

Cloning된 효모의 RNAI 유전자의 특성에 관하여

송영환, 김대영, 김진경

부산수산대학교 미생물학과

효모의 RNAI 유전자는 RNA processing에 관여 하는지 혹은 RNA transport에 관여 하는지 아직까지 유전자의 기능이 정확히 알려져 있지 않은 실정이다. 효모의 RNAI 유전자의 기능을 파악하기 위한 방법으로 본 연구에서는 *rna1-1* mutant gene을 cloning하여 이에 대한 DNA sequence를 조사함으로써 RNAI 유전자와 *rna1-1* 유전자의 차이점을 이해하고자 하였다. *rna1-1* marker를 갖는 yeast strain(R49)로부터 genomic DNA를 추출하여 이를 BglII로 절단하여 genomic southern blotting을 행한 결과 wild type의 경우와 동일하게 3.4 kb에서 hybridization되는 signal을 얻었으며, RNAI 및 *rna1-1*이 yeast genome내에 single site로 존재함을 보여 주는 결과를 얻었다. mutant strain으로부터 얻은 3.4 kb의 BglII fragment를 pUC19의 BamHI site에 subcloning하여 transformant들을 얻었고, wild type RNAI 유전자를 probe로 하여 *rna1-1* mutant 유전자를 cloning할 수 있었다. pUC19에 cloning된 RNAI 유전자 및 *rna1-1* 유전자로부터 다양한 Bal31 유도체를 얻어 이들에 대한 염기 서열을 비교한 결과 transcription initiation site에서 부터 down stream쪽으로 17 아미노산위치에 TCC가 TTC로 대치되어 있었으며 그 결과 serine이 phenylalanine으로 변환되는 결과를 얻었다. Wild type RNAI gene의 5'-region에는 3군데의 TATA-like sequence가 true TATA box인지 확인하기 위하여 Bal31 deletion에 의해 -103nt까지 deletion된 유도체를 얻었으며 Δ RNAI, *rna1-1*, 81-2-6 clone이 *rna1-1* allele와 complementation한지 확인하였으나 Δ RNAI은 TS-complementation을 하지 못하였다. 따라서 현재까지 TATA-box라고 알려진 부분은 promoter로 작용하지 못함을 확인하였다.

Key words : RNA I gene, *rna1-1* gene, colony hybridization, DNA sequencing

Bacteria를 주 대상으로 하던 분자생물학의 범위는 유전자 재조합기술의 발달로 인하여 eukaryotes에 유전자 재조합기술을 적용하려는 시도가 꾸준히 계속되어, 1980년도 초반부터 eukaryotes중 유전학적 체계가 가장 잘 알려져 있는 *Saccharomyces cerevisiae*를 중심으로 분자생물학적 연구의 영역을 확대하게 되었다. 한편 *Saccharomyces cerevisiae*의 RNA splicing에 관한 분자생물학적 연구를 수행하기 위해 *rna1-1* mutation에 관심을 가지게 되어 이것이 RNA splicing과 어떠한 연관 관계를 갖는지를 밝히기 위해 RNA I 유전자를 cloning하게 되었다(Song *et al.*, 1986 ; Song, 1988 ; Song *et al.*, 1989).

*Saccharomyces cerevisiae*의 RNAI 유전자의 온도감수

성 돌연변이주는 성장가능 온도(permissive temperature)인 23°C에서는 정상적인 성장을 하나, 성장억제 온도(nonpermissive temperature)인 37°C에서는 intervening sequence를 갖는 transfer RNA들의 전구물질들을 핵내에 축적시키는 현상을 보인다(Hutchison *et al.*, 1969 ; Shiokawa and Pogo, 1974). *rna1-1* 돌연변이는 tRNA, mRNA, rRNA의 생성을 방해할 뿐만 아니라, mRNA와 rRNA가 핵에서 세포질로의 이동 또한 방해하는 conditional pleiotropic effect를 보여준다(Hopper *et al.*, 1978 ; Hutchison *et al.*, 1969 ; Shiokawa and Pogo, 1974). 제한온도에서 *rna1-1* 돌연변이는 새로합성된 RNA의 축적속도를 빠르게 감소시킨다(Hutchison *et*

