

윤진호 교수지도

석사학위 청구논문

분열효모인 *S. pombe*에서 mRNA
export와 관련된 *spNic96* 유전자의
기능에 대한 연구

2007년

성신여자대학교 대학원

생물학과

정순임

분열효모인 *S. pombe*에서 mRNA
export와 관련된 *spNic96* 유전자의 기
능에 대한 연구

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2006년 11월

성신여자대학교 대학원

생물학과

정순임

논문 개요

진핵 생물에서 mRNP의 핵과 세포질 사이의 이동은 핵막에 존재하는 Nuclear Pore Complex(NPC)를 통해 이루어지며 이동 할 거대분자들을 특이적으로 인식하는 transport receptors(carriers)와 soluble transport factors들이 관여한다. mRNP의 carrier로 여겨지는 heterodimeric NXF-NXT단백질은 하등 진핵 세포인 효모에서부터 사람에 이르기까지 잘 보존되어 있으며, mRNP complex를 NPC까지 연결시키는 역할을 하는 것으로 추측된다. 효모에서 NXF와 homolog을 보이는 Mex67p은 mRNA 전사와 processing과정에 관여하는 여러 단백질들과 결합하여 export receptor로서의 기능을 담당한다. mRNA export관련 돌연변이들은 synthetic lethal screen을 이용하여 분열효모에서 mRNA export pathway의 가장 중요한 player인 Mex67와 synthetic lethality를 보이는 3종류의 mutant를 확인하였다. 그 중 하나의 mutant로부터 아직 기능이 밝혀지지 않은 새로운 유전자를 클로닝하여 *spNic96*이라 명명하였다. *spNic96* 유전자는 851개의 amino acid를 encode하고 있으며 ORF 부분에 1개의 intron이 존재한다. 이 유전자는 *S. cerevisiae*의 nucleoporin인 *Nic96*, *S. pombe npp106*과 유사성을 갖는다. *spNic96* 유전자는 성장에는 필수적이지 않았다.

목 차

논문개요

목차

그림목차

도표목차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험재료.....	7
2. <i>spNic96</i> knockout mutant 제조	
(1) Subcloning을 이용한 knockout mutant 제조.....	13
(2) Double joint PCR(DJ-PCR)을 이용한 knockout mutant 제조.....	16
(3) <i>S. pombe</i> transformation.....	19
(4) <i>spNic96</i> knockout mutant 확인.....	19
3. <i>spNic96</i> -GFP construct 제조.....	22
III. 결과	24
IV. 결론.....	39
참고문헌	
영문초록	
감사의 글	

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	9
Table 4. PCR primer used in this study	10
Table 5. <i>spNic96</i> deletion PCR conditions for subcloning	15
Table 6. <i>spNic96</i> deletion PCR conditions for DJ-PCR	17
Table 7. PCR condition for <i>spNic96</i> -GFP constructs	23

그림 목 차

Figure 1. Surface of nuclear pore complex architecture	5
Figure 2. Phylogenetic tree of <i>S.pombe</i> and <i>S. cerevisiae</i>	6
Figure 3. Map of pBluescript SK+ vector	14
Figure 4. Schematic diagram of synthetic lethality	26
Figure 5. Multiple sequence alignment of spNic96p with Nic96p and Npp106p	27
Figure 6. <i>spNic96</i> gene deletion by subcloning	30
Figure 7. Construction of <i>spNic96</i> deletion mutants	32
Figure 8. <i>spNic96</i> gene deletion by DJ-PCR	35
Figure 9. Confirmation of <i>spNic96</i> gene disruption by PCR	36
Figure 10. Construction of <i>spNic96</i> -GFP	38

I. 서론

원핵 생물과는 다르게 진핵 생물에서는 유전정보가 핵 안에 저장되어 있는 반면, 단백질의 합성은 세포질에서 일어난다. 이러한 분리는 유전자의 안정적인 저장 및 발현조절에는 유리하지만, RNA와 단백질 같은 거대분자들은 핵과 세포질을 끊임없이 이동하여야만 한다. 이러한 거대분자들의 핵과 세포질 사이의 이동은 핵막에 존재하는 Nuclear Pore Complex(NPC)를 통해 이루어진다. NPC는 효모의 경우 40MDa, 척추동물 같은 경우 125MDa 정도의 거대 분자로 이루어져 있다. 서로 다른 크기지만 기본적인 NPC의 구조는 효모에서 척추 동물까지 보존되어 있으며 Nuclear basket, central core, cytoplasmic fibrils로 이루어져 있다(Stoffler et al., 2001; Fig 1). NPC를 구성하는 단백질을 nucleoporins(Nups)이라 하며 효모의 경우 30 종류가 있으며 그 중 절반이 degenerate FG repeats를 포함하고 transport 복합체에 docking site를 제공한다. nuclear transport에는 signal과 에너지를 필요로 하며 nuclear import시에는 Nuclear localization signals(NLS), nuclear export시에는 Nuclear export signals(NES)을 갖는 단백질이 karyopherins(Kaps or importins/exportins)이라 불리는 importin- β family의 transport receptors와 상호작용이 일어나 물질의 이동이 가능해진다. karyopherins의 N-terminal domain은 small GTPase Ran과 binding하며 Ran-GTP와 FG nucleoporin과의 상호작용을 통해 cargoes의 운반을 매개한다. 핵에는 Ran-GTP가, 세포질에는 Ran-GDP가 각각 분포되어 이동하는 거대분자들의 운반 방향성을 결정한다(Weis, 2003; Lei and Silver, 2002).

Ran은 mRNA export에서 필수적인 mRNA binding protein의 recycling에 있어 중요하다. 새로 합성된 RNA 전구체는 많은 수의 heterogeneous

nuclear (hn) RNP 단백질, 또는 processing factor와 조합되고 5-capping, splicing, 3' end cleavage, polyadenylation을 수행하여 nuclear export가 가능한 성숙된 mRNP 복합체를 형성한다. 핵과 세포질 사이를 왕래하고 export가 진행되는 동안 hnRNP는 mRNA와 조합되어 있기 때문에 mRNP 복합체는 nuclear exit를 매개하는 signal을 포함하고 있을 것으로 보여진다 (Nakielny et al., 1999).

mRNA의 export는 다른 RNA(tRNA, rRNA, snRNA등)의 transport와 달리 훨씬 복잡하고 전혀 다른 기작에 의해 일어나며(Reed and Hurt,2002), importin- β type family에 속하는 transport receptors나 Ran 단백질이 관여하지 않고, non- β type의 carriers인 heterodimeric NXF-NXT 단백질과 수많은 soluble export factors가 관여하고 있다(Cullen, 2003; Thakurta et al., 2003; Erkmann and Kutay, 2004). mRNP의 carrier로 여겨지는 heterodimeric NXF-NXT단백질은 하등 진핵 세포인 효모에서부터 사람에게 이르기까지 잘 보존되어 있으며, mRNP complex를 NPC까지 연결시키는 역할을 하는 것으로 추측된다(Cullen, 2003; Erkmann and kutay, 2004). Soluble export factors로는 RNA 결합단백질(Npl3p, Nab2p 등), nucleoporin 또는 NPC-associated proteins(Mtr2p, Gle1p, Rae1p, Nup116p, Nup159p 등), RNA helicase(Sub2p, Dbp5 등), ATPase(Elf1p 등) 등이 있다. 고등 생물에서 이 단백질들의 homolog들도 mRNA export에 관여하며 효모의 돌연변이들을 complementation하는 것으로 보아 mRNA export의 작용 기작은 진화적으로 잘 보존되어 있는 것으로 여겨진다(Lei and Silver, 2002; Cullen, 2003).

mRNA export pathway는 작용 기작의 복잡성 때문에 in vitro system 연구와 생화학적인 접근방법에도 한계가 있다. 그러므로 mRNA export에 관여하는 factor들을 찾기 위해 유전학적, 분자/세포생물학적 연구방법이 잘 확

립되어 있는 효모가 좋은 model system으로 이용된다. 하등 진핵 생물로서 *S.cerevisiae*와 *S. pombe*는 유전적 조작이 용이하고 생화학적, 생리적 기능 분석시스템이 잘 확립되어 있어 진핵 생물의 기본적인 생명현상을 연구하는데 좋은 model system이다. 그러나 분열효모인 *S. pombe*와 발아효모인 *S.cerevisiae*는 18S rRNA 분석에 의해 진화적으로 상당히 멀리 떨어진 것으로 밝혀졌으며(Fig 2), 전체 유전자의 30% 정도가 완전히 다른 만큼 여러 면에서 차이점을 보이고 있다. mRNA export 기작에 있어서도 두 효모는 상당한 차이점을 보인다. NXF-NXT인 *S. cerevisiae* Mex67p-Mtr2는 mRNA export에 필수적이거나 *S. pombe* Mex67p-Nxt1는 필수적이지 않다(Segref et al.,1997; Yoon et al., 2000; Thakurta et al., 2004). 오히려 *S. cerevisiae*에서는 필수적이지 않은 Rae1p이 *S. pombe*에서는 필수적이다. 실제로 Rae1p과 고등생물의 Rae1p homolog는 mRNA export carrier 인 NXF-NXT heterodimers와 유사한 성질을 보임으로써 비슷한 역할을 담당하는 것으로 추측된다(Pritchard et al., 1999; Sabri and Visa, 2000; Yoon et al., 2000; Blevins et al., 2003). 서로 다른 두 종류의 효모에서 보이는 이러한 차이는 mRNA export에 중요한 두 단백질(Mex67p, Rae1p)이 중복된 기능을 수행하거나 또는 다르게 조절되는 여러 mRNA export pathways 의 존재 가능성을 암시한다. 이와 같이 두 효모의 차이점은 진핵 생물의 전체적인 mRNA export 기작을 이해하기 위해 상호 보완적으로 작용하고 있다.

mRNA export의 작용 기작을 이해하기 위해서는 가장 중요한 carrier 역할을 할 것으로 생각되는 Mex67p 또는 Rae1p과 상호작용하는 새로운 export factor를 찾아내고 그 역할을 규명하는 것이 매우 중요하다.

본 실험에서는 mRNA export관련 돌연변이들은 synthetic lethal screen 을 이용하여 분열효모에서 mRNA export pathway의 가장 중요한 player인 Mex67와 synthetic lethality를 보이는 3종류의 mutant 중 하나의 mutant로

부터 아직 기능이 밝혀지지 않은 새로운 유전자를 클로닝하여 *spNic96*라 명명하였다. *spNic96* 유전자는 1개의 intron을 가지고 있으며 97.5 kDa, 851개의 amino acid를 encode하고 있다. 또한 *spNic96*는 *S. cerevisiae*의 nucleoporin인 *Nic96*, *S. pombe* *Npp106* 와 similarity를 보인다. 또한 *spNic96* 유전자가 제거된 돌연변이를 제조하여 *spNiC96* 유전자의 mRNA export시 기능에 대하여 고찰하고자 한다.

