

출아효모에서 S기 checkpoint에 관여하는 *DPB11*에 관한 연구

임선희 · 박정은 · 김중현 · 오규선 · 선우양일 · 정정남*

동아대학교 자연과학대학 생물학과

DPB11 is a component of the S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*

Sun-Hee Leem, Jung-Eun Park, Jung-Hyun Kim, Kyu Seon Oh,
Yangil Sunwoo and Chung-Nam Chung*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Dong-A University, Pusan 604-714

Abstract

The *DPB11* gene, which genetically interacts with DNA polymerase II (ϵ) encoded by *POL2* and *DPB2*, is required for DNA replication and the S phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. The transcripts of *DPB11* did not fluctuated as evidently as *DPB2* and *POL2* genes during cell cycle. To identify the physical interaction between Dpb2 and Dpb11, we examined the interaction by two-hybrid system. The interaction between Dpb2 and Dpb11 was detected in a two-hybrid assay. These results suggest that the amount of the Dpb2-Dpb11 complex may peak at the G1/S boundary. Therefore, we strongly suggest the involvement of the Dpb2-Dpb11 complex in a progression of DNA replication and S-phase checkpoint.

Key Words – *DPB11*; cell cycle; checkpoint; *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

진핵세포의 DNA 복제는 세포주기 S기(Synthetic phase) 동안 염색체 상에 존재하는 많은 복제원점(replication origin)에서 시작된다. S기 동안 완전히 복제된 염색체는 M기(Mitotic phase)에 분리되며, 이러한 두 시기는 G1(Gap 1)과 G2(Gap 2)라 불리는 두 Gap에 의해 분리되어있다 [14]. 염색체 상의 각 복제원점들은 S기 초기 혹은 후기 동안 복제를 시작하며, 세포는 이러한 복제개시가 M기가 완전히 끝날 때까지 다시 개시되지 않도록 제어한다[7,10,20].

세포주기에 있어 세포가 어떻게 복제 시기를 결정하며, 또 M기가 완료될 때까지 복제의 재개시가 억제되는가에 대한 기작은 현재까지 확실하지 않다.

DNA 중합효소를 포함하여 DNA 복제에 관여하는 많은 효소들은 G1/S 경계역에서 염색체 DNA를 복제하기 위하여 생성되며, S기 DNA 복제에 DNA 중합효소가 중심적 역할을 수행한다. 출아효모의 핵 내에 존재하는 DNA 중합효소로서 4 종류의 DNA 중합효소 I, II, III 그리고 IV와 미토콘드리아의 DNA 중합효소가 분리 정제되어있다. 그 외에 DNA 회복에 관여하는 REV3 유전자도 그 아미노산 서열로 미루어 6번째의 DNA 중합효소로서의 가능성이 시사된다. 그러나 이 유전자는 세포증식에 필수적이지 아니며 DNA 복제에도 직접 관여하지 않는다. DNA 중합효소IV

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: 82-51-200-7267, Fax: 82-51-200-7269
E-mail: cnchung@daunet.donga.ac.kr

역시 포유동물의 DNA 회복에 관여하는 DNA 중합효소 β 와 기능의 유사성을 나타내며 세포의 증식에는 필수적이지 아니다. 이러한 점을 미루어 염색체 DNA의 복제에 관여하는 효소로서 DNA 중합효소 I, II, III을 들 수 있다[12,21]. 먼저 DNA 중합효소 I (Pol I)은 DNA primase 복합체로 DNA 복제 개시에 필수적으로 DNA primase는 RNA를 합성하고 Pol I은 RNA primer를 이용하여 짧은 DNA 가닥을 합성한다. 이렇게 짧은 DNA 가닥이 만들어지면 PolII와 PolIII가 관여하여 DNA 가닥을 신장시킨다. PolII는 256-, 80-, 34-, 30-, 그리고 29-kDa의 단백질 복합체[6]로서 정제되었으며, 이 중 256-kDa subunit는 catalytic subunit로서 DNA 중합기능을 갖지만, 그 외의 다른 subunits의 기능은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 이 256-과 80-kDa subunits는 각각 POL2와 DPB2에 의해 암호화되어있고, 염색체 DNA 복제에 필수적이다[1,3,9]. DPB3 유전자에 의해 암호화된 34-와 30-kDa subunits는 그 결손에 의해 자발적 변이(spontaneous mutation) 빈도가 증가되므로 DNA 합성의 정확성에 필요한 것으로 제안된다[2].

