



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

윤진호 교수지도
석사학위 청구논문

분열효모인 *S. pombe*에서 mRNA
export와 관련된 *spNup97* 유전자의
기능에 대한 연구

2008

성신여자대학교 교육대학원
교육학과 생물교육전공
황 덕 경

분열효모인 *S. pombe*에서 mRNA
export와 관련된 *spNup97* 유전자의
기능에 대한 연구

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2008년 5월

성신여자대학교 교육대학원

교육학과 생물교육전공

황덕경

인 준 서

황덕경의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 윤진호인

심사위원 이승복인

심사위원 김인순인

성신여자대학교 교육대학원

논문 개요

진핵생물에서 핵과 세포질 사이의 거대분자들의 이동은 세포들이 정상적으로 돌아가는데 매우 중요하며, 핵막에 존재하는 유일한 통로인 nuclear pore complex (NPC)를 통해 이루어진다. NPC는 nucleoporin (nup)이라 부르는 30 여종의 단백질로 이루어진 거대 복합체이다. 이들 중 1/3 정도가 degenerate FG (phenylalanine, glycine) repeats를 포함하는 단백질로서, NPC의 중앙통로에 위치하며 transport complex에 docking site를 제공한다. NPC를 통한 이동 기작은 이동할 거대분자들을 선택적으로 인식하는 transport receptor를 필요로 하는 선택적인 능동수송이며, NPC의 역동적인 변화에 의해 조절된다. 단백질이나 다른 RNA의 이동과는 달리, mRNA의 핵에서 세포질로의 이동(export)은 훨씬 복잡한데, 이는 매우 많은 export factors가 mRNA export receptor와 상호작용하여 다이내믹(dynamic)한 구조인 mRNP complex를 형성하며, mRNA 대사과정의 다른 단계(transcription, 5' capping, splicing, 3' end cleavage, polyadenylation)와 긴밀하게 연결되어있기 때문이다.

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 mRNA export에 중요한 역할을 하는 mRNA export receptor인 Mex67과 연관되는 factors를 밝히기 위해 Mex67 null mutant allele와 synthetic lethality를 보이는 SLMex3 돌연변이 균주로부터 *nup97* 유전자를 클로닝하였다. *nup97* 유전자는 851개의 amino acid를 암호화하고 있으며 ORF 부분에 1개의 인트론을 가지고 있다. *nup97p*은 *S.pombe*의 nucleoporin인 *npp106*, *S.cerevisiae*의 nucleoporin인 Nic96, Vertebrate의 nucleoporin인 Nup93과 homology를 보인다. *nup97*은 세포 생장에 필수적이며, 이 유전자의 발현을 억제시키면 핵 안에 poly(A)⁺ RNA가 축적된다. 정상적인 기능을 가진 *nup97*-GFP를 이용하여 세포 내에서 위치를 관찰한 결과, 이 단백질은 NPC에 위치하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 *nup97* 유전자가 nucleoporin을 암호화하고 있으며, mRNA export 관여하는 것을 시사한다.

목 차

논문개요

목차

그림목차

도표목차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험재료	
1) 균주	6
2) Plasmid	6
3) 배지 및 배양조건	6
4) 효소 및 시약	7
5) Primer 및 sequence analysis	7
6) 완충용액 및 반응용액	7
2. 실험방법	
1) 형질전환	17
2) DNA isolation	17
3) <i>nup97</i> knockout	18
4) Southern Blotting	21
5) Random spore analysis	22
6) Construction of plasmid	
① <i>nup97</i> subcloning into pREP series vectors	22
② GFP- <i>nup97</i> plasmid	23
③ Integration vector 제조	24

7) Cracking of <i>E. coli</i>	25
8) <i>In situ</i> hybridization	25

III. 결과

1) SLMex3 돌연변이 균주로부터 <i>mex67</i> 결실돌연변이와 synthetic lethality를 보이는 <i>nup97</i> 유전자의 cloning.....	27
2) <i>nup97</i> 결실돌연변이주 (Knockout mutants) 제조 및 분석.....	31
3) <i>nup97</i> 유전자의 과발현 (overexpression).....	34
4) <i>nup97</i> 유전자의 발현 억제 (repression)와 mRNA export 결합.....	35
5) <i>nup97</i> 단백질 의 세포 내 위치	40

IV. 토의.....	45
-------------	----

참고문헌

영문초록(Abstract)

도 표 목 차

Table 1. Strains used in this study.....	10
Table 2. <i>S.pombe</i> medium composition.....	12
Table 3. <i>E.coli</i> medium composition.....	14
Table 4. PCR primer used in this study.....	15

그림 목 차

Figure 1. <i>spnup97</i> gene deletion by DJ-PCR	20
Figure 2. Cloning of <i>spnup97</i> from SLMex3	29
Figure 3. Multiple sequence alignment of <i>spnup97p</i> with Nic96p and Npp106p	30
Figure 4. Confirmation of <i>spnup97</i> gene disruption	33
Figure 5. Tetrad analysis	34
Figure 6. Growth of wild type and <i>spnup97</i> over expression strain was monitored by spot assay	35
Figure 7. Construction of <i>spnup97</i> deletion mutants	38
Figure 8. Poly(A) ⁺ RNA localization in <i>spnup97</i> mutants	39
Figure 9. Growth of wild type and $\Delta nup97$ strain was monitored by spot assay	39
Figure 10. localization of <i>nup97</i>	42
Figure 11. Construction of <i>nup97</i> -GFP	44

I. 서 론

진핵세포는 원핵세포와 달리 핵막을 가지고 있어 유전자 발현에 있어서 시간적, 공간적으로 분리가 되어있다. 유전정보를 가지고 있는 DNA가 핵 밖으로 직접 나갈 수 없기 때문에 이를 대신하여 mRNA에 유전정보를 전사(transcription)하고 mRNA가 핵 밖을 나가 세포질에서 유전정보를 해독(translation) 한다. 이렇게 유전자가 발현 되기 위해서는 핵과 세포질 사이의 끊임없는 물질교환(Nucleocytoplasmic Trafficking)이 일어 나야 한다. 그러기 위해서는 핵막에 존재하는 nuclear pore를 통과 해야 하는데, nuclear pore는 거대한 구조로서 yeast에서 40MDa, mammalian cell에서 60MDa에 달한다. 그래서 이러한 구조를 nuclear pore complex (NPC) 라고 한다. NPC는 단백질과 RNA의 핵과 세포질 사이의 이동(Nucleocytoplasmic transport) 시, 중요한 역할을 한다. NPC의 전체 구조는 표면상으로 nuclear basket, central core, cytoplasmic fibril로 나뉘며(Tran and Wentz, 2006), central core는 세포질과 nuclear ring 사이에 8개의 대칭적인 중심 구조를 가지는데 이를 spoke complex 라고 한다(Fahrenkrog and Aebi, 2003).

NPC는 약 30여 종류의 단백질(nucleopore protein)로 이루어져 있으며 이를 구성하고 있는 단백질을 nucleoporins (Nups) 이라 부른다 (Rout and Aitchison, 2001; Vasu and Forbes, 2001). Nucleoporins은 3종류로 이루어져 있는데, 첫 번째로 FG nucleoporin은 Phe-Gly-rich repeat domain으로 활성화된 transport channel을 채우고 있으며, 수용성의 transport receptors의 통과를 매개하여 nucleocytoplasmic transport에 직접적으로 작용한다. (Rexach and Blobel, 1995; Bayliss *et al.*, 2000). 두 번째 종류는 FG-repeat sequence를 제외한 nucleoporin으로 NPC의 구조를 구성하는 단백질이고, 세 번째는 NPC를 nuclear membrane에 고정시켜주는 단백질로 NPC는 구성되어있다.

NPC를 통한 transport에는 nuclear transport receptors(karyopherin, importin- β family)가 필요한데, 이 receptors는 cargo protein의 짧은 peptide signal을 인식할 수 있다. 각각의 signal은 nuclear localization signal (NLS) 또는 nuclear export signal (NES)를 나타낸다(Mattaj and Englmeier, 1998; Görlich and Kutay, 1999; Pemberton *et al.*, 1998). Karyopherin은 export하는 RNA인 RNA cargo들도 인식할 수 있으며 일반적으로 두 가지로 나뉘는데, import cargo를 인식하는 것을 importins, export cargo를 인식하는 것을 exportins 이라고 한다(Köhler and Hurt, 2007).

mRNA export는 다른 RNA(tRNA, snRNA, miRNA)나 단백질의 export와 달리 굉장히 복잡하며, 다른 RNA(tRNA, snRNA, miRNA)와 단백질의 export에 관여하는 karyopherin이나 RanGTP-RanGDP gradient에 직접적으로 의존하지 않는 transport receptor를 이용한다(Reed and Hurt, 2002; Conti and Izaurralde, 2001). 또한 매우 많은 export factors(adaptors, release factors)가 mRNA export receptor와 상호작용하여(Rodriguez *et al.*, 2004; Reed and Cheng, 2005; Huang and Steitz, 2005) 다이내믹(dynamic)한 구조를 이루고 이동하는데 이 구조를 mRNP complex라고 한다.

mRNA export receptor로 yeast에는 Mex67-Mtr2 complex와 metazoan에 TAP-p15(NXF1-NXT1) complex가 있으며, 이 receptor들은 항상 heterodimer 상태로 존재하고, Mex67과 TAP은 homology를 보이지만, Mtr2와 p15는 아미노산 서열에서 homology를 보이지 않는 단지, 유사한 기능을 담당하는 orthology를 보인다. 앞서 설명 한대로 mRNA export receptor는 karyopherin과 구조적으로 연관이 없으며, RanGTP에 의존하지 않지만, FG nucleoporin과 물리적으로 interaction 할 수 있다. 이것은 FG nucleoporin 그물망(meshwork)으로 이루어진 NPC의 centre pore를 통과할 수 있다는 것을 의미한다(Reed and Hurt, 2002; Cole and Scarcelli, 2006; Stutz and Izaurralde, 2003)

mRNA export receptor는 RNA와 직접적으로 결합할 수 있지만, RNA-binding

protein인 adaptor와 함께 작동한다. Yeast에는 Yra1, metazoan에는 ALY/REF adaptor가 존재하는데, mRNA export receptor와 직접적으로 결합할 수 있다(Reed and Hurt, 2002; Stutz and Izaurralde, 2003). 게다가 Yra1와 ALY/REF는 다른 export factor(yeast에는 Sub2, metazoan에는 UAP56)와 물리적으로 interaction 한다(Sträßer and Hurt, 2001; Zenklusen *et al.*, 2002). Sub2와 UAP56은 RNA helicases로 mRNP 발생(biogenesis)에 관여하는 여러 complex와 결합할 수 있는데, 여기에는 TREX(transcription-coupled export complex)와 spliceosome이 포함된다. 이와 같이 Yra1와 ALY/REF는 adaptor로써 upstream에는 RNA binding protein과 downstream에는 mRNA export receptor 사이를 연결하는 다리 역할을 하고 있다.

그리고 mRNP complex를 구성하고 마치 adaptor 기능을 하는 SR protein이 있다. SR protein은 serine(Ser)과 arginine(Arg)이 풍부한 protein으로 splicing에 필수적인 역할을 담당하지만, mRNA export와 안정성, translation을 포함하는 mRNA 대사과정의 다양한 단계에서 조절자와 adaptor로써의 기능도 수행한다(Huang and Steitz, 2005).

TREX complex는 nuclear export에서 mRNA 발생(biogenesis) 단계를 통합한다. Yeast에서 4개의 TREX subunits로 Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2는 하나의 THO subcomplex를 형성하고(Chávez *et al.*, 2000), THO subcomplex는 transcription-dependent recombination과 co-transcriptional mRNP formation의 여러 측면에서 기능을 수행한다 (Jimeno *et al.*, 2002). 2개의 TREX subunits인 Yra1과 Sub2는 export factors로 mRNA export receptor와 물리적인 고리를 형성한다. Yeast에서 TREX는 transcription elongation 하는 동안에 나타나는 전사체(transcripts)를 계속적으로 싼으면서, 초기의 전사체가 mRNP로 folding 될 수 있게 촉진시키며, RNA binding protein을 recruit 할 수 있게 도와준다 (Zenklusen *et al.*, 2002; Sträßer *et al.*, 2002; Abruzzi *et al.*, 2004; Huertas and Aguilera, 2003; Hurt *et al.*, 2004).

이처럼 mRNA export는 splicing이나 transcription을 포함하는 mRNA 대사과정(metabolism)의 여러 다른 단계와 서로 긴밀하게 연관되어있는 것을 알 수 있다. 이 중 mRNA export에 가장 중요한 역할을 하는 mRNA export receptor는 mRNA processing이 끝난 성숙한(mature) mRNP complex를 NPC까지 연결시키고, NPC와의 interaction을 통해 mRNP complex가 통과 하도록 하는 역할을 할 것으로 추측된다(Erkmann and Kutay, 2004).

