

CYC8에 의한 *rad53* 돌연변이의 표현형 억제에 대한 연구

박경준 · 최도희 · 권성훈 · 김준호 · 배성호*

인하대학교 자연과학대학 생명과학과

Phenotypic Suppression of *Rad53* Mutation by CYC8

Kyoung-Jun Park, Do-Hee Choi, Sung-Hun Kwon, Joon-Ho Kim, and Sung-Ho Bae*

Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

(Received February 26, 2009/Accepted March 15, 2010)

RAD53 functions as an effector kinase of checkpoint pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, which plays a central role to regulate many downstream cellular processes in response to DNA damage. It also involves in transcriptional activation of various genes including RNR genes which encode the key enzyme required for dNTP synthesis. In this study, we identified CYC8 as a suppressor for the hydroxyurea sensitivity of *rad53Δ* mutation. *Rad53Δ* mutant transformed with a multi-copy plasmid containing CYC8 showed increased hydroxyurea resistance. In contrast, TUP1 which forms a complex with CYC8 did not function as a suppressor. In the case of mutations, both *cyc8Δ* and *tup1Δ* suppressed hydroxyurea sensitivity of *rad53Δ*. Since CYC8 can propagate as a prion in yeast, overexpression of CYC8 induced misfolding of the normal CYC8 proteins, resulting in dominant *cyc8⁺* phenotype. Therefore, it is suggested that CYC8 can act as a multi-copy suppressor due to its prion property. It was observed that the levels of RNR transcription were increased in the yeast strains containing either multi-copies of CYC8 gene or *cyc8Δ* mutation, suggesting that the increased level of RNR will elevate the intracellular pools of dNTPs, which, in turn, suppress the phenotype of *rad53Δ* mutation.

Keywords: CYC8, prion, RAD53, ribonucleotide reductase, TUP1

검문지점(checkpoint)은 잘못된 염기쌍 형성(mismatched base-pairing), 이중가닥 절단(double-strand break), 복제분기점(replication fork)의 정지 등 여러 종류의 DNA 이상에 대응하여 유전체의 안전성을 유지하는데 매우 중요한 감시 체계이자 신호 체계이다. 이러한 DNA 이상은 DNA 복제, DNA 수리(repair), DNA 재조합(recombination), sister chromatid cohesion 과 같은 과정에서 주로 생성된다(3, 15). 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 MEC1과 RAD53은 각각 포유동물의 ATR과 Chk2의 homolog이며, 모든 검문지점에서 세포주기를 멈추는데 중심적인 역할을 하는 검문지점 인산화 효소로서 효모의 생존에 필수적인 유전자이다(2, 4).

MEC1과 RAD53은 검문지점 경로에 관여하는 것 외에도 DNA 손상에 반응하는 전사 활성화 과정에도 역할을 한다(13). Ribonucleotide reductase (RNR)는 MEC1과 RAD53에 의해 전사 조절되는 표적 유전자 중의 하나로서, ribonucleoside

diphosphate (NDP)를 deoxy 형태(dNDP)로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소이다. MEC1과 RAD53은 DNA 손상에 반응하여 DUN1을 활성화시키고, 활성화된 DUN1은 RNR 유전자의 전사를 유도한다(7, 21). 효모에서 deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)의 생성은 전적으로 RNR 효소에 의존하며(11), DNA 손상은 RNR 유전자의 발현을 증가시켜 dNTP 수준을 6-8배 정도 증가시킨다(5). dNTP의 증가는 translesion DNA 합성과 같은 DNA 수리 경로를 촉진시키며 DNA 손상 이후의 효모 세포의 생존율을 현저히 향상시킨다.

