

베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 *Saccharomyces cerevisiae* 유전자의 클로닝

진은희 · 이동원 · 김진미 · 박희문*

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

Cloning of a Gene Involved in Biosynthesis of β -1,3-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*

Eun-Hee Jin, Dong-Won Lee, Jinmi Kim and Hee-Moon Park*

Department of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT: DNA fragment being able to restore *in vitro* activity of β -1,3-glucan synthase was cloned by transformation of the *Saccharomyces cerevisiae* LP353 mutant strain with genomic library constructed in the YCp50. For the selection of transformants which showed no detectable phenotype linked to recovery of the defect in β -1,3-glucan synthase activity, the colony autoradiography was successfully applied. The restriction map of the cloned DNA fragment, which is 8.5-kb in length, was constructed. Both the YEplac195 and the YCp50 carrying the 8.5-kb fragment increased β -1,3-glucan synthase activity of LP353 by two fold. Neither the YEplac195 nor the YCp50 carrying the 8.5-kb DNA fragment, however, complemented the temperature-dependent osmotic sensitivity which is another distinctive phenotype of LP353. Subcloning experiments indicated that a functional region was located in 4.8-kb *Bgl*III-*Kpn*I fragment. The 4.8-kb fragment was also able to increase the level of β -1,3-glucan content in cell wall as well as the resistance of cells to cell wall lytic enzyme, β -1,3-glucanase. The growth rate of the LP353 with 4.8-kb fragment was almost same as that of wild type strain in liquid medium with 1.2 M sorbitol at nonpermissive temperature. Taken these results together, the 4.8-kb fragment seemed to contain the *BGS2* gene for β -1,3-glucan synthase activity in yeast *S. cerevisiae*.

KEYWORDS: *S. cerevisiae*, β -1,3-glucan, Cloning

진균류의 세포벽을 구성하는 주된 성분은 탄수화물이며, 세포벽 건조 중량의 약 절반 가량이 베타-1,3-(β -1,3-)와 베타-1,6-글루칸(β -1,6-glucan)으로 구성되어 있다. 이중 베타-1,3-글루칸의(부분적으로 베타-1,6-글루칸 사슬을 갖고 있음) 함량이 베타-1,6-글루칸(부분적으로 베타-1,3-글루칸 사슬을 가짐)보다 더 높으며(Cabib 등, 1988), 나머지 세포벽 성분의 90% 이상은 mannoprotein으로 구성되어 있다(Balou, 1982).

베타-1,3-글루칸 합성효소(β -1,3-glucan synthase)는 원형질막에 부착되어 있으며, UDP-포도당(Uri-

dine diphospho-glucose)를 기질로 사용하여 포도당이 베타-1,3-결합으로 연결된 중합체를 합성하나 기존의 베타-1,3-글루칸을 primer로 요구하지는 아니한다(Shematek 등, 1980). 한편 이 효소는 zymogen 형태로 존재하지도 아니하며 2가 양이온을 요구하지도 아니하나, GTP(guanosine triphosphate) 및 그 유도체에 의하여 활성이 강하게 증진되는 특성이 있다(Shematek 등, 1980). 베타-1,3-글루칸의 합성에 GTP 등이 요구되는 특성은 *S. cerevisiae*를 비롯한 다수의 균류에서 공통적으로 발견되는 현상으로서(Kang 등, 1986), 균류의 세포벽 합성과정 중 특히 베타-1,3-글루칸 합성과정이 세포분열 주기와 연결되어 GTP-결합 단백질에 의하여 조절되는 것

*Corresponding author

으로 보여진다(Mol 등, 1994). 그런데 지금까지 베타-1,3-글루칸 합성체계에 대한 연구는 주로 생화학적 수준에서만 이루어졌는데, 이의 주된 이유는 효소의 분리 정제가 이루어진 바가 없고, 유전학적 연구에 필수적인 적절한 돌연변이체를 얻은 바도 없었기 때문이다.

극히 최근에 이르러 베타-1,3-글루칸 합성효소에 관련된 분자유전학적 연구들이 소수의 연구자들에 의하여 보고된 바 있다. 즉, Hong 등(1994)은 베타-글루칸합성을 저해하는 물질인 *Hansenula mrakii* K9 killer toxin에 내성을 갖는 *S. cerevisiae*의 돌연변이주를 얻고 이를 숙주로 사용하여, 약 1.5 kb 크기의 *KNR4*(*Hansenula mrakii* K9 killer toxin-resistant gene 4)를 클로닝하였는데, 이 유전자는 *S. cerevisiae*의 생존에 필수적인 것은 아니나, 이 유전자가 손상되면 세포벽의 베타-1,3-글루칸 함량이 낮아지며, *KNR4* 산물의 예상 아미노산서열은 핵단백질인 SMIp와 100% 동일함을 보고하였다. Kasahara 등(1994)은 역시 베타-글루칸 합성을 저해하는 *Hansenula mrakii*의 HM-1 killer toxin에 내성을 갖는 *S. cerevisiae* 돌연변이주를 얻어 클로닝을 시도하여 이 toxin에 내성을 갖게 하는 5.4 kb 크기의 *HKR1*(*Hansenula mrakii* killer toxin resistant gene 1)을 클로닝했으며, Southern과 Northern 분석결과 genome 내에 이 유전자가 한 copy 존재하며, 이 유전자를 과량 발현시키면 세포벽의 베타-글루칸 함량이 베타-글루칸 합성효소의 활성과는 상관없이 높아짐을 확인하고, 이 유전자의 산물이 베타-글루칸의 합성과정을 조절하는 것으로 추정하였다. 한편, Enderlin 등(1994)은 *Neurospora crassa*로부터 비허용온도에서 세포벽이 없는 원형질 상태로 존재하고 베타-1,3-글루칸 합성효소능도 손상된 돌연변이주를 숙주로 사용하여, 이를 회복시켜 주는 유전자의 클로닝을 시도한 결과, *S. cerevisiae*의 *KNR4*/*SMII* 유전자와 높은 상동성을 보여주는 2.6 kb의 *gs-1* 유전자를 클로닝하였다. 그런데, 앞서 보고된 *KNR4*, *HKR1* 및 *gs-1* 유전자는 모두 베타-1,3-글루칸 합성과정의 조절에 관여하는 유전자로 추정되기는 하나, UDP-포도당을 기질로 사용하는 베타-1,3-글루칸 합성효소 유전자는 아닌 것으로 보고되었다. Douglas 등(1994a, 1994b)은 균류의 베타-1,3-글루칸 합성효소의 저해물질로 알려진 echinocandin에 내성을 보

