

분열효모 핵공단백질인 Nup184의 기능에 필요한 부위 분석 및 SUMO 변성

채애리 · 장수연 · 윤진호*

성신여자대학교 생명과학·화학부 및 기초과학연구소

Analysis of a Region Required for the Functions of Fission Yeast Nucleoporin Nup184 and Its SUMO Modification

Airee Chai, Sooyeon Jang, and Jin Ho Yoon*

Basic Science Research Institute, School of Biological Science and Chemistry,
College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 142-732, Republic of Korea

(Received May 17, 2012 / Accepted June 4, 2012)

The Nup188 protein is one of the largest evolutionally conserved nucleoporins (Nups) that compose the inner ring of nuclear pore complex (NPC). The Nup184 protein, fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* ortholog of Nup188p, is required for normal growth and mRNA export in nutrient-rich medium (YES). Here, we identified a carboxyl region (482 to 1628) of Nup184 protein that was enough to complement the defects of both growth and mRNA export when the $\Delta nup184$ knock-out mutant was grown in YES medium. This region is also required for localization of GFP-Nup184 fusion to the nuclear periphery. In addition, we found that ORF of Nup184 (predicted 1564 amino-acid protein) registered in *S. pombe* GeneDB (hosted by Sanger Institute, UK) is 64 amino-acid residues shorter than that predicted by our sequence data. This carboxy-terminal region is necessary for the functions of Nup184p. We further demonstrated that Nup184 protein was conjugated with SUMO *in vivo*.

Keywords: *S. pombe*, mRNA export, nucleoporin, Nup184, SUMO modification

유전정보를 저장하고 있는 DNA가 들어있는 핵(nucleus)은 진핵생물에서 가장 중요한 세포소기관으로, 이중 막으로 된 핵막에 의해 둘러싸여 있어 세포질과 격리되어 있다. 이러한 구획은 유전자 전사가 일어나는 핵과 단백질 합성이 일어나는 세포질을 구분함으로써 유전물질의 안정적 저장과 유전자 발현의 주요한 조절기전을 제공하지만, 단백질과 RNA와 같은 거대분자들의 핵과 세포질 사이의 이동을 필요로 한다. 이러한 거대분자들의 선택적인 이동은 핵막에 존재하는 유일한 통로인 핵공복합체(Nuclear Pore Complex, NPC)를 통해 이루어진다. 핵공복합체는 진핵생물에 존재하는 가장 크고 복잡한 단백질 중합체 중의 하나로, 분자량이 효모에서는 60 MDa, 척추동물에서는 120 MDa에 달하는 것으로 추정된다(Reichelt *et al.*, 1990; Rout *et al.*, 2000). 생물 종에 따라 크기는 매우 다양하지만, 핵공복합체의 전체 구조는 모든 진핵생물에서 도우넛 모양으로 비슷하다. 핵막을 관통하는 중심구조는 8개의 spoke들이 중앙 통로를 둘러싸고 있는 대칭적인 구조를 이루고 있으며, 이 통로를 통해 거대

분자들의 능동수송이 이루어진다. 또한 중심구조로부터 핵 쪽의 nuclear basket과 세포질 쪽의 cytoplasmic filaments가 돌출되어 나와있는데, 이들은 모두 이동할 거대분자를 수반하는 수송 운반체(transport receptors)가 결합할 수 있는 자리를 제공한다(Stoffler *et al.*, 1999; Suntharalingam and Went, 2003; Hoelz *et al.*, 2011; Aitchison and Rout, 2012). 핵공복합체는 진화적으로 잘 보존된 핵공단백질(nucleoporin)이라 불리는 30여 종의 단백질로 구성되어 있으며, 각각의 핵공단백질은 다수(8, 16, 또는 32개)로 존재하여 핵공복합체 1개는 약 500-1,000개의 핵공단백질이 모여 형성되는 것으로 추정된다(Rout and Aitchison, 2001; Cronshaw *et al.*, 2002). 지금까지의 생화학적 연구와 직접적인 구조 연구 및 컴퓨터 분석을 통해 핵공복합체는 모듈 방식으로 전체구조를 형성하며, 핵공단백질들은 주로 몇 가지 접힘(fold) 방식으로 이루어졌다는 조성의 단순함이 밝혀졌다(Devos *et al.*, 2004, 2006; Hoelz *et al.*, 2011; Aitchison and Rout, 2012). 핵공단백질들은 복합체 내에서의 대략적인 위치와 예상되는 구조적 접힘 방식에 따라 몇 개의 그룹으로 나눌 수 있다(Devos *et al.*, 2006; Alber *et al.*, 2007; Aitchison and Rout, 2012). Transmembrane 그룹에 속하는 핵공단백질들은 transmembrane 나선과 cadherin

*For correspondence. E-mail: jhoyoon@sungshin.ac.kr; Tel.: +82-2-920-7675; Fax: +82-2-920-7675

