

Note

## 분열효모에서 TREX-2 복합체의 구성요소인 Sus1이 성장 및 mRNA 방출에 미치는 영향

배수정 · 윤진호\*

성신여자대학교 생명과학·화학부

### Effects of Sus1, a component of TREX-2 complex, on growth and mRNA export in fission yeast

Soo Jeong Bae and Jin Ho Yoon\*

School of Biological Science and Chemistry, Sungshin Women's University, Seoul 01133, Republic of Korea

(Received February 21, 2017; Revised March 13, 2017; Accepted March 16, 2017)

Sus1 / ENY2 is a tiny conserved protein that is involved in chromatin remodeling and mRNA biogenesis. Sus1 is associated to two nuclear complexes, the transcriptional coactivator SAGA and the nuclear pore associated TREX2. In fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, ortholog of Sus1 / ENY2 was identified from the genome database. Tetrad analysis showed that the *S. pombe sus1* is not essential for growth. However, deletion of the *sus1* gene caused cold-sensitive growth retardation with slight accumulation of poly(A)<sup>+</sup> RNA in the nucleus. And the Sus1-GFP protein is localized mainly in the nucleus. Yeast two-hybrid analysis and co-immunoprecipitation experiment showed that Sus1 interacts with Sac3, another subunit of TREX2 complex. These results suggest that *S. pombe* Sus1 is also involved in mRNA export from the nucleus as a component of TREX-2 complex.

**Keywords:** fission yeast *S. pombe*, mRNA export, *sus1*, TREX-2 complex

원핵세포와는 다르게 진핵세포에서는 핵 안에 존재하는 유전자들이 단백질로 발현되기 위해서 더 복잡한 여러 과정을 거쳐야 한다. 먼저 염색질의 변형을 동반하는 전사의 시작, pre-

mRNA의 합성과 가공(5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 절단 및 폴리아데닐화)을 거쳐, 성숙한 mRNP (messenger ribonucleoparticle)로 포장(packaging)된 후, 성숙한 mRNA는 핵 막에 존재하는 핵공복합체(nuclear pore complex)를 통해 핵에서 세포질로 방출된다. 방출된 mRNA는 단백질로 해독되거나 분해되는 과정을 겪는다. 이렇게 복잡한 일련의 유전자 발현과정들은 조직화되어 조절되며 서로 영향을 주고받는다(Stewart, 2010; Rodriguez-Navarro and Hurt, 2011). 이러한 유전자 발현 과정들의 통합과 조절에는 여러 인자로 구성된 단백질 복합체 (multi-protein complex)들이 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다.

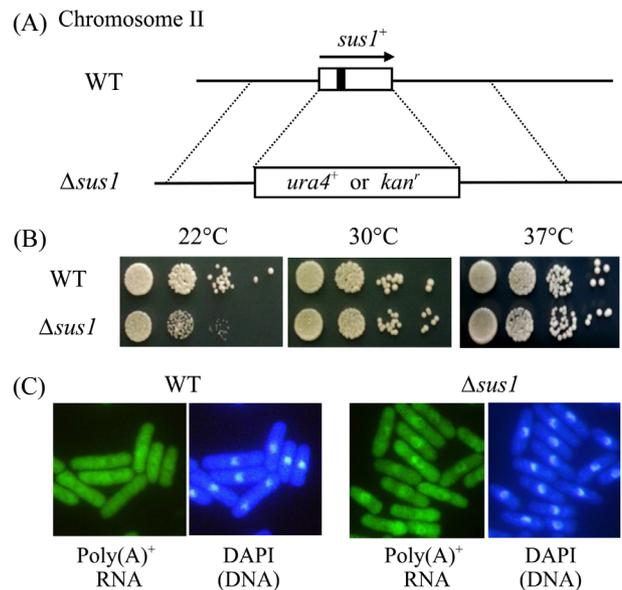
Sus1 / ENY2는 mRNA 전사와 세포질로의 방출 과정을 연계 시키는데 중요한 역할을 하는 단백질이다(Galan and Rodriguez-Navarro, 2012). ENY2는 초파리에서 전사 활성화에 관여하는 조절자를 유전적인 방법으로 선별하는 과정에서 처음으로 동정되었다(Georgieva *et al.*, 2001). 이후 출아효모에서도 ENY2와 유사한 Sus1이 mRNA 방출인자인 Yra1와 연관된 단백질로 동정되어, mRNA 전사와 방출에 관련되어 있음이 알려졌다(Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004). 효모에서부터 사람까지 진화적으로 잘 보존되어 있는 Sus1 / ENY2는 약 100개의 아미노산 잔기로 이루어진 11 kDa 정도의 작은 핵 단백질로, SAGA 복합체와 TREX-2 복합체의 구성인자이다(Kopytova *et al.*, 2010). 전사 보조활성자인 SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase)