이는 *S. cerevisiae* 돌연변이주를 제조하고, 이를 숙주로 사용하여 유전자를 클로닝한 결과, echinocandin에 대한 내성이 베타-1,3-글루칸 합성효소를 암호화하고 있는 유전자(*etg1-1*)의 돌연변이에 의한 것이며, 이 유전자가 베타-1,3-글루칸 합성효소 복합체의 한 subunit(catalytic subunit)을 암호화하고 있다고 보고하였다.

이와같이 균류에서 베타-1,3-글루칸 합성효소 유전자를 클로닝한 보고는 극히 적다. 그런데, 본 실험실에서는 비허용 온도에서 삼투감수성을 나타내는 동시에 베타-1,3-글루칸 합성능이 현저히 손상된 *S. cerevisiae*의 돌연변이주를 얻어내어 그 특성을 조사하고(Song 등, 1992), 이를 유전적으로 분석한 결과, 베타-1,3-글루칸 합성능 저하는 최소한 두 가지의 유전자(*BGS1*, *BGS2*)의 돌연변이에 의하여 나타나는 것으로 보고한 바 있다(Lee 등, 1994a, 1994b). 따라서, 본 연구에서는 이 돌연변이주를 대상으로 베타-1,3-글루칸 합성에 관여하는 유전자의 클로닝을 시도하여, 돌연변이주의 베타-1,3-글루칸 합성효소능을 부분적으로 회복시켜주는 DNA 단편을 얻고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

조건설험에 사용한 균주 및 플라스미드는 Table 1에 나타난 바와 같다. 균주는 glycerol(20%)에 현탁한 후 -70°C 에서 보관하였으며, 필요 시에는 30°C 평판 배지에서 2~3일간 배양하여 사용하였다. *S. cerevisiae*용 완전배지(YEPD)의 조성은 Bacto-yeast extract 1%, Bacto-peptone 2%, dextrose 2%였으며 최소배지(YNB)의 조성은 Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67%, dextrose 2%였다. 선택배지(amino acid drop-out media)는 최소배지(YNB)에 각각의 아미노산을 첨가하여 사용하였다. 삼투안정제가 첨가된 배지는 완전배지 또는 최소배지에 2.4M sorbitol을 최종농도가 1.2M이 되도록 첨가하여 37°C 에서 배양하였다. 이때 삼투안정제인 sorbitol은 따로 멸균하여 식힌 후 배지에 첨가하였다. *E. coli* DH5a는 LB배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, agar 20 g per liter)를 사용하여 37°C 에서 배양하였다. 고체배지들은 1.5~2% 정도의 Bacto-

agar를 첨가하여 사용하였다.

형질전환 및 형질전환체의 선별

*S. cerevisiae*용 low-copy plasmid인 YCp50(Rose 등, 1987)을 이용하여 제조된 genomic library로 돌연변이주를 litium acetate 법으로 형질전환시켰다(Ito 등, 1983). 삼투안정제가 첨가되지 아니한 YEPD 고체배지에서 상대적으로 빠른 생장을 보이는 콜로니를 일차선별하여 이쭉시게로 새로운 YEPD 평판 배지에 접종하여 37°C에서 2일간 배양하였다. 이들 중, 베타-1,3-글루칸 합성능이 증진된 형질전환체를 선별하기 위하여, Bulawa 등(1986)이 사용한 콜로니 자기방사법을 변형하여 사용하였다. 즉, 적절한 크기로 콜로니가 형성된 평판배지에 여과지(Whatman paper No.14)를 올려 지긋이 눌러 콜로니를 부착시킨 후, 빈 페트리디쉬로 옮기고 적당량의 액상 YEPD 배지를 가하여 여과지를 충분히 적셨다. 이를 4시간 동안 37°C에서 배양한 다음 여과지를 Buchner funnel 위에 올려놓고 멸균수로 1회 세척하여 37°C에서 2시간 동안 말려 세포를 permeabilization시켰다. TGM 완충용액(50 mM Tris, 1 mM EGTA [ethylene-glycol-o,o'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid](pH 7.5), 1 mM 2-Mercaptoethanol)으로 여과지를 적신 다음, 1.57 μ M UDP-(¹⁴C)-glucose (specific activity 318 μ Ci/mol, NEN)가 포함된 베타-1,3-글루칸 합성효소 측정용 반응혼합액 1.5 ml을 가하여, 30°C에서 3시간 동안 반응시켜 UDP-(¹⁴C)-glucose가 여과지 상의 콜로니에 incorporation 되도록 하였다. 이 여과지를 2 ml의 10% TCA(trichloroacetic acid)/66% 에탄올 용액으로 옮겨 상온에서 30분간 방치하여 반응을 중지시킨 다음, 10 ml 66% 에탄올과 10 ml의 0.1N ammonium acetate/66% 에탄올로 각각 3번 세척한 후 말렸다. 잘 말린 여과지를 X-선 필름(Kodak)에 3~4일 동안 상온에서 감광시켰으며, 감광 후의 여과지를 Ponceau S(Sigma)로 염색하여 콜로니의 상대적인 균체밀도를 측정하였다. 각 콜로니로부터 방출된 방사능에 의하여 X-선 필름이 감광된 정도와 Ponceau S로 염색된 정도를 상호비교하여, 상대적으로 균체밀도는 낮으나 방사능은 강하게 방출된(즉, UDP-(¹⁴C)-glucose가 많이 incorporation 된) 것으로 보여지는 콜로니를 이차 선별하여, 재조합 플라스미드의 존재

유무 및 베타-1,3-글루칸 합성능을 조사하였다.