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

Strains	Genotype	Source
AY217	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18</i>	Yoon <i>et al.</i> (2000)
972	<i>h⁻</i> (wild type)	Leupold (1950)
NU1	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r</i>	This study
NU2	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 nup184-gfp::ura4⁺</i>	This study
NU6~NU13	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup184::kan^r /pZU184 ~ pZU184Δ7</i>	This study
PUX2	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 nup184-gfp::ura4⁺ Δpmt3::kan^r /pREP41X-pmt3GG</i>	This study

접힘으로 구성되어 있으며, 핵막에 핵공복합체를 고정시키는 역할을 담당한다. 주변 FG 그룹에 속하는 핵공단백질들은 FG repeats와 coiled-coil 접힘으로 구성되어 있으며, 핵공복합체의 중앙 통로에 자리하거나 nuclear basket 또는 cytoplasmic filaments에 존재하여 수송운반체와 직접적인 결합부위를 제공할 뿐만 아니라 비특이적 물질이동을 막는 물리적인 장벽의 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. 중심 scaffold 그룹에 속하는 핵공단백질들은 β-propeller와 α-solenoid 접힘으로 구성되어 있으며, 앞의 두 그룹을 연결하며 핵공복합체의 중심구조를 형성한다.

SUMO (small ubiquitin-like modifier)는 진핵생물에서 진화적으로 잘 보존된 작은 폴리펩티드(10-11 kDa)로, 표적 단백질을 변형시킨다. SUMO의 가공된 C-말단 글리신 잔기가 표적 단백질의 리신 잔기의 ε-아미노 그룹과 isopeptide 결합을 형성함으로써 표적 단백질은 SUMO 변형된다. 또한 SUMO 폴리펩티드가 다른 SUMO의 리신 잔기에 결합하여 SUMO 사슬을 형성하기도 한다. 이러한 SUMO 변형 과정은 ubiquitin 변형과 비슷하게 E1-활성화 효소, E2-접합효소, E3-연결효소 등의 연속적인 활성을 필요로 하며, 탈 SUMO (desumoylation)와 SUMO 사슬 편집(chain-editing)에 SUMO-protease가 관여한다(Dohmen, 2004; Mukhopadhyay and Dasso, 2007). 이렇게 SUMO 변형(SUMOylation)된 표적 단백질은 성질(세포 내 위치 결정, 다른 단백질과의 결합 능력 등)이 변하게 되어 전사, DNA 복제, DNA 손상 반응, 세포주기, 핵과 세포질 사이의 물질이동 등 수많은 세포 기능에 영향을 미친다(Zhao, 2007; Geiss-Friedlander and Meichior, 2007). SUMO 변형된 단백질로 최초로 알려진 RanGAP1 (Ran GTPase activating protein 1)은 핵공복합체의 cytoplasmic filaments에 위치하여 핵과 세포질 사이의 물질이동에 중요한 역할을 담당한다. RanGAP1의 SUMO 변형은 이 단백질이 핵공복합체의 cytoplasmic filaments에 위치하는데 중요하다는 것이 밝혀졌다(Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997). 이후 SUMO 변형에 관여하는 효소들이 핵공복합체에 위치하는 것이 알려지면서, 핵공복합체에서의 sumoylation-desumoylation 과정이 핵과 세포질 사이의 물질이동뿐만 아니라 앞서 언급한 생물학적인 기능을 발휘하는데 매우 중요하다는 것이 알려지고 있다(Palancade and Doye, 2008).

분열효모인 *S. pombe*의 *nup184* 유전자는 중요한 mRNA export 인자인 Rae1의 온도민감성 대립유전자 *rae1-167*과 합성 치사(synthetic lethality)를 보이는 돌연변이체로 처음 분리되었으며, 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*와 인간의 핵공단백질

인 Nup188과 유사성을 보였다(Whalen *et al.*, 1999). 이 핵공단백질은 효모에서 인간까지 진화적으로 보존되어 있으며, 전체적인 α-helical 접힘구조가 수송운반체인 karyopherin과 유사한 S-like 모양을 이루는 것으로 밝혀졌다(Amlacher *et al.*, 2011; Flemming *et al.*, 2012). 출아효모의 Nup188을 포함한 커다란 구조 핵공단백질들(Nup157, Nup170, Nup192)은 핵공복합체 중심구조의 inner ring을 구성할 것으로 예측되었으며, transmembrane 그룹에 속하는 Pom152과 연결되어 있을 뿐만 아니라 linker 핵공단백질인 Nic96와 연결을 통해 핵공복합체의 다른 내부 구조와도 유전적, 물리적으로 연결되어 있다고 알려졌다(Aitchison *et al.*, 1995; Fabre and Hurt, 1997; Aitchison and Rout, 2012). 최근, 호열성 곰팡이인 *Chaetomium thermophilum*의 핵공단백질을 이용한 재구성 실험을 통해 커다란 구조 핵공단백질(Nup170, Nup188, Nup192)들이 핵공복합체 중심구조의 inner ring을 구성하며 linker 핵공단백질(Nic96, Nup53)과 연결되어 있음이 밝혀졌다(Amlacher *et al.*, 2011).

