

Schizosaccharomyces pombe의 Kinesin 유전자의 클로닝과 염기서열분석

정재욱¹ · 최성민¹ · 이명석² · 김형배^{1*}

¹고려대학교 생명공학원, ²숙명여자대학교 생물학과

Kinesin은 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Drosophila melanogaster* 등에서 발견 되었으며 dynein 과 더불어 세포분열 과정중 chromosome의 이동과 spindle pole의 분리에 관련된 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 기존에 발견된 kinesin 유사 유전자의 homology가 많은 motor domain을 이용하여 primer를 합성한후 이를 이용하여 *Schizosaccharomyces pombe*로부터 kinesin heavy chain의 유전자를 클론하였다. 염기서열을 결정한 결과 2496 bp의 해독률을 갖고 있으며 832개의 아미노산으로 이루어진 분자량이 96 kd의 kinesin heavy chain을 암호화 하는 것이 밝혀졌다. 기존에 밝혀진 다른 organism의 kinesin과 서열을 비교한 결과 새로이 클론된 *S. pombe*의 kinesin은 C-terminal motor subfamily에 속함이 밝혀졌다.

KEY WORDS □ cell cycle, kinesin, microtubule, *Schizosaccharomyces pombe*

세포가 분열을 할 때 어떻게 3차원적인 구성을 이루면서 그 나름대로 mother cell과 동일한 형태를 갖추어 가는가 하는 세포형태형성기작은 현대 생물학에서 해결하고자 하는 문제 중의 하나이다. 이를 해결하기 위하여 복잡한 동물세포나 식물세포를 이용하기 보다는 보다 구조가 간단하고 진핵세포의 기본이 되는 yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Schizosaccharomyces pombe*를 이용하는 것이 현명한 접근이라 할 수 있다(20). 이들 yeast에서 cytoskeletal element인 actin과 microtubule은 세포형태형성기작에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 이에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다(1, 7, 8, 18) 특히 actin은 *S. cerevisiae*와 *S. pombe*의 bud의 형성과 세포질 분열시에 매우 중요한 작용을 하는 것으로 알려졌으며(2, 19, 23, 24), microtubule은 세포분열시 chromosome의 이동에도 관여하지만, 특히 핵의 이동에 관여한다고 간주된다(2, 6, 19). 근래에 와서는 microtubule과 더불어 chromosome의 이동과 spindle의 이동에 중요한 역할을 하는 kinesin에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다(11, 21, 26, 32, 35).

Kinesin은 squid optic lobe에서 최초로 발견되었으며 세포내 vesicle의 axonal transport와 axon의 presynaptic 지역으로 subcellular particle이 이동하는 것에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다(33). Kinesin은 110 kd의 heavy chain과 62-70 kd의 light chain으로 구성되어 있으며(33) 자연상태에서는 2개의 heavy chain과 2개의 light chain으로 구성되어 있다(16). 근래에 와서는 kinesin heavy chain과 유사한 유전자들이 많이 발견되었으며 이들은 세포분열시 chromosome의 이동과 spindle pole의 분리에 관계된다고 알려졌다(11). *Saccharomyces cerevisiae*에서는 *CIN8*, *KAR3*, *KIP1*, *KIP2*, *SMY1*

등 5가지 이상 발견되었고 chromosome의 이동과 spindle pole의 분리가 외에도 zygote 형성시에 핵의 융합과 myosin 돌연변이를 suppress하는 등 다양한 기능을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다(17, 21, 27, 29). *Aspergillus nidulans*에서는 *bimC* 유전자가 발견되었고(10) *Drosophila melanogaster*에서는 *ncd*, *nod*, *klp3a* 유전자 등 6개 이상의 kinesin 유전자가 발견되었다(4, 9, 25, 28, 34, 36). *Schizosaccharomyces pombe*에서는 *cut7* 유전자가 클론 되었으며(14, 15) 이들 kinesin 유전자는 대부분 mitosis와 meiosis에서 중요한 역할을 하며 일부 murine central nervous system에서는 특별한 세포소기관의 이동에 관여한다고 보고되어 있다(3).

본 연구에서는 *Schizosaccharomyces pombe*에서 다양한 kinesin의 기능에 비하여 *cut7* 하나만이 클론 되었기 때문에 *cut7* 이외의 새로운 kinesin 유전자를 클론 하고자 시도하였다. Kinesin의 heavy chain에 존재하는 ATP 결합부위와 microtubule 결합부위를 포함하는 약 350개의 아미노산이 매우 유사성이 높아 이 부위를 이용하여 primer를 합성하였다. 이 primer를 사용하여 *S. pombe*의 genomic DNA와 PCR을 이용하여 해당유전자의 증폭을 시도하였으며 이로부터 유전자의 일부를 증폭하였다. 증폭된 유전자의 일부의 염기서열을 결정하여 비교하여보니 기존의 kinesin heavy chain 유전자와 유사성이 매우 높아 이 부위를 probe로 하여 *S. pombe*의 UNI-ZAP XR vector에 만들어진 cDNA library로부터 plaque hybridization을 이용하여 새로운 kinesin 유전자를 클론하였다. 현재 새로이 클론 된 kinesin 유전자의 염기서열을 결정하였으며 그 기능을 밝혀내기 위하여 연구를 진행하고 있다.

