



분열효모 라머카이네이즈에 의한 DNA 복제 스트레스 반응 조절

이가람 · 김제훈 · 권수정 · 박희문* 

충남대학교 생명시스템과학대학 미생물·분자생명과학과

LAMMER kinase modulates the DNA replicative stress response in fission yeast

Garam Lee, Je-Hoon Kim, Soo Jeong Kwon, and Hee-Moon Park* 

Department of Microbiology & Molecular Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

(Received December 2, 2022; Accepted December 8, 2022)

Involvement of the LAMMER kinase (Lkh1) in replicative stress response of *Schizosaccharomyces pombe* was investigated. The Rad3 (sensor kinase for replication checkpoint) deletion was more sensitive to hydroxyurea (HU) than the LAMMER deletion. However, the Lkh1/Rad3 double deletion and the Rad3 single deletion showed almost the same level of HU sensitivity. The Lkh1 deletion increased the expression of *rad3*⁺ and downstream genes (*cdc18*⁺ and *cdc22*⁺). These results suggested that the Lkh1 modulates the *rad3*⁺ expression negatively. Both of Tup11 and Tup12 were also involved in response to HU and thus in *rad3*⁺ expression, but the Tup proteins in HU response seemed to be activated by unknown factor(s) other than the previously known Lkh1. Here, we presented clues for novel findings indicating the involvement of LAMMER kinase and Tup proteins in the replication stress response by modulating Rad3 activity.

Keywords: fission yeast, LAMMER kinase, Rad3, replicative stress

진핵세포생물에 잘 보존되어 있는 라머카이네이즈(LAMMER kinase)는 Ser/Thr kinase와 자기인산화능의 Tyr kinase 활성을 갖는 이중 특이성 인산화 효소이다(Yun *et al.*, 1994). 지금까지 밝혀진 고등동물의 라머카이네이즈는 precursor mRNA의 splicing을 조절하는 인간의 hClik1,2,3, 효모의 mating factor 발

현을 억제할 수 있는 애기장대의 AFC1 (Bender and Fink, 1994), SR (serine/arginine rich) splicing factor를 조절하는 쥐의 mClik (Colwill *et al.*, 1996), 초파리의 눈 및 배 발생에 관여하는 DOA (Du *et al.*, 1998), 담배의 SR splicing factor 인산화에 관여하는 PK12 (Lopato *et al.*, 1996) 등이 있다. 고등동물에서 발견된 다양한 라머카이네이즈의 기능이 동일하지는 않으나, SR 단백질을 인산화하여 pre-mRNA의 splicing을 조절하는 기능은 유사하며(Nayler *et al.*, 1997), 발달, 분화 및 신호전달에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히, 사람의 라머카이네이즈는 세포분화과정에 영향을 미치기 때문에 돌연변이 발생 시 유방암, 전립선암 등의 발생과 진행에 관여한다(Talmadge *et al.*, 1998).

한편, 효모류 라머카이네이즈는 *Schizosaccharomyces pombe*의 균사형 성장(Kim *et al.*, 2001), 산화적 스트레스 반응(Park *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2007), 세포영양(Kang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2018) 및 세포주기(Yu *et al.*, 2013), *Saccharomyces cerevisiae*의 균사형 성장(Park *et al.*, 2011) 및 온도민감성(Park and Park, 2011), 그리고 *Candida albicans*의 균사형 성장, 스트레스내성 및 병원성에 관련이 있다(Lim *et al.*, 2020). 사상균의 경우에는 *Aspergillus nidulans*의 성장 및 분화(Kang *et al.*, 2013), *Aspergillus fumigatus*의 성장, 분화 및 병원성(Lim *et al.*, 2021), 그리고 식물병원균인 *Ustilago maydis*의 유전체 안정성과 염색체 분리과정에 작용한다(de Sana-Tomas *et al.*, 2015).

세포 내에서 다양한 기능을 수행하는 라머카이네이즈의 하

*For correspondence. E-mail: hmpark@cnu.ac.kr;
Tel.: +82-42-821-6417; Fax: +82-42-822-7367

위 조절자나 기질 등에 대한 연구가 상대적으로 가장 많이 수행된 *S. pombe*의 경우, 라머카이네이즈(Lkh1)가 결핍되면 세포 길이가 야생형에 비해 짧아지는데(Kim *et al.*, 2001) 이는 세포 주기 중 G1기가 짧아져 S기로의 전이가 빨라지기 때문에 나타나는 현상으로, 세포주기를 조절하는 CDK (cyclin-dependent kinase)의 저해자인 Rum1이 Lkh1-의존적 인산화 과정 결손으로 활성화되지 못함에 따라 CDK의 활성이 높아지기 때문이다(Yu *et al.*, 2013). 한편, CDK 활성 증가는, 전사인자 복합체인 MBF (*Mlu* I cell cycle box binding factor)에 의해 조절되는 G1/S기 특이 유전자의 발현이(Fernandez-Sarabia *et al.*, 1993; Connolly and Beach, 1994; Yoshida *et al.*, 2003) 비정상적으로 증가하는 상황을 초래하여, 해당 세포가 복제-스트레스(replication stress)에 이은 유전체 불안정성(genome instability) 상황에 처하게 된다. 이 같은 G1/S기 전사의 규제해제(deregulation)에 의해 야기된 복제-스트레스는 DNA손상을 막는 HDR (homology-directed repair)의 활성화와 정상조건에서는 필수적이지 아니한 유전자의 필수기능 획득(예: MBF 의존적 replication licensing factor인 Cdc18의 저해) 등에 의하여 잘 극복되는 특성이 있다(Caetano *et al.*, 2011). 한편, 세포주기 조절에 관여하는 Rum1과 DNA복제에 관여하는 Cdc18이 분열효모의 DNA복제개시와 연계되어 있으며(Jallepallid and Kelly, 1996), *Ustilago maydis*의 유전체 안정성 유지와(de Sana-Tomas *et al.*, 2015), *Candida albicans*의 DNA 복제-스트레스 유전자 발현(Lim *et al.*, 2020), 그리고 *Magnaporthe oryzae*의 DNA 복제-스트레스 반응(Li *et al.*, 2022)에는 라머카이네이즈가 관여함이 보고된 바 있다.

