

분열효모에서 mRNA Export와 관련된 *rsm1* 유전자의 유전학적 분석

강숙희 · 윤진호*

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과 및 기초과학연구소

mRNA의 핵에서 세포질로의 이동(mRNA export)에 관여하는 것으로 여겨지는 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 *rsm1* 유전자의 역할을 알아보기 위해 *kan^r* 유전자를 이용하여 결실돌연변이주(deletion mutant)를 제조하였다. *rsm1* 유전자는 생장에 필수 유전자는 아니지만, *rsm1* 결실돌연변이주는 야생형에 비해 생장이 조금 늦고 mRNA export도 약간의 결함을 보였다. *rsm1* 유전자와 mRNA export의 중요 유전자와의 연관관계를 알아보기 위해, 이중돌연변이주(double mutants)를 제작하여 성장결함 정도와 mRNA export 결함 정도를 조사하였다. 조사한 유전자들 중에서 *mex67* 또는 *npp106* 돌연변이 유전자는 *rsm1* 결실돌연변이 유전자와 함께 존재하면 성장과 mRNA export가 더욱 악화되었다. 반면, *thp1* 돌연변이 유전자는 *rsm1* 결실돌연변이 유전자와 함께 존재하면 오히려 성장과 mRNA export 정도를 야생형과 유사한 정도로 호전시켰다. 이와 같은 결과들은 *rsm1* 유전자와 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

Key words □ genetic analysis, mRNA export, *rsm1*, *Schizosaccharomyces pombe*

핵막에 의해 분리된 핵과 세포질 사이의 물질이동(nucleocytoplasmic trafficking)은 핵막에 존재하는 유일한 통로인 핵공복합체(nuclear pore complex, NPC)를 통해 이루어진다(5). NPC는 핵공단백질(nucleoporin)이라 불리는 30여 종류의 단백질들로 이루어진 40 MDa 이상의 거대 복합체로, 하등진핵 생물로부터 사람에게 이르기까지 진화적으로 잘 보존되어 있다(2, 17). NPC를 통한 이동 기작은 수송운반체(transport receptors)를 필요로 하며, 에너지가 소모되는 선택적인 능동수송이며, NPC의 역동적인 변화에 의해 조절된다(25). 그러므로 이러한 이동을 필요로 하는 모든 세포의 생리작용(유전자 발현, 성장, 신호전달, 세포주기 조절, 죽음 등)에 NPC는 영향을 미친다(22).

tRNA, rRNA, microRNA (miRNA), small nuclear RNA (snRNA) 등의 핵에서 세포질로의 이동기작은 단백질의 핵과 세포질 사이의 이동기작과 유사하다(10). 즉, Ran 단백질이 관여하며, importin- β family에 속하는 수송운반체가 RNA의 뉴클레오티드 모티프 또는 RNA와 결합하고 있는 단백질의 NES (nuclear export signal)를 인식하여 RNA를 수송한다. 하지만, mRNA의 핵에서 세포질로의 이동(mRNA export)은 단백질이나 다른 RNA의 이동과는 달리, 훨씬 복잡하며 전혀 다른 기작에 의해 일어나는 것으로 여겨진다(10, 16). mRNA export에는 importin- β family에 속하지 않는 수송운반체가 관여하며, Ran의 농도구배도 직접적으로 관여하지 않는다(6, 15). mRNA는 전사되는 순간부터 많은 단백질과 결합하여 아주 커다란 mRNP 중합체를 이루며, 이러한 mRNP 중합체는 mRNA가 전사되어 소멸할 때까지 시간적, 공간적으로

결합단백질이 달라지는 역동적인 구조를 이루고 있다(4). 또한, mRNA export는 전사과정 뿐만 아니라 전사 후 가공과정(5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 절단 및 폴리아데닐레이션)과도 밀접하게 연관되어 있어, 성숙한 mRNP만이 핵에서 세포질로 수송된다. 이러한 mRNA export 기작은 효모에서 사람까지 진화적으로 잘 보존되어 있다(3, 21).

mRNA export에는 일반적으로 이형이합체인 수송운반체(효모에서는 Mex67-Mtr2, 후생생물에서는 NXF1/TAP-NXT1/p15)가 mRNA에 직접 결합하거나 어댑터 단백질과의 결합을 통해 간접적으로 결합한다(9). 이렇게 결합한 수송운반체는 성숙한 mRNP 중합체를 NPC까지 연결시키고, NPC와의 약한 상호작용을 통해 mRNP 중합체가 NPC를 통과하도록 역할을 하는 것으로 추측된다(6). 어댑터 단백질에는 Yra1 (효모)/ALY/REF (후생생물), SR 단백질들(SRP20, 9G8, Npl3 등), TREX와 TREX-2 복합체의 구성요소(Sub2/UAP56, Sac3 등) 등이 알려져 있다(8, 12, 19, 20). 이밖에도 mRNP export에 관여하는 NPC의 특정 핵공단백질들 또는 NPC-결합단백질(Gle1, Rae1 등) 뿐만 아니라, RNA 결합단백질(Nab2 등), RNA helicase (Dbp5p 등), ATPase (Elf1p 등) 등도 mRNA export에 관여하는 중요한 단백질들이다(10, 26).

