

*Saccharomyces cerevisiae*의 10-nm Filament Ring의 생성기작에 대한 연구

김성철 · 정재욱 · 김형배

고려대학교 자연과학대학 생물공학과

*Saccharomyces cerevisiae*의 mother cell과 daughter cell의 연결부위의 원형질막 바로 안쪽에 존재하는 10-nm filament ring은 세포형태 형성과정에 중요한 역할을 하리라 간주되나 그 명확한 생성기작과 기능은 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 CDC12 유전자로부터 gene fusion technique을 이용하여 CDC12 단백질을 만들고 이로부터 항체를 형성하였다. 이 항체를 이용하여 10-nm filament ring의 생성기작과 기능에 대하여 연구하였다. 그 결과 CDC12 단백질은 cell cycle 전주기 동안 항상 전이되나 bud가 나오기 바로 직전에 bud가 나올 부위에 polymerization 되었다가 세포질 분열 바로 직후에 unpolymerization 되며 cytoskeletal element의 일종인 actin과는 무관하게 행동하는 것이 밝혀졌다. 이러한 10-nm filament는 bud가 나올 부위의 올바른 선정과 세포질 분열에 중요한 역할을 하리라 간주된다.

KEY WORDS □ *Saccharomyces cerevisiae*, CDC12, 10-nm filament ring, gene fusion

현대 생물학에서 가장 해결하고자 하는 문제 중의 하나는 cellular morphogenesis(세포 형태형성기작), 즉 세포가 분열을 할 때 어떻게 3차원적인 구조를 이루면서 그 나름대로 세포의 형태를 갖추어 가는가를 밝혀내는 일이라 할 수 있다. 이를 해결하기 위해서 yeast를 재료로 한 cytoskeletal element에 대한 연구(1, 7, 12, 14)와 세포 분열주기 돌연변이(*cdc mutant*)에 관한 연구는(3, 8, 9, 11, 15, 16) 세포 형태형성기작을 밝혀내는데 아주 적합한 연구로 여겨지고 있으며, *Saccharomyces cerevisiae*와 *Schizosaccharomyces pombe* 모두에서 활발히 진행되고 있다.

*S. cerevisiae*는 분열시에 아래와 같은 몇 단계의 뚜렷한 형태적인 변화를 나타내며 분열한다. 즉 i) bud가 나올 부위를 선정하고, ii) 그 부위의 세포벽에 chitin ring을 형성하고, iii) chitin ring이 형성된 부위에서 bud가 출현하며, iv) bud가 자라고, v) 핵이 daughter cell과 mother cell의 경계부위로 이동한 후 핵분열을 일으키며, vi) 그 후에 세포질 분열이 일어나 새로운 세포벽이 생겨서 두 개의 세포로 나뉘어지는 등 매우 뚜렷한 몇 단계의 형태형성학적 변화를 나타낸다(6, 20, 23). 다른 진핵세포에서 처럼 yeast에서도 cytoskeletal element인 microtubule과 actin(2, 4, 12, 13, 18)이 형태형성 과정에 중요한 역할을 하고 있으며, 또한 명백한 기능이 밝혀지지 않은 10-nm filament도 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다. 이 10-nm filament는 mother cell과 daughter cell의 연결부위의 세포막 바로 아래 존재하며(4, 5), 전자현미경을 이용한 관찰에 의하면 bud가 나올 때에 그 부위의 세포막 안쪽에 생겼다가 세포질 분열 전에

사라지는 것으로 알려졌다.

