Killer효모 *Saccharomyces cerevisiae*에 있어서 *SKI3*유전자의 구조와 분자생물학적 기능

한국과학기술연구원 유전공학센터
이 상 기

*Saccharomyces cerevisiae*의 killer株에는 L-A, L-B·C, M, T, W 등 5종의 二重鎖 RNA (dsRNA)를 갖는 VLP(Virus-Like Particles, virus狀 粒子)가 세포질 내에 존재하고 있다(1). 이들 VLP들은 체세포분열이나 감수분열 또는 세포질 혼합 등의 방법을 통해서만 다른 세포로의 轉移가 가능하므로 體外的인 방법을 통해 自發的으로 감염될 수 있는 동물성 virus와는 큰 차이를 보이고 있다. 그러나 이러한 감염방법의 차이에도 불구하고 이들 VLP들의 복제방법은 기본적으로 동물성 dsRNA와 동일하다.

Killer 현상에 관여하는 유전자들은 VLP 중 주로 M 및 L-A dsRNA상에 존재하고 있다. M dsRNA에 존재하는 killer 유전자는 killer toxin을 coding하며 L-A dsRNA상의 killer 유전자는 자신 및 M dsRNA의 coat 단백질을 coding하고 있다(2). 따라서 M 및 L-A dsRNA의 복제 정도에 따라 killer 현상의 强度가 조절되고 있다. 그러나 이들 VLP들이 다량 복제되어 숙주세포 내에서 killer toxin이 과잉 생산될 경우 숙주세포 자체의 生存에도 영향을 받게 되므로 M 및 L-A dsRNA의 복제에 있어서는 이들 VLP와 숙주세포간에 정교한 균형이 유지되어야만 한다. 실제로 이러한 균형은 VLP들이 자신의 복제에 숙주세포인 효모의 염색체상에 존재하고 있는 *MAK*(maintenance of killer) 유전자를(3, 4), 숙주세포는 *SKI*(superkiller) 유전자를 각각 이용함으로써 유지되고 있다(5, 6). 즉 *MAK* 단백질들은 VLP의 복제에 있어서 陽性制御物(positive regulator)로 작용하는 반면 *SKI* 단백질들은 陰性制御物(negative regulator)로 작용함으로써 VLP와 숙주세포간의 균형유지가 가능해 진다. *MAK* 유전자들은 숙주세포 자신의 增殖에도 필수적인 유전자이므로 숙주세포가 단순히 *MAK* 유전자를 不活性化 시킴으로써 VLP의 복제를 제어할 수 없는 반면(7) *SKI* 유전자들은 VLP의 억제에만 관여함으로써 숙주세포 자신의 增殖에는 영향을 미치지 않으므로 숙주세포 입장에서는 *SKI* 유전자야말로 효율적인 자기방어수단으로 이용될 수 있는 유전자이다.

이제까지 발견된 *SKI* 유전자는 *SKI2*, *SKI3*, *SKI4*, *SKI6*, *SKI7*, *SKI8*의 5가지로서 이 중 *SKI8*만이 cloning된 상태이다(8). 본 연구에서는 *SKI3* 유전자를 cloning한 후 이 유전자의 염기서열 분석을 통해 *SKI3* 유전자가 coding하는 단백질의 구조를 밝히고 *SKI3* 유전자의 killer 효모 내에서의 분자생물학적 기능을 밝히고자 하였다.

SKI3 유전자의 cloning과 염기서열분석

SKI3 유전자의 cloning을 위해 CEN vector의 일종인 PTI15(9)과 효모의 전체 genomic bank를 이용하여 complementation test를 통해 *SKI3* 유전자를 갖는 plasmid를 분리하였다. 이 plasmid를 *SKI3* 변이주인 *S. cerevisiae* 2634 (*MATa leu2 his5 ura3 SKI3-11 mkt1* L-A-HN M_2)株에 形質轉換시켰다. 20℃에서 배양한 후 나타난 대형 colony를 다시 20℃와 32℃에서 배양하고 MB 평판배지상에서 killer 기능을 상실한 colony를 선별하였다. 이 때 *SKI3* 변이주에서는 *mkt1* 변이가 억제되므로 32℃에서 M_2 dsRNA를 유지시킴으로써 killer性이 되지만 *SKI3* 유전자에 의해 complementation되면 M_2 dsRNA가

