

분열효모에서 *sphpr1* 유전자의 결실이 성장 및 mRNA Export에 미치는 영향

이현주 · 윤진호*

성신여자대학교 생명과학·화학부 및 기초과학연구소

Effects of the Repression of *sphpr1* Expression on Growth and mRNA Export in Fission Yeast

Hyun-Joo Lee and Jin Ho Yoon*

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

(Received June 11, 2012 / Accepted June 20, 2012)

THOC1/Hpr1 is one subunit of THO complex that is an evolutionally conserved assembly involved in the mRNA packaging and mRNA export during transcription elongation. In fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, an ortholog (spHpr1) of THOC1/Hpr1 was identified based on sequence alignment. A deletion mutant in a diploid strain was constructed by replacing one of spHpr1-coding region with a *kan^r* gene using one-step gene disruption method. Tetrad analysis showed that the *sphpr1* is essential for growth. Over-expression of *sphpr1* from strong *nmt1* promoter caused no defects of growth and mRNA export. However, repression of the *sphpr1* expression resulted in growth inhibition accompanied by accumulation of poly(A)⁺ RNA in the nucleus. These results suggest that spHpr1 is involved in mRNA export from the nucleus to cytoplasm.

Keywords: *S. pombe*, *sphpr1*, mRNA export, THO complex

진핵생물에서 mRNA의 생성(biogenesis)과 세포질로의 방출(mRNA export)은 매우 복잡한 과정들로 단백질들과 복합체들 사이의 수많은 일시적인 상호작용들이 관여한다. 단백질을 암호화하고 있는 mRNA 분자들은 RNA 중합효소II에 의해 전사되는 동안 여러 단백질들과 결합하여 mRNA-Protein 복합체인 mRNP로 포장(packaging)된다(Köhler and Hurt, 2007; Kelly and Corbett, 2009). 세포질에서 단백질로 해독되기에 적합한 성숙 mRNA가 핵 안에서 생성(전사, 5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 말단의 절단 및 폴리아데닐화) 되고 방출되는 모든 과정들은 서로 아주 밀접하게 연관되어 있으며, 한 과정에서 문제가 생기면 다른 과정들에도 영향을 미치게 된다(Fasken and Corbett, 2009; Stewart, 2010). 또한, 잘못 가공되거나 적절히 포장되지 못한 mRNP 중합체는 핵에서 방출되지 못하며, 결국 exosome에 의해 분해된다(Schmid and Jensen, 2010).

THO는 효모에서 사람까지 진화적으로 잘 보존된 거대 복합체(complex)로, 전사 신장(elongation) 과정에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 mRNP의 포장 및 세포질로의 방출을 용이하게

한다. 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 THO 복합체는 전사-의존적으로 염색질에 결합하며, 전사가 일어나는 동안 mRNP에 mRNA 방출인자인 Yra1과 Sub2를 효과적으로 불러들이는데 필수적인 역할을 담당한다(Strasser *et al.*, 2002). 출아효모의 THO는 4개의 소단위(Tho2, Hpr1, Mft1, Thp2)로 구성되어 있으며(Chávez *et al.*, 2000), 이중에서 주요 소단위인 Hpr1 (포유동물에서는 THOC1)과 Tho2 (THOC2)는 연구된 모든 진핵생물에 존재한다. THO 소단위 중 어느 것을 제거하더라도 THO 복합체는 와해되며, 이러한 돌연변이들은 모두 전사의 결함, 전사와 연관된 DNA 재조합의 빈도 증가, RNA 방출의 결함, exosome과 관련된 mRNA의 불안정성 증가 등의 표현형을 보인다(Chávez and Aguilera 1997; Chávez *et al.*, 2000; Jimeno *et al.*, 2002; Libri *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2002). 또한, THO 복합체는 mRNA 방출인자인 Sub2/UAP56, Yra1/Aly, Tex1 등과 함께 TREX (transcription/export)라는 커다란 복합체를 형성하며, Sub2와 Yra1의 돌연변이들도 THO 소단위와 비슷한 표현형을 보인다(Strasser *et al.*, 2002; Köhler and Hurt, 2007). 뿐만 아니라, 전사동안 THO 복합체는 mRNA 방출인자인 Mex67, SR-유사인자인 Gbp2와 Hrb1, 그리고 스플라이싱과 전사 신장에 관여하는 Prp19 복합체와도 상호작용하는 것이 밝혀졌다