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서는 일반적인 mRNA 수송운반체로 여겨지는 Mex67은 생장에 필수적이지도 않고 *mex67* 결실돌연변이 자체는 mRNA export 결함도 보이지 않는다(31). 하지만, *mex67* 결실돌연변이는 알려진 mRNA export 인자들과 합성치사(synthetic lethality)를 보이며, 이러한 합성치사 돌연변이들은 mRNA export 결함을 보인다(23, 24). 본 연구진은 이전에 분열효모인 *S. pombe*에서 *mex67* 결실돌연변이와 합성치사를 보이는 돌연변이를 선별하여, *rsm1* 유전자를 클로닝하였다

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-920-7675, Fax: 82-2-920-7675
E-mail: jhoyoon@sungshin.ac.kr

(28, 29). 본 실험에서는 *rsm1* 유전자와 mRNA export의 중요 유전자와의 연관관계를 알아보기 위해, 이중돌연변이주를 제작하여 생장과 mRNA export 결합 정도를 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

*Schizosaccharomyces pombe*의 기본적인 유전학적 방법과 세포 배양 기술은 *S. pombe* standard method를 사용하였다(1, 13). 본 실험에 사용된 효모 *S. pombe* 균주는 Table 1에 정리하였다. 재조합 플라스미드의 증폭과 선택을 위한 형질전환용 균주로 *E. coli* TOP10을 사용하였다. *E. coli*의 배양을 위해서는 일반적으로 사용되고 있는 Luria-Bertani (LB: 0.5% yeast extract, 1% bacto-tryptone, 1% NaCl) 액체 배지를 사용하였고, 필요시에는 항생제 (ampicillin)를 100 µg/ml로 첨가하여 37°C에서 키웠다. 효모 균주의 배양을 위한 배지는 EMM (Edinburgh minimal medium)과 YES (Yeast extract with supplements: 0.5% yeast, 3% glucose, supplements: 225 mg/L adenine, leucine, uracil) 배지를 사용하였고, 이중돌연변이주 제조를 위한 균주 교배에는 ME (malt extract 3%) 배지를 사용하였다. *nmt* 프로모터의 억제제를 위해서는 EMM 배지에 15 µM 티아민(thiamin)을 첨가하여 사용하였고, *kan^r* 유전자를 가진 균주를 선택하기 위해서는 EMM 배지에 항진균제인 G418을 100 mg/L 농도로 첨가하였으며, 고품 배지는 2% agar를 첨가하여 28°C에서 배양하였다.

결실돌연변이주, 이중돌연변이주와 플라스미드 제조

Δrsm1::kan^r 결실돌연변이는 one-step gene disruption 방법을

사용하여 제조하였다. 먼저 *rsm1* 유전자의 5' flanking 부위와 3' flanking 부위를 각각 1 kb씩 PCR로 증폭하여 pBluscript SK(+) 벡터의 *Bam*HI과 *Xho*I 절단부위에 클로닝하였다. PCR 프라이머에 각각 *Bam*HI과 *Not*I 그리고 *Not*I과 *Xho*I 절단부위를 삽입하였다. 이렇게 클로닝된 DNA 절편은 *rsm1* 유전자의 5' 부위와 3' 부위가 *Not*I 제한효소 절단부위로 연결되어 있다. 이렇게 생성된 *Not*I 자리에 *kan^r* 유전자를 포함하는 *Not*I DNA 절편을 삽입하였다. 완성된 플라스미드를 *Bam*HI과 *Xho*I로 잘라내어 반수체 균주인 AY216 또는 AY217에 형질전환시켜 G418에 내성을 갖는 형질전환체를 얻었다. 형질전환체 중에서 PCR과 Southern blot으로 결실돌연변이체를 선별하였다(Fig. 1).

이중돌연변이의 제조는 교배형이 서로 다른 각각의 돌연변이를 ME 배지에서 교배한 후, random spore analysis를 통해 선별하였다. 즉, 형성된 유성포자를 YES 배지 또는 EMM 배지에서 발아시켜 단일 콜로니를 선별한 다음, marker 유전자를 검사하여 이중돌연변이를 선별하였다.

81X-Rsm1, 41X-Rsm1, 3X-Rsm1 플라스미드 제작을 위해서는 프라이머에 *Bam*HI과 *Xho*I 절단부위를 삽입하여 *rsm1* 유전자의 ORF만을 PCR로 증폭한 다음, pREP81X, pREP41X, 또는 pREP3X 벡터의 *Bam*HI과 *Xho*I (또는 *Sal*I) 절단부위에 클로닝하였다(11).