재료 및 방법

S. pombe DNA 추출

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 0415-860-1413, Fax : 0415-864-2665
E-mail : Hyong@tiger.korea.ac.kr

S. pombe DNA의 추출은 Beach와 Nurse(5)의 방법을 변형하여 사용하였다. S. pombe strain 972h⁻를 1~2×10⁷ cells/ml까지 키우고 원심분리한 후 20 mM citrate-phosphate buffer (pH5.6)에 희석하였다. 5 mg/ml의 lysing enzyme(Sigma)을 가한 후, 30°C에서 약 20분간 배양하여 세포벽을 제거하였다. 세포벽 제거 후에 0.15M NaCl/0.1M EDTA(pH8.0)와 Proteinase K(1 mg/ml)를 가하고 25% SDS를 가하였다. 45°C에서 1~2시간 배양한 후 5M potassium acetate를 가하여 얼음에 30분~1시간 정도 두었다. 원심분리를 하고 남은 상등액에 RNase(1 mg/ml)를 가하여 37°C에서 1시간 배양한 후 phenol로 추출하고 ethanol 침전을 하여 순수 DNA를 얻었다.

PCR을 이용한 유전자의 증폭

S. pombe 972h⁻ strain의 200 ng(1 µl) DNA와 각각의 primer 2 µg(2 µl)을 섞은 후 10X TAQ buffer(100 mM Tris pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% Gelatin, 20 mM DTT)를 5 µl 가하고, 10X dNTP를 10 µl 가하였다. H₂O를 26 µl 첨가하여서 최종 양을 50 µl로 맞춘 후에 light mineral oil을 5방울을 떨어뜨렸다. 이들 sample을 94°C에서 5분간 가열한 후에 0.5 µl(2.5 unit) TAQ polymerase(BRL)를 가하고 94°C에서 2분간 둔 후 30 cycle을 반복하였다. 1 cycle은 각각 94°C에서 1.5분 denaturation, 50°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 3분간 polymerization이 포함되며 마지막 cycle에서는 72°C에서 10분간 둔 후에 4°C로 낮추었다. 반응이 끝난 후에는 150 µl의 chloroform을 이용하여 mineral oil을 제거하고 1.6% agarose gel을 이용하여 결과를 확인하였다(12, 13, 22, 30). 이와 같이 증폭된 유전자는 agarose gel을 이용하여 전기영동 한 후 해당되는 증폭부위를 추출하여 pBlueskript vector의 PstI과 EcoRI 부위로 subclone 하였다.

Plaque hybridization과 Southern hybridization

S. pombe의 cDNA library는 UNI-ZAP XR vector의 EcoRI과 XhoI 부위에 만들어져 있으며 genomic DNA library는 pWH5 vector의 BclI 부위에 만들어졌다. 이들의 titer를 각각 조사한 후에 primary screen을 위하여 10⁴배 희석을 하여 plate 당 3000~4000개의 plaque가 나오게끔 집중하였으며, 각 library 당 20개의 plate를 이용하여 조사하였다. 이들을 nitrocellulose paper에 transfer하고, 5분간 0.5N NaOH 용액에 denaturation한 후 neutralization을 시켰다. 실온에서 nitrocellulose paper를 말린 후, 80°C 진공 oven에서 bake하여 DNA를 고정시켰다. PCR로 증폭된 유전자를 ³²P로 label 한 후 probe로 이용하여 양성으로 나타나는 plaque를 3차 조사까지 하였다.

Southern hybridization을 위하여 agarose gel 전기 영동을 한 후, 모세관현상을 이용하여 DNA를 nitrocellulose paper에 하룻밤 전이 시켰다. DNA를 paper에 고정시킨 후, hybridization 시키는 방법은 plaque hybridization에서 사용한 방법을 이용하였다.

Random primer를 이용한 DNA label 방법

9 µl의 일직선화된 DNA(100 ng~200 ng)를 1 µl의 primer [d(NNNNNN)]와 섞은 후, 100°C에서 5분간 열을 가하고 얼음으로 옮겼다. 2 µl의 buffer(0.5M Tris, 0.1M MgSO₄, 1 mM DTT)와 2 µl의 dNTP(0.6 mM dGTP, dCTP, dTTP)와 5 µl의 dATP(Alpha-³²P)를 섞은 후, 2~5 unit의 klenow enzyme를 가하여 22°C에서 60분간 배양하였다. 반응을 멈추기 위하여 80 µl의 stop solution(0.1% SDS, TE)을 가한 후 hybridization하기 전에 5분간 끓여서 사용하였다.

Clone된 유전자의 염기서열분석

Single-strand DNA주형은 plasmid pBluescript와 helper phage를 이용하여 만들었다. 염기서열은 New England Biolab의 M13 sequencing primer(-20)와 reverse sequencing primer (-24)나 주문제작한 primer를 사용하여 dideoxynucleotide chain termination 방법(31)으로 분석하였다. Sequenase와 반응용액은 United States Biochemical의 Sequenase DNA sequencing kit를 사용하였으며 반응조건은 공급자가 제시한대로 따랐다.

DNA 유사성 비교는 DNA star program을 이용하였다.

