

효모의 베타-1,3-글루칸 생합성 결함을 초래하는 돌연변이 유전자(*soo1-1*)의 분리 및 분석

이재준 · 이동원 · 김기현 · 박희문*

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

출아 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 베타-1,3-글루칸 생합성의 결함을 초래하는 돌연변이 유전자(*soo1-1*)를 분리하여 돌연변이 부위의 염기서열을 결정하고 그 특성을 분석하였다. *soo1-1* 유전자의 염기서열 분석 결과, 681번의 염기인 G가 A로 치환되어 *Soo1p*의 Gly²²⁷이 Asp로 치환되는 결과를 나타내는 것으로 판명되었고, *soo1-1* 유전자는 기존에 보고된 *ret1-1* 유전자와 동일한 돌연변이 유전자로 판명되었다. 그러나, *ret1-1*이 나타내는 온도감수성 형질은 배지에 1.2 M sorbitol 등의 삼투안정제를 추가하면 극복될 수 있으며, *soo1-1/ret1-1*의 돌연변이 부위가 세포벽 합성 관련 단백질의 번역 후 수식과정에 영향을 미칠 것임을 확인하였다. 한편, *Soo1p/α-COP*의 N-말단에 존재하는 6개의 WD40 domain 중 5번째 WD40 domain이 효모의 세포벽 합성이나 구조유지에 중요한 역할을 담당할 것임을 시사하는 결과를 얻었다.

Key words □ mutant allele, *S. cerevisiae*, *soo1-1*, WD40 domain

효모 세포벽의 주된 성분은 키틴(chitin)과 글루칸(glucan) 등의 탄수화물인데, 세포벽 건조 중량의 약 절반 가량은 베타-1,3-와 베타-1,6-글루칸으로 구성되어 있고 이중 베타-1,3-글루칸의 함량이 베타-1,6-글루칸 보다 더 높다(1,2). 베타-1,3-글루칸 합성효소(β -1,3-glucan synthase)는 원형질막에 부착되어 있으며, UDP-포도당(Uridine diphospho-glucose)을 기질로 사용하여 포도당이 베타-1,3-결합으로 연결된 중합체를 합성하는데, zymogen 형태로 존재하지도 아니하며 2가 양이온을 요구하지도 아니하나, GTP 및 그 유도체에 의하여 활성이 증진되는 특성이 있다(32). 베타-1,3-글루칸의 합성에 GTP 또는 그 유도체가 요구되는 특성은 *Saccharomyces cerevisiae*를 비롯한 다수의 균류에서 공통적으로 발견되는 현상으로(12), 균류의 세포벽 합성 과정 중 특히 베타-1,3-글루칸 합성 과정이 세포 분열주기와 연결되어 GTP-결합 단백질에 의하여 조절되며(21), 이 GTP-결합단백질은 Rho1 단백질인 것으로 밝혀졌다(5,26). 그러나, 막단백질인 베타-1,3-글루칸 합성효소의 분리 정제에 성공한 바가 없으며, 베타-1,3-글루칸 합성체계에 대한 생리 생화학적 연구는 원형질막 혼합체를 사용하여 수행한 것으로 베타-1,3-글루칸 합성효소에 대한 정확한 정보가 부족하다.

최근 진균류의 세포벽 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 유전자에 대한 분자유전학적 접근이 이루어져 다수의 유전자가 밝혀지게 되었다. Douglas 등은 베타-1,3-글루칸 합성효소의 저해물질로 알려진 echinocandin에 내성을 보이는 돌연변이주를 *S. cerevisiae*에서 얻어내고, echinocandin에 대한 내성이 insoluble

membrane fraction 중 특히 베타-1,3-글루칸 합성효소의 catalytic subunit을 암호화하고 있는 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 보고하였으며, 이 돌연변이주를 이용하여 *FKS1* (EK506 sensitive) 유전자를 클로닝한 바 있다(3,4). 그 후 몇몇 연구자들이 Douglas 등과는 다른 방법으로 유전자를 클로닝하였는데, 흥미롭게도 모두 *FKS1*과 동일한 유전자로 밝혀졌다(23). 이외에도 *Candida albicans* (20), *Aspergillus nidulans* (13), *Schizosaccharomyces pombe* (9), *Cryptococcus neoformans* (36) 및 *Paracoccidioides brasiliensis* (25) 등에서 *FKS1*의 유사 유전자가 클로닝되었으나, 이들 유전자 및 유전자 산물의 생체내 기능에 대한 연구는 명확히 밝혀진 바 없어 지속적인 연구가 필요하다.

본 연구진은 *S. cerevisiae*로부터 베타-1,3-글루칸 합성능이 손상되어 삼투감수성을 보이는 새로운 형태의 온도의존적 돌연변이주를 제조·선별하고(35), 유전적 분석 및 클로닝 실험을 수행하여 베타-1,3-글루칸의 생합성에 관여하는 새로운 두 가지 유전자인 *SOO1*과 *BGS2*를 클로닝하였다(11,15,16,17). 이 중 *SOO1*은 온도의존적 감수성을 상보(complementation)할 뿐만 아니라 베타-1,3-글루칸 합성능도 회복시켜주는 특성이 있는데, 그 염기서열을 분석해 본 결과, 흥미롭게도 분비 단백질이 ER에서 Golgi로 이송되거나, ER에 상주하는 단백질이 Golgi에서 ER로 역이송되는 과정에 관여하는 COPI vesicle의 구성 단백질 중 하나인 α -COP(non-clathrin-coat protein α)의 유전자(7)와 동일한 것으로 판명되었다(16). 이는 효모의 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 단백질이 원형질막으로 이송되는 과정에 COPI vesicle이 관여함을 시사하는 것이다. 이미 알려진 바와 같이, *SOO1*은 효모생존에 필수적인 유전자로 *SOO1*이 파괴된 균주는 삼투안정제가 존재하여도 생장이 불가능하였으나, 특이하게도 *soo1-1* 돌연변이주