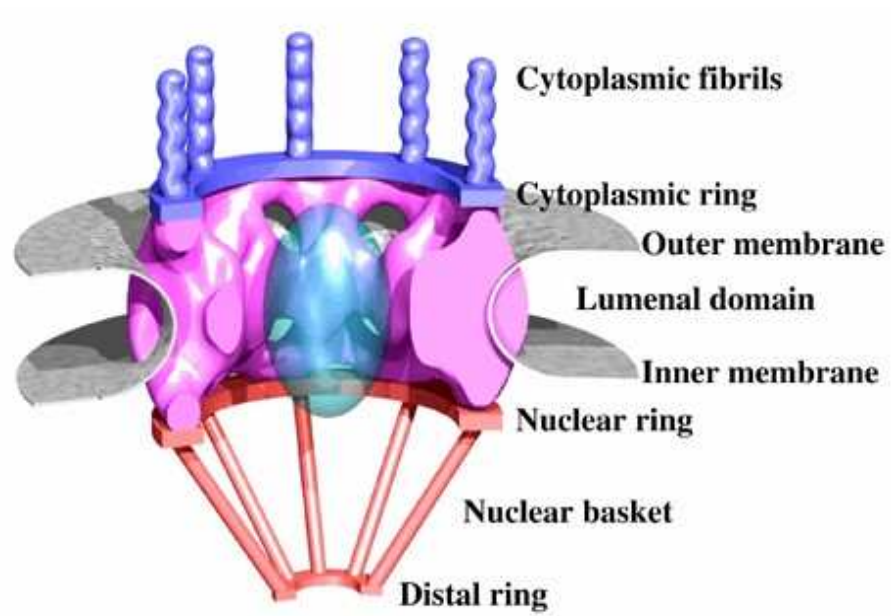


Figure 1. Surface of nuclear pore complex architecture

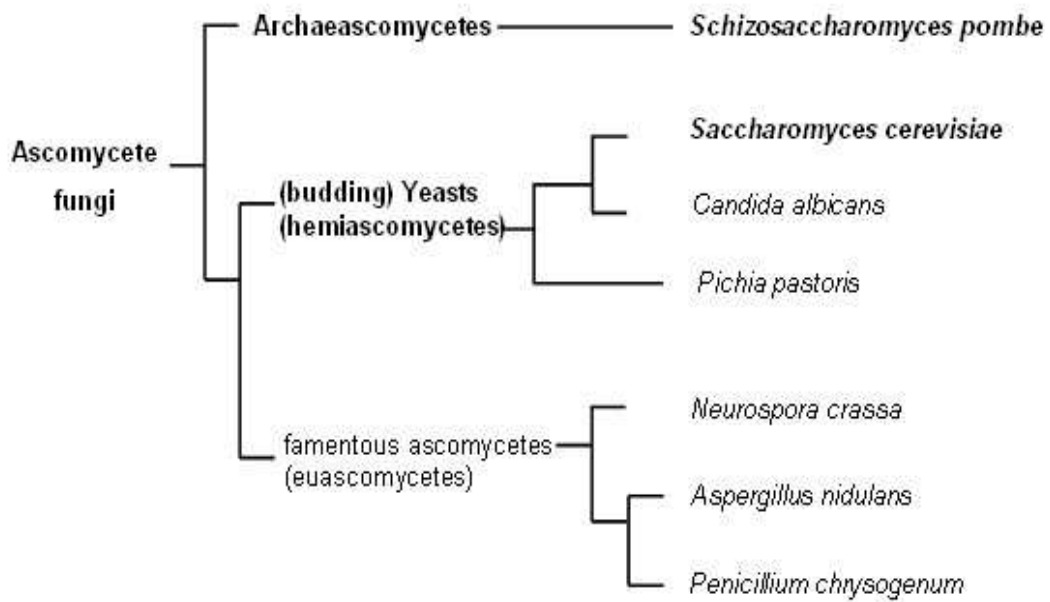


Figure 2. Phylogenetic tree of *S. pombe* and *S. cerevisiae*

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1-1 재료 및 시약

S. pombe 균주는 haploid strain AY217 과 Diploid strain SP286, ED665/668 을 사용하였고, Plasmid 는 pBlueskript SK(+)-*NotI*, 41uGFP, 41u3GFP 를 사용하였다. *S. pombe* 배양에는 YES 와 EMM(Edinburgh minimal medium)을 사용하였다. *E. coli* 배양에는 LB 배지를 사용하였으며, LB 에 첨가하는 Ampicillin 과 YES 에 첨가하는 G418 의 농도는 100 μ g/ml 로 하였다. 효모 배양에 사용한 배지는 Difco, Q-Bio, 사용된 Chemical 들은 Sigma 와 MP 제품을 사용하였다. PCR 에 필요한 primer 는 제노텍, Taq polymerase 는 제넨메드 Nova Taq, TaKaRa Pfu 를 사용하였으며, 제한효소는 New England Biolabs(NEB), ligation kit 는 TaKaRa 제품을 사용하였다. Southern blotting 에 사용된 ECL (Enhanced Chemiluminescence labeling and detection) kit 는 Amersham Life Science , PCR clean up kit 와 gel extraction kit 는 QIAGEN 제품을 이용하였다.

Table 1. Strains used in this study

Strains	Genotype
<i>S. pombe</i>	
SP 286	h+/h+leu1-32/leu-32ura4-d18/ura4-d18ade6-M210/ade6-M216
ED665/668	h+/h-leu1-32/leu-32ura4-d18/ura4-d18ade6-M210/ade6-M216
AY 217	h-leu1-32 ura4-d18
<i>E. coli</i>	
Top10	F-,mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC),80lacZM15,lacX74, deoR,recA1,araD139,(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG

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

YES(Yeast Extract) Medium	
YE powder	35g
5g Yeast Extract-Y	
30g dextrose	
Supplements : 225mg/ℓ adenine, leucine, uracil	
EMM(Edinburgh Minimal Medium)	
EMM powder	32g
3g potassium hydrogen phthalate	
2.2g sodium phosphate dibasic	
5g ammonium chloride	
20g dextrose	
2.1g minimal salt	
0.2g vitamins	
3mg trace elements	

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

LB(Luria-Bertani) Medium	
NaCl	10g
Tryptone	10g
Yeast extract	5g
Agar	2%

Table 4. PCR primer used in this study

Primer name	Primer sequence (5' → 3')
Nic 5For	GAACACGAGGCACATATGTG
Nic 3Rev	AATGGAAAAGTGTCTCTGAG
Nic U5Rev-tail	ACATATAGCCAGTGGGATTTGTAGCTA ATGGTCAAGATG TAAACAAGAAC
Nic K5Rev-tail	CTGGGCCTCCATGTCTGCTGGCCGGGTA ATGGTCAAGATG TAAACAAGAAC
Nic U3For-tail	GGTGTGGAACAGAATAAATTAGATGATA CTGCTGCTA AACAGGCTGATG
Nic K3For-tail	CGCTATACTGCTGTCGATTCGATACTA TA CTGCTGCTAA ACAGGCTGATG
Nic 5Nest	CTTCTGCTGAAAATGGAGGA
Nic 3Nest	GAAGACTAGTGCATTCAACA
Kan 1	ATTGCGGCCGCTTTAGCTTGCCTCGTCCC
Kan 2	AATGCGGCCGCTGGATGGCGGCGTTAGTAT
Kan 5DJ	ACCCGGCCAGCGACATGGAG
Kan 3DJ	AGTATCGAATCGACAGCAGT
Kan 4F	GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG
Kan 2R	CGCACGTCAAGACTGTCAAGGAG
Ura4 1	ATTGCGGCCGCTACAAATCCCCTGGCT
Ura4 2	TATGCGGCCGCATCTAATTTATTCTGTT
Ura 4F	TGAATGTAAAATACCATGTAGAC
Ura 2R	CACAAATGCATACATATAGCCAG
Ura 5DJ	AGCTACAAATCCCCTGGCT
Ura 3DJ	CATCTAATTTATTCTGTTCC
Nic96 1	ACACTCGAGGCACATATGTGGGC
Nic96 2	AATGCGGCCGCGAAGTCACCGAGTTCACC
Nic96 3	AATGCGGCCGCAATGCACTAGTCTTCATG
Nic96 5	ACATCTAGAAACGCCTTCCGTTTCGCTA
Nic96 7	CAAAGAGGTGGAATTCGTG
Nic96 8	CTTGTCGACATGACGGTTGCGTCTGACGA

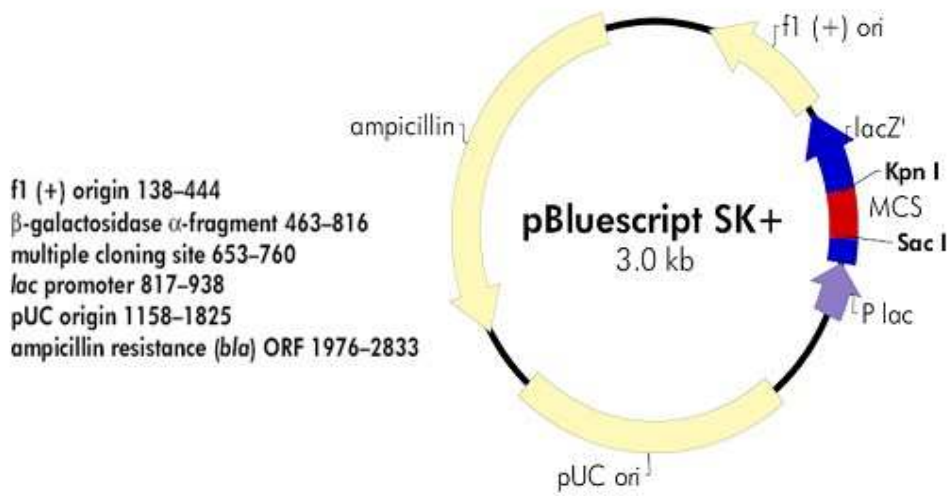
Table 4. PCR primer used in this study (continued)

Primer name	Primer sequence (5' → 3')
Nic96 9	ATAGGATCCTGTCATTTCTATTTTCGCAGC
Nic96 10	CTTGTCGACACGGTTGCGTCTGACGATTC
Nic96 11	ATAGGATCCTCATGTCATTTCTATTTTCGC
Nic96 t	CATTGGCGCGTTATGAGGAC
Nic96 2t	CGCTGAACGTAATGAACTTC

2. *spNic96* knockout mutant 제조

1) Subcloning을 이용한 Knockout mutant 제조

spNic96 gene의 ORF 부분을 제외한 5', 3' flanking region 각 부분의 primer를 제작하였다. 5' PCR products는 upstream에 *XhoI*(5-ACA**CTC GAG**GCACATATGTGGGC-3)과 downstream에 *NotI*(5-AAT**GCGGCCG**CGAAGTCACCGAGTTCAC-3) site를 첨가하여 제작하였고, 3' PCR products는 downstream에 *NotI*(5-AAT**GCGGCCG**GCAATGCACTAGTCTTCATG-3)과 upstream에 *XbaI*(5-ACA**TCTAGA**AACGCCTTCCGTTCCGCTA-3)을 첨가하여 각 부분을 PCR로 증폭하였다. pBluescript SK(+)-*NotI* vector(Fig 3)의 *XhoI*과 *XbaI* site를 이용하여 효소 처리 한 후 PCR products와 ligation하여 cloning 하였다. 그 다음 *spNic96* gene을 대체 시킬 Marker gene인 *ura4*와 *kan^r*을 PCR을 이용하여 증폭시켰다. 이때 *ura4*는 pDW234 plasmid를 *kan^r*은 pBGle1 plasmid를 각각 template로 이용한다. PCR mixture와 reaction 은 Table 5에 정리하였다. 첫 번째 cloning으로 조작하고자 하는 flanking region 삽입이 확인된 pB*spNic96*에 *NotI* site를 이용하여 PCR한 *ura4*와 *kan^r*을 *NotI*으로 처리한 후 두 번째 cloning시켰다. 이렇게 조작된 pB*Nic96/ura4*, pB*Nic96/kan^r* 을 *XhoI/XbaI* 효소 처리하여 조작된 fragment만 얻었다.



pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 601–826)

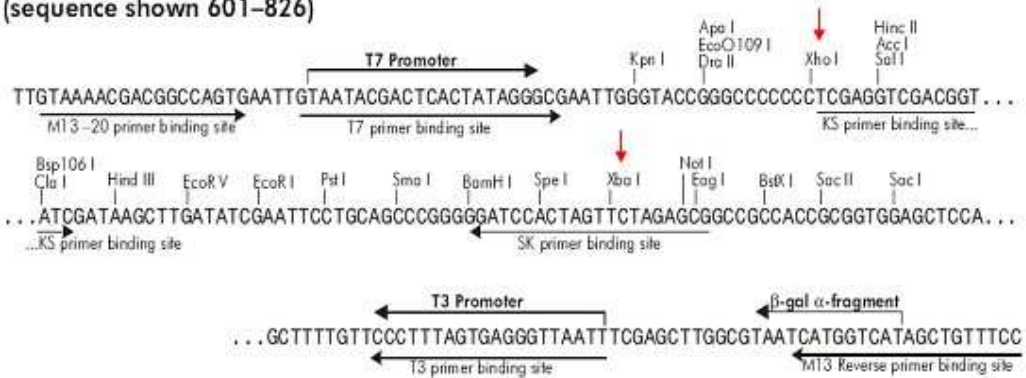


Figure 3. Map of pBluescript SK+ vector (Stratagene).