또한 실질적으로 mRNA 발생의 모든 단계에는 transcription, mRNA processing, export에서 가능한 errors를 탐지할 수 있도록 엄격한 quality control이 관여하고 있다(Fasken and Corbett, 2005). 한 예로 NPC의 구조 중, nuclear basket에 존재하는 Mlp1-Mlp2 system이 quality checkpoint로 준비되어있다. Mlp1-Mlp2 system은 2개의 실 같은 protein이 nuclear face를 향해 붙어있고, unspliced transcripts를 빠져나가지 못하게 막는 역할을 한다(Fasken and Corbett, 2005; Green *et al.*, 2003; Galy *et al.*, 2004; Vinciguerra *et al.*, 2005).

*S. pombe*에서 mRNA export에 가장 중요한 역할을 하는 receptor인 Mex67과 연관이 있는 factor를 찾기 위해 Synthetic lethality를 이용하여 Mex67과 synthetic lethal을 보이는 mutants를 찾아 screening 하였다(Yoon, 2003). 이 중, SLmex3에 *S. pombe* Library DNA를 형질전환 시켜 그 중, +B1 에서 성장한 형질전환체(transformant)를 찾아 plasmid를 분리해 낸 다음, 그것을 다시 SLmex3에 재형질전환(re-transformation)시켜 얻어낸 plasmid를 SLmex3와 complementation 하는지 성장정도(growth)를 체크하여 complementation 하는 sequence 부분을 SPCC. 1620.11이라 하였다. 이 유전자는 하나의 intron과 851 아미노산을 encode 하고 있으며, 또한 이 sequence 부분을 *S.pombe* 의 nucleoporin 인 Npp106, *S.cerevisiae*의 nucleoporin 인 Nic96, Vertebrate의 nucleoporin인 Nup93과의 sequence 를 비교해보니 homology를 보였다. 그래서 이 유전자가 아마도 nucleoporin일 것이라 생각하고 또한 이 유전자에서 만들어지는

단백질의 molecular weight가 97.5kDa이라서 이 유전자의 이름을 *snup97*이라고 명명하였다(Cho *et al.*, 2007).

본 연구에서는 *nup97* 유전자가 결실(deletion)된 돌연변이주(mutant)를 제조하고, *nup97* 유전자가 과발현(over expression) 되었을 때의 형질을 조사하였으며, *in situ* hybridization을 통하여 mRNA export의 결함을 조사하였다. 그리고 *nup97* 단백질의 N말단 또는 C말단에 GFP 단백질을 붙인 constructs를 제조하여 *nup97* 단백질의 세포 내 위치를 조사하고, Endogenous level로 *nup97*-GFP 단백질을 발현시켜 *nup97* 단백질의 세포 내 위치를 정확히 알아보기 위하여 세포 염색체(chromosome)에 위치하는 *nup97* 유전자에 제조한 Integration vector 삽입하여 형광현미경하에서 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

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 pDW232, pDW234, pREP series (3X, 41X, 81X)를 사용하였고, GFP-vector에 DNA를 subcloning하기 위해 pZA69, pZA69U, 41U3GFP, 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) 액체 배지를 사용하였고(Table. 3), 필요 시에는 LA액체 배지 (LB 액체 배지에 ampicillin을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가)를 사용하여 37°C에서 키웠다. 고형 배지는 2% 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 mating을 시키기 위해서는 ME(malt extract : 3% bacto-malt extract)를, 돌연변이주의 분리를 위해서는 PMG(Pombe Glutamate medium) 배지에 G418 (200mg/ ℓ)를 첨가하였다. 필요 시에는

EMM(Edinburgh minimal medium)배지에 15 μ M Thiamin을 첨가하여 사용하였으며, 고형 배지는 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 구입하였다. 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 구입하였으며, In Situ Hybridization을 위한 Fluorescin-Antidig-oxigenin Ab.는 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)에 주문했다. 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 blotting 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* Hybridization 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), oligo 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>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i>	Yoon <i>et al.</i> (2000)
SP 286	<i>b⁺/b⁺ leu1-32/ leu-32 ura4-d18</i> <i>/ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216</i>	Matsumoto and Beach(1991)
SP 286($\Delta nup97$)	<i>b⁺/b⁺ leu1-32/ leu-32 ura4-d18/</i> <i>ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216,</i> <i>$\Delta nup97::kan^r$ or $ura4^+$/ $nup97^+$</i>	This study
$\Delta nup97::kan^r/3X$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::kan^r/pREP3X-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::kan^r/41X$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::kan^r/pREP41X-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::kan^r/81X$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::kan^r/pREP81X-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::kan^r/69$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::kan^r/pZ\Delta 69-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::kan^r/69u$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::kan^r/pZ\Delta 69u-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::kan^r/41u3$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::kan^r/41u3GFP-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::ura4^+/3X$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::ura4^+/pREP3X-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::ura4^+/41X$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::ura4^+/pREP41X-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::ura4^+/81X$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::ura4^+/pREP81X-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::ura4^+/69$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::ura4^+/pZ\Delta 69-nup97$</i>	This study
$\Delta nup97::ura4^+$ $/81EGFP$	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18</i> <i>$\Delta nup97::ura4^+/pREP81EGFP-nup97$</i>	This study
$nup97$ -GFP	<i>b⁻ leu1-32 ura4-d18/nup97-GFP::ura4⁺</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
MmSO ₄ (23.7 mM)	4 g/ℓ
ZnSO ₄ .7H ₂ O (13.9 mM)	4 g/ℓ
FeCl ₂ .6H ₂ O (7.40 mM)	2 g/ℓ
molybdic acid (2.47 mM)	0.4 g/ℓ
KI (6.02 mM)	1 g/ℓ
CuSO ₄ .5H ₂ O (1.60 mM)	0.4 g/ℓ
citric acid (47.6 mM)	10 g/ℓ

Table 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
Nic t	CATTGGCGCGTTATGAGGAC
Nic 2t	CGCTGAACGTAATGAACTTC
Nic96 3T	TGCTCAGTTGTGGAAAGCTG
Nic96 4T	TACTTCAATCATTTTCAGGTG
Nic96-10	CTTGTCGACACGGTTGCGTCTGACGATTC
Nic96-11	ATAGGATCCTCATGTCAITTTCTATTTTCGC
Nic96 14	TCGTCTATTAAGGAACGGTG
Nic96-20	TGCTCAGTTGTGGAAAGCTG
Nic96-21	CTCATGATGCTGAATCAATTC
Nic96-22	CACTAGTCAACAGAGAATTC
Nic96-23	TAGTTTACTACTACTCATCTC
Nic96-24	ACGCGATTCCTACAAGTCTC
Nic96-25	AGGTGTCTAACTAATCTTGA
Nic96-30"	GACTCATATGACGGTTGCGTCTGACGA
Nic96-31"	ATCAGTCGACATGACGGTTGCGTCTGAC
Nic96-32	TACTGGATCCTGTCAITTTCTATTTTCGCAG
Nic96-33	TACTGGATCCTCATGTCAITTTCTATTTTCG
Kan 5DJ	ACCCGGCCAGCGACATGGAG
Kan 3DJ	AGTATCGAATCGACAGCAGT
Ura 5DJ	AGCTACAAATCCCCTGGCT
Ura 3DJ	CATCTAATTTATTTCTGTTCC
Kan-2R	CGCACGTCAAGACTGTCAAGGAG
Kan-4F	GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG
Ura-2R	CACAAATGCATACATATAGCCAG
Ura-4F	TGAATGTAAAATACCATGTAGAC
Nic U3 For-2	GGTGTGGAACAGAATAAATTAGATGAC GCTGCGAAATAGAAATGACATG

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

Primer name	Primer sequence
Nic K3 For-2	CGCTATACTGCTGTCGATTCGATACTACG CTGCGAAATAGAAATGACATG

2. 방법

1) 형질전환 (Transformation)

(1) *S. pombe* 형질전환

*S. pombe*의 형질전환은 Lithium Acetate 방법(Alfa *et al.*, 1993)으로 수행하였다. 야생형 이배체균주인 SP286과 반수체균주인 AY217를 각각 EMM + all 액체배지와 YES 액체배지 10ml에 seed한 뒤 28°C에서 하루 정도 키운 후, fresh EMM + all 액체배지와 YES 액체배지 50ml에서 $5-8 \times 10^6$ cell/ml이 될 때까지 배양하였다. 이들 세포를 harvest 하여 멸균한 TDW로 wash한 후, 1x TE/LiAC로 condition 잡아주고 원심 분리하여 cell만 얻은 다음 $1-2 \times 10^9$ cell/ml의 농도가 되도록 1x TE/LiAC로 resuspension하였다. 이렇게 얻어진 cell 50 μ l와 salmon sperm DNA 2.5 μ l, 형질전환 하고자 하는 DNA 4 μ l을 넣고 잘 섞어 준 후, 50% PEG 150 μ l를 넣고 mix 한 다음 28°C에서 30분간 incubation하였다. 42°C에서 10분간 heat shock을 준 다음 상온에 2분간 방치한 후, 원심 분리하여 50% PEG를 완벽히 제거한다. *ura4+* maker가 형질전환된 cell은 1x TE에 resuspension하여 EMM-U plate에 spreading한 뒤 28°C에서 4일 정도 incubation하고, *kanr* maker가 형질전환된 cell은 EMM+ all 고체배지에 spreading하여 28°C에서 over night 한 후 PMG+G418 고체배지로 replica 떠서 4일 간 28°C incubator에서 배양하였다.

(2) *E. coli* 형질전환

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

2) DNA isolation

*S.pombe*로 형질전환하여 얻은 형질전환체를 각각의 배지에 streaking하여 single colony를 얻은 후, 각각의 selectable marker가 있는 EMM 액체배지 10ml에 seed하여 이틀정도 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 확인하고, 원심분리 하여 상층 액을 제거 하였다. 0.55ml TE, 1% SDS로 cell을 resuspension 한 다음 65°C에서 10분간 처리하였다. 5M potassium acetate 175 μ l를 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 l첨가 한 뒤 vortex로 잘 섞어 준 후 13,000rpm으로 5분간 spin down 시켜 상층액만 따내 새로운 tube로 옮겼다. 한번 더 반복하여 3M sodium acetate 30 μ l와 100% ethanol 750 μ l을 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.

또 다른 DNA isolation 방법으로 위 방법과 동일하게 Zymolase 20T로 1시간 처리한 다음 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit를 사용하여 DNA를 분리 하였다.

3) *nup97* knock-out

(1) DJ- PCR

*nup97*의 기능을 알아보기 위해 deletion(knock-out) construct를 제조하였다. 5', 3' flanking region 각 부분과 *nup97* 유전자의 ORF 부분을 대체 시킬 selectable marker *kan^r/ura4⁺*의 primer를 제작하였고, 5'Rev, 3'For 는 *kan^r/ura4⁺* marker 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(*kan^r/ura4⁺*) 각각을 증폭한 후, 전기영동으로 확인한 다음 QIAGEN PCR clean up kit를 이용하여 purify하였다. First PCR에서 얻어진 product들을 5'flanking amplicon : marker 유전자(*kan^r/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). PCR 후, 전기영동으로 확인한 다음 QIAGEN gel extraction kit를 이용하여 gel elution 하였다.

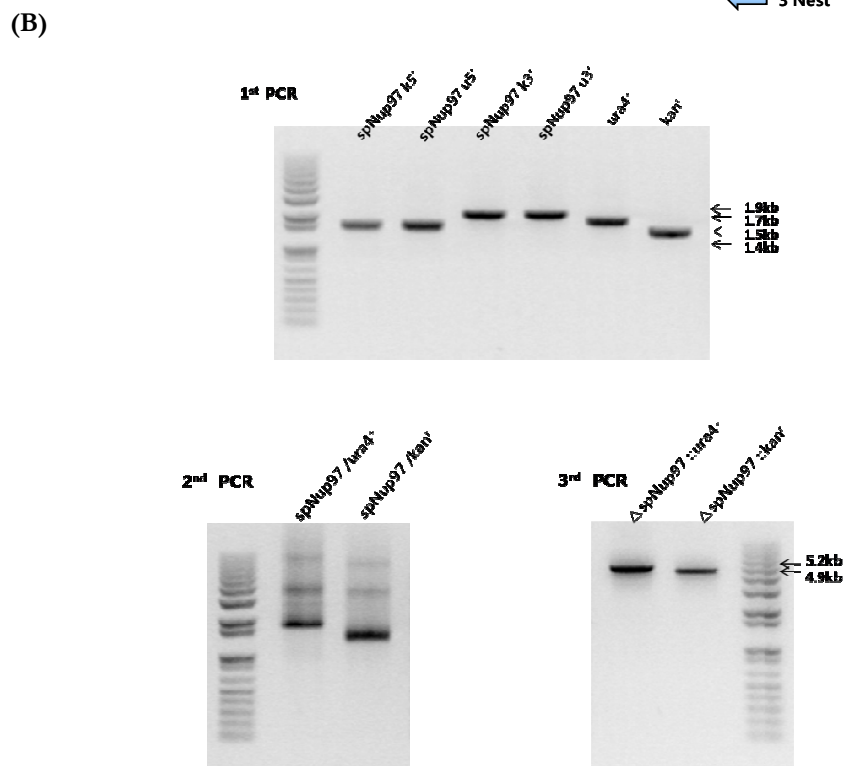
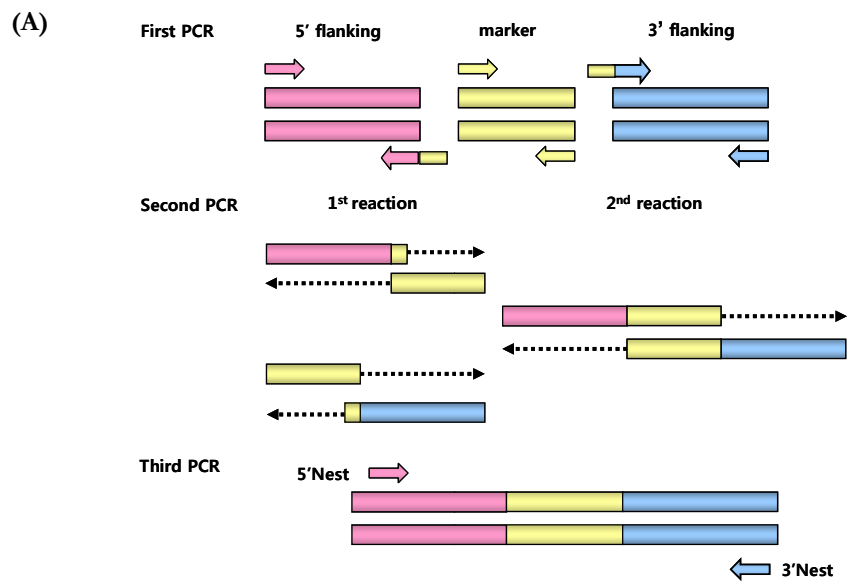