오늘날까지 밝혀진 yeast의 60여 가지 *cdc mutant* 중에서 *cdc3*, *cdc10*, *cdc11*과 *cdc12 mutant*는 temperature-sensitive mutant로서 22°C에서는 정상적으로 분열하며 10-nm filament ring을 갖고 있으나, 37°C에서는 이 ring이 소실되며 정상적인 분열을 하지 못하고 있다. 즉 이 mutant는 bud를 계속 만들어 내고, DNA합성과 핵분열을 계속하나, 세포질 분열이 일어나지 못하여서 비정상적으로 길게 자란 여러개의 bud와 여러 개의 핵을 가진 세포로 변하여 간다(11, 19). 위와 같은 관찰로 미루어 볼 때 10-nm filament는 정상적인 bud를 만드는 단계와 세포질 분열이 일어나는 단계에서 중요한 역할을 하는 듯하나 명확한 기능은 밝혀지지 않았다. Mutant에 대한 complement effect를 이용하여 *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12* 유전자가 clone 되었고 sequencing 되었으며(10) 이들 유전자로부터 발현되는 단백질을 조사하여 본 결과 10-nm filament의 구성분일 가능성이 많아졌다(15, 16). 그러나 10-nm filament에 대한 직접적인 연구는 전혀되어 있지 않은 상태이며 본 연구에서는 이에 관한 연구를 위하여 *CDC12* 유전자를 이용하였다. *CDC12* 유전자를 *E. coli*의 *lacZ* 및 *trpE* 유전자와 fusion 시킨 후 이들 생성물로부터 항체를 형성하였고 형광 현미경을 통하여 관찰하여 본 결과, *CDC12* 항체가 10-nm filament를 인식하는 것을 관찰하였다. 또한 10-nm filament ring이 bud가 생길 때에 형성되었다가 세포질 분열시에 사라지는데 이러한 과정이 mRNA의 on과 off의 문제인지 혹은 전이 후의 문제인지를 조사하기 위하여 동조배양과 *CDC12* 항체를

이용한 immunoblot을 통하여 조사하여 보았다. 이때에 actin도 10-nm filament ring과 동일하게 bud가 생길 부위에 모이는데 이들 두 cytoskeletal element들이 어떠한 연관 관계가 있는지 혹은 무관하게 행동하는지를 조사하여 보았다.

재료 및 방법

Plasmid, strain과 배양 방법

사용된 *Saccharomyces cerevisiae* strain은 C276, *MATa/MATa* wild type: JPTA 1493-H01, *MATa/MATa*, *cdc12-6/cdc12-6*; C276-4A, *MATa*이며, 이들은 glucose를 포함하고 있는 YM-1 medium에서 rotary shaker를 이용하여 키우며, 온도민감성 돌연변이는 22°C에서 약 $\sim 10^7$ cells/ml까지 키우다가 36°C로 옮겨서 키운다.

Plasmid pUR과 pATH vector는 J. Pringle 실험실에서 공급받았으며, 각각 *E. coli* strain, BMH71-18과 HB101을 이용하여 대량 생산을 하였다.

CDC12 유전자와 *E. coli lacZ* 유전자와 *trpE* 유전자와의 fusion

lacZ 유전자와 CDC12 유전자를 fusion하기 위해서는 pUR vector(21)를 사용하며, *trpE* 유전자와의 fusion을 위해서는 pATH vector(24)를 이용하여 fusion을 하였다. Fusion을 하기 위하여 필요한 recombinant-DNA technique이나 *E. coli* transformation에 관한 방법 등은 DNA clong 문헌에 있는 방법을 이용하였다 (22).

Fusion 단백질의 추출

pUR vector는 BMH71-18 strain에 transformation을 하고 pATH vector는 HB101 strain에 transformation하였다. Transformation 후에 37°C에서 키우면서 각각 IPTG와 IAA로 2시간 induce한 후 insoluble한 preparation으로 fusion 단백질을 추출하였다(15). Insoluble한 preparation을 위하여 50 ml의 *E. coli* 배양액을 12,000×g로 침전시킨 후 1 ml의 STE solution(25% sucrose, 25 mM Tris-pH 8.0, 1 mM EDTA)로 suspension 시킨다. 이곳에 100 μ l의 lysozyme(10 mg/ml)과 200 μ l의 NP-40(1%)를 가한 후에 sonication을 이용하여 cell을 부순다. 부어진 cell을 microcentrifuge를 이용하여 제침전 시킨 후 0.2% NP-40와 0.3 M NaCl로 두번 washing한 후 insoluble한 sample을 침전시켜서 얻는다.