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 042-821-6417, Fax : 042-822-7367
E-mail : hmpark@cnu.ac.kr

인 LP0353은 배지에 삼투안정제를 첨가하면 비허용온도에서 생장이 가능하였다(16,17). 이러한 결과는, *soo1-1*의 돌연변이가 부위가 효모의 세포벽 베타-1,3-글루칸의 생합성에 관여하는 단백질을 직접 또는 간접적으로 인식하여 ER과 Golgi를 거쳐 원형질막으로 수송되도록 하는데 결정적인 역할을 할 것임을 시사하는 것이다.

따라서, *SOO1*의 돌연변이가 대립인자(allele)인 *soo1-1*을 분리하여 돌연변이가 일어난 부위를 확인하면, *Soo1p/α-COP*의 아미노산 잔기 중, 베타-1,3-글루칸 합성효소 등 효모의 세포벽 생합성에 관여하는 단백질의 vesicular transport 과정에 중요한 역할을 하는 잔기를 확인할 수 있을 것이다. 이를 위하여 본 연구에서는 돌연변이가 유전자 *soo1-1*을 분리하고 그 염기서열을 분석하여, 돌연변이가 일어난 부위를 확인하고 그 기능을 유추하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 *E. coli*는 HB101과 DH5α로 LB배지에 접종하여 37°C에서 배양하였으며, 형질전환시킨 균주들은 ampicillin이 100 μg/ml되게 첨가한 배지에서 배양하였다. 효모 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*는 본 실험실에서 제조한 돌연변이주인 LP0353 (*MATα ura3-52 lys2-801 soo1-1 bgs2*) 그리고 야생형으로 GS-1-36 (ATCC 26108; *MATα SUC2 mal gal2*)를 기본균주로 사용하였다. *soo1-1* 돌연변이가 유전자를 분리하기 위한 균주로는 돌연변이주인 LP0353의 염색체에 야생형의 *SOO1* 유전자가 한 copy 더 삽입된 균주인 LP0353/DS1을 제조하여 사용하였다. *S. cerevisiae*의 배양 및 성장양상 조사는 YEPD (Bacto-yeast extract 1%, Bacto-peptone 2%, dextrose 2%, agar 2%)와 SC-Ura (synthetic complete Uracil drop-out media: Bacto-yeast nitrogen base without amino acid 0.67%, dextrose 2%, drop-out mix without uracil 0.2%, agar 2%)를 사용하여 수행하였다(27). LP0353을 비허용온도인 37°C에서 배양할 때에는 삼투안정제로 1.2 M sorbitol이 첨가된 YEPD 배지를 사용하였으며, 이때 sorbitol은 따로 멸균하여 50°C로 식힌 후 배지에 첨가하였다.

DNA 조작 및 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 변형된 Mandel과 Higa의 방법(19)으로 수행하였고, 효모의 형질전환은 lithium acetate법(10)으로 수행하였다. *E. coli*로부터 플라스미드 DNA의 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하였고, 염기서열 분석을 위한 플라스미드는 Qiagen사 (GmbH, Hilden, Germany)의 plasmid kit을 사용하여 순수분리하였다. 제한효소에 의한 DNA의 절단, ligation 및 agarose gel 전기영동은 Sambrook 등의 방법(29)에 따라 수행하였다. DNA 염기서열은 순수분리한 DNA를 주형으로 USB사(Cleveland, USA)의 version 2.0 Sequenase kit을 사용한 Sanger법(30)으로 결정하였다.

돌연변이 유전자 (*soo1-1*)의 분리 및 돌연변이 부위의 확인

URA3 marker를 갖는 YIplac211에 *SOO1*의 전체 ORF를 포함하고 있는 5.8 kb의 *Sall* 절편을 클로닝하였다. 이 재조합 플라스미드(YIplac211S)를 *E. coli* DH5α에 형질전환시켜 플라스미드를 증폭 분리하였다. 분리한 YIplac211S를 LP0353에 형질전환시켜 *Ura⁺* 콜로니를 선별하고, Southern blotting으로 상동성 단일교차(homologous single crossing-over)에 의하여 전체 플라스미드가 염색체의 *soo1-1* 자리에 삽입되었는지를 확인한 후, 형질전환체의 온도 의존적 삼투감수성 및 베타-1,3-글루칸 합성능의 회복 여부를 조사하여 *SOO1* 유전자가 삽입된 균주(LP0353/DS1)를 확인 분리하였다.

