

Schizosaccharomyces pombe 포자형성 유전자(*spo5*)의 Cloning 및 전사조절

김 동 주

大阪市立大學 生物學科

Cloning and Transcription Analysis of Sporulation Gene (*spo5*) in *Schizosaccharomyces pombe*

Dong-Ju Kim

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558, Japan

Abstract

Sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has been regarded as an important model of cellular development and differentiation. *S. pombe* cells proliferate by mitosis and binary fission on growth medium. Deprivation of nutrients especially nitrogen sources, causes the cessation of mitosis and initiates sexual reproduction by mating between two sexually compatible cell types.

Meiosis is then followed in a diploid cell in the absence of nitrogen source. DNA fragment complemented with the mutations of sporulation gene was isolated from the *S. pombe* gene library constructed in the vector, pDB 248⁺ and designated as pDB(*spo5*)1.

We further analyzed six recombinant plasmids, pDB(*spo5*)2, pDB(*spo5*)3, pDB(*spo5*)4, pDB(*spo5*)5, pDB(*spo5*)6, pDB(*spo5*)7 and found each of these plasmids is able to rescue the *spo5*-2, *spo5*-3, *spo5*-4, *spo5*-5, *spo5*-6, *spo5*-7 mutations, respectively. Mapping of the integrated plasmid into the homologous site of the *S. pombe* chromosomes demonstrated that pDB(*spo5*)1, and pDB(*spo5*)R1 contained the *spo5* gene.

Transcripts of *spo5* gene were analyzed by Northern hybridization. Two transcripts of 3.2 kb and 2.5kb were detected with 5kb *Hind* III fragment containing a part of the *spo5* gene as a probe. The small mRNA(2.5kb) appeared only when a wild-type strain was cultured in the absence of nitrogen source in which condition the large mRNA (3.2kb) was produced constitutively. Appearance of a 2.5kb *spo5*-mRNA depends upon the function of the *mei1*, *mei2* and *mei3* genes.

Key words: sporulation, transcription, expression, Northern analysis, *Schizosaccharomyces pombe*.

서 론

진핵생물인 효모가, 환경요인의 변화에 대응하여 영양증식으로 부터 유성생식의 변환을 일으키는 것은 잘 알려진 사실이다. 유성생식은 접합에 의한 일배체로부터 이배체로의 전환과, 이배체 세포의 포자형에

의한 일배체로의 전환과정으로 부터 형성된다. 효모의 포자형성은 영양세포로 부터, 자낭포자의 형태적, 기능적 변화를 동반하는 세포분화의 과정이며, 분화 기능을 해명하기 위한 뛰어난 모델이라고 생각되어져 있으며, 또한 이 모델은 고초균의 아포형성과 함께 여러 분야에서 연구가 활발하게 진척되어 있다. 효모의

[†] Corresponding author : Dong-Ju Kim

자낭포자 형성 세균의 아포형성과는 서로 다르며, 감수분열을 수반하는 것은 이러한 현상의 중요성을 입증하는 것이다. 감수분열은 유전적 재조합을 증명하는 기구로서, 모든 진핵생물에 있어서 보편적으로 관찰할 수 있는 형태형성 과정이다. 또한, 포자형성의 유무, 포자의 형태, 자낭포자의 수 등은 효모균의 분류에 있어서 중요한 지표인 것이다.

출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*와 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에 있어서는, 유전학적 해석법이 확립되어 있으며, 유전자 조작을 위한 숙주 벡터계가 보편적으로 잘 개발되어져 있다. 그리고, 유성생식의 개시와 진행을 인위적으로 제어할 수 있기 때문에, 포자형성 과정에 있어서 분자기구의 기능에 관하여 용이하게 해명할 수 있다. 분열효모 *S. pombe*는 일배체 세대를 중심으로 하는 생리활성을 갖고 있으며, 영양세포는 통상적으로 일배체로 존재한다¹⁾. Hetero에서는 h^+ 형과 h^- 형으로 명명되어진 2종류의 접합형이 존재하며, 배지중의 영양원인 질소원의 결핍에 의해서, 서로 다른 접합형 (h^+ 형과 h^- 형)의 세포간에서 접합이 일어나 2배체 접합이 형성된다²⁾.