항체형성

Insoluble preparation으로 분리된 fusion 단백질 0.5 ml과 Freund's complete adjuvant 0.5 ml을 섞은 후에 토끼에 subcutaneous로 injection하였다. Booster shot으로는 동일 양을 incomplete adjuvant에 섞어서 3주 간격으로 injection한 후 매 injection 10 일 후에 bleeding을 하여서 immunoblot을 이용하여 항체의 형성여부를 확인하였다. 항체형성 후에는 nitrocellulose paper에 붙어 있는 *trpE* fusion이나

lacZ fusion 단백질을 이용하여 서로 cross affinity purification(15, 16)을 하여서 이용하였다.

SDS gel electrophoresis 와 immunoblot

SDS gel electrophoresis는 Laemmli(17)의 방법을 이용하며 protein transfer와 immunoblot은 Towbin (25)의 방법을 이용하였다.

Yeast의 등조배양과 단백질 추출

*S. cerevisiae*의 C276-4A strain을 2×10^7 cells/ml의 농도로 키운 후에 새로운 YM-1 medium을 이용하여 1×10^7 cells/ml의 농도로 희석하였다. 최종 농도가 5 μ l/ml가 되도록 α factor를 넣어 주고 1시간 30분 동안 22°C에서 배양을 하였다. 1시간 30분 후에는 모든 세포가 G1 stage에 멈추기 때문에, 원심분리를 이용하여 α -factor를 씻어준 후에 새로운 YM-1에서 다시 배양하면서 30분 간격으로 cell을 eppendorf tube에 harvest 하였다. 단백질을 추출하기 위해서는 glass bead를 넣고 proteinase inhibitor인 0.5 mM PMSF, 0.02 units/ml aprotinin, 0.001 mg/ml의 TPCK, 0.001 mg/ml의 leupeptin, 0.001 mg/ml pepstatin을 넣은 후에 20초씩 10번의 vortex를 함으로써 cell을 부수어서 단백질을 추출하였다.

Indirect immunofluorescence 방법

Indirect immunofluorescence를 이용한 실험은 yeast의 cytoskeletal element를 연구하는데 많이 이용되고 있으며, 여러 가지 방법이 개발되어 있다(2, 14-16). 그 대표적인 방법으로는 cell을 5% formaldehyde로 2시간 고정한 후에 glucylase로 cell wall을 제거하였다. Cell wall제거 후, primary 항체로 label하고, FITC가 붙어있는 secondary 항체(goat anti-rabbit)로 label하여 형광현미경으로 관찰하였다. Actin staining을 위해서는 5배 희석시킨 Rhodamine-phalloidin에 5분간 yeast를 배양한 후 actin을 관찰하였다.

결 과

CDC12 fusion 단백질 합성

lacZ 유전자와 CDC12 유전자를 fusion하기 위해서는 pUR288 vector를 사용하였고, *trpE* 유전자와의 fusion을 위해서는 pATH3 vector를 이용하여 fusion하였다. Fusion을 위하여 yRP7 vector에 clone된 CDC12 유전자의 *Hind*III 부위와 *Eco*RV 부위를 자른 후에 recombinant DNA technique을 이용하여 pUR288 vector와 pATH3 vector의 *Hind*III-*Sall* 부위내로 재조합을 하였다(Fig. 1). Fusion한 후에는 pUR288(CDC12)는 BMH71-18을 pATH3(CDC12)는 HB101 *E. coli* strain을 이용하여 transformation을 하였다. Fusion 단백질은 induce된 후에 insoluble prep.으로 추출되며 SDS gel을 running하여서 확인한 결과, CDC12-*lacZ* fusion은 약 160 kd에서 CDC12-*trpE* fusion은 약 80 kd에서 fusion 단백질이 감지되었다(Fig. 2).