LP0353/DS1으로부터 돌연변이 유전자인 *soo1-1*을 분리하기 위하여, 우선자 염색체 DNA를 분리하고, 염기서열 분석결과 조사된 *SOO1* 유전 내의 제한효소 작용 부위 중 YIplac211에는 없고 *SOO1* 유전자에만 절단부위가 한군데 존재하는 제한효소 (*BclI*, *BstEII*, *BglII* 및 *AccIII*)를 각각 처리한 후 ligation시켜 ligation pool을 제조하였다. 이렇게 제조한 ligation pool 내에는 벡터인 YIplac211에 *SOO1*의 전체 ORF(일부는 야생형의 *SOO1* 유전자에서 유래한 것이고, 나머지 부분은 돌연변이 *soo1-1* 유전자에서 유래한 것)가 삽입된 재조합 벡터가 포함되게 된다. 이 ligation pool을 각기 *E. coli* DH5α에 도입하여 ampicillin 내성을 보이는 형질전환체를 얻고, 플라스미드 및 insert의 존재 여부를 전기영동으로 확인하였다. 확인된 insert를 각각 효모용 벡터인 YCplac33에 클로닝한 후, LP0353에 도입시켜 온도 의존적 삼투감수성의 회복 여부를 조사하여, LP0353의 돌연변이형질을 회복시키지 못하는 재조합 플라스미드를 선별하였다. 이 실험으로 돌연변이가 일어난 부위를 포함하는 DNA 절편부위를 확인한 후, *soo1-1* 중 이 부위만 pBluScript에 서브클로닝하고, 이미 결정된 *SOO1* 유전자의 염기서열을 바탕으로 제조한 sequencing primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

결과 및 고찰

SOO1 유전자가 삽입된 균주(LP0353/DS1)의 제조

전체 *SOO1*을 포함하는 5.8 kb의 *Sall* 절편을 YIplac211에 클로닝하여 제조한 플라스미드를 LP0353에 형질전환시켜 *Ura⁺* 형질전환체를 1 차 선별하고, 이 중 비허용온도인 37°C에서 생장이 가능한 형질전환체 10 개를 2차 선별하였다. 이렇게 얻어진 형질전환체의 염색체에는 LP0353의 염색체에 존재하는 *soo1-1*과 플라스미드 상의 *SOO1* 사이에 상동성 단일교차(homologous single crossing-over)가 일어나 YIplac211의 좌우에 야생형의 *SOO1* 유전자와 *soo1-1* 돌연변이가 유전자가 동일한 방향으로 존재하게 된다. 즉, *soo1-1* 유전자 내의 돌연변이 부위보다 뒤쪽에서 단일교차가 일어나면 YIplac211의 앞쪽에는 *soo1-1* 대립인자(allele)가, 뒤쪽에는 야생형 대립인자인 *SOO1*이 위치하게 되는 반면, 단일교차가 *soo1-1* 유전자 내의 돌연변이 부위보다 앞쪽에서 일어나면 그 반대의 유전자 배열을 갖게 된다(Fig. 1A). 2 차로 선별한 형질전환체의 염색체에 *SOO1* 및 YIplac211플라스미드의 삽입 여부를 확정하기 위하여 형질전환체의 염색체를 대상으로 YIplac211 DNA를 probe로 사용한 Southern analysis를 수

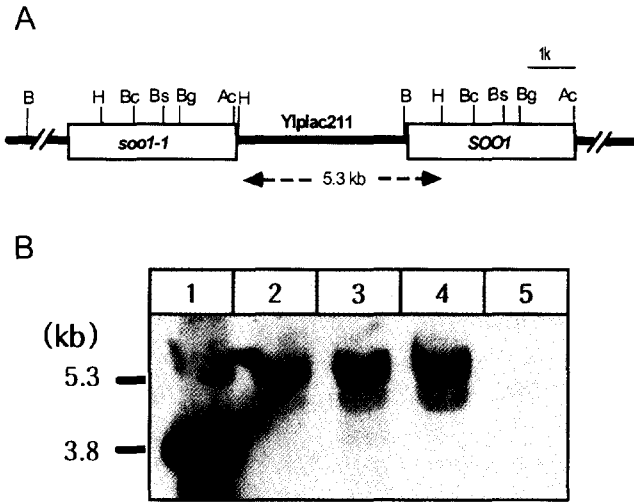


Fig 1. A: Restriction map of LP0353/DS1 chromosomal DNA used for allele rescue experiments. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; Bc, *Bcl*II; Bs, *Bst*EII; Bg, *Bg*II, Ac, *Acc*III. B: Southern blot analysis of putative LP0353/DS1 strains using YIplac211 DNA as a probe. lane 1. YIplac211; lane 2~4, *Hind*III digests of chromosomal DNA from LP0353/DS1 candidates; lane 5, *Hind*III digest of chromosomal DNA from LP0353.

행하였다. 그 결과, 예상대로 약 5.3 kb 크기의 band가 검출되어 LP0353의 염색체 상에 *SOO1* 과 *soo1-1* 대립인자가 모두 존재하는 균주(LP0353/DS1)가 제조되었음을 확인하였다(Fig. 1B).

위의 결과로 LP0353/DS1 염색체 상에는 YIplac211 서열 좌우로 *soo1-1*과 *SOO1* 유전자가 각각 존재함을 확인하였으나, 이들 대립인자의 배열순서는 알 수 없으므로 이를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 그런데 두 대립인자의 염색체 상의 위치와는 상관없이 LP0235/DS1의 염색체 DNA를 *Bam*HI으로 처리하여 self-ligation 시키면 YIplac211과 함께 그 앞쪽에 위치하는 *SOO1* (또는 *soo1-1*)을 함께 얻을 수 있다는 사실에 착안하여(Fig. 1A) 다음과 같은 실험을 행하였다. 즉, LP0353/DS1 염색체를 *Bam*HI으로 잘라 self-ligation한 후 *E. coli*에 형질전환시켜 플라스미드를 얻고, 이 플라스미드에 존재하는 *SOO1* 대립인자를 YCplac33에 옮긴 후, 돌연변이주인 LP0353에 형질전환시켜 온도 의존적 삼투감수성의 회복 유무를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2A와 B에서 보듯이 *Bam*HI으로 얻어진 부분이 돌연변이주 LP0353의 온도 의존적 삼투감수성을 상보하지 못하므로 YIplac211 서열 앞쪽에 돌연변이 대립인자인 *soo1-1*이 위치함을 확인하였다. 한편, *Acc*III로 처리하여 얻은 DNA는 YIplac211 서열 뒷부분에 위치하는 *SOO1* 대립인자를 포함하게 되는데, 이는 LP0353의 온도 의존적 삼투감수성을 상보하지 못하였다. 따라서, LP0353/DS1의 염색체에는 YIplac211 서열을 중심으로 앞쪽에는 *soo1-1* 대립인자가 존재하고 그 뒤쪽에 *SOO1* 대립인자가 존재하는 것으로 확정하였다.