감수분열과 포자형성 결손 변이주에 관한 단리와 유전해석에 관한 연구 보고들에 의하면, 전사레벨에서 유전자 발현의 조절, mRNA processing, 단백질간의 상호작용, protein kinase 와 같은 단백질 인산화에 의한 조절 등의 다양한 기구가 복합적으로 작용하는 것으로 시사되어져 있다³⁻⁶⁾.

*S. pombe*는 최근 재조합 DNA 실험을 위한 숙주 벡터계가 개발되어, 이미 많은 유전자가 cloning 되어져 있다^{7,8)}. 포자형성에 특이적으로 관여하는 유전자(spo)들의 유전해석의 결과에 의하면, 감수분열에 수반되는 염색체의 분배 및 핵의 분리, 이동과 형태변화에 미소기관이 결정적인 역할을 하고 있다고 생각할 수 있다. 특히, 미소관 spindle의 형성은 핵막상의 spindle 극체에 의해서 제어 되어지고 있다고 할 수 있다^{9,10)}.

*S. pombe*의 spo5 변이체에서 감수분열은 외관상 정상적으로 일어나며 4개의 1배체핵이 형성되지만, 포자벽은 전혀 형성되지 않는 특징을 갖고 있었다. 다시 말해서, 명확한 spo5⁻의 표현형을 제시하고 있었다.

본 연구에서는 단리한 spo5 변이체의 생리화학적 구조변화와 유전자 해석에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균 체

본 실험에 사용한 분열효모 *S. pombe*의 유전자형은

Table 1. *Schizosaccharomyces pombe* strains

Stains	Genotype				
CII9-14	h90	spo 5-B2	ade 6-M210	ura 1	leu 1
C332-1B	h90	spo 5-B37	ade 6-M210	leu 1	
KD70	h90	spo 5-B37	ade 6-M216	ura 1	leu 1
L975	h90	wild-type			
CD16-1	h^-/h^-	ade 6-M210/	ade 6-M216	cyh 1/+	+lys 5
Cd16-3	h^-/h^-	ade 6-M210/	ade 6-M216	cyh 1/+	+lys 5

Table 1에 제시하였다. 형질전환에 사용한 대장균 수용균(형질전환) (Hanahan' method)으로서는 HB101를 이용했으며, single-stranded DNA조제(Viera'method)에는, 파지 M13K07과 숙주균 MV1184를 이용하였다.

2. 배 지

1) 대장균용 배지

액체배지로서는, LB 배지 및 2×YT 배지 (Difco Laboratories, Michigan, USA) 를 사용하였다. 약제내성을 조사하기 위하여 ampicillin (40mg/L)과 tetracycline (20mg/L) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)를 배지에 첨가하였다. 고체배지 조성에는, 액체배지에 한천을 1.5% (w/v)가 되도록 첨가한 후에 조제하였다.

2) S. pombe 용 배지

완전배지로서는, 효모 extract (YEA), 합성 최소배지의 경우는 SD 배지를 이용하였다. 포자형성 유도시에는 MEA배지와, 합성포자형성배지 (SSA, SSL)를 이용하였다. Plotoplast 조제에는 MML 배지를 이용하였다¹⁾. 이용한 배지는 필요에 따라서, adenine (75mg/L), uracil (50mg/L), 이외의 아미노산 (50mg/L)을 첨가했다. 고체배지 조성에는, 한천을 2%~2.5% (w/v)가 되도록 첨가한 후에 조제하였다. 배지조성은 Gutz 등¹⁾의 문헌을 참고하였다.

3) Plasmid

대장균과 분열효모의 양세포내에서 증식할 수 있는 shuttle vector pDB248⁸⁾를 이용하였으며 pDB248은 대장균 plasmid pBR322에 출아효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 LEU2 유전자 및 2 μ plasmid의 복제기점을 함유하는 단편으로부터 구축되었다⁷⁾.