따라서, 본 연구에서는 Rum1의 활성조절로 세포주기를 조절하는 분열효모의 라머카이네이즈가 DNA 복제-스트레스 반응(replicative stress response)에도 관여할 가능성이 높은 것으로 예상되어, 복제-스트레스를 야기하는 약제인 HU (hydroxyurea)

처리에 대한 라머카이네이즈 결손균주의 민감성, 복제-스트레스 반응 관련 유전자 및 MBF의존성 유전자의 발현 양상 등을 살펴보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 실험에서 사용한 *Schizosaccharomyces pombe* 균주는 Table 1과 같으며, 효모배양을 위한 완전배지로는 YES (0.5% Bacto-yeast extract, 3% glucose, supplement: leucine 250 mg/L, adenine 75 mg/L, uracil 75 mg/L)를 최소배지로는 EMM (0.3% KH phthalate, 0.22% Na₂HPO₄, 0.5% NH₄Cl, 2% glucose, 50X salts stock sol'n 20 ml/L, 10,000X minerals stock sol'n 0.1 ml/L, 1,000X vitamins stock sol'n 1 ml/L)를 사용하였으며 필요에 따라 DNA 복제-스트레스 반응 유도 약제(hydroxyurea, HU)와 산화충격을 야기하는 약제(hydrogen peroxide, H₂O₂)를 배지에 첨가하여 30°C에서 진탕배양 하였다. 최소배지의 경우, 균주의 영양 요구성에 따라 아데닌, 우라실, 류신 등을 첨가하였으며, 고체배지는 2%의 한천을 첨가하여 제조하였다.

DNA 손상 약제 처리 후 성장 및 유전자 발현 양상 확인

DNA 손상 약제인 HU의 처리는 Miyabe *et al.* (2009)의 방법을 수정하여 수행하였다. 즉, 효모를 YES배지에서 30°C로 OD₆₀₀이 0.5가 될 때까지 배양한 후, 각기 다른 농도의 HU가 포함된 YES 평판배지에 10배씩 연속 희석한 배양체를 점 점 종하고 30°C에서 3일간 배양하여 관찰하였다. RNA 추출을 위해서는 YES배지에서 30°C로 OD₆₀₀이 0.3이 될 때까지 배양한 효모 세포를 HU가 첨가된 액체배지에서 4시간 더 배양하였다.

Table 1. *Schizosaccharomyces pombe* strains used in this study

Strains	Genotype	Source (Reference)
D665	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18</i>	Laboratory stock (Kang <i>et al.</i> , 2010)
PHM5L	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18 Δlkh1⁺::leu2</i>	Laboratory stock (Kang <i>et al.</i> , 2010)
ED665R	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18 Δrad3⁺::KanMX</i>	Laboratory stock
PHM5LR	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18 Δlkh1⁺::leu2 Δrad3⁺::junk sequence</i>	Laboratory stock
PHMT11	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18 Δtup11⁺::KanMX</i>	Laboratory stock (Kang <i>et al.</i> , 2010)
ED665T12	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18 Δtup12⁺::KanMX</i>	Laboratory stock
PHMT11T12	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18 Δtup11⁺::KanMX Δtup12⁺::ura4</i>	Laboratory stock (Kang <i>et al.</i> , 2010)
SP107	<i>h⁻ ade6 - M210 leu1 -32 ura4 -D18 Δprk1⁺::ura4</i>	Laboratory stock (Park <i>et al.</i> , 2018)

RNA 추출과 RT-qPCR

RNA 추출은 Invitrogen사에서 제공하는 Trizol 방법을 따르되, 세포파쇄단계를 추가하여 수행하였다. 즉, 효모배양 현탁액을 50 ml 시험관에 넣고 원심분리 한 후 2 ml 시험관에 세포 약 0.2~0.3 g을 옮겨 담고, 0.3 g의 600 µm Glass bead (Sigma)와 0.4 ml의 Trizol (Invitrogen)을 첨가한 뒤 Mini-beadbeater (BioSpec Products)로 20초씩 2번 처리하였다. Trizol 0.6 ml을 넣고 10초 동안 혼합한 뒤 chloroform 0.2 ml을 첨가하여 10초 동안 혼합하였다. 상온에서 10분간 방치한 후, 4°C 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 뒤 0.4 ml의 상등액을 취하였다. 상등액에 0.4 ml의 isopropanol을 첨가하고 섞어준 후, 상온에서 10분 반응하고 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 침전물을 75% 에탄올로 세척하였다. 5분간 상온에서 말린 후 DEPC로 처리한 증류수 40 µl를 첨가하여 60°C에서 10분간 침전물을 녹였다. 추출한 총 RNA는 RNA용 agarose gel (1% agarose, 20 mM MOPS, 8 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 1.85% formaldehyde)에 전기영동하여 rRNA band를 통해 RNA 상태를 확인한 뒤, RT-qPCR을 위한 cDNA 합성에 사용하였다.