돌연변이 유전자(*soo1-1*) 내의 돌연변이 부위 확인

*S. cerevisiae*의 돌연변이체로부터 돌연변이 유전자를 분리하고,

돌연변이 부위를 확인하기 위한 방법으로 gap-repair법 등이 있으나(28), 본 실험에서는 돌연변이 *soo1-1* 내의 돌연변이 부위를 비교적 용이하게 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 *soo1-1*의 분리를 시도하였다. 즉, LP0353/DS1으로부터 염색체 DNA를 분리하고, 염기서열분석결과와 조사된 제한효소지도를 바탕으로 (Fig. 1A) YIplac211 서열 내에는 작용부위가 없고 *SOO1* 유전자에만 절단부위가 한군데 존재하는 제한효소(*Bcl*II, *Bst*EII, *Bg*II 및 *Acc*III)를 각각 처리한 후 self-ligation시켰다. 이를 각기 *E. coli* DH5 α 에 도입하여 ampicillin 내성을 보이는 형질전환체를 얻어, 이들 형질전환체 내의 플라스미드 및 insert의 존재 여부를 전기영동으로 확인하였다. 확인된 insert를 각각 YCplac33에 클로닝한 후, LP0353에 도입시켜 온도의존적 삼투감수성의 회복 여부를 조사하여, LP0353의 돌연변이형질을 회복시키지 못하는 재조합 플라스미드를 선별하였다. 그 결과 Fig. 2A에서 보듯이 조사한 4 가지 경우 모두 돌연변이주인 LP0353의 온도 의존적 삼투감수성 표현형을 회복시키는 결과를 보였다. 따라서,

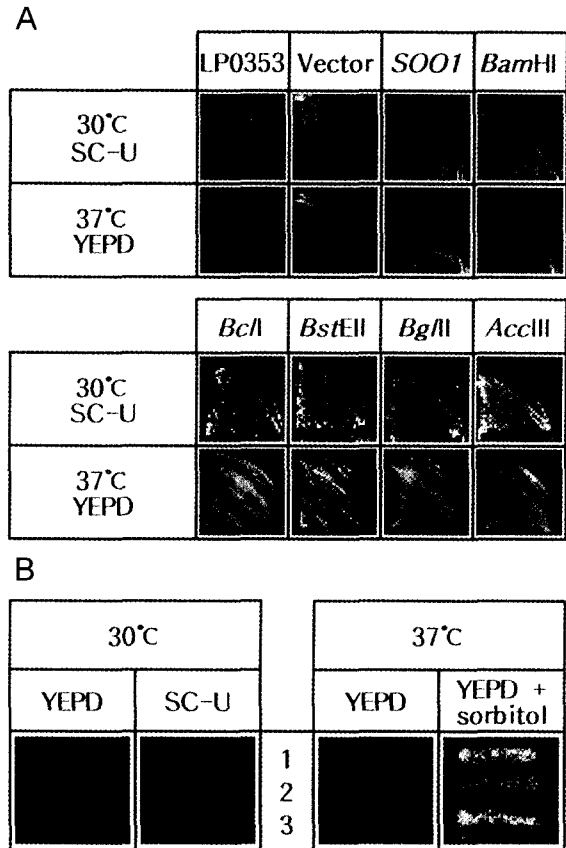


Fig 2. A: Complementation test of temperature-dependent osmosensitive phenotype of LP0353. The mutant strain, LP0353 was transformed with YCplac33 containing each of the DNA fragment rescued by digestion of LP0353/DS1 chromosomal DNA with restriction enzymes indicated, respectively. The growth of strains were tested at the culture conditions indicated. B: Growth patterns of wild type (1), LP0353 (2), and LP0353 transformed with YCplac33 containing the *soo1-1* allele (3). SC-U stands for synthetic complete medium without uracil.

LP0353의 온도 의존적 삼투감수성을 야기하는 돌연변이는 *BclI* 절단부위의 앞 쪽, 즉 *SOO1*의 ORF 시작점으로부터 800bp 부분 내에 존재하는 것으로 확정하였다.

