

## 효모 감수분열과정에서의 유전자 재조합 기전 특이적 DNA 중간체의 구조 변화

성영진<sup>1,2</sup> · 윤상욱<sup>2,3</sup> · 김근필<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>차의과학대학교 의생명과학과, <sup>2</sup>중앙대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>3</sup>서울대학교 자연과학대학 생명과학부

### Identification of Meiotic Recombination Intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*

Young Jin Sung<sup>1,2</sup>, Sang Wook Yoon<sup>2,3</sup>, and Keun Pil Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, CHA University, Gyeonggi-do 463-836, Republic of Korea

<sup>2</sup>School of Biological Sciences, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Republic of Korea

<sup>3</sup>School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

(Received January 15, 2013 / Accepted March 8, 2013)

During meiosis, genetic recombinants are formed by homologous recombination accompanying with the programmed double-strand breaks (DSBs) and strand exchanges between homologous chromosomes. The mechanism is generated by recombination intermediates such as single-end invasions (SEIs) and double-Holliday junctions (dHJs), and followed by crossover (CO) or non-crossover (NCO) products. Our study was focused on the analysis of meiotic recombination intermediates (DSBs, SEIs, and dHJs) and final recombination products (CO and NCO). We identified these meiotic recombination intermediates using DNA physical analysis under *HIS4LEU2* "hot spot" system in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. For DNA physical analysis, when the hot spot locus is recognized by restriction enzyme from synchronous meiotic cells, the fragmented DNA that are forming recombination intermediates can be detected and quantified through Southern hybridization analysis. Our study suggests that this system can analyze the structural change of recombination intermediates during DSB-SEI transition, double-Holliday junctions and crossover/non-crossover products in meiosis.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, crossover/non-crossover, double-strand breaks, meiotic recombination

출아효모는 가장 간단한 형태의 진핵 생물로 다루기 쉽고 빠르게 배양할 수 있으며, 고등생물에 이르기까지 많은 유전자가 잘 보존되어 있어 생체 내 DNA 복제, 재조합, 손상 후 회복, 세포주기 조절 등의 원리를 연구하는데 유용한 모델생물로 널리 쓰이고 있다. 출아효모는 인간의 세포주기와 매우 유사하여 DNA 복제 시 발생하는 신호경로와 단백질-단백질 또는 단백질-DNA간의 상호작용에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. DNA 재조합에 대한 연구는 DNA 복제과정과 비교하여 상대적으로 많이 이루어지지는 않았지만 DNA 손상 후 회복과정과 더불어 이 과정을 이해하기 위해 여러 연구가 활발하게 진행되고 있다. 재조합은 유전정보의 새로운 조합이 생기는 것으로 보통 감수분열 과정에서 일어난다. 감수분열은 두 번의 연속된 분열로 염색체 수가 반감하고 상동염색체가 서로 분리된다. 다양한 종에서 감수분열은 공통적으로 2개의 상동 DNA 염기서열이 서로 교차하고, 교차가 일어난 부위의 염기서열은 원래 DNA 염기서열대로 유

지된다. 이러한 재조합을 상동재조합(homologous recombination, HR)이라고 한다. 감수분열 과정에서 일어나는 재조합은 먼저 부모 DNA가 복제되면서 이루어진다. 제 1 분열 전기 세사기(leptotene)에 나선상의 복제된 딸 DNA 가닥은 cohesin에 의하여 조금씩 집결하고, Spo11에 의하여 DNA 이중 가닥 절단(DSBs)이 발생하게 되면서 재조합이 개시된다(Keeney and Kleckner, 1997; Keeney, 2001; Neale *et al.*, 2005). 이 과정 중에 이중 가닥 절단의 5' 말단이 5'→3' 핵산말단가수분해효소(Mre11-Rad50-Xrs2 nuclease complex, Sae2 and Exo1 nuclease)에 의해 삭제되는 재절단(resection) 반응으로 3' 말단의 단일 가닥 DNA (single-stranded DNA) 부분이 노출된다. 접합기(zygotene)에 상동 염색분체가 접합되기 시작하고 노출된 말단 중 하나가 상동 염색분체의 상동서열을 찾아 단일 가닥 침투(single-end invasions, SEIs)를 통해 D-고리를 형성한다. 이런 재조합 파트너 선택을 "homolog bias" 라고 한다(Zickler and Kleckner, 1999; Hunter, 2006; Kim *et al.*, 2010). 태사기(pachytene)에 상동염색체의 접합이 완료되고 나머지 말단의 갭이 채워지면서 이중 홀리데이

\*For correspondence. E-mail: [kpkim@cau.ac.kr](mailto:kpkim@cau.ac.kr); Tel.: +82-2-820-5792; Fax: +82-2-820-5899

접합(dHJs)이 만들어진다. 복사기(diplotene)에 이중 홀리데이 접합으로 교차된 DNA 가닥은 키아스마를 형성하고 염색체는 더욱 응축되며, 이동기(diakinesis)에 교차성 재조합(crossover, CO) 산물 또는 비교차성 재조합(non-crossover, NCO) 산물로 해리되어 재조합 DNA가 완성된다. 이후 중기에 재조합이 완료된 염색체가 적도면에 배열되고 후기에 쌍을 이룬 4가닥의 염색분체는 2가닥씩 양극으로 나뉜다. 제 2 분열에서는 2가닥의 염색분체가 1가닥씩 나뉘어 최종적으로 염색체 수가 반수가 되는 감수분열이 완료된다.