DNA 복제기작에 대한 Pol2의 기능을 이해하기 위해 그 기능이 알려지지 않은 DPB2와 상호작용하는 인자를 동정하기 위한 실험에서 *dpb2-1* 변이주의 multicopy suppressor로서 DPB11이 분리되었다[4]. DPB11의 과다발현은 POL2 유전자의 C-말단에 변이를 지닌 *pol2-11*과 *pol2-12* 변이주의 변이를 또한 극복하였다. 이 C-말단 부위는 다른 subunit와 상호작용에 매우 중요하며[9], 또한 이 부위는 S기의 checkpoint 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[11]. 더욱이 DPB11 유전자의 아미노산 서열은 S기 시작 및 세포주기 checkpoint에 필요한 분열효모의 Cut5/Rad4와 유사하다는 것이 밝혀졌다[15,16].

본 연구는 세포주기 중 Dpb11의 기능을 이해하기 위하여 세포주기 중 발현수준을 조사하고, *in vivo* 내의 2-hybrid system을 이용하여 Dpb11과 세포주기 중 DNA 복제기작에 관여하는 Dpb2와의 직접결합을 조사하였다. 그 결과 세포주기를 통하여 DPB11 유전자의 발현이 변동하지 않는다는 결과는 DPB11 유전자와 상동성을 나타내는 분열효모의 CUT5/RAD4 유전자의 발현 양상이 동일하여 다른 단백질과의 상호작용에 의해 조절작용을 나타냄을 시사한다. 또한 *in vivo* 내의 2-hybrid system을 통하여 Dpb11과 Dpb2와 결합력을 지니는 것이 밝혀져 Dpb11은 DNA 복제시스템을 통해 S기 Checkpoint 기능을 가진다는 것이 제안되었다. 이러한 결과를 토대로 DPB11과 DPB2는 단순히 유전적인 multi-copy suppression이 아닌 실제 *in vivo* 상호작용을 보여주었으며, 또한 Dpb2 단백질의 분자간 상호결합이 일어나는 것도 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid DNA

본 실험에 사용된 출아효모 균주와 대장균은 Table 1에 표시하였다. 세포주기가 진행되는 동안 DPB11 유전자의 발현량을 조사하기 위한 Northern blot analysis에 사용된 total RNA 분리에는 W303A 균주를 사용하였고, 단백질간 *in vivo* 내의 상호작용을 조사하기 위한 two-hybrid법에는 Y190과 양성 대조균으로서 SNF1(pSE1111)과 SNF4(pSE1112)를 지니고 있는 Y190/SNF 균주를 사용하였다[5]. 또한 CB001 균주는 proteinase 생성이 결손된 균주로서 형질 전환된 벡터로부터 단백질의 검출에 사용하였다.

Table 1. Strains used in this study

Strain	Genotype
W303-1A	<i>Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>
W303-1B	<i>Mat α ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>
W303-1A/B	<i>Mata/ α diploid, cross of W303-1A and W303-1B</i>
Y190	<i>Mata gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2,3,112 +URA3::GAL-lacZ, LYS2::GAL(UAS)-HIS3 cyh'</i>
Y190/SNF	Y190 with pSE1111 and pSE1112
CB001	<i>Mata leu2 trp1 ura3 prb pep4::URA3</i>
DH5 α	<i>F⁻ ϕ80d lacZDM15 endA1 recA1 hsdR17 [r_k⁻ m_k⁺] supE44 thi-1 λ⁻ gyrA96 relA1 Δ[lacZYA -argF] U169</i>

