

Schizosaccharomyces pombe 포자형성유전자 (*spo 5*)의 발현조절기구의 해석

金東周 · 下田親*

제주대학교 해양학과 · *대판시립대학 생물학과

Expression and Regulatory Analysis of Sporulation Gene (*spo 5*) in *Schizosaccharomyces pombe*

Dong-Ju KIM and Chikasi SHIMODA*

Department of Oceanography, College of Ocean Sciences, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

*Department of Biology, Faculty of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558, Japan

Sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has been regarded as an important model of cellular development and differentiation.

S. pombe cells proliferate by mitosis and binary fission on growth medium. Deprivation of nutrients especially nitrogen sources, causes the cessation of mitosis and initiates sexual reproduction by mating between two sexually compatible cell types. Meiosis is then followed in a diploid cell in the absence of nitrogen source.

DNA fragment complemented with the mutations of sporulation gene was isolated from the *S. pombe* gene library constructed in the vector, pDB 248' and designated as pDB (*spo 5*)1. We further analyzed six recombinant plasmids, pDB (*spo 5*)2, pDB (*spo 5*)3, pDB (*spo 5*)4, pDB (*spo 5*)5, pDB (*spo 5*)6, pDB (*spo 5*)7, and found each of these plasmids is able to rescue the *spo 5-2*, *spo 5-3*, *spo 5-4*, *spo 5-5*, *spo 5-6*, *spo 5-7*, mutations, respectively.

Mapping of the integrated plasmid into the homologous site of the *S. pombe* chromosomes demonstrated that pDB (*spo 5*)1, and pDB (*spo 5*)R1 contained the *spo 5* gene.

Transcripts of *spo 5* gene were analyzed by Northern hybridization. Two transcripts of 3.2 kb and 2.5 kb were detected with 5 kb *Hind III* fragment containing a part of the *spo 5* gene as a probe. The small mRNA (2.5 kb) appeared only when a wild-type strain was cultured in the absence of nitrogen source in which condition the large mRNA (3.2 kb) was produced constitutively. Appearance of a 2.5 kb *spo 5*-mRNA depends upon the function of the *mei1*, *mei2* and *mei3* genes.

Key words : sporulation, expression, Northern analysis, *Schizosaccharomyces pombe*, *Amphioxus*

서 론

진핵생물인 효모가, 환경요인의 변화에 대응하여 영양 증식으로 부터 유성생식으로 변환을 일으키는 것은 잘 알려진 사실이다. 유성생식은 접합에 의한 일배체로부터 이배체로의 전환과, 이배체 세포의 포자형에 의한 일배체로의 전환과정으로 부터 형성된다. 효모의 포자형성은 영양세포로부터, 자낭포자의 형태적, 기능적 변화를 동반하는 세포분화의 과정이며, 분화기능을 해명하기 위한 뛰어난 모델이라고 생각되어져 있으며, 또한 이 모델은 고초균의 아포형성과 함께 여러분야에서 연구가 활발하게 진척되어 있다. 효모의 자낭포자 형성세균의 아포형성과는 서로 다르며 감수분열을 수반하는 것은, 이러한 현상의 중요성을 입증하는 것이다. 감수분열은 유전적 재조합을 증명하는 기구로서, 모든 진핵생물에 있어서 보편적으로 관찰할 수 있는 형태형성 과정이다. 또한, 포

자형성의 유무, 포자의 형태, 자낭포자의 수 등은 효모균의 분류에 있어서 중요한 지표인 것이다.

출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*와 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에 있어서는, 유전학적 해석법이 확립되어 있으며, 유전자 조작을 위한 숙주 벡터계가 보편적으로 잘 개발되어져 있다. 그리고, 유성생식의 개시와 진행을 인위적으로 제어할 수 있기 때문에, 포자형성 과정에 이어서 분자기구의 기능에 관하여 용이하게 해명할 수 있다. 분열효모 *S. pombe*는 일배체세대를 중심으로 하는 생리활성을 갖고 있으며, 영양세포는 통상적으로 일배체로 존재한다 (Cutz et al., 1974). Hetero에서는 h⁺형과 h⁻형으로 명명되어진 2종류의 접합형이 존재하며, 배지중의 영양원인 질소원의 결핍에 의해서, 서로 다른 접합형 (h⁺형과 h⁻형)의 세포간에서 접합이 일어나 2배체 접합이 형성된다.

감수분열과 포자형성 결손 변이주에 관한 단리와 유전

해석에 관한 연구 보고들에 의하면, 전사레벨에서 유전자 발현의 조절, mRNA processing, 단백질간의 상호작용, protein kinase와 같은 단백질 인산화에 의한 조절등의 다양한 기구가 복합적으로 작용하는 것으로 시사되어져 있다 (Bresch et al., 1968; Shimoda et al., 1985; Shimoda et al., 1987; Fugioka et al., 1989; Mcleod et al., 1987; Kelly et al. 1988).

*S. pombe*는 최근 재조합 DNA 실험을 위한 숙주 벡터 계가 개발되어, 이미 많은 유전자가 cloning 되어져 있다 (Beach et al., 1981; Beach et al., 1982). 포자형성에 특이적으로 관여하는 유전자 (*spo*)들의 유전해석의 결과에 의하면, 감수분열에 수반되는 염색체의 분배 및 핵의 분리, 이동과 형태변화에 미소기관이 결정적인 역할을 하고 있다고 생각할 수 있다. 특히, 미소관 spindle의 형성은 핵막상의 spindle 극체에 의해서 제어 되어지고 있다고 할 수 있다 (Hirata et al., 1982; Tanaka et al., 1982).