\*For correspondence. E-mail: [jhoyoon@sungshin.ac.kr](mailto:jhoyoon@sungshin.ac.kr);  
Tel.: +82-2-920-7675; Fax: +82-2-920-2047

복합체는 진화적으로 보존된 전사 보조활성자(co-activator)로 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서는 약 10%의 유전자 발현에 관여한다(Bhaumik, 2011). SAGA는 20여 개 단백질로 구성된 2 MDa 크기의 염색질-변형 복합체(chromatin-modifying complex)로 히스톤 H3 아세틸전이효소(HAT) 활성화와 히스톤 H2B 탈유비퀴틴 효소 활성을 가지고 있으며, 4개의 기능적인 모듈 구조로 되어있다(Rodríguez-Navarro, 2009; Weake and Workman, 2012). 출아효모에서 Sus1 단백질은 Ubp8 (탈유비퀴틴 효소), Sgf73, Sgf11 등과 함께 탈유비퀴틴 모듈(DUBm)을 구성하고 있으며, DUBm는 SAGA 복합체가 전사의 시작과 신장, mRNA 방출에 관여하는데 중요한 역할을 담당한다(Rodríguez-Navarro, 2009). TREX-2 복합체(Transcription-Export complex 2)도 다양한 진핵 생명체에 진화적으로 보존되어 있으며, 출아효모에서는 Sac3, Thp1, Sem1, Cdc31, Sus1 단백질로 구성되어 있다(Ellisdon *et al.*, 2012). TREX-2 복합체는 핵공복합체와 결합하고 있으며, mRNA 전사와 방출을 연결할 뿐만 아니라 DNA 복제와 유전체의 안정성에도 관련되어 있다(González-Aguilera *et al.*, 2008; Bermejo *et al.*, 2011; García-Oliver *et al.*, 2012). 최근의 연구 결과들은 SAGA와 TREX-2의 공통 구성요소인 Sus1/ENY2가 정확한 mRNA의 생성을 위해 mRNA 전사의 시작부터 방출까지 다양한 역할을 하는 단백질을 강하게 시사한다(Galan and Rodríguez-Navarro, 2012). 또한, SAGA와 TREX-2의 Sus1 단백질은 출아효모의 GAL 유전자들과 같이 활발히 전사되는 조건에서 유전자 자체가 핵공복합체 근처로 이동하여 위치하는 ‘gene-targeting’ 현상에도 관여한다(Cabal *et al.*, 2006). 이 밖에도 Sus1은 mRNA 저장과 분해에 관여하는 세포질의 P-body 나 스트레스 과립(stress granules)과도 관련이 있음이 알려졌다(Cuenca-Bono *et al.*, 2010). 이와 같이 Sus1 / ENY2는 핵과 세포질에서 진행되는 mRNA 대사의 여러 과정에 중요한 역할을 담당한다. 하지만 생명체에 따라 유전체의 구조나 유전자 발현 경로에 차이점이 존재하기 때문에, Sus1 / ENY2의 구조와 기본적인 기능이 진화적으로 잘 보존되어 있더라도 생명체에 따라 차이점도 존재한다. 예를 들어, 핵공복합체에 위치하고 있는 효모의 TREX-2와는 다르게 포유동물의 TREX-2는 전사가 일어난 장소에서 mRNP를 핵공복합체로 이동시키는 역할을 한다(Jani *et al.*, 2012).

