

Saccharomyces cerevisiae에서 세포주기의 진행과 조절에 관련된 변이주들의 분리 및 특성화

박정은 · 임선희 · 선우양일*
동아대학교 자연과학대학 생물학과

본 연구에서는 세포주기의 G1/S기에 관련된 유전자의 작용기작을 이해하기 위하여 출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하여 세포주기 진행 및 조절에 관련된 변이주를 분리하여 특성화하는 연구를 수행하였다. 먼저 새로운 변이주를 분리하기 위해서 HeLa 세포와 출아효모에서 G1을 유발하는 CPO(ciclopirox olamine) 약제에 대해 감수성을 보이는 변이주를 선별하였다. 그 결과, 총 31개의 CPO에 대한 감수성 변이주들이 분리되었고, ciclopirox olamine sensitivity의 첫 글자를 따서 *cos mutants*라 명명하였다. *cos* 변이주들의 표현형의 특성을 결정하기 위해 MMS(methylmethane sulfonate)와 HU(hydroxyurea)에 대한 감수성을 조사하여 그 성질에 따라 4개의 group으로 나누었다. Group I에는 *cos27, cos28, cos32, cos33, cos36, cos37, cos40, cos42, cos46, cos50, cos52, cos53* 변이주가 포함되고, 이들은 MMS와 HU 두 약제 모두에 대해서 감수성을 보여 S기 checkpoint에 관련된 것으로 보이고, Group II는 *cos43, cos48* 변이주로 MMS에 대해서 감수성을 지녀 G1기 또는 G2기 checkpoint에 관련된 것으로 추측된다. Group III 변이주에는 *cos35, cos47, cos54, cos55, cos56*이 포함되고 HU에 대해서 감수성을 보여 S기에 관련된다고 보여지며, Group IV 변이주는 *cos29, cos30, cos31, cos34, cos38, cos39, cos41, cos44, cos45, cos49, cos51, cos57*로서 단지 CPO에 대해서만 감수성을 나타냈다. 더욱이 변이주의 최종표현형을 형광현미경을 이용하여 조사하여, S기 checkpoint에 관련된 것으로 보이는 *cos37* 변이주를 확인하였다. 또한, 변이주와 야생주의 이형접합체인 이배체를 만들어 변이주의 유전학적 분석을 수행하였다.

Key words □ cell cycle, checkpoint, ciclopirox olamine, start point, *Saccharomyces cerevisiae*

출아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*는 작은 genome size에도 불구하고 고등 진핵생물과 긴밀히 연관되어 있으며, 동물세포에서 분리가 어려운 세포주기 조절에 관련된 유전자를 비교적 쉽게 분리할 수 있다. 더욱이 현재 출아효모의 전체 염기서열 결정이 완료되어, 분자유전학적 접근이 유용한 연구대상으로 진핵생물의 모델시스템으로 널리 이용되고 있다(23).

세포주기의 연구에서 있어 출아효모는 매우 중요한 역할을 수행하여 왔다. 출아효모의 세포주기는 DNA가 복제되는 S기와 분열이 이루어지는 M기 그리고 그 사이의 존재하는 G1기와 G2기로 나누어진다(9,17,19). 이러한 세포주기가 정확히 진행되기 위해서는 각 단계에서 철저한 조절과 제어가 필요하며, 이러한 기작은 checkpoint system에 의해 이루어진다(15,24). Checkpoint는 세포주기에서 앞 단계가 완성된 후에 다음 단계로 진행하도록 하는 조절 기작으로, Weinert와 Hartwell에 의해 X선에 조사된 세포가 G2기에 정지하여 상해를 받은 DNA가 완전히 회복을 끝낸 후 증식을 재개하는 것을 발견하여 이러한 현상을 Checkpoint라는 용어로 처음 사용하였다(15,24). 출아효모에서 DNA 복제가 정지되거나 약제에 의해 손상을 받게 되면 checkpoint system은 이러한 상해가 회복될 때까지 세포주기를

정지시키게 된다.

이러한 세포주기 진행을 조절하는 checkpoint 기능은 G1기와 G2기에서 일반적으로 잘 알려져 있고(3), 특히 G1기 후반의 START 부위는 세포가 환경적 영향과 세포내 상태를 감지하여 세포주기를 진행할 것인지, 아니면 다른 발생적 단계로 도입할 것인지를 결정하는 시점이다(20,23). 만약 이 시기에 관련된 유전자가 UV를 조사하거나 약제를 처리하는 등의 방법으로 DNA 상해가 유발되면 세포는 G1기 checkpoint 조절에 의해 상해가 회복될 때까지 S기 개시를 지연하게 된다. 또한 G2기 checkpoint 부근에서 DNA 상해가 유발되면 유사분열이 연기되고, 특히 G2 checkpoint에서는 환경 및 세포 성장 뿐 아니라 DNA 복제 완료에 대한 조절도 함께 이루어진다(3,20,28,31). 최근에는 S기 checkpoint에 관련된 연구도 이루어지고 있다(5,10).

Checkpoint 관련유전자로서 START와 S기의 주요 연결인자인 *cdc18* 유전자는 START 특이적 전사인자에 의한 중요한 target 유전자이며, 또한 Cdc18 단백질은 직접 DNA 복제개시에 관여하는 것으로 밝혀졌다(7,12,29). Cdc18 단백질은 ORC(origin recognition complex)와 결합하며, DNA 합성 시기에 높은 수준으로 발현되어 M기로의 진입을 억제한다. 이러한 결과로 Cdc18 단백질은 복제 origin의 활성화에 관여하는 initiator기능을 가진 분자로 간주되고 있다. 이러한 분열효모의 *cdc18*과 기능적·구조적 상동체로 밝혀진 출아효모의 *cdc6* 유전자를 다량 발현시키게

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 051-200-7262, Fax: 051-200-7269
E-mail: yisunwoo@daunet.donga.ac.kr

되면 M기의 시작이 지연된다(7,12,29).

DNA damage checkpoint에 작용하는 유전자로는 *rad9*, *rad17*, *rad24*, *mec1*, *mec2/rad53/sad1/spk1* 그리고 *mec3*가 있다(14, 30). 그 중에서 *mec1*과 *mec2*는 G1과 G2 checkpoint에 부분적으로 중복된다. 여러 checkpoint 돌연변이주들 중에서 *rad9*, *rad2*, *rad53* 등은 G1과 G2 checkpoint 모두에서 활성을 지니고, 최근에 이들은 S기에 positive하고 M기에 negative한 조절기능을 가지는 S/M checkpoint에 관련된 유전자라는 것이 출아효모와 분열효모에서 밝혀졌다(5,6,8,11).

