*The Korean Journal of Microbiology, Vol. 38, No. 2, June 2002, p. 96-102*
*Copyright©2002, The Microbiological Society of Korea*

# 출아효모의 세포주기동안 DNA 상해에 의한 발현 유도에 미치는 *DPB11* 유전자의 영향

임선희[1] · 배호정[1] · 김중현[1] · 김은아[1] · 김승일[2] · 김수현[2] · 박정은[1] · 김재우[1,3] · 선우양일[1]*

[1]동아대학교 자연과학대학 생물학과, [2]한국기초과학지원연구원 프로테옴 분석팀, [3]동아대학교병원 임상병리실

**S기 checkpoint 기작은 DNA 복제 저해나 DNA 상해 등에 반응하여, S기 세포주기 정지를 일으키거나 상해 회복에 관련된 유전자들의 전사가 유도됨으로서 진핵세포에서의 유전적인 안정성을 유지한다. 이러한 반응에 대한 *dpb11* 변이주의 결손을 확인하기 위해서, *DPB11* (DNA polymerase B possible subunit) 유전자의 과다발현 효과에 대해 조사하고, HU (Hydroxyurea)와 MMS (Methyl methanesulfonate)에 대한 감수성 및 DNA 상해 물질에 의한 *RNR3* (Ribonulectide reductase) mRNA의 전사 유도를 조사하였다. *RNR3* mRNA의 전사는 DNA 합성 저해에 의해 발생한 스트레스나 화학물질에 의한 직접적인 DNA 상해 등에 의해 유도되어진다. 그 결과, *dpb11-1* 변이주는 DNA 상해 물질에 감수성을 나타내었고, *RNR3* mRNA 전사유도 또한 야생형 균주에 비해 약 40% 정도 감소를 나타내었다. 더욱이 *dpb2-1* 균주에서도 이와 동일한 결과를 얻었다. 그러므로 *DPB2*와 *DPB11* 유전자는 복제에 대한 sensor로서, 복제 정지 요인에 대한 세포주기 반응과 전사 조절에 모두 작용하는 것으로 사료된다.**

**Key words** □ **cell cycle, *DPB11*, *Saccaromyces cerevisiae*, S phase checkpoint**

진핵세포에서 세포주기의 각 단계에서 정확하고 순차적인 조절은 성공적인 염색체 DNA의 복제와 딸세포로의 정확한 유전정보의 전달에 매우 중요하다. 이러한 세포주기의 조절에는 많은 생화학적 과정들이 관여하며, 이는 세포주기 진행에서 앞 단계의 과정이 완료된 후에 다음 과정이 시작되는 것을 보증하는 것으로 이러한 과정을 checkpoint라고 한다(19). 그 중 S기 checkpoint는 유전정보의 정확한 복제 및 다음 세대로의 전달에 필수적인 것으로, 염색체 상의 각 복제원점들은 S기 초기 혹은 후기 동안 복제를 시작하여, M기가 완전히 끝날 때까지 다시 복제 개시가 시작되지 않도록 제어한다(7,15). 이러한 S기 checkpoint 기작은 염색체 복제 동안 DNA 상해나 복제의 방해 요인이 존재할 때 활성화되어, 세포주기 진행을 지연시키고 DNA 상의 결함을 회복시킨 후 다시 진행되게 한다. S기 checkpoint 기작은 복제가 일어나는 동안 DNA 상해나 복제 정지 요인이 존재할 때, 먼저 세포주기 진행을 정지시키는 기작, 복제진행의 장해 요인의 회복에 관련된 유전자들의 전사조절, 그리고 정지 요인이 되는 상해 등에 직접 결합하는 인자들의 분자적 기작을 포함한다(13,26).

염색체 DNA 복제에는 DNA 중합효소를 포함하여 DNA 복제에 관여하는 많은 효소들이 G1/S 경계 부위에서 생성되며, 그 중에서도 DNA 중합효소가 가장 중심적 역할을 수행한다. 출아효모의 핵 내에 존재하며 염색체 DNA의 복제에 관여하는 DNA 중합효소로서 3 종류의 DNA 중합효소 I, II, 그리고 III이 분리정제되었다(18,26,27). DNA 중합효소 I (Pol1)은 DNA primase 복합체로 DNA 복제 개시에 필수적이며 DNA primase는 RNA를 합성하고 Pol1은 RNA primer를 이용하여 짧은 DNA 가닥를 합성한다. Pol2와 Pol3는 이렇게 만들어진 짧은 DNA 가닥에 연이어 잇는 DNA 가닥의 신장에 관여한다. Pol 2는 256-, 80-, 34-, 30-, 그리고 29-kDa의 단백질 복합체로서 정제되었으며 (6), 이 중 256-kDa subunit는 *POL2* 유전자에 의해 암호화되고, 촉매단위로서 DNA 중합기능을 갖고 있으며, 또한 S기 checkpoint에도 매우 중요한 역할을 한다(17). 그 이외의 두 번째 하위단위인 80-kDa subunit는 *DPB2*에 의해 암호화되고, 염색체 DNA 복제에 필수적이다(2,14). *DPB3* 유전자에 의해 암호화된 34-와 30-kDa subunits는 그 결손에 의해 자연적 변이(spon-taneous mutation) 빈도가 증가되므로 DNA 합성의 정확성에 필요한 것으로 제안되었다(1). 이러한 하위단위 중 특히 *POL2*는 *DUN2* 유전자와 동일하다는 것이 밝혀졌으며, 이 변이주인 *dun2* (DNA damage-uninducible mutant)는 DNA 상해제 처리 후 유발되어지는 유전자의 발현에 결손을 나타내었다(17). 이러한 연구로 *POL2*는 S기 checkpoint에 관여되어 있으며, 또한 S기 동안 상해나 복제 정지 요인에 대해 sensor의 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. 이에 비해 다른 복제 효소인 Pol1과 Pol3에서는 염색체 복제 외의 checkpoint 기능은 밝혀져 있지 않다(17). 이는 *POL2*가 복제 기작에 활성효소로 작용하면서 동시에 다른 단백질과의 상호작용을 통해 복제기작의 정확성이나 진행을 조절한다는 것을 의미한다. DNA 복제기작에 대한 Pol2의 기능을 이해하기 위해 그 기능이 알려지지 않은 Dpb2와 상호작용하는 인자를 동정하기 위한 실험에서 *dpb2-1* 변이주의 multicopy suppressor로서