In situ hybridization

세포 내의 poly(A)⁺ RNA의 분포를 알아보기 위한 *in situ* hybridization은 이전 논문에 서술되어 있다(26). 혼성화 탐침으로는 α-digoxigenin을 3' 말단에 붙인 Oligo-(dT)₅₀을 사용하였다. 형광현미경으로 혼성화 탐침을 관찰하기 위해서는 FITC-anti-digoxigenin

Table 1. *Schizosaccharomyces pombe* strains used in this study

Strains	Genotype	Sources
AY217	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18</i>	31
<i>Δrsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δrsm1::kan^r</i>	This study
<i>Δmex67</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δmex67::ura4⁺</i>	31
<i>Δp15</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δp15::ura4⁺</i>	32
<i>rae1-167</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 rae1-167</i>	32
<i>Δnpp106</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δnpp106::ura4⁺</i>	32
<i>Δnup184</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::ura4⁺</i>	27
<i>Δthp1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δthp1::ura4⁺</i>	30
<i>Δmlo3</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δmlo3::ura4⁺</i>	23
<i>rae1-167Δrsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 rae1-167 Δrsm1::kan^r</i>	This study
<i>Δnpp106Δrsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δnpp106::ura4⁺ Δrsm1::kan^r</i>	This study
<i>Δthp1Δrsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δthp1::ura4⁺ Δrsm1::kan^r</i>	This study
<i>Δnup184Δrsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::ura4⁺ Δrsm1::kan^r</i>	This study
<i>Δmex67Δrsm1/81X-Rsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δmex67::ura4⁺ Δrsm1::kan^r (pREP81X-Rsm1)</i>	This study
<i>p15Δrsm1/81X-Rsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δp15::ura4⁺ Δrsm1::kan^r (pREP81X-Rsm1)</i>	This study
<i>Δmlo3Δrsm1/81X-Rsm1</i>	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 Δmlo3::ura4⁺ Δrsm1::kan^r (pREP81X-Rsm1)</i>	This study

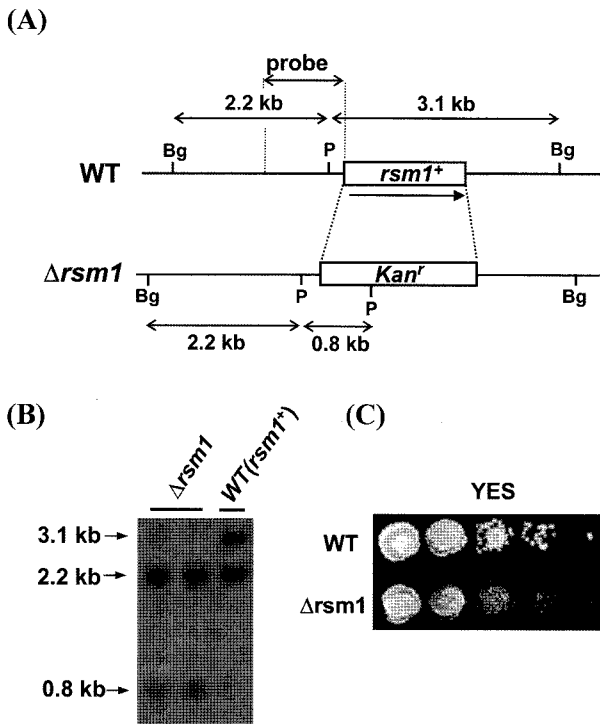


Fig. 1. Construction of *rsm1* deletion mutants. (A) Schematic diagram representing construct of *rsm1* null allele in *S. pombe*. Most of *rsm1* open reading frame (ORF) region was substituted with marker gene, *kan^r*, by one-step gene disruption method. The *rsm1* ORF is denoted by open boxes and the direction of transcription is shown by arrow under the ORF. The DNA fragment used as probe in Southern blotting and the expected sizes of hybridized DNA fragments in wild type and null alleles are shown. Bg, *BgIII*; P, *PstI*. (B) Confirmation of disruption of the *rsm1* locus by Southern hybridization. Genomic DNAs isolated from haploid wild type (WT) and haploid strains with disrupted *rsm1* ($\Delta rsm1$) were digested with *BgIII* and *PstI*. Hybridization was performed with probe denoted in (A). (C) Growth retardation of *rsm1* knockout mutant. Wild type and *rsm1*-disrupted cells were spotted in 10-fold serial dilutions onto YES plate and incubated for 4 days at 28°C.

Fab 항체(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하였다. DNA 염색을 위해서는 4', 6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)을 사용하였다.

