

推薦教員	バイオサイエンス研究科 動 細 工学講座 河 憲二 教授		
氏	竹内 雅人	提出	成 18 年 1 月 30 日
題	出芽酵 の新規小 体 子シャペロン Rot1p の同定と解析		

旨

DNA の遺伝情報から機能的な蛋白質を作るためには、正確な転写と に続き、ポリペプチド鎖の適切な三次元構造形成(折り畳み)が必 である。新生ポリペプチド鎖は非特異的に凝集しやすく、折り畳みは迅速かつ正確に行われねばならない。細 内では、子シャペロンと総称される多 なる蛋白質群が新生ポリペプチド鎖の成熟を 助している。Hsp70(heat shock protein of 70kDa)ファミリー蛋白質は最も主 なる子シャペロンであり、 々な 助因子と協調することで多彩な機能を発揮する。小 体内での蛋白質折り畳みは糖鎖修飾、ジスルフィド結合形成などを伴う複雑な過程であり、小 体内在性 Hsp70(BiP/Kar2p)の果たす 割は数多いと考えられる。しかし、BiP/Kar2p の 助因子に関する知見は しい。 研究は小 体内腔での蛋白質折り畳み 助機構の解 を 指し、Kar2p の新規 助因子の同定を試み、候 蛋白質 Rot1p の機能解析を行った。

最初に、出芽酵 遺伝学を いて Kar2p 新規 助因子の同定を試みた。Kar2p のペプチド結合 域の 異である *kar2-1* と合成致死を示す 異株のスクリーニングを行い、8 クローンの合成致死 異株を取得、うち 6 株について 異遺伝子 (*CDC1*, *KRE6* (2 クローン), *ROT1*, *SEC11*, *SKN1*) を同定した。そのうち、*ROT1* について詳細な解析を行った。*ROT1* は必須遺伝子であり、細 の β -1,6-グルカン合成への関 が示されているが、Rot1p の具体的な機能については全く知られていない。

Rot1p は全長 256 アミノ酸残基からなり、N 端及び C 端に疎水性 域を持つ。既知の蛋白質との相同性や機能モチーフなどは見つけられなかった。疎水性 域を除いた Rot1p(25-231)を大腸菌で発現精製、抗 Rot1p 抗体を作製して Rot1p の基 的性質を調べた。Rot1p は主に 3 箇所 N 結合型糖鎖修飾を受けており、内在性 蛋白質であった。また、スクロース 度勾配遠心 により、Rot1p が主に小 体に局在することがわかった。

研究で取得した *rot1-2* 異株では、unfolded protein response が恒常的に活性化されていた。また、*ROT1* の転写 は小 体ストレスによって増加した。さらに、*ROT1* は *KAR2* の他にも幾つかの小 体品質管 機構遺伝子と遺伝学的相互作用 を示し (*CNE1*, *LHS1*, *SCJ1*, *UBC7*)、Rot1p が小 体品質管 機構に関 していることが示唆された。

rot1-2 異株の電子顕微鏡観察を行ったところ、細胞が肥厚化し、小体が増加していた。蛍光顕微鏡観察では、Kar2p、Rot1p の集合体が見られ、小体での異常蛋白質蓄積が示唆された。また、液の形態、酸性化は正常であったが、autophagic body が蓄積していた。

以上の結果より、Rot1p は小体内で蛋白質の成熟に寄っており、*rot1-2* 異株では細胞合成や、autophagic body の消化に必要な蛋白質が成熟できないと考えた。そこで、細胞の β -1,6-グルカン合成に重要な蛋白質 Kre5p, Kre6p の成熟を調べた。*rot1-2* 異株では Kre5p, Kre6p が共に激減していた。pulse-chase 実験により、Kre6p が小体関連経路により合成直後に分解されていることを確認した。また、Rot1p の免疫沈降により Rot1p が Kre6p に一過的に結合することがわかった。従って、Rot1p は小体で少なくとも Kre6p のコシャペロンとして機能しているといえる。一、異型 *rot1-2p* も野生型と同様に、Kre6p に一過的に結合していた。Rot1p が基質蛋白質の成熟を助するためには、結合するだけでは不十分であり、その作用も必須であると考えられる。

続いて、組み換え Rot1p を精製して *in vitro* での機能解析を行った。C 末端疎水性領域を HA-His₆ タグと入れ換えた Rot1p(1-235)-HAHis₆ を酵母で過剰発現させ、細胞抽出液から Ni-NTA 及びゲル透過を繰り返して精製した。精製に用いた高塩濃度条件下では、Rot1p は単体であったが、低塩濃度では(非常にゆっくりと)二体を形成した。一、異型 *rot1-2p* は二体化しなかった。二体化は Rot1p の機能に重要であると考えられる。

α -Mannosidase(α -Man)を基質として、酵母性蛋白質の凝集を阻むコシャペロン活性を測定したところ、Rot1p は効よく酵母性 α -Man の凝集を抑制した。異型 *rot1-2p* も、効果はやや落ちるもののコシャペロン活性を示した。Citrate synthase を基質とした場合にも Rot1p はコシャペロン活性を示したが、 α -Man の場合よりも低効であった。Rot1p が基質の N-結合型糖鎖を認識している可能性を考え、糖鎖を除去した α -Man を基質としたところ、Rot1p のコシャペロン活性は低下した。また、糖鎖(Glc₁Man₅GlcNAc₂)を加えて(糖鎖付き) α -Man の凝集抑制を測定したところ、Rot1p のコシャペロン活性が部分的に阻害された。Rot1p は基質の N-結合型糖鎖とポリペプチド鎖の両方を認識して結合するレクチンコシャペロンであると考えられる。

研究では、遺伝学的手法により Kar2p と共に蛋白質成熟を助する新規因子を探索し、必須遺伝子 *ROTI* を同定した。そして、機能未知であった Rot1p 自身が小体局在のコシャペロンであることを示した。Rot1p は主に糖蛋白の成熟に寄っていると考えられる。Calnexin は糖蛋白の成熟を助する重要なコシャペロンであるが、BiP/Kar2p との協調は知られていない。Rot1p は Kar2p 助因子でもある可能性が高く、小体での蛋白質成熟機構の新たな一員が研究により示唆された。

出芽酵母の新規小胞体分子シャペロン
Rot1p の同定と解析

竹内 雅人
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座
(河野 憲二 教授)

平成18年1月30日提出

目次

1. 序論.....	4
蛋白質折り畳みと分子シャペロン.....	4
Hsp70.....	4
Hsp40.....	5
ヌクレオチド交換反応制御因子.....	5
システムの連動による蛋白質成熟、分解.....	6
小胞体内腔での蛋白質折り畳みと 小胞体シャペロン・フォーディング酵素.....	6
小胞体関連分解(ERAD).....	7
BiP/Kar2p 補助因子.....	7
2. 材料と方法.....	8
プラスミド及び菌株.....	8
<i>kar2-1</i> 合成致死変異株の作成及びスクリーニング.....	8
抗 Rot1p 抗体の作製.....	9
膜内在性の判定.....	9
スクロース密度勾配遠心.....	9
蛍光顕微鏡観察.....	9
電子顕微鏡観察.....	9
Pulse-chase 実験.....	10
免疫沈降.....	10
組み替え蛋白質の発現と精製.....	11
ATPase 活性の測定.....	12
蛋白質凝集阻止活性の測定.....	13
その他.....	13
3. 結果.....	14
<i>kar2-1</i> 合成致死変異株の取得と変異遺伝子同定.....	14
Rot1p は小胞体に局在し、 内腔側に露出した必須の膜蛋白質である.....	15
<i>rot1-2</i> は <i>kar2</i> のアレル特異的に合成致死性を示す.....	16
<i>ROT1</i> と小胞体品質管理機構遺伝子との遺伝学的相互作用.....	17
<i>ROT1</i> と小胞体ストレス、Unfolded Protein Response の関係.....	18
<i>rot1-2</i> 変異株の電子顕微鏡観察.....	18

<i>rot1-2</i> 変異株の蛍光顕微鏡観察.....	19
モデル蛋白 carboxypeptidaseY の成熟に対する <i>rot1-2</i> 変異の影響.....	19
Rot1p は <i>in vivo</i> で kar2p と複合体を形成する.....	20
Rot1p は Kre6p の折り畳みと成熟に必要である.....	21
Rot1p は HA-Kre6p と一過的に結合する.....	23
組み換え Rot1p の発現と精製の試み.....	24
組み換え Rot1p の発現と精製.....	26
R-Rot1p は二量体化する.....	28
Rot1p は Kar2p のヌクレオチド交換因子様補助因子である.....	28
Rot1p はシャペロン活性を持つ.....	29
4. 議論.....	31
総論.....	31
各論.....	33
<i>kar2-1</i> 合成致死変異株のスクリーニングについて.....	33
Rot1p の基本的性状について.....	33
ROT1 と小胞体品質管理関連遺伝子の遺伝学的相互作用について.....	34
<i>rot1-2</i> 株の顕微鏡観察について.....	36
<i>kar2-1 rot1-2</i> 二重変異株での CPY の成熟不全について.....	36
Kar2p と Rotp-HA の複合体形成について.....	37
Kre5p-HA の Rot1p 依存性について.....	37
HA-Kre6p の成熟について.....	38
Rot1p と HA-Kre6p の結合について.....	39
Rot1p の二量体化について.....	40
Rot1p による Kar2p の ATPase サイクル制御について.....	40
Rot1p のシャペロン活性について.....	42
5. 図表.....	43
6. 謝辞.....	68
7. 参考文献.....	69

1. 序論

蛋白質折り畳みと分子シャペロン

生命の設計図と呼ばれるゲノムは幾多の蛋白質のアミノ酸配列を規定する。蛋白質は細胞の構造体や酵素として、生命の根幹を成す。個々の蛋白質の機能を決定するのはそのアミノ酸配列であるが、正確な配列のみが機能的な蛋白質の条件ではない。アミノ酸が一行に連なったポリペプチド鎖が正しく折り畳まれ、適切な三次元構造をとって初めて機能的な蛋白質となるのである。蛋白質の折り畳み様式は、基本的にそのアミノ酸配列に依存する。しかし、細胞内での蛋白質折り畳みは完全に自律的には進行しない。細胞内の蛋白質濃度は約 30%(w/v)に及び、蛋白質がひしめきあう隙間に水分子をはじめとした小分子が存在していると考えられている。合成途上のポリペプチド鎖や、何らかの原因で変性した蛋白質は非特異的な凝集を起こしやすく、その結果生じる凝集塊は強い細胞毒性を持つ。ゆえに、蛋白質は迅速かつ正確に折り畳まれねばならない。他方試験管内の実験では、多くの蛋白質の自律的折り畳みには時間がかかり、効率も悪いことが示されている。細胞内では、様々な蛋白質(ファミリー)が未成熟・変性蛋白質の凝集を防ぎ、蛋白質の円滑な折り畳み(又は再生)を促進している。これらの蛋白質ファミリーは、分子シャペロンと総称される。分子シャペロンは、「(新生)蛋白質に一過的に結合して、その成熟(折り畳みや修飾、会合など)を促進する分子」と定義される(1-3)。In vitro の実験では、変性蛋白質の凝集を防ぐ活性がシャペロン活性と呼ばれている。

Hsp70

多種多様な分子シャペロンの中でも、熱ショック蛋白 70kDa(Heat shock protein of 70kDa; Hsp70)は真核細胞での新生蛋白質折り畳みにおいて主要な役割を果たす(1-4)。Hsp70 は原核生物から真核生物まで非常に高度に保存され、真核生物ではほぼ全ての細胞内小器官に見出される(5)。Hsp70 は N 末端側約 44kDa の ATPase ドメインと、C 末端側約 28kDa の基質結合ドメインからなる(図 1A)。Hsp70 は ATP 加水分解のサイクルに伴って基質への結合解離を繰り返す(図 1B; (4))。ATP 結合型の Hsp70 は「開いた」状態で、基質結合速度は速いが親和性は弱い。ADP 結合型の時は「閉じた」状態で、基質と安定に結合する(6)。Hsp70 は ATP 結合型の時に基質と結合し、同時に ATP を加水分解して基質を保持する。その後ヌクレオチド交換反応に伴い、基質を放出する(7)。この ATPase サイクルの律速段階は(真核生物の Hsp70 では)ATP 加水分解であり、基質の結合により加水分解速度が若干(2~3 倍)上昇することが知られている(8)。Hsp70 は伸びた状態の、比較的疎水性の高いペプチド(約 8 残基)に結合する(6)。折り畳み途上、又は変性した蛋白質から露出した構造不全領域に結合解離を繰り返すことで、Hsp70 は基質蛋白質の非特異的凝集を

防ぎ、折り畳みを促進すると考えられている。また、蛋白質折り畳みの補助のみが Hsp70 の機能ではない。伸びた状態のポリペプチドに結合する(そして恐らく物理的な力を加える)能力を活かして、Hsp70 は蛋白質の膜透過補助、転写因子や小胞被覆蛋白質の機能制御等、多岐にわたった機能を発揮する(9)。