Table 5. *spNic96* deletion PCR conditions for subcloning

PCR mixture (final 100 μ l)		PCR reaction	
5' /3' flanking region			
Template DNA (9N2)	1 μ l		
Nic 1/3 primer	1 μ l		
Nic 2/5 primer	1 μ l		
10X dNTP	10 μ l		
10X Buffer	10 μ l	94 °C	2min
Pfu	1 μ l	94 °C	30sec
TDW	76 μ l	50 °C	1min
		72 °C	1min
		72 °C	5min
		4 °C	∞
			25 cycle
kan^r/Ura4			
Template DNA (pBGle/pDW234)	1 μ l		
Kan 1/Ura4 1 primer	1 μ l		
Kan 2/Ura4 2 primer	1 μ l		
10X dNTP	10 μ l		
10X Buffer	10 μ l		
Pfu	1 μ l		
TDW	76 μ l		

2) Double joint PCR(DJ-PCR)을 이용한 knockout mutant 제조

spNic96 deletion construct 제조를 위해 5', 3' flanking region 각 부분과 *spNic96* ORF 부분을 대체 시킬 selection marker *kan^r/ura4* 의 primer를 제작하였다. 5' Rev, 3' For 는 *kan^r/ura4* maker tail을 붙여서 primer를 디자인 하였다. knockout construct PCR은 Double joint PCR(DJ-PCR) 방법(J.H. Yu et al., 2004)을 이용하였다. First PCR 에서는 5' For와 5' Rev + marker tail, 3' For + marker tail와 3' Rev, marker gene(*kan^r/ura4*) 각각을 증폭한 후 전기영동으로 확인 한 다음 QIAGEN PCR clean up kit를 이용하여 purify하였다. First PCR에서 얻어진 product들을 5' flanking amplicon : marker gene(*kan^r/ura4*) : 3' flanking amplicon 1:3:1의 비율로 섞어서 second PCR을 수행하였다. second PCR product를 template로 5' , 3' Nest primer를 이용하여 최종적으로 third PCR을 진행하였다. PCR 후 전기영동으로 확인 한 다음 gel elution 하여 QIAGEN gel extraction kit를 이용하여 purify하였다. DJ-PCR 각 단계마다의 PCR mixture와 reaction 은 Table 6에 정리하였다.

Table 6. *spNic96* deletion PCR conditions for DJ-PCR

First PCR: amplification of 5' , 3' flanking regions and marker

PCR mixture (final 100 μ l)		PCR reaction	
5' flanking region			
Template DNA (9N2)	1 μ l		
Nic 5' For primer	1 μ l		
Nic U5/k5 Rev primer	1 μ l		
dNTP	10 μ l		
10X Buffer	10 μ l		
Taq polymerase	1 μ l		
TDW	76 μ l		
3' flanking region		94 $^{\circ}$ C	2min
Template DNA (9N2)	1 μ l	94 $^{\circ}$ C	30sec
Nic 3' Rev primer	1 μ l	55 $^{\circ}$ C	1min
Nic U3/k3 For primer	1 μ l	72 $^{\circ}$ C	1min
dNTP	10 μ l	72 $^{\circ}$ C	7min
10X Buffer	10 μ l	4 $^{\circ}$ C	∞
Taq polymerase	1 μ l		
TDW	76 μ l		
kan^r/ura4			
Template DNA			
(pBGle/pDW234)	1 μ l		
K5/U5 DJ primer	1 μ l		
K3/U3 DJ primer	1 μ l		
dNTP	10 μ l		
10X Buffer	10 μ l		
Taq polymerase	1 μ l		
TDW	76 μ l		

25 cycle

Table 6. *spNic96* deletion PCR conditions for DJ-PCR (continued)

Second PCR: fusion of three fragments mix

PCR mixture (final 25 μ l)		PCR reaction	
5' flanking amplicon	1 μ l	94 °C	2min
3' flanking amplicon	1 μ l	94 °C	30sec
Kan/ura amplicon	3 μ l	58 °C	20min
dNTP	2 μ l	72 °C	5min
10X Buffer	2.5 μ l	72 °C	10min
Taq polymerase	0.25 μ l	4 °C	∞
TDW	15.25 μ l		

} 10 cycle

Third PCR: amplification of the fused knockout constructs

PCR mixture (final 100 μ l)		PCR reaction	
Template DNA (2 nd PCR product)	0.5 μ l	94 °C	2min
Nic 5 Nest primer	1 μ l	94 °C	30sec
Nic 3 Nest primer	1 μ l	55 °C	1min
dNTP	10 μ l	72 °C	2min
10X Buffer	10 μ l	72 °C	5min
Taq polymerase	1 μ l	4 °C	∞
TDW	76.5 μ l		

} 25cycle

3) *S. pombe* transformation

*S. pombe*의 transformation은 Lithium Acetate 방법(Warbrick et al, 1993)으로 수행하였다. AY217, ED665/668 strain을 EMM+UL media에 seed한 뒤 28°C에서 하루 정도 키운 후, fresh EMM+UL media에서 $5-8 \times 10^6$ cell/ml이 될 때까지 배양하였다. 이들 세포를 harvest 하여 멸균한 TDW로 wash한 후, 1x TE/LiAC로 다시 wash 하고 원심 분리하여 cell만 얻은 다음 $1-2 \times 10^9$ cell/ml의 농도가 되도록 1x TE/LiAC로 resuspension 하였다. 이렇게 얻어진 cell 100 μ l와 salmon sperm DNA 5 μ l, transformation 하고자 하는 DNA 8 μ l을 넣고 잘 섞어 준 후, 50% PEG4000 300 μ l를 넣고 mix 한 다음 28°C 에서 30분간 incubation하였다. 42°C에서 8분간 heat shock을 준 다음 상온에 2분간 방치한 후 원심 분리하여 50% PEG4000를 완벽히 제거한다. *ura4* maker가 형질 전환된 cell은 1x TE에 resuspension하여 EMM-U plate에 spreading한 뒤 28°C에서 4일 정도 incubation하고, *kan^r* maker가 형질 전환된 cell은 YE media에 resuspension하여 28°C 에서 o/n 한 후 YE+G418배지에 spreading한 후 3 일 간 28°C incubator에서 배양하였다.

4) *spNic96* knockout mutant 확인

① Genomic DNA isolation

*S. pombe*로 transformation하여 얻은 transformant를 각각의 배지에 streaking 하여 single colony를 얻은 후 EMM+UL media 10ml에 seed하여 이틀 정도 키웠다. 3,000rpm에서 2분 동안 원심 분리하여 cell을 가라 앉힌

후 CES buffer 1ml에 resuspension하였다. Zymolase 20T (2.5 mg/ml) 를 처리하여 vortexing 한 후 37°C에서 1시간 정도 둔 다음 10% SDS를 처리하여 cell wall이 벗겨졌는지 현미경으로 체크하고 원심분리 하여 상층 액을 제거 하였다. 0.55ml TE, 1% SDS로 cell을 resuspension 한 다음 65°C에서 10분간 처리하였다. 5M potassium acetate 175 μ l 을 첨가하고 ice에서 10분 정도 둔 후 13,000rpm으로 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층 액만 0.5ml 따낸 다음 동량의 isopropanol을 처리하여 -20°C에 10분간 두었다. 13,000rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리 한 다음 pellet만 얻어 70% ethanol로 wash하고 air dry한 후 50 μ g/ml RNaseA가 첨가된 TE 350 μ l로 resuspension하여 65°C에 10분간 처리하였다. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1을 300 μ l 첨가 한 뒤 vortex로 잘 섞어 준 후 13,000rpm으로 5분간 spin down 시켜 물 층만 따내 새로운 tube로 옮긴다. 한번 더 반복하여 3M sodium acetate 30 μ l 와 100% ethanol 750 μ l 을 넣고 섞은 후 ice에서 10분간 처리 한 다음 10,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심 분리하여 얻어진 pellet를 70% ethanol로 wash 후 air dry 시키고 30 μ l TDW로 resuspension하여 DNA를 분리 하였다.

② Knockout mutant PCR 확인

앞에서 분리한 DNA를 template로 사용하여 Knockout construct를 PCR로 확인하였다. 5' 확인은 Nict(5-CATTGGCGCGTTATGAGGAC-3)와 Kan2R(5-CGCACGTCAAGACTGTCAAGGAG-3)/Ura2R(5-CACAAATGCATACATATAGCCAG-3) primer를 이용하여 증폭하였고, 3' 확인은 Kan4F(5-GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG-3)/Ura4F(5-TGAATGTAAAATACCATGTAGAC-3) 와 Nic7(5-CAAAGAGGTGGAATTCGTG

-3)primer를 이용하여 증폭하였다. 전체 size 확인은 Nic5Nest(5-CTT CTGCTGAAAATGGAGGA-3)와 Nic3Nest(5-GAAGACTAGTGCATTC AACA-3)를 이용하여 PCR을 수행하여 제대로 Knockout된 균주를 확인하였다.

③ Southern Blotting

spNic96 유전자가 정확히 disruption 되었는지 확인하기 위해 Amershams ECL nonisotopic method 를 사용하여 Southern blotting 을 수행하였다. Genomic DNA 를 *SalI/BglII*제한효소로 자른 후 DNA 절편을 size marker 와 같이 1 % low EEO agarose gel 에서 전기영동 하여 분리한 후, depurination 용액에서 15 분, denaturation 용액에서 40 분 그리고 neutralization 용액에서 40 분간 처리하였다. 이어 gel 상의 DNA 단편들을 reverse transfer 방법으로 Schleicher & schuell 용기를 이용하여 20X SSC 내에서 Hybond-N⁺ membrane 으로 4 시간 동안 이동시켰고 UV 로 cross-link(0.15J/cm²)하여 membrane 에 고정하였다.

Prehybridization 은 42 °C에서 1 시간 동안 ECL hybridization solution 으로 하였고, Probe labeling 은 100ng/μl 의 probe DNA 2.5 μl 에 TDW 7.5 μl 를 섞어 준 후 5 분 동안 boiling 시켜 denaturation 시킨 다음 ice 에 재빨리 넣어주었다. Labeling reagent 와 glutaraldehyde 를 10 μl 씩 넣고 잘 섞어 준 후 37°C에서 10 분간 incubation 한 다음 Prehybridization 한 solution 과 잘 섞어 주고 Hybridization 은 42 °C for 16 시간 동안 진행하였다. Primary Wash Buffer 로 membrane 을 wash 하고 2XSSC 로 다시 wash 한 후 ECL DNA detection reagent 를 이용하여 detection 수행한 다음,

chemi-doc 에서 Quantity one (Bio-Rad) program 을 이용하여 signal 을 확인하였다.

