Aspergillus nidulans 분비소낭 구성요소인 α -COP과 ε -COP의 결합 부위 분석

송은정 · 김기현 · 이환희 · 박정석 · 강은혜 · 박희문*

충남대학교 생명시스템과학대학 미생물분자생명과학과

Analysis of Protein Domain for Interaction between α -COP and ε -COP in *Aspergillus nidulans*

Eun-Jung Song, Ki-Hyun Kim, Hwan-Hee Lee, Jeong-Seok Park, Eun-Hye Kang and Hee-Moon Park*

Department of Microbiology and Molecular Biology, College of Bioscience and Biotechnology,
 Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received 5, November 2012., Revised 8, November 2012., Accepted 13, November 2012)

ABSTRACT: In order to screen interactor(s) of the *Aspergillus nidulans* α -COP of COPI vesicle, we performed the yeast two hybrid screening by using the gene for *A. nidulans* α -COP as a bait and identified ε -COP of the COPI vesicle as an interacting protein. The *A. nidulans* gene for the ε -COP was designated *aneA*⁺ (*A. nidulans* epsilon-COP), which encoded 296 amino acid residues with high level of identity with orthologs from other fungi. Domain analyses with yeast two-hybrid system suggested that the interaction between α -COP and ε -COP relied on the C-terminus of both proteins, and that the N-terminal WD domain of α -COP and the TPR region of ε -COP were not essential but required for the enhancement of the interaction. These results indicate that the interaction mode between α -COP and ε -COP of COPI vesicle is evolutionarily well conserved in eukaryotes.

KEYWORD : *Aspergillus nidulans*, α -COP, ε -COP, Yeast two-hybrid assay

서 론

진핵세포의 분비단백질(secretory protein)은 coat 단백질(COPs)로 이루어진 운송소낭(transport vesicle)에 의해 운송되는데, 운송소낭은 clathrin-coated vesicle과 non-clathrin coated vesicle로 나뉘어진다. Endocytic transport 과정 중 trans-Golgi network(TGN)이나 세포막으로부터 유래되는 운송소낭은 clathrin-coated vesicle로 구성되며, endoplasmic reticulum(ER)과 Golgi 사이의 단백질 운송은 non-clathrin coated vesicle인 COPI와 COPII에 의해 이루어진다. Coated vesicle의 구조 변화는 소낭에 의해 운송되는 화물(cargo)이나 coat polymerization과 machinery components와의 상호작용에 영향을 미친다(Langer *et al.*, 2007).

COPI vesicle은 α , β , β' , γ , δ , ε , ζ 의 7개 subunit (COP)이 세포질 G-단백질의 일종인 ADP ribosylation factor(ARF)의 도움으로 Golgi 바깥표면에서 550 kDa의 cytoplasmic complex인 coatomer를 형성함으로써 만들어진다(Serafini *et al.*, 1991, Waters *et al.*, 1991). 포유류의 coatomer는 고농도 염이 존재하는 상태에서는 B-와 F-

subcomplex로 분획되는데, B-fraction은 α , β' , ε -COP로 구성되며 소낭 형성 시 바깥쪽으로 노출되며, 기능적으로는 clathrin과 관련되어 있다(Eugster *et al.*, 2000). Yeast two-hybrid를 이용한 coatomer 간의 상호작용을 분석한 결과, β/δ , γ/ζ , α/ε , α/β' -COP 사이에서 상호결합이 일어나며, 결정구조분석 결과 α -COP의 C-terminal domain (CTD)와 ε -COP이 heterodimer를 이루는 것으로 밝혀진 바 있다(Hsia and Hoelz, 2010).

효모류인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 coatomer를 구성하는 7개의 subunit이 모두 동정되고, 세포 내 기능 및 상호결합방식이 연구된 바 있는데, ε -COP을 제외한 모든 COP은 생존에 필수적이다. α -COP의 N-말단에 존재하며 COPI vesicle cargo(KKXX-tagged 단백질 등)과 상호작용하는 것으로 알려진 WD40 motif에 돌연변이가 생긴 *soo1-1/ret1-1*(G227D), *ret1-2*(S226F), *sec33-1*(P147L, S226F) 돌연변이주는 온도민감성을 보였다. 특히 *soo1-1* 돌연변이주는 세포벽 β -1,3 글루칸 합성이 감소하고(Lee *et al.*, 1999), β , ε -COP과의 결합이 이루어지지 않으나 β' -COP과는 결합하는 것으로 밝혀졌으며(Kim *et al.*, 2012), 각종 분비단백질의 당화과정(glycosylation)과 세포 외 분비양상에 영향을 미치는 것으로 조사되었다(Kim *et al.*, 2011). 또한, C-말단 돌연변이주인 *ret1-3*는 온도감

