

## 분열형 효모에서의 *mas2* 유전자의 세포 내 기능

신상민 · 차재영 · 하세은 · 심선미 · 김형도 · 이정섭<sup>1</sup> · 박종균\*

원광대학교 생명과학부, 기초자연과학연구소, <sup>1</sup>조선대학교 BK21 단백질활성제어 인력양성 사업팀

Received November 21, 2008 / Accepted January 20, 2009

**Intracellular Functions of the *mas2* Gene in the Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*** Sang Min Sin, Jae Young Cha, Ha Se Eun, Sun Mi Sim, Hyoung Do Kim, Jung Sup Lee<sup>1</sup> and Jong Kun Park\*. *Faculty of Biological Science and Research Institute for Basic Science, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea, <sup>1</sup>Department of Biological Science Research Center for Proteineous Materials, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea* - The regulation of gene expression plays an important role in cell cycle controls. In this study, a novel *mas2* (mitosis associated protein) gene, a homolog of human SMARCAD1 was isolated and characterized from a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) using gene-specific polymerase chain reaction. The isolated gene contained a complete open reading frame capable of encoding 922 amino acid residues with a typical promoter, as judged by nucleotide sequence analysis. It was also found that an SNF2 domain is located, which is involved in the chromosome remodeling. The quantitative analysis of the *mas2* transcript against *adh1* showed that the expression level of *mas2* is high before septum formation in *S. pombe*. When *mas2* null mutant cells were grown at 27 and 35°C, the cytokinesis of *mas2* null mutant was greatly delayed and a large number of multi-septate and mis-segregated cells were produced. In addition, the number of multi-septate cells significantly increased. When cells were cultured in YES rich medium to increase proliferation, the abnormal phenotypes *mas2* null mutant dramatically increased. These phenotypes could be rescued by an over-expression of the *mas2* gene. The Mas2 protein localized in the nuclei of *S. pombe*, as evidenced by Mas2-EGFP signals. These results suggest that the *mas2* is homologous to human SMARCAD1 gene and involved in septum formation and chromosome remodeling control.

**Key words** : *Schizosaccharomyces pombe*, Mas2-EGFP, *mas2*, SMARCAD1

### 서 론

Helicase 그룹에 속하는 단백질들은 DNA 혹은 RNA와 상호작용하는 단백질 그룹들을 포함하고 있다. 이들은 대개 핵산 대사, 즉 DNA 복제, 전사, 돌연변이를 일으킨 염기의 회복과 절제 같은 DNA 회복과정에서 필수적인 일을 담당하고 있다[22,35]. 또한, 이 단백질들은 특별한 생화학적 활성이나 helicase 그룹들 간의 서열 상동성에 의해서 여러 helicase 가족으로 분류되어 왔다.

유사분열 시 세포가 분열하여 나뉘지는 동안, 새롭게 합성된 딸 염색분체는 완전하게 복제된 후에 응축이 일어나고, 각 딸세포에 복제된 핵이 동등하게 분리되어야 한다. 또한, 전사의 활성화와 억제, 염색체 구조의 응축이나 풀림에 따라 때때로 수행되고, 이런 변화는 DNA 결합 단백질의 접근을 쉽게 만든다. 이런 구조적 변화는 염색체의 국지적 결실 혹은 뉴클레오솜의 재구성을 일으키고, 커다란 다단백질 구조를 갖는 염색체 재구성 복합체의 형성을 유도하게 된다[13,37]. 이러한 세포분열 과정은 진핵세포인 효모부터 인간에 이르기까지 세

포분열 과정뿐만 아니라 단백질의 구조와 기능면에서 높은 빈도의 상동성을 갖고 보존되어 왔다.

세포주기 조절에 관한 고등 진핵생물의 기초적인 과정을 연구하기 위한 중요한 모델로 분열형 효모인 *Schizosaccharomyces pombe*가 많이 연구되고 있다[25]. 첫 번째 재구성 복합체는 이들 분열형 효모의 SWI/SNF 단위체에서 처음 동정되었다. 이 단위체는 염색체의 억제를 해제하기 위해서 필요하고 유도성 유전자를 활성화시키는 과정에서도 필요한 것으로 알려져 있다[7,28]. 많은 연구실에서 효모의 SWI/SNF 복합체의 활성화에 관한 기사를 연구하고 있으며 이들 기능 중에서 가장 두드러지게 나타나는 부분은 DNA 뿐만 아니라 뉴클레오솜에 강한 친화력을 갖고 결합하며, DNA 나선의 작은 홈에 결합할 것으로 추측된다는 점이다. SWI/SNF는 또한 전사인자의 접근성과 뉴클레오솜 DNA에 제한효소 접근성을 높여주는 역할을 담당하며, 단일 뉴클레오솜의 DNase I 활성화 후 히스톤과 DNA의 밀착성을 파괴해 주는 역할을 수행한다[4,28]. SWI/SNF는 뉴클레오솜이 없는 구역을 만드는데 관여하는 *cis*와 *trans*에서 히스톤들의 움직임을 촉매하는 것으로도 알려져 있다. 게다가 효모의 SWI/SNF 복합체는 부분적인 DNA 뒤틀림 변화를 촉진시키고 접근성이 용이한 뉴클레오솜을 만드는 것으로 보고되었다. 이 그룹의 구성원들은 DNA 회복(RAD5, RAD16, RAD54, 그리고 ERCC6), 전사 조절(Brahma, ATRX,

#### \*Corresponding author

Tel : +82-63-850-6200, Fax : +82-63-843-2781

E-mail : jkpark@wonkwang.ac.kr

and SNF2), 그리고 세포 증식을 조절(MOT1, STH1, ISWI, BRG, and BRM)하는 유전자들을 포함하고 있다[2,10,14,17,20, 24]. 추가적으로 SNF2와 상동성을 갖는 DDM1이 식물에서 동정되었는데, 이것은 복제 동안 메틸화를 시켜주는 복합체를 염색체에 쉽게 도달할 수 있도록 해주는 것으로 알려져 있다.

SNF2 기능은 전사조절, 다양한 형태의 DNA 회복, 세포 주기 조절, 그리고 유사분열 시 염색체 분리 등의 과정에 참여한다고 알려져 있다. 이들의 공통적인 특성은 단백질-DNA 복합체를 떼어내기 위한 ATP 가수분해에 이용된다고 추측되어 왔다. SWI2/SNF2 단백질 그룹은 효모에서 커다란 다중결합 복합체의 한 부분을 차지하고 염색체 구조를 재구성함으로써 전사를 조절하는 중요한 역할을 한다는 것이 발견되었다[2,3,26,32]. SWI2/SNF2 그룹은 CHD-1, ERCC6, 그리고 사람과 쥐의 상동성을 갖는 RAD54등이 포함 된다. CHD-1은 helicase 도메인뿐만 아니라, chromodomain과 DNA-결합 구역까지 가지고 있는 것으로 보고되었다[9,18]. ERCC6는 전사된 DNA 가닥의 손상을 회복하기 위해 필요하며, ERCC6의 돌연변이는 자외선에 초민감성을 보이고, 성장 지연, 신경의 퇴화를 보이는 코카인 증후군(Cockayne's syndrome)의 원인이 된다[29]. DEAD/GH/H 박스는 바이러스, 효모 그리고 고등동물의 helicase 그룹의 단백질에서 보존되어 있다. SNF2 helicase들은 7개의 독특하고 높게 보존되어 있는 모티프들을 갖고 있다. 이들 7개의 보존된 모티프들 각각의 기능은 아직 다 밝혀지지 않았지만, 이들 그룹의 모든 것들은 NTP를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있고, 전사 활성화의 기능을 보여준다. Helicase 그룹들 중 DEAD/GH/H 박스를 갖는 것들은 전사 조절, 재조합, 그리고 DNA 회복의 기능을 갖는다.

