

분열효모에서 *spNab2* 유전자의 결실돌연변이 및 과발현에 대한 분석

윤진호

성신여자대학교 자연과학대학 생명과학 · 화학부 및 기초과학연구소

mRNA의 3' 말단형성 뿐만 아니라, 성숙한 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 중요한 역할을 하는 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 폴리(A)-RNA 결합단백질인 Nab2와 유사한 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 단백질을 암호화하는 유전자(*spNab2*로 명명)의 결실돌연변이주(deletion mutant)를 제조하여 그 특성을 조사하였다. 이배체인 *S. pombe* 균주에 하나의 *spNab2* 유전자만을 결실시킨 후 4분체분석(tetrad analysis)을 수행한 결과, *S. cerevisiae* NAB2와는 다르게 이 유전자는 생장에 반드시 필요하지 않았다. 또한 *spNab2* 결실돌연변이는 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동도 정상적으로 보였다. *spNab2*의 역할을 알아보기 위해, 티아민에 의해 발현이 조절되는 강력한 프러모터를 이용하여 *spNab2*를 과발현시켰다. *spNab2* 유전자가 과발현되면, 세포의 생장이 심하게 억제되었으며, 폴리(A)-RNA가 핵 안에 축적되고 세포질에서는 줄어들었다. 또한 GFP 융합단백질을 이용하여 *spNab2* 단백질의 세포 내 위치를 관찰한 결과, *spNab2*-GFP는 주로 핵 안에 존재하였지만 세포질에서도 관찰되었다. 이와 같은 결과들은 *spNab2* 유전자 역시 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 관여하고 있음을 시사한다.

Key words □ *spNab2*, mRNA export, deletion mutant, over-expression, *S. pombe*

진핵생물에서는 핵 안에서 전사된 mRNA 전구체가 여러 가공 과정(5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 폴리아데닐화 등)을 거쳐 성숙한 mRNA가 되며, 오직 성숙한 mRNA만이 선택적으로 핵에서 세포질로 나와 단백질 합성에 이용된다(15). 그러므로 폴리(A)-RNA의 핵에서 세포질로의 이동(mRNA export)은 mRNA의 가공과정 뿐만 아니라 전사 그 자체와도 연관된 매우 복잡한 과정이다(3, 4, 19). RNA 중합효소II에 의해 전사된 mRNA 전사체는 수많은 이형 핵 리보단백질(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP)과 결합하여 아주 커다란 mRNP 중합체를 이루며, 이러한 mRNP 중합체는 mRNA가 전사되는 순간부터 소멸할 때까지 시간적, 공간적으로 결합단백질이 달라지는 역동적인 구조를 이루고 있다(5, 12).

mRNP export에는 하등 진핵생물인 효모에서부터 인간에 이르기까지 진화적으로 잘 보존되어 있는 export 수용체(효모에서는 Mex67-Mtr2, 후생생물에서는 TAP-p15 또는 NXF1-NXT1)와 많은 export 어댑터 단백질들이 관여한다(11, 12, 13). 어떻게 오직 성숙한 mRNA만 선택되는지는 불명확하지만, mRNA와 비특이적이고 약한 결합을 하는 export 수용체 단백질을 mRNP로 불러 모으기 위해서는 여러 어댑터 단백질이 반드시 필요한 것으로 알려져 있다(12). 어댑터 단백질들은 export 수용체를 불러 모으는 기능 이외에도 mRNA 전사 및 가공과정의 중요한 인자로서 작동하고 있으므로, 이러한 과정들과 mRNA export를 연결하는 역할도 담당하는 것으로 여겨진다. 이러한 어댑터에는 TREX

(transcription export) 복합체, TREX-2 복합체(Sac3-Thp1-Cdc31-Sus1 복합체), RNA 결합단백질인 Npl3, 그리고 폴리(A) 결합단백질인 Nab2 등이 알려져 있다(12, 13).

