

분열형 효모에서 *mas3*⁺ 유전자의 세포내 기능 연구

황미라 · 차재영 · 신상민 · 박종균*

원광대학교 자연대 생명과학부

Received January 24, 2005 / Accepted February 2, 2005

Studies on Intracellular Functions of the *mas3*⁺ Gene in the Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Mi Ra Hwang, Jae Young Cha, Sang Min Shin and Jong Kun Park*. *Division of Biological Sciences, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea* – The regulation of gene expression plays an important role in cell cycle controls. In this study, a novel *mas3*⁺ (mitosis associated protein) gene, a homolog of human SMARCAD1, was isolated and characterized from a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The overall homology between the helicase proteins of the two species is 87%. This DEAD/H box-containing molecule has seven highly conserved sequence regions that allow us to place it in the SNF2 family of the helicase superfamily. Knock-out cell of *mas3*⁺ gene was constructed using kanMX6 as a selection marker. Survival of *mas3* null mutant exposed to UV or MMS was similar to those of wild type cells. *mas3*⁺ expression was lowest at G₂ and gradually increased. Cytokinesis of *mas3* null mutant was abnormal at 26°C and 35°C and a large number of multi-septate cells were produced. These results indicate that the *mas3*⁺ is involved in cytokinesis and cell shape control.

Key words – *S. pombe*, helicase, SMARCAD1, multi-septate cells, cytokinesis

진핵생물은 하나 이상의 핵을 가진 세포로 구성되어 있으며 세포핵이 유전정보의 보관 장소이며 세포 분열시 딸세포로 유전정보가 전달된다. 세포가 분열할 때 뉴클레오솜은 복제 후 염색체 형태로 바뀌며 이 염색체가 딸세포에 균등히 분배된다[1]. 세포분열의 조절은 생명체가 정상적인 생명현상을 유지하는데 가장 중요한 조절 기능의 하나이며 세포 분열은 세포 주기라는 과정을 통해 이루어진다[1]. 또한 세포는 세포분열을 계속 할 것인지 아니면 멈춘 채 그대로 있을 것인지를 엄격히 통제하고 있으며 이로써 분화된 각 세포의 고유한 기능을 유지하고 있다. 정상 세포가 자신이 갖고 있는 세포분열의 통제기능을 상실하면 분열을 계속하여 종양을 형성하기도 하고 이들 중 일부는 악성종양으로 발전하기도 한다[2].

세포 주기는, 발생 이후 성장의 최초 단계(G₁), DNA 합성 및 염색체 복제의 단계(S), 세포 분열 준비 단계(G₂), 세포 분열로 모(母)세포와 동일한 2개의 딸세포를 형성하는 단계(M) 등으로 나뉜다. Hartwell은 그 중 한 유전자(*cdc28*)가 세포 분열의 G₁단계의 제어에 관여한다는 사실을 밝혀냈다[3-5]. *cdc28* 이외에도 *cdc7*, *cdc19*, *cdc25*, *cdc33*, *cdc34*, *cdc37* 등은 DNA 복제를 수행하거나 세포의 분열기를 진행시키는데 관련된 유전자로서 그 특징이 밝혀졌다[6,7].

진핵생물의 염색체는 DNA복제, 전사, 해독 과정을 통해 유전정보를 전달하고 단백질을 합성하며 DNA와 RNA 그리고 단백질의 상호 작용에 의해서 영향을 받는다. 따라서 진핵생물에서 DNA복제, 전사, DNA상해회복 등의 과정이 중요하며 기존에 연구된 helicase 유전자들의 특성을 보면 DNA복

제, 전사, DNA상해회복과 관련된 유전자들이 많다. helicase 유전자들은 DNA재조합 회복과정이나 염기절제회복, 뉴클레오티드 절제회복 과정을 통해 DNA상해회복을 하는 것과 관련된 유전자들이 많으며 대표적인 예로 인간의 ERCC6, *Rad54* 유전자, *Saccharomyces cerevisiae*의 *Rad3*, *FUN30*, *Rad5* 유전자, *E.coli RecQ*, *dnaB* 유전자 등이 있으며, 사람에서 알려진 5 개의 *RecQ* family helicase들 중 일부는 각각 Werner's 증후군, Bloom's 증후군 등과 같은 유전체 불안정성, 종양형성, 노화의 증세를 나타내는 유전병들의 원인이 된다[8-10]. 또한 최근에 세포분열 중 전사과정에 관련된 helicase 유전자들의 연구가 많이 보고되고 있으며 SNF2 family에 속하는 *Saccharomyces cerevisiae*의 *FUN30*, *S. pombe*의 *Rhp54*, 인간의 *Rad54* 등이 있으며, 새로운 메카니즘을 분석하기 위해서 계속 연구되고 있다[11,12].

따라서 본 연구에서는 *S. pombe*에서 아직 세포내 기능이 밝혀지지 않은 유전자로 helicase superfamily 중에서도 세포분열 중 전사 과정과 관련된 SNF2 family에 속하며 이미 그 특성이 DNA 상해 회복과 관련이 있는 유전자로 밝혀진 인간의 SMARCAD1의 유전자와 87%의 높은 상동성을 보이는 유전자로 새로운 유전자 SPCC1235.05c를 분석하였고, 새로운 유전자는 세포주기 조절에 관여하는 유전자로 *mas3*⁺ (mitosis associated protein)로 명명 하였으며, 이 유전자의 기능을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

상동성을 보이는 유전자 분석

NCBI의 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)와 Sanger cen-

*Corresponding author

Tel : +82-63-850-6200, Fax : +82-63-843-2781

E-mail : jkpark@wonkwang.ac.kr

ter의 *Schizosaccharomyces pombe*의 genome database (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_pombe/)를 이용하여 가능성 있는 유전자를 선별하였다.

