

분열효모에서 *spDbp5* 유전자의 결실돌연변이 제조와 기능에 대한 연구

배진아 · 조현진 · 윤진호*

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과 및 기초과학연구소

mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 중요한 역할을 하는 발아효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 DEAD-box RNA helicase인 *DBP5* 유전자와 유사한 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 유전자(*spDbp5*로 명명)의 결실돌연변이주(knockout mutant)를 제조하여 그 특성을 조사하였다. 이배체인 *S. pombe* 균주에 하나의 *spDbp5* 유전자만을 결실시킨 후 4분체분석(tetrad analysis)을 수행한 결과, 이 유전자가 결실된 반수체 균주는 성장하지 못했다. mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 있어서 *spDbp5*의 역할을 알아보기 위해, *spDbp5*의 발현이 티아민(thiamin)에 의해 억제되는 균주를 제작하여 *in situ* hybridization을 통해 세포 내의 poly(A)⁺ RNA 분포를 살펴보았다. *spDbp5* 유전자의 발현이 억제되면, poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 축적되고 세포질에서는 줄어들었다. 이와 같은 결과들은 *spDbp5* 유전자 역시 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 매우 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

Key words □ deletion mutant, mRNA export, *Schizosaccharomyces pombe*, *spDbp5*

진핵생물에서는 핵 안에서 일어나는 전사와 세포질에서 일어나는 단백질 합성은 분리되어 있다. 이러한 분리는 유전자의 안정적 저장 및 발현조절에 유리하지만, RNA와 단백질 같은 거대분자들이 핵과 세포질을 끊임없이 이동하여야만 한다. 이러한 거대분자들의 핵과 세포질 사이의 이동(Nucleocytoplasmic transport)은 세포들이 정상적 살아가는데 매우 중요하며, 핵막에 존재하는 유일한 통로인 Nuclear Pore Complex (NPC)를 통해서 이루어진다(6).

단백질이나 다른 RNA (tRNA, rRNA, snRNA 등)의 이동과는 달리, mRNA의 핵에서 세포질로의 이동(mRNA export)은 훨씬 복잡하며 전혀 다른 기작에 의해 일어나는 것으로 여겨진다(19). mRNA는 많은 단백질과 결합하여 아주 커다란 mRNP 중합체를 이루며, 이러한 mRNP 중합체는 mRNA가 전사되어 소멸할 때까지 시간적, 공간적으로 결합단백질이 달라지는 역동적인 구조를 이루고 있다(5). 이러한 mRNP export에는 receptors가 필요하며, 하등 진핵생물인 효모에서부터 인간에 이르기까지 진화적으로 잘 보존되어 있다(4). Nuclear Export Factors (NXFs)로 불리는 단백질 family에 속하는 단백질들(효모에서는 Mex67p, 인간에서는 NXF1/TAP)이 주된 mRNA Export Receptors로 작용한다고 여겨지며(12), 이들은 가공과정(mRNA processing)이 끝난 성숙한 mRNP 중합체를 NPC까지 연결시키고, NPC와의 약한 상호작용을 통해 mRNP 중합체가 NPC를 통과하도록 역할을 하는 것으로 추측된다(7). 어떻게 오직 성숙한 mRNA만 선택되는지는 불명확하지만, NXF 단백질과 mRNA의 결합은 약하고 비특이적이므로 이 결합을 위해서는 여러 adaptor 단백질이 반드시 필요

하다. Adaptor 단백질에는 mRNA 전사 및 가공과정에 관여하는 Sub2/REF1 단백질, EJC 구성요소들, SR 단백질들, THO/TREX 구성요소 등이 알려져 있다(9, 11, 16, 21, 22). 이밖에도 mRNP 중합체와 특이적으로 결합하는 NPC의 특정 단백질 또는 NPC-associated 단백질(Gle1p, Rae1p 등) 뿐만 아니라, RNA 결합단백질(Npl3p, Nab2p 등), RNA helicase (Dbp5p 등), ATPase (Elf1p 등) 등도 mRNA export에 관여하는 중요한 단백질들이다. mRNA export의 작용기작은 아직 확실치 않지만, 위에 언급한 여러 soluble mRNA export factors 사이의 중요한 단백질-단백질 상호작용이 최근 연구에 의해 밝혀지고 있다(20, 24).