출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 hnRNP 단백질인 Nab2 (nuclear abundant poly(A) RNA binding protein 2)는 폴리(A) RNA에 결합하는 단백질로 처음 알려졌으며, 출아효모 생장과 mRNA export에 필수적이다(2, 9, 10). Nab2 단백질은 주로 핵 안에서 관찰되지만 핵과 세포질을 왕복할 수 있다(9, 6). Nab2 단백질이 핵 안으로 들어가기 위해서는 karyopherin 패밀리에 속하는 이동수용체인 Kap104가 필요하며, Nab2 단백질의 핵에서 세포질로 나오는 과정에는 아르기닌 메틸전이효소인 Hmt1이 관여하고 mRNA의 전사가 진행되고 있어야 한다(9, 14). Nab2 단백질은 export 어댑터 단백질로서의 기능 이외에도 핵 안에서 또 다른 폴리(A) RNA 결합단백질인 Pab1 단백질과 상호작용하여 폴리(A) 꼬리의 길이를 조절한다(10). 또한 Nab2 단백질은 핵공 복합체(nuclear pore complex) 결합단백질인 Mlp1 단백질과 상호작용하여 아직 가공과정이 진행 중이거나 잘못 가공된 mRNP 복합체가 세포질로 나가지 못하게 하고 결국 핵 안에서 분해되도록 하는 mRNP의 질적인 관리에도 관여하는 것으로 보고되었다(7).

출아효모인 *S. cerevisiae*와 분열효모는 *S. pombe*는 모두 자낭곰팡이(Ascomycota)에 속하는 하등 진핵생물로서 진핵생물의 기본적인 생명현상을 연구하는 모델생물체로 많이 연구되고 있지만, 여러 면에서 많은 차이점을 보인다. 그러므로 진핵생물의 전체적인 mRNA export 기작을 이해하기 위해서는 상호보완적인 관계에 있는 두 효모들을 비교분석하는 것이 바람직하다. 본 실험에서는 *S. cerevisiae*의 Nab2 단백질과 유사한 *S. pombe*의 단

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

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

Strains	Genotype	Source
AY217	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18</i>	21
SP286	<i>h⁺/h⁺ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216</i>	17
SP286 (AspNab2)	<i>h⁺/h⁺ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216, ΔspNab2::ura4⁺/spNab2⁺</i>	This study
AY217 (3X-Nab2 or 41X-Nab2)	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 /3X-Nab2 or 41X-Nab2</i>	This study
AspNab2 (GFP-Nab2 or Nab2-GFP)	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 ΔspNab2::ura4⁺/GFP-Nab2 or Nab2-GFP</i>	This study

백질을 암호화하는 유전자(SPAC14C4.06c)를 결실시키거나 과발현시켜 mRNA export에서의 기능을 알아보자 하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

기본적인 분열효모의 배양과 유전학적인 기술은 *S. pombe* 표준 방법을 사용하였다(1, 20). 본 실험에 사용된 분열효모 *S. pombe* 균주는 Table 1에 정리하였다. 재조합 플라스미드의 증폭과 선택을 위한 형질전환용 균주로 대장균(*E. coli*) Top10'을 사용하였으며, 대장균의 배양을 위해서는 일반적으로 사용되는 Luria-Bertani (LB : 0.5% 효모 추출물, 1% bacto-trypton, 1% 염화나트륨) 액체 배지를 사용하였고, 필요시에는 암피실린(ampicillin)을 100 µg/ml로 첨가하여 37°C에서 키웠다. 분열효모 균주의 배양을 위한 배지는 EMM (Edinburgh minimal medium) 과 YES (Yeast extract with supplements : 0.5% 효모 추출물, 3% 포도당, 보충제 : 225 mg/L 아데닌, 류신, 유라실) 배지를 사용하였고, 28°C에서 배양하였다. *nmt* 프로모터의 억제력을 위해서는 EMM 배지에 15 µM 티아민(thiamin)을 첨가하여 사용하였으며, 고형 배지는 2% agar를 첨가하였다.