균주 및 배지

균주로는 *Schizosaccharomyces pombe* sp286 (*h+/h+*: *ade6-M216*, *ade6-M216*: *leu1-32*, *leu1-32*: *ura-D18*, *ura4-D18*), Q356 (*cdc25-22*: *leu1-32*)을 사용하였으며 genomic DNA는 Sanger center에서 얻은 *S. pombe* cosmid DNA clone spcc1235를 이용하였다. *S. pombe* 를 성장 시키는 배지로는 완전배지(YES: 0.5% yeast extracts, 3% dextrose supplemented with desired amino acids)와 최소배지(EMM)에서 성장시켰다.

핵산 추출

박테리아 플라스미드 DNA는 알카라인 분해 방법으로 추출하였다. 효모에서의 RNA추출 방법은 효모를 완전(YES)배지에서 OD₅₉₅ (0.7~1.0)이 되도록 대수기까지 성장시킨 후 수확하여 수확한 세포를 1 ml DEPC-treated water로 세척한 후 1.5 ml microfuge tube에 옮겨서 원심분리기를 이용하여 세포와 DEPC-treated water를 분리시켰다. 분리된 세포에 AE buffer (50 mM Sodium acetate, pH 5.3, 10 mM EDTA)를 500 µl 넣어 문쳐진 세포를 풀어주었다. 여기에 10% SDS 50 µl를 넣은 후 phenol/chloroform (1:1)를 AE buffer에 10% SDS를 첨가한 buffer를 같은 양으로 넣어준 후 vortex mixer를 이용하여 최대의 빠르기에서 15~20초간 세포를 섞어준 다음 65°C에 4분간 배양한 후 바로 얼음으로 옮겼다. 그 후 4°C에서 12000×g로 5분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5 ml microfuge tube에 옮긴 후 RNA를 침전시키기 위하여 상층액에 2.5배의 absolute ethanol, 10분의 1배의 3 M Sodium acetate, pH 5.3을 넣었다. 침전된 RNA를 차가운 70% ethanol로 세척한 후 공기 중에서 말린 다음 30~50 µl의 DEPC-treated water에 녹인 후 -20°C에 보관 하였다.

Northern blot analysis

cdc25-22 mutant세포를 이용하여 mRNA를 추출한 후 3.7% formaldehyde가 포함된 1.2% 아가로스 겔에 전기영동을 하여 nitrocellulose membrane (Amersham)에 옮긴다. [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, NEN Corp.)로 표지된 *mas3*⁺ 또는 *adh1*⁺ probe를 42°C에서 20시간동안 핵산 교잡시켜 줌으로써 membrane에 부착시킨 후 X-film을 이용하여 감광시켰다. Probe는 oligo-labeling 방법으로 만들었다.

*S. pombe*에서 synchronous 배양과 추출

cdc25-22 돌연변이 세포를 25°C, 완전배지(YES)에서 mid-log phase까지 배양한 후 원심분리기 이용하여 분리하여 상층액은 버리고 침전된 세포를 새로운 완전배지(YES)에 분주

한 후 36°C에서 4시간 동안 배양 하여 세포주기를 G₂로 정지시켰다. 5시간이 지난 후 G₂로 정지되었음을 현미경 상에서 확인 한 후 다시 25°C에서 배양을 하여 20분 간격으로 20 ml 씩 세포를 모은 후 RNA를 추출하기 위하여 -70°C에 보관하였다.

중합연쇄반응

중합 연쇄반응 방법은 Cryer등의 방법[13]을 변형하여 사용하였다. 중합 연쇄반응 기기는 Stratagene사의 Robocycler을 사용하였다. Knock-out을 확인하기 위해서 Knock-out된 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 사용하였다. 또한 primer 염기서열은 primer1 (forward); 5' CAG CGG ACG AGC GGT ATA 3' primer2 (reverse); 5' GGG CGT GCC TGA CTC TTA 3'이며 primer를 0.5 µM를 각각 사용하였다. 또한 이 반응에는 0.2 mM dNTP와 Bionex사의 α -Taq polymerase를 사용하였다. 변성은 95°C에서 5분, annealing은 50°C에서 30초간 하였고 신장은 72°C에서 1분간하여 30 cycle을 수행하였다. 이를 확인하기 위하여 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

Southern blot analysis

mas3⁺ 유전자가 있는 부분을 제거하고 이 부분에 *kanMX6* 유전자를 넣어 재조합 DNA를 합성하였다. 야생형(sp286)세포와 *kanMX6* 유전자가 들어 있는 *mas3*⁺ 유전자를 knock-out한 세포의 genomic DNA를 추출하여 이를 EcoR V로 처리한 후 1% 아가로스 겔에 전기영동을 하여 membrane에 옮겼다. [α -³²P]dCTP로 표지된 probe를 42°C에서 20시간동안 핵산 교잡시켜 줌으로써 membrane에 부착시킨 후 X-film을 이용하여 감광시켰다.

세포 형태 관찰

야생형 *S.pombe* 세포와 *mas3*⁺ knock-out 세포를 완전배지(YES)에 배양한 후 3.7% formaldehyde에 고정시켰다. 세포를 염색하기 전에 물로 두 번 세척하였다. 관찰 할 세포를 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, Mo)와 Fluorescent brightener 28 (Calcofluor)로 염색한 후 ZEISS형광 현미경 400배율, 1000배율에서 관찰하여 ZEISS digital camera로 1000 배율에서 촬영하였다.

세포 생존율 분석

정상 세포와 *mas3*⁺ 유전자를 knock-out한 세포를 완전배지(YES)에서 배양한 후 세포가 5×10^2 이 되도록 YES (고체배지)에 도말한 후 0~200 J/m²의 다양한 선량의 자외선(UV)과 0.01%의 MMS (methyl methanesulfonate)를 처리한 후 3일간 배양하여 대조군에 대한 colony 수의 비율을 그래프로 나타내었다.

