTGGTTTCGA
Nup211-20	ATCGTCGACACACGATTCTTCCTGGACAGA
Nup211-21	CATCCCGGGTTTGCTTTCTTTTGGTTTCGA
Ura 5DJ	AGCTACAAATCCCCTGGCT
Ura 3DJ	CATCTAATTTATTCTGTTCC
Ura-2R	CACAAATGCATACATATAGCCAG
Ura-4F	TGAATGTAAAATACCATGTAGAC
GFP-3R	TCCGTATGTTGCATCACC

2. 실험방법

1) Construction of plasmids

(1) pREP series *nup211* subcloning

반수체 균주인 AY217에 *nup211* 유전자가 들어있는 vector를 형질전환 하고 염색체의 *nup211* 유전자를 결실시켜 *nup211* 유전자를 inducible marker에 따라 switch 처럼 on/off 할 수 있도록 하기 위해 pREP vectors(3X, 41X, 81X)에 *nup211* 유전자의 ORF(open reading frame)을 subcloning 하였다. pREP vector는 *nmt* 프로모터를 가지고 있으며, 이것은 티아민(+B₁)이 존재하면 작동하지 않는 프로모터로, 이 프로모터의 세기는 3X가 가장 강력하고, 41X는 중간 정도, 81X는 가장 약한 세기로 작동하는 특징을 가지고 있다. pREP3X, pREP41X, pPEP81X vector는 *XhoI/SmaI* 제한효소로 자르고 *nup211*은 *SalI/SmaI* 제한효소로 자른 뒤 subcloning을 하였다. 이것을 *E. coli*에 형질전환시켜 얻은 콜로니(colony)를 cracking으로 수행하여 확인하였다.

pREP series vector는 leucine marker가 존재하고 있어서, 형질전환체들을 leucine이 없는 EMM배지에서 골라 내었다.

(2) GFP -*nup211* plasmid

nup211 유전자가 발현되어 만든 단백질의 세포 내 위치를 추적하기 위하여 GFP(Green Fluorescence Protein)를 포함하고 있는 vectors와 subcloning 하였다.

GFP vector로는 pZA69U, pREP81-EGFPc를 사용하였으며, pZA69U는 *nup211*의 5-terminal 쪽으로 GFP가 존재하기 때문에 stop codon을 가진 primer를 사용하였다. pREP81-EGFPc는 *nup211*의 3-terminal 쪽으로 GFP sequence가 들어가기 때문에 stop codon을 가지고 있지 않은 primer를 사용하였다. PCR로 증폭한 insert 부분과 pZA69U, pREP81-EGFPc는 각각 *SalI/SmaI* 제한효소로 자른 뒤 subcloning을 하였다. 이것을 *E. coli*에 형질전환하여 나온

콜로니(colony)는 cracking을 통해 확인하였다.

GFP vector는 uracile marker가 있어서, 이 형질전환체들을 uracile이 없는 EMM 배지에서 골라 내었다.

(3) Integration vector 제조

Endogenous level로 *nup211*-GFP 단백질을 발현시켜 *nup211* 단백질의 세포 내 위치를 정확히 알아보기 위하여, *nup211*-GFP 유전자를 염색체의 자신의 위치로 삽입하여 세포 하나당 *nup211* 유전자가 하나만 발현 되는 Integration vector를 제조 하였다. 앞에서 만든 *nup211* 유전자를 subcloning한 GFP vectors 중, *nup211*-pREP81EGFPc vector를 이용하였다. *nup211*-pREP81EGFPc vector를 insert로 하여 *PstI/SacI* 제한효소로 잘랐는데, 여기에는 *nmt* 프로모터의 stop codon도 포함된다. 이것은 한 세포당 하나의 *nup211* 유전자가 발현하도록 하기 위해서 design한 것이다. *PstI/SacI* 제한효소로 자른 insert를 QIAGEN gel extraction kit를 이용하여 gel elution 하였다.

vector로는 *ura4⁺* marker를 가지고 있는 pDW234를 이용하여 *PstI/SacI* 제한효소로 잘라주었다. 이것을 subcloning 하여, *E. coli*에 형질전환 시켜 나온 콜로니를 cracking으로 확인 하여 골라내었다. 골라낸 constructs는 miniprep을 통하여 vector를 분리한 뒤, 원래 염색체의 *nup211* 유전자 사이로 삽입될 수 있도록 *BspMI* 제한효소로 자른 후, 야생형 반수체 균주인 AY 217에 형질전환 시켜 selectable marker를 가진 배지에서 골라내었다.

2) Cracking into *E.coli*

Cracking은 subcloning한 plasmid constructs를 *E. coli*에 형질전환 시켜 나온 형질전환체 중, insert가 들어간 콜로니(colony)를 screen하는 방법이다. 먼저 *E. coli* 형질전환을 통해 나온 single colony를 LA 고형배지에 patch하여 하루 동안

배양한 뒤, 이것을 2x loading dye 15 μ l에 자란 colony를 루프로 따서 잘 풀어주었다. 여기에 2x cracking buffer (0.2M NaOH, 0.5% SDS, 20% sucrose) 15 μ l를 넣고 13,000rpm에서 8분 동안 원심분리 해준다. 원심분리한 것을 self-ligation된 대조군(control)과 함께 전기영동으로 확인하였다. self-ligation된 형질전환체보다 insert가 들어간 형질전환체의 크기가 더 크기 때문에 이것을 이용하여 원하는 형질전환체를 골라내었다.

3) Transformations

(1) *S. pombe* transformation

*S. pombe*의 형질전환은 Lithium Acetate 방법(Alfa *et al.*, 1993)으로 수행하였다. 야생형 이배체균주인 SP286과 반수체 균주인 AY217를 각각 EMM + all 액체배지와 YES 액체배지 10ml에 seed한 뒤 28 $^{\circ}$ C에서 하루 정도 배양한 후, fresh EMM + all 액체배지와 YES 액체배지 50ml에서 5-8 x 10⁶ cell/ml이 될 때까지 배양하였다. 이들 세포를 harvest하여 멸균한 TDW로 wash한 후, 1x TE/LiAC로 condition을 조절해주고 원심분리하여 cell만 얻어낸 다음 1-2 x 10⁹ cell/ml의 농도가 되도록 1x TE/LiAC로 resuspension하였다. 이렇게 얻어진 cell 50 μ l와 salmon sperm DNA 4 μ l, 형질전환 하고자 하는 DNA 4 μ l을 넣고 잘 섞어 준 후, 50% PEG 150 μ l를 넣고 mix한 다음 28 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation하였다. 42 $^{\circ}$ C에서 10분간 heat shock을 준 다음 상온에 2분간 방치한 후, 원심분리하여 50% PEG를 완벽하게 제거하였다. *ura4*⁺ maker가 형질전환된 cell은 1x TE에 resuspension하여 EMM-L,U 고형배지에 spreading한 뒤 6일 정도 28 $^{\circ}$ C incubator에서 배양하였다.

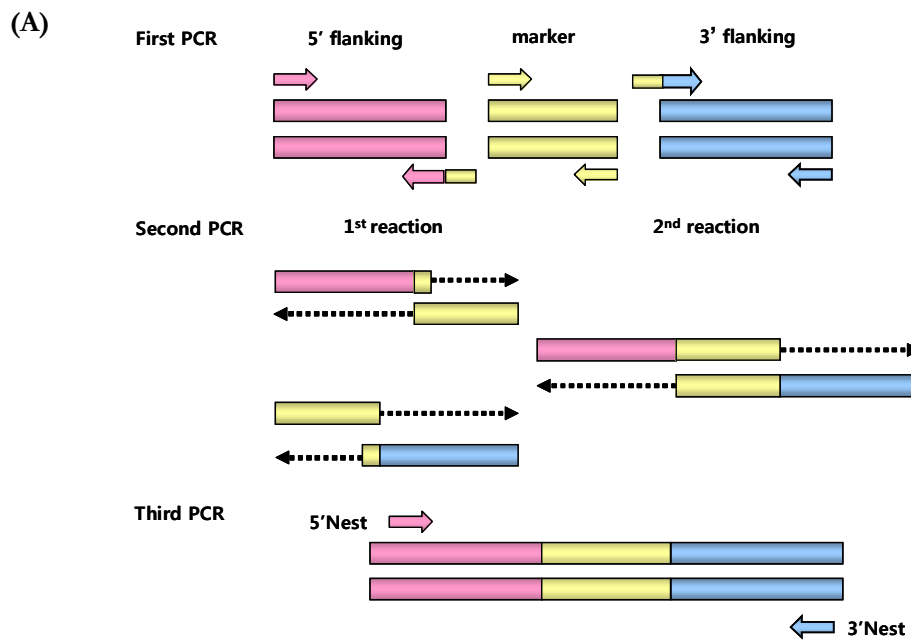
(2) *E. coli* transformation

*E. coli*의 형질전환은 CaCl₂ 방법 (Sambrook and Russell, 2001)을 사용하였다.