3. *spNic96*-GFP construct 제조

spNic96 단백질의 세포 내 위치를 형광현미경으로 확인하기 위하여 GFP (green fluorescence protein) 단백질을 붙인 construct 를 제조하였다. 이를 위해 *spNic96* ORF 부분만을 증폭할 5' *spNic96*-GFP, 3' *spNic96*-GFP primer 를 제작하였고 *nmt41* promoter 와 GFP 가 integration 되어 있는 41uGFP/41u3GFP vector 를 이용하였다. 5' *spNic96*-GFP(Nic10: 5-CTTGTCGACACGGTTGCGTCTGACGATTC-3 /Nic11: 5-ATAGGATCCTCATGTCATTTCTATTTTCGC-3), 3' *spNic96*-GFP(Nic8: 5-CTTGTCGACATGACGGTTGCGTCTGACGA-3/Nic9: 5-ATAGGATCCTGTCATTTCTATTTTCGCAGC-3) 각각을 PCR 방법으로 증폭한 다음 PCR product 는 *Sall* 과 *BamH1* 제한효소로 처리하고 41uGFP/41u3GFP vector 는 *XhoI* 과 *BamH1* 으로 처리하여 cloning 하였다.

Table 7. PCR condition for *spNic96*-GFP constructs

PCR mixture (final 100 μ l)		PCR reaction	
<i>spNic96-5/3GFP</i>			
Template DNA (9N2)	0.5 μ l	94°C	2min
Nic 10/8 primer	1 μ l	94°C	30sec
Nic 11/9 primer	1 μ l	50°C	1min
10X dNTP	10 μ l	72°C	1min
10X Buffer	10 μ l	72°C	5min
Pfu	1 μ l	4°C	∞
TDW	76.5 μ l		

} 25cycle

III. 결과

1. Synthetic lethal 돌연변이 주 SLMex3으로부터 *spNic96* cloning

S. pombe 에서 mRNA export 에 관여하는 *Mex67* 과 유전적으로 연관이 있는 유전자를 찾기 위하여 *Mex67* 유전자 전체가 deletion 된 균주에서 synthetic lethal mutants 를 screen 하였다. 두 유전자 각각에 mutation 이 따로 일어났을 때는 growth 에 영향을 미치지 않지만 기능적으로 연관된 두 유전자 모두에 mutation 이 생기면 cell 이 치사 되는 것을 synthetic lethal 이라 한다. synthetic lethal screening 을 위해 *nmt1*(no message in thiamine) promoter 를 사용, thiamine 이 첨가되었을 때 유전자 발현이 저해 되는 system 을 사용하였으며 균주로 $\Delta mex67:: Kan^r/pREP81X-Mex67$ strain 을 이용하였다. pREP81X-Mex67 plasmid 의 Mex67 유전자는 *nmt1* promoter 에 의해 조절을 받으므로 thiamine 이 첨가된 배지에서는 *Mex67* 의 발현이 억제된다(Fig 4). 이러한 원리를 이용하여 *Mex67* 과 synthetic lethal 인 mutants 를 1 차 screen 하여 10 개의 candidates 를 확인, mRNA export 에 결함을 보이는 3 개의 돌연변이 주를 최종적으로 선별하여 SLMex1, SLMex2, SLMex3 이라 명명하였다. 이중 SLMex3 에 *S. pombe* 의 genomic DNA library 를 transformation 하여 thiamine 이 첨가된 배지에서 자라는 transformants 들을 selection 하였다. 이들 transformants 로부터 total DNA 를 추출하여 *E. coli* 에 transformation 하여 각각의 plasmid 를 rescue 한 다음, SLMex3 돌연변이 주에 re-transformation 하여 complementation 하는 2 개의 clone 들을 분리하였다. 이 중 *S. cerevisiae* 의 nucleoporin 인 Nic96p 와 homology 를 보이는 putative nucleosome

complex subunit 를 포함하는 9N2 clone 을 확인하여 *spNic96* 라고 명명하였다.

새롭게 확인된 *spNic96p* 과 homolog 를 가지는 *S. cerevisiae* 의 *Nic96p*, *S. pombe* 의 *Npp106p* 사이의 단백질 sequence alignment 수행 결과 *spNic96p* 단백질은 *Nic96p*, *Npp106p* 단백질과 14% identical, 35% similar 를 나타내었다(Fig 5).

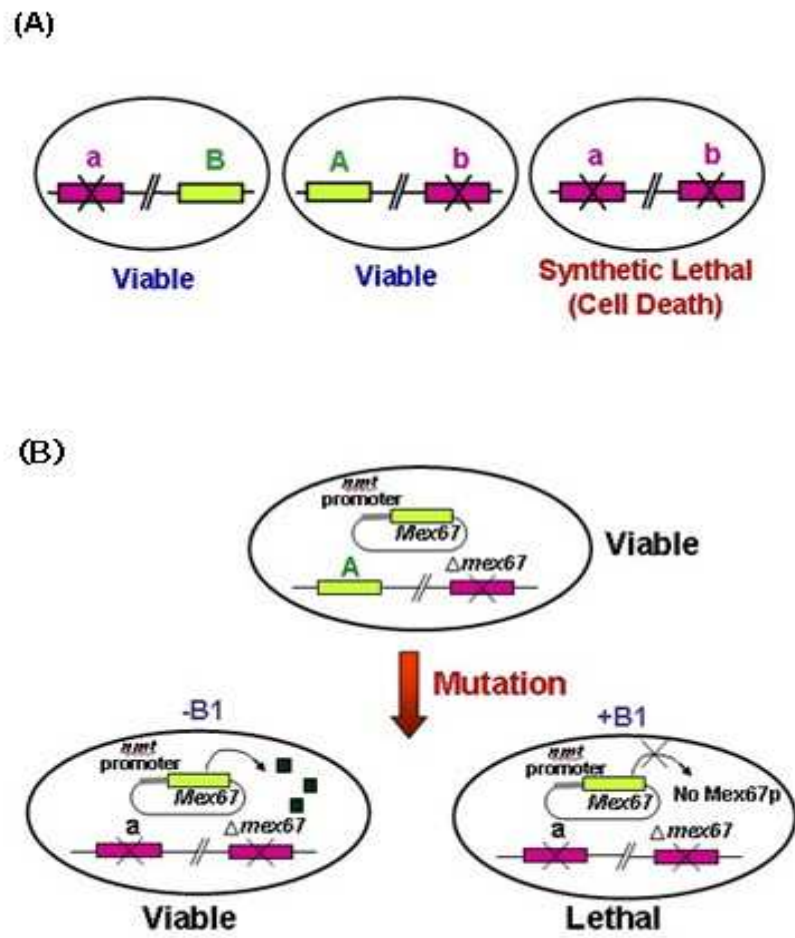


Figure 4. Schematic diagram of synthetic lethality(A) and synthetic lethal screen with *mex67* null allele in *S. pombe*(B).

```

Nic96      -----MLETLRGNKLSHSGTSGKANKKLNELLESSDNLPSASSELGSIQVSIINELRRRV 53
spNic96   -----MTVASDDSPKEARGIPFLDQKSRKLANELLEPCLPFIQFNLGEIQRRAKH 50
Npp106    MESKBAKEKGVNTSDSKGSIESSISDLREKSOHLFGVLLLEPOVFPVIQYGLNQLBEKARN 60

Nic96      PQLRSNKASKDYTKAHYLLANSGLSPEDVDAPFKDLQTNQFLEPNPPKIIIESELELFYIR 113
spNic96   YLNTVPTSKDGNTKAHYLLAGSGINABQWKKIESLS--LQVRPPTTLELSPTDVMPLK 108
Npp106    LESKVLTRDGDTKAHYLLAESGMNABQTRQKIYSIHHSFPWQLELDKKSLYEOPHTKL 120

Nic96      TKKEENILMSIFOLLNGATKDFDNFINHNLNDVAQHKNEVMKNPGILIQDKKTVDHKKS 173
spNic96   YHREKNVLSLSEALVQNTQIAFDQYLEEBEWRSKAAKSRPSEDN---ILLENKKRVSPYPP 165
Npp106    YNGQ-NVVASIENGYQSNVYEPQLRLMKNNNGIAVENTKTEPMEDVVGKLLHRSKDNSGLGTS 179

Nic96      ISS-----LDPKLPSSWGNKGN-----NILNSNESRLNV 201
spNic96   SVQ-----RSQKFASTLKMCL-----BEEALHGFQSKL 193
Npp106    ISMSLRPNLARPLL TASSVKSQSVRLRELVGNSLPIPTGSLTKIDGLNQLSNDLRSQT 239

Nic96      NENNILREKPEYARIVPOENNSRQ-----ANGNPDIANEPTISILSSANGTRNA 250
spNic96   VSSFCEVAREFAHDTKSLLLYESWK-----LLSSVILDKDSVTVFPGNKGIISKA 242
Npp106    TNIPGFAEKASSPAAAHVHKLNEARINQACHVWSLPASVSQMVNTEVIOLEPDVAALAHM 299

Nic96      QLLESW-----KILESMKSDINIVEVGKQYLEQOFLQYTDNLYKEN----MN 294
spNic96   FDIETE-----DGSVNSRFYQR-ISDCSRKPLEAQPFPEVLNKEIAKTPQAALV 289
Npp106    IDETRYGMGDFEARHLALDSSSAALAVEKNCIEGSLKYLENOFLSLIDLHLS DAG---H 355

Nic96      EGLATNVNKKIKSFIDTKLKKADKSVKISNLTVINGVPIWALIFYLLRAGLIKEALQVLV 354
spNic96   GGVPFSIRNKIRAYLNIRLLRNG-VWINPDLEIIODVPIWAFIFYLLRCGFLKEAVDFTEE 348
Npp106    ITTVNSVEKVIAYSKLREYKNG-SWIKSTVSVVNDVPLVWVLPYLMRSGLDAAALQEVNT 414

Nic96      NKANIKKVEQSFITYFKAYASSKDHGLPVEYSTKLHTEYNQHIKSSLDGDPYRLAVYKLI 414
spNic96   NRDLFEKVAEKPPFYINAYAKAPNGILPQLRSOLFSEPNQTI RLOESSDPYKYAVYKII 408
Npp106    YSDDEEKLGSRSEPLYEYSYAKNPSLPLPKQLRDLQAEYGLMKYAPE-DPEKHALYKLL 473

Nic96      GRCDLSRKNI PAVTLSEIDWLWMHMLIIEK-----DAENDPVYERYSLIEDPQNIISY 468
spNic96   GRCDLSKTSKSPSICSVTEDYIWPQLILSRF-----TEKSVSAHEFPSELDVQHILLS 462
Npp106    GNCBPHRVSLPEVCVTSBDMYVIQLMRCRVNQNDVIDSNGGOSTNSLENLYQLEBKIVAE 533

Nic96      GPSRFSN-----YYLQTL LLSGLYGLAIDYTYTFSEMDAVHLAIGLASLKLKIDSSTR 522
spNic96   GSDYPTNNGSNPVMYFLLMLCGLYERAINL YPYFPPTDAVHFAITCAYYGLLRTPAPSS 522
Npp106    GPRYFNPKNNTPTNYELALLMCGEERAISELHTNYPVEATHPAVAMAYYGLLRTKNYEK 593

Nic96      LTKKP-----KRDIFANILANYTKSPRYS DPRVAVEYLVLTITLNEGPTDV 568
spNic96   VVSNEPKIQSMLVETKSGKPSLEPDL LIDYTOTQELSPVMSACYLIPMCKID--KYI 580
Npp106    NENTLIYEAD-----DVKINFPQLIIAYLKHLEYVDAAVYLDYIACIPLVP--AYO 642

Nic96      ELCHBALRELVLBTKEFTVLLGKIGRDGARIPGVIEBROP LHVVRDEKEFLHTITEQAAR 628
spNic96   SMCHKSLCSLVLSTRDYVNLGDIRGDGERTPSPLENHRSLIGLSSVKEYLSKITLTAAR 640
Npp106    ACSINLTKILLQSHBESKFLGDIKFPDTERTTGLLDLYLRLIPEDHDS--LQKYLEGAR 700

Nic96      RADEDGRIYDSILLYQLAEBYDIVITLVNSLLSDTLSAS-----DLDQPLVGPDDNS 680
spNic96   QADDQGLLSDAILLYHLAEDYDAAVTVINRRLGSALLR-----FLDQFVFPD--- 687
Npp106    BADDGDRFGDSIILYHLLGDYDTVIGVAIKNLSQSIVSRGLWSIDSKESKNHHISSNVVA 760

Nic96      ETNPVLLARRMASIYFDNAGISRQIHVKNEICMLLLNISSIRELYFNKQWQBTLSOMEL 740
spNic96   --KLISLTKSMHDVYNRNPSLYAKVDYKNRETTNLLLTVBAFNAYTNEDYEQALSSLQO 745
Npp106    SEAPDALAANL LAMYESNPKKSAKVSATNKKALKVLLKVVVKVOKLYGQEKWDEVLLQIEH 820

Nic96      LDLLPFS-----DELSARKKAQDFSNLDDNIVKNIPNLLIITLSCISNMIH 786
spNic96   LEILPLDPLDSDC-----ETPVVRKLAKERFLNENLLQNVPGIVLIAMNSLKELYA 797
Npp106    LDLLPINEVOAEFEPNEQIPPI SARLRRRAFEPSTEQDEVLSVIPSLMYISMSSIKALYR 880

Nic96      ILNESKY-QSSTKGOQIDSLKNVARQCMYAGMIQYRMPRETYSTLINIDVSL- 838
spNic96   KQKSSSFGND AISVDKLRLYROKARRIVMYSFLIEYRMP SQILEQLNRCEIEMT 851
Npp106    TISKLPVVNEESK-KKLORLQFKGSMVMESTMIRSRLSPOILEYLOABOLITLL 933