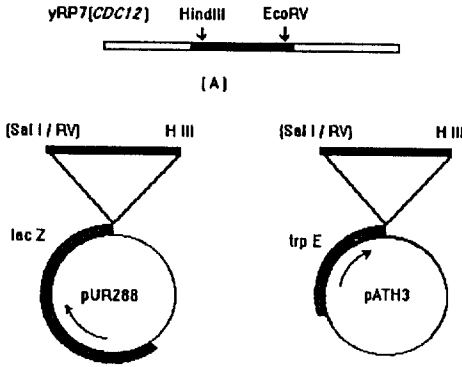


Fig. 1. Structures of *lacZ*:*CDC12* and *trpE*:*CDC12* fusion plasmid.

(A): *CDC12* fragment (1120 bp) was subcloned into yRP7 vector. (B): A 1100 bp *EcoRV*-*HindIII* fragment of *CDC12* gene was subcloned into *Sall*-*HindIII* site of pUR288 and pATH3 vector. In each case, the vector was linearized with *Sall*, treated with the Klenow fragment of DNA polymerase to produce blunt ends, digested with *HindIII*, and then ligated to the gel-purified *EcoRV*-*HindIII* fragment.

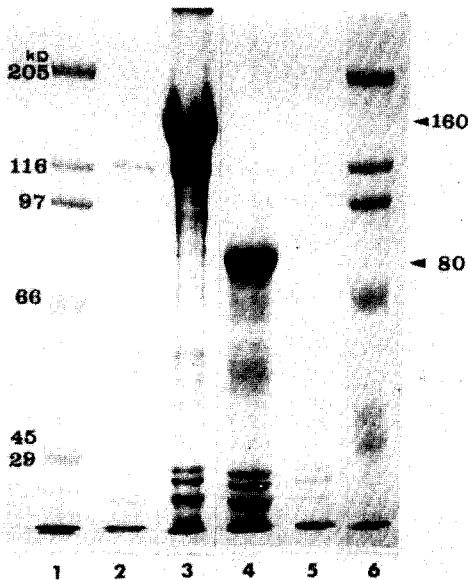


Fig. 2. Identification of fusion proteins by SDS-PAGE. Lanes 1, 6: Molecular weight marker; lane 2: Insoluble proteins from *E. coli* strain BMH 71-18 containing pUR288 vector; lane 3: Insoluble proteins from *E. coli* strain BMH71-18 containing pUR288-*CDC12* vector; lane 4: Insoluble proteins from *E. coli* strain HB101 containing pATH3-*CDC12* vector; lane 5: Insoluble proteins from *E. coli* strain HB101 containing pATH3 vector.

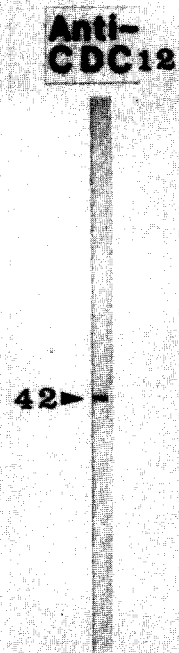


Fig. 3. Identification of *CDC12* protein in blots of yeast proteins using affinity-purified antibodies.

Primary antibody was diluted to 1:30. Secondary antibody used was a 1:200 dilution of HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG. The position of *CDC12* protein is indicated at 42 kd.

***CDC12* 생성물에 대한 항체 형성**

Fusion 단백질의 polyclonal antibody를 얻기 위해 토끼를 이용하였으며 생성된 antibody의 titer와 그들이 *CDC12* 유전자의 생성물에 대한 항체인가를 조사하기 위하여 immunoblot을 이용하였다. 그 결과 *CDC12* 항체는 *S. cerevisiae*의 전체 단백질 중 42 kd의 polypeptide와 결합하였다(Fig. 3). 이 결과는 sequencing의 결과로부터 얻어진 *CDC12* 단백질의 molecular weight와 매우 유사하였다.