4) *nup211* knock-out

(1) DJ- PCR

*nup211*의 기능을 알아보기 위해 deletion(knock-out) construct를 제조하였다. 5', 3' flanking region 각 부분과 *nup211* 유전자의 ORF 부분을 대체 시킬 selectable marker *ura4*⁺의 primer를 제작하였고, 5'Rev, 3'For 는 *ura4*⁺ maker tail을 붙여서 primer를 design 하였다. Knock-out construct PCR은 Double Joint PCR (DJ-PCR) 방법 (Yu *et al.*, 2004)을 이용하였다(Fig. 1A). First PCR에서는 5'For와 5'Rev + marker tail, 3'For + marker tail와 3'Rev, marker 유전자(*ura4*⁺)를 각각 증폭한 후, 전기영동으로 확인한 다음 QIAGEN PCR clean up kit를 이용하여 purify하였다. First PCR에서 얻어진 product들을 5'flanking amplicon : marker 유전자 (*ura4*⁺) : 3'flanking amplicon 1:3:1의 비율로 섞어서 second PCR을 수행하였다. second PCR products를 template로 5', 3'Nest primer를 이용하여 최종적으로 third PCR을 진행하였다(Fig. 1B).



(B)

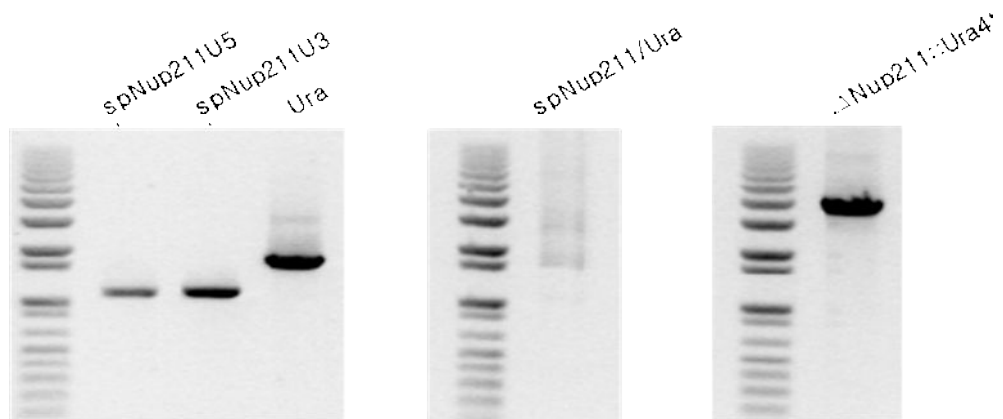


Fig. 1. *nup211* gene deletion by DJ-PCR.

5) Yeast genomic DNA isolation

*S.pombe*로 형질전환하여 얻은 형질전환체를 각각의 배지에 streaking하여 single colony를 얻은 후, 각각의 selectable marker가 있는 EMM 액체배지 10ml에 seed하여 이틀 정도 배양하였다. 13,000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 cell을 가라 앉힌 후 CES buffer 1ml에 resuspension하였다. 그 다음으로 Zymolase 20T (2.5 mg/ml)를 처리하여 vortexing 한 후 37°C에서 45분 정도 놓아 둔 다음 10% SDS를 처리하여 cell wall이 완벽히 벗겨졌는지 현미경으로 확인 하였다. 원심 분리하여 상층액은 제거하고, QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit를 사용하여 DNA를 분리 하였다.

6) Southern Blotting

nup211 유전자가 정확히 disruption 되었는지, 혹은 *nup211*-GFP 가 야생형 균주 염색체로 정확히 삽입 되었는지 확인하기 위해 Amersham ECL nonisotopic method 를 사용하여 Southern blotting 을 수행하였다. Genomic DNA 의 *nup211* 유전자를 *ura4⁺* marker 로 치환시킨 DNA 는 *Hind*III 제한효소로 자르고, *nup211*-GFP integration vector 가 삽입된 DNA 는 *Eco*RI 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 and schuell 용기를 사용하여 4 시간 동안 transfer 하였다. 그 다음 DNA 단편들을 transfer 시킨 Hybond-N+ membrane 을 UV 로 cross-link(0.15J/cm²)하여 DNA 를 membrane 에 고정시켰다.

Pre-hybridization은 42°C에서 1시간 동안 ECL hybridization solution으로 하였고,

Probe labeling은 100ng/ μ l의 probe DNA 1.5 μ l에 TDW 8.5 μ l를 섞어 준 후, 5분 동안 끓여 denaturation 시킨 다음 ice에 재빨리 넣어주었다. Labeling reagent와 glutaraldehyde를 10 μ l씩 넣고 잘 섞어 준 후 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation 한 다음 Prehybridization한 solution과 잘 섞어 주고 Hybridization은 42 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 진행하였다. Primary Wash Buffer로 membrane을 wash하고 2x SSC로 다시 wash한 뒤, ECL DNA detection reagent를 이용하여 detection을 수행하였다. 그 다음 chemi-doc에서 Quantity one(Bio-Rad) program을 이용하여 signal을 확인하였다.

7) *In situ* Hybridization

50ml의 액체배지에서 2-4 x 10⁶ cell/ml가 되도록 키워 30% formaldehyde를 6ml 첨가하여 45분간 fixing하고, 0.3M glycine 용액으로 washing 한 후, spheroplast buffer에 1 x 10⁷ cell/ml가 되도록 풀어주어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. poly-lysine으로 coating된 slides에 SCE(sorbitol, citrate-phosphate, EDTA)로 풀어 준 cells을 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 놓아두고, -20 $^{\circ}$ C methanol에 slides을 2시간 이상 넣어두었다. methanol을 완전히 말린 후, 2x SSC로 washing하고 10 μ l의 hybridization solution을 첨가하여 coverglass를 덮어 37 $^{\circ}$ C에서 over-night 하였다. 그리고 2x SSC로 상온에서 5분, 다시 상온에서 20분간 washing하고 37 $^{\circ}$ C에서 2x SSC로 20분간 2번씩 washing한 후 Fluorescine-Antidigoxigenin Antibody solution을 10 μ l 첨가하여 coverglass를 덮어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 놓아 두었다. 2x SSC로 상온에서 15분간 2번씩 washing하여 air dry한 후, DAPI mounting medium을 12 μ l 첨가하여 coverglass를 덮고 sealing 하였다. 이를 형광현미경을 통해 signal을 확인하였다.

8) Spot assay for growth

균주를 selective auxotroph가 있는 10ml EMM 액체배지에 seed해서 stationary phase로 키웠다. 10 fold로 serial dilution해서 (2×10^7 cells/ml) 루프를 이용해 leucine이 없는 PMG와 EMM 고형배지, leucine이 없고 티아민(+B1)이 첨가된 PMG와 EMM 고형배지에 plating 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. *nup211* 결실돌연변이주 (knock-out mutants) 제조 및 분석