본 연구는 SNF2 가족으로 DEAD/GH/H 박스를 갖고, helicase로 추측되는 유전자인 *mas2*<sup>+</sup> (mitosis associated protein)를 *S. pombe*로부터 분리하여, 각 모티프를 확인하고, 유전자 파괴를 이용한 유전자 결손과 과발현을 통해 세포의 변화를 확인하고 *mas2*<sup>+</sup> 유전자가 세포 내에서 어떠한 기능을 담당하는지와 여러 가지 helicase 기능 중 어떤 기능을 담당하는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

상동성을 보이는 유전자 분석

NCBI의 blast와 Sanger Centre의 *Schizosaccharomyces pombe*의 genome project data를 이용하여 가능성 있는 유전자를 선별하였다.

균주 및 유전자 운반체

균주로는 *Schizosaccharomyces pombe* diploid인 SP286과 *cdt25-22* 돌연변이주인 Q356를 사용하였으며, genomic DNA는 Sanger centre에서 보내준 *S. pombe* genomic DNA clone,

SPAC25A8을 이용하였다. Plasmid vector로는 pGEM-T와 pREP1 vector를 사용하였다. 세포 내 위치를 확인하기 위해서 pEG3/SPAC25A8.01c genomic DNA-EGFP가 클로닝되어 있는 TB40을 사용하였다. 클로닝한 plasmid를 증폭하기 위하여 형질전환에 사용된 *Escherichia coli* 균주로는 JM109를 사용하였다(Table 1).

배지

*S. pombe*를 배양하기 위해 완전배지인 YES (yeast extract with supplements), YPD (yeast extract - peptone - dextrose)와 최소배지로 EMM (Edinburgh minimal medium)배지를 사용하였다. 대장균 균주의 배양과 cDNA 유전자 추출에 사용된 배지에는 LB (luria-bertani)배지를 사용하였다. 형질 전환체 선발에 사용된 배지는 MacConkey agar plate에 항생제 ampicillin (50 µg/ml)을 넣은 고체배지를 사용하였다.

프라이머

유전자 분리를 위한 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)에는 gene-specific PCR을 수행하였고, sub-cloning에 사용하기 위해서 *Nde I*, *BamH I*과 같은 제한효소 자리를 첨가하여 프라이머를 작성하고 knock-out을 알아보기 위해선 제한효소 자리가 없는 프라이머를 사용하였다. Loading control로 *adh1*<sup>+</sup> 프라이머를 사용하였다. 모든 프라이머는 바이오닉스(Bionics)사에 의뢰하여 제작하였다(Table. 2).

세포 배양과 일반적인 기술

세포와 돌연변이체는 26와 35°C에서 YES와 EMM을 사용하고 배양하였다. 세포주기에 따른 격막 형성 시기를 알아보기 위하여 *cdt25-22* 돌연변이주를 사용하였고, 25°C에서 배양

Table 1. Strains used in this study

<i>S. pombe</i>	
SP286	<i>h<sup>+</sup>/h<sup>+</sup> leu1-32/leu1-32 ade6-210/ade6-216 ura4-D18/ura4-D18</i>
Q356	<i>h<sup>+</sup> cdt25-22</i>
<i>E. Coli</i>	
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F'[traS36 proAB+ lacI lacZΔM15]</i>

Table 2. Primer sequence information

Name	Sequence
Forward- <i>Nde I</i>	5'-CATATGATTTCGCTTGGATACATTG-3'
Reverse- <i>BamH I</i>	5'-CGGGATCCCTAATCATCGTCATCTTCAGC-3'
Forward-KO detect	5'-GGCATTATTTAGCATCAG-3'
Reverse-KO detect	5'-GAATAGATGCAAAAAGAT-3'
Forward- <i>adh1</i> <sup>+</sup>	5'-TCTGCCACACCGATTTACACG-3'
Reverse- <i>adh1</i> <sup>+</sup>	5'-TGTAGTAAGGCTTGACGAGAC-3'

후 36°C에서 4시간 세포주기를 정지 시킨 후 다시 25°C로 옮겨서 세포들을 모으고 혈구계산기를 이용하여 격막 형성 시기를 알아보았다. pREP1 vector에 클로닝된 *mas2<sup>+</sup>* 유전자를 과발현시키기 위하여, 세포들을 thiamine이 5 mg/ml (*nmt1<sup>+</sup>* 프로모터 '켜짐')이 첨가된 EMM 배지에서 성장시켰다. 세포는 thiamine이 없는 EMM 액체 배지로 3회 씻어 낸 후, 같은 온도로 thiamine이 없는 EMM (*nmt1<sup>+</sup>* promoter '켜짐') 배지에서 15시간 동안 성장시켰다. 액체 배지에서 성장시킨 세포는 0.1% formaldehyde/sodium chloride 용액을 이용하여 고정시켰다 [15,19,23].

#### *S. pombe*로부터 동일화 배양 준비

*cdt25-22* 돌연변이주인 Q356 세포는 25°C에서 YPD안에서 중간 대수기까지 16시간 동안 성장하였다. 그리고 원심분리기에 의해 모은 후 새로운 배지에 접종하고 다시 16시간 동안 세포들이  $1 \times 10^6$  cell/ml이 될 때까지 배양하였다. 세포주기 과정을 멈추게 하기 위해 36°C에서 4시간 동안 진탕 없이 배양하였다. 다시 25°C로 옮겨서 진탕 배양을 하면서 20분 단위로 세포들을 모았다.

#### DNA 및 RNA 준비

*S. pombe*의 전체 RNA 추출방법으로, 효모를 YES배지에 OD값이 0.7-1.0 정도인 대수기까지 배양하였다. 세포를 원심분리기를 이용해 모은 후 50 mM Na/acetate (pH 5.3), 10 mM EDTA ('AE 버퍼')를 첨가한 후 Phenol/chloroform mixture (1:1)를 세포 현탁액에 직접 첨가하였다. 혼합물을 65°C에서 4분간 배양한 후 실온까지 온도가 내려갈 때까지 얼음 속에서 급속히 식혔다. 혼합물을 원심분리 후 상층액은 새로운 튜브에 옮기고 absolute ethanol과 1/10배의 3 M Na·acetate (pH 5.3) 넣고 RNA를 침전시켰다. 70% 에탄올로 씻은 후 에어 드라이를 시키고 RNA 덩어리를 DEPC 처리한 물로 녹여주었다.

#### 세포 염색

YES 액체배지에서 배양한 세포들을 37% formaldehyde로 고정하였다. 고정된 세포를 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨리고 DAPI (1 mg/ml)를 섞어주었다. 각각의 샘플들은 형광현미경 (Zeiss)을 이용하여 사진을 찍었다.

#### 알킬화제 처리 또는 자외선 조사에 따른 세포생존을 분석

정상 세포와 *mas2<sup>-</sup>* gene knock-out 세포를 MMS (0.0001, 0.001, 0.01  $\mu$ l/ml)가 첨가된 YES 배지에 12시간 또는 36시간 후까지 배양하여 형성된 콜로니의 개수를 세어서 측정하였다. 자외선 조사를 위해서는 세포들을 0-200 J/m<sup>2</sup>의 자외선을 조사하여 12시간 또는 36시간 후까지 배양한 후 형성된 콜로니의 개수를 세어서 분석하였다.