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 051-200-6789, Fax: 051-200-7269
E-mail: shleem@daunet.donga.ac.kr

*DPB11*이 분리되었다(4). *DPB11*의 과다발현은 *POL2* 유전자의 C-말단에 변이를 지닌 *pol2-11*과 *pol2-12* 변이주의 변이를 또한 극복하였다. 이 C-말단 부위는 다른 구성성분과 상호작용에 매우 중요하며(14), 또한 이 부위는 S기의 checkpoint 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(17). 더욱이 *DPB11* 유전자의 아미노산 서열은 S기의 시작 및 세포주기 checkpoint에 필요한 분열효모의 Cut5/Rad4와 유사하다는 것이 밝혀졌다(20). 또한 *in vivo* 내의 two hybrid system을 통하여 Dbp11과 Dpb2가 결합력을 지니는 것이 밝혀져 Dpb11은 DNA 복제시스템을 통해 S기 checkpoint 기능을 가진다는 것이 제안되었다(10).

현재까지 알려진 *DPB11* 유전자의 S기 checkpoint 기능을 주로 상해요인이나 복제 정지 요인에 의해 세포주기가 정지하는 것에 대해서만 조사하였다. 본 연구에서는 *POL2*와 상호 작용하는 것으로 알려진 *DPB2*와 *DPB11* 유전자가 DNA 상해물질인 MMS (Methylmethane sulfonate) 혹은 HU (hydroxyurea)를 처리하여 염색체 DNA의 복제 완료에 미치는 영향을 조사하고, 이러한 DNA 상해에 의해 유도되는 *RNR3* 유전자의 전사수준을 *dpb2-1*과 *dpb11*-1 변이주에서 조사하였다. 그 결과 *POL2*에서와 같은 DUN (damage-uninducible) 표현형을 나타내어, 이 *dpb2-1*과 *dpb11*-1 변이주 양쪽 모두가 S기 상해요인에 대해 세포정지 기능 및 상해회복에 관련된 유전자의 전사유도 과정에 기능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 *DPB11* 유전자의 과다발현은 세포성장에 오히려 저해 요인을 나타내므로 유전자 산물의 양적 조절이나 단백질간의 상호작용이 세포주기에서 매우 중요한 것으로 사료된다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmid DNA

본 실험에 사용된 출아효모 균주와 대장균은 Table 1에 표시하였다. 세포주기가 진행되는 동안 DNA 상해제인 MMS를 처리한 후, 복제 완료된 염색체의 상태를 알아보기 위한 CHEF gel 전기영동에는 YHA410, YHA9, YHA411 균주를 사용하였고, 전체 RNA의 분리 및 그 외의 실험에는 W303A 균주와 *dpb2-1*, *dpb11*-1 균주를 사용하였다.

*DPB11* 유전자의 과다 발현 영향을 조사하기 위해 사용된 plasmid DNA로는 single copy vector인 pKOM1 (GAP-promoter)과 pKOM2 (GAL-promoter) 에 각각 *DPB11* 유전자를 삽입한 pKOM1+*DPB11*과 pKOM2+*DPB11*, 그리고 2 $\mu$ origin의 multi-copy vector인 pYES2 (GAL-promoter)과 pYES2+*DPB11*을 사용하였다.

### 배지 및 약제

효모 및 대장균을 이용한 유전학적 방법은 Sambrook 등(1989)의 방법 및 Sherman 등(1986)의 방법을 사용하였다(23,25). 대장균 DH5$\alpha$의 증식용 배지로 LB (Luria-Bertani) broth (0.5% Yeast extract, 1% Bactotrypton, 0.5% NaCl, 50 $\mu g/ml$ Ampicillin)를 사용하여 37°C에서 배양하였다. Plasmids의 형질전환에 사용된 선택배지는 SC-Ura 배지 (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 1× amino acids dropout Uracil)를 사용하였다. 또한 Galactose 유도의 효과를 조사하기 위해 YPGal 배지 (1% Yeast extract, 2% Bacto-peptone, 3% Galactose, 2% Bacto agar)를 사용하였다.

