

분열효모에서 *spThoc7* 유전자의 결실이 생장 및 mRNA Export에 미치는 영향

고은진 · 윤진호*

성신여자대학교 생명과학·화학부 및 기초과학연구소

Effects of *spThoc7* Deletion on Growth and mRNA Export in Fission Yeast

Eun-Jin Koh 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 August 27, 2014 / Accepted September 17, 2014)

THOC7/Mft1 is a member of the THO complex that is an evolutionally conserved assembly connecting transcription elongation with mRNP packaging and mRNA export. In fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, an ortholog (*spThoc7*) of THOC7/Mft1 was isolated by partial complementation of the lethality in synthetic lethal mutant, SLRsm1. A deletion mutant in a diploid strain was constructed by replacing one of *spThoc7*-coding region with an *ura4⁺* gene using one-step gene disruption method. Tetrad analysis showed that the *spthoc7* is nonessential for growth. But the $\Delta thoc7$ null mutant showed slight defects of both growth and mRNA export. And the functional *spThoc7*-GFP protein is localized mainly in the nucleus. These results suggest that *spThoc7* is also involved in mRNA export from the nucleus to cytoplasm.

Keywords: *S. pombe*, mRNA export, THO complex, Thoc7

전사와 해독이 세포질에서 동시에 일어나는 원핵세포와는 달리, 진핵세포의 mRNA 생성은 핵에서 진행되며 세포질에서 일어나는 해독과 시간적, 공간적으로 분리되어 있다. 핵안에서 전사되는 pre-mRNA는 가공과정인 5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 절단 및 폴리아데닐화를 거쳐 mature mRNA가 된다. 이렇게 완성된 mature mRNA만이 세포질로 방출되기 적합한 mRNP (messenger ribonucleoprotein) 복합체를 형성하여 핵막에 존재하는 핵공복합체(nuclear pore complex)를 통해 세포질로 방출된다. 이러한 진핵세포의 mRNA 생성은 매우 복잡한 과정으로 단백질-단백질, 단백질-핵산 사이의 수많은 일시적인 상호작용에 의해 조절되고 있으며, 전사에서부터 방출까지 모든 단계들이 서로 매우 밀접하게 연관되어 있다(Kohler and Hurt, 2007; Kelly and Corbett, 2009). 또한 mRNA 생성과정 중에 문제가 생기면 mRNA surveillance system이 활성화되어 잘못된 mRNP 복합체는 핵에서 방출되지 못하며, 결국 exosome에 의해 분해된다(Houseley *et al.*, 2006; Schmid and Jensen, 2010).

mRNA 생성과정에 중요한 THO 복합체는 효모에서 사람까

지 진화적으로 잘 보존되어 있으며, 활성화된 유전자의 전사 신장과정에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, mRNA의 3'-말단형성, mRNP의 포장 및 세포질로의 방출을 용이하게 한다(Luna *et al.*, 2012). 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 처음 밝혀진 THO 복합체는 RNA 중합효소 II의 가장 큰 소단위인 Rbp1의 인산화된 C-말단 영역(CTD)과 직접 결합함으로써 전사가 활성화된 유전자 부위로 recruit된다(Meinel *et al.*, 2013). 또한 THO 복합체는 전사가 일어나는 동안 mRNA 방출인자인 Yra1 (RNA-결합 단백질), Sub2 (DEAD box RNA helicase)와 결합하여 TREX (transcription and export)라 불리는 커다란 복합체를 형성하여 mRNP에 결합한다. THO/TREX 복합체는 mRNA 방출에 필수적인 mRNA 방출운반체(export receptor)인 Mex67와 결합할 뿐만 아니라, SR-유사인자인 Gbp2와 Hrb1, 그리고 스플라이싱과 전사 신장에 관여하는 Prp19 복합체와도 상호작용하는 것이 밝혀졌다(Strasser *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002; Hurt *et al.*, 2004; Chanarat *et al.*, 2011). THO 소단위 중 어느 것을 제거하더라도 THO 복합체는 와해되며, THO/TREX 소단위의 결실돌연변이들은 모두 mRNA 생성과 방출에 결함을 보이며, exosome과 관련된 mRNA의 불안정성 증가 등의 표현형을 보인다(Chávez and Aguilera, 1997; Chávez *et al.*, 2000;

