

*Saccharomyces cerevisiae*의 감수분열 특이적 Protein Kinase인 Ime2의 역할

임선희 · 탁연수 · 선우양일*
동아대학교 자연과학대학 생물학과

출아효모에서는 질소원의 고갈과 *MATa/MATα* 이배체 세포의 감수분열기 특이적인 유전자 발현에 의해 체세포분열기의 G1기에서 감수분열기로의 진행이 결정된다. 이러한 두 경로는 감수분열기 특이적인 *IME* 유전자군에 의한 전사조절에 의해 활성화되어 감수분열기가 시작된다. 본 연구는 *IME2* 유전자가 protein kinase로서 감수분열기의 어떤 과정에 직접 관여하는가를 조사하기 위하여 먼저 PCR mutagenesis를 통하여 온도감수성 *ime2* 변이주를 분리하였다. 전체 62 개의 온도감수성 변이주 중에서 온도에 따른 포자형성능과 감수분열기 재조합 빈도에 대하여 명확한 차이를 나타내는 3 종류의 변이주들(*ts · ime2-11*, *ts · ime2-12*와 *ts · ime2-13*)을 선택하였다. 이러한 3 종류의 온도감수성 변이주를 이용하여 제한온도에서 감수분열기 초기과정 중 결손을 조사하기 위해, FACScan analysis를 한 결과 *IME2* 유전자가 감수분열기의 DNA 복제과정의 개시 및 완료에 관여함을 알 수 있었고, *his4* 혹은 *arg4 locus*에서 감수분열기 재조합 빈도의 측정으로 재조합 과정에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 더욱이 Δ *mre4* 파괴주에 *IME2* 유전자를 과다발현시켜 그 영향을 조사한 결과, 감수분열기 특이적인 protein kinase인 *IME2*와 *MRE4*가 감수분열기 초기과정인 재조합 과정에서는 동일한 경로에 작용한다는 것이 제시되었다.

KEY WORDS □ *IME2*, meiotic recombination, *S. cerevisiae*, spore formation

진핵세포의 세포주기는 크게 체세포분열기와 감수분열기로 나눌 수 있으며, 특히 감수분열기는 진핵세포만이 지니는 특징으로 분류할 수 있다. 진핵세포의 감수분열기에 대한 해석은 이러한 감수분열기에 특이적으로 관여하는 유전자에 대한 연구를 통해 가능하게 되었다(3, 16). 출아효모에서 감수분열기로의 진행은 환경적인 요인으로서 질소원 등의 영양고갈에 의해 G1기에서 체세포분열기로의 진행을 멈추게 되고, 유전적인 요인으로는 *MATa/MATα* 이배체 세포의 감수분열기 특이적인 유전자 발현에 의해 결정된다(7). 이러한 두 요인에 의해 일단 감수분열기로 들어간 세포는 감수분열기 전 DNA 복제과정(premeiotic DNA synthesis)과 감수분열기 재조합과정(meiotic recombination)을 거쳐서 2번의 연속적인 분열을 통해 최종산물인 4개의 반수체 포자를 형성한다. 체세포분열기와 감수분열기에 작용하는 유전자들에 대한 연구는 1970년대 이후부터 급속히 진행되어 왔으며, 두 세포분열기에 동시에 작용하는 유전자군과 어떤 특정 시기에만 작용하는 유전자군이 존재한다(10, 19). 세포주기의 진행에 대한 결정이 이루어지는 START 시점인 체세포분열기의 G1/S기와 감수분열기 초기과정인 감수분열 전 DNA 복제 시기는 각 세포주기의 도입에 대한 결정이 이루어지는 시기라는 점에서 그 유사성을 지닌다(19, 20). 이러한 시기에 작용하는 유전자군을 비교하면, 체세포분열기에서는 *CDC28*, *CDC4*, *CDC7* 등의 유전자들의 작용점을 거쳐 DNA 합성이 일어나지

만, 감수분열기에서는 *IME1*, *IME2*, *MCK1* 등과 같은 감수분열기 특이적인 유전자가 작용하고 있다(8, 21, 27). 특히 *IME2* protein kinase는 *CDC28*의 homolog로서, 감수분열기에서 *CDC28*의 기능이 *IME2*에 의해 대체되는 것으로 밝혀졌는데, 이는 각 발생단계에 따라 특이적 유전자가 작용하고 있음을 시사한다(2, 6, 26). 특히 *CDC7* 유전자는 감수분열기에서는 DNA 합성 이후에 작용하며, 체세포분열기에서는 DNA 합성 이전에 작용하여 두 시기에서 서로 다른 작용점을 갖는 것으로 알려져 있다(18). 이러한 보고들에서 감수분열기 특이적 유전자에 관한 연구에 의해 감수분열기 제어기작을 규명할 수 있을 것으로 사료된다.

감수분열기 도입 및 포자형성에 중요한 역할을 하는 유전자로서 *IME*(inducer of meiosis) 그룹이 잘 알려져 있고, *IME1*~*IME4*는 감수분열기 세포에서 높은 수준으로 발현되고 감수분열 과정에 필수적이다(23, 25, 26). 본 연구에 사용한 감수분열기 특이적 *IME2* 유전자는 Mitchell 등(17)에 의해 *MATa/MATα* 배수체에 multi-copy library를 도입한 후, 영양배지에서 감수분열기로 진행된 세포에서 처음 분리되었다. 이 유전자의 DNA sequencing을 분석한 결과는 645 아미노산을 coding하는 1935 bp의 ORF(open reading frame)를 지니고, 이 ORF의 아미노 말단 부위인 약 400 아미노산 영역에서 serine-threonine protein-kinase와 상동성을 나타내었다. 특히 체세포분열기에서 G1/S과 G2/M기 진행에 관여하는 Cdc28 단백질과 높은 상동성을 지닌다(23). Δ *ime2* 파괴주의 표현형은 포자 형성이 관찰되지 않고, 감수분열 전 DNA 합성이 일어나기 전에 감수분열기 진행을 멈

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 82-51-200-6789, Fax: 82-51-200-6789
E-mail : yisunwoo@daunet.donga.a.ac.kr

추며, 이러한 파괴주에서는 초기 혹은 후기의 감수분열과정에 관여하는 유전자의 발현이 유도되지 않는 것이 보고되었다(15). 감수분열기 초기단계에 속하는 감수분열 전 DNA 복제 및 재조합과정은 감수분열기 진행 및 완료에 매우 중요하며, 이 시기는 재세포분열기의 G1/S기에 해당한다고 생각되나 현재까지 이러한 과정들의 전사 제어기구에 대한 연구는 상세히 밝혀지지 않았다.