Hsp40

細胞内では、Hsp70 が単独で機能することはほとんどないと考えられている。様々な Hsp70 補助因子が発見されており、そのほとんどは Hsp70 の ATPase 活性を調節することで Hsp70 の機能(シャペロン活性)を制御している(図 1B)。Hsp40 ファミリー蛋白質は Hsp70 の最も重要なパートナーである(1-4, 10)。Hsp70 単独での ATPase 活性は非常に弱い、Hsp40 は Hsp70 の ATP 加水分解反応を促進し、ATPase 活性は 5-10 倍にまで刺激される。また、Hsp40 もシャペロンであり、Hsp70 同様に伸びた状態のペプチドを認識する(11)。基質蛋白質に結合した Hsp40 が Hsp70 の ATP 加水分解反応を刺激することで、Hsp70 と基質蛋白質の結合が促進されると考えられている(12)。Hsp40 と協調することにより、Hsp70 は比較的親水性のポリペプチド鎖にも結合しやすくなり、より幅広い構造不全蛋白質が認識される(13)。少なくとも *in vitro* で変性蛋白質を再生する際には、Hsp70 単独では不十分であり、Hsp40 と協力する必要がある(14)。Hsp40 も高度に保存された蛋白質であるが、その N 末端約 70 アミノ酸残基は特に保存性が高い。この領域は大腸菌の Hsp40、DnaJ にちなんで J ドメインと呼ばれ、Hsp70 の ATPase 活性刺激に必要十分である。Hsp40 はそれぞれ特異的な Hsp70 を認識するが、J ドメインがその認識を担当する(11)。Hsp40 には J ドメインの他に G/F rich 領域、ジンクフィンガー様ドメイン、C 末端低保存性領域がある。これらのうち J ドメインのみを持つ蛋白も数多く見出されており、J 蛋白質と総称される。J 蛋白質は J ドメインで Hsp70 を誘導、活性化して様々な生命現象に役立てている(9)。一例を挙げると、小胞体膜蛋白質 Sec63p は小胞体膜の蛋白質通過孔(translocon)に近接し、小胞体内腔に J ドメインを露出している。Sec63p は小胞体内在性 Hsp70(BiP)を translocon に誘導、活性化し、小胞体内に送り込まれてきた新生蛋白質に結合させる(15)。BiP は新生蛋白質の膜通過、折り畳みの双方を促進する(16-18)。

ヌクレオチド交換反応制御因子

ヌクレオチド交換因子(nucleotide exchange factor, 以下 NEF と記す)も重要な Hsp70 補助因子である(19-27)。原核生物型 Hsp70 はヌクレオチド交換反応が遅いため NEF との協調が必須であるが、真核生物型 Hsp70 のヌクレオチド交換反応は比較的速いため、必ずしも NEF を必要とはしない(1, 2, 4)。蛋白質折り畳みにおける NEF の関与は不明だが(19, 28, 29)、小胞体への蛋白質膜透過には BiP と NEF の協調が必要である(25, 30)。一方、哺乳類細胞の細胞質局在の Hip は、ヌクレオチド交換反応を抑制して Hsp70-基質複合体を安定化する。Hip は *in vivo*, *in vitro* の双方で、Hsp70-40 による蛋白質折り畳み活性を促進す

る。Hip は 4 量体若しくは 2 量体を形成し、シャペロン活性を持つ。同一の基質に結合した複数の Hsp70 を Hip が近接させることや、Hip が Hsp70 と同時に基質蛋白質に結合することが Hsp70-40 システムの活性向上に寄与していると考えられている(31-34)。

システムの連動による蛋白質成熟、分解

Hop(細胞質局在)は Hsp70 と Hsp90 に同時に結合し、二つのシャペロン系を連結する(35)。哺乳類の Hop は Hsp70-40-Hip 複合体に作用し、Hsp70 の ATPase 活性には影響しない。一部のキナーゼやホルモンレセプターの成熟には Hip と Hop によるシャペロン系連動が不可欠である。Hop による Hsp40-70 系と Hsp90 の連動は、*in vitro* での変性蛋白再生にも高い効果を示す(36)。

CHIP(細胞質局在)は Hsp70 の ATPase 活性を低下させるが、詳細な機構は不明である。Hop が「折り畳み複合体」形成に機能していたのに対し、CHIP は「分解複合体」形成に関与する。CHIP は Hsp70, Hsp90 と結合し、さらにユビキチンリガーゼ(E3)として機能して、Hsp70 に結合した基質の分解を促進する(37-41)。CHIP による蛋白質分解誘導は、ヌクレオチド交換因子により抑制、制御されている(42, 43)。

このように、哺乳類細胞質局在の Hsp70 には Hsp40/J 蛋白質以外にも幾つかの補助因子が発見されている。これらは Hsp70 に対して協調的に働くこともあれば競合することもあり、細胞質の Hsp70 の機能制御が精密に、多様に行われていることを示唆している(42-44)。

小胞体内腔での蛋白質折り畳みと小胞体シャペロン・フォーディング酵素

小胞体内腔での蛋白質の成熟はシグナル配列の切断、糖鎖修飾 (N-結合型、O-結合型)、ジスルフィド結合形成、膜への挿入、そして GPI(glycosyl phosphatidyl inositol)アンカー化などを含む複雑な過程である(図 2; (45-48))。BiP(Hsp70)と Hsp40/J 蛋白質、GRP94(Hsp90)、Lhs1p/ORP150(Hsp110)など細胞質にもホモログが存在する蛋白質に加え、calnexin/calreticulin、PDI(Protein disulfide isomerase)ファミリー蛋白質など小胞体特異的な蛋白質が新生蛋白質成熟に関与している。個々の新生蛋白質の性質に応じ、これらの因子が様々に協力してその成熟に寄与することが明らかになりつつある(49-57)。

Calnexin/calreticulin は基質蛋白質の N-結合型糖鎖とポリペプチド鎖の両方を認識して結合するレクチンシャペロンである(45, 47, 56, 58, 59)。N-結合型糖鎖修飾は $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ のオリゴ糖が新生ポリペプチド鎖のコンセンサス配列(Asn-X-Ser/Thr; X は Pro 以外)の Asn に付加されてなされる(図 3)。N-結合型糖鎖末端の Glc 3 残基(と Man 1~2 残基)は小胞体内で切断され、Calnexin は $\text{Glc}_1\text{Man}_{7,9}\text{GlcNAc}_2$ を認識して結合する。Glucosidase II による最後の Glc の切断が、基質の calnexin からの解離をもたらすと考えられている。UDP-glucose:glycoprotein glucosyl transferase (UGT)は、折り畳みの不完全な蛋白質の

Man₉GlcNAc₂ を認識して Glc 1 残基を付加、calnexin への再結合を促進する(60)。以上が calnexin cycle と呼ばれ、糖蛋白質の成熟に重要な役割を果たしている。

PDI は新生蛋白質のジスルフィド結合を形成するオキシダーゼ活性と、ジスルフィド結合の組み換えを促進するイソメラーゼ活性の両方を持ち、基質蛋白質の適切なジスルフィド結合形成に貢献する(61, 62)。PDI ファミリーに属する ERP57 は、calnexin/calreticulin に結合して機能している(45)。

小胞体関連分解(ERAD)

細胞質では、正常な折り畳み(成熟)に失敗したポリペプチドはプロテアソームにより分解される。小胞体内腔の異常ポリペプチドは細胞質に逆輸送され、やはりプロテアソーム依存的に分解される。この過程は小胞体関連分解(endoplasmic reticulum associated degradation; ERAD)と呼ばれる(図 2; (45, 47))。逆輸送も translocon を通じて行われると考えられており、小胞体膜の細胞質側に存在する E2 と E3 が逆輸送されてきたポリペプチドをポリユビキチン化する。プロテアソームも小胞体膜上に存在し、速やかな分解がなされる(63)。糖蛋白質の ERAD は糖鎖の修飾により制御される。Man₈GlcNAc₂ の糖鎖を持つ異常蛋白質は二つのレクチン様蛋白質(Mnl1p/EDEM, Yos9p)により認識され、ERAD に供される(64-67)。Man₉ から Man₈ の切断を行う Mannosidase I は反応速度が比較的遅く、糖蛋白質の折り畳み猶予期間のタイマーとして働いていると提唱されている(68)。

BiP/Kar2p 補助因子

BiP(酵母オーソログは Kar2p; (69, 70))は小胞体への新生蛋白質透過、折り畳み、異常蛋白質の小胞体保留と ERAD、そして小胞体ストレス(異常蛋白質の小胞体蓄積)応答の制御など、多彩な機能を発揮している(15-18, 45, 47, 71-76)。BiP/Kar2p も細胞質局在の Hsp70 同様に精巧な機能制御を受けているであろうと考えられる。上述のように小胞体内腔にのみ見られる現象もあり、BiP/Kar2p 補助因子が細胞質の Hsp70 補助因子にはない機能を有していることも期待される(62)。しかし、BiP/Kar2p 補助因子に関する知見は細胞質 Hsp70 のそれに比べ乏しい。小胞体内在性 Hsp40/J 蛋白質については近年高等真核生物でも次々と同定され(62, 77, 78)、またヌクレオチド交換因子である Sill1p/BAP, Lhs1p/ORP150 が最近発見されたが(20, 22, 25)、その他 Hip や Hop に相当するような因子等は発見されていない。本研究では、出芽酵母遺伝学を用いて Kar2p の新規補助因子を探索、候補として得た機能未知で生育に必須の蛋白質、Rot1p の解析を行った。

2. 材料と方法

プラスミド及び菌株

本研究で用いたプラスミドは主に PCR を用いて作成した。表 1 にプラスミドの構成を示す。大腸菌は主に DH5 α を用いた。組み換え蛋白質の発現には BL21(DE3)RIL 株 (Stratagene) を用いた。大腸菌の培養には 2 \times YT(1.6 % polypeptone, 1 % yeast extract, 0.5 % NaCl) を用いた。酵母菌の操作は常法に従った(79)。酵母菌の培養には YPD(2 % glucose, 1 % yeast extract, 2 % polypeptone)、SD(2 % glucose, 0.67 % yeast nitrogen base w/o amino acids(GIBCO))、SC(SD+amino acids) を用いた。本研究に用いた酵母菌株と各株の遺伝子型を表 2 に記す。CH1462 株と YPH499 株を掛け合わせ、片方の染色体上の *KAR2* 遺伝子を pK2D2 を用いて破壊、YM2 株を得た。YM2 株に pCUA3K2 を導入し、4 分子解析により YM3 株を得た。YM3 株に FY23 株を 3 回掛け合わせ、YM5 株と FW1 株を得た。YM5 株を HO 転換し(80)、YM6 株を得た。YM5, 6 株に pRS303 を形質転換し、さらに pCL2-*kar2-1* を形質転換し、YM7 及び 8 株とした。YM7, 8 株に変異導入を行い(後述)、YMS58 株を得た。YMS58 株を FY23 株と 4 回掛け合わせ、YM16 及び YM18 株を作成した。YM16, YM18 株に pKCH, pKSJH, pLD2 を形質転換し、それぞれ *CNE1*, *SCJ1*, *LHS1* 遺伝子の破壊を行った。YM7 株を FW1 株と掛け合わせて YM9 株として、さらに pRD2 を形質転換して *ROT1* を破壊、YM10 株を作成した。YM10 株に pRS314-*ROT1* を形質転換し、4 分子解析により YM11 及び YM12 株を得た。YM11 に対して全ての組み合わせで pRS314-*KAR2*, *kar2-1*, *kar2-113*, *kar2-133*, *kar2-159*, *kar2-191* と pCL2-*ROT1*, *rot1-2* を導入し、plasmid shuffling により *ROT1* 又は *rot1-2* と *KAR2* 若しくは各 *kar2* 変異アレルを組み合わせた。同様に、pRS316-*ROT1* と pT-*ROT1-HA* を YM12 株に導入し、shuffling を行った。YM16 または YM18 に pB-*KRE5HA-TRP1* から T3, T7 プライマーを用いた PCR 増幅断片を形質転換、Kre5p-HA 発現株 YM27, YM28 を作製した。同様に、pB-*HAKRE6-CgTRP1* からの PCR 断片を YM16, 18 に形質転換して HA-Kre6p 発現株 YM41, 42 を作製した。YM27, 28, 41, 42 については相同組み換え領域を PCR で増幅して cloning, sequencing して組み換えが正しく、また PCR による変異導入がないことを確認した。W303-CQ 株より *UBC7* 破壊カセットを PCR で増幅し、YM41, 42 株に形質転換、YM43, 44 株を得た。

kar2-1 合成致死変異株の作成及びスクリーニング

詳細は筆者提出の修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学 修士論文番号 9771064 合成致死法を用いた出芽酵母 BiP/Kar2p 関連因子の探索) に記述した。略記すると、YM7 及び YM8 株を致死率 40 % で EMS(ethylmethane sulfonate) で処理し、colony sectoring 及び 5-FOA(5-fluoroorotic acid)感受性を指標にスクリーニングを行った。変異遺伝子の同定には、pRS314 をもとに作成された出芽酵母 genomic library(ATCC#77164)を変異株に形質転換し、colony sectoring