#### Knock-out을 위한 중합효소 연쇄 반응

Knock-out을 위한 실험에서는 *S. pombe* genomic DNA clone SPAC25A8을 추출하여 주형으로 30 ng 정도를 사용하였고 knock-out을 확인하기 위해서는 knock-out된 세포와 정상세포로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern blot 분석을 통하여 확인하였다. PCR을 위하여 0.5 uM primer, 0.2 mM dNTP, Taq polymerase (TaKaRa)를 모두 포함하는 25  $\mu$ l PCR 혼합물을 이용하여 이루어졌다.

## 결 과

#### 인간 SMARCAD1 유전자와 상동성을 갖는 분열형 효모의 *mas2* 유전자의 분리

인간의 SMARCAD1 유전자와 상동성을 갖는 분열형 효모의 유전자는 인간의 유전자를 기초로 분열형 효모의 database를 통하여 상동성을 가진 유전자를 검색함으로써 확인되었다. 확인된 분열형 효모의 *mas2<sup>+</sup>* 유전자와 인간의 SMARCAD1 유전자는 83%가 같고, 27%가 유사했다. 또한, 쥐가 가지고 있는 *smarcad1/Etl-1* 유전자와도 인간과 유사한 상동성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 마찬가지로 출아형 효모인 *S. cerevisiae*의 FUN30과의 상동성도 거의 일치하는 것을 확인하였다. 이로 인해 *mas2<sup>+</sup>* 유전자는 진화적으로 잘 보존되어 있다는 것을 알 수 있었다.

*mas2<sup>+</sup>* ORF의 전체 길이인 2,769 bp의 서열은 Sanger centre에서 기증받은 *S. pombe* SPAC25A8가 클로닝 되어있는 cosmid로부터 gene specific-PCR에 의하여 증폭하였다. Gene specific-PCR 결과 약 2.7 kb 위치에서 밴드를 확인하였다. 정상세포에서 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 genomic DNA와 같은 크기의 밴드를 확인하였다(Fig. 1A). 또한, 생물정보학을 이용한 인트론과 엑손의 분석에서도 인트

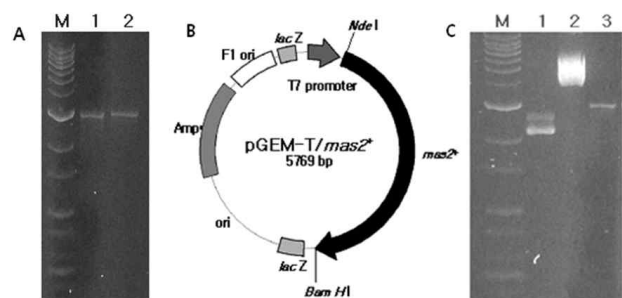


Fig. 1. A. Electrophoresis of gene-specific PCR (1), RT-PCR product (2) and 1 kb marker (M). B. Diagram of the pGEM-T vector recombined with *mas2<sup>+</sup>* DNA. PCR product 2769bp was eluted and ligated with T-vector. The resulting recombinant plasmid was designated as pGEM-T/*mas2<sup>+</sup>*. C. Electrophoresis of *mas2<sup>+</sup>* PCR product (3) using pGEM-T/*mas2<sup>+</sup>* (2) as a template. (M, 1 kb marker; 1, pGEM-T vector)

론이 발견되지 않았다. 이들 결과를 토대로 *mas2<sup>+</sup>* 유전자는 인트론을 포함하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이 증폭된 유전자를 pGEM-T 벡터에 클로닝 하기 위해 PCR을 수행하였고, PCR 산물을 젤에서 회수하여 pGEM-T 벡터와 섞어서 결합을 시켰다(Fig. 1B). 클로닝된 pGEM-T/*mas2<sup>+</sup>*는 pGEM-T 벡터와 *mas2<sup>+</sup>* PCR product를 통해서 일차적으로 확인하였다(Fig. 1C). 더욱 정확한 결과를 위해 sequencing을 의뢰하여 pGEM-T 벡터에 *mas2<sup>+</sup>* 유전자가 클로닝 되어 있는 것을 확인하였다.

세포주기에 따른 *mas2<sup>+</sup>* 유전자의 발현

*mas2<sup>+</sup>*의 발현양은 *cdc25-22* 돌연변이주인 Q356 세포를 이용하여 세포 내에서 일정한 양으로 발현되는 *adh1<sup>+</sup>* 유전자와의 발현양과 northern blot 분석으로 비교하여 측정하였다. Q356 세포의 G2-M기 경계에서 세포주기를 일시적으로 멈추게 하기 위해서 배양 후 20분 간격으로 모아, 백분율로 격막 형성율을 구하였다(Fig. 2A). Loading control로 사용한 *adh1<sup>+</sup>*

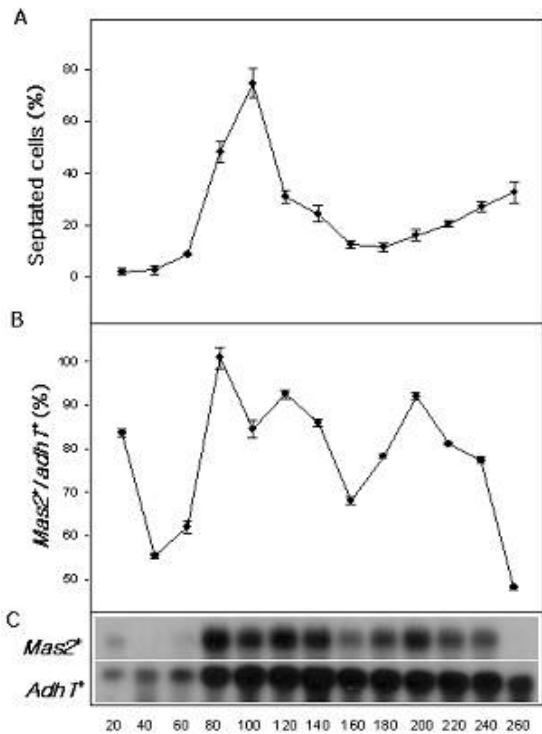


Fig. 2. *mas2<sup>+</sup>* mRNA level is maximal before the percentage of septated cells is maximal. Septation index (A) and mRNA levels of *mas2<sup>+</sup>* (B) during mitosis in *S. pombe cdc25-22* mutant cells cultured at 25°C were synchronized by transient temperature shift to 36°C for 4 hr and then shifted back to 25°C for various time periods. Quantification of *mas2<sup>+</sup>* transcript against *adh1<sup>+</sup>* (B) from the autoradiogram of northern blot (C) is shown. Each data represents the mean±S.D. of least three independent experiments.

