

*Saccharomyces cerevisiae*의 CDC3 유전자와 유사한 *Schizosaccharomyces pombe* 유전자의 클로닝

김 형 배

고려대학교 자연과학대학 생물공학과

출아법으로 분열하는 *S. cerevisiae*는 mother cell과 bud cell과의 연결부위 근처 원형질막 내부에 10-nm filament ring이 존재한다. CDC3, CDC10, CDC11, CDC12 유전자가 이 filament를 암호화할 가능성이 많은 것으로 알려져 있으며, 근래에 CDC3와 CDC12 유전자의 생성물들이 filament ring에 존재한다는 것이 형광현미경을 이용하여 밝혀졌으나 그 기능은 밝혀지지 않았다. 이에 본인은 10-nm filament ring의 기능을 알아보기 위하여 ring을 이루고 있는 *S. cerevisiae*의 CDC3 유전자와 유사한 *S. pombe* 유전자의 clone을 시도하였다. 이를 위하여 λ gt11 expression vector에 *S. pombe* genomic library를 만들고 CDC3 항체를 이용하여 screen하였다. Screen된 유전자를 sequencing하여 본 결과, 2개 이상의 intron이 존재하는 것이 밝혀졌으며, 일부 부위의 아미노산 서열과 CDC3 아미노산 서열을 비교하여 본 결과, 약 62%의 유사성이 존재하였다.

KEY WORDS □ *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cdc 돌연변이, 10-nm 필라멘트 링, CDC3

현대 생물학에서 해결하고자 하는 문제 중의 하나는 cellular morphogenesis(세포 형태형성기작), 즉 세포가 분열을 할 때 어떻게 3차원적인 구성을 이루면서 그 나름대로 세포의 형태를 갖추어 가는가를 밝혀내는 일이라 할 수 있다. 이를 해결하기 위해서 yeast를 재료로 한 cytoskeletal element에 대한 연구와(1, 9, 10, 17) 세포 분열주기 돌연변이(cell division cycle mutant)에 관한 연구는(5, 11, 12, 15, 19, 21, 32, 34) 세포형태 형성기작을 밝혀내는데 적합한 연구로 여겨지며, *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 두개의 세포로 나누어지는 등 매우 뚜렷한 몇 단계의 형태형성학적 변화를 나타낸다(8, 28, 31). 다른 진핵세포에서 저립 yeast에서도 cytoskeletal element인 microtubule과 actin이(2, 6, 17, 18, 20, 26) 형태형성 과정에 중요한 역할을 하고 있으며, 또한 명백한 기능이 밝혀지지 않은 10-nm filament ring도 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다. 이 10-nm filament ring은 mother cell과 daughter cell의 연결부위의 세포막 바로 아래 존재하며(6, 7), 전자현미경을 이용한 관찰에 의하면

bud가 나올 때 그 부위의 세포막 안쪽에 생겼다가 세포질분열 전에 사라지는 것으로 알려져 있다.

오늘날까지 밝혀진 yeast의 70여 가지 cdc mutant 중에서 cdc3, cdc10, cdc11과 cdc12 mutant는 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, DNA 합성과 핵분열을 계속하나, 세포질 분열이 일어나지 못하여 비정상적으로 길게 자란 여러개의 bud와 여러개의 핵을 가진 세포로 변하여 간다(15, 27). 위와 같은 관찰로 미루어 볼때 10-nm filament ring은 정상적인 bud를 만드는 단계와 세포질분열이 일어나는 단계에서 중요한 역할을 하는 듯하다.

이에 CDC3, CDC10, CDC11, CDC12 유전자가 clone되었고, 그들의 염기서열이 결정되었으며(13), gene fusion 방법에 의하여 CDC3, CDC12 유전자의 생성물이 10-nm filament ring에 존재한다는 것이 밝혀졌다(21, 22). 그러나, 아직까지는 10-nm filament ring의 명확한 기능이 밝혀지지 않은 상태이다.

본 연구에서는 10-nm filament ring의 기능을 밝혀내기 위하여 *S. cerevisiae*의 CDC3 유전자와 유사한 유전자를 *S. pombe*로부터 clone하였다. 이를 위하여 λ gt11 expression vector에 만들어진 *S. pombe* genomic library와 CDC3 항체를 이용하였으며 clone된 CDC3 유사 유전자를 sequence하여 염기서열을 비교하였다.