al., 1969; Shiokawa and Pogo, 1974). 새로 합성된 RNA의 60%를 핵속에 축적시킨다(Hutchison *et al.*, 1969). 하지만 *Saccharomyces cerevisiae*의 RNAI 유전자는 RNA processing에 관여하는지 혹은 RNA transport에 관여하는지 아직까지 유전자의 기능이 정확히 알려져 있지 않은 실정이다. 이미 RNAI 유전자는 cloning되어 있고 RNAI 유전자의 기능을 밝히려는 연구가 많이 진행되고 있다(Song *et al.*, 1989; Atkinson *et al.*, 1985; Traglia *et al.*, 1989). 그러나 현재까지 RNAI 유전자의 명확한 기능은 밝혀져 있지는 않은 실정이다.

본 연구에서는 *rna1-1* mutation의 특성을 연구하여 RNAI 유전자의 특성을 파악하고자 하였다. *rna1-1* mutant yeast strain(R49)로부터 3.4Kb에 해당하는 BglII fragment를 갖는 recombinant들을 확보하고 이들을 wild type의 RNAI 유전자를 Digoxigenin으로 표지하여 probe로 이용하였으며, colony hybridization에 의해 *rna1-1* mutant 유전자를 cloning하고자 하였으며 이에 대한 DNA sequence를 조사함으로써 RNAI gene과 *rna1-1* gene과의 차이점을 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

Yeast total DNA의 분리

yeast DNA를 순수분리하기 위해서 Cryer의 방법(Cryer *et al.*, 1975)을 변형하여 사용하였으며 DNA를 분리할 효모균주를 500ml의 YEPD에 stationary phase까지 배양하여 6.000×10^9 에서 1분간 원심분리하여 균체를 수확 후 cell wall lytic enzyme인 zymolyase를 이용하여 yeast genomic DNA를 추출하였다.

E. coli plasmid DNA 분리방법

실험에 사용한 각종 plasmid를 추출하기 위하여 Terific Broth(Sambrook *et al.*, 1989)를 이용하였으며 maximum yield of high quality plasmid DNA 분리 방법(Liszewski, 1989)에 의하여 plasmid DNA를 추출하였다.

*E. coli*의 형질전환

E. coli JM109, *recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA* 96, *relA1*, *thi4*(*lac-proAB*), 「F' *traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*⁺*ZM*」를 host cell로 이용하였으며 Bio Rad *E. coli* pulser 0.1cm cuvette에 넣고 25uF, 200Ω에서 1.8KV로 처리하여 한번의 pulse를 가하여 electroporation을 행하였다.

Nucleic Acid Labeling and Detection

rna1-1 유전자의 선별을 위하여 DNA의 labeling과 detection은 Boehringer Mannheim사의 DIG DNA Labeling and Detection Kit를 이용하였으며 High density colony hybridization(Hanahan and Meselson, 1989) 방법에 따라 screening 하였다.

DNA 염기 배열순서의 결정

Cloning된 유전자의 염기서열은 United states Biochemical사의 Sequenase Version 2.0Kit를 이용하여 di-deoxy-chain termination method(Sanger *et al.*, 1979)를 변형한 방법을 사용하였으며 ³²S-dATP는 Amersham사에서 부터 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

Yeast total DNA의 준비

rna1-1 유전자를 cloning하기 위하여 *rna1-1* marker를 갖는 R49 strain으로 부터 total yeast DNA를 분리하였다. *Saccharomyces cerevisiae*의 게놈의 크기는 3.0×10^7 이므로(Zilsel *et al.*, 1992) 0.7% agarose Gel상에서 *E. coli* genomic DNA와 비교한 결과 약간 위에 band가 나타나는 것으로 보아서 알려진 *Saccharomyces cerevisiae* 게놈 크기와 비슷하고 그것의 온전성을 확인 하였다.