많은 checkpoint에 관여하는 유전자들은 주로 효모의 변이주들 이용한 분자유전학적 접근을 통해 얻어졌다(25). 세포주기를 정지시키는 DNA 상해제나 DNA 복제 저해제를 처리한 후, 세포 주기가 지연되지 않고 계속 진행되는 변이주들을 조사하여 이에 상응하는 checkpoint 유전자들을 클로닝하였다. 이러한 유전자들을 이용한 연구 결과에서 checkpoint 기능이 단순히 세포주기를 정지시키는 것만 아니라 DNA 회복과 전사조절 특히 DNA 회복에 관여하는 유전자의 발현유도에도 관여한다는 사실을 알게 되었다(21,33).

이를 배경으로 본 논문에서는 세포주기의 START 진행과 DNA 복제개시를 연결하는 시기인 G1/S기에 주목하여, 포유동물 세포인 HeLa cell에서 G1 동조화(synchronization)를 유도한다고 보고되어진(32) CPO (ciclopirox olamine) 약제를 출아효모에 처리하여 포유동물 세포와 같이 G1 arrest가 일어남을 확인하였다. 이에 따라 세포주기에서 G1기와 S기에 관련된 유전자들의 기작을 연구하기 위하여 CPO 약제에 대하여 감수성을 나타내는 *cos*(ciclopirox olamine sensitive, *cos27~cos57*) 변이주들을 분리하였다. 분리된 각 변이주가 세포 주기의 어느 시점에서 결손을 보이는지를 알아보기 위해 MMS, HU에 대한 감수성을 조사하였고, 유전학적 실험에 이용하기 위해 이배체(diploid)를 제작하여 변이주의 우·열성 변이와 포자형성률을 조사하고, 사분체 분석을 이용하여 포자의 생존율을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 Plasmid

본 실험에 사용된 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 반수체 균주로는 W303A와 W303B가 사용되었고, 이배체 균주로는 이 두 균주를 교배한 W303A/B가 사용되었으며, 각 균주의 유전형은 다음과 같다; W303A(*Mata ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3, 112 can1-100*), W303B(*Mata ade2-1 ura3-1 his3-11, 15 trp1-1 leu2-3, 112 can1-100*), W303A/B(W303A × W303B: *MATa ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11, 15/his3-11, 15, trp1-1/trp1-1, leu2-3, 112/leu2-3, 112, can1-100/can1-100*). 야생주인 W303B와 W303A에 MNNG를 처리하여 돌연변이화(mutagenesis)하였다. 분리된 변이주들의 이배체 형성 여부를 확인하기 위한 Mater로는 KR20A-1(*Mata, lys1-1*)과, KR20A-2 (*Matα, lys1-1*)를 사용하였다.

배지 및 약제

출아효모의 배지 조성 및 배양 조건에는 Sherman 등의 방법(27)을 이용하였다. 효모의 배양에는 영양배지로 YPD(2% polypeptone, 2% glucose, 1% yeast extract)를 사용하였다. 온도 감수성을 조사 조건으로 ts(thermosensitive)는 37°C, cs(cold sensitive)는 16°C에서 배양하였다. 변이주의 동정에 사용된 약제인 CPO($C_{14}H_{24}N_2O_3$, Sigma, co.)는 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 0.1 M 농도의 stock solution을 만들었다. CPO 첨가배지는 YPD 배지 혹은 선택배지인 SC-Leucine(0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 2% agar) 배지를 멸균하여 약 50°C 정도로 식힌 후, 각 배지에 다양한 농도로 첨가하여 만들었다. 그리고 돌연변이화에 이용된 MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; $C_2H_5N_5O_3$)는 메탄올에 녹여 10 $\mu\text{g/ml}$ 인 stock solution을 만들어 희석하여 사용하였고, MMS(methylmethane sulfonate)와 HU(hydroxyurea; Sigma, co.) 배지 역시 멸균한 배지를 식힌 후 여러 농도로 첨가하여 사용하였다. 이배체 세포의 포자 형성 조사에는 SPM(sporulation medium: 포자형성배지; 1% potassium acetate, 0.1% bacto-yeast extract, 0.05% glucose, 2% agar) 배지를 사용하였다(2).

MNNG 처리 농도의 결정

W303A와 W303B 균주를 YPD 액체배지에서 하룻밤 배양하여 2×10^8 cells/ml로 사용하였다. MNNG에 대한 각 농도별 생존율(survival rate)을 조사하기 위해서 O/N culture 1 ml씩을 Epp. tube에 분주한 후, 10,000×g로 1분간 원심 분리하여 멸균된 증류수로 씻어 내고 1 ml의 sodium phosphate buffer (pH 7.0)을 첨가하여 균주를 현탁하였다. 이렇게 준비된 각 tube에 MNNG를 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 30°C에서 1시간 진탕 배양시킨다. 배양 후 원심 분리하고 반응 정지액(5% sodium thiosulfate) 1 ml를 넣어 여분의 MNNG를 불활성화시킨다. 다시 원심 분리한 후, sodium phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml에 균주를 현탁한 후, 1 plate당 200~300개 정도의 콜로니가 나올 수 있도록 희석(10^{-4} , 10^{-5})시킨 뒤 YPD 배지에 도말하였다. 각 배지는 25°C에서 3~4일간 배양시킨 후 콜로니를 계수하여 생존율을 조사하였다(2).

CPO 감수성 변이주의 분리 방법

가. CPO 처리농도 결정

W303A 균주를 하룻밤 배양하여 2×10^8 cells/ml로 준비하여 CPO 농도 0, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 μM 의 YPD+CPO 배지에 200 μl 씩 도말한 후, 30°C에서 3~4일간 배양하였다. 이 배지에서의 야생주 W303A의 생존율을 조사하여 생존에 영향을 미치지 않는 최대 농도를 CPO 감수성 변이주의 분리 농도로 결정하였다.

나. MNNG에 의한 균주의 돌연변이화

O/N culture 1 ml을 Epp. tube에 분주한 후, 위에서 결정된 MNNG 농도로 30°C에서 1시간 처리하여 돌연변이화를 수행하였다. MNNG를 처리한 후, sodium phosphate buffer (pH 7.0) 1

ml에 현탁하여 YPD 한 plate 당 약 200~300 콜로니가 나타날 수 있도록 희석하여 도말하고, 25°C에서 3~4일간 배양하였다.

다. CPO 감수성 변이주의 동정

돌연변이화시킨 후, YPD plate에 배양시킨 콜로니를 위에서 결정된 190 μ M CPO를 첨가한 YPD plate에 replica한 후 16°C, 25°C, 37°C에서 3~4일간 배양하였다. 각 온도에서 배양된 YPD+CPO plate와 처음 plate를 비교하여, YPD plate에는 생존하나 YPD+CPO plate에는 생존하지 않는 콜로니를 CPO 감수성 변이주 (CPO sensitive mutant)로서 분리하였다. 또한 온도에 대한 감수성으로는 37°C의 YPD+CPO plate에서 생존하지 않은 콜로니를 ts-CPO 감수성 변이주로서, 16°C의 YPD+CPO plate에서 생존하지 않은 콜로니를 cs-CPO 감수성 변이주로 분리하였다.