재료 및 방법

S. pombe DNA 추출

S. pombe DNA의 추출은 Beach와 Nurse(3)의 방법을 변형하여 사용하였다. *S. pombe*를 낮은 log phage까지 키운 후에 5 mg/ml의 lysing enzymes (Sigma)로 cell wall을 제거하였다. Cell wall을 제거한 후에 원심분리로 침전시키며, 0.15 M NaCl과 0.1 M EDTA(pH 8.0)를 가하고, proteinase K와 2% SDS를 가하였다. 45°C에서 1~2시간 배양을 한 후에 5 M potassium acetate를 가하여 얼음에서 1시간 정도 두었다. 원심분리를 하고 남은 상등액에 RNase를 처리한 후 phenol로 추출하고 ethanol 침전을 하여서 순수 *S. pombe* DNA를 얻었다.

S. pombe transformation 및 분자유전학적인 방법

*S. pombe*를 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ cells/ml까지 키운 후에 침전시키고, TBT(0.2 M lithiocyanate, 1 mM Mg(OAc) $_2 \cdot 4H_2O$, 0.2 mM Ca(OAc) $_2$, 10% triacetin)용액에 현탁시켰다. TBT 용액에 있는 세포에 약 1 μ g의 DNA를 가하고 PEG를 가하여 잘 섞었다. 30°C에서 2시간 배양을 하고, 42°C에서 5분간 열처리를 한 후, Tris buffer를 가한 후에 최소배지에 접종하여 키웠다. 다른 분자유전학적인 방법은 Sambrook *et al.*(30)의 방법을 이용하였다.

*S. cerevisiae*와 *S. pombe*로부터 단백질의 추출

Cell을 $4 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$ ml까지 키운 후에 H₂O로 원심분리를 이용하여 씻었다. 약 1 ml의 cell을 1 ml의 H₂O로 희석한 후 100 μ l의 protease inhibitor(0.1 mM PMSF, 0.02 unit/ml aprotinin, 1 μ g/ml TPCK, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin)를 가하고 glass beads를 첨가하였다. 20초씩 9번 vortex를 하여 cell을 파괴하고 단백질을 추출하여 약 1 μ g/ml 농도의 단백질을 얻었다.

Gel electrophoresis 및 immunoblot

*S. cerevisiae*와 *S. pombe*에서 추출된 단백질의 농도측정은 Lowry의 방법(23)을 이용하였으며 SDS gel은 0.5% Comassie blue R-250(45% methanol/10% acetic acid 용액)을 이용하여 염색하고 20% methanol/10% acetic acid 용액으로 탈색하였다. SDS gel상의 단백질은 Hoefler의 TE42 electroblotter를 이용하여 1A의 전류로 2시간 동안 nitrocellulose paper에 transfer하였다. 필요한 경우, blot은 0.2% Ponceau-S(0.3% trichloro acetic acid 용액) 염색액에 5분간 염색을 하고 PBS에서 탈색하면 염색되었던 모든 단백질이 탈색을 하게 된다(29). Immunoblot을 위하여 토끼로부터 얻은 정제된 1차 항체는 1 : 50으로 희석하여 사용하였으며 이들에 의하여 반응된 단백질은 1 : 500으로 희석된 HRP-conjugate된 2차 항체와 기질(4-chloro-1-naphthol)을 사용하여 탐지하였다.

S. pombe library 작성

*S. pombe*의 972h⁻ strain의 genomic DNA를 추

출한 후에 26-gauge의 주사바늘을 이용하여 약 2~6 kd이 되도록 DNA를 부렸다. 약 4 μ g의 부위된 DNA를 *EcoRI* methylase에 의하여 37°C에서 1시간 정도 methylation시킨 후에 methylase는 70°C에서 10분간 불활성화시켰다. 다음으로 DNA fragment에 *EcoRI* linker를 붙이고 *EcoRI* 제한효소로 절단을 하였다. 이들 fragment를 λ gt11의 *EcoRI* 자리에 ligation시킨 후에(33) λ DNA *in vitro* packing system을 이용하여(Clontech Lab.) packing을 하였다. 이때에 약 2×10^5 phage가 나타난다. 0.64 μ g/ml X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)과 16 mM IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 포함한 배지를 이용하여 blue plaque와 clear plaque을 비교하여 본 결과 약 80% 정도가 insert를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다.