출아효모의 Nup188는 생장에 필수적이지는 않지만 결실돌연변이(null mutant)는 온도에 민감성을 보이며 단백질의 import와 핵막의 모양에 결함을 나타낸다(Nehrbass *et al.*, 1996; Zabel *et al.*, 1996). 이종상동체(ortholog)인 분열효모의 Nup184도 생장에 필수적이지는 않지만, Nup188와는 달리 *Δnup184* 결실돌연변이는 온도 민감성을 보이지 않았고 단백질의 import와 핵막의 모양도 정상이었다(Whalen *et al.*, 1999). 하지만 *Δnup184* 결실돌연변이는 완전배지인 YES 배지에서 생장과 mRNA export에 결함을 보였다(Whalen *et al.*, 1999). 본 연구에서는 분열효모인 *S. pombe* Nup184의 연속적인 부분 결실돌연변이체들을 제작하여, 이 단백질의 기능과 위치 선정에 N-말단 부위는 필요치 않으며 C-말단 부위가 중요함을 밝혔다. 이 과정에서 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에 존재하는 Nup184의 DNA 염기서열에는 G가 하나 결실되어 종결코돈 위치가 잘못됐음을 밝혔다. 또한 Nup184 단백질이 multi-sumoylation되어 있음을 보였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

본 실험에 사용된 효모 *S. pombe* 균주는 Table 1에 정리하였으며, 기본적인 유전적 그리고 세포배양 기술은 *S. pombe* 표준 방법을 사용하였다(Moreno *et al.*, 1991; Alfa *et al.*, 1993). 재조합 플라스미드의 증폭과 선별을 위한 형질전환용 균주로 *E. coli*

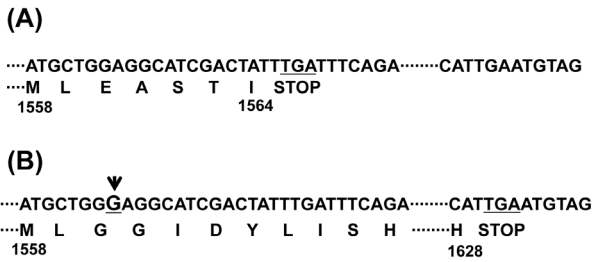


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the region showing a difference in *nup184* gene. The predicted translation stop codon (TGA) is underlined and the position of amino acid residues is shown by the numbers under amino acid sequence. (A) The data obtained from *S. pombe* GeneDB (Sanger center). (B) The altered Nup184 ORF confirmed by direct DNA sequencing with genomic DNA from wild-type strain 972 and AY217. The inserted position of additional G is denoted by arrowhead above the underlined bold G.

TOP10 (Invitrogen, USA)을 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 ampicillin을 100 µg/ml로 첨가하여 37°C에서 키웠다. 효모 균주의 배양을 위해 EMM (Edinburgh minimal medium), PMG (Pombe Glutamate Medium), YES (Yeast extract with supplements: 0.5% yeast, 3% glucose, supplements: 225 mg/L adenine, leucine, uracil) 배지를 사용하였고, kanamycine-저항 균주의 선별을 위해서 항진균제인 G418을 YE 배지에 100 µg/ml로 첨가하였다. *nmt1* 프로모터의 억제제를 위해서는 EMM 배지에 비타민 B₁인 티아민(thiamin)을 15 µM로 첨가하여 사용하였으며, 고형 배지는 2% 한천을 첨가하였다.

플라스미드 및 결실, 삽입돌연변이체의 제조

$\Delta nup184::kanMX4$ 결실돌연변이는 double-joint PCR (Yu et al., 2004)에 의해 형질전환시킬 DNA 절편을 증폭한 다음, AY217 균주에 one-step gene disruption 방법을 사용하여 제조하였으며, genomic DNA를 분리하여 PCR을 통해 결실돌연변이를 확인하였다. Nup184-GFP 삽입균주는 다음과 같이 제작하였다. 먼저 81X-Nup184-GFP 벡터에서 N-말단 일부가 제거된 Nup184-GFP 부위를 *Pst*I, *Sac*I으로 잘라내어 삽입용 벡터인 pDW234에 클로닝하였다. pDW234-Nup184GFP를 *Kpn*I로 절단하여 AY217에 형질전환한 후, 염색체 상의 *nup184* 유전자 위치로 삽입된 것을 Southern blotting으로 확인하였다. *nup184* 유전자의 연속적인 부분결실 돌연변이(pZU184Δ1-pZU184Δ9) 제조를 위해서, *Sal*I 제한효소 인식부위와 ATG 코돈을 삽입한 프라이머와 *Bam*HI 제한효소 인식부위와 STOP 코돈을 삽입한 프라이머를 이용하여 각각의 *nup184* 유전자 부위를 PCR 증폭한 후 pZA69U 벡터의 *Xho*I과 *Bam*HI 자리에 클로닝하였다. pREP41X-pmt3GG 벡터는 N-말단 부위에 Myc-tag되고 C-말단이 GG로 종결되는 *pmt3* 유전자를 PCR 증폭한 후 pREP41X 벡터의 *Xho*I과 *Bam*HI 자리에 클로닝하여 제조하였다. 이렇게 제작된 벡터들은 제노텍(Korea)에 DNA 염기서열 분석을 의뢰하여 확인하였다.

