

COPI 소낭 구성체인 α -COP의 돌연변이가 균류 세포벽 합성에 미치는 영향

이환희 · 박희문*

충남대학교 생명과학부(대학) 미생물학과

Effect of Mutation in α -COP, A Subunit of the COPI Vesicle, on Cell Wall Biogenesis in Fungi

Hwan-Hee Lee and Hee-Moon Park*

Department of Microbiology, School of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received June 11, 2007)

ABSTRACT: The cell wall is essential for the survival and osmotic integrity of fungal cells. It is the framework to which biologically active proteins such as cell adhesion molecules and hydrolytic enzymes are attached or within which they act. Recently it was shown that mutations in α -COP, a subunit of COPI vesicle, is responsible for the thermo-sensitive osmo-fragile phenotype of fungi, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*, and suggested that α -COP may play a crucial role in translocation of protein(s) of the β -1,3-galactan synthase complex and cell wall proteins, thus may contribute to the maintenance of cell wall integrity. In this review, we summarized the relationship between the intra-cellular protein translocation machinery, especially the α -COP of COPI vesicle, and cell wall biogenesis in fungi. We also discussed potential use of secretory mutants in basic and applied research of the fungal cell walls.

KEYWORDS: α -COP, Cell wall protein, COPI, Fungi, Mutation

자연계에서 진균류의 생활사는 세포를 둘러싸고 있는 구조물인 세포벽(cell wall)에 의존하여 이루어진다. 세포벽은 세포의 모양을 유지하거나 삼투충격으로부터 세포를 보호하는 등 진균류의 생존에 있어 필수적인 구조체로서, 유성생식을 위한 세포간의 엉김이나 뭉침현상 그리고 병원성 유지에도 중요한 역할을 수행한다. 특히 세포벽은 특정 물질들을 걸러내는 역할을 함으로써 진균류의 생존에 유해한 물질이 세포 내로 침투하는 것을 막아주는 장벽의 역할도 수행한다(Klis, 1994). '세포벽'이라는 특이 구조물은 고등 진핵 생물, 특히 인간세포에는 없는 것으로 진균류의 발생 및 분화를 이해하기 위한 연구 대상이며, 진균류의 세포벽 생합성과정 연구는 인체에 무해한 새로운 항진균성 약물(antifungal agents)을 개발하기 위한 중요한 정보를 제공할 수 있다(Pardo *et al.*, 2000). 진균류의 세포벽을 구성하는 성분에 대해서는 비교적 연구가 많이 이루어진 편이나, 합성된 세포벽 내에서 각 구성성분간의 상호작용이나 조립과정이 어떻게 이루어지고 조절되는 지는 여전히 잘 모르고 있는 상황이다. 지금까지의 연구결과로는 세포벽 합성 및 재구성에 다양한 생합성 경로가 관여하고 세포벽 내부에서는 수많은 유전자 산물이

공조하는 과정이 필요하다는 사실이 알려져 있으며, 최근에는 다양한 모델 진균류를 대상으로 한 돌연변이체 분석, 유전체 및 단백질체 분석 등을 통하여, 세포벽 합성에 관여하는 대사경로 및 유전자 산물의 기능에 대한 연구가 이루어지고 있다(Bowman and Free, 2006). 본 논문에서는 진균류의 세포벽 합성과정과 진핵세포의 분비단백질(secretory protein) 운송기구와의 상관관계를 중심으로 최근까지의 연구동향을 살펴보고자 한다.

균류 세포벽 성분

효모를 비롯한 진균류의 세포벽은 다당류인 키틴(chitin) 및 β -글루칸(glucan), 그리고 만노프로테인(mannoprotein)인 당단백질로 구성되어 있다(Cid *et al.*, 1995; Klis, 1994; Orlean, 1997). 진균류 세포벽의 다당류 성분은 포유류에는 없고 진균에만 특이적으로 존재하고, 세포벽 단백질(CWPs: Cell Wall Proteins)의 일부는 진균의 병원성과 관련이 있는 이형전환과정에도 관여한다. 따라서, 효모류를 비롯한 진균류의 형태발달과정을 이해하고, 진균류 세포표면 구성성분의 합성을 선택적으로 저해하는 약제를 개발하거나(Cabib *et al.*, 1991; Tuite, 1992), 효모류에 적용 가능한 단백질 표면발현 기술(surface display

*Corresponding author <E-mail: hmpark@cnu.ac.kr>

technique)을 개발하려면(Murai *et al.*, 1997; Shibasaki *et al.*, 2000), 다당류 및 단백질로 구성된 세포벽 구성성분의 생합성과정 및 조립과정에 대한 정확한 정보가 필요하다.

일반적으로 진균류의 세포벽은 구조성 요소인 키틴, β -1,3 및 β -1,6-글루칸, 그리고 β -1,4 글루칸이 있으며, 그 공간을 채우는 간질성 물질로는 만노프로테인(mannoprotein), 갈락토 만노프로테인(galactomannoprotein), 글루쿠로노 만노프로테인(glucuronomannoprotein), 그리고 β -글루칸 등이 발견 된다(Cabib *et al.*, 1991). 세포벽 합성과정에 대한 연구가 가장 많이 이루어진 단세포 효모류인 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포벽은 세포벽 단백질(CWPs), β -1,3- 및 β -1,6-글루칸, 그리고 키틴으로 구성되어 있고, 이들은 다양한 양상의 공유결합으로 서로 연결되어 있다(Cid *et al.*, 1995; Kapteyn *et al.*, 1996, 1997; Klis, 1994) (Fig. 1). *S. cerevisiae*의 경우 β -글루칸 사슬이 약 60%를 이루고 있으며 만노프로테인인 CWPs가 약 40%를 그리고 키틴이 약 2%를 차지하는 것으로 알려져 있으나, 사상균의 경우는 효모류 보다 훨씬 많은 양의 키틴을 함유하고 있다(Lipke and Ovalle, 1998).

CWPs는 환원제 처리에 의해 추출되는 것, glucanase 처리에 의해 추출되는 것, 그리고 SDS 처리에 의해 추출되는 것 등으로 나뉜다. 이 중 glucanase에 의해 추출되는 CWPs는 GPI(glycosylphosphatidylinositol)-CWPs와 PIR(protein internal repeat)-CWPs로 나뉘는데, GPI-CWPs는 N-말단 신호서열, ER내부에서 잘려나가 GPI-anchor가 부