결과 및 고찰

rsm1 결실돌연변이주의 제작과 분석

분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*에서 Mex67은 생장에 필수적이기도 않고 *mex67* 결실돌연변이 자체는 mRNA export 결함도 보이지 않는다(31). 즉, 분열효모에서는 다른 인자들이 Mex67과 중복되는 역할을 담당하거나, 또 다른 일반적인 mRNA export 경로가 존재할 가능성을 의미한다. 그러므로 분열효모에서 *mex67* 결실돌연변이를 이용하여 mRNA export에 관여하는 합성 치사 돌연변이를 이전에 선별하였다(28). 이중 SLMex1 돌연변이

를 상보하는 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, 이 유전자는 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자임을 알아내고, *rsm1*이라 명명된 바 있다(29).

본 실험에서는 *rsm1*이 mRNA export에 관여하는 것으로 알려진 다른 유전자들과 유전학적으로 연관이 있는지의 여부를 확인하고자 하였다. 이를 위해 우선 항진균제인 G418에 내성을 나타내는 *kan^r* 유전자를 이용하여 *rsm1* 유전자 전체를 결실시킨 *Arsm1::kan^r* 반수체 결실돌연변이를 one-step gene disruption 방법을 사용하여 제조하였다(Fig. 1). G418을 첨가한 배지에서 자라는 형질전환체 중에서 *rsm1* 유전자가 *kan^r* 유전자로 치환된 결실돌연변이를 선별하기 위해, 형질전환체의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 대조군으로 사용한 *rsm1* 유전자가 야생형인 균주는 3.6 kb의 DNA가 증폭되는 것에 비해 4.2 kb가 증폭되는 결실돌연변이를 선별하였다(자료 미제시). *rsm1* 유전자만이 *Kan^r* 유전자로 치환된 것을 다시 한번 확인하기 위해 Southern hybridization을 수행하였다(Fig. 1A and B). *rsm1* 유전자의 위쪽 부위를 probe로 사용하면, 야생형은 3.1 kb와 2.2 kb band가 보이지만 형질전환체는 2.2 kb와 0.8 kb band를 보이므로 형질전환체가 *rsm1* 결실돌연변이임을 확인하였다.

rsm1 유전자가 결실된 균주가 죽지 않는 것으로 보아, *rsm1*은 생장에 필수 유전자는 아니라는 것을 확인하였다. 하지만 $\Delta rsm1$ 결실돌연변이는 Fig. 1C에서 보는 바와 같이 야생형에 비해 성장속도가 느렸다. *Arsm1* 결실돌연변이가 mRNA export에 결함을 보이는지를 알아보기 위해, poly(A)⁺ RNA의 분포를 살펴보았다. 야생형 균주에서는 poly(A)⁺ RNA가 세포 전체에 균일하게 분포하지만(Fig. 4A), $\Delta rsm1$ 결실돌연변이에서는 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되는 현상을 볼 수 있었다(Fig. 4B). 또한, 결실돌연변이에서는 세포가 긴 것, 동그란 것, 구부러진 것, 부풀 것, 세포분열에 이상이 있는 것 등의 비정상적인 형태의 세포가 야생형보다 높은 빈도로 관찰되었다. 이러한 결과는 *rsm1*이 없으면 mRNA export에 결함이 생기므로 전반적인 단백질의 합성이 감소하고, 이로 인해 세포주기, 형태 등 여러 가지 결함이 이차적으로 발생하는 빈도가 증가하여 전반적인 생장이 느려지는 것으로 사료된다.

이중돌연변이주의 제작과 분석

분열효모에서 mRNA export에 관여하는 것으로 알려진 다른 유전자들과 *Arsm1* 결실돌연변이가 유전학적으로 연관이 있는지의 여부를 알아보려고 이중돌연변이를 제작하였다. *Anpp106*, *Anup184*, *Athp1*, *rae1-167* 등의 돌연변이들을 각각 *Arsm1* 결실돌연변이와 교배하여 얻은 유성포자들 중 *Arsm1* 돌연변이와 각각의 돌연변이를 동시에 갖고 있는 이중돌연변이들을 선별하였다. 이렇게 얻은 이중돌연변이들의 성장과 poly(A)⁺ RNA의 분포를 살펴보았다. *rae1-167*과 *Anup184*는 *Arsm1*과 이중돌연변이가 되더라도 성장 정도가 단일돌연변이들과 큰 차이가 없었으며(Fig. 3A), poly(A)⁺ RNA의 분포도 차이가 없었다(Fig. 4, c~f). 하지만, *Anpp106*은 *Arsm1*과 이중돌연변이가 되면 단일돌연변이들에 비해 성장속도도 느려지고 poly(A)⁺ RNA도 핵 안에 많이

축적되었다(Fig. 3A and Fig. 4, g-h). 반면, *Δthp1*은 이중돌연변이가 되면 오히려 *Δrsm1*의 성장과 mRNA export 결함을 야생형과 같은 정도로 회복시켰다(Fig. 3A and Fig. 4, I-j).