결과 및 고찰

Primer의 합성

Kinesin heavy chain은 S. cerevisiae나 Drosophila 등에서 여러 가지가 밝혀져 있으며 이들 중 ATP 결합 가수분해 부

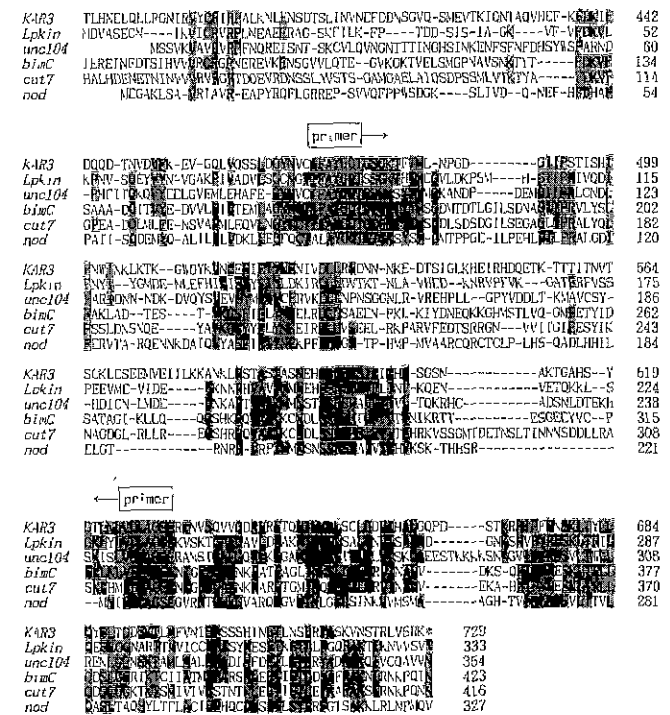


Fig. 1. Locations of primers used for PCR and comparison of the predicted amino acid sequences of kinesin heavy chains from *S. cerevisiae* (KAR3), squid (*Lpkin*), *Caenorhabditis elegans* (*unc104*), *A. nidulans* (*bmC*), *S. pombe* (*cut7*) and *D. melanogaster* (*nod*).

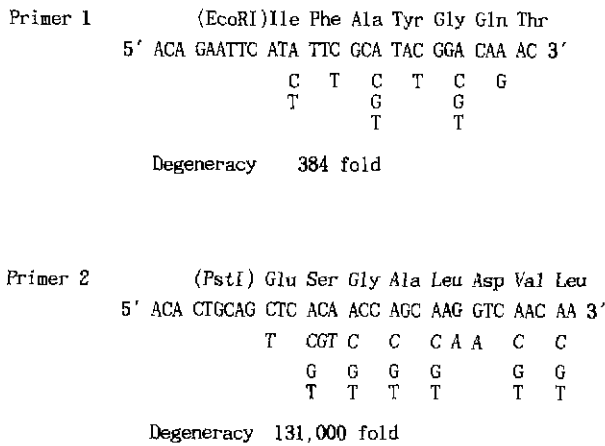


Fig. 2. Sequence analysis of the primer.

위와 microtubule 결합부위가 가장 유사성이 많은 보존된 지역으로 알려져 있다(12, 16, 25). 본 연구에서는 kinesin motor domain의 ATP 결합부위의 Ile-Phe-Ala-Tyr-Gly-Gln-Thr에 해당하는 부위와 ATP 결합 부위의 downstream에 해당하는 Leu-Val-Asp-Lcu-Ala-Gly-Ser-Glu에 해당하는 부위를 이용하여 degenerate된 oligonucleotide를 합성한 후 양쪽 끝에 EcoRI 과 PstI base를 첨가하여 primer로 사용하였다(Fig 1, 2).

S. pombe DNA의 증폭

Primer를 합성한 후, S. pombe 972h⁻에서 추출한 genomic DNA와 합성된 primer를 섞어 PCR을 이용하여 유사 유전자의 일부를 증폭하였다. 증폭한 후 agarose gel 전기영동을 이용하여 확인하여 보니 490 bp에서 700 bp에 7개의 뚜렷한 DNA band를 관찰 할 수 있어 뚜렷한 유전자의 증폭을

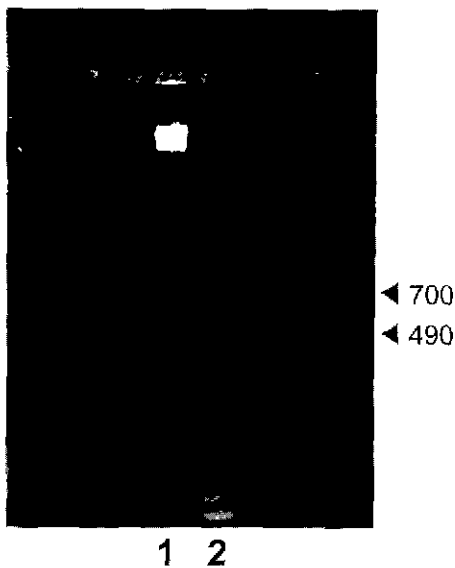


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of the amplified DNA after PCR.
 lane 1: 123 bp DNA molecular weight ladder.
 lane 2: S. pombe genomic DNA(972h⁻) after amplification.