결 과

Helicase 유전자와 상동성을 보이는 유전자 분석

본 연구자는 *S.pombe*에서 인간 helicase 유전자와 상동성을 가지는 helicase 유전자중 아직 연구되지 않은 새로운 helicase 유전자를 분석하기위하여 SNF2 helicase의 상동성을 보이는 motif를 분석하고 이를 이용하여 *S. pombe* genomic DNA 염기서열 데이터베이스로 부터 blast program을 이용하여 새로운 helicase SPCC1235.05c 유전자를 분리 및 분석하였다. 이 유전자는 아직 그 특성이 밝혀지지 않은 유전자로 SNF2 family helicase 유전자인 사람의 SMARCAD1 [14]의 유전자와 helicase motif에서 87%의 높은 상동성을 보였다(Fig. 1). 또한 SPCC1235.05c 유전자는 NLS (nuclear localization signals) 서열과 DEAD/H box를 포함한 7개의 helicase motif가 상동성을 가지고 있으며, helicase family 중 SNF2 family에 속하는 helicase 유전자로 분석되었다. 이렇게 분석된 유전자를 *mas3*⁺ (mitosis associated protein 3)으로 명명하였다. *mas3*⁺ 유전자는 SNF2 family의 대표적인 단

백질인 *S. cerevisiae*의 Fun30과도 높은 상동성을 보였으며, 기능을 보이는 helicase motif에서 더욱 높은 상동성을 보였다. 게다가 motif와 motif 사이의 아미노산 서열에서도 높은 상동성을 보였으며, 이는 *S. pombe*의 *mas3*⁺가 Fun30이나 SMARCAD1와 상동성을 보이며, 같은 helicase 기능을 보일 것으로 강력히 추정된다.

mas3⁺ 유전자의 세포주기에서의 발현

Helicase 유전자는 DNA 복제, 전사 및 DNA 상해 회복과정에 중요한 역할을 하며 기존의 알려진 *Rhp54*등의 helicase 들은 전사 요소로 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 [15]. 따라서, 세포주기별 *mas3*⁺ 유전자의 전사 수준을 분석하기 위하여 *cdc25-22 mutant*[16] 세포를 이용하여 Northern blot analysis를 수행하였다(Fig. 2). *cdc25-22 mutant* 세포는 세포주기조절 유전자가 결손된 세포로 온도에 민감성 돌연변이 세포이며 성장 온도인 25°C에서 36°C로 온도 변화를 주게 되면 세포주기가 G₂로 정지되는 세포이다. 또한 빠르게 온도를 정상 온도인 25°C로 바꿔주게 되면 다시 정상적인 세

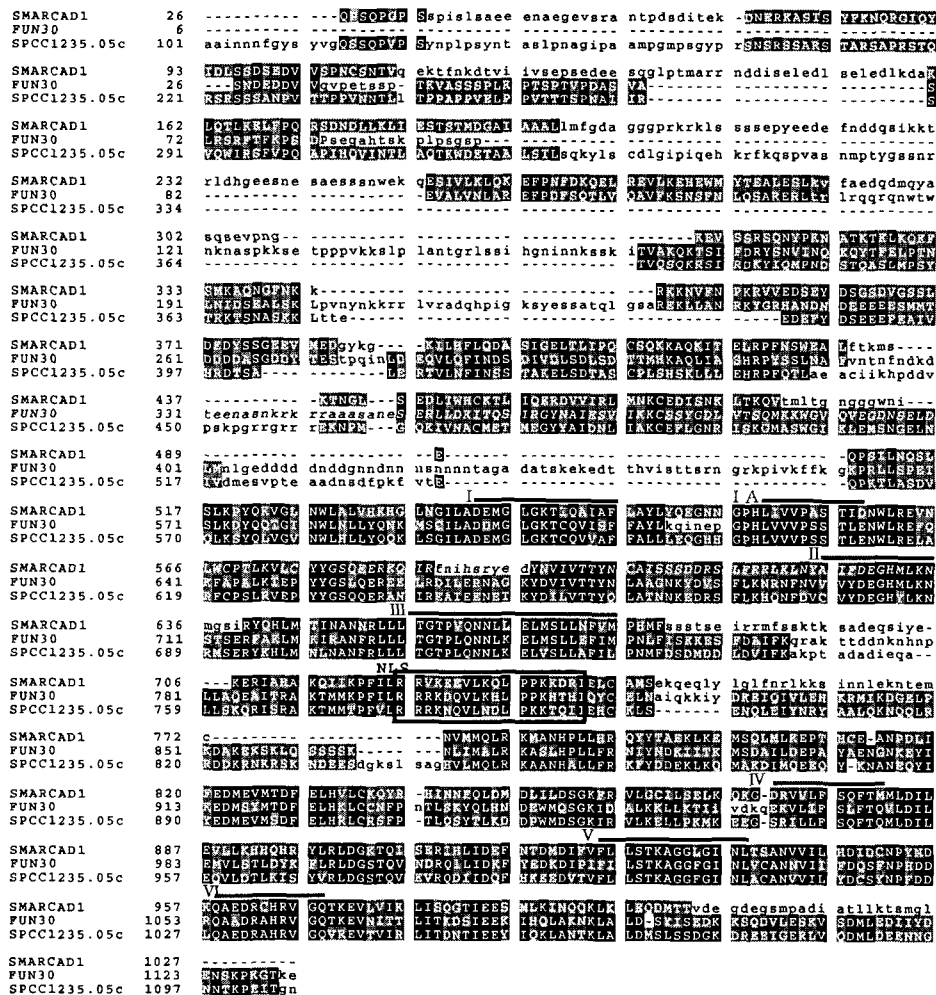


Fig. 1. Alignment of SMARCAD1 homologous genes. SNF2 helicase motifs are overlined. The nuclear localization signal (NLS) motifs are boxed.