```

Figure 5. Multiple sequence alignment of spNic96p with Nic96p and Npp106p using CLUSTAL-W (EBI) program. Identical (Yellow) and similar (Grey) amino acids are indicated.

2. *spNic96* knockout construct 제조 및 분석

① subcloning을 이용한 knockout mutant 제조

spNic96 knockout construct를 제조하기 위하여 *spNic96* 유전자의 ORF부분을 제외한 5', 3' flanking region의 primer를 제작하여 각각을 증폭하였다. Cloning에 사용할 pBluescript SK(+)-*NotI* vector에 있는 *XhoI*, *XbaI* site를 이용하기 위하여 5' PCR products에 *XhoI*, 3' PCR products에는 *XbaI* site를 첨가 하였다. 그리고 *spNic96* 유전자 부분을 대체시킬 selection marker *Ura4*와 *kan^r*을 삽입 시키기 위하여 5' 과 3' 각각에 *NotI* site를 첨가하였다.

5' flanking region은 *Nic1*과 *Nic2* primer를 이용하여 871bp의 fragments를 증폭하였고, 3' flanking region은 *Nic3*과 *Nic5* primer를 이용하여 1014bp의 fragments를 확인하였다. 증폭된 각각의 fragments는 purify한 후 5' 쪽은 *xhoI*과 *NotI*, 3' 쪽은 *XhoI*과 *NotI* 효소로 처리하고, *XhoI*과 *XbaI*으로 처리한 pBluescript SK(+)-*NotI* vector에 cloning하여 각 부분의 fragments가 제대로 끼어 들어간 *pBspNic96* 만 골라 내었다.

spNic96 유전자를 대체시킬 *Ura4*와 *kan^r*을 PCR 방법으로 증폭 시켜 각각 1.7kb, 1.4kb fragments를 확인한 후 *NotI*으로 처리하고, 앞에서 골라낸 *pBspNic96* 역시 *NotI*으로 처리하여 다시 한번 더 cloning하여 최종적으로 *pBspNic96/ura4*, *pBspNic96/kan^r* 을 확인하였다(Fig 6).

이렇게 얻어진 *pBspNic96/ura4*, *pBspNic96/kan^r* plasmid를 *XhoI*과 *XbaI*으로 처리한 다음 fragment만 Diploid strain(SP286) 과 haploid strain(AY217)에 transformation하여 나온 colony들의 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 DNA들은 PCR로 확인하였으며 5' 은 *Nict-kan4F*, *Nict-*

ura4F primer를 이용하여 size를 확인 하였고, 3' 은 kan2R-Nic2t, ura2R-Nic2t primer, construct 전체는 Nict-Nic2t primer를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭하였다. PCR로 *ΔspNic96::kar^r* mutant로 예상되는 2개의 균주를 확인하였다. 이들 mutant를 Southern Blotting을 수행하여 gene disruption을 확인하고자 하였다(Fig 7).

그러나 PCR 로 확인 한 gene knockout mutant 들이 Southern Blotting 수행 결과 wild type 과 동일한 양상을 나타내어 결과적으로 제대로 knockout 이 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다. 재차 위 실험을 반복 하였으나 동일한 결과를 나타내었다. 이는 만들어진 construct 가 *S. pombe* chromosome 상으로 homologous recombination 될 때 문제가 있었기 때문 일 것으로 사료되어 방법을 달리하여 DJ-PCR 을 통한 gene knockout construct 를 제조하였다.

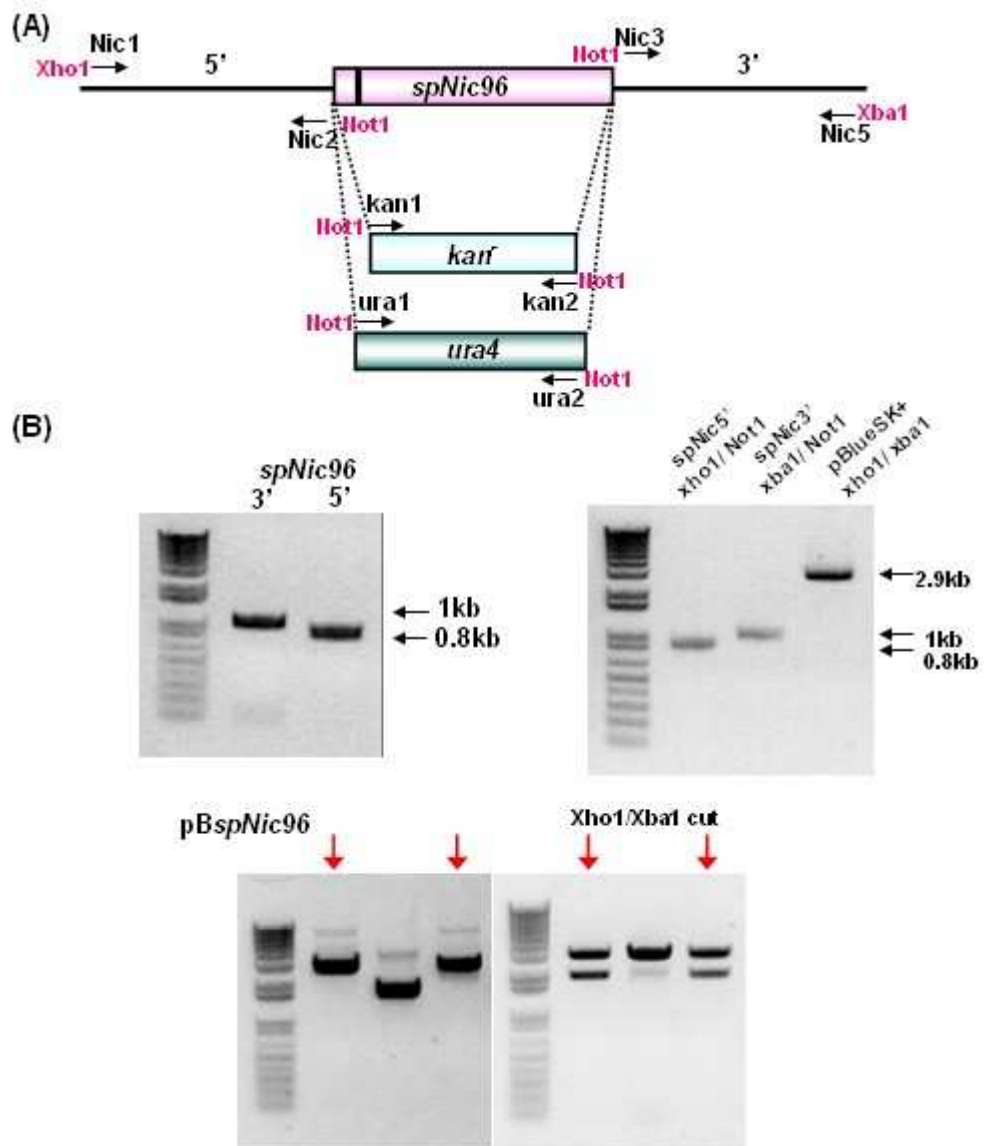


Figure 6. *spNic96* gene deletion by subcloning.

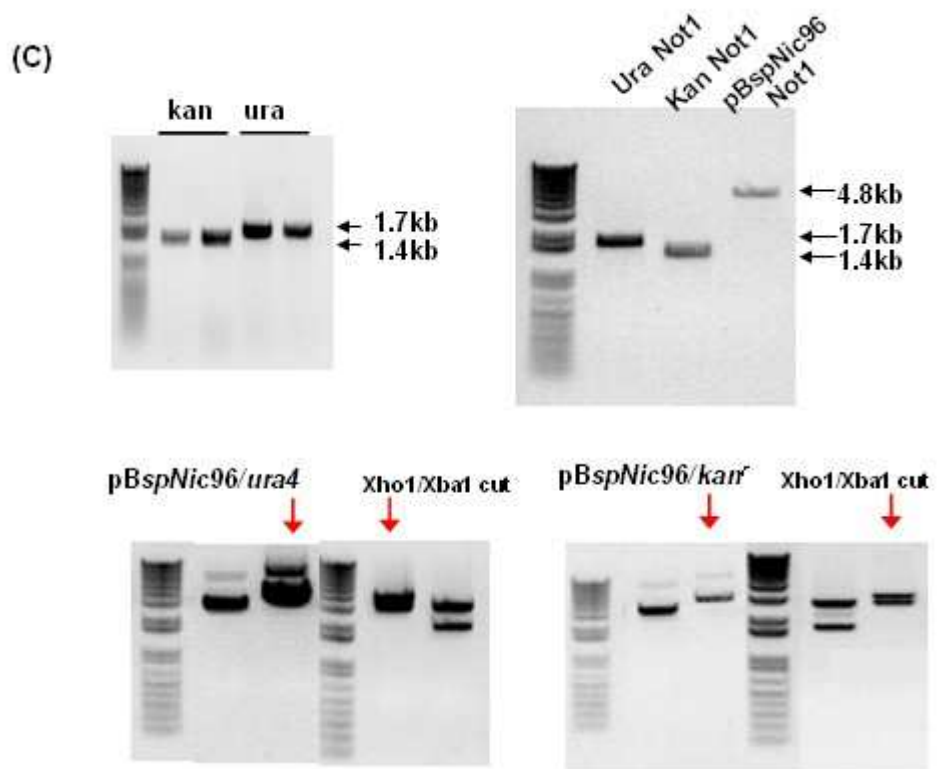


Figure 6. *spNic96* gene deletion by subcloning (continued)