본 연구는 *IME2* protein kinase의 감수분열기에서의 작용점을 알아보기 위하여, 먼저 PCR mutagenesis 방법을 사용하여 온도 감수성 돌연변이 (temperature-sensitive mutant; *ts* 변이주)를 분리하였다. 이러한 온도 감수성 변이주는 허용온도와 비허용온도에서의 포자형성능에 의하여 분리되었으며, 처음 62 변이주 중에서 온도에 따른 그 표현형이 명확한 세 개의 변이주 (*ts · ime2-11*, *ts · ime2-12*, *ts · ime2-13*)를 선택하여 다음의 실험에 사용하였다. 각 변이주를 감수분열기로 유도한 후, 감수분열기 초기 단계에 속하는 감수분열 전 DNA 복제과정과 감수분열기 재조합과정에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 제한온도에서 감수분열 전 DNA 복제와 감수분열기 재조합 과정 양쪽에서 부분적으로 기능을 상실한 것으로 나타났다. 이는 *IME2* 유전자의 기능이 감수분열기의 도입 단계뿐만 아니라 감수분열 전 DNA 복제와 감수분열기 재조합 과정의 개시 및 진행에도 관여하는 것으로 보여진다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

Plasmid DNA의 증폭을 위해 사용한 대장균 균주는 *DH5α*로서 그 유전형은 *supE44 ΔlacU169(φ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1*이다. 형질전환에 사용된 LB 배지는 1% bactotryptone, 0.5% bacto yeast extract, 0.5% NaCl의 조성으로 하였고, 엠펜실린이 첨가된 배지는 멸균한 후, 50°C까지 식혀 엠펜실린의 최종농도가 50 μg/ml이 되도록 만들었다 (1). 이때 고체 배지는 1.5%의 agar를 첨가하여 사용하였다.

본 실험에서 사용한 출아효모의 균주는 Table 1에 나타내었다. 효모의 성장에 사용하는 영양 배지로는 YPD 배지(2% glucose, 2% polypeptone, 1% yeast extract)를 사용하였고, 형질전환이나 파괴주 균주의 제작에 사용하는 선택배지는 아미노산 합성배지(SD)로서 0.67% yeast nitrogen base과 2% glucose에 선택적으로 사용할 아미노산만을 제거한 1×아미노산 용액을 첨가하여 만들었다. 이때 사용한 아미노산 용액은 10×아미노산 용액을 stock 용액으로 하였고, 그 조성은 Kasier 등(9)이 기술한 방법에 의해 준비하였다. 균주의 포자형성을 위해서는 먼저 YPD 고체배지에서 균을 도말하여 단일 콜로니를 얻은 후 YPD 액체배지에서 하룻밤 배양하였다. 이 배양액을 감수분열기로 효율적으로 동조시키기 위해 포자형성 전 배지인 YPA (presporulation medium; 1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% potassium acetate)에 희석하여 12 시간 배양 후, 집균하여 동량의 SPM (sporulation medium; 0.3% potassium acetate, 0.03% raffinose)에 현탁하여 'return to growth' 등의 실험에 사

Table 1. Genotypes of yeast strains

Strain	Mating type	Genotype
NKY857	a	<i>lys2 ho::LYS2 ura3 leu2::hisG his4X</i>
NKY860	α	<i>lys2 ho::LYS2 ura3 leu2::hisG his4B</i>
NKY1238	a	<i>lys2 ho::LYS2 ura3 leu2::hisG his4X::LEU2-URA3 arg4-nsp</i>
NKY1240	α	<i>lys2 ho::LYS2 ura3 leu2::hisG his4B::LEU2 arg4-bgl</i>
SLD101	2n	NKY857×NKY860
SLD102	2n	NKY1238×NKY1240
SLD501(<i>Δime1</i>)	2n	Integration of <i>Δime1</i> plasmid into NKY857/860
SLD502(<i>Δime2</i>)	2n	Integration of <i>Δime2</i> plasmid into NKY1238/1240
SLH501	a	Integration of <i>Δime2</i> plasmid into NKY1238
SLH502	α	Integration of <i>Δime2</i> plasmid into NKY1240
SLH503	α	Integration of <i>ts · ime2-11</i> plasmid into NKY1240
SLD503	2n	SLH503×SLH501
SLH504	α	Integration of <i>ts · ime2-12</i> plasmid into NKY1240
SLD504	2n	SLH504×SLH501
SLH505	α	Integration of <i>ts · ime2-13</i> plasmid into NKY1240
SLD505	2n	SLH505×SLH501
KJC101	2n	<i>leu2/leu2 his4-4/his4-290 CAN1/can1^r ura3/ura3 ho::LYS2/ho::LYS2 trp1/trp1 CYH2/cyh2 ADE6/ade6 ade2/ade2 lys2/lys2</i>
IMD403 (<i>Δmre4</i>)	2n	KJC101 with <i>Δmre4/Δmre4</i>

용하였다. 포자형성용 고체배지는 1% potassium acetate와 0.1% yeast extract와 0.05% glucose와 2% agar를 첨가하여 만들었고, 균주를 도말한 후 3~4 일간 배양하여 사용하였다(1).

