

효모의 mating pheromone 신호전달과정에 관여하는 유전자의 돌연변이 분리 및 분석

김지혜 · 김환규 · 장광엽
전북대학교 자연과학대학 생물학과

Isolation and Characterization of the Mutants in the Genes Involved in Mating Pheromone Signalling

Ji-Hye Kim, Hwan-Gyu Kim and Kwang-Yeop Jahng
Department of Biology, College of Natural Sciences,
Chonbuk National University, Chonju 560-756, Republic of Korea

ABSTRACT: The gene *CDC70* encoding the α -subunit of G protein has been known to be a component involved in mating pheromone signalling in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. To isolate mutations of the genes involved in the signal transduction, *Saccharomyces cerevisiae* the strain bearing the *cdc70-5* mutation was mutagenized to be forced to recover the ability of colony-formation at restrictive temperature, which means the new mutation can suppress the temperature sensitivity of the *cdc70-5* phenotypes. Among these suppressors, *sir⁻* and *mata2⁻* mutations are excluded because of no relationship to signal transducer. And the selected suppressors were analyzed for the linkage relationships by the tetrad analysis. Out of fifteen suppressors isolated, twelve were classified into four linkage groups, designated as *sga1*, *sga2*, *sga3*, *sga4* by the tetrad analysis. The other three genes were determined for the linkage.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*, mating pheromone signal, *CDC70*

효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포형(cell type)은 haploid인 a-형과 α -형 그리고 mating된 diploid인 a/ α 형 등 세가지가 존재한다. 두 종류의 haploid 세포가 mating을 하기 위해서는 상대편 세포가 분비하는 mating pheromone (a-형은 a-factor를, α -형은 α -factor를 분비함)에 의해 서로 유도되어 mating이 일어나게 된다(Thorner, 1981; Bucking-Throm *et al.*, 1973). 즉, a-형 세포는 α -factor에 의해서 α -형 세포는 a-factor에 의해서 mating을 할 수 있는 준비 상태로 변하게 되어 mating이 이루어진다. 과정은 mating pheromone에 의해서 유발된 신호가 세포내에서 전달됨으로써 pheromone에 대한 반응이 나타나는 것으로 부터 시작되는데, 이는 상대편 haploid 세포에 자극을 줌으로써 mating에 필요한 여러가지 세포내 변화가 초래된다. Gamete 상태로 변하는 현상의 예를 보면 세포의 분열이 G₁ 단계

에서 중지되고(Hartwell 1974; Hartwell and Unger 1977), 세포의 크기가 커지고 모양이 변형("shmoo"라 일컬음)되며(Hartwell 1967; Levi 1956), 세포 표면에 응집원이 축적되고(Betz *et al.*, 1978; Terrance and Lipke 1981), mating에 필요한 유전자들의 transcription이 증가되는 것 등이다(Baffi *et al.*, 1984; Hagen *et al.*, 1986). 이러한 변화를 mating pheromone에 대한 반응이라 설명하였고, 이 반응 등은 mating pheromone에 의해 유발된 신호가 세포내에 전달되어 유전자를 발현되는 것으로 생각하고 있다.

효모의 mating과정은 비교적 오래 전부터 활발한 연구가 진행되었는데, Mackay 와 Manney (1974)는 mating 과정을 수행할 수 없는 돌연변이를 분리, 분석하여 mating 과정에 영향을 미치는 여러 유전자들을 처음으로 확인하였다. Hartwell (1980)은

mating factor에 대해 반응을 보이지 않는 돌연변이를 얻으므로써 신호전달과정에 관여하는 유전자를 밝힐 수 있는 기초를 마련하였다. 그후 유사한 실험과정을 거쳐 mating 과정에 관여하는 여러 유전자들이 보고되었는데 이들 유전자 산물들은 작용기능에 따라 크게 2가지로 구분된다; 하나는 신호전달과정의 전달물질로 작용하는 것이며, 다른 것은 신호 유발물질인 pheromone 생성에 관여하는 것들이다. 신호전달과정에 관여하는 유전자들은 *GPA1* (*SCG1/CDC70*), *BAR1*, *SST2*, *END1*, *END2*, *STE2*, *STE3*, *STE4*, *STE5*, *STE7*, *STE11*, *STE12*, *STE18* 로 보고되고 있으며 pheromone 생성 및 분해에 관여하는 유전자에는 *MFa*, *MF α* , *KEX1*, *KEX2*, *STE6*, *STE13*, *STE14* 등으로 보고되고 있다 (Thorner 1981; Herskowitz and Oshima 1981; Cross *et al.*, 1988). 효모의 pheromone 신호전달과정은 포유동물의 G protein에 의해 전달되는 신호전달체제와 구조적으로 유사한데, 효모의 pheromone 신호는 G 단백질을 이차 신호전달물질로 이용하여 전달한다는 보고가 있다 (Jahng *et al.*, 1988; Dietzel and Kurjan 1987; Miyajima *et al.*, 1987; Reneka *et al.*, 1988).

