

분열효모에서 Nup97의 기능과 세포 내 위치에 대한 연구

황덕경 · 윤진호*

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과 및 기초과학연구소

발아효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 핵공단백질인 Nic96 단백질과 유사성을 보이는 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 Nup97의 기능과 세포 내 위치를 조사하였다. *nup97*을 과 발현시켰을 때는 생장과 poly(A)⁺ RNA의 분포에 별다른 이상을 보이지 않았다. 하지만, *kan^r* 유전자를 이용하여 제작한 $\Delta nup97$ 결실돌연변이는 *nup97*의 발현이 억제되면, poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되었고 비정상적인 DNA 분포를 보였으며 결국 성장하지 못했다. 한편, Nup97p의 N말단 또는 C말단에 GFP를 붙인 Nup97-GFP 융합단백질의 세포 내 위치를 확인하고자 하였다. 이러한 융합단백질들이 $\Delta nup97$ 결실돌연변이의 성장결함을 정상적으로 상보하는 것을 확인하고, *nup97*-GFP 유전자를 염색체의 *nup97* 유전자 위치에 삽입한 균주를 제작하였다. 자신의 프로모터에서 발현된 Nup97-GFP 융합단백질은 정상적인 기능을 보였으며, 핵막 주위에 접점이 위치하였다. 이와 같은 결과들은 Nup97 단백질 역시 핵공단백질로 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 중요하다는 것을 시사한다.

Key words □ mRNA export, nucleoporin, *nup97*, *Schizosaccharomyces pombe*

진핵세포의 핵막에 존재하는 유일한 통로인 Nuclear Pore Complex (NPC)는 거대한 단백질 구조물로 분자량이 효모에서는 40 MDa, 척추동물의 세포에서는 60 MDa에 달한다(3, 14). 하지만 NPC의 전체 구조는 모든 진핵생물에서 비슷한데, 핵 쪽의 nuclear basket, 핵막을 관통하는 central core, 세포질 쪽의 cytoplasmic filament 등의 세 부분으로 나뉘며, central core는 8개의 spoke들이 중심 통로를 둘러싸고 있는 대칭적인 구조를 이루고 있다(6, 15). NPC는 핵공단백질(nucleoporin)이라 불리는 30여 종의 단백질로 구성되어 있으며, 대부분의 핵공단백질은 대칭적으로 NPC의 세포질과 핵 쪽에 모두 존재하지만, 일부는 비대칭적으로 NPC의 한 쪽에만 존재한다(8).

이온이나 대사산물 또는 25-40 kDa 보다 적은 분자들은 단순 확산에 의해 NPC를 통과할 수 있으나, 대부분의 거대분자들은 능동수송에 의해 효과적으로 NPC를 통과한다. NPC를 통한 핵과 세포질 사이의 거대분자들의 이동은 진화적으로 잘 보존된 수송운반체(karyopherins 또는 importin- β family members라 불림)를 필요로 한다(10, 18). 이동할 거대분자들은 일반적으로 nuclear localization signal (NLS) 또는 nuclear export signal (NES)이라는 신호를 가지고 있으며, 수송운반체가 이러한 신호를 인식하여 결합함으로써 이동복합체를 형성한다. 이동복합체는 NPC의 중앙 통로에 위치한 FG-핵공단백질들과 상호작용을 통해 NPC를 통과한다(16). 이러한 이동기작은 GTP 또는 GDP와 결합하고 있는 작은 GTPase인 Ran 단백질에 의해 조절된다(11). 즉, 핵과 세포질 사이의 RanGTP-RanGDP 농도구배가 수송운반체와 이동 거대분자들의 결합과 분리를 결정한다(7).

mRNA는 전사단계부터 많은 단백질과 결합하여 아주 커다란 mRNP 중합체를 이루는데, 전사 후 가공과정(5' 캡핑, 스플라이싱, 3' 절단 및 폴리아데닐레이션) 동안 결합단백질이 달라지는 역동적인 구조를 이루고 있다. 이러한 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동(mRNA export)은 다른 거대분자들의 이동보다 훨씬 복잡하며 전혀 다른 기작에 의해 일어나는 것으로 여겨진다(13, 17). mRNP export에 필요한 주된 수송운반체는 하등 진핵생물인 효모에서부터 인간에 이르기까지 진화적으로 잘 보존되어 있는데, Nuclear export factors (NXFs)로 불리는 단백질 family에 속하는 단백질들로 효모에서는 Mex67p, 척추동물에서는 NXF1/TAP이다(4, 9). mRNP 중합체에 결합한 수송운반체는 NPC와의 약한 상호작용을 통해서, 전사 후 가공과정이 모두 끝난 성숙한 mRNA만을 세포질로 이동시키는 역할을 하는 것으로 생각된다(5).