돌연변이 유전자(*soo1-1*)의 염기서열분석 및 특성분석

LP0353/DS1의 염색체 DNA를 *BamHI* 처리하여 얻은 *soo1-1* 유전자 5'-부위의 800 bp를 대상으로 염기서열을 분석한 결과, *soo1-1* 돌연변이 유전자는 681번째 염기인 G가 A로 치환되어 *Soo1p*의 227번째 아미노산인 Gly(GGC)이 Asp(GAC)로 치환되는 것으로 보고된 *ret1-1* 돌연변이 유전자(31)와 동일한 것으로 확인되었다(Fig. 1). 그러나, 기존의 *ret1-1* 돌연변이는 비허용온도에서는 자라지 못하는 온도감수성 돌연변이로만 알려져 있는데 반하여, 본 연구 결과로부터 비허용온도에서 자라지 못하는 *ret1-1/soo1-1* 돌연변이형질은 sorbitol등의 삼투안정제가 배지에 첨가되면 극복될 수 있다는 새로운 사실을 발견하였다(Fig. 2B). 또한 이 결과는 본 연구진이 이미 보고한 결과(16)와 함께 *ret1-1/soo1-1* 돌연변이에 의하여 효모의 세포벽 합성에 이상이 초래된

다는 사실을 최초로 밝힌 것으로, *Soo1p*의 Gly²²⁷이 *S. cerevisiae*의 세포벽 베타-1,3-글루칸 합성효소(β -1,3-glucan synthase)와 세포벽의 물리적 견고성의 유지에 관여하는 세포벽 단백질의 수송 및 번역 후 수식과정(post-translational modification)에 중요한 역할을 담당하는 부위임을 시사하는 흥미로운 결과이다.

***Soo1p* N-말단의 특성**

본 연구의 실험 대상인 α -COP을 비롯한 다수의 단백질에서 WD40 domain이 반복적으로 존재하는 것이 발견되는데, WD40 domain은 β 가닥과 회전(β -strands and turns)으로 구성된 소위 말하는 β -프로펠러(β -propeller) 구조를 형성하며(22), 이 구조는 단백질 수송에 관여하는 몇몇 단백질에서 발견되는 tetratricopeptide repeats와 상호작용하는 것으로 알려져 있다(8). 특히, α -COP의 WD40 domain은 COPI에 의하여 운송되는 dilysine으로 표지된 단백질(KKXX-tagged protein)과의 상호작용에 관여하는 것으로 알려져 있다(18,31). 그런데 최근 α -COP/*SOO1*의 N-말단부위에 있는 6군데의 WD40 domain(Fig. 3 참조)은 효모가 생존이나

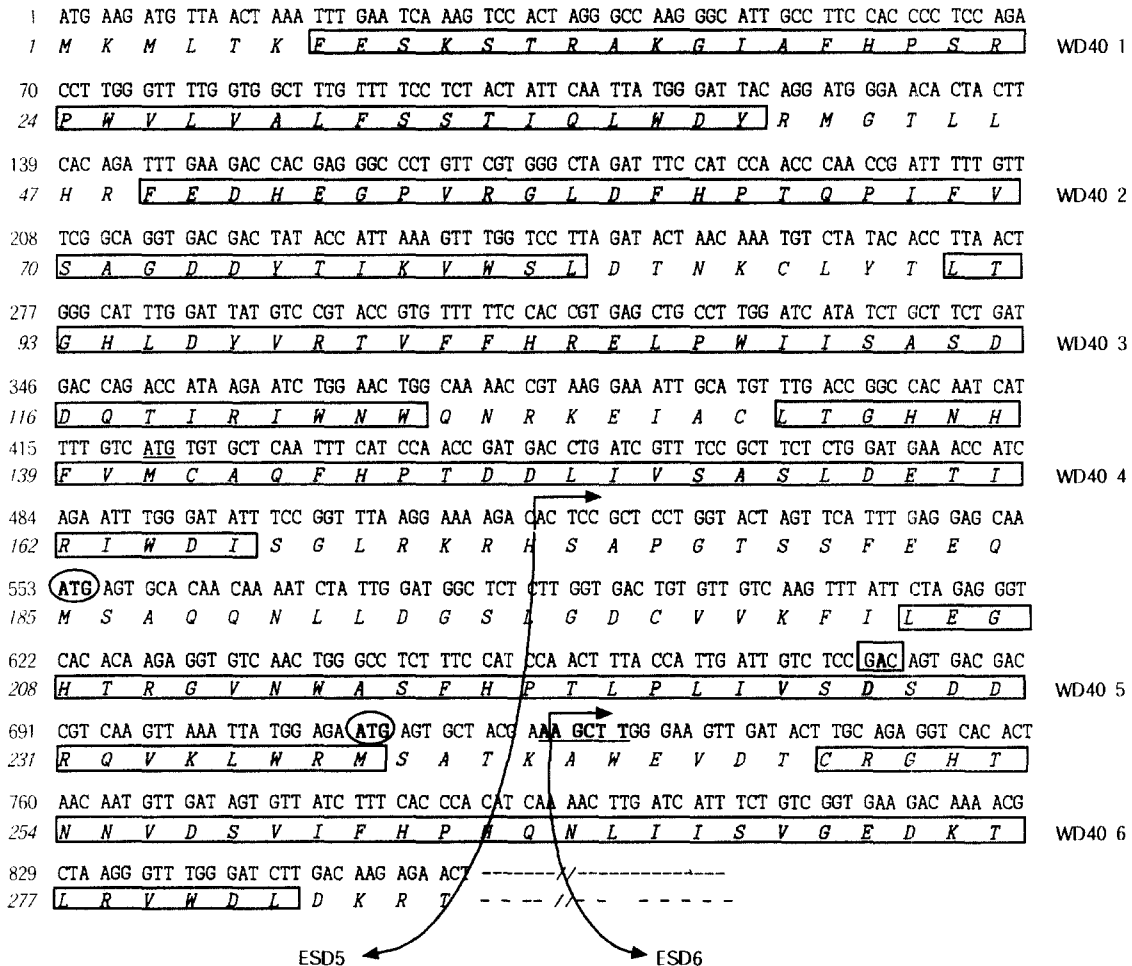


Fig 3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of N-terminal region of the *soo1-1* allele. Grey boxes indicate the WD40 domains. Putative ATG codons which can act as translation initiation site in the ESD5 construct are emboldened and indicated by circle. Mutated codon is indicated by white box and mutated nucleotide and amino acid sequence are emboldened. Start point of the *SOO1* gene in the ESD5 and the ESD6 constructs is indicated by line with arrow head. *HindIII* restriction site is emboldened and underlined.