사용된 DNA 플라스미드

IME2 유전자는 Yoshida 등에 의해 처음 분리된 pMW1 플라스미드(30)를 사용하여, *BstI*과 *PstI*으로 잘라 *IME2*의 단편을 얻었다. 이 단편을 YCplac33(5) 플라스미드의 multicloning site인 *SmaI*과 *PstI*을 절제한 후, ligation으로 삽입하여 YCplac33-*IME2*를 만들어 이를 pSL501로 명명하였다. 그리고 PCR mutagenesis의 결과 얻어진 3 종류의 변이를 지닌 플라스미드에서 *IME2* ORF 영역 내의 *HindIII-EcoRI* 부위를 절제 후, YCplac33-*IME2* 플라스미드의 이 영역과 치환, 삽입하여 pSL503(*ts · ime2-11*), pSL504(*ts · ime2-12*)과 pSL505(*ts · ime2-13*) 플라스미드를 만들었다(Fig. 2). 또한 유전자를 과다발현(over-expression)시키기 위한 플라스미드로서, pGAL-*IME2*는 pYES2 플라스미드 (Invitrogene)의 multicloning site인 *SmaI*과 *PstI*에 *IME2*의 ORF 부분을 삽입하여 만들었다. 그리고 pGAL-*IME1*는

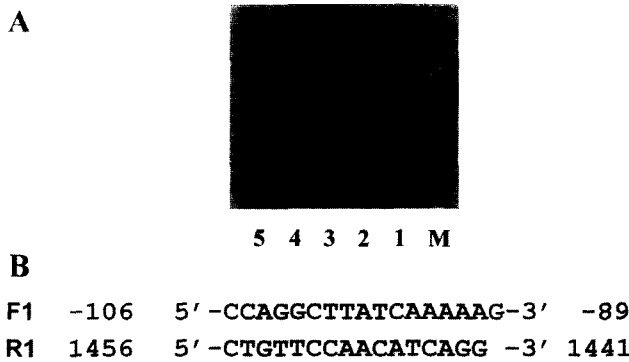


Fig. 1. PCR products and used primers. (A) A 1 kb ladder was used as a size marker. Lane 1~5 showed the PCR products of Mut1~5. PCR was performed according to the *Material and Methods*. One-tenth of the PCR products was run on a 0.7% agarose gel, and showed one band of ~1.4 kb in size. (B) Two oligomers were used in this PCR reaction.

YCpPGAL1-IME1(25)의 *Bam*HI 단편을 분리 정제하여 pYES 플라스미드의 *Bam*HI site에 삽입하여 만들었다(29).

PCR (Polymerase Chain Reaction) mutagenesis

IME2 유전자의 Random mutagenesis를 수행하기 위해 Leung 등(11, 28)의 방법을 다소 변형하여 사용하였다. PCR mutagenesis로 YCplac33-*IME2* 플라스미드에 삽입된 *IME2* ORF 영역 내의 *Hind*III-*Eco*RI 부위에 변이를 도입하기 위해, 그 바깥 부분의 염기서열을 합성하여 만든 forward primer(F1)과 reverse primer(R1)를 사용하였다(Fig. 1B). 변이 도입을 위해 실제 사용한 5 가지 조건은 Table 2에 표시하였다. primer의 사용

Table 2. Condition of PCR mutagenesis (단위 : μ l)

	Mut1	Mut2	Mut3	Mut4	Mut5
DNA (0.1 μ g/ml)	10	10	10	10	10
Buffer (kit)	10	10	10	10	10
5 mM MnCl ₂	10	-	10	10	10
β -mercaptoethanol	-	-	-	-	1
DMSO	-	-	-	-	3
forward primer (400 μ g/ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
reverse primer (400 μ g/ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
10 mM dGTP	2	2	3	3	3
10 mM dATP	2	1	1	0.6	1
10 mM dCTP	2	2	3	3	3
10 mM dTTP	2	2	3	3	3
H ₂ O	59	70	57	57.4	53
<i>Taq</i> enzyme (TaKaRa; 4~5 U/ml)	0.6	0.6	1	1	1
Running Cycle	25	25	35	35	35

농도는 400 μ g/ml로 하여 1.5 μ l를 사용하였고, 주형 DNA는 YCplac33-*IME2*를 *Pst*I으로 잘라 직선형으로 만들어 사용하였다. PCR 반응은 *Taq* polymerase kit(Takara)를 사용하여 Takara사의 Automated terminal cyler로 수행하였다. PCR에 의해 합성된 DNA단편은 *Hind*III-*Eco*RI 제한효소를 사용하여 잘라낸 후, 1% low-melting agarose gel로 전기영동하여 약 1.4 kb의 단편을 절제한 후, β -agarase I을 처리하여 정제하여 사용하였다. 정제한 PCR mutagenized DNA 단편을 삽입벡터인 YCplac33-*IME2*의 *Hind*III-*Eco*RI 부분을 잘라낸 후, 그 자리에 TaKaRa ligation kit을 이용하여 삽입하였다.

ts · *ime2* 돌연변이 플라스미드의 선별 및 변이주의 제작

온도 감수성 변이를 지닌 플라스미드를 선별하기 위하여, *IME2*의 파괴주인 SLD501(Δ *ime2*) 균주에 유전적 마커로서 *URA3*를 지닌 YCplac33-*ts* · *ime2* 플라스미드로 형질전환시켜 *Ura*⁺의 형질전환체를 얻었다. 각 형질전환체를 다시 SD-Ura 배지에 patch 하여 2일 정도 25°C에서 배양한 후, 다시 SPM 배지에 replica하여 25°C와 35.5°C에서 4일간 배양하여 감수분열기로 진행시켰다. PCR로 돌연변이를 도입한 플라스미드를 지닌 형질전환체들의 감수분열기로의 진행정도를 알아보기 위해 SPM 배지에서 배양시킨 균들을 광학현미경하에서 포자형성능을 살펴 보았다. 이때 25°C에서는 포자를 형성하나 35.5°C에서는 포자를 형성하지 않는 것을 선별하여 이를 *ts-ime2* 플라스미드를 지닌 것으로 간주하였다. 이러한 균주로부터 플라스미드를 회수하여, 다시 SLD501 균주에서 형질전환하여 재확인하였다. 선별된 *ts-ime2* 플라스미드 중에서 온도감수성의 표현형이 명확한 세 종류의 플라스미드(*ts* · *ime2*-11, *ts* · *ime2*-12, *ts* · *ime2*-13)를 선별하여, NKY860 균주에 삽입시켜 one-step gene disruption에 의해 변이주를 제작하였다(22). 온도감수성 조사는 교체배지에서는 25°C와 35.5°C, 액체배지에서는 25°C와 34°C에서 수행하였다.