추출한 총 RNA를 주형으로 oligo dT와 M-MLV reverse transcriptase (Elpis Biotech)를 사용하여 단일가닥 cDNA를

합성하였다. RT-qPCR은 대조군인 *act1*⁺과 실험군인 *rad3*⁺, *cdc18*⁺, *cdc22*⁺의 cDNA로부터 약 100 bp의 산물을 증폭할 수 있는 primer와, SYBR green 기반의 AccuPower Greenstar 2X Mix (Bioneer) 및 Exicycler™96 (Bioneer)를 이용해 Bioneer사가 제공한 사용법을 따라 수행하였다. RT-qPCR에 사용한 oligonucleotide primer는 Table 2에 제시하였다.

세포 내 활성산소종 검출

야생형과 라머카이네이즈 결손주를 YES 액체배지에서 다소 이른 대수기 중반(OD₆₀₀ = 0.3)까지 배양한 후 H2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 최종 농도 50 µM이 되도록 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다. 이후 과산화수소(10 mM)와 HU (5 mM) 각각 처리한 상태에서 2시간 더 배양하여 세포를 수득하고, PBS (phosphate buffered saline)로 세척하여 형광현미경(Olympus System Microscope Model BX51)으로 균주별 세포 내 활성산소종의 축적 정도를 측정하였다.

결 과

DNA 복제-스트레스가 라머카이네이즈 결손돌연변이에 미치는 영향

G1/S기 전이에 관여하는 유전자 발현을 관장하는 전사인자 복합체인 MBF는 DNA 복제-스트레스 반응 유전자의 발현에도 관여하는 것으로 알려져 있으며(de Bruin *et al.*, 2008; Gomez-Escoda *et al.*, 2011), 라머카이네이즈인 Lkh1은 산화 충격 등의 각종 외부 스트레스 반응에 관여한다(Park *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2007). 따라서, MBF기능 조절에 관여하는 Lkh1이 DNA 복제-스트레스 반응에도 관여할 가능성이 있기 때문에, DNA 복제-스트레스 유발 약제인 HU 처리에 대한 야생형과 Lkh1-결손주의 성장양상 변화를 조사하였다.

일반적으로 세포에 DNA 복제-스트레스를 가하거나, G1기

Table 2. Primers used for quantitative real time PCR

Name	Sequence (5'-3')
act1_RT_F	CCC AAA GCT GAG GGT TGG AA
act1_RT_R	ACC GCC GAA CGT GAA ATT GT
rad3_RT_F	ACC AGC TAA AGA TGC TAA CAG AGC
rad3_RT_R	GTA TAA GTT GCC ATC CGT ACC TCT
qRT_cdc22_F	TTG GCA TGC CGA TGT TAT GG
qRT_cdc22_R	TTG GGG CAG AAG AAG GTC CA
cdc18_RT_F	CTT CAC AAC GTG CTG GAT CA
cdc18_RT_R	GCG ACT CTA GTT CAC ATT GG

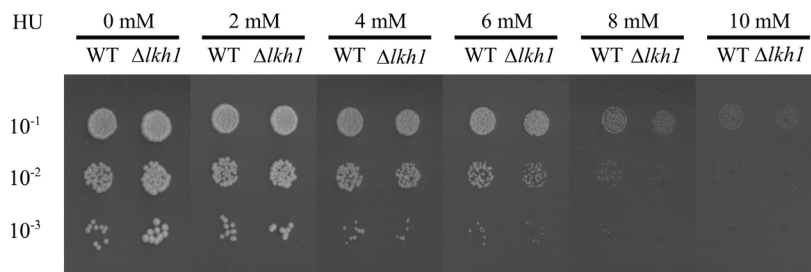


Fig. 1. Growth of *S. pombe* strains on plates supplemented with hydroxyurea. Serially diluted (10-fold) cells were spotted onto the plates contained various concentrations of hydroxyurea (HU) and incubated for 3 days at 30°C. WT (wild type strain), $\Delta lkh1$ (*lkh1* deletion strain).

정지를 유도하기 위하여 10~15 mM의 HU를 4시간 처리하나 (Miyabe *et al.*, 2009), 본 실험에서는 야생형에 비하여 Lkh1-결손주 생장이 선택적으로 저해되는 농도를 결정하기 위하여 0 mM에서 10 mM까지 2 mM 단위로 HU가 첨가된 고체배지에 점 접종하여 성장 양상을 관찰하였다. 그 결과 HU가 6 mM 이상 첨가된 배지에서 Lkh1-결손주의 성장저해가 특징적으로 관찰되었다(Fig. 1).

라머카이네이즈가 복제-스트레스 반응의 sensor kinase (Rad3)에 미치는 영향

DNA 손상을 야기하는 환경에 접한 진핵세포에서 작동하는 대표적인 단백질은 손상야기 자극을 감지하는 인산화효소(sensor kinase)인 ATR이며, 분열효모에서는 Rad3가 그 역할을 한다. 흥미롭게도 Rad3 결손은 미성숙 상태의 G1기 세포가