본 연구에서는 출아효모와 함께 중요한 모델 생명체인 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에서 Sus1 / ENY2와 유사한 이종상동체(ortholog)가 성장 및 mRNA 방출에 관여하는지, TREX2 복합체의 다른 구성요소들과 상호결합 하는지, 그리고 이 단백질의 세포 내 위치 등을 조사하였다. 먼저 *S. pombe*

유전체 database인 Pombase ([www.pombase.org](http://www.pombase.org))에서 Sus1 / ENY2와 유사한 단백질을 암호화하는 유전자인 SPBC6B1.12c을 찾았다. 이 유전자는 인트론이 1개 있으며, 108개 아미노산 잔기로 이루어진 예상 분자량 12.31 kDa, 등전점이 pH 4.45인 아주 작은 크기의 단백질을 암호화하고 있다. 본 연구에서는 이전에 기술된 분열효모의 유전학적 방법과 배양 방법을 사용하였다(Moreno, 1991; Alfa *et al.*, 1993). *ura4<sup>+</sup>* 선별유전자로 치환된  $\Delta$ *sus1* 결실돌연변이 균주를 만들기 위해서, double-joint PCR 방법으로 DNA 절편을 제작한 후 이배체 균주인 SP286 ( $h^{+} / h^{+}$  *leu1-32 / leu1-32 ura4-d18 / ura4-d18 ade6-210 / ade6-216*)에 형질전환하는 one-step gene disruption 방법을 사용하였다. 형질전환체 중에서 이배체의 두 *sus1* 유전자 중 하나만 결실된 것을 PCR로 확인하여 선별하였다(Fig. 1A). 이렇게 얻은 SP286(*sus1<sup>+</sup> / Δsus1*) 균주에서 유성생식에 의해 형성된 반수체의 자낭포자를 얻어 4분체(tetrad) 분석을 수행하였다.  $\Delta$ *sus1::ura4<sup>+</sup>* 결실돌연변이를 가진 반수체 자낭포자도 모두 정상적인 콜로니를 형성하므로 *sus1<sup>+</sup>*은 생장에 필수적



**Fig. 1. Deletion of *S. pombe sus1* caused the cold-sensitive defects of growth and mRNA export.** (A) A schematic representing the *sus1* deletion allele in *S. pombe*. The entire *sus1* ORF region was replaced by *kan<sup>r</sup>* or *ura4<sup>+</sup>* genes by one-step gene disruption method. The *sus1* (SPBC6B1.12c) open reading frame (ORF) is shown by an open box and one intron is denoted by vertical line in the open box. The direction of transcription is indicated by arrow above the ORF. (B) Growth of haploid wild-type *sus1<sup>+</sup>* (WT) cells and *sus1::kan<sup>r</sup>* deletion mutant cells were monitored by spot assay on YES medium. Cells were incubated for 5 days at 22°C and 3 days at 29°C and 37°C, respectively. (C) Cells were grown to the mid-log phase at 22°C. The localization of poly(A)<sup>+</sup> RNA was assessed by *in situ* hybridization with oligo (dT) probe. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

이지 않음을 확인하였다(자료 미제시). 출아효모 *S. cerevisiae*의  $\Delta sus1$  결실돌연변이는 23°C와 30°C (최적 온도)에서 약간 느리게 성장하지만 37°C에서는 온도-민감성(temperature-sensitive, ts) 표현형을 보인다(Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004). 하지만 분열효모 *S. pombe*의  $\Delta sus1$  결실돌연변이는 최적온도(30°C)와 고온(37°C)에서 정상적인 성장속도를 보인 반면, 오히려 낮은 온도(22°C)에서는 성장속도가 현저히 느려지는 저온-민감성(cold-sensitive, cs) 표현형을 보였다(Fig. 1B). 선별유전자로 *kan<sup>r</sup>*를 사용하여 반수체 균주인 AY217 (*h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-d18*)에서 직접 얻은  $\Delta sus1::kan<sup>r</sup>$  결실돌연변이도 같은 생장을 보였다.