Plaque hybridization

위에서 작성된 library를 *S. cerevisiae*의 CDC3 항체(21)를 이용하여 screen하였다. Plate당 약 3000개 정도의 plaque를 N.C. paper에 transfer한 후에 0.5% Tween20과 5% nonfat dry milk를 갖고 있는 TBST 용액(blocking solution)을 이용하여 30분간 block시켰다. Block된 paper를 1 : 30으로 blocking solution에 희석된 CDC3 항체로 반응시키고 다시 1 : 200으로 희석된 2차 항체(HRP-conjugated goat anti-rabbit-IgG)로 반응시켰다.

양성반응을 나타내는 plaque는 이들 paper를 3 mg/ml의 4-chloro-1-naphthol(methanol에 용해)과 0.05% hydrogen peroxide를 포함한 기질용액속에서 5~15분간 반응시킴으로써 찾아낼 수 있으며, 이러한 색깔반응은 증류수에 paper를 씻음으로써 멈출 수 있었다. 양성반응 plaque를 찾은 후에 3차까지 다시 screen하여서 한 plate에 있는 모든 plaque가 양성 반응으로 나타날 때까지 screen하였다(4, 33).

결 과

*S. cerevisiae*의 CDC3 항체와 반응하는 *S. pombe* 단백질

*S. cerevisiae*의 10-nm filament를 이루는 단백질과 유사한 단백질의 *S. pombe*에서의 존재를 알아보기 위하여 CDC3 항체(21)를 이용하여 *S. pombe*의 전체단백질과 immunoblot을 하였다. 그 결과, 약 60 kd 크기의 *S. pombe* polypeptide가 반응하는 것이 밝혀졌으며, *S. cerevisiae*에서는 약 62 kd의 CDC3 단백질과 반응하였다(Fig. 1).

*S. pombe*에서 CDC3와 유사한 유전자의 cloning

Immunoblot에서 *S. cerevisiae*의 CDC3 항체와 반응하는 *S. pombe* 단백질이 밝혀졌으며, 이에 해당하는 유전자를 찾으려 시도하였다. λ gt11 expression vector에 *S. pombe* genomic-DNA library를 만들고, CDC3 항체를 이용하여 screen하였다. 약 2×10^5 plaque를 screen하여서 두 개의 positive clone(λ #3

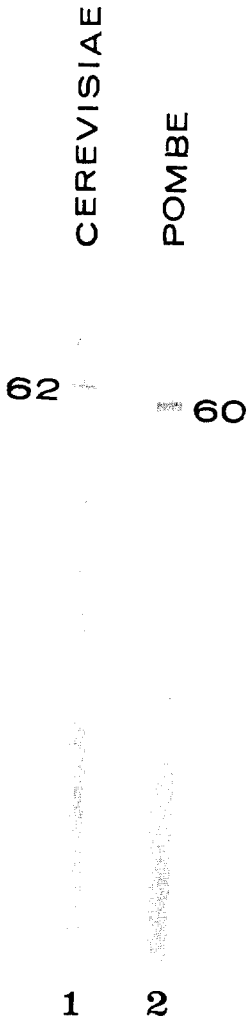


Fig. 1. Identification of CDC3 protein in *S. cerevisiae* and CDC3-like protein in *S. pombe* using CDC3-specific antibodies.

Total cellular proteins were isolated from *S. cerevisiae* strain C276 (lane 1) and *S. pombe* strain 972h⁻¹ (lane 2). The primary antibody was a 1:50 dilution of affinity-purified CDC3-specific antibodies and the secondary antibody was a 1:100 dilution of HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG. The positions of CDC3 protein at ~62 kD and CDC3-like protein at ~60 kD are indicated.