분열효모인 *S. pombe*에서는 mRNP export 수송운반체인 *mex67*이 생장에 필수적이지 않다(20). 그러므로 *mex67*과 연관이 있는 유전자나 중복적인 역할을 하는 다른 유전자를 찾기 위해 *mex67* 결실돌연변이와 합성치사(synthetic lethality)를 보이는 3개의 돌연변이를 선별하였으며(19), 이 중 한 돌연변이의 합성치사(synthetic lethality)를 상보하는 유전자를 클로닝하여 *nup97*이라 명명하였다(2). 본 실험에서는 *nup97* 유전자가 과 발현되거나 억제되었을 때의 생장 정도와 mRNA export 결함 여부를 조사하였다. 또한 N 말단 또는 C말단에 GFP 단백질을 붙인 *nup97*을 제조하여 세포 내 위치를 알아보았다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

기본적인 유전적 그리고 세포배양 기술은 *S. pombe* standard

*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>	20
AY217 (3X-Nup97 or 41X-Nup97 or 81X-Nup97)	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18/ 3X-Nup97 or 41X-Nup97 or 81X-Nup97</i>	This study
ΔNup97 (3X-Nup97 or 41X-Nup97 or 81X-Nup97)	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup97::kan/ 3X-Nup97 or 41X-Nup97 or 81X-Nup97</i>	This study
ΔNup97 (3X-GFP-Nup97 or 81X-Nup97-GFP)	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 Δnup97::kan/ 3X-GFP-Nup97 or 81X-Nup97-GFP</i>	This study
Nup97-GFP	<i>h⁻ leu1-32 ura4-d18 nup97-GFP::ura4⁺</i>	This study

method를 사용하였다(1, 12). 본 실험에 사용된 효모 *Schizosaccharomyces pombe* 균주는 Table 1에 정리하였다.

재조합 플라스미드의 증폭과 선택을 위한 형질전환용 균주로 *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, 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 위한 배지는 EMM (Edinburgh minimal medium)과 YES (Yeast extract with supplements: 0.5% yeast, 3% glucose, supplements: 225 mg/L adenine, leucine, uracil) 배지를 사용하였고, 28°C에서 배양하였다. *nmt1* 프로모터의 억제에 대해서는 EMM 배지에 비타민 B₁인 티아민(thiamine)을 15 µM로 첨가하여 사용하였으며, 고형 배지는 2% 한천을 첨가하였다.

플라스미드 및 결실돌연변이의 제조

비타민 B₁에 의해 억제되는 *nmt1* 프로모터를 가진 pREP 벡터들(pREP3X, pREP41X, pREP81X)에 *nup97*의 ORF를 클로닝하기 위해, 5'에 제한효소 *SalI*과 *BamHI* 절단부위를 각각 넣은 primer인 Nic96-31; 5'-ATCAGTCGACATGACGGTTGCGTCTGAC3'과 Nic96-33; 5'-TACTGGATCCTCATGTCAATTTCTATTTCG3'을 사용하였다. Nup97-GFP 제작을 위해서는 pZA69, pREP81-EGFPc 등의 벡터들을 사용하였으며, 이를 위해 5'에 제한효소 *NdeI*, *SalI*, *BamHI* 절단부위를 각각 넣은 primer인 Nic96-30; 5'-GACTCATATGACGGTTGCGTCTGACGA-3', Nic96-31; 5'-ATCAGTCGACATGACGGTTGCGTCTGAC-3', Nic96-32; 5'-TACTGATCCTGTCAATTTCTATTTCGAG-3', Nic96-33; 5'-TACTGGA TCCTCATGTCAATTTCTATTTCG-3'을 사용하였다.