**Table 1.** Strains used in this study

| Strain | Genotype |
|---|---|
| W303-1A | *Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1* |
| W303-1B | *Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1* |
| W303-1A/B | *Mata/*$\alpha$ diploid, cross of W303-1A and W303-1B |
| *dpb2-1* | W303-1A *dpb2-1* |
| *dpb11-1* | W303-1A *dpb11-1* |
| YHA410 | *Mata ade1 bar1*$\Delta$ *his2 leu2 trp1 ura3* |
| YHA9 | YHA410 *dpb2-1* |
| YHA411 | YHA410 *dpb11-1* |
| DH5$\alpha$ | F$^-$ $\varphi$80d *lac*ZDM15 *end*A1 *rec*A1 *hsd*R17 [$r_k^-$ $m_k^+$] *sup*E44 *thi*-1 $\lambda^-$ *gyr*A96 *rel*A1 $\Delta$[*lac*ZYA –*arg*F] U169 |

### HU, NOC 그리고 MMS에 대한 감수성 조사

YPD+HU (hydroxyurea, Sigma, St. Louis, USA) 고체배지는 0, 50, 100 mM의 농도, YPD+NOC (nocodazole, Sigma, St. Louis, USA)은 0, 20, 50 $\mu g/ml$ 농도, 그리고 YPD+MMS는 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05%로 각각 저장 용액을 첨가하여 만들었다. 감수성을 조사하기 위하여 야생주와 두 변이주를 약제가 첨가된 각 배지에 streaking하여 3~4 일간 25°C에서 배양한 후, 야생주와 변이주에서의 감수성을 비교 조사하였다.

### Contour-clamped homogeneous-electric-field (CHEF) 겔 전기영동

야생주와 두 변이주를 25°C에서 early log phase ($1\times10^7$ cells/*ml*)까지 배양한 후, $\alpha$-factor (30 ng/*ml*)로 동조화하거나 비동조화된 상태에서 0.2 M의 HU, 0.03%의 MMS, 그리고 30 $\mu g/ml$의 NOC을 각각 처리하여 각 0, 2, 4, 6 시간 간격으로 세포를 집균한다. 집균한 세포를 zymolyase 20T (ICN Biomedical, USA)로 처리한 후, low melting agarose에 넣어 proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany)를 Kaiser 등(1994)의 방법에 따라 CHEF Mapper system (Bio-Rad, Richmond, USA)을 이용하여 수행한다 (9).

### 형광현미경 분석

야생주와 두 변이주를 $1\times10^6$ cells/*ml*로 희석하여 YPD 액체배지에 접종한 후, 25°C에서 2 시간 배양하여 세포수가 약 $5\times10^6$ cells/*ml*에 도달하면, 균주를 양분하여 한 쪽은 0.03%의 MMS를 처리하고 다른 쪽은 MMS를 처리하지 않은 상태로 진탕 배양하였다. 이때 MMS를 처리한 시간을 0 시간으로 하여,

각각 0 시간 처리한 시료와 4 시간 처리한 시료를 1 *ml*씩 Epp. tube에 옮겨 집균한 뒤 1 *ml*의 냉각된 멸균수로 세척하고 다시 1 *ml*의 0.1 M sorbitol, 40% ethanol에 현탁한다. DNA를 관찰하기 위해서 고정된 세포를 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenilindole)로 염색하여 슬라이드 글라스 위에 DAPI (1 *μg/ml*)를 3 *μl* 떨어뜨린 후 그 위에 고정된 세포를 3 *μl* 떨어뜨려 형광현미경으로 야생주(W303A)와 변이주를 비교 관찰하였다.

### 유전자산물의 조사

YPD 고체배지에서 자란 야생주 W303A와 변이주인 *dpb2-1*과 *dpb11-1*의 콜로니를 YPD 액체배지에서 배양하여 O/N culture를 만든 후, 다음 날 100 *ml*의 YPD에 희석하여 접종하였다. 접종한 균주가 지수기 ($1\times10^7$ cells/*ml*)에 도달했을 때를 0시간으로 하여 DNA 상해제인 0.03%의 MMS를 처리하였다. 처리전의 시료를 대조군으로 하여 0시간부터 매 2시간마다 배양액을 모아 2, 4, 6시간의 각각 20 *ml* 씩 분취하여 세포를 모았다. 전체 RNA의 분리는 Kaiser 등(1994)의 방법에 따라 수행하였으며(9), DNA 상해제에 의해 그 발현이 유도되는 유전자로 *RNR3*의 ORF 내 *Pvu*II (179)과 *Hin*dIII (2585) 제한효소 자리를 이용하여 잘라, 이 DNA 단편을 probe DNA로 사용하였다(5).