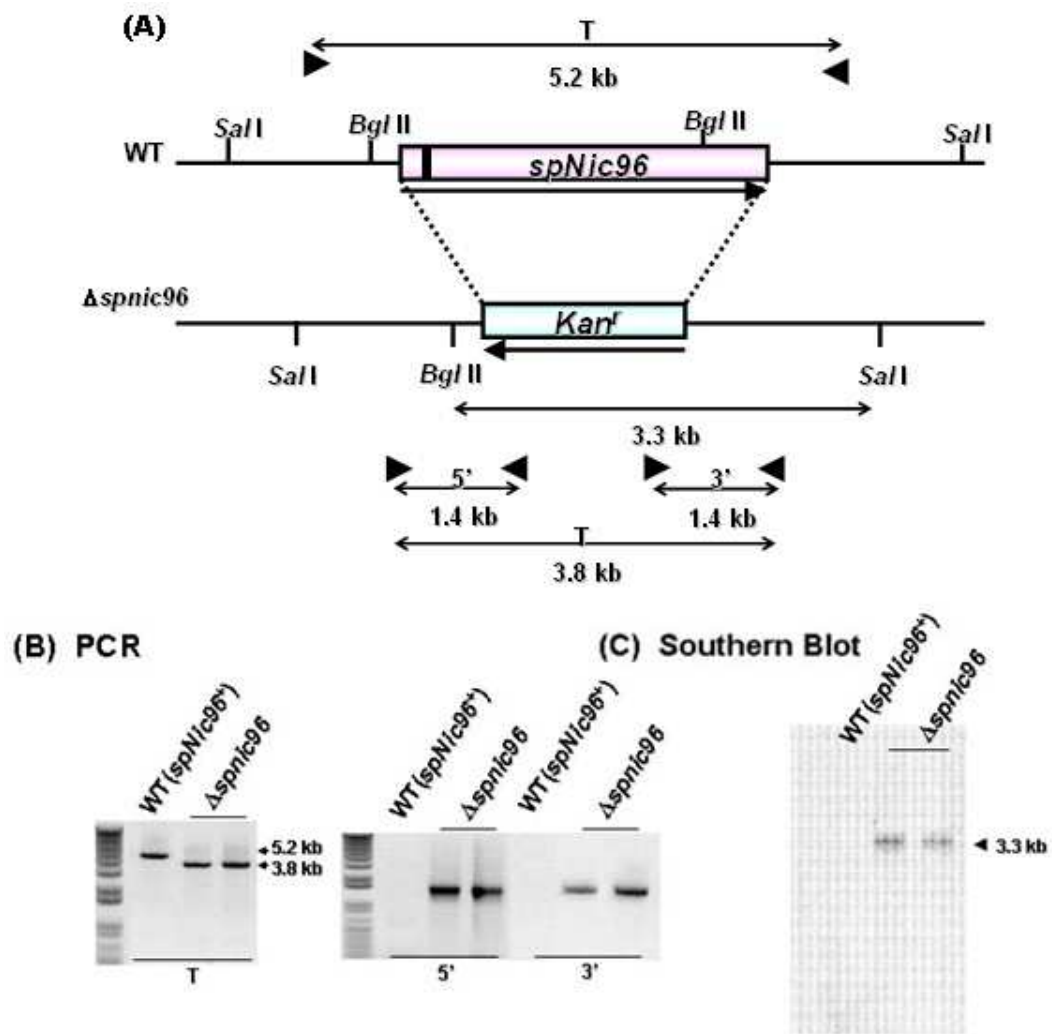


Figure 7. Construction of *spNic96* deletion mutants. Confirmation of *spNic96* gene disruption by PCR(B) and Southern hybridization probed with *kan^r* (C)

② DJ-PCR을 이용한 knockout mutant 제조

Knockout construct를 만들기 위한 또 다른 방법으로 DJ-PCR 방법을 사용하였다. DJ-PCR을 위한 Primer 디자인 시 spNic96 ORF의 3' 쪽을 600bp정도 남겨둔 채 knockout primer를 제작하였다. 이는 앞에서 수행한 subcloning을 이용한 knockout construct 제조 시 spNic96 ORF 전체를 제거 하여 만들어진 construct의 homologous recombination 문제를 해결하기 위함이었다. DJ-PCR primer 제작 시 특이한 점은 5' Rev와 3' For에 marker로 대체될 *Ura4*와 *kan^r* 유전자 일부분을 첨가한다는 것이다. DJ-PCR은 3단계의 PCR을 수행하여 construct를 제조 하는 것으로 First PCR에서는 5' , 3' , marker gene 각 부분을 증폭하여 PCR products를 얻은 후, Second PCR에서는 First PCR products들의 농도를 고려하여 적당한 비율로 섞어서 증폭한 다음 second PCR product를 template로 5' , 3' Nest primer를 이용하여 최종적으로 third PCR을 진행한다.

First PCR 과정에서 5' flanking region은 Nic5For-K5Rev primer, Nic5For-U5Rev primer 각각을 증폭하여 940bp의 PCR products를 확인하였고, 3' flanking region은 Nic3Rev-K3For primer, Nic3Rev-U3For primer를 이용해서 증폭하여 845bp의 PCR products를 확인하였다. Marker gene으로 사용할 *kan^r*과 *ura4*도 K5DJ-K3DJ, U5DJ-U3DJ primer를 이용하여 각각 1383bp와 1727bp의 products를 확인하였다. Second PCR은 5' flanking amplicon : marker gene(*kan^r*/*ura4*) : 3' flanking amplicon 1:3:1의 비율로 섞어서 증폭한 다음 second PCR products를 template로 5' , 3' Nest primer를 이용, 최종적으로 third PCR을 진행하여 3328bp의 *ura4* knockout construct와 2984bp의 *kan^r* knockout construct를 제조하였다 (Fig 8). 이렇게 제조된 knockout construct를 gel elution 하여 purify 한

후 Diploid strain(ED665/668)과 haploid strain(AY217)에 transformation 하여 나온 colony들의 genomic DNA를 분리하였다.

분리한 DNA들은 5' 은 Nict-Kan2R, Nict-Ura2R primer를 3' 은 Kan4F-Nic7, Ura4F-Nic7 primer, construct 전체는 Nic5' nest-Nic3' nest primer를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 확인 결과 deletion mutants $\Delta spNic96::kan^r$ (Diploid), $\Delta spNic96::ura4$ (Diploid) 각각 2개씩의 균주를 확인할 수 있었다(Fig 9).

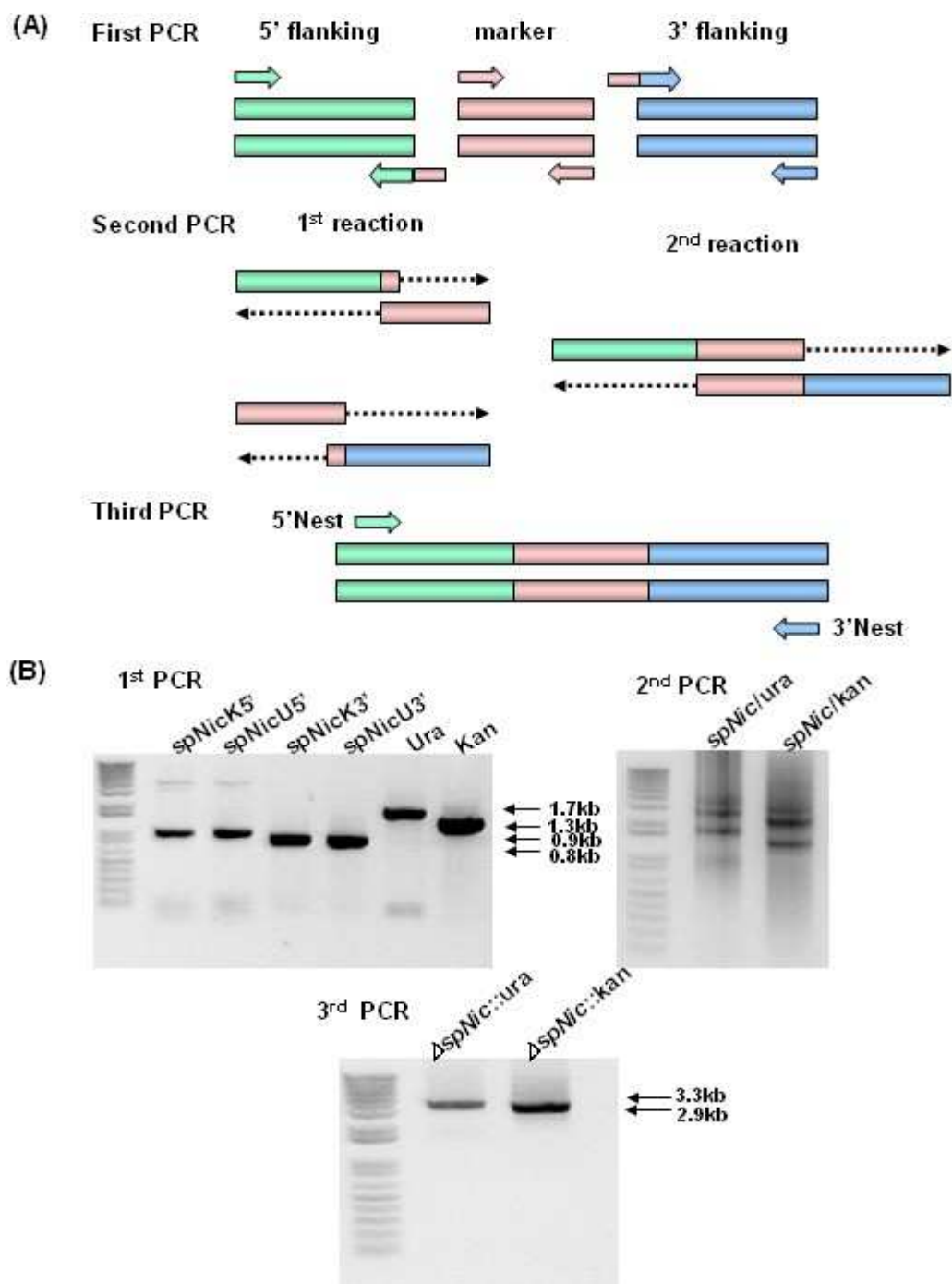


Figure 8. *spNic96* gene deletion by DJ-PCR.

