

kem 1, 효모의 Cell Division과 Nuclear Fusion을 조절하는 유전자

김진미

한국과학기술원 유전공학센터

효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 life cycle은 크게 두가지로 구분되는데 세포가 분열하여 증식하는 cell division cycle과 mating type이 다른 두 세포가 만나 접합하는 conjugation cycle이 있다. Conjugation cycle에서는 (Fig. 1) 세포질이 합쳐지는 과정에 (cell fusion) 뒤이어 두 개의 parental nuclei가 접합하는 nuclear fusion이 일어나면서 안정 이배체 (stable diploid)를 형성한다. 전자현미경상에서 관찰한 결과에 의하면, nuclear fusion이 일어날 때 핵막에 위치한 spindle pole body로부터 뻗어 나오는 extranuclear microtubules이 두 개의 parental nuclei를 서로 가까이로 이동시켜 주며, 근접하게 위치하게 된 핵은 spindle pole body 부근에서 합쳐짐으로 알려져 있다(1, 2).

Nuclear fusion에 관여하는 것으로 지금까지 알려진 유전자로는 *kar 1*, *kar 2*, *kar 3*, *cdc 4*, *cdc 37*, *bik 1*, 그리고 *tub 2*이다. *kar 1* 유전자의 산물은 spindle pole bodies 구조의 한 구성원으로 microtubules과 spindle pole bodies의 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 있다(3, 4). *tub 2*는 microtubules의 subunit인 β -tubulin의 유전자이다(5). 이외에도 관련된 유전자들이 더 밝혀져야 하며 또 nuclear fusion 과정에 spindle pole body와 microtubules이 중요한 역할을 하므로, 우리는 nuclear fusion 과정중 특히 microtubules와 spindle pole body의 기능에 관련되는 새로운 유전자를 찾아내고자 하였다. 유전학적인 접근방법을 개발하여 세계의 새로운 유전자 *kem 1*, *kem 2*, *kem 3*를 찾아냈다(6). 본고에서는 *kem 1* 유전자의 기능에 대해 중점적으로 연구한 결과를 서술하려 한다.

1. *kem 1* Mutant의 Nuclear Fusion Defect

Nuclear fusion defect는 보통 두가지 형태로

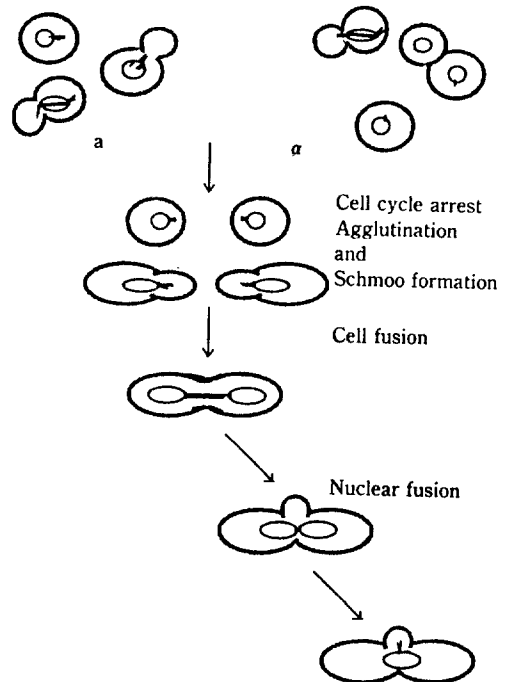


Fig. 1. Schematic diagram of yeast conjugation cycle. Mating factors produced by haploid cells of each mating type induce the initial steps of conjugation; G1 arrest, agglutination, and shmoo formation. When cells of opposite mating type pair, the cell walls separating two cells are degraded and cell fusion occurs with cytoplasmic mixing. Two parental nuclei are brought together and nuclear fusion occurs starting at the spindle pole body. When a diploid nucleus is formed, the zygote initiates the mitotic cell cycle, budding off a diploid cell.

구분한다; (a) mating에 참여하는 두 parent 세포가 모두 mutant이어야만 nuclear fusion이 일어나지 않는 경우, 이를 bilateral defect라 한다. (b) 두 parent 중 하나만이 mutant이어도 nuclear fusion이 일어나지 않는 경우, 이를 unilateral defect라 한다. *kem1* mutant는 bilateral nuclear fusion defect가 있다. Wild type의 mating이나 wild type × *kem1* mutant의 mating인 경우 정상적인 nuclear fusion이 이루어져 stable diploid를 형성하는데 반해, *kem1* × *kem1*의 mating인 경우 정상적인 cell fusion은 일어나지만 만들어진 접합체 (zygotes)의 30%는 nuclear fusion이 이루어지지 않는다. 결과적으로 diploid 대신 많은 수의 cytoductant라는 haploid progeny를 형성한다 (cytoductant는 핵은 haploid parent의 성질을 지니면서 세포질은 두 parent로부터 온 성질을 모두 갖는 세포를 말한다).