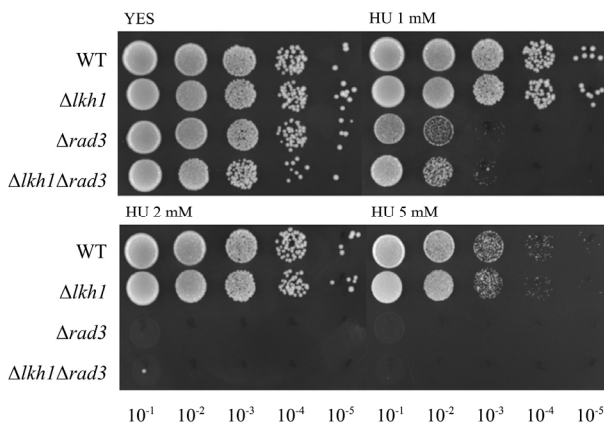


Fig. 2. Sensitivity of *S. pombe* strains to hydroxyurea. Serially diluted (10-fold) cells from mid-exponential phase of wild type, $\Delta lkh1$ (*lkh1* deletion strain), $\Delta rad3$ (*rad3* deletion strain), and $\Delta lkh1\Delta rad3$ (*lkh1* and *rad3* double-deletion strain) were plated onto YES plates supplemented with 0, 1, 2, and 5 mM hydroxyurea, respectively. Plates were incubated at 30°C for 3 days.

S기로 이행되어 DNA 손상-스트레스와 복제-스트레스에 민감하게 만드는 특성이 있음이 보고된 바 있는데(Bøe *et al.*, 2018), Lkh1-결손주 역시 DNA 손상-스트레스 반응을 야기하는 조건의 하나인 산화충격에 민감하고(Park *et al.*, 2003), 복제-스트레스 유발 약제인 HU에 민감성을 나타내므로, DNA 복제-스트레스 반응경로에서 Lkh1과 sensor kinase인 Rad3가 기능적으로 연계되어 있음을 예상할 수 있다. 따라서 야생형, Lkh1-결손주, Rad3-결손주 및 Lkh1/Rad3-이중결손주의 HU 민감성을 조사한 결과, Lkh1-결손주는 야생형보다는 더 민감하였으나 Rad3-결손주보다는 덜 민감하였으며, 흥미롭게도 Lkh1/Rad3-이중결손주의 HU 민감도는 Rad3-결손주와 동일한 수준으로 조사되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 Lkh1가 Rad3의 상위에서 음성조절자로 작용할 가능성을 시사하는 것이다. 한편, 야생형과 Lkh1-결손주에서 *rad3*⁺ 유전자 발현양을 측정 한 결과, HU 처리 조건 하에서 야생형에 비하여 Lkh1 결손주의 *rad3*⁺ 발현양이 현저히 증가하였다(Fig. 3A). 이러한 결과는 HU 처리 등과 같은 DNA 손상 환경에서 Lkh1이 *rad3*⁺ 발현을 음성적으로 조절함으로써 Rad3에 의해 작동되는 DNA 복제 체크포인트(replication checkpoint) 활성이 조절됨을 시사한다.

라머카이네이즈가 복제-스트레스 반응에 작동하는 MBF-의 존성 전사에 미치는 영향

Rad3 하위의 DNA 복제 체크포인트 유전자는 MBF라 불리는 전사인자 복합체에 의해 발현이 조절되므로(Dutta *et al.*, 2008), MBF에 의해 발현이 조절되는 유전자 중 세포주기의 S기 진입과 체크포인트 조절에 관여하는 유전자인 *cdc18*⁺ (Kelly *et al.*, 1993)와 ribonucleotide reductase 유전자인 *cdc22*⁺ (Håkansson *et al.*, 2006)의 발현을 조사하였다. 그 결과, *cdc18*⁺와 *cdc22*⁺의 발현은 HU를 처리하지 않은 상태에서는 야생형

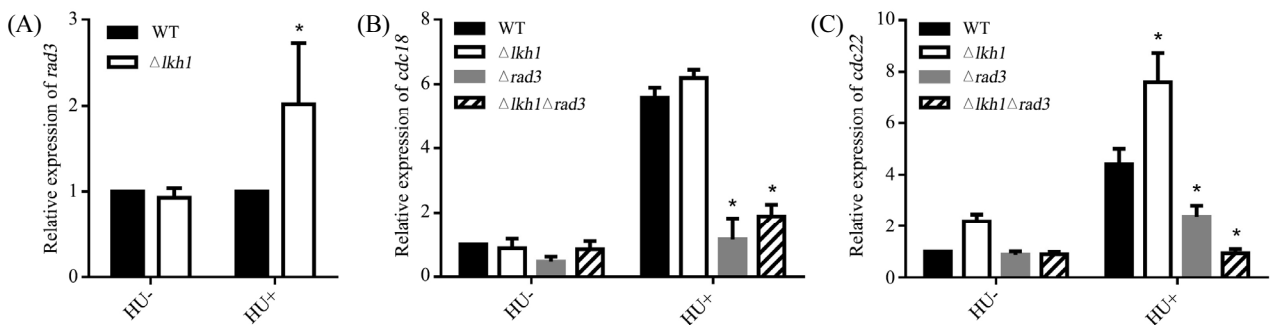


Fig. 3. Effect of hydroxyurea on the MBF-dependent gene expression in *S. pombe* strains. Quantitative real time PCR was performed to analyze the expression of MBF-dependent genes in $\Delta lkh1$ (*lkh1* deletion strain), $\Delta rad3$ (*rad3* deletion strain), and $\Delta lkh1\Delta rad3$ (*lkh1* and *rad3* double-deletion strain) cells with or without hydroxyurea (5 mM, 4 h) treatment. Primers specific to each gene were used. (* $p < 0.05$)