と 5-FOA 感受性を回復させる遺伝子を同定した。

抗 Rot1p 抗体の作製

pQE-*ROTI* を形質転換した大腸菌 BL21(RIL)を 37°C で培養、O.D. 0.8 で 1 mM IPTG を加え、1 時間培養した。封入体を 1 % TritonX-PBS でよく洗浄し、U buffer(50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 6 M urea, pH 8.0)に懸濁した。懸濁液を 100,000g で 1 時間遠心後 Ni-NTA と 4 °C で o/n rotation した。レジンを 20 mM imidazole-U buffer で洗浄し、250 mM imidazole-U buffer で His₆-Rot1p(25-231)を溶出した。さらに、preproffesis(ディスクゲル SDS-PAGE による蛋白質精製システム, ATTO)で精製、Ni-NTA を用いて濃縮、0.1 % SDS-4 M urea-PBS に透析してモルモット 2 匹に注射した。抗血清を抗 Rot1p 抗体として用いた。

膜蛋白質の判定

YM16 株を液体 YPD, 30 °C で培養、対数増殖期に 10 mM NaN₃ を加えてから回収した。LE buffer(10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % sucrose, pH 8.0 at 4 °C)に 200 O.D. cells/ml で懸濁、ガラスビーズにより破碎した。抽出液に終濃度 0.5 M NaCl, 2 M urea, 0.2 M Na₂CO₃, 1 % Triton X-100 のいずれかを加え(LE buffer の組成を変えないように)、4 °C で 1 時間 rotation した。遠心分離(100,000 g, 1 時間)により可溶性分画と膜分画に分離、膜分画は 1 % SDS-TBES(50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150mM NaCl, pH 8.0 at 4 °C)に懸濁した。ウェスタンブロットにより Rot1p と Sec61p を検出した。

スクロース密度勾配遠心

前項と同様に培養、回収した菌体を LM buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % sucrose, pH 8.0 at 4 °C) または LE buffer 中で破碎した。各抽出液 250 µl を LM または LE buffer で作製した 20-60 %スクロース密度勾配(12 ml)に重層、Beckman SW40Ti ローターを用い、150,000 g で 8 時間遠心した。チューブの上からピペットにより 1 ml ずつ回収、分画した(管壁のすぐ内側を回るようにして吸った)。各分画について、ウェスタンブロットで Rot1p, Sec61p を検出した。

蛍光顕微鏡観察

菌体の抗体処理は常法に従った(81)。図 4 では Axiophoto microscope (Carl Zeiss)に Plan-Neofluar objective lens (100x/1.3, oil; Carl Zeiss)を装着して観察、DP70 CCD camera (Olympus)により画像を得た。図 8 では Apotome system(Axiovert 200 microscope, a Plan-Apochromat objective lens (100x/1.4, oil), an AxioCam MRm CCD camera and Axio Vision 4 software [Carl Zeiss]) を Apotome mode で使用した。

電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は、東京大学分子生命科学研究所の平田愛子先生に依頼した(81)。YM16 及び YM18 株を YPD、23 °C で培養し、対数増殖期に 37 °C に

シフト、2 時間又は 6 時間培養後に回収した。菌体は液体窒素で瞬間凍結して切片作製に供した。

Pulse-chase 実験

(CPY の項)

酵母菌を Cys, Met 不含の SC 培地で 23 °C で培養、対数増殖期の菌体を回収、新しい培地に 5 O.D./ml で懸濁した。菌体を 33 °C (*kar2-113*, *kar2-159* の株) または 37 °C (*KAR2*, *kar2-1* の株) で 30 分培養後、0.4~0.8 Mbq/O.D.cells の [³⁵S-]Met/Cys (EXPRESS protein labelling mix; perkin elmer) を加えさらに 5 分培養した。同じ温度の SC を加え、最終的に 2 O.D./ml, 0.01 % Met, 0.08 % Cys として chase の培養を開始、適宜菌体を回収した (2 O.D. 分ずつ)。DTT (Dithiothreitol) 処理を行った場合、温度シフト後 15 分で終濃度 5 mM の DTT を加えた。さらに 15 分培養後 10 分間ラベルを行い菌体を一旦回収、SC 培地 (0.01 % Met, 0.08 % Cys) に懸濁して (DTT を除去し) chase 培養を開始した。回収した菌体には終濃度 10 mM の NaN₃ を加え、150 µl の 1 % SDS-TBES (50 mM Tris pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl) 中でガラスビーズにより菌体を破碎した。Lysate は 65 °C で 10 分加熱後遠心 (15000 rpm, 10 min.)、2 % TritonX-100-TBES 450 µl と抗 CPY 抗体又 1.2 µl を加えて 4 °C で 2 時間以上反応させた。Protein A-Sepharose 10 µl (bed vol., Amersham) を加えて室温で 1.5 時間反応後、2 % TritonX-100-0.2 % SDS-TBES (DTBES), 2 M urea-DTBES, 0.5 M NaCl-DTBES, TBES の順でビーズを洗浄、15 µl の 1×PAGE buffer を加えて 95 °C で 5 分間加熱、全量を SDS-PAGE 及び autoradiography による解析に供した。EndoH 処理を行う際には、洗浄したビーズに denaturation buffer (0.5 % SDS, 1 % β-mercaptoethanol) を加えて 95 °C に加熱して蛋白質を溶出、製品の指示書に従って Endo Hf (New England BioLabs) で消化した。シグナルの検出、解析には BAS2500 システム (Fujifilm) を用いた。

(Kre5p-HA, HA-Kre6p の項)

菌体を同様に SC-Cys, Met で培養、10 O.D./ml に懸濁した。37 °C で 10 分培養後、0.4~0.8 Mbq/O.D.cells の [³⁵S-]Met/Cys を加えて 10 分培養、Met, Cys を終濃度それぞれ 0.01 %, 0.08 % まで加えてチェイスした。抗体反応は CPY と同様に、抗 HA 抗体 1 µl ずつを使って行った。ビーズは 2 M urea-TBESX (1 % TritonX-TBES) で 1 回、0.5 M NaCl-TBESX で 2 回、TBESX で 1 回洗い、SDS-PAGE buffer を加えて 65 °C で 5 分加熱、以下同様に蛋白質を分離検出した。

免疫沈降

(非変性条件; Kar2p-Rot1p-HA の項)

菌体を YPD, 30 °C で培養、適宜薬剤処理を行い、対数増殖期で 15 O.D. 分の菌体を回収した。終濃度 10 mM の NaN₃ を加え氷上で 5 分静置、600 µl の TBESX 中でガラスビーズにより菌体を破碎した (1.5 ml チューブ 3 本に分けて実施)。Lysate を微量高速遠心機で 15000 rpm, 10 分間遠心後、1.2 µl の preimmune serum

(抗 Kar2p 抗体のもの) を加えて 4 °C で 30 分反応、100,000 g で 30 分遠心した。上清を Protein A-Sepharose 20 µl と 30 分反応、その上清に抗 Kar2p 抗体または preimmune serum 1.2 µl を加えて 1 時間反応した。Protein A-Sepharose 10 µl を加えてさらに 1 時間反応、TBESX でビーズを 5 回洗浄後 denaturation buffer 10 µl を加え蛋白を溶出、EndoH 処理後ウェスタンブロットを行った。

(変性条件; Rot1p-HA-Kre6p の項)

YM41, 42 を液体 YPD, 23 °C で培養、 $A_{600}=1.0$ で 37 °C に移して 10 分間培養した。NaN₃ と DSP(Dithiobis[succinimidyl] propionate; Pierce; 100 mM DMSO 溶液を実験直前に作製) をそれぞれ終濃度 15 mM と 0.5 mM になるよう加え、5 分間培養、Tris (pH 7.4 at rt) を終濃度 50~100 mM まで加え、DSP の反応を停止した。Cycloheximide(CHX) 処理時には、37 °C 10 分の培養後 CHX を終濃度 0.1 mg/ml になるよう加え、5 分又は 10 分培養した後に NaN₃ と DSP で処理した。回収した菌体は液体窒素で凍結、-20 °C で保存した。100 µl の 1 % SDS-TBES 中で菌体を破碎、65 °C で 5 分加熱後微量高速遠心機で遠心(15,000 rpm, 10 分, 室温)して抽出液を回収した。2.5 % TritonX-100-TBES 400 µl を加え、菌体量に応じた量の抗 Rot1p 抗体(0.5 µl/O.D. cells) と 10 µl の protein A-Sepharose ビーズを加え、4 °C で 2 時間 rotation した。ビーズの洗浄と蛋白質の溶出は HA-Kre6p の pulse-chase と同様に行い、全量をウェスタンブロットに供した。

組み替え蛋白の発現と精製

・ GST-J-His₆ : 文献に従った(15)。

・ His₆-Kar2p:pQE-KAR2 を形質転換した BL21(RIL) を 30 °C で培養、O.D. 0.6 で 25 °C にシフト、30 分後に終濃度 0.2 mM の IPTG を加えて 1 時間培養した。菌体を液体窒素で凍結後、1 % TritonX-100-PS Buffer(50 mM K₂HPO₄, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM imidazole, pH 7.4 at 4 °C) に懸濁、lysozyme を終濃度 0.5 mg/ml、PI mix (終濃度 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A) と DNase I(TaKaRa) 5 µl を加えて 30 分氷上に静置した。菌体を超音波処理後 (10 秒×6) 遠心(100,000×g)、Ni-NTA(Qiagen) 0.5 ml と反応させた(4 °C, o/n)。Resin はそれぞれ 20 ml の 1 M KCl-PS buffer と 20 mM imidazole-PS buffer で洗浄、さらに 6 ml の 60 mM imidazole-PS buffer と 10 ml の 1 mM ATP-PS buffer で洗浄した。E buffer(20 mM Hepes, 500 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 250 mM imidazole, 1 mM ATP, 1 mM 2-mercaptoethanol, 20 % (w/v) glycerol, pH 7.4 at 4 °C) で蛋白質を溶出し、C buffer(250 mM imidazole を含まない E buffer) で平衡化した Superdex 200(Amersham) カラムを用いてさらに精製した(単量体を回収した)。回収した分画を再度 Ni-NTA にかき、C buffer で洗浄後 E buffer で溶出、P buffer (20 mM Hepes, 500 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 50% glycerol, pH 7.4 at 4 °C) に透析して -20 °C で保存した。His₆-Kar2p(T249G) も同様に精製、保存した。

・ R-Rot1p 及び r-rot1-2p : pYEX-RHH(rHH) を持つ FY23 株を液体 SC-Leu で

$A_{600}=1.5\sim 1.8$ まで培養した(2l フラスコに 500 ml の培地、30 °C、230 rpm)。回収した菌体は液体窒素で凍結、-80 °Cで保存した。菌体(r-Rot1p には 8~16 l 分、r-rot1-2p には 24 l 分)を L buffer (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 500 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM imidazole, 1 % TritonX-100, 20 % glycerol, pH 7.4 at 4 °C)に懸濁、PI mix を加え、ガラスビーズと bead-beater(Biospec)を用いて破碎した。抽出液を 100,000 g で 1 時間遠心、1.5 ml の Ni-NTA と 4 °C で o/n 反応させた。レジンを W buffer (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 500 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, pH 7.4 at 4°C)で洗浄、E buffer で溶出した。C buffer で平衡化した superdex 75(Amersham)でさらに精製を行い、His₆-Kar2p 同様に Ni-NTA に再結合させて溶出、P buffer に透析して-20°C で保存した。R-rot1-2p の精製も同様に行った。

ATPase 活性の測定

・総 ATPase 活性: His₆-Kar2p(1 μM)を RL buffer (20 mM Hepes, 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.0 at 30 °C) 中で 200 μM ATP(2.5 nCi/ml [α -³²P]-ATP を含む)と 30 °C で反応させた。また、r-Rot1p (5 μM) and/or GST-J (0.5 μM)を適宜加えた。10, 20, 30 分反応時に(GST-J 添加時には 5, 10, 15 分)一部を取って 1/10 量の停止溶液 (5 M 蟻酸, 5 M 塩化リチウム)と混合、反応を停止させた。1 μl を polyethyleneimine cellulose thin layer plates (Merck)に滴下、展開溶液(0.5 M 蟻酸, 0.5 M 塩化リチウム)で展開した。BAS2500 システムで [α -³²P]-ATP と [α -³²P]-ADP を検出、定量して [α -³²P]-ATP から [α -³²P]-ADP への変換速度を算出した。