한편, *Δmlo3*와 *Δmex67*의 경우는 *Δrsm1*와 교배하여 이중돌연변이를 선별할 수 없었다. 이러한 결과는 *Δmlo3* 또는 *Δmex67*의 돌연변이가 *Δrsm1*와 합성치사를 보이거나 포자의 성숙이나 발아에 문제가 있어, 이중돌연변이를 얻지 못할 가능성을 의미한다. 그러므로, *Δmlo3* 또는 *Δmex67*와 *Δrsm1*의 이중돌연변이를 얻기 위해, *rsm1* 유전자의 발현이 *nmt* 프로모터에 의해 조절되는 플라스미드(3X-Rsm1, 41X-Rsm1, 81X-Rsm1)를 제작하여 *Δrsm1* 결실돌연변이에 형질전환시켰다. 3X-Rsm1은 가장 강력한 야생형의 *nmt* 프로모터를 가지고 있으며, 41X-Rsm1과 81X-Rsm1은 *nmt* 프로모터의 TATA box에 돌연변이를 일으켜 프로모터의 세기가 3X-Rsm1에 비해 41X-Rsm1은 중간 정도이고 81X-Rsm1은 가장 약하다. 하지만 이 벡터들은 모두 비타민 B₁ (티아민)에 의해 발현이 억제된다(7, 11). 형질전환체들을 티아민이 없는 배지(-B1)와 티아민이 들어있는 배지(+B1)에서 각각 키워 성장 정도와 poly(A)⁺ RNA의 분포를 살펴보았다. 배지에 티아민을 넣어 플라스미드(3X-Rsm1, 41X-Rsm1, 81X-Rsm1)의 *rsm1*의 발현을 억제하더라도 *Δrsm1* 결실돌연변이의 성장 정도는 야생형과 비슷하였다(Fig. 3B). poly(A)⁺ RNA의 분포는 41X-Rsm1, 81X-Rsm1의 경우 *rsm1*의 발현을 억제되면(+B1), 핵 안에 약간 축적되는 것이 보였다(Fig. 2). 이 결과는 티아민에 의해 *rsm1*의 발현이 억제되어 basal level로 *rsm1*이 발현되더라도 약간의 mRNA export 결함만을 보일 뿐 성장 속도를 회복하는 데는 지장이 없음을 의미하며, 세포 안에서 Rsm1은 소량만으로도 성장에는 충분한 기능을 하는 것으로 사료된다.

이렇게 81X-Rsm1이 형질전환된 *Δrsm1* 결실돌연변이와 *Δmlo3*,

Δmex67, *Δp15* 돌연변이를 각각 교배하여 이중돌연변이를 얻을 수 있었다. 이렇게 얻은 이중돌연변이들을 티아민이 없는 배지(-B1)와 들어있는 배지(+B1)에서 성장과 poly(A)⁺ RNA의 분포를 조사하였다. *Δmlo3Δrsm1*(81X-Rsm1)과 *Δp15Δrsm1*(81X-Rsm1) 이중돌연변이는 *rsm1*의 발현을 억제하더라도 성장(Fig. 3B)과 mRNA export (Fig. 4, k-n)가 차이가 크게 없었다. 하지만, *Δmex67 Δrsm1*(81X-Rsm1) 이중돌연변이의 경우 *rsm1*의 발현을 억제하면, mRNA export가 심한 결함을 보였다(Fig. 4, o). 반면 예상과는 달리, *rsm1*의 발현이 억제되더라도 합성치사를 보이지 않고 단지 성장 속도만 더 느려졌다. 이러한 결과는 앞서 설명한 바와 같이 *Δmex67Δrsm1*과는 다르게 *Δmex67Δrsm1*(81X-Rsm1) 이중돌연변이는 81X-Rsm1 플라스미드에서 basal level로 발현되는 극히 소량의 Rsm1 단백질만으로도 합성치사를 면할 수 있을 것이라고 생각되기 때문이다.

결과들을 정리하면, *Δrsm1* 돌연변이는 *rae1-167*, *Δnup184*, *Δp15*, *Δmlo3* 등의 돌연변이들과는 별다른 상호작용을 하지 않았