nup211 유전자의 기능을 알아보기 위해, 반수체 균주 AY217과 이배체 균주 SP286을 one-step gene disruption 방법을 사용하여 *nup211*의 암호화 부위 (open reading frame, ORF)를 selectable marker 유전자인 *ura4*⁺로 치환하였다. *ura4*⁺ 유전자는 유라실 생합성에 관여하므로 유라실이 없는 배지에서 성장하는 형질전환체를 선별할 수 있다. 먼저 ‘방법’에서 기술한대로 DJ-PCR (double-joint PCR) 방법을 이용하여 *nup211* 유전자의 5'과 3' flanking 부위를 각각 *ura4*⁺ 유전자의 양 옆에 붙여, *nup211*의 ORF가 *ura4*⁺ 유전자로 치환된 $\Delta nup211::ura4^+$ DNA 단편을 제작하였다 (Fig. 2A). 이렇게 제작된 DNA 절편을 이배체 균주에 형질전환시켜 유라실이 없는 배지에서 자라는 형질전환체들을 얻었다. 형질전환체들로부터 2개의 *nup211*⁺ 유전자 중 하나만 *ura4*⁺ 유전자로 치환된 형질전환체 ($\Delta nup211::ura4^+/nup211^+$)를 PCR을 통해 선별하였다 (Fig. 2B). *nup211* ORF가 *ura4*⁺로 치환된 *nup211* 결실돌연변이주는 5' 부위에서 1.0kb, 3'부위에서 1.1kb의 DNA가 증폭되었지만, 야생형 균주에서는 5'과 3'부위에서 DNA가 증폭되지 않았다. 또한 전체부위를 PCR로 증폭하면 야생형은 7.6kb, *nup211* 결실돌연변이주는 3.8kb의 DNA 절편이 증폭되었다. 이렇게 얻은 이배체 균주로 부터 감수분열에 의한 반수체 포자를 형성하도록 한 후, 미세조작기로 분리하여 배양하는 사분체분석 (tetrad analysis)을 수행하였다. 하나의 자낭에 있는 4개의 포자 중 2개만 콜로니로 성장하고 2개는 성장하지 못하는 2:2 분리양상을 보였다. 콜로니를 형성한 포자는 모두 유라실이 없는 배지에서 자라지 못하는 것으로 보아 *nup211* 유전자가 야생형인 반수체이고, 성장하지 못한 포자는 *nup211* 유전자가 결실된 반수체 포자이다. 이 실험 결과는 발아효모의 *Mlp1* 유전자와는 다르게, 분열효모의

nup211 유전자는 생장에 필수적임을 의미한다.

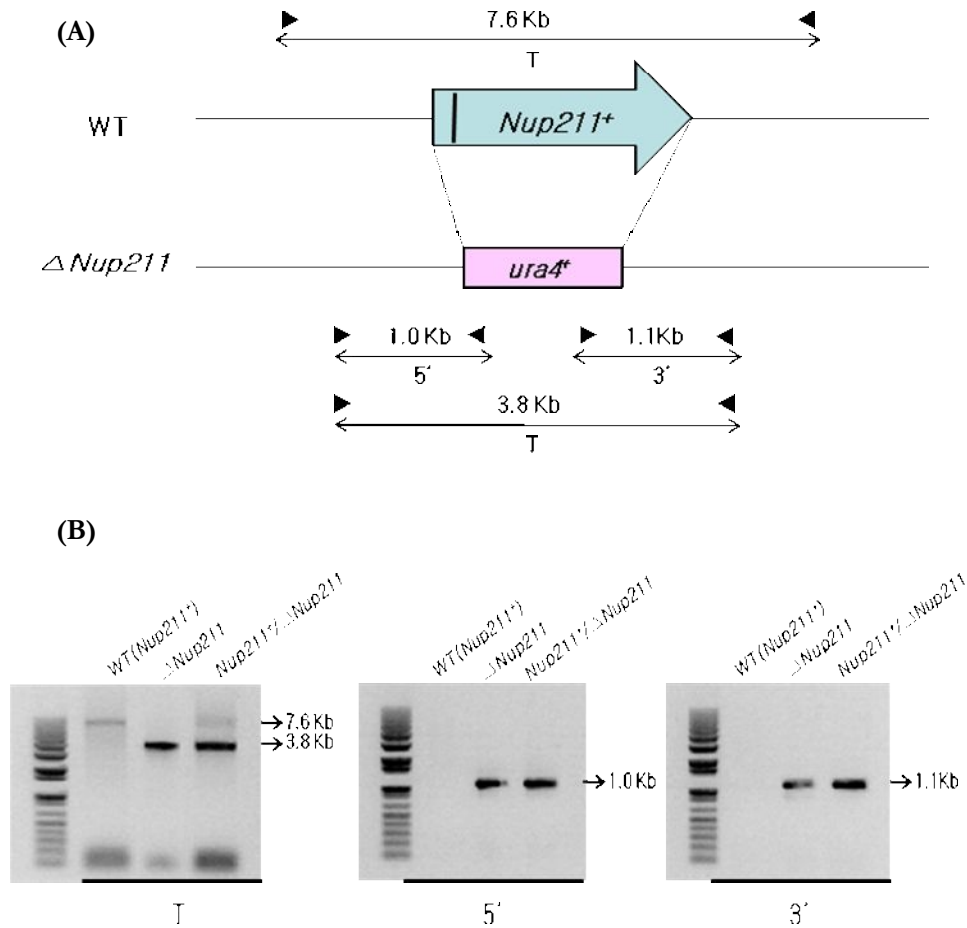


Fig. 2. Construction of *nup211* deletion mutants. (A) Schematic diagram representing construct of *nup211* null allele in *S.pombe*. Most of *nup211* open reading frame (ORF) region was substituted with maker gene, *ura 4⁺*, by one-step disruption method. (B) Confirmation of disruption of the *nup211* locus. PCR was performed with primers denoted in (A), using genomic DNAs from wild type(WT), diploid disruption one of the *nup211* locus (*nup211⁺/Δnup211::ura4⁺*), and haploid(*Δnup211::ura4⁺*) harboring pREP81X-Nup211.

2. *nup211* 유전자의 과발현 (over expression)

nup211 유전자가 결실된 균주는 성장하지 못하므로, *nup211* 유전자가 과발현 (over expression) 되었을 때, 그 균주의 성장과 mRNA export에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다. 이를 위해 *nmt* 프로모터를 가진 pREP-vectors (pREP3X, pREP41X, pREP81X)에 *nup211*의 ORF를 클로닝하였다. pREP3X는 가장 강력한 야생형의 *nmt* 프로모터를 가지고 있고, pREP41X와 pREP81X는 *nmt* 프로모터의 TATA box에 돌연변이를 일으켜 프로모터의 세기가 pREP3X에 비해 pREP41X는 중간 정도이며 pREP81X는 가장 약하다. 하지만 이 벡터들은 모두 티아민 (비타민 B₁)에 의해 발현이 억제된다. 제작된 플라스미드 (pREP3X-Nup211, pREP41X-Nup211, pREP81X-Nup211)들을 야생형 반수체 균주 AY217에 형질전환 하였다. 이 형질전환체 (*nup211*⁺/3X-, 41X-, 또는 81X-Nup211)를 티아민이 없는 배지에서 배양하여 염색체의 *nup211*⁺ 유전자 외에 추가로 플라스미드에서 *nup211*를 과발현시켜 성장 정도를 spot assay로 확인하였다. 한편, 대조균은 AY217에 빈 pREP3X와 pREP81X를 형질전환시킨 균주를 사용하였다. 그 결과 pREP3X-Nup211은 티아민이 존재하는 배지 보다 티아민이 없는 배지에서 성장속도가 훨씬 느렸지만 죽지는 않았다. pREP41X-Nup211은 티아민이 존재하는 배지 보다 티아민이 없는 배지에서 성장속도가 약간 느렸다. 하지만 pREP81X-Nup211은 티아민이 존재하는 배지와 존재하지 않은 배지에서 성장속도는 별다른 차이가 없었다 (Fig. 3).

또한 *nup211*의 과발현이 mRNA export에 영향을 미치는지를 *in situ* hybridization을 통하여 확인해 본 결과, 티아민이 있는 배지에서 배양한 균주는 모두 poly(A)⁺ RNA가 세포 전체에 분포하였지만, 티아민이 없는 배지에서 배양한 균주 중 pREP3X-Nup211은 mRNA export가 억제되어 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되어 있는 것으로 확인 되었다 (Fig. 4).