Flow cytometry analysis

감수분열 전 DNA 복제 과정의 진행을 조사하기 위해 Flow Cytometry analysis를 수행하였다. YPD 액체배지에서 선별한 콜로니를 하룻밤 배양한 후, YPA 배지에서 12 시간 배양하고 다시 SPM 배지에 최종 1×10^7 cells/ml로 하여 25°C와 34°C로 나누어 감수분열기로 도입시킨다. 준비된 샘플을 4°C에서 70% 에탄올에 12 시간동안 고정시킨 후, 50 mM Na-citrate(pH 7.5)로 씻고 현탁한 후, sonication하여 각 샘플의 세포 수를 측정하였다. 각 샘플의 세포 수는 4×10^6 개의 세포로 0.5 ml의 50 mM Na-citrate에 현탁시킨 후, 12.5 μ l의 10 mg/ml RNase A(Sigma)를 첨가하여 50°C에서 1 시간동안 처리하였다. 처리 후 25 μ l의 proteinase K(20 mg/ml, Merk)를 첨가하여 50°C에서 1 시간 더 배양시킨 후 sonication하였다. 원심분리 후, 침전된 균을 DNA 염색액인 Propidium Iodide (PI; 10 μ g/ml, Sigma)를 포함한 50 mM Na-citrate를 0.5 ml 첨가하여 현탁하였다. PI가 첨가된 샘플을 4°C의 암 상태에서 하루동안 넣어둔 후, 다시 sonication하여 FACSscan analyzer(Becton Dickinson)로

Table 3. The mutation frequency of transformants containing the PCR products amplified under various condition

PCR condition	ts mutants/total transformant
Mut1	10/50 (20%)
Mut2	62/1506 (4.1%)
Mut3	16/153 (10.5%)
Mut4	No transformant
Mut5	5/59 (8.5%)

분석하였다(4).

감수분열기 재조합 과정

각 형질전환체 균주들과 온도감수성 변이주들을 위의 방법 (*ts · ime2* 돌연변이 플라스미드의 선별 및 변이주의 제작)으로 25°C와 35.5°C에서 감수분열기로 도입시킨 후, SD-His 배지에 replica하여 25°C에서 3일간 배양하여 *his4* locus(*his4-X/his4-B*)에서 His⁺의 재조합체가 생성되는지를 조사하였다. 또한 'return-to-growth' 법으로 각 온도감수성 변이주들의 감수분열기 재조합 과정의 빈도를 *his4* locus(*his4-X/his4-B*)와 *arg4* locus(*arg4-nsp/arg4-bgl*)에서 조사하였다. 사용한 콜로니를 액체 YPD 배지에서 하룻밤 배양하여, 이를 포자형성 전 배지인 액체 YPA 배지에 1/100로 희석하여 접종한 후(2~5×10⁶ cells/ml), 25°C에서 12 시간 배양하여 약 1~2×10⁷ cells/ml이 되도록 배양하였다. 배양된 세포를 SPM으로 현탁한 후, 같은 양의 SPM에 접종하였다. SPM에 현탁된 균주를 양분하여 각각 25°C와 34°C에서 250 rpm으로 진탕 배양하면서 각 시간별로 sampling하여 희석한 후, 영양배지인 YPD와 선택배지인 SD-His 배지에 도말하여 25°C에서 4일간 배양하였다. 이때 YPD와 SD-His와 SD-Arg의 배지에서 형성된 콜로니 수를 세어 재조합 빈도를 측정하였다.

결과 및 고찰

PCR mutagenesis

*IME2*의 유전자가 삽입된 YCplac33-*IME2* 플라스미드 내의 *HindIII-BamHI*의 1.4 kb 영역에서 실험방법에 따라 PCR mutagenesis를 수행하였다. PCR 반응은 Leung 등(11, 28)의 방법을 다소 변형하여 94°C에서 1 분, 50°C에서 1 분, 70°C에서 4 분으로 25 cycles를 수행하였다(Table 2). 각 5 종류의 조건은 복제효소의 정확성을 결여시키는 MnCl₂의 농도와 dNTP의 농도 중에서 dATP만을 감소시켜 다른 dNTP와의 비율을 다르게 하여 돌연변이를 유발시켰다(Fig. 1A). 이러한 PCR products를 *BamHI-EcoRI*으로 처리한 후, 다시 YCplac33-*IME2*의 *BamHI*과 *EcoRI*의 단편과 치환하여 YCplac33-*ts · ime2*의 mutant plasmid library를 만들었다. 이러한 5 종류의 library를 가지고 효모의 SLD502 균주에 형질전환 시킨 후, 전체 형질전환체에 대한 온도감수성 돌연변이주를 포자형성능으로 조사하였다(Table 3). 이 5 가지 library 중에서 그 돌연변이 빈도가 가

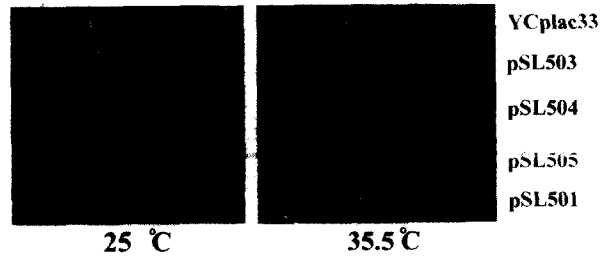


Fig. 2. Meiotic recombination was measured by intragenic recombination of *his4* heteroalleles to His⁺. Patches of transformants were grown for 4 days on a SPM plate at 25°C or 35.5°C and then replica plated to SD lacking histidine (SD-His) to detect His⁺ recombinants. The photograph shows the SD-His plates after incubation for 3 days at 25°C. The transformants carry the single-copy plasmid pSL501 (YCplac33-*IME2*), pSL502 (YCplac33-*ts · ime2*), pSL503 (YCplac33-*ts · ime2*), pSL504 (YCplac33-*ts · ime2*), or YCplac33 with no insert.

