



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

핵공 단백질 Nup184p의
SUMO 변형과 mRNA export에
미치는 영향에 관한 연구

2009

성신여자대학교 대학원

생물학과

조현진

핵공 단백질 Nup184p의
SUMO 변형과 mRNA export에
미치는 영향에 관한 연구

윤진호 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2008년 11월

성신여자대학교 대학원

생물학과

조현진

인 준 서

조현진의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

성신여자대학교 대학원

논문개요

nup184 유전자는 하나의 인트론을 포함하여 4776개의 염기쌍을 가지고 있다. 4695 염기쌍으로 이루어진 이 유전자의 열린 읽기틀(open reading frame, ORF)은 1564개 아미노산으로 이루어졌으며, 분자량 176.9 kDa로 예측되는 핵공단백질(nucleoporin)을 암호화하고 있다. 생장에 필수적이지는 않으나 mRNA export에 영향을 미치는 것으로 여겨지는 *nup184* 유전자의 결실 돌연변이를 제조하였다. *nup184* 유전자가 결실된 돌연변이 균주 ($\Delta nup184$)는 최소배지(EMM)에서 야생형 균주에 비하여 느린 속도를 보이거나 그 정도는 심하지 않았다. 그러나 영양이 풍부한 합성배지 (YES)에서는 야생형에 비해 성장이 눈에 띄게 저해되는 특징을 가지고 있었다.

N-말단에 녹색형광단백질(GFP)를 붙인 pZU184는 $\Delta nup184$ 균주의 생장 결함, mRNA export 결함을 모두 상보(complementation) 하는 것으로 보아, GFP-Nup184 단백질이 정상적인 기능을 하는 것을 알 수 있었다. GFP-Nup184 단백질은 핵 막 주위에 점점이 위치하였으며, SUMO 변형되어 있는 듯 보였다. 또한 Nup184 단백질의 아미노(N) 말단 혹은 카복시(C) 말단이 부분적으로 삭제된 부분결실 돌연변이를 제조하여 $\Delta nup184$ 균주에 형질전환한 후, 균주의 생장, 세포 내의 위치, SUMO 변형 정도, 그리고 mRNA export에 미치는 영향 등을 조사하였다. 네 종류의 부분결실 돌연변이 중 N-말단 480개 아미노산이 결실된 pZU184 Δ 2는 모든 면에서 정상적인 pZU184와 비슷한 패턴을 보였다. 하지만 N-말단 아미노산이 각각 228개와 714개 결실된 pZU184 Δ 1과 pZU184 Δ 3, 그리고 C-말단 아미노산이 96개 결실된 pZU184 Δ 4은 생장 결함, mRNA export 결함을 모두 상보하지 못했으며, 세포 내 위치도 정상적이지 않았다.

목 차

논문개요

목차

그림목차

도표목차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험재료	
1-1. 균주 및 배지	6
1-2. 플라스미드	7
1-3. 재료 및 시약	7
1-4. 프라이머	8
1-5. Antibody	8
1-6. 반응용액	8
2. 방법	
2-1. 클로닝을 이용한 GFP 벡터 제조	
(1) pREP81X-Nup184-EGFPc 벡터의 제조.....	18
(2) pDW234를 이용한 Nup184-GFP 벡터 제조	18
(3) pZA69u 벡터를 이용한 pZU184, pZU184 Δ 1~4 벡터 제조 ...	19
2-2. <i>E.coli</i> 의 형질전환	20
2-3. <i>E.coli</i> cracking	20
2-4. DJ-PCR을 이용한 결실 돌연변이 균주의 제조	20
2-5. <i>S.pombe</i> 의 형질전환	21
2-6. <i>S.pombe</i> Genomic DNA isolation	22

2-7. Spot assay for Growth	22
2-8. Western blotting analysis	23
2-9. <i>In situ</i> Hybridization	24

III. 결과

1. Nup184-GFP 균주의 제조와 분석	
(1) pREP81x-Nup184EGFPc 벡터의 제조와 형질전환	25
(2) Nup184-GFP 삽입 균주의 제조	26
2. <i>nup184</i> 결실 돌연변이 균주의 제조	28
3. <i>nup184</i> 부분결실 돌연변이 균주의 제조와 분석	
(1) <i>nup184</i> 부분결실 돌연변이 균주의 제조	30
(2) <i>nup184</i> 부분결실 돌연변이 균주의 성장비교	33
(3) <i>nup184</i> 부분결실 돌연변이 균주의 위치추적	36
4. Nup184 단백질의 SUMO 변형 조사	39
5. <i>nup184</i> 돌연변이 균주의 mRNA export 결합 조사	42

IV. 토의

참고문헌

영문초록

도 표 목 차

Table 1. Strains used in this study	11
Table 2. Composition of Medium for <i>S. pombe</i>	13
Table 3. Composition of Medium for <i>E.coli</i>	15
Table 4. PCR primer used in this study	16
Table 5. Summary of <i>nup184</i> truncated vector complementation	44

그림 목 차

Figure 1. Construction of Nup184p-GFP	27
Figure 2. Construction of <i>nup184</i> deletion mutant	29
Figure 3. Growth test of <i>nup184</i> deletion mutants by Spot assay	30
Figure 4. Scheme of <i>nup184</i> truncated constructs	32
Figure 5. Growth test of <i>nup184</i> truncated mutants by Spot assay	35
Figure 6. Localization of Nup184p-GFP fusion proteins	38
Figure 7. SUMO modification of Nup184p-GFP	41
Figure 8. Poly(A) ⁺ RNA localization of <i>nup184</i> mutants	43

I. 서론

유전자는 생물이 살아가기 위한 정보와 진화의 단서를 가지고 있다. DNA에 암호화 되어있는 이 정보는 전사(transcription)를 통해 RNA로 전해지고 해독(translation)을 통해 단백질로 이어진다. 유전물질을 담고 있는 핵과 세포질의 구분이 모호한 원핵생물(prokaryote)과 달리 뚜렷한 핵과 핵막을 가지고 있는 진핵생물(eukaryote)은 구획화를 통한 세포 내 기작의 단계화와 복잡성으로 그 분명한 차이를 보여준다. 또한 핵막은 공간적인 분리막 역할 뿐만 아니라 기능면에서도 중요한 역할을 한다.

핵공복합체(Nuclear pore complex, NPC)는 핵막에 존재하며 이를 통해 핵과 세포질 사이에 물질교환이 이루어진다. 이 NPC는 약 30종류의 핵공단백질(nucleoporin, nup)로 이루어진 40MDa 이상의 거대한 복합체이다. 25-40kDa 이하의 작은 물질들은 NPC 사이로 단순확산 되어 이동할 수 있지만 그 이상의 큰 물질은 핵과 세포질 사이를 이동할 때 반드시 NPC를 통과해야만 한다(Fried and Kutay, 2003). NPC는 진화적으로 잘 보존되어 하등 진핵생물로부터 사람에 이르기까지 유사한 구조를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Cronshaw et al., 2002, Rout et al., 2000). NPC의 구조는 핵막과 연결되어 있는 NPC body, 세포질 쪽으로 길게 뻗어있는 cytoplasmic filaments, 그리고 핵막 안쪽으로 바스켓 구조를 이루고 있는 nuclear basket의 세 종류의 도메인을 가지고 있다. 전자현미경을 이용한 연구 결과 NPC는 8개의 단위체(spoke)로 이루어져 있으며 이 구조는 핵막을 중심으로 비대칭적인 모양을 하고 있음이 밝혀졌다. NPC를 이루는 핵공단백질들은 대개 각 단위체에 하나씩이 아닌 다수(multi-copy)로 존재하며 하나의 핵공단백질은 핵막을 중심으로 대칭 혹은 비대칭의 다양한 분포를 가진다. NPC의 직경은 약 25~30nm인 것으로 알려져 있으며, 그 내부는 터널과

같이 비어있는 것이 아니라 반복적인 F(페닐알라닌)과 G(글리신) 아미노산 서열이 FG(Phe-Gly)도메인을 형성하는 핵공단백질이 자리하고 있다. 이러한 FG 도메인은 특별한 3차 구조를 가지지 않고 실 모양으로 길게 늘어진 형태를 띄고 있으며 NPC 내부에 자리하여 그 사이를 통과하는 물질수송에 직 간접적인 역할을 할 것이라는 가설이 나오고 있다(Rout and Wente, 1994).

핵과 세포질 사이를 이동하는 단백질과 RNA(tRNA, rRNA, miRNA, snRNA 등)의 이동은 mRNA의 이동과 다른 기작을 가진다. Ran(Ras-like GTPase)단백질은 핵막을 중심으로 서로 다른 형태로 존재한다. 세포질에 존재하는 RanGAP(RanGTPase activation enzyme)에 의해 세포질에서는 RanGDP의 상태로 존재하며, NPC의 nuclear basket과 인접한 RanGEF(Ran guanine nucleotide-exchange factor)에 의해 핵 안에서는 RanGTP 형태로 존재한다. 세포질에서 핵으로, 혹은 핵 내부로부터 세포질로 이동하고자 하는 물질은 특정 서열(NLS 혹은 NES, nuclear localize(or export) sequence)을 가져야만 한다. 이 서열은 수송운반체 (importin 혹은 exportin, 통합하여 karyopherin이라고도 함)에 의해 인식되어 핵 내부로 들어가게 되는데 이때 Ran 단백질의 형태에 따라 물질수송의 방향성을 결정짓게 된다(Stewart, 2007).

그러나 mRNA의 이동은 Ran 단백질의 영향을 받지 않으며 위와 같은 고전적인(classical) 수송기작을 따르지 않는다. 효모에서 알려진 mRNA 수송단백질로는 Mex67/Mtr2p 복합체이며, 이 단백질은 그 자체로 mRNA와 결합하는 힘이 약하나 Yra1p를 어댑터로 하여 mRNA를 수송할 수 있는 복합체를 이룬다. Mex67p는 NPC의 핵공단백질과 상호작용을 하며 핵과 세포질 사이를 이동하는 것으로 알려져 있으며 고전적 운송기작의 수송단백질인 karyopherin과는 다른 구조를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한

mRNA는 전사 후 가공과정(mRNA maturation : 5'capping, 3'poly-adenylation, splicing)을 거쳐 완전한 모양을 갖춘 mRNA만이 핵막을 통과하여 세포질로 이동할 수 있으며, 이 과정을 거치면서 추후의 운송기작과 해독과정에 작용할 단백질이 결합하게 됨으로써 거대한 mRNP 복합체를 이루게 된다. 이러한 구조적인 차이점을 기반으로 하여 mRNA의 핵에서 세포질로의 운송은 다른 단백질이나 RNA와는 구별된 기작을 요구하는 것으로 알려져 있다(Köhler and Hurt, 2007).

NPC는 핵과 세포질 사이에 위치하는 단순한 물질교환의 통로라고 여겨져 왔다. 그러나 최근의 연구결과 NPC는 핵과 세포질 사이의 물질이동에 능동적인 개입을 하고 있을 가능성이 높음이 알려졌다(Tran, and Wente, 2006). 누룩 곰팡이(*Aspergillus nidulans*)는 세포분열시 고등 진핵생물과 달리 핵막의 붕괴가 일어나지 않거나 부분적으로 일어난다(De Souza et al., 2004). 이때 특정 핵공단백질(Gle2/Rae1, Nup98)이 인산화되어 이로 인해 NPC의 구조가 변화하고 물질을 통과시키는 투과성(permeability)이 변화되어 핵과 세포질 사이를 오가는 물질들의 조절이 가능하게 된다(Tran E.J., and Wente S.R., 2006). 이는 NPC가 단순한 통로의 역할을 하고 있지 않음을 시사한다. 또한 NPC는 그 자체로 역동적인 구조를 가지고 있다는 연구결과도 나오고 있다. 세포주기의 특정시기 뿐만 아니라 물질이 NPC를 통과하는 순간에도 그 구조가 변화하며, 이동하는 물질의 종류나 조건에 따라 핵공단백질의 구성도 변화한다는 보고도 있다(Fahernkrog et al., 2002, Paulillo et al., 2005).

SUMO(Small Ubiquitin like Modifier)는 세포내의 단백질 변형에 관여하는 97개의 아미노산으로 된 작은 단백질이다. 유비퀴틴(ubiquitin)과 마찬가지로, SUMO는 타겟 단백질에 결합하여 단백질의 기능을 변화시키거나, 단백질 유전체의 복합성을 증가시킨다. 또한 SUMO는 전사, DNA의 복제와 복구,

세포주기의 진행, 신호전달, 단백질의 타겟팅과 안정화, 해독 등의 세포 내 기작에 관여한다(Ronald, 2005). 이 작은 단백질은 GTP 가수분해 효소인 RanGAP1에 결합하는 것으로 인해 처음으로 발견되었다(Matunis et al., 1996).