*For correspondence. E-mail: jhoyoon@sungshin.ac.kr; Tel.: +82-2-920-7675; Fax: +82-2-920-2047

Jimeno *et al.*, 2002; Libri *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2002; Köhler and Hurt, 2007). 비록 이러한 돌연변이들이 생장에 필수적이지 않고 전체적인 유전자들의 발현 양상에도 아주 크게 영향을 미치지 않지만, 특히 길이가 크고 GC 비율이 높은 유전자들은 가장 급격하게 영향을 받는다(Chávez *et al.*, 2001). 뿐만 아니라 THO 복합체의 돌연변이들에서는 전사된 RNA가 DNA에서 분리되지 않고 RNA/DNA 혼성 loop (R-loop)가 형성되는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 유전체의 불안정성(genomic instability)이 증가하게 되어 결과적으로 DNA hyper-recombination 표현형을 보인다(Aguillera, 2002).

출아효모의 THO 복합체는 Tho2p (184 kDa), Hpr1p (88 kDa), Tex1p (47 kDa), Mft1p (45kDa), Thp2p (33 kDa) 등의 5개 소단위로 구성되어 있다(Chávez *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2012), 이 중에서 주요 소단위인 Hpr1 (포유동물에서는 THOC1), Tho2 (THOC2)와 Tex1 (THOC3)는 연구된 대부분의 진핵생물에서 잘 보존되어 있다. 초파리, 사람과 같은 고등동물의 THO 복합체는 잘 보존된 THOC1, THOC2, THOC3 이외에 THOC5, THOC6, THOC7 등의 총 6개의 소단위로 구성되어 있다(Rehwinkel *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2005). 이와 같이 고등동물에서 THO 복합체는 구성이 다소 다르지만, 출아효모와 마찬가지로 UAP56 (Sub2의 상동체), ALY/REF (Yra1의 상동체)와 함께 TREX 복합체를 형성하여, mRNA 생성과 방출에 관여하는 것으로 보인다. 하지만 전사 동안 recruit되는 출아효모와는 다르게, 포유동물에서 THO/TREX 복합체는 전사-비의존적으로 spliced mRNA에만 특이적으로 결합한다. 즉, 포유동물의 THO/TREX 복합체는 스플라이싱 후 생성되는 exon junction complex (EJC) 그리고 캡-결합(cap-binding) 단백질인 CBP80과 상호작용함으로써 spliced mRNA의 5' 말단 쪽에 스플라이싱 및 캡-의존적으로 recruit된다(Masuda *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006).

본 연구진은 이전에 분열효모인 *S. pombe*에서 mRNA 방출인자를 암호화하고 있는 *rsm1* 결실(deletion) 돌연변이가 대립유전자와 합성치사(synthetic lethal)를 보이는 돌연변이 균주들을 선별하였다(Moon *et al.*, 2010). 합성치사란 한 세포에 돌연변이 유전자가 하나만 각각 존재하면 생존에 문제가 없지만, 2개의 서로 다른 돌연변이가 유전자들이 동시에 존재하면 죽는 것을 말한다. 선별된 합성치사 돌연변이들은 *rsm1* 결실돌연변이와 어떤(unknown) 돌연변이가 유전자를 동시에 가지고 있어 성장하지 못한다. 하지만 선별을 위해 합성치사 돌연변이들은 p81X-Rsm1 벡터에 티아민-억제(thiamine-repressible) *nmt1* 프로모터에 의해 발현이 조절되는 *rsm1* 유전자를 가지고 있기 때문에, 티아민이 없는 배지(-B1)에서는 Rsm1이 발현되어 성장할 수 있고, 티아민이 들어있는 배지(+B1)에서는(합성치사 조건에서는) Rsm1의 발현이 억제되어 죽는다(Fig. 1A). 합성치사 돌연변이 균주인 SLRsm1에 genomic DNA library를 형질전환하여, 티아민이 들어있는 배지(+B1)에서 합성치사를 완전히 또는 부분적으로 상보하는 클론들을 얻었다. DNA sequencing 분석을 통해 얻은 클론들의 염기서열을 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에서 찾아보았다. 성장결함을 완전히 상보하는 클론들은 *rsm1* 유전자를 가지고 있었으며, 부분적으로 상보하는 클론들은