***CDC12* 항체의 세포화학적 관찰**

CDC12 항체가 10-nm filament를 인식하는지의 여부를 확인하기 위하여 indirect immunofluorescence 방법을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 전자현미경하에서 10-nm filament가 있으리라 간주되는 mother cell과 daughter cell의 연결부위에서 관찰되었다(Fig. 4a, b). 이러한 결과를 재확인하기 위하여 *cdc12* 돌연변이 세포를 37°C에서 30분간 배양한 후에 *CDC12* 항체로 label하였다. 어떠한 label도 감지되지 않았다(Fig. 4c). 전자현미경하에서도 *cdc12* 돌연변이를 37°C에서 배양하면 30분이내에 10-nm

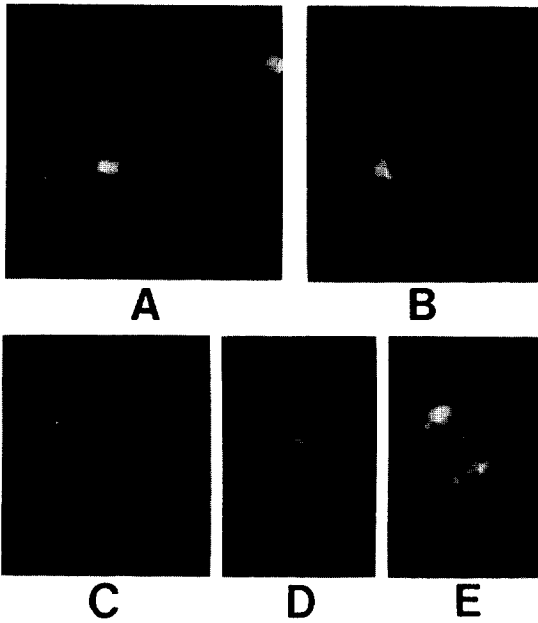


Fig. 4. Immunofluorescence result of CDC12 antibodies.

(A, B): C276 (wild type) cells stained with CDC12 antibodies. (C): JPTA 1493-H01 (*cdc12*) cell grown at 36°C for 30 min and stained with CDC12 antibodies. (D, E): A unbudded cell (C276) stained with CDC12 antibodies (D) to see 10-nm filament ring, and Rhodamine-phalloidin (E) to see actin cluster. Primary antibody was used at 1:3 dilution. FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody was used at 1:200 dilution. Rhodamine-phalloidin was diluted at 1:5. Magnifications are 1500 fold.

filament ring이 소실되는 것이 관찰되었으므로 이 결과는 이들 항체가 10-nm filament를 감지하였다는 것을 보충하여 준다.

Filament ring의 생성기작

10-nm filament ring은 bud 형성시에 나타났다가 세포질 분열 후에 사라지는데 이것은 ring 단백질은 항상 전이되며 존재하는데 ring이 형성되었다가 없어지는가 하는 문제를 조사하였다. 동조배양을 통하여 각각의 분열단계에 있는 yeast의 단백질을 추출하여서 CDC12 항체를 이용하여 조사를 하여본 결과, 모든 분열단계에서 filament 단백질은 존재하나 이들이 bud가 나올 시기에 polymerization 되었다가 세포질 분열 후에 unpolymerization 되는 것이 밝혀졌다 (Fig. 5).

Actin과 10-nm filament와의 관계

Yeast cytoskeletal element인 actin 또한 분열에 중요한 역할을 하며, bud가 나올 부위에 filament

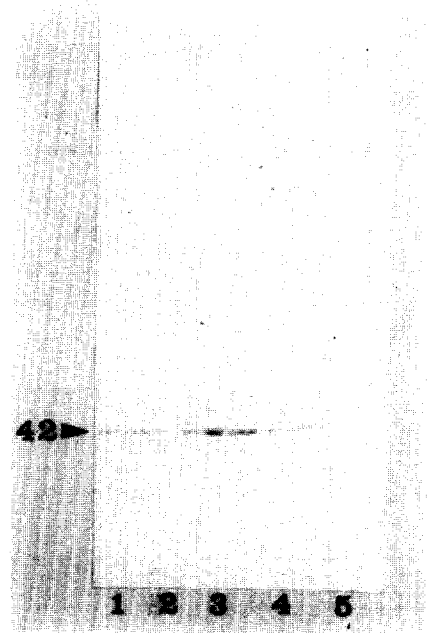


Fig. 5. Organization of 10-nm filament ring.