*S. pombe*의 *spo5* 변이체에서 감수분열은 외관상 정상적으로 일어나며 4개의 1배체핵이 형성되지만, 포자벽은 전혀 형성되지 않는 특징을 갖고 있다. 다시말해서, 명확한 *spo5*의 표현형을 제시하고 있었다.

따라서 본 연구에서는 단리한 *spo5* 변이체의 구조와 기능을 해명하기 위하여, 이 유전자의 cloning과 발현조절에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

균 체

본 실험에 사용한 분열효모 *S. pombe*의 유전자형은 표 1-1에 제시한다. 형질전환에 사용한 대장균 수용균 (형질전환) (Hanahan et al.,) 으로서는 HB101를 이용했으며, single-stranded DNA조제 (Viera et al., 1987)에는, 파지 M13 K07과 숙주균 MV1184를 이용하였다.

배 지

1. 대장균용 배지

액체배지로서는, LB 배지 및 2×YT 배지 (Difco Laboratories, Michigan, USA)를 사용하였다. 약제내성을 조사하기 위하여 ampicillin (40 mg/l)과 tetracycline (20 mg/l) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. USA)를 배지에 첨가하였다. 고체배지 조성에는, 액체배지에 한천을 1.5% (W/V)가 되도록 첨가한 후에 조제하였다.

2. *S. pombe*용 배지

완전배지로서는, 효모 extract (YEA), 합성최소배지의 경우는 SD 배지를 이용하였다. 포자형성 유도시에는

MEA 배지와, 합성포자형성배지 (SSA, SSL)를 이용하였다. Plotoplast 조제에는 MML 배지를 이용하였다 (Gutz et al., 1974). 이용한 배지는 필요에 따라서, adenine (75 mg/l), uracil (50 mg/l), 이외의 아미노산 (50 mg/l)을 첨가했다. 고체배지 조성에는, 한천을 2%~2.5% (w/v)가 되도록 첨가한 후에 조제하였다. 배지조성은 Gutz등 (1974)의 문헌을 참고하였다.

Plasmid

대장균과 분열효모의 양세포내에서 증식 할 수 있는 shuttle vector pDB248' (Beach et al., 1982)를 이용하였으며 pDB248'은 대장균 plasmid pBR322에 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 LEU2 유전자 및 2 μ plasmid의 복제기점을 함유하는 단편으로부터 구축되었다 (Beach et al., 1981).

Gene library

spo5 유전자는 형질전환을 이용하여 *S. pombe*의 genomic library로 부터 단리하였다. 이 genomic library은 *S. pombe* 야생형 homotalic strain L975의 전 genomic DNA를 Hind III로 한정분해한 단편을 shuttle vector pDB248'에 연결하여 구축한 것이다 (Shimoda et al., 1985).

효소의 반응

제한효소의 반응은 통상 5~15 units의 효소를 사용했으며, 37°C에서 1~2시간동안 반응을 이행하였다. DNA ligase (Takara Shuzo Co. Ltd., Tokyo) 반응은 DNA 시료에 1/10량의 ligase용 염용액을 첨가한 용액중에서 T4 DNA ligase (Toyobo Co., Ltd., Osaka)를 작용시켜서, DNA를 결합시켰다. 반응은 4°C에서 15시간 반응을 이행하였다. Alkaline phosphatase (Toyobo Co., Ltd., Osaka)은 DNA 말단의 탈 인산화를 위하여 대장균 C75 유래의 alkaline phosphatase를 사용하였다. 반응은, EDTA를 최종 농도 10 mM이 되도록 첨가하여 반응을 정지시켰다.

형질전환

대장균 형질전환은 Mandel과 Higa등 (1970)의 방법을 개량하여 이행하였다. 전 처리한 대장균 배양세포를 수용균으로 하여 200 μl의 plasmid DNA 용액을 첨가하여, 30분정도 병냉처리 한 후, 42°C에서 열처리하여 배양배지에서 형성된 colony들을 형질전환체로 이용하였다. 분열효모 *S. pombe*의 형질전환은 Beach등 (1982)에 의해서 개발된 방법으로 이행하였다.

*E. coli*로 부터 plasmid DNA 조제

Birnboim와 Doly등 (1979)에 의해서 고안된 SDS-alkaline 용균법에 의해서 plasmid DNA 조제하였으며, 또한 고 순도로 plasmid DNA를 대량으로 조제할 경우에는, Maniatis등 (1982)의 방법에 의해서 개발된 CsCl-EtBr 밀도구배 원심법으로 이행하였다.

Agarose gel 전기영동

전기영동은 submarine형 전기영동장치 (HE13, Taka Shuzo Co. Ltd., Tokyo)와 agarose gel (agarose gel L03, Takara)를 이용하며 이행하였다. 분리용 gel의 농도는, 0.6~0.8%로 사용하였다. DNA 전기영동은, TBE 완충용액 (90 mM Tris-Borate, pH 8.0, 2.5 mM EDTA)를 이용하였으며, DNA 시료에 gel-loading 완충용액 (60% sucrose, 0.02% (w/v) bromophenol blue, 0.02% (w/v) xylene cyanol, 0.025 M EDTA)를 1/10량을 첨가하여 영동 gel상에 loading 하였다. 영동은 정전압 100 V에서 40분동안 이행한 후, 영동 gel를 EtBr 수용액중에서 염색하여 UV 조사에 의해서 목적하는 DNA 단편을 확인하였다.