많은 DEAD-box RNA helicase들은 거의 모든 생명체에서 발견되며, RNA 대사과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(18). DEAD-box RNA helicase인 Dbp5는 진화적으로 잘 보존되어 있으며, mRNA export에 필수적인 기능을 하는 단백질이다(3). 이 단백질은 핵과 세포질을 왕복할 수 있으며, 주로 NPC의 세포질 쪽에 존재하므로 mRNA export의 마지막 단계에서 기능을 할 것으로 여겨졌다(3, 10). 실제로 Dbp5 단백질은 *in vitro*에서 약한 ATPase 활성과 RNA helicase 활성을 보이지만, NPC의 세포질 쪽에 결합하는 Gle1 단백질과 inositol hexakisphosphate (IP₆)에 의해 활성이 증가하고(1, 25), NPC의 세포질 쪽에서 Mex67과 Nab2 등의 단백질을 mRNP 중합체로부터 제거하는 RNA:단백질 remodeling 활성을 보이는 것으로 밝혀졌다(13, 23).

하등진핵생물로서 발아효모인 *S. cerevisiae*와 분열효모인 *S. pombe*는 여러 면에서 많은 차이점을 보이므로 진핵생물의 전체적인 mRNA export 기작을 이해하기 위해 상호보완적으로 작용하고 있다. 본 실험에서는 *S. cerevisiae*의 Dbp5와 유사한 *S. pombe*의 단백질을 암호화하는 유전자의 결실돌연변이를 제조하여 mRNA export에서의 기능을 알아보자 하였다.

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

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

기본적인 유전적 그리고 세포배양 기술은 *S. pombe* standard method를 사용하였다(2, 17). 본 실험에 사용된 효모 *Schizosaccharomyces pombe* 균주는 Table 1에 정리하였다.

재조합 플라스미드의 증폭과 선택을 위한 형질전환용 균주로 *E. coli* Top10을 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. *nmt* 프로모터의 억제력을 위해서는 EMM 배지에 15 µM 티아민(thiamin)을 첨가하여 사용하였으며, 고형 배지는 2% agar를 첨가하였다.

결실돌연변이체와 플라스미드 제조

ΔspDbp5::Ura4⁺ 결실돌연변이는 double-joint PCR에 의한 one-step gene disruption 방법을 사용하여 제조하였다(27). *ΔspDbp5::Ura4⁺* DNA 단편을 제작하기 위한 primers는 다음과 같다. 5For; 5'-ATGAGCGCGTTAACTCATCC-3', 5Rev; 5'-ACATATAGCCAGTGGGATTTGTAGCTTTCTGTCTCCAGTGTAGTTGACAT-3', 3For; 5'-GGTGTGGAACAGAATAAATTAGATGCACTTAAAA TGTAAGCATGTTGA-3', 3Rev; 5'-GATCCTGACGGTCCTGC CGA-3', 5Nest; 5'-TAGCCTGTGAACAGGAATTC-3', 3Nest; 5'-TCAACTTCTTTCCGATGCTC-3'. 3번째 PCR 후에 증폭된 *ΔspDbp5::Ura4⁺* DNA 단편은 젤-분리 후에 이배체 SP286 균주 또는 반수체 AY217 (pREP81X-Dbp5 또는 pREP41X-Dbp5) 균주에 형질전환하였다. *Ura⁺* 형질전환체 중에서 PCR과 Southern blot으로 결실돌연변이체를 선별하였다. pREP81X-Dbp5 또는 pREP41X-Dbp5 플라스미드 제작을 위해서는 Dbp5-3; 5'-GTAC TCGAGATGTCAACTACACTGGGACA-3', Dbp5-4; 5'-GATGGA TCCTTACATTTTAAGTGCATTCT-3' primers를 사용한 PCR로 *spDbp5* ORF를 증폭하였다. Dbp5-3와 Dbp5-4 primers는 각각 *XhoI*과 *BamHI* 서열을 가지고 있으므로, pREP81X 또는 pREP41X을 *XhoI*과 *BamHI*으로 절단하여 ligation하였다.