이번 연구의 초점은 이전 논문에서 기술된 *HIS4LEU2* “hotspot”을 이용하여(Kim et al., 2010) 제 1 감수분열 전기에 시작되는 이중 가닥 절단과 이후 형성되는 재조합 중간 단계에 있는 DNA 구조다형을 Southern 분석 방법을 통해 확인할 수 있음을 제시한다. 이를 통해 감수분열 과정에 관여하는 여러 단백질들의 신호경로와 상관관계를 유추할 수 있다.

## 재료 및 방법

### 효모균주

본 실험에 사용한 출아효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 유성생식을 하는 SK1에서 유래한다. *ho::hisG*, *leu2::hisG*, *ura3* (*PstI-SmaI*), *nuc1::hph* (Goldstein and McCusker, 1999)이 동형 접합이고 *HIS4::LEU2-(BamHI)/his4X::LEU2-(NgoMIV)-URA3* (Kim et al., 2010)가 이형접합이다.

### 포자 생존성 분석

이배체 단일 colony를 2 ml SPM 배지에 접종하여 30°C에서 300 rpm으로 24시간 동안 배양한 후, 1 ml을 원심분리하여 0.4 mg 100-T Zymolyase를 첨가한 후 4°C에서 15분간 반응시켰다. 4개로 나누어 진 포자를 YPD 고체배지 위에 각각 분리하여 30°C에서 2일 동안 배양하였다.

### 생식세포 분열 유도 및 배양법

본 실험에 사용한 모든 배지는 미리 30°C로 예열하여 사용하였다. 출아효모는 -80°C에서 YPG 액체배지(1% Yeast Extract, 2% Bacto-Peptone, 40% Glycerol)에 저장 중인 것으로부터 YPG 고체배지(1% Yeast Extract, 2% Bacto-Peptone, 2% Bacto-Agar, 3% Glycerol)로 접종하고, 다음날 YPD 고체배지(1% Yeast Extract, 2% Bacto-Peptone, 2% Bacto-Agar, 2% Glucose)에 도말하여 2일간 배양하였다. YPD 고체배지에서 자란 단일 colony를 YPD 액체배지(1% Yeast Extract, 2% Bacto-Peptone, 2% Glucose)로 접종하여 24시간 동안 배양한 뒤, G1기에 동조화 시키기 위해 200 ml SPS (Supplemented Pre-Sporulation Medium; 0.5% Yeast Extract, 1% Bacto-Peptone, 0.67% Difco Yeast Nitrogen Base without Amino Acid and Containing Ammonium Sulphate, 1% Potassium Acetate, 0.05 M Potassium Biphthalate, pH 5.5 with 10 N KOH) 배지에 1/400로 희석되도록 접종하여 오비탈 교반 배양기에서 300 rpm, 30°C로 18시간 동안 배양하였다. G1기에

동조화된 효모는 원심분리하여 상등액을 제거하고, 200 ml SPM (Sporulation Medium; 1% Potassium Acetate, 0.025% Raffinose, 0.01% Antifoam) 배지로 다시 현탁하였다. 이것을 원심분리하여 상등액을 제거함으로써 미량으로 남아 있는 배지 성분을 씻어내었다. 침전시킨 효모는 250 ml SPM 배지로 현탁하여 오비탈 교반 배양기에서 300 rpm, 30°C로 감수분열을 유도하였다. 10% Sodium Azide를 0.23 ml씩 분주한 튜브에 각 시간 별로(0, 2.5, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 24 h) 23 ml씩을 취해 3000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 재조합이 진행 중인 DNA간의 교차결합(cross-link)을 안정화하기 위해 Psoralen 용액(0.01 mg/ml Trioxalen, 50 mM Tris-HCl; pH 8.0, 50 mM EDTA; pH 8.0)을 첨가하고, 365 nm 파장의 자외선을 10분간 조사하였다. 각 시간 별 세포는 원심분리하여 상등액을 제거하고 -20°C로 냉각시켜 더 이상의 감수분열이 진행되지 않도록 하였다.

### Genomic DNA 추출

교차결합된 상태가 분리되지 않게 하기 위하여 vortex 믹서는 사용하지 않았다. Guanidine과 Phenol/Chloroform을 이용한 방법으로 각 시간 별 샘플에서 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. 해당된 세포에 1 ml Spheroplasting buffer (1 M Sorbitol, 50 mM KPO<sub>4</sub>; pH 7.0, 10 mM EDTA; pH 8.0)와 β-Mercaptoethanol (final conc. 1% v/v) 그리고 0.4 mg 100-T Zymolyase를 넣고 현탁하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응을 끝낸 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 Guanidine solution (4.5 M Guanidine-HCl, 0.1 M EDTA; pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.05% Sodium Lauryl Sarkosyl)을 넣어 65°C에서 20분간 반응시켰다. 그 다음 100% EtOH을 첨가하여 -20°C에서 2시간 동안 보관한 뒤, 원심분리하여 상등액을 제거하고 RNase solution (100 mM Tris-HCl; pH 8.0, 10 mM EDTA; pH 8.0, 50 µg/ml RNase A; DNase free)를 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 용액은 micro centrifuge 튜브로 옮기고 Proteinase-K solution (20 mg/ml, in 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl; pH 8.0, 50% Glycerol)을 첨가하여 65°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 후에 Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 원심분리를 하였다. 상등액은 새로운 micro centrifuge 튜브로 옮겨 3 M Sodium Acetate (NaOAc pH 5.5)와 100% EtOH을 넣어 상온에서 20분간 침전시켰다. 그리고 다시 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 TE buffer (50 mM Tris-HCl; pH 8.0, 10 mM EDTA; pH 8.0)에 녹여 -20°C에 보관하였다.