RNA 조제

전 RNA의 조제는 Jenness 등 (1983)의 방법에 의해서 이행했다. 동결보존한 배양세포를 완충용액에 의해서 전처리한 시료를 2배량의 phenol/chloroform와 혼합하여, 0℃에서 3분간 파쇄한 후 초고속원심분리 (25,000 rpm, 10 min)에 의해서 전 RNA를 회수하였다. Poly (A)⁺ RNA는 Maniatis등 (1982)의 방법에 의해서, oligo dT cellulose-affinity column (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)을 이용하였다. 전 RNA 표품은 65℃에서 2분간 가열하여 변성시킨 후, SDS/LiCl을 각각 최종농도 0.3%, 0.4 M이 되도록 첨가하여 30 ml의 고염농도 완충용액 (10 mM EDTA, 0.3% SDS, 0.4 M LiCl)으로 poly(A)⁻ RNA를 용출하였다. 그리고, 저염농도 완충용액 (10 mM Tris-HCl/pH 7.2)으로 poly(A)⁺ RNA를 용출하여 정제하였다.

Northern hybridization

Poly (A)⁺ RNA를 포르마린 (6.5%)과 포름알데히드 (50%) 존재하의 55℃에서 약 15분간 변성시킨 후 6.7%의 포르마린을 함유한 1%의 agarose gel 전기영동에 의해서 RNA를 전기적으로 분리하였다. 영동 후 분리한 gel로부터 RNA를 나일론 membrane-filter에 전이시켰다. 이 membrane-filter (Amersham Corp., Amersham, England)를 80℃에서 2~4시간 열처리하여 RNA를 고정시킨 후 hybridization에 이용하였다. 방사성 probe는 plasmid

DNA 또는 적절한 제한효소 단편을 nick translation법 (Amasham kit), 또는 random primer (Takara kit)에 의해서, ³²P-dCTP로 표식하였으며, hybridization은 Thomas (1980) 방법에 의하여 이행하였다. 50% 포름아미드 존재하에서 방사성 probe와, 42℃에서 1~2일간 보온한 후 hybridization을 이행하였다. Membrane-filter를 실온에서 0.1% SDS를 함유한 2×SSC 용액으로 15분간 5회 처리한 다음, 0.1% SDS/0.2×SSC 용액으로 10분간 2회 세정, 건조시킨 후 autoradiography를 이행하였다.

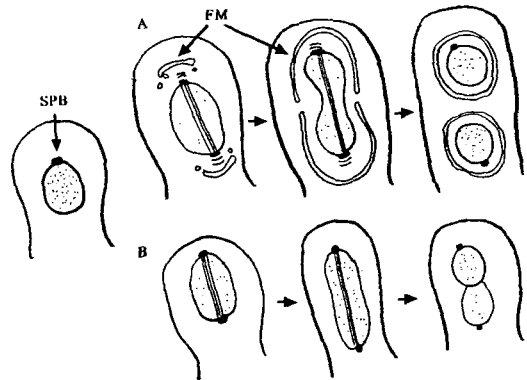


Fig. 1. Comparison of morphological changes of nuclear apparatus in the wild type and the *spo 5* mutant during meiosis in the fission yeast *S. pombe*. Abbreviations used are as follows; SPB, spindle pole body; FM, forespore membrane. A, wild type; B, *spo 5* mutant.

결 과

spo 5 유전자의 cloning

*S. pombe*의 포자형성 결손변이체 *spo 5* (Fig. 1)의 유전자의 cloning은 본연구실에서 확립된 방법에 의해서 이행하였다 (Shimoda et al., 1985; Shimoda et al., 1987). 효모, 대장균 shuttle vector pTB248' (Beach et al., 1982)의 *Hind* III 부위에 *S. pombe* genomic DNA의 *Hind* III 단편을 연결하여 구축한 genomic library로부터 plasmid DNA를 조제하여, *spo 5* 변이체 C199-1A (h90 *spo 5*-B2 *ade 6*-M210 *ura 1 leu 1*) (Table 1)에 형질전환에 의해서 도입하였다. 벡터 plasmid pTB248'에는 선택 마커로서 *Leu 2* 유전자가 삽입되어 있으며, 이 *Leu 2* 유전자는 *S. pombe*의 *leu 1* 변이를 상보한다. 여기서, 형질전환 처리한 세포를 먼저 leucine이 첨가되지 않은 합성포자형성배지에 접종하여 *Leu*⁺ 형질전환체를 선택하였다. 수용균의 *spo 5* 변이가 상보된 세포는 이 선택배지상에서 포자를 형성하게 된다. 여기서 leucine 비감수성인 형질전환체를

Table 1. *Schizosaccharomyces pombe* strains

Strains		Genotype		
C119-1A	h^{90}	<i>spo 5</i> -B2	<i>ade 6</i> -M210	<i>ura1 leu 1</i>
C332-1B	h^{90}	<i>spo 5</i> -B37	<i>ade 6</i> -M210	<i>leu 1</i>
KD70	h^{90}	<i>spo 5</i> -B37	<i>ade 6</i> -M216	<i>ura1 leu 1</i>
L975	h^{90}	wild-type		
CD16-1	h^+/h^-	<i>ade 6</i> -M210/ <i>ade 6</i> -M216	<i>cyh1</i> /+ +/ <i>hys 5</i>	
CD16-3	h^-/h^-	<i>ade 6</i> -M210/ <i>ade 6</i> -M216	<i>cyh1</i> /+ +/ <i>hys 5</i>	