*sus1* 유전자가 최적온도와 정상온도에서는 생장에 전혀 영향을 미치지 못하고 단지 저온-민감성 생장을 보이므로, 핵에서 세포질로 mRNA의 방출에는 영향을 주는지를 알아보기 위해 세포 내의 poly(A)<sup>+</sup> RNA의 분포를 fluorescence *in situ* hybridization (FISH)을 통해 알아보았다. FISH는 이전 논문에서 언급한 방법을 사용하였다(Yoon *et al.*, 2000). 혼성화 탐침으로는 3' 끝에  $\alpha$ -digoxigenin이 결합된 oligo-(dT)<sub>50</sub>을 사용하였으며, FITC-antidigoxigenin Fab 항체(Roche)를 사용하여 poly(A)<sup>+</sup>와 혼성화된 oligo-(dT)<sub>50</sub>을 형광현미경에서 관찰하였다. Figure 1C에서 보듯이 야생형(WT) 균주에서는 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 정상적으로 세포 전체에 거의 균일하게 분포한다.  $\Delta sus1$  결실돌연변이도 최적온도에서는 정상적인 poly(A)<sup>+</sup> RNA 분포를 보였지만, 낮은 온도에서는 핵 안에 약간 더 축적되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 1C). 이와 같은 결과는 분열효모의 Sus1은 성장과 mRNA 방출에 필수적이지는 않지만, 저온에서는 성장과 mRNA 방출에 필요하다는 것을 의미한다.

Sus1 단백질이 결여되면 저온에서 정상적인 성장과 mRNA 방출에 영향을 주기 때문에, 반대로 Sus1 단백질이 과발현되는 균주를 제작하여 표현형을 관찰하였다. 먼저 *Sus1* 열린읽기틀(ORF)만을 강력한 야생형 *mtt1* 프로모터에 붙여서(Maundrell, 1993), *Sus1*의 전사가 티아민에 의해 조절되는 3X-Sus1 벡터를 제작하였다. 3X-Sus1 벡터를 야생형 균주인 AY217에 형질전환하였다. 이렇게 제작된 균주(WT / 3X-Sus1)는 염색체에서 발현되는 *sus1*<sup>+</sup> 유전자 이외에 티아민이 없는 배지에서는 3X-Sus1 벡터로부터 Sus1이 훨씬 더 많이 발현된다. 하지만, *Sus1* 유전자가 과발현되더라도 생장에 아무런 영향이 없었으며, poly(A)<sup>+</sup> RNA의 분포 조사에서도 야생형 균주와 큰 차이점을 발견할 수 없었다(자료 미제시).

다음으로 Sus1 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위하여 GFP (Green Fluorescence Protein)를 이용하였다. 이를 위해 GFP 유전자를 *Sus1* ORF의 3' 말단에 붙인 *Sus1-gfp::kan<sup>r</sup>*

DNA 절편을 DJ-PCR로 제작하여 *Sus1* 유전자좌위에 삽입하여 Sus1-GFP 단백질이 발현되도록 하였다. 이렇게 제작한 균주는 PCR과 DNA 염기서열 분석을 통해 *Sus1* 유전자가 *Sus1-gfp*로 치환된 것을 확인하였다. 이 균주에서 Sus1-GFP의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰한 결과, 세포질에서도 약간 존재하였지만 대부분 핵에서 관찰되었다. 다만 핵질에 균일하게 분포하지는 않았고, 핵막 근처에 과립형태로 좀 더 많이 존재하는 것처럼 관찰되었으나 핵공복합체와 연관되어 있는지는 확실치 않았다(Fig. 2).

