

ScKns1 결손에 의한 *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b 균주의 온도 민감성 억제 효과

박윤희 · 박희문*

충남대학교 생명시스템과학대학 미생물 · 분자생명과학과

Temperature Sensitivity of Sigma Background Is Suppressed by the Disruption of *ScKNS1* in *Saccharomyces cerevisiae*

Yun-Hee Park and Hee-Moon Park*

Department of Microbiology and Molecular Biology, College of Bioscience and Biotechnology,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

(Received June 3, 2011 / Accepted June 14, 2011)

The *Saccharomyces cerevisiae* S288c strain does not show haploid and diploid filamentous growth, and biofilm formation, because it has a *flo8* nonsense mutation unlike Σ 1278b strain which has a *FLO8* gene. During the heat stress experiments to investigate the role of ScKns1, LAMMER kinase in *S. cerevisiae*, we found that Σ 1278b strain revealed heat sensitivity at 37°C, a mild heat stress in contrast to S288c strain. We also found that the disruption of ScKns1 and the addition of sorbitol suppress heat sensitivity of Σ 1278b strain. These results suggest the possibility that Flo8 and ScKns1 may interact to transducer a signal for regulating heat stress through a novel signaling pathway.

Keywords: *FLO8*, *Saccharomyces cerevisiae*, *ScKNS1*, Σ 1278b, temperature sensitivity

진핵세포 생물은 삼투압, 열 및 산화 스트레스 등의 다양한 외부 환경의 자극을 수용하여 반응하는 신호전달경로를 가지고 있다. *Saccharomyces cerevisiae*의 대표적인 신호전달경로 중 하나인 cAMP/PKA 경로[cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA) pathway]는 전사조절인자인 Flo8과 Flo11를 통해 질소고갈 환경에서 균사형 성장 및 세포응집(flocculation)현상을 유도한다. Pheromone에는 Fus3, 질소고갈 환경에는 Kss1, 삼투 스트레스에는 Hog1, 그리고 세포벽 합성 스트레스에는 Slr2 등, 외부 신호에 따라 다양한 MAPK [a mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway]로 이루어진 특성화된 신호전달경로를 보인다(4).

실험실에서 사용하는 *S. cerevisiae* 균주는 크게 BY4741을 포함하는 S288c 계열과 Σ 1278b 계열로 구분할 수 있다. S288c 계열은 효모 유전체 프로젝트의 표준 균주로 실험실에서 일반적으로 사용하는 균주이나, *FLO8* 유전자의 정지돌연변이(nonsense mutation)로 인하여 질소고갈 환경에서 반수체의 부착 성장, 배수체의 위균사형 성장 및 생체막 형성 등의 형태변화가 관찰되지 않는다(8). 그러나 Σ 1278b 계열은 질소고갈 환경과 에탄올 등의 단쇄 알코올 첨가에 의해 형태변환

이 나타난다(3, 9). 이와 같이 *S. cerevisiae*에서 유전적 배경의 차이는 S288c 계열에서 *FLO8* 유전자의 돌연변이에 의한 표현형 차이와 함께 생존에 필수적인 유전자의 종류도 달라진다(2). 그러므로 유전자 기능 연구에 있어서 실험 균주의 유전적 배경은 중요한 고려 요소 중 하나이다.

LAMMER kinase는 serine/threonine 잔기와 tyrosine 잔기를 모두 인산화 할 수 있는 이중 특이성 인산화 효소로 효모, 식물, 동물 및 사람을 포함하는 진핵생물에서 진화적으로 잘 보존되어 있다. 분열효모의 LAMMER kinase는 산화 스트레스와 관련되어 있으며, 균사형 성장 및 세포응집현상에 관여한다고 밝혀졌다(5, 7, 11). 또한 Lkh1은 전사억제인자인 Tup11 및 Tup12과 결합하며 그들을 인산화하는 것으로 알려졌다(6). 그러나, *S. cerevisiae*의 LAMMER kinase인 ScKns1은 그 기능에 대해 보고된 바는 없다.