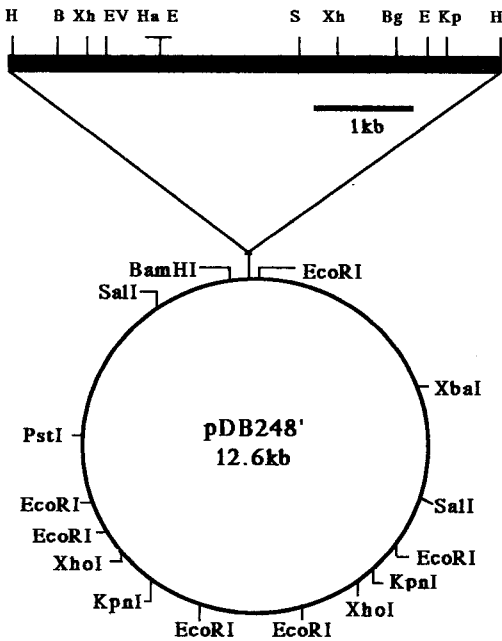


Fig. 2. Restriction endonuclease cleavage map of the cloned 5 kb DNA fragment containing the *spo 5* gene.
The thick bar indicates the chromosomal DNA from *S. pombe* L975, and circular line indicated the plasmid pDB248'. Abbreviations used are as follows; H, *Hind* III; B, *Bam* HI; Bg, *Bgl* II; X, *Xho* I; EV, *Eco* RV; Ha, *Hap* I; E, *Eco* RI; S, *Sma* I; k, *Kpn* I.

30% EtOH로 처리하여, 영양세포를 치사시킨 후, 생존세포를 포자형성배지에 접종하였다. 그리고 형성된 콜로니를 Iodine 염색법에 의하여 포자가 형성된 콜로니만을 screening 하였다.

그리고 Leu^+/Spo^+ 형질전환체에 관해서 표현형이 복귀돌연변이에 의한 것인가, 또는 이 도입된 plasmid에 의한 것인가를 결정하기 위하여, plasmid 결실실험을 이 행하였다. 벡터로 사용한 pTB248' plasmid는 효모 세포 중에서는 불안정하고 비선택배지인 leucine을 함유한 최소배지, 또는 완전배지에서 큰 빈도로 세포로부터 상실되었다. Leu^+/Spo^+ 형질전환체를 완전배지에서 충분히 증식시킨 후, leucine 요구성과 포자형성 능력을 조사

한 결과, 이들 양 형질은 동시에 고빈도로 상실하고 있었다. 이러한 결과는, *spo 5* 변이를 상보하는 DNA가 plasmid상에 clone화 된 것을 입증하는 것이다.

취득한 Spo^+ 형질전환체로부터 염색체 DNA를 추출하여, 제한효소 *Hind* III로 처리하여 pTB248' plasmid의 *Hind* III 부위에 연결하여 대장균 HB101에 형질전환후, ampicillin 약제 내성균으로부터 recombinant plasmid DNA를 회수하였다.

Hind III로 소화하여 전기영동으로 조사한 결과, pTB 248'의 *Hind* III 부위에 약 5 kb의 DNA 단편이 삽입되어 있는 것을 확인하였다. 이 recombinant plasmid를 pDB (*spo 5*)1으로 명명하여 각종의 제한효소를 이용하여, 약 5 kb의 삽입 DNA 단편에 관하여 제한효소지도도를 작성하였다. 그 결과, 이 DNA 단편상에는 *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Eco* RV, *Xho* I, *Sma* I, *Hpa* I, *Kpn* I 부위가 존재하고 있다 (Fig. 2).

pDB (*spo 5*)1의 subcloning

pTB248'의 *Hind* III 부위에 약 5 kb의 DNA 단편을 삽입하여 구축한 pDB (*spo 5*)1의 제한효소 지도도를 중심으로 하여, 이 plasmid의 *Hind* III 부위에 연결한 5 kb의 DNA 단편을 동일한 *Hind* III 부위에서 역방향으로 연결한 pDB (*spo 5*)1을 구축하여, *spo 5* 변이체에 도입한 결과, pDB (*spo 5*)1과 동일한 변이체를 상보하고 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 5 kb의 *Hind* III 단편상에 *spo 5* 변이를 상보시키는데 필요한 모든 영역이 포함되어 있는 것을 확인하였다. 그리고 *spo 5* 변이의 상보에 필수영역을 한정하기 위하여 subcloning을 이 행하였다 (Fig. 3). 삽입 단편상의 단일 제한효소 부위인 *Bam* HI 부위를 이용하여 pDB (*spo 5*)1을 *Bam* HI로 소화한 후에 T4 ligase로 처리하여, *Bam* HI 단편을 결실시킨 plasmid를 구축하였다[pDB (*spo 5*)2]. 그리고 동일한 방법으로 *Hind* III, *Sma* I 부위를 결실시킨 plasmid를 구축하였다[pDB (*spo 5*)6, pDB (*spo 5*)7]. 또한 약 3 kb의 *Bam* HI/*Bgl* II DNA 단편을 agaros gel로 부터 회수하여 pTB248'의 *Bam* HI 부위에 연결하여 recombinant plasmid를 구축하였다[pDB (*spo 5*)4]. Subcloning에 의해서 취득된 각각의 재조합 plasmid DNA를 *S. pombe*의 *spo 5* 변이주 C332-1B와