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

(Strasser *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002; Hurt *et al.*, 2004; Chanarat *et al.*, 2011).

본 연구에서는 분열효모인 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에서 Hpr1/THOC1 단백질과 유사한 *S. pombe*의 단백질을 암호화하는 open reading frame (ORF)인 SPCP25A2.03을 찾아 mRNA 방출에 관여하는지를 알아보려고 하였다. 이 ORF에는 인트론이 2개 있으며 752개 아미노산으로 이루어진 예상 분자량 85.2 kDa, 등전점(isoelectric point, pI)이 pH 4.9인 단백질을 암호화하고 있다. 474개의 아미노산으로 이루어진 *S. cerevisiae* Hpr1 단백질에 비해 훨씬 길고 아미노산 서열의 유사성도 높지 않지만, 아미노산 잔기 77부터 564까지 efThoc1 도메인이 존재하므로 이 유전자를 *sphpr1*로 명명하였다.

본 실험에서는 이전에 기술된 분열효모의 유전학적 방법과 배양 방법을 사용하였다(Alfa *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1991). *kan^r* 선별유전자로 치환된 $\Delta sphpr1$ 결실돌연변이 균주를 만들기 위해서 double-joint PCR 방법으로 DNA 절편을 제작한 후, 야생형 균주에 형질전환하는 one-step gene disruption 방법을 사용하였다. $\Delta sphpr1::kan^r$ DNA 절편을 이배체 균주인 SP286 (*h⁺h⁺ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-210/ade6-216*)에 형질전환시켜 항진균제인 G418이 들어간 배지에서 자라는 형질전환체를 얻었다. 형질전환체의 DNA를 추출하여 PCR로 확인하는 과정을 통하여 2개의 *sphpr1* 유전자 중 하나만 *kan^r* 유전자로 치환된 이배체($\Delta sphpr1::kan^r/sphpr1^+$)를 선별하였다(Fig. 1A) 이렇게 얻은 SP286($\Delta sphpr1$) 균주로부터 포자형성을 할 수 있는 *h⁺h⁹⁰* 이배체를 선별한 다음 4분체 분석을 수행하였다. 하나의 이배체 세포는 감수분열에 의해 4개의 반수체 포자(4분체)를 형성하므로, 10개의 4분체를 미세조작기(micromanipulator)로 각각 분리하여 완전배지에서 배양하였다. 하나의 자낭에 있는 4개의 포자 중 2개만 콜로니로 성장하고 2개는 성장하지 못하는 2:2 분리양상을 보였다(Fig. 1B). 콜로니를 형성한 포자는 모두 G418이 들어간 배지에서 자라지 못하는 것으로 보아 *sphpr1* 유전자가 야생형인 반수체이고, 성장하지 못한 포자는

sphpr1 유전자가 결실된 $\Delta sphpr1::kan^r$ 유전자형을 갖는 반수체 포자이다. 이러한 결과는 생장에 필수적이지는 않지만 온도민감성(temperature-sensitive) 표현형을 보이는 출아효모의 *HPR1* 유전자와는 다르게, 분열효모의 *sphpr1* 유전자는 생장에 필수적임을 의미한다.