Δ*nup97::kan* 결실돌연변이는 double-joint PCR에 의해 형질전환시킬 DNA 절편을 증폭한 다음, pREP-Nup97 벡터들이 들어 있는 AY217 균주에 one-step gene disruption 방법을 사용하여 제조하였다(21). Nup97-GFP 삽입균주는 다음과 같이 제작하였다. 먼저 앞서 제작한 81X-Nup97-GFP에서 N 말단일부가 제거된 Nup97-GFP 부위를 *XhoI*, *SacI* DNA 절편을 잘라내어 삽입용 벡터인 pDW234에 클로닝하였다. pDW234-Nup97GFP를 *BglII*로 절단하여 AY217에 형질전환한 후, 염색체 상의 *nup97* 유전자 위치로 삽입된 것을 Southern blotting으로 확인하였다.

In situ hybridization

세포 내의 poly(A)⁺ RNA의 분포를 알아보기 위한 *in situ* hybridization은 이전 논문에서 서술되어 있다(20). 혼성화 탐침으로는 α-digoxigenin을 3' 말단에 붙인 Oligo-(dT)₅₀을 사용하였다. 형광현미경으로 혼성화 탐침을 관찰하기 위해서는 FITC-anti-digoxigenin Fab 항체(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하였다. DNA 염색을 위해서는 4', 6-Diamidino-2'-phenylindole (DAPI)을 사용하였다.

결과 및 고찰

nup97 유전자의 과 발현 또는 억제 시 형질분석

mex67 결실돌연변이와 합성치사를 보이는 돌연변이 균주로부터 클로닝한 *nup97* 유전자는 생장에 필수적이었다(2). 즉, *nup97* 유전자가 결실된 균주는 생장하지 못하였으므로, 반대로 *nup97* 유전자가 과 발현되면 생장에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 이를 위해 *nmt1* 프로모터를 가진 발현 벡터인 pREP3X, pREP41X, pREP81X에 각각 *nup97*의 ORF를 클로닝하였다. pREP3X는 가장 강력한 야생형의 *nmt1* 프로모터를 가지고 있으며, pREP41X와 pREP81X는 *nmt1* 프로모터의 TATA box에 돌연변이를 일으켜 프로모터의 세기가 pREP3X에 비해 pREP41X는 중간 정도이고 pREP81X는 가장 약하다. 하지만 이 벡터들은 모두 비타민 B₁ (티아민)에 의해 발현이 억제된다. 제작된 플라스미드 (3X-Nup97, 41X-Nup97, 81X-Nup97)를 야생형 반수체 균주인 AY 217 형질전환하였다. 형질전환체들을 티아민이 없는 배

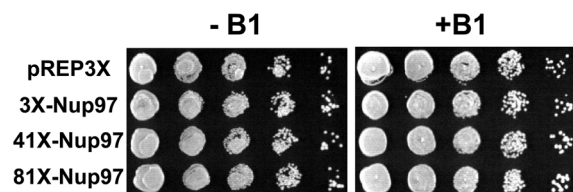


Fig. 1. Overexpression of *nup97* has no effect on growth. Haploid wild type (AY217) cells transformed with 3X-Nup97, 41X-Nup97, 81X-Nup97 or pREP3X (empty vector) were spotted in 10-fold serial dilutions onto EMM plates in the absence of (-B1) or in the presence of (+B1) thiamine and incubated for 5 days at 28°C.

지(-B1)에서 키워 염색체의 *nup97* 유전자 이외에 추가로 플라스미드에서 *nup97*을 과 발현시킨 것을, 티아민이 있는 배지(+B1)에서 키운 것과 성장 정도를 spot assay로 비교하였다(Fig. 1). 대조군은 AY217에 빈 벡터인 pREP3X를 형질전환시킨 균주를 사용하였다. *Nup97*의 발현을 억제하는 +B1 배지에서와 마찬가지로 -B1 배지에서 *Nup97* 유전자가 과 발현되었을 때도 대조군