효모의 접합과정에서 pheromone에 의한 신호를 전달하는 물질인 G 단백질의 subunit는 유전자 *GPA1* (*SCG1* 또는 *CDC70* 이라고도 명명되었음)에 의해 coding 된다 (Miyajima *et al.*, 1987; Dietzel and Kurjan 1987; Jahng *et al.*, 1988). *cdc70-5* 돌연변이는 Jahng 등 (1988)에 의해 mating 과정에서 수용체 단백질을 coding하는 유전자인 *ste2⁻*가 결여된 a형 세포에 자외선을 처리하여 mating 능력을 갖게된 a형 세포로부터 분리되었는데, 이 결과에 의하여 pheromone에 의한 신호의 흐름이 수용체와 G protein을 통하여 전달된다는 사실을 인식하게 되었다 (Jahng *et al.*, 1988). 즉, pheromone 신호는 G 단백질을 거쳐 mating에 필요한 여러가지 유전자로 전달되는데 이 물질은 신호전달과정의 전반부에 존재함이 알려졌다. 따라서 신호전달과정에서 G 단백질 이후에 관여하는 유전자에 대한 정보를 얻기 위하여 돌연변이 *cdc70-5*에 대한 억제돌연변이를 분리하였다.

본 연구는 pseudo-reversion 방법 (Jarvik & Bostein, 1975)을 이용하여 *cdc70* 돌연변이를 억제할 수

있는 또 다른 돌연변이를 획득하여 분석함으로써, 효모의 mating pheromone에 의한 세포내 신호를 전달하는 물질을 coding 하거나 조절하는 유전자에 대한 정보를 얻고자 시도 하였다. 즉 여기서 만들어진 15 mutants, *cdc70* 돌연변이의 억제돌연변이를 분리한 후 이중 mating이 안되거나 포자형성이 안되는 세개를 제외한 나머지 12 개의 억제돌연변이의 연관군을 결정하였다.

材料 및 方法

사용된 효모 균주 및 배지: 사용된 효모 균주는 표-1에 나타나 있으며 균주 A14-3로부터 획득한 억제돌연변이주들은 개별적으로 기록하지 않았으며, mating type을 조사하는데 사용된 262a 및 262 α , 그리고 mating pheromone 생성여부를 조사하는데 이용된 y330 (*MAT α* , *bar1*)을 제외한 모든 효모 균주는 야생형인 381G 계열균주와 동일 계열이다. 일반적인 균주의 배양과 보관, mating type 조사, 영양요구성 조사, 포자형성 및 사포자분석에 사용된 배지는 주로 Mortimer and Hawthorn(1969) 및 Sherman 등(1982)의 방법에 따랐다.

유전학적 분석: 포자형성, mating type 결정, 유전자형 결정, 및 사포자분석(tetrad analysis)등은 Mortimer와 Hawthorne (1969)의 방법에 따랐다.

돌연변이 유발: YEPD (yeast extract, 10gm/l; peptone, 20gm/l; dextrose, 20gm/l; agar-액체배지에서는 제외함- 20gm/l) 액체 배지에서 대수증식기 상태로 자란 균주 A14-3 (*MAT α* , *cdc70-5*)의 세포 (2×10^6 cells/ml)를 YEPD 평판 배지에 도말한 후 254 nm의 자외선 (7,750 C J/ sec m²)을 10초 동안 - 이 상태에서 세포사멸율은 약 50% - 조사 한 후, YEPD 평판배지에 빛을 차단시킨 상태로 colony가 형성될 수 있도록 실온 (23°C)에서 3일 동안 배양하였다. Colony가 형성된 plate를 새로운 YEPD 평판 배지에 replica plating 한 후 38°C에서 24시간 동안 배양시켜 colony를 형성하는 균주만 선별하였다.

***sir⁻* 및 *mata2⁻* 돌연변이 배제:** 새로이 형성된 억제돌연변이는 α -형 세포의 표현형만을 나타내며 *cdc70-5*의 표현형 또한 a/ α 세포에서는 발현되지 않는다 (Jahng *et al.*, 1988). 따라서 38°C에서 성장한 돌연변이 중 signal transducer 와 직접적으로 관

런이 없는 유전자들인 *sir⁻* 및 *mata2⁻* 돌연변이를 배제시키기 위하여 a/α 의 표현형이 발현되는 균주, 즉 mating pheromone을 생성하지 못하는 균주들은 일차적으로 제외하였다. 이를 위해서 y330 균주를 이용하였으며 이 균주는 *bar1⁻* 돌연변이를 포함하고 있어서 α -factor에 과민한 균주로 보고된 바 있다 (Chan and Otte 1982a, 1982b). YEPD 액체 배지에서 자란 대수증식기 상태의 세포를 YEPD 평판 배지에 2×10^7 cells/ml 정도 도말하여 실온(23°C)에서 lawn을 형성할 수 있도록 24시간 동안 배양한 후 이를 분리된 돌연변이주와 함께 동시에 새로운 YEPD 평판배지에 replica plating하여 34°C에서 배양하였다.

돌연변이주와 유전자 CDC70과의 연관여부 조사
: *cdc70-5* 표현형을 억제하는 돌연변이가 일어난 유전자와 효모에서 G-protein의 α -subunit를 coding하는 유전자인 *CDC70*과 연관여부를 조사하고, 또한 이 억제돌연변이들이 extragenic 돌연변이인지, intragenic 돌연변이인지를 확인하기 위하여, 새로이 얻은 억제돌연변이주들과 *CDC70* 유전자를 갖는 야생형균주인 381Ga6와 유성교배를 하였다. 이렇게 하여 얻어진 diploids를 사포자분석을 통하여 온도 감수성을 여부를 조사하였다(Mortimer and Hawthorne 1969). 사포자분석은 네개의 포자들이 보이는 heterozygous한 marker의 분리양상을 분석하는 것으로 두 유전자 사이 또는 동일한 유전자의 염색체사이에 있는 두 marker사이의 연관에 관한 정보를 얻을 수 있다. 즉, 형질이 다른 두개의 균주를 교배시켜 diploids를 만들어 분석하면 세가지의 ascus type을 볼 수 있다. 가령, cross-over가 일어나지 않았다면 asc이는 모두 parental ditype (PD ; AB, AB, ab, ab)으로 재조합형은 존재하지 않음을 보여주며, cross-over가 한 번 일어나면 tetra type (TT ; AB, Ab, aB, ab) 재조합형과 비조합형이 2 : 2로 존재)이 생긴다. 반면에 multiple하게 cross-over가 일어나면 non-parental ditype (NPD ; Ab, Ab, aB, aB) 재조합형만 존재)이 형성된다. 여기에서 PD ; NPD ; TT의 출현빈도는 두 유전자상의 연관관계를 반영하는 것으로 유전자 지도의 지표가 된다.