를 기준으로 *mas2<sup>+</sup>*의 발현 양을 정량하였다. 격막 형성과 비교했을 때, *mas2<sup>+</sup>* mRNA 수준은 G2기에 가장 낮았고, M기 전에 높았다. 특히 격막 형성율이 최고일 때, 그 전 단계에서 *mas2<sup>+</sup>* mRNA수준은 가장 높았다(Fig. 2B and 2C). *mas2<sup>+</sup>* 유전자가 M기 전에 가장 높다는 것은 Mas2 단백질이 염색체 분리에 관여하여 각 극으로 염색체가 정확히 이동할 수 있도록 도와주는 SNF2 기능의 한 가지를 수행할 것이라고 추측할 수 있으며, 다른 여러 인자들, 특히 세포주기에 관계하는 *act* 같은 여러 인자들과 상호 작용을 통하여, 핵분열에 관여할 것이라고 예상할 수 있었다. 그 외의 기능은 먼저 격막 형성에 관여하는 *clr4*, *ppbl*, *stf1*, *mid1*과 같은 인자들과도 관여하여, 양극으로 핵이 이동하고 정확한 위치에 격막이 형성될 수 있도록 도와주는 보조인자의 역할을 수행할 것이라고 생각하였다. 그리고, 핵 분열이 끝나고 세포분열이 일어나기 위하여 염색체 풀림과 응축 같은 염색체 재구성이 일어나야만 한다. SNF2 그룹으로 *mas2<sup>+</sup>*는 이때 다양한 일을 할 것으로 생각된다. 이러한 가설은 *mas2<sup>+</sup>*의 발현율을 비교하여 보았을 때, M기 전에 가장 높았다가, 유사분열이 최고치에 다다랐을 때는 발현양이 줄어들고, 그 후 M기가 지난 후에 다시 상승하는 결과를 보고 예측할 수 있었다.

*mas2<sup>+</sup>* 유전자의 파괴

*mas2<sup>+</sup>* 유전자의 기능을 알아보기 위해서 유전자 파괴 방법을 사용하였다. 유전자가 파괴되는 자리는 *mas2<sup>+</sup>*의 ORF 자리이고, *kanMX6* 유전자를 갖고 있는 plasmid DNA를 형질전환시키면, 상동재조합에 의해 이배체 염색체의 *mas2<sup>+</sup>* 자리로 들어가고, *mas2<sup>+</sup>*는 제거되었다(Fig. 3). Southern blot 분석 결과 *mas2<sup>+</sup>* 유전자를 갖는 정상세포에서는 6.6 kb의 크기를 갖고 있었고, *mas2<sup>+</sup>* 유전자가 파괴된 세포에서는 5.24 kb의 크기를 갖고 있었다. 이로 인해, *mas2<sup>+</sup>* 유전자가 파괴되었다는 것을 확인하였다(Fig. 4).

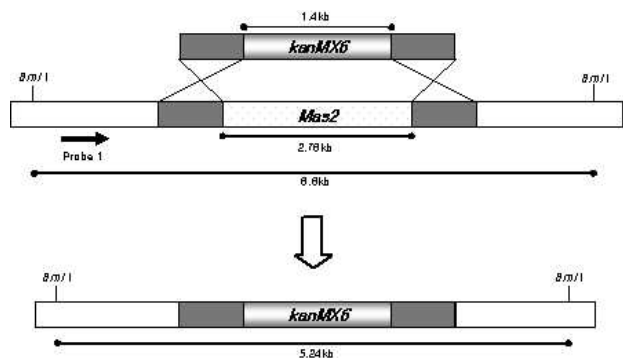


Fig. 3. Gene disruption of *mas2<sup>+</sup>* gene using *kanMX6*. (A) The diagram of *mas1<sup>+</sup>* gene (the coding region indicated by the shaded arrow) disrupted by PCR based gene targeting method using *S. pombe kanMX6* gene. Chromosomal DNA cleaved with *smI* was hybridized with probe 1.

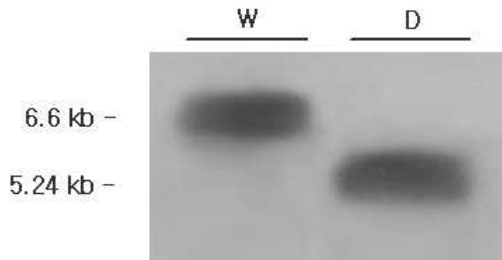


Fig. 4. Southern blot analysis of the disrupted *mas2*<sup>Δ</sup> gene. Chromosomal DNA cleaved with *smI* was hybridized with probe 1 as described in Fig. 1A. W: wild type; D: disruption diploid.

*mas2*<sup>Δ</sup> 유전자가 존재하지 않는 돌연변이의 표현형

*mas2*<sup>Δ</sup> 유전자가 파괴된 완전돌연변이 세포를 YES 배지에서 각각 26, 32 그리고 35°C에서 배양시킨 세포들을 시간 별로 살펴보았을 때, 26와 35°C에서 배양시킨 세포들은 시간이 지남에 따라 정상과 다른 형태의 세포들이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이들 형태는 정상과 다르게 세포들이 다중 격막을 형성하거나 격막의 생성위치가 세포의 중앙이 아닌 다른 위치나 두꺼운 형태의 격막들이 나타났다. 또한, 정상세포들에 비해서 세포의 길이가 길어지는 현상과 분지형 세포, 단편조각들로 떨어지는 현상도 관찰하였다. 특히 35°C에서 이런 현상이 두드러지게 나타났다(data not shown).

다중 격막이나 격막이 두껍게 생기는 현상을 관찰했기 때문에, DAPI 염색법에 의해 핵을 관찰하였다. DAPI 염색으로 핵을 관찰했을 때, *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이 세포에서 많은 문제가 발생되고 있다는 것을 알 수 있었다. *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이의 핵은 먼저 핵분열이 일어나지 않아 한쪽으로만 핵이 이동한 후 격막이 형성된 세포들을 관찰할 수 있었다. 그리고 핵분열은 일어났지만, 동등하게 일어나지 않고 양쪽 핵의 양이 다르게 분리된 현상도 보였다. 또 어떤 것들은 'cut' (cell untimely torn) 표현형이라고 해서, 핵분열이 일어나기 전에 격막이 형성되는 것으로서 격막이 핵을 자르는 현상도 관찰되었다. 그 외에 염색체가 응축되지 않고 풀려있는 상태나 재 복제를 해서 DNA양이 기본보다 더 많은 양을 갖고 있는 세포들도 확인되었다(data not shown). Calcofluor 염색을 통해서 *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이 세포들이 시간 경과에 따른 다중격막 형성율을 측정 한 결과 정상세포보다 *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이 세포들에서 다중격막 형성율이 훨씬 높은 것이 확인되었다. 특히 35°C에 선 격막 형성율이 다른 온도보다 현저히 높다는 것이 확인되었다(Fig. 5B).

이 결과들로 인해 *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이는 세포분열 과정을 지연시킬 뿐만 아니라, 핵분열 시 필수적이지는 않지만, 중요한 역할을 수행한다는 것을 확인할 수 있었다. 우선 *mas2*<sup>Δ</sup>는 핵분열에 관여한다고 생각된다. 다양한 염색체의 돌연변이 현상은 이런 생각들을 뒷받침 해준다. *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이는 이