Yeast DNA BglII 절단

약 20kb 이상의 size를 갖는 yeast DNA를 BglII로 완전 절단 하였으며 4.55Kb에서 아주 진하게 나타나는 band를 확인할 수 있었다. 이는 100~200 copy의 tandem repeat로 존재하고 9.08Kb의 repeat unit를 갖는

yeast rDNA상에 존재하는 BglII fragment가 나타나는 것이다(Peter *et al.*, 1991). 4.55Kb의 band가 선명하게 생성되는 것을 확인함으로써 genomic DNA가 full digestion 되는 것을 간접적으로 확인 할 수 있는 indicator로 이용하였다.

Southern Blotting

rnal-1 gene을 cloning 하기 앞서 yeast DNA를 Bgl II로 절단하고 RNA I 유전자에 포함되어 있는 EcoRV-BamH I (450 bp fragment, Fig. 1의 lane 1의 가장 작은 fragment)를 probe로 하여 Southern hybridization하였다. Fig. 1의 오른쪽 panel에 나타난 바와 같이 YEpr-RNA I (81-2-6)의 경우 2개의 fragment에서 강한 signal이 나왔으며 1.32Kb의 small fragment에서는 전혀 hybridization signal이 나타나지 않았다. 또한 3.4kb에

해당하는 fragment는 RNA I gene이 완전히 포함되는 부분이며 EcoRV-BamH I fragment(450bp)는 여기에 포함되어 있다. lane 1의 EcoRV-BamH I의 경우에도 450bp에서 signal이 나타났으며 다른 band에서도 signal이 나타났다. 이러한 결과가 hybridization시 stringency를 낮추었기 때문에 나타나는 결과라고 볼 수 있으나, lambda DNA(lane 3)의 경우 전혀 hybridization signal이 없음으로 보아 사용한 probe와 homology가 있는 것으로 보인다. lane 4에 있는 것처럼 BglII로 절단한 yeast DNA에서는 3.4Kb에 단 하나의 band가 나타나고 이 band는 4.5Kb의 ribosomal DNA fragment바로 아래 위치함을 알 수 있었다. 즉, rnal-1 유전자 및 RNA I gened은 yeast genome상에서 single copy로 존재함을 알 수 있으며, lane 2의 두번째 fragment와 정확히 일치함을 알 수 있었다.

Library의 제조

rnal-1 유전자를 cloning하기 위하여 3.4kb의 BglII fragment를 분리하여 이를 passenger DNA로 사용하였으며, pUC19를 BamH I으로 절단하고 calf intestinal alkaline phosphatase를 처리한 것을 vector로 사용하였다.

Ligation sample의 transformation 결과 4×10^4 개의 recombinant를 확보할 수 있었으며 평균 insert size를 알아보기 위하여 임의로 여러개의 colony를 선별하여 plasmid DNA를 분리하여 HindIII로 확인한 결과 약 3~4kb의 insert가 삽입되어 있음을 알 수 있었다.

Colony hybridization

제조된 library에서 rnal-1 유전자를 cloning하기 위하여 직경 82mm의 plate에 약 5×10^4 개의 recombinant colony를 도말하여 high density colony hybridization을 행하였다. probe는 RN.11 유전자의 내부에 존재하는 1.5 kb에 해당하는 HindIII fragment를 elution하여 사용하였다.

Fig. 2에서 나타난 바와 같이 high density colony hybridization에 의해 positive signal을 갖는 8개의 clone

Fig. 1. Genomic southern hybridization with DIG labeled 3.4kb BglII fragment of pUCRNAI for identifying the single copy of 3.4kb fragment which contains rnal-1 mutant gene.

lane 1 : YEpr24RNAI(81-2-6)-EcoRV/BamH I digestion
lane 2 : YEpr24RNAI(81-2-6)-BglII digestion
lane 3 : Lambda DNA digested with EcoRI/HindIII as size marker
lane 4 : Yeast DNA(containing rnal-1 allele)-BglII digestion

Fig. 2. High density colony hybridization with DIG labeled 3.4kb BglIII fragment for screening rna 1-1 mutant clone.(Panel A) 2nd screening of rna1-1 mutant clone are shown in panel B.