In situ hybridization

세포 내의 poly(A)⁺ RNA의 분포를 알아보기 위한 *in situ* hybridization은 이전 논문에서 서술되어 있다(Yoon et al., 2000). 혼성화 탐침으로는 3' 말단에 α -digoxigenin을 붙인 Oligo-(dT)₅₀을 사용하였다. 형광현미경으로 혼성화 탐침을 관찰하기 위해서는 FITC-anti-digoxigenin Fab 항체(Roche Applied Science, Germany)를 사용하였다. DNA 염색을 위해서는 4', 6-Diamidino-2'-phenylindole (DAPI)을 사용하였다.

단백질 추출, 면역침강(immunoprecipitation) 및 Western blot

이전 논문(Caspari et al., 2000; Yoon et al., 2000)에 서술되어 있는 방법에 따라 면역침강 및 Western blot 분석을 위한 단백질을 분별효모에서 추출하였다. GFP-tagged 단백질의 면역침강을 위해서 단일클론 anti-GFP mouse 항체(Abcam, England)와 protein A/G plus beads (Santacruz Biotechnology, USA)를 사용하였다. GFP-tagged 단백질의 Western blot 분석을 위해서는 폴리클론 anti-GFP goat 항체(AbD Serotec, England)를, Myc-tagged 단백질의 분석에는 폴리클론 anti-GFP rabbit 항체(Abcam, England)를 사용하였으며, ECL (GE healthcare, USA)을 사용하여 Kodak image station 4000MM PRO (Kodak, USA)에서 신호를 감지하였다.

결과 및 고찰

nup184 유전자의 열린읽기틀(open reading frame, ORF) 수정

분별효모인 *S. pombe*에서 중요한 mRNA export 인자 중의 하나인 *rae1*과 합성치사(synthetic lethality)를 보이는 유전자로 *nup184*는 처음 클로닝되었다(Whalen et al., 1999). *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK) 자료에 의하면, *nup184* 유전자는 1564개 아미노산으로 이루어진 분자량 176.9 kDa의 핵공단백질을 암호화하고 있다. 하지만 이 자료의 ORF에 따라 Nup184의 C-말단에 Green fluorescence protein (GFP) 유전자를 붙여 발현시키면 아무런 형광신호를 관찰할 수 없었으며(자료 미제시), *nup184* 유전자가 결실된 균주(knock-out mutant)의 여러 결함을 상보(complementation)하지도 못하였다(Fig. 2B). 이 유전자의 ORF를 확인하기 위하여 *S. pombe*의 유전체 염기서열 분석에 사용된 야생형 균주인 972 균주 또는 본 실험실에서 사용하는 AY217 균주의 염색체 DNA로부터 *nup184* 유전자 부위를 PCR 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 분석 결과, 유전체 database (Sanger Center)에는 Fig. 1과 같이 염기서열 자리 4751에 G가 하나 결실되어 있었다(시작코돈 ATG의 A를 I로 시작하여 72 염기쌍의 인트론 서열도 포함하여 번호를 매김). 결과적으로 열린 읽기틀(open reading frame)이 변하여 1560 위치의 글루탐산(E)부터 달라진다(Fig. 1). 그러므로 1564개가 아닌 1628개의 아미노산 잔기로 구성된 단백질이 만들어질 것으로 예측되었다. 실제로 확인된 ORF를 기준으로 C-말단에 GFP 단백질을 붙인 Nup184-GFP를 제조하여 발현시키면 핵막 위치에 점점이 형광신호를 볼 수 있었으며, YES 배지에서의 성장 결함도 상보하였다(Figs. 2 and 4A).