Padmanabha 등(10)에 의해 수행된 *ScKns1*의 기능에 관한 기존 연구는 S288c 계열에서 진행되었기 때문에, 본 실험실에서는 1278b 계열에서 *ScKns1Δ* 돌연변이를 제조하고 균사형 성장 여부를 비롯한 ScKns1의 기능 연구를 수행하였다(미발표 자료). ScKns1의 세포 내 기능을 파악하기 위하여 SGD, BioGRID, BioFIXIE, DIP, Portal PathCalling 및 YeastRC Two-Hybrid database를 포함하는 database를 이용하여 ScKns1

* For correspondence. E-mail: hmpark@cnu.ac.kr; Tel: +82-42-821-6417; Fax: +82-42-822-7367

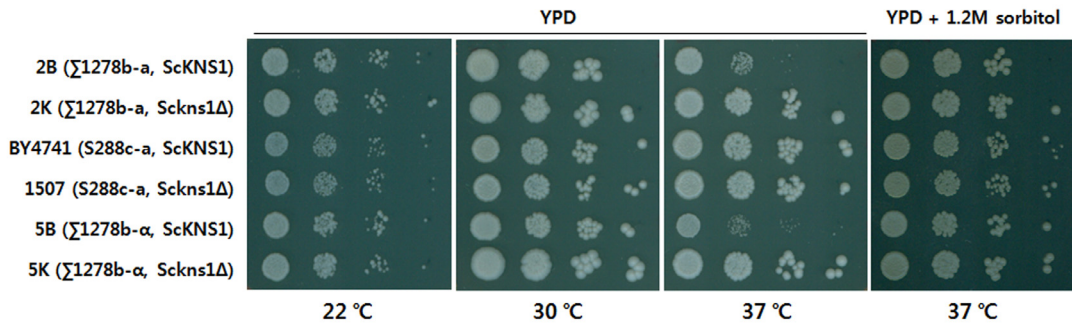


Fig. 1. Heat sensitivity of *Sckns1Δ* mutants. Cells with 10-fold serial dilutions were spotted onto YPD or YPD with 1.2 M sorbitol and incubated for 3 days at 22°C, 30°C, and 37°C, respectively.

의 interactor를 확인하였다. 이들 중 Sdp1은 이중특이성 protein-tyrosine phosphatase로 열 스트레스 존재 시 cell wall integrity 경로의 MAPK인 Slt2를 탈인산화하여 음성조절한다. 또한 phospho-protein chip data를 통하여 ScKns1이 Slt2을 인산화함이 확인되었다(12). 그리하여 *Sckns1Δ* 돌연변이에서 열에 대한 반응을 살펴보았다. 각 균주를 YPD 액체 배지에서 2×10^6 cells/ml의 농도로 배양한 뒤, 연속 희석하여 YPD 배지와 1.2 M sorbitol을 포함하는 YPD 배지에 점적중하여 3일 동안 배양하고 관찰하였다. 저온 스트레스 조건에 해당하는 22°C와

정상 조건인 30°C에서는 야생형과 *Sckns1Δ* 균주는 생장에 차이를 보이지 않았으나, 온화된 열 스트레스 조건인 37°C에서 Σ1278b 야생형은 열 감수성을 보이는 데 반해, *Sckns1Δ* 균주는 Σ1278b 야생형의 열 감수성이 회복되었다(Fig. 1). 그러나 Σ1278b 균주가 보이는 열 감수성은 S288c 균주에서는 관찰되지 않았으며, Σ1278b 계열의 *Sckns1Δ* 균주에서 보이는 열 감수성의 회복도 또한 나타나지 않았다(Fig. 1). ScKns1 결손에 의한 Σ1278b 균주의 열 감수성의 회복은 교배형과는 무관하였다. 한편 삼투안정제인 1.2 M sorbitol이 포함된 YPD 배에 점적중하고 37°C에서 배양하였을 때에는 Σ1278b 야생형 균주가 보이는 열 감수성이 회복되었다(Fig. 1).