SUMO 단백질은 연속적인 효소 연쇄작용(cascade)에 의해 타겟 단백질과 결합한다. SUMO 단백질은 먼저 특이적 분해효소(SUMO protease 혹은 SUMO de-conjugation enzyme)에 의해 C-말단에 두개의 글리신(G)을 남겨둔 채 나머지 부분은 잘려져 나가게 된다(SUMO maturation, Miura et al., 2007). C-말단이 변형된 후 활성화 효소(E1)의 시스테인(cysteine)과 SUMO 말단의 글리신의 카복시 그룹이 ATP를 소모하며 thioester 결합을 이루어 활성화 된다. 활성화된 SUMO는 E1에서 접합효소(conjugation)인 E2의 시스테인으로 옮겨져 thioester 중간산물을 형성하게 되며, SUMO 결합효소(E3)에 의해 타겟 단백질의 리신(K)의 ϵ 잔기와 결합한다(Ronald, 2005, Deborah et al., 2002, Tang et al., 2008). SUMO 변형은 특이적 분해효소에 의해 가역적인 반응이 가능하며 이 분해효소는 두 가지 역할을 한다. 첫째는 타겟 단백질로부터의 SUMO 분리이며, 둘째는 새로 합성된 SUMO 단백질의 성숙이다(Ronald, 2005). SUMO는 단백질의 변형과 그에 따른 조절(regulation)으로 인해 세포 내 신호전달 조절 등 그 복잡성에 기여한다.

SUMO consensus sequence(Ψ KxE/D)는 SUMO 단백질이 타겟과 결합하는 서열이며 여기서 Ψ 는 큰 소수성 잔기를, K는 SUMO가 결합하는 리신(lysine), X는 모든 아미노산, 그리고 E(glutamic acid) 혹은 D(aspartic acid)는 산성의 아미노산을 의미한다.

nup184 유전자는 하나의 인트론과 4695개의 염기서열을 가지고 있으며 단백질의 크기는 약 176.9 KDa 이다. *nup184* 유전자는 생장에 필수적이지는

않으나 mRNA export에 영향을 미치는 중요한 필수 유전자인 *rae1*과 합성치사(synthetic lethality)를 보이며 결실 돌연변이는 핵 안에 RNA가 축적되어 있는 mRNA export defect 현상을 보인다(Whalen et al., 1999). 또한 *nup184* 유전자 염기서열의 분석을 통해 SUMO가 결합하는 SUMO consensus 서열이 6군데 존재함을 발견하였으며, 이 서열의 중간에 STOP 코돈을 삽입하여 생성한 돌연변이인 Nup184-1p의 세포 내 위치가 핵 표면에 자리하지 않고 세포질로 퍼져있음이 관찰되었다(Whalen et al., 1999).

이에 본 연구에서는 *nup184* 유전자의 부분적인 삭제를 통한 Nup184 단백질의 SUMO 변형과 mRNA export에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1-1 균주 및 배지

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

S. pombe 의 세포배양 기술과 유전학적 방법은 *S. pombe* standard method 를 사용하였다(Alfa et al., 1993, Moreno et al.,1991). 효모 배양에는 EMM(Edinburgh minimal medium) 을 기본으로 사용하였으며 Table.2 에 그 조성을 나타내었다. 형질전환된 균주의 선별은 배지의 첨가물 (supplements, 225 mg/l, adenine, leucine, uracil) 조합을 이용하였다. 또한 *nmt* 프로모터의 억제를 위하여 EMM 과 PMG 배지에 15 μ M 농도로 티아민(thiamin, B₁)을 첨가하였다. G418 에 내성을 갖는 유전자(*kan^r*)로 치환된 결실 돌연변이 균주의 선별에서는 YES 배지의 경우, 첨가한 항진균제인 G418 농도를 100 mg/l로 하였으며 PMG 배지의 경우 각각 200 과 400 mg/l 로 농도를 단계별로 조절하였다. 배양 온도는 28°C를 유지하였으며 액체배지는 진탕배양 하였고 고형배지는 2% Agar 를 첨가하였다.

E.coli 배양에는 LB 배지를 사용하였으며, 항생제(ampicillin) 의 농도를 100 mg/ml로 첨가하여 37°C에서 배양하였다.

1-2 플라스미드

본 실험에서 Nup184 단백질과 GFP 단백질의 조합을 위해 pDW232 (invitrogen), pREP81x-EGFPc(Rachel, 1998), pZA69u 를 사용하였다. Nup184-GFP의 위치추적과 프로모터에 의한 과발현 조사의 대조군으로 pUZ184GFP 벡터(Whalen et al., 1999)가 사용되었다. 또한 Nup184 단백질의 SUMO 변형을 조사하기 위하여 대조군으로 Gle1-GFP 벡터가 사용되었다(Moon et al., 2008).

1-3 재료 및 시약

효모 배양에 사용한 배지는 Difco, MP 제품을 사용하였고 첨가된 Chemical 들은 Sigma 와 MP, Q-bio, Elpis 제품을 사용하였다. PCR 에 사용된 프라이머는 제노텍, Sigma-Proligo 에 의뢰하였으며 Taq polymerase 는 Nova Taq(제넨메드), TaKaRa pyrobest, Prime STAR 를 사용하였다. 제한효소는 New England Biolabs(NEB)와 Promega 의 버퍼를 사용하였다. Southern blotting 과 western blotting 에 사용된 ECL(Enhanced Chemi-luminescence labeling and detection) kit 는 Amersham Life Science, In situ hybridization 에 사용된 Anti-digoxigenin-fluorescein, dig oligo DT 는 Roche 제품을 사용하였다.

PCR clean up kit 와 Gel extraction kit, genomic DNA isolation kit 는 QIAGEN 과 진을 제품을 이용하였다.

전기영동에 필요한 agarose 는 Bio rad 와 Q-biogen 제품을 이용하였으며, SDS-PAGE gel 에 사용된 acrylamide gel 은 Elpis 제품을 사용하였다.

Western blotting 에 사용된 antibody 는 sigma, PVDF membrane 은 milipore 와 Bio-rad 제품을 사용하였다.

1-4. 프라이머

PCR에 사용된 프라이머는 GC 비율을 40~60%로 맞추고 반복적인 AT 염기서열을 피했다. 농도는 0.02 μ mol 로 하여 18~20mer 의 길이로 제노텍과 Sigma-Proligo에 주문하였다. 본 실험에 사용된 프라이머는 Table.3에 정리하였다.

1-5. Antibody

Primary antibody로는 Anti-GFP N' terminal antibody produced in rabbit(sigma, G1544)를 사용하였으며, Secondary antibody로는 Anti Rabbit IgG(Whole molecule) Peroxidase Conjugate in goat(sigma, A6154)를 사용하였다.

1-6. 반응 용액

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

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

2) Genomic DNA isolation

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

3) In Situ Hybridization

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

4) Western blotting

Buffer A	PBS, 50mM NaF, 10mM NaN ₃
20%, 5% TCA (wt/vol)	
Gel loading buffer	250mM Tris–HCl [pH 8.0] 2% SDS, 5% Glycerol, 5% β–Mercaptoethanol

	0.1% Bromphenol blue
Gel running buffer	Trise base, Glycine, SDS
Transfer buffer	Tris base, Glycine, Methanol 10% SDS
TN-TX buffer	1M Tris-HCl pH 7.5 5M NaCl, 20% Triton X-100
Blocking buffer	2% Skim milk in TN-TX
5) E.coli cracking	
2X cracking buffer	0.2M NaOH, 0.5% SDS, 20% Sucrose

Table 1. Strains used in this study

Strains	Genotype	Source
AY 217	$h^- leu1-32 ura4-d18$	Yoon et al., (2000)
$\Delta nup184::ura4^+$	$h^+ leu1-32 ura4-d18 \Delta nup184::ura4^+$	Whalen et al., (1999)
$\Delta nup184::kan^r$	$h^- leu1-32 ura4-d18 \Delta nup184::kan^r$	This study
pZU184 Δ 1	$h^- leu1-32 ura4-d18 /pZU184\Delta 1$	This study
pZU184 Δ 2	$h^- leu1-32 ura4-d18 /pZU184\Delta 2$	This study
pZU184 Δ 3	$h^- leu1-32 ura4-d18 /pZU184\Delta 3$	This study
pZU184 Δ 4	$h^- leu1-32 ura4-d18 /pZU184\Delta 4$	This study
pZU184	$h^- leu1-32 ura4-d18 /pZU184$	This study
pUZ184GFP	$h^- leu1-32 ura4-d18 /pUZ188GFP$	This study
184-GFP	$h^- leu1-32 ura4-d18 Nup184-GFP::ura4^+$	This study

Table 1. Strains used in this study (continued)

Strains	Genotype	Source
<i>Δnup184::kan^r/pZU184Δ1</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/pZA69u-nup184Δ1</i>	This study
<i>Δnup184::kan^r/pZU184Δ2</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/pZA69u-nup184Δ2</i>	This study
<i>Δnup184::kan^r/pZU184Δ3</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/pZA69u-nup184Δ3</i>	This study
<i>Δnup184::kan^r/pZU184Δ4</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/pZA69u-nup184Δ4</i>	This study
<i>Δnup184::kan^r/pZU184</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/pZA69u-nup184</i>	This study
<i>Δnup184::kan^r/pUZ184</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/pUZ184GFP</i>	This study
<i>Δnup184::kan^r/pZA69u</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/pZA69u</i>	This study
<i>Δnup184::kan^r/Gle1-GFP</i>	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r/Gle1-GFP</i>	This study
<i>E. coli</i> Top 10 ^o	<i>F⁻,mcrA(mrr-hsdRMS-mcrBC),80lacZM15,lacX74,</i> <i>deoR,recA1,araD139,(ara-leu)7697,galU,galK,rpsL,endA1,</i> <i>nupG</i>	Invitrogen

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

YES (Yeast extract) Medium	
YE powder	5g
Dextrose	30g
Supplements : 56.25mg/ <i>l</i> (Adenine, Leucine, Uracil)	

EMM (Edinburgh Minimal Medium)	
Potassium hydrogen Pthallate	3 g/ <i>l</i>
Na ₂ HPO ₄	2.2 g/ <i>l</i>
Ammonium chloride	5g/ <i>l</i>
Dextrose	20 g/ <i>l</i>
50X Salts	20 ml/ <i>l</i>
1000X Vitamins	1 ml/ <i>l</i>
10000X Minerals	0.1 ml/ <i>l</i>
Supplements : 225mg/ <i>l</i> (Adenine, Leucine, Uracil)	

PMG (Pombe Glutamate medium)	
Potassium hydrogen pthallate	3 g/ <i>l</i>
Na ₂ HPO ₄	2.2 g/ <i>l</i>
L-glutamic acid, monosodium salt	3.75 g/ <i>l</i>
Glucose	20 g/ <i>l</i>
50X Salts	20 ml/ <i>l</i>
1000X Vitamins	1 ml/ <i>l</i>
10000X Minerals	0.1 ml/ <i>l</i>
Supplements : 225mg/ <i>l</i> (Adenine, Leucine, Uracil)	

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

50X Salt Stock	
MgCl ₂ .6H ₂ O	52.5 g/ l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.735 g/ l
KCl	50 g/ l
Na ₂ SO ₄	2 g/ l
1000X Vitamin Stock	
Pantothenic acid	1 g/ l
Nicotinic acid	10 g/ l
Inositol	10 g/ l
Biotin	10 mg/ l
10000X Mineral Stock	
Boric acid	5 g/ l
MnSO ₄	4 g/ l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4 g/ l
FeCl ₂ .6H ₂ O	2 g/ l
Molybdic acid	0.4 g/ l
KI	1 g/ l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.4 g/ l
Citric acid	10 g/ l

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

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

Table 4. PCR Primer used in this study

Name	Sequence (5' → 3')
Nup184-1	CAT TGG AGA CAA ACA TGG TG
Nup184-2	ATT CCG ACT TTC CGT ACG TG
Nup184-3	CTT GCT CTA ACA ACG CAT CG
Nup184-4	CCT TCT TGC ACA GCA TCA AG
Nup184-5	CTG GGC CTC CAT GTC GCT GGC CGG GTA CAT CTA AGA TCC AAG ACC AAG AG
Nup184-6	CGC TAT ACT GT GTC GAT TCG ATA CTA CTG AAT TGA AGA TTG AGA TGC TG
Nup184-8	GAC <u>TCA TAT</u> GGG TGA TTA TTT ACT CTC
Nup184-9	TAC <u>TGG ATC</u> CAA TAG TCG ATG CCT CCA GC
Nup184-10	AAC GTT GAC GTG CAA TTG AC
Nup184-11	TGG CAT CGA CAA TTC TGT TC
Nup184-12	TCA <u>CTC GAG</u> CAT GGG TGA TTA TTT ACT CTC
Nup184-13	GGT ATC TTC <u>AGA GCT</u> CTT GC
Nup184-14	TCA <u>CTC GAG</u> ATG GGT GAT TAT TTA CTC TC
Nup184-15	TCA <u>GGA TCC</u> TCA AAT AGT CGA TGC CTC C
81EGFPc-1	AGA CTG CAG GTC CAA GAA GTA GTC TCA GA
Nup184-20	TCA <u>CTC GAG</u> TCA AAT AGT CGA TGC CT
Nup184-21	TCA <u>GGA TCC</u> CGA TGG GTG ATT ATT TA
Nup184-22	TCA <u>GGA TCC</u> CGA ACG TTG ACG TGC AA
Nup184-23	TCA <u>GGA TCC</u> CGG ATC AGA GGG CTA GT