진핵생물의 RNR은 큰 소단위(subunit)와 작은 소단위로 구성된 $\alpha_2\beta_2$ 의 이형사량체(heterotetramer)이며, 효모에는 4개의 RNR 유전자가 있다(12, 19). RNR1과 RNR3는 서로 교체할 수 있는 큰 소단위 단백질을 암호화한다. RNR1이 주된 형태를 이루고, RNR3는 정상적인 조건에서는 매우 낮은 수준으로 발현되다가 유전자 손상 스트레스에 의해 전사가 유도된다(10). 작은 소단위는 RNR2와 RNR4로 구성되어 있는데, 여기에는 효소 활성화에 필수적인 tyrosine 잔기의 자유 라디칼이 존

* For correspondence. E-mail: sbae@inha.ac.kr; Tel: +82-32-860-7712; Fax: +82-32-874-6737

제한한다. DNA 복제 저해제인 hydroxyurea (HU)는 이 tyrosine 라디칼을 제거하여 RNR 효소를 비활성화 시킨다. 그 결과, 세포 내의 dNTP는 고갈되고 세포는 사멸하게 된다(11).

효모에서 RNR 유전자를 과량 발현시키거나 RNR의 단백질성 저해제(protein inhibitor)를 암호화하는 SML1 유전자를 삭제시켜 세포 내 dNTP 수준을 증가시키면 *mec1Δ* 또는 *rad53Δ* 돌연변이의 치사성(lethality)이 억제된다. 이러한 현상을 근거로 MEC1과 RAD53의 기능 중에서 효모의 생존에 필수적인 기능은 세포 내 dNTP 수준을 유지하고 조절하는 기능일 것이라고 제안되었다(6, 14). 비록 *sml1Δ* 돌연변이가 *mec1Δ* 또는 *rad53Δ* 돌연변이의 치사성은 억제하지만 DNA 손상에 대한 민감성은 회복시키지 못하며, *mec1* 점 돌연변이의 HU, UV, methyl methanesulfonate (MMS)에 대한 민감성도 *sml1* 돌연변이에 의해 줄어들지 않는다는 관찰은 이러한 가설을 뒷받침한다(20). 본 연구에서는 *rad53Δ* 돌연변이가 효모 균주의 HU에 대한 민감성을 경감시키는 다사본 억제 유전자(multi-copy suppressor)를 스크리닝하여 광범위한 전사 억제자로 작용하는 CYC8을 동정하였다. CYC8 유전자를 과량 발현시키거나 삭제하면 *rad53Δ* 돌연변이의 HU 민감성이 억제되었으며 dNTP 생성에 관여하는 유전자인 RNR의 전사가 증가되는 현상을 발견하였다. 이러한 결과를 바탕으로 CYC8 유전자의 이상이 *rad53Δ* 돌연변이의 HU 민감성을 억제하는 기작은 RNR의 발현 증가를 통한 세포 내 dNTP 양의 증가일 것으로 추측된다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 돌연변이 제조

본 연구에 사용한 균주는 모두 YPH499 (17)에서 유래되었으며 Table 1에 정리하였다. 효모 배양에 사용한 완전배지(YPD)와 최소배지(synthetic drop-out, SD)는 Chris 등(9)의 방법을 따랐다. 유전자 삭제 돌연변이 제조에는 one-step gene replacement 방법(1, 17)을 사용하였다. CYC8과 TUP1 유전자를 삭제하기 위해서 각 ORF의 5' 또는 3' flanking region과 55 base-pair에 걸쳐 상동성을 갖는 primer를 사용하여 PCR

Table 1. Yeast strains used in this study

Strains	Genotype
YPH499	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>
YHM1	YPH499 <i>sml1Δ:URA3</i>
ARM531	YPH499 <i>rad53Δ::HIS3 sml1Δ::URA3</i>
YKJC11	ARM531 <i>cyc8A::TRP1</i>
YKJT10	ARM531 <i>tup1A::TRP1</i>
YKJR1	YPH499 <i>rad53Δ::HIS3 /pRS325-CYC8</i>

방법으로 선발 표시자(TRP1 또는 HIS3)를 증폭하였다. 사용한 primer는 Table 2와 같다.