Sus1/ENY2은 TREX-2/AMEX의 구성인자이므로, 분열효모의 Sus1도 TREX-2의 구성인자로 작용하는지를 알아보기 위해 yeast two-hybrid 분석을 하였다. 이를 위해 TREX-2 구성인자들의 *S. pombe* 이중상동체인 Sac3, Pci2, Dss1, Cdc31뿐만 아니라 TREX 구성인자인 Hpr1, Tho2, Mft1, Thoc5, Tex1 및 mRNA 방출인자인 Uap56, Mlo3, Mex67를 각각 *lexA* 작동자의 DNA 결합 영역(BD)을 가진 pTLexA4 벡터와 GAL4 활성화 영역(AD)을 가진 pGAD424 벡터(Clontech Laboratories, Inc.)에 클로닝하고, DNA 염기서열 분석을 통해 클로닝이 제대로 되었음을 확인하였다. 이렇게 제작한 벡터들과 대조균인 빈 벡터를 L40 균주 (*MATa his3 $\Delta$ 200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS::4lexAop-HIS3 URA3::8lexAop-LacZ GAL4*)에 형질전환하였다. 먼저 pGAD424 벡터의 GAL4 활성화 영역과 융합된 Sus1 (AD-Sus1)이 홀로 존재할 때는 리포터인 *His3* 유전자를 발현시키지 못하는 것을 확인하기 위해, AD-Sus1과 DNA 결합 영역을 가진 빈 pTLexA4 벡터(BD-X)를 함께 형질전환하였다. 기대한 바와 같이 AD-Sus1과 BD-X를 함께 가진 형질전환체에서는 *His3* 유전자가 발현되지 않았다(Table 1). Table 1에 정리한 바와 같이, AD-Sus1과 BD-Sac3, BD-Dss1, BD-Mft1, BD-Tex1의 조합이 각각 *His3* 유전자를 발현시켰다. 하지만 pTLexA4 벡터에 클로닝된 BD-Dss1과 BD-Mft1은 홀로 *His3* 유전자를 발현시킬 수 있으므로, AD-Sus1과 BD-Dss1



**Fig. 2. Localization of Sus1 protein fused to GFP.** Sus1 was tagged with GFP at its carboxy-terminal (Sus1-GFP). The *sus1-gfp* fusion gene was integrated into the *sus1* locus, and the localization of the fusion protein was shown. 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.

조합, 그리고 AD-Sus1과 BD-Mft1 조합에서의 *His3* 유전자 발현은 Sus1 단백질과 이 단백질들의 상호작용에 의해 나타난 결과로 해석하기 어려웠다. 그러나 대조군 실험에서 BD-Sac3과 Tex1는 홀로 리포터 유전자를 발현시킬 수 없으므로, two-hybrid 실험 결과는 Sus1과 Sac3, Tex1 단백질 사이에 각각 물리적인 상호작용이 있음을 의미한다. 이러한 결과를 한번 더 확인하기 위해, 앞의 실험과 반대로 pTLexA4 벡터의 DNA 결합 영역에 융합된 Sus1 (BD-Sus1)과 pGAD424 벡터에 클로닝된 조합으로 two-hybrid 분석을 하고자 하였으나, 음성 대조군 조합인 BD-Sus1과 빈 벡터인 AD-X을 가진 형질전환체도 *His3* 유전자를 발현시켰기 때문에 BD-Sus1이 다른 단백질들과 상호작용하는지 확인할 수 없었다. 출아효모 TREX-2는 Sac3 단백질이 scaffold로 작용하고 여기에 다른 단백질이 결합하고 있는 구조로, Sac3의 C-말단 부위에 한 분자의 Cdc31과 두 분자의 Sus1 단백질이 함께 결합하여 CID-모듈을 형성함으로써, 핵공복합체의 핵 안쪽 구조물인 basket에 결합하는 것으로 알려졌다(Jani *et al.*, 2009). 그러므로 분열효모에서 two-hybrid 실험으로 보인 Sus1과 Sac3의 상호작용 결과는 출아효모의 구조 결과와 일치한다. 한편, Sus1과 TREX의 구성인자인 Tex1과의 상호작용은 리포터 유전자의 발현을 약하게 유도하였으며, 이러한 상호작용이 직접적인지 아니면 간접적인지는 알 수는 없었다. 또한, Sus1은 two-hybrid 분석에서 DNA 결합 영역과 융합되면 각각 단독으로 리포터 유전자를 발현시킬 수 있었는데, 이것은 이 단백질들이 리포터인 *His3*의 UAS에 결합하면 자체적으로 전사를 활성화시키는 것으로

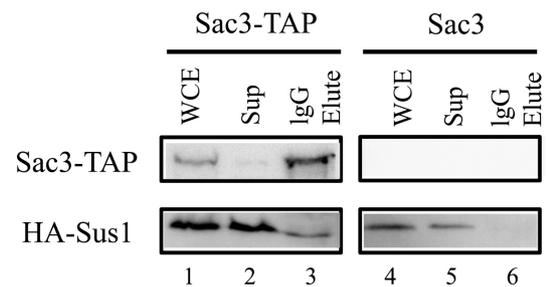
추측되며, 좀 더 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