MMS와 HU에 대한 감수성 조사

YPD+MMS 배지는 YPD 고체배지에 MMS를 0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02%의 농도로 첨가하여 만들었고, YPD+HU 배지는 HU 농도가 각각 0, 50, 100 mM이 함유되도록 첨가하였다. 야생주 W303A와 각 변이주를 2 ml의 YPD 액체배지에 접종하여 25°C에서 진탕 배양하여 1×10^7 cells/ml 세포수로 배양한 후, 균주를 $(5 \times 10^6) \times 5^0, 5^{-1}, 5^{-2}, 5^{-3}$ cells/ml로 단계적으로 희석하여 준비하고, 그것을 위의 농도로 준비된 YPD+MMS 배지와 YPD+HU 배지에 streaking 및 spotting하여 3~4일간 배양한 후 감수성을 비교 조사하였다.

형광 현미경 분석

야생주와 변이주를 YPD 액체배지에 1×10^6 cells/ml로 희석하여 25°C에서 2 시간 배양한 후, 균주를 양분하여 한 쪽은 CPO를 처리하고 다른 쪽은 CPO를 처리하지 않은 상태로 진탕 배양하였다. 이때 CPO를 처리한 시간을 0시간으로 하여 6시간 처리 후 집균한다. 집균된 각 균주를 0.1 M sorbitol, 40% ethanol에 고정시킨 후, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하여 형광현미경하에서 비교 관찰하였다.

우·열성 변이 조사

변이가 우성 혹은 열성임을 확인하기 위하여 반수체인 변이주와 다른 교배형을 지닌 야생주를 접합하여 이형 접합체 (heterozygote)를 만들었다(2). 이배체의 확인은 mater의 조사와 포자형성능력으로 결정하였다. 이렇게 만들어진 변이주와 야생주의 이형 이배체의 CPO 약제에 대한 감수성을 조사하여 야생주와 유사한 감수성을 나타내면 그 변이를 열성으로 분류하고, 변이주와 유사한 표현형을 나타내면 그 변이를 우성으로 분류하였다.

포자 형성을 및 생존율 조사

위에서 얻어진 각각의 이배체를 SPM 배지에 patch하여 25°C에서 4~5일간 배양한 후, 광학현미경하에서 세포를 계수하여 포자 형성율을 조사하였다. 또한 이렇게 얻어진 포자형성 균주를 100 μ l의 TE(10 mM Tris-Cl pH7.5, 1 mM EDTA 8.0)에 현탁하여 5 μ l의 zymolase (5 mg/ml)를 넣어 얼음 위에서 5분간 처

리한 후, 미세조작기(micromanipulator, Narishige co., Japan)를 사용하여 포자를 각각 분리하였다(2).

결 과

CPO에 대한 감수성 변이주의 분리

세포주기에서 G1기와 S기에 주목하여 이에 관련된 유전자를 분리하기 위해 G1 동조화를 일으키는 CPO에 감수성을 나타내는 새로운 변이주를 분리하였다. 먼저 변이주들을 분리하기 위해, 야생형 균주인 W303A와 W303B에 임의 돌연변이화를 수행하였다. MNNG를 돌연변이원으로 사용하여 야생주의 생존율을 조사하여 Fig. 1에 나타내었다. 이 중 생존률이 70% 정도를 나타내는 MNNG 농도인 3 μ g/ml를 처리 농도로 결정했다. 이렇게 결정된 농도를 기준으로 다시 야생형 균주에 MNNG를 처리하여 돌연변이화하여 YPD 배지에 약 200~300 콜로니가 나타나도록 도말하여 25°C에서 3 일간 배양하였다. 이렇게 형성된 콜로니 중에서 변이주의 선별(screening)을 위해 야생주의 생존율에는 영향을 미치지 않는 농도인 190 μ M CPO 약제가 첨가된 배지에 replica하여 16°C, 25°C, 37°C에서 4일간 배양하였다. 그 결과 총 75,000 콜로니 중에서 각각 교배형 별로 α -type 16개의 변이주와 a-type 15개의 변이주가 분리되어 Ciclopirox Olamine Sensitive의 첫 글자를 따서 *cos mutant*라고 명명하였다(Fig. 2, 3 및 Table 1). 전체 31개의 변이주 중에서 *cos27*, *cos42*는 CPO에 대해서 강한 감수성을, *cos30*, *cos31*, *cos32*, *cos37*, *cos45*, *cos46*, *cos47*, *cos48*, *cos56*은 CPO에 대해서 약한 감수성을 보였고, *cos35*,

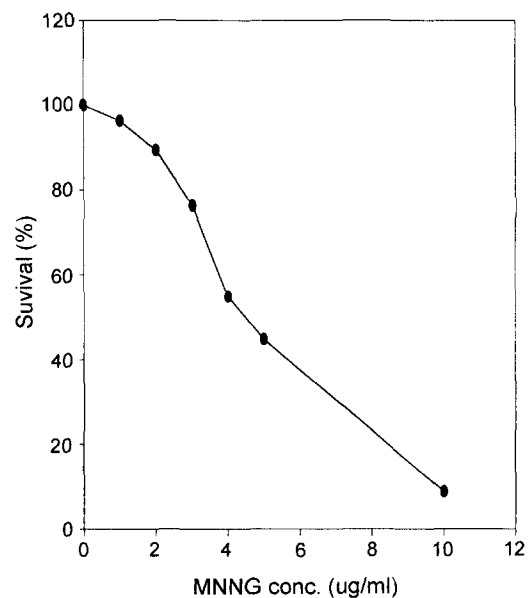


Fig. 1. Sensitivity to MNNG of the wild-type (W303A). The Cells of wild-type were grown to a stationary phase in YPD media at 25°C and treated with various concentrations of MNNG. The MNNG-treated cells were incubated at 30°C for 1 hour. Then cells were spread to YPD plate and incubated at 25°C. Colonies were counted after 4 days incubation.