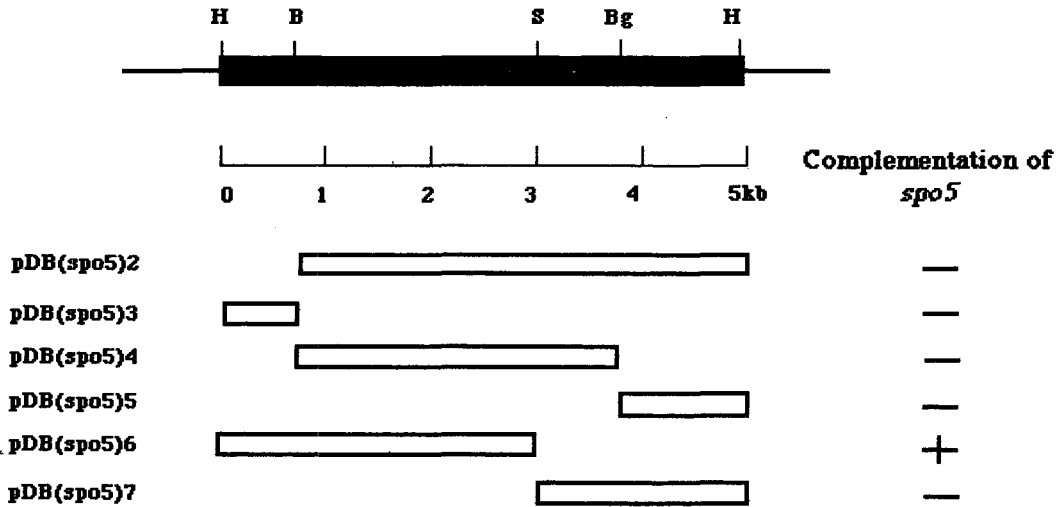


Fig. 3. Subcloning of the 5 kb *Hind III* fragment in plasmid *pDB (spo 5)1* containing the *spo 5* gene. Six kinds of deletion derivatives were constructed by digestion of the inserted DNA in *pDB (spo 5)1*. The DNA fragments were recovered by electroelution from agarose gels, ligated onto the vectro plasmid *pDB248'*. Complementation of the *spo 5* mutation in the different subclones in *pDB248'* is shown on the right of the figure. +, complementation; -, no complementation. Restriction enzymes used are: H, *Hind III*; B, *Bam HI*; Bg, *Bgl II*; S, *Sma I*. The line and open bars indicated the vector plasmid *pDB248'* and chromosomal DNA, respectively.

KD 70 (Table 1)에 형질전환으로 도입하여 얻어진 형질 전환체의 포자형성능력을 위상차 현미경으로 조사하였다 (Fig. 3). Fig. 3의 결과로부터 *spo 5* 변이를 상보시키는데 필요한 영역은 *Hind III*부터 *Sma I*까지의 약 3 kb가 필수적인 영역으로 확인되었다.

Northern hybridization

spo 5 유전자의 발현 조절과 해석

Cloning한 *spo 5* 유전자 영역으로 부터 전사되는 mRNA의 동정을 이행하기 위하여 Fig. 3의 DNA 단편을 probe하여 Northern hybridization을 이행하였다. RNA는 homotalic wild-type strain L975 (Table 1)를 SSL-N포자형성배지에서 7시간 배양한 세포로부터 조제한 poly (A)⁺ RNA를 이용하였다. 사용한 probe 종류 및 그 결과의 autoradiography는 Fig. 4에서 제시한다.

*Hind III*의 전장 5 kb의 2개의 전사산물이 검출되었으며, probe B

에서는 2.5 kb와 probe D에서는 3.2 kb의 전사산물은 우측의 *Xho I* 부위의 좌측영역으로부터 전사되어지는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로 주터 *spo 5* 변이를 상보하는 *Hind III/Sma I* 영역과 2.5 kb의 mRNA 전사산물이 일치 한다는 것을 확인 하였으며, 또한 2.5 kb의 mRNA는 subcloning에 의해서 필수영역이라고 생각했던 것처럼 *Bam HI* 부위의 probe와 hybridize하는 결과

로부터 이 2.5 kb의 전사산물이 *spo 5* 유전자의 mRNA임을 증명하였다 (Fig. 4).

spo 5 유전자 전사방향 결정

*Hind III/Bam HI*의 약 0.7 kb 영역을 *pUC118/119*에 삽입하여 구축한 recombinant plamid로부터 유전자의 전사 방향을 결정하기 위하여 ³²P로 표식한 단일가닥 DNA를 조제하여 2.5 kb의 mRNA와 hybridization을 검토하였다. 그 결과 *Hind III*에서 *Bam HI* 방향으로 신장시킨 ³²P로 표식된 DNA만이 hybridize 하였다. 이 결과로부터 2.5 kb의 mRNA의 전사방향은 *Bam HI*에서 *Hind III*로 전사되어지는 것을 입증하였다 (Fig. 4).

spo 5 유전자의 전사조건

분열효모의 *in vitro*에 있어서, 포자형서는 배지상의 질소원의 고갈 및 접합형 유전자좌의 heterozygote를 필요로 한다. 지금까지 clone화 되어진 *spo 6* 유전자의 전사 레벨에서 생각해 보면, 전사 과정에 있어서 2가지의 조건을 필요로 한다는 것이 명백하게 밝혀져 있다 (Kishida et al., 1986). 여기서, *spo 5* 유전자가 전사에 필요한 조건을 Northern hybridization 법에 의해서 조사하였다. 먼저, 접합형 유전자 *mat 1*에 관해서 hetero 접합체인 균주 CD16-1 (Table 1)를 최소배지에서 24시간 배양한 균체를 집균하여 합성포자 형성배지에 접종한 다음, 26°C에서 7시간 배양하여, 이들 균체로부터 poly (A)⁺ RNA를 조제하였다. 그리고 recombinant plasmid *pDB (spo 5)2*를