이미 알려진 *mex67* (mRNA export receptor), *sac3* (mRNA export factor), *mlo3* (Yra1의 *S. pombe* 이종상동체), 그리고 THOC7과 유사한 단백질을 암호화하는 open reading frame (ORF)인 SPCC24B10.11c 유전자를 가지고 있었다(Fig. 1B). 클로닝된 유전자들이 *rsm1* 결실유전자와 합성치사를 보이는 유전자인지를 확인하기 위해, SLRsm1 합성치사 돌연변이 균주에서 각각의 유전자들을 PCR 증폭하여 DNA sequencing을 하였다. *mex67*, *sac3*, *mlo3*, SPCC24B10.11c 유전자 모두 야생형과 차이가 없는 것으로 보아(자료 미제출), 이 클론들은 모두 SLRsm1 합성치사 돌연변이의 성장결함을 상보하는 multi-copy suppressor로 작용한 것으로 보인다.

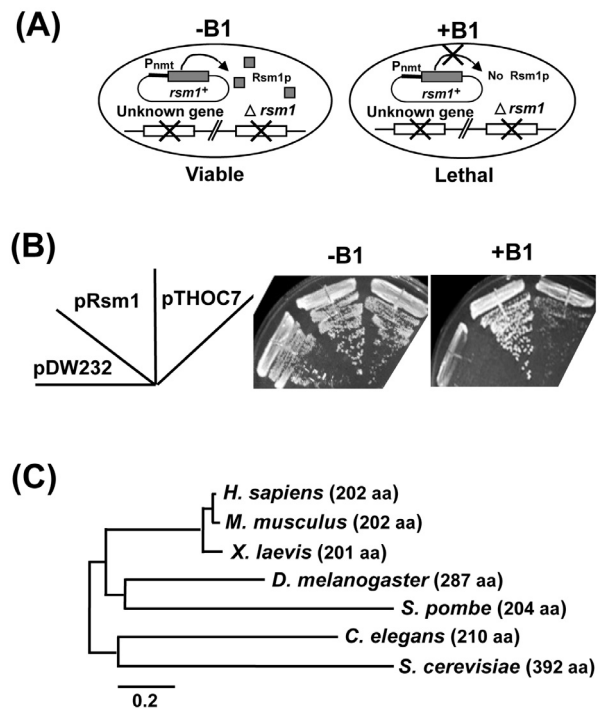


Fig. 1. Isolation of *thoc7* (SPCC24B10.11c) that complements the growth defect of synthetic lethal mutant, SLRsm1. (A) Schematic diagram represents the synthetic lethality in SLRsm1 mutants. Wild-type *rsm1* ORF is denoted by shaded boxes and expressed under the control of the *nmt1* promoter (P_{nmt}) in pREP81X plasmid. The Δ *rsm1* null allele and unknown mutated genes are shown by open boxes with a cross. Synthetic lethal mutants are kept viable by expression of *rsm1* from the pREP81X plasmid in the absence of thiamine (-B1). In the presence of thiamine (+B1), the expression of *rsm1* is repressed, resulting in the inhibition of growth. (B) Suppression of the growth defect in synthetic lethal mutant, SLRsm1 by *rsm1* and *thoc7* (SPCC24B10.11c). SLRsm1 cells carrying pDW232 (empty vector), pRsm1 (*rsm1*), and pTHOC7 (SPCC24B10.11c) were streaked onto EMM agar in the absence (-B1) and presence (+B1) of thiamine. Cells were incubated for 4 days at 28°C. (C) Neighbor-joining phylogenetic tree based on amino acid sequences of THOC7 from selected organisms, such as human (*Homo sapiens*, NP_079351.2), mouse (*M. musculus*, NP_079711.1), fruit fly (*D. melanogaster*, CAF04325.1), nematode (*C. elegans*, CAB54184.1), amphibian (*X. laevis*, NP_001080651.1), budding yeast (*S. cerevisiae*, P33441.1), and fission yeast (*S. pombe*, CAB76220.1) by MEGA program.