연관군 결정 : 분리된 억제돌연변이주들이 어느 유전자에서 유발되었는지, 그리고 유전자 종류는 몇가지나 되는지를 알아보기 위하여, 억제돌연변이

균주들 간에 유성교배를 하여 diploid를 형성한 후 사포자분석을 통해서 유전자 상호간의 연관 여부를 확인하였다. 이 과정에서 mating efficiency가 낮은 돌연변이들이 존재함을 알 수 있었는데 이와같이 mating이 낮은 빈도로 이루어지는 균주들 간의 접합은 원형질채용합 방식(Rose *et al.*, 1986)을 이용하여 diploid 세포를 얻어 분석하였다.

結果 및 考察

진핵 세포에서 수용체에 의한 신호 전달 과정과 같은 복잡한 생명현상 연구를 위한 재료로써 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)는 여러가지 유리한 점들이 있다. 이 중에서도 유전학적 분석 방법과 분자 생물학적 분석 방법을 접목할 수 있는 잇점이 있어 생명현상을 분자적 수준에서 설명이 가능하다. 특히, 효모의 mating pheromone system은 진핵 생물 중 자극원으로서 pheromone 과 수용체에 대하여 돌연변이를 이용한 유전학적 분석이 이루어져 있으며, 또한 이들을 coding 하는 유전자들이 분리되어 보고된 바 있다(Thorner 1981 ; Herskowitz and Oshima 1981).

효모의 mating 과정에 관여하는 유전자를 연구하기 위하여 Mackay와 Manney (1974) 등은 mating을 수행할 수 없는 돌연변이를 분리한 후 유전학적 분석을 실시하여 얻은 결과 mating 과정에 적어도 6가지 이상의 유전자들이 관여한다는 사실을 알았다. 이는 mating 과정이 상당히 복잡한 단계를 거쳐 이루어짐을 암시한다. 그후 Hartwell (1980)은 같은 목적으로 mating pheromone에 대한 반응을 보이지 않는 온도감수성 돌연변이를 분리, 분석하여 mating 과정에 관여하는 유전자를 보고하였다. 그러나 이들이 보고한 유전자 중에서 pheromone에 의한 신호를 직접 전달하는 매체를 coding하는 것은 pheromone 수용체 역할을 하는 *STE2* (α factor receptor ; Nakayama *et al.*, 1985, Burkholder and Hartwell 1985)와 *STE3* (α factor receptor ; Nakayama *et al.*, 1985, Hagen *et al.*, 1986) 그리고 G 단백질의 β 와 γ subunit을 각각 coding하는 *STE4*와 *STE18*등이 보고되었다(Whiteway *et al.*, 1989). 한편 pheromone의 신호를 전달하는 매체에 관한 지식을 얻고자 서로 다른 접근방법을 이용하여 3

개의 연구실에서 거의 동시에 동일한 유전자를 cloning하였는데 그 유전자는 *GPA1* (*SCG1* 또는 *CDC70*)으로, 고등동물에서 hormone 등의 신호전달물질로 광범위하게 이용되고 있는 G 단백질의 α subunit와 유사한 단백질을 coding하는 유전자로 알려졌다 (Miyajima *et al.*, 1987; Dietzel and Kurjan 1987; Jahng *et al.*, 1988). 특히, Jahng 등(1988)이 효모의 mating 과정에 관여하는 유전자에 대해 밝힌 것에 의하면 α -factor를 수용하는 수용체 단백질을 coding하는 유전자 *STE2*가 결여된 a-형 효모세포에 돌연변이를 유발시켜 *STE2* 결여를 억제할 수 있는, 즉 α -factor 수용체 단백질이 없는데도 불구하고 mating을 할 수 있는 a-형 세포 돌연변이를 획득하였다 (Jahng *et al.*, 1988; Reed *et al.*, 1988). 이 실험에서 얻은 돌연변이는 complementation test 와 linkage analysis를 통하여 분석한 결과 3 group의 유전자 (*CDC70*, *CDC72*, *CDC73* 이라 명명함)에 속하였으며 이들 돌연변이의 형태적 특징은 세포분열이 G-1 단계에서 중지되고 모양이 shmoo 형이었다. 또한 돌연변이는 수용체 단백질을 coding하는 유전자인 *ste2*가 결여된 세포가 mating을 할 수 있게 되었다. 돌연변이는 *ste2* 결여를 억제할 수 있었다. 이들 돌연변이가 mating 과정에서 수용체 단백질을 우회하여 mating 과정을 완료한다고 해석할 수 있기 때문에 유전자는 mating 과정에서 수용체 단백질 (*ste2* 생성물)에 의한 신호를 받아 전달한다고 풀이할 수 있다. 유전자 *CDC70*을 효모의 genomic library로부터 cloning 하여 DNA의 restriction 지도, linkage analysis sequence 등을 통해서 분석한 결과 *CDC70*은 G 단백질의 α -subunit를 coding하는 유전자라는 사실을 알았으며 이를 토대로 효모의 pheromone에 의한 세포내 신호전달 과정에 관한 가설을 제시한 바 있다 (Jahng *et al.*, 1988).