Table 3. PCR Primer used in this study (continued)

Name	Sequence (5' → 3')
Nup184-24	GAC TCG AGA TGG TCG ACT TA
Nup184-25	GAC TCG AGA TGT TGC ACA TG
Nup184-26	GGC TCG AGA TGT TTC AAC TT
Nup184-27	ATG GAT CCT CAA TTG AAT CG
Kan-2R	CGC ACG TCA AGA CTG TCA AGG AG
Kan-4F	GCA GTT TCA TTT GAT GCT CGA TG

2. 방 법

2-1. 클로닝을 이용한 GFP 벡터 제조

(1) pREP81X-Nup184-EGFPc 벡터의 제조

pREP81X-EGFPc 벡터의 MCS(Multicloning Site)의 효소 절단부위를 이용하여 *nup184* 유전자의 ORF(Open Reading Frame)와 GFP(Green fluorescence protein) 유전자를 재조합한 플라스미드를 제작하였다. PCR 을 통해 증폭한 유전자 조각은 앞부분에 *Xho*I (5-TAC TGG ATC CAA TAG TCG ATG CCT CCA GC-3)과 끝부분에 *Bam*HI (5-TCA CTC GAG CAT GGG TGA TTA TTT ACT CTC-3) site를 첨가하였다. 벡터는 *Sa*I과 *Bam*HI 절단부위를 이용하여 효소 처리한 후 PCR로 증폭한 유전자 조각과 붙여 클로닝 하였다. *Sa*I과 *Xho*I은 각각의 제한효소가 잘라낸 DNA의 양 가닥 끝이 상보적인 염기서열을 가지고 있어 서로 다른 효소로 잘라내도 이를 붙여 하나의 가닥으로 쓸 수 있으므로(complementary end) 이를 이용하였다. 이러한 방법으로 만들어진 벡터를 이용하여 이를 발현시키면 Nup184 단백질의 C- 말단에 GFP가 발현되어 키메라 단백질이 만들어진다.

(2) pDW234를 이용한 Nup184-GFP 벡터 제조

위에서 제조한 pREP81X-Nup184-EGFPc를 template로 하여 증폭한 가닥을 ARS 시퀀스가 없는 pDW234 벡터의 제한효소 절단부위를 이용하여 삽입(integration) 벡터를 만들었다. 이때 사용된 프라이머는 앞부분에 *Sa*I

(5-GGT ATC TTC AGA GCT CTT GC-3), 끝쪽에 *Pst*I (5- AGA CTG CAG GTC CAA GAA GTA GTC TCA GA-3) site를 첨가하였다. 벡터는 *Sac*I과 *Pst*I 효소 처리한 후 클로닝 하였다. 이렇게 만들어진 벡터를 이용하여 *nup184* 유전자의 C- 말단에 GFP 단백질이 삽입된 균주를 제조할 수 있다.

(3) pZA69u 벡터를 이용한 pZU184, pZU184Δ1~4 벡터 제조

Nup184 단백질의 N- 말단에 GFP가 결합된 Nup184-GFP 벡터를 제조하였다. PCR을 통한 증폭으로 *nup184* 유전자 조각의 5' 말단에 *Xho*I (5-TCA CTC GAG ATG GGT GAT TAT TTA CTC TC-3)과 3' 말단에 *Bam*HI (5-TCA GGA TCC TCA AAT AGT CGA TGC CTC C-3)을 삽입하여 효소처리 하였다. 또한 Nup184 단백질의 C- 말단에 존재하는 SUMO consensus 위치의 역할을 간접적으로 알아보며, 또한 *nup184* 유전자를 부분적으로 삭제하였을 때 미치는 영향을 알아보기 위하여 네 종류의 부분 돌연변이 벡터를 제조하였다. pZU184Δ1 벡터는 5' 말단에 *Xho*I (5-GAC TCG AGA TGG TCG ACT TA-3)과 3' 말단에 *Bam*HI (5- TCA GGA TCC TCA AAT AGT CGA TGC CTC C-3)을 삽입하였으며 효소 절단부위의 바로 뒤에 ATG 코돈을 삽입하여 229번째 아미노산부터 단백질이 만들어지도록 제조하였다. 위와 같은 방법으로 pZU184Δ2 벡터는 5' 말단에 *Xho*I (5-GAC TCG AGA TGT TGC ACA TG-3), 3' 말단은 *Bam*HI (5-TCA GGA TCC TCA AAT AGT CGA TGC CTC C-3)을 삽입하여 481번째 아미노산부터 발현되도록 제조하였다. pZU184Δ3 벡터는 5' 말단에 *Xho*I (5- GGC TCG AGA TGT TTC AAC TT-3), 3' 말단에 *Bam*HI (5-TCA GGA TCC TCA AAT AGT CGA TGC CTC C-3)을 삽입하여 715번째

아미노산부터 만들어지도록 제조하였다. pZU184Δ4 벡터는 5' 말단에 *Xho*I (5-TCA CTC GAG ATG GGT GAT TAT TTA CTC TC-3), 3' 말단에 *Bam*HI (5-ATG GAT CCT CAA TTG AAT CG-3)을 삽입하였으며 1468번째 아미노산의 뒤쪽에 STOP 코돈을 삽입하여 단백질의 발현이 4404번째에서 멈추도록 제조하였다. pZA69u 벡터는 *Sal*I과 *Bam*HI 효소 처리하여 위의 다섯 조합의 유전자 조각과 클로닝 하였다. pZA69u 벡터는 *nmt* 프로모터를 가지며 그 세기는 pREP-3X 벡터와 유사한 것으로 알려져 있으며 uracil 마커를 가지고 있다.

2-2. *E.coli*의 형질전환

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

2-3. *E.coli* Cracking

형질전환으로 벡터가 들어간 균주를 선별하기 위한 방법으로, LA배지에 각 균주를 patch하여 overnight한다. 1.5ml micro tube에 2X loading dye를 15 μ l씩 분주한 후 patch한 배지에서 균을 따내 섞는다. Cell을 잘 풀어준 후 15 μ l 2X Cracking buffer를 첨가하고 tapping한 후 5분간 원심분리 한다. 각 tube에서 10 μ l씩 따내어 1.5% agarose gel에 약 20분간 전기영동 한다.

2-4. DJ-PCR을 이용한 결실 돌연변이 균주의 제조

nup184 유전자가 제거된 돌연변이 균주를 얻기 위하여 DJ-PCR(Double

Joint PCR, Yu et al., 2004)를 이용하였다. 첫번째 반응에서는 *nup184* 유전자 ORF의 5' 방향으로 약 1kb 가량 떨어진 부분과, 치환하고자 하는 *kan^r* 유전자의 ORF 앞쪽과 *nup184* 유전자를 조합한 프라이머를 이용하였다. 또한 3' 방향으로 같은 원리를 적용하여 *nup184* 유전자의 양 끝쪽의 시퀀스를 증폭하였다. 치환할 *kan^r* 유전자의 ORF의 증폭에는 pBGle1-Kan^r 벡터를 이용하였다. 첫번째 반응의 결과물을 정제한 후 각각을 1 : 3 : 1 (5' : *kan^r* : 3')의 비율로 혼합하여 두번째 반응을 진행하여 결손 돌연변이 균주를 만들기 위한 DNA 가닥을 증폭하였다. 이때 만들어지는 결과물들은 다양한 조합으로 섞여있으므로 원하는 가닥보다 약 0.1kb 정도 짧게 되도록 프라이머를 잡아 세번째 반응을 진행하였다.

위의 방법으로 제조된 DNA 가닥을 야생형 균주에 형질전환시켜 얻은 결실 돌연변이는 첫날은 G418을 첨가하지 않은 PMG 배지에 접종하여 약 18시간 정도 배양한 후 G418을 400mg/l의 농도로 첨가한 PMG 배지에 멸균된 벨벳천을 이용하여 찍어낸 후 약 4일간 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 이렇게 제조된 돌연변이는 YES에서 성장이 느린 것을 이용, 배지에 따른 성장 테스트와 PCR로 확인하였다.

2-5. *S. pombe*의 형질전환

*S. pombe*의 형질전환은 Lithium Acetate 방법(Warbrick et al, 1993)으로 수행하였다. 효모를 적정배지에 접종하여 약 12시간 배양한 다음 50 ml에 계대배양하여 $0.5-1 \times 10^7$ cell/ml ($OD_{595} = 0.2 \sim 0.5$) 되도록 배양한다. 세포를 원심분리 하여 10ml의 멸균된 증류수로 세척한 뒤 1×10^9 cell/ml 이 되도록 LiAc/TE(0.1M LiAc, 1X TE)로 풀어준다. 분주한 세포 100 μ l에 형질전환용 DNA 1 μ g, Salmon sperm DNA 4 μ l (10mg/ml)를 섞고 50% PEG 용액

300 μ l을 첨가하여 28 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 이후 42 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 heat shock을 준 후 세포를 선별배지에 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 EMM의 경우 약 4일, YES의 경우 약 2일간 배양하였다. G418 저항성을 갖는 유전자(*kan^r*) 형질전환 실험의 경우, PMG 선별배지에 약 16시간 배양한 후 G418이 첨가된 PMG 배지에 멸균된 벨벳 천을 이용하여 새로운 배지로 옮겨 배양하였다. 이때 G418의 농도는 YES의 경우 100mg/l, PMG는 200~400mg/l의 농도로 사용하였다.

2-6. *S.pombe* Genomic DNA isolation

효모의 chromosomal DNA의 추출은 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)을 사용하였다. 동봉된 버퍼에서 세포를 터뜨리는 작용을 하는 버퍼는 효모의 세포벽을 파괴시키지 못한다. 이를 제거하기 위한 시약은 Kit에 제공되지 않았으므로 다음과 같이 수행하였다.

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

2-7. Spot Assay for Growth

형질전환된 효모의 분열속도를 측정하기 위한 간접적인 방법으로, 효모를 선택배지에 stationary phase로 키운 뒤 2×10^7 cell/ml 이 되도록 농도를

맞춘다. 농도를 맞춘 cell들은 10^3 cell/ml 부터 10^7 cell/ml 까지 순차적으로 희석하였고 고형배지에 $3\mu\text{l}$ 씩 loop를 사용하여 일정간격을 유지하며 동그라미를 그려준 뒤 약 4~5일간 배양한다.

2-8. Western blotting analysis

효모를 50ml의 EMM배지에 exponential phase($2\sim 5 \times 10^6$ cell/ml) 로 키운 뒤 원심분리 한다. Buffer A와 20% TCA(Trichloroacetic acid)로 워싱한 후 $200\mu\text{l}$ 의 20% TCA와 glass bead $500\mu\text{l}$ 를 넣어 섞어준다. Bead beater에 넣어 30초 간격으로 5분 동안 세포를 터뜨린다. 위의 과정에서 각 시간 간격마다 동일한 시간으로 얼음에 두어 튜브 내 온도가 올라가지 않도록 유지시킨다. $400\mu\text{l}$ 의 5% TCA를 넣고 vortex 하여 단백질이 녹아나올 수 있도록 하며 이를 4000rpm의 속도로 15초간 원심분리 한다. 상등액은 새로운 튜브로 옮겨 14000rpm으로 원심분리 하여 침전물만 남긴다. 침전물에 gel loading buffer를 $50\mu\text{l}$ 을 넣고 20분간 vortex 하여 완전히 녹인다. 침전물이 녹은 것을 확인한 후 10분간 끓여준 후 전기영동 한다. 전기영동에 사용된 gel은 6%와 8% SDS-Polyacrylamide Gel이다.