Fig. 1 *spnup97* gene deletion by DJ-PCR

4) Southern Blotting

nup97 유전자가 정확히 disruption되었는지, 혹은 *nup97*-GFP가 야생형 균주 염색체로 정확히 삽입 되었는지 확인하기 위해 Amershams ECL nonisotopic method를 사용하여 Southern blotting을 수행하였다. Genomic DNA의 *nup97* 유전자를 *ura4+* marker로 치환시킨 DNA와 *nup97*-GFP integration vector가 삽입된 DNA는 *EcoR* I 제한 효소로 자르고, *nup97* 유전자가 *kan* marker로 치환된 DNA는 *EcoR* I, *Hind*III 제한 효소로 자른 후, DNA 절편을 size marker와 같이 1 % low EEO agarose gel에 전기영동 하여 분리한 후, depurination 용액에서 15분, denaturation 용액에서 45분, 그리고 neutralization 용액에서 45분간 처리하였다. 이어 gel 상의 DNA 단편들을 reverse transfer 방법으로 20X SSC solution을 이용하여 Hybond-N+ membrane으로 Schleicher and schuell 용기를 사용하여 4시간 동안 transfer 하였다. 그 다음 DNA 단편들을 transfer 시킨 Hybond-N+ membrane을 UV로 cross-link(0.15J/cm²)하여 DNA를 membrane에 고정시켰다.

Prehybridization 은 42 °C에서 1시간 동안 ECL hybridization solution으로 하였고, Probe labeling 은 100ng/ μ l의 probe DNA 2.5 μ l에 TDW 7.5 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°C에서 10분간 incubation 한 다음 Prehybridization한 solution 과 잘 섞어 주고 Hybridization은 42°C에서 16시간 동안 진행하였다. Primary Wash Buffer로 membrane을 wash하고 2X SSC로 다시 wash한 뒤, ECL DNA detection reagent를 이용하여 detection을 수행하였다. 그 다음 chemi-doc에서 Quantity one(Bio-Rad) program을 이용하여 signal을 확인하였다.

5) Random spore analysis

Random spore analysis는 이배체균주(diploid)를 sporulation 시켜 반수체균주(haploid)로 만드는 방법으로, 염색체의 한쪽가닥에 *nup97* 유전자가 결실된 h^+/h^+ 이배체균주 SP286($nup97^+/nup97^-/3X^-, 41X^-, 81X^- nup97$)에 h^- 반수체균주인 AY217를 ME plate에서 멸균된 증류수(TDW)로 섞어 cell을 cross시키고 2~3일간 28°C에서 배양해 cross되어 이배체(h^+/h^-)가 된 세포들이 감수분열 하여 sporulation되게 한다. cell을 1ml의 증류수에 풀어주고 여기에 glusulase를 5~7 μ l 첨가한 후, 6시간 28°C에서 배양하여 형성된 유성포자를 제외한 영양세포를 lysis시킨다. 28°C에서 증류수로 세척한 후, 적당한 수의 spores를 (EMM: 1000 spores/plate, YES: 100 spores/plate) 적정배지에 plating 하였다. 그리하여 3X-, 41X-, 81X- *nup97*를 가지는 *nup97* 유전자가 결실된 반수체 돌연변이를 골라낼 수 있었다.

6) Construction of plasmids

(1) pREP series – *nup97* subcloning

반수체 균주인 AY217에 *nup97* 유전자가 들어있는 vector를 형질전환 하고 염색체의 *nup97* 유전자를 결실시켜 *nup97* 유전자를 inducible marker에 따라 switch 처럼 on/off 할 수 있도록 하기 위해 pREP vectors(3X, 41X, 81X)에 *nup97* 유전자의 ORF(open reading frame)을 subcloning 하였다. pREP vector는 *nmt* 프로모터를 가지고 있으며, 이것은 vitamin B₁ (+B₁)이 존재하면 작동하지 않는 프로모터로, 이 프로모터의 세기는 3X가 가장 강력하고, 41X는 중간 정도이고, 81X는 가장 약한 세기로 작동하는 특징을 가지고 있다.

*nup97*의 ORF 부분을 PCR 하기 위해 pREP-vectors가 가지는 multi-cloning

site에 존재하는 enzyme site를 포함하는 primer를 제작하였다. Nic96-31”(5’ ATCAG**GT**CGACATGACGGTTGCGTCTGAC 3’)에는 *Sa*I site가, Nic96-33(5’ TACT**GGATCC**TCATGTCA**TTT**CTA**TTT**TCG 3’)에는 *Bam*HI site가 포함되어 있으며, *nup97* 유전자까지만 증폭될 수 있게 *Bam*HI site 3’쪽으로 stop codon을 가지고 있다. 이 primer를 가지고 PCR을 수행하면, *nup97* 유전자의 5’, 3’ flanking region에 각각 *Sa*I, *Bam*HI site를 가지게 된다. insert 부분이 되는 *nup97*은 *Sa*I/ *Bam*HI 제한 효소로 자르고, pREP-vectors는 *Xho*I/ *Bam*HI 제한 효소로 잘랐다. 여기서 *Xho*I 과 *Sa*I은 효소 site가 달라도 ligation 되는 특징이 있지만 다시 *Xho*I 이나 *Sa*I 제한 효소로 잘리진 않는다. Insert : vector를 10 : 1로 하여 ligation하였고, 이것을 *E. coli*에 형질전환 하여 나온 콜로니(colony)는 cracking을 수행하여 확인하였다.

(2) GFP – *nup97* plasmid

nup97 유전자가 발현 되어 만든 단백질의 세포 내 위치를 추적하기 위하여 GFP(Green Fluorescence Protein)를 포함하고 있는 vectors와 subcloning 하였다. Vector의 multi-cloning site에 존재하는 enzyme site를 포함하는 primer를 제작하였다. Nic10(5’ CTT**GT**CGACACGGTTGCGTCTGACGATTC 3’)은 *Sa*I site를, Nic11(5’ ATAG**GGATCC**TCATGTCA**TTT**CTA**TTT**TCGC 3’)은 *Bam*HI site를 포함하고 있으며 *nup97* 유전자까지만 증폭될 수 있게 *Bam*HI site 3’쪽으로 stop codon을 가지고 있다. Nic96-30”(5’ GACT**CA**TAT**GT**ACGGTTGCGTCTGACGA 3’)은 *Nde*I site, Nic96-31”(5’ ATCAG**GT**CGACATGACGGTTGCGTCTGAC 3’)은 *Sa*I site를 포함하며, Nic96-32(5’ TACT**GGATCC**TCATGTCA**TTT**CTA**TTT**TCGCAG 3’)와, Nic96-33(5’ TACT**GGATCC**TCATGTCA**TTT**CTA**TTT**TCG 3’)은 *Bam*HI site를 포함한다. 또한 Nic96-33은 *Bam*HI site 3’쪽으로 stop codon을 포함한다.

GFP vector로는 pZA69, pZA69U, 41U3GFP, pREP81-EGFPc를 사용하였으며, 위의 primer를 가지고 pZA69로 subcloning 시킬 insert는 Nic10/ Nic11로, pZA69는

Nic96-31”/ Nic96-33으로 PCR을 수행하였으며, *nup97*의 5’쪽으로 GFP가 붙기 때문에 stop codon을 가진 primer를 사용하였다. 41U3GFP는 Nic96-31”/ Nic96-32로, pREP81-EGFPc는 Nic96-30”/ Nic96-32를 가지고 PCR을 수행하였는데, 41U3GFP와 pREP81-EGFPc는 *nup97*의 3’으로 GFP sequence가 들어가기 때문에 stop codon을 가지고 있지 않은 primer를 사용하였다. PCR로 증폭한 insert 부분을 각각 포함하고 있는 제한효소로 자르고 pZA69, pZA69U, 41U3GFP는 *SaI*/ *Bam*HI 제한 효소로, pREP81-EGFPc는 *Nde*I/ *Bam*HI 제한 효소로 잘라 insert : vector를 10 : 1로 하여 ligation을 수행하였다. 이것을 *E. coli*에 형질전환 하여 나온 콜로니(colony)를 cracking 하여 골라내었으며, 골라낸 constructs는 miniprep을 통하여 vector를 분리한 뒤, 확인용 제한효소로 잘라 확인하였다.

(3) Integration vector 제조

Endogenous level로 *nup97*-GFP 단백질을 발현시켜 *nup97* 단백질의 세포 내 위치를 정확히 알아보기 위하여, *nup97*-GFP 유전자를 염색체의 자신의 위치로 삽입하여 세포 하나당 *nup97* 유전자가 하나만 발현 되는 Integration vector를 제조 하였다. 앞에서 만든 *nup97* 유전자를 subcloning한 GFP vectors 중, *nup97*-pREP81EGFPc vector를 이용하였다. *nup97*-pREP81EGFPc vector를 insert로 하여 *Xba*I/*Sac*I 제한 효소로 잘랐는데, 여기에는 *nmt* 프로모터의 stop codon도 포함된다. 이것은 앞에서 설명한대로 한 세포당 하나의 *nup97* 유전자가 발현하도록 하기 위해서 design한 것이다. *Xba*I/*Sac*I 제한효소로 자른 insert를 QIAGEN gel extraction kit를 이용하여 gel elution 하였다.

vector로는 *ura4*⁺ marker를 가지고 있는 pDW234를 이용하여 *Sa*I / *Sac*I 제한 효소로 잘라주었다. 이것을 insert : vector를 10 : 1로 넣어주어 ligation 하였고, *E. coli*에 형질전환 시켜 나온 콜로니를 cracking 하여 골라내었다. 골라낸 constructs는 miniprep을 통하여 vector를 분리한 뒤, 원래 염색체의 *nup97* 유전자

사이로 삽입될 수 있도록 *Bgl*II 제한효소로 자른 후, 야생형 반수체 균주인 AY 217에 형질전환 시켜 selectable marker를 가진 배지에서 골라내었다.

7) Cracking into *E.coli*

Cracking은 subcloning한 plasmid constructs를 *E. coli*에 형질전환 시켜 나온 형질전환체 중, insert가 들어간 콜로니(colony)를 빨리 screen하는 방법이다. 우선 *E. coli* 형질전환을 통해 나온 single colony를 LA plate에 patch하여 하루 키운 후, 2x loading dye 15 μ l에 이쑤시개로 colony를 따서 잘 풀어준다. 2x cracking buffer (0.2M NaOH, 0.5% SDS, 20% sucrose) 15 μ l를 넣고 12,000rpm 에서 5분 원심분리 해준다. 원심분리 한 것을 전기영동 하여 확인하였다. 이 때, 대조군(control)으로 self-ligation 된 형질전환체도 같이 걸어준다. self-ligation 된 형질전환체보다 insert가 들어간 형질전환체의 크기가 더 큰 것을 이용하여 원하는 형질전환체를 골라내었다.

8) *In situ* Hybridization

50 ml의 배지에 2-4 x 10⁶ cell/ml되게 키워 30% formaldehyde를 6ml 첨가하여 45분간 fixing하고, 0.3 M glycine 용액으로 washing 한 후, spheroplast buffer 에 1 x 10⁷ cell/ml되게 풀어주어 37°C에서 1시간 배양하였다. poly-lysine으로 coating된 slides에 SCE(sorbitol, citrate-phosphate, EDTA)로 풀어 준 cells을 놓아 4°C에서 2시간 방치하고, -20°C methanol에 slides을 2시간 이상 넣어두었다. methanol을 완전히 말린 후, 2x SSC로 washing하고 10 μ l의 hybridization solution을 첨가하여 coverglass를 덮어 37°C에서 over-night 하였다. 2x SSC로 상온에서 5분, 다시 상온에서 20분간 washing하고 37°C에서 2x SSC로 20분간 2번씩 washing한 후

Fluorescein-Antidigoxigenin Antibody solution을 $10\mu\text{l}$ 첨가하여 coverglass를 덮어 37°C 에서 1시간 배양하였다. $2\times$ SSC로 상온에서 15분간 2번씩 washing하여 air dry 한 후, DAPI mounting medium을 $12\mu\text{l}$ 첨가하여 coverglass를 덮고 sealing 하였다. 이를 형광현미경을 통해 signal을 관찰하였다.