### 전기 영동법에 의한 DNA 구조분석

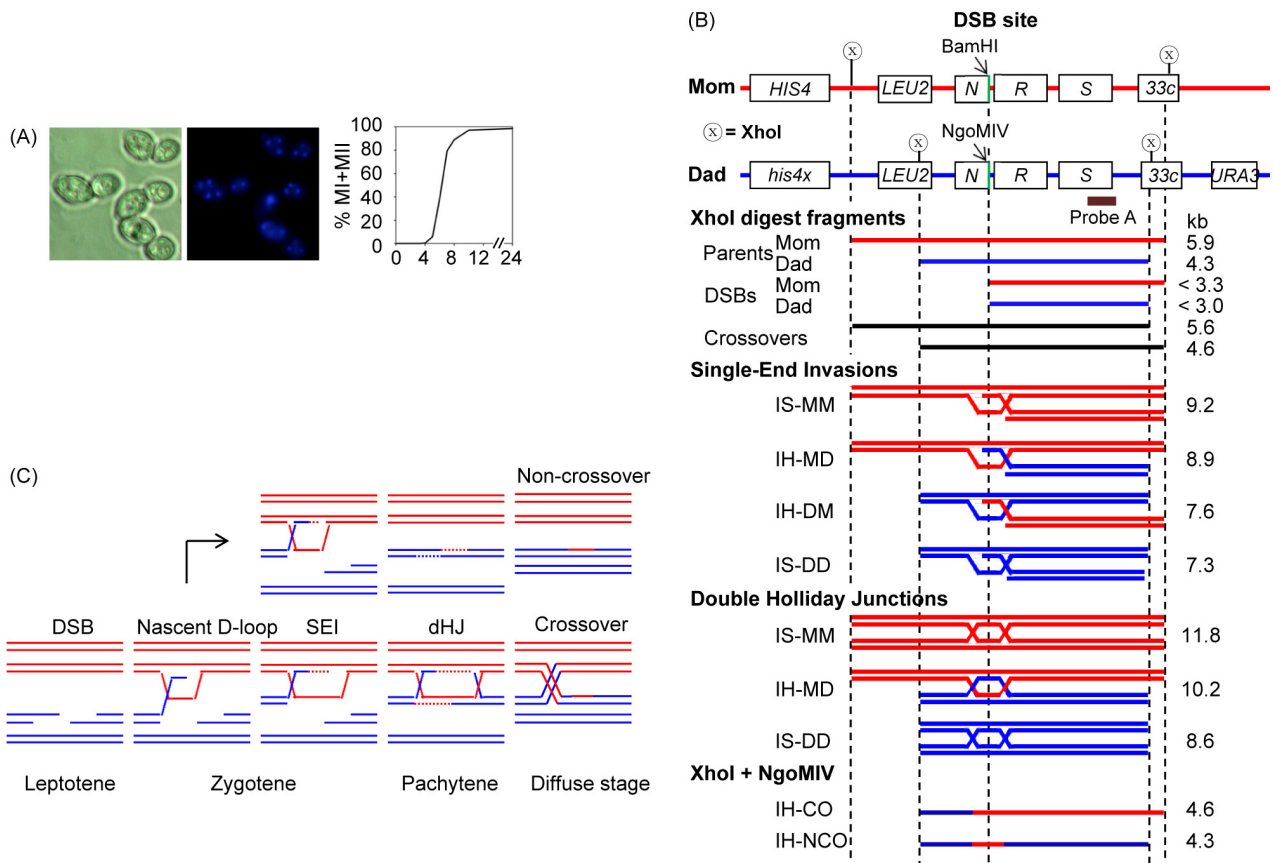
재조합 중간체 산물들은 *HIS4LEU2* “hot spot”으로 분석하였다(Hunter and Kleckner, 2001; Oh et al., 2007). DNA 물리적 구조분석을 위해 이전에 기술된 방법을 사용하였다(Wanat et al., 2008; Kim et al., 2010). 1차원 젤 분석을 위해, 2 µg의 DNA를 *XhoI* (Enzymomics) 제한효소로 처리한 후 0.6% SeaKem LE 아가로스에 1 × TBE, 2 V/cm의 조건으로 24시간 동안 전기영동을 하였다. 2차원 젤 분석을 위해, 2.5 µg의 DNA