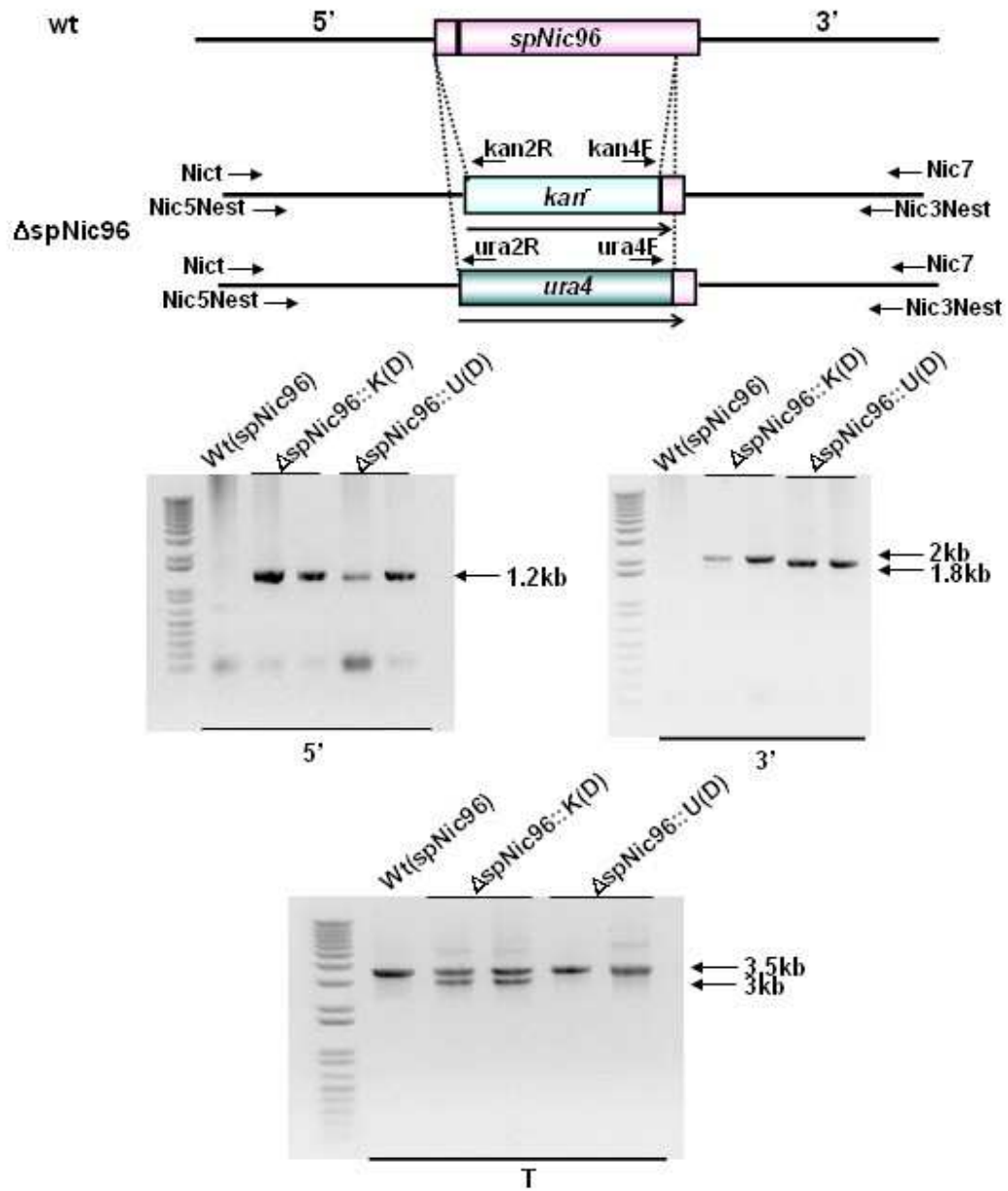


Figure 9. Confirmation of *spNic96* gene disruption by PCR

3. *spNic96*-GFP construct 제조 및 분석

spNic96 단백질의 세포 내 위치를 형광현미경으로 확인하기 위하여 GFP 단백질을 붙인 construct를 제작하였다. *spNic96* 단백질의 N-terminal 부분에 GFP를 붙일 *spNic96-5GFP* primer와 C-terminal 부분에 GFP를 붙일 *spNic96-3GFP* primer를 디자인 하였으며, GFP와 *nmt41* promoter가 integration되어 있는 41uGFP/41u3GFP vector(9.3kb)를 사용하였다. *spNic96-5GFP*는 Nic10-11 primer를, *spNic96-3GFP*는 Nic8-9 primer를 이용하여 각각을 PCR로 증폭, 2.6kb의 PCR products를 확인하였다. 이들을 *Sall*과 *BamHI* 제한효소로 처리하고 41uGFP/41u3GFP vector는 *XhoI*과 *BamHI*으로 처리하여 *spNic96-5GFP/41uGFP*, *spNic96-3GFP/41u3GFP*을 cloning하였다(Fig 10). Cloning하여 제대로 *spNic96*-GFP construct가 삽입된 plasmid를 골라내어 haploid strain(AY217)에 transformation하였다. 실험에 사용된 41uGFP/41u3GFP vector가 *ura4* marker와 thiamine 존재 시 발현이 억제 되는 *nmt* promoter을 가지고 있기 때문에 uracil과 thiamine을 뺀 EMM+L plate에 spreading 하여 27°C에서 3일간 배양한 다음 colony를 형광현미경에서 GFP signal을 관찰하였다. *spNic96-3GFP*가 삽입된 transformant에서만 GFP signal이 cell 전체적으로 diffusion된 양상으로 확인되었다. 이는 *spNic96* 단백질 발현 시 조작되어 붙여진 GFP 단백질로 인해 본래의 구조를 이루지 못하여 나타난 결과로 생각된다.

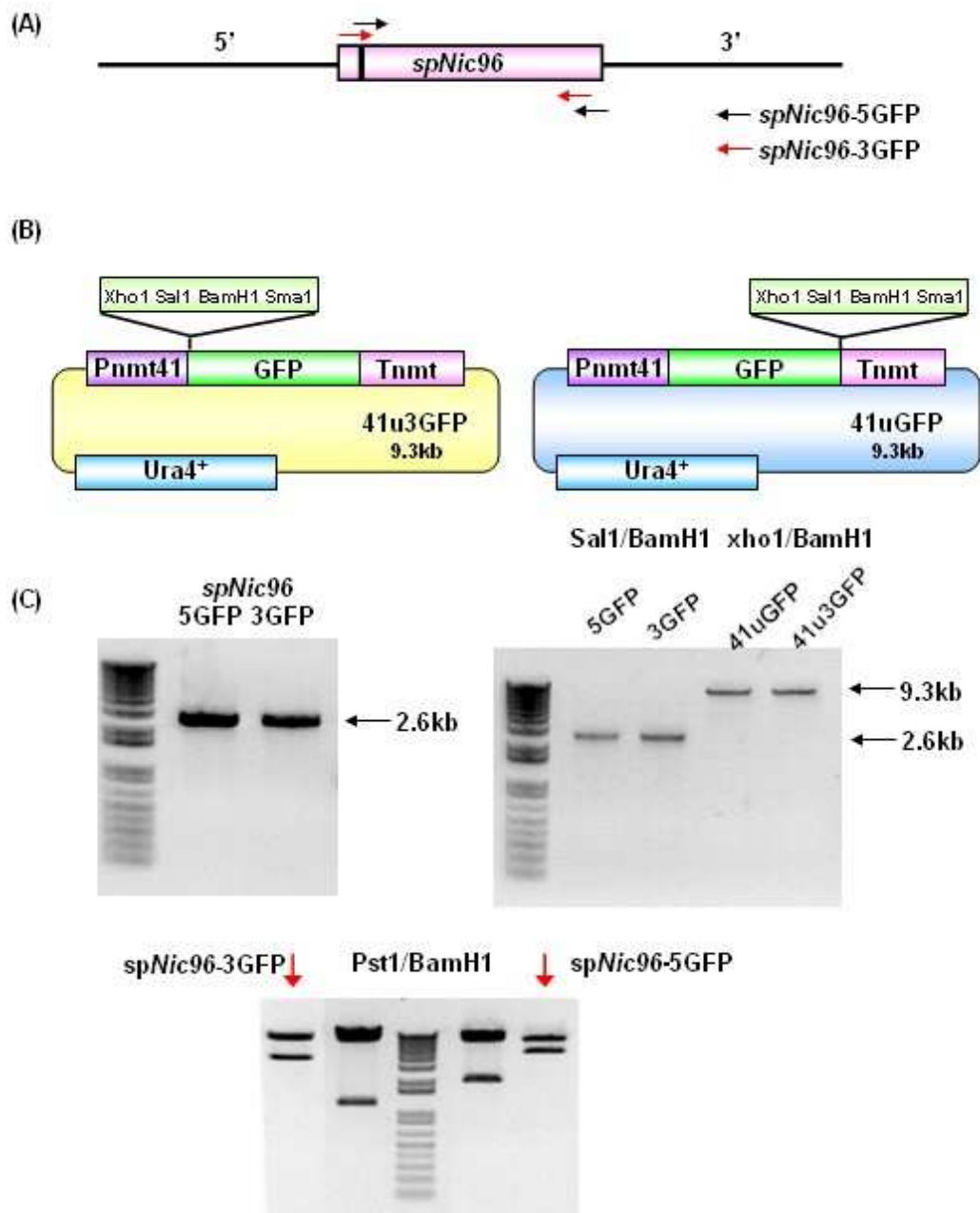


Figure 10. Construction of *spNic96*-GFP

IV. 결론

진핵 생물의 유전자 발현은 핵막에 존재하는 NPC를 통하여 핵에서 세포질로 mRNA export되어야만 완료될 수 있다. 유전정보를 가지고 있는 거대 분자인 mRNPs가 NPC를 통과할 때는 nuclear export factor(NXF)가 중요하게 관여한다. NXF는 하등 진핵 생물인 효모(Mex67)에서부터 사람(TAP)에 이르기까지 진화적으로 보존되어있다. *S. pombe*에서 Mex67p은 생장에 필수적이지 않지만 mRNA export에 관여하고, DNA 염기서열 뿐만 아니라 단백질의 여러 domain들도 기능적으로 TAP과 매우 유사하다 (Yoon et al., 2000). Mex67과 유전적으로 연관이 있는 유전자를 찾기 위하여 Mex67 유전자 전체가 deletion된 균주에서 두 유전자 각각에 mutation이 따로 일어났을 때는 growth에 영향을 미치지 않지만 기능적으로 연관된 두 유전자 모두에 mutation이 생기면 cell이 치사 되는 synthetic lethal mutants를 screen 하였다. Screen으로 골라낸 candidates 중에서 mRNA export에 결함이 있는 3개의 mutants를 선별하여 SLMex1, SLMex2, SLMex3이라 명명 하였다. 이중 SLMex3 mutant의 synthetic lethal 유전자를 클로닝하여 SLMex3 돌연변이 주에 re-transformation하여 complementation하는 2개의 clone들을 분리하였다. 이중 *S. cerevisiae*의 nucleoporin인 Nic96p와homology를 보이는 putative nucleosome complex subunit를 포함하는 9N2 clone을 확인하여 *spNic96*라고 명명하였다.

*spNic96*유전자의 기능을 확인하기 위하여 우선적으로 deletion mutant를 제조를 하였다. Deletion mutant 제조는 2가지 방법을 이용하여 제조 하였으며 첫 번째 방법이 subcloning을 이용한 deletion, 두 번째 방법이 DJ-PCR을 통한 deletion이다. 각각의 방법으로 만들어진 deletion constructs들은 *S. pombe* transformation에 의해 세포 내 *spNic96*유전자의 상동 염기서열이

있는 부위에서 homologous recombination 을 통해 염색체 내로 치환됨으로써 유전자 결손이 일어나게 된다. 이들 deletion constructs가 제대로 *S. pombe*에 삽입되었는지를 확인하기 위해 PCR과 Southern blotting을 수행하여 정확하게 gene disruption된 균주들을 분리해 낼 수 있다.