・ヌクレオチド交換反応: His₆-Kar2p または His₆-Kar2p T249G (10 μM)を RL buffer 中で 20 μM の ATP(0.5 Ci/ml [α -³²P]-ATP を含む)と 4 °C で 30 秒反応させた。RL buffer で平衡化した Autoseq G-50 column (Amersham)により遊離のヌクレオチドを除去し、Kar2p- [α -³²P]-ATP 複合体を回収した(通過分画; Kar2p 濃度は約 8 μM になる)。Kar2p- [α -³²P]-ATP 複合体(1 μM)を 2 mM の cold ATP と 10 μM の BSA を含む RL buffer 中(計 50 μl 程度)、20 °C で反応させた。1, 2, 3 分経過時に一部(15 μl 程度)を再度 Autoseq G-50 にかけて遊離ヌクレオチドを除去した。R-Rot1p(r-rot1-2p)は 5 μM 加えた。0 分用には Kar2p- [α -³²P]-ATP 複合体の希釈を上記同様に、但し 4°C で行い、即座に Autoseq G-50 にかけた。Kar2p に結合した(2 回目の G-50 の素通り分画の) [α -³²P]-ATP と [α -³²P]-ADP を同様に TLC 展開、検出、定量した。

・single-turnover の ATP 加水分解反応: 同様に精製した Kar2p- [α -³²P]-ATP 複合体(1 μM)を 2 mM の cold ATP を含む RL buffer 中、20 °C で反応させた。1, 2, 3, 4 分で一部を回収して 1/10 量の停止溶液と混合、総 ATPase 活性測定と同様に処理した。

蛋白質凝集阻止活性の測定

α -Mannosidase (α -Man, エンドウ豆由来, sigma)は A buffer (50 mM 酢酸緩衝液, 150 mM KCl, 0.1 mM ZnSO₄, 10 % glycerol pH 5.5 at 4 °C)に透析した。Citrate synthase (CS, ブタ心臓由来, Roche)は B buffer (20 mM Hepes, 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol, pH 7.0 at 30°C)に透析した。 α -Man (30 μ M), CS (40 μ M)を等量の D buffer (20 mM Hepes, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 8 M guanidine-HCl, pH 7.0 at 30 °C)と混合、それぞれ 37 °Cまたは室温で 1 時間変性させた。 α -Man の糖鎖除去時には、まず 50 % glycerol を含む A buffer に透析し、1/8 量の D buffer と混合、室温で 1 時間静置した。続いて A buffer で約 3 倍に希釈し、10 U/ μ l の EndoH と 37 °Cで 1 時間反応させた(α -Man 濃度は 30 μ M)。糖鎖除去率は SDS-PAGE と coomassie brilliant blue 染色による見積もりでは 9 割以上であった(データは示さない)。糖鎖を除去した α -Man を等量の D buffer と混合し、37 °Cで 1 時間変性させた。変性させた α -Man、CS を RL buffer に 50 倍希釈(終濃度はそれぞれ 0.3 μ M, 0.4 μ M)して A₃₂₀ の増加を測定した。また、図 16 に示した濃度の r-Rot1p, r-rot1-2p, BSA, Glc₁Man₉GlcNAc₂(60 μ M)を α -Man, CS の希釈前に適宜加えておき、反応を行った。Glc₁Man₉GlcNAc₂はニワトリ卵白の IgY から精製したもので、名古屋市立大学の加藤晃一先生からご供与いただいた。

その他

ウェスタンブロッティング、ノザンブロッティング、 β -Galactosidase assay、は常法に従った(72)。

3. 結果

kar2-1 合成致死変異株の取得と変異遺伝子同定

Kar2p と協調して新生蛋白質の折り畳みを行う因子を同定するため、出芽酵母 *kar2-1* 合成致死変異株のスクリーニングを行った。合成致死とは、二つの非致死的な変異が同時に存在することで致死的効果をもたらす現象である。二つの変異が合成致死を示した場合、それらの遺伝子産物は同一の生命現象に関与している可能性が高い(82)。Kar2p は蛋白質の折り畳みのみならず、新生ポリペプチド鎖の小胞体膜通過(translocation)や異常蛋白質の細胞質への逆輸送(retro-translocation)においても重要な役割を果たす。*kar2-1*(Pro515→Leu) はペプチド結合領域の変異であり、translocation には影響を示さない。しかし *kar2-1* 株では Unfolded Protein Response(UPR)が強く誘導され、蛋白質の折り畳みに異常が生じている可能性が示唆される(72)。UPR は、Tm(N-結合型糖鎖修飾阻害剤 (83),以後 Tm と記す)や Dithiothreitol(ジスルフィド結合の破壊, 以後 DTT と記す)などの薬剤により強く誘導され、異常蛋白質の小胞体内蓄積が引き金になって誘導されると考えられている(72, 73)。そこで、*kar2-1* との合成致死変異株を取得することで、求める因子の候補を得ることが出来ると考えた。

kar2-1 変異株に化学的変異導入(Ethylmethanesulfonate による)を行い、約 20 万のクローンをスクリーニングし、8 クローンの *kar2-1* 合成致死変異株を得た。全て劣性の単独変異を導入していることを確認した。出芽酵母 genomic library を用い、6 クローンについて変異遺伝子を *CDC1*, *KRE6*, *ROT1*, *SEC11*, *SKN1* と同定した。*Kre6* 変異株は 2 回得られた。Cdc1p は細胞質局在の蛋白質であり、詳細な機能は不明であるが細胞内のイオン恒常性を保つ働きをされると考えられている(84)。小胞体内の Ca^{2+} や Mn^{2+} 濃度は糖鎖修飾機構に影響することが知られており、*CDC1* の変異により小胞体内環境が攪乱され、*kar2-1* と合成致死を生じたと推定する。*KRE6*, *SKN1* は相同的遺伝子であり、細胞壁の β -1,6-グルカン合成に関わっている(85)。機構は不明ながら、Kar2p が細胞壁合成に関与していることが既に示されており(75)、細胞壁合成に著しい支障を生じたため合成致死となったと考えられる。*ROT1* は細胞周期制御因子 *TOR2* の温度感受性変異に対する抑圧性変異のスクリーニングにより同定された(86)。*ROT1* は必須遺伝子であり細胞壁合成への関与が示されていたが、局在や具体的な機能は全く不明であった(87)。*SEC11* は小胞体シグナル配列を切断する signal peptidase の触媒サブユニットをコードしている(88)。*SEC11* の変異が UPR を強く誘導することは既に報告されており、蛋白質の折り畳み、成熟が阻害されていると推測される。これらのなかから、*ROT1* を解析対象に絞った。Rot1p はシグナル配列及び膜貫通領域をもつと予想され、機能未知の必須因子であ

る。また、本研究で取得した *rot1-2* 変異株で UPR の誘導が観察される（後述）など、Rot1p が小胞体内での蛋白質折り畳み機構に関与している可能性があると考えたためである。

Rot1p は小胞体に局在し、内腔側に露出した必須の膜蛋白質である

Saccharomyces genome database などのデータベースによれば、*ROT1*(YMR200w)は 256 アミノ酸残基からなる蛋白をコードしている。しかし、以前の報告ではデータベースの配列に誤りがあるとされていた(86)。本研究で使用した菌株及び genomic library の *ROT1* 遺伝子の sequencing を行ったところ、いずれもデータベースの配列と一致した。本研究では、データベースの配列を採用する。*ROT1* の相同的遺伝子は *Schizosaccharomyces pombe* 及び *Candida albicans* の genome database には存在するが、原核生物および高等真核生物のゲノムには発見できなかった。

以前の報告通り、*ROT1* は単為生殖に必須であった（図 4B）。本研究で取得した *rot1-2* 変異は G134→A の点変異であり、Gly45→Glu の変換をもたらす。*rot1-2* 変異は単独で (*kar2* 変異と共存しなくとも) 温度感受性の原因となり、35°C 以上で *rot1-2* 変異株は増殖を停止する（図 5C, 死滅はせず、許容温度下で再度増殖を開始する; データは示さない）。

Rot1p は N 末端にシグナル配列様の疎水的領域を持ち、4 カ所の N-結合型糖鎖修飾部位を持ち、C 末端に膜貫通領域と考えられる疎水性領域を持つ（図 4A）。その他には既知のモチーフや、既知の蛋白質との相同性は確認できなかった。N 末端と C 末端の疎水性領域を除いた His₆-Rot1p(25-231)を大腸菌で発現、精製してモルモットに注射し、抗 Rot1p 抗血清を作製した。酵母抽出液に対してウェスタンブロットを行ったところ、約 39kDa と 37kDa にバンドが確認された(図 4C)。39kDa のバンドが主で、37kDa の割合は少なかった。以後、37kDa の方を sRot1p (small Rot1p)と称する。*Rot1-2* 変異株抽出液についても同様に解析したところ、約 41kDa のバンド 1 本のみが検出された(図 4C)。Endoglycosidase H(EndoH)消化により Rot1p の N-結合型糖鎖修飾を確認した。経時的に反応を停止させて部分消化を行ったところ、EndoH 処理に伴い Rot1p-HA の分子量は段階的に減少し、Rot1p は 3 ヶ所で N-結合型糖鎖修飾を受けていることがわかった(図 4C)。sRot1p は(図 4C では確認しづらいが)ほぼ同じ泳動度の 2 本のバンドで、EndoH 処理の結果より、片方は糖鎖が 2 本の Rot1p であると推定する。もう一方の EndoH 処理後の分子量は約 26kDa と見積もられ、EndoH 処理後の Rot1p(約 31kDa)よりも 5kDa ほど小さかった。Rot1-2p も 3 本の N-結合型糖鎖を有していた。糖鎖切断後も、Rot1p よりも *rot1-2p* の泳動度が小さかったが、大腸菌で発現させた His₆-*rot1-2p*(25-231)の泳動度も His₆-Rot1p(25-231)よりも約 3kDa 分遅かった(データは示さない)。Rot1-2p が Rot1p よりも多くの修飾(O-結合型糖鎖など)を受けている可能性は否定できな

いが、ポリペプチド鎖の性質自体も変異によって変化している。

続いて、microsome を高濃度の塩、アルカリ、界面活性剤で処理して Rot1p の抽出を検討した。小胞体局在の膜蛋白質である Sec61p は界面活性剤処理でのみ抽出され、Rot1p も同様の挙動を示した(図 4D)。従って、Rot1p は膜内在性蛋白質であることがわかった。

Rot1p の細胞内局在を調べるため、スクロース密度勾配遠心を行った(20-60%)。Mg²⁺ の存在下では、Sec61p は高密度側に分画された(図 4E, +Mg²⁺, #8-11)。一方、EDTA により小胞体膜からリボソームを剥離した場合には、Sec61 の分布が低密度側に移動した(図 4E, +EDTA, #4-6)。Rot1p も Sec61 と同じ分布を示し、Rot1p が小胞体に局在していることが示された(図 4E)。Rot1-2p も小胞体に局在していた(データは示さない)。一方、sRot1p は小胞体と、Mg²⁺ 存在下では小胞体よりやや低密度の膜分画、およびもっとも低密度側に広く検出された(図 4E, 下のパネル)。作製した抗 Rot1p 抗血清の力価が低かったため、Rot1p の C 末端に HA タグを融合して解析に用いた。融合遺伝子を *ROT1* 破壊株に導入したところ $\Delta rot1$ を相補可能であり、融合蛋白質は機能的であることを確認した(図 4B)。間接蛍光抗体法により Rot1p-HA の局在を観察したところ、核の周辺及び細胞内部と周縁部に網目状の蛍光像が観察された(図 4F)。これは出芽酵母小胞体の典型的な染色像であり、Kar2p も同じ分布を示した。HA タグをシグナル配列の C 末端側若しくは膜貫通領域の N 末端側に挿入した際も、それぞれの融合蛋白質は機能的であり、同様の蛍光像が得られた(データは示さない)。理由は不明であるが、Rot1p-HA については sRot1p が検出されなかった(データは示さない)。

以上より、Rot1p は主に小胞体に局在し、内腔側に露出した膜蛋白質であり、生育に必須であることがわかった。

Rot1-2 は *kar2* のアレル特異的に合成致死性を示す

ある二つの変異遺伝子にアレル特異的な合成致死性が観察され、その特異性が各変異の表現型の強さ(温度感受性など)と一致しなかった場合、二つの遺伝子産物が直接相互作用している可能性が示唆される(82)。そこで、*kar2* の幾つかの温度感受性変異アレルと *rot1-2* の合成致死性を調べた。*Kar2* の変異アレルは 3 つのグループに分けられる(71, 72, 74, 89)。*Kar2-113* と *kar2-159* は ATPase ドメインの変異で、translocation が強く阻害され、Kar2p による蛋白質折り畳みや ERAD にも大きな影響が出る。*kar2-191* も ATPase ドメインの変異であるが、translocation への影響は中程度である。*Kar2-1* 及び *kar2-133* はペプチド結合領域の変異で、translocation には影響しないが UPR が強く誘導される。また、ERAD にも若干支障を来す。上記の *kar2* 変異アレルと *rot1-2* を組み合わせたと、*kar2-113 rot1-2* 二重変異株でのみ合成致死性が観察されなかった(図 5A)。*kar2-113* は *kar2-1* や *kar2-133* よりも強い表現型を示