Sus1과 Sac3의 상호결합을 좀 더 확인하기 위해, TAP (Tandem Affinity Purification)을 사용하여(Puig *et al.*, 2001) 공동침전 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 실험을 수행하였다. 이를 위해 TREX-2의 주요 구성요소인 *sac3* ORF의 3' 말단에 TAP tag를 붙인 *sac3-tap::kam<sup>r</sup>* DNA 절편을 제작한 후, *sac3<sup>+</sup>* 유전자 위치에 삽입하여 Sac3-Tap 균주를 제작하였다(Gould *et al.*, 2004). TAP tag에는 Protein A와 CBP (Calmodulin binding peptide)이 연속적으로 존재한다(Rigaut *et al.*, 1999). 한편 Sus1 단백질의 N' 말단에는 HA tag를 붙이기 위해 pSLF273 벡터에 *Sus1* 유전자를 클로닝하였다(Forsburg and Sherman, 1997). 제작된 균주와 pHA-Sus1 벡터는 DNA 염기서열 분석을 통해 이상이 없음을 확인하였다. 이렇게 제작된 pHA-Sus1 벡터를 Sac3-Tap 균주 그리고 Sac3-Tap 단백질이 발현되지 않은 대조군 균주(Sac3)에 각각 형질전환하였다. 형질전환체로부터 얻은 세포 추출물을 사용하여 Sac3 단백질을 IgG-Sepharose beads로 포획하였다. HA-단백질이 포획된 Sac3-Tap 단백질과 같이 침전되는지의 여부를 western blotting으로 분석함으로써, Sus1과 Sac3 단백질들이 서로 물리적으로 상호작용을 하는지를 알아보았다. 대조군에는 Sac3-Tap 단백질이 발현되지 않으므로, HA-tagged Sus1 단백질은 정상적으로 발현되었지만 IgG-Sepharose beads로 포획되지 않았다(Fig. 3, lanes 4-6). 반면, Sac3-Tap 단백질이 IgG beads에 포획된 경우, HA-Sus1도 같이 포획되었다(Fig. 3, lanes 1-3). 이러한 결과들은 분열효모의 Sus1 단백질이 Sac3 단백질과 강하게 결합하는 것을 보여주며, 분열효모에서 Sus1의 이종상동체도 TREX-2

**Table 1. Yeast two-hybrid analysis**

AD-	BD-	His3 expression	AD-	BD-	His3 expression
Sus1	<sup>a</sup> X	-	X	Sus1	+
Sus1	Sac3	+	X	Sac3	-
Sus1	Pci2	-	X	Dss1	+
Sus1	Dss1	+	X	Mft1	+
Sus1	Cdc31	-	X	Tex1	-
Sus1	Hpr1	-			
Sus1	Tho2	-			
Sus1	Mft1	+			
Sus1	Thoc5	-			
Sus1	Tex1	±			
Sus1	Uap56	-			
Sus1	Mlo3	-			
Sus1	Mex67	-			

<sup>a</sup>X indicates the empty vector.



**Fig. 3. Association of *sus1* with Sac3 in *S. pombe* extracts.** The Sac3-TAP and Sac3 (control) cells were transformed with HA-Sus1 plasmid. The TAP tag consists of two IgG binding domains of *S. aureus* protein A (Prot A) and a calmodulin binding peptide (CBP) separated by a TEV protease cleavage site. Input whole cell extracts were prepared from strains expressing Sac3-Tap or Sac3 only. Tap or Sac3-Tap associated proteins were captured on IgG-Sepharose beads and separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane and detected by Western blot using antibodies against HA or protein A. Input whole cell extracts (WCE), supernatants (Sup), and eluents from IgG bead (IgG Elute) are shown as indicated.