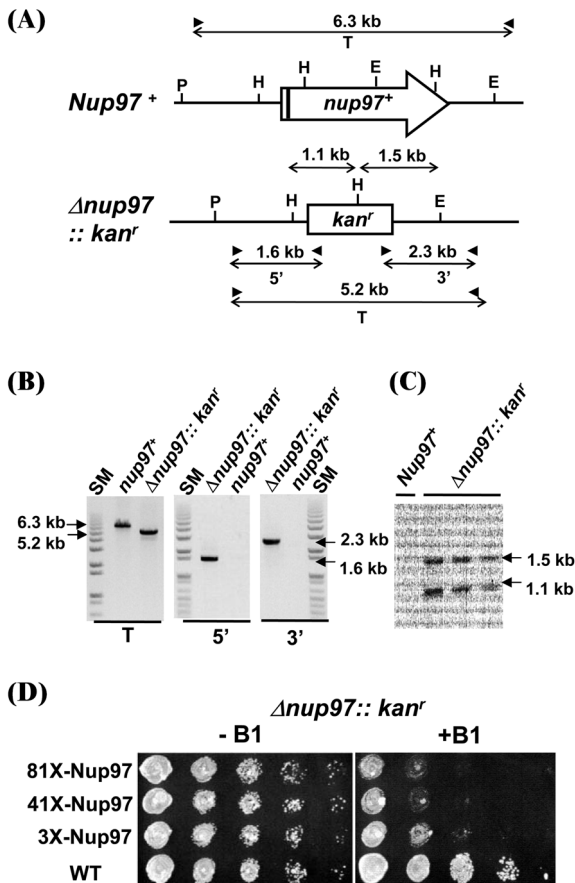


Fig. 2. Construction of $\Delta nup97$ deletion mutants. (A) Schematic diagram representing construct of *nup97* null allele in cells harboring plasmids, 81X-*Nup97*, 41X-*Nup97* or 3X-*Nup97*. Most of *nup97* open reading frame (ORF) region was substituted with marker gene, *kan*^r, by one-step gene disruption method. The *nup97*⁺ ORF and the direction of transcription is denoted by open arrow, and the intron is shown by thick line in the open arrow. The positions of PCR primers for confirmation of wild type and null alleles are indicated by arrowheads, and the expected sizes of PCR products are shown between the arrowheads. The expected sizes of Southern blot using *kan*^r gene as a probe are also shown above the null allele. E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I. (B) Confirmation of disruption of the *nup97* locus. PCR was performed with primers denoted in (A), using genomic DNAs from wild type (*nup97*⁺), and haploid ($\Delta nup97::kan^r$) harboring 81X-*Nup97*, 41X-*Nup97* or 3X-*Nup97*. SM represents DNA size markers. (C) Southern blotting. The genomic DNAs from wild type (*nup97*⁺) and haploid ($\Delta nup97::kan^r$) harboring 81X-*Nup97*, 41X-*Nup97* or 3X-*Nup97* were digested with *Eco*RI and *Hind*III, and hybridized with DNA of *kan*^r gene. (D) Repression of *nup97* expression results in the defect of growth.

과 비슷하게 성장에 영향이 없었다. 또한 poly(A)⁺ RNA의 세포 내 분포도 큰 차이를 보이지 않았다(자료 미제시). 이러한 결과는 *Nup97* 단백질이 과 발현되더라도 다른 mRNA export 요소들을 방해하지 못하거나, 플라스미드의 *nmt1* 프로모터로부터 *nup97* 유전자가 제대로 발현되지 않았을 가능성을 의미한다.

nup97 유전자가 과 발현되더라도 성장에는 아무런 영향이 없었으므로, 위에서 제작한 플라스미드에서 *nup97* 유전자가 제대로 발현되는지를 확인하고자 하였다. 이를 위해 3X-*Nup97*, 41X-*Nup97*, 81X-*Nup97*들이 각각 형질전환된 균주에서 염색체의 *nup97* 유전자와 *kan*^r 유전자를 치환시키는 방법으로 *nup97* 유전자를 결실시켰다. 이렇게 *nup97* 유전자가 결실된 균주를 PCR과 Southern hybridization을 수행하여 선별하였다(Fig. 2). 이렇게 선별된 균주는 염색체의 *nup97* 유전자가 없지만, 플라스미드의 *nmt1* 프로모터에 의해 발현되는 *nup97*을 가지고 있다. 이러한 균주들은 +B1 배지에서 *nup97* 유전자의 발현이 억제되면 생장이 억제되었고, -B1 배지에서 *nup97* 유전자가 발현되면 정상적으로 성장하였다(Fig. 2D). 대조군으로 3X-*Nup97*이 형질전환되어 있으며, 염색체의 *nup97* 유전자를 결실시키지 않은 야생형 균주를 사용하였다. 이러한 결과는 플라스미드에서 *nup97* 유전자가 정상적으로 발현하고 있음을 의미하며, 또한 *nup97* 유전자가 성장에 필수적이라는 것을 확인시킨다. 이러한 생장의 억제가 mRNA export의 결함과 관계가 있는지 알아보기 위해 각각의 균주에서 *in situ* hybridization을 수행하여 poly(A)⁺ RNA의 세포 내 분포를 알아보았다. Fig. 3에서 보듯이, -B1 배지에서 *nup97*이 발현되면 야생형 균주와 마찬가지로 poly(A)⁺ RNA가 세포 전체에 고루 퍼져있었다. 반면, +B1 배지에서 *nup97*의 발현이 억제되면 poly(A)⁺ RNA 농도가 핵 안에는 높아지고 세포질에는 감소하였다. 이것은 mRNA export에 결함이 있음을 의미한다. 또한 DNA의 분포도 정상세포와는 차이점을 보였다. 성장과