결실돌연변이체와 플라스미드 제조

ΔspNab2::ura4⁺ 결실돌연변이는 double-joint PCR에 의한 one-step 유전자결실 방법을 사용하여 제조하였다(22). *ΔspNab2::ura4⁺* DNA 단편을 제작하기 위한 PCR 프라이머는 다음과 같다. 5For (5'-GATCATCATCGTGTGAAGAC-3'), 5Rev (5'-ACATATAGCCAGTGGGATTTGTAGCTAGTCATGTTGTTGGTTACAGTCA-3'), 3For (5'-GGTGTGGAACAG AATAAATTAGATGAACAACCTTCATGTTCTTCTGTGT-3'), 3Rev (5'-CTGTATCATTAGCCTCGTCA-3'), 5Nest (5'-AACTCG TTGCCCTCAAACCTG-3'), 3Nest (5'-CTACGAGGACTACGAG AAGA-3'). 3번째 PCR 후에 증폭된 *ΔspNab2::ura4⁺* DNA 단편은 젤-분리 후에 이배체 SP286 균주에 형질전환하였다. Ura⁺ 형질전환체 중에서 PCR과 Southern blot으로 결실돌연변이체를 선별하였다. 이렇게 얻은 SP286(*ΔspNab2*) 균주로부터 사분체분석을 통하여 반수체인 *spNab2* 결실돌연변이를 얻었다. 3X-Nab2 또는 41X-Nab2 플라스미드 제작을 위해서는 *XhoI* 인식부위를 첨가한 Nab2-7 (GCACTCGAGATGACTACATTACTGGAAAC), *BamHI* 인식부위를 첨가한 Nab2-8 (GCTGGATCCTTACACA

GAAGGAACATGAA) 프라이머를 사용한 PCR으로 *spNab2* ORF를 증폭하였다. 증폭한 DNA 절편을 *XhoI*과 *BamHI*로 절단하여, pREP3X 또는 pREP41X 플라스미드의 *XhoI*과 *BamHI* 절단부위로 클로닝하였다.

In situ 혼성화(hybridization)

세포 내의 폴리(A)-RNA의 분포를 알아보기 위한 *in situ* 혼성화는 이전 논문에서 서술되어 있다(21). 혼성화 탐침으로는 α-digoxigenin을 3' 말단에 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.

결과 및 고찰

spNab2 결실돌연변이주의 제작과 분석

성숙한 mRNA의 export와 생장에 필수적인 역할을 하는 출아효모 *S. cerevisiae*의 폴리(A)-RNA 결합단백질인 Nab2 단백질과 유사한 단백질을 암호화하는 open reading frame (ORF)인 SPAC14C4.06c를 분열효모인 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에서 찾았다. 이 ORF는 2개의 인트론이 있으며, 307개 아미노산으로 이루어진 예상 분자량 33.9 kDa의 단백질을 암호화하고 있다. 525개의 아미노산으로 이루어진 *S. cerevisiae* Nab2 단백질에 비해 다소 짧지만, 이 단백질의 아미노산 서열은 Nab2와 65.5%의 유사성을 보이므로, 이 유전자를 *spNab2*로 명명하였다. *S. cerevisiae* Nab2 단백질은 4개의 영역(domain)으로 구성되어 있다: 독특한 N-말단 영역, 글루타민이 풍부한 (QQQP) 영역, 아르기닌-글리신(RGG) 영역, zinc finger 영역(2). 기능이 알려지지 않고 생장에 필요하지 않은 QQQP 영역, 그리고 Nab2 단백질이 핵으로 이동하는데 필요한 RGG 영역은 *spNab2*에는 보존되어 있지 않았지만, mRNA export에 필요한 N-말단 영역은 높은 유사성을 보였다(16). 또한 폴리(A)-RNA와 Nab2의 결합에 중요한 C-말단 부위의 zinc finger 영역은 분열효모에서도 보존되어 있었지만, *S. cerevisiae*에서는 CCCH 유형의 zinc finger 모티프가 7개 존재하는 반면 *S. pombe*에서는 3개만 존재하였다. 같은 유형의 zinc finger 모티프와 mRNA export에 필수적인 영역에서 유사성이 높으므로, *spNab2*도 mRNA의 핵 밖으로 수송에 관여하는지를 알아보고자