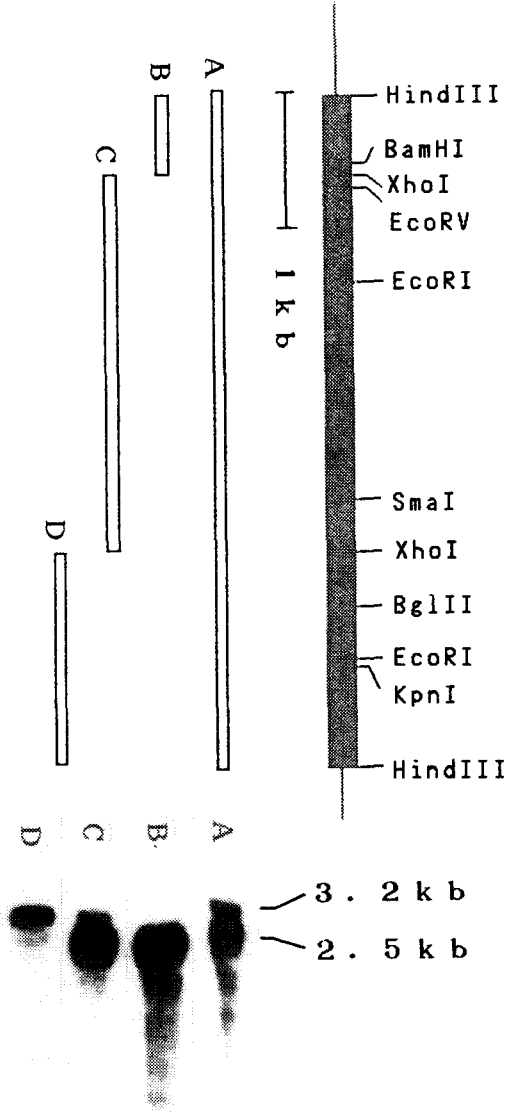


Fig. 4 Mapping of the *spo 5* mRNA by Northern blot analysis. Poly(A⁺) RNA was prepared from a wild type strain 1975 H90 cultured in SSI-N for 7 hr. Each fragment was subcloned on plasmid pUC119/118, and used for probe. Cloned plasmids were labelled with ³²P-dCTP by a random priming method. Each fragment, carried in the recombinant plasmid pUC119 or 118, designated as A~D, respectively. The designated subclones as probe were; A pUC(*spo 5*)1; B, pUC(*spo 5*)2; C, pUC(*spo 5*)3; D, pUC(*spo 5*)4.

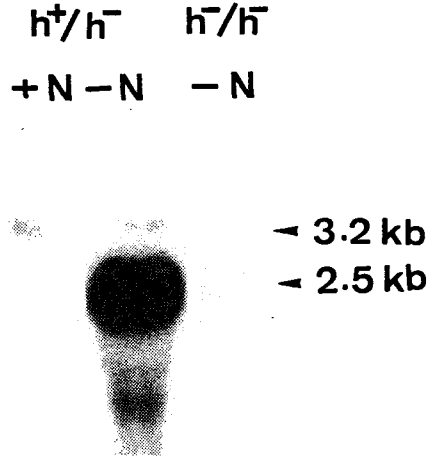


Fig. 5 Northern blot analysis of poly(A⁺) RNA prepared from diploid strains (CD16-1 and CD16-3). RNA was extracted from CD16-1 cultured in SSL+N for 18 hr (+N) or in SSL-N for 7 hr (-N). RNA was also prepared from CD16-3 cultured in SSL-N for 7 hr (-N). Hybridization probes were ³²P-labeled pDB (*spo 5*)6 containing a 3 kb *Hind III*/*Sma I* fragment in pDB (*spo 5*)1. SSL+N, SSL medium with nitrogen sources; SSL-N, SSL medium without nitrogen sources. h⁺/h⁻, heterogeneous strain; h⁻/h⁻, homogeneous strain.

nick translation법에 의해서 ³²P로 표식하여 probe DNA로 사용하였다. 이 결과 probe DNA와 hybridization하는 밴드가 3.2 kb와 2.5 kb에서 검출되었으며 (Fig. 5), *spo 5* 유전자를 함유하는 3 kb 영역으로부터 적어도 2종류의 mRNA가 전사되어지고 있다는 것을 확인할 수가 있었다. 또한 3.2 kb의 전사산물은 영양세포와 포자형성세포 사이에서는 존재하는데 반하여, 2.5 kb의 전사산물은 포자형성 세포에서만 검출되었다 (Fig 5). 그리고 전사레벨에서 접합형 유전자에 관하여 조사하였다. Homo 접합형 (h⁻/h⁻)인 2배체균주 CD16-3 (Table 1)을 질소원이 함유하지 않는 포자형성배지에서 동일한 방법으로 배양한 후, poly(A)⁺ RNA를 조하여 동일한 조건하에서 Northern 분석을 이행한 결과, 이들 세포에서는 3.2 kb에서만 전사산물이 검출되었으며, 2.5 kb에서는 전혀 전사산물이 검출되지 않았다 (Fig. 5). 이상의 결과로부터 *spo 5*-mRNA (2.5 kb)의 출현은 질소원이 고갈된 상태와 접합형 유전자좌의 hetero 접합성을 요구하는 것이 입증되었다. 따라서 *spo 5* 유전자의 발현은 환경요인 (질소원결핍)과 유전적 요인 (접합형 유전자좌의 구성)에 의한 전사차원에서 제어되어지고 있다는 것이 증명되었다.