Table 2. The used oligonucleotides

primer name	5' -oligomer- 3'	enzyme site
DPB2-Forward	CCC ATT GTA AGC TTC AAT GCC	Hind III
DPB2-Reverse	GCA TTA TTT CTA GAT ATA TCT C	Xba I
DPB11-Forward	CGC CAA GCT TTC TGC C	Hind III
DPB11-Reverse	CGT GTC TTC TGC ATG CGA TCC	Sph I

배지 및 약제

효모 및 대장균을 이용한 유전학적 방법은 Sambrook 등 [18] 및 Sherman 등[19]의 방법을 사용하였다. 대장균 DH5 α 의 증식용 배지로 LB(Luria-Bertani) broth(0.5% Yeast extract, 1% Bactotrypton, 0.5% NaCl, 50 μ g/ml Ampicillin)를 사용하여 37°C에서 배양하였다. Two-hybrid용 plasmids의 형질전환에 사용되는 선택배지는 SC-leu와 SC-trp 배지(0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 1 \times amino acids dropout leucine 혹은 tryptophan)를 사용하였다. 이러한 형질전환체를 이용한 Two-hybrid system을 통해 상호결합을 알아보기 위해 SC-his + 25 mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazole; Sigma co.) 배지에 형질전환체를 streaking하여 30°C에서 3일간 배양한 후 콜로니의 형성을 조사하였다.

Two-hybrid analysis

DPB2와 DPB11 유전자의 ORF 영역은 Table 2의 primer를 이용해서 PCR을 수행하여 얻는다. 이렇게 얻어진 단편을 각각 pAS1과 pACT II [5]에 삽입하여 Gal4-Dpb11과 Gal4-Dpb2 융합 단백질(fusion protein)을 만든다. pAS1과 pACT II plasmids는 각각 Gal4의 DNA binding domain과 activation domain을 포함하여 최종적으로 pAS1/DPB2, pACT II/DPB2, pAS1/DPB11과 pACT II/DPB11이 만들어졌다. 각 plasmid는 Y190 균주에 형질전환하였고 각 형질전환체는 선택배지 SC-trp, SC-leu, SC-trp-leu에서 얻어졌다. 이렇게 얻어진 형질전환체를 각 선택배지에서 다시 patch하여 자라게 한 후, filter paper(Whatman no. 50)에 replica한다. 이 filter paper를 액체질소로 냉동시킨 후, 색깔을 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)을 포함한 Z buffer(10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, Na-PO₄, pH 7.0)를 사용하여 조사하였다. 또한 Permeabilized cell assay를 통한 β -galactosidase의 활성단위를 조사하기 위해서는 OD₄₂₀ / OD₆₀₀ \times volume assayed(ml)

\times time(min) 식을 이용하였다[19].

Western blot analysis

각 plasmid를 사용하여 형질전환된 CB001 균주를 배양한 후, 집균하여 lysis buffer(10% glycerol, 50 mM Tris[pH 7.5], 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.2% Nonidet P-40, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, complete protein inhibitor [Boehringer Mannheim]로 현탁한 후 glass bead로 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 polyacrylamide gel에 lane 당 10 μ g씩 전기영동하여 분리한 후, Immunobilon-P 막에 transfer를 수행한 후 HA(hemagglutinin) monoclonal antibody에 의해 검출하였다.

결과 및 고찰

DPB11의 전사수준은 세포주기를 통해 일정하게 발현된다

DNA 중합효소를 포함한 S기에 작용하는 많은 유전자들은 세포주기에 따라 그 전사수준의 변동을 나타내며, 대부분 G1/S기 경계에서 그 발현이 최고점에 이르게 된다. DNA 중합효소 II(ϵ)의 두 번째 subunit인 DPB2 유전자 역시 이러한 전사수준을 나타내며, 변이주인 *dpb2-1*의 multicopy suppressor로서 Araki 등[4]에 의해 DPB11 유전자가 보고되었다. 이러한 DPB11 유전자의 세포주기 중 전사수준을 조사하였는데, 먼저 elutriation[22]법에 의하여 동조시킨 출아효모 세포를 사용하여 세포주기의 각 시기 별로 RNA를 추출하여 조사하였다. Northern blot analysis의 대조군으로서 세포주기 중 G1/S기에서 발현이 최고점을 나타내는 POL2와 S기에서 발현이 최대화되는 Histone 2B 그리고 발현량의 변동을 나타내지 않고 전사수준이 일정하게 나타나는 Protein 1을 사용하였다.