Fig. 4. DNA and amino acids sequence analysis of the PCR product.

확인할 수 있었다(Fig 3).

증폭된 유전자의 서열결정

증폭된 유전자를 agarose gel에서 elution한 후 EcoRI과 PstI 부위를 이용하여 pBlueskript vector 내로 subclone을 하였다. 이렇게 subclone된 유전자를 E. coli 내로 형질전환 시킨 후 plasmid를 추출하여 염기서열을 결정하여 보니 Agarose gel에서 증폭된 것으로 확인된 7개의 DNA band중 하나인 468 bp (156아미노산)로 이루어진 DNA가 subclone됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 증폭된 일부 유전자의 예상되는 아미노산 서열을 이미 알려진 kinesin 유전자의 해당부위와 유사성을 비교하여 보았더니 유사성이 높은 DNA fragment임이 밝혀졌다.

Plaque hybridization을 이용한 S. pombe에서 kinesin 유전자의 클론

증폭된 유전자를 probe로 하여 S. pombe의 cDNA library로부터 plaque hybridization을 이용하여 kinesin 유전자를 클론 하였다. 클론 된 kinesin 유전자의 염기 서열을 결정한 결과 2497 bp의 open reading frame이 발견되었고 이로부터 832개의 아미노산으로 이루어진 분자량이 96 kd에 달하는 단백질을 암호화하는 것이 밝혀졌다(Fig. 5). PCR을 이용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 1711-2178 bp 지역에서 발견되었으며 PCR에 의해서 증폭된 유전자의 전체 유전자가 클론 되었음을 확인 할 수 있었다. 새로이 클론 된 S. pombe kinesin은 ATP가 결합하는 motor domain이 C-terminal 쪽에 위치하며 기존에 밝혀진 다른 organism의 kinesin 유전자와의 유사성을 비교한 결과 accharomyces cerevisiae의 KAR3 (27)와 Drosophila의 ncd(25)와 동일한 C-motor domain kinesin subfamily에 속함이 밝혀졌다. S. pombe의 kinesin은 S. cerevisiae의 KAR3와 31%, Drosophila의 ncd와는 26%, mouse의 KIFC1과 KIFC2(3)와는 31%. 16%의 유사성이 있음이 밝혀졌고 conserved된 지역인 ATP 결합 motor domain은 KAR3와 47%, ncd와는 38%, mouse의 KIFC1과 KIFC2와는 39%, 30%의 유사성이 있음이 밝혀졌다(Fig 6).

본 연구는 진핵세포의 형태형성기작을 밝히는 것이 그 목적이며, 이 세포 형태형성 기작을 밝혀내기 위해서 진핵세포 중에서 가장 간단한 system을 갖고 뚜렷한 형태적인 변화를 나타내며 분열하는 yeast를 재료로 연구하였다. 특히