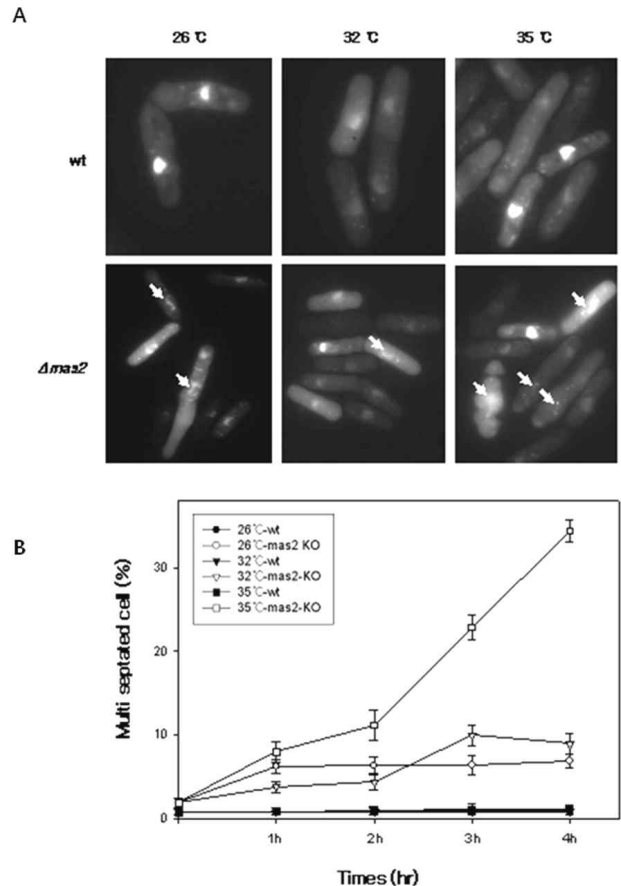


Fig. 5. Formation of multi-septate cells grown at various temperatures. WT and  $\Delta mas2$  cells were grown at 26, 32 and 35°C for various time periods in the YES medium. Each data represents the mean±S.D. of at least six dependent experiments.

뿐만 아니라 앞서 예측했듯이 세포분열 후 염색체 재구성에 문제가 발생했다는 것 또한 알 수 있었다. 세포 분열이나 격막이 형성되었으나, 두 개의 딸세포 중 한쪽 세포에서만 염색체의 응축이 일어나고 다른 한쪽은 풀려 있는 현상들을 발견할 수 있었고, 한쪽 딸세포에서만 핵이 재분열하는 현상도 관찰하였다. 이런 현상들이 보여주는 결과로 미루어보아 염색체의 분열의 결함이나 염색체의 재구성의 결함은 격막 형성을 방해하며, 격막 형성위치의 결함이나 또한 두꺼운 형태의 격막, 분지형 세포와 같이 정상과 다른 형태로 격막이 형성되어 결과적으로 정상과 다른 세포분열을 일으키는 결과를 낳게 되었을 것이다. *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이와 대조적으로 정상세포에선 분지형 세포나 세포분열의 지연, 핵 분열시 이상 등이 정상온도뿐만 아니라 제한온도인 26와 35°C에서 발견되지 않았다. 또한, *mas2*<sup>Δ</sup> 완전돌연변이가 26와 35°C에서 특히 정상과 다른 표현형이 많이 발견되었다. 이것은 세포가 제한온도라는 상황에 부딪혔을 때, *mas2*<sup>Δ</sup> 유전자가 발현되어 제한온도 이하에서 겪는 여러 가지 스트레스에 대항하는 기능을 수행하거나 다른

유전자와 함께 상호작용하여 기능을 수행할 것이라고 예상할 수 있었다. 결론적으로 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이의 표현형이나 여러 염색법을 이용한 세포 관찰 실험들을 통해 *mas2<sup>+</sup>* 유전자가 M기 전 단계부터 G1기에 이르기 까지 염색체 재구성과 격막 형성, 세포분열에 깊은 연관이 있다는 것을 알 수 있었다.

**알킬화제와 자외선을 통한 생존율 측정**

*mas2<sup>+</sup>* 유전자가 DNA 상해에 대한 회복에 관여하는지 알아보기 위하여 알킬화제와 자외선을 처리한 후 생존율을 분석하였다. 측정 결과, *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이 세포의 생존율이 더 낮을 것이라는 기대와는 달리 정상세포와 생존율에서 큰 차이를 보이지 않았다. 이것은 *mas2* 단백질이 DNA 상해원인 MMS나 UV에 의한 상해를 회복시키는 인자로 사용되지 않는다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

***mas2<sup>+</sup>* 유전자를 과발현 시킨 세포의 표현형**

*mas2<sup>+</sup>* 유전자를 과발현 시키기 위해 *nmt1* 프로모터[32]를 사용하였다. *nmt1* 프로모터는 thiamine이 존재하면 (+T) 불활성화되고, 존재하지 않으면 (-T) 활성화된다. 제한효소 *Nde*I과 *Bam*HI을 이용하여 pGEM-T/*mas2<sup>+</sup>* 벡터에서 *mas2<sup>+</sup>*의 개시코돈과 종결코돈을 포함하여 절단하고, 절단한 단편을 plasmid pREP1 벡터와 섞어 ligase를 이용하여 접합시켜 클로닝을 하였다(Fig. 7A). 클로닝된 pREP1/*mas2<sup>+</sup>* 벡터는 pREP1 벡터와 *mas2<sup>+</sup>* PCR product를 통하여 전기영동으로

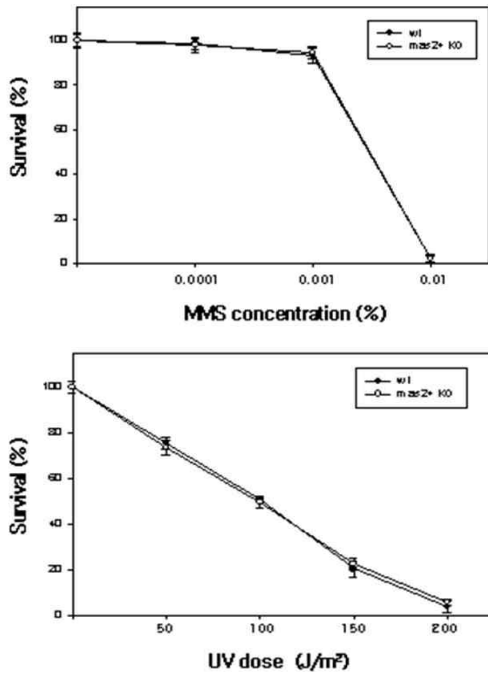


Fig. 6. Survival of wt or *mas2<sup>+</sup>*-disrupted mutant (*mas2<sup>+</sup>* KO) following exposure to various concentrations of MMS or to various doses of UV.

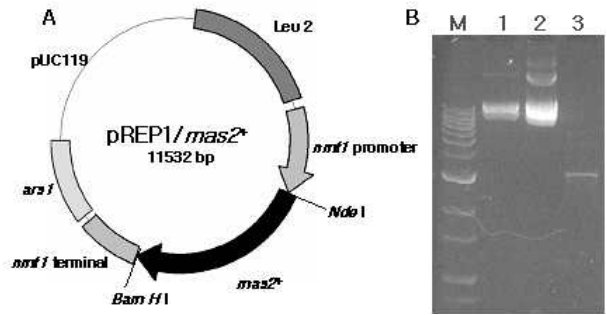


Fig. 7. (A) Diagram of the pREP1 vector recombined with *mas2<sup>+</sup>* DNA. pGEM-T/*mas2<sup>+</sup>* vector was restricted with *Nde*I and *Bam*HI and ligated with pREP1 vector. The resulting recombinant plasmid was designated as pREP1/*mas2<sup>+</sup>*. (B) Electrophoresis of *mas2<sup>+</sup>* PCR product (3) using pREP1/*mas2<sup>+</sup>* (2) as a template. (M, 1 kb maker; 1, pREP1 vector)

확인하였다(Fig. 7B). pREP1/*mas2<sup>+</sup>* 벡터를 정상세포 (wt/*mas2<sup>+</sup>*)와 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이( $\Delta$ *mas2<sup>+</sup>*/*mas2<sup>+</sup>*)에 형질전환시키고, 형질전환체를 thiamine이 들어있는 배지에서 leucine을 이용하여 선별하였다.