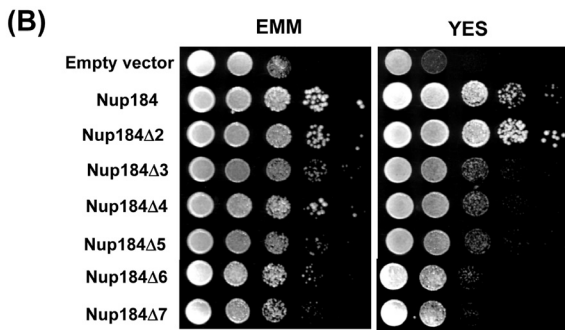
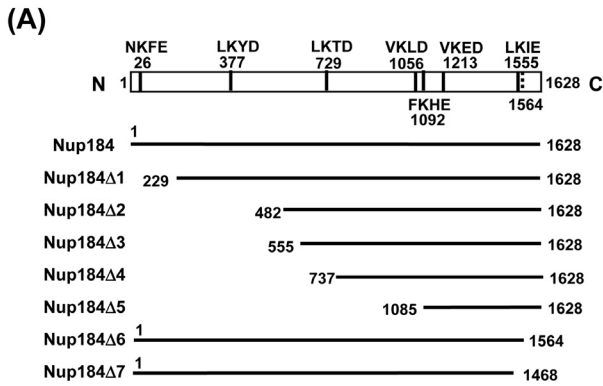


Fig. 2. Complementation of the growth retardation of $\Delta nup184$ null mutant by Nup184 deletions. (A) Schematic drawings of full-length Nup184 protein and the partially deleted Nup184 protein are shown. The *nup184* open reading frame is denoted by open box. The putative SUMO consensus sequences (ψ KxE/D, where ψ represents large hydrophobic residue) are shown and their positions are indicated by thick lines and the numbers pointing the potential SUMO conjugation residue, lysine (K). The location of the wrong nonsense codon is noted by dashed thick line. The numbers at the beginning and the end of the fragments indicate the first and the last amino acid numbers, respectively. (B) Growth of $\Delta nup184$ null mutants transformed with different plasmids. Cells were spotted in 10-fold serial dilutions onto EMM and YES plates and incubated for 4 days and 3 days at 29°C.

기능을 갖는 Nup184 단백질의 최소 영역 분석

Nup184는 핵공복합체의 중심구조를 구성하는 핵공단백질이지만 성장에 필수적이지 않다. 하지만 *nup184* 유전자가 결실된 균주는 야생형 균주에 비해 특히 YES 배지에서 생장이 많이 늦었으며, mRNA export에도 결함을 보였다(Whalen *et al.*, 1999). 이러한 Nup184의 기능을 갖는 영역(region)들을 알아보기 위해 Nup184의 N-말단과 C-말단 부위의 연속적인 부분결실 돌연변이체를 제작하였다(Fig. 2A). 이를 위해 N-말단에 GFP를 붙여 발현시키는 pZA69U 벡터를 이용하였다. Nup184의 영역을 각각 PCR 증폭하여 pZA69U 벡터에 클로닝한 후, 제한효소의 절단분석 및 DNA 염기서열 분석을 통하여 각각의 부분결실 돌연변이체가 제대로 제작되었음을 확인하였다. 이렇게 제작된 벡터들을 *nup184* 유전자가 결실된 균주에 형질전환시킨 후, 형질전환체들의 성장 정도를 EMM 배지와 YES 배지에서 spot assay

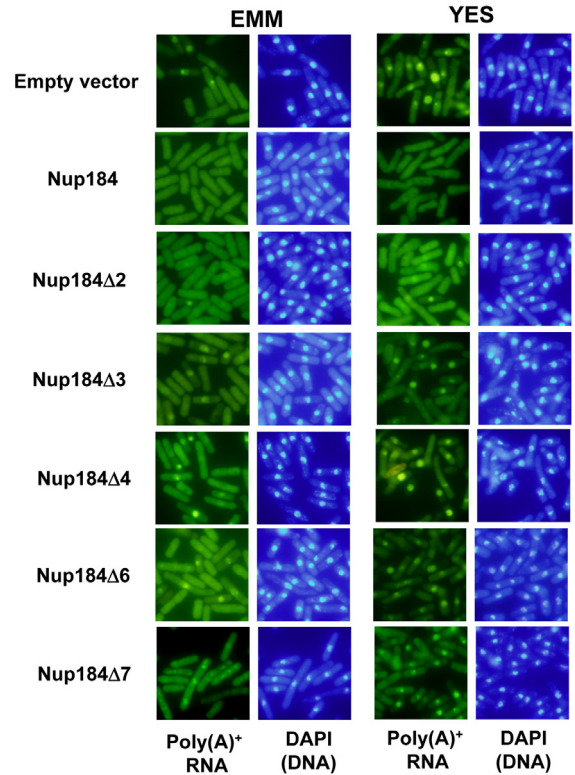


Fig. 3. Localization of poly(A)⁺ RNA. Cells transformed with various plasmids as indicated were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM at 29°C. The cells were then shifted to EMM medium or YES medium, were grown for 18 h, and stained for poly(A)⁺ RNA. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