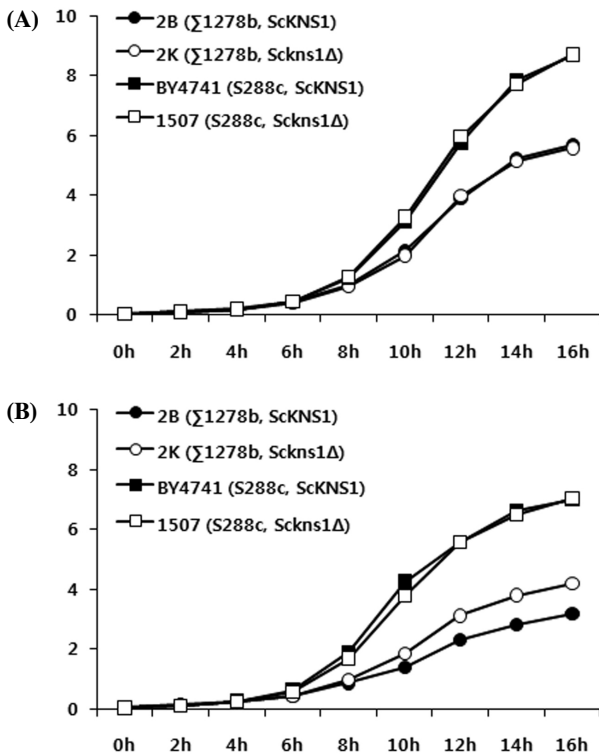


Fig. 2. Growth analysis of *Sckns1Δ* mutants. Growth was monitored at 600 nm. Cells were incubated in YPD medium at 30°C (A) and 37°C (B). All strains are mating type 'a'.

점적중에 의한 열 감수성 실험과 함께 각각의 온도조건에서 배양하면서 600 nm에서 흡광도를 측정하여 *Sckns1Δ*의 성장을 확인하였다. 30°C에서는 *Sckns1Δ* 돌연변이에 의한 생장의 차이는 관찰되지 않았고, 유전적 배경에 따른 S288c 계열과 Σ1278b 계열에의 생장의 차이만 관찰되었다(Fig. 2A). 그러나 37°C에서는 S288c와 Σ1278b라는 유전적 배경에 따른 생장의 차이는 물론, Σ1278b 계열의 야생형의 생장이 감소하였으며 *Sckns1Δ* 돌연변이에서 그러한 생장의 감소가 회복되었다(Fig. 2B).

*S. cerevisiae*에서 열 스트레스는 stress-activated protein kinases (SAPKs)인 HOG 신호전달경로와 cell wall integrity MAPK 신호전달경로인 Slt2에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(1). 또한 스트레스 관련 전사조절인자인 Hsf1과 Msn2/Msn4에 의해 열충격 단백질 및 chaperone이 조절된다(14). 한편 Flo8은 반수체의 부착성장 및 배수체의 균사형 성장, 세포융집현상과 생체막 형성을 조절하는 cAMP/PKA 경로의 전사조절인자로 알려졌다(8). 그동안 cAMP/PKA 경로의 PKA 활성이 스트레스 관련 전사조절인자를 조절하여 열 감수성과 열 내성을 보임은 보고되었으나(14), Σ1278b 계열이 온도 감수성을 보이며, Flo8이 열 내성에 관여한다는 보고는 없었다. 본 실험에서 관찰한 S288c와 Σ1278b 계열에서 나타난 온도 민감성의 차이는 Flo8이 *S. cerevisiae*의 열 내성에 음성조절인자로 작용할 수 있음을 시사한다. 비록 이러한 가설을 확인하기 위해서는 S288c 계열에 Flo8의 과발현으로 열 감수성이

Table 1. A list of the *S. cerevisiae* strains used in this study

Strains	Genotype	Background	Relative genotype	Reference /Source
2B	<i>Mat a ura3-52 leu2::hisG his3::hisG</i>	Σ1278b	Σ1278b-a, ScKNS1	(13)
2K	<i>Mat a ura3-52 leu2::hisG his3::hisG kns1::HIS3</i>	Σ1278b	Σ1278b-a, ScKns1Δ	This study
5B	<i>Mat a ura3-52 leu2::hisG trp1::hisG</i>	Σ1278b	Σ1278b-α, ScKNS1	(13)
5K	<i>Mat a ura3-52 leu2::hisG trp1::hisG kns1::LEU2</i>	Σ1278b	Σ1278b-α, ScKns1Δ	This study
BY4741	<i>Mat a ura3-52 leu2::hisG his3::hisG</i>	S288C	S288C-a, ScKNS1	Research Genetics
1507	<i>Mat a ura3-52 leu2::hisG his3::hisG</i>	S288C	S288C-a, ScKns1Δ	Research Genetics

나타나는지 확인해 볼 필요가 있다. 게다가 삼투 안정제의 첨가에 의해 Σ1278b 균주의 온도 감수성이 사라지는 것은 Σ1278b의 세포벽 조성이 S288c의 그것과는 다르며, Flo8이 cell wall integrity 경로와도 연관된 증거가 된다.