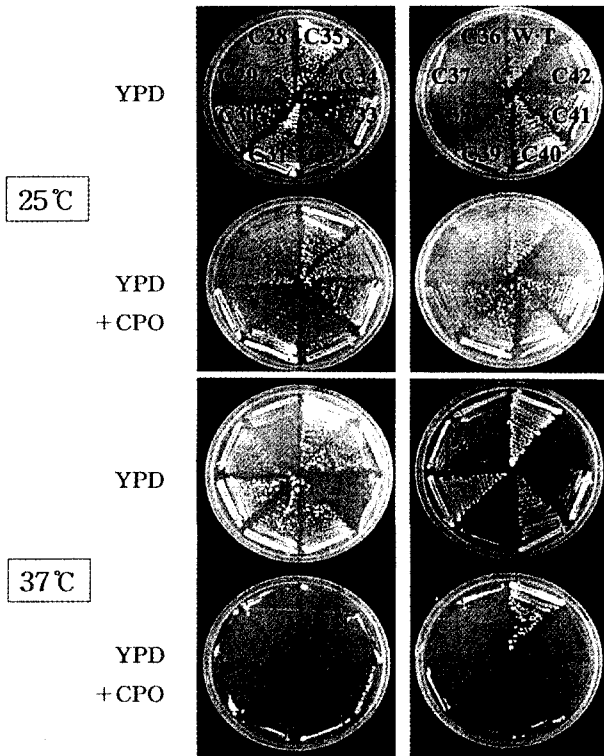


Fig. 2. CPO-sensitivity of 15 *cos* mutants of α -type. The sensitivities were tested by streaking the mutants onto YPD plate and YPD plate containing 190 μ M of CPO, and incubated at permissive temperature (25°C) and restrictive temperature (37°C) for 3 days. The 'C' indicated 'cos'.

*cos41, cos49, cos50, cos51, cos53, cos57*은 CPO배지 중 37°C에서 성장하지 않는 고온 감수성 및 CPO 감수성 변이주 (thermosensitive; ts-CPO sensitive mutant)로 나타났고, *cos39*는 CPO 배지 중 16°C의 배양조건에서 성장하지 않는 약한 저온 감수성 및 CPO 감수성 변이주(coldsensitive; cs-CPO sensitive mutant)로 보여지며, *cos28, cos29, cos33, cos34, cos36, cos38, cos40, cos43, cos44, cos52, cos54, cos55*는 저온 및 고온의 온도 감수성 및 CPO 감수성 변이주로 확인되었다(Fig. 2.3 및 Table 1).

MMS에 대한 감수성 조사

MMS는 DNA 상해제로서 정상적인 세포가 이 약제에 노출되어 상해를 입게 되면 checkpoint의 조절로 세포주기는 진행을 멈추고 DNA 회복계의 활성화로 그 상해가 완전히 회복되면 다시 세포주기를 진행하게 된다. 그러나 DNA 회복 기작에 결손이 일어난 변이주는 DNA 상해제에 노출되면 DNA 회복이 일어나지 않아 극심한 생존율 감소를 보이게 된다. 이에 비해 DNA 회복 기작은 정상이나 세포주기의 진행에 결손을 갖는 checkpoint에 관련된 변이주들은 상해 받은 DNA가 완전히 회복될 때까지 세포주기를 멈추지 못하여 DNA 상해를 조금 남긴 채로 세포주기의 다음 단계로 진행하여 MMS에 대해 약한 감수성을 보여주는 것으로 보고되고 있다(1,3,11,14,15,24,28,29). 따라서 각 변이주들

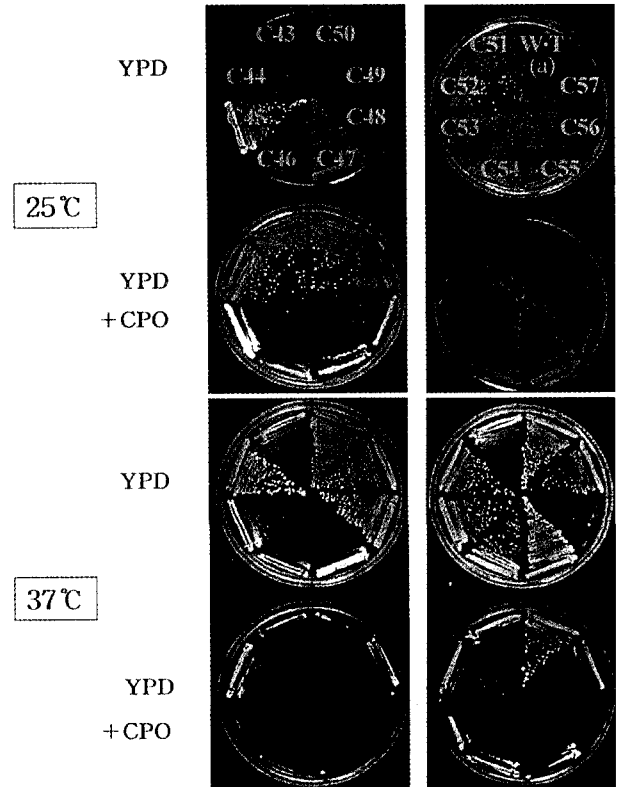


Fig. 3. CPO-sensitivity of *cos* mutants of a-type. The sensitivities were tested by streaking the mutants onto YPD plate and YPD plate containing 190 μ M of CPO, and incubated at permissive temperature (25°C) and restrictive temperature (37°C) for 3-days. The 'C' indicated 'cos'.

의 DNA 상해제인 MMS에 대한 감수성을 조사하기 위해 여러 농도의 MMS를 첨가한 YPD배지에서 조사하였다. 그 결과, 야생주에서는 그 생존율에 영향을 주지않는 MMS의 농도에서도 *cos36, cos37, cos42, cos52, cos53*은 비교적 강한 감수성을 보였고, *cos28, cos32, cos33, cos40, cos43, cos46, cos48, cos50*은 MMS에 대해 약한 감수성을 보였다(Fig. 4).

HU에 대한 감수성 조사

HU는 세포주기의 S기 저해제로 작용하고 ribonucleoside reductase의 작용을 방해한다(22,23). 따라서 HU와 같은 저해제에 감수성을 나타내는 변이주들은 S기나 S기 checkpoint에 결손을 지니는 것으로 알려져 있다(24, 25). 이러한 가능성을 조사하기 위하여 각 변이주들을 야생주와 함께 여러 농도의 HU를 첨가한 YPD 배지에서 감수성을 조사하였다. 그 결과, *cos37, cos42, cos56*은 HU에 대해서 강한 감수성을 보였고, *cos28, cos32, cos33, cos35, cos36, cos40, cos46, cos47, cos50, cos52, cos53, cos54, cos55*는 HU에 대해서 약한 감수성을 나타내었다(Fig. 5).