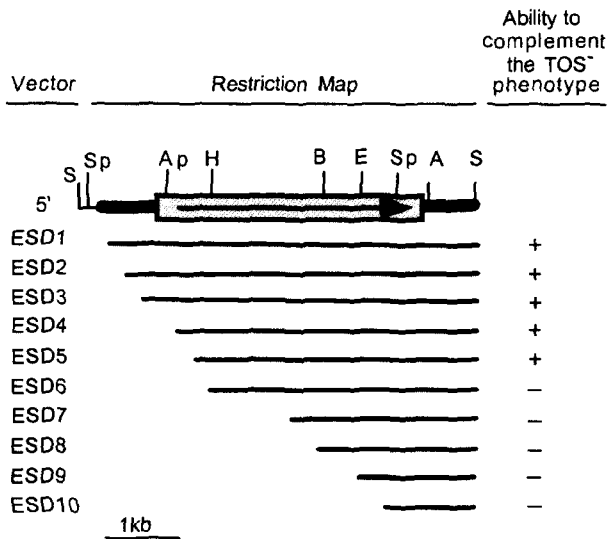


Fig 4. Determination of functional region being able to complement the temperature-dependent osmosensitive phenotype of LP0353 with YEplac33 containing each of N-terminal truncated form of the *SOO1*. N-terminal truncated forms of the *SOO1* were generated by the unidirectional nested deletion with *ExoIII* nuclease, except ESD6 clone which was generated by the *HindIII* digestion. The temperature-dependent osmosensitivity(TOS⁻) of transformants was tested at non-permissive temperature, 37°C. The ability to complement the TOS⁻ phenotype is depicted as plus(+). White box and black bar with arrow head represent ORF and direction of transcription of the *SOO1*, respectively. S, *SalI*; Sp, *SphI*; Ap, *Apal*; H, *HindIII*; B, *BglII*; E, *EcoRI*; A, *AvaI*.

coatomer의 정상적인 기능에는 필수적인 부분은 아니지만, 단백질질을 Golgi에서 ER로 역수송(retrograde transport)하는 기작의 하나인 dilysine-의존적(KKXX-dependent) 운송기작에 관여하는 부위로 밝혀졌다(6). 따라서, N-말단부위가 없는 *Soo1p*가 LP0353의 온도 의존적 삼투감수성도 회복시킬 수 있는지 확인하기 위한 실험을 다음과 같이 행하였다.

본 연구진의 선행 연구에서(16) *SOO1* 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 *ExoIII*를 처리하여 제조한 바 있는 *SOO1*의 serial deletion constructs (ESDs)를 각각 LP0353에 도입하여 이들이 LP0353의 온도 의존적 삼투감수성 형질을 상보하는지 조사하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보듯이 518번 염기부터 시작되는 ESD5 construct는 여전히 돌연변이 형질을 정상으로 회복시킬 수 있는 것으로 나타났으며, 725번째 염기부터 시작되는 염기서열에 절단부위(5'-AAGCTT-3')가 있는 제한효소인 *HindIII*를 처리하여 *HindIII* 부위 앞쪽의 N-terminal region을 제거한 ESD6 construct는 돌연변이주인 LP0353의 온도 의존적 삼투감수성을 상보하지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *HindIII* 작용부위 앞쪽의 N-말단이 제거된 *RET1/SOO1*이 *ret1-1*의 온도감수성 표현형을 상보할 수 있음을 보여준 Schröder-Köhne 등(31)의 결과와 일치하는 것이며, ESD5 construct이 시작되는 518번 염기와 *HindIII* 작용부위인 725번 염기 사이에 있는 ATG 코돈(codon) 중 하나가 번역개시코돈(translation initiation codon)으로 작용할 것임을 시사하는 결과이다. 이 부위의 염기서열을 조사한

결과, 번역개시점으로 작용할 가능성이 있는 ATG 코돈이 553번 염기와 712번 염기에 존재하는 것으로 밝혀져, 이 두 개의 ATG 코돈 중 하나가 번역개시점으로 작용하여 N-말단이 제거된 형태의 *Soo1p*를 합성하는 것으로 추정할 수 있었다.