SPCC24B10.11c ORF에는 인트론이 3개 있으며 202개 아미노산으로 이루어진 예상 분자량 23.28 kDa, 등전점(isoelectric point, pI)이 pH4.48인 단백질을 암호화하고 있다. 이것은 204개의 아미노산으로 이루어진 사람과 생쥐의 THOC7 단백질과 아미노산 서열의 유사도(homology)는 61%, 동질도(identity)는 21% 정도이며, 유사 정도는 특정 영역에 국한되지 않고 단백질 전체에서 보였다. 사람(*Homo sapiens*), 생쥐(*Mus musculus*), 초파리(*Drosophila melanogaster*), 개구리(*Xenopus laevis*), 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*), 출아효모(*S. cerevisiae*), 그리고 분열효모(*S. pombe*)의 THOC7/Mft1 단백질을 MEGA 프로그램을 사용하여(Tamura *et al.*, 2013), 계통수(neighbor-joining tree)를 그려보았다(Fig. 1C). SPCC24B10.11c 단백질은 초파리의 THOC7와 가장 유사하였으며, 출아효모의 Mft1보다 사람,

생쥐, 초파리의 THOC7과 더 유사하였다. 그러므로 분열효모의 SPCC24B10.11c 유전자를 *sphoc7*로 명명하였다.

분열효모의 spThoc7이 실제로 mRNA 방출에 관여하는지를 알아보고자 하였다. 본 실험에서는 이전에 기술된 분열효모의 유전학적 방법과 배양 방법을 사용하였다(Moreno, 1991; Alfa *et al.*, 1993). *ura4⁺* 선별유전자로 치환된 $\Delta thoc7$ 결실돌연변이 균주를 만들기 위해서 double-joint PCR 방법으로 DNA 절편을 제작한 후, 야생형 균주에 형질전환하는 one-step gene disruption 방법을 사용하였다. $\Delta thoc7::ura4⁺$ DNA 절편을 이배체 균주인 SP286 (*h⁺/h⁺ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-210/ade6-216*) 과 반수체 균주인 AY217 (*h⁻ leu1-32 ura4-d18*)에 각각 형질전환시켜 유라실이 없는 배지에서 자라는 형질전환체를 얻었다. $\Delta thoc7$ 결실돌연변이를 선별하기 위해 형질전환체의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 대조균으로 사용한 야생형인 균주에서는 2.7 kb의 DNA만이 증폭되는 것에 비해 3.7 kb도 증폭되는 결실돌연변이를 선별하였으며, 대조균에서는 아무것도 증폭되지 않는 *ura4⁺*에 존재하는 프라이머와 5'쪽 또는 3'쪽 프라이머를 사용하여 결실돌연변이에서는 각각 1.0 kb의 DNA가 증폭되는 것도 확인하였다(Fig. 2A). 이렇게 얻은 이배체 SP286($\Delta thoc7$) 균주로부터 포자형성을 할 수 있는 *h⁺/h⁹⁰* 이배체를 선별한 다음 4분체(tetrad) 분석을 수행하였다. 분석한 10개의 사분체에서 모든 포자들이 콜로니를 형성하였다. 콜로니를 형성한 4개의 포자 중 2개는 유라실-영양요구 표현형을 보이므로 야생형 *sphoc7* 유전자를 가진 반수체이고, 나머지 2개의 포자는 유라실이 없는 배지에서도 성장하므로 *sphoc7* 유전자가 결실된($\Delta thoc7::ura4⁺$ 유전자형을 갖는) 것이었다. 하지만 $\Delta thoc7$ 결실돌연변이 균주는 측정된 모든 온도(22, 28, 34°C)에서 야생형 균주보다 느린 성장 속도를 보였다(Fig. 2B). 또한 반수체 AY217 균주에서 *sphoc7* 유전자를 바로 결실시킨 것도 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과는 출아효모의 THO 복합체를 암호화하고 있는 유전자들과 마찬가지로 분열효모의 *sphoc7* 유전자도 성장에 필수적이지는 않지만, 측정된 모든 온도 범위에서 정상적인 성장에 필요하다는 것을 의미한다.