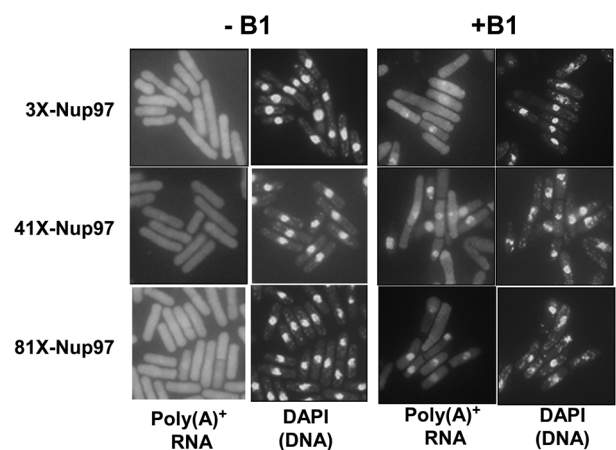


Fig. 3. Poly(A)⁺ RNA localization in $\Delta nup97::kan^r$ mutants harboring 81X-*Nup97*, 41X-*Nup97* or 3X-*Nup97*. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) at 28°C. Cells were then shifted to EMM medium containing thiamine (+B1) and grown for 18 hr. Coincident DAPI staining is shown in the right panels.

mRNA export의 결합 정도는 81X-Nup97을 가진 균주가 가장 심하고, 41X-Nup97과 3X-Nup97을 가진 균주일수록 약해졌다. 이것은 +B1 배지에서 *nup97*의 발현이 억제되더라도 pREP3X의 *nmt1* 프로모터가 가장 강력하여 basal level의 발현이 높기 때문 일 것으로 사료된다. *S. pombe*에서 *mex67*은 생장에 필수적이지

않지만 *nup97*은 생장과 mRNA export에 필수적이라는 결과는, *nup97* 단백질이 Mex67 단백질 이외의 다른 중요 mRNA export 요소들과 상호작용을 하거나, 또는 Mex67 단백질이 관여하지 않는 중요 mRNA export 경로에 관여할 가능성을 암시한다.

Nup97 단백질의 세포 내 위치 분석

nup97 유전자가 암호화하는 단백질의 세포 내 위치를 알아보기 위하여 GFP (Green Fluorescence Protein)를 이용하였다. 이를 위해 GFP 벡터인 pZA69와 pREP81-EGFPc에 *nup97* ORF를 클로닝하였다. 이렇게 제작한 3X-GFP-Nup97, 81X-Nup97-GFP 플라스미드는 각각 *nup97*의 N 말단 또는 C 말단에 GFP가 위치한다. 이 플라스미드를 야생형 균주에 형질전환한 후, GFP 융합 단백질이 정상적으로 기능을 하는지 확인하고, 염색체에서 발현된 *nup97*과 경쟁하지 않도록 염색체의 *nup97* 유전자는 결실시켰다. 이렇게 제작된 균주는 -B1 배지에서 Nup97-GFP 융합단백질이 발현되면 야생형 균주와 마찬가지로 정상적인 성장을 보였고, +B1 배지에서 발현이 억제되면 성장도 역시 억제되었다(Fig. 4C). 다만, 프로모터가 강력한 3X-GFP-Nup97인 경우는 basal level의 발현만으로도 생장이 가능하였다. 이 결과들은 플라스미드에서 발현되는 Nup97-GFP 융합 단백질이 정상적인 기능을 가지고 있음을 의미한다. Nup97-GFP 융합 단백질의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 5). 3X-GFP-Nup97에서 Nup97-GFP 융합단백질이 과 발현되면 세포 전체에 퍼져있지만, 81X-Nup97-GFP에서 적당히 발현되면 핵막 주위에 주로 많이 관찰되었다. 이 융합단백질들은 플라스미드의 *nmt1* 프로모터에서 발현되는 것이므로, Endogenous level로 Nup97-GFP 단백질을 발현시켜 Nup97 단백질의 세포 내 위치를 정확히 알아보기 위하여, *nup97-GFP* 유전자를 염색체의 자신의 위치로 삽입시켰다(Fig. 4). *nup97-GFP*가 염색체 상의 *nup97* 유전자의 위치에 정확히 삽입된 형질전환체를 Southern blotting으로 확인하였다(Fig. 4A and B). 이렇게 *nup97* 자신의 프로모터에 의해 염색체에서 Nup97-GFP 단백질만이 발현되는 균주도 생장이 정상적이므로