형광현미경 분석

cos 변이주들은 CPO 약제 처리에 의해 생존율의 저하를 나타

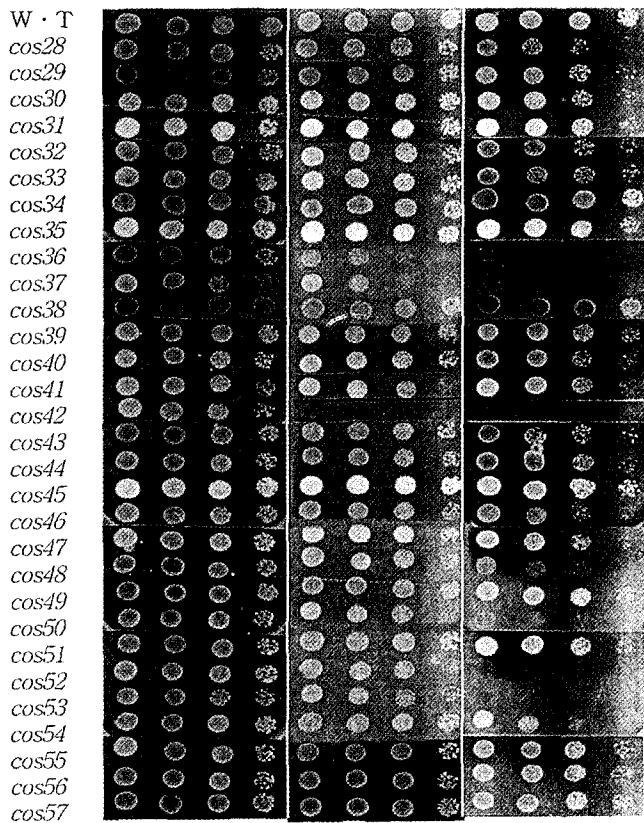


Fig. 4. MMS sensitivity of *cos* mutants. The sensitivities to MMS were tested by spotting the mutants onto YPD plate contained series concentrations of MMS. The mutants were grown until 5×10^6 cells/ml and prepared five-fold serial dilutions ($5^0, 5^{-1}, 5^{-2}, 5^{-3}$ cells/ml) of log-phase culture. Aliquots (5 μ l) of each cell suspension were spotted onto YPD and YPD+MMS plate. And the plates were incubated at 25°C for 2~3 days.

내며, 이 때 세포가 어떠한 형태로 최종 표현형(terminal phenotype)을 나타내는지를 형광 현미경하에서 관찰할 수 있다(5,13). 야생주의 경우에는 같은 농도의 약제처리 후에도 세포의 형태에 변화가 없는데 비해, 변이주인 *cos47*의 경우에는 하나의 세포 안에 2 개의 핵이 보여졌고, *cos37*의 경우에는 새로 분열된 세포 안에 명확한 핵의 형태가 없이 DNA 조각들이 나타났다(Fig. 6).

이배체의 특성 조사

가. 이배체의 제작

출아효모는 반수체 혹은 이배체로 존재할 수 있어 유전적 분석에 적합하며, 우성 및 열성 돌연변이를 쉽게 얻을 수 있다. 분리된 각 변이주의 우·열성을 조사하기 위하여 반수체 변이주와 반수체 야생주를 교배하여 이형 접합체를 만들었다(14,16). 이렇게 형성된 각각의 이형접합자를 mater 조사 및 포자형성을 유도하여 이배체임을 확인하였다(Fig. 7).

Table 1. Phenotype of *cos* mutants

	type	cpo	sensitivity	MMS	HU	growth	growth rate	Group
<i>cos27</i>	α	S	S	S	ts	very slow	I	
<i>cos28</i>		cs/ts	S	S	N	N	I	
<i>cos29</i>		cs/ts			N	N	IV	
<i>cos30</i>		S			N	N	IV	
<i>cos31</i>		S			N	N	IV	
<i>cos32</i>		S	S	S	N	slow slow	I	
<i>cos33</i>		cs/ts	S	S	N	N	I	
<i>cos34</i>		cs/ts			N	N	IV	
<i>cos35</i>		ts		S	N	N	III	
<i>cos36</i>		cs/ts	S	S	N	slow	I	
<i>cos37</i>		S	S	S	N	very slow	I	
<i>cos38</i>		cs/ts			N	N	IV	
<i>cos39</i>		cs			ts	slow slow	IV	
<i>cos40</i>		cs/ts	S	S	N	very slow	I	
<i>cos41</i>		ts			N	very slow	IV	
<i>cos42</i>		S	S	S	ts	slow slow	I	
<i>cos43</i>	a	cs/ts	S		N	N	II	
<i>cos44</i>		cs/ts			N	slow	IV	
<i>cos45</i>		S			N	N	IV	
<i>cos46</i>		S	S	S	N	slow	I	
<i>cos47</i>		S		S	N	N	III	
<i>cos48</i>		S	S		N	slow	II	
<i>cos49</i>		ts			N	N	IV	
<i>cos50</i>		ts	S	S	N	slow	I	
<i>cos51</i>		ts			N	N	IV	
<i>cos52</i>		cs/ts	S	S	N	slow	I	
<i>cos53</i>		ts	S	S	N	slow	I	
<i>cos54</i>		cs/ts		S	N	N	III	
<i>cos55</i>		cs/ts		S	N	N	III	
<i>cos56</i>		S		S	ts	slow	III	
<i>cos57</i>		ts			N	N	IV	

ts, thermosensitive; cs, cold sensitive; S, sensitive; N, normal

나. 변이주의 우·열성변이의 확인

확인된 이배체들을 YPD+CPO 배지에 도말하여 37°C에 배양한 후 그 표현형을 조사하였다. 이때 이형 접합체인 이배체의 표현형이 야생주와 같은 성질을 나타내면 그 변이는 열성 변이가 되며, 변이주와 같은 성질을 나타내면 우성 변이로 구분할 수 있다(26). 본 연구에 이용된 전체 10개의 변이주 중에 *cos28, cos30, cos33, cos36, cos39, cos45, cos46, cos47, cos50*은 모두 야생형과 같은 성질을 나타내어 열성 변이주로 확인되었고, *cos42*는 낮은 CPO 농도에서는 야생형의 성질을 나타내고 높은 CPO 농도에서는 변이주의 성질을 보이는 불완전 우성의 표현형을 나타내었다(Fig. 8).