sphoc7 유전자가 성장에 영향을 미치지므로 mRNA 방출에는 영향을 주는지를 알아보기 위해 세포 내의 poly(A)⁺ RNA의 분포를 fluorescence *in situ* hybridization (FISH)을 통해 알아보았다. FISH는 이전 논문에 언급한 방법을 사용하였다(Yoon *et al.*, 2000). 혼성화 탐침으로는 3' 끝에 α -digoxigenin이 결합된 oligo-(dT)₅₀을 사용하였으며, FITC-antidigoxigenin Fab 항체 (Roche, Germany)를 사용하여 poly(A)⁺와 혼성화된 oligo-(dT)₅₀을 형광현미경에서 관찰하였다. 핵의 위치는 4', 6'-diamidino-2'-phenylindole (DAPI)로 DNA를 염색하여 관찰하였다. Fig. 2C에서 보듯이 야생형(WT) 균주에서는 poly(A)⁺ RNA의 분포가 세포질과 핵 안에 골고루 퍼져있지만, $\Delta thoc7$ 결실돌연변이 균주에서는 핵 안에 약간 더 축적되어 있는 것이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 분열효모의 spThoc7 단백질이 필수적이지는 않지만 정상적인 bulk mRNA의 핵에서 세포질로의 방출에 필요하다는 것을 의미한다.

spThoc7 단백질이 결여되면 정상적인 성장과 mRNA 방출에 영

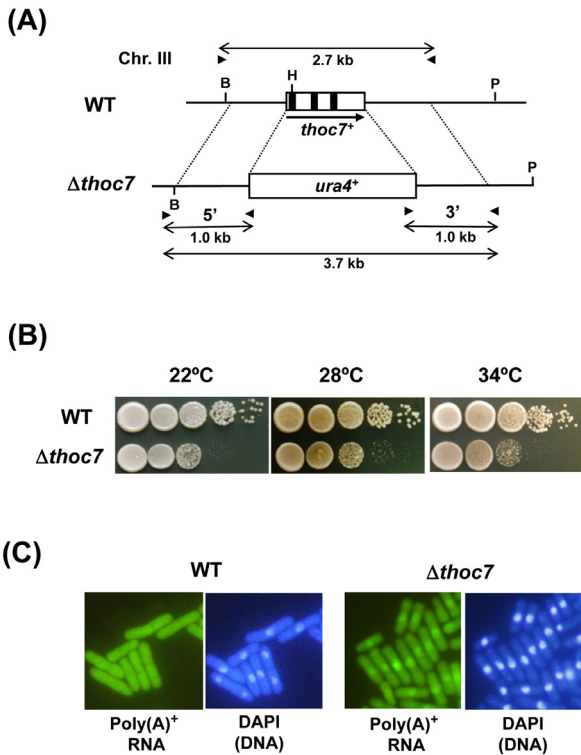


Fig. 2. *S. pombe thoc7* deletion mutants showed the slight defects of both growth and mRNA export. (A) A schematic representing the construct of $\Delta thoc7$ null allele in *S. pombe*. The *thoc7* ORF region was replaced by the marker gene, *ura4⁺* by one-step gene disruption method. The *thoc7* (SPCC24B10.11c) ORF is represented by open boxes and three introns are shown by vertical thick line in the open box. The direction of transcription is denoted by arrow under the ORF. The positions of PCR primers for confirmation of wild type and null allele are indicated by arrowheads. The size of PCR products is denoted under the arrows. B, BamHI; H, HpaI; P, PvuII. (B) Growth of haploid wild-type *thoc7⁺* (WT) cells and $\Delta thoc7$ deletion mutant cells were monitored by spot assay on YES medium and incubated for 5 days at 22°C, 3 days at 28°C, and 2 days at 34°C, respectively. (C) Poly(A)⁺ RNA localization. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium at 28°C. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