すアレルであり、*kar2-159* とはほぼ同様の表現型を示す。しかし、*kar2-1* と *kar2-133* が *rot1-2* と合成致死性を示したのに対し、*kar2-113 rot1-2* には合成致死性が見られなかった。従って、Kar2p と Rot1p が直接相互作用している可能性が示唆された。

ROT1 と小胞体品質管理機構遺伝子との遺伝学的相互作用

次に、*KAR2* 以外の既知の小胞体品質管理機構関連遺伝子と *ROT1* の遺伝学的相互作用を調べた。まず、非必須遺伝子について *rot1-2* 変異株で破壊を行い、生育への影響を観察した。調査した遺伝子は、*CNE1*, *IRE1*, *JEM1*, *LHS1*, *SCJ1*, *SIL1*, *UBC7* である。*CNE1* は calnexin の出芽酵母オーソログをコードする。出芽酵母 Cne1p が異常蛋白質の小胞体残留に寄与していること、*in vitro* でシャペロン活性を示すことは報告されている(90, 91)が、*in vivo* での蛋白質折り畳みや ERAD における Cne1p の重要性は不明である。Ire1p は小胞体膜蛋白質であり、UPR 活性化の際にシグナル伝達因子として機能する(73)。出芽酵母では、*IRE1* 破壊株では UPR は活性化されない。Jem1p は J 蛋白質であり、小胞体膜の内腔側に結合している。Jem1p は ERAD において Kar2p と協調することが知られているが、Scj1p の補助的な役割であり、Jem1p の主に核融合時(1 倍体酵母の接合時)に働くと考えられている(92-94)。Lhs1p は哺乳類細胞の Orp150/Grp170 のオーソログと考えられ、Hsp70 の近縁蛋白質である Hsp110 ファミリーに属する。Lhs1p は Kar2p の NEF として新生ポリペプチド鎖の translocation に重要であり、強い熱ショック時の変性蛋白質保護において重要な役割を果たすことが示されている(25, 30, 95, 96)。Scj1p は Hsp40 であり、変性蛋白質の凝集防止等には重要であるが、新生蛋白質の折り畳みにおいては必須ではない(93, 97, 98)。Sil1p は Kar2p のヌクレオチド交換因子であり、translocation と retrotranslocation の双方において Kar2p と協調する(20, 30)。Ubc7p は小胞体膜上、細胞質側に存在する E2 で、*Δubc7* 株では ERAD が重大な損傷を受ける(74, 99, 100)。

Δcne1 または *Δscj1* と *rot1-2* の二重変異により、強い生育障害が確認された(図 5B)。また、*Δlhs1 rot1-2* 株でも弱いながら合成的効果がみられた(図 5B)。*Δjem1*, *Δsil1* と *rot1-2* の二重変異では、合成的効果は確認できなかった(データは示さない)。*Δire1 rot1-2* 株では、*rot1-2* 株に比べ若干生育が回復していた(データは示さない)。*Δubc7* と *rot1-2* の二重変異により、23 °C では若干の生育障害が観察されたが、32 °C 以上では *rot1-2* 株よりも生育が改善し、制限温度でも生育が認められた(図 5D; ただし、増殖速度はとても遅かった)

次に、上記の遺伝子について *rot1-2* 株で過剰発現させて *rot1-2* 変異の抑圧効果を検討した。*CNE1*, *IRE1* 及び *SCJ1* の過剰発現により、生育の回復が観察された。しかし、制限温度下においてはやはり生育不能であった(図 5C)。*LHS1* の過剰発現も *rot1-2* 株の生育を改善し、さらに制限温度下においても生

育可能であった (図 5C)。 *JEM1*, *KAR2*, *SIL1* および *rot1-2* の過剰発現は効果がなかった(データは示さない, *UBC7* は未検定)。

以上より、*ROT1* は *KAR2* 以外の小胞体品質管理遺伝子(*CNE1*, *IRE1*, *LHS1*, *SCJ1*, *UBC7*)とも遺伝学的相互作用があり、*Rot1p* が小胞体品質管理に関与していることが示唆された。

***ROT1* と小胞体ストレス、Unfolded Protein Response の関係**

UPR は小胞体内の異常蛋白蓄積によって活性化され、小胞体内環境を改善すべく、*KAR2* など小胞体分子シャペロンをはじめ様々な因子の転写量を増加する。小胞体内で新生蛋白質の折り畳み、修飾、ゴルジ体への輸送、そして異常蛋白の排除までの一連の過程に関わる因子の変異はしばしば UPR の恒常的活性化をもたらす。

Rot1p が品質管理機構に関与している可能性を探るため、*rot1-2* 変異株での UPR 活性化を検討した。UPR により転写活性化される遺伝子は、プロモーター領域に UPR element (UPRE)と呼ばれる転写調節領域を持つ。UPRE の制御下に β -galactosidase 遺伝子をレポーターとしたプラスミドを野生型株、変異株に導入した。形質転換体細胞内の β -galactosidase 活性を指標として、*rot1-2* 変異株での UPR 活性化を検討した。図 6A に示すように、*rot1-2* 変異株では許容温度下 (23 °C) にあっても野生型株よりも高い β -galactosidase 活性が確認された。*KAR2* は UPRE を持ち、UPR によって転写上昇が見られる(101)。ノザンブロットにより *rot1-2* 変異株の *KAR2* mRNA 量を測定したところ、野生型にくらべ若干の増加を確認した(図 6B)。このことから、*rot1-2* 変異株では UPR が恒常的に活性化している可能性が高い。また、*rot1-2* 変異株は Tm に対する感受性がより強く、野生型株が生育可能な濃度で変異株は全く生育が見られなかった (図 6C)。さらに、Tm 及び DTT で処理した菌体では *ROT1* mRNA 量が約 2.5 倍にまで増加していた (図 6D)。しかし、*ROT1* の転写活性化は Δ *ire1* 及び Δ *hac1* 株でも同様に起こる(データは示さない)。小胞体ストレス時には UPR と平行して *Ire1p* や *Hac1p* 非依存的な経路による転写活性化が起こることが知られており(102)、後者が *ROT1* の転写を活性化していると推測される。

***Rot1-2* 変異株の電子顕微鏡観察**

Rot1-2 変異の生理的影響を分析するため、変異株の電子顕微鏡観察を行った。変異株は許容温度 (23 °C)、制限温度 (37 °C) で 2 時間及び 6 時間処理した。変異株は制限温度での培養後 6 時間程度で生育速度が大きく低下するため(データは示さない)、この条件を選択した。許容温度下においても、*rot1-2* 変異株では細胞壁の肥厚化、密度の低下、厚みの不均一化が観察され (図 7B)、既に報告されている *rot1* 変異による細胞壁合成不全と一致した。頻度はまれ

であったが、セプタ（分裂隔壁）の分離不全も観察された（図 7C）。制限温度下においては、ときおり小胞体の増加と、それに伴う核の変形を確認した（(103); 図 7E）。さらに、高電子密度の細胞内器官の伸長や断片化が観察された（図 7F-H）。頻度は断片化の方が高かった。

Rot1-2 変異株の蛍光顕微鏡観察

続いて、蛍光顕微鏡を用いて *rot1-2* 株の観察を行った。37 °C で 6 時間培養した変異株の Kar2p の局在を、間接蛍光抗体法により観察した。野生型株では Kar2p は主に核の周り、細胞周縁部に局在し、また細胞内の編み目状構造も観察された(図 8A)。変異株では、Kar2p の全体的な分布は野生型株と変わらないものの、局所的に(小胞体に沿って)Kar2p が集合していた(図 8B)。Rot1-2p についても、Kar2p と同様に局所的な集合が観察された(図 8D)。小胞体に異常蛋白質が蓄積したときにも、同様の Kar2p の局所的集合が観察されている(104)。

電子顕微鏡観察では、液胞は一般に高電子密度の細胞内器官として観察される。図 7F, G に示した高電子密度の細胞内小器官が形態異常を起こした液胞である可能性を検証するため、液胞の蛍光顕微鏡観察を行った。酸性コンパートメントに蓄積するキナクリンで菌体を処理したところ、変異株でも野生型株と同様に大きな、丸い液胞が観察された(図 8E, F)。液胞の形態は正常で、酸性化も正常になされていると考えられる。しかし、変異株の液胞の内部には小胞が多数観察された。この小胞が autophagic body である可能性を検証するため、GFP を融合した Atg8p を発現させた菌体を観察した。(Autophagic body とは、autophagy の際に形成された二重膜の autophagosome が液胞と融合し、液胞内に放出された内膜のことである(105)。通常、autophagic body は速やかに消化されるが、液胞のプロテアーゼ変異体などでは autophagic body の蓄積が観察される。また、Atg8p は autophagosome のマーカー蛋白質として用いられている(106)。) 野生型株では autophagic body は消化され、GFP-Atg8p は液胞内に拡散していた(図 8G)。一方、変異株では GFP-Atg8p はドット状に存在していた(図 8H)。野生型株で栄養飢餓によりオートファジーを誘導し、PMSF 処理により(プロテアーゼを阻害し)autophagic body 消化を阻害した際にも、同様の像が得られた(図 8I)。

以上より、*rot1-2* 変異株では細胞壁の異常のみならず様々な形態異常が観察され、Rot1p が分泌経路の生理状態に大きな影響を与えていることが示唆された。

モデル蛋白 carboxypeptidaseY の成熟に対する *rot1-2* 変異の影響

Rot1p が小胞体内の蛋白質成熟に関与していることを検証するため、モデル蛋白 carboxypeptidaseY(CPY)の成熟をパルス-チェイス法により追跡した。CPY

は小胞体内で 4 本の N-結合型糖鎖修飾を受け、5 本のジスルフィド結合を形成する (ER form, 67 kDa; (107))。CPY の折り畳みに糖鎖修飾は必須ではない (速度は遅くなる) が、ジスルフィド結合形成は必須である。折り畳みの完了した CPY はゴルジ体に輸送され、糖鎖の伸長を受ける (golgi form, 69 kDa)。最終的に CPY は液胞に輸送され、プロシークエンスが切断されて成熟型になる (mature form, 61 kDa)。従って、SDS-PAGE での分子量変化を指標に CPY の成熟を追跡することが可能である(108)。

Rot1-2 変異株で CPY の成熟を追跡したところ、制限温度下 (37°C) においても異常は確認できなかった(図 9A)。*kar2-1* 変異株を用いた場合にも、やはり CPY は正常に成熟した (図 9B)。そこで、*kar2-1 rot1-2* 二重変異株を用いたところ、若干の影響がみられた (図 9B)。chase10 分においても小胞体型が残存し、またチェイス 0 分では糖鎖修飾を全く受けていない CPY が一部存在した (図 9B 矢印)。

培地中に DTT を添加すると、CPY は折り畳みを完了できずに小胞体に残留される。培地中から DTT を除去すると、CPY は Kar2p 依存的に折り畳まれてゴルジ体以降へと輸送される(17)。この、post-translocational folding についても *rot1-2* 変異の影響を検証した。この場合も、*rot1-2* 又は *kar2-1* 変異それぞれ単独では CPY の成熟に異常は確認できなかった (図 9C, D)。しかし、*kar2-1 rot1-2* 二重変異株では顕著な影響が観察された (図 9D)。チェイス 0 分の時点で、3 本のバンドが確認された。EndoH 消化を行ったところ、3 本のバンドは 1 本になったことから、それらは N-結合型糖鎖数の異なる proCPY であることがわかった(Fig. 9E)。一番上のバンドは *kar2-1 ROT1* 株の ER form と同じ泳動度であることから、4ヶ所すべてで糖鎖修飾をうけていると考えられる。また、ER form が 67kDa、mature form が 61kDa、N-結合型糖鎖が 1 本 2kDa 程度であることから、一番下のバンド(mature form より小さい)は糖鎖修飾を受けていない proCPY であると推測する。2 本目のバンドについては、上下のバンドとの距離から推定して 3 本の N-結合型糖鎖を持つと推測される。チェイスを行ってもバンドパターン(3 本の比率および泳動度)に変化はみられなかった(図 9D)。このことから、CPY のゴルジ体以降への輸送が起こっていないと考えられる。従って、CPY の折り畳みが進行していないと推測する。これらより、Kar2p と Rot1p が蛋白質の折り畳みにおいて協調していることが示唆された。同じ実験条件では、translocation の傷害は認められなかった(データは示さない)。

Rot1p は *in vivo* で *kar2p* と複合体を形成する

Rot1p が Kar2p と協調して機能している可能性を検証するため、免疫沈降法により両者の物理的相互作用を調べた。Rot1p-HA 発現株抽出液から Kar2p を免疫沈降し、Rot1p-HA の共沈を検出したところ、生理的条件下ではごく僅か