III. 결 과

1. SLMex3 돌연변이 균주로부터 *mex67* 결실돌연변이와 synthetic lethality를 보이는 *nup97* 유전자의 클로닝

mRNA export receptor를 암호화하는 *mex67* 유전자와 유전적으로 연관이 있는 factors를 찾기 위해 synthetic lethal screen 방법을 사용하였다. Synthetic lethality란, 각각의 유전자에 따로 돌연변이가 생기면 생존하지만 두 유전자에 동시에 돌연변이가 생기면 세포가 죽는 것을 의미하며, 어떤 유전자와 연관되어 있는 또 다른 유전자를 찾을 수 있는 실험 방법이다. mRNA export receptor인 *mex67*과 synthetic lethality를 보이는 돌연변이를 선별하기 위해, *nmt* 프로모터를 가지고 있는 vector에 *mex67*의 ORF를 subcloning하였다. 여기서 *nmt* 프로모터란, no message thiamine의 약자로 vitamin B₁ (+B₁)이 존재하면 발현이 억제되는 프로모터를 말한다. 이렇게 제작된 plasmid를 *mex67* null allele에 형질전환시켜 얻은 형질전환체 (transformants)는 EMM-B₁ 과 EMM+B₁ 배지에 키움으로써 *mex67* 유전자의 발현을 switch 처럼 on/off 할 수 있게 해주었다. 이 균주를 돌연변이원으로 처리한 후, +B₁ 배지에서 *mex67* 유전자의 발현이 억제되었을 때, synthetic lethality를 보이는 3개의 돌연변이를 선별하였다 (Fig 2A). 이렇게 얻은 돌연변이 균주들을 *mex67*과 synthetic lethality를 보인다고 하여 SLMex1, SLMex2, SLMex3 이라고 명명하였다 (Yoon, 2003).

이 중, SLMex3에 *S. pombe* Library DNA를 형질전환시켜 +B₁ 배지에서도 성장하는 형질전환체를 찾아 plasmids를 분리해 낸 다음, 그것을 다시 SLMex3에 재형질전환 (re-transformation)시켜 +B₁ 배지에서의 성장결함을 complementation하는 것을 확인하였다. 이렇게 얻은 plasmid (9N2)를 DNA sequencing하여 *S. pombe*의 genome data와 비교한 결과, 이 plasmid의 insert에는

4개의 ORF가 존재함을 알았다. 각각의 ORF들을 다시 subcloning하여 SLmex3를 complementation하는 유전자가 최종적으로 SPCC1620.11이라는 것을 알았다(Fig. 2B). SPCC1620.11 유전자가 암호화하는 단백질은 *S.pombe*의 nucleoporin인 Npp106p, *S.cerevisiae*의 nucleoporin인 Nic96p, Vertebrate의 nucleoporin인 Nup93p과 homology를 보였다 (Fig. 3). 또한 이 단백질의 예상되는 분자량이 97.5kDa이어서 이 유전자의 이름을 *nup97*이라고 명명하였다 (Cho *et al.*, 2007).

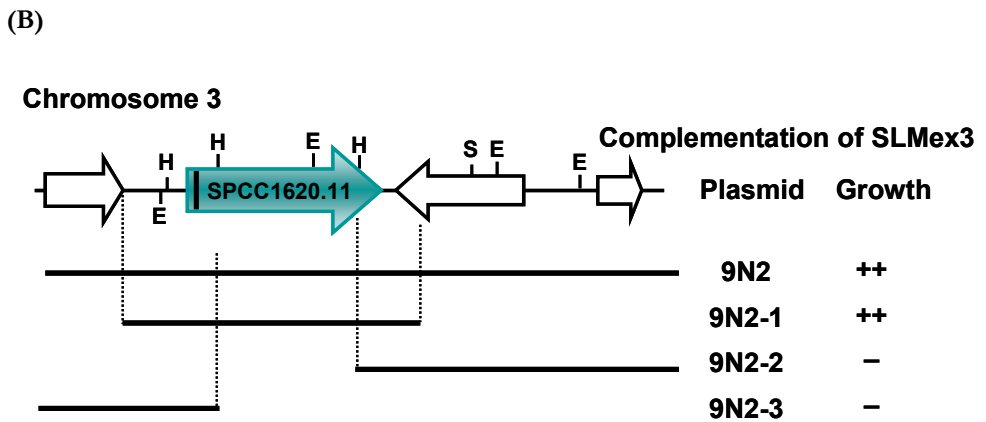
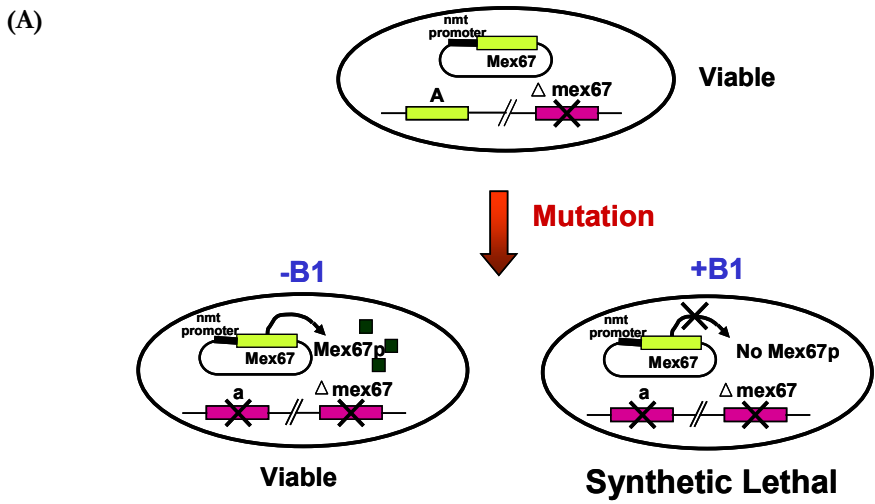


Fig. 2 Cloning of *nup97* from SLMex3

(A) Screen of Synthetic lethal mutants with $\Delta mex67$ in *Schizosaccharomyces pombe*.

(B) Isolation of cognate gene of SLMex3 (Cho, *et al.*, 2007).

```

scNic96 -----MLETLRGNKLSHSGTSKGANKKLNELLESSDNLPSASSELESGIQVSIINELRRRV 53
spNup97 -----MTVASDDSPKEARGIPFLDQKSRKLANELLEPLPEIQPNLGEIEORAKH 50
spNpp106 MESKEAKEKGVNTSDSKGSQIESISDLRREKSOHLPGVLLPEQVPVVIQYGLNQLBEKARN 60

scNic96 PQLRSNRKASKDYTKAHYLLANSGLSPEDVDATIKDLQTNQFLEPNPFKIESEBLEFYIR 113
spNup97 YLNTVPTSKDGNTKAHYLLAGSGINABOTVKKIESLS--LQVRPPTLLELSPTDVMFLK 108
spNpp106 LESKVLTRDGDTKAHYLLAESGMNABOTROKIYSIHHSVPDQLELDKKSLEYEQPHTKL 120

scNic96 TKKEENILMSIEBOLLNGATKDFDNFINHNLNLDWACHKNEVMKNPFGILIQDKKTVDHKKS 173
spNup97 YHRKENVLNSLEALVQNTQIAFDQYLEEVEVRSKAAKSRPSEDN---LLENKKRVSFYFP 165
spNpp106 YNGQ-NVVASIENGYQSNVVEPQLRLMKNNNGIAVENTKTBEMEDVGGKLLHSKDNSQLGTS 179

scNic96 ISS-----LDPKLPSSWGNKGN-----NILNSNESRLNV 201
spNup97 SVQ-----RSOKPASTLKMCL-----EBEALHGFQSKL 193
spNpp106 ISMSLRPNLARPLLTAASSVKSSQSVRSLREVGSNLPIPTGSLTKIDGLNNQSNDLTRSQT 239

scNic96 NENNILREKPENYARIYVQFNNSRQ-----ANGNPDIANEFISILSSANGTRNA 250
spNup97 VSSPCEVAREFAHDTKSLLLYESWK-----LSSVILDKDSVTVPGNKGIISKA 242
spNpp106 TNIFGPAEKASSFAAAVHKLNEARIRNQACHVVSPLPASVSOHYNTEVYIQLEDAVSSLAHM 299

scNic96 QLLESV-----KILESMKSKDINIVEVGGKOYLEQOFLQYTDNLYKKN----MN 294
spNup97 FDIETE-----DGSVNSRPYQR-ISDCSRKFLBAQFPPEVLNKEIAKTPQAAV 289
spNpp106 IDETRYGMGDFEARHLALDSSSAALAVEKNCIEGSLKYLENQFLSLIDLHLS DAG----H 355

scNic96 EGLATNVNKKIKSEIDTKLKKADKSVKISNLTVINGVPIWALIPYLLRAGLIKEALQVLVE 354
spNup97 GGVPFSIRNKIRAYLNIRLLRNG-VWINPDLEIQDVPWAPIFYLLRCGFLKEAVDETEE 348
spNpp106 ITTVNSVEKVIAYSKLREYKNG-SWIKSTVSVVNDVPLVWVLYLVRSGQLDAALQEVNT 414

scNic96 NKANIKKVEQSFLTYPKAYASKDHGLPVEYSTKLHTEYNGHIKSSLDGDPYRLAVYKLI 414
spNup97 NRDLPEKVABKPPFYINAYAKAPNGILPRLRSQLPSEFNQIRLOESSDPYKAYVYKII 408
spNpp106 YSDDEPKLGRSEPLRYEYSYAKNPSLPLPKQLRDRLOAEYGGQLMKYAPE-DPFKHAIVKLL 473

scNic96 GRCDLRSRKNIPAVTLSIEDWLVHMLMLIKEK-----DAENDPVYERYSLDFQNIISY 468
spNup97 GRCDLRSKTSKSPSICSVTEYIYVQQLLSREF-----TEKSVSAHEFPFSLQEDVQHILLSY 462
spNpp106 GNCBPHRVSLPEYCVTSEDMYVIQLMFCRVNQNQDVIDSNGQSTNSLENLYQLEKKIVAR 533

scNic96 GPSRFSN-----YYLQTLLLSGLYGLAIDYTYTFSEMDAVHLAIGLASLKLKFKIDSSTR 522
spNup97 GSDYPTNNGSNPVMYFLLMLCGLYERAINELYPPPTDAVHFAITCAYYGLLRTPAPSS 522
spNpp106 GPRYPNPKNNTPTNYELALLMCGEERAISELHTNYPVEATHEFAVAMAYYGLLRTRKNYEK 593

scNic96 LTKKP-----KRDIRFANILANYTKSPRYSDFRVAVEYLVLIITLNEGPTDV 568
spNup97 VVSNEPGKIQSMVLVETKSGKPSLEFRDLLIDYTQTCQELSPVMSACYLIPMKID--KYI 580
spNpp106 NENILYIYEA-----DVKINFPQLIIAYLKHLEBYVDAAVYLDYIACIPLVP--AYQ 642

scNic96 ELGHEALRELVLBTKEFTVLGKIGRDGARIPGVIEERQPLLHVRDEKEFLHTITEBOAAR 628
spNup97 SMGHKSLCSLVLSTRDYVNLGDIRGDERTPSPLENHRSLIGLSSVKEYLSKITLTAAR 640
spNpp106 ACSINLTKILLQSHRESKFLGDIKPDTERITGLLDLYLRLIFPDHDS--LOKLYLEGAR 700

scNic96 RADEDGRYDSEILLYQLABEYDIVITEVNSLSDTLESAS-----DLDQPLVGPDDNS 680
spNup97 QADDQGLSDAIIYHLAEDYDAAVTVINRRLGSALLR-----FLDQVFPDP--- 687
spNpp106 EADDDGRFGDSIIILYHLGDYDTVIGYAIKNLSSQIYSRGLWSIDSKESKNMHISSNVVA 760

scNic96 ETNPVLLARRMASIYFDNAGISRQIHVKNEICMLLLNISSIRELYPNKQVQETLSOMEL 740
spNup97 --KLISLTKSMMDVYNRNPSLYAKVDYKNRETTNLLLVTAEPNAYTNKDYBOALSSLQQ 745
spNpp106 SEAFDALAANELAMYESNPKKSAKVSATNKKALKVLLKVVVKOKLYGQEKVDEVLQLIEH 820

scNic96 LDLLPFS-----DELSARKKAQDFSNLDDNIVKNIPNLLIITLSCISINMIH 786
spNup97 LEILPLDPLDSDC-----ETPVVRKLAKBERFLNENLQNVPGIVLIAMNSLKELYA 797
spNpp106 LDLLPINEVQAEPPEPNEQIPPISARLRRRAPEFSTFQDEVLVSVIPSLMYISMSIKALYR 880

scNic96 ILNESKY-OSSTKGGQIDSLKKNVARQCHIYAGHIQYRNFRBTYSTLINIDVSL- 838
spNup97 KOKSSSPGNDASIVDKLRLYROKARRIVMYSFLIEYRMPSSQILEQLNRCIEIEMT 851
spNpp106 TISKLPVYNEESK-KKQLRLQPKGSMLYMPSTMIERSLSPQILEYLOAEQLTLL 933

```

Fig. 3 Multiple sequence alignment of *spnup97p* with Nic96p and Npp106p using CLUSTAL-W(EBI) program. Identical (Yellow) and similar (Grey) amino acids are indicated (Cho, *et al.*, 2007).