또한 ScKns1 결손이 Σ1278b 계열이 37°C에서 보이는 열 감수성을 회복하는 결과는 LAMMER kinase인 ScKns1이 기존의 연구에서 알려진 것처럼 열 내성과 관련한 Sdp1과 Slf2와 관계 있음을 보여줄 뿐만 아니라, cAMP/PKA 경로의 Flo8을 통하여 열 내성에도 관계하고 있을 가능성을 제시한다. 그러므로 이상의 결과는 PKA 경로를 구성하는 전사조절인자인 Flo8이 cell wall integrity MAPK 경로와 연결된 ScKns1을 통하여 열 스트레스를 조절하는 새로운 신호전달경로를 구성할 가능성을 제시한다.

ScKns1Δ 돌연변이 균주를 이용한 스트레스에 대한 반응 분석은 LAMMER kinase와 연관된 다양한 신호전달기작을 규명할 수 있을 것이며, LAMMER kinase가 이중특이성 인산화 효소로 Ser/Thr kinase와 Tyr kinase 사이 혹은 기존에 밝혀진 신호전달경로 사이의 cross-talk에 중요한 기능을 할 것으로 추정된다.

적요

Saccharomyces cerevisiae Σ1278b 균주는 *FLO8* 유전자를 가지고 있는 반면, S288c 균주는 *flo8* 정지돌연변이를 포함하고 있어서 반수체의 부착 성장, 배수체의 위균사형 성장 및 생물막 형성 현상을 보이지 않는다. *S. cerevisiae*의 LAMMER kinase인 ScKns1의 기능을 파악하기 위한 온도 감수성 실험을 수행한 결과, S288c 균주와 달리 Σ1278b 균주가 37°C의 열 스트레스에 민감함을 발견하였으며, 흥미롭게도 *ScKns1Δ* 돌연변이가 이러한 감수성을 회복시킴을 확인하였다. 또한 Σ1278b 균주의 열 감수성은 삼투안정제인 sorbitol의 첨가에 의해 회복되었다. 이러한 결과는 Flo8은 ScKns1이 연관된 열 스트레스를 조절하는 신호전달경로를 구성할 가능성을 제시한다.

감사의 말

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2006-521-C00162).

참고문헌

- de Nadal, E. and F. Posas. 2009. Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J.* 29, 4-13.
- Dowell, R.D., O. Ryan, A. Jansen, D. Cheung, S. Agarwala, T. Danford, D.A. Bernstein, P.A. Rolfe, L.E. Heosler, B. Chin, and *et al.* 2010. Genotype to phenotype: a complex problem. *Science* 328, 469.
- Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles, and G.R. Fink. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* 68, 1077-1090.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300-372.
- Kang, W.H., Y.D. Park, J.S. Hwang, and H.M. Park. 2007. RNA-binding protein Csx1 is phosphorylated by LAMMER kinase, Lkh1, in response to oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 581, 3473-3478.
- Kang, W.H., Y.H. Park, and H.M. Park. 2010. The LAMMER kinase homolog, Lkh1, regulates Tup transcriptional repressors through phosphorylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 285, 13797-13806.
- Kim, K.H., Y.M. Cho, W.H. Kang, J.H. Kim, K.H. Byun, Y.D. Park, K.S. Bae, and H.M. Park. 2001. Negative regulation of filamentous growth and flocculation by Lkh1, a fission yeast LAMMER kinase homolog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1237-1242.
- Liu, H., C.A. Styles, and G.R. Fink. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* 144, 967-978.
- Lorenz, M.C., N.S. Cutler, and J. Heitman. 2000. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 11, 183-199.
- Padmanabha, R., S. Gehrung, and M. Snyder. 1991. The *KNS1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a nonessential protein kinase homologue that is distantly related to members of the *CDC28/cdc2* gene family. *Mol. Gen. Genet.* 229, 1-9.
- Park, Y.D., W.H. Kang, W.S. Yang, K.S. Shin, K.S. Bae, and H.M. Park. 2003. LAMMER kinase homolog, Lkh1, is involved in oxidative-stress response of fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 1078-1083.
- Ptacek, J., G. Devgan, G. Michaud, H. Zhu, X. Zhu, J. Fasolo, H. Guo, G. Jona, A. Breitkreutz, R. Sopko, and *et al.* 2005. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.
- Rupp, S., E. Summers, H.J. Lo, H. Madhani, and G. Fink. 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* 18, 1257-1269.
- Trott, A. and K.A. Morano. 2003. The yeast response to heat shock, pp. 71-119. In S.H.a.W.H. Mager (ed.), *Yeast Stress Response*, Springer.