4) Gene Library

spo5 유전자는 형질전환을 이용하여 *S. pombe*의

genomic library로 부터 단리하였다. genomic library는 *S. pombe* 야생형 homotalic strain L975의 전 genomic DNA 를 *Hind* III로 한정 분해한 단편을 shuttle vector pDB248'에 연결하여 구축한 것이다⁴⁾.

5) 효소반응

제한효소의 반응은 통상 5~15 units의 효소를 사용했으며, 37°C 에서 1~2 시간동안 반응을 이행하였다. DNA ligase (Takara Shuzo Co, Ltd., Tokyo) 반응은 DNA 시료에 1/10량의 ligase용 염용액을 첨가한 용액 중에서 T4 DNA ligase(Toyobo Co., Ltd., Osaka)를 작용시켜서, DNA를 결합시켰다. 반응은, 4°C 에서 15시간 반응을 이행하였다. Alkaline phosphatase (Toyobo Co., Ltd., Osaka)은 DNA 말단의 탈 인산화를 위하여 대장균 C75유래의 alkaline phosphatase를 사용하였다. 반응은, EDTA를 최종농도10 mM이 되도록 첨가하여 반응을 정지시켰다.

6) 형질전환

대장균 형질전환은 Mandel과 Higa 등¹⁶⁾의 방법을 개량하여 이행하였다. 전 처리한 대장균 배양세포를 수용균으로 하여 200 μ l에 10 μ l의 plasmid DNA용액을 첨가하여, 30분 정도 냉장처리한 후, 42°C에서 열처리하여 배양배지에서 형성된 colony들을 형질전환체로 이용하였다. 분열효모 *S. pombe*의 형질전환은 Beach 등⁶⁾에 의해서 개발된 방법으로 이행하였다.

7) *E. coli*로부터 Plasmid DNA 조제

Birboim와 Doly 등¹¹⁾에 의해서 고안된 SDS-alkaline 용균법에 의해서 plasmid DNA 조제하였으며, 또한 고순도로 plasmid DNA 를 대량으로 조제할 경우에는, Maniatis 등¹²⁾의 방법에 의해서 개발된 CsCl-EtBr 밀도구배 원심법으로 하였다.

8) Agarose Gel 전기영동

전기영동은 submarine형 전기영동장치 (HE13, Tkara Shuzo Co. Ltd., Tokyo)와 agarose gel (agarose gel L03, Takara)를 이용하며 이행하였다. 분리용 gel의 농도는, 0.6~0.8%로 사용하였다. DNA 전기영동은, TBE 완충용액(90mMTris-Borate, pH 8.0, 2.5mM EDTA)을 이용하였으며, DNA 시료에 gel-loading 완충용액 (60% sucrose, 0.02%(w/v) bromophenol blue, 0.02%(w/v) xylene cyanol, 0.025M EDTA)을 1/10량을 첨가하여 영동 gel 상에 loading 하였다. 영동은 정전압 100V에서 40분 동안 이행한 후, 영동 gel을 EtBr 수용액 중에서 염색하여

UV 조사에 의해서 목적하는 DNA 단편을 확인하였다.

9) RNA 조제

전 RNA의 조제는 Jennsen 등¹³⁾의 방법에 의해서 이행했다. 동결보존한 배양세포를 완충용액에 의해서 전 처리한 시료를 2배량의 phenol/chloroform과 혼합하여, 0°C에서 3분간 파쇄한 후 초고속원심분리 (25,000 rpm, 10min)에 의해서 전 RNA를 회수하였다. poly(A)⁺ RNA는 Maniatis 등¹²⁾의 방법에 의해서, oligo dT cellulose-affinity column (Phrmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)을 이용하였다. 전 RNA 표품은 65°C에서 2분간 가열하여 변성시킨 후, SDS/LiCl을 각각 최종농도 0.3%, 0.4M이 되도록 첨가하여 30ml의 고염농도 완충용액 (10mM EDTA, 0.3% SDS, 0.4M LiCl)으로 poly(A)⁻ RNA를 용출하였다. 그리고, 저염농도 완충용액 (10mM Tris-HCl/pH7.2)으로 poly(A)⁻ RNA를 용출하여 정제하였다.