착되는 C-말단부 등을 갖는 특징이 있으며, 분비경로를 통하여 세포벽에 도달한 후 글루칸과 공유결합으로 연결된다. 한편, PIR-CWPs는 N-말단 신호서열, Kex2p 인식 부위 그리고 하나 이상의 내부 반복서열 등을 갖고 있으나 C-말단에 GPI-anchor 결합부위는 발견되지 않으며, 아마도 이 단백질의 O-linked side chain을 통해 다른 세포벽 성분과 결합될 것으로 추정되고 있다(Kapteyn *et al.*, 1996, 1997). *S. cerevisiae*의 유전체 해독결과, 약 53종의 단백질이 GPI-CWPs인 것으로 분석되었으나 이 중 실험을 통하여 입증된 것은 약 14종에 불과하다(Hamada, 1998). 한편, 환원제 처리에 의하여 추출되는 단백질은 대부분 기능 등이 규명되지 아니한 종류들로 분비 단백질인지의 여부도 불확실하나(Edwards *et al.*, 1999), 일부 PIR-CWPs는 환원제 처리에 의하여 추출된다는 보고가 있으며(Moukadiri and Zueco, 2001), 최근 *S. cerevisiae* 세포벽의 글리칸(glycan)에 공유결합으로 연결된 단백질체(proteome)를 분석한 결과 총 19개가 동정되었는데 이 중 12개는 GPI가 결합된 세포벽 단백질이고, 4개는 PIR 단백질 계열 그리고 나머지 3개는 알칼리 감수성(alkali-sensitive) 결합으로 글리칸에 연결된 PIR-유사 단백질로 밝혀진 바 있다(Yin *et al.*, 2005). 그리고, 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*의 세포벽 단백질체를 분석한 결과로는 공유결합으로 연결된 단백질 6개가 동정되었는데, 이 중 4개는 GPI를 매개로 연결된 단백질이고 2개는 알칼리 감수성을 보이는 세포벽 단백질로 동정되었다(de Groot *et al.*, 2007).

균류 세포벽 성분의 합성 및 조립

*Saccharomyces cerevisiae*에서 세포벽 성분의 생합성은 두 단계로 이루어진다고 볼 수 있는데, 첫째 키틴과 β -1,3-글루칸은 원형질막에 존재하는 합성효소체계에 의하여 합성된 키틴이나 β -1,3-글루칸 사슬이 원형질막 바깥쪽으로 밀려나가는 과정인, 소위 말하는 'vectorial synthesis'에 의하여 합성된다(Cabib *et al.*, 1991). 한편, CWPs는 분비경로를 통과하면서 합성되고 분비되며, 일부 β -1,6-글루칸도 ER과 Golgi에서 합성되는 것으로 알려져 있다(Roemer *et al.*, 1994; Shahinian *et al.*, 1998). 최종적으로 이들 성분들이 상호작용하여 기능적인 세포벽으로 조립 된다(Fig. 1 참조).

최근 진균류의 세포벽 β -1,3-글루칸 생합성에 관여하는 유전자에 대한 분자유전학적 접근이 이루어져 다수의 유전자가 밝혀지게 되었다. Douglas *et al.*(1994b)은 β -1,3-글루칸 합성효소의 저해물질로 알려진 echinocandin에 내성을 보이는 돌연변이주를 *S. cerevisiae*에서 얻어내고, echinocandin에 대한 내성이 insoluble membrane fraction 중 특히 β -1,3-글루칸 합성효소의 catalytic subunit을 암호화하고 있는 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 보고하였으

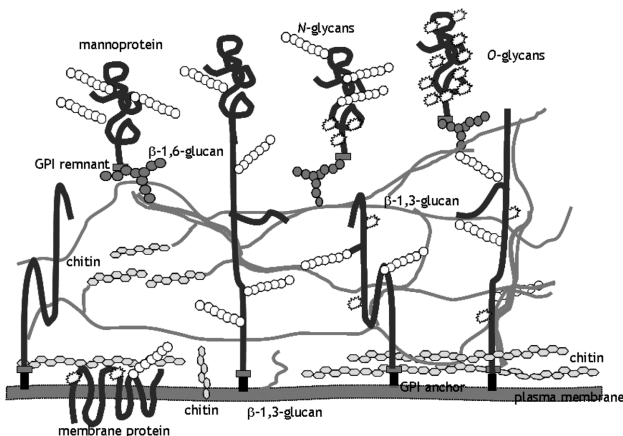


Fig. 1. Schematic presentation of cell wall architecture. Chitin (○) and β -1,3-glucan (—) chain are synthesized at the plasmamembrane and protruded into the outside of the cell by the mechanism so-called 'vectorial synthesis'. The cell wall mannoproteins (—), which are post-translationally modified by N-glycosylation (○) at ER and O-glycosylation (●) at Golgi, are attached to the plasmamembrane through the GPI anchor (■) and thus GPI remnant (■). The mechanism for addition of β -1,6-glucan (●) is not known. (The Figures from Lipke and Ovalle (1998) and Bowman and Free (2006) were adapted).

며, 이 돌연변이주를 이용하여 *FKSI*(FK506 sensitive) 유전자를 클로닝한 바 있다(Douglas *et al.*, 1994a). 그 후 몇몇 연구자들이 Douglas 등과는 다른 방법으로 유전자를 클로닝하였는데, 흥미롭게도 모두 *FKSI*와 동일한 유전자로 밝혀졌다(Castro *et al.*, 1995; El-Sherbeini *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1995). 이외에도 *Candida albicans* (Mio *et al.*, 1997), *Aspergillus nidulans* (Kelly *et al.*, 1996), *S. pombe* (Cortes *et al.*, 2002), *Cryptococcus neoformans* (Thompson *et al.*, 1999) 및 *Paracoccidioides brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2000) 등에서 *FKSI*의 유사 유전자가 클로닝되었으나, 이들 유전자 및 유전자 산물의 생체 내 기능에 대한 연구는 명확히 밝혀진 바 없어 지속적인 연구가 필요하다. Song *et al.* (1992)은 효모인 *S. cerevisiae*로부터 β -1,3-글루칸 합성능이 손상되어 삼투감수성을 보이는 새로운 형태의 온도 의존적 돌연변이주를 제조·선별하고, 유전적 분석 및 클로닝 실험을 수행하여 β -1,3-글루칸의 생합성에 관여하는 새로운 두 가지 유전자인 *SOO1*과 *BGS2*를 클로닝하였다(Lee *et al.*, 1994, 1999; 진 등, 1995). 이 중 *SOO1*은 온도 의존적 감수성을 상보(complementation)할 뿐만 아니라 β -1,3-글루칸 합성능도 회복시켜주는 특성이 있는데, 그 염기서열을 분석해본 결과, 흥미롭게도 ER(Endoplasmic Reticulum)에 상주하는 단백질이 Golgi에서 ER로 역이송되는 과정에 관여하는 COPI 소낭의 구성 단백질 중 하나인 α -COP(non-clathrin-coat protein α)의 유전자(Letourneur *et al.*, 1994)와 동일한 것으로 판명되었다(Lee *et al.*, 1999). 이는 효모의 β -1,3-글루칸 생합성에 관여하는 단백질이 원형질막으로 이송되는 과정에 COPI 소낭이 관여함을 시사하는 것이다.