Fig. 1에서 보여주는 것과 같이 DPB11 유전자의 전사수준은 대조군의 Protein 1과 같이 세포주기를 통해 그 전사

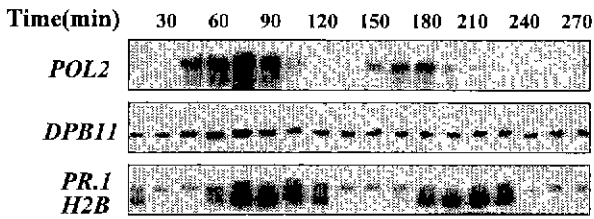


Fig. 1. Steady-state levels of the *DPB11* mRNA during the cell cycle. *S. cerevisiae* W303A cells were synchronized by elution as described before[8]. G1 cells obtained by centrifugal elutriation were released into fresh medium. Samples were withdrawn every 20 min. To make sure that the same amount of total RNA from each time point was applied on a gel, the gel was stained with ethidium bromide before RNA transfer to a membrane. Based on intensity of rRNA bands, approximately the same amount of total RNA was used in each time point in this experiment. Northern blots were hybridized with ³²P-labeled *Bam*H1-*Aat*II DNA fragment of *DPB11* along with ³²P-labeled Histone H2B, Protein 1 and *POL2* DNA [13]. *PR. 1*; protein 1 mRNA, *H2B*; Histone H2B mRNA.

수준이 변동하지 않았다. 이러한 결과는 분열효모에서 DNA 염기배열에서 상동성을 지니며 기능상 유사성을 나타내는 *Cut5* 유전자의 전사수준과 동일하게 나타났다[17]. 따라서, *DPB11*은 S기의 DNA 복제과정에 직접 관여하지 않고 DNA 복제에 관련된 효소 등에 결합하여 S기 Checkpoint에 관여할 가능성을 나타내었다. 그러므로 유전적 상호작용이 밝혀진 *DPB2*와의 단백질간 상호작용을 two hybrid analysis를 통하여 조사하였다.

Dpb2와 Dpb11 단백질 간의 물리적 상호 결합

dpb2-1 변이주에 대한 *DPB11* 유전자의 multi-copy suppression의 결과[4]는 *DPB2*와 *DPB11* 두 유전자 사이의 유전학적 상호작용을 시사한다. 또한 *DPB11* 유전자는 HU (hydroxyurea)와 같은 S기 저해물질에 대해서도 감수성을 나타내었다[4]. 유전자의 발현에 있어서도 *DPB2* 유전자 산물은 세포주기동안 각 시기에 따른 전사수준의 변동을 보이지만, *DPB11* 유전자 산물은 Fig. 1에서 보여주는 것과 같이 일정한 발현량을 나타낸다. 이러한 결과를 미루어

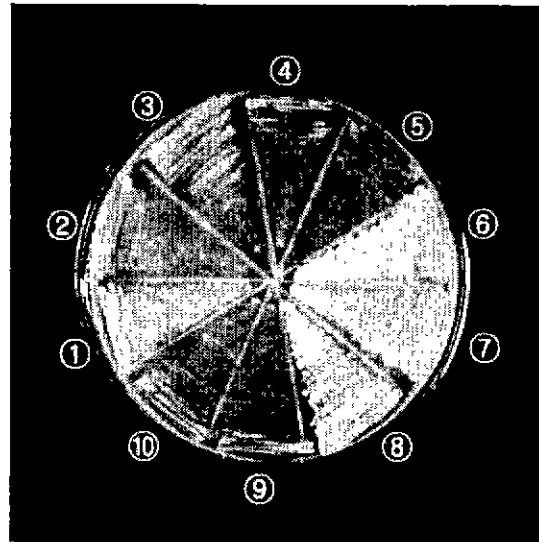


Fig. 2. Physical interaction between *DPB2* and *DPB11*. Transformants of Y190 carrying each pair of the plasmids were streaked onto SC-His + 25 mM 3-AT plate and incubated at 30°C for 3~4 days. Plasmids in this transformation were shown in Table 3 as same number, respectively.