10) Northern Hybridization

Poly(A)⁺ RNA를 포르말린 (6.5%)과 포름알데히드 (50%) 존재하의 55°C에서 약 15분간 변성시킨 후 6.7%의 포르말린을 함유한 1%의 agarose gel 전기영동에 의해서 RNA를 전기적으로 분리하였다. 영동 후 분리한 gel로부터 RNA를 나일론 membrane-filter에 전이시켰다. 이 membrane-filter (Amersham Corp., Amersham, England)를 80°C에서 2~4시간 열처리하여 RNA 를 고정시킨 후 hybridization에 이용하였다. 방사성 probe는 plasmid DNA 또는 적절한 제한효소 단편을 nick translation법 (Amasham kit), 또는 random primer (Takara kit)에 의해서, ³²P-dCTP로 표식하였으며, hybridization은 Thomas¹⁴⁾방법에 의하여 이행하였다. 50% 포름아미드 존재하에서 방사능 probe와, 42°C에서 1~2일간 보온한 후 hybridization을 이행하였다. Membrane-filter를 실온에서 0.1% SDS를 함유한 2×SSC 용액으로 15분간 5회 처리한 다음, 0.1% SDS/0.2×SSC 용액으로 10분간 2회 세정, 건조시킨 후 autoradiography를 하였다.

결과 및 고찰

1. *spo5* 유전자 cloning

*S. pombe*의 포자형성 결손변이체 *spo5* (Fig. 1) 유전자의 cloning은 본 연구실에서 확립된 방법에 의해서 이행하였다^{4,5)}. 효모, 대장균 shuttle vector pTB248' ⁸⁾의 *Hind* III부위에 *S. pombe* genomic DNA의 *Hind* III

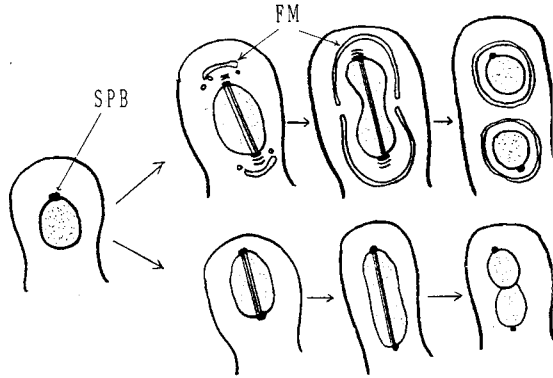


Fig. 1. Comparison of morphological changes of nuclear apparatus in the wild type and the *spo5* mutant during meiosis in the fission yeast *S. pombe*. Abbreviations used are as follows; SPB, spindle pole body; FM, forespore membrane. A, wild type; B, *spo5* mutant.

단편을 연결하여 구축한 genomic library로부터 plasmid DNA를 조제하여, *spo5* 변이체 C119-1A (h 90 *spo5*-B2 *ade* 6-M210 *ura* 1 *leu* 1) (Table 1)에 형질전환에 의해서 도입하였다. 벡터 plasmid pTB248'에는 선택 마커로서 *Leu* 2 유전자가 삽입되어 있으며, 이 *Leu* 2 유전자는 *S. pombe*의 *leu* 1 변이를 상보한다. 여기서, 형질전환 처리한 세포를 먼저 leucine이 첨가되지 않은 합성포자형성배지에 접종하여 *Leu*⁺형질전환체를 선택하였다. 수용균의 *spo5* 변이가 상보된 세포는 이 선택배지상에서 포자를 형성하게 된다. 여기서 leucine 비감수성인 형질전환체를 30% EtOH로 처리하여, 영양세포를 치사시킨 후, 생존세포를 포자형성배지에 접종하였다. 그리고 형성된 콜로니를 Iodine 염색법에 의하여, 포자가 형성된 콜로니만을 screening 하였다.