를 *XhoI* 제한효소로 처리한 후 0.4% SeaKem GOLD 아가로즈에 1 × TBE, 1 V/cm의 조건으로 20시간 동안 전기영동을 하고 Ethidium Bromide (EtBr, 0.5 µg/ml)로 염색을 하였다. 그런 다음 각 레인을 잘라내어 새로운 2차원 젤 트레이에 전기영동 방향의 90°의 각도로 위치시키고 2차원 젤(0.8% SeaKem LE 아가로즈, 0.5 µg/ml EtBr 포함)을 그 위에 부어 굳혔다. 0.5 µg/ml EtBr이 첨가된 1 × TBE에서 6 V/cm의 조건으로 4°C에서 6시간 동안 전기영동 하였다. 교차성 재조합 산물과 비교차성 재조합 산물을 1차원 젤에서 분석하기 위해, 2 µg의 DNA를 *XhoI*과 *NgoMIV* (New England Biolabs) 제한효소로 처리하여 0.6% SeaKem LE 아가로즈에 1 × TBE, 2 V/cm의 조건으로 24시간 동안 전기영동을 하였다. Southern 분석법은 이전 연구에 기술된 “Probe A”를 이용하여 수행하였다(Schwacha and Kleckner, 1997). Probe는 Prime-It RmT Random Primer Labeling Kits (Agilent Technologies)를 이용하여 방사성 동위원소로 식별하였다. 혼성화한 DNA는 Bio-Rad phosphoimager and Quantity One® 소프트웨어로 정량하였다.

**결과**

**포자형성**

효모는 성장을 위한 탄소원으로 해당과정과 포도당 신생합성 과정을 모두 이용할 수 있다. 포자형성은 이배체(a/a 타입) 세포에서만 발생하며 일반적으로 Potassium Acetate가 포함된 배지로 옮겨지면 시작된다(Miller, 1957; Croes, 1967; Fowell, 1969; Roth and Halvorson, 1969; McCusker and Haber, 1977; Freese et al., 1982). 이배체 세포를 YPD 액체배지에서 포화성장 시킨 뒤, SPS 배지에 1/400로 접종하고 18시간 동안 배양하여 모든 세포를 G1기에 동조화하였다. G1기에 동조화 된 세포는 SPM배지로 옮겨 일제히 감수분열을 유도하고 각 시간(0, 2.5, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 24 h) 별로 샘플을 수확하였다. 각 시간 별 샘플에서 0.5 ml씩을 취해 0.5 M Sorbitol (with 40% EtOH) 용액으로 고정하였다. 고정된 세포는 0.01 mg/ml DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하고 세포 하나 당 형광을 띄는 핵의 갯수가 1개인 것과 2개 또는 4개인 것으로 구분하여 감수분열을



**Fig. 1.** Yeast Meiosis and DNA physical analysis system. (A) The image shown are micrographs of unstained or DAPI stained yeast cells 10 h after transfer SPM medium (magnified × 1,000). (B) Map of the *HIS4LEU2* hotspot locus showing diagnostic restriction sites and probe binding position. “Mom” and “Dad” distinguished via *XhoI* restriction site polymorphisms (circled Xs). Each fragment digested with *XhoI* or *XhoI* + *NgoMIV* are shown that DNA size of parental, recombinant, DSBs, dHJs, SEIs and crossover products can be detectable after gel electrophoresis and Southern hybridization with probe A. (C) DNA events of post-DSB steps in meiotic prophase I.

통한 포자화 진행 정도를 확인하였다(Fig. 1A). 세포는 감수분열을 유도한지 6-7시간 사이에 50%의 포자형성 진행률을 보였고 24시간에 거의 모든 세포에서 4개의 포자를 형성하였다.

**재조합 중간체 분석 시스템**

감수분열 재조합 과정 중 만들어지는 각각의 재조합 중간체를 분석하기 위해서 *HIS4LEU2* “hotspot” system을 이용하였다(Cao et al., 1990; Hunter and Kleckner, 2001; Oh et al., 2007). 이 시스템은 출아효모 3번 염색체의 *HIS4* 유전자 3' 방향에 *LEU2* 염기서열이 삽입된 것으로 하나의 이중 가닥 절단을 만들어낸다.

감수분열을 유도하여 각 시간 별로 수확한 세포에서 DNA를 추출하여 *XhoI* 또는 *XhoI* + *NgoMIV* 제한효소로 처리하면 감수분열 전기에 진행되는 재조합 중간체를 크기에 따라 분리할 수 있다(Fig. 1B).