과 #6)을 찾아내어 이들로부터 DNA를 추출하여 restriction mapping에 의하여 서로 중복되는 부위가 있는 것을 발견하였다(Fig. 2). Clone λ#6의 Sall-HindIII fragment와 clone λ#3의 1.4 kb HindIII-ClaI fragment를 서로 연결하여 pSP100의

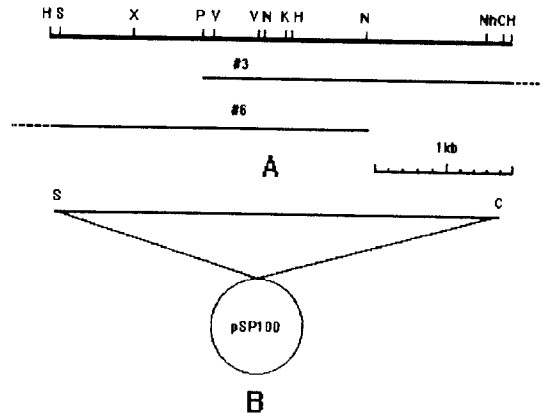


Fig. 2. Restriction map of the CDC3-like gene region. (A) The inserts of the λ#3 and λ#6 are shown. (B) Sall-HindIII fragment of #6 and HindIII-ClaI fragment of λ#3 were ligated and subcloned into Sall and ClaI site in pSP100.

C, ClaI; H, HindIII; K, KpnI; N, NdeI; Nh, NheI; P, PstI; S, Sall; V, EcoRV; X, XhoI.

Sall과 ClaI 부위로 삽입시켰다(Fig. 2).

Clone된 유전자의 확인

Clone된 유전자가 CDC3 단백질과 유사한 단백질을 생산하는 유전자인지의 여부를 확인하기 위하여 clone된 유전자가 subclone된 *S. pombe*의 high copy vector인 pSP100를 이용하였다(Fig. 2). 이 vector를 *S. pombe*에 transformation시킨 후 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 CDC3 항체를 이용하여 반응을 조사하여 보았더니 60 kD 부근에서 매우 강한 반응을 보였다(Fig. 3). Clone된 유전자가 high copy vector에 subclone되어서 매우 강한 반응을 보였으며, vector를 갖고있지 않은 972h⁻¹ strain에서는 약한 반응을 보였다. 이로써 CDC3와 유사한 *S. pombe* 유전자가 clone되었음이 밝혀졌다.

Clone된 유전자의 sequencing 및 CDC3 유전자와의 유사성 비교

Clone된 유전자의 XhoI-NdeI 부위(Fig. 4)를 sequencing한 결과, 여러 개의 intron이 유전자의 앞부분에 존재하며, 현재 intron의 명확한 위치를 찾아내고 있는 중이다. Clone된 genome 유전자를 probe로 이용하여 cDNA library를 조사하고 있으며, primer extension 등을 이용하고 있다. 명확히 밝혀진 유전자 후반부의 단백질시열과 CDC3 단백질과 유사성을 비교하여 보았다. 비교한 결과, 동일한 아미노산이 47%이며 유사한 아미노산까지 간주한다면, 62%의 유사성이 있었다(Fig. 4, 5).

고찰

CDC3, CDC10, CDC11, CDC12 유전자에 돌연변

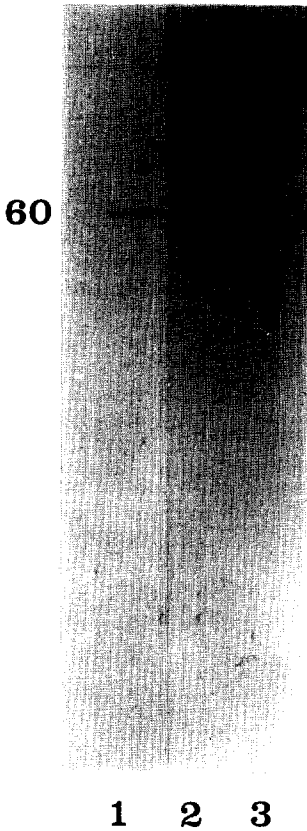


Fig. 3. Recognition of CDC3-like protein from the newly cloned gene in *S. pombe*.

Total cellular proteins were prepared from strain 972h' (lane 1) and strain ED665 containing plasmid pSP100-CDC3-like gene region (lane 2, 3). The primary antibody (CDC3) was used at a 1:50 dilution and the secondary antibody was a 1:100 dilution of HRP-conjugated goat anti-rabbit-IgG. The position of CDC3-like protein at ~60 kd is indicated.