고 찰

*S. pombe*는 숙주백터계가 잘 개발되어 있기 때문에 유전자 산물이 동정되지 않은 유전자도, genomic library를 형질전환법으로 도입하여 돌연변이를 상보하는 clone을 screening하여 목적하는 유전자를 clone화할 수 있다 (Beach et al., 1982). 이러한 방법에 의하여, *spo 5* 돌연변이를 상보하는 5 kb의 DNA 단편을 대장균, 효모 shuttle vector pTB248'의 *Hind* III 부위에 cloning하였다. 이 DNA 단편을 벡터의 삽입방향으로 역으로 연결시킨 다음, *spo 5* 변이체의 상보능력을 조사하였다 (Fig. 3). 그 결과, 결과에서 서술한 바와 같이 상보능력은 동일하였다. 이러한 사실은 삽입된 단편상이 유전자 발현은 벡터의 promoter로부터 전사가 일어난 것이 아니라, 삽입 단편상의 효모 고유의 promoter에 의해서 전사가 일어난 것으로 확인되었다.

따라서 clone화한 DNA 단편 배열상에는 번역영역 뿐만 아니라 promoter 영역이 포함될 수 있는 가능성이 높다. 결실변이 도입해석으로부터, *spo 5* 유전자는 *Sma* I부터 *Hind* III의 3 kb 영역에 존재하는 것을 시사 하였다 (Fig. 3). 이 결과는 *spo 5*-mRNA가 이 영역에서 약 2.5 kb 크기로 검출되었으며, 이 단편상의 유전해석으로부터 추측하여, 2.5 kb의 전사산물은 모순되지 않는다. 번역에 의해서, 최대 800 아미노산 잔기를 형성하는 단백질을 code할 수 있는 크기이다 (Fig. 4).

Northern 분석법에 의해서 *spo 5* 유전자의 전사를 조사하였다. 결과에서, 서술한 바와 같이, 이 유전자는 질소기아 조건하에서만 유전자가 발현하는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 분열효모는 영양이 풍부한 배지중에서 세포 분열에 의해서 증식하며, 영양기아상태가 되면 분열을 G 1기에서 정지하여 유성생식으로 들어가 최종적으로는 포자를 형성하게 된다. 감수분열과 포자형성에 필수적인 유전자의 대부분은 질소원이 결핍된 상태하에서 전사가 활성화 된다는 것이 증명되었다 (Shimoda et al., 1985 and 1987). 이러한 유전자들은 환경으로부터의 질소기아 시그널에 의한 동일한 메커니즘하에서 전사의 활성화가 일어나고 있다는 확실한 입증은 없지만, 현재까지의 연구결과에 의하면, 이들 유전자의 발현은 엄밀한 제어경로에 따라서 발현한다고 하는 모델을 지지하고 있다. 다시말해서, 질소기아시그널에 의한 감수분열의 개시는 7 개의 유전자 산물로부터 형성되어진 정밀한 제어계에 의해서 그 기능이 이루어지고 있다는 것을 증명하였다 (Iino et al., 1985 and McLeod et al., 1986). 이 모델에 의하면, 영양생장 조건에서는 부(-) 제어 인자인 *pat1*

protein kinase가, 정(+) 제어 인자인 *mei2* 단백질의 작용을 제어하기 때문에 감수분열이 개시되지 않는다. 질소기아 조건 상태하에 세포를 두게 되면, 먼저 접합형 유전자 *matPi*와 *matMi*의 전사가 유도되어, 구성적으로 발현하는 *matPc*, *matMc*의 산물과 함께 combination을 이루어 *mei3* 유전자의 전사를 유도한다 (Shimoda et al., 1987 and Fujioka et al., 1989). *mei3* 유전자는, *pat1* protein kinase 단백질과 결합하여 kinase활성을 저해한다. 이 결과, *mei2* 단백질이 작용하여 감수분열을 유도한다. 그리고 *mei2* 유전자의 전사는 접합형 유전자와는 독립적으로 질소기아 시그널에 의해서 활성화 되어진다 (Shimoda et al., 1987 and Fujioka et al., 1989, Watanabe et al., 1988). Fig. 4에서 제시한 것과 같이 *spo 5* 유전자의 전사는 접합형 유전자와의 heterozogote를 요구한다. 다시 말해서 h^-/h^-2 배체에서는 *spo 5*-mRNA가 검출되지 않았다 (Fig. 5). 이러한 결과는 명백하게 *spo 5*의 전사가 접합형 유전자에서 *mei2* 유전자에 이르는 제어시스템에 의존하고 있다는 것을 입증하는 것이다. 또한 *spo 3*, *spo 6* 유전자의 전사에 있어서도 동일한 제어기구가 작용하고 있다는 것이 입증되었다 (McLeod et al., 1987). 이들 포자형성 유전자가 질소기아 조건하에서, 전사가 활성화 되는 기구는, *matPi*와 *matMi*, *mei2* 등이 활성화되는 것과는 다른 제어인자에 의해서 조절되어진다고 생각할 수 있다. 감수분열의 정(+)인자인 *mei2* 산물이 포자형성 유전자의 전사 활성화인자로서 작용한다고 하는 것이, 하나의 모델이 될 것이다. 물론 *mei2* 유전자 뿐만 아니라, 그외의 다른 단백질에 의해서도 작용할 가능성도 있다. 그리고 포자형성 유전자군의 발현이 또한 단일 전이인자에 의해서 유도되는 것은 아니며, 이들 유전자에 관여하는 복합적인 인자들이 작용하고 있을 것으로 생각된다.