1	TAA AAC GCT CTT TTT AAC TTA TAG	ATG GTA ATT GAG AAT ACA AAG GAC ATT TOC ATA AAC ACA GCG TAT AAA CGA CAG GAA GAT	84
		M V I E N T K D I S I N T G Y K R Q E D	
85	GCT TTA AAC ACA GAT TCT GAG GAC TTA ATA TAT CGA CCA AAA AAA AJT AJT AAA ACA AAT CAA GAG GAT GCA GTA CAT GAT TTG	168	
	A L N T D S E D L I Y R P K K J I K T N Q E D A V H D L		
169	AAA TAC GAA AAT TTC GTA TCA AAA AAT CAC GTT TTA CAA AGC GAC AJT AAT GGC AAG AAG AGG GAC AGC AAT CGA GAC AAG GCC	252	
	K Y E N F V S K N H V L Q S D I N G K K R D S N R D K A		
253	GCT GTA GTC ACA GCG CCA ATT GCT TCT ACT CAT GAA TCT AAT TAC GAA TCT GGT TCC AAA TTT AAA GAG AGT TGG CTG CCT	336	
	A V V T A P I A S T H E S N Y E E S V S K F K E S W L P		
337	CAA TTA AAA GAT CTC AJT GAA TCT CAT AAA ACA ATA TGC GAA TCA ACG TTA GCC TAC GAG AGT GAT CAA GCT ATG GCT TCT TCT	420	
	Q L K D L I E S H K T I C E S T L A Y E S D Q A M A S S		
421	AAT ACA TTA AAG AGA ATA AAA GAT TTA AAA AGC AAA CCA AAA AAT AJT ATA CAG TTA GAA AGG TTG CAT ATG CTA TCT AAT GGC	504	
	N T L R I K D I A S K C N J I N L E R L E R L S N G		
505	GAA CAT CGT TTA TTA TGG AAA GAC GAA ACC GAT GAT AJT GAG TCT GCA TAC TTG AAC CTT AGA TCA CAT CTT CAG GTA CAA GAA	588	
	E H R L L S K D E F D D I E S A Y L N L R S H L Q V Q E		
589	CAG GTT TAC GCT GAA AAG GAT CAT GAA TAT TGG TTA CAA CTT CAA TCA TAC AGA GAG GCA GCA GAA AAG GCC AAG CAA GAT ATT	672	
	Q V Y A E K D H E Y S L Q L Q S Y R E A A E K A K Q D I		
673	TTA GAA ACA AAA GAA AAT CTT TCC TCT GAA TTA TCG ATA TGG AAT ATC CAG TTG AAG GAA GCC AAG GAA AGG TTA GAA GCT GCG	756	
	L E L S E N L S E I S A T G A K E L K E A K A		
757	AAT GCA AGC TAC CAA AAG CTA CGT CGA GAA CAC AAA GAA CTT GCA CTT TAT CAT GAA AAG AAA ACA CAT TCT CTA GTT TGT AAT	840	
	N A S Y Q K L R R E H K E L A L Y H E K K T H S L V C N		
841	CTA AAT GGT GAA CGA AAA TCC TTT GCG GAT TTT GTT GAG AAC GAA GTA AAG TCA TAT AAA CAT GAA TAT GCC AAT ATT TGT GAA	924	
	L N G E R K S F G D F V E N E V K S Y K H E Y A N I C E		
925	TCA CTT CCG AGA GCT CTA GTG CTG ATA CAA GGT TCT TGT ACT GAG AAA AJT TTG CGT TTT AAA GAA AAA ATT CTG GAC TTA TTA	1008	
	S L R R A L V L I Q G S C T E K A I T R F K E K I L D L L		
1009	GAA ATG AAA CAA CAA GAA GAA AAT GAT CGA ATA TCC CAC AJT GAT TAT GAG AAT GAT TTA ACG GTT AAA AAG CTT AAA AGG AGA	1092	
	E M K Q Q E E N D R I S H I D Y E N D L T V K K L K R R		
1093	ATA TCT GAG TTG GAA ATG GCA GTA AAA GAA TAT GAA TGG GAA AAA TCA TAC TGG GAA AAA GAA TAT GAA GAA AAA ATC TCC TCT	1176	
	I S E L E M A V K E Y E S E K S Y S E K E Y E E K I S S		
1177	CTG CGT ATA GAA TTA GAA GAC AAG TTA GCT GAA ATT GAC ATG CTT CGA AAT AAA CTG TTA AAG GAA GAG CAT AAA CAC CAC TCT	1260	
	L R I E L E D K L A E I D M L R N K L L K E E H K H C S		
1261	ACA TCT GAA AAA CTT GAA GAA CTT TCT AAA TAT GTT GCA AGT AJT CAA GAT AAA GAA AGA AAT AAT GCC CAG AAC GCA TTG GAA	1344	
	T S E K L E E L S K Y V A S I Q D K E R N N G Q N A L E		