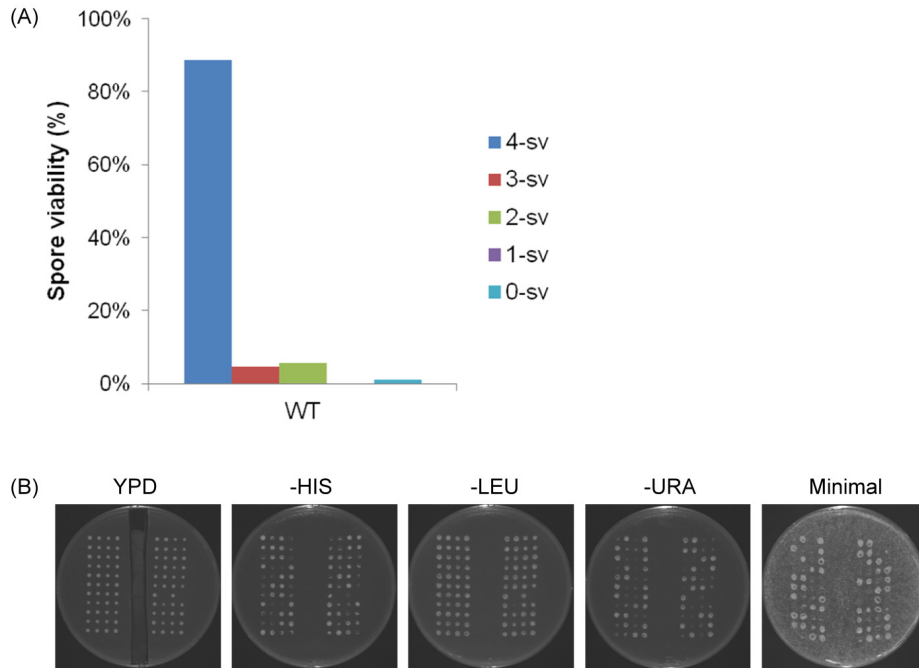
**포자생존성**

“Mom”의 유전자형을 가진 반수체 효모와 “Dad”의 유전자형을 가진 반수체 효모를 각각의 교배형에 맞게 교배하여 6시간 동안 YPD 고체배지에서 배양하였다. 교배하여 융합된 이배체 효모와 그렇지 않은 반수체 효모를 선별하기 위하여 6시간 동안 배양한 효모를 YPD 고체배지에 도말하여 30°C에서 2일간 배양하였다. 도말하여 2일간 배양한 이배체 효모는 단일 콜로니의 표면이 매끈한 특징을 가지고 있기 때문에 반수체 효모와 비교하여 선별할 수 있다. 선별한 이배체 효모를 SPM 배지에 10시간

이상 배양하여 감수분열을 유도하였다. 세포벽을 제거하고 4개의 포자를 하나씩 분리하기 위해 *Zymolyase*를 처리하였다. YPD 고체배지 위에 포자를 하나씩 나열하고 30°C에서 2일간 배양하였다. 나열된 4개의 포자에서 증식한 콜로니 수를 측정할 결과, 이배체 효모에서 감수분열을 통해 분리된 반수체 효모는 90% 이상이 생존하였다(Fig. 2A).

**“Mom”과 “Dad” 유전자형 확인**

“Mom”은 *HIS4::LEU2* 유전자형을 가지고 있어 Histidine (HIS)과 Leucine (LEU)이 결핍된 배지에서 스스로 부족한 아미노산을 합성하여 증식할 수 있다. 반면 “Dad”는 *his4x::LEU2-URA3* 유전자형을 가지고 있어 HIS이 결핍된 배지에서 아미노산을 합성할 수 없어 증식하지 못하지만(x는 점 돌연변이가 있음을 뜻함), LEU과 Uracil (URA)이 결핍된 배지에서는 스스로 아미노산을 합성하여 증식할 수 있다. 상동인 반수체 효모 “Mom”과 “Dad”의 유전자형을 확인하기 위하여 Yeast Tetrad Dissection & Replication기법을 사용하였다. “Mom”과 “Dad”의 유전자형을 가진 반수체 효모를 각각의 교배형에 맞게 교배하고 감수분열을 유도하였다. 현미경에 설치된 Yeast Tetrad Dissection 전용 바늘을 이용하여 4개의 포자를 YPD 고체배지 위에 분리하여 나열하고 30°C에서 2일간 배양하였다. YPD 고체배지의 크기보다 약간 작은 지름의 평평한 원통에 100% 면을 올려 놓고 그 위에 YPD 고체배지를 뒤집어서 찍어낸 다음 HIS, LEU 그리고 URA가 각각 결핍된 고체배지를 하나씩 찍어서 복사하였다. 또한 각 포자의 교배형을 확인하기 위하여 YPD 액체배지에 교배

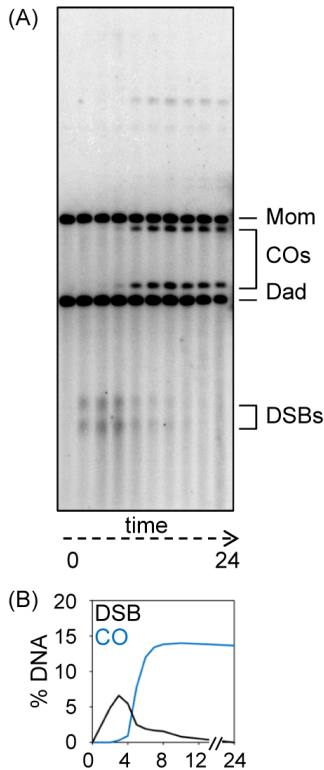


**Fig. 2.** Spore viability and yeast tetrad dissection. (A) Spore viability of wild type yeast. (B) The image shown is separated tetrad spores of yeast after mating. Parental homologs, “Mom” and “Dad” distinguished via HIS, LEU and URA lacking plate. \* sv; spore viability with the number of grown spores from dissected tetrads.