장 낮은 Mut2 조건에서 만들어진 돌연변이주만을 다음 실험에 사용하기로 하였다. 이러한 조건은 점돌연변이가 주로 일어난다고 보고되어진 Leung 등(9, 21)의 방법에 의한 실험과도 비슷한 빈도를 나타내었다.

***ts · ime2* 플라스미드의 선별 및 변이주 제작**

위의 Mut2 조건에서 얻어진 *ts · ime2* plasmid library를 SLD501 균주에 형질전환시켜 약 1500 개의 Ura⁺의 형질전환체를 얻어 *IME2*의 포자형성에 대한 온도 감수성을 조사하였다. 재료 및 방법에서 설명된 선별방법에 의해 25°C와 35.5°C에서 감수분열기로 도입시킨 후, 62개의 온도감수성 형질전환체를 분리하였다. 이러한 온도감수성 형질전환체 중 표현형이 명확한 몇 균주만을 분리하기 위하여 replica 방법에 의한 감수분열기 재조합 빈도를 조사하였다 (Fig. 2). 재조합빈도는 *his4* locus (*his4-X/his4-B*)에서 His⁺의 재조합체가 25°C에서는 생성되지만 35.5°C에서는 생성되지 않는 형질전환체를 분리하여 최종적으로 3 종류를 선택하였다.

이러한 형질전환체는 감수분열기 초기과정에 결손을 나타내는 것으로 보여지지만, *ts · ime2* 플라스미드의 성질은 균주의 성장 속도 혹은 플라스미드의 보유율 등에 의해 많은 차이를 나타낼 수 있으므로 염색체 상의 *IME2* 유전자와 *ts · ime2-11*, *ts · ime2-12*와 *ts · ime2-13*을 상동성을 이용하여 치환시킴으로서 3 종류의 반수체 변이주를 제작하였다(Table 1). 이 반수체 변이주 (SLH503, SLH504, SLH505; *MAT α*)를 감수분열기로 도입시키

Table 4. The frequency of spore formation in wild-type and *ts · ime2* strains

Strains	25°C	34°C
SLD502	75~85%	70~80%
SLD503	15~20%	0%
SLD504	30~40%	1~2%
SLD505	15~20%	0%

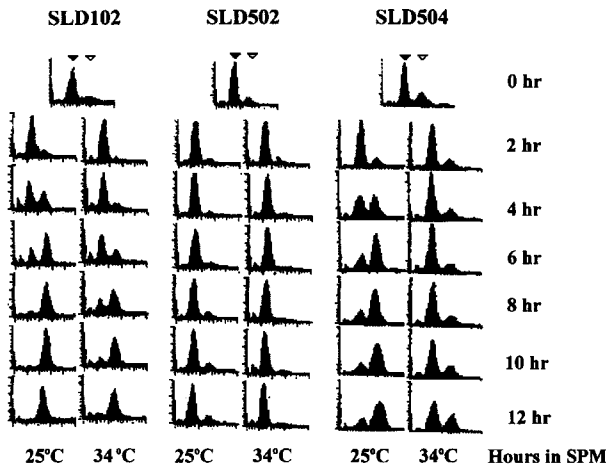


Fig. 3. Flow cytometry analysis of wild-type(SLD102), $\Delta ime2$ disruptant (SLD502) and $ts \cdot ime2$ mutant(SLD504) strains. Cells were grown at 25°C or 34°C during meiosis and taken at various time after transfer to sporulation medium. The peaks of DNA contents are indicated as black (\blacktriangledown ; 2C) and white (\triangledown ; 4C) inverted triangle.

기 위하여 $\Delta ime2$ 반수체 변이주 (SLH501; *MATa*)와 접합시켜 배수체로 만들었다(SLD503, SLD504, SLD505; Table 1). 이때 *IME2* 유전자는 우성의 표현형을 지니므로 $ts \cdot ime2$ 의 성질을 나타낸다. 이렇게 만들어진 3 종류의 배수체 변이주들을 사용하여 감수분열 초기진행과정에 대한 온도의 효과를 살펴보기 위해, 먼저 감수분열기 최종산물인 포자형성을 조사하였다(Table 4). 각 변이주의 온도에 대한 효과는 액체배지와 고체배지에서 각각 그 제한 온도가 다소 차이를 나타내었다. 고체배지에서의 SLD503과 SLD505는 25°C에서는 포자형성이 약 15~20%로 나타났고, 34°C, 36°C에서는 포자형성을 하지 않았다. SLD504는 고체상태의 SPM 배지의 25°C에서는 약 30~40%의 포자를

형성하였으나, 34°C에서는 약 1~2%, 36°C에서는 전혀 형성하지 않았다. 이러한 포자형성율은 각 균주당 약 1000 개의 세포를 관찰하여 나타내었다. 고체배지와 달리 액체배지에서는 온도 감수성의 차이를 나타내었고, 세 종류의 변이주 모두 포자형성이 가능하지 않는 최저온도는 34°C로 나타났다. 액체배지에서의 포자형성율은 24 시간에 고체배지와 유사한 빈도를 나타내었다. 이는 염색체 상에서 치환된 $ts \cdot ime2$ 단편이 플라스미드로 존재할 때와 동일한 표현형을 지니고 있음을 시사한다. 그러므로 이렇게 제작된 배수체 변이주들을 사용하여 감수분열기 초기과정에 대한 조사를 25°C와 34°C의 액체배지에서 각 시간별로 조사하였다 (meiotic time course).