少量の Rot1p-HA が Kar2p と複合体を形成していた (図 10)。一方、Tm 及び DTT 処理時には Kar2p-Rot1p-HA 複合体量は劇的に増加した。Rot1-2p-HA についてもほぼ同様の結果が得られたが、DTT に対する反応性が比較的悪かった(データは示さない)。Rot1p は基質に結合した状態の Kar2p を認識して結合、Kar2p と協力して蛋白質の折り畳みを行っている と推測する。Tm と DTT のどちらを使用した場合も複合体量が増加し、併用の場合には相加的な効果があったことから、様々な基質に結合した Kar2p が認識されていると思われる。薬剤処理を行った場合でも、Kar2p と共沈する Rot1p 量は全体の数%程度であり、複合体はごく一過的な性質のものであると考えられる。細胞抽出液中の Kar2p 量と Rot1p-HA 量は、薬剤処理時にはいずれも約 1.4 倍に増加していた。

Rot1p は Kre6p の折り畳みと成熟に必要である

CPY 以外のモデル蛋白質として、invertase と Gas1p(GPI アンカー蛋白質)の パルス-チェイス実験を行ったが、いずれの場合も *rot1-2* 変異(単独)による明確な成熟阻害は見られなかった(データは示さない)。*Rot1-2* 変異株では UPR 活性化がみられるものの程度が弱い(図 6A)ことも合わせ、Rot1p は一部の蛋白質の成熟にのみ関与しているのではないかと考えた。そこで、Rot1p 依存的に成熟する蛋白質の探索を試みた。*Rot1-2* 変異株では細胞壁の β -1, 6 グルカン量が激減していることが報告されている(87)。本研究でも、*rot1-2* 変異による細胞壁の異常を確認した(図 7)。Rot1p は「 β -1, 6 グルカン合成に重要な蛋白質」の成熟に寄与していると予想した。酵母細胞壁の主要構成成分は高マンノース化蛋白質と β -1, 3 グルカンである。 β -1, 6 グルカンは細胞壁乾燥重量の約 5 %ほどであるが、上記二種に加えキチンなどの細胞壁構成成分をつなぎ合わせる重要な役割を担っていると考えられている(109)。 β -1, 6 グルカンの合成は細胞膜上で起こるものの、 β -1, 6 グルカン合成に必要な酵素群は小胞体から分泌経路に沿って存在している。 β -1, 6 グルカンを蛋白質に結合させるために必要な修飾(蛋白質に結合した糖鎖に対する)が分泌経路で段階的に行われているという説が提唱されている(85)。 β -1, 6 グルカン合成に関与する蛋白質は十数種知られているが(109)、特に重要な Kre5p と Kre6p を Rot1p 依存的蛋白質の候補とした。Kre5p は小胞体に局在する可溶性蛋白質で UGT に相同性があるため糖転移酵素と予想されているが、詳細な機能は不明である(110)。*KRE5* 破壊株では β -1, 6 グルカンがほとんど検出されず、酵母の生育に重大な影響を与える((111, 112)菌株の系列によっては致死的)。*Kre6p* はゴルジ体に局在する II 型膜蛋白質であり、糖鎖の修飾に関与していると推測されている(85, 113)。*KRE6* 破壊株では β -1, 6 グルカン量が野生型株の半分程度に減少する(75, 111-113)。

Kre5p, Kre6p の成熟等を観測するため、染色体上の *KRE5*、*KRE6* 遺伝子をそれぞれ *KRE5-HA-HDEL*、*HA-KRE6* に入れ換えた(図 11A)。*KRE5-HA-HDEL*

株は若干の増殖遅延がみられ(データは示さない)、Kre5p-HA-HDEL(以降 Kre5p-HA に省略する)の機能は完全ではない可能性がある。HA-KRE6 株は野生型株と同等の速度で生育した(データは示さない)。Kre5p-HA 発現株抽出液のウェスタンブロット解析を行った。23 °Cで培養時、23 °Cから 37 °Cに温度を変えて 2 時間培養時、いずれの場合も *rot1-2* 株での Kre5p-HA の顕著な減少などは認められなかった(図 11B)。しかし、*rot1-2* 株を継続的に 30 °Cで培養した際には、Kre5p-HA 量が *ROT1* 株の約 20 %程度にまで減少していた(図 11B)。次に、パルス-チェイス実験により Kre5p-HA の安定性を検証した。23 °Cで培養した菌体を 37 °Cで 10 分培養してから 37 °Cでパルス-チェイスを行ったが、*rot1-2* 株でも Kre5p-HA の安定性に影響はみられなかった(図 11C; 30 °Cで継続的に培養した際のパルス-チェイスは未検定)。しかし、*rot1-2* 株の Kre5p-HA は *ROT1* 株の Kre5p-HA よりもわずかに低分子量であった。EndoH 消化により、N-結合型糖鎖修飾の違いが泳動度の差を生じていることがわかった。Kre5p には N-結合型糖鎖修飾部位が 13 ヶ所有り、*rot1-2* 株では Kre5p-HA の糖鎖が 1~数本少ないと(泳動度から)推測される。しかし、この違いはウェスタンブロットでは確認できなかった(図 11B)。

ROT1 HA-KRE6 株から抽出した HA-Kre6p のウェスタンブロット解析では、3 本のバンドが検出された(図 11D; 約 125, 130, 140 kDa; 順番に A, B, C form と称する)。HA-Kre6p の大半は B form であった。EndoH 消化後も HA-Kre6p のバンドは 3 本検出され、量比も同程度であったため(図 11D)、各 form の違いは N 結合型糖鎖修飾の違いではないと考えられる。一方、*rot1-2* 株では、HA-Kre6p 量は 23 °Cでも *ROT1* 株の 20 %強、30 °C、37 °Cでは 10 %程度と激減しており、また A form の割合が多かった(図 11D)。*Rot1-2* 株では HA-Kre6p が折り畳みを完了できずに分解されている可能性があり、また修飾が正常になされていないと考えられる。これらの可能性を検証するために、パルス-チェイス実験で *ROT1* 株と *rot1-2* 株における HA-Kre6p の修飾と分解を観測した。菌体を 23 °Cで培養、37 °Cで 10 分間培養してから 10 分間ラベル、チェイスした。*ROT1* 株では、パルス終了時には A form のみが検出されたが、チェイス 15 分の時点で約半分が B form に変換されていた(図 11E)。B form への変換はそれ以上進まず(チェイス 60 分までは)、A form と B form の安定性に違いは認められなかった。また、C form はほとんど検出されなかった。*ROT1* 株では、チェイス 60 分の時点で約 60 %の HA-Kre6p が残っていたが、*rot1-2* 株では HA-Kre6p は速やかに分解された(図 11E)。HA-Kre6p 量(A, B form 合算)の定量結果を図 10F に示す。*Rot1-2* 株での HA-Kre6p の半減期は約 15 分であった。*Rot1-2* 株での HA-Kre6p の分解が ERAD によるものであることを確認するため、同様の実験を *rot1-2 Δubc7* 株で行った。*Rot1-2 Δubc7* 株では HA-Kre6p が比較的安定化しており、HA-Kre6p の分解が ERAD 依存的であることがわかった(図 11F)。*Rot1-2 Δubc7* 株でも、HA-Kre6p の B form への変換はみられ

なかった(データは示さない)。また Kre5p-HA について観察されたように、パルス-チェイス実験では *rot1-2* 株の HA-Kre6p は *ROT1* 株の HA-Kre6p よりもわずかに低分子量であった(図 11E)。EndoH 処理により、この場合も N-結合型糖鎖修飾の違いであることがわかったが、やはりウェスタンブロットでは違いは見られなかった(図 11D)。

Rot1p は HA-Kre6p と一過的に結合する

Rot1p が HA-Kre6p の折り畳み及び修飾に直接関与しているならば、Rot1p と HA-Kre6p は直接相互作用しているはずである。また、相互作用は HA-Kre6p が成熟するまでの一過的なものであると予想される。そこで、免疫沈降により Rot1p と HA-Kre6p の相互作用を調べた。菌体を Dithiobis(succinimidyl) propionate(DSP; 脂質可溶性のクロスリンカー。DTT により切断できる)で処理した後、変性条件で抗 Rot1p 抗体による免疫沈降に供した。Rot1p は Kar2p と協力して機能している可能性があるため、DSP 処理時にはアジ化ナトリウムを同時に加え、細胞内の ATP を枯渇させた(Rot1p と HA-Kre6p 複合体の安定化を期待した)。免疫沈降物のウェスタンブロットを行い、Rot1p と共沈降した HA-Kre6p を検出した。図 12 に示すように、DSP 依存的に Rot1p と HA-Kre6p の結合を確認した。また、*rot1-2p* についても HA-Kre6p との結合が検出された(図 12)。HA-Kre6p の結合量は、むしろ *rot1-2p* の方が多かった(*ROT1* 株は 50.O.D.分、*rot1-2* 株は 1 O.D.分の菌体抽出液を免疫沈降に供した。免疫沈降された Rot1p と *rot1-2p* の量と、それぞれと共沈降した HA-Kre6p の量を比較)。小胞体膜上に数多く存在する Sec61p(translocon の主要構成因子)の共沈降は検出されず(図 12)、DSP によるクロスリンクは特異的になされていると考えられる。次に、Rot1p と HA-Kre6p の結合が一過的であることを示すため、菌体をシクロヘキシミド(CHX; 翻訳阻害剤)で処理した後に DSP で処理し、同様に免疫沈降を行った。CHX 処理中に Rot1p に結合していた HA-Kre6p が折り畳みや修飾を終えて解離すれば、その後に DSP 処理を行っても Rot1p との結合は検出されないと予想した。*ROT1* 株、*rot1-2* 株いずれの場合にも、CHX 処理によって Rot1p と HA-Kre6p の結合量が減少し(図 12)、Rot1p(*rot1-2p*)と HA-Kre6p の結合が一過的であることが示された。分子シャペロンは、「新生蛋白質に一過的に相互作用し、その成熟を補助する分子」と定義される(1, 2)。パルス-チェイスの結果も合わせ、Rot1p は HA-Kre6p のシャペロンであると言える。なお、この実験の場合には *rot1-2* 株の HA-Kre6p は *ROT1* 株の HA-Kre6p よりも若干分子量が小さかった(図 12)。

組み換え Rot1p の発現と精製の試み

以上の *in vivo* の実験で、Rot1p が小胞体で分子シャペロンとして Kre6p(をはじめとした蛋白質)の折り畳み、修飾の補助を行っていることがわかった。また、Rot1p が Kar2p と協調して機能している可能性も示唆された。Rot1p 自身のシャペロン活性や、Kar2p 補助因子としての機能を詳細に検討、証明していくためには、精製蛋白質を用いた *in vitro* の実験が不可欠である。そこで、組み換え Rot1p の精製を試みた。

まず、大腸菌を用いた発現、精製を試した。Rot1p の N 末端と C 末端の疎水性領域を除いた部分 (E25-S231) を Glutathione-S-transferase (GST) または Maltose binding protein (MBP) に融合して発現させた。通常の BL21(DE3) 株では Rot1p 融合蛋白質は生産されず、翻訳が途中で停止したと考えられる多数の断片のみが検出された。大腸菌では稀にしか使われないコドンを使う遺伝子の場合、aminoacyl-tRNA の不足により翻訳が途中で停止してしまいがちになることが知られている。そこで、3 種の希少コドンを導入した大腸菌 BL21(DE3)RIL(stratagene)を用いたところ、発現に顕著な改善が見られた。しかし、通常発現誘導条件 (37 °C、1 mM IPTG 等) では生産された Rot1p 融合蛋白質は全て封入体を形成した。そこで、発現温度を 20 °C、IPTG 濃度を 50 nM まで下げ、さらに培養時の aeration を最大にする工夫(培養液をフラスコ容量の 1/10 以下にして、250 rpm で培養する)をしたところ、可溶性蛋白質の回収が可能になった。封入体からの蛋白質回収を試みた際は、(翻訳中止?)Rot1p 断片または分解産物などの除去が非常に困難であり、蛋白質の再折り畳みも困難であった。融合の相手としては、GST と MBP を検討したが、MBP が優れていた。GST 融合時は、発現量は多いもののほとんどが封入体を形成してしまった。His₆ タグのみの場合も、可溶性蛋白質はほとんど得られなかった。MBP 融合時は、発現量は GST 融合蛋白質に比べ低いものの、ほぼ完全に可溶性の蛋白質が生産された。翻訳中止または分解による断片を除去するため、Rot1p(25-231)の N 末端側に MBP を融合、C 末端側に His タグを付加した。GST-Rot1p-His₆ で精製を試みた場合、Ni-NTA への親和性が非常に低く、Glutathione(GSH)-Sepharose への親和性もやや低かった。GST-Rot1p-His₁₀ を用いたところ、Ni-NTA にはよく結合するものの、GSH-Sepharose には全く結合しなかった。MBP-Rot1p-His₈ は Ni-NTA によく結合し、60 mM imidazole を用いた洗浄も可能であった。一方、amylose-agarose には回収した蛋白質の半分以下しか結合せず、さらに精製効果もほとんどなかった。陰イオン交換クロマトグラフィー(MonoQ; FPLC システム; Amersham)を行ったが、(恐らく凝集のため)回収率が非常に悪く、混入蛋白質の分離もほとんどできなかった。疎水性クロマトグラフィーも検討したが、Phenyl superose(Amersham)に対しては親和性が強すぎ、ほとんど溶出不可能であった (pH の変更や界面活性剤添加も効果がなかった)。Factor Xa による MBP の切除効率はよかったが、Rot1p-His₈