## 결과 및 고찰

### 세포 생존에 대한 *DPB11* 유전자의 과다발현 효과

*DPB11* 유전자는 *dpb2-1* 변이주의 제한온도에서의 치사를 multi-copy에 의해 극복하는 유전자로서 분리되었다(4). Pol2, Dpb2, Dpb11 단백질은 상호 서로 결합하는 것이 유전적으로 혹은 *in vivo* 내의 two hybrid system에 의해 확인되었다. 단백질간의 상호결합은 분자간에 이루어지므로 단백질 분자의 상호비가 매우 중요하다고 볼 수 있다. *dpb11-1* 변이주를 사용하여 *DPB11* 유전자의 과다 발현 영향을 조사하기 위해 먼저 single copy vector인 pKOM1 (GAP-promoter)과 pKOM2 (GAL-promoter)에 *DPB11* 유전자를 삽입하였다(Fig. 1A). 여기에 사용한 vector에서 GAP promoter에 비해 GAL promoter는 좀 더 많은 양의 발현이 유도된다. 이렇게 만들어진 vector를 *dpb11-1* 변이주에 형질전환하여 제한온도 34°C에서 변이주의 생장을 각각 YPD 배지와 YPGal 배지에서 비교하였다. Fig. 1A의 왼쪽 고체배지에서 보여주는 것과 같이 pKOM1 (Fig. 1A-1)과 pKOM2 (Fig. 1A-3) 그리고 GAL promoter가 활성을 나타내지 않는 pKOM2+*DPB11* (Fig. 1A-4)에서는 세포 생장에 제한을 보였으나, pKOM1+*DPB11* (Fig. 1A-2)에서는 좋은 생장을 나타내었다. 그러나 YPGal 고체배지에서는 pKOM1+*DPB11* (Fig. 1A-2)와 pKOM2+*DPB11* (Fig. 1A-4)이 들어있는 균주에서 제한온도에서의 세포 생장의 저하가 극복되었다. 그러므로 single copy plasmid를 사용한 *DPB11* 유전자의 발현은 세포성장을 정상으로 회복시켰다. 2 *μ* origin의 multi-copy vector인 pYES2 (Fig. 1B-1)와 pYES2+*DPB11* (Fig. 1B-2, -3, -4)을 사용하였을 때, 34°C의 YPD 고체배지에서 pYES2+*DPB11*이 들어있는 균주에서 정상적인 생장을 나타내었다. 이는 pYES2+*DPB11* 내의 GAL promoter가 multi-copy로 존재하면서 약한 발현이 나타나는 것으로 보여진다. 그러나 Fig. 1B의 YPGal 배지에서는 GAL promoter의 발현이 정상적으로 유도되어 Fig. 1의 A와는 달리 생장이 오히려 저해되는 것이 나타났다. 이는 과량의 발현이 단백질간의 상호작용에 방해요인이 될 수 있음을 나타내고, Cdc6 단백질에 의한 세포주기에서도 단백질의 발현 양에 의해 진행의 양성적 혹은 음성적 조절이 가능함이 알려져 있다(8,24). 그러므로 이러한 결과는 Dpb11 단백질이 세포주기 조절에 다른 두 방향의 조절 단백질과 관련되어 있을 가능성을 시사한다.

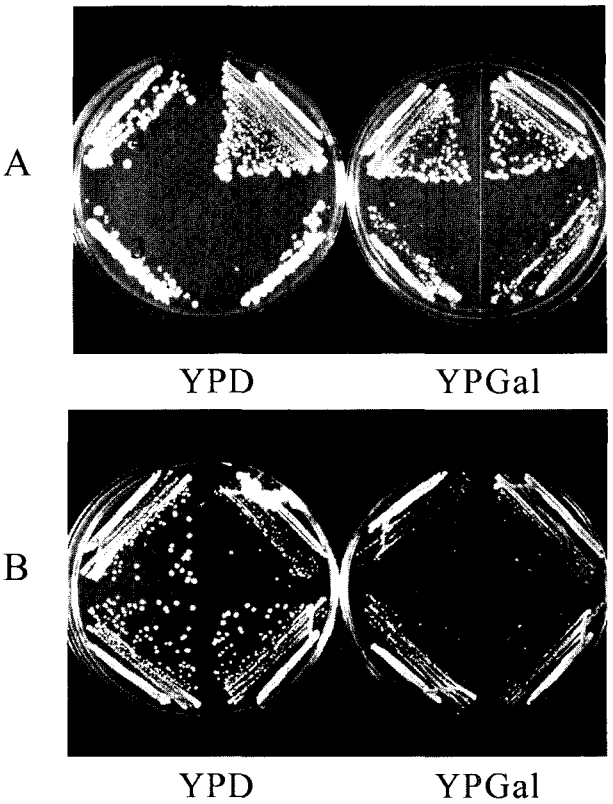


**Fig. 1.** Complementation of temperature-sensitive growth of *dpb11-1* mutant. (A) *dpb11-1* cells harboring pKOM1 (1), pKOM1+*DPB11* (2), pKOM2 (3) and pKOM2+*DPB11* (4) plasmids were streaked onto YPD and YPGal plates and incubated at 34°C for 3 days. (B) *dpb11-1* cells harboring pYES2 (1) and pYES2+*DPB11* (2, 3, 4; individual colonies) plasmids were streaked and incubated at the same condition with (A).

### *DPB2*와 *DPB11*은 복제기구를 통한 S기 checkpoint 조절을 수행한다

Araki 등 (1995)에 의한 연구에서 *dpb11* 변이주가 S기 저해제인 HU와 DNA 상해제인 MMS에 약한 감수성을 나타내는 것이 밝혀져, *DPB11* 유전자가 *DPB2*와 상호작용을 지니고 S기 checkpoint에 관여할 가능성이 시사되었다(4). 본 연구에서는 그 기능이 완전히 밝혀지지 않은 *DPB2*와 *DPB11* 유전자의 S기 checkpoint에서의 기능을 조사하였다.