cdc70-5 돌연변이의 억제돌연변이의 분리 : 효모의 세포내 신호전달과정에 관여하는 유전자 *CDC70*에 돌연변이가 일어난 균주 A14-3(*Mata*, *cdc70-5*)에 UV를 처리해서 돌연변이 *cdc70-5*를 억제할 수 있는 억제돌연변이를 획득하였다. 돌연변이 *cdc70-5* 표현형의 특징 중 하나가 a/ α 세포에서는 발현되지 않는 것으로 보고된 바 있으므로 (Miyajima *et al.*, 1987; Jahng *et al.*, 1988), 만약 억제돌연변이중 a/ α 의

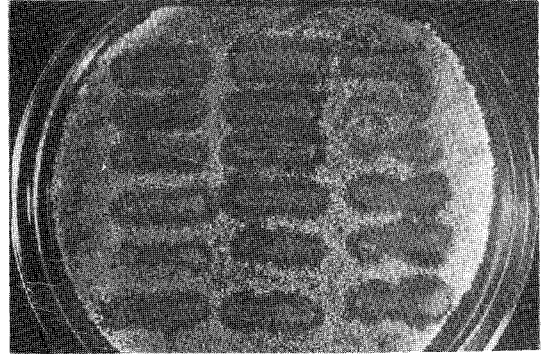


Fig. 1. Representative strains of mutation showing growth-inhibition zone around their colonies.

표현형으로 발현되는 돌연변이가 형성되면, signal transducers와 직접 관련이 없고 mating type에 영향을 주는 유전자에 돌연변이가 일어났을 가능성이 있으므로 이런 종류의 돌연변이는 배제시켰다. 효모의 3번 염색체에 위치하는 *HMRa* 유전자(Homothallic yeast에서 mating type이 switch되는데 쓰이는 유전자)는 정상적인 상태에서는 발현되지 않지만 이를 억제하고 있는 유전자인 *SIR1*, *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*에서 돌연변이가 일어나면 *HMRa*가 발현되기 때문에 a/ α 상태로 된다 (Rine *et al.*, 1979). 또한 효모의 mating type은 유전자 *MAT*에 의해서 지배되어 a-형 세포에서는 *MATa*가 존재한다. *MATa*에는 *MATa1*과 *MATa2* 두가지 complementation group이 존재한다. 만약 *MATa2*에 돌연변이가 일어나면 a형 표현형이 동시에 발현되므로 *mata2⁻*와 같은 돌연변이를 배제시켰다. 이를 위해서 균주 y330을 이용하였는데 y330은 유전자 *BAR1*에 돌연변이가 일어나서 α -factor에 과민한 성질을 보이고 있어 정상적으로 α -factor를 분비하는 a-형 세포 주변에서는 세포분열이 일어나지 않는다 (Hicks and Herskowitz 1981). 만약 돌연변이가 *sir⁻*, *mata2⁻* 이라면 a/ α 형 표현형이 발현되므로 α -factor를 분비하지 못하게 되고, 따라서 colony 주위에 zone이 형성되는 균주만을 선별하였다 (그림 1). 새로이 얻은 억제돌연변이주는 pheromone 신호전달과는 직접적으로 관계가 없는 *sir⁻*나 *mata2⁻* 돌연변이를 배제하였으며 *cdc70-5* 표현형인 온도감수성(temperature sensitivity)을 억제하여 38°C에서 세포분열과 세포생장이 이루어져 정상적으로 출아를 하였다(그림 2).

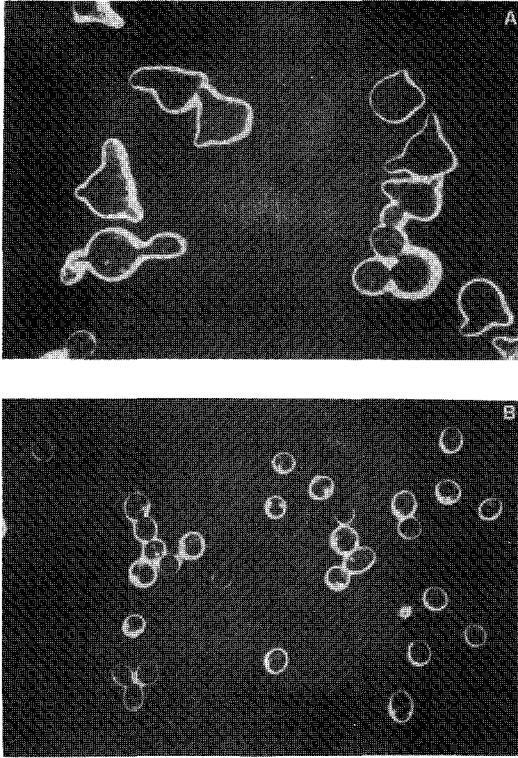


Fig. 2. Cellular morphology of the haploid cells bearing suppressor of *cdc70-5* mutation. Cells were observed with phase contrast optics; a) 6 hours incubated cells of *cdc70-5* after temperature shift to 38°C and b) Incubated for 24 hours at 38°C, suppressor of *cdc70-5*.