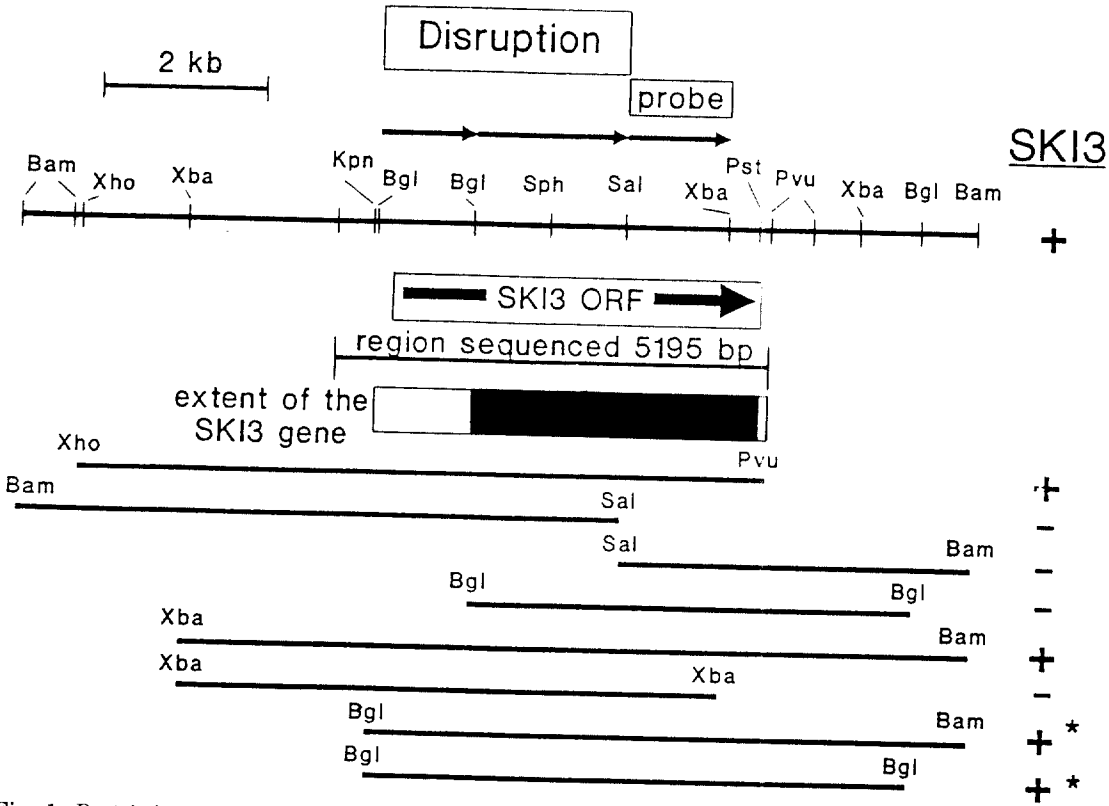

Fig. 1. Restriction map of pSKI3:5-1 and results of subcloning experiments. Fragments from pSKI3:5-1 were subcloned into pTI15 or YCp50 (19) and transformed into strain 2634 (*MATa ski3 ura3 mktl* K_2 L-A-HN) and transformants were tested for K at 32°C and cold sensitivity of cell growth. The subclones marked with the "*" were inserted in opposite orientations in the *Bam*H1 site of pTI15. In constructing the gene disruption, the region eliminated and substituted by the *URA3* gene is boxed and labeled "Disruption".

상실되어 32℃에서 非 killer性 形質을 갖게 되는 성질을 이용하여 *SKI3* 유전자를 갖는 clone (pSKI3 : 5-1)을 최종적으로 분리하였다. 이 clone의 제한지도를 작성하고 subcloning 실험을 통해 complementation test를 해본 결과 *SKI3* 유전자는 *Bgl*II와 *Pvu*II 사이에 존재함을 알 수 있었다(Fig.1). *SKI3* 유전자를 포함하는 8.3 kb의 DNA 절편을 Bluescript vector에 도입시킨 후 합성 primer와 sequenase를 이용하여 5195 bp의 *Bgl*II-*Pvu*II DNA 절편의 염기서열을 분석한 결과 4,296 bp 크기의 open reading frame (ORF)이 존재하며 이로부터 1,432개의 amino 산 잔기를 갖는 단백질이 합성되고 있음을 추정할 수 있었다(Fig.2). 또한 다음과 같은 실험결과로부터 Fig.2에 표시한 유전자의 ORF는 실제로 *SKI3* 유전자의 ORF임을 확인할 수 있었다.