Synchronized cells were harvested at 0 min(1), 30 min(2), 60 min(3), 90 min(4), and 120 min (5). Their proteins were extracted and transferred to N.C. paper after SDS-PAGE. The presence of 10-nm filament proteins was checked using CDC12 antibodies.

Table 1. The relationship between actin cluster and 10-nm filament ring formation on budding site. Percentage was based on counts of 300 cells for each sample.

ring	actin cluster		actin	ring formation	
	present	absent		present	absent
	98	2		92	8

ring과 유사한 시기에 보인다. 그러므로 actin과 filament ring과의 관계 즉, actin이 모이기 때문에 filament ring이 생기는지 혹은 filament ring이 생기기 때문에 actin이 모이는지를 조사하기 위하여 동일한 세포를 actin은 Rhodamine-phalloidin으로 label하고 filament ring은 FITC로 double labeling 하여서 조사하여 보았다(Fig. 4d, e). 그 결과, actin이 모인 부위에서 대부분 filament ring이 모였으나, 8%가 filament ring이 존재하지 않았으며, 그 반대로 filament ring이 존재하는 곳에 2%의 세포가 actin이 모여 있지 않았다(Table 1). 그러므로, actin과 filament ring은 아무런 상관 관계가 없이 bud가 생길 부위에 모이는 것으로 나타났다.

고 찰

10-nm filament ring의 기작을 이해하기 위하여 CDC12 항체를 이용하였으며 이를 만들기 위하여 CDC12 유전자와 *E. coli* 유전자와 fusion을 하여, fusion 생성물로부터 항체를 형성하였다. 이들 항체와 yeast의 전체 단백질과 immunoblot을 하여 본 결과 약 42 kd의 polypeptide와 반응을 하였다. 이는 CDC12의 sequencing으로부터 계산된 molecular weight인 44 kd과 매우 유사하며 약간의 차이는 단백질의 구조에 따라서 나타난다고 생각된다. 항체를 이용하여 indirect immunofluorescence로 세포내의 인식 부위를 조사하여 본 결과, mother cell과 daughter cell의 경계부위에 존재하는 10-nm filament의 부위를 인식한다는 것이 밝혀졌다. 이를 보충하기 위하여 *cdc12* 돌연변이 세포를 CDC12 항체로 label 하였다. 22°C에서는 존재하나, 37°C로 옮겨서 배양했을 때는 30분 이내에 사라졌다. 이는 전자 현미경의 결과와 동일하며 CDC12 항체가 10-nm filament ring을 인식한다는 결과를 보충하게 되었다. 전자현미경 관찰의 결과, 10-nm filament ring은 bud가 나온 후에 bud 주위에 생겨나며, cytokinesis 바로 전에 사라진다고 관찰되었으나(8), CDC3 항체를 이용한 실험결과, 10-nm filament ring은 bud가 나오기 20여분 전에 bud가 나올 부위에 생겨나며 사라지는 시기도 세포질 분열 후에 사라지며, 어느 것은 새로운 filament ring과 소멸되어 가는 오래된 ring과 두 ring이 존재하는 경우가 발견되었다(15). 본 연구에서는 위와 같이 filament ring이 생겼다가 사라지는데 그 기작이 무엇에 의한 것인가를 동조배양을 이용하여 조사하여 보았다. 그 결과 여러 단계의 cell cycle을 통하여 항상 10-nm filament 단백질이 yeast내에 존재한다는 것이 CDC12 항체를 이용하여 밝혀졌으며, 전이 이후의 조절이라는 것이 밝혀졌다. 10-nm filament의 구성분을 이루는 단백질은 bud가 나오기 바로 전에 polymerization 되었다가 세포질 분열 후에 unpolymerization 되는데 그러한 기작을 야기시키는 이유는 연구해 볼만한 일이라고 사려된다.