그리고 *Leu*⁺/*Spo*⁺ 형질전환체에 관해서 표현형이 복귀돌연변이에 의한 것인가, 또는 이 도입된 plasmid에 의한 것인가를 결정하기 위하여, plasmid 결실실험을 이행하였다. 벡터로 사용한 pTB248' plasmid는 효모 세포 중에서는 불안정하고 비선택배지인 leucine을 함유한 최소배지, 또는 완전배지상에서 큰 빈도로 세포로부터 상실되었다. *Leu*⁺/*Spo*⁺ 형질전환체를 완전배지에서 충분히 증식시킨 후, leucine 요구성과 포자형성 능력을 조사한 결과, 이들 양 형질은 동시에 고빈도로 상실하고 있었다. 이러한 결과는, *spo5* 변이를 상보하는 DNA가 plasmid상에 clone화 된 것을 입증하는 것이다.

취득한 *Spo*⁺형질전환체로부터 염색체 DNA를 추출하여, 제한효소 *Hind* III로 처리하여 pTB248' plasmid의

Hind III부위에 연결하여 대장균 HB101에 형질전환

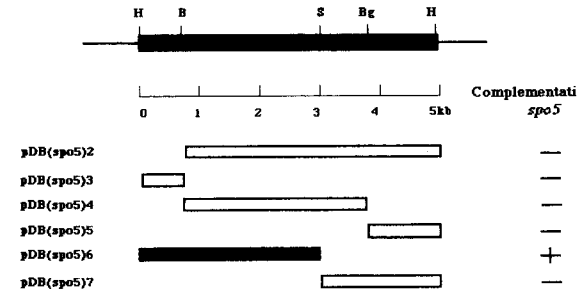


Fig. 2. Restriction endonuclease cleavage map of the cloned 5 kb DNA fragment containing the *spo5* gene. The thick bar indicates the chromosomal DNA from *S. pombe* L975, and circular line indicated the plasmid pDB248'. Abbreviations used are as follows; H, *Hind* III; B, *Bam* HI; Bg, *Bgl* II; X, *Xho* I; EV, *Eco* RV; Ha, *Hap* I; E, *Eco* RI; S, *Sma* I; k, *Kpn* I.

후, ampicillin 약제 내성균으로부터 재조합 plasmid DNA를 회수하였다.

Hind III로 소화하여 전기영동으로 조사한 결과, pTB248'의 *Hind* III 부위에 약 5kb의 DNA 단편이 삽입되어 있는 것을 확인하였다. 이 재조합 plasmid를 pDB(*spo5*)1으로 명명하여 각종의 제한효소를 이용하여, 약 5kb의 삽입 DNA 단편에 관하여 제한효소 지도를 작성하였다. 그 결과, 이 DNA 단편상에는 *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Eco* RV, *Xho* I, *Sma* I, *Hpa* I, *Kpn* I 부위가 존재하고 있었다 (Fig. 2).

2. pDB(*spo* 5)1 subcloning

pTB248'의 *Hind* III 부위에 약 5kb의 DNA 단편을 삽입하여 구축한 pDB(*spo5*)1의 제한효소 지도를 중심으로, 이 plasmid의 *Hind* III부위에 연결한 5kb의 DNA 단편을 동일한 *Hind* III부위에서 역방향으로 연결한 pDB(*spo5*)R1 를 구축하여, *spo5* 변이체에 도입한 결과, pDB(*spo5*)1과 동일한 변이체를 상보하고 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 5kb의 *Hind* III 단편상에 *spo5* 변이를 상보시키는데 필요한 모든 영역이 포함되어 있는 것을 확인하였다. 그리고 *spo5* 변이의 상보에 필수영역을 한정하기 위하여 subcloning을 이행하였다(Fig. 3). 삽입 단편상의 단일 제한효소 부위인 *Bam* HI 부위를 이용하여 pDB(*spo5*)1을 *Bam* HI 로 소화한 후에 T4 ligase로 처리하여, *Bam* HI 단편을 결실시킨 plasmid를 구축하였다 [pDB(*spo5*)2]. 그리고 동일한 방법으로 *Hind* III, *Sma* I 부위를 결실시킨 plasmid