다사본 억제 유전자 스크리닝

RAD53은 효모의 생존에 필수적인 유전자이지만 *sml1Δ* 돌연변이 균주에서는 삭제 돌연변이가 생존 가능하므로(20) 이를 이용하여 *sml1Δ rad53Δ* 이중 돌연변이 균주 ARM531을 제조하였다. ARM531을 다사본 플라스미드(multi-copy plasmid)인 pRS325를 기반으로 하여 제조된 유전체 DNA library (선발 표시자는 Leu)로 형질전환한 후, 5 mM HU를 포함하고 leucine이 결핍된 고체 SD 최소배지에서 배양하여 HU에 내성이 있는 형질전환 콜로니를 선발하였다. 이때 HU가 없는 배지에서도 일부 세포를 배양하여 유전체 DNA library로 형질전환된 전체 콜로니 수를 추정함으로써 다사본 억제자 후보가 선발되는 빈도를 계산하였다.

HU가 포함된 배지에서 형성된 콜로니를 다시 같은 배지에 도말하여 정상적인 콜로니 형성여부를 확인한 후, 액체 배지에서 배양하여 플라스미드를 추출하고, 플라스미드에 포함된 유전체 DNA의 염기서열을 분석하였다.

HU에 대한 민감성 조사

액체 YPD 배지에서 지수기(exponential phase)까지 배양한 효모 세포(1×10^7 cells/ml)를 10배씩 차례로 희석하여 5 mM HU를 함유한 고체 SD 최소배지에 10 μ l씩 찍고, 30°C에서

Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences
CYC8-Del3	5'-GGC ATA TGA CGC CAC TTT AC A GTT CAA TCC CTC ATC TGC AGA TTG TAC TGA GAG TGC ACC-3'
CYC8-Del4	5'-TTG GTT GGA CAC TAG ATG ACT CTG GTT CCG TAT TAA GCG GCG CAT CTG TGC GGT ATT TCA C-3'
TUP1-Del1	5'-CAT CAG CGA AGC AAG AAC AAC TGG CTG AAC ACG TGC CCC TCT ATC TGT CC GAT TGT ACT GAG AGT GCA CC-3'
TUP1-Del2	5'-GAC GAA TCA CCA GAT ATT GCC AAA GAG TGT GAA GTG ACG GCT ATG CCC AC CGC ATC TGT GCG GTA TTT CAC-3'
RNR1-RT1	5'-GCA GCC GAT CGT TCT GTC TA-3'
RNR1-RT2	5'-CAA TCC CTT CTT CCA TCC GT-3'
RNR3-RT1	5'-TGG AAG ATA GTG TTG CCC CA-3'
RNR3-RT2	5'-CCG GAA CAT GAC TCA CAA GC-3'

* The underlined sequences are homologous to either 5' or 3' flanking region of the target ORFs.

2-4일간 배양하였다.

cDNA 제조

RNA 추출을 위해서 효모 세포(2×10^7 cells)를 수확하고 glass bead로 세포를 분쇄한 후, RNeasy[®] Mini kit (QIAGEN, USA)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 역전사 효소(reverse transcriptase, RT) 반응은 oligo(dT)를 이용한 random cDNA 합성 방법을 사용하였으며, RNA 1 µg을 사용하여 다음 두 단계로 진행하였다. 먼저 oligo(dT)₁₈ primer 0.5 µg (Bioneer, Korea)을 포함한 반응 혼합물(11 µl)을 70°C에서 5분간 두었다. 그 다음으로 2 mM dNTP와 10× M-MLV RT reaction buffer (0.5 M Tris-HCl; pH 8.3, 0.75 M KCl, 30 mM MgCl₂, 0.1 M DTT)를 각각 2 µl, Ribonuclease inhibitor (20 unit/µl) 0.5 µl, M-MLV reverse transcriptase (200 unit/µl, Enzymatics, Korea) 1 µl, 그리고 물 3.5 µl를 첨가하여 최종 20 µl가 되게 하였다. RT 반응은 42°C에서 60분간 MLV reverse transcriptase (200 unit/µl, Enzymatics) 1 µl, 그리고 물 3.5 µl를 첨가하여 최종 20 µl가 되게 하였다. RT 반응은 42°C에서 60분간 진행시킨 후 PCR의 주형으로 사용하였다.