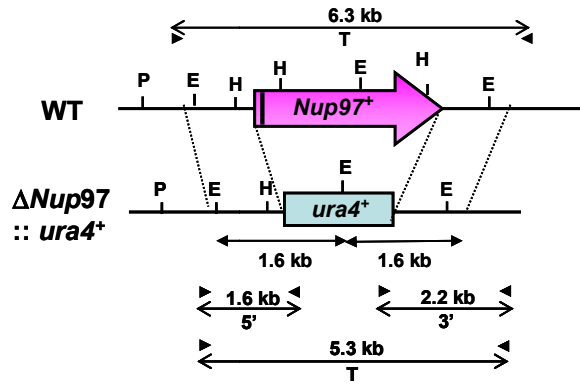
2. *nup97* 결실돌연변이주(knock-out mutants) 제조 및 분석

nup97 유전자의 기능을 알아보기 위해, 안정적인 h^+/h^+ 이배체 (diploid) 균주인 SP286에 one-step gene disruption 방법을 사용하여 *nup97*의 암호화 부위(open reading frame, ORF)를 selectable marker 유전자로 치환하였다. Selectable marker 유전자로써 항진균제인 G418에 내성을 보이는 *kan^r* 유전자와 uracil 생합성에 관여하는 *ura4⁺* 유전자를 사용하였다(Fig. 4A, B). 먼저 ‘방법’에 기술한대로 *nup97* 유전자의 5'과 3' flanking 부위를 각각 *ura4⁺* 또는 *kan^r* 유전자의 5'과 3'에 붙여, *nup97*의 ORF가 *ura4⁺* 와 *kan^r*로 각각 치환된 DNA 절편을 DJ-PCR로 제작하였다 (Fig. 1). 이 DNA 절편을 이배체 균주인 SP286에 형질전환하여 G418을 넣거나, uracil을 뺀 배지에서 형질전환체를 얻었다. 형질전환체에서 DNA를 순수분리하여 하나의 *nup97* 유전자만 marker 유전자로 치환된 균주를 PCR로 확인하였다. *kan^r*과 *ura4⁺* 유전자 부위의 Primer로 PCR을 수행하면, *nup97* ORF가 *ura4⁺*와 *kan^r*로 치환된 것은 5' 부위에서 1.6kb의 DNA가 증폭되고, 3' 부위에서 각각 2.2 kb (*ura4⁺*의 경우)와 2.3kb (*kan^r*의 경우)의 DNA가 증폭되지만, *nup97* 유전자에서는 5'과 3'이 증폭되지 않는다. 전체부위를 PCR로 증폭하면 야생형은 6.3kb가 증폭되지만 *ura4⁺*로 치환된 것은 5.3kb, *kan^r*로 치환된 것은 5kb의 DNA 절편이 증폭된다 (Fig. 4C).

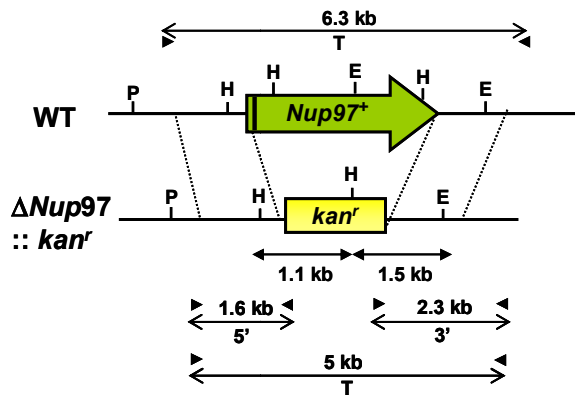
위에서 얻은 이배체 균주인 SP286 (*nup97⁺/Δnup97::ura4⁺*)은 mating type이 h^+/h^+ 로 유성포자를 형성하지 않는다. 하지만 낮은 빈도(10^{-3})로 포자형성을 할 수 있는 h^+/h^{90} 로 자발적으로 전환된다. h^+/h^{90} 이배체를 iodine 증기를 이용하여 선별한 다음 tetrad analysis를 수행하였다. 하나의 이배체 세포는 감수분열을 통해 4개의 반수체 포자 (tetrad)를 형성한다. 10개의 tetrad를 미세조작기로 각각 분리하여 YES 배지에서 배양한 결과, 하나의 자낭에 있는 4개의 포자 중, 2개만 콜로니 (colony)를 형성하고 2개의 포자는 콜로니를 형성하지 못하는 2 : 2

양상을 보였다 (Fig. 5). 콜로니를 형성하지 못하는 포자는 발아하지 못하거나 매우 긴 비정상적인 2~4세포 수준에서 성장이 멈추었다. 콜로니를 형성하는 포자들은 모두 uracil이 없는 배지에서 자라지 못하는 것으로 보아 정상인 *nup97* 유전자를 가진 반수체임을 알 수 있었다. *nup97* 유전자가 *ura4+*로 치환된 결실돌연변이는 생장을 하지 못하므로, *nup97* 유전자는 생장에 필수적인 유전자임을 의미한다.

(A)



(B)



(C)

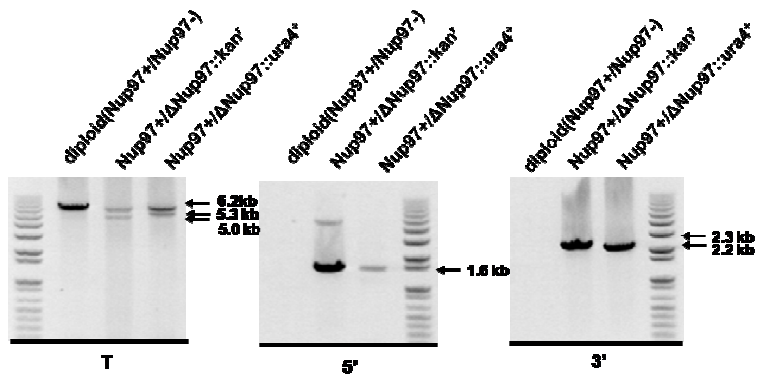


Fig. 4 Construction of *spnup97* deletion mutants.

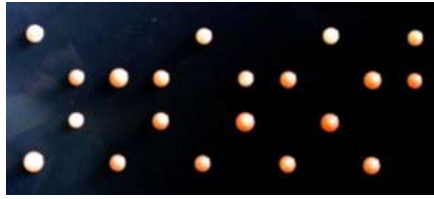


Fig. 5 Tetrad analysis (Cho, *et al.*, 2007)

3. *nup97* 유전자의 과발현 (over expression)

nup97 유전자가 결실된 (deletion)된 균주는 성장하지 못하므로, 반대로 *nup97* 유전자가 과발현되면 (over expression), 성장에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 이를 위해 *nmt1* 프로모터를 가진 pREP-vectors (pREP3X, pREP41X, pREP81X)에 *nup97*의 ORF를 subcloning 하였다. pREP3X는 가장 강력한 야생형의 *nmt1* 프로모터를 가지고 있으며, pREP41X와 pREP81X는 *nmt1* 프로모터의 TATA box에 돌연변이를 일으켜 프로모터의 세기가 pREP3X에 비해 pREP41X는 중간 정도이고 pREP81X는 가장 약하다. 하지만 이 vectors는 모두 비타민 B₁ (Thiamine)에 의해 발현이 억제된다. 제작된 plasmids (pREP3X-*nup97*, pREP41X-*nup97*, pREP81X-*nup97*)를 야생형 반수체 균주인 AY 217 형질전환하였다. 형질전환체 (*nup97*⁺/3X⁻, 41X⁻, 또는 81X-*nup97*)를 비타민 B₁이 없는 배지 (-B₁)에서 키워 염색체(chromosome)의 *nup97*⁺ 유전자 이외에 추가로 plasmids에서 *nup97*를 과발현 (over expression)시켜 성장 정도를 spot assay로 확인하였다 (Fig. 6). 대조군 (control)은 AY 217에 빈 pREP3X와 pREP81X를 형질전환시킨 균주를 사용하였다. *nup97*의 발현을 억제하는 +B₁ 배지에서와 마찬가지로 -B₁ 배지에서 *nup97*⁺ 유전자가 과발현 되었을 때도 대조군과 비슷하게 성장에 영향이 없었다.

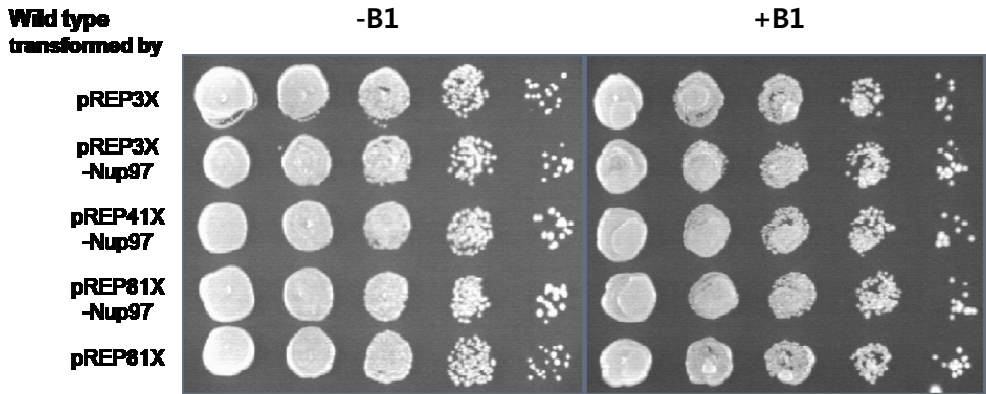


Fig. 6 Growth of *nup97* over expression strain was monitored by spot assay

4. *nup97* 유전자의 발현 억제 (repression)와 mRNA export 결함

nup97 유전자는 생장에 필수적이므로, *nup97* 유전자의 발현을 억제했을 경우 어떤 기능에 결함을 보이는지 알아보려고 하였다. *S. pombe*에서 *nup97* 유전자가 결실 (deletion)된 균주는 성장하지 못하므로, 앞서 언급한 *nmt* 프로모터를 사용하여 *nup97* 유전자의 발현을 조절할 수 있는 반수체 균주를 제작하였다. 이를 위해 하나의 *nup97* 유전자 좌위 (locus)만 *ura4+* marker 유전자로 치환되어 생장이 가능한 이배체 균주인 SP286 (*nup97+/nup97::ura4+*)을 이용하여 *nup97* 유전자가 결실된 반수체 균주를 제작하였다. 먼저 SP286 (*nup97+/nup97::ura4+*)에 앞서 제작한 plasmids (3X-*nup97*, 41X-*nup97*, 81X-*nup97*)를 형질전환시켰다. 그리고 h⁺/h⁹⁰로 전환된 이배체를 선별하여 random spore analysis를 통해 *nup97*이 결실된 반수체 (Δ *nup97::ura4+* /3X-, 41X-, 또는 81X-*nup97*)를 골라내었다. 이를 위해 uracil과 leucine이 없는 배지에서 포자를 발아시켰는데, 이유는 Plasmids는 selectable

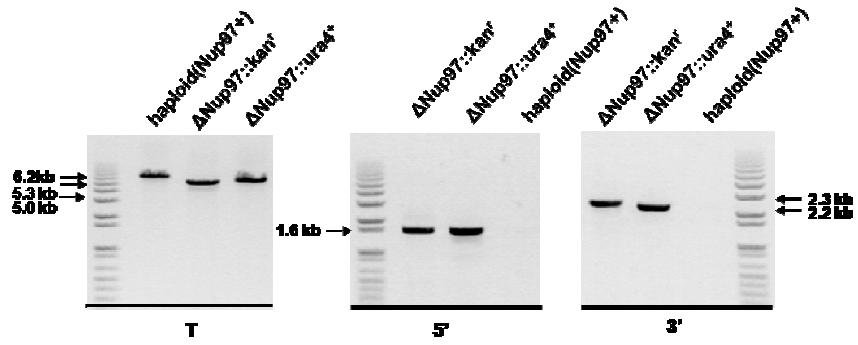
marker로 *LEU2* 유전자를 가지고 있고 *nup97*은 *ura4+* 유전자를 이용하여 결실 (*nup97::ura4+*)되어 있기 때문이다. 또 다른 방법으로 반수체 균주인 AY 217에 plasmids를 형질전환 시킨 후, 염색체의 *nup97* 유전자를 결실시켰다. 이렇게 얻은 반수체 균주는 염색체의 *nup97+* 유전자가 결실되어 있지만, *nmt* 프로모터에 발현이 조절되는 plasmids의 *nup97+* 유전자가 있으므로 -B1 배지에서 성장할 수 있다. 이렇게 염색체의 *nup97* 유전자가 결실된 것을 PCR (Fig. 4A, B and Fig. 7A)과 Southern hybridization을 수행하여 확인하였다 (Fig. 7B). *ura4+* 유전자로 치환된 균주의 DNA는 *EcoRI* 제한 효소로 자르고, *kan^r* 유전자로 치환된 균주의 DNA는 *EcoRI*, *HindIII* 제한 효소로 자른 후, probe로 *ura4+*와 *kan^r* 유전자를 사용하여 blotting을 수행한 결과, *ura4+*으로 *nup97+* 유전자가 결실된 균주의 DNA에서는 1.6kb 크기의 signal을 확인 할 수 있었고, *kan^r*으로 결실된 균주의 DNA는 1.5kb와 1.1kb 크기의 signal을 확인 할 수 있었다 (Fig 7B).