그러나 억제돌연변이(*sga*)주들은 실험과정에서 대부분이 야생형에 비해 현저히 감소된 mating efficiency를 보여주는 것으로 미루어 억제돌연변이가 일어난 유전자들은 mating 과정에 관여하는 것으로 사료된다. 왜냐하면 만약 pheromone 신호를 전달하는 유전자에 돌연변이가 일어났다면 당연히 mating이 영향을 받을 것이기 때문이다.

돌연변이 세포의 특징 : *cdc70-5* 돌연변이의 haploid 세포의 형태적 특징은 온도감수성 돌연변이이며 높은 온도(38°C)에서는 세포분열이 G1 단계에서 중단되어 모양은 shmoos 형이며(Jahng *et al.*, 1988), diploid 세포에서는 돌연변이 표현형이 발현되지 않는 haploid-specific 유전자로 보고되었다(Jahng *et al.*, 1988). 본 실험에서 얻어진 *cdc70-5*의 표현형을 억제하는 돌연변이주들은 38°C에서 세포 모양이 shmoos인 *cdc70-5* 돌연변이의 표현형인 온도감수성을 억제하는 것으로 그림 2에서 보는 바와 같이 정상적으로 출아(budding)를 하고 있으며 대부분이 야생형에 비하여 mating efficiency가 감소된 현상을 보였다. 특히 *SGA2*와 *SGA4*에 속하는 돌연변이주들의 mating efficiency는 야생형에 비해 0.001% 미만으로 조사되었다. 이들이 보여주는 낮은 빈도의 mating efficiency는 이들 유전자가 pheromone 신호전달 과정에 관여하리라는 점을 강하게 시사한다.

돌연변이주와 CDC70 유전자 사이의 연관여부

Table I. Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype*	Source
381Ga6	<i>MATa ade6 his4 lys2 trp1 tyr1</i>	L. Hartwell
381Ga2	<i>MATa ade2 his4 lys2 trp1 tyr1</i>	L. Hartwell
381Ga6	<i>MATa ade6 his4 lys2 trp1 tyr1</i>	L. Hartwell
381Ga2	<i>MATa ade2 his4 lys2 trp1 tyr1</i>	L. Hartwell
A14-3	<i>MATa cdc70-5 ade2 his4 lys2 trp1 tyr1</i>	K. Y. JAHNG
A14-1	<i>MATa cdc70-5 ade6 his4 lys2 trp1 tyr1</i>	K. Y. JAHNG
y330	<i>MATa ade2 bar1 cry1 lys1 trp1 tyr1 ura3</i>	S. I. Reed
262a	<i>MATa hom3 thr1</i>	S. I. Reed
262a	<i>MATa hom3 thr1</i>	S. I. Reed

*Gene symbols indicate mutations leading to requirements for the following : *ade* (Adenine requiring), *his* (Histamine requiring), *hom* (Homoserine requiring), *leu* (Leucine requiring), *lys* (Lysine requiring), *thr* (Threonine requiring), *trp* (Tryptophan requiring), *tyr* (Tyrosine requiring), *ura* (Uracil requiring).

Additional symbols include the following : *bar* (Barrier deficient), *cdc* (Cell Division Cycle blocked at high temperature), *cry* (Cryptopleurine resistance), *MAT* (Mating type locus), *ste* (Sterile)

Table II. Linkage analysis between mutation locus and CDC70.

Cross	Ascus type		
	PD ^a	NPD ^b	TT ^c
<i>MAT cdc70-5 mutx</i>	<i>cdc70-5 mutx</i> (ts ⁺)	<i>cdc70-5 MUT</i> (ts ⁻)	<i>cdc70-5 mutx</i> (ts ⁺)
x	<i>cdc70-5 mutx</i> (ts ⁻)	<i>cdc70-5 MUT</i> (ts ⁻)	<i>cdc70-5 MUT</i> (ts ⁻)
<i>MATa CDC70</i>	<i>CDC70 MUT</i> (ts ⁺)	<i>CDC70 mutx</i> (ts ⁻)	<i>CDC70 mutx</i> (ts ⁺)
	<i>CDC70 MUT</i> (ts ⁺)	<i>CDC70 mutx</i> (ts ⁻)	<i>CDC70 MUT</i> (ts ⁺)
Number of observed tetrads			
mut11	4	3	3
mut14		1	4
mut16	4		3
mut42	5	1	6
mut48	2	2	5
mut91	2	9	6
mut209		1	4
mut210	4		4
mut223	2	1	10
mut225		3	9
mut234			5
mut249	3	4	7
mut251	4	4	5
mut275	1	8	8
mut278			2

^aPD: Parental Ditype, ^bNPD: Non-Parental Ditype, ^cTT: Tetra Type.

조사 : 분리된 돌연변이 *cdc70-5*의 억제돌연변이 유전자가 유전자 *CDC70*과 연관이 되었는지 여부를 조사하기 위해 사포자분석을 행하였다(표-2). 분리된 억제돌연변이주들과 381Ga6(*MATa*, *CDC70*)를 접합하여 diploid를 얻어 포자를 형성시킨 후 사포자 분석을 실시한 결과 tetrad type이 PD, NPD 과 TT로 나타났다. 만약 분리된 15 개의 돌연변이 균주들이 *CDC70* 유전자와 연관되어 있다면 사포자 분석 결과 PD만 나타나게 될 것이다. 그러나 표 2에서 보여지는 바와 같이 각 돌연변이주마다 PD, NPD, TT이 나타나므로 분리된 돌연변이주들은 *CDC70* 유전자와 연관되어 있지않은 다른 유전자에서 돌연변이가 유발되었음을 알 수 있었다.