분비 단백질 수송기구 COPI의 특성

진핵세포의 분비경로를 통해 단백질이 운송되는 주된 방법의 하나는 방향성 소낭 운송(vectorial vesicular transport)이다. 운송소낭(transport vesicle)은 다양한 단백질성 외피(coat)에 의해 만들어지는데, 운송단백질(cargo protein) 선별, 소낭 형성 그리고 표적 막(target membrane)으로 소낭 전달과정에서 결정적인 역할을 한다. 단백질성 외피에 의해 만들어지는 운송소낭은 클라스린-외피 소낭(clathrin-coated vesicle)과 비클라스린-외피 소낭(non-clathrin-coated vesicle)로 대별되는데, 클라스린-외피 소낭은 trans-Golgi network(TGN)에서 세포막이나 라이소좀(lysosome) 등으로의 정방향 수송(anterograde transport)이나 세포막으로부터 세포질로의 endocytic transport 과정에 주로 관여하고, ER과 Golgi 사이의 단백질 운송은 COPI와 COPII 소낭에 의하여 이루어진다(Rothman and Wieland, 1996; Schekman and Orci, 1996). COPII는 단백질이 ER로부터 Golgi로 수송되는 과정(anterograde

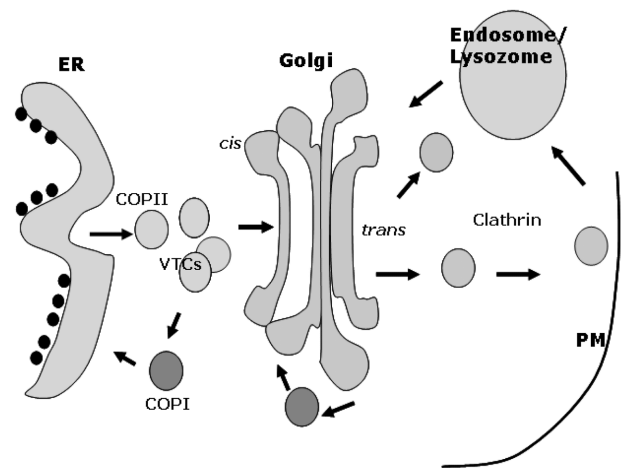


Fig. 2. Intracellular protein trafficking mediated by vesicular transport systems.

transport)에 관여하는데 반하여, COPI은 단백질이 Golgi로부터 ER로 역수송되는 과정(retrograde transport)에 관여하는 것으로 알려져 있다(Bethune *et al.*, 2006; Letourneur *et al.*, 1994; Sato and Nakano, 2007) (Fig. 2).

COPI은 첫째 Golgi cisternae 내에서 분비단백질의 정방향 수송에 관여하며(Orci *et al.*, 1997; Rothman and Wieland, 1996), 둘째 ER에서 Golgi로의 수송 특히, GPI-anchored 단백질의 수송에 관여하며(Sutterlin *et al.*, 1997), 셋째 dilysine motif(KKXX-motif)를 갖는 단백질을 Golgi로부터 ER로 역수송(retrograde transport)하는 과정에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Cosson and Letourneur, 1994, 1997; Gaynor *et al.*, 1994; Letourneur *et al.*, 1994; Lewis and Pelham, 1996; Orci *et al.*, 1997). 최근에는 COPI이 endosomal trafficking에도 관여하는 것으로 제안되고 있다(Daro *et al.*, 1997; Whitney *et al.*, 1995). 지금까지 제시된 증거들에 의하면, COPI 외피(coatomer)는 α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -COP의 7개 subunit와 small ras-like GTPase인 ARF1으로 구성되어 있고, 고온에서 α -COP의 안정화에 관여하는 ϵ -COP을 제외한 모든 subunit는 효모의 생존에 필수적이다(Duden *et al.*, 1998). COPI은 Golgi에서 ER로 역수송되는 단백질에 공통적으로 존재하는 dilysine motif를 인식하여 역수송하는데(Cosson and Letourneur, 1994), 7 가지 subunit 중 α -, β' -, γ -COP에 돌연변이가 생긴 *ret1-1*, *sec27-1* 및 *sec21-1* 돌연변이는 dilysine motif를 인식하지 못하여 단백질을 역수송하지 못한다(Cosson *et al.*, 1998; Letourneur *et al.*, 1994).

포유류의 경우, 일단 조립된 coatomer는 half-life가 약 28시간에 이르는 안정한 복합체로, subunit의 교환도 일어나지 않는다(Lowe and Kreis, 1998). Two-hybrid system을 이용한 분석 결과, β/δ -COPs, γ/ζ -COPs, α/ϵ -COPs 그리고 α/β' -COPs간에 결합이 일어난다는 것으로 확인되었다

(Faulstich *et al.*, 1996). 또한, *in vitro*에서 고농도의 염(salts)이 존재하면 coatomer는 $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP subcomplex와 $\beta'/\gamma/\delta/\zeta$ -COP subcomplex로 나뉘어지며, $\beta'/\gamma/\delta/\zeta$ -COP subcomplex는 다시 β/δ COP과 γ/ζ COP으로 분리되기도 하는데, $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP subcomplex는 여전히 KKXX-motif와 결합할 수 있으며, β/δ COP은 ARF와 GTP- γ S의 존재 하에 Golgi막에 결합하는 능력을 보인다(Cosson and Letourneur, 1994; Fielder *et al.*, 1996; Lowe and Kreis, 1998; Pavel *et al.*, 1998). Two-hybrid system을 이용하여 COPI subunit간의 상호작용(결합) 부위를 자세히 조사한 Eugester *et al.*(2000)의 결과에 의하면, β/ϵ -COP, α/β -COP, β'/β -COP, β'/γ -COP, 그리고 γ/ϵ -COP 사이에도 결합이 일어나고, 특히, α -COP의 경우 C-말단부위는 다른 subunit와의 작용 및 coatomer의 안정성 유지에 필요한 부위이며, N-말단의 WD40 도메인은 KKXX-motif를 갖는 수송단백질의 인식과 역수송에만 필요한 부위로 이 부위가 제거되어도 30°C에서의 효모 성장에는 아무런 영향이 없다.

α -COP 돌연변이와 균류 성장

α -COP의 N-말단부위에는 단백질 수송에 관여하는 몇몇 단백질과 상호 작용하는 것으로 알려져 있는 WD40 motif(Harrison-Lavoie *et al.*, 1993)가 6개 존재하는데, WD40 motif는 β -가닥과 회전(β -strands and turns)으로 구성된 소위 말하는 β -프로펠러(β -propeller) 구조를 형성하며(Neer and Smith, 2000), 단백질 수송에 관여하는 몇몇 단백질에서 발견되는 tetratricopeptide repeats와 상호 작용하는 것으로 알려져 있으나(Harrison-Lavoie *et al.*, 1993), α -COP에 존재하는 WD40 motif의 기능은 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나, 최근의 연구결과에 의하면, α -COP/SOO1의 N-말단부위에 6개의 WD40 motif가 밀집되어 있는 WD40 도메인은 30°C에서 효모의 생존이나 일반적인 COPI의 기능 수행에 필수적이지 않지만, COPI가 작용하는 단백질 역수송기작의 하나인 KKXX-의존적(KKXX-dependent) 운송기작에는 필수적인 부위로 확인되었다(Eugester *et al.*, 2000).