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

수성을 보이며 비허용온도에서 α -COP의 분해와 carboxypeptidase Y(CPY)의 수송에 결합을 보였다. 이러한 돌연변이 표현형은 ε -COP의 과발현에 의해 회복되나, ε -COP은 효모 생존에 필수적인 것은 아니지만 α -COP을 안정화함으로써 coatomer를 유지하는 역할을 한다(Duden *et al.*, 1998).

사상균인 *Aspergillus nidulans*의 α -COP을 암호화하고 있는 유전자에 결합이 발생한 *sod^VC1*(stabilization of disomy) 돌연변이는 당초 핵분열과 균사생장에 이상을 초래하는 것으로 밝혀졌으나(Whittaker *et al.*, 1999), 본 연구진의 연구결과 세포벽 생합성과 단백질 분비과정에도 영향을 미치며 *A. nidulans*의 α -COP이 *S. cerevisiae* α -COP 돌연변이주의 TOS 표현형을 회복시킬 수 있음을 밝힘으로써 사상균과 효모의 분비소낭 구성 및 기능이 유사함을 보고한 바 있다(Lee *et al.*, 2002). 그런데, 각종 산업용 효소의 생산균주로 흔히 사용되는 *Aspergillus* 속 균류를 위시한 사상균의 경우 분비단백질 경로가 효소의 분비 및 생장에 크게 영향을 미침에도 불구하고 분비소낭의 구성 및 기능에 대한 연구는 *S. cerevisiae* 등에 비하여 상대적으로 부진한 실정이다.

본 연구에서는 *A. nidulans* α -COP의 기능에 영향을 미치는 상호작용하는 단백질을 탐색하기 위하여 yeast two hybrid screening을 수행한 결과, ε -COP을 상호작용 단백질로 선별하고 해당 유전자의 특성을 분석하고 α -COP과 ε -COP간의 상호작용 부위 분석을 시도하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

S. cerevisiae 균주는 L40(MATa *his3D200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3) URA3::8lexAop-lacZ*)GAL4를 사용하였다. 배양배지로는 YEPD(1.0% yeast extract, 2.0% bacto-peptone, 2.0% glucose)와 합성 최소배지(0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2.0% glucose, 0.2% drop-out amino acid mixture)를 사용하였다. Yeast-two hybrid 스크리닝을 위한 감별배지로는 SC 배지에 X-gal(20 mg/mL)과 BU-salt(0.5 M Na₂HPO₄, 0.2 M NaH₂PO₄)을 첨가하여 사용하였다. 플라스미드는 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하여 증식시켰으며, 형질전환실험은 ampicillin(100 ug/mL)나 zeocin(50 ug/mL)이 든 LB 배지(1.0% yeast extract, 0.5% sodium chloride, 1.0% bacto-tryptone)를 사용하여 수행하였다.

효모 및 대장균의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 100 uL의 원형질체 현탁액에 플라스미드를 혼합하여 4°C에서 30분, 42°C에서 50초 반응하고, LB 배지 1 mL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양 후 ampicillin이 든 LB 배지에 도말하였다. 효모의 형질

전환은 Chen 등(1997)의 one-step transformation method를 이용하였는데, 5×10^7 개의 세포와 100 ng이상의 DNA를 one step buffer[90 uL의 50 %(w/v) PEG4000, 5 uL의 2.0 M DTT, 5 uL의 2.0 M lithium acetate(pH 6), 2.5 uL single strand carrier DNA(10 ug/uL)]에 혼합한 후, 39°C 배양조에서 1시간 배양하고 선택배지에 도말하여 30°C에서 3~4일 배양한 후 형질전환체를 얻었다.

AN α -COP/Sod^VC interactor 및 결합부위 선별을 위한 플라스미드 제조

Yeast two hybrid용 bait 플라스미드를 제조하기 위하여 pGEM T-easy vector(Invitrogen, USA)에 클로닝 되어 있는 *A. nidulans* α -COP의 유전자인 *sod^VC*를 *Apal*과 *PstI*으로 잘라내어 pHybLex/zeo벡터(Invitrogen, USA)에 클로닝 하였다. Prey 플라스미드로는 pAD-GAL4-2.1 벡터의 *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소 자리에 *A. nidulans* cDNA 절편들이 클로닝 되어 있는 라이브러리(전북대학교 '장광엽' 교수 제공)를 이용하여 α -COP의 interactor를 선별하였다.