향을 주기 때문에, 반대로 spThoc7 단백질이 과발현(over-expression) 되는 균주를 제작하여 표현형을 관찰하기로 하였다. 먼저 *sphoc7* ORF만을 강력한 야생형 *nmt1* 프로모터에 붙여서, *sphoc7*의 전사가 티아민에 의해 조절되는 3X-Thoc7 벡터를 제작하였다. 3X-Thoc7 벡터를 야생형 반수체 균주인 AY217과 $\Delta thoc7$ 결실 돌연변이에 각각 형질전환하였다. 이렇게 제작된 균주(WT/3X-Thoc7)는 염색체에서 발현되는 *sphoc7* 유전자 이외에 티아민이 없는 배지에서는 3X-Thoc7 벡터로부터 *sphoc7*가 훨씬 더 많이 발현된다. 하지만, *sphoc7* 유전자가 과발현되더라도 생장에 아무런 영향이 없었으며, FISH를 통한 poly(A)⁺ RNA의 분포 조사에서도 야생형 균주와 큰 차이점을 발견할 수 없었다(자료 미제출). 티아민이 들어있는 배지에서도 3X-Thoc7 벡터가 $\Delta thoc7$ 결실돌연변이 균주의 생장결함을 상보하는 것으로 보아, 3X-Thoc7 벡터로부터 basal level로 *sphoc7*가 발현되더라도 세포의 생장에 충분하다는 것을 알 수 있었다.

다음으로 spThoc7 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위하여 GFP (Green Fluorescence Protein)를 이용하였다. 이를 위해 GFP 유전자를 *sphoc7* ORF의 3' 말단에 붙인 *thoc7-gfp::kan'* DNA 절편을 DJ-PCR로 제작하여 *sphoc7* 유전자 위치에 삽입하여 spThoc7-GFP 단백질이 endogenous 수준으로 발현되도록 하였다. 이렇게 제작한 균주는 PCR과 DNA sequencing을 통해 genomic *sphoc7* 유전자가 *thoc7-gfp*로 치환된 것을 확인하였다. 이렇게 *sphoc7* 자신의 프로모터에 의해 염색체에서 spThoc7-GFP 단백질만이 발현되는 균주도 생장이 정상적이므로(자료 미제출), 삽입된 spThoc7-GFP 단백질이 정상적인 기능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이 균주에서 spThoc7-GFP의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰한 결과, 세포질에서도 약간 존재하였지만 대부분 핵 안에서 관찰되었다(Fig. 3).

위와 같은 결과들은 분열효모의 Thoc7 이종상동체(ortholog)도 mRNA 방출에 관여하며 *S. pombe*의 THO 복합체도 유사한 역할을 담당한다는 것을 의미한다. 하지만 분열효모 *S. pombe*의 유전체 data에서는 *in silico* 분석을 통해 출아효모 *S. cerevisiae*의 THO 구성인자들을 모두 발견할 수 없었다. 즉 모든 진핵세포

에서 잘 보존된 Hpr1, Tho2, Tex1은 보존되어 있지만, Fig. 1C에서 보듯이 Mft1와는 유사도가 매우 낮은 Thoc7 이종상동체가 존재하고 Thp2 이종상동체는 찾을 수 없었다. 오히려 고등생물의 THOC5 이종상동체가 존재한다. 또한 출아효모 *S. cerevisiae*의 THO 구성인자들이 모두 생장에 필수적이지 않고 이들의 돌연변이들은 모두 비슷한 표현형을 보이지만(Luna *et al.*, 2012), 분열효모 *S. pombe*에서는 Hpr1/THOC1, Tho2/THOC2 이종상동체는 생장에 필수적이고 나머지 인자들은 생장에 필수적이지 않다. 이와 같이 *S. pombe*의 THO 복합체는 출아효모보다 고등생물과 더 비슷해 보이므로, *S. pombe*의 THO 복합체를 연구하는 것은 고등생물에서의 THO 역할을 이해하는데 많은 도움이 될 것이라고 사료된다.