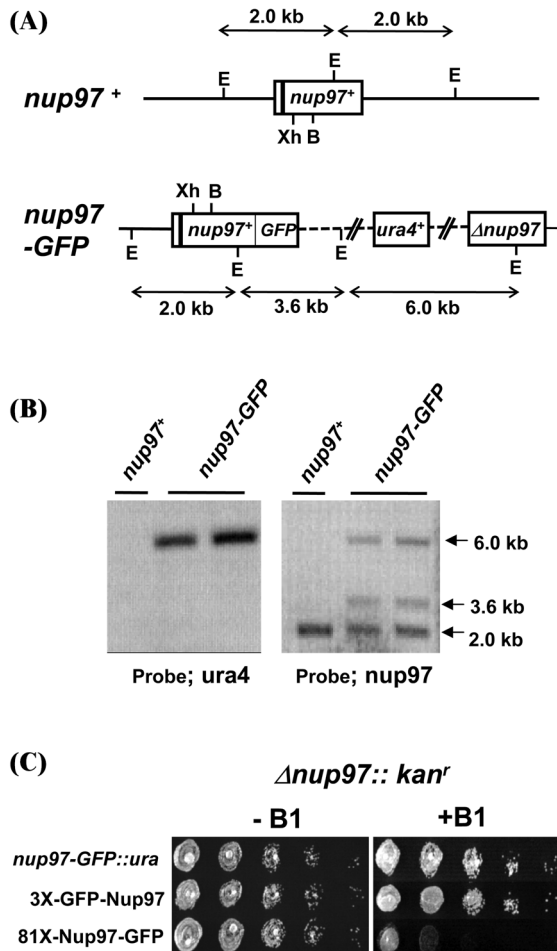


Fig. 4. Construction of *nup97-GFP::ura4⁺* strain. (A) Schematic diagram representing construct of *nup97-GFP::ura4⁺* allele in *S. pombe*. The integrated *nup97-GFP::ura4⁺* allele contains a partial tandem duplication in which the manipulated C-terminus of *nup97-GFP* ORF is fused to the endogenous locus, and the non-expressed C terminal fragment is integrated downstream. The ORF of chimeric *nup97⁺-GFP* is denoted by open box and the intron is shown by thick line in the open box. The plasmid DNA containing no yeast origin and a yeast marker, *ura4⁺*, is shown by dotted line. The expected sizes of Southern blotting using *nup97* gene as a probe are also shown. B, *Bgl*III; E, *Eco*RI; Xh, *Xho*I. (B) Confirmation of integrated *nup97-GFP* locus by Southern hybridization. The genomic DNAs from wild type (*nup97⁺*) and *nup97-GFP::ura4⁺* strain (*nup97-GFP*) were digested with *Eco*RI, and hybridized with DNA of *nup97* gene. (C) Growth of integrated *nup97-GFP::ura4⁺* strain and $\Delta nup97::kan^r$ strains harboring 3X-GFP-Nup97 or 81X-Nup97-GFP. Cells were spotted in 10-fold serial dilutions onto EMM plates in the absence of (-B1) or in the presence of (+B1) thiamine and incubated for 4 days at 28°C.