RET1의 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 보이며(Schröder-Kohne *et al.*, 1998), α -COP이 파괴된 균주에 α -COP의 N-말단에 있는 6개의 WD40 domain 모두가 제거된 *ret1Δ1-285* 유전자를 발현시키면 허용온도인 30°C에서는 생장이 가능하지만, 비허용온도인 37°C에서는 생장이 불가능하다고 하였다(Eugester *et al.*, 2000). 그런데, *soo1-1* 돌연변이는 SOO1/RET1의 681번 염기인 G가 A로 치환되어 Soo1p/ α -COP의 N-말단에 존재하는 6개의 WD40 도메인 중 다섯 번째 WD40 도메인 내에 위치하는

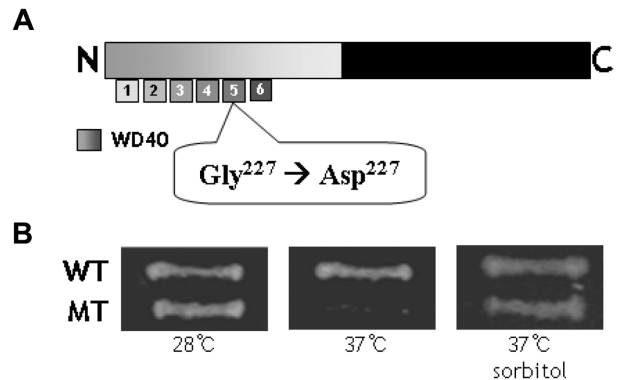


Fig. 3. Location of the *soo1-1/ret1-1* mutation in *Saccharomyces cerevisiae* α -COP (A). The *soo1-1* mutant showed the temperature-dependent osmosensitive growth at nonpermissive temperature (37°C) (B).

Gly²²⁷이 Asp로 치환된 *ret1-1* 유전자와 동일한 것으로 판명되었다(이 등, 2001). 그런데 한편, 30°C에서는 생존 가능하나 37°C에서는 삼투안정제가 없으면 생존이 불가능한 *soo1-1/ret1-1* 돌연변이주를 대상으로 37°C에서 삼투감수성의 상보여부를 조사해본 결과, Soo1p/ α -COP의 5번째와 6번째의 WD40 도메인이 모두 포함된 DNA에 의해서는 삼투감수성이 극복되었으나, 6번째 WD40 도메인만 갖는 construct에 의해서는 삼투감수성이 극복되지 아니하였다(이 등, 2001). 따라서, α -COP/Soo1의 N-말단에 위치하는 6개의 WD40 도메인 중 5번째 WD40 도메인이 세포벽의 합성이나 구조유지에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정할 수 있다(Fig. 3).

지금까지 연구된 α -COP 유전자(RET1)의 돌연변이에 대한 특성을 살펴보면, 흥미롭게도 N-말단부에 돌연변이가 일어난 경우, *sec33-1*을 제외한 모든 돌연변이가 KKXX-tagged 단백질의 역방향 운송에 결함을 보이며, N-말단부의 WD40 도메인 내에 돌연변이가 일어난 경우는 모두 온도감수성(ts: temperature sensitivity)을 보인다. 그런데, 흥미롭게도 효모의 경우 온도감수성을 보이는 WD40 도메인의 돌연변이는 공통적으로 α -COP의 N-말단부위에 존재하는 6개의 WD40 motif 중 5번째 motif에 위치하는 것임을 발견할 수 있다(Table 1). 한편, 사상성 진균류인 *Aspergillus nidulans*에서는 α -COP 관련 유전자로 *sod¹¹C*이 동정되었고(Whittaker *et al.*, 1999), *sod¹¹C*는 효모를 비롯한 다른 생물체의 α -COP과 높은 유사성을 보이는 것으로 확인되었다(Lee *et al.*, 2000) (Fig. 4).

특이한 것은 사상성 진균류인 *A. nidulans*에 α -COP 돌연변이주(*sod¹¹C1*) 역시 온도 의존적 삼투감수성을 보이며, 비허용온도에서 삼투안정제가 존재하는 상황에서도 비정상적인 균사생장양상을 보이며, 세포벽 합성효소의 활성화와 세포벽 구성성분의 함량에 있어 결함이 있는 것으로 조사되어, α -COP이 *A. nidulans* 등 사상균의 세포벽 생합성과정에도 기능함을 확인하였다(Lee *et al.*, 2002b).

Table 1. The location of α -COP point mutations and the corresponding phenotypes of mutant α -COP strains*

Alleles	Changes	Defects <i>in vivo</i>	References
<i>ret1-1 (soo1-1)</i>	G227D	retrograde KKXX transport; ts; inability to bind to KKXX; anterograde GPI-anchored protein transport cell wall integrity; ts protein glycosylation	Letourneur <i>et al.</i> , 1994; Schoder-Kohne <i>et al.</i> , 1998; Sutterlin <i>et al.</i> , 1997; Lee <i>et al.</i> , 1999, 2001; This study
<i>ret1-2</i> <i>sec33-1</i>	S226F P147L, S226F	retrograde KKXX transport; ts slow growth even at low temp.; ts; anterograde CPY transport	Schoder-Kohne <i>et al.</i> , 1998 Eugester <i>et al.</i> , 2000; Wuestehube <i>et al.</i> , 1996
<i>ret1-4</i>	G311D	retrograde KKXX transport; Non-ts	Schoder-Kohne <i>et al.</i> , 1998
<i>ret1-5</i>	G317S	retrograde KKXX transport; Non-ts	Schoder-Kohne <i>et al.</i> , 1998
<i>ret1-3</i>	S1188F	α and ε -COP instability; ts; anterograde CPY transport	Eugester <i>et al.</i> , 2000; Duden <i>et al.</i> , 1998
<i>sod^{II}C1</i>	I1042D and others	cell wall integrity and protein secretion; ts	Lee <i>et al.</i> , 2002, this study

*The Data reported by Eugester *et al.* (2000) were updated.

한편 *A. nidulans* α -COP의 돌연변이 유전자 *sod^{II}C1*의 염기서열을 분석한 결과, α -COP 유전자의 intron과 α -COP C-말단의 염기 A³⁴⁷³와 T³⁴⁷⁴가 G³⁴⁷³와 A³⁴⁷⁴로 치환되어 있는 것임을 확인하였다(Lee *et al.*, 2006). 또한, *S. cerevisiae*의 α -COP(*SOO1/RET1*) 돌연변이주의 온도 의존적 삼투 감수성이 *A. nidulans*의 α -COP 유전자에 의하여 극복됨을 확인함으로써(Lee *et al.*, 2002b), 진균류의 단백질 분비기구가 유사한 기능을 수행하는 것으로 추정되었다. 그러나, 최근 연구결과에 의하면 α -COP이 파괴된 *S. cerevisiae*의 돌연변이주에서는 *A. nidulans* α -COP이 기능할 수 없는 것으로 조사되었으며, 온도 감수성을 보이는 *S. cerevisiae*의 ε -COP 파괴균주와는 달리 *A. nidulans*의 ε -COP 파괴균주는 온도 감수성을 비롯하여 검출 가능한 표현형이 나타나지 않는 것으로 보아(Song *et al.*, 2005), α -COP과 ε -COP의 상호결합을 비롯한 COPI 소낭의 구성 및 기능에서 차이가 있을 가능성을 시사하고 있다.

α -COP 돌연변이와 세포벽 단백질

지금까지 5번째 WD40 motif를 비롯한 6개의 WD40 motif 각각이 *ret1-1* 돌연변이 형질과 어떤 상관관계가 있는지 보여주는 직접적인 증거가 제시된 바 없을 뿐만 아니라, 특히 α -COP의 WD40 도메인과 세포벽 구조 유지와의 관계 역시 규명된 바 없다. 그런데, *ret1-1* 돌연변이에 대한 일련의 연구결과는 α -COP 특히 WD40 도메인과 세포벽 구조 유지와의 상관관계를 설명할 수 있는 몇 가지 단서를 제공하고 있다.