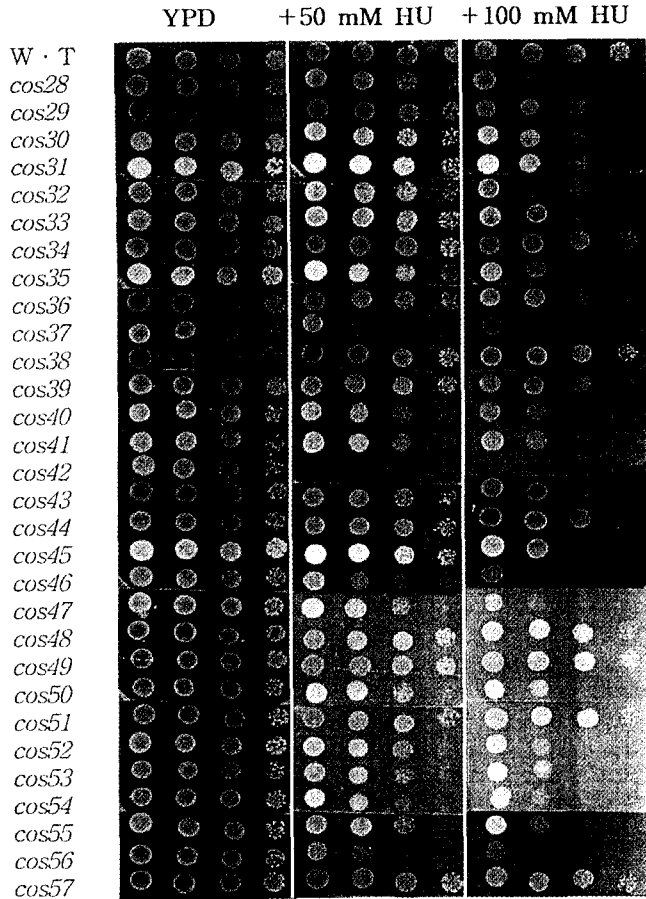


Fig. 5. HU sensitivity of *cos* mutants. The sensitivities to HU were tested by spotting the mutants to YPD plate containing serial concentrations of HU. The mutants were grown until 5×10^6 cells/ml and prepared five-fold serial dilutions ($5^0, 5^{-1}, 5^{-2}, 5^{-3}$ cells/ml) of log-phase culture. Aliquots ($5 \mu\text{l}$) of each cell suspension were spotted onto YPD and YPD+HU plate. And the plates were incubated at 25°C for 2~3 days.

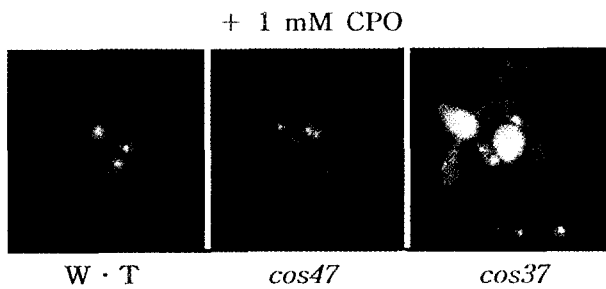


Fig. 6. Nuclei structure of wild-type, *cos47* and *cos37* with DAPI. After the cells of wild-type and mutants were grown at 25°C until 1×10^6 cells/ml, 1 mM CPO was added, and then the cells were shifted up to in YPD media at 37°C and incubated for 6 hr. The cells are fixed and stained with DAPI and examined under the fluorescence microscope ($\times 1,000$).

다. 포자 형성율 조사

각 이배체들의 포자 형성율을 조사하기 위해 포자형성배지에

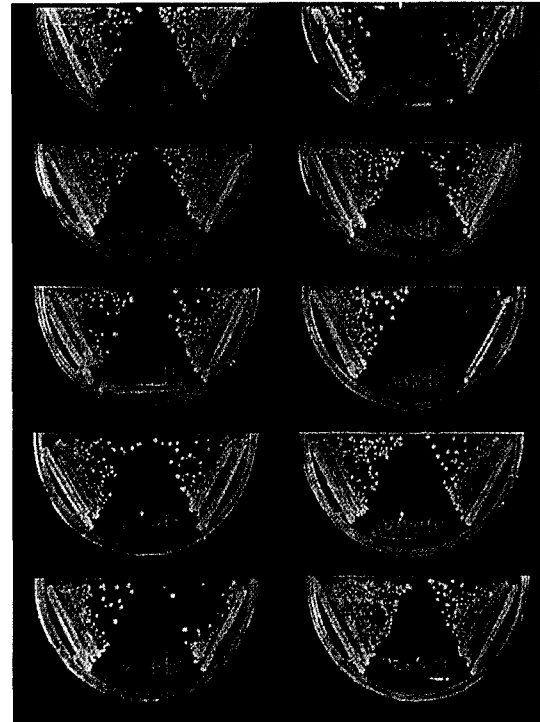


Fig. 7. The comparison of the dominant or recessive phenotype of mutants. After diploids were constructed from wild-type and mutant, they were streaked onto the YPD plate containing $190 \mu\text{M}$ of CPO and the plates were incubated at 37°C for 4 days. Then the sensitivity of each diploid was compared with sensitivity of wild-type and mutants, respectively. Each diploids were determined whether they are dominant or not.

Table 2. Rate of sporulation

Strain	Sporulation (%)
wild type	59.3
<i>cos28</i>	41.9
<i>cos30</i>	48.2
<i>cos36</i>	52.4
<i>cos42</i>	48.8
<i>cos45</i>	35.6
<i>cos46</i>	41.1
<i>cos47</i>	41.3
<i>cos50</i>	54.2

patch하여 감수분열을 유도하여 포자를 형성시킨 뒤 현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 8). 그 결과 야생주는 59.3%의 포자 형성율을 보였고, 각 변이주들은 Table 2에서와 같이 야생주보다는 약간 낮은 포자 형성율을 보여 주었다. 특히 *cos45*의 경우에는 야생형 균주보다 20% 낮은 포자 형성율을 보였다.

라. 사분체 분석(tetrad analysis)

위의 과정에서 형성된 포자를 사용해서 사분체 분석을 수행하

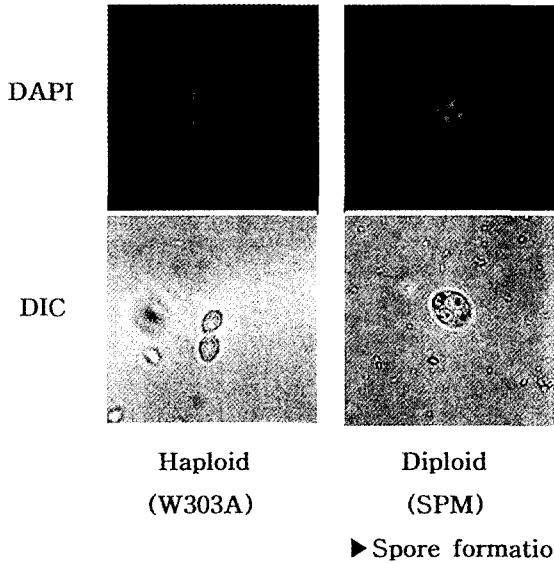


Fig. 8. Nuclei structure of spore with DAPI. The constructed diploid cells were incubated in SPM plate at 25°C for 5 days. The cells were fixed and stained with DAPI, and examined under the fluorescence microscope (×1,000).