이가 생김 돌연변이체는 37°C에서 10-nm filament ring이 소실되고 정상적인 분열을 하지 못하며 CDC3, CDC12 유전자의 생성물이 10-nm filament ring의 구성 성분임이 밝혀졌으나(21, 22), 아직 그 기능은 명확히 밝혀지지 않았다. 10-nm filament ring의 보다 명확한 기능을 밝혀내기 위해서 본 연구에서는 *S. cerevisiae*의 filament를 이루는 단백질과 유사한 단백질의 유전자를 *S. pombe*에서 찾아내고 그 유전자의 기능을 밝히려고 시도하였다. *S. pombe*를 재료로 이용한 이유는 *S. pombe*와 *S. cerevisiae*가 동일한 yeast에 속하면서 유사한 점이 많으나, 또한 다른 점도 많이 갖고 있다는 이유에서 였다. 이들은 동일한 yeast에 속하면서도 계통분류학상으로 매우 거리가

```
GATGTTTCATG CTGAGCTCC TAGCTACACT CTTCACTACA TACATAACCA CCAACACGGG 1
GGTTTTGCGAT AATTTCCTAC ATGGCGTCAA TGGTACTCCG GGATGGTATG CCTACAGTTA 61
AAGATGATTC CACTAGAAGC AGGGGTTCCG ACGTTGATTC TTTCACATCT ACAGATAATG 121
TAACGCCAAAT AAATGTTGAG GCAGCCATT T CAGAAAAACA GAATGAAGAA AAACCCATTC 181
AGGATAATTC TGAACAAGAG GTAATCAATT ATTTAAAAAT CCTTTACTAA TATTTAGTTC 241
AATCCGCACG TTAGTATAAT CCAGCUTCAG TTGAACGGAT ACGTTGGATT CGCTAGTCTT 301
CCTAATCAAT GGCATGCTCG TTGTGTTCST CAAGGTTTTA ATTTCAACGT ATTAGTATTA 361
GGGGAAAGCG GTTCAGGGAA ATCTACACTT GTGAATACCG TATTGAATAG AGATGTTTAC 421
CCACCCGACC AGAAATCTTT AACTGGGGAT TTTGGAGTGA ACCCAGAAC CACTGTTATG 481
ATCAACTCTT CTGCACTTGA AATAGTGAA AATGGTATCA GTCTTCAATT AAATGTAATT 541
GATACACCCG GTTTTGGCGA TTTTATGAC AACACCGATT GTTGGCAACC AGTTTTGACA 601
GATATCGAGG GTCCGTATGA TCAATATCTT GAGCTTGAAA AGCACAATCC TCGATCTACT 661
ATTCAAGATC CAAGAGTICA TGCTTGTATA TTTTTFATTC AGCCTACTGG TCATGCTATA 721
AGTGCTATGG AGCTTCGAGT TATGTTGGCT TTGCACGAGA AAGTAAATAT TATACCCATC 781
ATTGGAAAG CCGATACACT AACGGATGAT GAACCTAECT TTACGAAGGA AATGGTAAGC 841
CCTAATCTTG ATTTAAAGTT OCTAATGAAA AAATGATAGA TTTTGAGAGA TATCCAATAC 901
CACAAATCA GAATTTTCTT CCTCCGACA TATGAGACCG ATGATCCTGA ATCAGTGGCA 961
GAAAATGCAG ACATCATGAG TAGAATACCT TTTGCTATAA TTGCTTCTAA TACATTCGTG 1021
GTCAACAATG AAGGAAAGCG CGTCCGCGGG AGGGGTGACC CATGGGGCGT TGTGGAAGTC 1081
GATAATGAAG AGCATTCTGA TTTCCCTAAG CTTGCTGAAA TGCTTATTCG AACACACTTA 1141
GAAGAACTCA AAGAACAGAG AAATAAGCTG TATGAAGCGT ATCGTACTGA ACGGTTGCTT 1201
AGCAGCGGAA TATCACAGA TCACTCCGTT TTTCTGGAAG TCAACCCTAG TGCTAAACTC 1261
GAAGAGGAGC GTGCCCTTACA CGAAGAGAAA TTGATGAAAA TGGAAAGCAGA AATGAAAACC 1321
ATTTTTTCTC AGAAGGTTC AAAAAAGAA GATGCTCTTA AACAACTGA AAACGAGTTA 1381
CGTACCOCGC ATCCGGAAAT GAAGGCAGCA TTGGAGAAGC AAAAAGCTGA CTTAATTGAT 1441
CACAAAAATC GCTTAATGCA AGCTAAGCT CCGCCGAAA ATGAGAAGAG TAAAAGGAAG 1501
TTTTTAAAT AGTCTCTTA CTAGCTGATA TTTATTGTA TGACACCGCA GTTC 1561
```