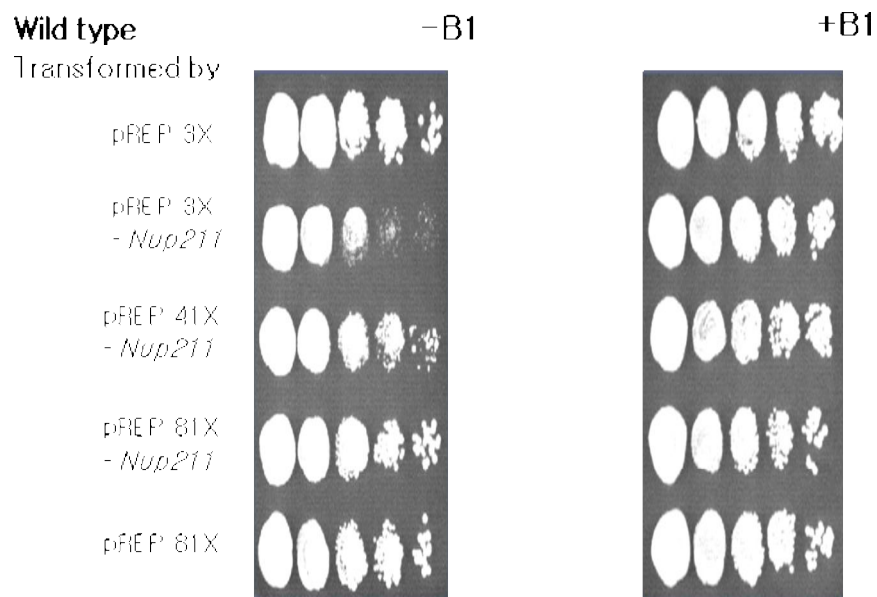


Fig. 3. Growth of *nup211* over expression strain was monitored by growth. In the absence of thiamine (-B1), the expression of pREP3X-*Nup211*, pREP41X-*Nup211* is repressed, resulting in inhibition of growth. But the strain is kept viable by expression of pREP3X-*Nup211*, pREP41X-*Nup211* from plasmids in the presence of thiamine (+B1). Wild type and pREP3X-*Nup211*, pREP41X-*Nup211*, pREP81X-*Nup211* cells harboring indicated plasmids were spotted in 10-fold serial dilutions onto EMM plates in the absence of (-B1) or in the presence of (+B1) thiamine and incubated for 7 days at 27 °C.

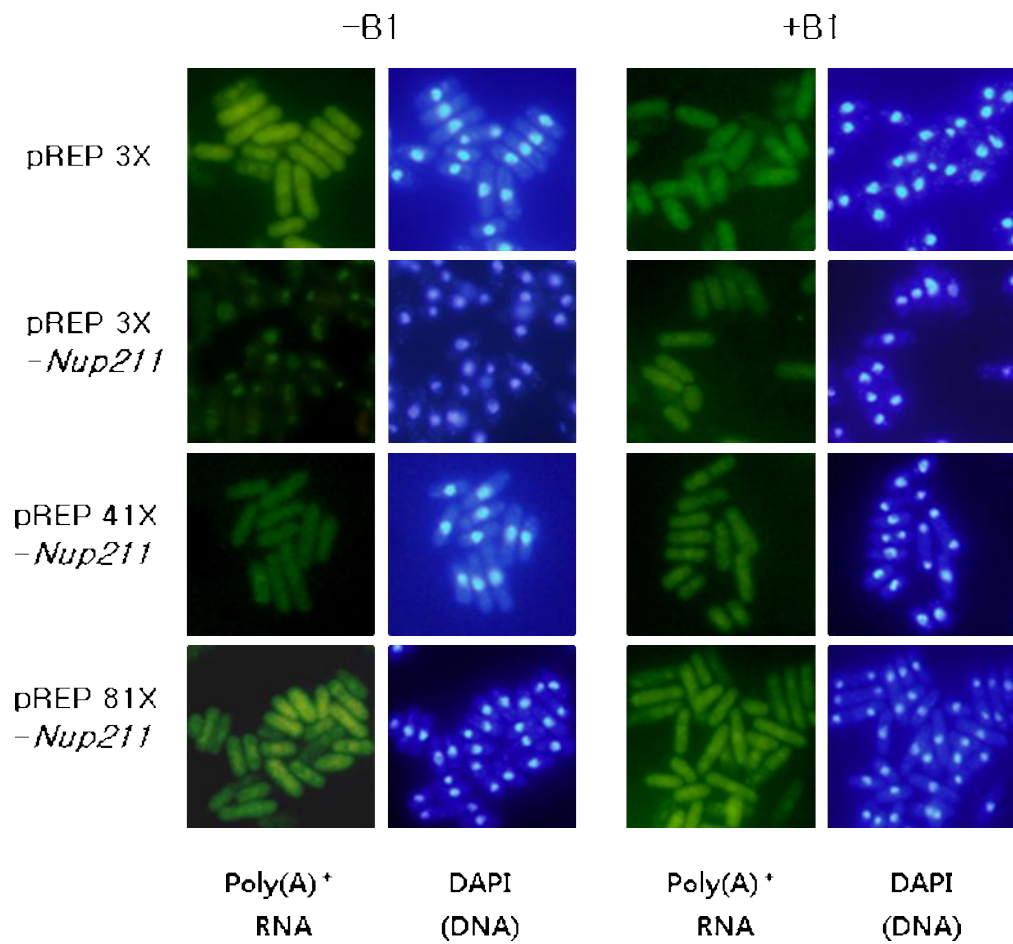


Fig. 4. Growth of *nup211* over expression strain was monitored by mRNA export. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine (+B1) at 27°C. The cells were then washed and shifted to EMM medium without thiamine (-B1) and were grown for 24h. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

3. *nup211* 유전자의 발현 억제 (repression)와 mRNA export 결함

nup211 유전자는 생장에 필수적이므로 이 유전자의 기능을 확인하기 위해 *nup211* 유전자의 발현이 조절되는 균주를 제작 하였다. *S. pombe*에서 *nup211* 유전자가 결실된 균주는 성장하지 못하므로, 앞에서 언급한 *nmt* 프로모터를 사용하여 *nup211* 유전자의 발현을 조절할 수 있는 반수체 균주를 제작하였다. 즉, pREP81X-Nup211 플라스미드가 형질전환된 반수체 AY217 균주를 이용하여 염색체 *nup211*의 결실돌연변이 균주를 제작하였다 (Fig. 5). 이렇게 제작된 반수체 균주는 염색체의 *nup211*⁺ 유전자가 결실되어 있지만, *nmt* 프로모터에 발현이 조절되는 플라스미드의 *nup211*⁺ 유전자가 존재하므로 티아민이 없는 (-B1) 배지에서 성장할 수 있다. 염색체의 *nup211* 유전자가 결실된 것을 Southern hybridization을 수행하여 확인하였다 (Fig. 6). 결실된 균주의 DNA를 추출하여 *Hind*III 제한효소로 자른 뒤, *ura4*⁺와 *nup211*를 probe로 혼성화하였다. 대조균인 야생형 균주 AY217은 *ura4*⁺를 probe로 사용하면 signal이 나오지 않았고, *nup211* probe인 경우 2.5kb, 0.7kb를 확인할 수 있었다. 결실 균주는 *ura4*⁺ probe인 경우 5.0kb, *nup211* probe인 경우 각각 2.5kb, 5.0kb를 확인할 수 있었다.

이렇게 선별된 균주 ($\Delta nup211::ura4^+/81X-nup211$)에서 *nup211* 유전자가 발현이 억제되면 세포생장에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 spot assay를 수행하였다. 대조균으로는 *nup211* 유전자가 결실되지 않은 AY217 (*nup211*⁺/81X-*nup211*) 균주를 사용하였다. 그 결과 티아민이 존재하는 (+B1) 배지에서는 *nup211* 유전자의 발현이 억제되면 생장에 결함을 보였고, 티아민이 존재하지 않는 (-B1) 배지에서는 *nup211* 유전자가 발현되어 정상적으로 성장하였다 (Fig. 7A). 이러한 결과는 81X-*nup211*가 정상적으로 작동하고 있음을 의미하며, 다시 한번 *nup211* 유전자가 생장에 필수적이라는 것을 보여준다.

nup211 유전자가 *S. pombe*에서 mRNA export에 관여하는지 확인하기 위하여 *nup211* 유전자가 결실된 균주 ($\Delta nup211::ura4^+/81X-nup211$)를 이용하여 티아민이 있는 배지 (+B1)와 티아민이 없는 배지 (-B1)에서 24시간 동안 배양 후 mRNA 분포가 어떻게 달라지는지 in situ hybridization을 수행하여 poly(A)⁺ RNA의 세포 내 분포를 확인하였다.

그 결과, 티아민이 없는 (-B1) 배지에서는 *nup211*이 발현되어 야생형 균주와 마찬가지로 poly(A)⁺ RNA가 세포 전체에 고루 퍼져있었다. 반면, 티아민이 있는 (+B1) 배지에서는 *nup211*의 발현이 억제되어 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7B). 이러한 결과는 *nup211* 유전자의 발현이 억제되면 mRNA export에 결함이 있음을 의미한다.