sphpr1 유전자는 생장에 필수적이므로, *sphpr1* 유전자의 발현이 억제(repression)되거나 과발현(over-expression)되는 균주를 제작하여 표현형을 관찰하기로 하였다. 먼저 *sphpr1* 유전자의 단백질을 암호화하는 ORF만을 *nmt1* 프로모터에 붙여서, *sphpr1*의 전사가 티아민에 의해 조절되는 3X-Hpr1 벡터를 제작하였다. *nmt1* 프로모터는 배지에 티아민이 없으면(-B1) 전사가 유도되고, 티아민이 존재하면(+B1) 전사가 억제되는 프로모터이다(Maundrell, 1993). pREP3X 벡터에 있는 야생형 *nmt1* 프로모터는 강력한 프로모터로 티아민이 없는 배지에서 발현 정도가 매우 높다(Forsburg, 1993). 형질전환을 통해 3X-Hpr1 벡터를 갖고 있는 야생형(WT) 반수체 균주인 AY217 (*h⁺ leu1-32 ura4-d18*)과 $\Delta sphpr1$ 결실돌연변이 균주를 얻었다. 이렇게 제작된 WT/3X-Hpr1 균주들은 염색체에서 발현되는 *sphpr1* 유전자 이외에 티아민이 없으면 3X-Hpr1 벡터에서 *sphpr1*가 훨씬 더 많이 발현된다. 하지만, *sphpr1* 유전자가 과발현되더라도 생장에 아무런 영향이 없었으며(Fig. 2), *in situ* hybridization을 통한 poly(A)⁺ RNA의 분포 조사에서도 야생형 균주와 차이점을 발견할 수 없었다(자료 미제시). 3X-Hpr1 벡터가 $\Delta sphpr1$ 결실돌연변이 균주의 성장결함을 상보(complementation)하는 것으로 보아(Fig. 2), 정상적으로 *sphpr1*이 발현된다는 것을 알 수 있었다. *In situ* hybridization의 혼성화 탐침으로는 3' 끝에 α -digoxigenin이 결합된 oligo-(dT)₅₀을 사용하였으며, FITC-antidigoxigenin Fab 항체(Roche, Germany)를 사용하여 poly(A)⁺와 혼성화된 α -digoxigenin이 결합된 oligo-(dT)₅₀을 형광현미경에서 관찰하였다(Yoon *et al.*, 2000). 핵의 위치는 4', 6'-diamidino-2'-phenylindole (DAPI)로 DNA를 염색하여 관찰하였다.

sphpr1 유전자의 과발현이 생장에 전혀 영향을 미치지 못하

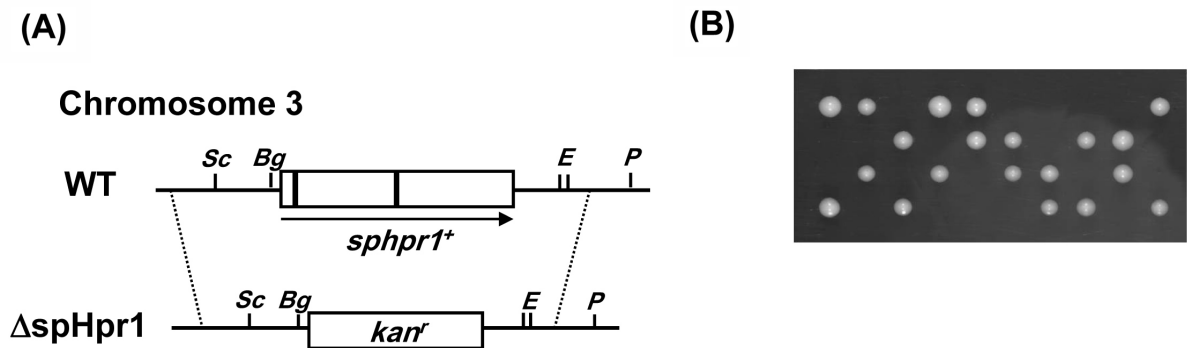


Fig. 1. *S. pombe sphpr1* gene is essential for growth. (A) A schematic representing the construct of $\Delta sphpr1$ null allele in *S. pombe*. The *sphpr1* open reading frame region was replaced by the marker gene, *kan^r*, by one-step gene disruption method. The *sphpr1* ORF is represented by open boxes and two introns are shown by vertical thick line in the open box. The direction of transcription is denoted by arrow under the ORF. Bg, BgII; E, EcoRI; P, PstI; Sc, SacI. (B) Tetrad analysis. Diploid cells disrupted one of the *sphpr1* loci were sporulated, and 10 tetrads were dissected on YES plate and incubated for 4 days at 30°C.