예를 들면, ER상주단백질로 분비단백질의 N-glycosylation에 관여하는 oligosaccharyltransferase(OST) 복합체에 이상이 생긴 *ost* 돌연변이체들의 돌연변이 형질(Knauer and Lehle, 1999) 또는, O-glycosylation에 관여하는 protein mannosyltransferase(PMT) 복합체에 이상이 생긴 *pmt* 돌연변이체들의 형질을 살펴보면, 그 돌연변이 형질이 본 연구진이 확인한 *soo1-1* 돌연변이 형질과 상당히

유사한 특징이 있다. 이들 복합체 단백질 중 상당수가 ER로의 역수송에 필요한 신호를 갖고 있어 COPI 소낭에 의해 ER로 역수송 될 가능성이 있음을 시사 하는데, 사실, *ret1-1* 돌연변이는 OST 복합체의 구성성분이며 KKXX-motif를 갖는 Wbp1p를 ER로 역수송 하지 못한다는 사실이 잘 알려져 있다(Letourneur *et al.*, 1994; Schroder-Köhne *et al.*, 1998).

따라서, 분비단백질의 glycosylation과정이 불완전한 돌연변이체는 세포벽 관련 돌연변이 형질을 나타내는 것으로 추정할 수 있는데, 이는 Wbp1p 등과 같은 glycosylation과 관련되어 있는 ER-상주 단백질들의 역수송 결함이 결과적으로 세포벽 합성과정의 결함을 초래하는 것으로 추정할 수 있다. 실제, 세포벽의 다른 구성성분과 공유결합으로 연결되어 있는 Cwp1p(Shimoi *et al.*, 1995)와 Sed1p(Shimoi *et al.*, 1998)를 비롯한 다량의 세포벽 단백질이 *ret1-1* 돌연변이에서는 수소결합으로 연결되어 있을 뿐만 아니라, β -1,3-글루칸, β -1,6-글루칸 및 만노즈 등의 당류 결합이 현저히 감소된 상태 즉, hypoglycosylation된 상태로 존재함을 발견하였다(Lee *et al.*, 2002a). 따라서, Wbp1p 등과 같은 ER-상주 단백질 역수송과정의 결함이 세포벽 합성과정이 결함을 초래한 것으로 추정할 수 있는데, 단백질의 C-말단에 역수송에 필요한 시그널을 갖고 있어 Golgi로부터 ER로의 역수송될 것이라 예상되는 단백질 중 ER에서의 N-glycosylation을 담당하는 단백질 복합체의 구성성분인 Wbp1(te Heesen *et al.*, 1992)과 O-glycosylation을 담당하는 단백질 복합체의 구성성분인 중 하나인 Pmt2(Lussier *et al.*, 1995)를 적색형광단백질(RFP: Red fluorescence protein)로 표지하여 관찰한 결과 *ret1-1* 돌연변이의 경우 비허용온도에서 ER로의 역수송이 일어나지 아니함을 발견함으로써 이러한 추정이 옳음을 확인하였다(Kim, 2005).

이외에도 단백질의 GPI(glycosylphosphatidylinositol) 잔기 부착에 관여하는 GPI transamidase의 구성성분 중 일부(Gaalp, Gpi16p)도 ER로의 역수송 신호를 갖고 있

A



B

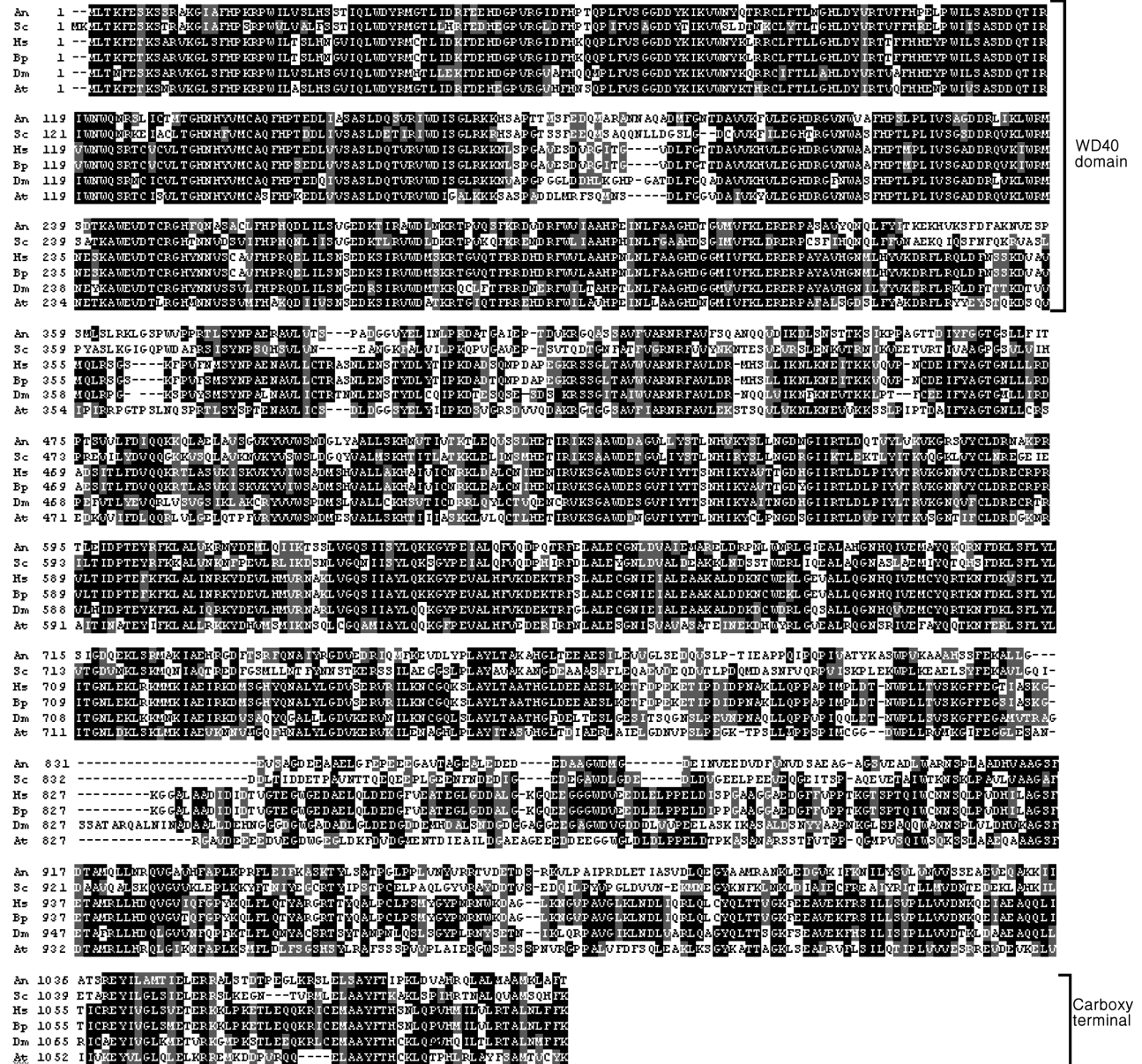


Fig. 4. Multiple alignment of amino acid sequences form the α -COP proteins of various organisms. Abbreviations: An, *Aspergillus nidulans*; Sc *Saccharomyces cerevisiae*; Hs, *Homo sapiens*; Bp, *Bos primigenius*; Dm, *Drosophila melanogaster*; At, *Arabidopsis thaliana*.