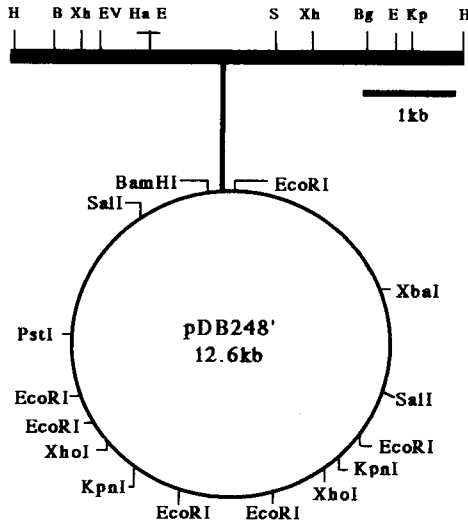


Fig. 3. Subcloning of the 5kb *Hind III* fragment in plasmid pDB(*spo5*)1 containing the *spo5* gene. Six kinds of deletion derivatives were constructed by digestion of the inserted DNA in pDB (*spo5*)1. The DNA fragments were recovered by electroelution from agarose gels, ligated onto the vector plasmid pDB 248'. Complementation of the *spo5* mutation in the different subclones in pDB 248' is shown on the right of the figure. +, complementation; -, no complementation. Restriction enzymes used are: H, *Hind III*; B, *Bam HI*; Bg, *Bgl II*; S, *Sma I*. The line and open bars indicated the vector plasmid pDB248' and chromosomal DNA, respectively.

하여 pTB248'의 *Bam HI*부위에 연결하여 recombinant -plasmid 를 구축하였다 [pDB(*spo5*) 4].

Subcloning에 의해서 취득된 각각의 재조합 plasmid DNA를 *S. pombe*의 *spo5* 변이주 C332-1B와 KD70 (Table 1)에 형질전환으로 도입하여 얻어진 형질전환체의 포자형성능력을 위상차 현미경으로 조사하였다 (Fig. 3). Fig. 3의 결과로부터 *spo5* 변이를 상보시키는데 필요한 영역은 *Hind III*부터 *Sma I* 까지의 약 3kb가 필수적인 영역으로 확인되었다.

3. Northern Hybridization

Cloning 한 *spo5* 유전자 영역으로부터 전사되는 mRNA를 동정하기 위해 Fig. 3의 DNA 단편을 probe로 하여 Northern hybridization을 이행하였다. RNA는 homotalic wild-type strainL975 (Table 1)를 SSL-N포자형성배지에서 7시간 배양한 세포로부터 조제한 poly (A)⁻ RNA를 이용하였다. 사용한 probe 종류 및 그 결

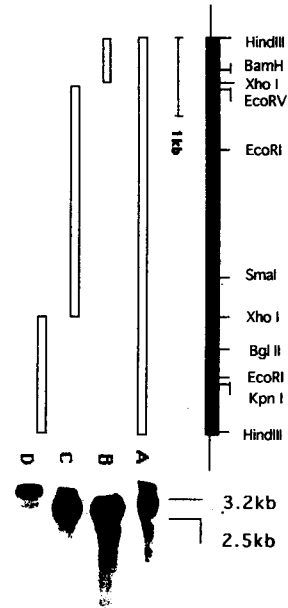


Fig. 4. Mapping of the *spo5* mRNA by Northern blot analysis. Poly (A)⁺ RNA was prepared from a wild type strain L975 H90 cultured in SSL-N for 7hr. Each fragment was subcloned on plasmid pUC119/118, and used for probe. Cloned plasmids were labelled with ³²P-dCTP by a random priming method. Each fragment, carried in the recombinant plasmid pUC119 or118, designated as A~D, respectively. The designated subclones as probe were; A, pUC (*spo5*)1; B, pUC (*spo5*)2; C, pUC (*spo5*)3; D, pUC (*spo5*)4.

과의 autoradiography는 Fig. 4에 제시하였다. *Hind III*의 5kb단편 (probe A)과 probe C 사이에서는 3.2kb와 2.5 kb의 2개의 전사산물이 검출되었으며, probe B 에서는 2.5kb 와 probe D에서는 3.2kb 에서만 전사산물이 검출되었다. 이러한 결과는, 2.5kb의 전사산물은 우측의 *Xho I* 부위의 좌측영역으로 전사되어지며, 3.2kb의 전사산물은 그 우측영역으로부터 전사되어지는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로부터 *spo5* 변이를 상보하는 *Hind III/Sma I* 영역과 2.5kb의 mRNA 전사산물이 일치한다는 것을 확인하였으며, 또한 2.5kb의 mRNA 는 subcloning에 의해서 필수영역이라고 생각했던 것처럼 *Bam HI* 부위의 probe 와 hybridize 하는 결과로부터 이 2.5kb의 전사산물이 *spo5* 유전자의 mRNA임을 증명하였다 (Fig. 4).