AN α -COP과 AN ε -COP 간의 결합부위를 분석하기 위한 two-hybrid assay용 플라스미드는 pHybLex/zeo에 AN α -COP 유전자를 pAD-GAL4-2.1에 AN ε -COP의 유전자를 각각 클로닝하여 제조하였다.

Two-hybrid assay

A. nidulans α -COP유전자가 클로닝된 bait 플라스미드를 갖는 L40 균주를 대상으로 prey용 플라스미드 라이브러리를 고효율 형질전환(Gietz and Schiestl, 1991)시킨 후, 1mM 3-AT(3-aminotriazole)이 첨가된 배지에서 자라고, X-gal이 포함된 배지에서 LacZ 양성반응을 나타내는 콜로니로 선별하였다. 선별된 콜로니로부터 plasmid를 분리하기 위해 3 mL YEPD 액체배지에서 배양하고, 배양된 세포를 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 침전체를 수득한 후, 200 uL의 세포파쇄용 완충용액(2.0% Triton X-100, 1.0% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.0 mM EDTA)에 현탁한 후 0.3 g glass bead와 200 uL PCI(Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol = 25:24:1)을 첨가하여 2분간 vortexing하였다. 다시 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액만 분리한 후, *E. coli* DH5 α 에 형질전환하여 ampicillin이 첨가된 LB배지로 선별하였다(Hoffman and Winston, 1987). 분리된 양성클론의 플라스미드에 클로닝된 유전자의 염기서열을 분석하고자 pAD-GAL4-2.1의 일부 염기서열을 이용하여 sequencing primer를 제조하였다. 제조된 primer로 제노텍(Genotech Inc., Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였고, 분석된 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information) GenBank의 DB를 이용하여 다른 균류의 유사유전자와 비교분석하였다.

In vitro mutagenesis

PCR을 이용한 site-directed mutation을 유도하기 위해 특정한 위치의 염기서열을 바꾸어 primer를 제조하였다. 돌연변이가 도입된 ϵ -COP 유전자를 증폭하기 위해 돌연변이 시킬 부위의 염기를 치환한 reverse primer-1(AGCAGCAGCAGTAGCGAA)와 forward primer(GAATCCATGGATCCATTCTCTGCAG)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 얻어진 PCR산물을 주형으로 reverse primer-2(GGCGGAGTATTTAGCAGCAGCAGTAGCGAA)와 forward primer로 PCR을 수행하여 산물을 얻고, 다시 이를 주형으로 reverse primer-3(CTATGAAGAAACCTTGGCGGAGTATTTAGCAGC)와 forward primer로 PCR을 수행하여 염기서열이 바뀐 ϵ -COP 돌연변이 유전자를 최종적으로 증폭하였다.

결과 및 고찰

A. nidulans α -COP/*Sod^V*Cp과 상호작용하는 단백질 스크리닝

sod^VC1 돌연변이에 의한 세포벽 결함의 원인을 규명하기 위한 접근의 하나로 *A. nidulans* α -COP(AN α -COP)과 결합하는 단백질을 선별하고자, prey용 *A. nidulans* cDNA library를 이용하여 yeast two-hybrid 스크리닝을 수행하였다. 그 결과 얻어진 양성클론을 다시 확인하고 (Fig. 1A), 양성클론 내의 AN α -COP과 상호작용하는 단백질 유전자의 염기분석 수행한 결과 *S. cerevisiae*의 ϵ -COP 유전자와 염기서열이 유사한 유전자로 판정되어 *aneA⁺* (*A. nidulans* epsilon-COP, AN ϵ -COP)으로 명명하고, 분석한 염기서열은 NCBI의 GenBank에 등재하였다 (AY885258). *aneA⁺* 유전자는 3개의 인트론과 4개의 엑손으로 구성되어 총 296개의 아미노산을 암호화하고 있으며, 다른 균류와 아미노산서열을 비교분석한 결과 *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* 및 *S. cerevisiae*의 ϵ -COP ortholog들과 각각 58%, 31%, 24%의 상동성을 보였다(Fig. 1B).

