The Korean Journal of Mycology
© The Korean Society of Mycology
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2012.40.4.224

한국균학회지
Kor. J. Mycol. 40(4) : 224-228 (2012)

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. nidualns* gene for the ε-COP was designated *aneA*$^{+}$ (*A. nidulans* epsilone-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 domian 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 나누어진다. 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 COPI과 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, ζ의 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-COP으로 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 세포외 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 carboxy-peptidase Y(CPY)의 수송에 결함을 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-COP 을 암호화하고 있는 유전자에 결함이 발생한 *sod*^{VI}*C1*(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)*GAL4*)를 사용하였다. 배양배지로는 YEPD(1.0% yeast extract, 2.0% bacto-peptone, 2.0% glucose)와 합성최소배지(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 Na_2HPO_4, 0.2 M NaH_2PO_4)을 첨가하여 사용하였다. 플라스미드는 *Escherichia coli* DH5α를 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 형질전환은 Chen 등(1997)의 one-step transformation method를 이용하였는데, 5×10^7개의 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.

ANα-COP/*Sod*^{VI}*C* 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*^{VI}*C*를 *Apa*I과 *Pst*I으로 잘라내어 pHybLex/zeo벡터(Invitrogen, USA)에 클로닝 하였다. Prey 플라스미드로는 pAD-GAL4-2.1 벡터의 *Eco*RI과 *Xho*I 제한효소 자리에 *A. nidulans* cDNA 절편들이 클로닝 되어 있는 라이브러리(전북대학교 '장광엽' 교수 제공)를 이용하여 α-COP의 interactor를 선별하였다.

ANα-COP과 ANε-COP 간의 결합부위를 분석하기 위한 two-hybrid assay용 플라스미드는 pHybLex/zeo에 ANα-COP 유전자를 pAD-GAL4-2.1에 ANε-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-aminotrizole)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* DH5α에 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*^{VI}Cp과 상호작용하는 단백질 스크리닝

sod^{VI}*C1* 돌연변이에 의한 세포벽 결함의 원인을 규명하기 위한 접근의 하나로 *A. nidulans* α-COP(ANα-COP)과 결합하는 단백질들을 선별하고자, prey용 *A. nidulans* cDNA library를 이용하여 yeast two-hybrid 스크리닝을 수행하였다. 그 결과 얻어진 양성클론을 다시 확인하고(Fig. 1A), 양성클론 내의 ANα-COP과 상호작용하는 단백질 유전자의 염기분석 수행한 결과 *S. cerevisiae*의 ε-COP 유전자와 염기서열이 유사한 유전자로 판정되어 *aneA*$^{+}$(*A. nidulans* epsilon-COP, ANε-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*, *Schizosaccahromyces 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 ANα-COP과 ANε-COP의 결합부분을 분석하고자 yeast two-hybrid system을 이용한 분석을 시도하였다. 먼저 ANα-COP의 N-말단에 존재하는 6개의 WD motif, middle region, COOH domain의 세 부분으로 나누어 ANε-COP과의 결합여부를 확인하였다(Fig. 2). 그 결과 C-말단이 제거된 ANα-COP(예: Δ781-1206, Δ1029-1206, Δ1-1026, Δ1-1027, Δ1-1028)은 ANε-COP과 결합하지 못하나, COOH 도메인만 갖는 ANα-COP(Δ1-780)은 ANε-COP과 강한 결합능을 보였으며, *S. cerevisiae ret1-3* 돌연변이의 경우와 유사하게 *Sod*^{VI}*C*의 C-말단인 1042번째 isoleucine이 aspartic acid로 치환된 돌연변이 단백질인 Sod^{VI}C1p(Lee *et al*., 2002)도 ANε-COP과 결합하지 않았다. 이로써 *S. cerevisiae*의 경우와 마찬가지로 *A. nidulans* α-COP의 C-말단이 ε-COP과의 결합에 필수적임을 알 수 있었다. 한편, ANα-COP의 N-말단에 위치하는 WD 도메인(Δ282-1206)은 ε-COP과의 결합능력이 없고 ANε-COP과의 결합에 필수적인 요소도 아니나(ΔW1-6, Δ1-780), 6개의 WD motif중 하나라도 손상된 경우(ΔW1~ΔW1-5)는 ANε-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