의 구성인자로 mRNA 방출에 관여한다는 것을 시사한다. 하지만 출아효모 *S. cerevisiae*와는 다르게 분열효모 *S. pombe*에서는  $\Delta sus1$  결실돌연변이가 고온에서 온도-민감성(ts) 표현형을 보이지 않을 뿐만 아니라, 최적 온도에서 생장과 mRNA 방출이 정상인 것은 두 효모에서 Sus1의 역할에 차이가 있음을 암시한다.

출아효모는 일반적으로 저온(22°C)에서 최적온도(30°C), 약한 열 충격이 있는 온도(37°C)까지 bulk mRNA의 분포가 변하지 않지만, 열 충격 조건(42°C)에서는 대부분 유전자의 전사가 억제될 뿐만 아니라 mRNA의 핵에서 세포질로의 방출도 억제되어 핵 안에 poly(A)<sup>+</sup> RNA가 축적된다. 이러한 조건에서도 열 충격 단백질(heat shock protein, HSP)을 암호화하는 유전자의 전사와 HSP mRNA의 방출은 선택적으로 이루어지는데, 이 과정에는 mRNA export 인자인 Gle2, Npl3, 핵공단백질인 Nup42 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(krebber *et al.*, 1999). 이와 같은 현상은 열 충격 단백질(heat shock protein)과 같은 스트레스-반응 단백질을 제외한 대부분의 단백질 합성을 멈춤으로써 효모가 스트레스에 빠르게 적응하도록 한다.

진핵생물 영역에서 잘 보존된 TREX-2, SAGA 복합체는 유전자 발현 등 염색질과 연관된 매우 다양한 과정에 관여한다. 출아효모 *S. cerevisiae*의 *Sus1*은 결실되더라도 생장과 mRNA의 방출에 필수적이지 않지만 어느 정도 결함을 보이고, 특히 고온(37°C)에서는 심각한 결함을 보이는 온도 민감성 표현형을 보인다(Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004). 그러나 *S. pombe*에서는 *Sus1*이 결실되면 고온과 최적온도에서는 생장과 mRNA의 방출이 정상이고 저온에서 결함을 보이는 표현형을 보인다. 이러한 차이의 이유는 정확히 알 수 없지만, Sus1 (또는 Sus1이 구성성분으로 존재하는 TREX2, SAGA 복합체)이 두 효모에서 각각 저온 또는 고온에서 중요한 단백질을 암호화하는 특정 유전자의 전사 및 그 mRNA의 방출에 관여하거나, Sus1이 없으면 TREX2 또는 SAGA 복합체의 기능이 저온과 고온에서 각각 문제가 생길 가능성도 있다. 이는 잘 보존된 Sus1의 기능은 기본적으로 유사하지만, 분열효모와 출아효모에서 차이점을 나타낼 수 있도록 세분화되어 있음을 시사한다. 그러므로 *S. pombe*의 Sus1의 기능과 구성요소들을 연구하는 것은 진핵세포의 일반적인 그리고 종 특이적인 TREX-2와 SAGA 복합체의 역할을 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

## 적 요

Sus1 / ENY2는 진핵생물에 잘 보존된 작은 단백질로 염색

사 리모델링과 mRNA 생성과정에 관여한다. Sus1 단백질은 전사 보조활성자인 SAGA 복합체와 핵공과 연관된 TREX2 복합체 등, 핵에 존재하는 2개 복합체의 구성 요소이다. 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 유전체 데이터에서 Sus1의 이중상동체를 찾아 기능을 분석하였다. 4분체 분석 결과 이 유전자는 생장에 필수적이지 않았으나, *Sus1* 유전자를 결실시키면 낮은 온도에서 생장이 느렸으며, poly(A)<sup>+</sup> RNA도 핵 안에 약간 축적되는 표현형을 보였다. 또한 Sus1-GFP 단백질은 주로 핵에 존재하였다. Yeast two-hybrid 분석과 공동면역침전 실험에서 Sus1 단백질은 TREX-2 복합체의 또 다른 구성인자인 Sac3와 상호작용을 하였다. 이와 같은 결과들은 *S. pombe*의 Sus1 단백질도 역시 TREX-2 복합체의 구성인자로 mRNA 방출에 관여하고 있음을 시사한다.