In situ Hybridization

세포 내의 poly(A)⁺ RNA의 분포를 알아보기 위한 *in situ* hybridization은 이전 논문에서 서술되어 있다(26). 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

mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 중요한 역할을 하는 발아 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 DEAD-Box RNA helicase인 DBP5 단백질과 유사한 단백질을 암호화하는 open reading frame (ORF)인 SPBC12C2.06을 분열효모인 *S. pombe*의 유전체 database (Sanger Center, UK)에서 찾았다. 이 ORF는 인트론이 없으며, 503개 아미노산으로 이루어진 분자량 56.3 kDa로 예측되는 단백질을 암호화하고 있다. 또한 이 단백질의 아미노산 서열은 *S. cerevisiae* DBP5와 57.3%의 동일성을 보이며, DEAD-box RNA helicase 영역이 잘 보존되어 있다. 그러므로 이 유전자를 *spDbp5*로 명명하고, mRNA의 핵 밖으로 수송에 관여하는지를 알아보고자 결실돌연변이 균주를 제작하여 특성을 연구하였다.

영양요구 선별유전자인 *Ura4*로 치환된 *spDbp5* 결실돌연변이 균주를 만들기 위해서, *spDbp5::Ura4⁺* DNA 단편을 double-joint PCR 방법에 의해 제작한 후 이배체 균주인 SP286에 형질전환시켜 유라실이 없는 배지에서 자라는 형질전환체를 얻었다(Fig. 1A). 이 형질전환체들로부터 2개의 *spDbp5* 유전자 중 하나만 *Ura4⁺* 유전자로 치환된 형질전환체(*ΔspDbp5::Ura4⁺/spDbp5⁺*)를 PCR을 통해 선별하였다(Fig. 1B). 이렇게 얻은 SP286 (*ΔspDbp5*) 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 현미조작기로 각각 분리하여 배양하였다. 하나의 자낭에 있는 4개의 포자 중 2개만 콜로니로 성장하고 2개는 성장하지 못하는 2:2 분리양상을 보였다(Fig. 1C). 콜로니를 형성한

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

Strains	Genotype	Source
AY217	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18</i>	Yoon et al. (2000)
SP286	<i>h⁺/h⁺ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216</i>	Matsumoto and Beach (1991)
SP286(<i>ΔspDbp5</i>)	<i>h⁺/h⁺ leu1-32/leu1-32 ura4-d18/ura4-d18 ade6-M210/ade6-M216, ΔspDbp5::Ura4⁺/spDbp5⁺</i>	This study
<i>ΔspDbp5</i> (81X-Dbp5)	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 ΔspDbp5::Ura4⁺ /pREP81X-Dbp5</i>	This study
<i>ΔspDbp5</i> (41X-Dbp5)	<i>h⁺ leu1-32 ura4-d18 ΔspDbp5::Ura4⁺ /pREP41X-Dbp5</i>	This study