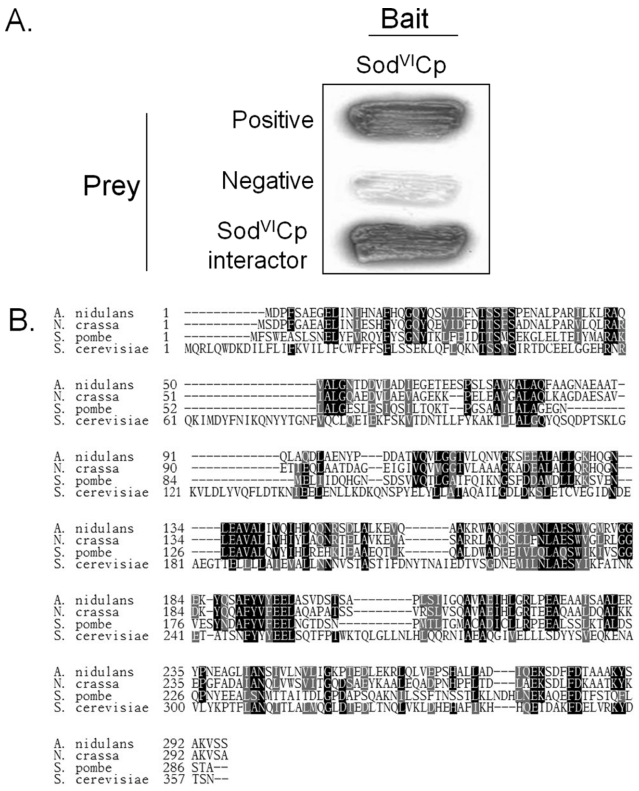

Fig. 1. Screening and identification of *A. nidulans* α-COP interactor. (A) Protein-protein interaction between α-COP^{VI}Cp/α-COP and a putative interactor was confirmed by the X-gal activity with yeast two-hybrid system. The pAD-GAL4-2.1 plasmids with no gene and with the gene for *S. cerevisiae* α-COP 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*

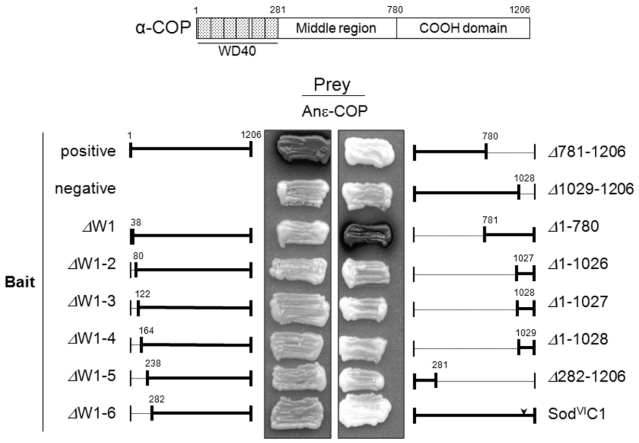

Fig. 2. Domain analysis of *A. nidulans* α-COP responsible for the interaction with ε-COP by using yeast two-hybrid system. Domain structure of the *A. nidulans* α-COP (ANα-COP) was depicted (upper panel); Wild type ANα-COP has 1,206 amino acids and six WD40 motif in N-terminal WD40 domain are indicated by dotted-boxes. Serially deleted ANα-COP was represented schematically (lower panel); The thin line indicates the deleted region of α-COP. ΔW1, deletion of the first WD40 motif; ΔW1-2, deletion of the first to the second; ΔW1-3, deletion of the first to the third so on; Δ781-1206, deletion of amino acids from 781 to 1206 so on. An arrow head at C-terminus of the $Sod^{VI}C1/\alpha$-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 ANα-COPs were expressed in the bait plasmid and tested for the interaction against ANε-COP.