로 비교하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 N-말단 부위의 481개 아미노산을 제거하여도(Nup184Δ2) 온전한 Nup184와 마찬가지로 성장 지체를 완전히 상보하였다. 하지만 N-말단 부위의 555개의 아미노산이 제거된 부분 결실돌연변이(Nup184Δ3)부터는 성장 지체를 거의 상보하지 못했다. C-말단의 경우는 단지 160개만 짧아져도(Nup184Δ7) 성장 지체를 상보하지 못했다. 유전체 database (Sanger Center)의 자료처럼 1564개의 아미노산 잔기만을 가진 Nup184(Nup184Δ6)도 성장 지체를 상보하지 못했다. 이러한 결과들은 N 도메인(아미노산 잔기 1에서 481까지)은 Nup184의 주요 기능에 중요하지 않고, Nup184의 C 도메인(아미노산 잔기 482에서 1628까지)이 주요 기능을 발휘하는데 필요충분함을 의미한다.

nup184 유전자가 결실된 균주는 생장이 지체되는 것과 함께 야생형 균주에 비해 mRNA export에도 결함을 보인다(Whalen *et al.*, 1999). 각각의 부분 결실돌연변이 Nup184가 mRNA export의 결함도 상보하는지 알아보고자 *in situ* hybridization을 수행하여 poly(A)⁺ RNA의 세포 내 분포를 알아보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 온전한 Nup184가 존재하면 야생형과 마찬가지로 poly(A)⁺ RNA가 세포 전체에 고루 퍼져있었다. 빈 벡터인 경우는 $\Delta nup184$ 결실돌연변이 균주와 똑같이, EMM 배지에서도 약 25% 정도의 세포들이 핵 안에 poly(A)⁺ RNA의 농도가 높

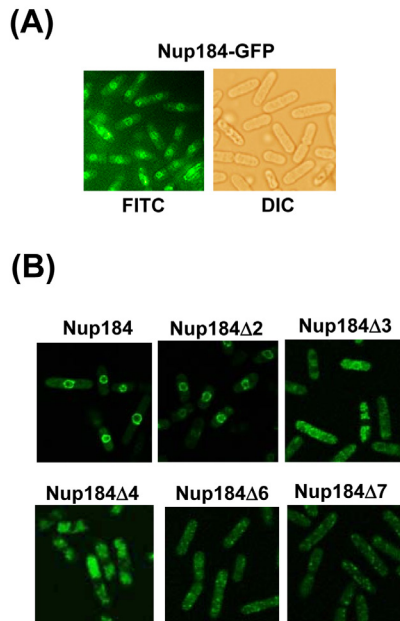


Fig. 4. Localization of Nup184 proteins fused to GFP. (A) Nup184 was tagged with GFP at its carboxy-terminal end. Localization of Nup184p-GFP fusions expressed at endogenous level from its own promoter. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium at 28°C. Coincident differential interference contrast (DIC) images are also shown in the right panels. (B) GFP was fused to full-length Nup184 and to proteins with deletions as indicated to the amino termini and expressed from the thiamine-repressible *nmt* promoter on pZA69U in Δ nup184 cells. Cells were grown in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine to mid-log phase, and the localization of the GFP fusion proteins were examined in live cells.

아져 있었고 YES 배지에서는 대부분의 세포에서 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되어 있고 세포질에는 줄어있는 심한 mRNA export 결함을 보였다. 생장 지체를 완전히 상보하는 Nup184Δ2인 경우 심한 mRNA export 결함은 거의 보이지 않았지만, 핵 안에 poly(A)⁺ RNA 농도가 약간 높았다. 생장 지체를 거의 상보하지 못했던 Nup184Δ3~Nup184Δ7들이 형질전환된 세포들은 Δ nup184 결실돌연변이와 마찬가지로 대부분 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 강하게 축적되어 있으므로, mRNA export 결함도 거의 상보하지 못하는 것으로 사료된다.

Nup184은 핵공단백질로 핵공복합체에 위치하여 mRNA export가 정상적으로 일어나도록 작용한다. 그러므로 각각의 부분 결실돌연변이들이 핵공복합체에 위치하는지를 살펴보았다. 먼저GFP 유전자를 *nup184* 유전자의 3' 뒤에 붙인 DNA 절편을 제작하여 염색체의 *nup184* 유전자 위치에 삽입한 균주를 만들었다. 이 균주에서는 Nup184-GFP 융합단백질이 자신의 프로모터에 의해 발현된다. YES 배지에서 생장과 mRNA export가 정상이므로, Nup184-GFP 융합단백질은 정상적인 기능을 한다고 추정된다. 이 균주에서 Nup184-GFP 융합단백질의 형광신호는 핵공단백질의 전형적인 패턴처럼 핵막 주변에 점점이 보였다(Fig. 4A). pZA69U 벡터에 클로닝된 *nup184* 유전자는 N-말단에

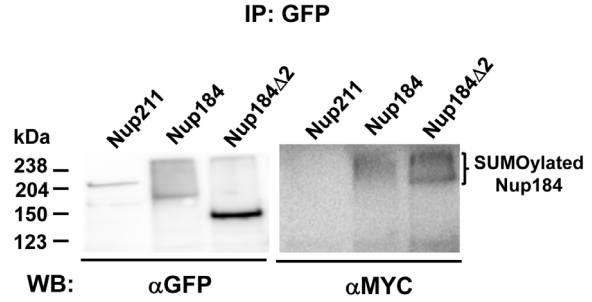


Fig. 5. SUMO modification of Nup184 protein in vivo. Multi-sumoylated GFP-Nup184 protein was identified by immunoprecipitation (IP) using the anti-GFP antibody followed by Western blot using the anti-GFP antibody (which recognizes GFP-tagged Nup184 or Nup211) and the anti-Myc antibody (which recognizes Myc-tagged SUMO).