Real-time PCR

RNR 유전자가 전사되는 수준을 비교하기 위하여 세포 내 RNA를 추출하여 cDNA를 제조하고, 이를 주형으로 사용하여 RNR 유전자를 증폭하는 primer로 real-time PCR을 수행하였다. PCR 반응 혼합물(20 µl)은 다음과 같다, 2 mM dNTP 2 µl, 10× Tag polymerase buffer 2 µl, primers (10 pmol/µl) 1 µl, Tag polymerase 1 µl (Enzymatics), SyBR Green 1 (Invitrogen, USA) 0.05 µl, cDNA 1 µl. Real-time PCR에 사용한 primer는 Table 2에 표시하였다.

PCR 반응은 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 다음과 같이 수행하였다; 94°C에서 5분간 주형을 변성시킨 후, 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec의 과정을 40번 반복하였다. 각 시료의 정량은 260 nm에서의 흡광도 분석에 기초한 표준화 값에 따랐다. 증폭 결과는 Sequence detection System software (Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

CYC8 과량 발현에 의한 *rad53Δ* 돌연변이의 HU 민감성 억제

본 연구진은 이전 연구에서 효모에서 돌연변이가 일어나면 세포 내 dNTP 수준을 변화시켜 *rad53* 돌연변이의 치사성을 억제하는 새로운 유전자 SRL4를 발견하였다(8). 뿐만 아니라 *srl4Δ* 돌연변이는 야생형 균주보다 HU에 더 강한 내성을 보였다. 이러한 발견을 바탕으로 본 연구에서는 *rad53Δ* 돌연변이 균주의 HU 민감성을 경감시키는 억제 유전자를 스크리닝하고자 하였다. *Rad53Δ sml1Δ* 이중 돌연변이 균주(ARM531)를 사용하여 재료 및 방법에서 설명한대로 약 5×10^5 개의 형질전환 콜로니(colony)를 스크리닝하여 12개의 후보군을 얻었다. 각

후보군을 배양하여 플라스미드를 추출하고, 플라스미드에 들어 있는 유전체 DNA 조각 주변의 염기서열을 분석하여 어떤 유전자가 들어있는지 조사하였다. 그 결과, 8개의 후보가 공통된 부분의 유전체 DNA 조각을 포함하고 있었으며, 이 중에서 CYC8만이 공통적으로 완전한 유전자로 존재하였다. CYC8이 들어있지 않은 후보 사이에는 어떤 공통되는 부분도 없었으며 억제자와는 상관없을 것으로 추정되는 DNA 조각만 포함하고 있었기 때문에 더 이상 분석하지 않았다.

CYC8이 억제 유전자인지 확인하기 위하여, 프로모터 부위를 포함하는 CYC8 유전자를 효모의 유전체 DNA로부터 PCR로 증폭하여 얻고, 다사본 플라스미드인 pRS325에 클로닝하여 pRS325-CYC8을 얻었다. 야생형(YPH499)과 *sml1Δ* 돌연변이 균주(YHM1)의 성장속도와 HU에 대한 민감성은 pRS325-CYC8의 영향을 받지 않았다(Fig. 1A). 그러나 다사본 억제자 스크리닝에 사용한 *rad53Δ sml1Δ* 이중 돌연변이 균주(ARM531)의 경우, HU에 매우 민감하여 5 mM HU 존재 하에서 거의 성장하지 못하는 반면, pRS325-CYC8으로 형질전환하면 야생형과 비슷한 수준으로 성장이 회복되는 것을 관찰하였다(Fig. 1A). 또한 CYC8이 다사본으로 존재하면 SML1 유전자가 야생형인 경우에도 *rad53Δ* 돌연변이가 생존하는 것을 발견하였다(Fig. 1A, bottom). 비록 이 균주(YKJR1)의 성장 속도는 매우 느렸지만 HU에 대한 내성은 *rad53Δ sml1Δ* 균주(ARM531)보다