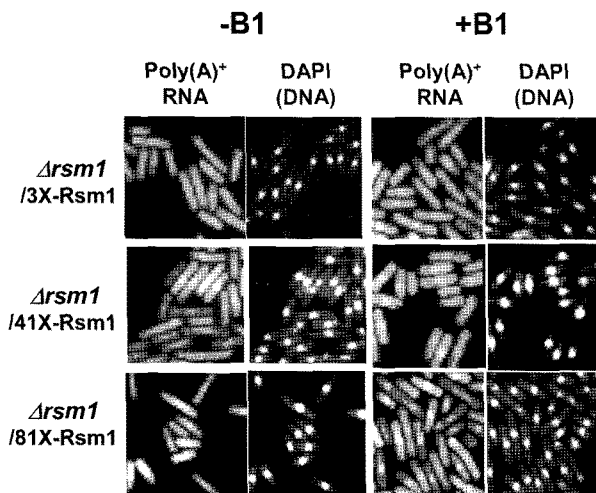


Fig. 2. Poly(A)⁺ RNA localization in *Δrsm1* mutant cells harboring 81X-Rsm1, 41X-Rsm1 or 3X-Rsm1. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) or in the presence of thiamine (+B1) for 18 hr. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

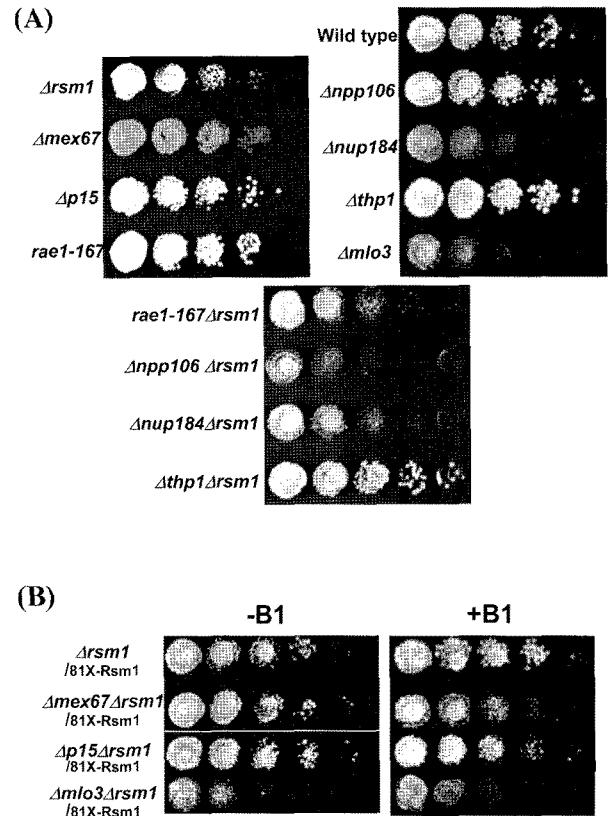


Fig. 3. Growth of single and non-lethal double mutants. (A) A serial 10-fold dilution of a stationary culture of wild type, the single mutants, *Δnpp106*, *Δnup184*, *Δthp1*, *Δmlo3*, *Δrsm1*, *Δmex67*, *Δp15*, *rae1-167*, and the double mutants, *rae1-167Δrsm1*, *Δnpp106Δrsm1*, *Δnup184Δrsm1*, *Δthp1Δrsm1* were plated on YES plates and grown for 4 days. (B) *Δrsm1* harboring 81X-Rsm1 and the double mutants harboring 81X-Rsm1, *Δmex67Δrsm1*, *Δp15Δrsm1*, and *Δmlo3Δrsm1* were plated on EMM plates in the absence of thiamine (-B1) or the presence of thiamine (+B1) and grown for 5 days.