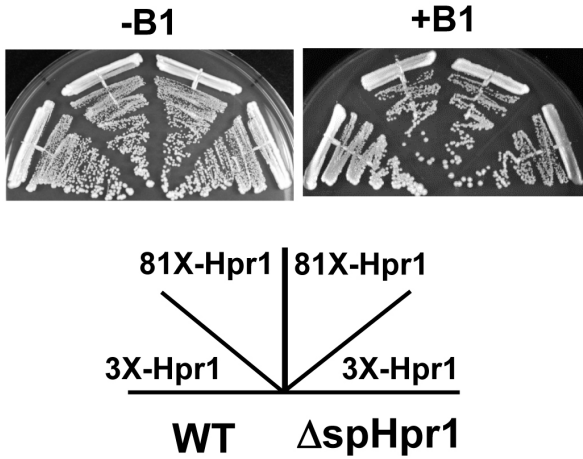


Fig. 2. Over-expression of *sphpr1* causes no defect of cell growth. Haploid wild-type AY217 cells (WT) and Δ *sphpr1* null mutant cells (Δ spHpr1) harboring 3X-Hpr1 or 81X-Hpr1 vectors were streaked onto EMM plates in the absence of (-B1) or in the presence of (+B1) thiamine and incubated for 4 days at 30°C.

므로, *sphpr1* 유전자의 발현이 억제(repression)될 때 생장과 mRNA 방출에 결함을 보이는지를 알아보려고 하였다. 야생형 *nmt1* 프로모터는 강력한 프로모터로 억제되더라도(티아민이 있는 배지) 기본발현 정도가 높기 때문에, 발현이 가장 약한 돌연변이형 *nmt1* 프로모터를 가진 pREP81X 벡터를 사용하였다. 하지만 81X-Hpr1 벡터를 가진 Δ spHpr1 결실돌연변이 균주들도

배지에 티아민이 존재(+B1)하더라도 생장이 여전히 정상이었다 (Fig. 2). 이것은 억제 가능한 가장 약한 돌연변이형 *nmt1* 프로모터라도 생장에 충분한 *sphpr1*을 전사한다는 것을 의미한다. 81X-Hpr1이 multi-copy 벡터이므로, 기본발현량을 줄이기 위해 돌연변이형 *nmt1* 프로모터에 의해 발현이 조절되는 P_{nmt} -*sphpr1* 대립유전자(allele)를 염색체의 *sphpr1* 유전자와 치환한 균주를 제작하였다(Fig. 3A). 기대한 바와 같이, 이 균주(P_{nmt} -spHpr1)는 배지에 티아민이 없으면(-B1) 정상적인 생장을 보였지만 티아민을 배지에 첨가하면(+B1) *sphpr1*의 발현이 억제되어 생장이 멈추었다(Fig. 3B). 또한, *sphpr1*이 발현되는 조건(-B1)에서 이 균주는 정상적인 poly(A)⁺ RNA 분포를 보이는 것에 비해, 티아민을 첨가하여 발현을 억제하면 핵 안에 poly(A)⁺ RNA가 축적되는 것이 관찰되었다(Fig. 3C). 이와 같은 결과들은 분열효모의 THOC1/Hpr1 이중상동체(ortholog)인 spHpr1도 mRNA 방출에 관여한다는 것을 의미한다.