결실돌연변이 균주를 제작하여 특성을 연구하였다. 영양요구 선별유전자인 *ura4⁺*로 치환된 *spNab2* 결실돌연변이 균주를 만들기 위해서, *spNab2::ura4⁺* DNA 단편을 double-joint PCR 방법에 의해 제작한 후, 이배체 균주인 SP286에 형질전환 시켜 유라실이 없는 배지에서 자라는 형질전환체를 얻었다(Fig. 1A). 이 형질전환체들로부터 2개의 *spNab2* 유전자 중 하나만 *ura4⁺* 유전자로 치환된 형질전환체(*ΔspNab2::ura4⁺/spNab2⁺*)를 선별하기 위해, 형질전환체의 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 대조균으로 사용한 *spNab2* 유전자가 야생형인 균주는 3.0 kb

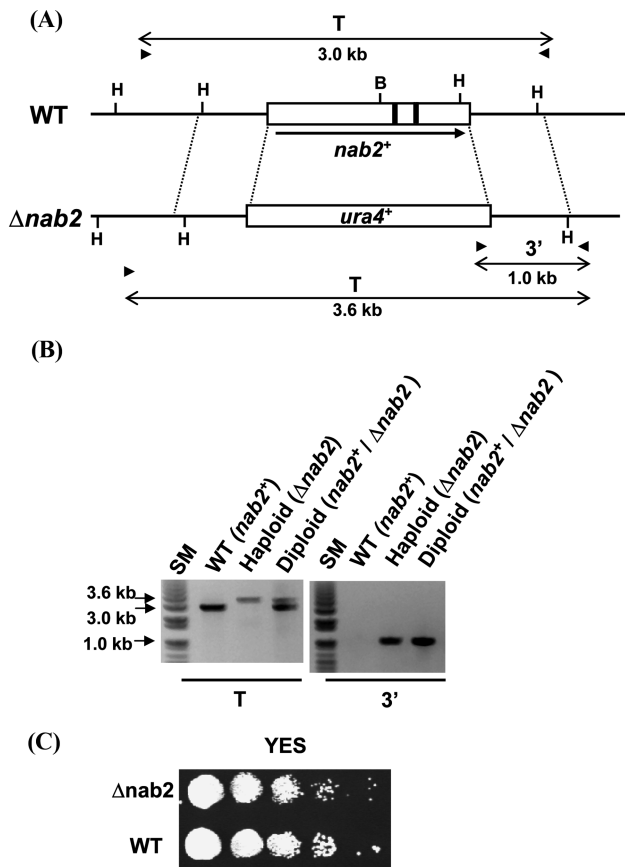


Fig. 1. *S. pombe* $\Delta nab2$ deletion mutants are viable. (A) A schematic diagram representing the constructs of the *nab2* null allele in *S. pombe*. Most of the *nab2* open reading frame region was replaced by the marker gene, *ura4⁺*, by one-step gene disruption method. The *spNab2* ORF is represented by open boxes and two introns are denoted by closed boxes. The direction of transcription is shown by arrow under the ORF. The positions of PCR primers for confirmation of wild type and null alleles are indicated by arrowheads, and the expected size of PCR products is also shown. B, *Bam*HI; H, *Hind*III. (B) Confirmation of the disruption of the *nab2* locus. Genomic DNAs isolated from wild type (WT), Diploid disrupted one of the *nab2* locus (*nab2⁺/Δnab2*), and $\Delta nab2$ haploid strains. The positions of PCR primers for confirmation of wild type and null alleles are indicated by arrowheads. (C) Growth of $\Delta nab2$ knockout mutant and wild type (WT). Wild type and *nab2* disrupted cells were spotted in 10-fold serial dilutions onto YES plate and incubated for 4 days at 28°C.