A. nidulans α -COP과 ϵ -COP의 결합부위 분석

효모류 등을 대상으로 수행된 이전 연구에 의하면, α -COP의 C-말단에 위치하는 약 170개의 아미노산이 ϵ -COP과의 결합에 관여 한다(Eugster *et al.*, 2000). 따라서 AN α -COP과 AN ϵ -COP의 결합부위를 분석하고자 yeast two-hybrid system을 이용한 분석을 시도하였다. 먼저 AN α -COP의 N-말단에 존재하는 6개의 WD motif, middle region, COOH domain의 세 부분으로 나누어 AN ϵ -COP과의 결합여부를 확인하였다(Fig. 2). 그 결과 C-말단이 제거된 AN α -COP(예: Δ 781-1206, Δ 1029-1206, Δ 1-1026, Δ 1-1027, Δ 1-1028)은 AN ϵ -COP과 결합하지 못하나, COOH 도메인만 갖는 AN α -COP(Δ 1-780)은 AN ϵ -

A.

B.

Fig. 1. Screening and identification of *A. nidulans* α -COP interactor. (A) Protein-protein interaction between α -COP^VCp/ α -COP and a putative interactor was confirmed by the X-gal activity with yeast two-hybrid system. The pAD-GAL4-2.1 plasmids with no gene and with the gene for *S. cerevisiae* α -COP were used as a negative control and a positive control, respectively. (B) Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of interactor (ϵ -COP) was performed with that of orthologs in other fungi. A. nidulans: *Aspergillus nidulans*, N. crassa: *Neurospora crassa*, S. pombe: *Schizosaccharomyces pombe*, S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

COP과 강한 결합능을 보였으며, *S. cerevisiae* *ret1-3* 돌연변이의 경우와 유사하게 *Sod^VC1*의 C-말단인 1042번째 isoleucine이 aspartic acid로 치환된 돌연변이 단백질인 *Sod^VC1p*(Lee *et al.*, 2002)도 AN ϵ -COP과 결합하지 않았다. 이로써 *S. cerevisiae*의 경우와 마찬가지로 *A. nidulans* α -COP의 C-말단이 ϵ -COP과의 결합에 필수적임을 알 수 있었다. 한편, AN α -COP의 N-말단에 위치하는 WD 도메인(Δ 282-1206)은 ϵ -COP과의 결합능력이 없고 AN ϵ -COP과의 결합에 필수적인 요소도 아니나(Δ W1-6, Δ 1-780), 6개의 WD motif중 하나라도 손상된 경우(Δ W1~ Δ W1-5)는 AN ϵ -COP과 결합하지 못하였다. 이러한 양상은 *S. cerevisiae*에서 조사한 경우(Kim *et al.*, 2012)와 동일한 것으로, α -COP의 COOH 도메인은 ϵ -COP과의 결합에 필수적인 요소이나, α -COP N-말단 WD 도메인의 구조적인 변화는 α -COP과 ϵ -COP과의 결합에 부정적인

Fig. 2. Domain analysis of *A. nidulans* α -COP responsible for the interaction with ε -COP by using yeast two-hybrid system. Domain structure of the *A. nidulans* α -COP (AN α -COP) was depicted (upper panel); Wild type AN α -COP has 1,206 amino acids and six WD40 motif in N-terminal WD40 domain are indicated by dotted-boxes. Serially deleted AN α -COP was represented schematically (lower panel); The thin line indicates the deleted region of α -COP. Δ W1, deletion of the first WD40 motif; Δ W1-2, deletion of the first to the second; Δ W1-3, deletion of the first to the third so on; Δ 781-1206, deletion of amino acids from 781 to 1206 so on. An arrow head at C-terminus of the Sod^{VI}C1/ α -COP indicates replacement of isoleucine 1042 by glutamic acid (I to D). In order to map the interacting domain on the α -COP, genes for the serially deleted AN α -COPs were expressed in the bait plasmid and tested for the interaction against AN ε -COP.

Fig. 3. Domain analysis of *A. nidulans* ε -COP responsible for the interaction with α -COP by using yeast two-hybrid system. Domain structure of the *A. nidulans* ε -COP (AN ε -COP) was depicted (upper panel); Wild type AN ε -COP has 296 amino acids and TPR (Tetratricopeptide Repeat) from 205th to 238th amino acid residue is indicated by grey box. Serially deleted AN ε -COP was represented schematically (lower panel); The dotted line indicates the deleted region of ε -COP. The numbers following the symbol " Δ " indicates the amino acid residues deleted; Δ 201-296, deletion of amino acids from 201 to 296. The D284A stands for the mutant ε -COP, in which replacement of glutamic acid 284 by alanine (D to A) was introduced by *in vitro* mutagenesis. In order to map the interacting domain on the ε -COP, genes for the serially deleted AN ε -COPs were expressed in the bait plasmid and tested for the interaction against AN α -COP.