spHpr1 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위하여 GFP (Green Fluorescence Protein)를 이용하였다. 이를 위해 GFP 벡터인 pZA69U에 *sphpr1* ORF를 클로닝하였다. 이렇게 제작한 pZA-Hpr1 벡터는 P_{nmt} -spHpr1 균주가 티아민이 첨가된 배지에서 생장과 mRNA 방출을 정상적으로 상보하므로, GFP-Hpr1 융합단백질이 정상적인 기능을 가지고 있음을 알 수 있었다(자료 미제시). 이 균주에서 GFP-spHpr1의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰한 결과, 주로 핵 안에 선행하게 존재하였다(Fig. 4). 위와 같은 결과들은 분열효모의 spHpr1 단백질도 THOC1/Hpr1과 유사한 역할을 담당한다는 것을 시사한다. 출아효모 *S. cerevisiae*와

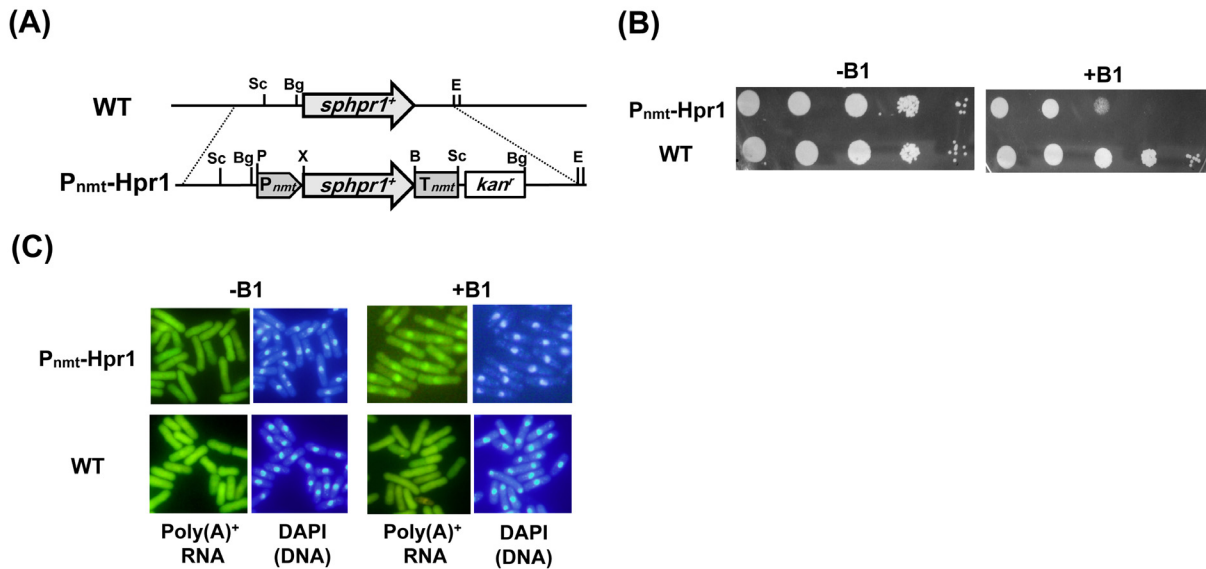


Fig. 3. Repression of the *sphpr1* expression causes defects of both growth and mRNA export. (A) A schematic diagram representing the constructs of the P_{nmt} -Hpr1 mutant in *S. pombe*. Genomic *sphpr1* gene was substituted with P_{nmt} -*sphpr1*⁺-*Tnmt*::*kan*^r. B, BamHI; Bg, BgIII; E, EcoRI; P, PstI; Sc, SacI; X, XhoI. (B) Growth of P_{nmt} -Hpr1 and wild-type strains was monitored by spot assay for 4 days at 30°C on EMM plates with (+B1) and without (-B1) thiamine. (C) Poly(A)⁺ RNA localization. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) at 30°C. The cells were then shifted to EMM medium without (-B1) or with thiamine (+B1), and were grown for 18 h. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