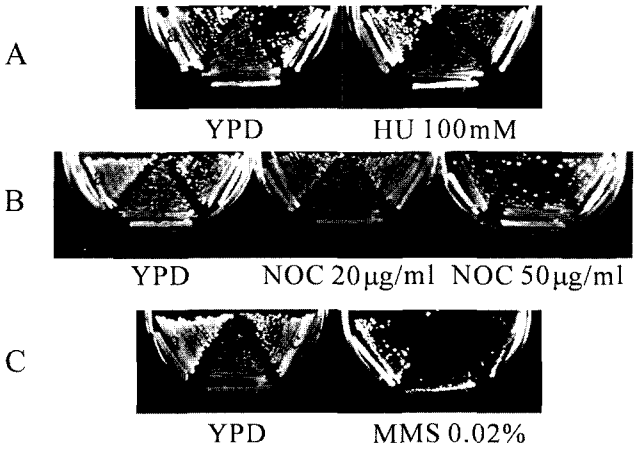


**Fig. 2.** DNA damage sensitivity in *dpb2-1* and *dpb11-1* mutants. Isogenic strains, W303A (wild type), *dpb2-1* and *dpb11-1* strains were streaked for HU (A), NOC (B) and MMS (C) plates and incubated at 25°C for 3 days.

먼저 S기 저해제인 HU, M기 저해제인 NOC (nocodazole) 그리고 DNA 상해제인 MMS에 대한 감수성을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 HU와 MMS에만 약한 감수성을 나타내어 S기에 그 기능이 제한되어 있음을 보여주었다. *DPB11*의 HU와 MMS에 대해서는 Araki 등(1995)에 의한 연구와 동일한 결과를 나타내었고(4), *DPB2* 또한 동일한 패턴을 나타내었다. 또한 MMS를 처리한 후, 야생주와 두 변이주에서 핵의 형태를 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 3). 그 결과, 야생주에서는 핵의 형태가 하나로 모인 정상적인 모양을 나타내었으나(Fig. 3A), *dpb2-1* (Fig. 3B)과 *dpb11-1* (Fig. 3C) 변이주에서는 핵의 형태가 여러 개의 조각으로 나타났으며 세포의 형태에서도 이형을 나타내었다. 이러한 결손은 DNA 상해가 존재함에도 불구하고 세포주기가 정지되지 않고 다음 단계로 진행됨으로써 나타난 결과로서 세포주기의 checkpoint에 결손을 나타내는 변이주에서도 보여졌다(16,21,22,28). 또한 MMS에 의한 이러한 염색체 DNA의 상해에도 불구하고 세포주기가 계속해서 진행되는가를 직접적으로 조사하기 위해, YHA410, YHA9, YHA411 균주를 사용하여 복제된 염색체 DNA를 CHEF 겔 전기영동으로 비교하여 보았다(Fig. 4A). 전기영동 후 겔에서 band로 보여지는 것은 복제가 완료된 염색체 DNA를 의미한다. 야생주에서는 MMS를 처리한 후 복제된 염색체가 시간에 따라 점차 줄어들어 6 시간 후에는 거의 나타나지 않았다. 이에 비해 *dpb2*와 *dpb11* 변이주에서는 야생주에 비해 약 40%의 복제된 염색체 DNA를 관찰할 수 있었다. 이는 MMS 처리 후 발생한 DNA 상해에도 불구하고 세포주기 진행이 정지되지 않았음을 의미한다. 또한 $\alpha$-factor로 동조화 시킨 후, 같은 처리를 한 경우에는 0 시간에서 6시간까지 시간에 따른 변화가 나타나지 않았다. 이는 $\alpha$-factor로 동조화에 의해 세포주기가 G1에서 정지된 후, MMS를 처리하면 세포주기가 정지를 나타내는 것으로 보여진다(data not shown). 또한 HU에서도 다소 유사한 경향을 나타내었으나, NOC에 대해서는 별다른 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4B). 따라서 *dpb2*와 *dpb11* 변이주가 G1 checkpoint에는 관여하지 않으나 S기 checkpoint에 관여하며, Araki 등(14)에 의해 밝혀진 DNA 복제에 의한 S기 checkpoint 조절 뿐 아니라 DNA 상해에 의해서도 직접 반응함을 의미한다.