Gel의 바닥부분까지 전기영동이 끝나면 size marker를 기준으로 필요한 부분만을 잘라내어 PVDF membrane으로 약 1시간 동안 40V로 wet transfer한다. Transfer된 membrane은 blocking buffer에 상온에서 30분 동안 처리한 후, primary antibody를 1:2000의 비율로 상온에서 30분간 붙였다. TN-TX 버퍼로 20분 동안 두번 워싱해준 뒤 2차 blocking과 secondary antibody를 같은 시간 동안 처리해준다. 이때 2차 antibody의 농도는 1:10000 이며 처리 후 ECL western blotting kit를 사용하여 밴드를 확인하였다.

2-9 *in situ* hybridization

효모를 $2-4 \times 10^6$ cell/ml의 농도로 배양한 후 30% formaldehyde를 6 ml 첨가하여 45분간 고정시킨다. 이를 0.3M PBS+Glycine 용액으로 워싱 후 spheroplast buffer 에 1×10^7 cell/ml되게 풀어주어 37°C에서 1시간 배양하였다. Poly-lysine으로 코팅된 슬라이드에 SCE 버퍼로 풀어준 cell을 올려놓아 4°C에서 2시간 둔 뒤 -20°C 메탄올에 슬라이드를 2시간 이상 넣어두었다. 메탄올을 완전히 말린 후 2×SSC로 워싱하고 10 μ l의 hybridization solution을 첨가하여 커버글라스를 덮어 37°C에서 overnight하였다. 2×SSC로 상온에서 5분, 이후 상온에서 20분간 워싱하고 37°C에서 20분간 2회 워싱한 후 Fluorescine-Antidigoxigenin Antibody solution을 10 μ l 첨가하여 커버글라스를 덮어 37°C에서 1시간 배양하였다. 이를 2×SSC로 상온에서 15분간 2번씩 워싱하여 말린 후 DAPI mounting medium을 12 μ l 첨가하여 커버글라스를 덮고 밀봉하였다. 이를 형광현미경으로 관찰하였다.

III. 결과

1. Nup184-GFP 균주의 제조와 분석

GFP(Green Fluorescent Protein)는 그 이름에서 알 수 있듯이 녹색 형광을 띄며, 하등 진핵생물인 효모에서부터 곤충, 포유동물에 이르기까지 다양한 종에 걸쳐 발현할 수 있는 약 26.9KDa의 작은 단백질이다. 또한 대상 생물체 내에서 단백질이 만들어졌을 때 독성반응이 없는 것으로 알려져 있으며, 형광을 띄기 때문에 세포나 조직을 파괴하지 않고 관찰할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Robert, 2008).

이를 이용하여 Nup184 단백질의 세포 내 위치추적과 GFP 항체를 이용한 western blotting을 위하여 Nup184-GFP 벡터를 제조하였다.

(1) pREP81X-Nup184EGFPc 벡터의 제조와 형질전환

pREP81X-EGFPc 벡터는 C-말단에 GFP 단백질을 붙일 수 있으며, GFP결합 단백질이 *nmt* 프로모터에 의해 발현된다. *nmt*(No Message in Thiamine) 프로모터는 비타민B₁ (티아민)에 의해 그 발현의 조절이 조절된다. 즉, 배지에 비타민B₁을 넣어주면 발현이 억제되고 비타민B₁을 제거하면 발현이 유도된다.

C-말단에 GFP가 결합된 키메라 단백질을 만들기 위하여 *nup184*의 ORF의 시작부위에서 STOP 코돈 앞부분까지를 PCR를 통해 증폭하였다. *nup184* 유전자는 하나의 인트론을 가지고 있어 이를 제거한 cDNA 클론을 PCR의 주형으로 사용하여 클로닝 하였다(Fig 1A, B). 이렇게 제조한 pREP81X-Nup184EGFPc 벡터를 야생형 균주에 형질전환하여 Nup184-

GFP 단백질의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰한 결과, 핵 막 주위에 점점이 위치하였다 (결과 미제시).

(2) Nup184-GFP 삽입 균주의 제조

nup184::gfp 유전자를 염색체 상의 *nup184* 유전자 위치에 삽입 (integration)하여 자신의 프로모터에 의해 발현되도록 균주를 제조하였다. 앞서 제작한 pREP81X-Nup184EGFPc을 *Pst*I과 *Sac*I으로 절단하여, *nup184* 유전자의 3' 부위의 3248 염기쌍과 연결된 *gfp* 유전자, 그리고 *nmt* 전사종결 부위를 가지는 DNA 절편을 pDW234 벡터에 클로닝 하여 pD184 벡터를 제조하였다. pDW234 벡터는 효모의 ARS(자가복제원점) 서열을 가지고 있지 않아, 염색체 상으로 삽입되지 않으면 세포 내에서 유지되지 않는다. 이렇게 제작된 pD184 벡터를 *nup184* 유전자 내에 존재하는 *Kpn*I 효소로 처리하여 선형(linear) DNA로 만든 다음, 야생형 균주에 형질전환함으로써 상동재조합을 통해 *nup184::gfp* 유전자가 염색체 상의 *nup184* 유전자 위치에 삽입되도록 하였다. 이렇게 제작된 균주가 YES 배지에서 정상적인 성장을 보이는 것으로 보아, Nup184-GFP 단백질이 정상적으로 기능을 하는 것을 알 수 있었다. 또한 이 균주를 형광현미경으로 관찰한 결과, Nup184 단백질이 핵 막에 위치하고 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 1C).

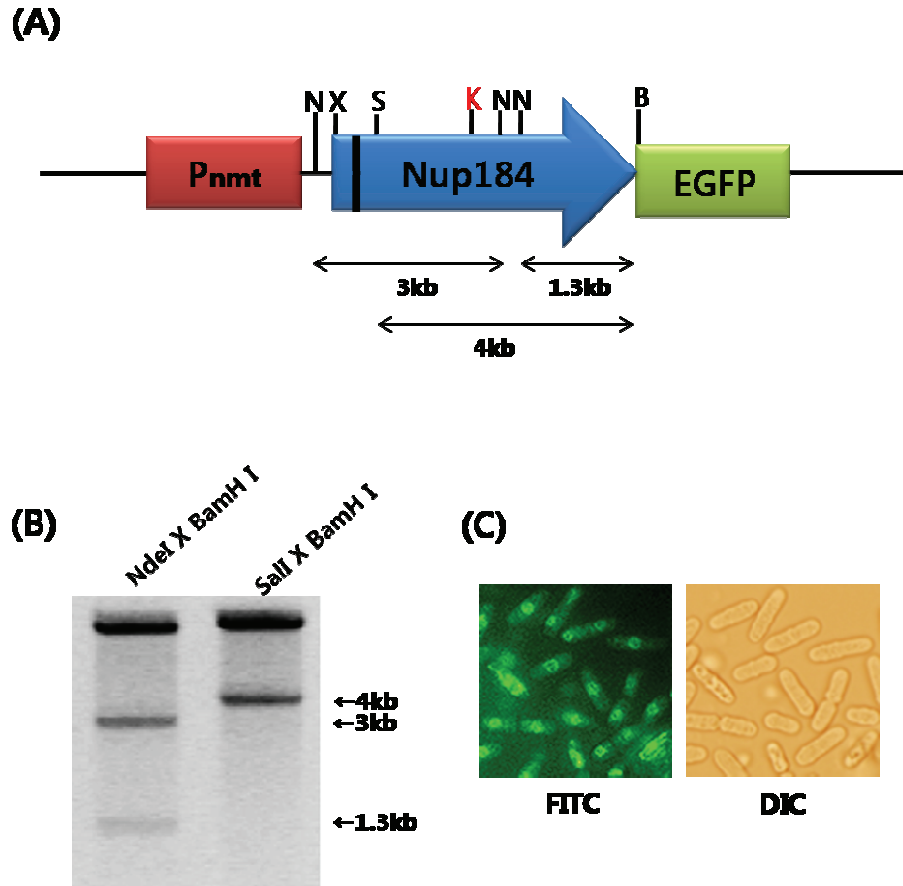


Figure 1. Construction of Nup184p-GFP

(A) Scheme of Nup184p-GFP vector construct. The positions of enzyme digestion sites are indicated by simplified alphabet. B : *Bam*HI, N : *Nde*I, K : *Kpn*I, S : *Sa*I, X : *Xho*I. **(B)** Confirm of pREP81x-nup184-EGFPc vector by restriction enzyme digestion. The size of confirmed enzyme digestion size are indicated by arrows. **(C)** Localization of Nup184p-GFP. Cell were incubated in EMM-L broth medium for 10 hour in B₁ absence condition.

2. *nup184* 결실 돌연변이($\Delta nup184::kan^r$) 균주의 제조

nup184 유전자의 일부분을 제거한 부분결실 돌연변이 벡터의 영향을 보기 위하여 *nup184* 유전자가 *kan^r* 유전자로 치환된 결실 돌연변이를 제조하였다. 앞서 ‘방법’ 에 기술한대로 DJ-PCR을 이용하여 *nup184* flanking 부분과 이어진 *kan^r* 유전자 조각을 증폭하였고, 이를 형질전환 하여 상동재조합을 통한 결실 돌연변이를 얻어내었다.

항진균제인 G418은 합성배지인 EMM 배지에서는 포함된 염(salt)에 의한 저해로 그 효과를 기대할 수 없으므로 복합배지인 YES에서 사용하여야 한다. *nup184* 유전자는 생장에 필수적이지 않으나 유전자가 결실되었을 때 복합배지(YES)에서 그 생장이 야생형 균주에 비해 느리다(Whalen et al., 1999). 그러므로 YES 배지에서는 정확한 결실 돌연변이 균주를 골라내기 어렵게 된다. 이를 해결하기 위한 방안으로 EMM에서의 질소원인 염화 암모늄(Ammonium chloride)을 글루탐산(L-glutamic acid, mono-sodium salt)으로 대체한 PMG 배지를 사용하였다. PMG 배지는 YES 배지에 비해 G418의 작용이 약화되지만 첨가하는 G418의 양을 YES 배지에 비해 약 2~4배를 사용하면, *kan^r* 유전자의 형질전환체를 선별할 수 있었다.

형질전환된 결실 돌연변이 균주는 G418이 첨가된 PMG 배지에서 약 5일만에 콜로니를 형성하였으며 야생형 대조군과 *ura4⁺* 유전자로 치환된 돌연변이 대조군(Whalen et al., 1999)과의 비교를 통해 YES 배지에서의 느린 성장을 확인하였다(Fig. 3). 또한 균주로부터 DNA를 분리하여 PCR을 통해 *nup184* 유전자가 *kan^r* 유전자로 치환된 것을 확인하였다. Fig. 1A에서 보듯이 야생형인 경우는 6.8 kb의 DNA 절편이 증폭되지만, 결실 돌연변이 균주에서는 3.8 kb의 DNA 절편이 PCR 증폭된다. 각 5' 과 3'의 유전자도 확인하였는데 야생형 균주의 경우 증폭이 되지 않았으며, 결실 돌연변이 균주는 약 1 kb의 증폭된 DNA 절편을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B).

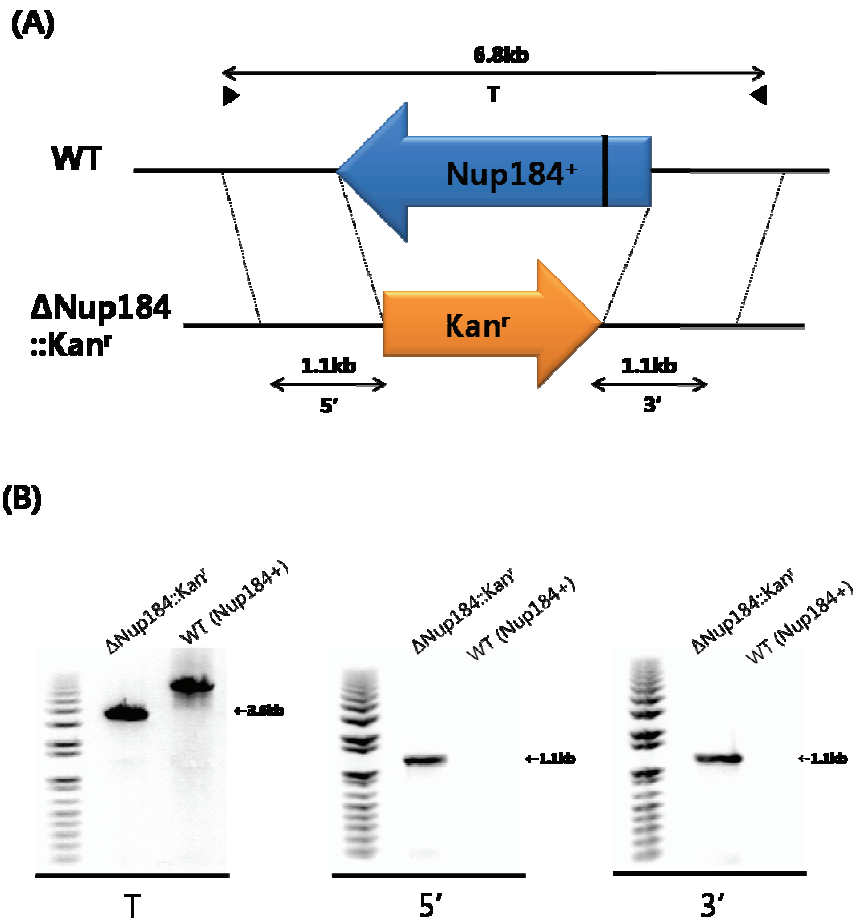


Figure 2. Construction of *nup184* deletion mutant

(A) Scheme of *nup184* deletion mutants. The position of PCR primers for confirm are indicated by arrowheads and predicted sizes of PCR fragments are shown upper direction of arrows. **(B)** Confirm of deletion mutants by PCR. Predicted sizes of PCR fragments are indicated by arrows. DNA isolated from wild type(h^+), null mutants(h^-).