2. *kem1* 유전자와 microtubules의 기능

효모의 microtubules는 두가지 형태의 구조가 있다; cytoplasmic microtubules과 intranuclear spindles이다. Cytoplasmic microtubules

은 conjugation에서 nuclear fusion에 관여하고 (1, 2), intranuclear spindles는 mitosis와 meiosis에서 염색체 이동과 핵분열에 중심된 역할을 한다 (8, 9). *kem1* 유전자가 nuclear fusion에 필요함은 위 항목에서 서술하였고 세포분열시 염색체 이동에 필요함은 Table 1에 요약되어 있는 결과에서 보여진다. 즉 *kem1* mutant인 경우 세포분열시 wild type에 비해 10-20배의 속도로 염색체를 잃는다.

Wild type의 효모 세포는 antimicrotubule drug인 benomyl이 20 ug/ml의 농도로 있는 배지에서 잘 자라지만 40 ug/ml의 농도에서는 세포생장이 중지된다 (5). 이는 benomyl이 tubulin에 붙으면서 microtubules을 depolymerize시켜 기능을 방해하기 때문이다. *kem1* mutant의 성장이 benomyl에 의해 영향을 받는지 실험해 보았더니 wild type에 비해 benomyl에 hypersensitive하여 10 ug/ml의 농도에서도 자라지 않음을 관찰하였다. Benomyl에 대한 sensitivity와 microtubules 사이의 밀접한 연관관계에 관한 지금까지의 연구보고를 보더라도 (5, 7) 이 결과는 *kem1* 유전자가 microtubules의 기능에 중요한

Table 1. Frequency of chromosome loss and mitotic recombination in *kem1/kem1* diploids

Diploid	Chromosome loss ^a	Mitotic recombination ^b
<i>kem1/kem1</i> (JK326)	1.2	2.30
<i>kem1/kem1-1</i> (JK327)	1.1	0.93
<i>kem1/kem1-5</i> (JK328)	3.2	1.61
<i>kem1-1/kem1-1</i> (JK329)	22.9	1.18
<i>kem1-5/kem1-5</i> (JK330)	16.4	1.87
<i>kem1-1/kem1-5</i> (JK331)	27.7	1.51

Each number represents an average derived from 6-8 independent assays.

^a Frequency of Can^R His⁻ cells appearing in a single colony. Numbers indicate (the number of Can^R His⁻ cells) / (the total number of diploid cells) × 10⁵.

^b Frequency of Can^R His⁺ cells appearing in a single colony. Numbers indicate (the number of Can^R His⁺ cells) / (the total number of diploid cells) × 10⁴.

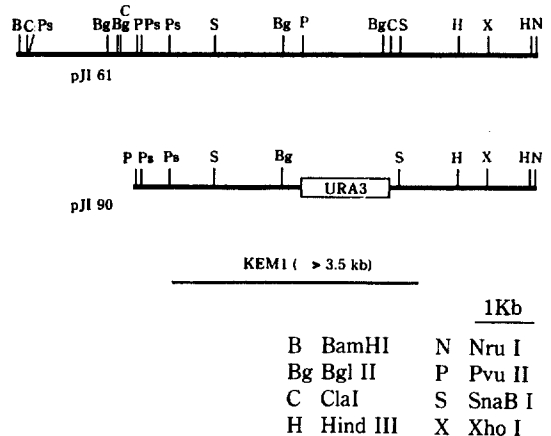


Fig. 2. DNA inserts of the plasmid vectors used in this study. pJI61; the 9.0 kb BamHI-NruI fragment of *KEM1* is inserted at the BamHI and the NruI sites of the integrating vector YIp5 (*URA3*). pJI90; The boxed region corresponds to the 1.1 kb HindIII fragment containing the *uRA3* gene which replaces the 1.3 kb PvuII-BstEII fragment internal to *KEM1*. pJI82; the 5.5 kb PvuII-HindIII fragment was inserted at the BamHI and HindIII sites of YCp50.

Table 2. Nuclear division and spindle pole body separation in large budded cells of *KEM1* and *kem1::URA3* strains.

<i>kem1</i>	0	34	11	41	0	(74) ^b
<i>kem1::URA3</i>	27	17	15	32	10	(133)

^a The diagram shows the large budded cells; nuclei, spindle pole bodies, and intranuclear spindles are shown.

^b Numbers indicate the percentage of cells with a diagrammed structure (the number in parentheses is the total number of cells examined).

역할을 하는 것임을 간접적으로 나타낸다.

3. *kem1* 유전자와 효모의 Mitotic Cell Division

kem1 유전자의 mitotic cell division에서의 역할을 연구하기 위하여 *kem1* 유전자의 기능이 완전히 소멸되는 *kem1* null allele을 *in vitro* DNA manipulation 방법으로 construct 하여 (Fig. 2) transformation/genomic integration에 의하여 효모 세포에 넣어 줌으로써 *kem1* null mutant를 얻었다.