영향을 미치는 것으로 결론 내릴 수 있었다.

AN ε -COP의 AN α -COP과의 결합부위 분석

AN ε -COP의 아미노산서열 분석 결과, TPR(Tetratricopeptide Repeat; W₄G₈Y₁₁G₁₅Y₁₇A₂₀Y₂₄A₂₇P₃₂) 부분이 205에서 238번 아미노산 사이에 존재하였다(Fig. 3). 일반적으로 TPR 영역은 right-handed helical 구조를 형성하며 단백질의 결합에 수용체 역할을 함으로써 단백질-단백질 상호작용을 촉진하며, 특히 효모의 경우 ε -COP의 TPR 부분이 α -COP의 C 말단(U-형태 구조)과 결합하는 것으로 알려져 있다(Hsia and Hoelz, 2010). 따라서, AN ε -COP의 TPR 부분이 AN α -COP과의 결합에 관여하는 지 여부를 조사하기 위하여 AN ε -COP을 TPR이 포함된 부분(Δ 1~200, Δ 239~296)과 포함되지 않는 부분(Δ 201~296, Δ 1~238)으로 나누어 분석한 결과, AN ε -COP의 TPR이 α -COP과의 결합에 필요하나(Δ 201~296), TPR부위 단독으로는 제대로 작용하지 못하며(Δ 239~296), TPR영역 뒤쪽의 C-말단부가 함께(Δ 1~200) α -COP과의 상호작용에 관여하는 것으로 추정되었다. 한편, TPR영역 뒤쪽의 C-

말단부는 단독으로 α -COP과의 결합이 가능한 필수부위(Δ 1~238)로 이 부위가 제거되면 α -COP과의 결합능은 사라지며(Δ 238~296), TPR 부위가 함께 존재할 때 결합능이 증대되었다(Δ 1~200).

AN ε -COP C-말단부위 중 α -COP과의 결합에 중요한 역할을 하는 아미노산을 동정하기 위하여 다른 균류의 ε -COP과 아미노산 서열분석 결과를 검토한 결과, ε -COP TPR부위 뒤쪽의 C-말단부에 상대적으로 아미노산 서열의 상동성이 높은 부위 3 곳(E²⁷⁸K²⁷⁹, F²⁸³D²⁸⁴, K²⁸⁹Y²⁹⁰)을 발견하고(Fig. 3의 위 패널), 이를 중심으로 ε -COP의 C-말단이 α -COP과의 결합에 미치는 영향을 보다 세밀히 조사하였다. 그 결과 K²⁸⁹Y²⁹⁰서열의 일부 또는 전체가 제거된 경우(Δ 289-296, Δ 285-296)에 비해 K²⁸⁹Y²⁹⁰와 F²⁸³D²⁸⁴서열이 모두 제거된 경우(Δ 283-296)와 K²⁸⁹Y²⁹⁰ 모두와 F²⁸³D²⁸⁴서열 일부가 제거된 경우(Δ 284-296)에 AN α -COP과의 결합이 현저히 감소하여, AN α -COP과 결합에 AN ε -COP의 F²⁸³D²⁸⁴서열이 주요한 기능을 담당할 것으로 추정하였으나, F²⁸³D²⁸⁴서열이 중 284번째 아미노산인 aspartic

acid을 *in vitro* mutagenesis를 통해 alanine으로 치환하여 도(F²⁸³A²⁸⁴) AN ϵ -COP과 AN α -COP의 결합에 별다른 결손이 나타나지 않는 것으로 보아 확정적인 결론은 도출할 수 없었다.