을 선별하여 이로부터 2차 screening을 수행하여 분명하고 뚜렷하게 구분되는 6개의 clone을 선별하였다.

선별한 recombinant중에서 DNA를 분리하여 HindIII로 절단하여 wild type RNA I 전자를 HindIII로 절단한 것을 marker로 사용하여 확인한 결과 동일한 1.55kb의 band를 확인할 수 있었으며 YEpRNA I (81-2-6), pBR 322 RNA I을 HindIII로 절단하여 비교하였을 때도 동일한 결과를 보았다. 또한 HindIII/BamHI으로 절단하여 확인한 결과, 선별된 recombinant는 3.4kb rna1-1 유전자를 포함하고 있음을 확인하였고 이를 pUC rna1-1이라 명명하였다. 또한 위의 반응에서 clone된 pUCrna1-1은 RNAI 유전자와는 orientation이 반대로 subclone

되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

rna1-1 유전자의 제한지도 작성

clone된 rna1-1 plasmid를 각종 제한효소로 절단하였다. 또한 위의 결과, 작성된 제한효소지도를 Fig. 3에 나타내었다. 제한효소지도 작성 결과, RNA I 유전자와 mutant rna1-1 유전자 사이에는 별다른 차이점을 찾지 못하였으므로 4개의 염기를 인식하는 Sau3A I으로 반응한 결과 역시 동일한 결과를 나타내었다.

Bal31 exonuclease에 의한 deletion

rna1-1과 RNA I 유전자 사이에는 제한 효소지도상에는 특별한 차이가 나타나지 않으므로 5'-flanking sequence와 coding region의 DNA sequence를 비교해 보고자 하였다. 따라서 Bal31 exonuclease에 의한 유도체들이 요구되어졌다.

Bal31 1unit는 33μg의 linear duplex pGEM DNA를 10분당 30℃에서 400bp씩 deletion된다는 조건에 맞추어 실험을 행하였다.

먼저 pUCRNA I 유전자를 pUC19에 존재하는 EcoRI site로 부터 deletion을 행하였으며 pUCrna1-1은 유전자 내부의 EcoRV site로 부터 deletion시켰다. 4T는 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60분으로 하였다. 이렇게 준비된 Bal31 유도체는 RNAI 유전자의 경우 다시 Xba I으로 절

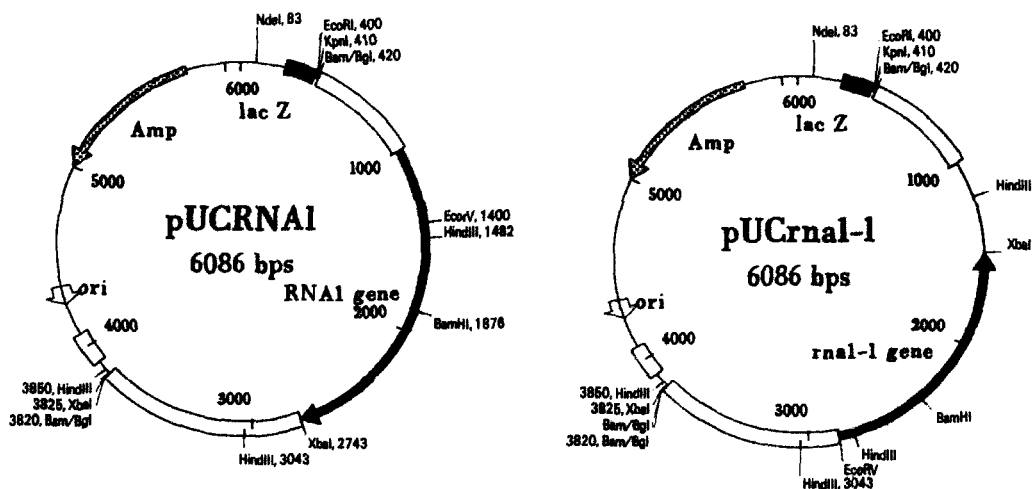


Fig. 3. Restriction map of recombinant plasmid containing RNAI and rna1-1 gene.