음이 밝혀져, 세포벽 구성 성분 중 당단백질과 세포벽 β 1,6-글루칸 사이의 공유결합에 관여하는 GPI-anchor의 수식과정도 *ret1-1/soo1-1* 돌연변이에 의해 영향을 받을 가능성이 있다. 또한, *soo1-1/ret1-1* 돌연변이가 나타내는 삼투감수성이 GPI-anchored 단백질의 하나인 Gas1p의 수송결합에 기인한 것일 가능성도 있다. 왜냐하면, *ret1-1* 돌연변이는 GPI-anchored 단백질인 Gas1p가 Golgi로 운송되

는 과정을 방해하는데(Sutterlin *et al.*, 1997), Gas1p는 GPI에 의하여 세포막 외층에 결합되어 있는 단백질로 효모의 세포벽 조립에 중요한 역할을 담당 한다(Fig 3). Gas1p에 결합이 생기면 효모 형태에 이상이 생기며 세포벽을 구성하는 글루칸 사이의 공유결합이 감소하게 된다(Popolo and Vai, 1999). 따라서, *soo1-1/ret1-1* 돌연변이에 의하여 세포벽 성분간의 공유결합을 촉매하는 Gas1p

가 정상적으로 작용할 수 없게 되어 종국적으로 세포벽의 견고성에 결함이 생겨 삼투감수성을 나타내는 것으로 추정할 수 있다.

이상의 사실로 미루어 볼 때, Soolp/-COP의 5번째 WD40 motif 내에 위치하는 227번 아미노산에 이상이 생긴 sool-1D는 비허용 온도인 37°C에서 Wbp1p 등의 OST 복합체 구성단백질의 역수송이나, 세포벽 구조유지에 중요한 Gas1p의 수송에 결함을 초래하고, 이 때문에 세포벽 합성 단백질인 β -1,3-글루칸 합성효소나 Cwp1p나 Sed1p 등과 같은 세포벽 구성 단백질의 운송 및 glycosylation 과정에 결함이 생기는 것으로 추정된다. 이러한 결함이 종국적으로 세포벽 구성성분의 합성이나 조립(assembly) 또는 세포벽 구조의 견고성(rigidity) 유지에 결함을 초래하여 sool-1D/ret1-1 돌연변이주의 온도 의존적 삼투감수성이 나타나는 것으로 추정할 수 있다.

분비경로 결손 돌연변이주를 이용한 연구

A. nidulans α -COP의 돌연변이주는 비허용온도에서 세포벽 합성기구의 결손 외에 다른 온도의존적 삼투감수성 외에도 세포 외 분비 단백질의 하나인 알칼리성 단백질가수분해 효소의 활성이 현저히 감소하는 현상도 발견되어 단백질 분비기구와 세포벽 합성이 밀접히 연관되어 있음을 재확인할 수 있었다(Lee *et al.*, 2002b). 이에 착안하여 *S. cerevisiae*의 α -COP 돌연변이주인 sool-1/ret1-1의 액체배양액에 분비되는 단백질의 양상을 야생형과 비교해 본 결과, 야생형의 경우 세포벽에 결합되어 있는 enolase 1과 2가 돌연변이주에서는 배양액으로 다량 유리되며, 정상적인 분자량 보다 작은 분자량의 enolase도 다량 분비되는 것으로 조사되었다(Kim and Park, 2004).

한편, sool-1 돌연변이에 의해 변화된 세포벽 단백질들의 구성을 2D 분석 등을 통하여 조사한 결과, 기존에 알려진 세포벽 단백질 외에도 다수의 해당과정 효소(glycolytic enzyme)와 열충격 단백질(heat shock protein)이 sool-1 돌연변이에 의해 세포벽에서 배양 배지 내로 유리되거나, 세포벽에서(또는 운송과정 중에) 부분적으로 가수분해됨을 확인하였다(Kim, 2005). 배지 내로 유출된 대부분의 세포벽 단백질들은 세포벽 내에서의 기능이 알려져 있지 않은 것이나, 일부 단백질은 세포질 내에서의 기능과 전혀 다른 성격의 역할을 하는 것으로 보고되었다. 예를 들면, sool-1 돌연변이에 의해 비정상적인 양상을 나타내는 단백질로 동정된 해당과정 효소인 enolase의 경우에는 *C. albicans*에서 세포벽 글루칸과 결합하고 있으며 또한 칸디다증(candidiasis) 발생과정의 주요 항원(antigen)으로 작용하고 있음이 밝혀져 있으며(Angiolella *et al.*, 1996; Edward *et al.*, 1999), 열충격 단백질인 Ssa1p 과 Ssa2p 단백질이 모두 파괴된 균주에서는 세포벽 단백질들의 심한 변화가 있는 것으로 보고된 바 있다(Lopez-Ribot and Chaffin,

1996). 이러한 결과는 앞서 살펴본 바와 같이 sool-1/ret1-1 돌연변이로 인하여 세포벽 단백질의 번역 후 수식 과정에 결함이 생기고 이로 인하여 세포벽 성분 간의 결합에 이상이 생겨 세포벽에 부착되어야 할 enolase 등의 세포벽 단백질이 배양액으로 유리되는 것으로 추정할 수 있다.

sool-1 돌연변이에 의해 세포 외부로 세포벽 결합 단백질이 다량 유리되는 현상이 세포벽 성분과 결합과정의 결손에 기인한 것 외에, 기존에 알려진 것과는 다른 단백질 분비경로의 작동 가능성(Rodriguez-Boulanger and Musch, 2004)이나 최근 관심을 끌고 있는 ER-stress에 의한 UPR(unfolded protein response) (Zhao and Ackerman, 2006)과 관련성이 있을 수 있다. 특히, UPR과정에 의하여 ER에서 Golgi로의 단백질 이송, Golgi 내 단백질의 glycosylation 및 단백질 분비가 증가되는 것으로 알려져 있는데, *S. cerevisiae* α -COP과 상호작용하는 단백질을 동정하기 위한 Yeast-Two-Hybrid 스크리닝 결과, Srp54, Kar2, Rpm2 및 Uso1이 검출되었다(Kim, 2005). 그런데 Srp54는 분비단백질이 세포질에서 ER로 이동에(Miller *et al.*, 1993), Kar2는 ER lumen에서 molecular chaperone의 기능을(Umebayashi *et al.*, 1999), Rpm2는 mitochondria 내 tRNA processin에(Dang *et al.*, 1993), Uso1은 COPII 소낭이 Golgi로 향하게 하는 과정(Cao *et al.*, 1998)에 관여하는 것으로 알려져 있으며, Srp54와 Kar2는 돌연변이형 α -COP(sool-1)과 결합하나, Rpm2와 Uso1은 결합하지 못하는 것으로 조사되어, α -COP이 COPI 외피 형성이 외의 기능을 수행할 가능성을 배제할 수 없다.