1345	CTA CAA GCT CGA ATC CAA CAG CTG GAA CCG AGA AAT GAA GAT ATG TAT AAT AAA CTG TTA GCA GAA GAA ATA ATC AGA CGA AAG	1428	
	L Q A R I Q G A L R N E D M Y N K L L A E I I R K		
1429	CTG CAT AAC GAC AJT CAA GAA CTA AAG GGA AAT AJT CGA GTT TTT TGT AGG GTT AGA CCA CTA CTC CCA AGT GAA GAA TCC GAA	1512	
	L H N D I Q E L K G N I R V F C R R V R P L L P S E E S E		
1513	TAT TGC AJT GCT GAT GTT TTA CAA TTT CCA GAT AAA GAC GCA CTA GAG CCA CAA AAA CTT AJT CTT AAA GGG CCT AAT GTT GAA	1596	
	Y C I A D V L Q F P D K D A L E P Q K L I L K G P N V E		
1597	TCA TCA CTC GCG CAT ACT TAT GAT CGT AAT TAT GAA TTT TCC TTT GAT CGA GTC TTT GCT CCT GAA AGC GAT AAC TCG TCC GTT	1680	
	S S L Y D R N Y F T D C F D R C V F A P E S D N S S		
1681	TTT GAG GAA ATA TCA CAG TTA ATT CAA AGC GCT AJT GAT GGT TAT AAT GTT AGT ATA TTT GCA TAT GGA CAA ACA GGA TCG GGT	1764	
	F E E I S Q L I Q S A I D G Y N V S I F A Y G Q I G S G		
1765	AAG ACG TAC ACA ATG TGG TCA CAA GAC CGT ATG ATA GCG ATG TCA AJT AAG CAT ATA TTT AAT TAT CTA TCA ACC TTG ACG GAG	1848	
	K J Y I M S S Q D G M I A M S I K H I F N Y L S I L R E		
1849	AAA GGG TGG GTG TAT AAA TTG AGA GGT CAG TTT TTG GAA AJT TAC AAT GAA ACG AJT TAT GAT CTA TTA AAC AAA GCG GAA ATG	1932	
	K G W V Y K L R G Q F L E I Y N E T I Y D L L N K A E M		
1933	TTG AAA AAT CCT AAG CAC GAT AJT CAT CAT GAT GAA AAG GAA AGA CGA ACA ACA GTG GAT AAC GTT TCA ATA ATT GAT TTT AAT	2016	
	L K N P K H D J H H D E K E R R T J V D N V S I I D F N		
2017	GAA GAA GAT ACT GTT TAC AAG ATG CTA AAT CGA GCA GGA GAA AAT CGA TTT ATA GCA GCG ACA AAA GCA AAT GAA CCG TCT TCA	2100	
	E E D I V Y K M L N R A G E N R F I A A I K A N E R S S		
2101	AGA TCA CAC ACT GTT TTC ATG CTG TAT ATA GAT GGT GAA AAT TCT AGA ACC AAA CAA ATA TGT AAA GGT ACG CTA AAT CTA GTT	2184	
	R S H I V F M L Y I D G E N S R I K Q I C K G I L N L V		
2185	GAT TTG GCA GGT TCT GAG CCG TTA AGT TAC AGT CAG GCA GTT GGG GAT AGA CTA CGA GAA ACG CAA GCT ATT AAT AAA AGT CTC	2268	
	D L A G S E R L S Y S Q A V G D R L R E T Q A I N K S L		
2269	AGC TGT CTT GGC GAT GTT ATC CAT GCA CTT GGA AAT GGC TCA AAT AGT ACC ACG AAG GAA AAG TCT CAC ATA CCA TAC CGA AAT	2352	
	S C L G D V I H A L G N A S N S T T K E K S H I P Y R N		
2353	TCA AAG CTA ACT TAT TTG TTA AAA TAT TCA CTT GGA AAA GGT GGC AAA ACC ATG TTT GTT AAT GTG TCT CCT TTA AAG TGG	2436	
	S K L T Y L L K Y S L G K G A K T L M F V N V S P L K S		
2437	CAA TTC ATG GAT ACA TTA AAT AGT CTG CGA TTT GCA ACA AAA GTC AAT GAT ACA AAA GTA GGT TCT ATT AAA CAT TAT AAA CGT	2520	
	Q F M D T L N S L R F A T K V N D T K V G S I K H Y K R		
2521	TAA GCTATTTTAGAGTAAAAATGTTTACCAAGCATTAAAGATGCTGGGTTTGGTGGAGCAGCTGCTGCTTGTGCTTGAATGATGGCACCTTTAACTTTGCTG	2525	
2626	AATTCCTCTGTGAGATTTTGTGTTGATTTTCGAGCGTGCACATAATTATGAATTAATAAAAATGACATAAGCAATTCGATAATACAAATGAAGAAGTACAACCTGCATT	2736	
2737	TTTAGAGAGCGATTTTAACTCAAGGAAATCTCTCTTTTCAAATTTCAACAACATACATTCTTTTATTAATGAAATCCAATCTCTGTTTTAACTGTGCTTCTCTCTCT	2847	