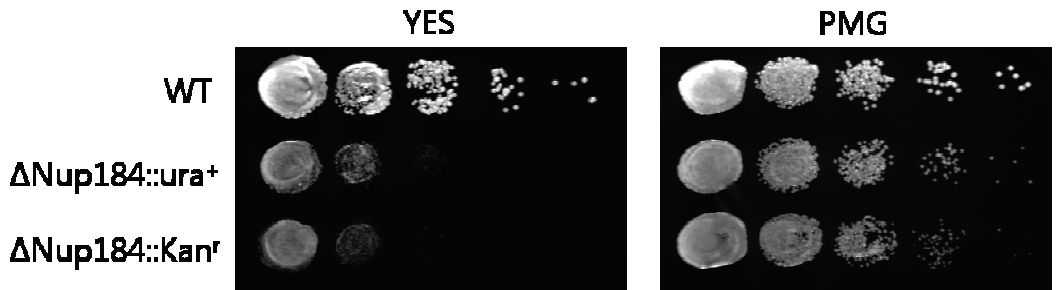


Figure 3. Growth test for *nup184* deletion mutants by Spot assay

The plates were incubated by 3days on nutrient rich medium(YES) and 4days minimal medium(PMG) at 28°. WT is wild type haploid(h⁻) AY217, *Δnup184::ura⁺* null mutant have growth defect on YES(Whalen et al., 1999). *Δnup184::kan^r* null mutant also seen growth defect on YES. PMG medium were thiamine(B₁) absence condition.

3. *nup184* 부분결실 돌연변이 균주의 제조와 분석

(1) *nup184* 부분결실 돌연변이 균주의 제조

Nup184 단백질의 N-말단 혹은 C-말단이 제거되었을 때의 영향을 알아보기 위하여 부분결실 돌연변이 벡터를 제조하여 *nup184* 결실 돌연변이 균주에 형질전환 하였다.

pZU184Δ1~3번은 ‘방법’에 기술한 대로 PCR을 통하여 Nup184 단백질의 N-말단 부분을 제거하였으며, pZU184Δ4번은 C-말단 부분을 제거하였다. 이렇게 제조한 pZU184Δ1은 229번째, pZU184Δ2는 481번째, pZU184Δ3는 715번째 아미노산부터 시작하는 Nup184 단백질을 발현한다. pZU184Δ4의

경우는 1468번째 아미노산의 뒤쪽에 STOP 코돈을 삽입하여 단백질의 C-말단이 결실된 것이다(Fig. 4). 벡터에 삽입될 유전자 절편에는 *XhoI*과 *BamHI*의 제한효소 인식부위를 넣어 벡터의 *SaI*과 *BamHI* 제한효소 인식부위에 클로닝 하였다. 이렇게 얻은 벡터를 *nup184* 결실 돌연변이 균주에 형질전환하여, uracil이 포함되어 있지 않고 비타민B₁이 첨가된 배지에 배양하였다. 이러한 방법으로 제조된 부분결실 돌연변이 균주는 *nup184* 유전자 내에 위치한 SUMO 공통서열 중 각각 1개 혹은 2개가 제거되어 있다(Fig. 4B).

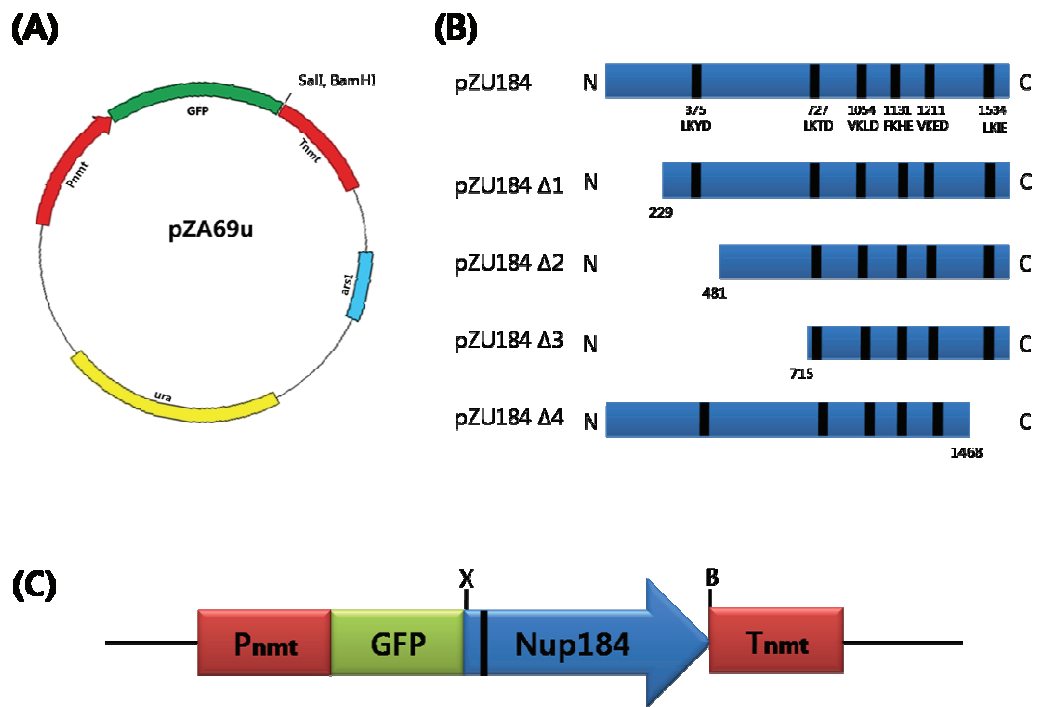


Figure 4. Scheme of *nup184* truncated constructs

(A) Plasmid map of pZA69u vector. Vector have ura⁺ selective marker. **(B)** Scheme of *nup184* truncated vector construct. LKYD(375), LKTD(727), VKLD(1054), FKHE(1131), VKED(1211), LKIE(1534) denotes SUMO consensus sequence. (ΨKXE, where Ψ is a large hydrophobic residue and K the modified lysine, E or D is acidic amino acid) **(C)** Scheme of pZU184 constructs. Simplified alphabet tell restriction enzyme site for this study. X : *Xho*I, B : *Bam*HI.

(2) *nup184* 부분결실 돌연변이 균주의 성장비교

nup184 부분결실 돌연변이가 효모의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. *nup184* 결실 돌연변이는 그 속도가 야생형과 비슷한 EMM 배지에서와 달리, YES 배지에서 야생형에 비해 느린 성장을 보인다(Whalen et al., 1999). 이를 이용하여 YES 배지 내의 성장속도 비교를 통하여 부분적으로 결실된 *nup184* 유전자의 영향을 관찰하였다. 또한 *nup184* 유전자의 과발현이 효모의 성장에 미치는 영향을 알아보았다.

pZU184 의 경우($\Delta nup184::kan^r/pZU184$), 벡터 내에 전체 유전자가 삽입되었기 때문에 YES 에서 그 성장속도는 야생형 균주와 비교하였을 때 저해되지 않았다. 이는 벡터 내 삽입된 유전자가 염색체 내의 결실된 유전자를 상보(complementation)하기 때문이다. 또한 EMM 에서의 성장을 관찰하였을 때 야생형 균주와 비슷한 성장속도를 보임을 확인하였다.

부분결실 돌연변이 균주의 성장정도를 관찰한 결과 YES 배지에서 각각 정도가 다른 성장저해 현상을 보임을 알 수 있었다. 그러나 EMM 배지에서는 pZU184 Δ 2 균주를 제외한 나머지 부분결실 돌연변이 균주의 성장정도가 비슷하게 관찰되었으며 pZU184 Δ 2 균주의 경우 그 성장속도는 야생형 균주와 pZU184 균주의 성장과 비슷했다.

pZU184 Δ 1 균주($\Delta nup184::kan^r/pZU184\Delta 1$)의 경우 YES 배지에서 결실 돌연변이 균주와 마찬가지로 성장저해 현상을 보였으나, 부분적으로 삭제된 유전자의 보완으로 인해 성장저해가 결실 돌연변이 균주에 비해 적었다. EMM 배지에서의 성장은 야생형과 pZU184 균주와 비교하였을 때 약간의 성장저해를 보였으나 YES 배지에서 보이는 저해 현상에 비해 그 정도가 약했다. pZU184 Δ 2 균주($\Delta nup184::kan^r/pZU184\Delta 2$)의 경우 벡터 내 유전자의 보완으로 인하여 YES 에서 성장저해 현상이 일어나지 않았으며,

EMM 배지에서서의 성장 또한 야생형과 비교하여 비슷한 정도를 보였다. pZU184Δ3 균주($\Delta nup184::kan^r/pZU184\Delta3$)의 경우 YES 배지에서 성장저해 효과가 나타났으며 그 정도는 pZU184Δ1 보다 심했다. pZU184Δ4 균주($\Delta nup184::kan^r/pZU184\Delta4$)의 경우 pZU184Δ3 균주에서 보이는 성장저해와 비슷한 정도를 보였다 (Fig. 5, Table 5).

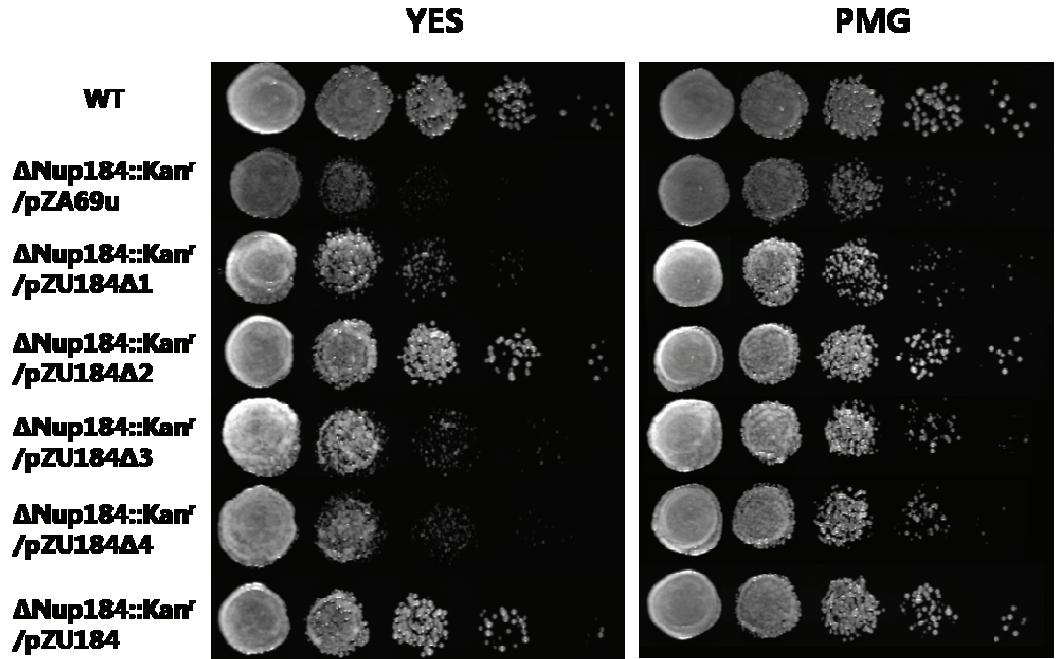


Figure. 5 Growth test of *nup184* truncated mutants by Spot assay

nup184 truncated mutants show growth defect in nutrient rich medium(YES). Mutants were incubated at 28° in YES(4days) and PMG(5days) in absent thiamine. WT is haploid wild type AY217(h⁻). The cell concentration was about 7.0~7.5 X10⁷cells/ml, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ each.

