

## 효모균 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포벽 분자 구조와 기능

서울대학교 의과대학 보라매병원 병리과, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 감염내과<sup>1</sup>

장미수 · 김성철<sup>1</sup> · 최상호<sup>1</sup> · 우준희<sup>1</sup>

= Abstract =

### The Molecular Structures and Function of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall

Mee Soo Chang, Sung Chul Kim<sup>1</sup>, Sang Ho Choi<sup>1</sup> and Jun Hee Woo<sup>1</sup>

Department of Pathology, Boramae Hospital, Seoul National University College of Medicine,  
Department of Infectious Diseases, Asan Medical Center, University of Ulsan,  
College of Medicine<sup>1</sup>, Seoul, Korea

The main characteristics of molecular structures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall are now elucidated. The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is composed of inner layer and outer layer and is the structure that plays an important role of providing physical and chemical protection and deciding the morphology of the cell. The inner layer of the cell wall is responsible for the mechanical strength of the wall and also providing the attachment sites for the proteins that form the outer layer of the cell wall. The outer protein layer limits the permeability of the cell wall, therefore, shields the plasma membrane from perturbation stimuli by foreign material such as enzymes and other chemicals. The molecular composition and organization of the cell wall may vary according to the environmental circumstances. The formation and genetic control of the specific cell wall protein-polysaccharide complexes is influenced by external conditions and stimuli. Cell wall construction is tightly controlled and strictly coordinated with progression of the cell cycle. This is reflected in the usage of specific cell wall proteins during consecutive phases of the cell cycle and in the recent discovery of a cell wall integrity checkpoint. [Kor J Med Mycol 2007; 12(3): 129-138]

**Key Words:** Cell wall, Molecular structures, Protein-polysaccharide, *Saccharomyces cerevisiae*

### 서 론

효모균 (*Saccharomyces cerevisiae*) 세포벽의 분자학적 구성에 대한 지식이 증가하여 세포벽에 존재하는 다양한 단백질과 다당류 복합체의 기

능도 추정에서 사실로 변화되고 있다. 더 나아가 세포벽에 가해지는 자극과 다양한 환경적인 상황에 대한 세포벽의 구성과 조성의 변화는 환경적 요소와 여러 가지 유전자 조절도 한 몫을 하고 있다. 세포벽의 구조는 정교하게 조절되고 있으나, 조절하는 기전을 우리는 단편적으로 밖에 알고 있지 못하다. 효모균세포의 기능과 구조의 관계를 정리하여 진균 연구의 기초로 활용하고자 한다<sup>1,2</sup>.

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 우준희, 138-736 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 감염내과  
전화: (02) 3010-3300, Fax: (02) 3010-6970  
e-mail: junheewoo@amc.seoul.kr

## 진균세포벽의 구조와 기능

세포벽은 물리적인 보호와 삼투적인 지지를 해주는 단단한 구조이다<sup>3</sup>. 전자현미경적 분석에서 세포벽은 성장조건과 유전적 요인에 영향을 받는 70~100 nm 두께의 electron-transparent 내층 (inner layer)과 electron-dense 외층 (outer layer)의 층상 구조를 나타낸다. 효모균에서 electron-transparent 내층 두께는 200 nm이다. 세포벽의 물리적인 강도는 주로 내층에 의해 형성되고, 내층은 세포벽 중량의 약 50~60% 정도되는  $\beta$ 1,3-glucan과 chitin으로 구성되어 있다. 세포표면으로부터 나오는 무거운 glycosylated mannoprotein으로 구성된 외층은 세포간의 인식에 관여하고<sup>4</sup>, 세포벽의 내부와 원형질막에 식물조직에 있는 세포벽 분해효소와 같은 외부효소의 접근을 제한한다<sup>5</sup>. 세포표면 단백질의 탄수화물 측쇄는 phosphodiester bridges를 많이 가지고 있으며, 생리적인 pH에서 음전하를 띠고 있어서 세포벽이 친수성을 나타내게 하여, 습기찬 환경이나 건조한 환경에서 보호 기능을 발현한다. 세포벽 단백질은 직접적으로 또는  $\beta$ 1,6-glucan에 의해 간접적으로  $\beta$ 1,3-glucan-chitin network와 공유결합하고 있다. 경우에 따라서는 다른 세포벽의 단백질에 disulfide-bond로 연결되어 있다<sup>6</sup>.

세포벽은 매우 탄력적이다. 효모세포는 고농도 용액에 옮겨졌을 때, 삼투압에 따라서 처음 부피의 60%까지 줄어들 수 있다. 이런 과정은 가역적이므로 원래 배지에 다시 옮겨졌을 때, 즉시 처음 부피로 팽창한다. 이런 세포벽의 탄력성은  $\beta$ 1,6-glucan chain의 탄력적인 특성 때문인 것으로 보인다. 분리된 세포벽은 760 Da의 분자량을 가진 분자만 통과시키나, 살아있는 세포의 세포벽은 특히 저농도 상태에서 그리고 성장 환경에 따라 더 큰 분자를 통과시킬 수 있다<sup>7</sup>.