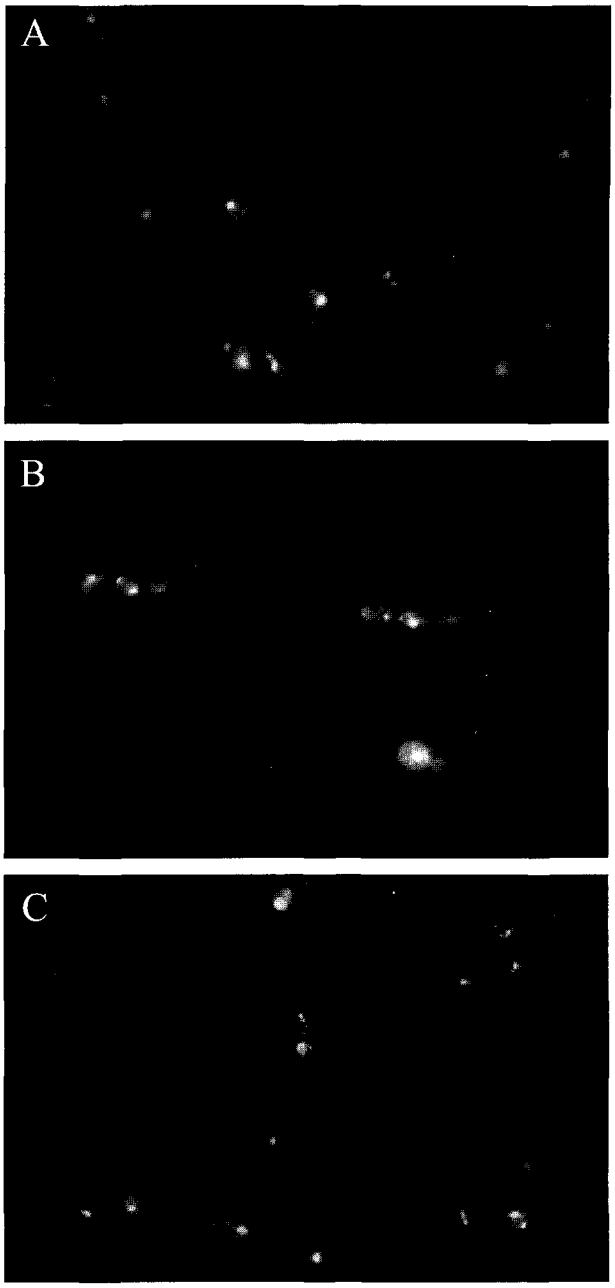


**Fig. 3.** Nuclear morphology in *dpb2-1* and *dpb11-1* mutants. Wild type (A), *dpb2-1* (B) and *dpb11-1* (C) strains were grown at 25°C until $5\times10^6$ cells/ml, added with 0.03% and then incubated for 4 hr. The cells were fixed and stained with DAPI and examined under the fluorescence microscope (×1,000).

### *dpb2*와 *dpb11*은 DUN 표현형을 나타낸다

위의 결과로서 *DPB2*와 *DPB11* 유전자가 S기 세포주기 진행

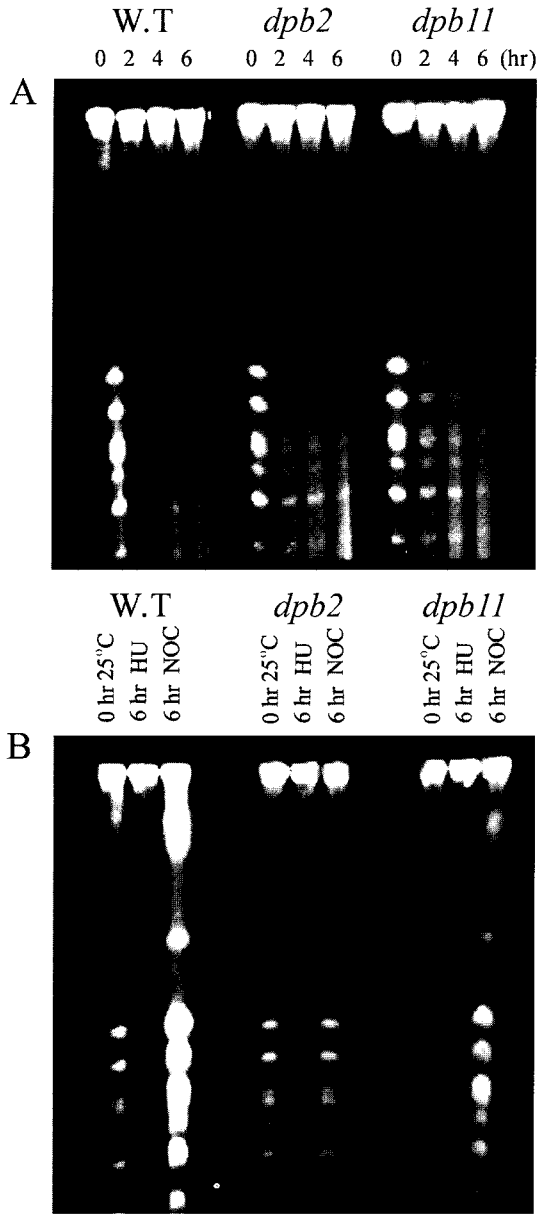


**Fig. 4.** CHEF gel electrophoresis using wild type, *dpb2-1* and *dpb11-1* stains. YHA410 (wild type), YHA9 (*dpb2-1*) and YHA411 (*dpb11-1*) strains were tested for 0.03% MMS (A), 100 mM HU (B) or 30 *μg/ml* NOC (B) contained YPD medium.