(3) *nup184* 부분결실 돌연변이 균주의 위치추적

위의 균주에서 Nup184-GFP 단백질 발현과 그 위치를 보기 위해 형광현미경 하에서 관찰하였다. 단백질의 과발현이 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 비타민 B₁ 을 약 16 시간 정도 처리한 균주(+B₁)와 비타민 B₁ 을 첨가하지 않고 배양한 균주(-B₁)를 비교하였다. 프로모터의 억제에 의해 +B₁ 에서는 -B₁ 보다 형광의 발현이 감소하여 그 세기는 줄어들었으나 위치의 추적은 보다 더 쉽게 관찰할 수 있었다.

Nup184-GFP 단백질은 핵 표면에 위치하며 그 위치는 NPC(Nuclear Pore Complex)와 유사한 것으로 알려져 있다(Whalen et al., 1999). *nup184* 유전자의 전체 ORF 가 삽입되어 있는 pZU184 균주의 경우 GFP 단백질이 NPC 의 표면에 위치하고 있는 것을 확인할 수 있었다. +B₁ 의 경우 thiamine 에 의한 프로모터의 억제에 의해 형광의 세기가 -B₁ 에 비해 강하지 않으나 그 위치는 pREP81X-Nup184GFP 와 비교하였을 때 동일한 위치임을 확인하였으며, Nup184 단백질의 N- 과 C-말단 양쪽에 GFP 를 붙여도 그 위치에는 변함이 없음을 발견하였다(Fig. 1C, Fig. 6a). +B₁ 에서는 세포의 길이가 정상세포보다 약 3 배정도 길어진 형태로 관찰되었는데 이는 과발현에 의한 것으로 추정된다(Fig. 6b). pZU184 Δ1 의 경우 +B₁ 의 결과를 통해 핵 표면에 위치하고 있음을 확인하였다(Fig. 6-c). 그러나 그 위치는 pZU184 에 비하여 불완전하며 모든 세포가 균일하게 핵 표면에 위치하고 있는 것은 아니었다. pZU184Δ2 의 경우 형광의 발현이 pZU184Δ1, 4 보다 강하여 억제되더라도 핵 표면에 위치하고 있는 것이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 6e). pZU184Δ3 의 경우 +B₁, -B₁ 두 가지 모두 세포 전체로 형광이 퍼져있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 6g, h). 이는 잘려져 나간 부분이 Nup184p 의 위치결정에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 또한

pZU184 Δ 4 의 경우 +B₁ 에서는 thiamine 에 의한 억제에 의하여 형광의 발현이 현저히 감소하여 관찰이 어려웠다. 또한 -B₁ 조건에서는 세포마다 형광의 발현이 다양하게 관찰되었으며 몇몇 세포는 형광을 띄지 않는 것을 발견하였다(Fig. 6i, j). 대조군으로 사용된 pUZ184GFP (Whalen et al., 1999) 벡터는 *nmt* 프로모터를 가지고 있지 않으며 본래의 유전자 발현 정도를 가지는 벡터이다. 이 균주를 +B₁ 과 -B₁ 에서 관찰하였을 때에 각각의 조건에서 GFP 의 발현 정도와 Nup184-GFP 의 위치가 변함이 없음을 확인하여 결실돌연변이 균주의 유전자 과발현에 대한 대조군으로 사용하였다(Fig. 6k, i).

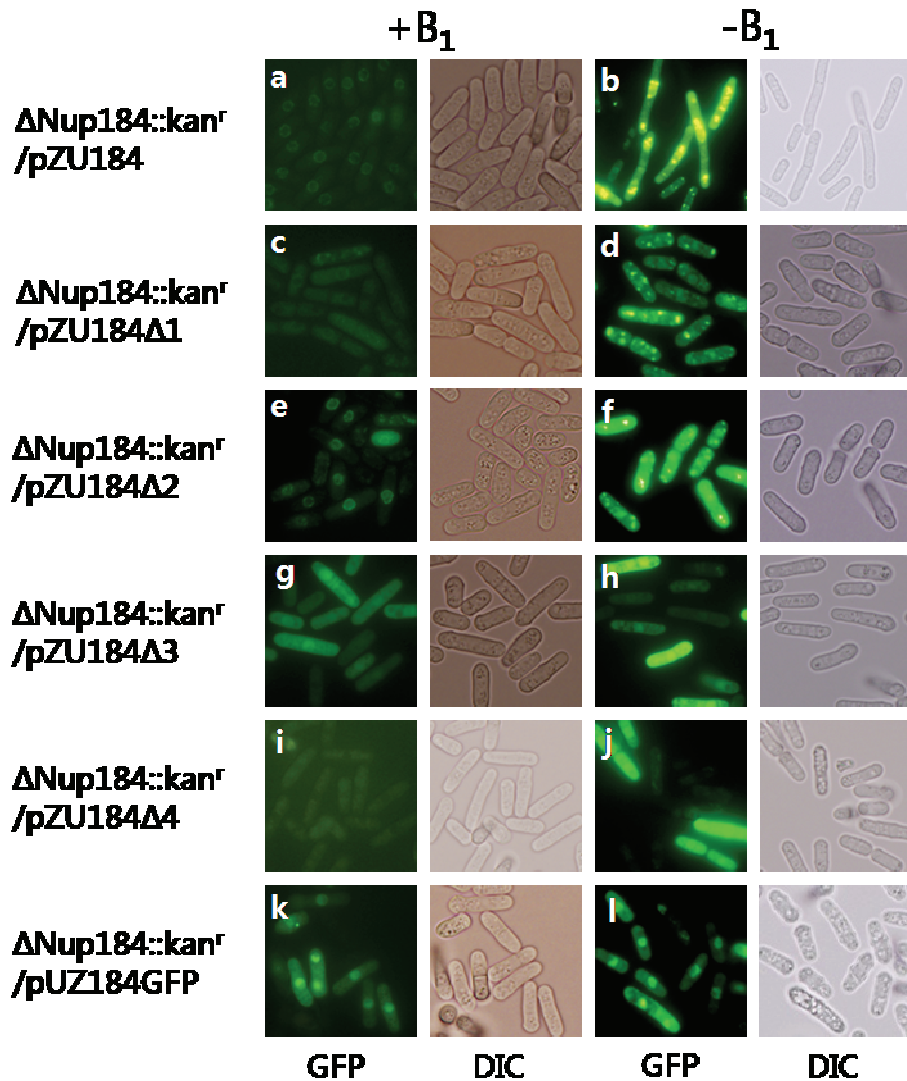


Figure.6 Localization of Nup184p-GFP fusion proteins

The ΔNup184::kan^r mutants transformed by pZU184Δ1~4 and pZU184, pUZ184. GFP was fused to Nup184p at the N terminus (except pUZ184GFP, C'). GFP is localized at the Nup184 locus (a,c,e,k) but, truncated strain is diffused to cytoplasm (g,i). the mutants were incubated absence or presence B₁ about 16hours each in EMM medium.

4. Nup184 단백질의 SUMO 변형 조사

nup184 유전자는 SUMO(Small Ubiquitin like Modifier) 인식 모티브인 SUMO consensus 서열 (Ψ KXE)을 가지고 있다. 여기서 Ψ 는 커다란 소수성 잔기를 의미하고, K는 SUMO와 결합하는 lysine을, X는 모든 아미노산을 의미하며, E 혹은 D는 산성의 잔기를 의미한다. SUMO(Small-Ubiquitin like Modifier)는 약 12kDa의 작은 펩티드로써 단백질의 변형과 안정화, 핵-세포질의 물질교환, 전사의 조절 등 세포 내의 많은 역할을 하는 단백질이다.

이러한 SUMO consensus 서열은 Nup184 단백질의 SUMO 변형의 단서가 되며 이를 알아보기 위하여 효모 균주로부터 단백질을 추출하여 western blotting을 수행하였다. 이에 부분 결실 돌연변이 균주와 전체 ORF가 삽입된 결실 돌연변이를 사용하였다. Western blotting에는 polyclonal GFP 항체와 ECL(Enhanced Chemi-luminescence labeling and detection)키트를 사용하여 그 밴드의 패턴을 확인하였다.

위의 ‘방법’에 기술한대로 단백질의 추출에 TCA(Trichloroacetic acid)를 이용하였다. Bead beater를 이용하여 세포를 파괴할 때 SUMO 단백질이 SUMO deconjugation 효소에 의해 제거(deconjugation)되어 그 변형의 유무를 파악하기 힘들기 때문에 TCA를 첨가하여 세포로부터 추출된 단백질은 즉시 응집되어 덩어리를 형성하도록 하였으며 이를 다시 녹여내어 변형된 단백질을 얻었다.

Nup184 유전자는 각각 375(LKYD), 727(LTKD), 1054(VKLD), 1131(FKHE), 1211(VKED), 1534(LIKE)번째 서열에 SUMO 단백질과 결합할 수 있는 서열을 가지고 있다.

pZU184 균주의 경우 Nup184 단백질의 알려진 크기 176.9KDa과 GFP의 크기 26.9KDa을 더한 값인 203.8KDa에 근접한 밴드를 바탕으로 하여 약

250KDa이상의 크기까지 밴드가 끌리는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7B, Lane 6). pZU184 Δ 1 균주의 경우 마찬가지로 위쪽으로 끌리는 밴드를 관찰하였으며 그 크기는 약 180KDa~으로 추정된다. pZU184 Δ 2 균주 또한 위로 끌리는 밴드를 관찰할 수 있었으며 약 150 kDa으로 그 크기가 예상된다. pZU184 Δ 3, 4 균주의 경우 계산된 값이 아닌 본래의 GFP 단백질의 크기와 유사한 크기에서 밴드가 관찰되었으며, 단일 밴드가 아닌 위쪽으로 끌리는 패턴을 보였다(Fig. 7B, Lane 4, 5). SUMO 변형의 대조군으로 사용된 Gle1-GFP 균주의 경우 계산된 값인 83.1 kDa에 근접한 밴드가 감지되었으며 단일 밴드만이 관찰되어 단백질의 변형이 일어나지 않음을 알 수 있었다(Fig. 7B, Lane 7).

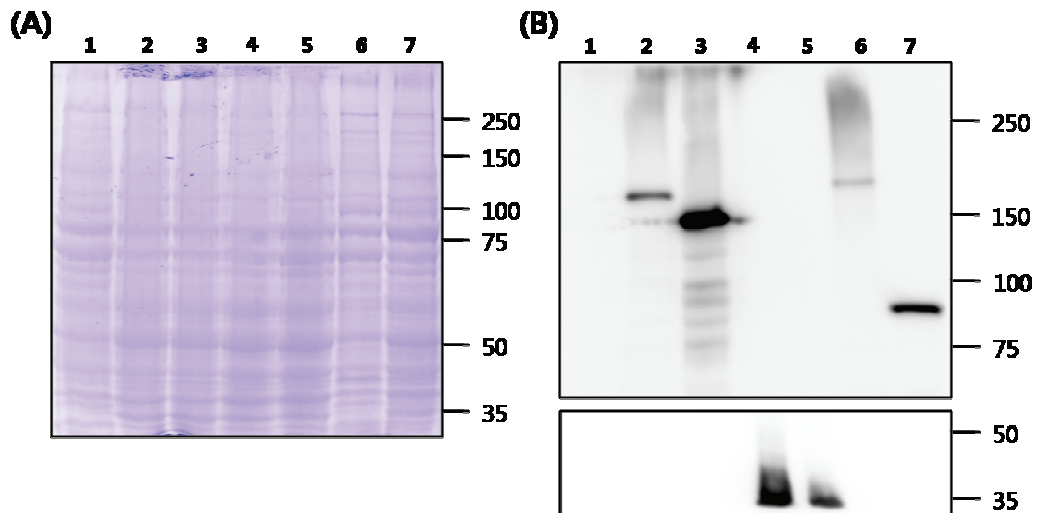


Figure. 7 SUMO modification of Nup184p-GFP

(A) poly-acryl amide gel were stained with coomassie brilliant blue. 8% gel. Lane 1. Δ Nup184::Kan^r, Lane 2. Δ Nup184::kan^r/pZU184 Δ 1, Lane 3. Δ Nup184::kan^r/pZU184 Δ 2, Lane 4. Δ Nup184::kan^r/pZU184 Δ 3, Lane 5. Δ Nup184::kan^r/pZU184 Δ 4, Lane 6. Δ Nup184::kan^r/pZU184, Lane 7. Δ Nup184::kan^r/Gle1-GFP. (B) SUMO modification of Nup184p-GFP by Western blotting.

5. *nup184* 돌연변이 균주의 mRNA export 결함 조사

nup184 유전자가 mRNA export에 미치는 영향과, 부분적으로 결실되어 벡터에 삽입된 유전자의 염색체 유전자 보완 정도를 알아보기 위하여 *in situ* hybridization을 통해 *nup184* 돌연변이 균주의 Poly(A)⁺RNA 분포를 조사하였다(Fig. 8).