(1) subcloning 실험결과 실제로 *SKI3* 활성을 complementation할 수 있는 최소범위는 1,677번 염기위치의 *Bgl*II 부위에서 5,060번 염기위치의 *Pst*I 부위 내에서 존재하고 최대범위는 490번 염기위치의 *Bgl*II 부위에서 5,190번 염기위치의 *Pvu*II 부위 내에서 존재하고 있다.

(2) 이 ORF 내에 포함된 *Sal*I-*Xba*I 절편을 template로 하여 합성된 RNA probe를 사용하여 Nothern blotting을 해본 결과 실제로 약 6 kb 정도의 RNA transcript가 같은 방향으로 生成되고 있다.

(3) 이 ORF로부터 약 163 kDa 정도의 *SKI3* 단백질이 生成되고 있는 것으로 추정되는데 실제로 *SKI3* 단백질로부터 생성된 항체가 약 165 kDa 정도의 단백질과 면역반응을 나타낸다.

Fig. 2. Sequence of the *SKI3* gene. The 9 amino acid peptide shown by fusion with β-galactosidase to be capable of directing a protein into the nucleus (Table 1) is boxed and labeled "Nuclear Localization Sequence 1". The fact that the *Bgl*II-*Bgl*II fragment lacking this sequence also directed β-galactosidase into the nucleus indicates that a second such sequence is also present in *SKI3* and two candidate sequences are underlined. Arrows show the repeated amino acid sequence in the hydrophilic region from amino acid residue 345 to 392.

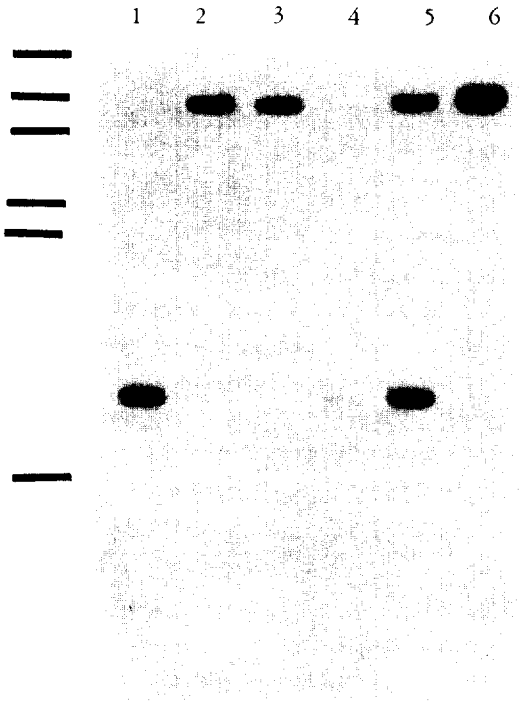

Fig. 3. Disruption of the *SKI3* gene. The *Bgl*II-*Sal*I fragment shown in Fig. 1 was replaced with a 1.2 kb *Bam*HI-*Sal*I fragment that included the *URA3* gene flanked by *Xba*I sites. DNA purified from each strain was digested with *Xba*I and used in a Southern blot with the *Sal*I-*Xba*I fragment shown in Fig. 1 as probe. As expected, this probe detected the 6.6 kb *Xba*I fragment in the parent. Strains carrying the disruption had a new *Xba*I site adjacent to each end of the inserted *URA3* gene, and so this probe detected only a 1 kb fragment that is essentially the same size as the probe itself.