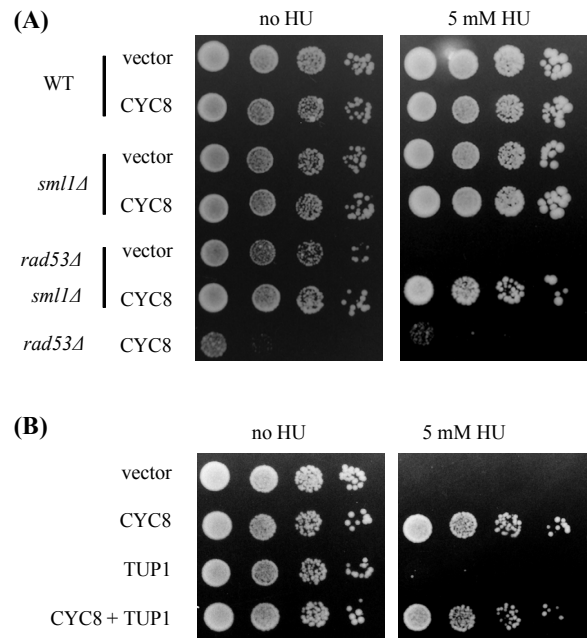


Fig. 1. Multi-copy suppression of HU sensitivity of *rad53Δ* mutation by CYC8. (A) Ten-fold serial dilutions (from 10^5 to 10^2 cells) of YPH499 (WT), YHM1 (*sml1Δ*), ARM531 (*rad53Δ sml1Δ*), and YKJR1 (*rad53Δ*) grown in liquid SD media were spotted onto YPD plates with or without 5 mM hydroxyurea (HU), followed by incubation at 30°C. Each strain was transformed with either multi-copy plasmid pRS325 (vector) or pRS325-CYC8 (CYC8). (B) ARM531 cells were transformed with either multi-copy plasmid pRS325 (vector), pRS325-CYC8 (CYC8), pRS325-TUP1 (TUP1), or both (CYC8+TUP1), grown in SD, and spotted onto YPD plates with or without 5 mM HU.

강하여 5 mM HU가 있어도 콜로니를 형성하였다. 이러한 결과는 앞에서 스크리닝한 유전체 DNA library의 유전자들 중에서 CYC8이 다사본 억제자라는 것을 말해준다.

CYC8은 TUP1과 복합체를 이루어 작용한다(18). 따라서 TUP1을 과량 발현시켜도 *rad53Δ* 돌연변이의 HU 민감성이 억제되는지 조사하였다. 그러나 CYC8과는 달리 TUP1은 다사본 억제자로 작용하지 못하였으며, CYC8과 TUP1을 동시에 과량 발현시키는 경우에는 CYC8만을 과량 발현시키는 경우보다는 약간 약해지지만 여전히 억제효과가 나타나는 것을 관찰하였다(Fig. 1B).

Cyc8Δ과 tup1Δ 돌연변이에 의한 억제

최근 보고에 따르면 효모의 CYC8이 프리온(prion) 단백질의 성질을 가지고 있는 것이 밝혀졌다(16). 이 논문에서는 CYC8을 과량 발현시키면 CYC8의 glutamine이 풍부한 부위가 자기 자신의 잘못된 접힘(misfolding)을 유발하고 이를 다른 CYC8 단백질에 전파하여 우성의 *cyc8⁺* 표현형이 나타난다. 뿐만 아니라, 이러한 변화는 세포질을 통하여 유전된다는 것을 보였다. 따라서 Fig. 1에서 CYC8이 다사본 억제자로 작용하는 것처럼 보이지만 실제로는 단백질의 잘못된 접힘 때문에 활성을 가진 CYC8 단백질이 없어져서 관찰되는 현상일 수 있다. 또한 이러한 가정은 TUP1은 왜 다사본 억제자로 작용하지 못하는지도 설명해준다. 그리고 이러한 가정이 맞다면 *cyc8⁺* 돌연변이도 억제자로 작용할 것으로 예상된다. 이를 확인하기 위하여 *rad53Δ* 균주에서 CYC8과 TUP1을 각각 삭제한 돌연변이를 제조하여 표현형을 관찰하였다.