세포벽의 물리적인 강도는 aniline blue에 특 징적으로 염색되는  $\beta$ 1,3-glucan에 의해 생긴다<sup>8</sup>.  $\beta$ 1,3-glucan chain들은 흔히 말하는 속빈나선구조

(hollow helix)에 내재하는 형태이므로, 다양한 신 장 상태로 있을 수 있는 탄력적인 용수철 모양 을 형성하기 때문에 세포벽이 탄력성을 가질 수 있다. Krainer 등은 magic-angle spinning <sup>13</sup>C-NMR 을 이용해  $\beta$ 1,3-glucan의 한 부분이 나선형 구조 를 가지고 있다는 것을 밝혀냈다<sup>9</sup>.

$\beta$ 1,3-glucan은 측벽에서 약간 결정화되어 있다. 휴지기 세포에서  $\beta$ 1,3-glucan 분자는 약 1500 당 단량체로 구성되어 있음이 밝혀졌는데, 이 결과는 추출과정 동안에 glucan chain의 가수분해의 결과로 인하여 축소된 것으로 생각할 수 있다<sup>10</sup>. 추출할 때 사용한 산의 형태에 따라 상당히 많은 중합반응이 보고되고 있는데, 효모는 성장단 계와 탄소원료에 어느 정도 의존하는 두 개의  $\beta$ 1,3-glucan synthase complexes를 사용하기 때문에 중합반응의 정도는 환경적인 상황에 따라 달라 진다<sup>11</sup>. 성장된 형태에서 휴지기 세포의  $\beta$ 1,3-glucan chain은 적당히 분지되어 있고, 약 3~4% 정도  $\beta$ 1,6-linked glucose residues를 가지고 있으며, 분지 정도는 성장 환경에 따라 다를 수 있다.

$\beta$ 1,3-glucan의 결정화가 잘 되지 않고 분리 추 출된 세포벽 (isolated walls)의 X-ray 회절 결과로 판단할 때 성장한  $\beta$ 1,3-glucan 분자에서 적당한 branching 정도는 regenerating spheroplasts의 표면 에서 보이는 전반적인 결정화를 방해한다. 반면 에 상당한 길이의 연속된 chain은 측쇄간연합을 안정되게 하여 3차원 network를 이룬다. 이것과 일치하게, negative staining을 사용하여 전자현미 경 연구에서 고립 세포벽은 약 20~60 nm 폭의 그물구조를 가지는 미세한 network가 있다. 분리 추출된 세포벽은 신장되지 않은 상태로 있기 때 문에, 살아 있는 세포의 glucan 층의 통로는 보 다 폭이 넓은 거라 생각되며 이것은 inner wall에 서 아주 큰 단백질에만 투과성에 제한이 되는 이유를 설명해준다.

효모에 있는 2개의  $\beta$ 1,3-glucan synthase complex는 환경조건에 따라서 Fks1 또는 Gsc2/Fks2 를 가지고 있다. 두 단백질 모두  $\beta$ 1,3-glucan의 합성에 중요한 경막단백 (multi-spanning trans-

membrane protein)들이고<sup>11</sup> 해당 유전자는 진균 사이에서 잘 보존되어 있다<sup>12</sup>. 일반적으로 Fks1와 Gsc2는 화학촉매의 subunit들로 생각되나, 아직 실험적으로 증명되지 않았다. 그 이유는 두 단백질은 *Schizosaccharomyces pombe* 내의 glycogen synthase와  $\alpha$ 1,3-glucan synthase에 있는 알려진 UDP-Glc binding site (K/RXGG)가 없기 때문이다<sup>13</sup>. 그 대신 원형질막을 통해 새로 형성된 chain을 밖으로 내보내는 공형성단백 (pore-forming protein)을 가지고 있다. Snap-frozen freeze-etched cells을 이용한 전자현미경 연구에서 원형질막의 particle들이 확인되었고, 근접 검사 시 직경 5 nm의 fibril이 원형질막에서 나오는 것을 볼 수 있다. 이 fibril은 세포벽의 안으로 들어가므로  $\beta$ 1,3-glucan fibril이라는 것을 알 수 있다. 분자 유전학적인 기술이 함께 적용되면 생체 안에서의  $\beta$ 1,3-glucan 합성에 좀더 완벽한 이해를 할 수 있을 것이다<sup>14</sup>.

효모에서 성장하는 (growing)  $\beta$ 1,3-glucan chain이 환원첨단 (reducing end)에서 또는 비환원첨단 (nonreducing end)에서 확장되는지는 확실하지 않다. 그러나 fungus인 *Sclerotium rolfii*의  $\beta$ 1,3-glucan은 비환원첨단에서 확장되고, bacterial cellulose, diatom chitin과 plant homogalacturonan은 비환원첨단에서 확장되어서, 이는 일반적으로  $\beta$ 1,3-glucan synthase도 경로 당화전달효소와 마찬가지로 입을 보여준다<sup>15</sup>. 이것은 growing chain의 환원첨단이 즉시 Pir cell wall protein과 coupling에, Bg12와 같은 processing enzyme들에 사용할 수 있게 한다<sup>16</sup>.