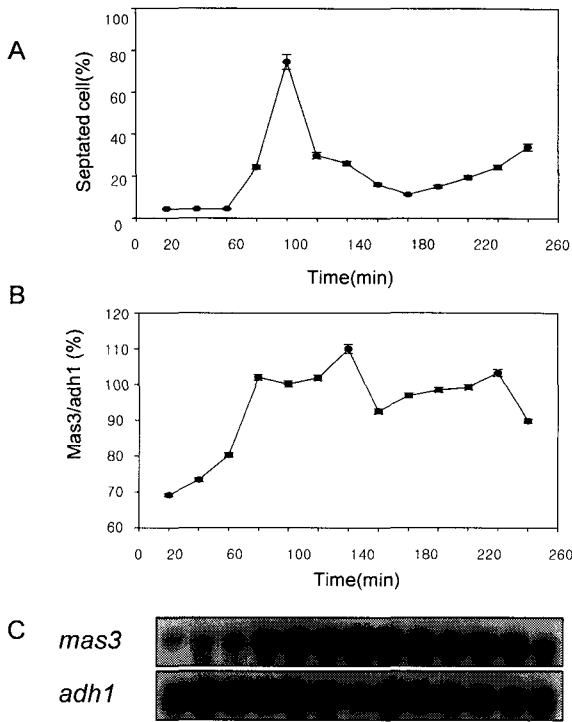


Fig. 2. Septation index (A) and mRNA levels of *mas3*⁺ (B) during mitosis in *S. pombe*. *cdc25-22* mutant cells cultured at 25°C were synchronized by transient temperature shift to 36°C for 4hr and then shifted back to 25°C for various time periods. Quantification of *mas3*⁺ (B) transcript against *adh1*⁺ from the autoradiogram of northern blot (C). Each data represents the mean±S. D. obtained from two independent experiments.

포주기로 돌아가는 돌연변이세포이다. 따라서 유전자 발현 정도를 알아보려고 할 때 기준으로 많이 이용되는 세포이다. 이렇게 G₂단계부터 성장시킨 *cdc25-22* mutant 세포를 20분 간격으로 260분까지 수확한 후 격막이 있는 세포수를 세고

그 비율을 그래프로 나타내었다(Fig. 2A). 또한 mRNA를 추출하여 Northern blot analysis를 수행하였다. 탐침은 *mas3*⁺ 유전자와 대조군으로 *adh1*⁺ 유전자를 [α -³²P] dCTP를 이용하여 만들었다. Northern blot을 수행한 결과 *mas3*⁺ 유전자는 격막이 형성되기 전인 80분부터 전사 수준이 높아지기 시작하여 140분에 그 수준이 가장 높았으며 세포질분열이 활발히 일어난 시기 이후에도 발현정도가 높음을 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 또한 *adh1*⁺과 *mas3*⁺의 발현 정도를 *mas3*⁺/*adh1*⁺로 나누어 그래프로 나타내었다(Fig. 2B). 그 결과 *mas3*⁺ 유전자는 세포분열 중 G₂단계에서는 점차적으로 발현양이 증가하며, G₁-S 사이에 가장 많이 발현이 되는 것을 알 수 있었다.

***mas3*⁺ 유전자의 knock-out 세포 구성**

어떤 특정 유전자의 세포내 기능을 알아보기 위해서는 그 유전자가 결실된 세포를 만든 후 그 유전자 결실에 따른 세포내 변화를 알아보고 그 유전자의 세포내 기능을 알아 볼 수 있다. 따라서 *mas3*⁺ 유전자의 결손 돌연변이를 구성하기 위하여 네오마이신 저항성 유전자인 *kanMX6*를 중합연쇄반응으로 *mas3*⁺ 유전자의 ORF 양쪽 부분을 합성 시켰다(Fig. 3A). 이를 다시 중합연쇄반응으로 합성하여 합성된 DNA를 전기 충격기법을 이용하여 형질전환 시켰다. 이를 네오마이신이 포함된 최소배지(EMM)를 32°C에서 최대 4일간 배양하여 생존한 세포를 각각 배양하였다. 이를 중합연쇄반응으로 확인한 후 다시 Southern blot 방법을 이용하여 배수체에서 모든 *mas3*⁺가 결손된 돌연변이를 분리하였다. 또한 이를 반수체로 분리한 후 완전 결손 및 생존함을 다시 한 번 확인하였다(Fig. 3B). probe1는 promoter 앞쪽에서 잡은 후 [α -³²P] dCTP를 이용하여 만들었다. 전체 사이즈가 6.5 kb이고 *mas3*⁺ 유전자는 3.85 kb, *kanMX6* 유전자는 2.2 kb이다. 따라서 Southern blot analysis를 통하여 knock-out된 세포의 예

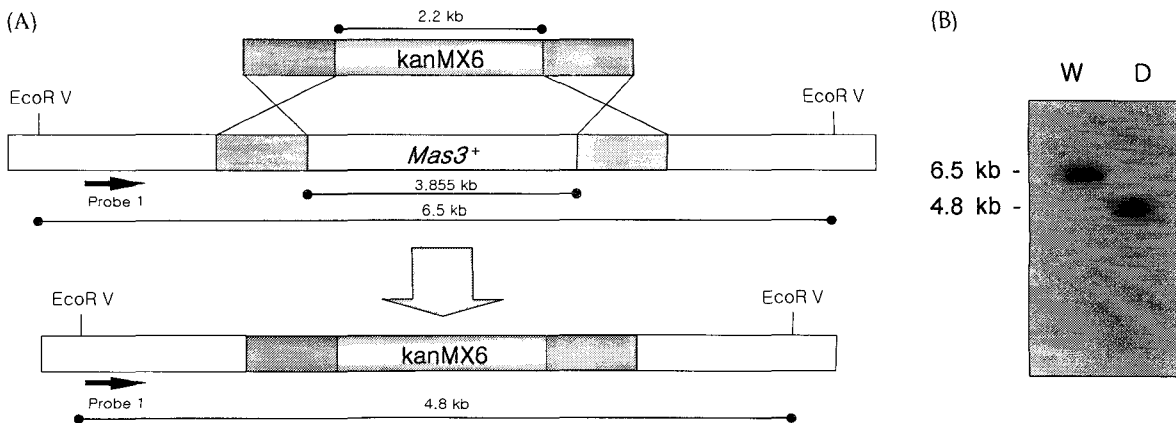


Fig. 3. Disruption of *mas3*⁺ gene using *kanMX6*. (A) The diagram of *mas3*⁺ gene (the coding region indicated by the shaded area) disrupted by PCR based gene targeting method using *S. pombe* *kanMX6* gene. (B) Southern blot analysis of the disrupted *mas3*⁺ gene. Chromosomal DNA cleaved with *EcoR V* was hybridized with probe 1. W, wild type; D, disruption diploid.