Δnup184::kan^r 결실 돌연변이 균주의 경우 *ura4⁺* 유전자로 치환된 결실 돌연변이 균주와 마찬가지로 복합배지(YES)에서 Poly(A)⁺RNA가 핵 내에 머물러 있는 mRNA export defect를 보였다. 또한 B₁이 포함된 최소배지(EMM+B₁)에서도 결함을 보였으나 그 결함 정도는 복합배지에 비해 약했다.

부분결실 돌연변이 균주에서의 mRNA export 결함 여부와 벡터 내 유전자의 염색체 유전자 보완을 조사하였다. 모든 부분결실 돌연변이 균주는 공통적으로 YES 배지에서 mRNA export에 결함을 보였으며, B₁이 포함된 EMM 배지에서 또한 결함을 보여 *nup184* 결실 돌연변이와 공통적인 현상이 관찰되었다. 그러나 각 균주마다 삽입된 *nup184* 유전자의 길이의 차이로 인해 염색체 유전자의 보완에 있어 차이를 보였다(Fig. 8, Table. 5)

pZU184Δ1 균주는 pZU184Δ3, 4 균주에 비해 YES 배지에서 mRNA export 결함이 적게 관찰되었으나 pZU184Δ2 균주와 비교하였을 때 결함을 보이는 세포의 비율이 높았다. pZU184Δ2 균주는 다른 부분결실 돌연변이 균주에 비해 적은 결함을 보이지만 전체 ORF가 삽입된 pZU184 균주에 비해서는 많은 수의 mRNA export 결함을 보였다(Fig. 8, Table 5).

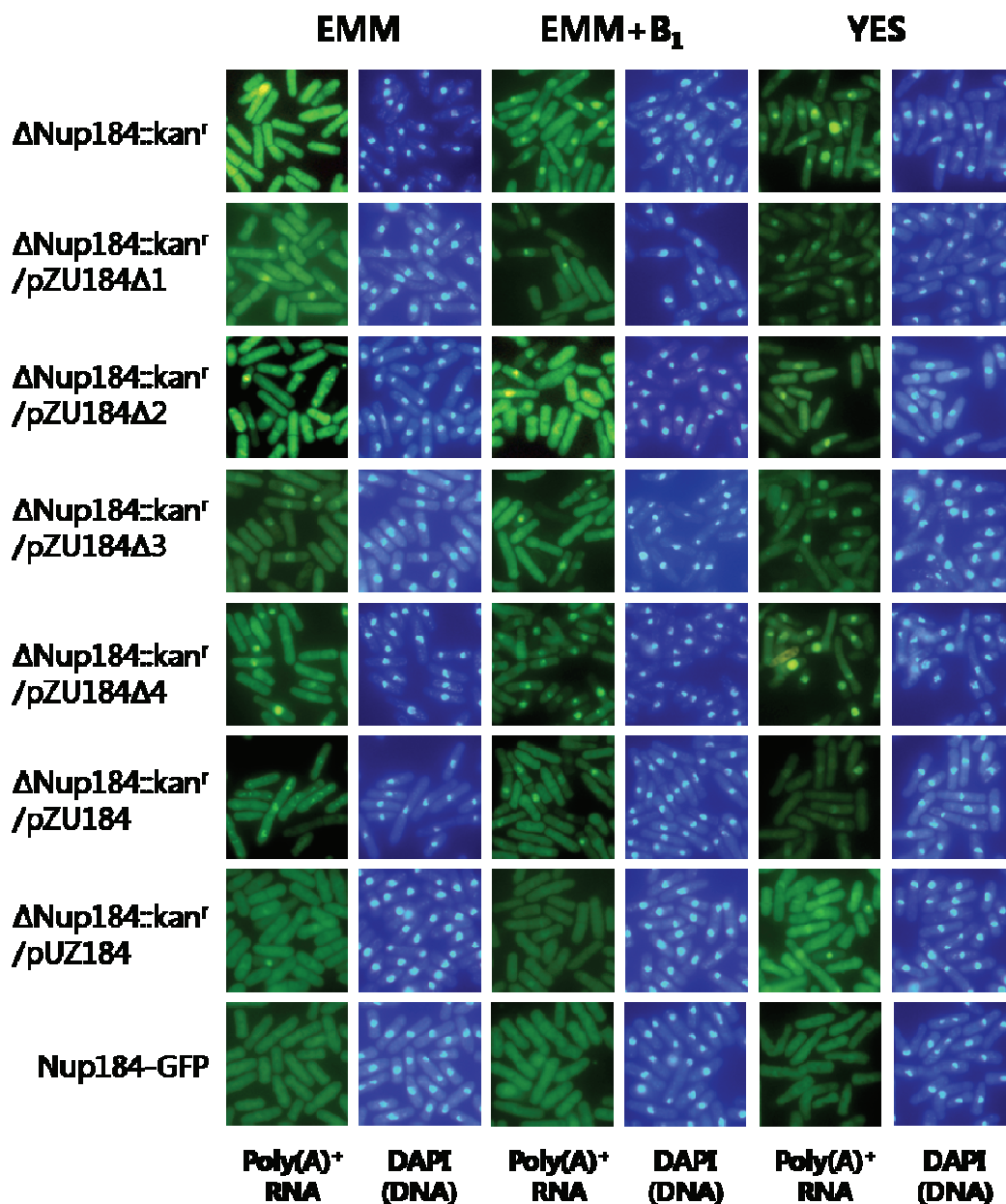


Figure. 8 Poly(A)⁺ RNA localization of *nup184* mutants

Poly(A)⁺ RNA localization by In situ hybridization. Mutants incubated EMM absence(-B₁), EMM added B₁ and nutrient rich medium(YES) about 18 hours.

Table. 5 Summary of *nup184* truncated vector complementation

	Growth Rate (EMM)	Growth Rate (YES)	SUMO Modification	mRNA export defect
<i>ΔNup184::karf</i>	+	+	N.d*	++
pZU184 Δ 1	+	++	+	++
pZU184 Δ 2	++	+++	+	+
pZU184 Δ 3	+	++	N.d*	+++
pZU184 Δ 4	+	++	N.d*	+++
pZU184	++	+++	+	-

(*N.d : Not determined)

Summarize this study one table. Each columns were indicated in Figure. 4, 5(growth rate), Figure. 7(SUMO modification), and Figure. 8(mRNA export).

IV. 토의

nup184 유전자는 생장에 필수적이지는 않지만 mRNA export에 영향을 미치는 중요한 필수 유전자인 *rae1*과 합성치사(synthetic lethality)를 보이며 결실 돌연변이는 핵 안에 RNA가 축적되어 있는 mRNA export defect 현상을 보인다(Whalen et al., 1999). 또한 *nup184* 유전자 염기서열의 분석을 통해 C' 말단에 SUMO가 결합되는 SUMO consensus 서열이 존재함을 발견하였으며, 이 서열의 앞쪽에 STOP 코돈을 삽입하여 생성한 돌연변이인 Nup184-1p의 세포 내 위치가 핵 표면에 위치하지 않고 세포질로 퍼져있음이 관찰되었다(Whalen et al., 1999).

nup184 유전자의 SUMO 변형과 mRNA export에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *kar^r* 유전자로 치환된 결실 돌연변이 균주를 제조하였다(Fig. 2). 이 균주는 *ura4⁺* 유전자로 치환된 돌연변이 균주와 마찬가지로 YES 배지에서 성장저해를 보였으며 mRNA export 결함을 보였다(Fig. 3, 8).

또한 *nup184* 유전자 내에 존재하는 SUMO consensus 서열의 역할과, 유전자가 부분적으로 결실되었을 때 효모에 미치는 영향을 알아보기 위해 네 종류의 부분결실 돌연변이 균주를 제조하였다. *nup184* 유전자에 존재하는 SUMO consensus 서열 중 C-말단에 존재하는 1535번째의 KIE 서열이 *nup184* 유전자의 위치결정과 SUMO 변형에 중요한 역할을 할 것이라고 가정하여 pZU184Δ4 벡터를 제조하였으며, 단백질의 N-말단이 제거되었을 때의 효과를 보기 위하여 pZU184Δ1~3 벡터를 제조하였다(Fig. 4).

앞서 기술한 '방법'대로 제조한 부분결실 돌연변이 균주의 성장속도와 SUMO 변형 유무, mRNA export의 결함을 관찰하였다.

pZU184Δ1 균주는 Nup184 단백질의 1~228번째 아미노산이 제거되어 229번째 아미노산부터 만들어진다. 균주의 성장속도는 PMG 배지에서는 결실

돌연변이 균주(*Δnup184::kar1*)에 비교하였을 때 비슷한 정도를 보였으며, YES 배지에서는 보다 빠른 성장을 보였다. 그러나 야생형 균주와 비교하였을 때 YES에서의 성장저해 현상은 여전히 나타났다(Fig. 5). 그리고 N' 말단에 위치한 GFP를 이용한 위치추적에서 과발현을 억제하기 위해 B₁을 첨가하여 배양한 결과, 단백질이 핵의 표면에 위치하고 있는 것이 관찰되었으나 그 정도는 불완전한 것으로 여겨진다(Fig. 6c). B₁을 첨가하지 않고 배양하여 관찰하였을 때는 세포질 전체로 퍼져있었으며, 점점이 관찰되는 단백질들이 관찰되는 등 과발현에 의해 정확한 위치추적이 어려웠다(Fig. 6-d) 또한 SUMO 변형 유무를 조사하였을 때 계산된 값인 약 180 kDa의 밴드와 그 위쪽으로 약 250 kDa 이상의 크기까지 끌리는 밴드가 확인되었다(Fig. 7 Lane 2). 이는 단백질의 SUMO 변형을 암시한다. 또한 mRNA export의 결함여부를 조사하였을 때 YES 배지와 EMM+B₁에서의 mRNA export 결함을 보이는 세포의 비율이 결실 돌연변이 균주보다 적게 관찰되었다(Fig. 8).

pZU184Δ2 균주의 경우 단백질의 481번째 아미노산부터 발현되며, 그 성장은 야생형 균주와 비슷한 정도를 보였다. 이 균주는 YES 배지에서 성장저해 현상을 보이지 않았으며 *nup184* 유전자의 전체 ORF가 삽입된 pZU184 균주와 유사한 성장패턴을 보였다(Fig. 5). 또한 이 균주의 위치추적 결과 B₁이 첨가된 배지에서 관찰하였을 때 핵 표면에 위치하는 뚜렷한 링 모양이 관찰되어 이 단백질이 NPC에 위치하고 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6-e). SUMO 변형의 유무 조사에서도 계산된 단백질 크기인 약 150kDa~의 밴드가 관찰되었으며, pZU184Δ1과 마찬가지로 약 250kDa이상의 크기까지 끌리는 패턴을 관찰할 수 있었다(Fig. 7 Lane3). 이 균주의 mRNA export 결함 조사에서는 결실 돌연변이 균주와 비교하였을 때 결함을 보이는 균주는 현저하게 감소하였으며, 그 정도는 pZU184 균주와 비슷하게 관찰되었다(Fig. 8).

pZU184Δ3~4 균주의 경우 각각 pZU184Δ 3의 경우 715번째부터 발현되

며, pZU184Δ4의 경우는 1468번째 아미노산에서 그 발현이 멈춘다(Fig. 4). 두 균주의 성장은 PMG 배지에서는 결실 돌연변이 균주와 비슷한 정도를 보였으며, YES 배지에서의 성장저해 현상은 pZU184Δ1 보다는 강하나 결실 돌연변이 균주에 비해서는 약간 빠른 정도를 보였다(Fig.5, Table. 5) 또한 단백질의 위치를 추적해본 결과 +B1과 -B1의 조건 모두 형광이 세포질 전체로 퍼져있어 핵 표면의 NPC에 위치하지 않음이 확인되었다(Fig. 6g, h, i, j). 그리고 이 두 균주의 SUMO 변형 조사 결과 예상된 크기가 아닌, 약 35 kDa 이상의 끌리는 밴드패턴을 확인하였다(Fig. 7 Lane 4, 5). 또한 mRNA export 결함을 조사하였을 때 YES 배지에서 poly(A)⁺ mRNA가 핵 안에서 세포질로 빠져나가지 못하는 것을 확인하였다(Fig. 8).

위의 ‘결과’를 통해 부분적으로 결실된 *nup184* 유전자는 pZU184Δ2 균주를 제외한 나머지 균주에서 알려진 Nup184 단백질의 위치인 핵 표면에 자리하지 못하며, mRNA export에 결함을 보임을 알았다. 그러나 SUMO 변형의 유무를 살펴보았을 때 두 균주(pZU184Δ3, pZU184Δ4)를 제외한 나머지 균주에서는 SUMO 변형으로 추정되는 밴드 끌림 패턴이 확인되었다. 이는 결실된 염색체 유전자를 벡터에 부분적으로 삽입된 유전자가 보완하지 못했거나 그 정도가 미미하기 때문인 것으로 여겨진다.