$\beta$ 1,3-glucan은 선형측쇄 (linear chain)로 합성되기 때문에 성장한 분자에서 분지의 존재는  $\beta$ 1,3-glucan processing enzyme들이 있다는 것을 의미한다. 등장성장 동안에 새로 합성된  $\beta$ 1,3-glucan 분자가 성장하는 세포벽으로 합쳐지는 데는 효소가 필요한데, 강력하게 작용하는 효소는  $\beta$ 1,3-glucan의 확장과 재배열에 작용하는 endotransglycosylase인 Gas1와 intrachain  $\beta$ 1,6-linkages에 작용하는 endotransglycosylase인 Bg12이다. Crh1,

**Table 1.** 효모균세포벽 구성물질

분자	중량 (%)	생성장소	분지 정도
Mannoproteins	35~40	분비경로	고도분지
$\beta$ 1,6-glucan	5~10	원형질막	고도분지
$\beta$ 1,3-glucan	50~55	원형질막	중등도분지
Chitin	1~2	원형질막	선형

SUN family도 유사작용을 할 것으로 추정되지만, 생체 내에서 그들의 정확한 기능은 아직 완전히 알려지지 않았다<sup>17-19</sup>.

Chitin은 bud scars의 내부와 주변, chitin ring에서 linear chains로 생성되는 것으로<sup>20</sup>, 모세포의 측벽에 좁은 범위에서 균일하게 퍼져있어 lateral walls의 intrinsic part 역할을 한다. Bud scars로부터 추출된 chitin은 190 N-acetylglucosamine 단일체 (monomer)로 구성되어 있으나, 측벽의 chitin에서 효과적인 역할을 하는지는 알려져 있지 않다. Calcofluor white는 chitin, chitosan, cellulose와 같은  $\beta$ 1,4-glucans에 결합하는 음이온의 형광염색물질이다.  $\beta$ 1,3-glucans과는 반응하는 부분이 적어서 *S. cerevisiae*에서 calcofluor white는 chitin을 관찰하기 위해 사용된다.

*S. cerevisiae*에서 chitin 합성은 3개의 chitin synthase가 관여되며, 정교하게 조절되고 있다<sup>20</sup>. 정상적인 환경에서 측벽에 chitin 침착은 세포질 분열 후에 발생하고 측벽에 chitin level을 상대적으로 낮게 유지한다. 발아흉터 (budding scar)를 제외하면 0.1~0.2%, budding scar를 포함하면 1~2%이다 (Table 1). 그러나 유전학적으로 약한 세포벽을 가진 세포들은 chitin 합성이 salvage mechanism의 한 부분으로 활성화되어, 측벽의 chitin level이 세포벽 건조중량의 20%까지 증가한다. 또한 salvage mechanism에서 알 수 있듯이, chitin은 growing bud의 세포벽에 침착한다<sup>21</sup>. 이에 해당하는 synthase는 Chs3에 암호화되어 있다<sup>22</sup>. Chs3는 multi-spanning membrane protein이며, 원형질막의 세포질 쪽에 작용한다. 다른 fungal chitin synthase들처럼 진단적인 요소인 D,D,D,QRRRW

을 가지고 있는 processive enzyme이다. Diatom chitin synthase는 UDP-GlcNAc를 기질로 사용하여 비환원침단에서 growing chitin chain을 연장한다. Fungal chitin synthase들이 비슷하게 작용하면, chitin chain의 reducing end는 원형질막을 통해 pore로부터 나타날 때  $\beta$ 1,3-glucan과  $\beta$ 1,6-glucan 분자 수용체부위에 coupling으로 작용한다<sup>23</sup>.

$\beta$ 1,6-glucan은 성장한 상태에서 평균적으로 약 130 glucose monomer들로 구성된 고도분지화된 수용성 중합체이다.  $\beta$ 1,6-glucan이  $\beta$ 1,3-glucan과 유사하게 불용성 직선형분자로 합성되는지, *S. rolfisii*에서 만들어지는  $\beta$ 1,3- $\beta$ 1,6-glucan 복합체처럼 수용성의 분지형분자로 합성되는지는 밝혀지지 않았다.

$\beta$ 1,6-glucan은 세포벽에서 GPI (GlycosylPhosphatidylinositol) 의존성 세포벽 단백질을  $\beta$ 1,3-glucan network에 연결하는데 사용되고, 또한 특히 세포벽에 대한 압력이 존재할 때 chitin에 대한 수용체부위로 작용한다<sup>23</sup>. Bussey 등은 세포벽의  $\beta$ 1,6-glucan level에 영향을 주는 여러 가지 유전자를 확인하였다<sup>24</sup>. 다양한 ER-resident proteins, Golgi-resident proteins, cell surface proteins가 세포벽  $\beta$ 1,6-glucan level에 영향을 미치고 있다. 그 결과 (i)  $\beta$ 1,6-glucan의 생합성은 ER 내에서 시작하는 단계별 과정이거나 (ii)  $\beta$ 1,6-glucan의 합성은 원형질막에서 일어나지만 primer의 단계별 합성이 필요하거나 (iii)  $\beta$ 1,6-glucan 합성은 원형질막에서 일어나지만 합성된 복합체의 활성도는 분비경로의 다양한 결합에 매우 민감하다고 설명할 수 있다. 그런데 immunogold labeling 방법으로 측정하면 세포내  $\beta$ 1,6-glucan을 발견할 수 없었고, 심지어 2시간 동안 제한된 온도에서 secretory vesicles들이 모여 있는 temperature-sensitive mutant에서도 발견할 수 없어서 생합성이 ER 내에서 시작하는 단계별 과정이라는 설명이 부정될 수 있겠지만 분석적 방법이 충분하지 않으므로 단정하기 어렵다.