*DPB11*의 기능은 DNA 복제 메커니즘에 속한 *DPB2*와 같은 유전자와 직접 결합하여 S기 checkpoint 기능을 수행할 가능성이 시사된다. 이러한 가능성을 조사하기 위해 출아효모의 two-hybrid system을 이용하여 *in vivo* 상 두 단백질 사이의 상호결합을 조사하였다. Two-hybrid analysis에 이용된 plasmid는 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 Gal4의 binding domain(pAS1)과 activation domain(pACT II)을 지닌 plasmid 내에 Table 2의 primer를 이용하여 PCR을 수행하여 얻은 각 ORF를 삽입하여 제작하였다. 실험대조군으로서 pAS1과 pACTII plasmid만 들어있는 형질전환체(Fig. 2-①)와 각 *DPB2*와 *DPB11*의 한 쪽만을 지닌 plasmid가 형질전환된 균주(Fig. 2-②~⑤), 그리고 두 단백질 사이의 상호결합이 알려진 양성 대조군으로 *SNF1*과 *SNF4* plasmid(pSE1111과 pSE1112)의 형질전환체(Fig. 2-⑥)를 사용하였다. 또한 Dpb2와 Dpb11의 각 단백질이 상호간 이량체를 형성하는가를 조사하기 위해 pAS1/*DPB2*와 pACTII/*DPB2*가 형질전환된 균주(Fig. 2-⑦)와 pAS1/*DPB11*과 pACTII/*DPB11*이 형질전환된 균주(Fig. 2-⑩)를 조사하였다. Dpb2와 Dpb11 두 단백질 사이의 상호결합을

조사하기 위해 서로 Gal4 binding domain과 activation domain을 바꾸어 만든 plasmid를 형질전환(Fig. 2-⑧, ⑨)하여 조사하였다.

Fig. 2의 결과는 각 형질전환체를 25 mM의 3-AT를 포함한 SD-His 선택배지에 streaking하여 성장을 조사한 것이다. 그 결과 대조군으로 사용한 ①~⑤의 균주에서는 SD-His+25 mM 3-AT 배지에서 낮은 성장률을 나타냈으며, 양성 대조군으로 이용된 SNF1과 SNF4의 결합은 ⑥에서 보이는 것과 같은 좋은 성장을 나타내었다. 단백질간 이량체를 조사한 결과에서 Dpb11 단백질(Fig. 2-⑩) 사이에는 상호 이량체를 형성하지 않는 것으로 나타났으나, Fig. 2-⑦에서 보여주는 것과 같이 Dpb2 단백질은 이량체 형성으로 Dpb2 단백질 사이에는 결합력을 지니는 것으로 나타났다. Dpb2-Dpb11 두 단백질 사이의 상호결합은 비록 Fig. 2-⑩에서는 SD-His+25 mM 3-AT의 선택배지에서 낮은 성장을 나타내었으나 Fig. 2-⑧에서는 양성 대조군과 같은 높은 성장을 나타내므로 두 단백질 사이의 상호작용을 시사한다.

Table 3은 단백질 사이의 상호결합을 β -galactosidase의 활성 측정에 의해 산정한 수치를 unit로 나타내었다. Table 3에 사용된 각 형질전환체는 Fig. 2와 동일한 것으로 ⑧의 pAS1/DPB2-pACTII/DPB11의 결합에 의한 활성은 양성 대조군 SNF1-SNF4와 유사한 값을 나타내었다. 그러나 융합 단백질을 상호 융합 단백질을 바꾸어 결합시킨 pAS1/DPB11-pACTII/DPB2의 경우에는 활성 값이 낮게 나타나 Fig. 2와 동일한 결과를 나타내었다.