Schröder-Köhne 등은 *RET1/SOO1*의 돌연변이 대립인자 중 5번째 WD40 domain에 돌연변이가 생긴 *ret1-1* (G²²⁷ to D)와 *ret1-2*(G²²⁶ to F)만 비허용온도인 37°C에서 생장이 불가능한 특성을 보인다고 하였고(31), Eugester 등은 *RET1/SOO1*이 파괴된 균주에 *Soo1p*의 N-말단에 있는 6개의 WD40 domain 모두가 제거된 *ret1Δ1-285* 유전자를 발현시키면 허용온도인 30°C에서는 생존이 가능하지만, 비허용온도인 37°C에서는 생존이 불가능하다고 하였다(6). 본 실험에서는, α-COP이 파괴된 균주를 사용하는 대신, 30°C에서는 생존이 가능하나 37°C에서는 삼투안정제가 없으면 생존이 불가능한 돌연변이주인 LP0353을 대상으로 37°C에서 삼투감수성의 상보여부만 조사하였는데, 다섯 번째와 여섯 번째의 WD40 domain이 모두 포함된 construct (ESD5)에 의해서는 삼투감수성의 상보가 가능하였으나, 6번째 WD40 domain 갖는 construct (ESD6)에 의해서는 삼투감수성의 상보가 불가능하였다 (Fig 3, 4). 이상의 결과를 종합하여 보면, 본 실험에 사용한 균주의 유전적 배경이 Eugester 등이 사용한 균주와 다르기는 하나, α-COP/*Soo1p*의 N-말단에 위치하는 6개의 WD40 domain 중 5번째 WD40 domain이 세포벽의 합성이나 구조유지에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정할 수 있다. 이러한 추정은 553번과 712번의 ATG로부터 시작하는 DNA construct를 각각 제조하고, 이들 construct이 30°C에서 α-COP이 파괴된 균주의 생존을 가능하게 하는지, 돌연변이주인 LP0353가 37°C에서 나타내는 온도 의존적 삼투감수성을 상보할 수 있는지를 조사하면 확정될 수 있을 것이며, 이를 확인하기 위한 실험을 진행 중이다.

한편, 최근 본 연구진이 *soo1-1/ret1-1* 돌연변이의 세포벽 구성 단백질의 특성을 조사한 바에 의하면, 정상 세포에서는 세포벽의 다른 구성성분과 공유결합으로 연결되어 있는 *Cwp1p* (34)와 *Sed1p* (33)가 수소결합으로 세포벽의 다른 구성성분과 연결되어 있으며 이들 단백질이 hypoglycosylation된 것으로 조사되었다(15). 그런데, ER에 상주하는(ER-resident) 단백질로, 분비단백질의 N-glycosylation에 관여하는 효소로 알려진 oligosaccharyl-transferase (OST) 복합체에 이상이 생긴 *ost* 돌연변이체들의 돌연변이형질(14)이 *soo1-1/ret1-1* 돌연변이 형질과 상당히 유사하다는 점은 *soo1-1* 돌연변이와 세포벽 합성과정의 결손과의 연관성을 해석하는 데 있어 시사하는 바가 크다. 즉, *Soo1p*의 5번째 WD40 domain 내에 위치하는 227번 아미노산에 이상이 생긴 *soo1-1p*는 비허용온도인 37°C에서 OST 복합체 구성단백질의 역수송을 정상적으로 수행하지 못하기 때문에, 세포벽 합성 단백질인 베타-1,3-글루칸 합성효소와 *Cwp1p*나 *Sed1p* 등의 세포벽 구성 단백질의 glycosylation이 정상적으로 이루어지지 못하는 것으로 추정된다. 이 때문에 *soo1-1* 돌연변이체는 비허용온도에서 베타-1,3-글루칸 함량이 감소하고, 세포벽의 견고성(rigidity) 유지에 필수적인 단백질의 정상적인 조립(assembly)도 일어나지 아니하여 삼투감수성을 나타내게 될 것이다. 이러한 추론을 뒷받침하기

위하여, *soo1-1* 돌연변이에 의한 Cwlp1과 Sed1p의 glycosylation 양상의 변화를 확인하고 Soo1p의 227번 아미노산을 다른 아미노산으로 치환할 경우 나타나는 돌연변이 형질을 조사하기 위한 실험을 진행 중이다.

본 연구에서 제시한 추론이 앞으로 입증된다면, 세포 내 단백질 수송에 관여하는 Soo1p/ α -COP이 세포벽 단백질을 비롯한 분비단백질의 glycosylation에 미치는 영향을 밝혀 낼 수 있게 될 것이며, 이를 근거로 효모를 비롯한 진균류의 세포벽 구조 유지에 중요한 역할을 담당하는 새로운 단백질을 규명함으로써 항진균제 개발에 필요한 새로운 표적물질을 찾아낼 수 있게 될 것이다. 또한 *S. cerevisiae* 등의 효모류를 외래 단백질 생산용 숙주로 사용할 때 제기되는 문제점인 hyperglycosylation의 문제를 해결할 수 있는 방안도 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 1998년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-1998-001-D00631).