## 감사의 말

이 논문은 2015년도 성신여자대학교 학술연구구성비 지원에 의하여 연구되었음.

## References

- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., Mcleod, M., and Warbrick, E. 1993. Experiments with Fission Yeast. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Bermejo, R., Capra, T., Jossen, R., Colosio, A., Frattini, C., Carotenuto, W., Cocito, A., Doksani, Y., Klein, H., Gomez-Gonzalez, B., *et al.* 2011. The replication checkpoint protects fork stability by releasing transcribed genes from nuclear pores. *Cell* **146**, 233–246.
- Bhaumik, S.R. 2011. Distinct regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by SAGA and TFIID. *Biochim. Biophys. Acta.* **1809**, 97–108.
- Cabal, G.G., Genovesio, A., Rodriguez-Navarro, S., Zimmer, C., Gadal, O., Lesne, A., Buc, H., Feuerbach-Fournier, F., Olivo-Marin, J.C., Hurt, E.C., *et al.* 2006. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**, 770–773.
- Cuenca-Bono, B., Garcia-Moliner, V., Pascual-Garcia, P., Garcia-Oliver, E., Llopis, A., and Rodriguez-Navarro, S. 2010. A novel link between Sus1 and the cytoplasmic mRNA decay machinery suggests a broad role in mRNA metabolism. *BMC Cell Biol.* **11**, 19.
- Ellisdon, A.M., Dimitrova, L., Hurt, E., and Stewart, M. 2012. Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*

- 19, 328–336.
- Forsburg, S.L. and Sherman, D.A.** 1997. General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene* **191**, 191–195.
- Galán, A. and Rodríguez-Navarro, S.** 2012. Sus1 / ENY2: a multitasking protein in eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 556–568.
- García-Oliver, E., García-Molinero, V., and Rodríguez-Navarro, S.** 2012. mRNA export and gene expression: the SAGA-TREX-2 connection. *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**, 555–565.
- Georgieva, S., Nabirochkina, E., Dilworth, F.J., Eickhoff, H., Becker, P., Tora, L., Georgiev, P., and Soldatov, A.** 2001. The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF<sub>II</sub>40 and potentiates transcription activation on chromatin templates. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5223–5231.
- González-Aguilera, C., Tous, C., Gómez-González, B., Huertas, P., Luna, R., and Aguilera, A.** 2008. The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 4310–4318.
- Gould, K.L., Ren, L., Feoktistova, A.S., Jennings, J.L., and Link, A.J.** 2004. Tandem affinity purification and identification of protein complex components. *Methods* **33**, 239–244.
- Jani, D., Lutz, S., Hurt, E., Laskey, R.A., Stewart, M., and Wickramasinghe, V.O.** 2012. Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4562–4573.
- Jani, D., Lutz, S., Marshall, N.J., Fischer, T., Köhler, A., Ellisdon, A.M., Hurt, E., and Stewart, M.** 2009. Sus1, Cdc 31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. *Mol. Cell* **33**, 727–737.
- Kopytova, D.V., Krasnov, A.N., Orlova, A.V., Gurskiy, D.Y., Nabirochkina, E.N., Georgieva, S.G., and Shidlovskii, Y.V.** 2010. ENY2: couple, triple...more? *Cell Cycle* **9**, 479–481.
- Krebber, H., Taura, T., Lee, M.S., and Silver, P.A.** 1999. Uncoupling of the hnRNP Npl3p from mRNAs during the stress-induced block in mRNA export. *Genes Dev.* **13**, 1994–2004.
- Maudrell, 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.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B.** 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218–229.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B.** 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1030–1032.
- Rodríguez-Navarro, S.** 2009. Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep.* **10**, 843–850.
- Rodríguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M.J., Antúnez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Pérez-Ortín, J.E., Reed, R., and Hurt, E.** 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* **116**, 75–86.
- Rodríguez-Navarro, S. and Hurt, E.** 2011. Linking gene regulation to mRNA production and export. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 302–309.
- Stewart, M.** 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 609–617.
- Weake, V.M. and Workman, J.L.** 2012. SAGA function in tissue-specific gene expression. *Trends Cell. Biol.* **22**, 177–184.
- 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.