GFP가 융합하게 된다. pZA69U-Nup184 벡터를 *nup184* 결실돌연변이에 형질전환시키면, *nup184* 결실돌연변이의 결함을 완전히 상보하므로 GFP-Nup184 융합단백질도 정상적으로 기능을 보이는 것으로 추정할 수 있으며, Nup184-GFP 융합단백질과 마찬가지로 정상적으로 핵공복합체에 위치하는 것으로 보였다(Fig. 4B). GFP-Nup184Δ2인 경우도 역시 예상대로 핵공복합체에 위치하였다. 하지만 GFP-Nup184Δ4~GFP-Nup184Δ7들은 형광신호가 세포질에 퍼져있었고 핵막 주변에는 거의 발견되지 않았다. 단지 GFP-Nup184Δ3의 경우는 대부분 세포질에 존재하지만 일부분의 세포에서는 핵막 주변에도 형광신호를 볼 수 있었다. 이러한 결과들은 Nup184 단백질은 핵공복합체에 위치해야만 정상적인 기능을 할 수 있음을 암시하며, Nup184 단백질이 핵공복합체에 위치하기 위해서는 N 도메인보다는 C 도메인(아미노산 잔기 482부터 C-말단까지)이 중요하다는 것을 시사한다.

Nup184 단백질의 SUMO 변형

GFP-Nup184 단백질들의 발현을 확인하기 위해 세포 추출물을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)로 영동한 후 GFP에 대한 항체를 사용하여 Western blot 분석을 하였다. 흥미롭게도 N-말단과 C-말단에 GFP가 융합된 Nup184 단백질들 모두 예상되는 크기 이외에 위쪽으로 끌리는 큰 분자량을 가진 것들이 보였다(Fig. 5A). N-말단에 HA를 붙인 HA-Nup184을 HA에 대한 항체로 Western blot 분석을 한 경우에도 같은 현상을 관찰할 수 있었다(자료 미제시). 하지만 대조군으로 사용된 다른 핵공단백질들에서는 이런 현상을 발견할 수 없었다. 큰 분자량의 Nup184 단백질이 SUMO 변형되어 있는 경우인지 확인하기 위하여 N-말단에 Myc epitope이 붙어 있고 C-말단이 GG로 가공된 형태의 SUMO를 발현하는 pREP41X-MYC-pmt3GG 벡터를 사용하였다. 분열효모의 SUMO를 암호화하고 있는 *pmt3* 유전자가 결실되어 있고 Nup184-GFP 유전자가 염색체에 삽입되어 있는 균주에 pREP41X-MYC-pmt3GG 벡터를 형질전환하였다. 이 균주에서 전체 단백질 추출물을 얻은 후, GFP에 대한 단일클론 항체를 사용하여 면역침강(Immunoprecipitation) 실험을 수행하였다. 대조군으로 사용한 침전된 Nup211-GFP 단백질은

anti-Myc 항체에 반응하지 않았다(Fig. 5). 하지만 Nup184-GFP의 경우 침전된 큰 분자량의 Nup184-GFP 단백질만 anti-Myc 항체에 탐지되었고 SUMO 변형되지 않은 크기의 Nup184-GFP는 예상대로 anti-Myc 항체에 반응하지 않았다(Fig. 5). 이러한 실험 결과는 Nup184 단백질이 SUMO 변형되어 있음을 보여준다. 또한 단일 band로 보이지 않고 퍼져있는 것처럼 보이는 것으로 보아 poly-SUMO 또는 multi-SUMO (또는 두 경우 모두) 변형되어 있음을 암시한다. Nup184 단백질의 예상 아미노산 서열을 분석하면 총 7곳의 SUMO consensus 서열(ψ KxE/D)이 존재하였다(Fig. 1A). 앞서 사용한 Nup184의 부분 결실돌연변이를 면역침강 실험한 결과 Nup184 Δ 2 (Fig. 5) 뿐만 아니라 모든 부분 결실돌연변이들 역시 SUMO 변형되어 있었다(자료 미제시). 이러한 실험결과로는 어느 부위가 SUMO 변형에 중요한 것인지 불명확하지만, 기능이 없고 핵공복합체에 위치하지 못하는 부분 결실돌연변이들도 SUMO 변형되는 것으로 보아 전체적인 SUMO 변형이 반드시 Nup184의 기능에 필요한 것은 아닌 것으로 추측된다. 하지만 여러 자리에 SUMO 변형되더라도 특정 부위(특히 C-말단 1555 위치의 LKIE)의 SUMO 변형이 Nup184의 기능에 필요할 가능성도 배제할 수 없다. SUMO 변형이 Nup184의 기능에 미치는 영향은 향후 더 많은 분석 실험이 필요할 것으로 사료된다.