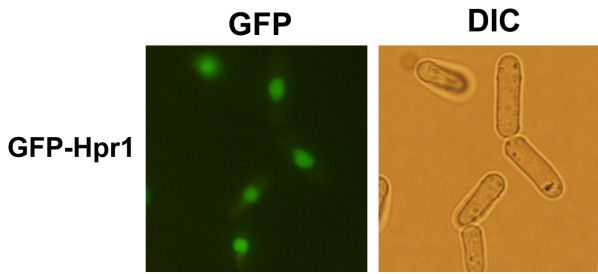


Fig. 4. Localization of spHpr1 protein fused to GFP. spHpr1 was tagged with GFP at its amino-terminal (GFP-Hpr1). Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine at 30°C. Coincident differential interference contrast (DIC) images are also shown in the right panel.

는 달리, spHpr1 단백질이 생장에 필수적인 것으로 보아 분열효모에서는 생장에 필수적인 유전자들의 발현이 THO 복합체에 의존적인 것을 암시한다. 포유동물의 THO와 마찬가지로 분열효모의 유전체에는 THO 복합체를 구성하고 있는 5개의 소단위 (THOC1~5)가 모두 보존되어 있는 것으로 보이므로, 출아효모의 THO 복합체를 연구하는 것은 포유동물에서의 THO 기능을 이해하는데 도움을 주리라 사료된다.

적요

THOC1/Hpr1는 mRNA가 전사되는 동안 mRNP의 포장과 mRNA 방출에 관여하는 진화적으로 잘 보존된 THO 복합체의 한 소단위이다. 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에서도 THOC1/Hpr1과 유사한 단백질을 암호화하는 유전자(*sphpr1*로 명명)를 찾아 그 특성을 조사하였다. 이배체 *S. pombe* 균주에 하나의 *sphpr1* 유전자만을 결실시킨 후 4분체 분석을 수행한 결과, 이 유전자는 생장에 필수적이었다. 티아민에 의해 발현이 조절되는 강력한 *nmt1* 프러모터를 이용하여 *sphpr1*를 과발현시키더라도 세포의 성장과 mRNA 방출에는 전혀 영향이 없었다. 하지만, *sphpr1*의 발현을 억제하면 생장이 억제되었으며 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되었다. 이와 같은 결과들은 *sphpr1* 유전자가 성장과 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출에 관여하고 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2010년도 성신여자대학교 학술연구구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., Mcleod, M., and Warbrick, E. 1993.

- Experiments with Fission Yeast. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Chanarat, S., Seizl, M., and Strässer, K. 2011. The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. *Genes Dev.* **25**, 1147–1158.
- Chávez, S. and Aguilera, A. 1997. The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev.* **11**, 3459–3470.
- Chávez, S., Beilharz, T., Rondón, A.G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Svejstrup, J.Q., Lithgow, T., and Aguilera, A. 2000. A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**, 5824–5834.
- Fasken, M.B. and Corbett, A.H. 2009. Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol.* **6**, 237–241.
- Forsburg, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2955–2956.
- Hurt, E., Luo, M.J., Röther, S., Reed, R., and Strässer, K. 2004. Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1858–1862.
- Jimeno, S., Rondón, A.G., Luna, R., and Aguilera, A. 2002. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J.* **21**, 3526–3535.
- Kelly, S.M. and Corbett, A.H. 2009. Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes. *Traffic* **10**, 1199–1208.
- Köhler, A. and Hurt, E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 761–773.
- Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., and Jensen, T.H. 2002. Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8254–8266.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127–130.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823.
- Schmid, M. and Jensen, T.H. 2010. Nuclear quality control of RNA polymerase II transcripts. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **1**, 474–485.
- Stewart, M. 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 609–617.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodríguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304–308.
- 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.
- Zenkhusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.C., and Stutz, F. 2002. Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8241–8253.