단하여 pUC19의 *sma* I, *xba* I site에 subcloning하고 *mal*-1 유전자는 self ligation 시켰다. 위에서 얻어진 Bal 31 유도체의 DNA를 분리하여 제한효소로 절단하여 확인한 결과 100 bp- 1kb까지 deletion된 다양한 Bal31 유도체를 확보할 수 있었다.

DNA염기 서열 분석

dideoxy chain termination방법에 의해 이미 밝혀진 RNA I 유전자의 염기서열과 clone된 *mal*-1의 5'-flanking 염기서열이 Fig. 4에 나타나 있다.

Fig. 4에서 나타난 바와 같이 transcription initiation에 중요한 역할을 하는 TATA box(Breathnach and Chambon, 1981)는 -69위치의 CATAATAT sequence로 추정되며, CAAT sequence(Bonoist *et al.*, 1980)는 -182 위치의 TCAAAT sequence로 추정된다. 그러나 RNA I 유전자에는 높은 transcription efficiency를 가지는 유전자에 나타나는 CT block(Dobson *et al.*, 1982)이나 Py-AAG sequence(Dobson *et al.*, 1982; Burke *et al.*, 1983) 등이 존재하지 않는다. 또한 wild type RNA I 유전자와 mutant *mal*-1 유전자를 비교한 결과 ATG transcription initiation codon으로부터 17번째 amino acid 위치에 TCC가 TTC로 mutation되어 있음을 확인할 수

```

NNNTGTGTAC CTATGTGCAA AATCCATCAA TTGTAGCGTT ACTGGTCTCT CATATTGATG  -360
AATCGACTGT GATCGGAGGA GCAGATGCAA AAGAAGGACA TCTCGTGGCG TTTCCTCTTT  -300
TGTGTAGTCT GGACCAACTT CTGATACTGA GCCCAGTGAG TTTTATTCCA AAACATTCTT  -240
GCCTCGGCGG TTCATAATGG TCTGTGAAGT CCTCTAGTCT TTTCCTGTTC TCGTGTGTGT  -180
TCATAATGTC AAATTCTACT TTTCATTTAA AGCTCTTAGT TTGTCATGG AATGCATGTC  -120
ACTATGCAGC TTGTGGGACA ATTAATGGAA AAAAATTTAT TAGGAAGATA TTGATCAAAAG  -70
GCATAATATC ACGGTAAAG GTGAATATAG GCCATTTTAA CAGGCTGTCT TTGAAACAG  -10

      MET ALA THR LEU HIS PHE VAL PRO GLN HIS GLU GLU GLU GLN
ATTTTAGCT ATG GCT AEC TTG CAC TTC GTT CCT CAG CAC GAG GAA GAA CAA

      PHE
VAL TYR SER ILE SER GLY LYS ALA LEU LYS LEU THR THR SER ASP ASP
GTT TAG TTC ATC TCT GGG AAG GCA CTC AAG TTA ACA ACC AGT GAC GAT
      TTC

      ILE LYS PRO TYR LEU GLU GLU LEU ALA ALA LEU LYS THR CYS THR LYS
ATC AAA OCA TAC CTG GAA GAA TTG GCA GCT TTG AAA ACC TGT ACC AAA

      LEU ASP LEU SER GLY ASN THR ILE GLY THR
TTA GAC CTT TCA GGG AAT ACA ATC GGT ACT

```

Fig. 4. Nucleotide sequence of RNA I gene including its flanking regions.