적요

Nup188 단백질은 진화적으로 보존된 가장 큰 핵공단백질 중의 하나로 핵공복합체의 inner ring을 구성하는 인자이다. Nup188의 이중상동체인 분열효모 *S. pombe*의 Nup184 단백질은 영양분이 풍부한 완전배지(YES 배지)에서 정상적인 성장과 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 필요하다. 본 연구에서는 Δ nup184 결실돌연변이를 YES 배지에서 배양할 때 보이는 성장지체와 mRNA export 결함을 상보하기 위해서 Nup184의 카르복시 부위(아미노산 잔기482에서 1628까지)가 필요함을 알아내었다. 또한 이 부위는 GFP-Nup184 융합단백질이 핵막에 위치하기 위해서도 필요하였다. 이 과정에서 *S. pombe* GeneDB (Sanger 연구소, 영국)에 등록되어 있는 Nup184의 열린읽기틀(1564개의 아미노산 잔기로 된 단백질로 예측)이 우리가 얻은 염기서열 데이터에 비해 66개의 아미노산 잔기가 짧다는 것을 발견하였다. 이 카르복시-말단 부위는 Nup184의 기능에 반드시 필요하였다. 이외에도 Nup184 단백질이 세포 안에서 SUMO 변형되어 있음을 보였다.

감사의 말

이 논문은 2010년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

Aitchison, J.D. and Rout, M.P. 2012. The yeast nuclear pore complex

and transport through it. *Genetics* **190**, 855–883.

Aitchison, J.D., Rout, M.P., Marelli, M., Blobel, G., and Wozniak, R.W. 1995. Two novel related yeast nucleoporins Nup170p and Nup157p: complementation with the vertebrate homologue Nup155p and functional interactions with the yeast nuclear pore-membrane protein Pom152p. *J. Cell Biol.* **131**, 1133–1148.

Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., and *et al.* 2007. Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* **450**, 683–694.

Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., Mcleod, M., and Warbrick, E. 1993. Experiments with Fission Yeast. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Amlacher, S., Sarges, P., Flemming, D., van Noort, V., Kunze, R., Devos, D.P., Arumugam, M., Bork, P., and Hurt, E. 2011. Insight into structure and assembly of the nuclear pore complex by utilizing the genome of a eukaryotic thermophile. *Cell* **146**, 277–289.

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.

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

Devos, D., Dokudovskaya, S., Alber, F., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., and Rout, M.P. 2004. Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS Biol.* **2**, e380.

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.

Dohmen, R.J. 2004. SUMO protein modification. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 113–131.

Fabre, E. and Hurt, E. 1997. Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu. Rev. Genet.* **31**, 277–313.

Flemming, D., Devos, D.P., Schwarz, J., Amlacher, S., Lutzmann, M., and Hurt, E. 2012. Analysis of the yeast nucleoporin Nup188 reveals a conserved S-like structure with similarity to karyopherins. *J. Struct. Biol.* **177**, 99–105.

Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 947–956.

Hoelz, A., Debler, E.W., and Blobel, G. 2011. The structure of the nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 613–643.

Leupold, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.* **24**, 381–480.

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**, 97–107.

Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G. 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135**, 1457–1470.

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

- Mukhopadhyay, D. and Dasso, M.** 2007. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 286–295.
- Nehrbass, U., Rout, M.P., Maguire, S., Blobel, G., and Wozniak, R.W.** 1996. The yeast nucleoporin Nup188p interacts genetically and physically with the core structures of the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **133**, 1153–1162.
- Palancade, B. and Doye, V.** 2008. Sumoylating and desumoylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties? *Trends Cell Biol.* **18**, 174–183.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L.Jr., Jarnik, M., Engel, A., and Aebi, U.** 1990. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell. Biol.* **110**, 883–894.
- Rout, M.P. and Aitchison, J.D.** 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* **276**, 16593–16596.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B.T.** 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell. Biol.* **148**, 635–651.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B., and Aebi, U.** 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 391–401.
- Suntharalingam, M. and Wente, S.R.** 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell* **4**, 775–789.
- Whalen, W.A., Yoon, J.H., Shen, R., and Dhar, R.** 1999. Regulation of mRNA export by nutritional status in fission yeast. *Genetics* **152**, 827–838.
- Yoon, J.H., Love, D., 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.
- 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.
- Zabel, U., Doye, V., Tekotte, H., Wepf, R., Grandi, P., and Hurt, E.C.** 1996. Nic96p is required for nuclear pore formation and functionally interacts with a novel nucleoporin, Nup188p. *J. Cell Biol.* **133**, 1141–1152.
- Zhao, J.** 2007. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 3017–3333.