이렇게 선별된 균주 ($\Delta nup97::ura4+$ /3X-, 41X-, 또는 81X-*nup97*)에서 *nup97* 유전자가 발현이 억제되면 세포생장에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 spot assay를 수행하였다. 대조군으로는 *nup97* 유전자가 결실되지 않은 AY217 (*nup97+*/3X- 또는 81X-*nup97*) 균주를 사용하였다. +B1 배지에서 *nup97* 유전자의 발현이 억제되면 생장이 억제되고 -B1 배지에서는 *nup97* 유전자의 발현되어 정상적으로 성장하였다 (Fig. 9). 이러한 결과는 plasmids가 정상적으로 작동하고 있음을 의미하며, 다시 한번 *nup97* 유전자가 생장에 필수적이라는 것을 보여준다.

nup97 유전자가 *S. pombe*에서 mRNA export에 관여하는지 알아보기 위하여 위에서 골라낸 *nup97* 유전자가 결실된 균주 ($\Delta nup97::kan^r$ /3X-, 41X-, 또는 81X-*nup97*)를 이용하여 in situ hybridization을 수행하여 poly(A)⁺ RNA의 세포 내 분포를 알아보았다. -B1 배지에서 키운 세포들을 -B1과 +B1로 분주한 후, 18 시간을 더 키워 mRNA 분포가 어떻게 달라지는지를 조사하였다. 그 결과, -B1 배

지에서 *nup97*가 발현되면 야생형 균주와 마찬가지로 poly(A)⁺ RNA가 세포 전체에 고루 퍼져있었다 (Fig. 8). 반면, +B1 배지에서 *nup97*의 발현이 억제되면 poly(A)⁺ RNA 농도가 핵 안에는 높아지고 세포질에는 감소하였다. 이것은 mRNA export에 결함이 있음을 의미한다. 핵 안에 축적(accumulation)되는 정도는 pREP81X-*nup97*을 가진 균주가 가장 심하고, pREP41X-*nup97*과 pREP3X-*nup97*을 가진 균주일수록 약해졌다. 이것은 +B1 배지에서 *nup97*의 발현이 억제되더라도 pREP3X의 *nmt* 프로모터가 가장 강력하여 basal level의 발현이 높기 때문일 것으로 사료된다. 또 한가지 흥미로운 점은 3X-*nup97* plasmid를 가지는 결실균주 ($\Delta nup97::kan^r/3X-nup97$)는 -B1과 +B1에서, 41X-, 81X-*nup97* plasmid를 가지는 결실균주 ($\Delta nup97::kan^r/41X-$ 또는 81X-*nup97*)는 각각 +B1에서 세포 상태가 elongation되거나 부푼 형태를 나타내거나, 세포분열이 되지 않는 등의 비정상적인 세포형태를 관찰 할 수 있었으며, DAPI 염색에서 정상형태가 아닌 비뚤어진 비정상적인 형태가 관찰되었다. 위 사실을 종합해 보면, *nup97*은 *S. pombe*에서 mRNA export에 관여할 뿐 아니라, 핵막을 구성하는 NPC 구조에도 관여할 가능성이 있는 것으로 사료된다. 그리고 mRNA export의 결함으로 인하여 단백질의 합성에도 영향을 주어 세포가 비정상적인 형태를 보이고 성장에도 영향을 미치는 것으로 보여진다.

(A) PCR



(B) Southern Blot

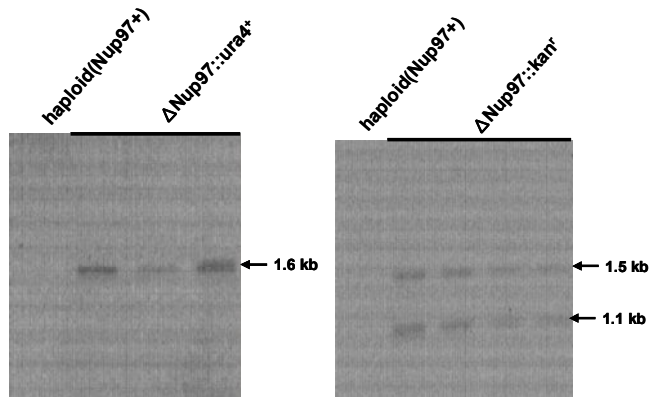


Fig. 7 Construction of *spnup97* deletion mutants.

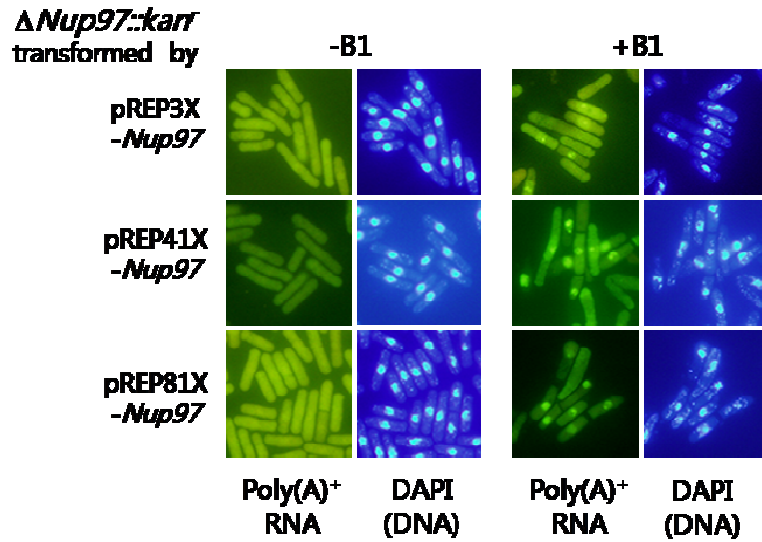


Fig. 8 Poly(A)⁺ RNA localization in *nup97* knockout mutants ($\Delta nup97::kan^r$) transformed with pREP3x-, pREP41x-, pREP81x-*nup97* in the absence and the presence of thiamine

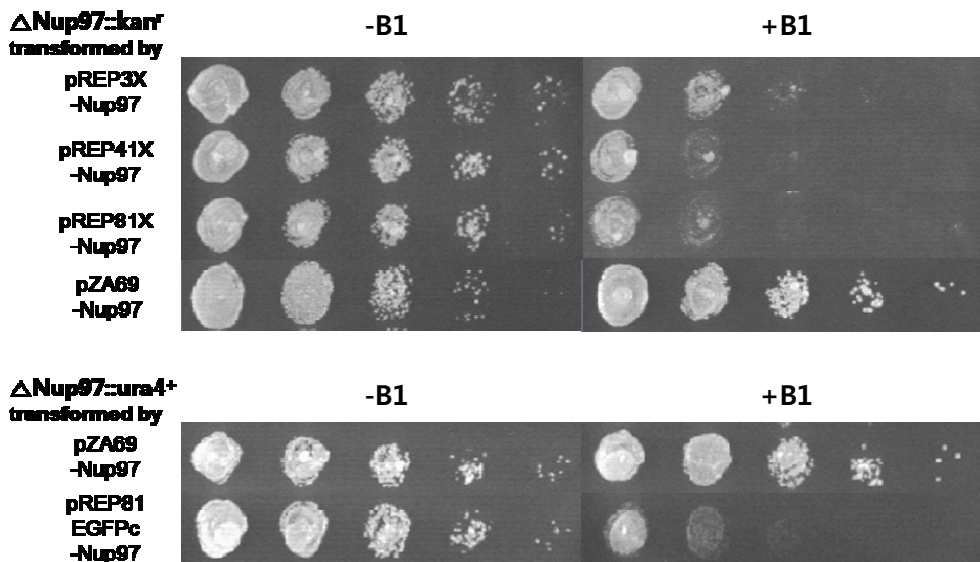


Fig. 9 Growth of wild type and $\Delta nup97$ strain was monitored by spot assay

5. *nup97* 단백질 의 세포 내 위치

nup97 유전자가 암호화하는 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위하여 GFP(Green Fluorescence Protein)를 이용하였다. GFP는 말 그대로 녹색 형광을 띄는 단백질로 형광현미경으로 관찰이 가능하기 때문에 *nup97* 단백질의 위치를 쉽게 관찰할 수 있다. 그래서 *nup97* ORF의 5' 혹은 3'에 GFP가 위치하도록 GFP construct를 제조한 다음에 야생형 균주 (AY 217과 SP 286)에 형질전환시켜 형광현미경으로 관찰하였다. Subcloning에 사용한 vector인 pZA69, pZA69u, 41u3GFP는 *nup97*의 N 말단에, pREP81-EGFPc는 C 말단에 GFP가 위치한다. 이 vector들은 모두 *nmt* 프로모터를 가지고 있으며, 프로모터의 세기는 pZA69와 pZA69u가 가장 강하고, 41u3GFP는 중간 정도이고, pREP81-EGFPc는 가장 약한 프로모터를 가지고 있다. 그리하여 비타민 B1의 유무의 따라 발현 정도를 다르게 하였다. 과발현되면 GFP-*nup97*은 세포 전체에 분포하지만, 발현이 조금되면 핵 막 주위에 점점이 관찰되었다 (Fig. 10A, B). 이것은 NPC를 구성하고 있는 nucleoporin 단백질의 전형적인 분포 모양이다.

또한, GFP-*nup97* plasmids를 가진 결실균주 ($\Delta nup97::kan^r/pZA69-nup97$, pZA69-*nup97*, 또는 pREP81EGFPc-*nup97*)을 제작하여 GFP-*nup97* 단백질이 정상적인 기능을 수행하는지를 보았다. spot assay를 수행한 결과, -B1 배지에서는 정상적으로 성장하였다 (Fig. 9). 이 결과는 plasmids에서 발현된 GFP-*nup97* 단백질이 정상적으로 기능을 한다는 것을 의미한다. +B1 배지에서는 *nmt* 프로모터의 세기대로, pZA69-*nup97* plasmid를 가진 결실균주는 성장하는 것을 관찰할 수 있었지만, pREP81EGFPc-*nup97* plasmid를 가진 결실균주는 프로모터 세기가 약하므로 거의 성장을 하지 못하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9).

Endogenous level로 *nup97*-GFP 단백질을 발현시켜 *nup97* 단백질의 세포 내 위치를 정확히 알아보기 위하여, *nup97*-GFP 유전자를 염색체의 *nup97* 유전자

신의 위치로 삽입시켰다 (Fig. 11). *nup97-GFP*가 *nup97* 유전자의 정확한 위치에 삽입되었는지 알아보기 위하여 골라낸 형질전환체의 DNA로 Southern hybridization을 수행하였다. *nup97-GFP* 균주의 DNA를 분리하여 *EcoRI* 제한효소로 자른 뒤, *ura4+*와 *nup97*를 probe로 blotting하였다. 대조균인 야생형 균주 AY217은 *ura4+*를 probe로 사용하면 signal이 나오지 않았고, *nup97* probe인 경우 2kb를 확인할 수 있었다. *nup97-GFP* 균주는 *ura4+* probe인 경우 6kb, *nup97* probe인 경우 각각 2kb, 3.6kb, 6kb를 확인할 수 있었다 (Fig. 11). 이 균주는 정상적으로 성장하였으며, *nup97-GFP*는 핵 막 주위에 선명하게 점점이 관찰되었다 (Fig. 10D).