*SKI*3 유전자와 숙주세포의 증식

*SKI*3 유전자가 숙주세포의 증식에 필수적으로 관여하는지를 확인하기 위하여 Rothstein(10)의 방법에 의해 *SKI*3 유전자의 염기 490에서 3,470에 해당되는 *Bgl*II-*Sal*I 부위를 *URA*3 유전자로 대체함으로써 *SKI*3 유전자를 disruption 시켰다(Fig.3). 이 plasmid를 K_2^+ L-A-HN *mkt*1의 표현형을 갖는 二數體 heterozygote에 形質轉換시킨 후 포자형성을 유도한 결과 98%의 포자가 발아됨을 확인하였다. 이 결과로부터 *SKI*8 유전자와 마찬가지로(8) *SKI*3 유전자도 숙주세포의 증식에 필수적으로 관여하는 유전자가 아님을 알 수 있었다. 또한 24개의 tetrad를 분석해 본 결과 각 tetrad 중 2개의 포자는 Ura^+인 사실로부터 *SKI*3 유전자가 disruption되어 있음을 확인할 수 있었고 32℃에서 killer 형질을 나타낸 것으로 미루어 *mkt*1 변이가 억제되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 *SKI*3 유전자는 *MAK* 유전자와는 相似하게 숙주세포의 증식에는 관여하지 않고 단지 killer VLP의 복제를 억제하는데 관여하고 있음을 확인하였다.

Table 1. Nuclear localization of *SKI3::lacZ* fusion proteins

Fusion protein structure	Plasmid	Percent β-galactosidase activity in the nucleus
$SKI3_{1\text{-}1424}$-*lacZ*	pSR605	35
lacZ	pLG669-Z	1
$SKI3_{1\text{-}296}$-*lacZ*	pSR1016	28
$SKI3_{306\text{-}314}$-*lacZ*	pSR1376	40

Nuclei were prepared from strain BJ3501 carrying the plasmids shown, and the percentage of β-galactosidase activity in the Percoll gradient fractions containing nuclei is shown. pSR605 carries the *Pst*I-*Pst*I fragment of pSKI3:5-1 (see Fig. 1) inserted into the *Pst*I site of YEp356 (15) producing an in-frame fusion of all but the last 8 amino acids of *SKI3* with *lacZ*. pLG669-Z (16) has the *lacZ* gene fused to the promoter and initiator methionine of the *CYC1* gene. pSR1016 has the *Bgl*II-*Bgl*II fragment of the *SKI3* gene including bases 490 to 1677 and amino acids 1-296 inserted into the *Bam*HI site of YEp353 (15) producing an in-frame fusion with β-galactosidase. pSR1376 was constructed by inserting synthetic oligonucleotides into the *Bam*HI site of pLG669-Z to insert the amino acid sequence I K Y F K K F P K (residues 306-314 of *SKI3*) followed by a *Sal*I site (producing the sequence V D) after the M T G S amino terminal of the β-galacosidase of pLG669-Z. Thus the amino terminal sequence of the final plasmid was M T G S I K Y F K K F P K V D L G S . . . β-galactosidase.

*SKI*3 단백질의 局所化(localization)

*SKI*3 유전자의 분자생물학적 기능을 규명하기

Table 2. Comparison of known nuclear localization signals with *SKI3* sequences

Gene	Known Nuclear Localization Signal Sequences Sequence	Reference
SV40 large T antigen	ProProLysLysLysArgLysVal	18
SV40 VPI capsid protein	ProThrLysArgLysGlySer	19
Yeast ribosomal protein L3	ProArgLysArg	20
Yeast ribosomal protein L29	LysThrArgLysHisArgGly LysHisArgLysHisProGly	21
Polyoma large T antigen	ProLysLysAlaArgGluAsp ValSerArgLysArgProArg	22
MAK16 residues 139-144 *MAI16* residues 282-287	ProLysValLysArgArg ThrLysArgProLysVal	23
Gene	Potential Nuclear Localization Signals in *SKI3* Sequence	
SKI3 residues 307-314	LysTyrPheLysLysPheProLys	This work