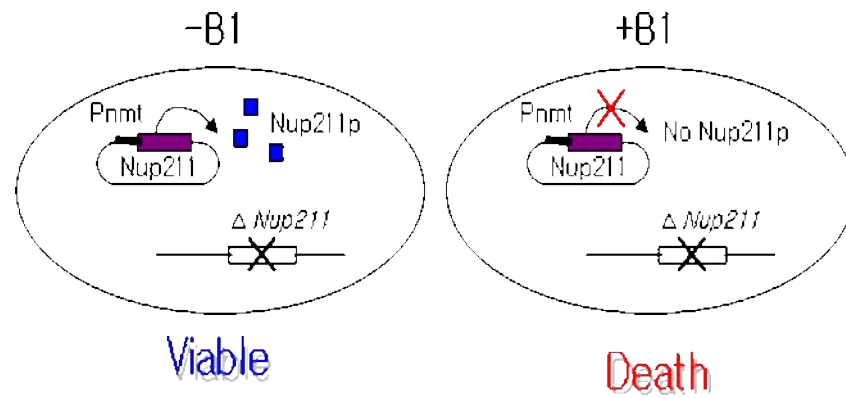


Fig. 5. Schematic diagram of synthetic lethality. Schematic diagram representing construction of chromosomal *nup211*-disrupted haploid strains harboring pREP81X-Nup211, in which *nup211* is expressed under the control of *nmt* promoter. This strain is kept viable by expression of *nup211* gene from plasmids in the absence of thiamine (-B1). In the presence of thiamine (+B1), the expression of *nup211* is repressed, resulting in inhibition of growth (Lethal).

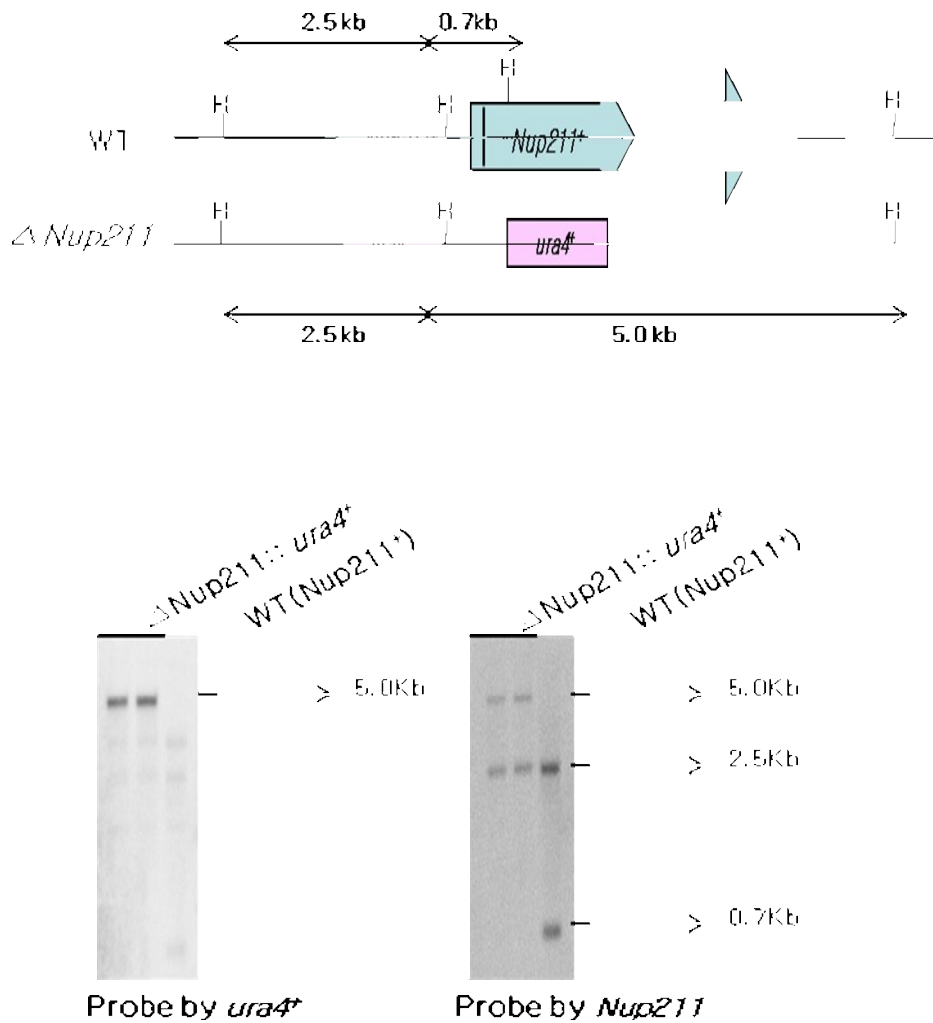


Fig. 6. Southern hybridization analysis for disruption of the *nup211*. Confirmation of *nup211* gene disruption by Southern hybridization probe with *ura4⁺* and *nup211*. Southern hybridization analysis was using genomic DNAs from wild type(WT) and haploid($\Delta nup211::ura4^+$) harboring pREP81X-Nup211.

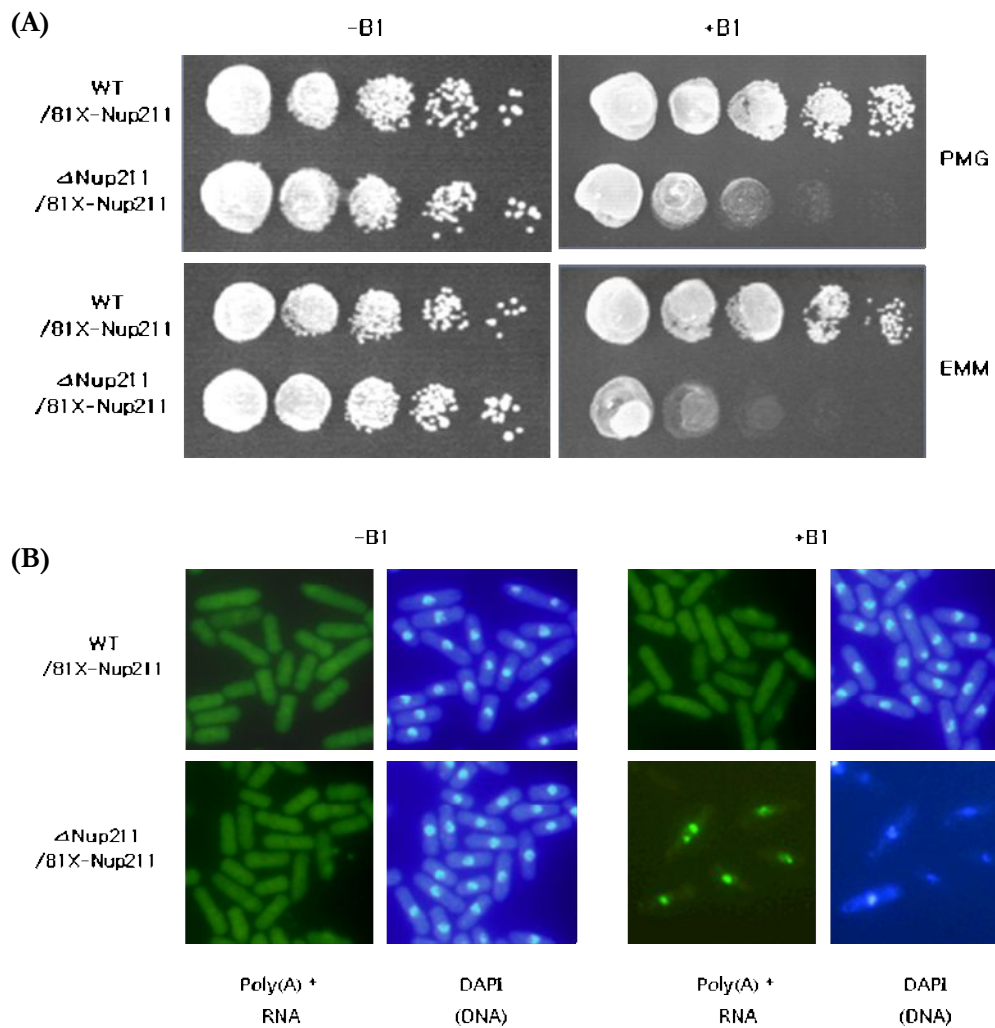


Fig. 7. $\Delta nup211$ mutants showed the defect of growth. (A) Growth of wild type (AY217 carrying pREP81X-Nup211 plasmid) and $\Delta nup211$ /pREP81X-Nup211 strains ($\Delta nup211$ mutants carrying pREP81X-Nup211 plasmid) was monitored by spot assay for 7 days at 27°C with (+B1) and without (-B1) expression of *nup211*. (B) Poly(A)⁺ RNA localization in the $\Delta nup211$ mutants. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) at 27°C. The cells were then shifted to EMM medium containing thiamine (+B1) and were grown for 24h. Coincident DAPI staining is shown in the right panels