***ts · ime2* 변이주에서의 감수분열 전 DNA 복제과정**

야생주(SLD102), $\Delta ime2$ (SLD502) 그리고 $ts \cdot ime2$ 변이주들 (SLD503, SLD504, SLD505; Table 1)을 meiotic time course를 수행하기 위하여 실험방법에 기술된 것과 같이 YPD, YPA 및 SPM의 액체배지를 사용하여 감수분열기로 도입시켰다. 감수분열기로 들어간 세포의 DNA의 합성과정을 시간의 경과에 따라 Flow cytometry analysis를 통하여 살펴보았다. 야생주에서는 25°C에 비해 34°C에서의 DNA 합성속도가 다소 늦어졌으나 8 시간 이후에는 대부분의 세포가 합성의 완료를 나타낸 반면, $\Delta ime2$ (SLD502)에서는 두 온도에서 모두 합성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 그러나 위의 $ts \cdot ime2$ 변이주들은 25°C에서는 야생주에 비해 속도는 다소 느리지만 DNA 합성이 일어났으나, 34°C의 제한온도에서는 $\Delta ime2$ 파괴주와는 달리 DNA 복제의 피크가 10 시간 이후에서부터 복제 전의 2C에서 복제 후의 4C로 약 15~20% 정도의 이동을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 *IME2* 유전자가 감수분열기의 도입부분에만 관여하여 전체 포자형성을 정지시키는 것이 아니라, 초기과정인 DNA 복제과정 자체의 진행에도 직접 관여한다고 생각되어진다.

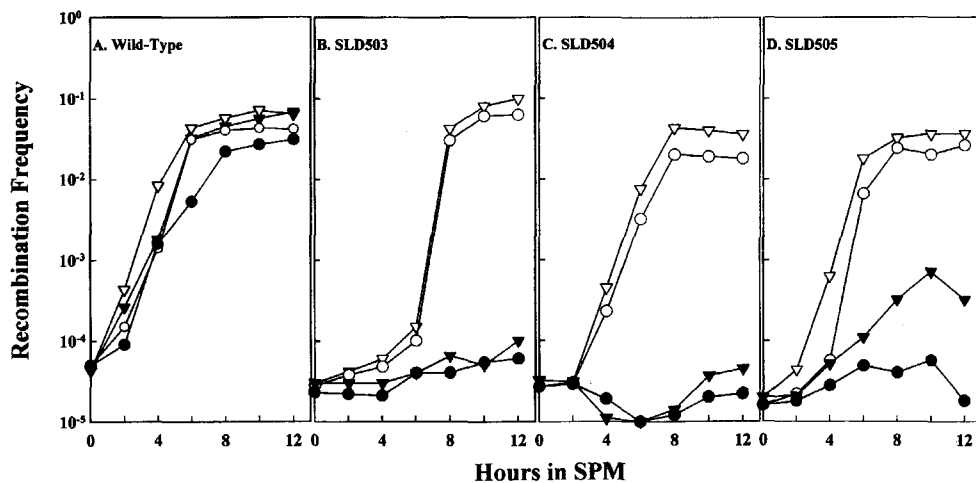


Fig. 4. Analysis of recombination frequency during meiotic time course between wild type and $ts ime2$ mutant cells measured the 'return to growth' method. Intragenic recombination at his4 locus (\triangledown , 25°C; \blacktriangledown , 34°C) and at arg4 locus (\circ , 25°C; \bullet , 34°C) during meiosis were examined. Cells were grown in YPA to 2×10^7 cells/ml were collected and suspended into the same density. At approximate times after incubation in SPM at 25°C or 34°C, aliquots were taken and plated onto YPD, SD-His and SD-Arg plates.

ts · ime2 변이주에서의 감수분열기 재조합과정

위의 야생주(SLD102)와 *ts · ime2* 변이주들(SLD503, SLD504, SLD505)의 meiotic time course 샘플을 FACScan analysis에 사용하고 동시에 감수분열기 재조합 과정을 관찰하기 위하여 *his4*와 *arg4* locus에서 유전자내 재조합(intragenic recombination)의 빈도를 조사하였다. 야생형에서는 두 locus 모두에서 재조합 빈도가 체세포분열기의 자연발생적 유발빈도를 나타내는 0 시간보다 감수분열기 도입 후 약 1000 배의 증가함을 나타내었다(Fig. 4). 온도감수성 *ime2* 변이주인 SLD503, SLD504, SLD505 균주에서는 25°C에서는 야생형과 비슷한 패턴으로 재조합 빈도를 나타내었지만, 제한온도인 34°C에서는 재조합 빈도가 약 10 배 정도의 증가만을 나타내었다(SLD505).

감수분열기의 진행과정은 일반적으로 DNA 복제를 거쳐 재조합 과정이 일어나는 것으로 알려져 있다(3). 그러나 최근의 실험들은 감수분열기의 복제 과정과 재조합 과정은 시간적으로 서로 겹쳐서 생기는 과정으로 보고하고 있다(19). 이러한 과정은 감수분열기만의 특징으로 이 두 과정이 매우 연관되어 일어나며 또한 많은 부분의 유전자들이 이 과정들에 동시에 이용되기도 한다(14). 위의 두 실험은 *IME2* 유전자가 전사인자나 혹은 protein kinase로서 이용되어 두 과정에 동시에 관여할 수도 있는 것으로 보여진다. 또한 이러한 초기과정의 조사를 통하여 *IME2* 유전자의 다양한 기능점에 대한 해석이 가능하다.