돌연변이주의 연관군 결정 : 분리된 15개의 돌연변이 균주 중 mutation loci 사이의 연관여부를 알아보기 위해 mating이 낮은 빈도이지만 이루어지

거나 또는 원형질체융합을 통하여 분석이 가능한 12개의 균주들을 분석한 결과 4 개의 group 으로 나누었는데 이들을 *sga1* (suppressor of G-protein-subunit), *sga2*, *sga3*, *sga4*라 명명하였다. *sga1*에 속하는 균주들 사이에서의 온도감수성을 이용한 사포자 분석 결과 *sga1* group 내에서는 서로 연관되어 있음을 알 수 있었다. *sga2*, *sga3*, *sga4* group 에 속하는 균주들 역시 사포자분석 결과 PD 만을 나타냄으로 해서 각 group 내에서는 서로 연관되어 있음을 알 수 있었다. 한편 *sga1*에 속하는 돌연변이 균주와 *sga2* group에 속하는 돌연변이 균주 사이의 사포자분석을 행한 결과 서로 연관되어있지 않음을 알 수 있었고 *sga2* group 과 *sga3* group, *sga3* group 과 *sga4* group, *sga4* group과 *sga1* group 사이에서도 역시 연관되어있지 않음을 알 수 있었다(표 3). 각 돌연변이 균주사이의 연관여부를 compleme-

Table III. Linkage analysis between mutation loci.

Cross	Ascus type		
	PD	NPD	TT
<i>cdc70-5</i> mutx1	<i>cdc70-5</i> mutx1 + (ts ⁺)	<i>cdc70-5</i> mutx1 mutx2 (ts ⁺)	<i>cdc70-5</i> mutx1 mutx2 (ts ⁺)
x	<i>cdc70-5</i> mutx1 + (ts ⁺)	<i>cdc70-5</i> mutx1 mutx2 (ts ⁺)	<i>cdc70-5</i> mutx1 + (ts ⁻)
<i>cdc70-5</i> mutx2	<i>cdc70-5</i> + mutx2 (ts ⁺)	<i>cdc70-5</i> + + (ts ⁻)	<i>cdc70-5</i> + mutx2 (ts ⁺)
	<i>cdc70-5</i> + mutx2 (ts ⁺)	<i>cdc70-5</i> + + (ts ⁻)	<i>cdc70-5</i> + + (ts ⁻)
Number of observed tetrads			
mut14-2d (<i>cdc70-5 sga1-1</i>)			
x mut14-3b (<i>cdc70-5 sga1-1</i>)	17		
mut14-2d (<i>cdc70-5 sga1-1</i>)			
x mut11-8d (<i>cdc70-5 sga2-1</i>)	3	2	6
mut14-2b (<i>cdc70-5 sga1-1</i>)			
x mut48-5b (<i>cdc70-5 sga3-1</i>)	4	6	10
mut14-2b (<i>cdc70-5 sga1-1</i>)			
x mut16-6a (<i>cdc70-5 sga4-1</i>)		5	4
mut11-17a (<i>cdc70-5 sga2-1</i>)			
x mut42-6a (<i>cdc70-5 sga2-2</i>)	12		
mut11-18d (<i>cdc70-5 sga2-1</i>)			
x mut48-1d (<i>cdc70-5 sga3-1</i>)	5	2	10
mut11-17a (<i>cdc70-5 sga2-1</i>)			
x mut16-6c (<i>cdc70-5 sga4-1</i>)		9	1
mut48-1d (<i>cdc70-5 sga3-1</i>)			
x mut48-5b (<i>cdc70-5 sga3-1</i>)	15		
mut48-1d (<i>cdc70-5 sga3-1</i>)			
x mut249-9b (<i>cdc70-5 sga3-2</i>)	14		
mut249-9c (<i>cdc70-5 sga3-2</i>)			
x mut16-6c (<i>cdc70-5 sga4-1</i>)		14	2
mut16-5a (<i>cdc70-5 sga4-1</i>)			
x mut16-6a (<i>cdc70-5 sga4-1</i>)	15		

ntation test 를 통하여 조사한 결과, 돌연변이의 연관군을 결정하였다 (표 4). 분리된 돌연변이들은 4 개의 group 으로 나뉘어졌으며 *sga1*, *sga2*, *sga3*, *sga4* group 들은 서로 다른 위치에서 돌연변이가 유발되었음을 시사한다.

분리된 15군주의 역제돌연변이중 나머지 3개의 돌연변이군주는 mating 이 이루어지지 않았고, 또한 원형질체융합에 의해 얻어진 diploid 들이 포자를 형성하지 못하였기 때문에 사포자분석을 행하지 못하였다. 이들이 mating 을 수행하지 못하는 이유를 현재의 실험결과로는 정확하게 설명할 수는 없지만 이를 설명할 수 있는 몇가지 가능성은 존재한다. 즉,

mating 과정에서 pheromone 에 대한 반응이 나타나면 세포간의 융합이 일어나고 (cell fusion), 이어서 핵간의 융합 (nuclear fusion) 이 이루어져 diploid 가 형성되는데 이 돌연변이들은 이 과정에 관여하는 유전자에서 변화가 생겼을 가능성을 배제할 수 없다. 또 다른 가능성은 만약 돌연변이가 일어난 유전자가 포자 형성 과정에 관여하는 것이라면 diploid 가 형성되었다더라도 정상적인 포자형성이 일어나지 않을 것이다. 세포융합이나 핵융합에 관여하는 유전자에 대한 보고는 이미 몇 차례 있었는데 *AGa1* (Suzuki and Yanagishima, 1985), *FUS1* 및 *FUS2* (Trueheart et al., 1987), *KAR1* (Rose and Fink, 1987), *TUB2*

Table IV. Complementation group of mutations.