4. *nup211* 단백질의 세포 내 위치

nup211 유전자가 암호화하는 단백질의 세포 내 위치를 확인해보기 위하여 GFP(Green Fluorescence Protein) 방법을 이용하였다. GFP는 녹색 형광을 띄는 단백질로 형광현미경으로 관찰이 가능하기 때문에 *nup211* 단백질의 위치를 쉽게 관찰할 수 있다. 그래서 *nup211* ORF의 5' 또는 3'에 GFP가 위치하도록 GFP construct를 제조한 다음, 야생형 균주 (AY 217과 SP286)에 형질전환시켜 형광현미경으로 관찰하였다. Subcloning에 사용한 vector pZA69u는 *nup211*의 N 말단에, pREP81-EGFPc는 C 말단에 GFP가 위치한다. 이 vector들은 모두 *nmf* 프로모터가 존재하며, 각각의 프로모터 세기는 pZA69u가 가장 강하고, pREP81-EGFPc는 가장 약한 프로모터를 가지고 있다. 이러한 특성을 이용하여 티아민의 유무의 따라 발현 정도를 다르게 하였다. 그 결과 과발현되면 GFP-*nup211*은 세포 전체에서 관찰되지만, 발현이 조금되면 핵에서 관찰되는 것이 확인되었다(Fig. 8A). 또한, 이를 Endogenous level로 *nup211*-GFP 단백질을 발현시켜 *nup211* 단백질의 세포 내 정확한 위치를 확인하기 위하여, *nup211*-GFP 유전자를 염색체의 *nup211* 유전자 위치로 삽입시켰다. 삽입시킨 이 균주는 정상적으로 성장하였으며, *nup211*-GFP는 핵 막 주위에서 선명하게 관찰되었다 (Fig. 8B.) 그리고 *nup211*-GFP가 *nup211* 유전자의 정확한 위치에 삽입되었는지 확인하기 위하여 PCR과 Southern hybridization을 수행하였다(Fig. 9,10). *nup211*-GFP 균주의 DNA를 추출하여 *EcoRI* 제한효소로 자른 뒤, *ura4⁺*와 *nup211*를 probe로 blotting하였다. 대조균인 야생형 균주 AY217은 *ura4⁺*를 probe로 사용하면 signal이 나오지 않았고, *nup211* probe인 경우 5kb를 확인할 수 있었다. *nup211*-GFP 균주는 *ura4⁺* probe인 경우 9.3kb, *nup211* probe인 경우 각각 3.6kb, 9.3kb를 확인할 수 있었다.

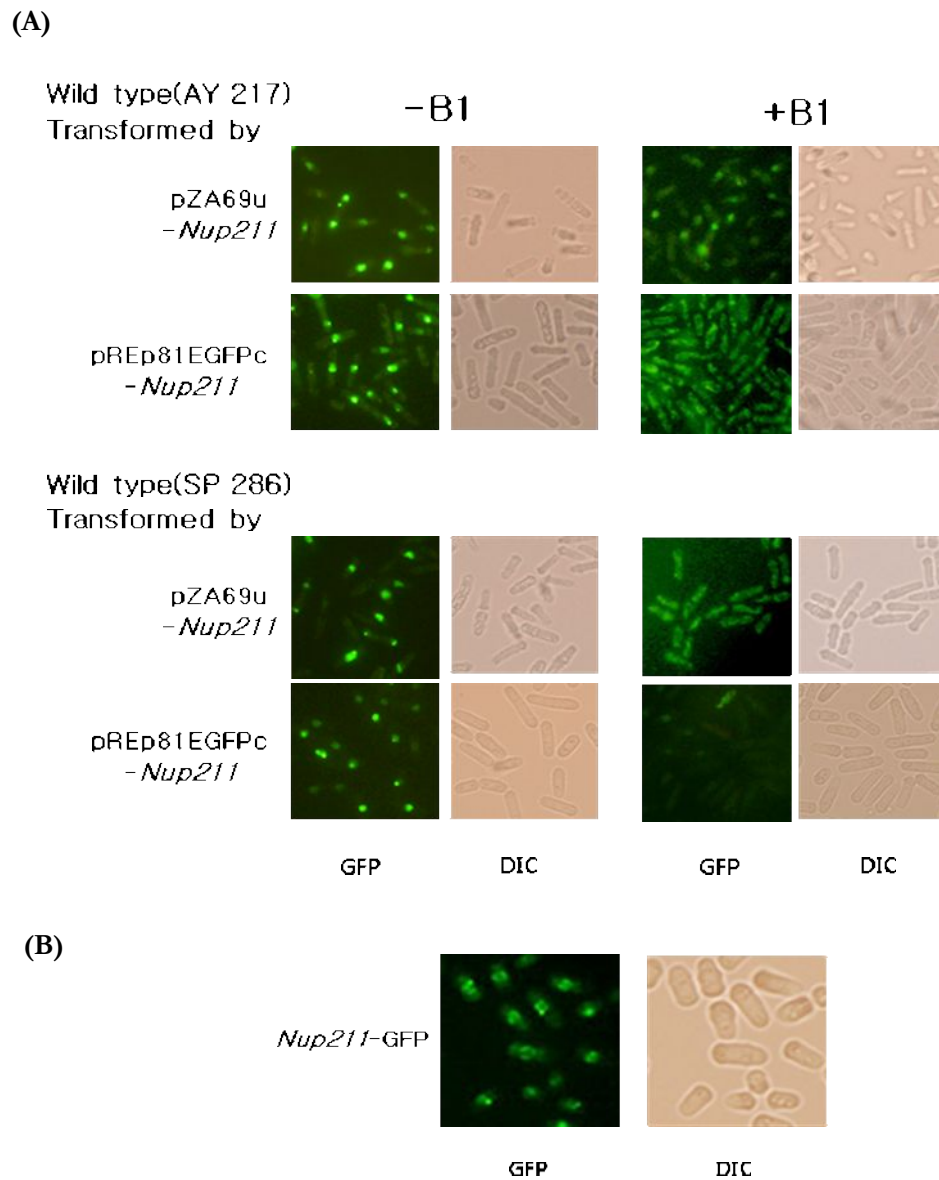


Fig. 8. Localization of Nup211p fused to GFP. Cells were grown to the mid-log phase on appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine (+B1) at 27°C. Coincident differential interference contrast (DIC) images are also shown in the right panels.