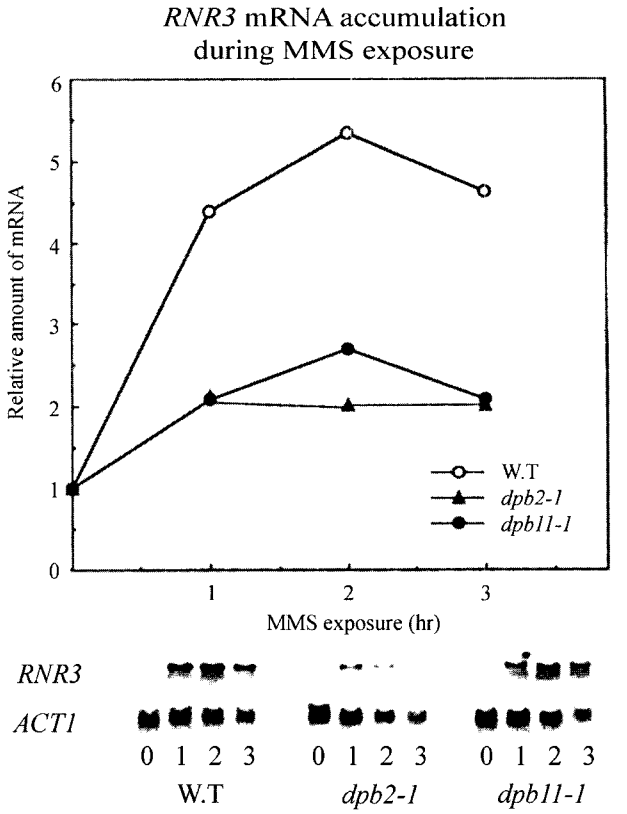


**Fig. 5.** MMS-induced transcription of *RNR3*. Representative RNAs are shown at the top panel. *ACT1* transcript levels were used as a loading control. Images were captured on a BAS 2000 Image analyze system and then analyzed the band quantity.

중에 DNA 상해 등의 복제 정지 요인에 반응하여 세포주기를 정지시키는 기능에 관여하는 것을 알 수 있다. S기 checkpoint 기능에는 이러한 세포주기 정지 기능과 DNA 상해에 의해 유도되는 상해회복에 관여하는 유전자 산물의 전사를 조절하는 기능을 지닌다(11,12). *dun* (damage-uninducible) 변이주들에서는 전사 유도가 감소를 보여준다(5,17).

*DPB2*와 *DPB11* 유전자의 전사조절 기능을 살펴보기 위해 변이주에 상해물질인 MMS를 처리한 후, 상해에 의해 전사가 유도되는 *RNR3*의 발현양을 조사하였다(Fig. 5). 그 결과 MMS 처리 후, 야생주에서는 *RNR3* 유전자 산물이 처리하기 전과 비교하여 약 5배 이상의 전사가 유도되었다. 이러한 유도는 *dpb2-1*과 *dpb11-1*에서도 일어났으나 야생주에 비해 *dpb2-1*에서는 약 20%, *dpb11-1*에서는 약 40%의 발현이 유도되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 *DPB2*와 *DPB11* 유전자가 S기 checkpoint 기능인 상해에 의해 유도되는 유전자 산물의 전사제어에도 관여하고 있음을 시사한다. 이러한 결과는 복제는 정상적으로 수행하지만 S기 checkpoint가 결손을 나타내는 *pol2-11*과 *pol2-12*의 변이주의 표현형과 유사한 것이다(17). 이러한 *pol2*의 변이 부위는 다른 단백질인 Dpb2와 결합력을 가지는 C-말단부위로서, Pol2, Dpb2 그리고 Dpb11의 상호결합이 S기 checkpoint에서 중요한 역할을 수행하는 것을 의미한다.

Pol2 단백질의 N-말단 부분은 효소 활성에 필수적이고 복제에 관여하는 동시에 C-말단은 다른 제어 단백질인 Dpb2 혹은 Dpb11 단백질과 상호 결합하여 세포주기 진행을 조절하는 것을 제안하였다(17,27). 그러나 *DPB2*의 S기 checkpoint 기작에 대한 연구 결과는 보고 되지 않았다. 본 연구를 통하여 *DPB2*와 *DPB11* 유전자가 복제에 직접 효소적 활성을 나타내기보다는 복제 기구를 통한 세포주기의 정확한 제어를 수행하는 S기 checkpoint에 관여하는 것으로 보여진다. 그러므로 복제에 필수적인 Pol2와 Dpb2 단백질이 염색체 복제를 수행함과 동시에 DNA 혹