형질전환체의 확인 및 DNA조작

형질전환체의 확인 및 DNA조작은 Sambrook 등(1989)의 방법에 의거하여 시행하였다. 즉, 이차선별에서 얻어진 형질전환체들의 플라스미드를 분리하여 *E. coli* DH5 α 에서 증폭시키고, 이를 LP353에 재형질전환하여 얻은 균주를 37°C에서 배양한 후, 효소능을 확인하였다. 또한, 제한효소를 처리하여 YCp50 벡터내에 insert의 존재 여부와 크기를 조사하였다. 클로닝된 insert를 다양한 종류의 제한효소로 각각 처리하여 37°C에서 1시간 30분 동안 반응 후 전기영동하여 제한효소지도를 작성하였다.

유전자 copy 수에 따른 영향을 분석하기 위하여, YCp50(low-copy plasmid)에 클로닝된 8.5-kb DNA fragment를 제한효소 *Bgl*II와 *Sal*I을 처리하여 분리한 후, *Bam*HI과, *Sal*I으로 처리된 YEplac195(Gietz와 Sugino, 1988)과 ligation시켰다. 한편 클로닝된 8.5 kb DNA에 제한효소로 처리하여 구성된 절편을 YEplac195에 옮긴 후 이를 LP353에 형질전환시켜 얻은 균주들의 효소능을 측정하였다.

베타-1,3-글루칸 합성효소능의 측정

Shematek(1980)의 방법과 Song 등(1992)의 방법에 의거하여 UDP-(¹⁴C)-glucose을 기질로 베타-1,3-글루칸 합성효소능을 측정하였다. 효소 활성도는 표준조건하에서 1 mg의 단백질량에 해당하는 효소에 의해 1 mg의 UDPG를 incorporation 하는 경우를 1 unit으로 정량하였다. 단백질은 bovine serum albumin(Sigma)을 표준시료로 하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량하였다.

세포벽 구성성분 분석 및 분석

세포벽 구성성분의 분석 및 분석은 Leal-Morales와 Ruiz-Herrera(1985)의 방법을 변형한 방법(Song 등, 1992)에 의거하여 조사하였다. 각 분석의 당량은 phenol-sulfuric acid 법에 의해 측정하였다(Chaplin, 1986).

β -1,3-glucanase에 대한 내성 조사

사용한 균주들을 Hong 등(1994)의 방법에 따라, 5 ml 최소배지에서 30°C로 36시간 동안 배양한 후

1.2M sorbitol이 들어있는 50 ml 최소액체배지에서 37°C로 흡광도(OD600)=1.0~1.2가 될 때까지 기른 후 수확하였다. 수확한 세포는 10 ml 완충용액(1.2M sorbitol, 25 mM EDTA [pH 8.0])에 현탁하고 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 원심분리한 세포를 1.5 ml의 효소용 완충용액(1.2M sorbitol, 100 mM sodium citrate [pH 5.8], 10 mM EDTA)에 현탁시킨 후, β -1,3-glucanase(10 μ g/ml)를 100 μ l 첨가하고 30°C에서 3시간 반응하였다. 반응 후 반응액 100 μ l와 5% SDS 400 μ l를 섞은 후 30°C에서 30분간 반응하여 흡광도(OD600)를 측정하였다.

생장양상

조사비허용 온도 액체배지에서의 생장양상은 다양한 DNA insert를 갖는 형질전환체를 제조하고, 30°C 최소액체배지에서 하루동안 배양하여, 37°C, 1.2M sorbitol이 들어있는 50 ml 최소 액체배지로 옮긴 후 매 5시간마다 시료를 채취하여 600 nm에서 흡광도

를 측정하여 조사하였다. 평판배지 상에서의 생장 양상은 대상 균주들을 삼투안정제가 들어있는 최소 평판배지와 삼투안정제가 들어있지 않는 최소평판 배지에 도달한 후 각각 37°C와 30°C에서 3~4일간 배양한 후 조사하였다.

결과 및 고찰

콜로니 자기방사법(Colony Autoradiography)에 의한 형질전환체의 선별

본 연구진이 LP353의 온도의존적 삼투감수성형 질과 베타-1,3-글루칸 합성능 손상형질을 유전적으로 분석하여 본 결과(Lee 등, 1994b), 온도의존적 삼투 감수성은 한 가지 유전자의 손상에 의하여 야기된 것으로 밝혀졌으나, 베타-1,3-글루칸 합성능 손상형 질은 최소한 두 가지 이상의 유전자가 손상되어 나타나는 것으로 조사되었다. 그런데, 베타-1,3-글루 칸 합성능 손상형질에 연관된 표현형 중 형질전환체