Table 3. The Activity as β -galactosidase units in transformants of Y190 carrying each pair of the plasmids.

transformed plasmid	activity (unit)
① pAS I + pACT II	0.04
② pAS I /DPB2	0.08
③ pACT II /DPB2	0.01
④ pAS I /DPB11	0.03
⑤ pACT II /DPB11	0.04
⑥ pSE1111 +pSE1112	1.37
⑦ pAS I /DPB2 +pACT II /DPB2	4.30
⑧ pAS I /DPB2 +pACT II /DPB11	1.38
⑨ pAS I /DPB11 +pACT II /DPB2	0.03
⑩ pAS I /DPB11 +pACT II /DPB11	0.04

이러한 결과의 차이는 Dpb2와 Dpb11 단백질이 Gal4의 binding domain 혹은 activation domain과 결합하여 만들어진 융합 단백질이므로 융합 위치에 따라 단백질간 상호작용이 저해될 가능성을 시사한다. 또 다른 가능성으로는 각 plasmid 내에 삽입된 유전자에서 만들어지는 단백질의 발현량이 한 쪽으로 편중되는 경우에도 이와 같은 결과가 얻어질 수 있다.

효모세포 내에서의 Gal4-HA-Dpb11 단백질의 발현 조사

Two-hybrid system에 의해 산출된 결과는 비특이적 결합에 의한 양성 반응의 가능성 및 융합 단백질 구조상의 문제 혹은 단백질 발현의 불균형 등으로 나타나는 결합의 저해를 생각할 수 있다. Fig. 2와 Table 3의 결과에서 비특이적 결합의 가능성을 알아보기 위해 Gal-HA와 Gal-HA-Dpb2 혹은 Gal-HA-Dpb11을 조사하여 형질전환을 수행하였으나 비특이적인 높은 결합력은 나타내지 않았다. 따라서 pAS1/DPB2-pACTII/DPB11의 구조는 결합하지만 pAS1/

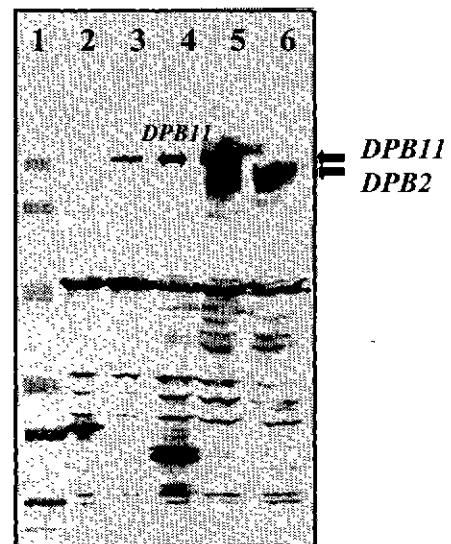


Fig. 3. Expression of the DPB11 gene in yeast. The protein extracts and precipitates were analyzed for the presence of Gal4-HA(pAS1 and pACTII; lane 2 and 4), Gal4-HA-Dpb11(pAS1/DPB11 and pACTII/DPB11; lane 3 and 5) and Gal4-HA-Dpb2 (pACTII/DPB2; lane 6). lane 1 shows the pre-stained size marker(20.9-, 29.1-, 35.5-, 50.6-, 83-, 101-kDa). The western blots of yeast extracts were probed with anti-HA monoclonal antibody.

DPB11-pACTII/DPB2의 구조로는 결합 저해가 일어날 가능성과 단백질 발현량의 불균형도 생각되어지므로, 먼저 각 플라스미드를 지닌 형질전환체에서 단백질 발현을 조사하였다. Fig. 3에서 나타내는 것과 같이 pAS1/DPB11(lane 3)를 지닌 균주에서의 Dpb11 단백질의 발현은 pACTII/DPB11과 pACTII/DPB2(lane 5, 6)를 지닌 균주에서의 Dpb11 및 Dpb2 단백질의 발현량에 비해 약 10배 이하의 적은 단백질만이 anti-HA monoclonal antibody에 의해 검출되었다. 결과적으로 pAS1/DPB11에 의한 DPB11 단백질이 pACTII/DPB2에 비해 매우 적은 양으로 발현되어 pAS1/DPB2와 pACTII/DPB11의 결합보다 매우 약한 결합을 나타내었을 가능성을 시사한다.