바깥 세포벽 층을 형성하는 mannoprotein들은 90% 이상의 탄수화물 분획을 함유한 당화 상태

이다<sup>12</sup>. 원형질막을 통과하지 않는 biotin의 황산화 유도체를 사용하여 세포를 biotinylation하는 것은 진짜 세포벽 단백질과 우연히 결합된 단백질을 구분하는 편리한 방법이다. Mannoprotein의 바깥층은 내부의 fibrillar layer보다 고분자물질에 덜 투과적이다. 이는 주로 asparagines residue에 연결된 길고 분지된 탄수화물 측쇄와 disulfide bridge가 있기 때문이다<sup>7</sup>. 짧은 oligomannosyl chain을 가지고 있는 serine과 threonine residue는 모여 있고, 그 결과 polypeptide backbone의 상대적으로 단단한 막대모양의 지점을 만든다. N-와 O-linked mannosyl side chain들에 있는 phosphodiester bridge들 때문에 효모의 세포표면은 많은 음전하를 띄고 있다. 항진균단백 (antifungal plant protein)인 osmotin은 높은 isoelectric point를 가지고 있고, 생리적인 pH에서 음전하를 띄게 되는데, 이에 대한 효모 세포들의 예민도는 세포표면의 mannosyl phosphate group의 존재유무에 의존한다<sup>25</sup>. 덧붙여서, 세포벽은 분해된 세포에서 나오는 양전하의 세포질단백 (cytosolic protein)과 결합할 수 있다.

세포벽 다당류에 공유결합하고 있는 단백질은 2가지는 GPI-CWPs와 Pir proteins이다. 첫 번째인 GPI-dependent cell wall protein (GPI-CWPs)는 일반적으로  $\beta$ 1,6-glucan 부분과 결합하여  $\beta$ 1,3-glucan과는 간접적으로 연결된다. *S. cerevisiae*의 유전자 (genome)에는 약 60~70 GPI 단백질들이 있는데 이 중 약 40개는 원형질막이 되고 나머지는  $\beta$ 1,6-glucan과 공유결합한다<sup>23,26</sup>. 이들은 구조적으로 반복되는 부분과 serine, threonine으로 구성되어 있다. 가장 광범위하게 연구된 GPI-CWP는 sexual agglutination에 포함되는 Sag1이다<sup>26</sup>. 성숙한 단백질은  $\beta$ 1,6-glucan에 연결시키는 original GPI anchor의 잔류물만을 가지고 있는데, 핵심구조는 -ethanolamine-Pi-(Man)<sub>4</sub>-에 의해 형성되며, 추가적인 ethanolamine phosphate group들에 의해 대체될 수 있다<sup>27</sup>. 흥미롭게도, 뜨거운 아세트산에 의해 세포벽에서 추출된  $\beta$ 1,6-glucan은 소량의 galactose를 가지고 있다. 유전적인 배경에서 이

것은 GPI-CWPs의 GPI anchor 잔류물의 부분으로 생각된다. *S. cerevisiae*의 세포벽에 있는 galactose의 존재는 빵효모에 있는 UDP-galactose transporter의 증거와 일치한다<sup>28</sup>.

두 번째인 Pir proteins (Pir-CWPs)는 알칼리에 약한 결합을 통해  $\beta$ 1,3-glucan에 직접 연결되는 세포벽 다당류로 생각된다. *S. cerevisiae*에는 4가지의 단백질이 모인 그룹이 발견되었다<sup>29</sup>. 그들은 모두 비슷하게 하나의 N-terminal signal peptide인 Kex2 site와 11개의 반복을 가지고 있는 부분과 보존된 공간 형태에서 4개의 cysteine residue들을 가지고 있는 매우 잘 보존된 하나의 carboxy-terminal region을 가진 (SP-Kex2-repeat(s)-CX(66)CX(16)CX(12)C)로 구성되어 있다. Pir1, Pir2/Hsp150, Pir3, Pir4/Cis3는 모두 면역학적으로 세포벽에 위치하고 있다. 여러 가지 추가적인 단백질들, 예를 들면 Paul과 그 유사체들, 아포벽 (spore wall)의 변이에 작용한다고 생각되는 Sps100, 영양소의 제한에 의해 유도되는 Ygp1은 N-terminal signal peptide를 가지고 있으나, GPI anchor를 위한 추가적인 signal은 없는 것으로 생각된다. 최

종 목적지는 세포벽이며 세포벽에 Pir-CWP와 같은 방법으로 연결되는 것이다<sup>30,31</sup>.

단백분해효소인 Bar1, MATa 세포들에 있는 sexual agglutinin complex의 active subunit인 Aga2, Pir4/Cis3와 같은 여러 가지의 세포벽 단백질들과 다른 알려진 또는 강력한 세포벽 glycanases인 Snu4/Scw3는 환원제를 사용하여 손상되지 않은 세포에서 분비된다. 이 사실은 이들이 다른 세포벽 단백질과 disulfide 결합함을 시사한다. 환원제는 용해되는 GPI-CWPs의 intermediate form을 분비한다. 분리 추출된 세포벽의 SDS 추출은 많은 단백질들을 분비하며 Transglucosylase인 Bgl2와 chitinase인 Cts1과 같은 예외를 제외하면, 진정한 세포벽 단백질들이 아니고, membrane fragmentation으로 인한 오염에 의해 생기는 것이다<sup>32</sup>.