Wild type 세포의 cell division cycle은 bud가 형성되면서 핵막의 spindle pole body가 duplicate되고 두 spindle pole bodies가 분리되어 핵막을 따라 이동하면서 핵이 분열한다. 이때 두 spindle pole bodies 사이에 intranuclear microtubules이 발달하면서 핵분열을 돕는다. *kem1* 기능이 소멸된 *kem1* null mutant는 세포분열의 속도가 매우 느리며 변형된 cell morphology를 보였다. 특히 상당수의 large-budded cell (bud가 mother cell의 크기만큼 자랐을 시기는 spindle pole body의 duplication/separation 과정에서 중지된 것을 관찰할 수 있으며 intranuclear microtubules이 발달하지 않았다 (Table 2). 또 세포의 10% 가량이 두개의 핵을 지닌 binuclear cell이라는 결과를 얻었다. 이는 아마 핵분열이 세포질 분열과 어긋나면서 분열된 핵이 bud로 이동하지 못한 것으로 추측된다. 이 결과들은 *kem1*

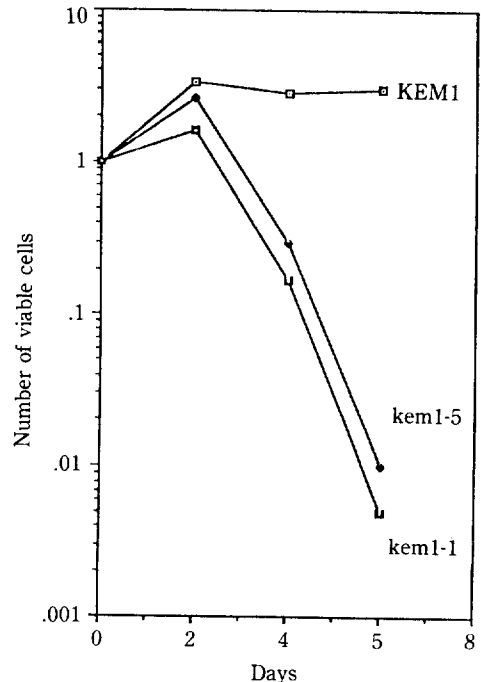


Fig. 3. Viability of *kem1* mutants after nitrogen starvation. Exponentially growing cultures of *KEM1* (JK204), *kem1-1* (JK205), and *kem1-5* (JK191) were shifted from YEPD to SD media lacking nitrogen. Viability was measured after various incubation periods.

유전자가 세포분열시 spindle pole body duplication에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

4. *kem1* 유전자는 배지의 영양 상태를 감지하여 세포분열을 조절하는 역할을 한다.

Wild type의 효모 세포는 배지의 영양이 부족할 경우 이 조건에 대한 즉각적인 반응으로 세포분열이 G1-stage에서 멈추면서 장기간 viability를 유지한다. 이 배성 세포 (diploids)는 이러한 조건에서 meiosis를 거쳐 spore를 형성한다. 그러나 *kem1* mutant는 특히 배지의 질소원이 부족되었을 때 wild type과 대조적으로 viability가 떨어짐을 관찰하였다. Fig. 3에서 보듯 4일 후엔 5%의 세포만이 viable하고 6일 후엔 거의 모든 세포가 죽는다. 또한 *kem1/kem1* mutant diploid는 영

양이 부족한 sporulation 조건에서도 spore를 형성하지 않는다. 이러한 결과들은 *kem 1* mutant가 배지에서의 영양 변화에 반응하지 못함을 나타낸다. 지금 열거한 성질들은 (sporulation defect와 sensitivity to nitrogen starvation) 효모에서의 RAS/Adenylate cyclase pathway에 관련된 일련의 유전자들의 잘 알려진 특성과 유사한 것으로 배지의 영양 상태에 관한 변화를 전달하는 일종의 signal transduction 체계에 의한 영향일 것으로 사려된다. 지금까지 우리가 연구한 결과에 의하면 (6) *kem 1* 이 RAS/Adenylate cyclase pathway에서 직접 역할을 하기 보다는 이와 parallel 한 또 하나의 pathway를 제시한다고 보겠다.

결론적으로, 앞에서 열거한 *kem 1*의 역할들을 고려해 볼 때 *kem 1* 유전자가 세포의 영양 상태에 따라 spindle pole body와 microtubules의 기능을 조절하는 조절 기작에 중요한 역할을 한다고 생각되어진다.

참 고 문 헌

1. Byers, B. and L. Goetsch, 1974 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 123-131.
2. Byers, B. and L. Goetsch, 1975 J. Bacteriol. 124: 511-523.
3. Conde, J. and G.R. Fink, 1976 Proc. Natl. Sci. U.S.A. 73: 3651-3655.
4. Rose, M.D. and G.R. Fink, 1987 Cell 48: 1047-1060.
5. Thomas, J.H., N.F. Neff, and D. Botstein, 1985 Genetics 112: 715-734.
6. Kim, J. and G.R. Fink submitted to Genetics
7. Schatz, P.J., F. Solomon, and D. Botstein, 1986 Mol. Cell Biol. 6: 3722-3733.
8. Byers, B., 1981 pp. 59-96. In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. vol. 1, Edited by Strathern, J.N., E.W. Jones, and J.R. Broach, Cold Spring Harbor, New York.
9. Huffaker, T.C., J.H. Thomas, and D. Botstein, 1988 Ann. Rev. Genet. in press

1. Byers, B. and L. Goetsch, 1974 Cold Spring