향후 세포벽 단백질의 합성 및 조립에 이상을 보이는 α -COP 돌연변이주(ret1-1/sool-1)를 이용하여 효모를 비롯한 진균류의 세포벽 구조 유지에 중요한 역할을 담당하는 단백질 중 Soolp/ α -COP의 돌연변이에 의하여 세포벽에 수송되지 못하거나, 세포벽으로 수송되더라도 비정상적으로 결합(조립)되는 새로운 단백질을 확인할 수 있을 것이므로, 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.

적 요

세포벽은 진균류의 생존과 삼투안정성 유지에 필수적인 구조체로, 세포부착성 단백질이나 가수분해효소 등과 같은 생물학적 활성을 갖는 다양한 단백질이 결합하거나 그 속에 자리잡고 작용할 수 있게 한다. 최근 효모류인 *Saccharomyces cerevisiae*와 사상균인 *Aspergillus nidulans*에서 세포 내 단백질 분비 소낭의 하나인 COPI 소낭을 구성하는 α -COP 단백질에 돌연변이가 일어날 경우, 온도의

존적 삼투감수성이 나타나는 것으로 밝혀졌다. 이러한 사실은 α -COP이 베타-1,3-글루칸 합성효소 복합체를 구성하는 단백질과 세포벽 단백질의 이송과정에 중요한 역할을 함으로써 세포벽 안정성 유지에 기여함을 시사하는 것이다. 본 총설에서는 세포 내 단백질 이송기구 중에서도 COPI 소낭을 구성하는 α -COP과 균류의 세포벽 형성과 정과의 관계에 대하여 기술하는 한편, 단백질 분비기구에 결손이 생긴 돌연변이주를 이용한 세포벽 합성기작에 대한 기초 및 응용연구의 가능성에 대하여 검토하여 보았다.

감사의 글

본 연구는 '2004년도 충남대학교 자체학술연구비지원 사업'의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

- 이재준, 김기현, 박희문. 2001. 효모의 베타-1,3-글루칸 생합성 결함을 초래하는 돌연변이 유전자(*soo1-1*)의 분리 및 분석. 한국미생물학회지 **37**: 42-48.
- 진은희, 이동원, 김진미, 박희문. 1995. 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 *Saccharomyces cerevisiae* 유전자의 클로닝. 한국균학회지 **23**: 129-138.
- Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N. and Cassone, A. 1996. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J. Infect. Dis.* **173**: 684-690.
- Bethune, J., Wieland, F. and Molleken, J. 2006. COPI-mediated transport. *J. Memb. Biol.* **211**: 65-79.
- Bowman, S. M. and Free, S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioAssay* **28**: 799-808.
- Cabib, E., Silverman, S. J., Shaw, J. A., Gupta, S. D., Park, H. M., Mullins, J. T., Mol, P. C. and Bower, B. 1991. Carbohydrates as structural constituents of yeast cell wall and septum. *Pure & Appl. Chem.* **63**: 483-489.
- Cao, X., Ballew, N. and Barlowe, C. 1998. Initial docking of ER-derived vesicles requires Usp1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* **17**: 2156-2165.
- Castro, C., Ribas, J. C., Valdivieso, M. H., Varona, R., del Rey, F. and Duran, A. 1995. Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)- β -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 5732-5739.
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. and Sanchez, M. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**: 345-386.
- Cortes, J. C., Ishiguro, J., Duran, A. and Ribas, J. C. 2002. Localization of the (1,3)- β -D-glucan synthase catalytic subunits homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J. Cell Sci.* **115**: 4081-4096.
- Cosson, P. and Letourneur, F. 1994. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**: 1629-1631.
- Cosson, P. and Letourneur, F. 1997. Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 484-487.
- Cosson, P., Lefkir, Y., Demolliere, C. and Letourneur, F. 1998. New COPI-binding motif involved in ER retrieval. *EMBO J.* **17**: 6863-6870.
- Dang, Y. L. and Martin, N. C. 1993. Yeast mitochondrial RNase P. Sequence of the RPM2 gene and demonstration that its product is a protein subunit of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **268**: 19791-19796.
- Daro, E., Sheff, D., Gomez, M., Kreis, T. and Mellman, I. 1997. Inhibition of endosome function in CHO cells bearing a temperature-sensitive defect in the coatamer (COPI) component epsilon-COP. *J. Cell Biol.* **139**: 1747-1759.
- de Groot, P. W., Yin, Q. Y., Weig, M., Sosinska, G. J., Klis, F. M. and de Koster, C. G. 2007. Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **24**: 267-278.
- Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Li, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Mandala, S. M., Frommer, B. R. and Kurtz, M. B. 1994a. 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., Marrinan, J. A., Li, W. and Kurtz, M. B. 1994b. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3- β -D-glucan synthase. *J. Bacteriol.* **176**: 5686-5696.
- Duden, R., Kajikawa, L., Wuestehube, L. and Schekman, R. 1998. ϵ -COP is structural component of coatamer that functions to stabilize α -COP. *EMBO J.* **17**: 985-995.
- Edwards, S. R., Braley, R. and Chaffin, W. L. 1999. Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**: 211-216.
- El-Sherbeini, M. and Clemas, J. A. 1995. Nikkomycin Z super-sensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 200-207.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R. 2000. COPI domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J.* **19**: 3905-3917.
- Faulstich, D., Auerbach, S., Orci, L., Ravazzola, M., Wegchlingel, S., Lottspeich, F., Stenbeck, G., Harter, C., Wieland, F. T. and Tschochner, H. 1996. Architecture of coatamer: molecular characterization of delta-COP and protein interactions within the complex. *J. Cell Biol.* **135**: 53-61.
- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M. A. and Rothman, J. E. 1996. Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**: 1396-1399.
- Gaynor, E. C., te Heesen, S., Graham, T. R., Aebi, M. and Emr, S. D. 1994. Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.* **127**: 653-665.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. and Kitada, K. 1998. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 53-59.
- Harrison-Lavoie, K. J., Lewis, V. A., Hynes, G. M., Collison, K. S., Nutland, E. and Willison, K. R. 1993. A 102 kDa subunit of a Golgi-associated particle has homology to beta subunits of trimeric G proteins. *EMBO J.* **12**: 2847-2853.
- Kaptein, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. and Klis, F. M.