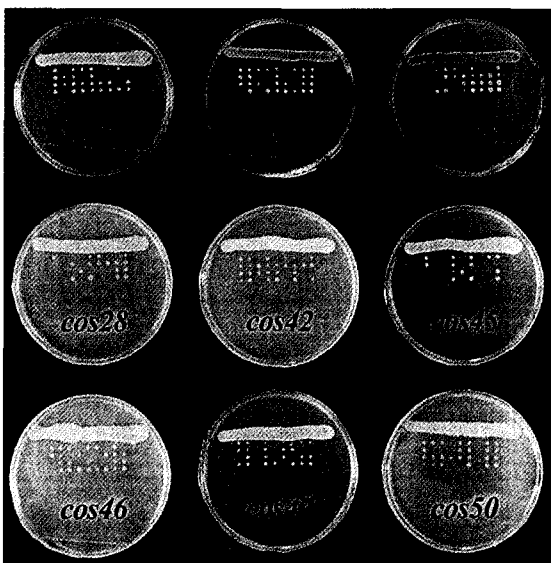


Fig. 9. Tetrad analysis. After asci were treated with zymolase, the treated spores were streaked in one line on the surface of a YPD dissection plate. Spore was separated on YPD plate by tetrad dissection (using a micromanipulator).

여 각 이배체의 포자 형성율을 조사하였다. 그 결과, 각 이배체의 포자의 생존율은 야생형과 비슷한 수준을 나타내었으나 *cos28*과 *cos45*의 경우에 야생주에 비해 약간 떨어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 9). 이러한 사분체 분석을 통해 얻어진 포자를 다시 교배형인 mater를 조사하여 각 변이주의 서로 다른 교배형인 α 와 α' type의 *cos* 변이주를 획득할 수 있었다.

고 찰

세포주기의 정상적인 진행을 조절하기 위한 checkpoint 기작의 존재 및 그 중요성에 대해서 최근에 많은 연구가 보고되었다(1, 3, 11, 14, 15, 24, 28, 29). 본 연구에서는 세포주기 중에서도 특히 G1과 S기의 경계의 START의 조절 기작에 주목하여, 이 시기에 작용하는 유전자의 변이주를 동정하고 분석하는데 중점을 두었다. 변이주의 동정에 사용된 항곰팡이성 약제인 CPO는 포유동물세포인 HeLa 세포에서 G1 동조화를 유도한다고 보고되었으며(32), 본 연구에서 출아효모에서도 G1 arrest 효과가 나타남을 알 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 하여 먼저 CPO에 대해 감수성을 보이는 총 31 종류의 *cos* 변이주를 분리하여 약제 및 온도에 대한 감수성을 Fig. 2와 3에 나타내었다. 또한 변이주들의 유전학적 특성을 조사하기 위하여 먼저 변이주와 야생주 간의 이형접합체인 이배체를 제작하여 CPO 약제에 대한 감수성으로서 변이의 우·열성을 조사하였다. 그 결과, *cos42* 변이주를 제외한 나머지 변이주는 모두 열성 변이로 확인되었고, *cos42*는 불완전 우성으로 나타났다.

각 변이주들의 세포주기에서의 결손을 조사하기 위하여, 먼저 MMS와 HU와 같은 DNA 상해제를 야생주에서 영향을 나타내지 않는 낮은 농도로 처리하여 checkpoint의 기능을 조사하였다. 이러한 조건에서 야생형은 약제에 의해 손상된 DNA를 회복한 후 다시 세포주기가 진행되므로 시간의 지연은 다소 보여지나 상해가 회복되어 생존율에는 영향을 나타내지 않는다. 그러므로 세포주기의 지연이 일어나지 않고 약한 약제 감수성을 나타내는 균주를 대개 checkpoint의 결손주로 간주한다(5, 24, 25). 이러한 성질을 중심으로 각 변이주들을 다음과 같이 세 그룹으로 나누었다 (Table 1). 그룹 I(*cos27, cos28, cos32, cos33, cos36, cos37, cos40, cos42, cos46, cos50, cos52, cos53*)은 MMS와 HU 두 약제에 대해서 모두 감수성을 나타내므로 S기 checkpoint에 관련되는 변이주군으로 나누었고, 그룹 II (*cos43, cos48*)는 MMS에 대해서만 감수성을 나타내므로 S기와는 무관한 G1기 혹은 G2기 checkpoint에 결손을 나타내는 것으로 보여지며, 그룹 III(*cos35, cos47, cos54, cos55, cos56*)는 S기 저해제인 HU에 대해서만 감수성을 보이므로 S기에 결손을 지니는 변이주로 간주된다. 그 외에 그룹 IV로서 *cos29, cos30, cos31, cos34, cos38, cos39, cos41, cos44, cos45, cos49, cos51, cos57* 변이주들은 MMS와 HU에 대해서는 감수성을 보이지 않으면서 단지 CPO에 대해서만 감수성을 가지는 변이주로서 더욱 세부적인 표현형의 조사가 필요하지만 약제의 막의 투과성에 관여하는 막 수송 단백질 등의 변이주들로 보여진다.

이러한 표현형에 의해 CPO에 대해 강한 감수성을 보이고 MMS와 HU에 대해서도 감수성을 보이는 *cos28, cos30, cos33, cos36, cos37, cos42, cos45, cos46, cos47, cos50*의 10개의 변이주를 선택하여 치사에 이르는 최종 표현형을 조사하였다. 그 결과, 대부분의 변이주에서 다소 야생형과는 다른 핵의 형태들을 보여주었으나, *cos47*의 경우에는 Fig. 8에서와 같이 한 세포안에 두 개의 핵이 존재하는 형태를 나타내었고, *cos37*의 경우에는 핵

이 절편화된 형태를 보여주었다. 이는 *cos47* 변이주가 세포질 분열없이 핵의 분열만 일어난 세포질 분열의 결손을 나타내는 것으로 보여지며, *cos37*의 경우에는 핵의 절편화를 나타내었다. 이는 위에서 분류한 표현형에서 S기 checkpoint의 결손을 나타낸 것과 관련성을 나타내는 것으로 정확한 S기의 완료가 이루어지지 않은 상태에서 M기에 진입하게 되면 핵의 절편화가 일어나게 된다. 이와 동일한 표현형이 S기 checkpoint의 결손을 나타내는 출아효모의 *dpb11* 변이주에서도 보고되었다(5).