4. *spo5* 유전자 전사방향 결정

*Hind III/Bam HI*의 약 0.7kb영역을 pUC118/119에 삽

입하여 구축한 recombinant plasmid로부터 유전자의 전사방향을 결정하기 위하여 ^{32}P 로 표식한 단일가닥 DNA를 조제하여 2.5kb의 mRNA와 hybridization을 검토하였다. 그 결과 *Hind* III에서 *Bam* HI 방향으로 신장시킨 ^{32}P 로 표식된 DNA만이 hybridize 하였다. 이 결과로부터 2.5kb의 mRNA의 전사방향은 *Bam* HI에서 *Hind* III로 전사되어지는 것을 입증하였다 (Fig. 4).

5. spo5 유전자의 전사조건

분열효모의 *in vitro*에 있어서, 포자형성은 배지상의 질소원의 고갈 및 접합형 유전자와의 heterozygote를 필요로 한다. 지금까지 clone화 되어진 spo 6 유전자의 전사레벨에서 생각해 보면, 전사 과정에 있어서 2가지의 조건을 필요로 한다는 것이 명백하게 밝혀져 있다¹⁵⁾. 여기서, spo5 유전자가 전사에 필요한 조건을 Northern hybridization 법에 의해서 조사하였다. 먼저, 접합형 유전자 mat 1에 관해서 hetero접합체인 균주 CD16-1(Table 1)를 최소배지에서 24시간 배양한 균체를 집균하여 합성포자 형성배지에 접종한 다음, 26°C에서 7시간 배양하여, 이들 균체로부터 poly(A)⁺ RNA를 조제하였다. 그리고 recombinant plasmid pDB (spo5) 2를 nick translation 법에 의해서 ^{32}P 로 표식하여 probe DNA로 사용하였다. 이 결과 probe DNA와 hybridization하는 밴드가 3.2kb와 2.5kb에서 검출되었으며 (Fig. 4), spo5 유전자를 함유하는 3kb 영역으로부터 적어도 2종류의 mRNA가 전사되어지고 있다는 것을 확인할 수가 있었다. 또한 3.2kb의 전사산물은 영양세포와 포자형성세포 사이에서는 존재하는데 반하여, 2.5kb의 전사산물은 포자형성 세포에서만 검출되었다 (Fig. 4).

요 약

분열효모 *S. pombe*의 포자형성은 배지상의 질소원 고갈에 의해 유도되어지며 감수분열로부터 포자형성에 도달하는 과정에는 다수의 특이적인 유전자들이 관여하고 있다.

본 실험에서는 *S. pombe* genomic library 형질 전환법으로 spo5 유전자를 상보하는 clone을 screening한 후, spo5 유전자를 단리하였다⁸⁾. 전포자막 구축에 필수적인 spo5 유전자를 보유하는 약 5kb의 DNA 단편을 대장균, 효모 shuttle vector pTB248'의 *Hind* III 부위에 subcloning 하였다. 그리고 이 DNA 단편으로부터 제한효소 지도를 작성하여 (Fig. 2), spo5 변이체의 상보능력을 조사하였다 (Fig. 3). 결과에서 서술한 바와 같

이 상보능력은 동일하였으며, 이러한 상보성 실험 결과로부터 삽입된 단편상의 유전자 발현은 벡터의 promoter로부터 전사가 일어나는 것이 아니라, 삽입 단편상의 효모 고유의 promoter에 의해서 전사가 일어나는 것으로 확인되었다. 따라서 clone화 한 DNA 단편 배열상에는 번역영역뿐만 아니라 promoter 영역이 포함된 것으로 판단되었다.