には凝集しやすい性質があったため、切断時の塩濃度を 150 mM に(50 mM では凝集)、切断前の MBP-Rot1p-His₈ 濃度を 2 µg/ul 以下に(3 µg/ul 以上では凝集)設定した (MBP 42.7 kDa, Rot1p-His₈ 24.6 kDa)。切断後、Rot1p-His₈ を Ni-NTA により精製を試みたが、大部分の Rot1p-His₈ が結合せずに流出した。わずかに回収できた Rot1p-His₈ も純度が低かった。さらに、恐らく混入蛋白質由来の ATPase 活性が検出されたために、Kar2p の ATPase 活性制御能を検定するのは困難であると思われた。また、精製時の状態からは組み換え Rot1p がほとんど不活性である可能性が高いのではないかと考えた。そこで、大腸菌での発現系は諦めて酵母の発現系を使うことにした。

Cu²⁺イオン添加に反応する *CUP1* プロモーター制御で、MBP-Rot1p-His₈ を酵母細胞質に発現させた。大部分の MBP-Rot1p-His₈ が可溶性であったが、Ni-NTA や TALON(Co²⁺レジン)では十分な精製度が得られなかった。Amylose-agarose は精製効果がなく、さらに吸着時または溶出時に MBP-Rot1p-His₈ がカラム内で凝集してしまった(高塩濃度による防止効果も限定的であった)。代わりに陰イオン交換カラムを用いたが、溶出がただらとしていて精製、回収ともに困難であった。Factor Xa により MBP の切断を行ったところ、Rot1p-His₈ は凝集しやすく、また非特異的に Factor Xa により切断されてしまう傾向が強かった。

MBP-Rot1p-His₈ は、仮に精製に成功しても MBP 切断が困難であるとわかったため、Rot1HAHis₈ を酵母細胞質に発現させて精製を試みた。しかし、Rot1pHAHis₈ はほとんどが凝集してしまった。Ni-NTA を用いて回収を試みたが、収量はわずかで純度も MBP-Rot1p-His₈ より低かった。陰イオン交換カラムでの精製を試みたが、若干の精製度上昇が見られる程度であった。次にゲル濾過(superdex 75; Amersham)を行ったところ、Rot1pHAHis₈ と混入蛋白質のほとんどが排除限界よりわずかに小さい凝集体として分画された。一方、一部の Rot1pHAHis₈ は推定分子量 30-35kDa に恐らく単量体として分画され、純度もかなり高かった。そこで Ni-NTA に続いてゲル濾過で精製を行い、再び Ni-NTA を用いて Rot1pHAHis₈ を濃縮した。しかし、20 l の酵母培養液からの収量はわずかに 150 µg 程度であった。Rot1pHAHis₈ 発現時のプロモーターを *TDH3p* に変更して改善を試みた。*TDH3* は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase をコードしており、増殖中の酵母内では最も多く発現している遺伝子のひとつである。その結果、収量は約 2 倍になった。また細胞破碎時に還元剤を添加することで Rot1pHAHis₈ の凝集を若干(1~2 割程度)抑えることができた。しかし、Rot1pHAHis₈ の保存は困難で、500 mM KCl と 1 mM DTT を添加し、50 % (v/v) グリセロール中で保存しても数日で凝集してしまった。Rot1p は 3 ヶ所の N-結合型糖鎖修飾を受けており(図 4C)、O-結合型糖鎖修飾も受けている可能性がある。Rot1p の安定化には、小胞体での糖鎖修飾が必要なのではないかと考え、小胞体(分泌経路)への発現と精製を試みた。

Rot1p のシグナル配列が切断されるか不明であったため、「Kar2p シグナル配列-His₆-Rot1p(25-231)-HA-HDEL」融合蛋白質(sK-HisR)を *GAL1* プロモーターから発現させた(ガラクトース誘導)。しかし、sK-HisR は発現量が低い上に、過剰の糖鎖修飾を受けていた。Ni-NTA または TALON による精製を行ったが、ほとんど回収できなかった。(この実験を行った際には *TDH3* プロモーターの利用価値を知らず、未検定)

次に、Rot1p C 末端の膜貫通領域を除かず、C 末端に HAHis₈ を融合して *TDH3* プロモーターから過剰発現させた(Rot1p(full)HAHis₈)。すると大部分が細胞質で凝集してしまっていたが、小胞体に輸送された Rot1p(full)HAHis₈ について精製を試みた。界面活性剤を含まない緩衝液中で酵母を破碎し、超遠心(100,000 g, 1 時間)により膜分画を回収、界面活性剤(終濃度 2 %の TritonX-100)を加えて可溶化した。膜分画の回収率は 5~6 割(菌体を凍結融解すると回収率が低下した)、可溶化率は 7~8 割であった。Ni-NTA よりも TALON の方が精製率が高かったため、TALON を用いることにした。しかし、可溶化した膜分画を TALON カラムに添加すると Rot1p(full)HAHis₈ がカラム内で凝集してしまっていた。膜分画を一旦陰イオン交換カラム(Q-Sepharose FF; Amersham)に添加、溶出させると TALON での精製時の凝集は回避できた。ところが、陰イオン交換カラムには Rot1p(full)HAHis₈ の 4 割弱しか結合せず、透析により塩濃度を下げても効果がなかった。次に、Blue sepharose(色素を結合した樹脂; Amersham)を試したところ、結合、溶出(0.5~1 M KCl)ともに良好であった(但し、カラムが飽和しやすい傾向があった)。Blue sepharose と TALON での精製後も純度が低かったため、別の精製法を検討した。Rot1p(full)HAHis₈ は N-結合型修飾を受けていたため、レクチン結合樹脂を試したが良好な結果は得られなかった。ConA-sepharose(Amersham)にはよく結合したが溶出できなかった。Lentil lectin-sepharose(Amersham)には 1 % TritonX-100 と 20 % グリセロールを含む緩衝液を用いるとほとんど結合しなかった。グリセロールを除き、0.5 % CHAPS にすることで結合させることができたが、精製効果はほとんどなかった。次に hydroxyapatite(BioLad)を使用したところ、Rot1p(full)HAHis₈ は 20 mM リン酸緩衝液でも hydroxyapatite にほとんど結合せず、素通り分画を回収することで精製度を高めることができた。最終的に、膜分画を回収、Blue sepharose、TALON、hydroxyapatite(素通り)、TALON で再度精製(回収)という手順で Rot1p(full)HAHis₈ を精製した。しかし、回収量がとても少なく、また精製度も十分とは思われなかった。(以上データは示さない)

組み換え Rot1p の発現と精製

次に、シグナル配列は Rot1p のものを残し、C 末端の疎水性領域を除いて HAHis₈ を結合した Rot1pHAHis₈(以降 recombinant Rot1p, r-Rot1p と称する)を *TDH3* プロモーターから過剰発現させた。sK-HisR を用いた際、恐らくゴルジ

体で行われたと思われる過剰の糖鎖修飾が見られたため、HDEL 配列は用いなかった(小胞体からの輸送が飽和するほど大量に発現させれば、一部は分泌されてもよいと考えた)。また、ベクターには *leu2-d* 変異遺伝子をマーカーに組み込んだ多コピープラスミドを用いた。多コピープラスミドを用いた場合にもコピー数(発現量)にはばらつきがあり、同一クローンであっても培養を続けると変化する傾向があった。*r-Rot1p* 過剰発現は毒性があるため、通常の高コピープラスミドでは安定した発現を行えなかった。*Leu2-d* は *LEU2* 遺伝子の変異アレルで、過剰に発現することで *leu2* を相補できるが、コピー数が低下すると相補できない。選択マーカーに *leu2-d* を用いることで、*R-Rot1p* の過剰発現を安定して行うことができた。

R-Rot1p については、過剰発現時も細胞質での凝集は少なかったが、小胞体内で凝集してしまっていた。しかし、O.D.1.5 以上まで培養を続けると、凝集が顕著に減少した(理由は不明である)。また、還元剤添加により回収率が若干上昇した。一部の *r-Rot1p* は過剰な糖鎖修飾を受けていたが、これらは O.D.1.5 以上まで培養しても凝集したままで、遠心分離により除去できた。変異型 *r-rot1-2p* は *r-Rot1p* よりも過剰な糖鎖修飾を受けたものの割合が高く、また可溶化率が低かった。改善策として、*HAC1i(S238A)* を発現させることで、可溶化率を若干上昇させることができた(以上のデータは示さない)。*Hac1p* は転写因子で、mRNA の *Ire1p* 依存的スプライシングによる活性制御を受けている。UPR の活性化に伴い *HAC1* mRNA 前駆体は活性型(*HAC1i*)に加工され、翻訳された *Hac1p* は各種小胞体シャペロン遺伝子などの転写活性化を行う。*HAC1i* はシングルコピープラスミド上、*HAC1* プロモーターから発現させても大変毒性が高く、ほぼ致死性である。*Hac1p S238A* は何らかの理由により転写活性化能が野生型よりも低い。*HAC1i(S238A)* を用いることで中程度に UPR を活性化することができて、毒性を比較的強く抑えられる(114)。

O.D.1.5~1.8 まで培養した菌体を破砕し、Ni-NTA を用いて精製した。さらにゲル濾過(superdex 75)により単量体 *r-Rot1p*(*r-rot1-2p*)を精製した(図 13A, B)。ほとんどの夾雑蛋白質は排除限界よりやや小さな凝集体を形成しており、ゲル濾過により除去できた。ゲル濾過後、Ni-NTA で再精製、回収した。凝集などを防ぐため、精製に用いた緩衝液は全て高塩濃度で、還元剤と 20%グリセロールを添加した。*R-Rot1p* は 8 l の培養液から 5~6 mg 得られたが、*r-rot1-2p* は 24 l の培養液から 1.3 mg しか得られなかった。*R-Rot1p* の純度はとても高かったが、*r-rot1p* の精製度はやや低かった(図 13C)。ゲル濾過では、*r-Rot1p* と *r-rot1-2p* とも約 40 kDa 程度の蛋白質として分画された。SDS-PAGE では大部分の *r-Rot1p* が約 40 kDa の泳動度を示し、約 38 kDa のものも少量含まれた。EndoH 処理により、これは N-結合型糖鎖の数または修飾の違う *r-Rot1p* であるとわかった(図 13C)。精製した *r-Rot1p* と *r-rot1-2p* は 50%グリセロールを含む緩衝液に透析し、-20~-30 °C で保存した。以下に記す活性は、半年以上損な

われなかった(それ以上は未検定)。

R-Rot1p は二量体化する

精製時の条件(高塩濃度、4 °C)では r-Rot1p は単量体であったが、低塩濃度の緩衝液に希釈して 30 °C で静置するとゆっくりと二量体化した(図 14A)。4 °C で反応させた際には二量体化は見られなかった(データは示さない)。一方、同じ条件で反応させても r-rot1-2p の二量体化は見られなかった(図 14A)。

次に、免疫沈降法により *in vivo* での二量体化を検証した。Rot1p と Rot1p-HA の両方を発現する菌体抽出液に対し、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物を抗 Rot1p 抗体を用いたウェスタンブロットで解析し、Rot1p-HA と共沈降してくる Rot1p を検出しようとしたが、Rot1p-HA と Rot1p の相互作用は確認できなかった(データは示さない)。

Rot1p は Kar2p のヌクレオチド交換因子様補助因子である

既知の Hsp70 補助因子のほとんどは Hsp70 の ATPase サイクルに何らかの影響を与える。R-Rot1p が Kar2p の ATPase 活性制御能を有するか否かを検証した。最初に、通常の ATPase 活性測定を行った。R-Rot1p によって Kar2p の ATPase 活性はわずかに上昇したが(図 15A)、有意差とは考えにくい。Hsp70 の ATPase サイクルは ATP 加水分解が律速段階であるため、NEF 単独では総 ATPase 活性には影響が見られないことが多い。そこで、Kar2p のヌクレオチド交換反応への Rot1p の効果を検討した。実験系の概念図を図 15F に示す。まず、Kar2p と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ の複合体を 4 °C で精製した。Kar2p- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ 複合体を、過剰量の ATP(ラベルされていない)と共に 20 °C で反応させた。一旦 Kar2p から解離した $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ (または、Kar2p によって加水分解された $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ADP}$) は、(過剰の ATP との競合により)再び Kar2p に結合することはほぼ無いと考えられる。Kar2p に結合している $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}/\text{ADP}$ 量を経時的に測定し、Kar2p からの ATP/ADP 解離を観測した。図 15B に示すように、r-Rot1p により Kar2p に結合した ATP 量の減少が加速された。ADP 解離には、r-Rot1p の明確な効果は認められなかった(図 15C)。既知の NEF はすべて、少なくとも ADP の解離を促進する(ほとんどの NEF は ATP の解離も促進する; (19, 24))。そして、J 蛋白質によって ATP 加水分解が促進されている Hsp70 にさらに NEF を加えると、(ADP から ATP への変換促進によって)総 ATPase 活性はさらに数倍上昇することが知られている。しかし、J 蛋白質によって活性化された