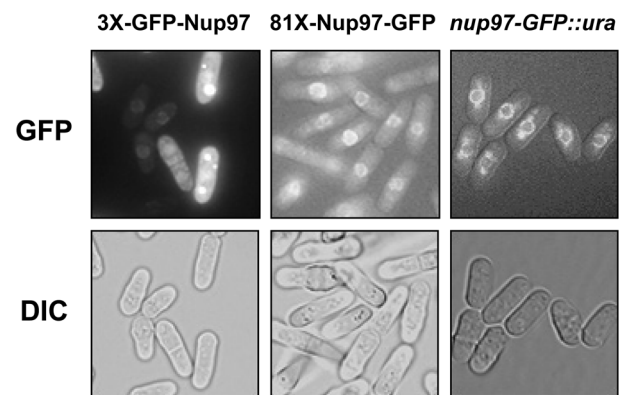


Fig. 5. Localization of Nup97p fused to GFP. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) at 28°C. Coincident differential interference contrast (DIC) images are also shown in the bottom panels.

(Fig. 4C), 삽입된 Nup97-GFP 단백질이 정상적인 기능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이 균주에서 Nup97-GFP의 세포 내 위치를 형광현미경으로 관찰한 결과, 핵막 주위에 아주 선명하게 점점이 관찰되었다. 이와 같은 결과들은 Nup97p 역시 상동성을 보이는 *S. cerevisiae*의 핵공단백질인 Nic96p, 척추동물의 핵공단백질인 Nup93p과 마찬가지로 핵공단백질이지만, 이들과는 달리 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 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, NY, USA.
- Cho, H.J., D.K. Hwang, S.I. Jung, and J.H. Yoon. 2007. *Schizosaccharomyces pombe* nup97, which genetically interacts with mex67, is essential for growth and involved in mRNA export. *J. Microbiol.* 45, 344-349.
- Cronshaw, J.M., A.N. Krutchinsky, W. Zhang, B.T. Chait, and M.J. Matunis. 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 158, 915-927.
- Cullen, B.R. 2003. Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* 116, 587-597.
- Erkmann, J.A. and U. Kutay. 2004. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 296, 12-20.
- Fahrenkrog, B. and U. Aebi. 2003. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 757-766.
- Grlich, D. and U. Kutay. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607-660.
- Hetzer, M.W., T.C. Walther, and I.W. Mattaj. 2005. Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 347-380.
- 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.
- Lei, E.P. and P.A. Silver. 2002. Protein and RNA export from the nucleus. *Dev. Cell* 2, 261-272.
- Moore, M.S. and G.A. Blobel. 1994. G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem. Sci.* 19, 211-216.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795-823.
- Reed, R. and E. Hurt. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108, 523-531.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148, 635-651.
- Suntharalingam, M. and S.R. Went. 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell* 4, 775-789.
- Tran, E.J. and S.R. Went. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125, 1041-1053.
- Vinciguerra, P. and F. Stutz. 2004. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 285-292.
- Weis, K. 2002. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 328-335.
- Yoon, J.H. 2003. Synthetic lethal mutations with *spmex67* of *Schizosaccharomyces pombe* in the mediation of mRNA export. *J. Microbiol.* 41, 115-120.
- 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.
- 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 June 10, 2008/Accepted June 26, 2008)

ABSTRACT : The Study on Function and Localization of Nup97 in Fission Yeast

Duk Kyung Hwang and Jin Ho Yoon* (Basic Science Research Institute and Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Republic of Korea)

We studied on the function and localization of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* Nup97p, which is homologous to nucleoporin Nic96p in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. There was no effect on growth and poly(A)⁺ RNA distribution of cells when *nup97* gene was overexpressed. However, the haploid $\Delta nup97::kan^r$ null mutants confirmed extensive poly(A)⁺ RNA accumulation in the nucleus, abnormal DNA distribution, and cessation of growth when *nup97* expression was repressed. We determined the subcellular localization of Nup97 tagged at the N terminus or the C terminus with GFP. Both fusions complemented growth defect of $\Delta nup97::kan^r$ null mutants. An integrated version of the *nup97-GFP* fusion was constructed at the *nup97* locus. Nup97-GFP fusions expressed from its own promoter was localized at the nuclear periphery with a punctate appearance. These results suggest that Nup97p in fission yeast is also nucleoporin, which is involved in mRNA export.