결실변이 도입 해석으로부터, spo5 유전자는 *Sma* I로부터 *Hind* III의 3kb 영역에 존재하였고 (Fig. 3), Northern 분석에 의해서 spo5 유전자의 전사를 조사한 결과, spo5 -mRNA는 *Sma* I로부터 *Hind* III의 3kb 영역에서 약 2.5kb 크기로 검출되었다. 이 단편의 유전해석으로부터 약 2.5kb의 전사산물은 최대 800개의 아미노산 잔기를 code하는 단백질로 판단되었다 (Fig. 4).

그리고, Northern 분석법에 의해서 spo5 유전자의 전사를 조사한 결과, 서술한 바와 같이, 이 유전자는 질소기아 조건하에서 만 유전자가 발현되는 것을 확인하였다 (Fig. 4-2.5kb 단편). 그 결과, 최소배지의 hetro matting-type 균주 (CD16-1) (Table 1)로부터 조제한 mRNA와 probe-DNA가 hybridize하는 전사산물은 spo5 유전자 coding 영역에서 3.2kb와 2.5kb의 mRNA가 검출되었다 (Fig. 4). 그리고 homo matting-type (CD16-3) (Table 1) 균주를 질소원이 함유되지 않은 포자형성 배지에서 배양한 후, 동일한 방법으로 mRNA를 조제하여 Northern hybridization으로 조사하였다. 그 결과, 이들 세포에서는 3.2kb에서 만 전사산물이 검출되었으며, 2.5kb의 mRNA는 검출되지 않았다 (Fig. 4).

이상의 결과로부터 spo5 유전자를 coding하는 전사산물인 2.5kb의 mRNA는 질소원이 고갈된 상태하에서, 접합형 유전자와의 hetro 접합성을 요구하는 것으로 입증되었고, spo5 유전자의 전사발현은 질소원이 결핍과 접합형 유전자와의 구성에 따른 환경요인과 유전적요인에 의해서 제어되어지고 있다는 것을 입증하였다.

참고문헌

- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Loprieno, N. : *Schizosaccharomyces pombe*. Handbook of genetic. Plenum Press, New York, pp 395~446(1974).
- Iino, Y. and Yamamoto, M. : Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2447~2451(1985).
- Breach, C., Muller, G. and Egel, R. : Genes invalved in meiosis and sporulaion of a yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **102**, 301~306(1986).

4. Shimoda, C. and Uehira, M. : Cloning of the *Schizosaccharomyces mei3* gene essential for the initiation of meiosis. *Mol. Gen. Genet.*, **201**, 353~356(1985).
5. McLeod, M., Stein, M. and Beach, D. :The product of the *mei3+* gene, expressed under contro ofthe mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *EMBO J.*, **6**, 729~736(1988).
6. McLeod, M. and Beach, D. : Homology between the *ran1* + gene of fission yeast and protein kinase. *EMBL J.*, **5**, 3665~3671(1986).
7. Beach, D. and Nurse, P. : High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **290**, 140~142(1981).
8. Beach, D., Piper, M. and Nurse, P. : Construction of *Schizosaccharomyces pombe* gene bank in a yeast bacterial shuttle vector and its use to isolate genes by complementation. *Mol. Gen. Genet.*, **182**, 326~329(1982).
9. Hirata, A. and Tanaka, K. : Nuclear behaviour during conjugation and meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **28**, 263~274 (1982).
10. Tanaka, K. and Hirata, A. : Ascospore developmen in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*. *J. Cell Sci.*, **56**, 263~279(1982).
11. Birnboim, H. C. and Doly, J. : A rapide alkali extraction procedure for sceening recombinant plasmide DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513~1523(1979).
12. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Moleclar cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989).
13. Jenesen, R., Sprague Jr, G. F. and Herskowitz, I. : Regulation of yeast mating-type interconversion: Feedback control of HO gene expression by the mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3035~3039(1983).
14. Tomas, P. S. : Hybridizationof denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5201~5205(1980).
15. Kishda, M. and Shimoda, C. : Genetic mapping of eleven spo genes essential for ascospore formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, **10**, 443~447(1986).
16. Mandel, M. and Higa, A. : Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 154~162(1970).

(2002년 2월 28일 접수)