있었다. 또한 *mal*-1의 염기서열을 RNA I 유전자와 단지 두개의 아미노산의 mutation에 의해 온도 감수성 phenotype을 유발한다는 보고도 있어(Helen. M. *et al.*, 1989) 이러한 아미노산의 대치가 온도감수성 돌연변이를 유발한다는데 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

RNAI 유전자의 TATA-like sequence 분석

본 연구에서 coding region외에 다른 부분에서 Mutation site를 확인하기 위하여 *mal*-1 유전자의 5'-flanking sequence를 분석하였으나 5'-flanking sequence 상에는 RNAI gene 및 *mal*-1에서 변화가 없었다. 따라서 RNA I 유전자의 transcription상의 특성을 조사하기 위하여 5'-flanking region에 존재하는 3군데의 TATA-like sequence(Fig. 5)들이 TATA box로 작용하는 지를 확인하고자 하였다. 위의 실험을 진행하기 위하여 pUCRNAI을 Bal31 deletion에 의해 -103nt까지 deletion된 유도체를 얻었으며 pUC Δ RNA I이라 명하였다. 또한 R 49(trp1, *ura*3-52, *mal*-1)에 transformation하기 위하여 pYEP*mal*-1, pYEP Δ RNA I을 작성하였으며 그 과정은 Fig. 6에 나타내었다. pYEP*mal*-1, pYEP Δ RNA I, 그리고 YEPRNAI(81-2-6) 각각을 R49에 transformation한 결과 pYEP Δ RNA I은 TS-complementation을 하지 못하였다(Fig. 7). 따라서 현재까지 알려진 부분은 promoter로 작용하지 못함을 확인하였다.

```

      -100      -80      -60      -70
GAA  AAAAATTAT  TAGGAAGATA  TTGATCAAAG  GCATAATATC

      -80      -60      -40      -30
ACGGTAAAG  GTGAATATAG  GCCATTTTAA  CAGGCTGTCT

      -80      -10
TTGAAACAG  ATTTTATAGCT  ATG
                        Met

```

Fig. 5. The 5'-flanking region of Δ RNA I gene and three possible TATA-like sequence.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 지원(903-0401-019-2)에 의해 수행되었음.