위해서는 세포질 내에서 생성된 *SKI3* 단백질이 세포 내의 어느 부위로 局所化되는지를 확인해야 한다. *SKI3* 유전자의 염기서열을 분석해 본 결과 Fig.2에 box로 표시되어 있는 염기서열이 핵내 국소화에 관여하는 전형적인 염기서열의 특성(11), 즉 (1) 주로 3~4개의 lysine이나 arginine 또는 proline 등의 alkali성 amino산 잔기로 구성되어 있고, (2) 산성 amino산 잔기는 결여되어 있으며, (3) 가급적 threonine, serine, asparagine 또는 glutamine의 잔기가 포함되어 있지 않은, 4~10개의 amino산 잔기로 구성된 peptide를 coding 할 수 있는 염기서열을 보유하고 있음을 발견하였다(Table 1). 이 염기서열이 실제로 *SKI3* 단백질의 핵내 局所化에 관여하는지를 확인하기 위하여 *S. cerevisiae* BJ3501 (*MATa Pep4*::*HIS3 Prb*1-Δ1·6R *lan*1 *ski*3 Δ200 *ura*-52) 株에 *SKI3* 유전자의 각 부위를 포함하는 DNA 절편과 *lacZ* 유전자가 융합된 수종의 plasmid를 形質轉換시킨 후 배양된 숙주세포의 핵부위만을 분획하여 β-galactosidase의 활성을 측정해 본 결과 일반적으로 세포질에 局所化되는 것으로 밝혀진 β-galactosidase가 이 경우에는 핵내에서 집중적으로 나타나고 있음이 확인되었다(Table 2). 그러나 핵내 局所化 신호서열(nuclear localization signal sequence)로 추정되는 LysTyrPheLysLysPheProLys 잔기를 포함하지 않은 경우에도 β-galactosidase의 전체활성 중 약 28%가 핵부위에 분포되어 있는 사실로부터 *SKI3* 유전자에는 최소 1개 이상의 핵내 局所化 신호서열이 존재하고 있는 것으로 추정된다. Fig. 2에 이와 같은 가능성에 있는 두군데의 염기서열을 밑줄로써 표시하였다. *SKI3* 단백질의 핵내 局所化는 DNA에만 특이적으로 반응하는 mithramycin 또는 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)이 핵부위에서만 반응한다든지, dot blotting에 의해 각 분획을 전체 효모 DNA와 hybridization시켰을 경우 핵 부위에서만 반응이 나타나거나, β-galactosidase의 활성이 핵부위에 집중되어 있다는 사실(Fig.4A)로도 확인이 되었고, *lacZ-SKI3* 융합단백질로부터 얻어진 항체를 사용하여 Western blotting 해본 결과 실제로 핵부위에서만 면역반응이 일어난 사실(Fig.4B)에 의해서도 뒷받침되고 있다.

SKI3 유전자의 분자생물학적 기능

Killer 효모 내에서 VLP의 복제증식과 숙주 자신의 방어보호 간의 균형을 유지시켜 주는데 관여하는 유전자 중 숙주의 방어에 관여하고 있는 것은 *SKI* 유전자인 것으로 알려져 있다(6). 실제로