Cyc8Δ 돌연변이 균주(YKJC11)는 야생형(ARM531)에 비해 성장이 매우 느린 것을 관찰할 수 있었으며 *tup1Δ* 균주(YKJT10)도 약간 느린 성장을 보였다. 그러나 5 mM HU가 있을 때는 야생형은 성장하지 못하는 반면, 돌연변이 균주들은 HU에 큰 영향을 받지 않는 것을 관찰하였다(Fig. 2, top). 이러한 결과가 *cyc8* 또는 *tup1* 돌연변이 때문인지 확인하기 위하여 돌연변이 균주에 단일사본(single-copy) 플라스미드인 pRS315에 클로닝된 TUP1 또는 CYC8 유전자를 형질전환하여 표현형이 야생형으로 되돌아가는지 확인하였다. 그 결과, *tup1Δ* 균주에 TUP1 유전자를, *cyc8Δ* 균주에 CYC8 유전자를 도입한 경우 HU에 대한 내성이 사라지는 것을 관찰하였다(Fig. 2, middle and bottom). 그러나 *cyc8Δ* 균주에 TUP1을 도입한 경우나 *tup1Δ* 균주에 CYC8을 도입한 경우에는 아무런 효과가 없었다. 따라서 *tup1Δ*과 *cyc8Δ*이 억제 돌연변이라는 것을 알 수 있으며, CYC8 유전자가 다사본일 때 *rad53Δ* 균주가 HU에 내성을 가지게 되는 것은 CYC8이 프리온 단백질의 특성을 가지고 있기 때문이라고 생각된다.

CYC8 이상에 의한 RNR 발현의 증가

HU는 RNR 효소의 억제자로 작용하여 dNTP 생성을 저해하므로 HU에 대한 내성이 증가하는 한 가지 방법은 RNR 유전자 발현의 증가로 세포 내 dNTP 생성이 증가하는 것이다. CYC8-TUP1 복합체는 가장 광범위한 전사 억제자 중의 하나

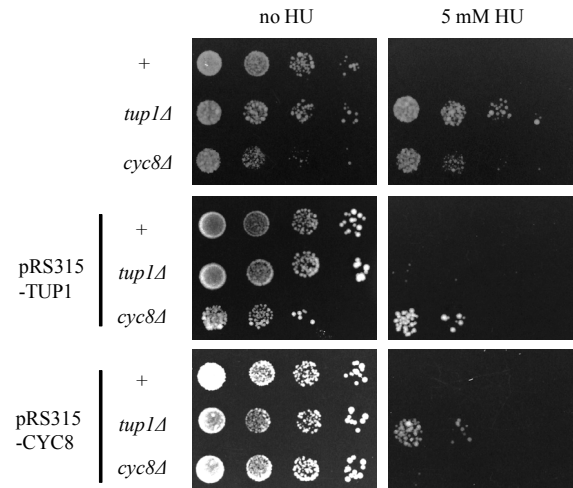


Fig. 2. Suppression of HU sensitivity of *rad53Δ* mutation by *cyc8Δ* and *tup1Δ* mutations. Ten-fold serial dilutions (from 10^5 to 10^2 cells) of ARM531 (+), YKJT10 (*tup1Δ*), and YKJC11 (*cyc8Δ*) were spotted onto YPD plates with or without 5 mM HU (top). Each strain was transformed with either single-copy plasmid pRS315-TUP1 (middle) or pRS315-CYC8 (bottom), and spotted onto YPD plates with or without 5 mM HU.