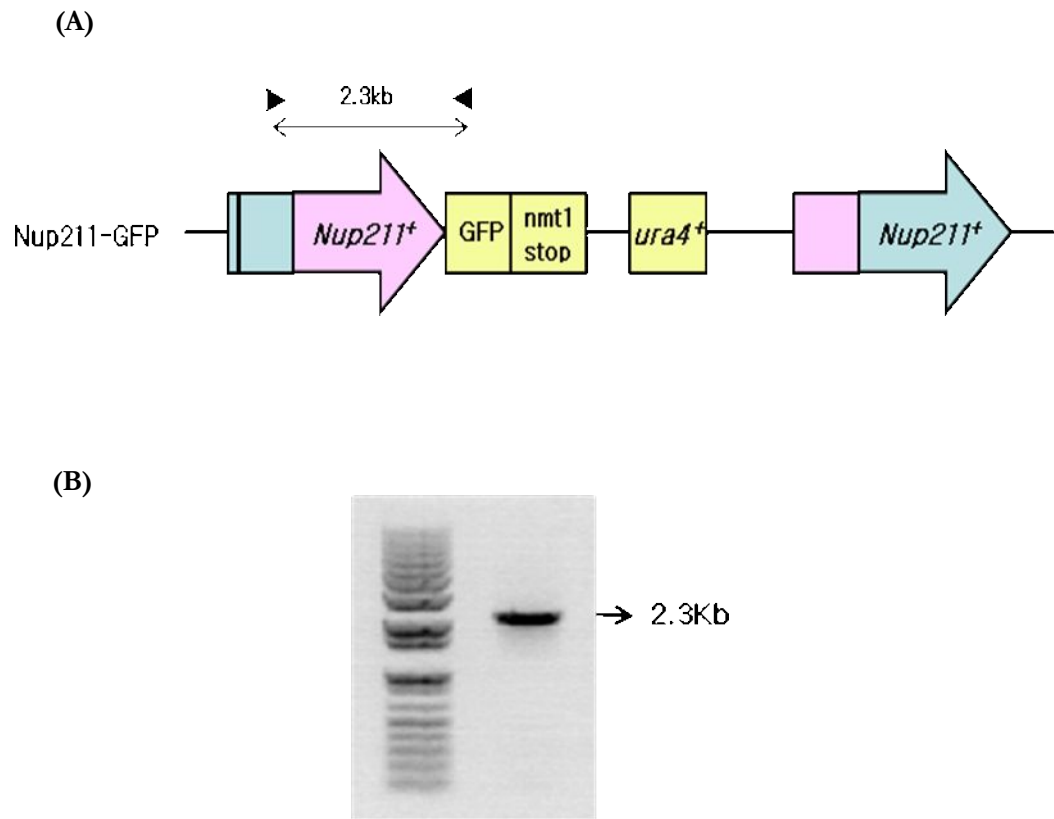


Fig. 9. Construction of Nup211-GFP. PCR was performed with primer denoted in (A), using genomic DNA from Nup211-GFP.

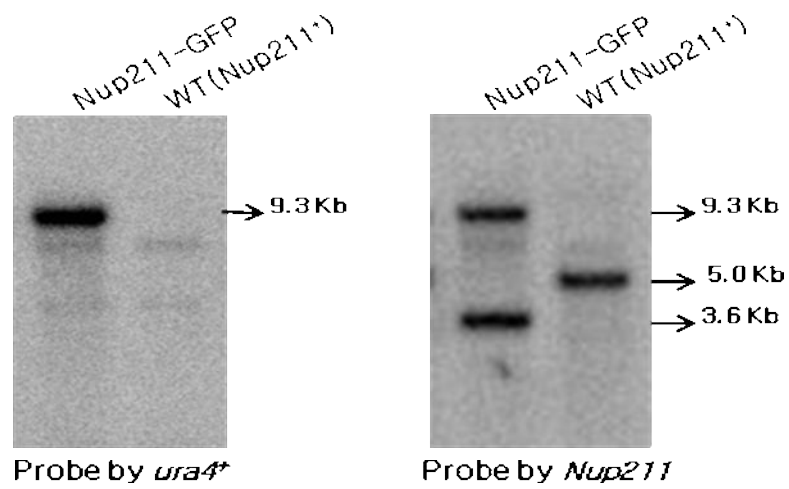
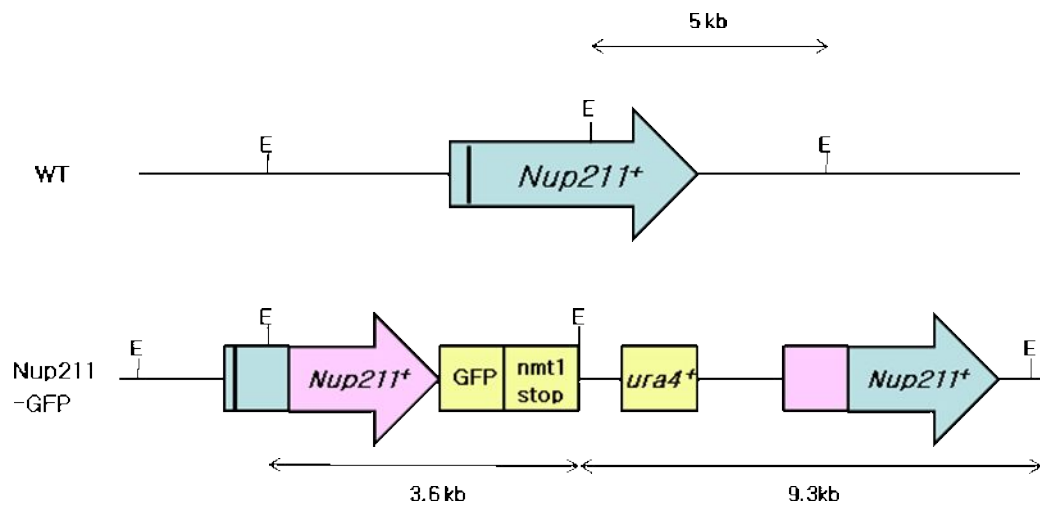


Fig. 10. Southern hybridization analysis for Nup211-GFP. Confirmation of Nup211-GFP by Southern hybridization probe with *ura4⁺* and *nup211*. Southern hybridization analysis was using genomic DNAs from wild type(WT) and Nup211-GFP.

IV. 토 의

분열효모인 *S. pombe* 에서 Nup211 단백질은 발아효모인 *S. cerevisiae* 의 nucleoporin 인 Mlp1 단백질과 척추동물의 nucleoporin 인 TPR 단백질과 homology 이다. *S. cerevisiae* 의 nucleoporin 인 Mlp1 은 스플라이싱 과정 중 인트론(Intron)이 완벽하게 제거되지 않은 mRNA 들을 핵 안에서 세포질로 빠져 나가지 못하도록 splicing factor 와 상호작용을 한다. 이렇게 스플라이싱이 제대로 이루어지지 않은 전사체들은 exosome 에 의해서 분해 되거나, spliceosome 이 다시 붙어서 intron 을 제거한다. 그러므로 Poly(A) tail 과 상호작용하는 Mlp1 은 핵 안에서 gene expression 의 마지막 단계에 관여한다.

따라서 본 연구는 분열효모인 *S. pombe* 에서 *nup211* 유전자의 기능을 확인하기 위하여 Double Joint PCR(DJ-PCR) 방법을 이용하여 *nup211* 결실 돌연변이주를 제조하여 확인하였다. 그 결과 *nup211* 은 세포생장에 필수적(essential)이고, mRNA export 에 관여하여 발현을 억제시키면 poly(A)⁺ RNA 가 세포질에서는 감소하고, 핵 안에 축적 되었다. 또한 Nup211-GFP 를 만들어 형광현미경으로 Nup211p 단백질의 세포 내 위치를 추적하여 NPC(Nuclear Pore Complex)에 위치하는 것을 확인하였다.

S. cerevisiae 에서 nuclear pore-associated protein 인 Mlp1(myosin-like protein 1)은 Mlp1 의 C-terminal 과 mRNA binding protein 인 Nab2 의 N-terminal 사이에서 상호작용이 일어나 poly(A)⁺ RNA 가 핵 밖으로 빠져 나가도록 한다. 이것으로 보아 *S. cerevisiae* 에서 Mlp1 과 Nab2 의 상호작용은 mRNA 의 nuclear pore export 에 매우 중요한 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있다.

따라서 본 연구는 분열효모인 *S. pombe* 에서 *nup211* 과 *nab2* 의 상호작용을 알아볼 뿐만 아니라, *in vitro* full-down assay 나 *in vivo* immunoprecipitation 을 통해 mRNA export 에 관여하는 단백질과 단백질 사이의 물리적인 결합을 조사하여

nup211p 단백질이 어느 export factor 와 complex 를 이루는지 알아내고, 결합하는 경우에는 binding domain 을 조사함으로써 작용 기작을 유추하는 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.
- Bangs P., Burke B., Powers C., Craig R., Purohit A., Doxsey S. (1998). Functional analysis of Tpr: identification of nuclear pore complex association and nuclear localization domains and a role in mRNA export. *J Cell Biol.* **143**, 1801-1812
- 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, Silver PA. (2004). Guardian at the gate: preventing unspliced pre-mRNA export. *Trends Cell Biol.* **14**, 222-5.
- 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 CN., Scarcelli JJ. (2006). Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Cell Biol.* **18**, 299-306.
- Cole CN., Scarcelli JJ. (2006). Unravelling mRNA export. *Nature Cell Biol.* **8**, 645-647.
- Cordes VC., Hase ME, Muller L. (1998). Molecular segments of protein Tpr that confer nuclear targeting and association with the nuclear pore complex. *Exp Cell Res.* **245**, 43-56
- Cordes VC., Reidenbach S., Rackwitz HR., Franke WW. (1997). Identification of protein p270/Tpr as a constitutive component of the nuclear pore complex-attached intranuclear filaments. *J Cell Biol.* **136**, 515-529
- Damelin M., Silver PA. (2000). Mapping interactions between nuclear transport factors in living cells reveals pathways through the nuclear pore complex. *Mol Cell.* **5**, 133-140.
- Davis LI. (1995). The nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem.* **64**, 865-896.
- Favreau C., Worman HJ., Wozniak RW., Frappier T., Courvalin JC. (1996). Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry.* **35**, 8035-8044.