형이 확실한 반수체 효모를 배양하여 YPD 고체배지에 도달한 것을 복사하고 30°C에서 1일간 배양하였다 (Fig. 2B). 이 실험기법은 *HIS4LEU2* “hotspot”을 지닌 돌연변이를 만드는 데 매우 유용한 방법으로 돌연변이를 만들고자 하는 단백질에 아미노산 혹은 항생제 내성 유전자로 표지하여 각각의 선택배지에서 손쉽게 돌연변이의 포함 여부를 알 수 있으며, 서로 다른 교배형과 융합하여 이배체 세포가 되면 스스로 아미노산을 합성하여 아미노산이 결여된 배지에서 성장할 수 있으므로 이를 통해 반수체 세포의 교배형 역시 확인할 수 있다 (Fig. 2B).

**1차원 젤 전기영동 분석**

*HIS4LEU2* “hotspot”에서 발생한 재조합 중간체와 재조합 결과물들은 젤 전기영동을 통하여 분석하였다 (Hunter and Kleckner, 2001; Oh *et al.*, 2007). 본 연구에서는 하나의 이중 가닥 절단이 높은 빈도로 발생하는 *HIS4LEU2* “hotspot”을 지닌 야생형 출아 효모 균주를 사용하였다. 동조화된 모든 세포에 일제히 감수분열을 유도하면 이중 가닥 절단과 그 이후의 과정에서 생성되는 중간체와 재조합 결과물을 전시간에 걸쳐 관찰할 수 있다. 감수분열을 유도하여 각 시간 별로 수확한 세포에서 gDNA를 추출하였다. gDNA를 *XhoI* 제한효소로 처리하여 “Mom”과 “Dad”에서 유래한 *HIS4LEU2* “hotspot”을 각기 다른 크기로 절단하였고 이를 아가로스 젤 전기영동으로 분리하였다. 재조합이 진행



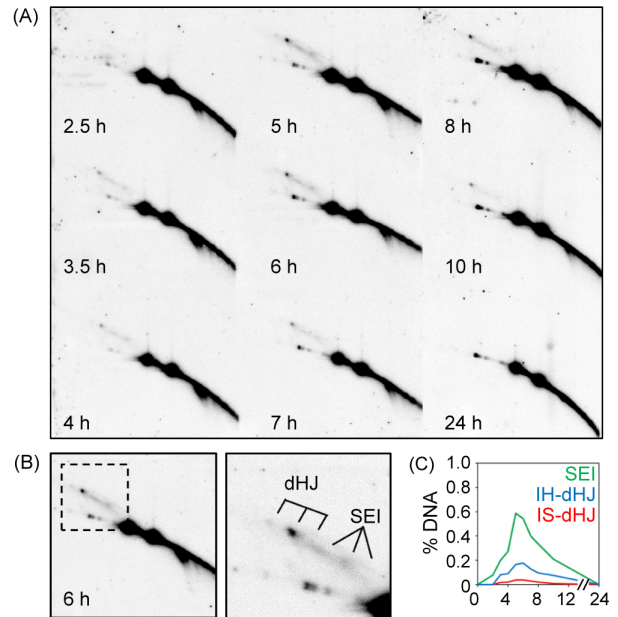
**Fig. 3.** One-dimensional (1-D) analysis. (A) Image of 1-D analysis gel hybridized with probe A showing the DSBs and crossovers. (B) Quantification of DSBs and crossovers.

되고 있는 DNA는 전체 중의 일부이며 “hotspot”이 외에도 *XhoI*에 의하여 절단된 여러 다른 조각들이 혼재하고 있기 때문에 “hotspot”의 특정 염기서열을 인식할 수 있는 Probe와 방사성 동위원소 ( $P^{32}$ -dCTP)를 이용하여 Southern 분석법을 수행하였다.

1차원 젤 전기영동을 통하여 각 시간 별로 발생한 이중 가닥 절단과 재조합 결과물을 DNA크기로 분리하였고 발생시기와 비율을 정량하였다. 이중 가닥 절단은 감수분열을 유도한지 2.5 h부터 관찰되었으며 3.5 h에 최고치에 이르렀고 시간이 지남에 따라 점차 감소하였다 (Fig. 3C). 이중 가닥 절단은 일종의 DNA 손상으로 세포는 이를 수리하기 위한 기전으로 상동 재조합을 통해 복구를 시도한다. 이중 가닥 절단이 수리되어 점차 사라짐에 따라 재조합 결과물이 보이기 시작하였고 이중 가닥 절단이 모두 수리되면 더 이상 재조합 결과물의 증가는 없었다.

**2차원 젤 전기영동 분석**

DNA에 이중 가닥 절단이 발생하면 손상된 DNA를 수리하기 위한 기전으로 3' 말단의 단일 가닥이 재절단에 의하여 노출되고, 이 말단은 상동서열을 찾아 침투하여 이중 홀리데이 접합을 형성한다. 이중 홀리데이 접합으로 DNA 가닥이 서로 교환되고 결국에는 해리되어 재조합산물을 생성한다. 2차원 젤 전기영동은 이중 가닥 절단과 재조합 결과물 사이의 중간 과정을 분석하기 위한 방법으로 재조합의 중간단계에 있는 DNA가 3' 단일 가닥 말단을 노출시켜 상동서열을 찾아 침투하는 것과 이중 홀리데이 접합의 형성을 각 시간 별로 관찰할 수 있다. 1차원 아가로스 젤 전기영동을 실시하고 각 lane을 잘라내어 이를 90°의 각도로 돌려 한번 더 전기영동을 실시하였다. 3' 단일 가닥이 상동서열을 찾아 침투하고 있는 DNA와 이중 홀리데이 접합으로 연결



**Fig. 4.** Two-dimensional (2-D) analysis. (A) Image of 2-D analysis gel hybridized with probe A showing the dHJs, SEIs. (B) Image of detailed of 6hr in Fig. 4A. (C) Quantification of SEIs and dHJs.