Fig. 4. DNA sequence analysis (*Xho*I-*Nde*I) of CDC3-like gene in *S. pombe*.

```
pombe gene ILRDIQYHNIRIFFPYTYETDDPESVAENADIMSRIPFALLASNFVNVNEKRVGR
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
CDC3 IINQLIQSNLELFPPIYSNDNAENSHLSERLFSLLPYAVIGSNDIVENYSGNQRGR

pombe gene RYRPGVVEVDNEEHSDFPKLRMLIRTHLEELKEQTNKLYEARTERLLSSGISQIH
: : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
CDC3 SYPRGVIEVDNDHSDFNLLKNLLIKQFMEELKERTSKIYENYRSSKLAKLGIKQDN

pombe gene SVFREVPNSAKLEERALEHEKLEAKMEADKTIKFSQKVEQEKDRLKOSENELRTRHRE
: : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
CDC3 SVPRKFDPIKQKEKTLHEAKLAKLEIEMKTVFQKQVSEKELKQKSETELFARHKE

pombe gene MKAALEKQKADLIIRKINRLMQAKAAA.....ENEKSKRKKFK
: : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
CDC3 MKEXLTKQLKALEDKKQLELSINSAsprvnhsPVPTKKKQFLR
```

Fig. 5. Alignment of the predicted amino acid sequence of CDC3-like gene in *S. pombe* and CDC3 in *S. cerevisiae*. Identical amino acids are indicated by a vertical line and similar amino acids are indicated by an asterisk.

떨며 포유류와 조류가 분화되기 이전에 서로 분리되었다고 한다. 분열방법에 있어서 *S. cerevisiae*는 bud를 형성하여 출아법으로 분열하는 budding yeast이며 *S. pombe*는 박테리아처럼 이분법으로 분열하는 fission yeast이다. 이렇게 다른 방법으로 분열하는 yeast 사이에서 분열에 관계되는 유사한 cytoskeletal element가 존재하며 그 기능을 밝힌다는 것은 매우 흥미로운 일이다. 현재까지의 실험의 결과를 보면 actin이나 microtubule등 매우 유사한 cytoskeletal element를 갖고 있다. *S. cerevisiae*의 β -tubulin 유전자와 *S. pombe*의 *NAD3* 유전자(β -tubulin을 암호화) 사이에는 73%의 유사성(16)이 있으며, actin과 microtubule 모두 세포분열시에 이들 두 yeast에서 동일한 역할을 한다(14, 24, 25). *S. pombe*에서 유사한 10-nm filament 단백질의 존재를 찾아내어 그들의 기능을 연구한다는 것은 매우 흥미롭다고 간주되어 *CDC3* 항체를 이용하여 *S. pombe* 단백질과의 반응을 Western blot상에서 조사하여 보았다. 그 결과, 60 kd 부근에서 반응하는 *S. pombe*의 peptide를 찾아내었으며 *CDC3* 항체를 이용하여 *S. pombe*의 λ gt11 expression vector에 있는 genomic library로부터 *CDC3* 유전자와 유사한 유전자를 찾아내었다. Clone된 유사한 유전자를 high-copy number vector에 subclone하여 *S. pombe*에 transformation시킨 후에 올바른 유전자가 clone됨을 재확인하여 보았다. Clone된 유전자의 *XhoI-NdeI* 부위를 sequencing하여 보았으나, 유전자의 앞부분에 여러 개의 intron이 존재하고 있어서 현재 명확한 intron 부위를 찾고 있는 중이며, cDNA를 이용하여 조사하고 있다. 뒷부분의 유사성을 비교하여 본 결과, 약 62%의 유사성이 있다. 이 유전자의 기능을 알아보기 위해서 유전자를 파괴시킨 후에 파괴된 유전자를 wild type 유전자와 교체시켜서 인위적인 돌연변이체를 만들 예정이다. 돌연변이체를 관찰함으로써 해당유전자의 기능을 밝힐 수 있으리라고 간주된다.