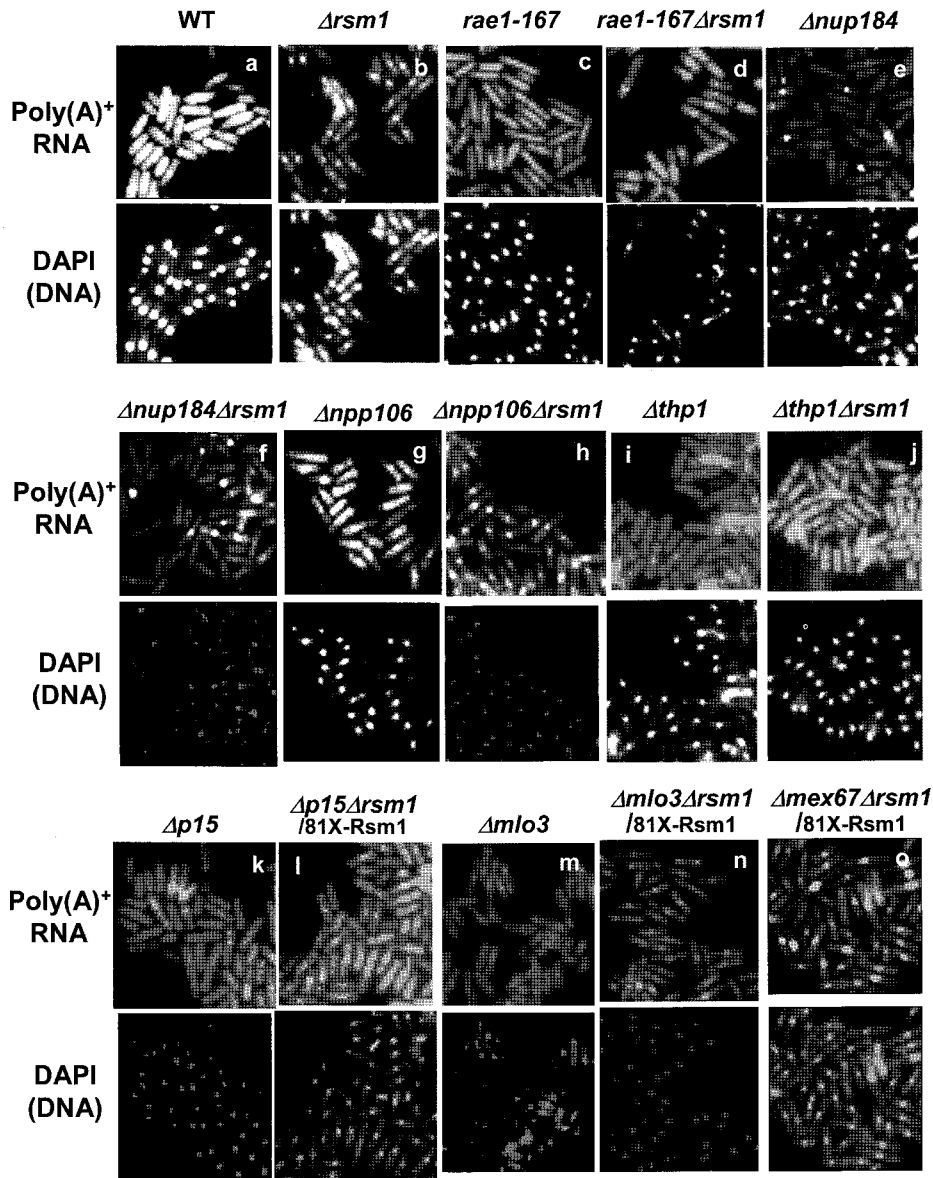


Fig. 4. Poly(A)⁺ RNA localization in single and non-lethal double mutants. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine (+B1) for 18 hr. Coincident DAPI staining is shown in the bottom panels.

지만, *Δnpp106* 또는 *Δmex67*과는 성장과 mRNA export가 더욱 더 결함을 보이는 상승효과가 나타났다. 반면, *Δthp1*은 오히려 *Δrsm1* 돌연변이가 보이는 약간의 성장과 mRNA export 결함을 상보하였다.

mRNA의 수송운반체로 여겨지는 Mex67p-Mtr2는 *S. cerevisiae*에서 mRNA export에 필수적이거나, 이것의 동족 복합체인 *S. pombe*의 Mex67p-p15는 필수적이지 않다(18). 오히려 *S. cerevisiae*에서는 필수적이지 않은 Rae1 단백질이 *S. pombe*에서는 필수적이다(31). 또한, *S. cerevisiae*의 Mex67p가 Yra1p에 의해 mRNP로 결합하는 것과 같이, *S. pombe*에서는 Rae1p가 Mlo3p (Yra1p와 동족 단백질)와 복합체를 형성한다(23). 이러한 유사성과 차이는 mRNA export에 중요한 두 단백질(Mex67p와 Rae1p)이 중복된 기능을

수행하거나, 또는 다르게 조절되는 mRNA export 경로에 관여할 가능성을 암시한다. 이런 관점에서 *rae1* 유전자가 *rsm1*과 상승효과를 보이지 않고 *mex67*과 상승효과를 보이는 실험 결과는, Rsm1p는 Mex67p보다는 Rae1p가 관여하는 mRNA export 경로에 연관되어 있다는 것을 암시한다.

분열효모의 Rsm1p는 발아효모의 Pml39p와 유사성을 가지고 있다(14). 발아효모에서 *pml39* 돌연변이는 NPC를 구성하는 핵공 단백질 중에서 mRNA export에 관여하는 핵공단백질(Nup84p, Nup120p, Nup133p 등)들과 이중돌연변이가 되었을 때만 성장에 더욱 더 결함을 보이는 상승효과를 나타낸다(14). 분열효모의 *rsm1* 돌연변이도 mRNA export에 관여하는 것으로 알려진 핵공 단백질인 *npp106*과 이중돌연변이가 되었을 때 성장에 결함을 보

이는 상승효과를 나타내므로, Rsm1p도 mRNA export에서 Pml39p와 유사한 역할을 담당할 가능성이 있다.

감사의 말

이 논문은 2005년 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2005-015-C00431/1).