상되는 사이즈는 야생형(sp286)은 6.5 kb에서 *mas3* knock-out은 4.8 kb에서 밴드가 나타나야 한다. probe1를 만든 후 Southern blot을 수행한 결과 야생형(sp286)은 6.5 kb에서 *mas3*⁺ knock-out은 4.8 kb에서 밴드를 확인 할 수 있었다. 이로써 *mas3*⁺ 유전자가 정확히 knock-out 되었음을 확인하였다.

***mas3*⁺ 유전자 결실에 따른 표현형의 변화**

mas3⁺ 유전자의 세포내 기능을 확인하기 위하여 *mas3*⁺ 유전자가 결실된 세포와 야생형의 세포를 성장 온도에 따른 변화를 알아보기 위하여 정상적인 성장 조건인 완전배지(YES)에서 온도만 변화를 시켜 온도별(26°C, 32°C, 35°C)로 성장을 시켰다. 그 결과 *mas3*⁺ 유전자가 결실된 세포는 정상 세포와는 다른 비정상적인 표현형을 보였다(Fig. 4A). 그림 4A에서 보이는 것과 같이 온도별(26°C, 32°C, 35°C)로 성장을 시켰을 경우 26°C와 35°C에서 성장시킨 세포는 정상 세포와 다른 형태의 비정상적인 세포 형태를 보였다. 세포가 길어졌거나, 다

수의 격막을 형성하는 등 세포의 표현형이 비정상적 유형들이 보였다. 따라서 *mas3*⁺ 유전자가 세포 분열 과정에 관여함을 시사한다[7,17,18].

mas3⁺ 유전자가 결실된 세포는 Calcofluor 염색을 통해 격막을 관찰했을 경우 정상 세포와는 다른 다격막 세포가 보였다(Fig. 4B). 그림 4B에서 보이는 것과 같이 온도별(26°C, 32°C, 35°C)로 성장을 시켰을 경우 26°C와 35°C에서 성장시킨 세포는 정상 세포와는 다르게 격막이 불규칙 적으로 형성되거나 다격막을 형성하는 세포가 보였고 35°C에서 4시간 정도 성장을 시켰을 경우 31% 정도가 다격막 세포가 형성되었다(Fig. 4D). 또한 *mas3*⁺ 유전자가 결실된 세포는 DAPI 염색을 통해 핵을 관찰 하였을 경우 정상 세포와는 다르게 핵이 깨지는 세포가 보였다(Fig. 4C). 그림 4C에서 보이는 것과 같이 온도별(26°C, 32°C, 35°C)로 성장을 시켰을 경우 26°C와 35°C에서 성장시킨 세포는 정상 세포와는 다르게 핵이 깨져서 하나의 세포에 다수의 핵이 존재하는 것처럼 보였고 그