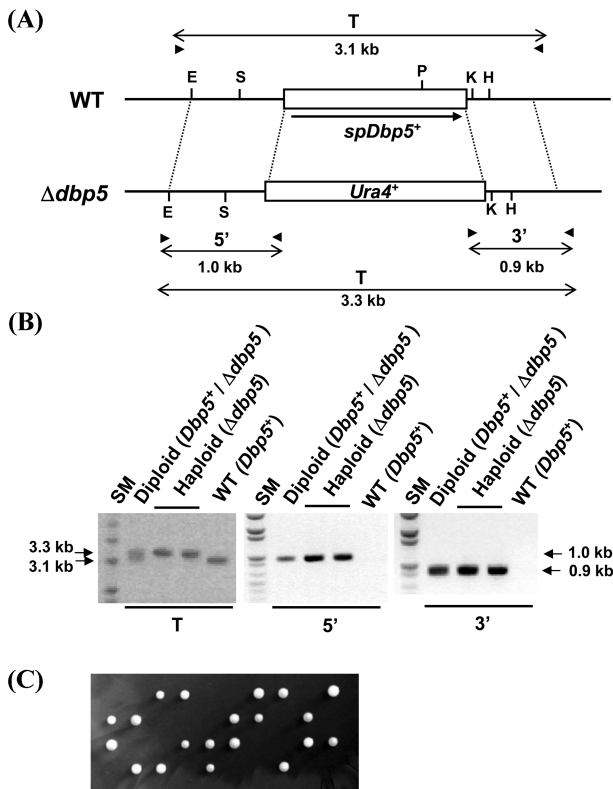


Fig. 1. Construction of *spDbp5* deletion mutants. (A) Schematic diagram representing construct of *spDbp5* null allele in *S. pombe*. Most of *spDbp5* open reading frame (ORF) region was substituted with marker gene, *Ura4⁺*, by one-step gene disruption method. The *spDbp5* ORF is denoted by open boxes and 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. E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; P, *PstI*; S, *SalI*. (B) Confirmation of disruption of the *spDbp5* locus. PCR was performed with primers denoted in (A), using genomic DNAs from wild type (WT), diploid disrupted one of the *spDbp5* locus (*spDbp5⁺/ΔspDbp5::Ura4⁺*), and haploid (*ΔspDbp5::Ura4⁺*) harboring pREP81X-*Dbp5* or pREP41X-*Dbp5*. SM represents DNA size markers. (C) Tetrad analysis. Diploid cells disrupted one of the *spDbp5* locus were sporulated, and 10 tetrads were dissected on YES plate and incubated for 4 days at 28°C.

포자는 모두 유라실이 없는 배지에서 자라지 못하는 것으로 보아 *spDbp5* 유전자가 야생형인 반수체이고, 성장하지 못한 포자는 *spDbp5* 유전자가 결실된 *ΔspDbp5::Ura4⁺* 유전자형을 갖는 반수체 포자이다. 이 실험 결과는 발아효소의 *DBP5* 유전자와 같이, 분열효소의 *spDbp5* 유전자도 생장에 필수적임을 의미한다.

spDbp5 유전자는 생장에 필수적이므로, 이 유전자의 기능을 알아보기 위하여 *spDbp5* 유전자의 발현이 조절되는 균주를 제작하였다. 먼저 *spDbp5* 유전자의 단백질을 암호화하는 ORF만을 *nmt1* 프로모터에 붙여서 *spDbp5*의 전사가 티아민에 의해 조절되는 pREP81X-*Dbp5*와 pREP41X-*Dbp5* 플라스미드를 제작하였다. *nmt1* 프로모터는 배지에 티아민이 없으면 전사가 유도되고,

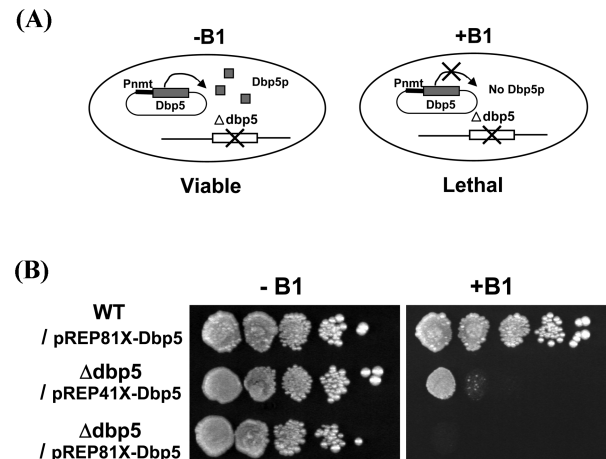


Fig. 2. Repression of *spDbp5* expression results in the defect of growth. (A) Schematic diagram representing construction of chromosomal *spDbp5*-disrupted haploid strains harboring pREP81X-*Dbp5* or pREP41X-*Dbp5*, in which *spDbp5* is expressed under the control of *nmt* promoter. This strain is kept viable by expression of *spDbp5* gene from plasmids in the absence of thiamine (-B1). In the presence of thiamine (+B1), the expression of *spDbp5* is repressed, resulting in inhibition of growth (Lethal). (B) Inhibition of growth by repression of *spDbp5* expression. Wild type and *spDbp5*-disrupted cells harboring indicated plasmids 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.