은 세포 환경에서 유발되는 여러 복제 정지 요인에 대해 sensor로 작용한다고 볼 수 있다. checkpoint 기능을 가진 Dpb11 단백질이 이들 단백질과 상호 작용하여, 복제 기구를 통해 S기의 정상적인 진행을 조절하는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 동아대학교 2000년도 교내 신전교수 연구비에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. Araki H., R.K. Hamatake, L.H. Johnston and A. Sugino. 1991a. *DPB2*, the gene encoding DNA polymeraseII subunit B, is required for chromosome replication in *Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4601-4605.
2. Araki H., R.K. Hamatake, A. Morrison, A.L. Johnson, L.H. Johnston, and A. Sugino. 1991b. Cloning *DPB3*, the gene encoding the third subunit of DNA polymeraseII of *Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res.* 19, 4867-4872.
3. Araki H., P.A. Ropp, A.L. Johnson, L.H. Johnston, A. Morrison, and A. Sugino. 1992. DNA polymerase II, the probable homolog of mammalian DNA polymeraseε, replicates chromosomal DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. EMBO J.* 11, 733-740.
4. Araki H., S.H. Leem, A. Phongdara, and A. Sugino. 1995. Dpb11, which interacts with DNA polymerase II (ε) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 11791-11795.
5. Foss E. 2001. Top1p regulates DNA Damage responses during S phase in *Saccharomyces cerevisiae. Genetics* 157, 567-577.
6. Hamatake R.K., H. Hasegawa, A.B. Clark, K. Bebenek, T.A. Kunkel, and A. Sugino. 1990. Purification and characterization of DNA polymerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 265, 4072-4083.
7. Hartwell L. and T.Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the orther of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
8. Hogan E. and D. Koshland. 1992. Addition of extra origins of replication to a minichromosome suppresses its mitotic loss in *cdc6* and *cdc14* mutants of *Saccharomyces cerevisiae. Prol. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3098-3102.
9. Kaiser C., S. Michaelis, and A. Mitchell. 1994. *Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor,* NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. Leem S.H., J.E. Park, J.H. Kim, K.S. Oh, Y. Sunwoo, and C.N. Chung. 2000. *DPB11* is a component of the S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae. Kor. J. Life Sci.* 10, 610-616.
11. Lew D.J., T. Weinert, and J.R. Pringle. 1997. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae* Vol 3, Cell Cycle Control in *Saccharomyces cerevisiae, Cold Spring Harbor, NY,* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. Lydall D. and T. Weinert. 1995. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* 270, 1488-1491.
13. Lydall D. and T. Weinert. 1996. From DNA damage to cell cycle arrest and suicide: A budding yeast perspective. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 4-13.
14. Morrison A.H., H. Araki, B. Clark, R.K. Hamatake, and A. Sugino. 1991. A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae. Cell* 80, 1143-1151.
15. Murry A. 1995. The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 5-11.
16. Nakai T., T. Shimomura, T. Kondo, K. Matsumoto, and K. Sugimoto. 2000. Rfc5, in cooperation with Rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Bio.* 20, 5888-5896.
17. Navas T.A., Z. Zhou, and S.J. Elledge. 1995. DNA polymeraseε links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* 80, 29-39.
18. Newlon C.S., T.D. Petes, L.M. Hereford, and W.L. Fangman. 1974. Replication of yeast chromosomal DNA. *Nature* 247, 32-35.
19. Roberge M. 1992. Checkpoint controls that couple mitosis to completion of DNA replication. *Trends Cell Biol.* 2, 277-281.
20. Saka. Y., F. Esashi, T. Matsusaka, S. Mochida, and M. Yanagida. 1997. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes Dev.* 11, 3387-3400.
21. Saka Y., P. Fantes, T. Sutani, C. McInerny, J. Creanor, and M. Yanagida. 1994. Fission yeast *cut5* links nuclear chromatin and M phase regulator in the replication checkpoint control. *EMBO J.* 13, 5319-5329.
22. Saka Y. and M. Yanagida. 1993. Fission yeast *cut5+*, required for S phase onset and M phase restraint, is identical to the radiation-damage repair gene *rad4+*. *Cell* 74, 383-393.
23. Sambrook J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
24. Santocanale C. and J.F.X. Diffley. 1996. ORC-and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae. EMBO J.* 15, 6671-6679.
25. Sherman F., G.R. Fink, and J.B. Hicks 1986. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
26. Stillman B. 1996 Cell cycle control of DNA replication. *Science* 274, 1659-1664.
27. Sugino A. 1995. Yeast DNA polymerases and their role at the replication fork. *Trends Biochem. Sci.* 20, 319-323.
28. Verkade H.M. and M.J. O'Connell. 1998. Cut5 is a component of the UV-responsive DNA damage checkpoint in fission yeast. *Mol. Gen. Genet.* 260, 426-433.
29. Zhou B. and S.J. Elledge. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-438.

**(Received May 22, 2002/Accepted June 7, 2002)**

**ABSTRACT: Effect of *DPB11* Gene for the Transcriptional Induction by DNA Damage During Cell Cycle in *Saccharomyces cerevisiae***

**Sun-Hee Leem[1], Ho-Jeong Bae[1], Jung-Hyun Kim[1], Eun A Kim[1,2], Seung Il Kim[2], Soohyun Kim[2], Jung-Eun Park[1], Jae-Woo Kim[1,3], and Yangil Sunwoo[1]*** ([1]Dept. of Biology, Faculty of Natural Sciences, Dong-A University, Busan 604-714, [2]Proteome Analysis Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, [3]Dept. of Clinical Laboratory, Dong-A University Hospital, Busan 602-714, Korea)

The S-phase checkpoint mechanisms response to DNA damage or inhibition of DNA replication for maintenance of genetic stability in eukaryotic cells. These roles include cell cycle control arrest at S-phase and transcriptional induction of repair genes. To characterize the defects of *dpb11* mutant for both these responses, we examined the over-expression effect of *DPB11* gene, the sensitivity to HU, MMS, and the transcriptional pattern by DNA damage agent for *RNR3* mRNA. *RNR3* transcript is induced in response to a wide variety of agents that either damage DNA directly through chemical modification or induce stress by blocking DNA synthesis. As results, *dpb11*-1 cells are sensitive to DNA damage agents and the level of *RNR3* mRNA is reduced approximately 40% than wild type cells. Moreover, we found the same results in *dpb2-1* cells. Therefore, we propose that *DPB2* and *DPB11* act as a sensor of replication that coordinates the transcriptional and cell cycle responses to replication blocks.