Table 1. Strains and plasmids used in this work

Strain and Plasmid	Genotype or Phenotype	Reference or Source	
<i>S. cerevisiae</i>	GS-1-36	<i>MAT SUC2 mal gal2</i>	E. Cabib
	F760	<i>MATa ura3-52 lys2-801 trp1-1</i>	J. Kim
	KY8	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade6 Gal⁺</i>	
	PS211	<i>MATa SUC2 mal gal2 CUP1 Tos⁻ Gs⁻</i>	Song <i>et al.</i> ^a
	PKD188	<i>MATa/a ura3-52/URA3-52 lys2-801/ LYS2-801 ade6/ADE6 Gal⁺/gal2 suc2/SUC2 MAL/mal cup1/CUP1 Tos⁺/Tos⁻ Gs⁺/Gs⁻</i>	PS211×KY8
	LFD37	<i>MATa/a URA3-52/ura3-52 lys2-801/lys2-801 TRP1-1/trp1-1 Gal⁺/Gal⁻ Tos⁻/Tos⁺ Gs⁻/Gs⁺</i>	LP3×F760
	LP3	<i>MATa lys2-801 Gal⁺ Tos⁻ Gs⁻</i>	Segregant from PKD118
<i>E. coli</i>	LP353	<i>ura3-52 lys2-801 Tos⁻ Gs⁻</i>	Segregant from LFD37
	DH5a	<i>supE44, ΔlacU169(ϕ80lac ZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	
Plasmid	YCp50	Ap ^R URA3	
	YEplac195	Ap ^R URA2 lacZ	

^aDerived from GS-1-36 by EMS mutagenesis (Song *et al.*, 1992).

선별에 이용할 수 있는 표현형질이 없어, 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 유전자의 클로닝이 불가능하였다.

따라서, 본 연구진은 Raetz(1975)가 대장균으로부터 막지질 합성효소가 손상된 돌연변이체 선별을 위하여 사용한 바 있고, Bulawa 등(1986)이 키틴 생합성효소 활성이 손상된 *S. cerevisiae* 돌연변이주의 선별에 사용하였던 콜로니 자기방사법을 변형하여 베타-1,3-글루칸 합성능이 회복된 형질전환체의 선별을 시도하였다. 즉, 일반적으로 원형질막을 통과하지 못하는 nucleotide-sugar(여기서는 UDP-glucose)가 원형질막을 통과할 수 있도록, 여과지روی 옮긴 콜로니를 건조시켜 permeabilization시키고, 여기에 UDP-(¹⁴C)-glucose가 포함된 베타-1,3-글루칸 합성효소 반응액을 첨가하여 반응시키면, 각 세포내로 들어간 기질인 UDP-(¹⁴C)-glucose가 세포내의 베타-1,3-글루칸 합성효소에 의하여 새로이 합성되는 베타-1,3-글루칸으로 incorporation 될 것이다. 따라서, 반응이 끝난 콜로니를 X-선 필름에 감광하면 각 콜로니를 구성하는 세포의 베타-1,3-글루칸 합성효소능에 비례하여 방사능이 검출될 것이다. 한편, 평판배지에 접종한 콜로니의 밀도가 상대적으로 균일하지 아니하므로, 여과지상의 콜로니를 Ponceu S로 염색하여 콜로니밀도 차이에 의한 방사능의 차이를 보정하면 실질적으로 베타-1,3-글루칸 합성효소능이 회복된 콜로니를 선별할 수 있을 것으로 기대하고, 베타-1,3-글루칸 합성능이 회복된 형질전환체의 선별을 시도하였다.

그 결과, Uracil 요구성이 회복된 총 3,000여개의 형질전환체 중 30°C YEPD 평판배지 상에서 비교적 빠른 생장을 보이는 185개의 콜로니를 일차선별하여 자기방사법을 시행하였다. 이 중 X-선 필름 상에서 방사능은 강하게 검출되나, 여과지 상의 콜로니를 Ponceu S로 염색하였을 때, 약하게 염색되어 콜로니 밀도가 낮은 것으로 판정되는 콜로니를 선별하여 이들의 베타-1,3-글루칸 합성능을 조사하였다 (Fig. 1). 그 결과 Table 2에서 보듯이 1번, 4번 균주가 베타-1,3-글루칸 합성능이 손상된 수주인 LP353보다 1.5배 내지 2배 높은 수준의 효소활성을 보여주었다. 이들 균주로부터 플라스미드를 재추출하고 대장균에서 증폭시켜, LP353을 재차 형질전환시킨 후, 효소활성을 측정하여 본 결과, 4번 균주만이 베타-1,3-

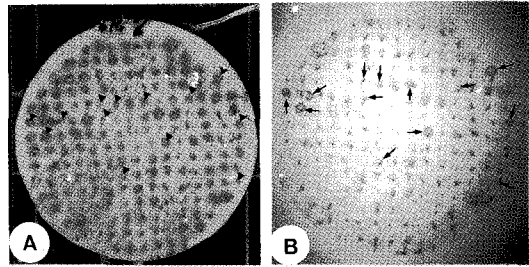


Fig. 1. Identification of *BGS2* transformants by Colony Autoradiography.

The preparation, assay, and autoradiography of replica prints was carried out as described in the text and Experimental Procedures. A: shows a replica print stained with Ponceu S. B: shows corresponding autoradiogram. The arrows indicate the positions of transformants showing relatively higher level of β -1,3-glucan synthase activity in comparison with the colony density revealed by Ponceu S staining.

Table 2. β -1,3-glucan synthase activity of transformants

Strain	β -1,3-glucan synthase activity ^a	
	Exp. 1	Exp. 2 ^b
Wild type (GS-1-36)	9.9	5.3
Mutant (LP353)	5.1	3.5
Transformant		
Strain 1	10.9	
Strain 2	4.5	
Strain 3	4.6	
Strain 4	7.6	7.7
Strain 5	4.0	
Strain 6	4.7	
Strain 7	5.3	

^aExpressed as UDPG (mg)/protein (mg)/h

^bCells transformed with the plasmid isolated from the cells used in Exp. 1 were used as enzyme source.

글루칸 합성능이 부분적으로 회복된 진정한 형질전환체로 확인되었다. 이상에서 보듯이 *in vitro* 효소활성은 낮으나, 형질전환체 선별에 사용할 적절한 표현형이 없는 LP353 등의 돌연변이주를 대상으로 베타-1,3-글루칸 합성에 관여하는 유전자의 클로닝에

콜로니 자기방사법이 효과적으로 이용될 수 있으며, 이를 이용하여 베타-1,3-글루칸 합성에 관여하는 또 다른 유전자의 클로닝이 가능할 것으로 사료된다.