1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiol.* **6**: 337-345.
- Kapteyn, J. C., Ram, A. F., Groos, E. M., Kollar, R., Montijn, R. C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. and Klis, F. M. 1997. Altered extent of cross-linking of 1,6-glucosylated manoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall 1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* **179**: 6279-6284.
- Kelly, R., Register, E., Hsu, M. J., Kurtz, M. and Nielsen, J. 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.
- Kim, K. H. 2005. Functional analysis of α -COP in glycosylation and transport of secretory protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. thesis. Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Kim, K. H. and Park, H. M. 2004. Enhanced secretion of cell wall bound enolase into culture medium by the *soo1-1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* **42**: 248-252.
- Klis, F. M. 1994. Cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869.
- Knauer, R. and Lehle, L. 1999. The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J. Biol. Chem.* **274**: 17249-17256.
- Lee, D. W., Ahn, G. W., Kang, H. G. and Park, H. M. 1999. Identification of a gene, *SOO1*, which complements osmo-sensitivity and defect in *in vitro* β -1,3-glucan synthase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1450**: 145-154.
- Lee, D. W., Kim, K. H., Chun, S. C. and Park, H. M. 2002a. Characterization of cell wall proteins from the *soo1-1/ret1-1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* **40**: 219-223.
- Lee, D. W., Park, S. W., Jin, E. H., Chung, J. H., Kim, J. and Park, H. M. 1994. Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective β -1,3-glucan synthase. *Kor. J. Genet.* **16**: 259-268.
- Lee, H. H., Chae, S. K., Kim, J. Y., Maeng, P. J. and Park, H. M. 2000. Genomic organization of *ancop* gene for α -COP homolog from *Aspergillus nidulans*. *Mycobiol.* **28**: 171-176.
- Lee, H. H., Park, J. S., Chae, S. K., Maeng, P. J. and Park, H. M. 2002b. *Aspergillus nidulans* *sod¹CI* mutation causes defects in cell wall biogenesis and protein secretion. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**: 253-257.
- Lee, H. H., Song, E. J., Park, J. S., Kim, K. H. and Park, H. M. 2006. Functional analysis of the COPI-coat proteins, α -COP and ϵ -COP, in *Aspergillus nidulans*. Proceedings of the 2006 Korea-Japan Fungal Genetics and Biology Conference: Recent Advances in Fungal Molecular Biology and Genomics, Sep. 3-6, 2006. Daejeon, Korea, Pp 54-56.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H. and Cosson, P. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**: 1199-1207.
- Lewis, M. J. and Pelham, H. R. 1992. Sequence of a second human KDEL receptor. *J. Mol. Biol.* **226**: 913-916.
- Lipke, P. N. and Ovalle, R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**: 3735-3740.
- Lopez-Ribot, J. L. and Chaffin, W. L. 1996. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**: 4724-4726.
- Lowe, M. and Kreis, T. E. 1998. Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**: 53-66.
- Lussier, M., Gentzsch, M., Sdicu, A. M., Bussey, H. and Tanner, W. 1995. Protein O-glycosylation in yeast. The PMT2 gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the PMT1-encoded activity. *J. Biol. Chem.* **270**: 2770-2775.
- Miller, J. D., Wilhelm, H., Gierasch, L., Gilmore, R. and Walter, P. 1993. GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation. *Nature* **366**: 351-354.
- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S. B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T. and Yamada-Okabe, H. 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.
- Moukadiri, I. and Zueco, J. 2001. Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Res.* **1**: 241-245.
- Murai, T., Ueda, M., Yamamura, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Amachi, T. and Tanaka, A. 1997. Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1362-1366.
- Neer, E. J. and Smith, T. F. 2000. A groovy new structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 960-962.
- Orci, L., Stamnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. 1997. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**: 335-349.
- Orlean, P. 1997. Biogenesis of yeast wall and surface components. Pp 229-362. In: Pringle, J. R., Broach, J. R. and Jones, E. W. Eds. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: cell cycle and cell biology. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Pardo, M., Ward, M., Bains, S., Molina, M., Blackstock, W., Gil, C. and Nombela, C. 2000. A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis* **21**: 3396-3410.
- Pavel, J., Harte, C. and Wieland, F. T. 1998. Reversible dissociation of coatamer: functional characterization of a beta/delta-coat protein subcomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2140-2145.
- Pereira, M., Felipe, M. S., Brigido, M. M., Soares, C. M. and Azevedo, M. O. 2000. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **16**: 451-462.
- Popolo, L. and Vai, M. 1999. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 385-400.
- Ram, A. F., Brekelmans, S. S., Oehlen, L. J. and Klis, F. M. 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**: 165-170.
- Rodriguez-Boulan, E. and Musch, A. 2005. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim. Biophys. Acta* **1744**: 455-464.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A. and Bussey, H. 1994. Characterization of the yeast (1 $\rightarrow$ 6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions

- between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell Biol.* **127**: 567-579.
- Rothman, J. E. and Wieland, F. T. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**: 227-234.
- Sato, K. and Nakano, A. 2007. Mechanism of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett.* **581**: 2076-2082.
- Schekman, R. and Orci, L. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**: 1526-1533.
- Schröder-Kohne, S., Letourneur, F. and Riezman, H. 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.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G. J., Sdicu, A. M., Thomas, D. Y., Jakob, C. A., Aebi, M. and Bussey, H. 1998. Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **149**: 843-856.
- Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Shbiaski, S., Zou, W., Murai, T., Ueda, M., Tanaka, A. and Osumi, M. 2000. Cytochemical evaluation of localization and secretion of a heterologous enzyme displayed on yeast cell surface. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 243-248.
- Shimoi, H., Kitagaki, H., Ohmore, H., Iimura, Y. and Ito, K. 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.
- Shimoi, H., Iimura, Y. and Obata, T. 1995. Molecular cloning of *CWP1*: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein localized with *Rarobacter faecitabidus* protease I. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**: 302-311.
- Song, E. J., Kim, K. H. and Park, H. M. 2005. Functional analysis of *Aspergillus nidulans* epsilon-COP. Proceedings of the 23rd Fungal Genetics Society Meeting, Mar. 15-20, 2005, Asiloma, USA.
- Song, M. R., Lee, D. W., Park, S. W., Bae, K. S. and Park, H. M. 1992. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in (1→3)-β-D-glucan synthase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 642-646.
- Sutterlin, C., Doering, T. L., Schimmoller, F., Schroder, S. and Riezman, H. 1997. Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J. Cell Sci.* **110**: 2703-2714.
- te Heesen, S., Janetzky, B., Lehle, L. and Aebi, M. 1992. The yeast WBP1 is essential for oligosaccharyl transferase activity *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J.* **11**: 2071-2075.
- Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Perfect, J. R. and Kurtz, M. 1999. A glucan synthase *FKS1* homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J. Bacteriol.* **181**: 444-453.
- Tuite, M. F. 1992. Antifungal drug development: the identification of new targets. *Trend. Biotechnol.* **10**: 235-239.
- Umebayashi, K., Hirata, A., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. 1999. Unfolded protein response-induced BiP/Kar2p production protects cell growth against accumulation of misfolded protein aggregates in the yeast endoplasmic reticulum. *Eur. J. Cell Biol.* **78**: 726-738.
- Whitney, J., Gomez, M., Sheff, D., Kreis, T. F. and Mellman, I. 1995. Cytoplasmic coat proteins involved in endoplasmic function. *Cell* **83**: 703-713.
- Whittaker, S. L., Lunness, P., Milward, K. J., Doonan, J. H. and Assinder, S. J. 1999. *sod⁷¹C* is an alpha-COP-related gene which is essential for establishing and maintaining polarized growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **26**: 236-252.
- Yin, Q. Y., de Groot P. W. J., Dekker, H. L., de Jong, L., Klis, F. M. and de Koster, C. G. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Sacharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Biol. Chem.* **280**: 20894-20901.
- Zhao, L. and Ackerman, S. L. 2006. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 444-452.