요 약

본 연구를 통해 *dpb2-1* 변이주의 multi-copy suppressor로 분리되어진 DPB11 유전자는 단순한 유전적 상호작용 뿐 아니라 Dpb2-Dpb11 단백질의 직접 결합을 통해 기능을 나타낸다고 볼 수 있다. DPB2 유전자는 DNA 중합효소II의 두 번째 subunit로서 DNA 복제기작에 관여하는 것으로 사료된다. 그리고 DPB11 유전자는 분열효모에서 S기 도입 및 S기 checkpoint에 관여하는 CUT5 유전자와 염기 배열에 있어 높은 상동성을 지니고 기능적으로도 유사한 것으로 보고되었다[4]. 따라서 Dpb11의 기능은 Dpb2-Dpb11 두 단백질 사이의 상호결합을 통해 S기 checkpoint에 관여할 가능성을 시사한다. 또한 Dpb2는 DNA 중합효소II의 활성단위체인 POL2와 직접결합을 이루며 DPB11과 POL2 유전자간의 유전적 상호작용에 대하여 보고[4]되어 있으므로 Pol2-Dpb2-Dpb11 간의 상호작용이 S기의 복제 및 checkpoint 기작에 중요한 역할을 수행할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 동아대학교 공모과제 교내 학술연구비에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. 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 polymerase ϵ , replicates chromosomal DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **11**, 733-740.

2. Araki, H., R. K. Hamatake, A. Morrison, A. L. Johnson, L. H. Johnston and A. Sugino. 1991. Cloning DPB3, the gene encoding the third subunit of DNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4867-4872.

3. Araki, H., R. K. Hamatake, L. H. Johnston and A. Sugino. 1991. DPB2, the gene encoding DNA polymerase II subunit B, is required for chromosome replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4601-4605.

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. Bai, C. and S. J. Elledge. 1997. Gene identification using the yeast two hybrid system. *Methods Enzymol.* **283**, 141-156.

6. Hamatake, K. R., 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 order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634.

8. Kitada, K., A. L. Johnson, L. H. Johnston and A. Sugino. 1993. A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutation, *dbf4*, encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4445-4457.

9. 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.

10. Murry, A. 1995. The genetics of cell cycle checkpoints. *Current Opin. Genet. Dev.* **5**, 5-11.

11. Navas, T. A., Z. Zhou and S. J. Elledge. 1995. DNA polymerase ϵ links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* **80**, 29-39.

12. Newlon, C. S., T. D. Petes, L. M. Hereford and W. L. Fangman. 1974. Replication of yeast chromosomal DNA. *Nature* **247**, 32-35.

13. Noskov, V., S. Maki, Y. Kawasaki, S.-H. Leem, B.-I.

- Ono, H. Araki, Y. Pavlov and A. Sugino. 1994. The RFC2 gene encoding a subunit of replication factor C of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1527-1535.
14. Nurse, P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**, 547-550.
15. 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.
16. Saka, Y., P. Fantes, T. Sutani, C. McInerney, 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.
17. 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.
18. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
19. Sherman, F., G. R. Fink and J. B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
20. Stillman, B. 1996. Cell cycle control of DNA replication. *Science* **274**, 1659-1664.
21. Sugino, A. 1995. Yeast DNA polymerases and their role at the replication fork. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 319-323.
22. White, J. H. M., D. G. Barker, P. Nurse and L. H. Johnston. 1986. periodic transcription as a means of regulating gene expression during the cell cycle : contrasting modes of expression of DNA ligase genes in budding and fission yeast. *EMBO J.* **5**, 1705-1709.