Northern blot 분석법에 의해 정상세포와 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이에서 pREP1/*mas2<sup>+</sup>* 벡터에서 과발현된 *mas2<sup>+</sup>*의 전사체 수준을 확인하였다. 형질전환시킨 세포들의 *mas2<sup>+</sup>* 전사체 수준은 pREP1 vector만 형질 전환시킨 대조군과 비교했을 때, 1.5배에서 2배 정도 더 많이 발현된 것을 알 수 있었다(Fig. 8). 과발현 시 세포의 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 *mas2<sup>+</sup>* 유전자의 발현을 유도해 Mas2을 증가시켰다. 정상세포와 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이 세포들의 표현형을 현미경상으로 확인했을 때, 정상세포에서 -T일 경우에 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이와 같은 다중격막 현상이나 분지형 세포들의 현상들이 발견되

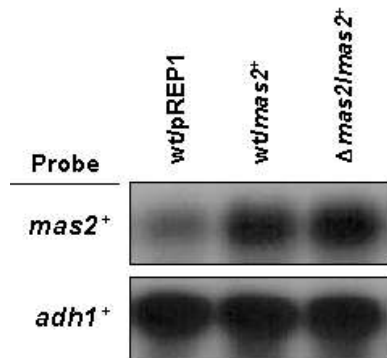


Fig. 8. Northern blot analysis of overexpression of *mas2<sup>+</sup>* in fission yeast. pREP1 is vector only transformed to wild type cells. *mas2<sup>+</sup>* over is pREP1-*mas2* transformed to wild type cells. Mas2 is pREP1-*mas2* transformed to *mas2<sup>+</sup>* disrupted cells. The blot was hybridized consecutively with *mas2<sup>+</sup>* and *adh1<sup>+</sup>* probes, the latter as a loading control.

었다. 이와 반대로 *mas2<sup>Δ</sup>* 완전돌연변이 세포들은 대다수가 정상세포와 같은 형태로 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 9A). *mas2<sup>Δ</sup>* 유전자의 과발현이 정상세포를 *mas2<sup>Δ</sup>* 완전돌연변이와 같은 표현형으로 바꿨다면, 핵의 모습도 *mas2<sup>Δ</sup>* 완전돌연변이와 같을 것이라고 예상하고 DAPI 염색법에 의해서 핵이 어떻게 변화하는지를 확인하였다. *mas2<sup>Δ</sup>* 완전돌연변이 표현형에서 보았을 때와 마찬가지로, 정상세포에 *mas2<sup>Δ</sup>* 유전자를 과발현 시킨 세포에서는 핵분열 실패, 염색체 미응축, 'cut' 현상 등이 *mas2<sup>Δ</sup>* 완전돌연변이와 같은 현상으로 발견되었다. *mas2<sup>Δ</sup>* 완전돌연변이에 과발현 시킨 세포는 세포의 대부분이 정상세포와 같은 현상으로, 핵분열의 문제점이나 격막형성의 문제점 등을 많이 회복하였다(Fig. 9B).

이 실험 결과로 *mas2<sup>Δ</sup>* 유전자는 염색체분리나 복제등과 같은 염색체 재구성에 중요한 역할을 담당하며, 격막형성 시에도 영향을 미친다는 것을 다시 한번 알 수 있었다. 또한 정상세포의 과발현을 통해 Mas2p은 없을 때도 큰 문제를 일으키지만 그 양이 너무 많을 때도 없을 때와 같은 문제를 일으킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 즉 세포내에선 Mas2p의 수준은 적절히 유지되어야 하며, 일정한 양만으로도 염색체의 정확

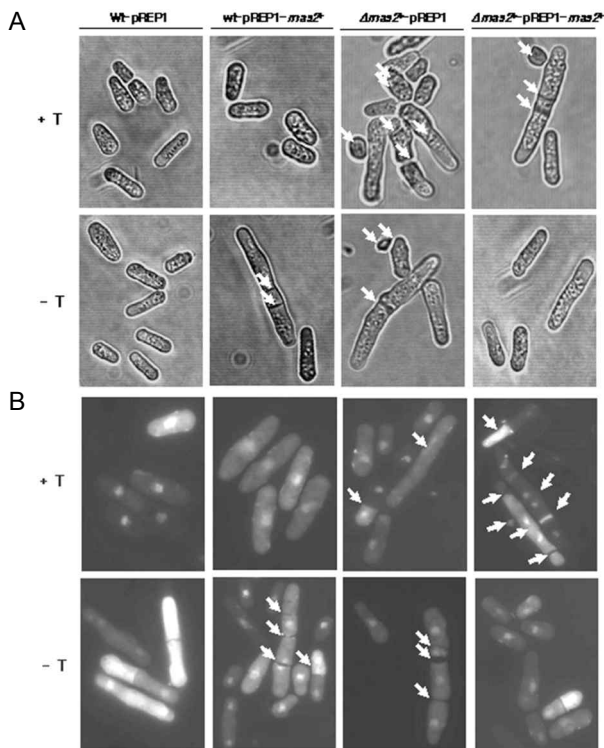


Fig. 9. (A) Morphology of *mas2<sup>Δ</sup>* null mutant transformed with pREP1-*mas2<sup>Δ</sup>* cells were cultured in the presence (+T) or absence (-T) of thiamine to repress or induce *mas2<sup>Δ</sup>* gene, respectively. (B) Morphology of *mas2* null mutant transformed with pREP1-*mas2<sup>Δ</sup>* cells were cultured in the presence (+T) or absence (-T) of thiamine to repress or induce *mas2* gene and were stained by DAPI.

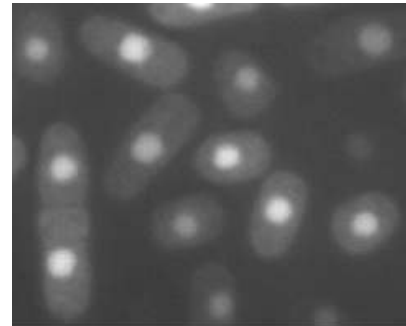


Fig. 10. Localization of Mas2p in the nucleus of *S. pombe*. Wild type (*h<sup>+</sup>*) cells were transformed with the plasmid TB40, whose expression of the Mas2p-GFP fusion protein is induced in the thiamine-free medium, and examined under a fluorescent microscope.

성, 재구성을 유지시켜주는 역할을 수행한다는 것을 알 수 있었다.

#### *S. pombe* 에서 Mas2 단백질의 세포 내 위치

*S. pombe*의 Mas2p이 세포 내에서 위치하는 곳을 알기 위해서, 정상세포인 *h<sup>+</sup>* 세포에 plasmid pEG3-*mas2*-EGFP (TB40) [14]를 사용하였고, 이것은 SpMas2p-GFP 융합단백질로 thiamine이 없는 상태에서 강력하게 발현되었다.

Mas2p는 NLS 서열인 KKRKR을 갖고 있기 때문에 핵 내에서 위치할 것이라고 예상하였다. 실험 결과 Mas2p-EGFP는 *S. pombe*의 핵 내에서 위치하는 것을 확인하였다(Fig. 10). DNA binding 도메인 등을 갖고 있는 helicase로 추측되는 *mas2<sup>Δ</sup>*는 핵 내에서 염색체 재구성과 유전정보의 유지에 관한 여러 일을 수행한다는 것을 확인하였다.