의 DNA가 증폭되는 것에 비해 3.6 kb도 증폭되는 결실돌연변이를 선별하였으며(Fig. 1B), Southern blotting으로 확인하였다(자료 미제시). 이렇게 얻은 SP286($\Delta spNab2$) 균주는 교배형이 *h⁺/h⁺*로 유성생식에 의한 포자형성을 하지 않는다. 하지만 *h⁺/h⁺* 유전자형은 낮은 빈도이지만(10^{-3}) 포자형성을 할 수 있는 *h⁺/h⁹⁰* 이배체로 자발적으로 전환되므로, *h⁺/h⁹⁰* 이배체를 선별한 다음 4분체분석을 수행하였다. 하나의 이배체 세포는 감수분열에 의해 4개의 반수체 포자(4분체)를 형성하므로, 10개의 4분체를 미세조작기(micromanipulator)로 각각 분리하여 배양하였다. 분석한 10개의 사분체 모두에서 4개의 자낭포자들이 모두 콜로니로 성장하였다(자료 미제시). 콜로니를 형성한 4개의 포자 중 2개는 유라실-영양요구 표현형을 보이는 야생형 *spNab2⁺* 유전자를 가진 반수체이고, 나머지 2개의 포자는 유라실이 없는 배지에서도 자라는 것으로 보아 *spNab2* 유전자가 결실된 *ΔspNab2::ura4⁺* 유전자형을 갖는 반수체 포자였다. 이렇게 만들어진 *spNab2* 결실돌연변이 균주는 야생형 균주와 거의 유사한 성장 속도를 보여주었다(Fig. 1C). 이 실험 결과는 생장에 필수적인 출아효모의 *NAB2* 유전자와는 다르게 분열효모의 *spNab2* 유전자는 생장에 필수적이지 않다는 것을 의미한다.

spNab2 결실돌연변이 균주(*ΔspNab2::ura4⁺*)가 mRNA의 수송에 결함을 보이는지를 알아보기 위해, 야생형(*spNab2⁺*) 균주와 *spNab2* 결실돌연변이 균주에서 폴리(A)-RNA의 분포를 *in situ* 혼성화를 통해 조사하였다. *spNab2* 결실돌연변이도 야생형 균주와 마찬가지로 폴리(A)-RNA가 세포 전체에 퍼져있는 분포를 보이는 것으로 보아(Fig. 2), mRNA의 대량수송에는 큰 결함이 없는 것으로 사료된다.

***spNab2* 과발현 균주의 제작과 분석**

spNab2 유전자가 *S. cerevisiae* *NAB2*와는 다르게 생장에 필수적이지 않고, 결실되더라도 mRNA export에 큰 결함을 보이지 않으므로, 이 유전자의 기능을 알아보기 위하여 *spNab2* 유전자를 과발현(over-expression) 할 수 있는 균주를 제작하였다. 먼저 *spNab2* 유전자의 단백질을 암호화하는 ORF만을 *nmt1* 프로모터에 붙여서, *spNab2*의 전사가 티아민에 의해 조절되는 3X-*Nab2*와 41X-*Nab2* 플라스미드를 제작하였다. *nmt1* 프로모터는 배지에 티아민이 없으면 전사가 유도되고, 티아민이 존재하면 전사가

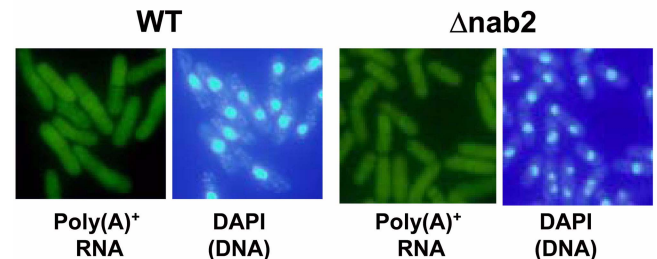


Fig. 2. Poly(A)⁺ RNA localization in $\Delta nab2$ mutants and wild type cells. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium at 28°C. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