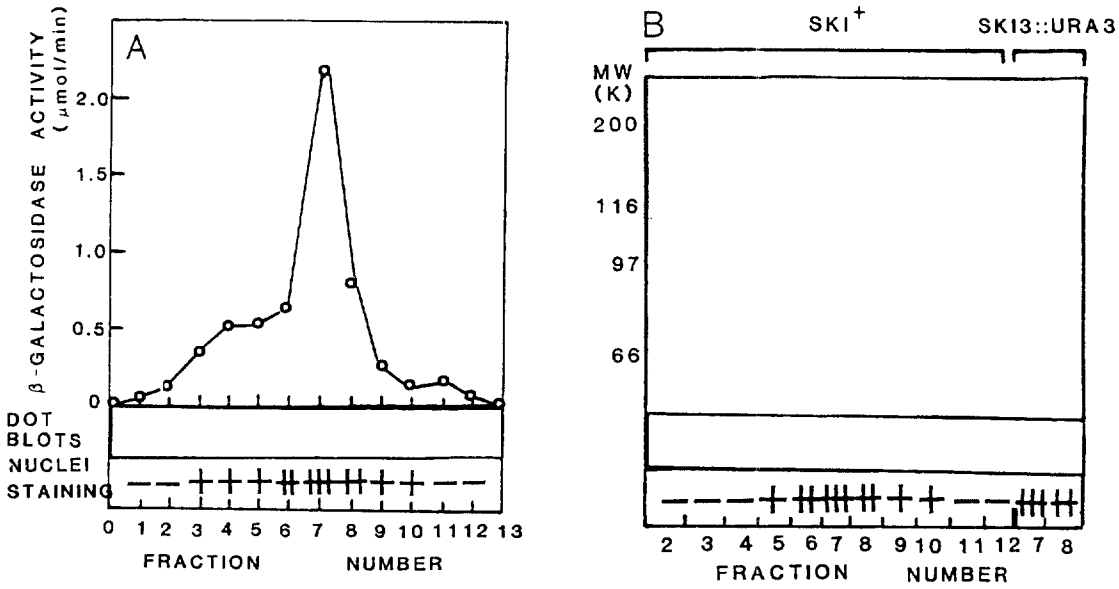

Fig. 4. Nuclear localization of the *SKI3* product. The *pep4 prb1* strain BJ3501 was grown with (panel A) or without (panel B, *SKI*+) the plasmid pSR605 which carries a fusion of amino acid residues 1-1424 of *SKI3* with *lacZ* (see Table 1). Nuclei were isolated on Percoll gradients and assayed for *SKI3* either by assaying β-galactosidase (panel A) or by Western blots using antibody to a purified *SKI3-lacZ* fusion protein (panel B). The location of nuclei in the gradient was done both by observing mithramycin- or DAPI-stained aliquots by UV fluorescence microscopy and by dot-blot hybridization for rDNA. In panel A, the supernatant fraction (prior to banding on Percoll) is shown as fraction 1. In panel B, the supernatant fractions are not shown, but had no immunoreactive bands on Western blots. Pre-immune serum was also tested for reactivity with the fusion protein used for immunization and showed less than 10^{-4} the reactivity shown by immune serum. The last two lanes in panel B show the nuclear fractions from a Percoll gradient of an extract of the *SKI3::URA3* disruption strain 2866 (*a leu2 ura3 SKI3::URA3* K+). In this experiment, and another in which all fractions were examined by Western blotting, no immunoreactive bands were detected.

본 연구에서 *SKI*3 유전자는 *SKI*8과 마찬가지로 숙주세포의 抗 virus性 자기방어에만 필수적인 기능을 나타내고 있으며 숙주세포의 增殖에 필수적으로 존재해야 하는 것이 아님이 밝혀졌다. 또한 *SKI*3 유전자로부터 coding되는 단백질은 163 kDa의 크기를 갖는 핵내 단백질로서 *SKI*3 유전자의 전사는 어떠한 인자에 의해서도 제어되지 않으므로 숙주세포 내에 일정량이 존재하는 構成酵素인 것으로 추정되고 있다.

SKI 유전자 연구에 있어서 가장 중요한 의문사항은 *SKI* 유전자의 분자생물학적 기능, 즉 이 유전자들이 어떤 기작에 의해 VLP의 복제를 억제하는가이다. Killer 형질에 관련된 VLP들이 숙주 내의 세포질 내에 존재하면서 복제를 하는 반면 본 연구결과 밝혀진 것처럼 *SKI*3 단백질은 핵내로 국소화되는 사실로부터 *SIK*3 단백질이 VLP에 직접적으로 결합하여 VLP의 복제를 억제시키는 것이 아니라 간접적인 억제 기작을 지니고 있는 것으로 보인다. 즉 VLP의 복제에 필요한 세포질 내의 어떤 성분 또는 인자들이 *SKI*3 단백질에 의해 구조적인 변형이 일어나거나 활성 등이 저해됨으로써 VLP의 복제에 간접적으로 영향을 미치는 것으로 추정된다. 최근 L-A VLP로부터 생산되는 180 kDa 크기의 단백질이 單鎖 RNA (ssRNA)와 결합하는 단백질이며 (12) L-A의 염기서열 분석을 통해 viral RNA polymerase의 기능을 나타내고 있음(13)이 확인되었다. 또한 이 단백질은 ribosome의 frameshifting에 의해 2개의 重複(overlapping)된 ORF가 융합되어야만 합성될 수 있음이 확인되었다(13). 일반적으로 이러한 ribosome의 frameshifting은 진핵 숙주세포 자체의 process와는 무관하게 주로 retrovir-

us의 복제시 나타나는 현상(14)이므로 아마도 *SKI*3 유전자도 ribosome이 형성되는 과정에서 이 ribosome들을 변형시켜 줌으로써 frameshift가 일어나는 것을 방지하는 역할을 담당하고 있을 가능성도 배제할 수 없다.