제한효소 지도작성 및 기능부위 분석

베타-1,3-글루칸 합성효소능이 회복된 형질전환체인 4번 균주로부터 플라스미드의 존재 유무를 조사하고, 클로닝된 insert의 크기와 제한효소지도를 작성하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보듯이, 클로닝된 DNA insert 내에는 *ClaI*, *BamHI*, *KpnI*, *SacI*, *SphI* 등의 제한효소 작용부위는 있었으나, *AccI*, *ApaI*, *ArriI*, *AvaI*, *BglII*, *SalI*, *XhoI*, *SfiI*, *Tth111I*, *XmaI*/*SmaI* 등의 제한효소 작용부위는 없었으며, insert의 크기는 8.5 kb로 확인되었다. 이러한 결과는 본 연구진이 이미 클로닝한 바 있는 또 다른 베타-1,3-글루칸 합성관련 유전자인 *BGS1*의 경우(Lee 등, 1994a)와는 다른 결과였다. 그런데, *BGS1*은 high-copy로 존재할 경우에는 비허용온도에서 삼투감수성을 회복시키나(Lee 등, 1994a), low-copy로 존재할 경우에는 온도의존적 삼투감수성을 회복시키지 않는 양상을 보인 바가 있어(Lee 등, 미발표 자료), 이를 확인하기 위하여, low-copy 플라스미드인 YCp 50에 들어있는 8.5-kb insert를 high-copy 플라스미드인 YEplac195로 옮겨 제조한 재조합 플라스미드인

pELG2BSL로 PL353을 형질전환시켜 보았다. 그 결과, copy 수에 무관하게 온도의존적 삼투감수성은 전혀 회복되지 아니하였으며(Fig. 3), insert가 없는 YEplac195을 갖는 숙주세포보다 베타-1,3-글루칸 합성효소능이 1.5 내지 2배 높은 수준으로 조사되었다(Table 3). 이상의 결과로 볼 때, 클로닝된 8.5-kb의 insert 내에는 *BGS1*과는 특성이 다른 새로운

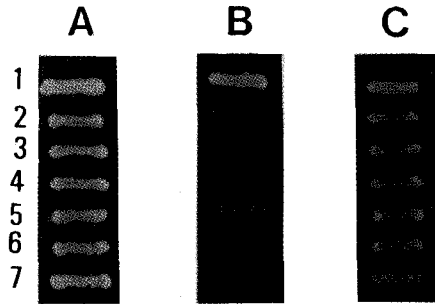


Fig. 3. The growth pattern of strains on solid medium.

A: ura drop-out media at 30°C, B: ura drop-out media without 1.2M sorbitol at 37°C, C: ura drop-out media with 1.2M sorbitol at 37°C, 1: GS-1-36, 2: LP353+pELG2BSL, 3: LP353+pCG2BSL, 4: LP353+pELG2BSC, 5: LP353+pELG2BKN, 6: LP353+pELG2SSH, 7: LP353+YEplac195.

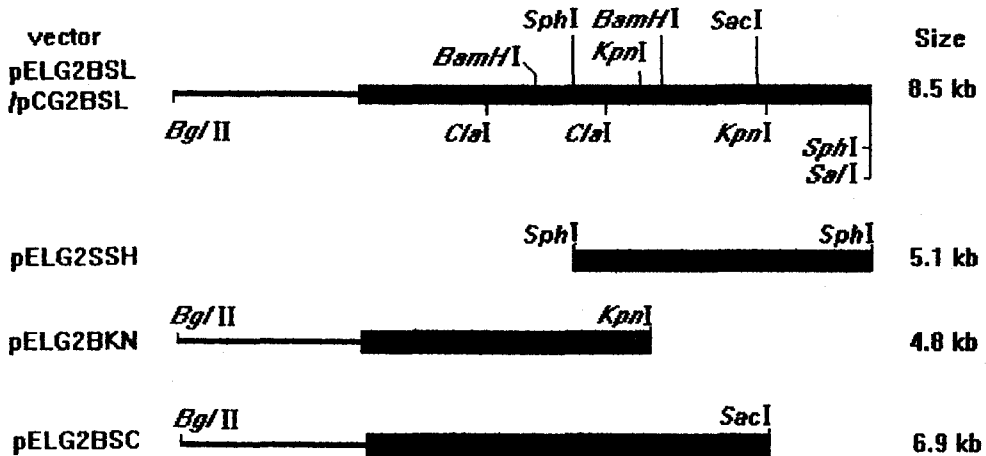


Fig. 2. Partial restriction map and subcloning of *BGS2*.

Plasmid DNA was isolated from transformant, and the insert was digested with various endonuclease. Three restriction fragments were subcloned into the YEplac195. The thick line indicates the coding region of *BGS2*. The thin line indicates vector sequence. The size indicates the length of coding region of *BGS2* only.

Table 3. β -1,3-glucan synthase activity, β -glucan content composition, and resistance to β -1,3-glucanase of various strains.

Strain	Specific activity ^a	β -glucan ^b			β -1,3-glucanase resistance ^{f,g}
		Total ^c	β (1 \rightarrow 6)	β (1 \rightarrow 3) ^d	
Wild type	16.5	299.1	30.2	268.9 (100) ^e	100.0
LP353 + pELG2BSL	12.7	264.5	35.0	229.5 (85.3)	94.0
LP353 + pCG2BSL	10.6	261.8	17.2	244.6 (91.0)	99.8
LP353 + pELG2BSC	8.9	244.4	23.6	220.8 (82.1)	91.3
LP353 + pELG2BKN	9.3	263.6	22.0	241.6 (89.9)	92.7
LP353 + pELG2SSH	4.2	180.1	45.1	135.0 (50.2)	79.2
LP353 + YEplac195	5.9	162.4	42.8	119.6 (44.5)	71.7

^aExpressed as UDPG (mg)/protein (mg)/h

^bExpressed as μ g/mg cell wall dry weight.