Yeast의 주요 cytoskeletal element인 actin도 항상 yeast내에 존재한다. Bud가 나오기 전에는 yeast내에 퍼져서 존재하다가 bud가 나오기 바로 전에 bud가 나올 부위에 모인다. Bud가 어느 정도 커질 때까지 mother cell과 daughter cell과의 경계 부위에 존재하다가 bud가 상당히 성장하면 yeast 전체로 다시 흩어진다. 흩어진 actin은 세포질 분열 바로 전에 경계 부위에 다시 모인 후, 세포질 분열이 일어나고서 다시 yeast내로 흩어진다는 것이 관찰되었다(2). 거의 actin과 10-nm filament ring은 유사하게 행동하기 때문에 이들 간의 관계를 조사하여 보았다. 하나의 cell을 double-labeling을 이용하여 actin과 filament ring을 동시에 관찰한 결과, 이들은 서로 무관하게 행동하는 것으로 밝혀졌다. 이를 보충하기 위하여

actin 돌연변이 세포에서 10-nm filament ring의 형성여부를 현재 관찰 중에 있으며, 이 결과는 이들의 무관성을 보완할 것이라고 기대된다.

cdc3, *cdc10*, *cdc11*, *cdc12* 돌연변이 세포는 37°C에서 배양할 때, 10-nm filament ring이 사라지고 여러 개의 bud가 길게 자라고 세포질 분열이 일어나지 않는다. 이러한 사실을 미루어 볼때, 10-nm filament ring은 올바른 bud가 나올 부위의 선정과 세포질 분열에 필요하리라고 간주되나 그 명확한 기능은 밝혀지지 않았다. 보다 더 명확한 기능을 밝혀내기 위하여 다른 세포에서 유사한 유전자를 clone하여 그들의 기능을 살펴보는 것은 매우 의미있는 일이라 간주된다. 현재 *S. cerevisiae*와 마찬가지로 yeast에 속하는 *S. pombe*를 대상으로 하여 유사한 유전자의 존재를 조사하고 있는 중이며, CDC12 항체와 *S. pombe*의 단백질과의 반응에서 뚜렷한 반응을 하는 polypeptide를 발견하였으며, 현재 다른 항체와의 반응도 조사중에 있다.

*S. cerevisiae*와 *S. pombe*는 동일한 yeast에 속하지만 계통분류학상으로 매우 거리가 멀며, 포유류와 조류가 분화되기 이전에 서로 분리되었다고 한다. 분열방법에 있어서 *S. cerevisiae*는 bud를 형성하여 출아법으로 분열하는 budding yeast이며, *S. pombe*는 bacteria처럼 이분법으로 분열하는 fission yeast이다. 이와 같이 다른 분열 방법으로 분열하는 yeast 사이에 분열에 관계된 유사한 단백질이 존재한다면 이는 매우 흥미로우며 이 유전자의 역할을 밝힘으로써 세포의 형태형성기작의 연구에 많은 도움을 줄 것으로 사려된다.

사 사

본 논문은 1991년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Adams, A.E.M., D. Botstein and D.G. Drubin, 1989. A yeast actin binding protein is encoded by SAC6, a gene founded by suppression of an actin mutation. *Science* **243**, 231-233.
2. Adams, A.E.M. and J.R. Pringle, 1984. Relation of actin and tubulin distribution to bud growth in wild type and morphogenetic mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **98**, 934-945.
3. Booher, R. and D. Beach, 1986. Site-specific mutagenesis of *cdc2*, a cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. cell. Biol.* **6**, 3523-3530.
4. Byers, B., 1981. Cytology of the yeast life cycle, p.59-66. J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach (ed.). In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor.