Fig. 5. DNA sequence analysis of the newly cloned kinesin gene and the predicted amino acids sequence. The probe which is prepared from PCR is indicated by a underline.

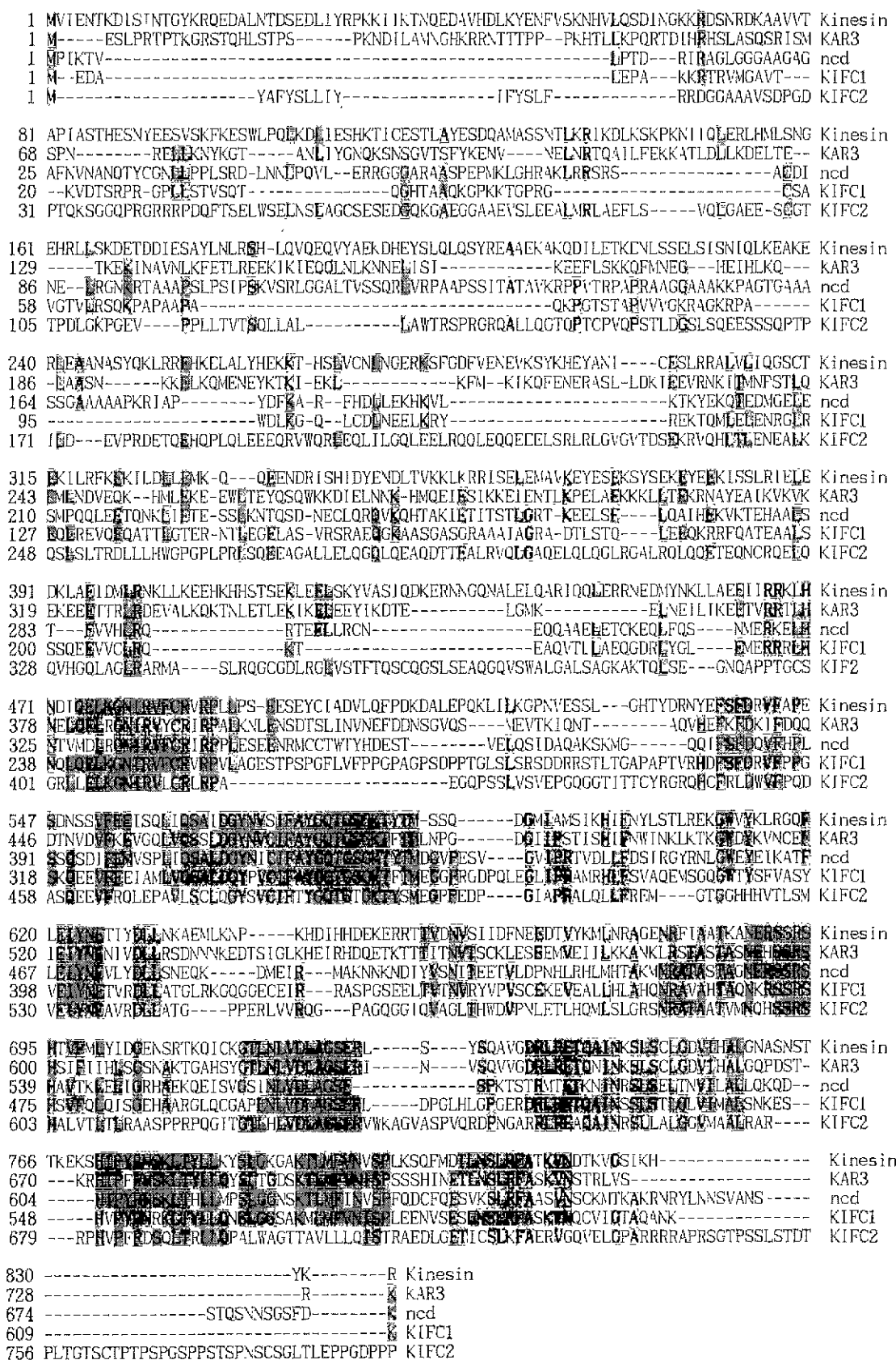


Fig. 6. Alignment of the predicted amino acids sequence of the kinesin heavy chains from *S. pombe* kinesin and the kinesin heavy chains from *S. cerevisiae* (KAR3), *D. melanogaster* (ncd) and mouse (KIFC1 and KIFC2).

cytoskeletal element 중 actin과 더불어 세포 분열에서 가장 중요한 역할을 하는 microtubule과 연관되어 작용하는 kinesin을 집중적으로 연구하기 위하여 해당 유전자를 *S. pombe*에서 찾아내려고 시도하였다. 그 결과 PCR을 이용하여 *S. pombe*에서 유사 유전자의 일부를 찾아내었고 plaque hybridization을 이용하여 *S. pombe* cDNA library에서 전체 유전자를 clone하여 염기서열을 결정하였다. 대부분의 kinesin은 세포 분열시 microtubule과 더불어 염색체의 이동에 관여하지만 일부 organism의 신경세포에서는 cell organelle의 이동과 vesicle의 이동에 관여하고(33) *S. cerevisiae*에서는 zygote의 형성과 myosin의 기능에 연관이 있는 등 다양한 역할을 하고 있음이 밝혀져왔다(17, 21, 27, 29). 본 연구에서 새로이 클론된 kinesin도 새로운 기능을 갖을 가능성이 있다고 여겨진다. 이를 위하여 염기서열을 바탕으로 *in vitro* mutagenesis를 이용하여 clone된 kinesin 유전자에 인위적인 돌연변이를 일으키며 이를 정상적인 유전자와 치환 하여서 그 때에 생겨나는 돌연변이의 형태학적, 생화학적인 연구를 수행함으로써 그기능을 파악하려고 현재 진행중에 있다. 또한 해당 kinesin의 항체를 유전자 융합기술을 이용하여 생성하여서 이를 이용하여 세포학적인 연구를 수행 함으로써 kinesin의 세포내의 존재위치와 세포분열시의 보다 정확한 기능을 파악하려고 시도 중에 있다. 이러한 실험으로부터 clone된 kinesin의 기능을 밝힘으로써 세포형태 형성기작의 이해에 큰 도움을 줄 것으로 사려된다.

감사의 말

본 연구는 교육부의 학술연구조성비 유전공학연구비(1997년 6월-1998년 5월)에 의하여 연구되었으며 일부는 한국과학재단 특정기초 연구과제(Grant Number: 94-0401-08-04-3; 1994년 9월-1997년 5월)의 지원에 의하여 연구 되었습니다.