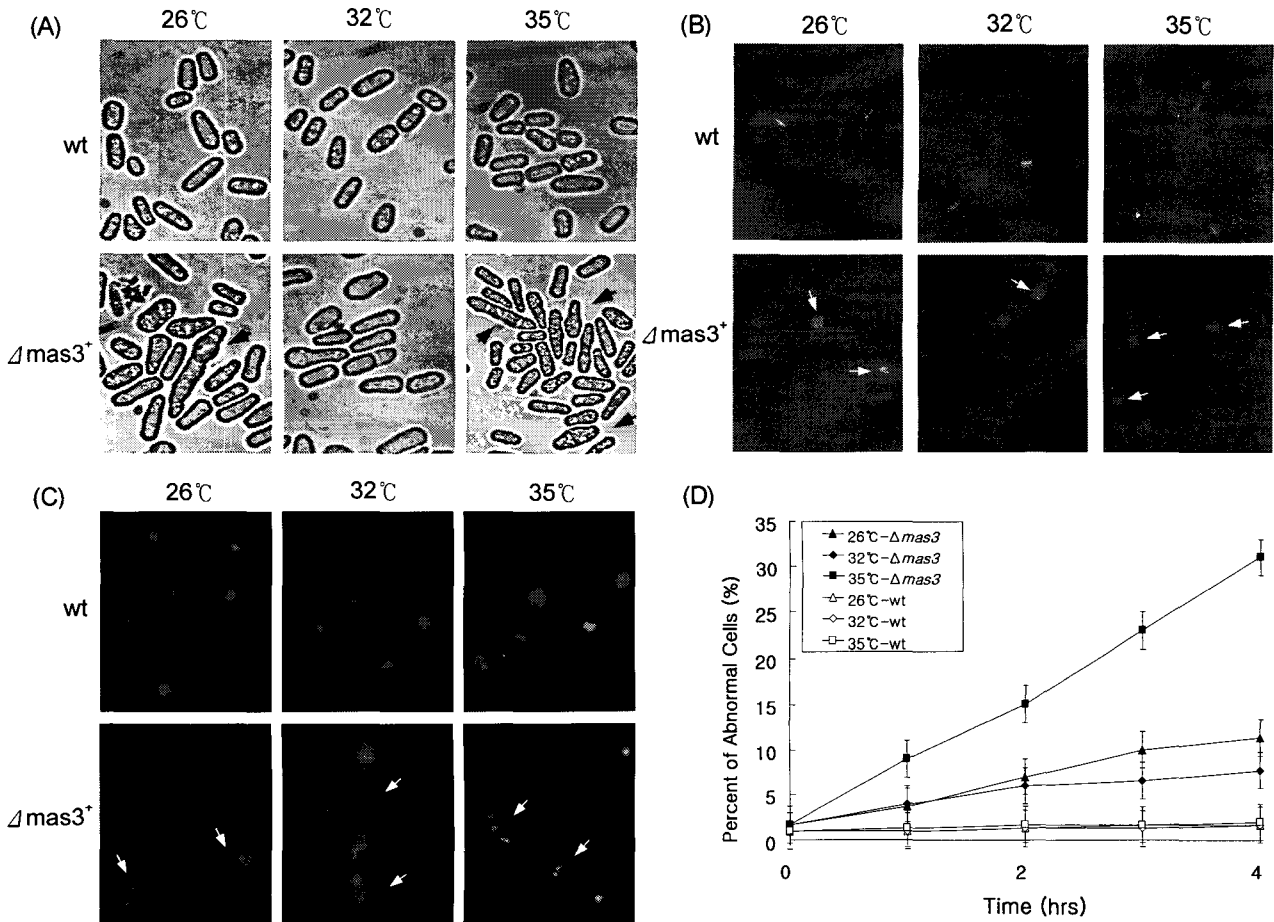


Fig. 4. Abnormal phenotypes of *mas3* null mutant. Wild type (wt) and *mas3* null mutant ($\Delta mas3$) cells grown in YES medium at 26°C, 32°C or 35°C. (A) The *mas3* null mutant cells are elongated and multi-septated, showing abnormal phenotypes (arrows). (B) Morphological examination of the *mas3* null mutant by Calcofluor stain. Arrows indicate the septurm. (C) Missegregation phenotype of *mas3* null mutant by DAPI stain. Arrows denote the fragmented nuclei. (D) Frequency of multi-septate cells from septate cells are shown. Each data represents the mean \pm 5. D. of at least six independent experiments.

비율이 26℃와 35℃에 비해 적지만 32℃에서도 보였다.

세포는 세포질이 팽창하고 DNA복제가 일어나면 분열하고 분열을 통하여 증식한다. 또한 체세포 분열에서는 특징적인 양상이 반복하여 나타나는데 이를 세포주기라 한다. 세포주기 중에서도 분열기에는 복제가 된 DNA가 정확히 둘로 나뉘어 두 개의 핵으로 각각 들어가고 세포질 분열을 통해 이 두 개의 핵은 두 개의 딸세포 안에 각각 존재하게 된다. 그 특성이 세포질 분열과정과 관련이 있는 Sid4p[19]유전자의 연구결과를 보면 Sid4p유전자가 결실된 세포는 세포분열 중 세포질 분열이 일어나지 못하는 이상이 생김으로 인해 세포가 길어지게 되고 다수의 핵이 생기게 되며 과다 발현 시 격막이 형성되지 못하는 등 세포 분열과정에 문제가 발생하였다. 또한 Mid2p[20]유전자는 세포질 분열과정에 문제가 발생함으로 인해 다격막 세포가 형성되는 비정상적인 세포 형태를 보였다. 이와 같이 *mas3*⁺ 유전자 결실시 성장 온도가 변함에 따라 정상 세포와는 다른 비정상적인 핵과 격막의 형성은 세포분열 과정 중 마지막 단계에 일어나는 세포질 분열과정과 관련이 있음을 나타낸다. 또한 세포질 분열이 제시기에 일어나지 못하고 비정상적으로 일어남으로 인해 핵이 깨지는 세포의 비율이 시간이 지남에 따라 증가하게 되고 불규칙적인 격막이 형성되거나 다수의 격막이 형성되는 것으로 보인다. 따라서 *mas3*⁺ 유전자가 세포 분열 과정에 관여함을 시사한다.

알킬화제와 자외선 처리에 따른 *mas3*⁺ 유전자 결실의 영향

기존에 연구된 helicase 유전자들로 *Rad3*, *Rad16*, *Rad54*, *Rad5*, *ERCC6*, *FUN30*, *SMARCAD1* 등은 연구 결과를 보면 그 특성이 DNA상해 회복 과정에 관련이 있는 유전자들이 많았다. 또한 *mas3*⁺ 유전자와 87%의 높은 상동성을 보이는 사람의 *SMARCAD1* 유전자도 그 특성이 DNA상해 회복 과정에 관련이 있는 유전자로 밝혀졌다[14]. 따라서 *mas3*⁺ 유전자의 세포내 특성을 알아보기 위하여 정상세포와 *mas3*⁺ 유전자가 knock-out된 세포에 자외선을 0~200 J/m²의 선량으로 조사하고 세포의 성장되는 정도를 비교 분석하였다(Fig. 5A). 또한 알킬화제인 MMS를 0.01%로 처리하고 세포의 성장되는 정도를 비교 분석하였다(Fig. 5B). 그 결과 정상세포와 *mas3*⁺ 유전자가 knock-out된 세포의 생존률은 거의 비슷하였다. *mas3*⁺ 유전자가 knock-out된 세포를 알킬화제인 MMS와 자외선을 처리했을 경우 정상세포와 생존률이 비슷한 결과로부터 *mas3*⁺ 유전자는 DNA 상해회복 과정에 관여하지 않음을 알 수 있다.

고 찰

모든 세포는 세포분열을 통하여 증식하며 세포분열의 조절은 그 생명체가 생명현상을 유지하는데 가장 중요하다. 동

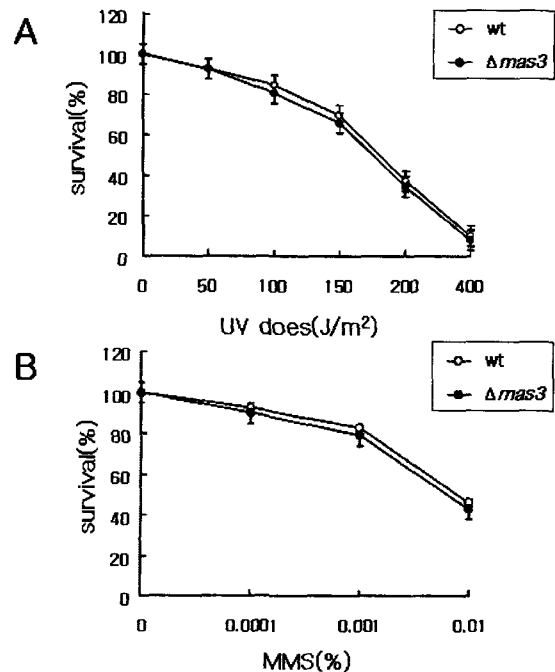


Fig. 5. Survival curves of wild type (wt) or *mas3* null mutant ($\Delta mas3$) following exposure to various doses of UV or to various concentrations of MMS.