티아민이 존재하면 전사가 억제되는 프로모터이다(15). 야생형 *nmt1* 프로모터는 강력한 프로모터로 억제되더라도(티아민이 있는 배지) 기본발현 정도가 높기 때문에, 발현이 약한 돌연변이형 *nmt1* 프로모터를 사용하였다. pREP41X와 pREP81X 플라스미드에는 각각 야생형에 비해 약한 돌연변이 *nmt1* 프로모터가 들어 있다(pREP41X는 weaker *nmt* 프로모터, pREP81X는 weakest *nmt* 프로모터)(8). pREP81X-*Dbp5* 또는 pREP41X-*Dbp5* 플라스미드가 형질전환된 반수체 AY217 균주를 이용하여, 염색체 *spDbp5*의 결실돌연변이 균주를 제작하였다(Fig. 2A). 이렇게 제작된 *ΔspDbp5* (81X-*Dbp5* 또는 41X-*Dbp5*) 균주는 티아민이 없는 배지(-B1)에서는 플라스미드의 *spDbp5* 유전자가 발현되므로 성장하였다(Fig. 2B). 하지만 티아민이 있는 배지(+B1)에서는 플라스미드의 *spDbp5* 유전자의 발현이 억제되므로 성장하지 못했다. 염색체 *spDbp5*가 결실되지 않은 균주는 티아민에 상관없이 잘 자랐다. 이러한 결과는 *spDbp5*의 발현이 티아민으로 억제되는 균주를 성공적으로 제작되었다는 것을 의미하며, *spDbp5* 유전자의 발현이 생장에 필수적임을 다시 한 번 보여준다.

spDbp5 유전자가 분열효소에서 mRNA의 수송에 관여하는지를 알아보기 위해, *spDbp5* 유전자의 발현이 조절되는 *ΔspDbp5* (81X-*Dbp5* 또는 41X-*Dbp5*) 균주에서 poly(A)⁺의 분포를 *in situ* hybridization을 통해 조사하였다. 이 균주를 티아민이 없는 배지에서 키우다가 둘로 나누어 하나는 티아민이 없는, 그리고 나머지 하나는 티아민을 첨가한 배지에서 16시간 더 키웠다. *spDbp5*

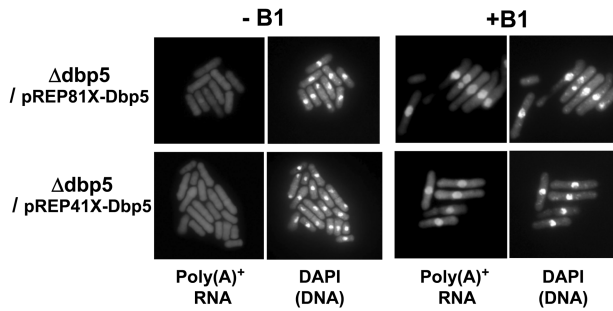


Fig. 3. Poly(A)⁺ RNA localization in *DspDbp5* mutants harboring pREP81X-*Dbp5* or pREP41X-*Dbp5*. Cells were grown to the mid-log phase in appropriately supplemented EMM medium in the absence of thiamine (-B1) at 28°C. Cells were then shifted to EMM medium containing thiamine (+B1) and grown for 18 hr. Coincident DAPI staining is shown in the bottom panels.