참고문헌

- Alfa, C., P. Fantes, J. Hyams, M. Mcleod, and E. Warbrick. 1993. Experiments with fission yeast. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY, USA.
- Cronshaw, 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.
- Cullen, B.R. 2003. Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* 116, 587-597.
- Darzacq, X., R.H. Singer, and Y. Shav-Tal. 2005. Dynamics of transcription and mRNA export. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 332-339.
- Dimaano, C. and K.S. Ullman. 2004. Nucleocytoplasmic transport: integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3069-3076.
- Erkman, J.A. and U. Kutay. 2004. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 296, 12-20.
- Forsburg, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21, 2955-2956.
- Huang, Y. and J.A. Steitz. 2005. SRprises along a messenger's journey. *Mol. Cell* 17, 613-615.
- Izaurralde, E. 2002. A novel family of nuclear transport receptors mediates the export of messenger RNA to the cytoplasm. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 577-584.
- Khler, A. and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 761-773.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123, 127-130.
- Moore, M.J. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-1518.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795-823.
- Palancade, B., M. Zuccolo, S. Loeillet, A. Nicolas, and V. Doye. 2005. Pml39, a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoproteins. *Mol. Biol. Cell* 16, 5258-5268.
- Reed, R. and E. Hurt. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108, 523-531.
- Rodriguez-Navarro, S., T. Fischer, M.J. Luo, O. Antunez, S. Bretschneider, J. Lechner, J.E. Perez-Ortin, R. Reed, and E. Hurt. 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116, 75-86.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison, A. Suprapto, 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.
- Segref, A., K. Sharma, V. Doye, A. Hellwig, J. Huber, R. Luhrmann, and E. Hurt. 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *EMBO J.* 16, 3256-3271.
- Strasser, K. and E. Hurt. 2000. Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *EMBO J.* 19, 410-420.
- Strasser, K. and E. Hurt. 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413, 648-652.
- Stutz, F. and E. Izaurralde. 2003. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell. Biol.* 13, 319-327.
- Suntharalingam, M. and S.R. Wenthe. 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell* 4, 775-789.
- Thakurta, A.G., G. Gopal, J.H. Yoon, L. Kozak, and R. Dhar. 2005. Homolog of BRCA2-interacting Dss1p and Uap56p link Mlo3p and Rae1p for mRNA export in fission yeast. *EMBO J.* 24, 2512-2523.
- Thakurta, A.G., G. Gopal, J.H. Yoon, T. Saha, and R. Dhar. 2004. Conserved nuclear export sequences in *Schizosaccharomyces pombe* Mex67 and human TAP function in mRNA export by direct nuclear pore interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 17434-17442.
- Tran, E.J. and S.R. Wenthe. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125, 1041-1053.
- Vinciguerra, P. and F. Stutz. 2004. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 285-292.
- Whalen, W.A., J.H. Yoon, R. Shen, and R. Dhar. 1999. Regulation of mRNA export by nutritional status in fission yeast. *Genetics* 152, 827-838.
- Yoon, J.H. 2003. Synthetic lethal mutations with *spmex67* of *Schizosaccharomyces pombe* in the mediation of mRNA export. *J. Microbiol.* 41, 115-120.
- Yoon, J.H. 2004. *Schizosaccharomyces pombe* *rsm1* genetically interacts with *spmex67*, which is involved in mRNA export. *J. Microbiol.* 42, 32-36.
- Yoon, J.H. 2006. Construction of *Schizosaccharomyces pombe* *spThp1* null mutants and its characterization. *Kor. J. Microbiol.* 42, 149-152.
- Yoon, J.H., D. Love, A. Guhathakurta, J.A. Hanover, and R. Dhar. 2000. Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8767-8782.
- Yoon, J.H., W.A. Whalen, A. Bharathi, R. Shen, and R. Dhar. 1997. Npp106p, a *Schizosaccharomyces pombe* nucleoporin similar to *Saccharomyces cerevisiae* Nic96p, functionally interacts with Rae1p in mRNA export. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7047-7060.

(Received June 6, 2008/Accepted June 23, 2008)

ABSTRACT: Genetic Analysis of Fission Yeast *rsm1* Which is Involved in mRNA Export

Suky Kang and Jin Ho Yoon* (Basic Science Research Institute and Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Republic of Korea)

We constructed the null mutants of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe rsm1* gene that is thought to be involved in mRNA export. Though *rsm1* gene is not essential for growth, the null mutant strain constructed by replacing the *rsm1*-coding region with an *kan'* gene showed growth retardation and mRNA export defects compared to wild type strain. We constructed double mutants which harbor *rsm1* null allele and mutant allele of genes involved in mRNA export. The *mex67* or *npp106* null allele, when combined with *rsm1* null allele, showed an additive effect on growth retardation and mRNA export defects. On the other hand, the *thp1* null allele restored the defects of growth and mRNA export of *rsm1* null mutant. These results suggest that *rsm1* plays a role in mRNA export from the nucleus.