Strain #	14-3b	210-10d	278-4d	11-17a	42-3d	223-7b	225-13a	275-6d	48-5b	249-9b	16-6a	234-12d
Locus (strain #)												
<i>sga1-1</i> (14-2b)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sga1-2</i> (210-18a)	-	NT ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sga1-3</i> (278-4c)	-	-	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>sga2-1</i> (11-8d)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>sga2-2</i> (42-6a)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>sga2-3</i> (223-7d)	+	+	+	-	-	-	-	-	NT	NT	+	+
<i>ga2-4</i> (225-11a)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>sga2-5</i> (275-6c)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>sga3-1</i> (48-1d)	+	+	+	+	+	NT	+	+	-	-	+	+
<i>sga3-2</i> (249-9c)	+	+	+	+	+	NT	+	+	-	-	+	+
<i>sga4-1</i> (16-5a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>sga4-2</i> (234-12b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

^aNT : Not Tested

(Thomas *et al.*, 1986) 등을 예로 들 수 있다. 특히 본 실험에서 분리된 억제돌연변이주들의 공통적인 표현형의 하나는 전반적으로 야생형과 mating을 시켰을 때보다 돌연변이들끼리 mating을 시켰을 때가 훨씬 낮은 mating efficiency를 보이는데 이는 *fus1* 또는 *fus2* 돌연변이의 표현형과 유사함을 보인다 (Trueheart *et al.*, 1987).

본 실험에서 분리된 *sga* 돌연변이는 pheromone 신호전달과정에 관여하리라 생각되지만 이들 유전자에 대한 생화학적 분석이 이루어지지 않아 이들의 역할과 기능에 관한 정보는 밝히지 못했으며, 4개 연관군(*SGA1*, *SGA2*, *SGA3*, *SGA4*)중 *SGA4*에 속하는 억제돌연변이 *sga4-2*를 이용하여 현재 cloning과정을 수행중인데, 이 돌연변이를 택해서 cloning을 하는 이유는 이 돌연변이 표현형이 낮은 빈도의 mating efficiency를 보여주기 때문이다. mating efficiency가 낮다는 것은 이 유전자가 mating 과정에 관여하리라는 가능성을 증가시킨다. 따라서 앞으로 유전학적, 생화학적 및 분자생물학적 분석이 진행되면 효모의 mating과정 및 신호전달과정을 규명하는데 보탬이 되리라 확신한다.

nal을 전달하는 물질을 coding 하거나 조절할 수 있는 유전자에 대한 정보를 얻기 위해서 효모에서 G-protein의 α -subunit를 coding 하는 유전자 *CDC70*에 돌연변이가 일어난 균주 A14-3(*MAT α* , *cdc70-5*)에 UV를 조사하여 돌연변이 *cdc70-5*를 억제할 수 있는 또 다른 돌연변이를 획득하였다. 돌연변이 *cdc70-5*의 표현형은 온도 감수성 (temperature sensitivity)이며, 38°C에서 배양하면 세포주기가 G1에서 정지되고 shmoo모양을 보인다. 균주 A14-3에 UV를 조사하였을 때 38°C에서 colony를 형성할 수 있고 세포분열이 정상적으로 진행되어 출아를 하고 있다는 것은 새로운 돌연변이가 *cdc70-5*의 표현형을 억제한다는 사실을 의미한다. 이러한 억제돌연변이 중 signal transducer와 직접적으로 관련이 없는 유전자들인 *sir⁻* 및 *mata2⁻* 돌연변이를 배제한 다음 선택된 15개의 돌연변이들을 중심으로 분석을 행하였다. 어느 유전자에서 유발 되었는지 그리고 유전자 종류는 몇 가지나 되는지를 알기 위하여 tetrad analysis를 통해 연관여부를 조사하여 분리된 15개의 돌연변이중 12개는 4개의 연관군 (*sga1*, *sga2*, *sga3*, *sga4*)에 속함을 알았다.

摘 要

효모의 mating pheromone에 의한 세포내 sig-

謝 辭

본 연구는 1989년 문교부 학술 연구 조성비의 일부로 수행되었음.