적 요

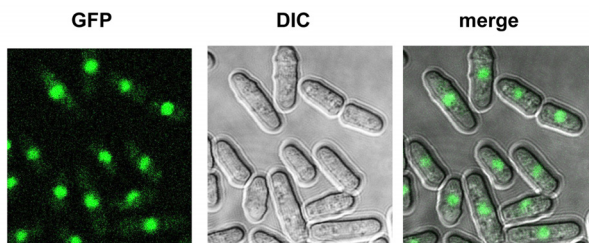
THOC7/Mft1는 mRNA가 전사되는 동안 mRNP의 포장과 mRNA 방출에 관여하는 진화적으로 잘 보존된 THO 복합체의 구성인자이다. 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에서 THOC7/Mft1의 이종상동체(spThoc7)가 합성시사 돌연변이체 SLRsm1의 생장 결함을 부분적으로 상보하는 것으로 선별되었다. 이배체 *S. pombe* 균주에 하나의 *sphoc7* 유전자만을 결실시킨 후 4분체 분석을 수행한 결과, 이 유전자는 생장에 필수적이지 않았다. 하지만, $\Delta thoc7$ 결실돌연변이는 생장과 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출에 약간의 결함을 보였다. 기능을 하는 spThoc7-GFP 단백질은 주로 핵 안에 존재하였다. 이와 같은 결과들은 spThoc7도 mRNA 방출에 관여하고 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2012년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Aguilera, A. 2002. The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J.* **21**, 195–201.
- 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.
- 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.
- Chávez, S., García-Rubio, M., Prado, F., and Aguilera, A. 2001. Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**,



Thoc7-GFP

Fig. 3. Localization of Thoc7 protein fused to GFP. Thoc7 was tagged with GFP at its carboxyl-terminal (Thoc7-GFP). An integrated version of the *thoc7-gfp* fusion was constructed at the *thoc7* locus, and the localization of the fusion protein was determined. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine at 28°C. Green fluorescent image (GFP) and coincident differential interference contrast image (DIC) are shown. And the merged image of both is also presented in the right panel.

- 7054–7064.
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.S., Hsu, J.L., Dias, A., and Reed, R.** 2006. Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**, 1389–1400.
- Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D.** 2006. RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 529–539.
- 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**, 3526–3355.
- 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.
- Luna, R., Rondón, A.G., and Aguilera, A.** 2012. New clues to understand the role of THO and other functionally related factors in mRNP biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**, 514–520.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R.** 2005. Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev.* **19**, 1512–1517.
- Meinel, D.M., Burkert-Kautzsch, C., Kieser, A., O'Duibhir, E., Siebert, M., Mayer, A., Cramer, P., Söding, J., Holstege, F.C., and Strässer, K.** 2013. Recruitment of TREX to the transcription machinery by its direct binding to the phospho-CTD of RNA polymerase II. *PLoS Genet.* **9**, e1003914.
- Moon, D., Park, Y., Kim, C., and Yoon, J.H.** 2010. Isolation of synthetic lethal mutations with *rsm1*-null allele in the fission yeast. *J. Microbiol.* **48**, 701–705.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P.** 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* **194**, 795–823.
- Peña, A., Gewartowski, K., Mroczek, S., Cuéllar, J., Szykowska, A., Prokop, A., Czarnocki-Cieciura, M., Piwowarski, J., Tous, C., Aguilera, A., and *et al.*** 2012. Architecture and nucleic acids recognition mechanism of the THO complex, an mRNP assembly factor. *EMBO J.* **31**, 1605–1616.
- Rehwinkel, J., Herold, A., Gari, K., Köcher, T., Rode, M., Ciccarelli, F.L., Wilm, M., and Izaurralde, E.** 2004. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 558–566.
- Schmid, M. and Jensen, T.H.** 2010. Nuclear quality control of RNA polymerase II transcripts. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **1**, 474–485.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondón, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and *et al.*** 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304–308.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.
- Yoon, J.H., Love, D.C., Guhathakurta, A., Hanover, J.A., and Dhar, R.** 2000. Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8767–8782.
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.C., and Stutz, F.** 2002. Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8241–8253.