- N.Y.
5. Byers, B. and L. Goetsch, 1976. Loss of the filamentous ring in cytokinesis defective mutants of budding yeast. *J. Cell Biol.* **70**, 35a.
 6. Cabib, E., R. Roberts and B. Boewrs, 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annu. Rev. and Biochem.* **51**, 763-793.
 7. Drubin, D.J., K.G. Miller and D. Botstein, 1988. Yeast actin-binding proteins: Evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* **107**, 2551-2561.
 8. Goebel, M.G., J. Yochem, S. Jentsch, J.P. McGrath, A. Varshavsky, and B. Byers, 1988. The yeast cell cycle gene *CDC34* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* **241**, 1331-1335.
 9. Gould, K.L. and P. Nurse, 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2⁺* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
 10. Haarer, B.K., S.R. Ketcham, S.K. Ford and J.R. Pringle, 1992. The *Saccharomyces cerevisiae* *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12* genes encode a family of similar proteins. *Genetics* in press.
 11. Hartwell, L.H., 1971. Genetic control of the cell division cycle in yeast: Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell. Res.* **69**, 265-276.
 12. Huffaker, T.C., J.H. Thomas and D. Botstein, 1988. Diverse effects of α -tubulin mutations on microtubule formation and function. *J. Cell Biol.* **106**, 1997-2009.
 13. Jacobs, C.W., A.E.M. Adams, P.J. Szaniszio and J.R. Pringle, 1988. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **107**, 1409-1426.
 14. Kilmartin, J.V. and A.E.M. Adams, 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* **98**, 922-933.
 15. Kim, H.B., B.K. Haarer and J.R. Pringle, 1991. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. Localization of the *CDC3* gene product and the timing of events at the budding site. *J. Cell Biol.* **112**, 535-544.
 16. Kim, H.B., S.R. Ketcham, B.K. Haarer and J.R. Pringle, 1992. Establishment of cell polarity in yeast: Early events in the organization of the budding yeast. *Mol. Cell Biol.* submitted.
 17. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 18. Novick, P. and D. Botstein, 1985. Phenotypic analysis of temperature sensitive yeast actin mutants. *Cell* **40**, 405-416.
 19. Pringle, J.R. and L.H. Hartwell, 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. p. 97-142 J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach (ed.), *In* The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, N.Y.
 20. Pringle, J.R., S.H. Lillie, A.E.M. Adams, C.W. Jacobs, B.K. Haarer, K.G. Coleman, J.S. Robinson, L. Bloom and R.A. Preston, 1986. Cellular morphogenesis in the yeast cell cycle. p. 47-80 J. Hicks (ed.), *In* Yeast cell biology. Alan R. Liss. N.Y.
 21. Sambrook, J. and E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, N.Y.
 22. Ruther, U. and B. Muller-Hill, 1983. Easy identification of cDNA clones. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **2**, 1791-1794.
 23. Sloat, B.F., A.E.M. Adams and J.R. Pringle, 1981. Roles of the *CDC24* gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **89**, 395-405.
 24. Spindler, K.R., D.S.E. Rosser and A.J. Berk, 1984. Analysis of adenovirus transforming proteins from early regions 1A and 1B with antisera to inducible fusion antigens produced in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **49**, 132-141.
 25. Towin, H., T. Stahelin and J. Gorden, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.

(Received June 13, 1992)

(Accepted July, 15, 1992)

ABSTRACT: Studies on the Organization of 10-nm Filament Ring in *Saccharomyces cerevisiae*
Kim, Seong-Chul, Jae-Wook Jung and Hyong Bai Kim (Department of Biotechnology, Korea University)

Saccharomyces cerevisiae contains 10-nm filament ring which lies just under the inner surface of the plasma membrane within the mother-bud neck. Although 10-nm filaments may be involved in cellular morphogenesis, their role and organization are not clear. Here we report the production of antibodies specific for the *CDC12* protein by use of gene fusion techniques, and studies on the organization and function of 10-nm filaments using these antibodies. The *CDC12* protein are translated through the whole cell cycle and present in the cytosol. They are polymerized just before bud emergence and unpolymerized after cytokinesis, and do not have organizational relationship with actin. The possible role of 10-nm filaments is the determination of bud emergence site and completion of cytokinesis.