물세포는 세포질 분리의 첫 번째 신호로 원형질막에 고랑이 생기는 것이며, 이 고랑은 분열하는 세포의 둘레에 생기며 점차 깊어지면서 세포의 중앙 쪽으로 파고 들어가며 고랑은 딸핵이 떨어져 나갈때까지 계속 깊어지면서 결국에는 세포를 완전하게 분리한다[1]. 분열형 효모도 세포질 분리가 일어나기 전에 격막이 형성되면서 딸세포로 분리되는 과정을 거쳐 분열을 하게 된다. 이와 같이 동물세포와 분열형 효모세포의 세포분열 과정을 보면 세포질 분리시만 조금 다를 뿐 비슷한 과정으로 분열을 한다[1]. 분열형 효모 *S. pombe* 는 하등 진핵세포로서 분열법으로 성장을 하고 *S. cerevisiae* 보다 진화된 유전 정보를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. *S. pombe* 는 genomic DNA 서열이 완전히 밝혀져 있으며 유전자 기능을 연구하기 편리한 시스템을 가지고 있다.

본 연구자는 *S. pombe* 세포주기 조절에 관여하고 있는 새로운 유전자의 기능을 밝히고자 하였다. 또한 *mas3*⁺ 유전자의 세포내 기능을 확인하기 위하여 *mas3*⁺ 유전자가 결실된 세포를 만들었다. *mas3*⁺ 유전자는 DEAD/H box를 포함한 7개의 helicase motif를 가지고 있으며 helicase superfamily 중에서도 SNF2 family 에 속하는 helicase 유전자이다. 또한 그 특성이 아직 밝혀지지 않은 유전자로 이미 그 특성이 밝혀진 인간의 *SMARCAD1* 의 유전자와 87%의 높은 상동성을 보였다(Fig. 1). Helicase superfamily 중에서 DEAD/H box를 포함하고 있는 helicase 유전자들은 전사조절, DNA재조합 회복, DNA상해회복 과정과 관련된 유전자들이 많다[14]. 또한 DEAD/H box를 포함하고 있는 helicase 유전자들은 몇

개의 family로 나눌 수 있고 그 family중에 SNF2 family는 아직 그 기능이 다 밝혀지지 않은 7개의 helicase motif를 가지고 있으며 이 family에 속하는 유전자들은 대부분 NTP를 가수분해하며, 전사 조절과 관련된 유전자들이 많다. 따라서 이 유전자들의 기능은 유전적인 병(색소건피증, Cockayne 증후군)과도 연관되어 있다. SMARCA1의 유전자는 DNA 상해 회복과 관련이 있는 유전자로 helicase superfamily 중에서도 SNF2 family에 속하며 SNF2 family 중에서도 DEAD box, DEGH box를 둘다 가진 helicase 유전자이다. *mas3⁺* 유전자는 SMARCA1의 유전자와의 높은 상동성을 보였다. 따라서 DNA상해회복과의 연관성을 알아보기 위하여 *mas3⁺* 유전자가 결실된 세포를 알킬화제인 MMS와 자외선을 다양한 선량으로 조사하여 세포 생존율을 분석한 결과 정상인 세포와 생존율이 비슷하였다. 그 결과 *mas3⁺* 유전자는 SMARCA1의 유전자와의 높은 상동성을 보였으나 DNA상해 회복 과정과는 관련성이 없었다(Fig. 5).

이미 그 특성이 밝혀진 유전자들 중 Sid4p 유전자[20]는 세포분열 과정 중에서도 세포질 분열과 관련이 있는 유전자이다. Sid4p 유전자가 결실된 세포는 세포질 분열이 일어나지 못함으로 인해 비정상적인 세포 분열이 일어나게 되고, 비정상적인 세포가 나타나게 된다. 세포질 분열이 제시기에 일어나지 못함으로 인해 원래의 세포보다 길어지게 되고 다수의 핵이 형성되게 되며 과다발현 시킨 결과 격막이 형성되지 못하는 세포 분열 과정에 문제가 발생하였다. 또한 Mid2p[19] 유전자는 세포질 분열과정에서 문제가 발생함으로 인해 다극막 세포가 형성되는 비정상적인 세포 형태를 보였다. 이 두 유전자는 세포분열 과정 중에서도 세포질 분열 과정에 관여함을 시사한다.

mas3⁺ 유전자가 결실된 세포를 온도별(26°C, 32°C, 35°C)로 성장을 시켜본 결과 26°C와 35°C에서 정상세포와 다른 형태의 비정상적인 세포 형태를 관찰하였다(Fig. 4A). 정상적인 세포는 분열기에는 두 개의 염색분체가 분리되어 반대방향으로 이동하여 분리된 딸세포가 핵 내에 위치하게 된다. 그리고 분열형 효모의 세포분열과정을 자세히 보면 간기에는 핵의 중심에 actomyosin ring이 형성되며 후기에는 유사분열 방추사에 의해 핵이 양극으로 나뉘어 지고 말기에는 양쪽에 핵을 중심으로 격막이 형성되면서 세포질 분리가 일어나므로써 완벽한 분열을 마치게 되는데[1] *mas3⁺* 유전자가 결실되었을 시는 세포 분열과정에서 문제가 발생하여 비정상적인 분열이 일어나는 것으로 보인다. 또한 비정상적인 세포분열의 이상으로 불규칙적인 격막이 형성되거나 다극막이 형성되는 세포의 비율이 시간이 지남에 따라 증가하게 되고 핵이 깨지는 세포의 비율도 증가하게 되는 것으로 보인다(Fig. 4B and C). 이와 같이 *mas3⁺* 유전자는 세포가 정상적인 세포분열을 하는데 있어서 관여하는 유전자들 중 하나이며 세포분열에 관여함을 시사한다. 또한 세포분열이 비정상적으로

일어난다는 것은 세포분열 과정 중 세포질 분리가 제시기에 일어나지 못하는 경우나 일어나지 않는 경우 그리고 핵분열이 일어나는 과정 중 유사분열 방추사, 미세소관, actomyosin ring형성에 문제가 발생하는 경우 세포분열이 비정상적으로 이루어지게 된다.