로 효모 유전자의 약 3%에 해당하는 150개 이상의 유전자의 전사를 억제한다(18). 따라서 만약 RNR 유전자들의 전사 조절에도 CYC8-TUP1이 관여한다면, CYC8 또는 TUP1 돌연변이에 의해 RNR 유전자의 전사가 증가하게 되고, 그 결과 세포 내 dNTP 양이 증가할 것이다. 이를 검정하기 위해 효모 세포의 RNA를 추출하고 역전사 효소 반응과 real-time PCR을 순차적으로 수행하여 RNR1과 RNR3 mRNA의 상대적인 양을 비교하였다. CYC8 유전자가 야생형일 때와 비교하여 CYC8 유전자를 다사본으로 도입하였을 때와 *cyc8Δ* 돌연변이일 때, RNR1과 RNR3 모두 약 2.5배에서 6배 정도 발현이 증가하였다(Fig. 3). 따라서 CYC8 유전자의 변화에 의한 *rad53Δ* 균주

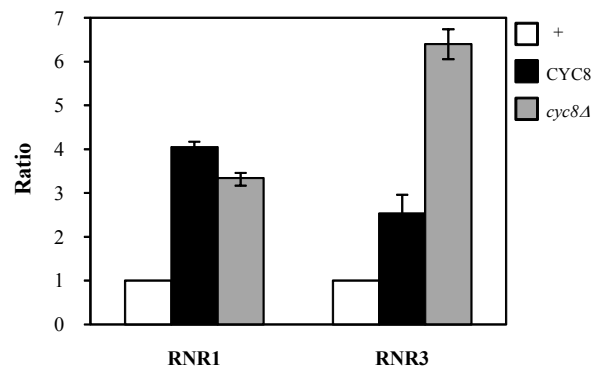


Fig. 3. RNR expression levels in ARM531 (+), ARM532 containing pRS325-CYC8 (CYC8), and YKJC11 (*cyc8Δ*). The cDNAs were prepared from total RNAs extracted from each strain as described in the 'Materials and Methods' section, and the levels of RNR1 and RNR3 cDNAs were quantitated by real-time PCR using the primers listed in Table 2. The averages and standard deviations from three independent experiments are shown.

의 HU 내성 증가는 RNR 유전자 발현 증가에 의한 간접적인 영향이라고 추측된다. *Rad53* 돌연변이의 치사성은 세포 내 dNTP의 양을 증가시키므로써 억제된다. 즉, RNR 유전자를 다사본으로 도입하거나 RNR 효소를 억제하는 *sml1* 유전자를 삭제하여 dNTP 생성을 증가시키면 *RAD53* 유전자는 효모의 생존에 필수적이지 않게 된다. 따라서 *CYC8*이 억제자로 작용하는 기작도 RNR의 전사를 증가시켜 세포 내 dNTP의 양을 올리는 것으로 생각된다. 그러나 *CYC8-TUP1* 복합체의 이상은 RNR 뿐만 아니라 매우 많은 유전자의 발현에 영향을 미치기 때문에 본 연구에서 발견한 억제 현상은 보다 복잡한 유전적 상호작용에 기인한 것일 수도 있다. 따라서 *CYC8-TUP1* 돌연변이가 *RAD53*에 미치는 영향을 보다 면밀히 조사하기 위해서는 *CYC8-TUP1* 복합체의 조절을 받는 많은 다른 유전자들에 대한 조사가 필요할 것으로 생각된다.

