

F313

효모 (*Saccharomyces cerevisiae*) 유전자 *THR4*의 발현조절 및
염기쌍 배열

류인왕*, 유은희, 이우영, 이호주
강원대학교 자연과학대학 생물학과

효모의 *THR4* 유전자는 아미노산 threonine 생합성 경로의 마지막 반응단계를 촉매하는 효소인 threonine synthase 의 구조 유전자로써, 영양요구성의 상보기작을 이용하여 클로닝하고(Lea and Lea, 1987), 이어서 염색체 통합 시험을 통해 구조유전자임이 1차로 확인되었다(Sohn and Lea, 1990). 본 연구에서는 *THR4* 유전자의 발현 및 조절 양상을 알아보기 위해 *lacZ-THR4* promoter 융합 재조합 DNA를 제조하여 wild type 균주 M1-2B 에 도입시켜, 어떤 배양 조건하에서 억제 또는 탈억제 되는지를 *lacZ-THR4* 융합 단백질의 활성을 통해 조사하고, mRNA 검색 및 *THR4* 유전자의 염기쌍 배열을 결정하였다. *THR4*의 발현 양상은 Thr의 첨가에 의하여 60-70%의 억제작용을 보였으며, 1.75mM 이하의 농도에서 점진적인 탈억제 작용을 나타내고 0.25mM (첨가 기준량의 10% 농도) 에서는 억제가 완전히 해제되어 *THR4* 유전자가 특이조절의 통제하에 발현 조절되며 기본 발현수준을 상시 유지하고 있음을 알 수있었다. 전사 수준에서의 발현 조절은 억제 및 탈억제 조건하에서 *THR4* 구조 유전자 부위인 0.9kb 절편을 probe로 하고 Digoxigenin 을 이용한 Northern 분석으로 조사하였다. *THR4* 유전자의 상류 조절부위 및 구조유전자의 염기쌍 배열은 클로닝된 4.4kb의 *Cla* I 절편으로부터 2.6kb의 상류조절부위와 1.6kb의 구조유전자 부위를 exonuclease *Bal*31으로 deletion시켜 M13 vector 에 도입하여 결정하였다. 기존의 발표된 *THR4* 유전자의 염기쌍 배열(Aas 와 Rognes, 1990; Mannhaupt 등., 1990)의 연구 결과가 본 연구에 의하여 재확인 되었고, 이들에 추가하여 상류 조절부위 (1.9kb)의 염기쌍배열이 규명되었다.

F314

효모 유전자 *THR1*의 발현조절 및 염기쌍 배열

유영민*, 이우영, 이호주
강원대학교 자연대학 생물학과

효모의 *THR1* 유전자는 threonine 생합성과 methionine의 생합성 경로의 분기점인 homoserine에서 threonine이 합성되는 경로의 첫번째 단계에 관여하는 유전자로서 threonine 요구성의 상보를 이용하여 클로닝된 바 있으며, 이 클로닝된 유전자가 homoserine kinase의 구조유전자임이 염색체통합 실험에 의하여 1차로 확인되었다(Choi and Lea, 1991). 본 연구에서는 이 클로닝된 *THR1* 유전자를 *lacZ* 구조유전자와 융합(pYY36)하여 융합단백질의 활성을 측정함으로써 *THR1*의 발현양상을 조사하였다. *THR1*의 발현은 threonine과 methionine을 각각 0 mM에서 5 mM까지 증가시켰을 때 β -galactosidase의 활성이 기본수준보다 각각 약 2배까지 증가되었다. 또한 methionine 0.25 mM과 2.0 mM 수준에서 threonine의 농도를 변화시켜 본 결과 threonine의 농도 변화에는 관계없이 *THR1*의 발현이 methionine에 의해서만 유도되었다. 전사수준에서의 *THR1*의 발현은 methionine을 첨가하였을때 mRNA을 DIG로 확인한 결과 methionine을 더 첨가한 조건에서 발현이 높음을 알 수 있었는데 이것은 *THR1*의 발현이 전사수준에서 조절됨을 나타낸다. 클로닝된 *Bam*H I - *Hind*III fragment(3.1 kb) 중 *Xba* I - *Hind*III(229 bp), *Hind*III - *Sau*3A I(452 bp), *Ssp* I - *Acc* I (528 bp)절편의 염기서열을 Sanger 방법으로 결정하여 보았더니, Mannaupt 등(1990) 및 Schultes 등(1990)이 발표한 *THR1*의 염기서열과 일치하였다.