HSP (heat-shock protein)군에 속하는 구성요소와 Tdh1, Tdh2, Tdh3와 같은 glycolytic enzyme들이 세포표면에서 많이 발견된다<sup>33</sup>. 약알칼리 환경에서 mercaptoethanol같은 환원제로 intact cell에서 추출하면 HSP는 세포벽 내에 포획되어 있거나 이온적으로 세포표면 단백질들과 결합되어

**Table 2.** 효모균 세포벽 유전자와 관련된 기능

기능	관련유전자
세포벽투과성	CCW12, YDR134C
생식	SAG1, AGA1, AGA2, FIG2
Flocculation	FLO1, FLO5, FLO9, FLO10
침습성성장	FLO11
생필립형성	FLO11
글루칸재형성	CRH1, CRH2, CRR1, FIG2 ispeculative, BGI2
세포분리	EGT2, PRY3, CTS1, DSE2, SDE4, SCW11
세포벽강화	CWP1, PIR1, PIR21HSP150, PIR3, PIR41CIS3
등방성 (Isotropic) 성장	PIR1, PIR21HSP150, PIR3, PIR41CIS3
발아성장	SPO1
정지상 (Stationary) 성장	SED1, SPI1
혐기성성장	DAN1, DAN4, TIP1, TIR1, TIR2, TIR3, TIR4
저온성장	TIP1, TIR1, TIR2, TIR4
대사	TIP1 FIT1, FIT2, FIT3

있다. HSP가 분해된 세포에서 나왔는지, 아니면 정해지지 않은 분비기전을 통해 배출되는지는 명확치 않다. HSP와 당용해효소는 regenerating spheroplasts의 배지에서도 발견된다<sup>34</sup>.

세포벽 단백질은 다양한 기능을 가지고 있다 (Table 2). 세포벽 단백질의 정확한 기능은 잘 알려져 있지 않다. 아주 작지만 많을 것으로 생각되는 GPI-CWPs인 Ccw12와 Ydr1234c는 세포표면에 mannans을 생성하며 다양한 GPI-CWPs는 효모 세포의 sexual agglutination과 flocculation과 같은 유착에 관여한다. 다른 것들은 Crh1, Crh2, Crr1과 같은 효소기능을 가지고 있다.

*PIR* 유전자의 표현은 세포벽 긴장이 있을 때 증가되며<sup>36</sup>, 이는 유전자의 산물이 세포벽의 강도에 관여할 것이라는 생각과 일치한다. 4개의 유전자들의 분열은 성장속도가 감소하며, Calcofluor white와 Congo red에 더욱 민감한 팽창세포로 변형되고, 이는 세포벽이 약해져 있다는 것을 보여준다<sup>29</sup>. 흥미롭게도, *PIR2*가 과도하게 표현된 세포는 plant antifungal protein인 osmotin에 내성을 나타내지만 *PIR1*, *PIR2*, *PIR3*가 없는 세포는 감수성이 있다. Osmotin에 대한 내성의 차이는 손상되지 않은 세포벽의 존재유무에 따라 다르다. 왜냐하면, spheroplasting 후에는 세포들이 모두 감수성을 나타내기 때문이다. Pir-CWPs는 세포벽이 osmotin과 다른 단백질들에 잘 투과되지 않도록 한다.

세포벽 다당체 단백질은 다양한 방법으로  $\beta$ 1,3-glucan network에 결합한다. 영양 배지에서 성장한 효모균 세포는 GPI-CWP- $\beta$ 1,6-glucan complex- $\beta$ 1,3-glucan complex가 많다. 이것은  $\beta$ 1,6-glucan의 nonreducing end에 GPI remnant를 통해 공유결합되어 있고 차례로  $\beta$ 1,3-glucan의 non-reducing end에 결합되어 있는 Ccw12, Tip1, Ssr1, Cwp1, Sag1과 같은 세포벽 단백질들로 구성된다<sup>23</sup>. GPI remnant (핵심구조: -ethanolamine-Pi- (Man)<sub>4</sub>-)는 phosphodiester bridge를 가지고 있기 때문에, 수성불소산을 사용하면 GPI-CWPs를 특이적으로 분리할 수 있다. Pir-CWP- $\beta$ 1,3-glucan은 다른 많은 CWP-

polysaccharide 복합체를 나타내며, PIR균의 단백질은  $\beta$ 1,3-glucan과 알칼리에 민감한 결합을 통해 연결되어 있다<sup>29</sup>. 약알칼리에 민감도가 있다는 것으로 볼 때 O-linked side chain을 포함하는 것으로 생각되지만, 결합의 특성은 완전히 파악하지 못한 상태이다. Pir-CWPs의 immunogold labeling을 통해 signal이 세포벽의 chitin- $\beta$ 1,3-glucan 층에 균일하게 퍼져있다는 것을 알 수 있다. 반대로 GPI-CWPs Sag1과 Flo1의 immunogold labeling은 바깥 세포벽층의 fibrillary layer에 강한 labeling을 보여준다. 이것은 Pir-CWPs가 inner layer의 한 부분이라는 것과  $\beta$ 1,3-glucan 분자는 하나의 Pir-CWP O-linked side chain에 reducing end를 통해 공유결합되는 것을 시사한다.