Cloning한 *spo 5* 유전자 염기배열의 결과로부터 얻어진, 유전해석으로부터 *spo 5* 단백질을 코드하는 (ORF) 영역의 아미노산 일차배열에 관하여 상동성을 검색한 결과, 이 *spo 5* 단백질은 해양, 연체동물인 *Amphioxus* 균류 유래의 Ca^{2+} 결합단백질 (CaVP)과 약 50% (conserved)의 상동성이 발견되었다 (Fig. 6). 일반적으로 Ca^{2+} 결합 단백질에 있어서 Ca^{2+} 결합 domain의 구조적 특징은 α -helix/loop/ α -helix의 2차구조를 형성하고 있기 때문에, CaVP과 결합하는 3개의 Ca^{2+} 결합 domain에서 상동성을 비교한 결과 제3 domain에서 약 50%의 상동성을 나타내고 있다 (Fig. 6). 이 결과로부터 상동성이 높게 보존된 제3 domain 아미노산 배열의 2차구조를 Robson 방법 (1987)에 의해서 컴퓨터로 검색했다 (Fig. 7).

최근 보고논문에 의하면 *S. pombe*로부터 분리되어진

요 약

분열효모 *S. pombe*의 포자형성은 배지상의 질소원의 고갈에 의하여 유도되어진다. 감수분열로부터 포자형성에 도달하는 과정에는 다수의 특이적인 유전자가 기능을 하고 있다. 본 연구에서는, 전포자막 구축에 필수적인 유전자 *spo 5*의 발현조절과 유전자의 메커니즘에 관하여 조사하였다.

spo 5 유전자를 보유하는 약 5 kb의 *Hind* III DNA 단편을 cloning 하였다. 이 단편으로부터 제한효소지도도를 작성하여 얻어진 DNA 단편을 probe로 하여, RNA blot-hybridization을 이행하였다. 이 결과, 최소배지의 hetro matting-type 균주 (CD16-1)로 부터 조제한 mRNA가 검출되었다. 그리고 이 전사산물을 전사레벨에서 해석하기 위하여, homo matting-type (CD16-3) 균주를 질소원이 함유되지 않은 포자형성배지에서 배양한 후, 동일한 방법으로 mRNA를 조제하여 Northern hybridization으로 조사하였다. 그 결과, 이들 세포에서는 3.2 kb에서만 전사산물이 검출되었으며, 2.5 kb의 mRNA는 검출되지 않았다.

이상의 결과로부터 *spo 5* 유전자를 coding하는 전사산물인 2.5 kb의 mRNA는 질소원의 고갈된 상태에서, 접합형 유전자좌의 hetro 접합성을 요구하는 것으로 입증하였다. *spo 5* 유전자의 전사발현은 질소원이 결핍과 접합형 유전자좌의 구성에 따른 환경요인과 유전적 요인에 의해서 제어되어지고 있다는 것을 입증하였다.

참 고 문 헌

- Breach, C., G. Muller and R. Ege. 1986. Genes involed in meiosis and sporulation of a yeast. *Mol. Gen. Genet.*, 102, 301~306.
- Beach, D. and P. Nurse. 1981. High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 290, 140~142.
- Beach, D., M. Piper and P. Nurse. 1982. Construction of *Schizosaccharomyces pombe* gene bank in a yeast bacterial shuttle vector and its use to isolate genes by complementation. *Mol. Gen. Genet.*, 182, 326~329.
- Bimboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapide alkali extraction procedure for screening recombinant plasmide DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7, 1513~1523.
- Gutz, H., H. Heslot, U. Leupold and N. Loprieno. 1974. *Schizosaccharomyces pombe*. Handbook of genetic. Plenum Press, New York, pp 395~446.
- Hirata, A. and K. Tanaka. 1982. Nuclear behaviour during conjugation and meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28, 263~274.
- Lino, Y. and M. Yamamoto. 1985. Mutants of *Schizosaccharomyces pombe* which sporulate in the haploid state. *Mol. Gen. Genet.*, 198, 416~421.
- Lino, Y. and M. Yamamoto. 1985. Negative control for the initiation of meiosis *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2447~2451.
- Jensen, R., G. F. Sprague Jr and I. Herskowitz. 1983. Regulation of yeast mating-type interconversion: Feedback control of HO gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3035~3039.
- Kishida, M. and C. Shimoda. 1986. Genetic mapping off eleven *spo* genes essential for ascospore fotation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, 10, 443~447.
- McLeod, M., M. Stein and D. Beach. 1988. The product of the *me3+* gene, expressed under contro of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *EMBO J.*, 6, 729~736.
- Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53, 154~162.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- McLeod, M. and D. Beach. 1986. Homology between the *ran1+* gene of fission yeast and protein kinase. *EMBL J.*, 5, 3665~3671.
- Robson, B. and J. D. Osguthorpe. 1987. Protein structure predication, p. 285~322. In Bishop, M. J and C. J. Rawling (ed), *Nucl. acid and protein sequence analysis a practical approach*, vol. 1. IRL press oxford, washington DC.
- Shimoda, C. and M. Uehira. 1985. Cloning of the *Schizosaccharomyces mei3* gene essential for the initiation of meiosis. *Mol. Gen. Genet.*, 201, 353~356.
- Shimoda, C., M. Uehira, M. Kishida, H. Fujioka, Y. lino and Y. Watanabe, M. Yamamoto. 1987. Cloning and analysis of transcription of the *mei2* gene responsible for initiation of meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.*, 269, 93~96.
- Tomas, P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5201~5205.
- Tanaka, K. and A. Hirata. 1982. Ascospore developmen in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*. *J. Cell Sci.*, 56, 263~279.
- Watanabe, Y., Y. lion, K. Furuhashi and C. shimoda, M. Yamamoto. 1988. The *S. pombe* *mei2* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *EMBO J.*, 7, 761~767.