유전자가 플라스미드에서 발현된 것(-B1)은 poly(A)⁺ RNA가 세포질 전체에 퍼져있으며(Fig. 3), 이것은 야생형 균주와 거의 비슷한 poly(A)⁺ RNA 분포이다. 하지만 *spDbp5* 유전자의 발현이 억제된 세포에서는 poly(A)⁺ RNA가 핵 안에 매우 강하게 축적되었으며 세포질에는 줄어들었다. 이것은 *spDbp5* 유전자의 발현이 억제되면 mRNA의 세포질로의 이동에 이상을 보인다는 것을 의미한다. 이러한 실험 결과는 분열효모에서도 *spDbp5* 유전자가 mRNA의 핵에서 세포질로의 이동에 매우 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

감사의 말

이 논문은 2006년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Alcazar-Roman, A.R., E.J. Tran, S. Guo, and S.R. Wentz. 2006. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat. Cell Biol.* 8, 711-716.
- Alfa, C., P. Fantes, J. Hyams, M. Mcleod, and E. Warbrick. 1993. Experiments with fission yeast. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N.Y., USA.
- 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.
- Dimaano, C. and K.S. Ullman. 2004. Nucleocytoplasmic transport: integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore. *Mol. Cell Biol.* 24, 3069-3076.
- Erkman, J.A. and U. Kutay. 2004. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 296, 12-20.
- Forsburg, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe*

- expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21, 2955-2956.
- Gwizdek, C., N. Iglesias, M.S. Rodriguez, B. Ossareh-Nazari, M. Hobeika, G. Divita, F. Stutz, and C. Dargemont. 2006. Ubiquitin-associated domain of Mex67 synchronizes recruitment of the mRNA export machinery with transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16376-16381.
- Hodge, C.A., H.V. Colot, P. Stafford, and C.N. Cole. 1999. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J.* 18, 5778-5788.
- Huang, Y. and J.A. Steitz. 2005. SRprises along a messenger's journey. *Mol. Cell* 17, 613-615.
- 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.
- Lund, M.K. and C. Guthrie. 2005. The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Mol. Cell* 20, 645-651.
- 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.
- Rocak, S. and P. Linder. 2004. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 232-241.
- Rodriguez-Navarro, S., T. Fischer, M.J. Luo, O. Antunez, S. Bretschneider, J. Lechner, J.E. Perez-Ortin, R. Reed, and E. Hurt. 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116, 75-86.
- Stewart, M. 2007. Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Mol. Cell* 25, 327-330.
- Strasser, K. and E. Hurt. 2000. Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *EMBO J.* 19, 410-420.
- Strasser, K. and E. Hurt. 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413, 648-652.
- Tran, E.J., Y. Zhou, A.H. Corbett, and S.R. Wentz. 2007. The DEAD-box protein Dbp5 controls mRNA export by triggering specific RNA:protein remodeling events. *Mol. Cell* 28, 850-859.
- Vinciguerra, P. and F. Stutz. 2004. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 285-292.
- Weirich, C.S., J.P. Erzberger, J.S. Flick, J.M. Berger, J. Thorner, and K. Weis. 2006. Activation of the DEXD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nat. Cell Biol.* 8, 668-676.
- 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-Domínguez, 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 February 24, 2008/Accepted March 11, 2008)

ABSTRACT: Construction of *spDbp5* Null Mutants Defective in mRNA Export

Jin-Ah Bae, Hyun-Jin Cho, 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 constructed the null mutants of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *spDbp5* gene that is homologous to DEAD-box RNA helicase *DBP5* in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which plays important roles in mRNA export out of nucleus. A null mutant in an h^+/h^+ diploid strain was constructed by replacing the *spDbp5*-coding region with an *ura4⁺* gene using one-step gene disruption method. Tetrad analysis showed that the *spDbp5* is essential for vegetative growth. The haploid *spDbp5* null mutants harboring pREP81X-*spDbp5* plasmid showed extensive poly(A)⁺ RNA accumulation in the nucleus and decrease in the cytoplasm after repression of *spDbp5* expression. These results suggest that *spDbp5* is also involved in mRNA export from the nucleus.