참고문헌

- 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. Bower. 1991. Carbohydrates as structural constituents of yeast cell wall and septum. *Pure & Appl. Chem.* 63, 483-489.
- Douglas, 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. 1994. 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.
- Douglas, C.M., J.A. Marrinan, W. Li, and M.B. Kurtz. 1994. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3- α -D-glucan synthase. *J. Bacteriol.* 176, 5686-5696.
- Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G.C. Chen, R.A. Ford, C.S.M. Chan, Y. Takai, and E. Cabib. 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science.* 272, 277-279.
- Eugester, A., G. Erigerio, M. Dale, and R. Duden. 2000. COPI domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J.* 19, 3905-3917.
- Gerich, B., L. Orci, H. Tschochner, F. Lottspeich, M. Ravazzola, M. Amherdt, F. Wieland, and C. Harter. 1995. Non-clathrin-coat protein is a conserved subunit for coatomer and in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3229-3233.
- Harrison-Lavoie, K.J., V.A. Lewis, G.M. Hynes, K.S. Collison, E. Nutland, and K.R. Willison. 1993. A 102 kDa subunit of a Golgi-associated particle has homology to beta subunits of trimeric G proteins. *EMBO J.* 12, 2847-2853.
- Ishiguro, J., A. Saitou, A. Duran, and J.C. Ribas. 1997. *cps1+*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J. Bacteriol.* 179, 7653-7662.
- Ito, H., Y. Fukuda, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- Jin, E.H., D.W. Lee, J. Kim, and H.M. Park. 1995. Cloning of gene involved in biosynthesis of β -1,3-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Mycol.* 23, 129-138.
- 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.
- Kelly, R., E. Register, M.J. Hsu, M. Kurtz, and J. Nielsen. 1996. Isolation of a gene involved in 1,3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. *J. Bacteriol.* 178, 4381-4391.
- Knauer R. and L. Lehle. 1999. The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 17249-17256.
- Lee, D.W. 2000. Ph.D. thesis. Chungnam National University, Taejon, Korea.
- Lee, D.W., K.W. Ahn, H.G. Kang, and H.M. Park. 1999. Identification of a gene, *SOO1*, which complements osmo-sensitivity and defect in β -1,3-glucan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1450, 145-154.
- Lee, D.W., S.W. Park, E.H. Jin, J.H. Chung, J. Kim, and H.M. Park. 1994. Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective β -1,3-glucan synthase. *Kor. J. Genet.* 16, 259-268.
- Letourneur, F., E.C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S.D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson. 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell.* 79, 1199-1207.
- Mandel, M and A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection *J. Mol. Biol.* 53, 109-118.
- Mio, T., M. Adachi-Shimizu, Y. Tachibana, H. Tabuchi, S.B. Inoue, T. Yabe, T. Yamada-Okabe, M. Arisawa, T. Watanabe, and H. Yamada-Okabe. 1997. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 179, 4096-4105.
- Mol, P.C., H.M. Park, J.T. Mullins, and E. Cabib. 1994. A GTP-binding protein regulates the activity of (1 \rightarrow 3)- β -glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 31267-31274.
- Neer, E.J. and T. F. Smith. 2000. A groovy new structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 960-962.
- Orlean, P. 1997. Biogenesis of yeast wall and surface components, p. 229-362. In J.R. Pringle, J.R. Broach, and E.W. Jones (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: cell cycle and cell biology.* Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Pastor, F.I.J., E. Valentine, E. Herrero, and R. Sentendaru. 1984. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoproteins released by Zymolyase and their contribution to wall architecture. *Biochim. Biophys. Acta.* 802, 292-300.
- Pereira, M., M.S. Felipe, M.M. Brigido C.M. Soares, and M.O. Azevedo. 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 16, 451-462.
- Qadota, H., C.P. Pyton, S. B. Inoue, M. Arisawa, Y. Anraku, Y. Zheng, T. Watanabe, D.E. Levin, and Y. Ohya. 1996 Identification

- of yeast Rhoip GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -glucan synthase. *Science*. 272, 279-281.
27. Rose, M.D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 28. Rothstein, R. 1991. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Meth. in Enzymol.* 194, 281-301.
 29. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 30. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. USA.* 74, 5463-5467.
 31. Schröder-Köhne, S., F. Letourneur, and H. Riezman. 1998. Alpha-COP can discriminate between distinct, functional di-lysine signals in vitro and regulates access into retrograde transport. *J. Cell. Sci.* 111, 3459-3470.
 32. Shematek, E.S., J.A. Braatz, and E. Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall: I. Preparation of β -(1,3)-glucan synthase. *J. Biol. Chem.* 255, 888-894.
 33. Shimoi, H., H. Kitagaki, H. Ohmore, Y. Iimura, and K. Ito. 1998. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J. Bacteriol.* 180, 3381-3387.
 34. Shimoi, H., Y. Iimura, and T. Obata. 1995. Molecular cloning of CWPI: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein localized with *Rarobacter faecitabidus* protease I. *J. Biochem. (Tokyo)* 118, 302-311.
 35. 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 \rightarrow 3)- β -D-glucan synthase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 642-646.
 36. Thompson, J.R., C.M. Douglas, W. Li, C.K. Jue, B. Pramanik, X. Yuan, T.H. Rude, D.L. Toffaletti, J.R. Perfect, and M. Kurtz. 1999. A glucan synthase *FKS1* homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J. Bacteriol.* 181, 444-453.

(Received January 7, 2001/Accepted March 8, 2001)

ABSTRACT : Isolation and Analysis of the Yeast Mutant Gene, *soo1-1*, which Confers the Defect in β -1,3-glucan Biosynthesis

Jae-Joon Lee, Dong-Won Lee, Ki-Hyun Kim, and Hee-Moon Park*(Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea)

Allele rescue and sequence analysis of *soo1-1* allele in *Saccharomyces cerevisiae* mutant LP0353 revealed that *soo1-1* is identical to the previously reported *ret1-1* allele, which has a base substitution of A for G⁶⁸¹ leading to an amino acid substitution of aspartic acid for glycine²²⁷ in Soolp. However, it was revealed that the addition of osmotic stabilizer, such as 1.2M sorbitol can rescue the temperature sensitive phenotype of the *ret1-1* mutant and that the *soo1-1/ret1-1* mutation may confer defects in post-translational modification of proteins involved in the yeast cell wall biogenesis. Evidence for a putative role of 5th WD40 domain of the Soolp/ α -COP in the construction and maintenance of cell walls was also presented by complementation test with deletion constructs of the *SOO1*.