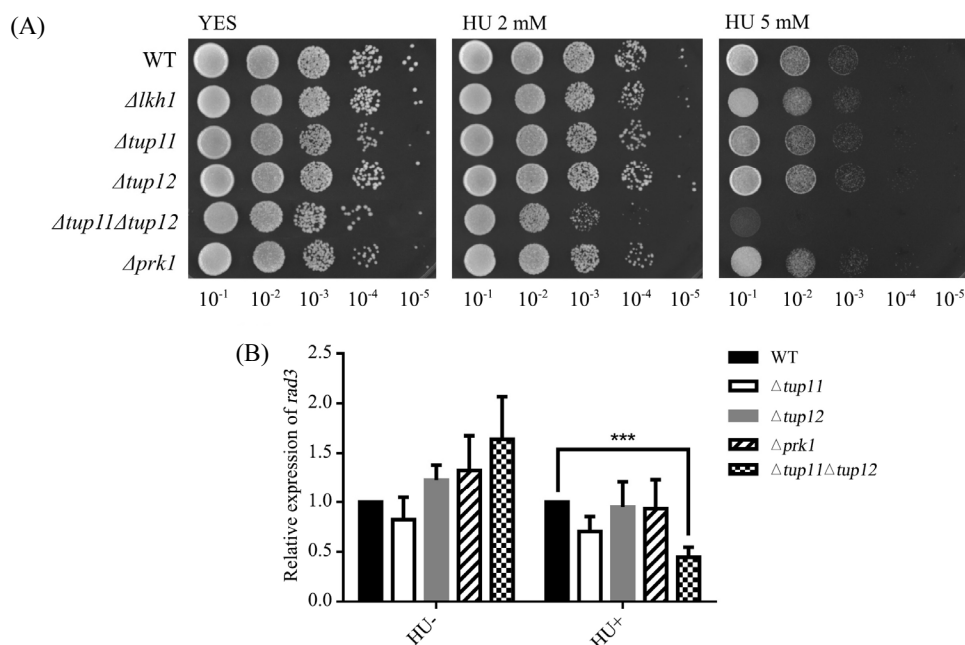


Fig. 4. Sensitivity of *S. pombe* strains to hydroxyurea and quantitative analysis of the *rad3+* gene expression. Serially diluted (10-fold) cells from mid-exponential phase of wild type, $\Delta lkh1$ (*lkh1* deletion strain), $\Delta tup11$ (*tup11* deletion strain), $\Delta tup12$ (*tup12* deletion strain), $\Delta tup11\Delta tup12$ (*tup11* and *tup12* double-deletion strain) and $\Delta prk1$ (*prk1* deletion strain) were plated onto the plates (A). Quantitative real time PCR was performed to confirm the expression of *rad3+* in wild type, $\Delta tup11$, $\Delta tup12$ and $\Delta prk1$ cells with or without hydroxyurea treatment (5 mM, 4 h) (B). (***) $p < 0.001$

과 결손변이주 간에 유의미한 수준의 차이를 보이지 아니하였으나, HU 처리로 복제-스트레스 반응을 유발한 조건에서는 Lkh1-결손주에서 야생형보다 두 유전자의 발현이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3A). 반면, Rad3-결손주와 Lkh1/Rad3-이 중결손주는 HU 처리 후 *cdc18+*와 *cdc22+*의 발현이 야생형이나 Lkh1-결손주에 비하여 모두 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3B and C). 따라서, 복제-스트레스 반응에서 체크포인트 활성을 조절하는 BMF-의존성 유전자 전사과정은 Rad3를 매개하는 Lkh1의 작용에 의하여 음성조절 됨을 알 수 있다.

복제-스트레스 반응에서 라머카이네이즈에 의한 *rad3+* 유전자 발현조절을 매개하는 인자

단백질 인산화효소인 라머카이네이즈가 *rad3+* 전사과정을 조절하기 위해서는 이 과정에 음성적으로 작용하는 전사인자(negative transcription factor)가 필요함을 예상할 수 있다. 그런데, Lkh1은 분열효모의 세포영김(flocculation)을 음성조절하며, 이 과정은 Lkh1에 의한 인산화로 활성화되는 글로벌 전사인자인 Tup11과 Tup12 (Kang et al., 2010) 그리고 Prk1에 의해 매개된다(Park et al., 2018). 또한 발아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 DNA 손상-스트레스 경로와 세포영김에 Tup 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다(Huang et al., 1998). 따라서, Lkh1 하위에서 작동하는 전사인자인 Tup11, Tup12 및

Prk1 존재 유무가 분열효모 세포의 HU에 대한 민감도와 *rad3+* 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 야생형과 돌연변이주의 HU 민감도를 조사한 결과, Fig. 4A에서 보듯이 Tup11, Tup12 및 Prk1이 단독으로 결손된 돌연변이주는 야생형 및 Lkh1-결손주와 별 다른 차이를 보이지 않았으나, Tup11과 Tup12가 모두 결손된 균주는 HU에 더욱 민감하였다. 이러한 관찰결과와 부합되게 Tup11, Tup12 및 Prk1가 단독으로 결손된 균주에서는 HU 처리 조건에서의 *rad3+* 유전자 발현이 야생형과 유의미한 차이를 보이지 아니하였으나, Tup11과 Tup12이 모두 결손된 이중결손주의 경우에는 HU 처리 조건에서 *rad3+* 발현량이 야생형에 비하여 유의미한 수준으로 감소하였다(Fig. 4B). 이는 DNA 복제-스트레스 조건에서 이루어지는 *rad3+* 유전자 발현이 Tup11와 Tup12의 공조에 의해서도 조절된다는 새로운 가능성을 보여주는 결과이다. 그러나, 분열효모의 라머카이네이즈에 의한 인산화로 활성화된 Tup 단백질은 세포영김이나, 포도당 대사의 음성조절자로 작동하는 유전발현 조절양상(Kang et al., 2010)과 비교해 볼 때, 복제 스트레스에 반응하여 *rad3+*의 발현을 증가시키는 과정의 Tup 단백질의 활성화에는 라머카이네이즈가 아닌 새로운 인자가 관여할 가능성을 배제할 수 없다.