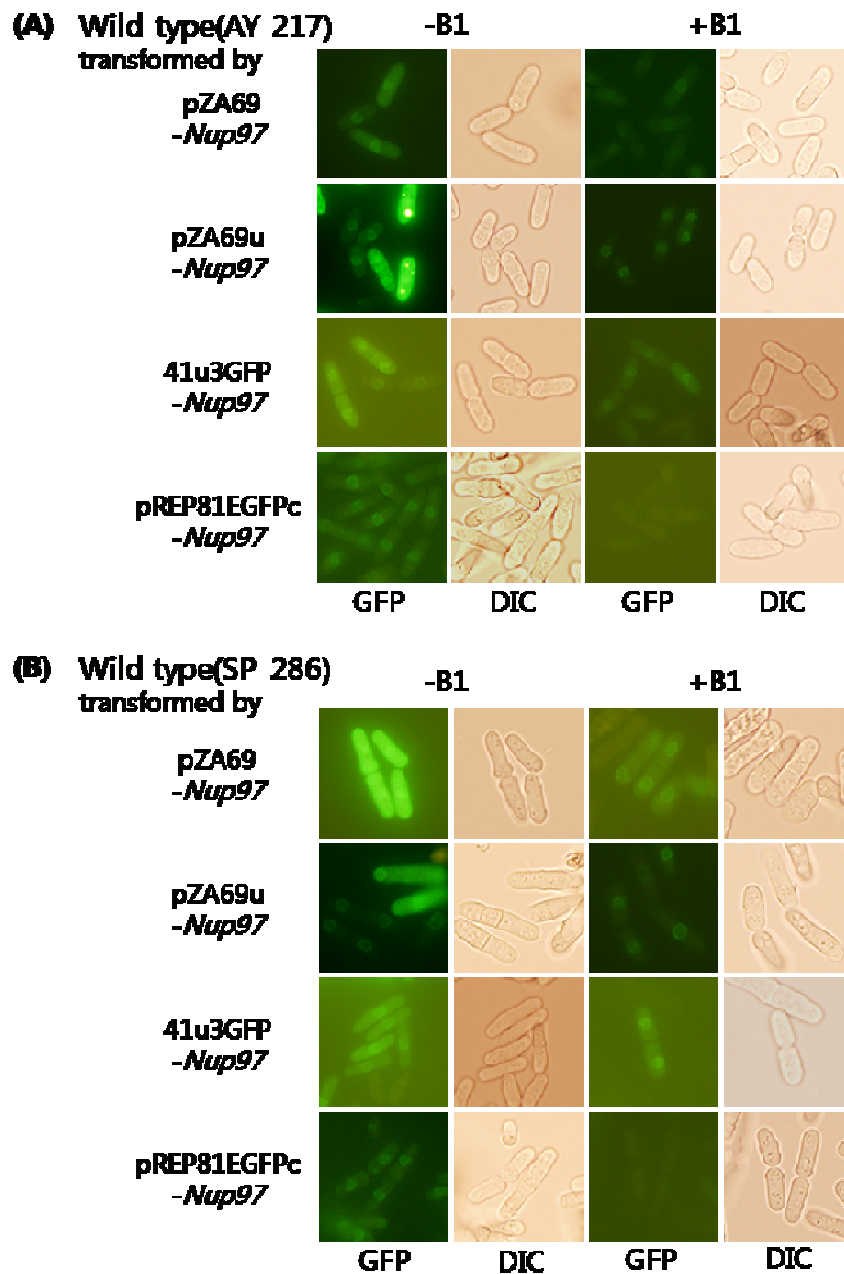


Fig. 10 localization of nup97p to the nuclear periphery.

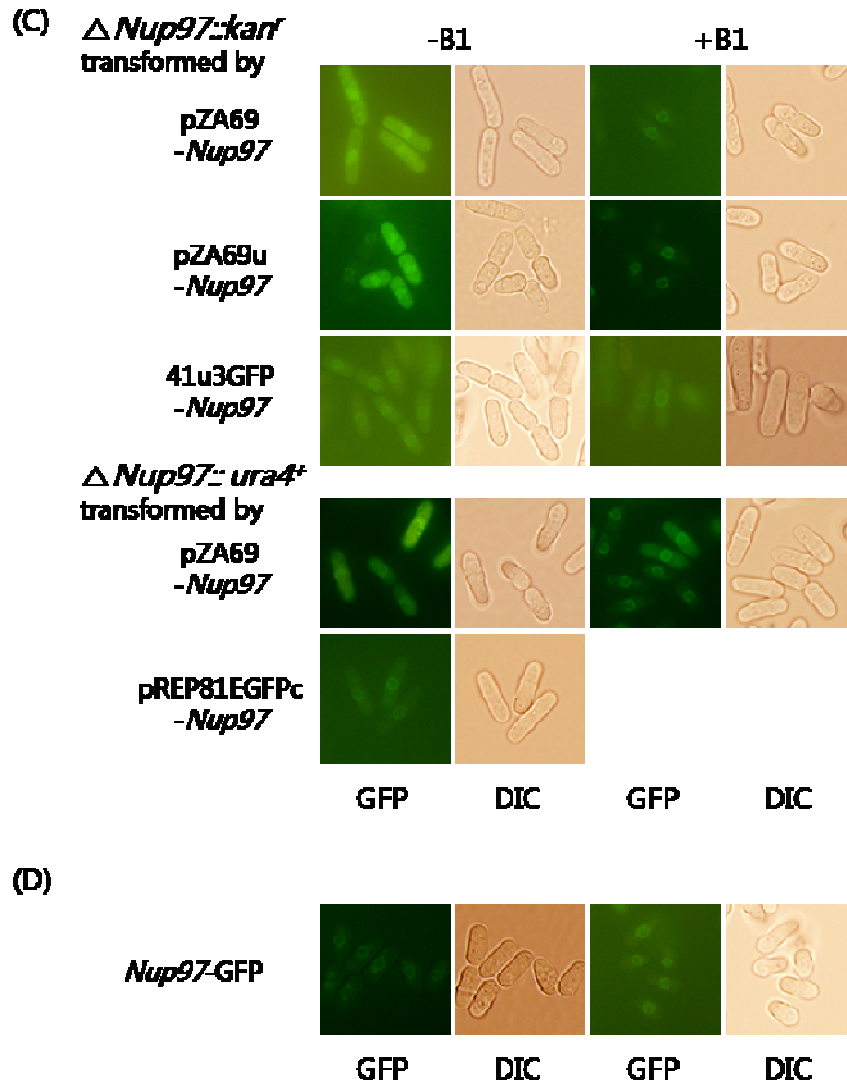
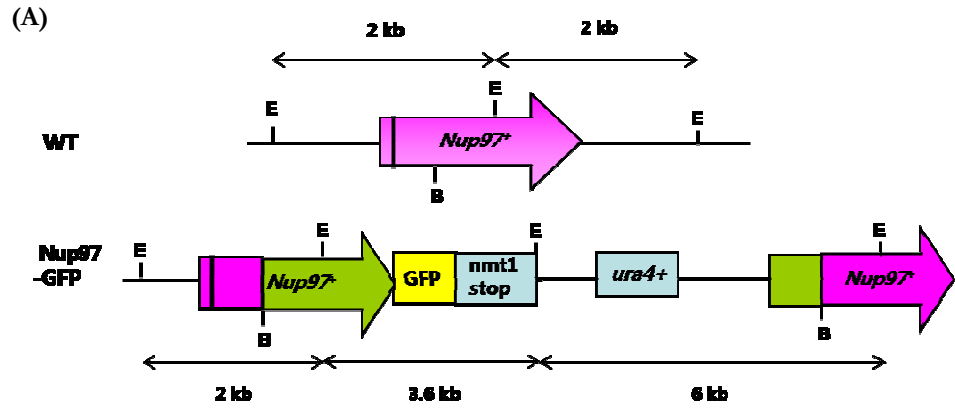


Fig. 10 localization of nup97p. (continued)



(B) Southern Blot

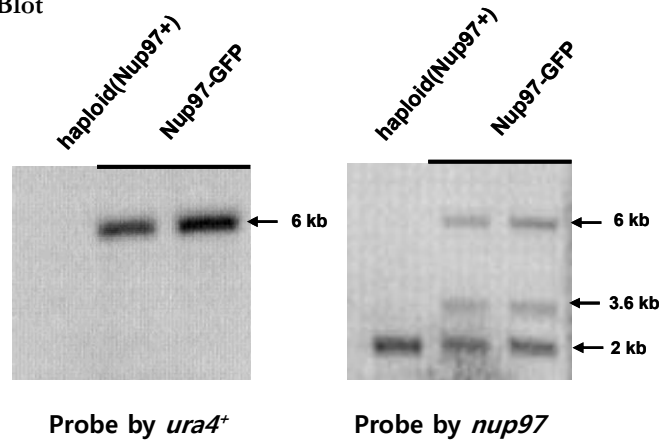


Fig. 11 Construction of *nup97-GFP*

IV. 토 의

진핵세포는 원핵세포와 달리 핵막을 가지고 있어 핵에서는 유전정보를 전사하고 세포질에서 그 유전정보를 발현하게 되는데, 이렇게 정상적으로 유전자가 발현되기 위해서는 유전정보를 받은 mRNA가 핵막에 존재하는 핵공(nuclear pore)을 빠져나와야 한다. 핵공은 거대한 구조로 nuclear pore complex(NPC)를 이루며 nuclear transport에 관문역할을 수행한다. 예전엔 NPC는 그저 단백질과 RNA가 지나다니는 통로로만 여겨졌으나 최근 연구된 결과, nuclear transport에 직접적으로 작용하는 역동적인(dynamic) 구조를 이루고 있으며, 이것은 NPC가 transport 하는 동안 구조를 변화시키거나, NPC를 이루고 있는 구성요소인 nucleoporin을 일시적으로 변화시키면서 이루어진다는 것이 밝혀졌다(Iran and Wentc, 2006).

mRNA export는 다른 RNA(tRNA, snRNA, miRNA)나 단백질의 export와 달리 굉장히 복잡하며, 다른 RNA나 단백질의 export에 관여하는 karyopherin이나 RanGTP-RanGDP gradient에 직접적으로 의존하지 않는 transport receptor를 이용한다(Reed and Hurt, 2002; Conti and Izaurralde, 2001). *S. pombe*에서 mRNA export receptor인 mex67과 유전적으로 연관이 있는 factor를 찾기 위해 mex67과 synthetic lethal을 보이는 mutant를 screen 하였다(Yoon, 2003).

그 중, SImex3로부터 얻은 DNA의 아미노산 서열을 *S.pombe*의 nucleoporin인 *Npp106*, *S.cerevisiae*의 nucleoporin인 *Nic96*, Vertebrate의 nucleoporin인 *Nup93*과 비교해보니 homology를 보였다. 그래서 이 유전자가 아마도 nucleoporin일 것이라 생각하고 또한 이 유전자에서 만들어지는 단백질의 molecular weight가 97.5kDa이라서 이 유전자의 이름을 *nup97*이라고 명명하였다(Cho *et al.*, 2007).

*nup97*과 homology를 보이는 *S.cerevisiae*의 *Nic96*은 NPC에서 subcomplex를 이루고 있으며, *Nup192*, *Nup188*, *Nup170*, *Nup157*, *Nup59*, *Nup53*을 포함한다.

Vertebrate의 Nup93 역시 NPC에서 subcomplex를 이루고, Nup205, Nup188, Nup155, Nup93, Nup35/53을 포함하고 있다(Hetzer *et al.*, 2005; Loiodice *et al.*, 2004; Mansfeld *et al.*, 2006; Schwartz, 2005). 또한 Nic96 complex와 Nup93 complex는 핵분열 시, NPC가 분리되었다 다시 조립될 때, 가장 먼저 조립되는 양상을 보이며(Hetzer *et al.*, 2005), 핵과 세포질 양쪽에 대칭적으로 분포되어 있다. NPC를 구성하는 nucleoporins은 NPC의 구조를 구성하고 있어서 움직이지 않는 것이 있는 반면, nuclear transport 시 transient 하게 나타나 역동적인(dynamic) 구조를 이루는 것도 있다. Nic96 complex와 Nup93 complex는 너무 역동적이지도 너무 고정적이지도 않은 중간 정도의 형태를 띄고 있는데, 위의 사실을 종합해 보면 Nic96과 Nup93의 예상되는 기능은 NPC 구조에도 관여하고, nuclear transport에도 관여할 것으로 사료 되어진다(Tran and Wentz, 2006).

nup97 유전자의 기능을 확인하기 위하여 *nup97* 결실 돌연변이주를 제조하여 확인한 결과, *nup97*은 세포생장에 필수적(essential)이고, mRNA export에 관여하여 발현을 억제시키면 핵 안에 mRNA가 축적되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 세포 내에서 NPC에 위치하는 것을 확인하였다. *S.pombe*에서 *nup97*은 Npp106과 마찬가지로 nucleoporin으로 작용하며 두 유전자는 homology를 보이지만, *nup97*이 세포 생장에 필수적인 것으로 보아 Npp106과는 다른 일을 수행할 것으로 여겨진다. 만약 Npp106과 같은 일을 수행한다면, *nup97* 유전자가 제 기능을 하지 못할 때, Npp106이 그 일을 대신 수행 할텐데, 그렇지 못하고 *nup97*이 제대로 발현되지 않으면 세포가 생장을 하지 못하기 때문이다.

본 연구에서는 앞으로 단백질과 단백질 사이의 물리적인 결합을 조사하기 위하여 *in vitro* full-down assay나 *in vivo* immunoprecipitation을 통해 *nup97* 단백질이 어느 export factor와 complex를 이루는지 알아내고, 결합하는 경우에는 binding domain을 조사함으로써 작용 기작을 유추하며, 여러 export factor와 multiple binding을 하는 경우에는 어떻게 경쟁하는지에 대한 연구가 진행되어야 한다.