억제되는 프로모터이다(18). pREP3X 플라스미드에 있는 야생형 *nmt1* 프로모터는 강력한 프로모터로 티아민이 없는 배지에서 발현 정도가 매우 높으며, pREP41X 플라스미드에 존재하는 돌연변이 *nmt1* 프로모터는 발현정도가 야생형에 비해 좀 약하다(8). 이렇게 제작된 플라스미드들을 야생형 반수체 균주(AY217)에 형질전환시켰다. 이렇게 제작된 균주들은 염색체에서 발현되는 *spNab2* 유전자 이외에 플라스미드에서 *spNab2*가 더 발현된다. 이렇게 제작된 AY217(3X-Nab2 또는 41X-Nab2) 균주는 티아민이 있는 배지(+B1)에서는 플라스미드의 *spNab2* 유전자의 발현이 억제되므로, 빈 플라스미드가 형질전환된 대조군과 마찬가지로 정상적인 성장을 보였다(Fig. 3A). 하지만 흥미롭게도 티아민이 없는 배지(-B1)에서 플라스미드의 *spNab2* 유전자가 과발현되면 성장에 심각한 장애를 보였다. 발현이 많은 3X-Nab2가 41X-Nab2에 비해 더 심한 성장 억제 효과를 보였다(Fig. 3A). 대조군은 티아민에 상관없이 잘 자랐다.

spNab2 유전자의 과발현이 성장에 심각한 저해현상을 보이므로, 이러한 성장억제가 mRNA의 export에 관련이 있는지 알아보기 위해 폴리(A)-RNA의 세포내 분포를 *in situ* 혼성화 통해 조

사하였다. 대조군인 빈 플라스미드를 가지고 있는 균주와 3X-Nab2 또는 41X-Nab2를 가지고 있는 균주들을 티아민이 있는 배지에서 키우다가 둘로 나누어 하나는 티아민이 없는, 그리고 나머지 하나는 티아민을 첨가한 배지에서 18시간 더 키웠다. 빈 플라스미드를 가지고 있는 대조군은 티아민의 유무에 상관없이 poly(A)⁺ RNA가 세포질 전체에 정상적으로 퍼져있었다(Fig. 3B). 하지만 3X-Nab2 또는 41X-Nab2를 가지고 있는 균주들은 모두 *spNab2* 유전자가 과발현되는 조건(티아민이 없는 배지)에서는 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 매우 강하게 축적되었으며 세포질에는 줄어들었다(Fig. 3B). 이것은 *spNab2* 유전자가 과발현되는 경우 mRNA의 세포질로의 이동에 심각한 이상이 생긴다는 것을 의미한다. 이러한 실험 결과는 성장과 mRNA export에 필수적인 역할을 하는 출아효모의 Nab2와는 다르게, 분열효모의 *spNab2*는 mRNA export에 보조적인 역할을 담당하거나 비슷한 역할을 하는 또 다른 단백질이 존재함을 시사한다.