결 론

효모의 superkiller 현상은 숙주세포와 virus간의 상호 균형유지에 있어서 어떤 기작이 관여하는가를 연구하는데 중요한 model system이 될 수 있으므로 최근들어 많은 관심의 대상이 되고 있다. 특히 *SKI* 유전자와 virus간의 상호제어관계가 명확히 규명될 경우 AIDS 등 현재 전세계적으로 문제가 되고 있는 virus성 질병의 원인규명과 진료에도 응용될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 *SKI* 단백질이 이제까지 보고된 여러가지 단백질과 구조적인 相同性(homology)이 매우 낮아 이 단백질의 기능에 관한 기본 정보가 부족할 뿐만 아니라 L-A나 M dsRNA의 복제를 제어하는 인자 및 작용기작이 정확하게 밝혀져 있지 않으므로 *SKI*3 유전자의 확실한 분자생물학적 기능규명에는 아직도 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

감사의 말씀

본고는 필자가 1987년 9월부터 13개월간 미국 NIH의 Dr. Reed B. Wickner의 연구실에서 수행한 연구결과의 일부를 정리한 것이다. Dr. Wickner의 지도에 깊은 감사를 드린다.

참고문헌

1. Wickner, R.B. *Ann. Rev. Biochem.* **55,** 373-395 (1986).
2. Hopper, J., Bostian, K.A., Rowe, L.B., Tipper, D.J. *J. Biol. Chem.* **252,** 9010-9017 (1977).
3. Wickner, R.B. Leibowitz, M.J. *J. Mol. Biol.* **105,** 427-443 (1976).
4. Wickner, R.B. *Genetics* **88,** 419-425 (1978).
5. Ridlen, S.P., Sommer, S.S. and Wickner, R.B. *Mol. Cell. Biol.* **4,** 761-770 (1984).
6. Toh-e, A., Guerry, P., Wickner, R.B. *J. Bacteriol.* **136,** 1002-1007 (1978).
7. Guerry-Kopecko, P., Wickner, R.B. *J. Bacteriol.* **144,** 1113-1118 (1980).
8. Sommer, S.S. Wickner, R.B. *Virology* **157,** 252-256 (1987) .
9. Icho, T., Wickner, R.B. *J. Biol. Chem.* **263,** 1467-1475 (1985).
10. Rothstein, R.J. *Methods Enzymol.* **101,** 202-211 (1983).
11. Hall, M.N. in Yeast Cell Biology, Hicks, J. ed. Alan R. Liss, Inc. pp.421-425 (1986).
12. Fujimura, T., Wickner, R.B. Cell, in press.
13. Icho, T., Wickner, R.B. Cell, in press.
14. Jacks, T., Power, M.D. Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J., Varmus, H.E. *Nature,* **331,** 280-283 (1988).
15. Myers, A.M., Tzagaloff, A., Dinney, D.M., Lusty, C.J. *Gene.* **45,** 299-310 (1986).
16. Guarente, L. Ptashne, M. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **78,** 2199-2203 (1981).
17. Johnston, N., Davis, R.W. *Mol. Cell. Biol.* **4,** 1440-1448 (1984).
18. Smith, A.E., Kalderon, D., Robers, B.L., Colledge, W.H., Edge, M., Gillett, P., Markham, A., Paucha, E. Richardson, W.D. *Proc. R. Soc. Lond. B* **226,** 43-58 (1985).
19. Wychwski, C., Benichou, D. Girard, M. *EMBO. J.* **5,** 2569-2576 (1986).
20. Moreland, R.B., Nam, H.G., Hereford, L.M., Fried, H.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82,** 6561-6565 (1985).
21. Underwood, M., Fried, H. Personal Communication.
22. Richardson, W.D., Roberts, B.L., Smith, A.E. *Cell.* **44,** 77-85 (1986).
23. Wickner, R.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85,** 6007-6011 (1988).