라머카이네이즈가 HU 처리에 의한 세포 내 활성산소종 생성 미치는 영향

라머카이네이즈 결손은 *S. pombe*의 산소충격 민감성을 초래하는 것으로 알려져 있다(Park *et al.*, 2003). HU는 세포 내 수퍼옥사이드 래디컬(superoxide radical)을 증가시키고, 수퍼옥사이드 래디컬로부터 유래된 하이드록시 래디컬(hydroxyl radical)이 궁극적으로 DNA 손상-스트레스를 야기하기도 한다(Singh and Xu, 2016). 따라서, 야생형에 비하여 HU에 민감성을 보이는 Lkh1-결손주의 특성은 HU이 야기하는 DNA 손상-스트레스에 제대로 대처하지 못하기 때문이기도 할 것이므로, HU에 의해 세포 내에 생성되는 활성산소종(oxygen radical)을 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H2DCFDA)을 이용한 형광현미경법으로 조사하였다. 그 결과, Fig. 5에서 보듯이 야생형과 Lkh1-결손주 모두 산화-스트레스 약제로 잘 알려진 과산화수소(H₂O₂) 보다 HU 처리에 의해 세포 내에 축적되는 활성산소종의 농도는 낮았으나, Lkh1-결손주 세포 내에 축적된 활성산소종의 농도가 야생형 보다는 더 높게 검출되었다. 이러한 결과는 Lkh1-결손주가 HU 처리에 의해 생성되는 세포 내 활성산소종을 효율적으로 제거하지 못하여 야생형보다 DNA 손상-스트레스나 복제-스트레스에 더 취약한 것임을 보여준다.

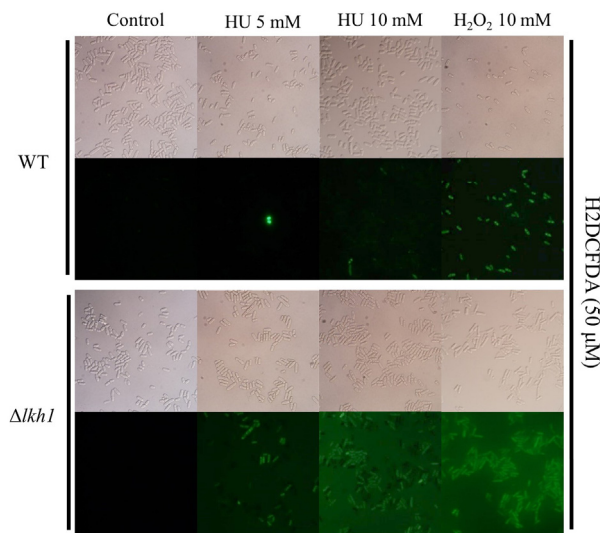


Fig. 5. Cellular accumulation of ROS in *S. pombe* strains. Cells were stained with H2DCFDA to detect intracellular accumulation of ROS by hydroxyurea treatment. The wild type and $\Delta lkh1$ (*lkh1* deletion strain) cell were grown to the early mid-exponential phase ($OD_{600} = 0.3$), followed by incubation at 30°C for 1 h with 50 μ M H2DCFDA. Thereafter, hydroxyurea and hydrogen peroxide were treated and incubated at 30°C for 2 h. Accumulation of ROS in the cells was observed by fluorescence microscopy.

고찰

본 연구에서는 분열효모인 *S. pombe*의 라머카이네이즈 결손돌연변이주가 DNA 복제-스트레스를 야기하는 약제인 하이드록시우레아(HU)에 민감성을 나타낸다는 사실에 착안하여 라머카이네이즈와 DNA 복제-스트레스 반응 조절인자와의 상관 관계를 살펴보았다.

흥미롭게도 정상적인 생장조건에서는 라머카이네이즈 결손에 의하여 DNA 복제 체크포인트의 sensor kinase 유전자인 *rad3*⁺의 발현이 변화하지 않았으나, HU 처리 등의 복제-스트레스가 야기되는 조건에서는 라머카이네이즈 결손에 의하여 *rad3*⁺ 발현량이 증가하였다. 이는 분열효모의 라머카이네이즈가 정상적인 생장조건이나 낮은 수준의 복제-스트레스(대략 5 mM 이하의 HU 처리)에서는 DNA 복제 체크포인트 경로에 특기할만한 영향을 미치지 아니하지만, 비교적 강한 수준의 DNA 복제-스트레스(최소 5 mM 이상의 HU 처리)가 가해진 조건에서는 라머카이네이즈가 DNA 손상-스트레스 및 복제-스트레스 반응 경로의 상위에서 작용하는 *rad3*⁺의 발현을 음성조절 함을 시사하는 것이다. 한편, HU 처리로 활성화되는 *rad3*⁺의 전사조절에 관여하는 전사인자를 동정하기 위한 시도로 알려진 전사인자 돌연변이주를 대상으로 HU 민감성과 Rad3 유전자 발현을 조사한 결과, 라머카이네이즈에 의해 활성화되는 것으로 알려진 음성전사조절자인 Tup11과 Tup12(Kang *et al.*, 2010)가 동시에 결실된 이중 돌연변이주만 HU 민감성을 보였으며 Rad3 유전자 발현은 예상과 달리 감소하였다. 이러한 결과는 HU 처리에 의한 Rad3 유전자 발현조절에 Tup11과 Tup12가 동시에 관여하나 이들의 활성화 Lkh1가 아닌 미지의 조절자에 의해 이루어지는 것으로 추정되었다.