***spNab2* 단백질의 세포 내 위치**

spNab2 유전자가 암호화하는 단백질의 세포 내 위치를 알아보

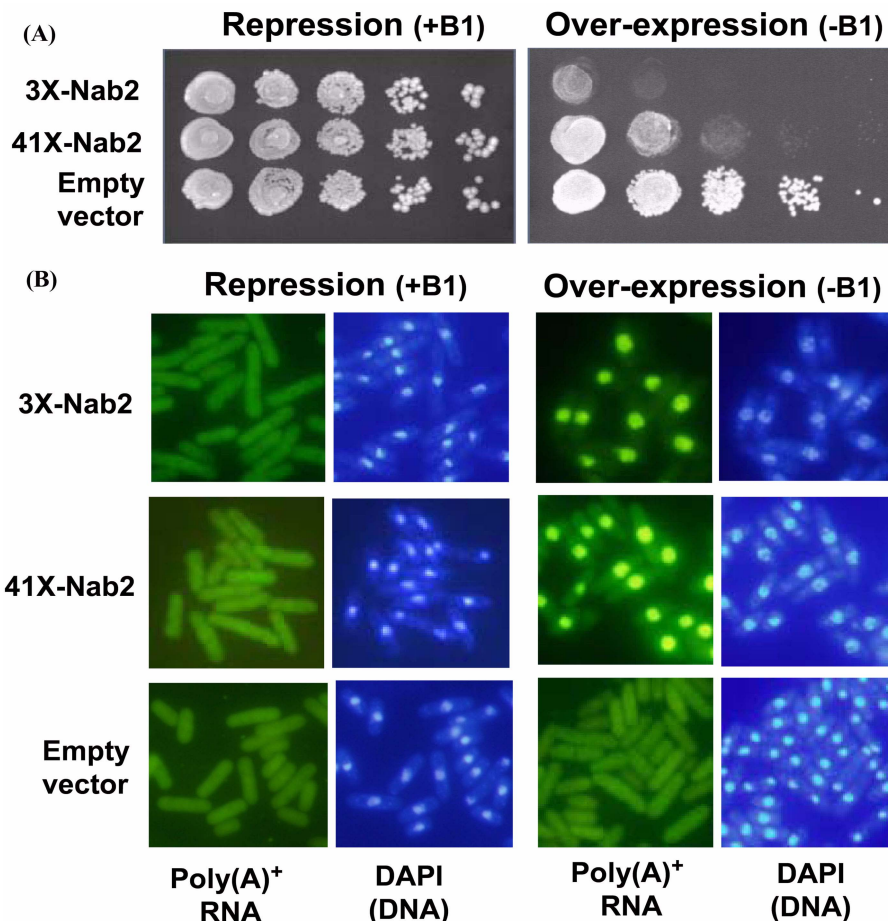


Fig. 3. Nab2 over-expression cause the defects of cell growth and mRNA export. (A) Growth of wild type (AY217) transformed with empty vector, 41X-Nab2, and 3X-Nab2. Strains was monitored by spot assay for 5 days in repressed or over-expressed conditions. (B) Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine (+B1) at 28°C. The cells were then washed and 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.

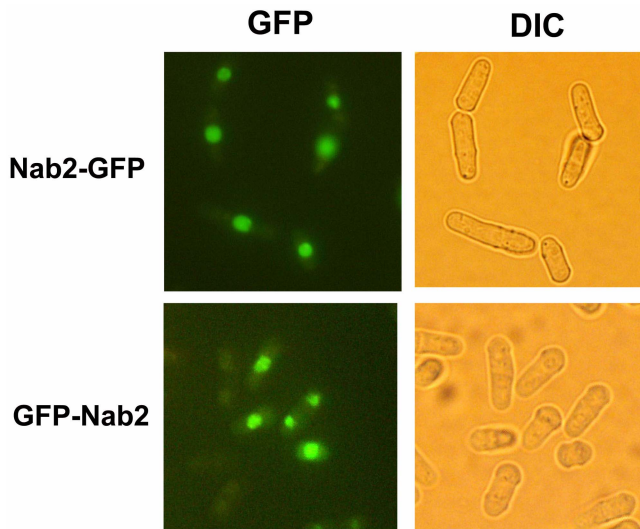


Fig. 4. Localization of Nab2 proteins fused to GFP. Nab2 was tagged with GFP at its amino-terminal (GFP-Nab2) or carboxy-terminal end (Nab2-GFP). Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the presence of thiamine (GFP-Nab2) or in the absence of thiamine (Nab2-GFP) at 28°C. Coincident differential interference contrast (DIC) images are also shown in the bottom panels.

기 위하여 GFP (Green Fluorescence Protein)를 이용하였다. 이를 위해 GFP 벡터인 pZA69와 pREP81-EGFPc에 *spNab2* ORF를 클로닝하였다. 이렇게 제작한 GFP-Nab2와 Nab2-GFP 플라스미드는 각각 *spNab2*의 N-말단 또는 C-말단에 GFP가 위치한다. 이 플라스미드들을 염색체에서 발현된 *spNab2*와 경쟁하지 않도록 $\Delta spNab2$ 균주에 형질전환하였다. 이러한 GFP-*spNab2* 융합단백질도 과발현되면 *spNab2* 과발현과 마찬가지로 생장이 억제되고 mRNA export에 결함을 보인다(자료 미제시). 형광현미경으로 융합단백질의 세포 내 위치를 관찰하면, N-말단 또는 C-말단에 GFP가 융합된 *spNab2* 융합단백질 모두 핵 안에서 강하게 위치하였지만 세포질에서도 약하게 관찰되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 핵과 세포질을 왕복할 수 있는 출아효모의 Nab2와 마찬가지로 *spNab2*도 주로 핵 안에서 mRNA export에 관여할 가능성을 시사한다.