Δmre4 파괴주에서의 *IME2* 유전자의 과다발현의 효과

MRE4 유전자는 Leem과 Ogawa(12)에 의해 분리된 감수분열기 특이적인 serine-threonine protein kinase로서, 감수분열기 재조합과정에 필수적임이 보고되었다(13). 현재까지 알려진 감수분열기 특이적인 protein kinase로는 이 *MRE4*와 *IME2*가 분리되어 있어, *Δmre4* 파괴주에서의 *IME2*의 overexpression 효과를 조사하였다. 균주는 Table 1에 나타난 KJC101(야생주)와 IMD403(*Δmre4*)를 사용하여, 감수분열기 특이적인 전사인자로 알려진 pGAL-*IME1*과 pGAL-*IME2*를 각 균주에 형질전환 시킨 후, 영양배지(mitosis)와 SPM 고체배지(meiosis)에서 3일간 배양한 후, *his4* locus에서 재조합 빈도를 조사하였다. 그 결과, 이 두 플라스미드로 각각 형질전환된 야생주는 영양배지 및 포자형성 배지에서 높은 빈도의 재조합이 유도되어, Smith와 Mitchell(24)의 연구와 일치하는 결과를 나타내었다. 그러나 pGAL-*IME1* 플라스미드에 의해 형질전환된 *Δmre4* 파괴주에서는 흥미롭게도 감수분열기 재조합 과정의 결손이 극복되어 재조합이 유도되었다. Smith와 Mitchell(24)의 연구에서는 감수분열기 초기 단계에 관여하는 균주로서 *spo11*을 사용하였으나 어느 경우에도 그 결손이 극복되지는 않았다. 이는 감수분열기 재조합 경로는 적어도 두 개로 나뉘어져 있으며, 이 중 한 경로에는 *IME1* 유전자가 작용하며, 다른 한 쪽은 *IME2*→*MRE4*의 경로로 간주된다. 이는 *MRE4*의 유전자 발현이 *Δime2*에서 나타나지 않으나 *Δmre4* 변이주에서는 *IME2* 유전자가 발현되므로 이러한 순서가 가능하다. 그러므로 Fig. 5의 결과로서 *IME1*의 경로가 재조합 과정에서 좀 더 주된 경로이며, 이 경로의 과다 발현으로 다른 경로의 결손이 극복될 것으로 사료된다.

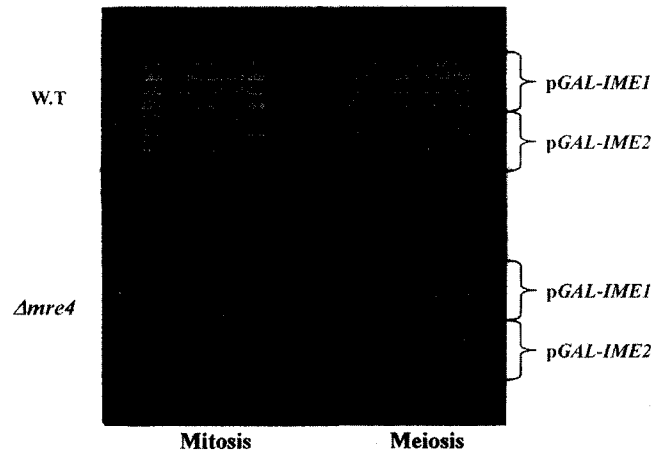


Fig. 5. Stimulation of recombination by increased *IME1* or *IME2* dosage in vegetative or sporulated cells. Patches of transformants with pGAL-*IME1* or pGAL-*IME2* in wild-type and *Δmre4* cells were grown in SD-Ura (mitosis) or SPM (meiosis) for 3 days at 30°C and then replica plated to SD lacking histidine (SD-His) to detect His⁺ recombinants during mitosis and meiosis. The photograph shows the SD-His plates after incubation for 2 days at 30°C.

출아효모에서 *IME2* 유전자는 감수분열기 초기, 말기의 유전자들의 전사에 필수로서, 이 유전자의 파괴주는 DNA 복제 이전에 기능을 상실하여 포자형성과정에 들어가지 못한다고 보고되었다(21, 24). 그러므로 *IME2* 유전자는 DNA 복제과정의 도입에 필수적인 유전자로 생각되었다(16, 24, 30). 이와 유사한 기능을 지닌 유전자로는 *IME1*~*IME4* 유전자들이 있고(18), 이 중 *IME1*과 *IME2*의 과다발현은 영양배지에서도 감수분열 과정을 수행하는 것으로 보고되었다(24). 현재까지의 이러한 보고들은 주로 유전자의 발현상태를 중심으로 한 전사인자에 관한 연구가 대부분이었으나, 본 연구에서는 protein kinase인 *IME2* 유전자가 감수분열기의 어떤 과정에 직접 관여하는가를 PCR mutagenesis를 통하여 3 종류의 온도감수성 변이주를 제작한 후, 그 결손을 제한온도에서 살펴보았다. 그 결과 FACScan analysis에서는 *IME2* 유전자가 감수분열기의 DNA 복제과정의 개시 및 완료에 관여함을 알 수 있었고(Fig. 3), 그리고 감수분열기 재조합 빈도의 측정으로 재조합 과정에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 과다발현 실험의 결과에서 감수분열기 재조합 과정에 protein kinase인 *IME2*와 *MRE4*가 동일한 과정에 관여한다는 것이 시사되었다. 이러한 결과들을 기초로 *IME2* 유전자는 감수분열기 특이적 serine-threonine protein kinase로서 감수분열기의 초기과정에 필수적이며, 유사분열기와 같이 감수분열기의 각 단계에서도 인산화 과정이 중요한 역할을 할 것으로 추측되어진다. 현재 단백질 인산화 과정은 출아효모에서는 포자형성 개시의 선결조건으로 *RAS/cAMP* 경로를 통하여 유도된다고 생각되어지고 있다(15, 18). 따라서 인산화 과정의 표적이 되는 유전자 산물의 분리는 *IME2* 유전자 산물의 기능에 대해 좀 더 명확한 증거를 제시할 것으로 생각되며, 본 연구에서 분리된 온도감수성 변이주를 사용하여 인산화 과정의 표적이 되는 유전자 산물의 분리를 시도할 수 있으리라 사료된다.