이전까지 보고된 분열효모의 라머카이네이즈 기능 연구결과 중 DNA 손상 및 복제-스트레스와 관련이 있는 것으로는, 정상적인 생장(또는 세포분열) 조건에서는 라머카이네이즈가 세포주기 조절자(CDK)의 활성저해인자인 Rum1 단백질을 매개로 분열주기의 G1기에서 S기로의 이행을 조절하며(Yu *et al.*, 2013), DNA 손상-스트레스를 야기하는 약제인 과산화수소 등의 산화충격제가 처리되면 라머카이네이즈가 항산화효소 유전자의 전사체 안정성 유지에 관여하는 단백질인 Csx1을 매개로 작용한다는 것이다(Kang *et al.*, 2007).

본 논문에서는 라머카이네이즈가 정상적인 생장조건뿐만 아니라 DNA 손상을 야기하거나 복제를 방해하는 비정상적인 조건에서도 분열효모의 세포주기 조절에 관여한다는 새로운 사실을 제시하였다. 또한 지금까지 알려진 DNA 손상-스트레스와 복제-스트레스 반응 경로의 최상위 인자인 Rad3의 상위

에 라머카이네이즈(Lkh1)와 음성전사조절인자(Tup11, Tup12)가 조절자로 기능한다는 증거를 제시하였다. 이와 더불어 복제-스트레스 처리 유무와 라머카이네이즈의 존재 유무와 무관하게 *rad3⁺*의 발현양은 일정 수준을 항상 유지한다는 결과(Fig. 3A)와 Tup11과 Tup12가 동시에 결손된 돌연변이주의 Rad3 유전자 발현이 증가한 결과(Fig. 4B)는 라머카이네이즈나 Tup 단백질 외에 Rad3의 활성을 조절하는 또 다른 조절자(또는 조절경로)가 존재할 가능성을 시사하는 것으로, 향후 라머카이네이즈와 Tup 단백질을 포함한 Rad3 상위조절자의 기능을 분석하는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*의 라머카이네이즈(Lkh1) 결손 돌연변이주가 하이드록시우레아(HU) 등에 의해 유도되는 DNA 복제 체크포인트와의 연관성을 조사하였다. Lkh1-결손주는 특정 농도(5 mM) 이상의 HU에 민감하였으며, DNA 복제 체크포인트의 센서카이네이즈인 Rad3-결손주는 Lkh1-결손주 보다 HU에 더 민감하였다. 한편, Lkh1과 Rad3가 모두 결손된 이중 돌연변이주는 Rad3 결손주와 동일한 수준의 HU 감수성을 보였으며, HU 처리로 Lkh1-결손주의 *rad3⁺* 및 하위 유전자 발현이 증가하였다. 이는 DNA 복제 체크포인트를 작동하는 Rad3의 활성이 Lkh1에 의해 음성조절됨을 시사하는 것이다. 한편, Lkh1과 Rad3 사이에서 작용하는 전사조절인자를 규명하기 위하여 Lkh1 하위의 조절자인 Tup11, Tup12 및 Prk1 결손주의 HU 민감성과 Rad3 유전자 발현을 조사한 결과, Tup11/Tup12 유전자가 동시에 결실된 이중 돌연변이주만 HU 민감성을 보였으며 Rad3 유전자 발현도 감소하였다. 이러한 결과는 HU 처리에 의한 Rad3 유전자 발현조절에 Tup11과 Tup12가 동시에 관여하나 이들의 활성화 Lkh1가 아닌 미지의 조절자에 의해 이루어짐을 시사한다.

감사의 말

본 연구는 2020년도 충남대학교 자체연구과제(재직II) 지원(과제번호: 2020-0696-01)에 의하여 수행되었음.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

- Bender J and Fink GR. 1994. AFC1, a LAMMER kinase from *Arabidopsis thaliana*, activates STE12-dependent processes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12105–12109.
- Bøe CA, Håland TW, Boye E, Syljuåsen RG and Grallert B. 2018. A novel role for ATR/Rad3 in G1 phase. *Sci. Rep.* **8**, 6880.
- Caetano C, Klier S, and de Bruin RAM. 2011. Phosphorylation of the MBF repressor Yox1p by the DNA replication checkpoint keeps the G1/S cell-cycle transcriptional program active. *PLoS ONE* **6**, e17211.
- Colwill K, Pawson T, Andrews B, Prasad J, Manley JL, Bell JC, and Duncan PI. 1996. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.* **15**, 265–275.
- Connolly T and Beach D. 1994. Interaction between the Cig1 and Cig2 B-type cyclins in the fission yeast cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 768–776.
- de Bruin RAM, Kalashnikova TI, Aslanian A, Wohlschlegel J, Chahwan C, Yates JR 3rd, Russell P, and Wittenberg C. 2008. DNA replication checkpoint promotes G₁-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11230–11235.
- de Sena-Tomás C, Sutherland JH, Milisavljevic M, Nikolic DB, Pérez-Martín J, Kojic M, and Holloman WK. 2015. LAMMER kinase contributes to genome stability in *Ustilago maydis*. *DNA Repair* **33**, 70–77.
- Du C, McGuffin ME, Dauwalder B, Rabinow L, and Mattox W. 1998. Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in *Drosophila*. *Mol. Cell* **2**, 741–750.
- Dutta C, Patel PK, Rosebrock A, Oliva A, Leatherwood J, and Rhind N. 2008. The DNA replication checkpoint directly regulates MBF-dependent G₁/S transcription. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5977–5985.
- Fernandez-Sarabia MJ, McNerny CJ, Harris P, Gordon CB, and Fantes PA. 1993. The cell cycle genes *cdc22⁺* and *suc22⁺* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encode the large and small subunits of ribonucleotide reductase. *Molec. Gen. Genet.* **238**, 241–251.
- Gómez-Escoda B, Ivanova T, Calvo IA, Alves-Rodrigues I, Hidalgo E, and Ayté J. 2011. Yox1 links MBF-dependent transcription to completion of DNA synthesis. *EMBO Rep.* **12**, 84–89.
- Håkansson P, Dahl L, Chilkova O, Domkin V, and Thelander L. 2006. The *Schizosaccharomyces pombe* replication inhibitor Spd1 regulates ribonucleotide reductase activity and dNTPs by binding to the large Cdc22 subunit. *J. Biol. Chem.* **281**, 1778–1783.
- Huang M, Zhou Z, and Elledge SJ. 1998. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* **94**, 595–605.
- Jallepalli PV, Tien D, and Kelly TJ. 1998. *sud1⁺* targets cyclin-