#### 고 찰

본 연구는 *S. pombe*의 helicase로 추측되는 많은 유전자 중 아직 연구가 되지 않은 유전자들 중에서 인간의 SMARCAD1과 쥐의 *smarcad1/Etl-1*과 가장 상동성이 높은 유전자인 *mas2<sup>Δ</sup>* (SPAC25A8.01c)를 추출하여 연구를 수행하였다. 많은 유전적 질환이 helicase 기능의 결함과 연관되어 있다는 사실은 놀랄만한 일이 아니다. 여태까지 cockayne syndrome B, xeroderma pigmentosum group B, 그리고 trichothiodystrophy는 DEAD/H 박스를 포함하는 단백질을 암호화하는 유전자의 결함에서 기인한다고 알려져 왔다. 또한, XNP/ATR-X 유전자는 helicase를 암호화하고 a-thalassemia에 연관된 mental retardation syndrome을 포함하고 있다. Bloom and Werner syndrome도 helicase들과 연관이 되어있다[4,12,16,29,33,34].

*S. pombe*의 *mas2<sup>Δ</sup>*와 높은 상동성을 갖는 인간의 SMARCAD1은 7개의 높게 보존된 서열을 갖고, 이 서열들이

helicase의 SNF2 그룹 안에 존재한다. 이들 DEAD/H 박스와 ATP-결합 모터프뿐만 아니라, hHel1은 NLS로 추측되는 서열과 몇몇 단백질-단백질 상호작용을 매개하는 구역을 갖고 있다. 유전자 발현 양을 분석해보면 hHel1 전사체는 여러 곳에서 나타나고, 독특하게도 내분비계 조직에서 높은 수준으로 나타난다. hHel1은 사람 염색체의 4q22-q23에 위치하며, 이 구역은 몇몇 사람의 질병인 leiomyosarcoma, hepatocellular carcinoma 과hematologic malignancies등을 포함하는 유전자의 휴지점과 결실 돌연변이가 많이 존재하는 곳으로 인간의 hHel1은 유전적으로 불안정한 발달에 중요한 역할을 하고 있다. 마찬가지로 상동성을 갖는 쥐의 Etl-1 유전자는 급속하게 성장을 촉진하는 SNF2/SWI2 그룹에 속하는 핵 내 단백질이다. 이 그룹의 구성체들은 helicase와 핵산 의존적 ATPases와 연관이 되어 있고, 전사의 조절, 염색체의 안정성 유지, 그리고 다양한 DNA 회복과 같은 세포 내 기작을 수행하기 위해 필수적인 기능을 담당 한다. Etl-1 단백질은 2세포기 전에 발현을 시작해서, 전체적인 배 발생 과정을 통해 흥선, 상피세포, 그리고 신경계에서 특히 높은 수준으로, 다양한 형태로 발현되고 대개 성체에서 조직에서 많이 발현된다고 알려져 있다. Etl-1은 세포의 생존이나 배 발생단계에서 필수적이진 않지만 돌연변이 쥐에선 발달이 늦고, 출산 전후에 치사율이 높았고, 수정 능력의 감소, 그리고 흉골이나 척수에 여러 가지 결함이 발견되었다[30].

*mas2<sup>+</sup>* 유전자는 SNF2 도메인과 DEAD/H/GH 박스를 갖고 있고, helicase C-말단이 존재한다. 유전자 파괴를 이용하여 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이를 만들었고, southern blot 분석을 통하여 유전자 파괴를 확인하였다. *mas2<sup>+</sup>* 유전자는 M기와 G<sub>1</sub>초기에 주로 발현을 하고, 염색체의 재구성과 격막 위치를 잡아주는 역할을 하는 것으로 관찰하였다. *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이를 DAPI 염색과 calcoflour 염색을 이용해서 관찰 하였을 때, 그 기능을 더욱 명확히 알 수 있었다. *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이 세포는 제한 온도나 정상 온도에서 배양하였을 때, 시간이 지남에 따라 다중 격막이 형성되는 것으로 확인 되었고, 다양하게 정상과 다른 표현형을 갖는 세포들이 나타났다. 그 세포들의 핵의 모습을 관찰했을 때, 염색체는 정확성을 잃고, 작은 염색체, 비분리 염색체, 재복제 염색체, 염색체 비응축, 염색체의 쪼개짐, 혹은 격막 형성 시에 염색체가 격막에 의해 잘리는 'cut' 현상도 발견되었다. 이와 마찬가지로, Mas2p의 과발현 또한 정상세포를 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이 세포와 같은 양상으로 만들어 버리는 것을 확인하였다. 하지만, *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이 세포에서의 Mas2p의 과발현은 정상세포로 회복시키는 현상 또한 발견하였다. 이로 인해, 세포내의 Mas2p의 양은 어느 정도의 수준으로만 유지가 되어야만 하고, 그 수준을 넘어가면 세포내의 문제가 크게 발생한다는 것을 알 수 있었다. 이런 염색체의 문제로 인해 발생한 다중 격막이나, 정확한 위치를 잡지 못하는 격막 형성은 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이에서 많이 발생하며, 제한 온

도인 35°C에서 더 많이 나타났다. 이것은 *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이 세포들이 정상 온도보다 제한 온도에 더 민감하다는 것을 알 수 있다.

Mas2p이 DNA 상해에 대한 회복 기작에 사용되는 인자인지 알아보기 위해 수행한 실험에선, MMS나 UV에 대해 생존율이 거의 같은 것으로 확인이 되어, Mas2p은 DNA 상해원인 MMS나 UV에 대한 회복 기작에 사용되지 않다는 것을 알 수 있었다. Mas2p은 NLS나 SNF2, DNA-binding 도메인 등을 갖고 있으며, 염색체 재구성에 관한 일을 담당할 것이다. 그렇다면, Mas2p은 핵 내에서 일을 할 것이라는 가설을 증명하기 위해, Mas2p이 세포 내에서 어느 곳에 위치하는지 알아보기 위해서 GFP를 이용하여 Mas2p이 핵 내에 위치한다는 것을 관찰하였다.

*mas2<sup>+</sup>*가 갖고 있는 SNF2 복합체는 세포 생장에 중요한 역할을 담당한다. 특히 사람의 암과 SWI/SNF 복합체는 연관이 되어있고, 종양 억제 단백질 그룹에 속하거나 연관이 되어 있다. 많은 연구실에선 염색체를 재구성하는 이들 복합체에 관한 정밀한 기작을 밝히기 위한 연구를 계속하고 있다. 이들 복합체가 어떻게 특별한 목표 유전자에 사용이 되는지, 그리고 어떻게 함께 일을 하고, 어떤 단백질과 함께 염색체를 재구성하는 일에 참여를 해서 유전자 발현을 억제 혹은 활성화시키는지에 대한 연구 등이 목적이다. 또한 종양억제에서의 염색체 재구성 관련된 연구는 암의 종류의 특성을 밝히거나 암 치료법의 확립으로 많은 환자들을 도울 수 있을 것이다. *mas2<sup>+</sup>* 연구도 이와 같은 맥락으로 인간을 모델로 할 수 없는 경우, 가장 적합한 모델로서 사용되는 *S. pombe*에서 상동성이 높은 유전자를 분리하고, *S. pombe*를 이용하여 연구를 수행하였다. 앞으로 Mas2p과 상호작용하는 다른 단백질들을 알아보고, 이들이 어떻게 염색체를 재구성하는지 기작을 밝히고, 그 밖에, 방추체나 혹은 방추사에 연관되어 일을 하는지도 밝히고자 한다.