적요

*RAD53*은 효모의 검문지점 경로가 DNA 손상을 감지하여 여러 가지 후속적인 세포 내 반응을 일으키는 데 핵심적인 역할을 하는 인산화 효소일 뿐만 아니라, dNTP 생성에 중요한 RNR 유전자 등의 전사 활성화 과정에도 관여하는 효모의 생존에 필수적인 유전자이다. 본 연구에서는 *rad53Δ* 돌연변이의 hydroxyurea에 대한 민감성을 억제하는 억제자로서 *CYC8*을 동정하였다. *CYC8* 유전자가 많은 사본으로 존재할 때 *rad53Δ* 균주의 hydroxyurea에 대한 내성이 증가하였으나, *CYC8*과 복합체로 작용하는 *TUP1*은 다사본 억제자로 작용하지 못하였다. 반면, 삭제 돌연변이의 경우, *cyc8Δ*과 *tup1Δ* 모두 억제자로 작용하였다. *CYC8*은 효모에서 프리온 단백질로 작용하기 때문에 과량 발현되면 정상적인 *CYC8* 단백질의 잘못된 접합을 유발하게 되고, 결과적으로 우성의 *cyc8⁺* 표현형이 나타나게 된다. 따라서 *CYC8*이 다사본 억제자로 작용하는 이유는 이러한 프리온의 특성 때문으로 추측된다. *CYC8*이 다사본이거나 *cyc8Δ* 돌연변이일 경우 모두 RNR 유전자의 전사가 증가되는 것을 관찰하였다. 따라서 *CYC8*에 의한 *rad53Δ* 돌연변이의 억제는 RNR 증가에 따른 세포 내 dNTP 증가 때문으로 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(20090083702).

참고문헌

- Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute, and C. Cullin. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21, 2239-3330.
- Ben-Yehoyada, M., J. Gautier, and A. Dupre. 2007. The DNA damage response during an unperturbed S-phase. *DNA Repair* 6, 914-922.
- Branzei, D. and M. Foiani. 2005. The DNA damage response during DNA replication. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17, 568-575.
- Branzei, D. and M. Foiani. 2006. The Rad53 signal transduction pathway: replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. *Exp. Cell Res.* 312, 2654-2659.
- Chabes, A., B. Georgieva, V. Domkin, X. Zaho, R. Rothstein, and L. Thelander. 2003. Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* 112, 391-401.
- Chabes, A. and B. Stillman. 2007. Constitutively high dNTP concentration inhibits cell cycle progression and the DNA damage checkpoint in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1183-1188.
- Chen, S., M.B. Smolka, and H. Zhou. 2007. Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 986-995.
- Choi, D.H., Y.M. Oh, S.H. Kwon, and S.H. Bae. 2008. The mutation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* *SRL4* gene rescues the lethality of *rad53* and *lcd1* mutations by modulating dNTP levels. *J. Microbiol.* 46, 75-80.
- Chris, K., S. Michaelis, and A. Mitchell. 1994. Methods in yeast genetics. pp. 207-217. In CSHL press
- Elledge, S.J. and R.W. Davis. 1990. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternate regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.* 4, 740-751.
- Elledge, S.J., Z. Zhou, J.B. Allen, and T.A. Navas. 1993. DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays* 15, 333-339.
- Huang, M. and S.J. Elledge. 1997. Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17, 6105-6113.
- Huang, M., Z. Zhou, and S.J. Elledge. 1998. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* 94, 595-605.
- Koc, A. and G.F. Merrill. 2007. Checkpoint deficient *rad53-11* yeast cannot accumulate dNTPs in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 527-530.
- Melo, J. and D. Toczyski. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 237-245.
- Patel, B.K., J. Gavin-Smyth, and S.W. Liebman. 2009. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nat. Cell Biol.* 11, 344-349.
- Sikorski, R. and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Smith, R.L. and A.D. Johnson. 2000. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 25, 325-330.
- Wang, P.J., A. Chabes, R. Casagrande, X.C. Tian, L. Thelander, and T.C. Huffaker. 1997. Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol. Cell Biol.* 7, 6114-6121.
- Zhao, X., E.G.D. Muller, and R. Rothstein. 1998. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* 2, 329-340.
- Zhao, X. and R. Rothstein. 2002. The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3746-3751.