^cDetermined as the carbohydrate content of both the Zymolyase-insoluble pellet and the solubilized supernatant before dialysis.

^dDetermined as the difference of the carbohydrate content between total and β -(1,6)-glucan.

^eThe amount of β -(1,3)-glucan of GS-1-36 was taken as 100.

^f β -1,3-glucanase resistance of GS-1-36 was taken as 100.

^gExpressed as (sample O.D.600/control O.D.600) \times 100 (%)

유전자(*BGS2*)가 존재하는 것으로 판정되었다.

8.5-kb insert 내에 존재하는 유전자의 기능부위를 확인하기 위하여, 서브클로닝을 시도하였다. 그런데, YCp50 내에는 *KpnI*, *SacI*, *SphI* 등을 처리하여 분리한 8.5-kb insert를 서브클로닝할 적절한 부위가 없어, pUC19에서 유래된 MCS(multi-cloning site)를 갖고 있는 YEplac195에 서브클로닝하여 재조합 벡터들을 제조하고, 이들을 LP353에 도입시켜 얻어진 형질전환체들의 효소능을 측정하였다. 그 결과 4.8-kb의 insert를 포함한 *BglII-KpnI* 절편을 갖는 재조합벡터(pELG2BKN)와 6.9-kb의 insert를 포함한 *BglII-SacI* 절편을 갖는 재조합벡터(pELG2BSC) 및 전체 8.5-kb insert를 가지고 있는 재조합벡터(pELG2BSL과 pCG2BSL)는 야생형에 근접하는 수준의 효소활성 회복양상을 보여주었으나, 5.1-kb의 insert를 포함한 *SphI-SphI* 절편을 갖는 재조합벡터(pELG2SSH)는 insert를 갖지 않는 YEplac195와 마찬가지로 숙주세포의 베타-1,3-글루칸 합성능을 회복시키지 아니하였다(Table 3). 이상의 결과로부터 클로닝된 8.5-kb insert 중 4.8 kb 크기의 insert를 갖는 *BglII-KpnI* 부위에 베타-1,3-글루칸 합성효소능과 관련된 유전자인 *BGS2*가 존재할 것으로 추

정하였다.

세포벽구성성분 분석 및 분석

이상에서 *BGS2* 유전자가 돌연변이주인 LP353의 *in vitro* 베타-1,3-글루칸합성 효소능을 부분적으로 회복시킨다는 것은 확인되었으나, 세포벽 베타-1,3-글루칸의 함량에는 어떠한 영향을 미치는지 조사하여 보았다. 즉, 서브클로닝된 DNA 절편을 가지고 있는 균주와 야생형 균주를 비허용 온도에서 배양하여, 세포벽 구성성분 중 베타-1,3-글루칸의 함량을 비교한 결과, Table 3에서 보듯이, 베타-1,3-글루칸 합성능과 세포벽의 베타-1,3-글루칸 함량이 비례하였다. 즉, 전체 8.5-kb 크기의 insert를 가지고 있는 세포뿐만 아니라 이와 비슷한 수준의 효소능을 보여주었던 4.8-kb의 insert를 포함하는 *BglII-KpnI* 절편을 가지고 있는 균주의 세포벽 베타-1,3-글루칸 함량이 숙주인 LP353의 베타-1,3-글루칸 함량보다 거의 2배 높게 조사되었다. 따라서, 4.8-kb의 insert를 포함하는 *BglII-KpnI* 절편에 포함된 *BGS2* 유전자는 *S. cerevisiae*의 *in vitro* 베타-1,3-글루칸 합성효소능 뿐만 아니라, *S. cerevisiae*의 주된 세포벽 성분의 하나인 베타-1,3-글루칸 합성에 직접 관여하는 유전

자임을 알 수 있었다.

β-1,3-glucanase에 대한 내성 조사

Lee 등(1994a)은 돌연변이체의 베타-1,3-글루칸 합성능이 β-1,3-glucanase인 Zymolyase에 대한 내성과 비례함을 보고한 바 있다. 따라서, BGS2 유전자가 *S. cerevisiae*의 Zymolyase에 대한 내성에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 3), *S. cerevisiae*의 베타-1,3-글루칸 합성효소능 증진에 영향을 주지 못하는 5.1-kb의 *SphI* insert를 가지고 있는 균주는 숙주세포인 LP353과 동일한 수준의 β-1,3-glucanase에 대한 내성을 나타내었으며, 나머지 insert를 갖는 균주들은 전체 8.5-kb의 insert를 갖는 균주와 동일한 수준의 내성을 나타내어, 이미 조사된 바와 같이 베타-1,3-글루칸 합성효소능에 비례하여 Zymolyase에 대한 내성도 증가함을 알 수 있었다. 따라서 4.8-kb의 insert 내에 존재하는 BGS2 유전자가 *S. cerevisiae*의 β-1,3-glucanase에 대한 내성에도 관여함을 알 수 있었다.