한편, 출아효모의 Nab2와 같이 mRNA export이외에 폴리(A) 꼬리의 길이 조절이나 mRNA의 질적인 관리에도 분열효모의 *spNab2*가 관여하는지를 알아보는 것도 흥미로울 것이다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 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, N.Y., USA.
- Anderson, J.T., S.M. Wilson, K.V. Datar, and M.S. Swanson. 1993. NAB2: a yeast nuclear polyadenylated RNA-binding protein essential for cell viability. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2730-2741.
 - Cole, C.N. and J.J. Scarcelli. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18, 299-306.
 - 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.
 - Duncan, K., J.G. Umen, and C. Guthrie. 2000. A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. *Curr. Biol.* 10, 687-696.
 - Fasken, M.B., M. Stewart, and A.H. Corbett. 2008. Functional significance of the interaction between the mRNA-binding protein, Nab2, and the nuclear pore-associated protein, Mlp1, in mRNA export. *J. Biol. Chem.* 283, 27130-27143.
 - Forsburg, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21, 2955-2956.
 - Green, D.M., K.A. Marfatia, E.B. Crafton, X. Zhang, X. Cheng, and A.H. Corbett. 2002. Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J. Biol. Chem.* 277, 7752-7760.
 - Hector, R.E., K.R. Nykamp, S. Dheur, J.T. Anderson, P.J. Non, C.R. Urbinati, S.M. Wilson, L. Minvielle-Sebastia, and M.S. Swanson. 2002. Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *EMBO J.* 21, 1800-1810.
 - Izaurrealde, 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.
 - Kelly, S.M. and A.H. Corbett. 2009. Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes. *Traffic* 10, 1199-1208.
 - Khler, A. and E. Hurt. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 761-773.
 - Lee, D.C. and J.D. Aitchison. 1999. Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. *J. Biol. Chem.* 274, 29031-29037.
 - Lei, E.P. and P.A. Silver. 2002. Protein and RNA export from the nucleus. *Dev. Cell* 2, 261-272.
 - Marfatia, K.A., E.B. Crafton, D.M. Green, and A.H. Corbett. 2003. Domain analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, Nab2p. Dissecting the requirements for Nab2p-facilitated poly(A) RNA export. *J. Biol. Chem.* 278, 6731-6740.
 - Matsumoto, T. and D. Beach. 1991. Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* 66, 347-360.
 - 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.
 - 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.

22. Yu, J.H., Z. Hamari, K.H. Han, J.A. Seo, Y. Reyes-Domnguez, and C. Scazzocchio. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet.*

Biol. 41, 973-981.

(Received December 1, 2009/Accepted December 11, 2009)

ABSTRACT : Effects of *spNab2* Deletion and Over-Expression on mRNA Export

Jin Ho Yoon (Basic Science Research Institute, School of Biological Science and Chemistry, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Republic of Korea)

We constructed the deletion mutants of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *spNab2* gene that is homologous to poly(A)-binding protein *NAB2* in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which plays crucial roles in mRNA 3' end formation and mRNA export from nucleus into the cytoplasm. A null mutant in an h^+/h^+ diploid strain was constructed by replacing the *spNab2*-coding region with an *ura4⁺* gene using one-step gene disruption method. Tetrad analysis showed that the *spNab2* is not essential for vegetative growth and mRNA export. However, over-expression of *spNab2* cause the severe growth defects and intensive accumulation of poly(A) RNA in the nucleus. Also, the *spNab2*-GFP fusions were localized mainly in the nucleus. These results suggest that *spNab2* is also involved in mRNA export out of the nucleus.