Cwp1과 같은 GPI-CWPs는 Pir-CWP와 같은 방법으로 알칼리에 민감한 결합을 통해  $\beta$ 1,3-glucan과 직접 연결되어 있다<sup>36</sup>. 그 결과 single- 또는 double-linked라는 2개의 추가적인 GPI-CWP-polysaccharide 복합체들이 구분된다. Cwp1과 강하게 double-link된 다른 GPI-CWPs는 세포벽의 자극에 대한 세포반응에 중요한 역할을 한다. 5번째 복합체는 chitin과 서로 직접 연결되어 있는  $\beta$ 1,6-glucan 분자와 연결된 GPI-CWP에서 확인되었다. 영양 배지에서 성장한 세포에서는 chitin- $\beta$ 1,6-glucan 복합체가 감소되었지만, 특별한 상황에서는 증가될 수 있다. 전체 chitin의 10%를 나타내는 측벽의 chitin이  $\beta$ 1,6-glucan과 특이적으로 연결된 것으로 보인다. 이것은 측벽의 chitin이 주로 complex GPI-CWP- $\beta$ 1,6-glucan-chitin의 형태로 존재한다는 것을 의미한다. 마지막으로, chitin은  $\beta$ 1,3-glucan과 직접 연결되기도 한다. Chitin- $\beta$ 1,3-glucan 복합체는 성장배아 (growing bud)처럼 붙어있는 chitin 분자 없이도 존재할 수 있고, chitin 분자는 다양한 세포벽 단백질 다당류 복합체에서 나타나는 다른  $\beta$ 1,3-glucan 분자에 결합할 수 있기 때문에 처음 복합체에서 생략될 수 있다.

Chitin과  $\beta$ 1,3-glucan의 합성은 원형질막에서 일어나고 GPI-CWPs와  $\beta$ 1,6-glucan의 결합은 원형질막 밖에서 일어나기 때문에 세포벽의 고분자물질

들 간의 결합도 원형질막 밖에서 생성되며 상호 결합에 관여하는 다양한 세포벽 assembly-enzyme 인 transglycosylase가 있음을 시사한다. 2개의  $\beta$ 1,6-linked glucose monomer들로 구성된 gentiobiose 존재 환경에서 성장한 세포에서는 원래 효모균보다 GPI-CWP reporter protein에 제대로 흡수되지 않고, Zymolyase에 감수성이 증가한다<sup>37</sup>. 이것은 gentiobiose가  $\beta$ 1,6-glucan을 포함하고 있는 cell wall assembly step을 저해함을 의미한다.

세포벽은 세포전체를 둘러싸고 있는 2층 구조의 supramolecular structure를 가지고 있다. 세포벽의 물리적인 강도는 측부로 연결되어 있는 chain들 간의 수소결합에 의해 함께 모여 있어서 3차원 망을 형성하는 moderately branched  $\beta$ 1,3-glucan molecule의 내부 층을 대부분 기반으로 한다. Methylation 분석은 각  $\beta$ 1,3-glucan polymer가 많은 측쇄들을 가지고 있는 것을 보여주었다.  $\beta$ 1,3-glucan terminal nonreducing ends는  $\beta$ 1,6-glucan과 chitin의 acceptor site로 기능하는 것으로 믿어지고 있는 반면,  $\beta$ 1,3-glucan 분자들의 reducing end는 Pir-CWPs 연결에 관여한다<sup>36</sup>. Methylation 분석에서 성장한  $\beta$ 1,6-glucan은 highly branched molecule임을 알 수 있었고 이로써 수용성인 이유가 설명되었다. Chitin은 세포질 분열이 일어난 후 측벽에 침착하고 세포벽을 굳어지게 한다. 이것은 세포벽의 총 chitin의 10% 미만이고,  $\beta$ 1,3-glucan 또는  $\beta$ 1,6-glucan과 결합될 수 있다<sup>23</sup>.

Sexual agglutinin인 Sag1의 생합성 경로는 세심히 연구되어 2개의 extracellular glycoform인 원형질막에 결합한 형태와 가용성 형태를 포함하여 여러 가지 intermediate glycoform들이 확인되었다<sup>26</sup>. 성숙한 세포벽의 형태와는 달리 2개의 extracellular intermediate는 아직  $\beta$ 1,6-glucan과 결합된 상태가 아니다. 이 결과로부터 GPI-CWP- $\beta$ 1,6-glucan- $\beta$ 1,3-glucan 복합체는  $\beta$ 1,6-glucan이  $\beta$ 1,3-glucan에 연결된 뒤 GPI-CWP가  $\beta$ 1,6-glucan과 결합하는 순서로 생성된다. 다른 CWP-polysaccharide 복합체들이 형성되는 방법에 대해서는 알려져 있지 않다.

GPI-CWPs, Pir-CWPs, disulfide-linked cell wall protein은 세포벽의 target fusion protein과 공유결합으로 연결된다<sup>6,38</sup>.