되어 있는 DNA는 가지를 형성하고 있어 아가로즈 젤에 EtBr을 함유시키면 재조합 중간체의 구조에 따라 이동되는 속도에 차이를 보이므로 각 상태 별로 분리해낼 수 있다. 1차원 젤 전기영동 분석과 마찬가지로 Southern 분석법을 수행하여 재조합 중간체를 분석하였다(Fig. 4A).

**교차성 및 비교차성 재조합 산물**

이중 가닥 절단이 재절단 되어 노출된 3' 단일 가닥 말단이 상동 염색체의 상동서열을 찾아 침투하여 이중 홀리데이 접합을 형성하고, 이 접합이 해리되는 방향에 따라 DNA 가닥이 완전히 교환된 교차성 재조합 산물과 일부만 교환된 비교차성 재조합 산물이 만들어진다.

감수분열을 유도하여 각 시간 별로 수확한 세포에서 추출한 gDNA를 *XhoI*과 *NgoMIV* 제한효소로 처리하여 1차원 젤 전기영동을 실시하면 교차성 재조합 산물과 비교차성 재조합 산물을 확인할 수 있다(Fig. 5).

**고찰**

본 연구에서는 *HIS4LEU2* “hotspot” 시스템을 이용하여 감수분열을 유도하고 재조합 과정에서의 DNA를 분석하여 어떻게 재조합이 진행되는지를 관찰하였다. 동조화된 세포에 일체히 감

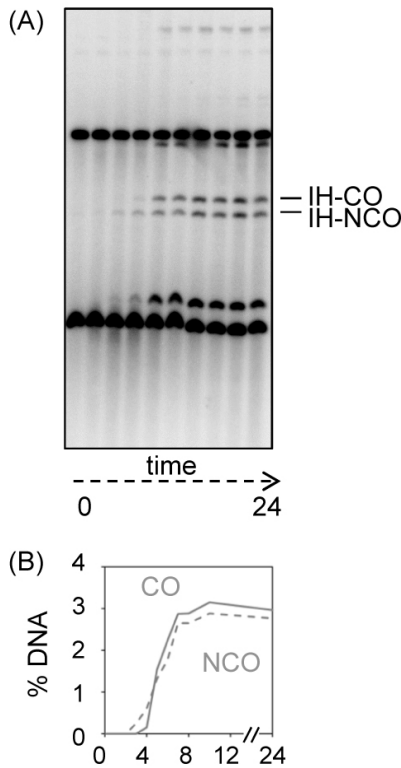
수분열을 유도시킨 뒤 gDNA를 추출하였고 1차원 또는 2차원 젤 전기영동을 통해 재조합 중간과정의 DNA가 어떤 형태로 존재하는지 분석하였다. “Mom”과 “Dad”의 DNA를 제한효소로 처리하여 각각 다른 길이의 절편으로 절단하고 이것을 정량하여 재조합의 진행과정을 모니터링하였다. 1차원 젤 전기영동으로 DNA를 분석한 결과 이중 가닥 절단은 3.5 h에서 최대치에 도달한 후 점차 감소하였고 이와 반대로 재조합 결과물들은 점차 증가하다가 이중 가닥 절단이 감소하는 시기의 3시간쯤 후에는 더 이상 증가하지 않았다. 이것은 이중 가닥 절단이 상동재조합을 통하여 회복되어 재조합 결과물들이 생성되었음을 의미한다(Fig. 3). 2차원 젤 전기영동을 통해 이중 가닥 절단의 형성부터 재조합 결과물이 만들어지기까지의 재조합 중간체를 분석하였다. 이중 가닥 절단이 관찰된 시간 이후에 노출된 3' 단일 가닥이 상동염기서열을 찾아 침투한 상태의 DNA가 관찰되었고 이중 홀리데이 접합을 형성한 상태의 DNA가 차례로 관찰되었다(Fig. 4). 이것은 하나의 이중 가닥 절단이 3' 단일 가닥 침투의 과정을 거쳐 이중 홀리데이 접합을 형성하는 연속된 과정이라고 할 수 있다(Fig. 1C). 결국에는 이중 홀리데이 접합이 해리되어 DNA 재조합과정이 완료된다.

*HIS4LEU2* “hotspot”은 Yeast Tetrad Dissection & Replication 기법을 통해 선택배지에서 손쉽게 선별할 수 있으며 재조합과 관련된 여러 돌연변이 균주를 만드는데 있어서도 매우 간편한 방법이다(Fig. 2B). 이를 이용하여 돌연변이 균주의 유전자형이 재조합 과정에 미치는 영향을 알아볼 수 있다.