본 연구를 통하여 세포주기의 연구에 있어 새로운 약제의 도입이 가능하게 되었으며, 분자유전학적 방법으로 세포주기 중 각 단계에서 결손을 나타내는 변이주들의 분리가 이루어졌다. 이러한 변이주들을 이용하여 이에 상보하는 유전자의 클로닝의 수행이 가능하며, 이들 유전자의 특성분석을 통하여 세포주기의 각 단계에 작용하는 유전자의 특성을 연구할 수 있으리라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 동아대학교 공모과제 교내 학술연구비에 의해 수행되었습니다. 또한 논문의 수정에 도움을 주신 실험실의 김 은아님께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

- Aboussekhra, A., J.E. Vialard, D.E. Morrison, M. Angeles de la Torre-Ruix, L. Cernakova, F. Fabre, and N.F. Lowndes. 1996. A novel role for the budding yeast RAD9 checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription. *EMBO J.* 15(15), 3912-3922.
- Adams, A., D.E. Gottschling, C.A. Kaiser, and T. Stearns. 1997. *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Al-Khodairy, F., E. Fotou, K.S. Sheldrick, DJF. Griffiths, AR. Lehman, and AM. Carr. 1994. Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 5, 147-160.
- Allen, J.B., Z. Zhou, W. Siede, E.C. Friedberg, and S.J. Elledge. 1994. The *SAD1/RAD53* protein kinase controls multiple checkpoint, and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev.* 8, 2401-2415.
- 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.
- Carr, A.M. 1995. DNA structure checkpoint in fission yeast. *Semin. Cell. Biol.* 6, 65-72.
- Cole, G.M. and R.K. Mortimer. 1989. Failure to induce a DNA repair gene, *RAD54*, in *Saccharomyces cerevisiae* does not affect DNA repair or recombination phenotype. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3314-3322.
- Costello, G., L. Rodger, and D. Beach. 1986. Fission yeast enters the stationary phase G0 form either mitotic G1 or G2. *Curr. Genet.* 11, 119-125.
- Diffley, J.F.X. 1996. Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev.* 10, pp. 2819-2830.
- Eberly, S.L., A. Sakai, and A. Sugino. 1989. Mapping and characterization of a new DNA replication mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 5, 117-129.
- Francescon, S., M. Grenon, D. Bouvier, and G. Baldacci. 1997. "p56^{chk1}" protein kinase is required for the DNA replication checkpoint at 37°C in fission yeast. *EMBO J.* 16(6), 1332-1341.
- Friedberg, E.C., G.C. Walker, and W. Siede. 1995. *DNA repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, DC.
- Greenfeder, S.A. and C.S. Newlon. 1992. A replication map of a 61-kb circular derivative of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III. *Mol. Biol. Cell.* 3, 999-1013.
- Hartwell, L.H. 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell.* 71, 543-546.
- Hartwell, L.H. and T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246, 629-634.
- Jensen, R., G.F. Sparque, and I. Herskowitz. 1983. Regulation of yeast mating type interconversion: feed back control of HO gene expression by mating type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 80, 3035-3039.
- Johnston, L.H. and N.F. Lowndes. 1992. Cell cycle control of DNA synthesis in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 20, 2403-2410.
- Kassir, Y. and G. Simchen. 1976. Regulation of mating and meiosis in yeast by mating type locus. *Genetics.* 82, 187-206.
- Kuerbitz, S.J., B.S. Plunkett, W.V. Walsh, and M.B. Kastan. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 7491-7495.
- Marini, N.J., E. Meldrum, B. Buehrer, A.V. Hubberstey, D.E. Stone, A. Traynor-Kakplan, and S.I. Reed, 1996. A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of *Cdc28* at START. *EMBO J.* 15, 3040-3052.
- Merchant, A.M., Y. Kawasaki, Y. Chen, M. Lei, and B.K. Bik. 1997. A Lesion in the DNA replication initiation factor *Mcm10* induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3261-3271.
- Michel, B., S.D. Ehrlich, and M. Uzest. 1997. DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J.* 16(2), 430-438.
- Murry, A. and T. Hunt. 1994. *The transition from G1 to S phase in the cell cycle*, Oxford University Press, Oxford. 89-116.
- Paulovich, A.G. and L.H. Hartwell. 1995. A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell.* 82, 841-847.
- Price, C., K. Nasmyth, and T. Schuster. 1997. A general approach to the isolation of cell cycle-regulated gene in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 17, 3261-3271.
- Saeki, T., I. Machida, and S. Nakai. 1980. Genetic control of diploid recovery after gamma-irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation. Res.* 73, 251-265.
- Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1989. *Laboratory course of manual for methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor press. N. Y.
- Siede, W., A.S. Friedberg, and E.C. Friedberg. 1993. RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7985-7989.
- Siede, W., A.S. Friedberg, I. Dianova, and E.C. Friedberg. 1994. Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents.

- Genetics*, 138, 271-281.
30. Sun, Z., D.S. Fay, F. Marini, M. Foiani, and D.F. Stern. 1996. "Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways". *Genes Dev.* 10, 395-406.
31. Weber, L. and B. Byers. 1992. A RAD9-dependent checkpoint blocks meiosis of cdc13 yeast cells. *Genetics*. 131, 55-63.
32. Urbani, L., S.W. Sherwood and R.T. Schimke. 1995. Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. *Exp. Cell Res.* 219, 159-168.
33. Zou, L., J. Miyochell, and B. Stillman. 1997. CDC45, a novel Yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 17, 553-563.

(Received January 9, 2001/Accepted February 13, 2001)

ABSTRACT: Characterization and Isolation of Mutants Involved in Cell Cycle Progression and Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*

Jung-Eun Park, Sun-Hee Leem, and Yangil Sunwoo*(Department of Biology, Faculty of Natural Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea)

These studies were carried out to understand the mechanisms of genes which are related in cell cycle progression at G1/S phase. Mutants involved in cell cycle progression and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* were isolated and characterized. To isolate new mutants, we screened the sensitivity to ciclopirox olamine (CPO) which inhibits the cell cycle traverse at or very near the G1/S phase boundary in HeLa cell and budding yeast. As results, we isolated 30 mutants and named *cos*(ciclopirox olamine sensitivity: *cos27~cos57*) mutants. To determine the phenotype of mutants, we examined the sensitivity to methylmethane sulfonate (MMS) and hydroxyurea (HU). Several mutants were sensitive to MMS and HU. According to these phenotypes, *cos* mutants were grouped into four. Group I mutants are *cos27*, *cos28*, *cos32*, *cos33*, *cos36*, *cos37*, *cos40*, *cos42*, *cos46*, *cos50*, *cos52* and *cos53* which show MMS, HU sensitivities and might act at a checkpoint pathway during S phase. Group II mutants are *cos43* and *cos48* which show MMS sensitivities and might act at a checkpoint pathway during G1 or G2 phase. Group III mutants are *cos35*, *cos47*, *cos54*, *cos55* and *cos56* which show HU sensitivities and might act at a progress pathway during S phase. Finally, Group IV mutants are *cos29*, *cos30*, *cos31*, *cos34*, *cos38*, *cos39*, *cos41*, *cos44*, *cos45*, *cos49*, *cos51* and *cos57* which show only CPO sensitivities. Moreover, we examined the terminal phenotype of mutants under fluorescent microscope and then found one of S phase checkpoint related mutant(*cos37*). Furthermore, we constructed the heterozygote strain between mutant and wild type haploid strains to study their genetic analysis of *cos* mutants.