## 요 약

유전자 발현의 조절은 세포주기 조절에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 새로운 *mas2<sup>+</sup>* (mitosis associated protein) 유전자는 인간의 SMARCD1과 상동성을 갖고 분열형 효모인 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)에서 gene-specific PCR 방법을 의해서 분리하였다. 분리된 유전자는 SNF2 도메인이 위치해 있고, 이것은 염색체 재구성에 관련되어 있다. *act1<sup>+</sup>*을 이용한 *mas2<sup>+</sup>* 전사체의 발현량 분석은 *mas2<sup>+</sup>*의 발현수준은 *S. pombe*에서 격막 형성 전에 가장 높았다. *mas2<sup>+</sup>* 완전돌연변이의 세포분열은 26와 35°C에서 지연되는 현상이 보였고, 다수의 다중 격막이나 핵분열이 일어나지 않는 세포들을 발견하였다. 세포들을 완전배지인 YES에서 증식을 증가시키기 위해서 배양했을 때, 정상과 다른 형태의 표현형을 가진 *mas2<sup>+</sup>* 완



전돌연변이 세포들이 증가했다. 이런 표현형들은 *mas2<sup>+</sup>* 유전자의 과발현에 의해서 감소하였다. Mas2 단백질은 *S. pombe*의 핵내에 위치하였다. 이런 결과들은 *mas2<sup>+</sup>*가 인간의 SMARCAD1과 상동성을 갖고 있고, 염색체 재구성과 격막 형성 조절에 사용된다는 것을 나타낸다.

### 감사의 글

이 논문은 원광대학교 2006년도 교비 연구 지원에 의해 연구되었음.

### References

- Auble, D. T. and S. M. Steggerda. 1999. Testing for DNA tracking by MOT1, a SNF2/SWI2 protein family member. *Mol. Cell Biol.* **19**, 412-423.
- Auble, D. T., K. E. Hansen, C. G. Mueller, W. S. Lane, J. Thomer and S. Hahn. 1994. Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev.* **8**, 1920-1934.
- Auble, D. T., D. Wang, K. W. Post and S. Hahn. 1997. Molecular analysis of the SNF2/SWI2 protein family member MOT1, an ATP-driven enzyme that dissociates TATA-binding protein from DNA. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4842-4851.
- Burns, L. G. and C. L. Peterson. 1997. The yeast SWI-SNF complex facilitates binding of a transcriptional activator to nucleosomal sites *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4811-4819.
- Cairns, B. R., Y. J. Kim, M. H. Sayre, B. C. Laurent and R. D. Kornberg. 1994. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1950-1954.
- Coin, F., E. Bergmann, A. Tremeau-Bravard and J. M. Egly. 1999. Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *EMBO J.* **18**, 1357-1366.
- Cote, J., J. Quinn, J. L. Workman and C. L. Peterson. 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**, 53-60.
- Ding, D. Q., Y. Tomita, A. Yamamoto, Y. Chikashige, T. Haraguchi and Y. Hiraoka. 2000. Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes Cells* **5**, 169-190.
- Delmas, V., D. G. Stokes and R. P. Perry. 1993. A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2414-2418.
- Deuring, R., L. Fanti, J. A. Armstrong, M. Sarte, O. Papoulas, M. Prestel, G. Daubresse, M. Verardo, S. L. Moseley, M. Berloco, T. Tsukiyama, C. Wu, S. Pimpinelli and J. W. Tamkun. 2000. The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol. Cell* **5**, 355-365.
- Du, J., I. Nasir, B. K. Benton, M. P. Kladdé and B. C. Laurent. 1998. Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Snf/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins. *Genetics* **150**, 987-1005.
- Ellis, N. A. 1997. DNA helicases in inherited human disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 354-363.
- Felsenfeld, G. 1996. Chromatin unfolds. *Cell* **86**, 13-19.
- Fryer, C. J. and T. K. Archer. 1998. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* **393**, 88-91.
- Gutz, H. and F. J. Doe. 1975. On homo- and heterothallism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mycologia* **67**, 748-759.
- Huang, S., B. Li, M. D. Gray, J. Oshima, I. S. Mian and J. Campisi. 1998. The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 39 3 59 exonuclease. *Nat. Genet.* **20**, 114-116.
- Gavin, I. J. H. Peter and L. P. Craig. 2001. SWI/SNF Chromatin Remodeling Requires Changes in DNA Topology. *Mol. Cell.* **7**, 97-104.
- Kanaar, R., C. Troelstra, S. M. Swagemakers, J. Essers, B. Smit, J. H. Franssen, A. Pastink, O. Y. Bezzubova, J. M. Buerstedde, B. Clever, W. D. Heyer and J. H. Hoeijmakers. 1996. Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Curr. Biol.* **6**, 828-838.
- Kohli, J. H. Hottinger, P. Munz, A. Strauss and P. Thuriaux. 1977. Genetic Mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by Mitotic and Meiotic Analysis and Induced Haploidization. *Genetics* **87**, 471-489.
- Kristen, E. N. and L. W. Jerry. 2002. The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1603**, 19-29.
- Laurent, B. C., I. Treich and M. Carlson. 1993. The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* **7**, 583-591.
- Lohman, T. M. and K. P. Bjornson. 1996. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 169-214.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130.
- Muchardt, C. and M. A. Yaniv. 1993. Human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **12**, 4279-4290.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**, 503-508.
- Peterson, C. L. 1996. Multiple switches to turn on chromatin? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 171-175.
- Peterson, C. L., A. Dingwall and M. P. Scott. 1994. Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2905-2908.
- Peterson, C. L. and J. W. Tamkun. 1995. The SWI-SNF com-

- plex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci.* **20**, 143-146.
29. Richmond, E., and C. L. Peterson. 1996. Functional analysis of the DNA-stimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3685-3692.
  30. Schoor, M., S. G. Karin, R. Derry and A. Gossler. 1999. Skeletal dysplasias, growth retardation, reduced postnatal survival, and impaired fertility in mice lacking the SNF2/SWI2 family member ETL1. *Mech. Dev.* **85**, 73-83.
  31. Tom, O. H., R. T. Utley, J. Côté, C. L. Peterson and J. L. Workman. 1996. Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex. *Science* **273**, 513-516.
  32. Utley, R. T., J. Côté, O. H. Tom and J. L. Workman. 1997. SWI/SNF Stimulates the Formation of Disparate Activator-Nucleosome Complexes but Is Partially Redundant with Cooperative Binding. *J. Biol. Chem.* **272**, 12642-12649.
  33. Varga-Weisz, P. D., M. Wilm, E. Bonte, K. Dumas, M. Mann and P. B. Becker. 1997. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* **388**, 598-602.
  34. Villard, L., A. M. Lossi, C. Cardoso, V. Proud, P. Chiaroni, L. Colleaux, C. Schwartz and M. Fontes. 1997. Determination of the genomic structure of the XNP/ATR gene encoding a potential zinc finger helicase. *Genomics* **43**, 149-155.
  35. Weeda, G., E. Eveno, I. Donker, W. Vermeulen, O. Chevallier-Lagente, A. Taieb, A. Stary, J. H. Hoeijmakers, M. Mezzina and A. Sarasin. 1997. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 320-329.
  36. West, S. C. 1996. DNA helicases: New breeds of translocating motors and molecular pumps. *Cell* **86**, 177-180.
  37. Whitehouse, I., A. Flaus, B. R. Cairns, M. F. White, J. L. Workman and O. H. Tom. 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* **400**, 784-787.
  38. Workman, J. L. and R. E. Kingston. 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 545-579.