이중 가닥 절단을 비롯한 재조합 중간체와 재조합 결과산물의 발생시기와 비율을 야생형 세포와 비교하여 정량적인 분석을 실시하면 돌연변이 균주가 재조합 과정의 어떤 단계에 영향을 미치는지를 알아볼 수 있다. 향후, 재조합 관련 단백질의 돌연변이 균주를 *HIS4LEU2* “hotspot” 시스템을 이용하여 1차원 및 2차원 젤 전기영동 기법으로 분석하면 재조합에 관련된 단백질들의 경로와 기능을 밝히는데 유용할 것으로 사료된다.

**적요**

유전자 재조합체는 상동염색체간의 예정된 DNA 가닥 전이와 교환이 이루어지는 상동염색체 재조합 과정에 의하여 생성된다. 이 재조합 경로는 DNA 이중 가닥 절단(double-strand breaks, DSBs)에 의해서 개시되며, 전이 과정의 중간단계에서 DNA의 구조적 변이 중간체인 단일 가닥 침투(single-end invasions, SEIs)와 이중 홀리데이 접합(double-Holliday junctions, dHJs)이 형성되어 교차성(crossover, CO) 혹은 비교차성(non-crossover, NCO) 결과물이 만들어진다. 본 연구는 이중 가닥 절단, 단일 가닥 침투, 이중 홀리데이 접합과 같은 재조합 중간체와 재조합 결과물의 구조분석에 초점을 두고, 이를 출아효모에서 인위적으로 이중 가닥 절단을 발생시킬 수 있는 *HIS4LEU2* “hot spot”을 이용한 물리적 분석방법으로 감수분열 재조합 중간체를 규명하였다. 물리적 분석을 위하여 동조화 된 세포에 감수분열을 유도한 후 hot spot 자리를 인식하는 제한효소를 처리하면, 재조합 중간체를 형성하고 있는 DNA 단편들을 Southern 분석법을 통해 탐지



**Fig. 5.** Crossover/Non-crossover (CO/NCO) analysis. (A) Image of CO/NCO analysis gel hybridized with probe A showing the crossover (CO) and non-crossover (NCO). (B) Quantification of CO and NCO.

및 정량 할 수 있다. 본 연구는 이 시스템으로 감수분열에서 이중 가닥 절단으로부터 기인하는 단일 가닥 침투, 이중 홀리데이 접합 그리고 교차성/비교차성 재조합체로 전이되는 DNA의 구조 다형을 분석할 수 있음을 제시한다.

### 감사의 말

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2012R1A1A1010578).

### 참고문헌

- Cao, L., Alani, E., and Kleckner, N.** 1990. A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell*. **61**, 1089–1101.
- Croes, A.F.** 1967. Induction of meiosis in yeast. II. Metabolic factors leading to meiosis. *Planta*. **76**, 227–237.
- Fowell, R.R.** 1969. Sporulation and hybridization of yeasts, pp. 303–386. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds.), *The yeasts*. vol. 1. Academic Press, Inc. New York, N.Y., USA.
- Freese, E.B., Chu, M.L., and Freese, E.** 1982. Initiation of yeast sporulation by partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J. Bacteriol.* **149**, 840–851.
- Goldstein, A.L. and McCusker, J.H.** 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1541–1553.
- Hunter, N.** 2006. Meiotic Recombination. *Molecular Genetics of Recombination*, pp. 381–442. In Aguilera, A. and Rothstein, R. (eds.), *Topics in Current Genetics*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Hunter, N. and Kleckner, N.** 2001. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell*. **106**, 59–70.
- Keeney, S.** 2001. The mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **52**, 1–53.
- Keeney, S. and Kleckner, N.** 1997. Meiosis specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*. **88**, 375–384.
- Kim, K.P., Weiner, B.M., Zhang, L., Jordan, A., Dekker, J., and Kleckner, N.** 2010. Sister cohesion and structural axis components mediate homolog bias of meiotic recombination. *Cell*. **143**, 924–937.
- McCusker, J.H. and Haber, J.H.** 1977. Efficient sporulation of yeast in media buffered near pH 6. *J. Bacteriol.* **132**, 180–185.
- Miller, J.J.** 1957. Metabolism of yeast sporulation. II. Stimulation and inhibition by monosaccharides. *Can. J. Microbiol.* **3**, 81–90.
- Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S.** 2005. Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* **436**, 1053–1057.
- Oh, S.D., Lao, J.P., Hwang, P.Y., Taylor, A.F., Smith, G.R., and Hunter, N.** 2007. BLM ortholog, Sgs1, prevents aberrant crossing-over by suppressing formation of multichromatid joint molecules. *Cell*. **130**, 259–272.
- Roth, R. and Halvorson, H.O.** 1969. Sporulation of yeast harvested during logarithmic growth. *J. Bacteriol.* **98**, 831–832.
- Schwacha, A. and Kleckner, N.** 1997. Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog only pathway. *Cell*. **90**, 1123–1135.
- Wanat, J.J., Kim, K.P., Koszul, R., Zanders, S., Weiner, B., Kleckner, N., and Alani, E.** 2008. Csm4, in collaboration with Ndj1, mediates telomere led chromosome dynamics and recombination during yeast meiosis. *PLoS Genet.* **4**, e1000188. doi:10.1371/journal.pgen.1000188.
- Zickler, D. and Kleckner, N.** 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 603–754.