본 연구자는 앞으로 *mas3⁺* 유전자의 세포내 기능을 좀 더 명확히 연구 하려고 한다. *mas3⁺* 유전자가 결실된 세포를 과다 발현 시킨 후 세포 형태를 관찰해 보고 Sid4p, Mid1, Mid2p 등 세포분열 과정과 관련된 유전자들과의 연관성을 알아보기 위하여 yeast two hybrid system 을 통하여 관련 유전자를 분석하여 *mas3⁺* 유전자와의 상호작용을 알아보고 세포내 기능을 확인하고자 한다.

요 약

세포주기 조절에서 유전자 발현의 조절은 매우 중요한 부분이다. 본 연구에서는 인간의 유전자인 SMARCA1과 상동성을 가지는 분열형 효모의 새로운 유전자 *mas3⁺*를 분리하였다. 이 두 유전자는 87%의 상동성을 보인다. *mas3⁺* 유전자는 DEAD/H box를 포함한 7개의 motif를 가지고 있어서 helicase superfamily 중에서도 SNF2 family에 속한다. kanMX6를 선별 표지로 이용하여 *mas3⁺* 유전자 결손 세포를 구성하였고 *mas3⁺* 유전자 결손 세포는 UV와 MMS 처리 실험에서 정상인 세포와 생존율이 비슷하여 DNA상해회복과는 관련이 없음을 알 수 있었다. *mas3⁺* 유전자의 세포주기별 발현 양을 분석한 결과 G₂ 단계부터 점차적으로 발현양이 늘어났다. *mas3⁺* 결손 돌연변이를 26°C와 35°C에서 배양한 결과, 비정상적인 세포질 분열 과정으로 인해 다중 격막 세포의 빈도가 증가 하였다. 이상의 결과들은 *mas3⁺* 유전자는 세포질 분열과 세포형태 형성에 연관되어 있음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참 고 문 헌

- David, A., S. T. Guertin and M. C. Dannel. 2002. Cytokinesis in Eukaryotes. *Micro. Mol. Bio Rev.* **66**, 155-178.
- McInerney, C. J. 2004. Cell cycle-regulated transcription in fission yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 967-72.
- Hirt, H., A. Pay, J. Gyorgyey, L. Bako, K. Nemeth, L. Bogre, R. J. Schweyen, E. Heberle-Bors and D. Dudits. 1991. Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 1636-40.
- Jaspersen, S. L., B. J. Huneycutt, T. H. Giddings, K. A.

- Resing, N. G. Ahn and M. Winey. 2004. Cdc28/Cdk1 regulates spindle pole body duplication through phosphorylation of Spc42 and Mps1. *Dev. Cell.* **7**, 263-74.
5. Bartlett, R. and P. Nurse. 1990. Yeast as a model system for understanding the control of DNA replication in Eukaryotes. *Bioessays.* **12**, 457-63.
 6. Russell, P. and P. Nurse. 1986. *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell.* **45**, 145-53.
 7. Krapp, A., E. Cano and V. Simanis. 2003. Mitotic hyperphosphorylation of the fission yeast SIN scaffold protein *cdc11p* is regulated by the protein kinase *cdc7p*. *Curr. Biol.* **13**, 168-72.
 8. Liu, J. L., P. Rigolet, S. X. Dou, P. Y. Wang and X. G. Xi. 2004. The zinc finger motif of *Escherichia coli* RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J. Biol. Chem.* **279**, 42794-802.
 9. Lowe, J., A. Sheerin, K. Jennert-Burston, D. Burton, E. L. Ostler, J. Bird, M. H. Green and R. G. Faragher. 2004. Camptothecin sensitivity in Werner syndrome fibroblasts as assessed by the COMET technique. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1019**, 256-9.
 10. Garcia, P. L., Y. Liu, J. Jiricny, S. C. West and P. Janscak. 2004. Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *EMBO J.* **23**, 2882-91.
 11. Miyajima A. 2002. Functional analysis of yeast homologue gene associated with human DNA helicase causative syndromes. Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. **120**, 53-74.
 12. Van den Bosch, M., J. B. Zonneveld, K. Vreeken, F. A. de Vries, P. H. Lohman and A. Pastink. 2002. Differential expression and requirements for *Schizosaccharomyces pombe* RAD52 homologs in DNA repair and recombination. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1316-24.
 13. Cryer, D. R., R. Eccleshull and J. Marmur. 1975. in *Methods cell Biology*, Vol. **12**, 39-44, Academic press.
 14. Adra, C. N., J. L. Donato, R. Badovinac, F. Syed, R. Kheraj, H. Cai, C. Moran, M. T. Kolker, H. Turner, S. Weremowicz, T. Shirakawa, C. C. Morton, L. E. Schnipper and R. Drews. 2000. SMARCAD1, a novel human helicase family-defining member associated with genetic instability: cloning, expression, and mapping to 4q22-q23, a band rich in breakpoints and deletion mutants involved in several human diseases. *Genomics.* **69**, 162-73.
 15. Catlett MG, Forsburg SL. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* Rdh54 (TID1) acts with Rhp54 (RAD54) to repair meiotic double-strand breaks. *Mol Biol Cell.* **14**, 4707-20.
 16. Takeda, T., T. Kawate and F. Chang. 2004. Organization of a sterol-rich membrane domain by *cdc15p* during cytokinesis in fission yeast. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1142-4.
 17. Krapp, A., S. Schmidt, E. Cano and V. Simanis. 2001. *S. pombe cdc11p*, together with *sid4p*, provides an anchor for septation initiation network proteins on the spindle pole body. *Curr. Biol.* **11**, 1559-68.
 18. Moreno, S., J. Hayles and P. Nurse. 1989. Regulation of *p34cdc2* protein kinase during mitosis. *Cell.* **58**, 361-72.
 19. Berlin, A., A. Paoletti and F. Chang. 2003. Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J. Cell Biol.* **160**, 1083-92.
 20. Chang, L. and K. L. Gould. 2000. Sid4p is required to localize components of the septation initiation pathway to the spindle pole body in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 5249-54.