다른 *Candida*종 즉 *Candida glabrata*에서 인간의 상피세포 부착에 관여하는 authentic GPI-CWP가 *S. cerevisiae*에서 표현되는 것처럼, 표피세포에 효과적으로 부착할 수 있어 *Candida albicans*의 세포벽도 *S. cerevisiae*와 비슷하게 구성되어 있다<sup>39</sup>. Pir-CWPs는 *C. albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*에서 발견된다. 여기에 나타나는 세포벽 형태는 핵분열효모 *Schizosaccharomyces pombe*에만 단지 부분적으로 관찰되는데, 그 이유는 첫째, *S. cerevisiae*와는 달리 *S. pombe*의 세포벽은 상당량의  $\alpha$ 1,3-glucan을 함유하고 있고, 둘째, southern analysis에서 *S. pombe*는 PIR-like gene이 없기 때문이다.

세포벽 단백질과 구성물질의 변이를 유발하여 구조와 기능의 관계를 연구할 수 있는데, De Groot 등은 *S. cerevisiae*에서 세포벽의 구조는 정교하게 조절되는 과정이며, 약 1200개 유전자들이 직간접적으로 세포벽 합성에 영향을 준다는 것을 보여주었다<sup>41</sup>. 손상된 세포벽을 가지고 있는 변종들의 확인을 위한 1차 선별은  $\beta$ 1,3-gluconase, Calcofluor white와 연관된 화합물질인 Congo red, SDS, caffeine과 같이 정상 세포벽 구조를 직간접적으로 방해하는 것으로 알려진 화합물에 대한 민감도의 증가에 기반을 두고 있다<sup>41,42</sup>. 이러한 화합물이 공통적으로 성장을 저해하는 효과는 삼투적으로 안정화 시키는 매질로 반감시킬 수 있다. 초음파 분해와 hypotonic shock에 대한 민감도 증가는 세포벽 결합을 가지고 있는 변종들을 확인하는데 사용되었다. 세포벽과 합쳐져 성장하는 부위에서는 세포분해를 유발하는 2-deoxyglucose가 세포벽 변종들을 확인하는데 효과적으로 사용된다. 대체적으로 culture filter는 증가된 양의 세포벽 단백질들과 defective cell wall assembly를 나타내는 불완전한 CWP-polysaccharide 복합체들을 선별 검사할 수 있다<sup>40</sup>. 일반적으로 세포벽 (cell wall perturbants)은 30°C

보다 37°C에서 보다 변형 또는 파괴되기 쉽다. 왜냐하면, 세포벽의 증가된 팽창압력과 37°C는 세포벽의 assembly enzyme들이 불활성화 되어 결합을 가진 세포벽을 나타내는 2가지의 동반 효과 때문이다.

## 요 약

진균세포벽의 구조는 새로운 항진균제의 발견을 향한 매우 흥미로운 목표이다. 세포벽의 polymer syntheses, cell wall assembly enzyme, cell wall polymer들의 remodeling에 관여하는 효소와 같은 더 특이적인 표적을 좀더 가까운 시야에서 볼 수 있게 되었다. 그러나 효모균 외에 다른 진균(fungus)에 대한 이 효소들의 세부적인 연구는 아직 시작에 불과하다. 무엇보다도 이 효소에 대한 생화학적 그리고 결정학적인 연구는 현재 알려진 방대한 분자유전학적 정보를 보충하기 위해서 시급히 필요하다.

효모의 세포벽은 오랜 기간 동안 환경적인 변화에 의존하는 조성과 구조의 제한된 변화를 가지고 있는 상대적으로 정적인 구조로 알려져 있다. 그리고 세균처럼 세포벽의 구조가 매우 역동적인 과정이며 세포는 지속적으로 세포벽 구성과 세포표면에 있는 세포벽 단백질에 따라 변화되고 있는 환경에 새로운 형태의 세포벽에 적응하고 있다. 하지만, 조절되는 방법이나 기전에 대해서는 더 연구가 필요하다. 또한 동시에 많은 자극 상황에 직면하면, 세포가 어떻게 행동하는지에 대한 의문점도 있다. 이러한 조절기전에 대하여 보다 나은 이해는 인류의 이익을 위해 효모균과 다른 fungi를 더 효율적으로 이용할 수 있도록 도와줄 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2006; 23: 185-202

2. Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 317-343
3. Smith AE, Zhang Z, Thomas CR, Moxham KE, Middelberg AP. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9871-9874
4. Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R, Tanner W. Mating type-Specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* 1994; 13: 4737-4744
5. Reynolds TB, Fink GR. Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 2001; 291: 878-881
6. Moukadiri I, Jaafar L, Zucco J. Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* mnn1 mnn9 double mutant by reducing agents. *J Bacteriol* 1999; 181: 4741-4745
7. De Nobel JG, Klis FM, Munnik T, Priem J, van den Ende H. An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 1990; 6: 483-490
8. Beauvais A, Bruneau JM, Mol PC, Buitrago MJ, Legrand R, Latge JP. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* 2001; 183: 2273-2279
9. Krainer E, Stark RE, Naider F, Alagramam K, Becker JM. Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning <sup>13</sup>C-NMR. *Biopolymers* 1994; 34: 1627-1635
10. Muller A, Ensley H, Pretus H, McNamee R, Jones E, McLaughlin E, et al. The application of various protic acids in the extraction of (1→3) beta-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Res* 1997; 299: 203-208
11. Cabib E, Drgonova J, Drgon T. Role of small G Proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 307-333
12. De Nobel H, van Den Ende H, Klis FM. Cell wall