감사의 말

본 논문은 1991년 3월부터 1993년 2월(24개월)까지의 2개년간 한국과학재단 핵심전문연구비(KOSEF 913-0401-015-2)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Adams, A.E.M., D. Botstein, and D.G. Drubin, 1989. A yeast actin-binding protein is encoded by *SAC6*, a gene found by suppression of an actin mutation. *Science* **243**, 231-233.
- 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.
- Beach, D. and P. Nurse, 1981. High frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **290**, 140-142.
- Benton, W.D. and R.W. Davis, 1979. Screening λ gt 11 recombinant clones by hybridization to single plaque *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
- 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.
- Byers, B., 1981. Cytology of the yeast life cycle, p. 59-66. In J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Byers, B. and L. Goetsch, 1976. Loss of the filamentous ring in cytokinesis defective mutants of budding yeast. *J. Cell Biol.* **70**, 35a.
- Cabib, E., R. Roberts, and B. Bowers, 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 763-793.
- Drubin, D.G., 1991. Development of cell polarity in budding yeast. *Cell* **65**, 1093-1096.
- 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.
- 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.
- Gould, K.L. and P. Nurse, 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2'* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
- Haarer, B.K., S.R. Ketcham, S.K. Ford, D.J. Ashcroft, and J.R. Pringle, 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12* genes encode a family of similar proteins. *Genetics* in press.
- Hagan, I.M. and J.S. Hyams, 1988. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell. Sci.* **89**, 343-357.
- 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.
- Hiraoka, Y., T. Toda, and M. Yanagida, 1984. The *ND43* gene of fission yeast encodes α -tubulin: A cold-sensitive *nda3* mutation reversibly blocks spindles formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* **39**, 349-358.
- 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.
- Jacobs, C.W., A.E. M. Adams, P.J. Szaniszió, and J.R. Pringle, 1988. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.*

107. 1409-1426.
19. Jones, S., M., Vignais, and J.R. Broch, 1991. The CDC25 protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound of RAS. *Mol. Cell Biol.* **11**, 2641-2646.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Kim, S.C., J.W. Jung, and H.B. Kim, 1992. Studies on the organization of 10-nm filament ring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 333-338.
 23. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 24. Marks, J., I.M. Hagan, and J.S. Hymes, 1986. Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: The role of the cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* **5**, 229-241.
 25. Marks, J. and J.S. Hymes, 1985. Localization of F-actin through the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. cell Biol.* **39**, 27-32.
 26. Novick, P. and D. Botstein, 1985. Phenotypic analysis of temperature sensitive yeast actin mutants. *Cell* **40**, 405-416.
 27. Pringle, J.R. and L.H. Hartwell, 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. p. 97-142. In J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach (ed.). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
 28. 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. In J. Hicks (ed.). Yeast cell biology. Alan R. Liss, N.Y.
 29. Pringle, J.R., R.A. Preston, A.E.M. Adams, T. Sterns, D.G. Drubin, B.K. Haarer, and E.W. Jones, 1989. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Meth. Cell Biol.* **31**, 357-435.
 30. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
 31. 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.
 32. Yoon, H. and J.L. Campbell, 1991. The CDC7 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a phosphoprotein that contains protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3574-3578.
 33. Young, R.A. and R.W. Davis, 1983. Efficient isolation of genes using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1194-1198.
 34. Ziman, M., J.M. Obrien, L.A. Ouellette, W.R. Church, and D.I. Johnson, 1991. Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Cell Biol.* **11**, 3537-3544.

(Received April 9, 1993)

(Accepted May 8, 1993)

ABSTRACT: Molecular Cloning of the Gene in *Schizosaccharomyces pombe* Related to the CDC3 Gene in *Saccharomyces cerevisiae*

Kim, Hyong Bai (Department of Biotechnology, Korea University, Chochiwon 339-800, Korea)

The budding yeast *S. cerevisiae* contains 10-nm filament ring that lies just inside the plasma membrane in the region of the mother-bud neck. It is possible that CDC3, CDC10, CDC11, CDC12 genes encode the filaments. Recently it has been shown that the CDC3 and CDC12 gene products are localized to the vicinity of the neck filaments by immunofluorescence. However, the role of the filament ring is not clear. In order to find out the role of filament ring, I have tried to clone the similar gene in *S. pombe* to the CDC3 in *S. cerevisiae*. Genomic library was constructed by use of λ gt11 expression vector and screened with CDC3 antibodies. From sequencing data, there were more than two introns in the newly cloned gene. There was 62% homology between the part of the predicted amino acid sequence of cloned gene and CDC3 amino acid sequence.