참 고 문 헌

- Abruzzi, K.C., Lacadie, S. and Rosbash, M. (2004) Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *EMBO J.* **23**, 2620-2631.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., Mcleod, M. and Warbrick, E. (1993) Experiments with fission yeast. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N. Y., USA.
- Bayliss, R., Littlewood, T. and Stewart, M. (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin- β in nuclear trafficking. *Cell* **102**, 99-108.
- Chávez, S., Beilharz, T., Rondón, A.G., Erdjument-Bromage H., Tempst, P., Svejstrup, J.Q., Lithgow, T. and 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 J.* **19**, 5824-5834.
- Cho, H.J., Hwang, D.K., Jung, S.I. and Yoon, J.H. (2007) *Schizosaccharomyces pombe* nup97, which Genetically Interacts with mex67, is Essential for Growth and Involved in mRNA export. *J Microbiol*, **45**, 344-349.
- Cole, C. N. and Scarcelli, J. J. (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 299-306.
- Conti, E. and Izaurralde, E. (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 310-319.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Williams, R., Alber, F., Eswar, N., Chait, B.T., Rout, M.P., and Sali, A. (2006) Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 2172-2177.
- 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.

- Fahrenkrog, B. and Aebi, U. (2003) The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 757–766.
- Fasken, M.B. and Corbett, A.H. (2005) Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nature Struct Mol. Biol.* **12**, 482–488.
- Galy, V., Gadal, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A. and Nehrbass, U. (2004) Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* **116**, 63–73.
- Green, D.M., Johnson, C.P., Hagan, H. and Corbett, A.H. (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. USA.* **100**, 1010–1015.
- Görlich, D. and Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 607–660.
- Griffis, E.R., Altan, N., Lippincott-Schwartz, J. and Powers, M.A. (2002). Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1282–1297.
- Grüter, P., Taberner, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B.K. and Izaurralde, E. (1998) TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol. Cell* **1**, 649–659.
- Hetzer, M.W., Walther, T.C., and Mattaj, I.W. (2005) Pushing the envelope: Structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 347–380.
- Huang, Y. and Steitz, J. A. (2005) SRprises along a messenger's journey. *Mol. Cell* **17**, 613–615.
- Huertas, P. and Aguilera, A. (2003) Cotranscriptionally formed DNA: RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell* **12**, 711–721.

- Hurt, E., Luo, M.J., Röther, S., Reed, R. and Strässer, K. (2004) Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 1858–1862.
- Jimeno, S., Rondon, A. G., Luna, R. and Aguilera, A. (2002) The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J.* **21**, 3526–3535.
- Köhler, A. and Hurt, E. (2007) Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* **8**, 761-773.
- Lindsay, M.E., Plafker, K., Smith, A.E., Clurman, B.E. and Macara, I.G. (2002). Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin- alpha:beta-mediated nuclear protein import. *Cell* **110**, 349–360.
- Loiodice, I., Alves, A., Rabut, G., Van Overbeek, M., Ellenberg, J., Sibarita, J.B. and Doye, V. (2004). The entire Nup107–160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3333–3344.
- Mansfeld, J., Guttinger, S., Hawryluk-Gara, L.A., Pante, N., Mall, M., Galy, V., Haselmann, U., Muhlhauser, P., Wozniak, R.W., Mattah, I.W., Kutay, U. and Antonin, W. (2006). The conserved transmembrane nucleoporin NDC1 is required for nuclear pore complex assembly in vertebrate cells. *Mol. Cell* **22**, 93–103.
- Matsumoto, T. and Beach, D. (1991) Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* **66**, 347-360.
- Mattaj, I. W. and Englmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265–306.
- Pemberton, L. F., Blobel, G. and Rosenblum, J.S. (1998) Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 392–399.
- 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.
- Rabut, G., Doye, V. and Ellenberg, J. (2004). Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1114–1121.
- Reed, R. and Cheng, H. (2005) TREX, SR proteins and export of mRNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 269–273.
- Reed, R. and Hurt, E.C. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**, 523–531.
- Rexach, M. and Blobel, G. (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**, 683–692.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C. and Stutz, F. (2004) Nuclear export of RNA. *Biol. Cell* **96**, 639–655.
- Rout, M.P. and Aitchison, J.D. (2001) The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* **276**, 16593–16596.
- 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.
- Schwartz, T.U. (2005) Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 221–226.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Lührmann, 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.
- Sträßer, K. and Hurt, E.C. (2001) Splicing factor Sub2p is required for nuclear export through its interaction with Yra1p. *Nature* **413**, 648–652.

- Strässer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondón, 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.
- Stutz, F. and Izaurralde, E. (2003) The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol.* **13**, 319-327.
- Tran, E.J. and Wentz, S.R. (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* **125**, 1041-1053.
- Vasu, S.K. and Forbes, D.J. (2001) Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 363-375.
- Vinciguerra, P., Iglesias, N., Camblong, J., Zenklusen, D. and Stutz, F. (2005) Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *EMBO J.* **24**, 813–823.
- Yoon, J.H., Love, D.C., Guhathakurta, A., Hanover, J.A. and Dhar, R. (2000) Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8767-8782.
- Yoon, J.H. (2003) Synthetic Lethal Mutants with spmex67 of *Schizosaccharomyces pombe* in the Mediation of mRNA export. *J Microbiol*, **41**, 115-120.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Domínguez, Y. and Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* **41**, 973-981.
- 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 *spnup97* gene involved in mRNA export in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

Hwang Duk Kyung

Department of Biology Education

Graduate School of Education

Sungshin Women's University

In eukaryotes, transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm occurs through the nuclear pore complex (NPC), which is embedded in the nuclear envelope, and requires soluble transport receptors that specifically recognize their cargo. The export of mRNA is more complex than the nucleocytoplasmic transport of protein and other RNAs (tRNA, rRNA, snRNA, and so on), because numerous additional export factors (adaptors, release factors) cooperate with the mRNA export receptors. Thus mRNA export is coupled with other steps of mRNA metabolism. Although it is unclear how the only mature mRNPs are selected to export, binding of mRNA receptors to mRNA is necessary for export.

The overall structure of the NPC can be superficially divided into three basic elements: nuclear basket, the central core, and the cytoplasmic fibrils. NPCs have an eightfold symmetrical core structure called spoke complex that is sandwiched between a cytoplasmic and a nuclear ring.

In order to identify mutations in genes that are functionally linked to *mex67* in mRNA export, three synthetic lethal mutants with the *mex67* null allele present in *S. pombe* were isolated. A novel *nup97* gene was isolated by complementation of the growth defect in one

of the synthetic lethal mutants, SLMex3. The *nup97* gene encodes a predicted 851-amino acid ORF with one intron. The Nup97p is similar to *Saccharomyces cerevisiae* nucleoporin, Nic96p and *S. pombe* npp106p, *Vertebrate* Nup93p. The *nup97* gene is essential for cell growth and repression of *nup97* causes mRNA accumulation in nucleus, suggesting that the defect of mRNA export out of the nucleus. We determined the subcellular localization of Nup97 tagged at the N terminus or the C terminus with GFP. Both fusions complemented growth defect of $\Delta nup97$ null mutants. An integrated version of the *nup97-GFP* fusion was constructed at the *nup97* locus. Nup97-GFP fusions expressed from its own promoter were localized at the nuclear periphery with a punctate appearance. These results suggest that Nup97p in fission yeast is also nucleoporin, which is involved in mRNA export.

감사의 글

2년 반이라는 대학원 생활이 너무 빨리 지나간 것 같아 한 편으로 아쉽지만 돌이켜보면 대학원에 와서 배운 것도 느낀 것도 너무 많습니다. 학부 때와는 다른 생활에 처음에는 적응하기 힘들었지만 시간이 지나면서 어느 누구보다도 잘 적응해 가는 제 모습이 신기하고 대견스러웠습니다. 많은 가르침을 받고 이제 그 결실을 맺어 고마운 분들께 감사의 마음을 전하려고 합니다.

먼저 이 논문이 나오기 까지 아낌없이 성심껏 지도해 주신 윤진호 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 선생님의 가르침을 너무 늦게 알아버린 못난 제자 잘 지도해 주셔서 너무 감사합니다. 앞으로 사회에 나가서도 그 가르침 잊지 않고 주어진 것에 열심히 임하는 사람이 되겠습니다. 그리고 바쁘신 와중에 시간 내시어 심사 해주신 서울대 치대 이승복 교수님과 김인순 교수님께 감사의 인사를 전합니다.

더불어 학부 때부터 많은 가르침을 주신 생물학과 배인하 교수님, 오용자 교수님, 김진일 교수님, 박경숙교수님, 강혜순교수님, 전용필 교수님 정말 감사 드립니다.

평생 잊을 수 없는 대학원생활을 함께한 우리 미생물학 연구실 식구들. 비록 나이는 어리지만 너무 의젓한 우리 선배들, 순임언니, 지영선배, 지혜선배. 선배들이 많이 챙겨주고 보살펴주며 보여준 후배들에 대한 사랑, 저도 배워서 제 밑의 후배들에게 많이 주려고 노력했습니다. 너무 고맙고 사랑합니다. 그리고 너무 이쁜 우리 깜찍이 후배들, 항상 옆에서 든든한 버팀목이 되어준 진아, 논문 쓸 때나 실험 할 때 옆에서 알게 모르게 많은 도움을 준 현진이, 힘들 때마다 한번 웃어주는 것으로 나에게 활력소를 준 동그라미, 너희들이 없었으면 언니 논문 못 썼을거야. 너무 고맙고, 모두 사랑해.

또한 학술제로 인연을 맺어 많이 정든 학부생 금옥이, 지선이, 아영이, 유정이, 리지, 근로인 혜지와 혜경이, 그리고 애리, 지혜. 힘든 학교생활에서 서로 위안 삼으며 더 잘 견디어 낼 수 있었던 것 같아, 모두 너무 고마워. 그리고 얼굴 알아보지 못해

도 만나면 반갑게 인사해주는 학부아이들. 열심히해서 생물학과 빛내는 사람이 되길 바래.

사랑하는 나의 친구들, 힘든 대학원생활 친구 스트레스 풀어준다고 많은 시간 같이 보내준 친구 장지, 멀리 남원에서 항상 응원해주는 신아, 연락 자주 못하는 못난 친구 둔 은주, 은영이, 인자, 선영, 진하, 혜영, 세원이, 지은이 너무 고맙다. 그리고 인생선배로 항상 멋진 조언을 아끼지 않으신 혜경언니, 지혜언니 정말 고맙습니다.

학부 때부터 날 행복하게 만든 우리 03학번 후배들, 진영이, 소라, 지영이, 민진이, 지선이, 승애언니, 선경언니, 은하. 그리고 04학번 윤아, 경선이, 계령이, 한나. 소중한 인연들, 너희들과 함께한 시간들 소중한 추억으로 간직할게. 고맙고, 사랑한다.

교생실습기간 교사에 대한 참된 역할과 무한한 사랑을 일깨워주신 성사중학교 오춘분 선생님. 평생 잊지 못할 대표수업과 2학년 8반 아이들과의 멋진 추억 많이 만들어 주셔서 감사합니다. 그리고 많이 부족한 저에게 너무나 큰 사랑을 안겨준 우리 2학년 8반 친구들에게도 감사의 마음을 전합니다. 더불어 실습기간 정 많이 들어 헤어지기 아쉬웠던 우리 교생쌤들, 정신적 지주였던 정은쌤, 엉뚱 소녀 방효정, 혜정쌤, 준희, 혜선, 극진, 준이. 우리 너무 잘 맞았던 거 알지! 늘 행복하고 건강하길 바래.

그리고 대학원생활에 많은 뒷바라지 해주신 너무 사랑하는 우리 가족들, 항상 귀여운 손녀의 못난 행동도 감싸주시는 우리 할머니, 너무 사랑해요. 항상 어려운 일 있을 때마다 옆에서 많은 힘이 되어주셔서 감사합니다. 오래오래 건강하세요, 절 낳으시고 기르시고 너무 많은 고생하시는 우리 엄마, 아빠, 대학원 보내주셔서 감사합니다. 앞으로 꼭 좋은 선생님 되어서 효도 많이 할게요. 그래도 저 철 많이 들었죠? 너무 사랑해요. 항상 투덜대는 동생 등록금도 내주고 세심하게 모든 면에서 많은 신경 써주는 고마운 우리 오빠, 너무 고맙고 내가 많이 사랑하는 거 알지! 미진씨랑 좋은 결실 맺길 바랄게. 이제 곧 우리식구가 될 미진씨, 오빠랑 예쁜 사랑하세요. 고마워요. 그리고 요새 부쩍 자라서 깜짝깜짝 나를 놀라게 하는 우리 예쁜 민지, 너무너무 사랑해.

마지막으로 비록 이 글에 올리지 못했지만 저를 아는 모든 분들과 논문 쓸 때 많은 도움을 주신 분들에게 감사의 마음을 전합니다.

앞으로 항상 모든 일에 최선을 다하며 여기서 만족하지 않고 더 큰 도약을 하기 위해 열심히 노력하는 사람이 되겠습니다.