본 실험 결과를 통해 *nup184* 유전자가 부분적으로 결실되었을 때 단백질의 위치결정과 mRNA export에 영향을 미친다는 것을 알게 되었다. 그러나 정확히 Nup184 단백질의 어느 부분이 그 역할을 하고 있는지는 아직 명확하지 않다. pZU184Δ2 균주는 pZU184Δ1 균주보다 유전자의 삭제된 부분이 더 많음에도 불구하고 결실 돌연변이 균주와 비교하였을 때 전체 ORF가 삽입된 pZU184 균주와 모든 실험결과에서 비슷한 양상을 보였다. 이는 벡터 내에 삽입된 유전자 조각이 결실된 염색체 유전자의 공백을 보완했음을 의미한다. N-말단의 SUMO 공통서열과 Nup184 단백질이 부분적으로 삭제되었음에도

불구하고 염색체 유전자의 보완이 잘 되었다는 것은, Nup184 단백질의 SUMO 변형은 N-보다 C-말단이 더 강하게 관련되어 있음을 암시한다. 또한 SUMO 공통서열의 Ψ 은 큰 소수성 잔기를 의미하는데 *nup184* 유전자 내에 존재하는 consensus 서열로 추정되는 부분은 총 6부분이다. 그러나 6종류의 서열 전부와 SUMO 단백질이 결합하는지는 아직 밝혀지지 않았으며, 위 서열의 소수성 아미노산은 각각 L(루신), V(발린), F(페닐알라닌)의 세 종류이며 이들 중 페닐알라닌의 크기가 가장 크다. 또한 페닐알라닌을 가지는 consensus 서열은 Nup184 단백질의 C-말단인 1131번째 아미노산이다. 이를 근거로 하여 Nup184 단백질의 SUMO 변형에는 C' 말단이 관여하는 것으로 추정되고 있다.

pZU184 Δ 3 균주의 경우 예상된 크기보다 짧은 길이의 단백질이 확인되었는데 이는 GFP 단백질의 크기와의 차이를 보였다. 이는 부분적으로 삭제된 Nup184 단백질의 영향으로 전체 단백질의 모양이 크게 변화하여, SUMO 변형기작이 아닌 분해 기작으로 진행되었을 가능성을 고려할 수 있다. 또한 pZU184 Δ 4 균주의 경우 C-방향으로 가장 말단의 SUMO consensus 서열이 삭제되었는데 이 단백질의 세포 내 위치가 제대로 이루어지지 않는 점과 세포 성장과 mRNA export에 있어 보완현상을 전혀 보이지 못하는 점 등을 미루어 볼때 Nup184 단백질의 C-말단부분이 단백질의 전체적인 구조와 기능면에 있어 중요한 역할을 하고 있을 것으로 추정된다. 그러나 pZU184 Δ 3, pZU184 Δ 4 균주의 경우 SUMO 변형의 조사 결과 계산된 단백질 크기가 나오지 않아 결과가 명확치 않으며 이는 추후 연구 방향의 결정에 검토해야 할 점으로 남아있다.

참 고 문 헌

Alaron L., Rachael F., and Mark H. 2007. A nuclear envelope protein linking nuclear pore basket assembly, SUMO protease regulation, and mRNA surveillance. *J. Cell Biol.* 178: 813–827.

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

Caspari T., Dahlen M., Kanter–Smoler G., Lindsay H.D., Hofmann K., Papadimitriou K., Sunnerhagen P., and Carr A.M.. 2000. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA–Related Protein That Associates with Rad1 and Rad9. *Mol. Cell Biol.* 20: 1254–1262.

Cronshwa, J.M., A.N. Krutchinsky, W. Zhang, B.T. Chait, and M.J. Matunis. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158: 915–927.

Deborah L. Taylor, Ho J.C., Oliver A., and Watts F.Z.. 2002. Cell–cycle–dependent localisation of Ulp1, a *Schizosaccharomyces pombe* Pmt3 (SUMO)–specific protease. *J. Cell Sci.* 115: 1113–1122.

De Souza, C.P., Osmani, A.H., Hashmi, S.B., and Osmani, S.A. 2004. Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in

Aspergillus nidulans. *Curr. Biol.* 14: 1973–1984.

Fahrenkrog, B., Maco, B., Fager, A.M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K.S., and Aebi, U. (2002). Domain-specific antibodies reveal multiple site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* 140 : 254–267.

Forsburg SL. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21(12): 2955–2966.

Fried H., and Kutay U. 2003. Nucleocytoplasmic transport: Taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1659–1688.

Köhler A., and Hurt E.. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* 8: 761–773.

Lewis A., Felberbaum R., and Hochstrasser M.. 2007. A nuclear envelope assembly, SUMO protease regulation, and mRNA surveillance. *J. Cell.* 178: 813–827.

Mahajan R., Delphin C., Guan T., Gerace L., and Melchior F. 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell.* 88(1): 97–107.

Matunis M.J., Coutavas E., and Blobel G.. 1996. A novel ubiquitin-like

modification modulates the partitioning of the Ran-GAPaseactivating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 135: 1457–1470.

Miura K., Jin J.B., and Hasegawa P.M. 2007. Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 495–502.

Moon D., Bae J.A., Cho H.J., and Yoon J.H. 2008. The fission yeast homologue of Gle1 is essential for growth and involved in mRNA export. *J Microbiol.* 46(4): 422–428.

Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetics analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194: 795–823.

Paulillo, S.M., Phillips, E.M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K.S., Powers, M.A., and Fahrenkrog, B. 2005. Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J. Mol. Biol.* 351: 784–798.

Rachel A.C., Dominic J.F.G, Katherine S.S., Richard E.R, Iain M.H., and Antony M.C. 1998. Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosacchromyces pombe*. *GENE.* 221: 59–68.

Robert F. Service, 2008. NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY : Three Scientists Bask in Prize's Fluorescent Glow. *Science*. 322(5900): 361.

Ronald T. Hay. 2005. SUMO : A History of Modification. *Mol. Cell*, 18: 1–12

Rout, M.P., and Wentte, S.R. 1994. Pores for thought: Nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4: 357–365.

Rout, M.P., J.D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148: 635–651.

Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (Third Edition). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N. Y., USA.

Stewart M. 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(3):195–208

Tang Z., Hecker C.M., Scheschonka A., and Betz H.. 2008. Protein interactions in the sumoylation cascade: lessons from X–ray structures. *FEBS J.* 275(12):3003–15

Tran E.J., and Wentte S.R. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on

the edge. *Cell*. 125(6): 1041–53.

Whalen W.A., Yoon J.H., Shen R., and Dhar R.. 1999. Regulation of mRNA export by nutritional status in fission yeast. *Genetics*. 152(3): 827–838.

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

Abstract

The study on SUMO modification of nucleoporin Nup184p and its effect on mRNA export.

Cho Hyun Jin

Department of Biology

Graduate School

Sungshin Women's University

nup184 gene contains one intron and encode a 1629 amino-acid protein with predicted molecular weight of 176.9KDa. We constructed *nup184* null and truncated mutants in fission yeast *Schizosaccharomces pombe*. These mutants are not essential for growth, but show severe growth retardation in nutrient-rich medium (YES).

Nup184 protein has 6 putative SUMO consensus sequences known to be conjugated by SUMO (Small ubiquitin like modifier). SUMO is small peptide composed of 97 amino-acid, and is able to SUMO can bind target protein by enzyme cascade pathway.

We constructed 4 kinds of *nup184* truncated mutants. These truncated constructs were transformed into *nup184* null mutants, and checked whether they could complement the growth retardation in nutrient rich medium (YES), mRNA export defects, localization, and SUMO modification.

Among of these mutants, pZU184Δ2 could complement *nup184* null

mutants comparable to wild type. pZU184 Δ 2 strain show not only normal growth in nutrient rich medium (YES) and poly(A)⁺ RNA distribution, but also SUMO modification pattern.

These results suggest that the nup184 SUMO consensus sequence is not only involved in Nup184p localization but also mRNA export.

감사의 글

시간은 화살과 같다는 말이 생각납니다. 실험실에 막 들어간 학부 시절이 어제 같은데 아직 한참 남았을 것 같은 대학원 생활은 끝을 향해 달려가고, 이렇게 감사의 글을 쓰고 있자니 감회가 새롭습니다. 미생물학 연구실에서의 2년반은 짧다면 짧은 시간이었겠지만 많은 배움과 경험을 할 수 있었던 날들이었습니다.

먼저 여러모로 많이 애써주신 윤진호 교수님께 감사 드립니다. 뒤에서 조용히 신경 써 주시고 끌어주신 많은 가르침 잊지 않고 사회에서도 잘 살아가겠습니다. 또 바쁜 시간을 내어 논문 심사를 해주신 인제대 김연수 교수님께도 감사 드립니다.

생물학과 학부 시절부터 많은 가르침을 주신 배인하 교수님, 오용자 교수님, 김진일 교수님, 박경숙 교수님, 강혜순 교수님, 전용필 교수님, 김인순 교수님께도 감사 드립니다. 또한 대학원 강의를 맡아주신 이승복 교수님, 이성진 교수님, 윤부현 교수님 감사 드립니다. 정부희 선생님, 김아영 선생님께도 감사 드립니다. 힘들고 막막할 때 좋은 말씀 많이 해주시고 힘이 되어주셨어요.

우리 미생물학 연구실 식구들 너무 고마워요. 유종의 미는 거두지 못했지만 학부때 많은 실험을 가르쳐준 숙희언니, 그리고 큰언니 순임언니, 지혜언니, 지영언니...그리고 미방의 영원한 비타민 덕경언니! 학부 때부터 많이 챙겨주시고 예뻐해 주셨죠. 언니랑 지냈던 시간들이 얼마나 즐거웠는지 몰라요. 논문 심사때 정말 감동이었어요. 그리고 2년반 동안 동고동락한 진아선배. 후배 시집살이 하느라 고생 많았지. 옆에서 지내면서 배운게 한두 가지가 아닌 것 같아. 꼭 멋진 선생님이 되어서 활약해주길 바래. 동그라미야, 잔소리 심한 선배 시집살이 하느라 얼마나 힘들었니. 난 사람들 시집살이만

시키는 것 같아. 너 두고 졸업할거 생각하니까 너무 걱정돼. 남은 1년 동안 잘 하고 열심히 달려보아. 난 너 없었으면 정말 논문 못냈을 거 같아.

그리고 우리 아이들, 금옥이, 지선이, 유정이, 리지, 뽀지, 보영이, 으뜸이, 애리! 실험실에 찾아오는 너희들을 볼 때마다 피로가 풀리곤 했어. 애리야 언니들 챙겨주고 매번 올 때마다 큰 웃음을 선사해줘서 고마워. 너와 동그라미의 만담과 장난을 잊지 않을게.

논문 쓴다고 생일도 제때 못 챙겨줘서 미안한 나의 베스트 보운이, 정은이. 언제나 내편에 서서 목소리 높여주고 이야기 들어주고...우리 우정 영원히 변치말자. 내가 항상 고마워하고 사랑하는거 알지? 그리고 언제나 바쁜 일상에 치여 사는 우리 상희. 내가 자주 곁에 있어주지 못해서 미안해. 조금만 더 올라가면 정상이 보일 거야. 그땐 웃으면서 내려오자 힘내. 그리고 잘 연락하지도 않는 날 챙겨주는 신혜. 고등학생 땐 내가 맨날 예민하게 굴어서 싸웠던 것 같은데 넌 항상 날 챙겨주곤 했지. 너무 고마워. 나의 소울메이트 우리 밥! 졸업작품 마감에 쫓기느라 힘들었을 텐데 날 더 응원해주고... 난 너의 영원한 여신님이 되겠어! 그리고 옆에서 많이 응원해준 은선이, 누님, 학부 졸업식때 와준 규한군도 고마워요.

영원한 나의 응원단 엄마, 아빠. 남들은 취직하는데 혼자서 공부하겠다고 대학원에 가도 딸을 믿고 말없이 밀어주시고 지켜봐주신 것 너무 감사해요. 밤새 한숨도 못 주무시고 일하시는데 힘들다고 투정부리고 어리게 굴어서 너무 죄송했어요. 이제부터라도 효도하는 딸이 될게요. 사랑해요. 그리고 어느새 훌쩍 어른스러워진 내 동생 성우, 언제나 서로에게 힘이 되는 존재라는걸 잊지 말자. 자신감을 가져!

마지막으로 언제나 곁에서 지켜주고 든직한 안식처가 되어준 사랑하는 유찬오빠와 이 논문이 나오기까지 도움을 주신 많은 분들께 감사의 글을 드립니다.