- dependent kinase-phosphorylated Cdc18 and Rum1 proteins for degradation and stops unwanted diploidization in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8159–8164.
- Kang EH, Kim J, Oh HW, and Park HM.** 2013. LAMMER kinase LkhA plays multiple roles in the vegetative growth and asexual and sexual development of *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **8**, e58762.
- Kang WH, Park YD, Hwang JS, and Park HM.** 2007. RNA-binding protein Csx1 is phosphorylated by LAMMER kinase, Lkh1, in response to oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **581**, 3473–3478.
- Kang WH, Park YH, and Park HM.** 2010. The LAMMER kinase homolog, Lkh1, regulates tup transcriptional repressors through phosphorylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **285**, 13797–13806.
- Kelly TJ, Martin GS, Forsburg SL, Stephen RJ, Russo A, and Nurse P.** 1993. The fission yeast *cdc18⁺* gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell* **74**, 371–382.
- Kim KH, Cho YM, Kang WH, Kim JH, Byun KH, Park YD, Bae KS, and Park HM.** 2001. Negative regulation of filamentous growth and flocculation by Lkh1, a fission yeast LAMMER kinase homolog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 1237–1242.
- Li L, Zhu XM, Wu JQ, Cao N, Bao JD, Liu XH, and Lin FC.** 2022. The LAMMER kinase MoKns1 regulates growth, conidiation and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 8104.
- Lim JY, Kim YJ, Woo SA, Jeong JW, Lee YR, Kim CH and Park HM.** 2021. The LAMMER kinase, LkhA, affects *Aspergillus fumigatus* pathogenicity by modulating reproduction and biosynthesis of cell wall PAMPs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 756206.
- Lim JY, Park YH, Pyon YH, Yang JM, Yoon JY, Park SJ, Lee H, and Park HM.** 2020. The LAMMER kinase is involved in morphogenesis and response to cell wall- and DNA-damaging stresses in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **58**, 240–247.
- Lopato S, Mayeda A, Krainer AR, and Barta A.** 1996. Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3074–3079.
- Miyabe I, Morishita T, Shinagawa H, and Carr AM.** 2009. *Schizosaccharomyces pombe* Cds1Chk2 regulates homologous recombination at stalled replication forks through the phosphorylation of recombination protein Rad60. *J. Cell Sci.* **122**, 3638–3643.
- Nayler O, Stamm S, and Ullrich A.** 1997. Characterization and comparison of four serine- and arginine-rich (SR) protein kinases. *Biochem. J.* **326**, 693–700.
- Park YD, Kang WH, Yang WS, Dhun KS, Bae KS, and Park HM.** 2003. LAMMER kinase homolog, Lkh1, is involved in oxidative-stress response of fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 1078–1083.
- Park YD, Kwon SJ, Bae KS, and Park HM.** 2018. LAMMER kinase Lkh1 is an upstream regulator of prk1-mediated non-sexual flocculation in fission yeast. *Mycobiology* **46**, 236–241.
- Park YH and Park HM.** 2011. Temperature sensitivity of sigma background is suppressed by the disruption of *ScKNS1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J. Microbiol.* **47**, 167–169.
- Park YH, Yang JM, Yang SY, Kim SM, Cho YM, and Park HM.** 2011. Function of dual specificity kinase, ScKns1, in adhesive and filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J. Microbiol.* **47**, 110–116.
- Singh A and Xu YJ.** 2016. The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes* **7**, 99.
- Talmadge C, Finkernagel S, Sumegi J, Sciorra L, and Rabinow L.** 1988. Chromosomal mapping of three human LAMMER protein-kinase-encoding genes. *Hum. Genet.* **103**, 523–524.
- Yoshida S, Al-Amodi H, Nakamura T, McInerney CJ, and Shimoda C.** 2003. The *Schizosaccharomyces pombe cdt2⁺* gene, a target of G1-S phase-specific transcription factor complex DSC1, is required for mitotic and premeiotic DNA replication. *Genetics* **164**, 881–893.
- Yu EY, Lee JH, Kang WH, Park YH, Kim L, and Park HM.** 2013. Fission yeast LAMMER kinase Lkh1 regulates the cell cycle by phosphorylating the CDK-inhibitor Rum1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 80–85.
- Yun B, Farkas R, Lee K, and Rabinow L.** 1994. The Doa locus encodes a member of a new protein kinase family and is essential for eye and embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **8**, 1160–1173.