비허용온도에서의 성장양상 조사

비허용온도인 37°C에서 베타-1,3-글루칸 효소능 손상과 삼투감수성을 함께 보이는 숙주인 LP353은, 비허용온도의 삼투안정제인 1.2M의 sorbitol이 첨가된 고체배지에서는 성장속도가 다소 느리기는 하나 야생형 수준에 해당하는 성장을 보이지만(Fig. 3C), 비허용온도의 액체배지에서는 삼투안정제가 존재하여도 성장하지 못하는 특성이 있다(미발표 자료). 따라서, BGS2 유전자가 비허용온도의 고체배지와 액체배지에서 LP353의 성장양상을 어떻게 변화시키는지 조사하였다. 즉, 앞서 실험에서 사용된 다양한 크기(5.1-kb, 4.8-kb, 6.9-kb, 8.5-kb)의 insert를 갖는 균주들의 성장양상을 숙주인 LP353, 그리고 야생형인 GS-1-36와 함께 비허용온도인 37°C의 고체배지와 액체배지에서 비교하였다. 그 결과 야생형(GS-1-36)을 제외한 어떠한 형질전환체도 37°C의 삼투안정제가 첨가되지 아니한 고체배지(Fig. 3B)나 액체배지(자료제시 생략)에서는 모균인 LP353과 마찬가지로 성장을 보여주지 아니하였다. 그러나 1.2M의 sorbitol이 삼투안정제로 첨가된 37°C 액체배지에서는, 돌연변이체인 LP353의 베타-1,3-글루칸 합성효소능 손상형질을 회복시켜 주지 못하는

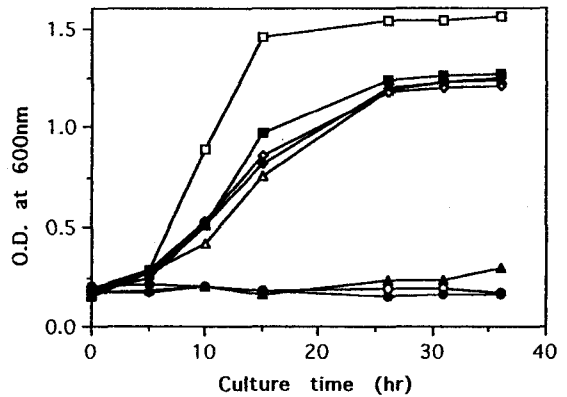


Fig. 4. Growth pattern of wild type and transformants in liquid medium with 1.2M sorbitol at 37°C.

(■): GS-1-36, (□): LP353+pELG2BSL, (◆): LP353+pCG2BSL, (◇): LP353+pELG2BSC, (▲): LP353+pELG2BKN, (△): LP353+pELG2SSH, (●): LP353+YEplac195, (○): LP353

5.1-kb의 insert를 포함하는 *SphI* DNA 절편을 제외한 모든 경우에 야생형의 수준에 근접하는 성장양상을 보여주었다(Fig. 4). 즉, BGS2 유전자는 LP353의 베타-1,3-글루칸 합성능 손상은 부분적으로 회복시켜 주나, 고체배지에서의 온도의존적 삼투감수성 형질은 회복시켜 주지 못한다. 그러나, BGS2 유전자는 LP353이 비허용온도의 삼투안정제가 첨가된 액체배지에서 자라지 못하는 돌연변이 형질은 회복시켜주는 것으로 조사되었다.

돌연변이체인 LP353이 비허용온도의 삼투안정제가 첨가된 고체배지에서는 자라나, 액체배지에서는 자라지 못하는 이유를 정확히 설명하기가 불가능하나, 이미 LP353을 비롯한 돌연변이체의 유전적 분석에서 밝혔듯이, LP353의 온도의존적 삼투감수성은 *TOS1-1* 유전자에 의하여 결정되며, *tos1-1* 돌연변이 형질은 세포막손상 등에 의한 것이 아니라 베타-1,3-글루칸 등의 세포벽 성분의 합성능 손상에 의한 것이라 추론(Lee 등 1994b)에 근거하여 볼 때 다음과 같은 설명이 가능하다. 즉, 액체배지는 1.5%의 한천이 첨가된 고체배지에 비하여 삼투압이 다소 낮을 것이므로, 비허용온도의 1.2M의 sorbitol이 첨가된 고체배지에서는 자라는 LP353이 1.2M sorbitol이 첨가된 액체배지에서는 자라지 못하나, BGS2 유전

자에 의하여 LP353의 베타-1,3-글루칸 합성능이 부분적으로 회복될 때 *tos1-1*의 결함도 부분적으로 회복되어 1.2M sorbitol이 첨가된 액체배지에서의 생장이 가능한 것으로 추정할 수 있다. 이러한 추론은 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 또 다른 유전자로 밝혀진 *BGS1*이 high copy로 존재할 때는 LP353의 베타-1,3-글루칸 합성능이 야생형 수준으로 회복됨과 동시에 온도의존적 삼투감수성도 회복되나, low copy로 존재할 때는 LP353의 온도의존적 삼투감수성이 회복되지 아니한 결과(Lee 등, 1994a)로도 뒷받침된다. 그러나, 이러한 추론은 관련 유전자들의 클로닝에 이은 기능분석에 의하여 확실히 규명될 것이다.

이상의 결과로 본 실험에서는 *Saccharomyces cerevisiae*의 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 것으로 밝혀진 유전자(*BGS1*, *BGS2*) 중(Lee 등, 1994a, 1994b) 하나인 *BGS2* 유전자를 성공적으로 클로닝한 것으로 추정된다. 현재 본 연구진이 수행 중인 *BGS2*의 염기서열 분석과 유전자파괴(gene disruption)에 의한 기능분석이 완료되면, *S. cerevisiae*의 베타-1,3-글루칸 생합성 유전자 및 그 조절기작에 대한 소중한 정보를 얻을 수 있으리라 사료된다. 한편, *bgs2* 돌연변이와 같이 베타-1,3-글루칸 합성능은 손상되었으나, 평판배지 상에서 이와 연관된 특이적인 표현형질을 나타내지 아니하는 또 다른 베타-1,3-글루칸 합성효소 유전자의 클로닝에 콜로니 자기방사법을 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