参考文献

- Baffi, R. A., Shenbagamurthi, P., Terrance, K., Becker, J. M., Naider, F. and Lipke, P. N. (1984): Different structure-function relationships for α -factor-induced morphogenesis and agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **158**: 1152-1156.
- Betz, R., Duntze, W. and Manney, T. R. (1978): Mating factor-mediated sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **4**: 107.
- Bucking-Throm, Duntze, W., Hartwell, L. H. and Manney, T. R. (1973): Reversible arrest of haploid yeast cells at the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor. *Exp. Cell Res.* **76**: 99-110.
- Burkholder, A. C. and Hartwell, L. H. (1985): The yeast α -factor receptor: Structural properties deduced from the sequence of the *STE2* gene. *Nuc. Acids Res.* **13**: 8464-8475.
- Chan, R. K. and Otte, C. A. (1982a): Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by α -factor and α -factor pheromone. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 21-29.
- Chan, R. K. and Otte, C. A. (1982b): Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by α -factor and α -factor pheromone. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 11-20.
- Clark, K. L. and Sprague, G. F. (1989): Yeast pheromone Pathway : Characterization of a suppressor that restores mating to receptorless mutants. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2682.
- Cross, F., Hartwell, L. H., Jackson, C. and Konopka, J. B. (1988): Conjugation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**: 429-457.
- Dietzel, C. and Kurjan, J. (1987): The yeast *SCG1* gene : a G α -like protein implicated in the α - and α -factor response pathway. *Cell.* **50**: 1001-1010.
- Hagen, D. C., McCarffrey, G. and Sprague, G. F. (1986): Evidence the yeast *STE3* gene encodes a receptor for the peptide pheromone α -factor: Gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1418-1422.
- Hartwell, L. H. (1967): Macromolecule synthesis in temperature sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* **93**: 1662-1670.
- Hartwell, L. H. (1974): *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* **38**: 164-198.
- Hartwell, L. H. (1980): Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. *J. Cell. Biol.* **85**: 811-822.
- Hartwell, L. H. and Unger, M. W. (1977): Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J. Cell. Biol.* **75**: 422-435.
- Herskowitz, I. and Oshima, Y. (1981): Control of the cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: Mating and mating-type interconversion, pp 181-209. In Strathern, J. N., Jones, E. W. and Broach, J. R. (ed.). *Molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor, New York.
- Hicks, J. B. and Herskowitz, I. (1981): Evidence for a new diffusible element of mating pheromones in yeast. *Nature* **260**: 246.
- Jahng, K. Y. (1988) Studies on the Start Genes in the Control of Cell Cycle and Mating Processes in *Saccharomyces cerevisiae*. A thesis for Ph.D. degree in Microbiology, Seoul National university.
- Jahng, Kwang-Yeop., Ferguson, J. and Reed, S. I. (1988) Mutations in a gene encoding the α -subunit of *Saccharomyces cerevisiae* G protein indicate a role in mating pheromone signalling. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2484-2493.
- Jarvik, J. and Botstein, D. (1975): Conditional-lethal mutations that suppress genetic defects in morphogenesis by altering structural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 2738-2742.
- Levi, J. D. (1956): Mating reaction in yeast. *Nature* **177**: 753-754.
- MacKay, V. and Manney, T. R. (1974); Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and phenotypic characterization of nonmating mutants. *Genetics* **76**: 255-271.
- Miyajima, I., Nakafuku, M., Nakayama, N., Brenner, C., Miyajima, A., Kaibuchi, K., Arai, K., Kaziro, Y. and Matsumoto, K. (1987) *GPA1*, a haploid-specific essential gene, encode a yeast homolog of mammalian G protein which maybe involved in mating factor signal transduction. *Cell.* **50**: 1011-1019.
- Mortimer, R. K. and Hawthorne, D. C. (1969): Yeast genetics, pp 385-460. In Rose, A. H. and Harrison, J. S. (ed.): *The Yeasts* vol. 1. Biology of Yeasts. Academic Press, London and New York.
- Nakayama, N., Miyajima, A. and Arai, K. (1985): Nucleotide sequence of *STE2* and *STE3*, cell type-specific sterile gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **4**: 2643-2648.

- Reed, S. I., Hadwiger, J. A. and Lorincz, A. T. (1985): Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene *CDC28*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 4055-4059.
- Reed, S. I., Ferguson, J. and Jahng, K.-Y. (1988): Isolation and Characterization of two genes encoding yeast mating pheromone signalling elements: *CDC72* and *CDC73*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **53**: 621-627.
- Reneke, J. E., Blumer, K. J., Courchesne, W. E. and Thorner, J. (1988): The carboxy-terminal segment of the yeast α -factor receptor is a regulatory domain. *Cell* **55**: 221-234.
- Rine, J., Strathern, J. N., Hicks, J. B. and Herskowitz, I. (1979): A suppressor of mating type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating type loci. *Genet.* **93**: 877-901.
- Rose, M. D., Price, B. R. and Fink, G. R. (1986): *Saccharomyces cerevisiae* nuclear fusion requires prior activation by factor. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3490-3497.
- Rose, M. D. and Fink, G. R. (1987): *KAR1*, a gene required for function both intranuclear and extramicrotubules in yeast. *Cell* **48**: 1047-1060.
- Sherman, F., Fink, G. R. and Hicks, J. B. (1982): *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Strathern, J., Hicks, J. and Herskowitz, I. (1981): Control of cell type in yeast by the mating type locus. The $\alpha 1$ - $\alpha 2$ hypothesis. *J. Mol. Biol.* **147**: 357-372.
- Suzuki, K. and Yanagishima, N. (1985): An α -mating type-specific mutation causing specific defect in sexual agglutinability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **9**: 185-189.
- Terrance, K. and Lipke, P.N. (1981): Sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **148**: 889-896.
- Thomas, J. H., Novick, P. and Botstein, D. (1986): Genetics of the yeast cytoskeleton. In *Yeast Cell Biology*, ed. J. Hicks, pp.14-36. New York: Liss.
- Thorner, J. (1981): Pheromone regulation of development in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 143-180. In Strathern, J. N., Jones, E. W. and Broach, J. R. (ed.). *Molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor, New York
- Trueheart, J., Boeke, J.D. and Fink, G. R. (1987): Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2316-2328.
- Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D. Y., Bell, L., Saari, G. C., Grant, F. J., O'Hara, P. and Mackay, V. L. (1989): The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. *Cell* **56**: 467-477.

Accepted for Publication on December 6, 1991