- Galy V. *et al.* (2004). Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell*. **116**, 63-73
- Galy V., Gadai O., Fromont-Racine M., Romano A., Jacquier A., Nehrbass, U. (2004). Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell*. **116**, 63-73.
- Gorlich D., Kutay U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **15**, 607-660.
- Gorlich D., Mattaj IW. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science*. **271**, 1513-518.
- Green DM. *et al.* (2003). The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1010-1015
- Hetzer M., Bilbao-Cortes D., Walther TC., Gruss OJ., Mattaj IW. (2000). GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Mol Cell*. **5**, 1013-1024.
- Köhler A., Hurt E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Mol. Cell Biol*. **8**, 761-763
- Michael P., Rout and John D., Aitchison. (2001). The Nuclear Pore Complex as a Transport Machine. *Mol Cell Biol*. **276**, 16593-16596
- Moore MJ. (2005). From birth to death: the complex life of mRNAs. *Science*. **309**, 1514-1518.
- Moroianu J. (1997). Molecular mechanisms of nuclear protein transport. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. **7**, 61-72.
- Nachury MV., Maresca TJ., Salmon WC., Waterman-Storer CM., Heald R., Weis K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*. **104**, 95-106.
- Nachury MV., Weis K. (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**, 9622-9627.
- Nigg EA. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*. **386**, 779-787.
- Pante N., Aebi U. (1996). Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. **31**, 153-199.

- Reed R., Hurt E. (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*. **108**, 523-531.
- Richard P. Grant¹, Neil J. Marshall¹, Ji-Chun Yang¹, Milo B. Fasken², Seth M. Kelly², Michelle T. Harreman², David Neuhaus¹, Anita H. Corbett² and Murray Stewart. (2007). Structure of the N-Terminal Mlp1-Binding Domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-Binding Protein, Nab2. *J. Mol. Biol.* **376**, 1048-1059
- Rout MP., Aitchison JD., Suprpto A., *et al.* (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol.* **148**, 635-651.
- Stewart, M. (2007). Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Mol. Cell.* **25**, 327-330.
- Stoffler D., Fahrenkrog B., Aebi U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* **11**, 391-401.
- Strambio-de-Castillia C, Blobel G, Rout MP. (1999). Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior. *J Cell Biol.* **144**, 839 -855
- Tran EJ., Wentz SR. (2006). Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell.* **125**, 1041-1053.
- Weirich, CS., Erzberger, JP., Flick, JS., Berger, JM., 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.
- Wentz SR. (2000). Gatekeepers of the nucleus. *Science.* **288**, 1374-1377.
- Wiese C., Wilde A., Moore MS., Adam SA., Merdes A., Zheng Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science.* **291**, 653-656.
- Wood V., Gwilliam R., Rajandream MA., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* **415**, 871-880.
- Yang Q., Rout MP., Akey CW. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell.* **1**, 223-234.
- Yoon, JH. (2003). Synthetic Lethal Mutants with *spmex67* of *Schizosaccharomyces pombe* in the Mediation of mRNA export. *J Microbiol.* **41**, 115-120.

Yoon JH., Whalen WA., 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.

Zhang C., Clarke PR. (2000). Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science.* **288**, 1429-1432.

Zimowska G., Aris JP., Paddy MR. (1997). A *Drosophila* Tpr protein homolog is localized both in the extrachromosomal channel network and to nuclear pore complexes. *J Cell Sci.* **110**, 927-94

Abstract

The study on function of nucleoporin *nup211* in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

Bae Jin-AH

Department of Biology Education

Graduate School of Education

Sungshin Women's University

In eukaryotes, nuclear export of mRNA takes place through the nuclear pore complex(NPC) embedded in the nuclear envelope and several soluble transport factors are involve in this process. The export of mRNA is more complex than the nucleocytoplasmic transport of protein and other RNAs, because numerous additional export factors cooperate with the mRNA export receptors. Thus mRNA export is coupled with other steps of mRNA metabolism.

We constructed deletion mutants of *nup211* in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, that is homologous to *Mlp1* in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *TPR* in Vertebrate, which plays import roles in mRNA export out of nucleus. The *nup211* gene contains encodes a 1837 amino-acid protein with predicted molecular weight of 211.4kDa. The *nup211* gene is essential for growth. The haploid *nup211* null mutant showed extensive poly(A)⁺ RNA accumulation in the nucleus and decrease in the cytoplasm after repression or overexpression of *nup211* expression.

And Nup211-GFP signal was detected in cytoplasm and nucleus, but predominantly concentrated at the nuclear periphery in a punctuate pattern, which was typical of yeast NPC. These results suggest that *nup211* in fission yeast is essential for growth and nuclear export of RNA.

감사의 글

먼저 이렇게 석사학위 논문을 무사히 마칠 수 있도록 도와주신 많은 분들께 감사하다는 말을 전해 드리고 싶습니다. 부족한 저를 인자하게 지도해 주신 윤진호 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 바쁘신데도 불구하고 귀중한 시간을 내주신 김인순 교수님과 김연수 교수님께 감사의 인사를 전합니다. 더불어 많은 가르침을 주신 생물학과 박경숙 교수님, 강혜순 교수님, 전용필 교수님께 감사 드립니다.

큰 딸을 위해서 항상 말 없이 뒤에서 지켜 봐주시고 응원해 주신 부모님께 감사 드립니다. 아빠, 엄마! 큰 딸이 꼭 선생님이 되어서 효도도 많이 하고 즐겁게 해드릴게요. 그러니까 아프지 마시고 건강하세요. 많이 많이 사랑합니다. 그리고 우리 귀염둥이 동생 진영이 지금은 공부하느라고 많이 힘들겠지만 항상 웃는 얼굴 잃지 말고 우리 더 힘내서 좋은 결실 맺자. 언니가 우리 진영이 많이 사랑 하는거 알지??

동고동락으로 대학원 생활을 함께한 미생물학 연구실 식구들... 후배들에게 많은 관심과 사랑을 준 순임언니, 지영언니, 지혜언니, 덕경언니에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 서로 의지하면서 마지막까지 함께한 현진이, 항상 말 없이 옆에서 언니를 도와 주던 대견한 동글이, 미생물학 연구실의 활력소이자 에너지인 애리, 방학 동안 열심히 언니의 실험을 도와주고 웃음을 선사한 지혜, 매번 항상 밝은 웃음으로 인사하는 으뜸이, 보영이, 마지막으로 기초과학연구소 근로로 언니와 함께한 혜경이와 소영이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

그리고 아주 짧은 시간이었지만 저에게 실험방법을 전수해 주신 서울대 치대 연구실에 있는 자상한 민엽오빠께도 감사드립니다. 앞으로 어떻게 될지는 모르겠지만 방사성동위원소 다룰 때에는 꼭 주의할게요.

늘 행복하게 만들어주는 베스트 프랜드인 호준 엄마 옥란이, 밝고 명랑한 승은이, 캐나다 유학생화로 고생하는 진주, 장난꾸러기 호선이, 가끔씩 연락해 힘을 실어주는 승이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 애들아~ 내가 너희들 얼마나 사랑하는지 알지?? 그리고 많은 격려와 힘을 실어 준 정필오빠, 매번 잊지 않고 찾아와 즐거움을 주는 미연이, 새봄이, 이 누나에게 웃음을 되찾아 주는 성태, 창민오빠, 은영언니, 수연이, 혜림이, 성희, 하얀이, 윤선이, 정아 등 순천향대학교 식구들에게도 감사의 마음을 전합니다.

교생실습기간 동안 교사에 대한 참된 사명감과 아낌 없는 사랑을 일깨워 준 선일여자중학교 1학년 9반 귀염둥이들과 모든 선생님들께 감사의 말씀을 전해드립니다. 더불어 한 달 동안 서로 도와주며 밝고 즐겁게 생활한 우리 교생 선생님들! 항상 행복하시고 꼭 훌륭한 선생님들이 되실꺼예요. 사랑합니다.

다시 한번 저에게 또 하나의 소중한 보물을 만들게 해주신 모든 분들께 진심 어린 마음으로 감사드립니다.