본 연구에서는 앞으로 분리한 *spNic96* deletion mutants들은 mRNA export와 관련된 중요 유전자(*mex67*, *rae1*, *npp106*, *nup184*)들과 유전학적 연관을 확인하기 위하여 각각의 mutant를 cross 시켜 double mutants를 만든 다음 synthetic lethality를 조사하여 이들 사이의 epistatic 관계를 알아내는 실험이 수행되어야 하며, 또 *spNic96* deletion mutant가 mRNA export에서 어떠한 결함을 보이는지 in situ hybridization을 수행하여 *spNiC96* 유전자의 mRNA export시 기능에 대한 연구가 필요하다.

참고 문헌

- Barbet, N., Muriel, W.J. and Carr, A.M. (1992) Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*, **114**, 59–66.
- Basi, G., Schmid, E. and Maundrell, K. (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene*, **123**, 131–136.
- Blevins, M.B., Smith, A.M., Phillips, E.M. and Powers, M.A. (2003) Complex formation among the RNA export proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. *J Biol Chem*, **278**, 20979–20988.
- Brown, J.A., Bharathi, A., Ghosh, A., Whalen, W., Fitzgerald, E. and Dhar, R. (1995) A mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* rae1 gene causes defects in poly(A)⁺ RNA export and in the cytoskeleton. *J Biol Chem*, **270**, 7411–7419.
- Brune, C., Munchel, S.E., Fischer, N., Podtelejnikov, A.V. and Weis, K. (2005) Yeast poly(A)[–]-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *Rna*, **11**, 517–531.
- Conti, E. and Izaurralde, E. (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 310–319.
- Cullen, B.R. (2003) Nuclear RNA export. *J Cell Sci*, **116**, 587–597.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. and Kataoka, N. (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell*

- Biol*, **3**, 195–205.
- Dunn, E.F., Hammell, C.M., Hodge, C.A. and Cole, C.N. (2005) Yeast poly(A)–binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes Dev*, **19**, 90–103.
- Erkman, J.A. and Kutay, U. (2004) Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp Cell Res*, **296**, 12–20.
- Fischer, T., Strasser, K., Racz, A., Rodriguez–Navarro, S., Oppizzi, M., Ihrig, P., Lechner, J. and Hurt, E. (2002) The mRNA export machinery requires the novel Sac3p–Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *Embo J*, **21**, 5843–5852.
- Forsburg, S.L. (1993) Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2955–2956.
- Forsburg, S.L. (2005) The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit Space Biol Bull*, **18**, 3–9.
- Forsburg, S.L. and Rhind, N. (2006) Basic methods for fission yeast. *Yeast*, **23**, 173–183.
- Fribourg, S., Braun, I.C., Izaurralde, E. and Conti, E. (2001) Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2–like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Mol Cell*, **8**, 645–656.
- Gould, K.L., Ren, L., Feoktistova, A.S., Jennings, J.L. and Link, A.J. (2004) Tandem affinity purification and identification of protein

- complex components. *Methods*, **33**, 239–244.
- Grant, R.P., Neuhaus, D. and Stewart, M. (2003) Structural basis for the interaction between the Tap/NXF1 UBA domain and FG nucleoporins at 1A resolution. *J Mol Biol*, **326**, 849–858.
- Hammell, C.M., Gross, S., Zenklusen, D., Heath, C.V., Stutz, F., Moore, C. and Cole, C.N. (2002) Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. *Mol Cell Biol*, **22**, 6441–6457.
- Herold, A., Klymenko, T. and Izaurralde, E. (2001) NXF1/p15 heterodimers are essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Rna*, **7**, 1768–1780.
- Kang, Y. and Cullen, B.R. (1999) The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev*, **13**, 1126–1139.
- Katahira, J., Strasser, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U. and Hurt, E. (1999) The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *Embo J*, **18**, 2593–2609.
- Kozak, L., Gopal, G., Yoon, J.H., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V., Thakurta, A.G. and Dhar, R. (2002) Elf1p, a member of the ABC class of ATPases, functions as a mRNA export factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **277**, 33580–33589.
- Lei, E.P. and Silver, P.A. (2002) Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell*, **2**, 261–272.
- Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M. and Jensen, T.H. (2002) Interactions between mRNA export commitment, 3'–

- end quality control, and nuclear degradation. *Mol Cell Biol*, **22**, 8254–8266.
- Maniatis, T. and Reed, R. (2002) An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, **416**, 499–506.
- Maundrell, K. (1993) Thiamine–repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, **123**, 127–130.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, **194**, 795–823.
- Pritchard, C.E., Fornerod, M., Kasper, L.H. and van Deursen, J.M. (1999) RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS–like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol*, **145**, 237–254.
- Reed, R. and Hurt, E. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre–mRNA splicing. *Cell*, **108**, 523–531.
- Reichert, V.L., Le Hir, H., Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2002) 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes Dev*, **16**, 2778–2791.
- Rodriguez–Navarro, S., Fischer, T., Luo, M.J., Antunez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Perez–Ortin, J.E., Reed, R. and Hurt, E. (2004) Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore–associated mRNA export machinery. *Cell*, **116**, 75–86.

- Sabri, N. and Visa, N. (2000) The Ct-RAE1 protein interacts with Balbiani ring RNP particles at the nuclear pore. *Rna*, **6**, 1597–1609.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Pante, N. and Hurt, E. (1998) Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol*, **18**, 6826–6838.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R. and Hurt, E. (1997) Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *Embo J*, **16**, 3256–3271.
- Siam, R., Dolan, W.P. and Forsburg, S.L. (2004) Choosing and using *Schizosaccharomyces pombe* plasmids. *Methods*, **33**, 189–198.
- Strasser, K. and Hurt, E. (2001) Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature*, **413**, 648–652.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. and Hurt, E. (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, **417**, 304–308.
- Thakurta, A.G., Gopal, G., Yoon, J.H., Kozak, L. and Dhar, R. (2005) Homolog of BRCA2-interacting Dss1p and Uap56p link Mlo3p and Rae1p for mRNA export in fission yeast. *Embo J*, **24**, 2512–2523.

- Thakurta, A.G., Gopal, G., Yoon, J.H., Saha, T. and Dhar, R. (2004) Conserved nuclear export sequences in *Schizosaccharomyces pombe* Mex67 and human TAP function in mRNA export by direct nuclear pore interactions. *J Biol Chem*, **279**, 17434–17442.
- Thakurta, A.G., Whalen, W.A., Yoon, J.H., Bharathi, A., Kozak, L., Whiteford, C., Love, D.C., Hanover, J.A. and Dhar, R. (2002) Crp79p, like Mex67p, is an auxiliary mRNA export factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **13**, 2571–2584.
- Vinciguerra, P. and Stutz, F. (2004) mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 285–292.
- Weis, K. (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 328–335.
- Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441–451.
- 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.
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.C. and Stutz, F. (2002) Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol*, **22**, 8241–8253.

Abstract

The study on function of *spNic96* gene involved in mRNA export in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

Jung Sun Im

Department of Biology

Graduate School

Sungshin Women's University

In eukaryotes, nuclear export of mRNA occurs through the nuclear pore complex (NPC) embedded in the nuclear envelope, and is mediated by soluble transport factors. One of evolutionally conserved key nuclear export factors is a heterodimer, NXF–NXT. We have used synthetic lethal genetic screen in *Schizosaccharomyces pombe*, in order to identify mutations in genes that are functionally linked to *mex67* (yeast homolog of NXF). Three mutations that are synthetic lethal in combination with the *mex67* null allele were isolated and define in separate complementation groups. We isolated cognate gene by complementation of one synthetic lethal mutant. This gene (we named it as *spNic96*) encodes a predicted 851–amino acid ORF with one intron. *spNic96* is similar to *Saccharomyces cerevisiae* nucleoporin, *Nic96* and *S. pombe npp106*. This gene is not essential for growth.

감사의 글

꿈은 생명보다 소중하다. 생명을 잃음은 육체의 죽음이지만 꿈을 잃음은 내 영혼의 죽음을 의미하기 때문이다. 삶은 꿈의 아름다움을 믿고 내일을 향해 질주하는 자의 것이다.

<7막 7장/홍정욱>

제 꿈을 향하여 이제야 한 발짝 뚫 것 같습니다. 이 자리에 오기까지 많이 부족한 저를 관심과 애정으로 지켜봐 주시고 큰 힘이 되어 주신 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저 저를 이끌어 주시고 언제나 세심한 배려를 베풀어 주신 지도교수님이신 윤진호 교수님께 감사 드립니다. 바쁘신 가운데도 논문 심사를 위해 시간을 내어주시고 많은 조언을 해주신 김종일 교수님과 전용필 교수님께도 감사의 마음 전합니다. 저에게 큰 가르침을 주시고 언제나 관심 어린 애정과 격려 주시는 생물학과 배인하 교수님, 오용자 교수님, 김진일 교수님, 박경숙 교수님, 강혜순 교수님, 전용필 교수님, 김인순 교수님께도 감사 드립니다.

평생 잊을 수 없는 첫 연구실 생활을 같이 한 우리 미생물학 연구실 식구들 너무나 사랑합니다. 대학원 동기인 숙희 언니, 지혜, 지영이. 후배 덕경이, 진아, 현진이. 이들을 생각하면 뭐라 형용할 수 없는 너무나 많은 감정들이 떠오릅니다. 웃고 울며 나눈 많은 얘기들, 서로 힘이 되어 주었던 시간들 너무나 그리울 것 같습니다.

저에게 언제나 든든한 힘이 되어 주신 동물분류학연구실의 정부희 선생님, 아영언니, 태우오빠, 태화오빠, 준구오빠, 인성이, 412호에서의 추억 잊지 못

할 것입니다. 마음 깊이 감사 드립니다. 식물분류학연구실 성민언니, 식물생태학연구실 현정언니, 은강언니, 유전학연구실 재희, 미영언니, 발생학연구실 희경이, 자명이, 근로학생으로 인연을 맺은 윤아와 지영이에게도 고마움을 전합니다. 연구실 생활에 소중한 추억들을 선물해 준 경진언니, 진영언니, 선영언니, 은정언니, 진아언니, 나영이, 진실이. 너무나 그립습니다. 고맙습니다.

내 삶의 한 부분인 나의 소중한 친구들 선아, 진이, 현진이, 미현이, 수민이. 언제나 한결 같은 내 편 순영, 보영, 은진, 진, 선주, 정현, 석규, 보현, 오동, 인테에게 이 기회에 고마운 마음을 전합니다.

짧은 시간이었지만 더 넓은 세계를 배울 수 있도록 아낌없는 조언과 격려를 해주신 한국생명공학연구원 의약유전체연구센터의 허광래 박사님, 김동욱 박사님, 김평일 박사님, 김리라 선생님, 경선언니, 선희언니, 승태오빠, 미영언니, 헤미에게도 감사 드린다는 말씀 전하고 싶습니다.

무엇보다 큰 사랑과 희생으로 지금의 저를 만들어 주신 부모님!! 너무 감사하고 사랑합니다. 세상의 모든 말로 표현해도 부족합니다. 언제나 실망시켜드리지 않는 멋진 큰 딸이 되겠습니다. 그리고 나의 소중한 가족들. 할머니, 할아버지, 외할머니, 외할아버지, 사랑하는 나의 동생들-세리, 고은, 순상. 언제나 화목한 우리 가족이 저에게 큰 힘과 용기를 주고 있습니다. 나의 든든한 지원군 귀남 이모와 이모부, 예인이, 예진이에게도 고마움을 표현합니다.

마지막으로 이 글에 올리지 못했지만 마음 써주시고 도움을 주신 모든 분들께 감사 드립니다.