비허용온도인 37°C에서 삼투감수성을 보이며 베타-1,3-글루칸 합성능이 현저히 손상된 *Saccharomyces cerevisiae* mutant(LP353)를 YCp50으로 제조한 yeast genomic library로 형질전환시킨 후, 콜로니 자기방사법으로 형질전환체의 선별을 시도한 결과, LP353의 베타-1,3-글루칸 합성능을 부분적으로 회복시켜 주는 약 8.5-kb 크기의 DNA 절편을 클로닝하는데 성공하였다. 클로닝된 8.5-kb의 DNA 절편은 copy 수에 무관하게 LP353의 또 다른 표현형질인 온도의존적 삼투감수성은 회복시켜 주지 못하였으나, 세포벽의 베타-1,3-글루칸 함량과 베타-1,3-글루칸 분해효소인 β -glucanase에 대한 내성은 copy

수에 무관하게 증가시켜 주었다. 한편, 8.5-kb의 DNA 절편은 37°C의 삼투안정제가 첨가된 액체배지에서 잘 자라지 못하는 LP353의 돌연변이 형질을 회복시켜 야생형의 수준에 근접하는 성장양상을 보여 주었다. 이상의 결과로 클로닝된 8.5-kb 크기의 DNA 절편은 *S. cerevisiae*의 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 유전자의 하나인 *BGS2*를 포함하고 있는 것으로 보여지며, subcloning을 통한 기능부위 분석 결과, 4.8-kb 크기의 *BglIII-KpnI* DNA 절편에 *BGS2*가 존재하는 것으로 추정되었다.

사 사

본 연구는 1993학년도 교육부 유전공학 학술연구 조성비의 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 본 실험에 사용된 플라스미드 YEplac195를 분양하여 주신 전북대학교 생물학과의 장광엽 교수께 감사드립니다.

參考文獻

- Ballou, C.E. 1982. The yeast cell wall and cell surface. pp. 335-360. In: J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach (ed.), The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Bulawa, C.E., M. Slater, E. Cabib, J. Au-Young, A. Sburlati, W.L. Adair, and P.W. Robbins, 1986. The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. *Cell*. **46**: 213-225.
- Cabib, E., B. Bowers, A. Sburlati, and S.J. Silverman. 1988. Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol. Sci.* **5**: 370-383.
- Cabib, E., S.J. Silverman, J.A. Shaw, S.D. Gupta, H.M. Park, J.T. Mullins, P.C. Mol, and B. Bowers. 1991. Carbohydrates as structural constituents of yeast cell wall and septum. *Pure. & Appl. Chem.* **63**: 483-489.
- Chaplin, M.F. 1986. Monosaccharides. pp. 1-36. In: M.F. Chaplin and J.F. Kennedy (ed.), Carbohydrate Analysis: A Practical Approach, IRL Press, Washington D.C.
- Douglas, C.M., J.A. Marrinan, W. Li, and M.B. Kurtz.

- 1994a. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with Echinocandin-Resistant 1,3- β -D-Glucan Synthase. *J. Bacteriol.* **176**: 5686-5696.
- Dougals, C.M., F. Foor, J.A. Marrinan, N. Morin, J.B. Nielsen, A.M. Dahl, P. Mazur, W. Li, M. El-Sherbeini, J.A. Clemas, S.M. Mandala, B.R. Frommer, and M.B. Kurtz. 1994b. The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS (ETG1)* gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- β -D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12907-12911.
- Enderlin, C.S., and C.P. Selitrennikoff. 1994. Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* gene required for (1,3) β -glucan synthase activity and cell wall formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9500-9504.
- Gietz, R.D. and A. Sugino, 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized test genes lacking six-base pair restriction site. *Gene* **74**: 527-534.
- Hong, Z., P. Nann, N.H. Brown, L.E. Tran, K.J. Shaw, R.S. Hare, and B. Didomenico. 1994. Cloning and characterization of *KNR4*, a Yeast gene involved in (1,3)- β -glucan synthesis. *J. Mol. Cell Biol.* **14**: 1017-1025.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Kang, M.S., and E. Cabib. 1986. Regulation of fungal cell wall: A guanine nucleotide-binding proteinaceous component required for activity of β -1,3-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 5808-5812.
- Kasahara, S., H. Yamada, T. Mio, Y. Shiratori, C. Miyamoto, T. Yaba, T. Nakajima, E. Ichishima, and Y. Furuichi. 1994. Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits β -glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **176**: 1488-1499.
- Leal-Morales, C.A. and J. Ruzi-Herrera. 1985. Alteration in the biosynthesis of chitin and glucan in the slime mutant of *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **9**: 28-38.
- Lee, D.W., S.W. Park, E.H. Jin, J. Kim, and H.M. Park. 1994a. Cloning and characterization of β -1,3-Glucan synthase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Mol. Biol. & Genet.* **9**: 135-136.
- Lee, D.W., S.W. Park, E.H. Jin, J.H. Chung, J. Kim, and H.M. Park. 1994b. Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in β -1,3-glucan synthase. *Kor. J. Genet.* **16**: 259-268.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mol, P.C., H.M. Park, J.T. Mullins, and E. Cabib. 1994. A GTP-binding protein regulates the activity of (1-3)- β -glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 31267-31274.
- Raetz, C.H.R. 1975. Isolation of *E. coli* mutants defective in enzymes of membrane lipid syntheses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 2274-2278.
- Rose, M.D., F. Winston, P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. Pp. 18, 67-68. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Shematek, E.S., J.A. Braatz, and E. Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall: I. Preparation and properties of β -(1,3)-glucan synthase. *J. Biol. Chem.* **255**: 888-894.
- Song, M.R., D.W. Lee, S.W. Park, K.S. Bae, and H.M. Park. 1992. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in (1,3)- β -D-glucan synthase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 642-646.
- Zlotnik, H., M.P. Fernandez, B. Bower, and E. Cabib. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriol.* **158**: 1018-1026.