참고문헌

1. Adams, A., D.E. Gottschling, C.A. Kaiser, and T. Stearns. 1997. *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
2. Dirick, L. and L. Goetsch, G. Ammerer, and B. Byers. 1998. Regulation of meiotic S phase by Ime2 and Clb5,6-associated kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. **281**, 1854-1857.
3. Esposito, R.E. and S. Klapholz. 1981. Meiosis and ascospore development. pp. 211-287. *In* The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance. J.N. Strathern E.W. Jones, J.R. Broach (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
4. Futcher B. 1993. Analysis of Cell Cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *In* The Cell Cycle: a Practical Approach. P. Fantes and R. Brooks, eds., Oxford University Press, Oxford, pp. 69-92.
5. Gietz, R.D. and A. Sugino. 1988. New Yeast-*Escherichia coli* shuttle Vectors Constructed with *in vitro* Mutagenized Yeast Genes Lacking Six-base Pair Restriction Sites. *Gene*. **74**, 527-534.
6. Kawaguchi, H., M. Yoshida, and I. Yamashita. 1992. Nutritional Regulation of Meiosis-specific Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biocom.* **56**, 289-297.
7. Kassir, Y. and G. Simchen. 1976. Regulation Mating and of Meiosis in Yeast by the Mating-type Region. *Genetics*. **82**, 187-206.
8. Kassir Y., D. Granot, and G. Simchen. 1988. *IME1*, a Positive Regulator Gene of Meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell*. **52**, 853-862
9. Kaiser C., S. Michaelis and A. Mitchell. 1994. *Method in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, pp. 207-217.
10. Kurtz S. and S. Lindquist. 1984. Changing Pattern of Gene Expression During Sporulation in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**, 7323-7327.
11. Leung D.W., E. Chen, and D.V. Goeddel. 1989. A Method for Random Mutagenesis of a Defined DNA Segment Using a Modified Polymerase Chain Reaction. *J. Methods Cell. Mol. Biol.* **1**, 11-15.
12. Leem, S.H. and H. Ogawa. 1992. The *MRE4* gene encodes a novel protein kinase homologue required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **20**, 449-457.
13. Leem, S.H. 1997. Improved Method for High Efficiency Transformation of *E. coli*. *Biochem. News: Review* **17**, 132-135.
14. Leem, S.H. C.-N. Chung, Y. Sunwoo, and H. Araki. 1998. Meiotic role of *SWI6* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3154-3158.
15. Magee, P.T. 1987. Transcription During Meiosis. *In* Meiosis, B. Mones (ed.), Academic Press. Inc., New York. pp. 355-382.
16. Malone, R.E. 1990. Dual Regulation of Meiosis in Yeast. *Cell*. **61**, 375-378.
17. Mitchell, A.P., S.C. Driscoll, and H.E. Smith. 1990. Positive Control of Sporulation Specific Genes by the *IME1* and *IME2* Products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 104-2110.
18. Mitchell, A.P. 1994. Control of Meiotic Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **58**, 56-70.
19. Murry, A. and T. Hunt. 1993. The Meiotic Cell Cycle. *In* the Cell Cycle, Oxford University Press, Oxford. pp. 167-182.
20. Murry, A. and T. Hunt. 1993. The Transition from G1 to S phase, *In* the Cell Cycle. Oxford University Press, Oxford. pp. 89-116.
21. Neigeborn, L. and A.P. Mitchell. 1991. The yeast *MCK1* Gene Encodes a Protein Kinase Homolog that Activates Early Meiotic Gene Expression. *Genes Dev.* **5**, 533-548.
22. Rothstein, R.J. 1983. One-step Gene Disruption in Yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202-211.
23. Sherman, A., M. Shefer, S. Sagee, and Y. Kassir. 1993. Post-transcriptional Regulation of *IME1* Determines Initiation of Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 375-384.
24. Smith, H.E. and A.P. Mitchell. 1989. A Transcriptional Cascade Governs Entry Into Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2142-2152.
25. Smith, H.E., S.Y. Su, L. Neigeborn, S.E. Driscoll, and A.P. Mitchell. 1990. Role of *IME1* Expression in Regulation of Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6103-6113.
26. Smith, H.E., S.E. Driscoll, R.A.L. Sia, H.E. Yuan, and A.P. Mitchell. 1993. Genetic Evidence for Transcriptional Activation by the Yeast *IME1* Gene Product. *Genetics*. **133**, 775-784.
27. Su, S.Y. and A.P. Mitchell. 1992. Identification of Functionally Related Genes that Stimulate Early Meiotic Gene Expression in Yeast. *Genetics*. **133**, 67-77.
28. Struhl, K., D.T. Stinchcomb, S. Scherer, and R.W. Davis. 1979. High Frequency Transformation of Yeast; Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules. *Proc. Natl. Sci. USA*. **76**, 1035-1039.
29. Suzuku, K., Y. Imai, I. Yamashita, and S. Fukui. 1983. *In vivo* Ligation of Linear DNA Molecular to Circular Forms in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **155**, 747-754.
30. Yoshida M., H. Kawaguchi, Y. Sakata, K.I. Kominami, M. Hirano, H. Shima, R. Akada, and I. Yamashita. 1990. Initiation of Meiosis and Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* Requires a Novel Protein Kinase Homologue. *Mol. Gen. Genet.* **221**, 176-186.

(Received October 14, 1999/Accepted November 24, 1999)

ABSTRACT : A Specific Role of Ime2, Meiosis-specific Protein Kinase, in the Early Meiotic Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

Sun-Hee Leem, Yon-Soo Tak and Yangil Sunwoo* (Department of Biology, Faculty of Natural Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea)

Entry into meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two major factors: the cell type (*MATa/MAT α*) and the nutritional state (starvation) of the cell. The two independent regulations act through *IME1* and *IME2* expression to initiate meiosis. *IME2* encodes a meiosis-specific protein kinase, and it enabled *MATa/MAT α* diploid cells to undergo meiosis and sporulation. The PCR mutagenesis method was applied for the isolation of thermosensitive *ime2* mutants. Among sixty two mutants isolated from the phenotype of defective spore formation under the restrictive temperature, three with the most easily observed temperature-sensitive phenotype (*ts·ime2-11*, *ts·ime2-12* and *ts·ime2-13*) were selected for further study. To understand the detailed functions of *IME2*, we examined the defects of these mutants in the early meiotic pathway including the premeiotic DNA replication and meiotic recombination. At the restrictive temperature, the *ime2* mutants were defective in premeiotic DNA replication and exhibited decreased level in meiotic recombination. These results suggest that the *IME2* gene plays essential role in meiotic recombination pathway as well as premeiotic DNA replication. As the result of the *IME2* overexpression in $\Delta mre4$, moreover, it was suggested that the *IME2* and *MRE4* genes act on the same pathway of initiation step in meiotic recombination.