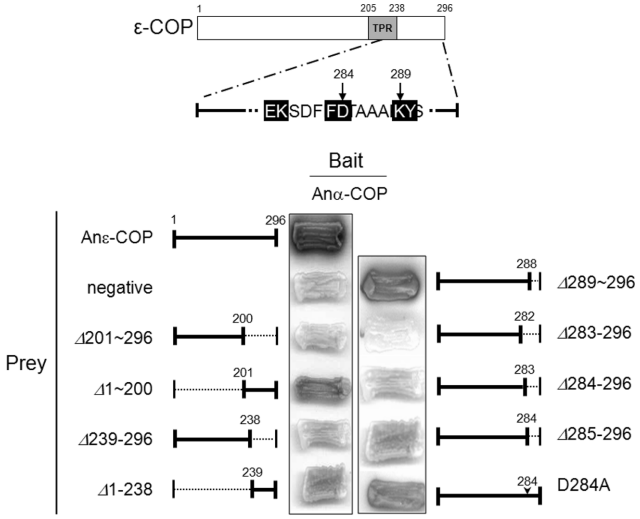

Fig. 3. Domain analysis of *A. nidulans* ε-COP responsible for the interaction with α-COP by using yeast two-hybrid system. Domain structure of the *A. nidulans* ε-COP (ANε-COP) was depicted(upper panel); Wild type ANε-COP has 296 amino acids and TPR (Tetratrico Peptide Repeat) from 205th to 238th amino acid residue is indicated by grey box. Serially deleted ANε-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; Δ201-296, 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 ANε-COPs were expressed in the bait plasmid and tested for the interaction against ANα-COP.

영향을 미치는 것으로 결론 내릴 수 있었다.

ANε-COP의 ANα-COP과의 결합부위 분석

ANε-COP의 아미노산서열 분석 결과, TPR(Tetratrico Peptide Repeat; $W_4G_8Y_{11}G_{15}Y_{17}A_{20}Y_{24}A_{27}P_{32}$) 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, ANe-COP의 TRP 부분이 ANa-COP과의 결합에 관여하는 지 여부를 조사하기 위하여 ANε-COP을 TPR이 포함된 부분(Δ1~200, Δ239~296)과 포함되지 않는 부분(Δ201~296, Δ1~238)으로 나누어 분석한 결과, ANε-COP의 TPR이 α-COP과의 결합에 필요하나(Δ201~296), TPR부위 단독으로는 제대로 작용하지 못하며(Δ239-296), TRP영역 뒤쪽의 C-말단부가 함께(Δ1~200) α-COP과의 상호작용에 관여하는 것으로 추정되었다. 한편, TRP영역 뒤쪽의 C-말단부는 단독으로 α-COP과의 결합이 가능한 필수부위(Δ1~238)로 이 부위가 제거되면 α-COP과의 결합능은 사라지며(Δ238~296), TPR 부위가 함께 존재할 때 결합능이 증대되었다(Δ1~200).

ANε-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($E^{278}K^{279}$, $F^{283}D^{284}$, $K^{289}Y^{290}$)을 발견하고(Fig. 3의 위 패널), 이를 중심으로 ε-COP의 C-말단이 α-COP과의 결합에 미치는 영향을 보다 세밀히 조사하였다. 그 결과 $K^{289}Y^{290}$서열의 일부 또는 전체가 제거된 경우(Δ289-296, Δ285-296)에 비해 $K^{289}Y^{290}$와 $F^{283}D^{284}$ 서열이 모두 제거된 경우(Δ283-296)와 $K^{289}Y^{290}$ 모두와 $F^{283}D^{284}$서열 일부가 제거된 경우(Δ284-296)에 ANα-COP과의 결합이 현저히 감소하여, ANα-COP과 결합에 ANε-COP의 $F^{283}D^{284}$서열이 주요한 기능을 담당할 것으로 추정하였으나, $F^{283}D^{284}$서열이 중 284번째 아미노산인 aspartic

acid을 *in vitro* mutagenesis를 통해 alanine으로 치환하여 도($F^{283}A^{284}$) ANε-COP과 ANα-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 암호하는 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, ANε-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.