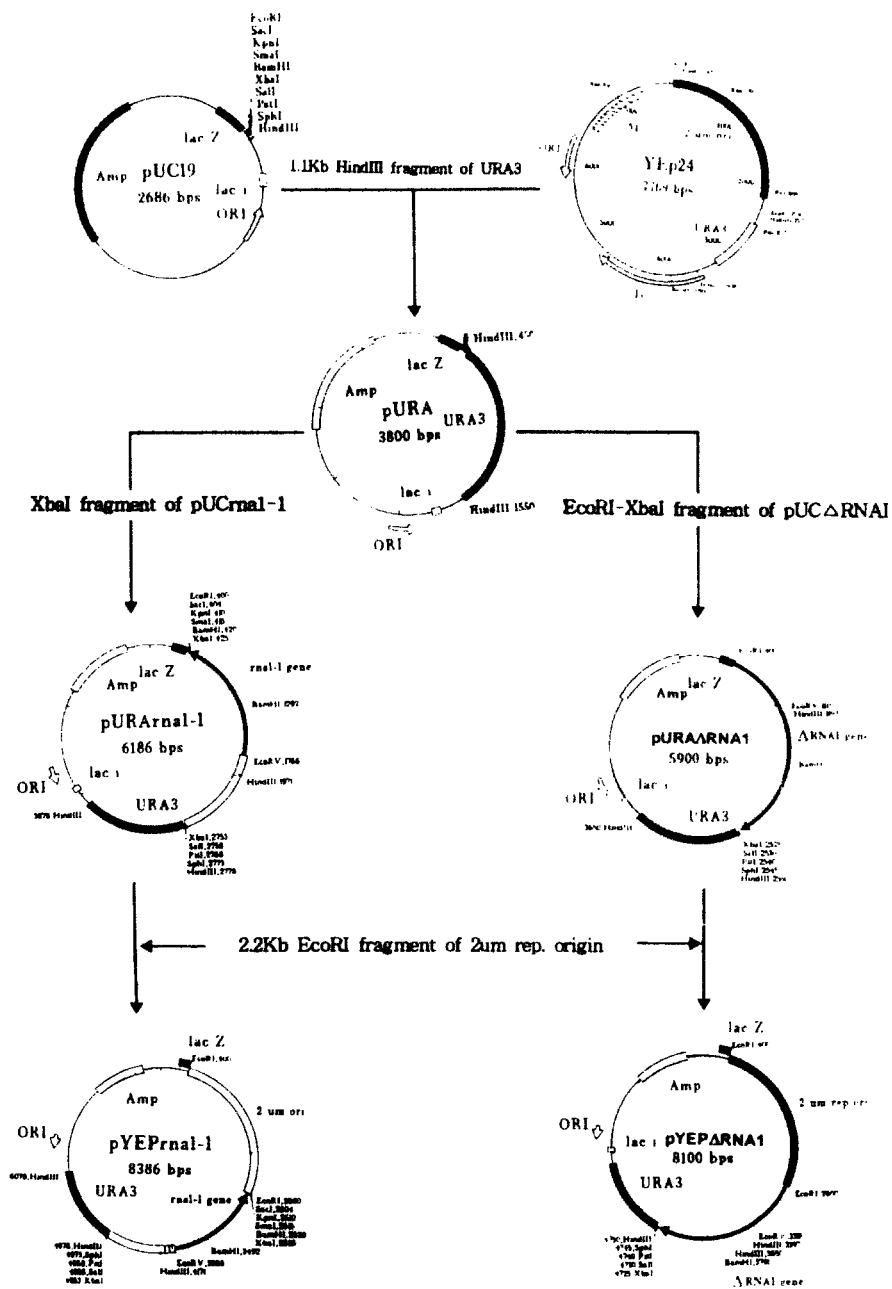


Fig. 6. Construction strategy for hybrid plasmids pYEPrnaI-1 and pYEPΔRNAI.

Fig. 7. Thermal sensitivity of three kinds of yeast transformants harboring pYEP Δ RNA I, pYEP-rna1-1, and wild type 81-2-6. pYEP Δ RNA I carrying -103nt in 5'-flanking sequence from ATG codon could not complement rna1-1 allele at 36°C.

참 고 문 헌

- Atkinson, N. and A. K. Hopper : Chromosome specificity of polysomy promotion by disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA I gene. *genetics* 1, 16 : 371~375, 1987.
- Atkinson, N. S., R. W. Dunst and A. K. Hopper : Characterization of an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene related to RNA processing : Cloning of RNA I and generation of a new allele with a novel phenotype. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 907~915, 1985.
- Beoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R. and Chambon, P. : The ovalbumin gene sequence of putative control regions. *Nucl. Acids Res.* 8 : 127~142, 1980.
- Breathnach, R., and Chambon, P. : Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50 : 349~383, 1981.
- D. Hanahan and M. Meselson : Plasmid Screening at High Colony Density Recombinant DNA Methodology. 267~275, 1980.
- D. R. Cryer, R. Eccleshall, and J. Marmur. : Methods Cell. Biol. 12~39, 1975.
- Didier, F. : Improved Phenol-Based Method for the Isolation of DNA Fragment from Low Melting Temperature Agarose Gels. *BioTechniques.* 13(1) : 24~26, 1992.
- Dobson, M. J., Tuite, M. F., Roberts, N. A., Kingman, A. J., Kingsman, S. M., Perkins, R. E., Conroy, S. C., Dunbar, B. and Forthergill, L. A. : Conservation of high efficiency promoter sequence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 10 : 2625~2637, 1982.
- Dower, William J., Miller, Jeff F. and Ragsale, Charles W. : High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electrophoration. *Nucleic Acids Research.* 16 : 6127~6145, 1988.
- Helen, M. K., Nigel, S. A. and Anita, K. Hopper. : Structural and Functional Analyses of *Saccharomyces cerevisiae* Wild-Type and Mutant RNAI Genes. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 2989~2999, 1989.
- Hopper, A., Banks, F. and Evangelidis, V. : A yeast mutant which accumulates precursor tRNAs. *Cell* 14 : 211~219, 1978.
- Hutchison, H. T., Hartwell, L. H. and McLaughlin, C. S. : Temperature-sensitive yeast mutant defective in ribonucleic acid production. *J. Bacteriol.* 99 : 807~814, 1969.
- Knapp, G., Beckmann, J., Johnson, P., Fuhrman, S. and Abelson, J. : Transcription and processing of intervening sequence in yeast tRNA genes. *Cell* 14 : 221~236, 1976.
- Knapp, G., Ogden, R., Peebles, C and Abelson, J. : splicing of yeast tRNA precursors : structure of the reaction intermediates. *Cell* 18 : 37~45, 1979.
- Legerski, R. J., J. L. Hodnett, and H. B. Gray, Jr. : Extracellular nucleases of *Pseudomonas* BAL31. III. Use of the double-strand deoxyriboexonuclease