참고문헌

- Adams, A.E.M., D. Botstein, and D.G. Drubin. 1989. A yeast actin binding protein is encoded by *SAC6*, a gene founded by suppression of an actin mutation. *Science* **243**, 231-233.
- Adams, A.E.M. and J.R. Pringle. 1984. Relation of actin and tubulin distribution to bud growth in wild type and morphogenetic mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **98**, 934-945.
- Aizawa, H., Y. Sekine, R. Takemura, Z. Zhang, M. Nangaku, and N. Hirokawa. 1992. Kinesin family in murine central nervous system. *J. Cell Biol.* **119**, 1287-1296
- Afshar, K., N.R. Barton, R.S. Hawley, and L.S.B. Goldstein. 1995. DNA binding and meiotic chromosomal localization of the *Drosophila* nod kinesin-like protein. *Cell* **81**, 129-138.
- Beach, D. and P. Nurse. 1981. High frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **290**, 140-142.
- Byers, B. 1981. Cytology of the yeast life cycle, p. 59-66. J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach (ed.), In The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, N Y.
- Drubin, D.G. 1991. Development of cell polarity in budding yeast. *Cell* **65**, 1093-1096
- Drubin, D.J., K.G. Miller, and D. Botstein. 1988. Yeast actin-binding proteins; Evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* **107**, 2551-2561.
- Endow, S.A., S. Henikoff, and L. Soler-Neidziela. 1990. Mediation of meiotic and early mitotic chromosome segregation in *Drosophila* by protein related to kinesin. *Nature* **345**, 81-83.
- Enos, A.P. and N.R. Morris. 1990. Mutation of a gene encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. *Cell* **60**, 1019-1027
- Goldstein, L.S.B. 1993. Functional redundancy in mitotic force generation. *J. Cell Biol.* **120**, 1-3.
- Gould, S.J., S. Subramani, and I.E. Scheffle. 1989. Use of the DNA polymerase chain reaction for homology probing: Isolation of partial cDNA or genomic clones encoding the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase from several species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 1934-1938.
- Gyllenstein, U.B. and H.A. Erlich. 1988. Generation of single-strand DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7652-7656.
- Hagan, I. and M. Yanagida. 1990. Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7* gene. *Nature* **347**, 563-566.
- Hagan, L. and M. Yanagida. 1992. Kinesin-related *cut7* protein associates with mitotic and meiotic spindles in fission yeast. *Nature* **356**, 74-76.
- Hirokawa, N., K.K. Pfister, H. Yorifuji, M.C. Wagner, S.T. Brady, and G.S. Bloom. 1989. Submolecular domains of bovine kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* **56**, 867-878.
- Hoyt, M.A., L. He, K.K. Loo, and W.S. Saunders. 1992. Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *J. Cell Biol.* **118**, 109-120.
- Huffaker, T.C., J.H. Thomas, and D. Botstein. 1988. Diverse effects of α -tubulin mutations on microtubule formation and function. *J. Cell Biol.* **106**, 1997-2009.
- Kilmartin, J.V. and A.E.M. Adams. 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* **98**, 922-933.
- Kim, H.B., B.K. Haarer, and J.R. Pringle. 1991. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. Localization of the *CDC3* gene product and the timing of events at the budding site. *J. Cell Biol.* **112**, 535-544.
- Lillie, S.H. and S.S. Brown. 1992. Suppression of a myosin defect by a kinesin-related gene. *Nature* **356**, 358-361.
- Mack, D. H. and J. Sninsky. 1988. A sensitive method for the identification of uncharacterized viruses related to known virus groups: Hepadnavirus model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6977-6981.
- Marks, J., I.M. Hagan, and J.S. Hymes. 1986. Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: The role of the cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* **5**, 229-241.
- Marks, J. and J.S. Hymes. 1985. Localization of F-actin through the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur.*

- J. cell Biol.* **39**, 27-32.
25. McDonald, H.B. and L.S.B. Goldstein. 1990. Identification and characterization of a gene encoding a kinesin-like protein in *Drosophila*. *Cell* **61**, 991-1000.
 26. McIntosh, J.R. and C.M. Pfarr. 1991. Mitotic Motors. *J. Cell Biol.* **115**, 577-585.
 27. Meluh, P.B. and M.D. Rose. 1990. KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. *Cell* **60**, 1029-1041.
 28. Murphy, T.D. and G.H. Karpen. 1995. Interactions between the nod kinesin-like gene and extracentromeric sequences are required for transmission of a *Drosophila* minichromosome. *Cell* **81**, 139-148.
 29. Roof, D.M., P.B. Meluh, and M.D. Rose. 1992. Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **118**, 95-108.
 30. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
 31. Sanger, F.S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
 32. Saunders, W.S., D. Koshland, D. Eshel, I.R. Gibbons, and M.A. Hyot. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* kinesin- and Dynein-related proteins required for anaphase chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **128**, 617-624.
 33. Vale, R.D., T.S. Reese, and M.P. Sheetz. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
 34. Willams, B.C., M.F. Reidy, E.V. Williams, M. Gatti, and M.L. Goldberg. 1995. The *Drosophila* kinesin-like protein KLP3A is a midbody component required for central spindle assembly and initiation of cytokinesis. *J. Cell Biol.* **129**, 709-723.
 35. Wordeman, L. and T.J. Mitchison. 1995. Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* **128**, 95-105.
 36. Zang, P., B.A. Knowles, L.S.B. Goldstein, and R.S. Hawley. 1990. A kinesin-like protein required for distributive for chromosome segregation in *Drosophila*. *Cell* **62**, 1053-1062.

(Received November 24, 1998/Accepted March 9, 1999)

ABSTRACT: Cloning and Sequence Analysis of the Kinesin Gene in *Schizosaccharomyces pombe*

Jae-Wook Jeong¹, Seong-Min Choi¹, Myeong-Sok Lee², and Hyong Bai Kim¹
 (¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, ²Department of biology, Sookmyung Women's University)

Kinesin has been discovered in *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, and *Drosophila melanogaster* and it has major roles in the movement of chromosomes and separation of spindle poles. In this study, a gene encoding kinesin heavy chain in *Schizosaccharomyces pombe* was cloned by using the polymerase chain reaction with degenerated primers corresponding to highly conserved regions of the kinesin heavy chain motor domain. The kinesin gene in *S. pombe* contains an open reading frame of 2496 base pairs and encodes a kinesin protein of 832 amino acids with a molecular weight of 96 kd. From the comparison of the predicted amino acids of the newly cloned kinesin, the kinesin in *S. pombe* belongs to the C-terminal motor subfamily of kinesin-related protein.