본 연구를 통하여 밝혀진 결과를 종합하면, 향후 심도 깊은 분석을 통해 정확한 활성부위가 동정될 것이나, *A. nidulans*의 α -COP과 ϵ -COP의 단백질-단백질 상호작용은 α -COP의 COOH 도메인과 ϵ -COP의 C-말단부위가 필수적이며, α -COP N-말단의 WD 도메인과 ϵ -COP의 TPR부위는 두 단백질 간의 결합을 촉진하는 조절부위로 밝혀졌다. 또한 *A. nidulans*와 효모류인 *S. cerevisiae*에서 α -COP과 ϵ -COP간 작용 분석결과가 유사한 것으로 보아, COPI 소낭의 구성요소인 α -COP과 ϵ -COP 간의 상호작용 기전은 진핵세포 내에서 진화적으로 잘 보존되어 있는 것으로 추정할 수 있다. 따라서, 진핵세포의 세포분열, 분화 및 단백질 분비와 COPI 분비소낭과의 관계를 분석하는 분자세포생물학적 연구에 사상균인 *A. nidulans* 나 효모류인 *S. cerevisiae*가 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

적 요

A. nidulans α -COP과 상호작용하는 단백질을 동정하기 위하여 α -COP을 암호화하는 유전자를 bait로 yeast two-hybrid 스크리닝용 *A. nidulans* cDNA 라이브러리를 탐색한 결과, COPI 소낭의 구성요소 중 하나인 ϵ -COP을 암호화하고 있는 유전자를 동정하고 *aneA*⁺(*Aspergillus nidulans* epsilon-COP, AN ϵ -COP)으로 명명하였다. *aneA*⁺ 유전자는 총 296개의 아미노산을 암호화하고 있으며, 다른 균류의 ϵ -COP과 높은 상동성을 보였다. Yeast two hybrid 시스템으로 두 단백질 간의 상호작용 부위를 분석한 결과, α -COP의 COOH 도메인과 ϵ -COP의 C-말단부가 필수 부위였으며, α -COP N-말단의 WD 도메인과 ϵ -COP의 TPR 부위는 두 단백질 간의 결합을 촉진하는 조절부위로 밝혀졌다. 또한 사상균인 *A. nidulans*와 효모류인 *S. cerevisiae*에서 α -COP과 ϵ -COP 간 작용양상이 유사한 것으로 보아, COPI 소낭의 구성요소인 α -COP과 ϵ -COP 간의 상호작용 기전은 진핵세포 내에서 진화적으로 잘 보존되어 있는 것으로 추정되었다.

감사의 글

이 연구는 2010년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음(과제관리번호: 2010-1631).

참고문헌

- Chen, D. C., Beckerich, J. M. and Gaillardin, C. 1997. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 232-235.
- Duden, R., Kajikawa, L., Wuestehube, L. and Schekman, R. 1998. Epsilon-COP is a structural component of coatomer that functions to stabilize alpha-COP. *EMBO J.* 17: 985-995.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R. 2000. COPI domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J.* 19:3905-3917.
- Gietz, R. D. and Schiestl, R. H. 1991. Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast.* 7:253-263.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57: 267-272.
- Hsia, K. C. and Hoelz, A. 2010. Crystal structure of alpha-COP in complex with epsilon-COP provides insight into the architecture of the COPI vesicular coat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:11271-11276.
- Kim, K. H., Kim, E. K., Kim, S. J., Park, Y. H. and Park, H. M. 2011. Effect of *Saccharomyces cerevisiae ret1-1* mutation on glycosylation and localization of the secretome. *Mol. and Cells.* 31(2):151-158
- Kim, K. H., Kim, E. K., Jeong, K. Y., Park, Y. H. and Park, H. M. 2012. Effects of mutations in the WD40 domain of alpha-COP on its interaction with the COPI coatomer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* 50:256-262.
- Langer, J. D., Stoops, E. H., Bethune, J. and Wieland, F. T. 2007. Conformational changes of coat proteins during vesicle formation. *FEBS Letters.* 581:2083-2088.
- Lee, D. W., Ahn, G. W., Kang, H. G. and Park, H. M. 1999. Identification of a gene, *SOO1*, which complements osmosensitivity and defect in *in vitro* β -1,3-glucan synthase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1450:145-154.
- Lee, H. H., Park, J. S., Chae, S. K., Maeng, P. J. and Park, H. M. 2002. *Aspergillus nidulans sod(VI)C1* mutation causes defects in cell wall biogenesis and protein secretion. *FEMS Microbiol. letters.* 208:253-257.
- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J. E. and Wieland, F. T. 1991. A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature.* 349:215-220.
- Waters, M. G., Serafini, T. and Rothman, J. E. 1991. 'Coatomer': A cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature.* 349: 248-251.
- Whittaker, S. L., Lunness, P., Milward, K. J., Doonan, J. H. and Assinder, S. J. 1999. *sodVIC* is an alpha-COP-related gene which is essential for establishing and maintaining polarized growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* 26:236-252.