- activity as the basic of a convenient method for the mapping of fragment of DNA produced by cleavage with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 5 : 14-45. 1978.
- Pardue, M. L. : "In situ hybridization". In : Hames, B. D. & Higgins, S. J.(eds). *Nucleic acid hybridization, a practical approach* ; IRL Press., Oxford, pp. 179~202. 1985.
- Peter, P., Agathe, S. and Christine, S. : 1991. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Method in Enzymology*. 194 : 169~182. 1991.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. K. : DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 5465~5467. 1977.
- Shing, Y. S. and Suraiya, R. A. : simple Procedure for Maximum Yield of High-Quality Plasmid DNA. *BioTechniques* 9(6) : 676~680. 1990.
- ShioKawa, K. and Pogo, A. : The role of cytoplasmic membrane in controlling the transport of nuclear messenger RNA and initiation of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71 : 2658~2662. 1974.
- Song, Y. H. : Studies on the molecular cloning of RNAI gene and its characterization of *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis in Ph. D degree Seoul Nat. Univ. 1988.
- Song, Y. h., S. S. Koh, Y. S. Rhee and H. S. Kang. : Cloning of RNA I gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. Jour. Microbiol.* 27(2) : 77~84. 1989.
- Southern, E. M. : Detection of specific sequence among DNA fragments separated by Gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503~517. 1975.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T. : A laboratory manual. *Molecular Cloning*. 1989.

Characterization of the cloned RNAI gene of *Saccharomyces cerevisiae*

Young Hwan Song, Dae young Kim and Jin Kyung Kim

Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan

The RNA I mutation of *Saccharomyces cerevisiae* is a recessive and temperature sensitive lethal mutation which interferes with the production of mRNA, rRNA, and tRNA. However, the precise role of RNAI gene have not been revealed until yet. We have cloned rna1-1 mutant gene from rna1-1 mutant yeast strain(R49 ; trp1, ura3-52, rna1-1). The 3.4kb BglII fragment of wild type RNAI clone(81-2-6) contains whole RNA I gene. The genomic southern blotting with BglII digested R49 genomic DNA as a probe shows the unique and identical band with wild type 3.4kb BglII fragment. Therefore, We prepared partial BglII genomic library(3~4kb BglII fragments) into BamH I site of pUC19. The rna1-1 mutant clone was screened with Digoxigenin(DIG)-labeled probe by high density colony hybridization. The 5'-flanking region of rna1-1 gene was sequenced by dideoxy chain termination method.

The 5'-flanking sequence of RNA I gene contains three TATA-like sequence ; TAATA, TATA and TTTTAA at position of -67, -45, and -36 from first ATG codon respectively. The 5'-flanking region of wild type RNA I gene from ATG codon to -103nt was deleted with Bal31 exonuclease digestion, generating pUC Δ /RNA I. After constructing pYEP Δ RNA I (consists of -103nt deleting RNA I gene, URA3 gene, 2 μ m rep. origin), pYEP $rna1-1$ (consists of Xba I fragment of pUC $rna1-1$, URA3 gene, 2 μ m rep. origin), and pYEPRNAI, each plasmid was transformed into host strain(*trp1*, *ura3-52*, *rna1-1*) by electroporation, respectively. Yeast transformant carrying pYEP Δ RNAI did not complement the thermal sensitivity of *rna1-1* gene. It means that TATA-like sequences in 5'-flanking region is not TATA sequence for transcribing RNAI gene and there may be other essential sequence in upstream region for the transcription of RNAI gene.