- maintenance in fungi. Trends Microbiol 2000; 8: 344-345
13. Hochstenbach F, Klis FM, van den Ende H, van Donselaar E, Peter PJ, Klausner RD. Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 98: 9161-9166
  14. Cui X, Shin H, Song C, Laosinchai W, Amano Y, Brown Jr RM. A putative homolog of the yeast beta-1.3 glucan synthase subunit FKS1 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers. Planta 2001; 213: 223-230
  15. Sugiyama J, Boisset C, Hashimoto M, Watanabe T. Molecular directionality of beta-chitin biosynthesis. J Mol Biol 1999; 286: 247-255
  16. Goldman RC, Sullivan PA, Zakula D, Capobianco JO. Kinetics of beta 1.3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene. Eur J Biochem 1995; 227: 372-378
  17. Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, et al. Glycosylphosphatidylinositol anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. J Biol Chem 2000; 275: 14882-14889
  18. Rodriguez-Pena JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C. A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. Mol Cell Biol 2000; 20: 3245-3255
  19. Mouassite M, Camougrand N, Schwob E, Demaison G, Laclau M, Guerin M. The 'SUN' family: yeast SUN41SCW3 is involved in cell septation. Yeast 2000; 16: 905-919
  20. Gabib E, Rob DH, Schmidt M, Crotti LB, Varma A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. J Biol Chem 2001; 276: 19679-19682
  21. Garcia-Rodriguez LJ, Duran A, Roncero C. Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing condition. J Bacteriol 2000; 182: 2428-2437
  22. Valdivieso MH, Ferrario I, Vai M, Duran A, Popolo L. Chitin synthesis in a gals mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 2000; 182: 4752-4757
  23. Kollar R, Reinhold BB, Petrakoval E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, et al. Architecture of the yeast cell wall. Beta (1-6) glucan interconnects mannoprotein, beta (1→3) glucan, and chitin. J Biol Chem 1997; 272: 17762-17775
  24. Shahinian S, Bussey H. Beta 1.6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol 2000; 179: 6279-6284
  25. Ibeas JL, Lee H, Damsz B, Prasad DT, Pardo JM, Hasegawa PM, et al. Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. Plant J 2000; 23: 375-383
  26. Lu CF, Montijn RC, Brown JL, Klis F, Kurjan J, Bussey H, et al. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1.6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J Cell Biol 1995; 128: 333-340
  27. Taron CH, Wiedman JM, Grimme SJ, Orlean P. Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects in Gpi1p and Gpi13p-deficient yeast suggest a branched pathway and implicate gpi13p in phosphothalamine transfer to the third mannose. Mol Biol Cell 2000; 11: 1611-1630
  28. Kainuma M, Chiba Y, Takeuchi M, Jigami Y. Over expression of HUTI gene stimulates in vivo galactosylation by enhancing UDP galactose transport activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2001; 18: 533-541
  29. Mersa V, Tanner W. Role of NaOH extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pirprotein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Yeast 1999; 15: 813-820
  30. Law DT, Segall J. The SPS100 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is activated late in the sporulation

- process and contributes to spore wall maturation. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 912-922
31. Destruelle M, Hlzer H, Kliinsky DJ. Identification and characterization of a novel yeast gene: the YGPI gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2740-2754
  32. Colman-Lerner A, Chin TE, Brent R. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 2001; 107: 739-750
  33. Delgado ML, O'Connor JE, Azorin I, Renau-Piqueras J, Gil ML, Gozalbo D. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology* 2001; 147: 411-417
  34. Pardo M, Ward M, Bains S, Molina M, Blackstock W, Gil C, et al. A Proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis* 2000; 21: 3396-3410
  35. Terashima H, Yabuki N, Arisawa M, Hamada K, Kitada K. Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)- attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 2000; 264: 64-74
  36. Kapteyn JC, ter Riet B, Vink E, Blad S, De Nobel H, Van Den Ende H, et al. Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* 2001; 39: 469-479
  37. Bom IJ, Klis FM, de Noble H, Brul S. A new strategy for inhibition of the spoliage yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* based on combination of a membrane-active peptide with an oligosaccharide that leads to an impaired glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent yeast wall protein layer. *FEMS Yeast Res* 2001; 1: 187-194
  38. Shibasaki Y, Kamasawa N, Shibasaki S, Zou W, Murai T, Ueda M, et al. Cytochemical evaluation of localization and secretion of a heterologous enzyme displayed on yeast cell surface. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 192: 243-248
  39. Cormack BP, Ghorri N, Falkow S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 1999; 285: 578-582
  40. De Groot PWJ, Ruiz C, Vazquez de Aldana CR, Duenas E, Cid VJ, Del Rey F, et al. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics* 2001; 2: 124-142
  41. Lussier M, White AM, Sheration J, di Paolo T, Treadwell J, Southard SB, et al. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1997; 147: 435-450
  42. Tomlin GC, Hamilton GE, Gardner DC, Walmsley RM, Stateva LI, Oliver SG. Suppression of sorbitol dependence in a strain bearing a mutation in the SRB1/PSA1/VIG9 gene encoding GDP-mannose pyrophosphorylase by PDE2 overexpression suggests a role for the Ras/cAMP signal-transduction pathway in the control of yeast cell-wall biogenesis. *Microbiology* 2000; 146: 2133-2146