Kar2p にさらに Rot1p を加えても、総 ATPase 活性の上昇は見られなかった(図 15A)。

Kar2p に結合した ATP 量減少の原因は (1)ATP が解離した (2)ATP が加水分解された の二つが考えられる。まず、r-Rot1p が Kar2p からの ATP 解離

促進能を持つかどうかを検証するため、ATP 加水分解のできない変異蛋白質 Kar2p T249G を用いて同様の実験を行った。R-Rot1p は Kar2p T249G からの ATP 解離を促進した(図 15D)。従って、r-Rot1p は Kar2p からの ATP 解離促進能を持つことが確認された。次に、Rot1p が Kar2p の ATP 加水分解を促進するかどうかを検証した。Kar2p- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ 複合体を精製し、過剰量の ATP 中で反応させ、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ から $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ADP}$ への変換を測定した。この方法では、反応開始時に Kar2p に結合していた $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ の加水分解のみ、つまり 1 回目の ATP 加水分解のみが検出されるので、加水分解反応の速度のみを観測することができる(図 15F)。R-Rot1p はごく弱くではあるが、Kar2p の ATP 加水分解を促進した(図 15E)。なお、r-rot1-2p 及び r-Rot1p 二量体も同様に作用した(図 15C, D; r-Rot1p 二量体のデータは示さない)。

以上より、Rot1p は Kar2p の NEF 様補助因子であることが示された。

Rot1p はシャペロン活性を持つ

Rot1p は *in vivo* で Kre6p の分子シャペロンとして、Kre6p に一過的に相互作用することがわかった(図 12)。しかし、免疫沈降実験では相互作用が直接的か間接的かは判別できない。また、Rot1p は Kar2p の補助因子として機能することも明らかになった(図 15)。従って、Rot1p は Kar2p を介して間接的に Kre6p に結合していて、Kre6p への効果も間接的であるかもしれない。一方で、Hsp40 や Hip などの Hsp70 補助因子は自身も分子シャペロンとして基質蛋白質に結合し、さらに Hsp70 に結合することが知られている(12, 14, 31)。Hsp40 や Hip が Hsp70 と協力して蛋白質の折り畳みを行う際には、Hsp70 の ATPase 活性制御能に加えて Hsp40, Hip 自身のシャペロン活性も必要である(14, 32)。そこで、Rot1p にシャペロン活性があるか否かを *in vitro* の系で検証した。*In vitro* でのシャペロン活性は変性蛋白質の凝集阻止能を指標に検定される。基質蛋白質をグアニジン塩酸により変性させ、緩衝液中に一気に希釈すると、基質蛋白質は速やかに凝集する。凝集体は光を散乱させるため、吸光度の上昇により凝集度を測定できる。まず、 $\alpha\text{-Mannosidase}(\alpha\text{-Man})$ を基質として用いた。R-Rot1p は変性 $\alpha\text{-Man}$ の凝集を抑制し、Rot1p が基質蛋白質に直接結合する分子シャペロンであることが示された(図 16A)。R-rot1-2p は r-Rot1p より若干劣るものの、やはりシャペロン活性を示した(図 16A)。次に、citrate synthase(CS) を基質として同様にシャペロン活性を測定した。R-Rot1p は CS の凝集を抑制したが、 $\alpha\text{-Man}$ の場合に比べてはるかに効率が悪かった(図 16B)。 $\alpha\text{-Man}$ は液胞の酵素で N-結合型糖鎖を 2 本持つ ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ と $\text{Xyl}_1\text{Man}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$ (115))が、CS はミトコンドリア局在で糖鎖修飾を受けない。そこで、Rot1p が calnexin と同様、N-結合型糖鎖を認識して結合している可能性を検討した。 $\alpha\text{-Man}$ の凝集抑制反応系に、精製した糖鎖 ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) を競合物質として加えたところ、r-Rot1p のシャペロン活性

が若干阻害された(図 16A)。また、EndoH 処理によりコア型糖鎖 (Glc₁Man₉GlcNAc₂)を除去した α -Man を基質に用いた場合、r-Rot1p の凝集抑制効果は低かった(図 16C)。糖鎖のある α -Man と糖鎖除去後 α -Man は変性処理の手順が異なるため図 16A の結果とそのまま比較することは出来ないが、 α -Man からの糖鎖除去が r-Rot1p の効果を減じた可能性が高いと考える。以上より、Rot1p は基質蛋白質の N-結合型糖鎖とポリペプチド鎖の両方を認識して結合する分子シャペロンであることが強く示唆された。

次に、r-Rot1p の二量体化がシャペロン活性に与える影響について検証した。 α -Man を基質とした場合には、単量体 1 分子と二量体 1 分子の比較では二量体の方が優れていたが、r-Rot1p の分子数当たりの比較では単量体の方がやや効果的であった(図 16D)。コア糖鎖を除去した α -Man の場合も同様であった(図 16C)。二量体の場合にも、競合糖鎖によりシャペロン活性が阻害された(図 16D)。一方、CS を基質とした場合には二量体化による顕著な活性上昇がみられた(図 16B)。

4. 議論

総論

本研究では、機能未知の蛋白質 Rot1p が出芽酵母小胞体に局在する新規の分子シャペロンであることを明らかにした。また、Rot1p が Kar2p の ATPase サイクル制御能を持ち、補助因子として共に蛋白質成熟補助を行う可能性が高いことを示した。

Rot1p は小胞体に局在し、内腔側に露出した膜蛋白質であった(図 4)。ROT1 は KAR2 をはじめとした小胞体分子シャペロン遺伝子に加え、ERAD に重要である UBC7 とも遺伝学的相互作用を示した(図 5)。また、rot1-2 変異により UPR の恒常的活性化が起きていると考えられ(図 6A, B)、小胞体量の増加(図 7D)や Kar2p の局所的集合(図 8D)が観察された。これらより、Rot1p は小胞体において蛋白質の成熟(折り畳み・修飾など)そして・または品質管理(異常蛋白質の小胞体保留と ERAD)に寄与していることが強く示唆された。Rot1 変異株では細胞壁の β -1, 6-グルカンに著しい傷害が生じることが報告されており(86, 87)、rot1-2 変異株でも細胞壁の異常を確認した(図 7B, C)。そこで、Rot1p は β -1, 6-グルカン合成に重要な蛋白質の成熟に関与していると推測して Kar5p, Kre6p の成熟を調べたところ、rot1-2 変異株では Kre6p が ERAD により速やかに分解されていた(図 11D,E)。また、Rot1p は Kre6p と一過的に相互作用しており(図 12)、Rot1p が分子シャペロンとして新生 Kre6p に結合し、折り畳みと修飾を補助していることが示された。In vitro の実験でも Rot1p は変性蛋白質の凝集を防ぐシャペロン活性を示した(図 16)ことから、Rot1p は折り畳み中の Kre6p に直接結合すると考えられる。以上より、Rot1p は小胞体局在の新規の分子シャペロンであることが示された。

一方、rot1-2 変異株ではモデル蛋白質 CPY の成熟には異常が見られず(図 9A)、また UPR の活性化も弱かった(図 5A, B)ことから Rot1p は特定の蛋白質の成熟に必要とされていると考えられる。しかし、ROT1 は必須遺伝子であり(図 4B)、rot1-2 変異により細胞壁のみならず液胞の機能も傷害を受けていた(図 8H)こと、そして in vitro で一般的な分子シャペロンとしての活性が検出された(図 16)ことから、Rot1p は(限定的ではあっても)様々な蛋白質の成熟補助に寄与していると考ええる。

Rot1p はシャペロンであるのに加え、Kar2p の補助因子である可能性が高い。Rot1-2 と kar2 の合成致死性は kar2 のアレル特異的で、kar2 の表現型の強さと必ずしも一致しなかった(図 5A)。このことから(酵母遺伝学の過去の例に基づき)、Kar2p と Rot1p が直接結合して重要な機能を果たしている可能性が示唆された。確かに Kar2p と Rot1p は in vivo で複合体を形成しており、複合体量

は小胞体内の異常蛋白質蓄積によって大きく増加した(図 10)。そして、還元した CPY の折り畳みは *kar2-1* や *rot1-2* 単独変異株では(ほとんど)影響を受けなかったが、*kar2-1 rot1-2* 二重変異株では糖鎖修飾と折り畳みに著しい傷害が認められた(図 9C, D)。以上より、Kar2p と Rot1p は蛋白質の折り畳みや修飾において協調していると考えられる。また、精製蛋白質を用いた *in vitro* の実験で、Rot1p が Kar2p に結合した ATP の解離を促進する作用があることがわかった(図 15)。現在広く認められている Hsp70 の作用機序を前提にすると Rot1p の Kar2p 制御活性の生理的意義は不明であるが、Rot1p は Kar2p の補助因子である可能性が高い。

本研究(と将来期待される Rot1p に関する研究)の意義は、Kar2p-Rot1p 系の新規性と、Rot1p の新規性にある。*In vitro* の実験から、Rot1p は基質蛋白質の N-結合型糖鎖とポリペプチド鎖の両方を認識している可能性が示された(図 16)。Hsp70 は伸びた状態のポリペプチド鎖を認識する分子シャペロンであり(2, 4)、Kar2p の機能は基本的に細胞質の Hsp70 とあまり変わらないと考えられる。また、BiP/Kar2p と calnexin/carleticulin は別個の系として機能していると考えられている(54)。Rot1p は糖蛋白質の折り畳みや成熟において Kar2p と協調して働き、Kar2p の小胞体分子シャペロンとしての機能を増強するのではないかと考える。蛋白質の折り畳みや修飾補助における Kar2p と Rot1p の作用機序を解明するためには、Kar2p の ATPase サイクルに対する Rot1p の効果をさらに検証する必要がある。それにより、小胞体内での蛋白質折り畳み機構の新しい一面を示すことができると期待される。Rot1p には既知の蛋白質との一次配列上の相同性が認められないが、(レクチン)シャペロンとして既知の重要な蛋白質(calnexin)と類似した機能をもつ。その一方で、Rot1p は既知の Hsp70 補助因子とは異なる作用を示す可能性がある。高等真核生物の Rot1p 機能的オーソログ探索が望まれることは確かだが、Rot1p の新規性には研究対象として十分な価値があると思われる。

上述のように Rot1p はすべての糖蛋白質の成熟に関与しているわけではない。Kre6p 以外の Rot1p 依存的蛋白質を(網羅的に)同定することで、Rot1p の基質特異性が何に起因するか解明できると期待される。分泌経路の新生蛋白質の一部のみが Kar2p-Rot1p の系に依存して成熟する理由(どのような特性を持った蛋白質が Rot1p を必要とするのか?)、そして Kar2p-Rot1p 系の作用機序を明らかにできれば、酵母小胞体内腔での蛋白質成熟機構の理解のみならず、細胞内での蛋白質成熟機構の理解に貢献できるであろう。

各論

kar2-1 合成致死変異株のスクリーニングについて

スクリーニング系は機能していたが、得られた変異株は少なく飽和にはほど遠かった。2 クローン以上得られた変異遺伝子は *kre6* のみであり、*sec63* など *kar2-1* と合成致死性を示すことが知られている遺伝子の変異株が得られなかったためである。スクリーニングは全て合成培地上で行ったが、変異導入後は生育の悪いクローンが数多く出現し、多くを死滅させてしまい回収に失敗した。2 次スクリーニングで完全培地にストリークすることにより、結果的には 3 次以降での手間を省き、また回収クローン数も大幅に増やすことができるはずである。

2 クローンの *kre6* 変異株、そのホモログの *skn1* 変異株も *kar2-1* 合成致死変異株として同定された。 $\Delta kre6 \Delta skn$ 二重変異は致死ではない。Kre5p など、Kre6p 以外の β -1,6-グルカン合成に重要な蛋白質の成熟が *kar2-1* 株では傷害を受けているのかもしれない。*KRE6 \Delta skn1* 株は酵母の生育にも β -1,6-グルカン量にも影響がないことが知られている(113)。*kar2-1 skn1* 株が合成致死性を示す理由として、*kar2-1* 株では Kre6p の成熟にも影響が出ている可能性が挙げられる。Kre6p は Rot1p に依存して成熟するため(図 11D-F)、Kar2p と Rot1p が協調して Kre6p の成熟補助を行っている可能性が示唆される。

Rot1p の基本的性状について

Rot1p は 1 回膜貫通の I 型膜蛋白質であることがわかった(図 4A, C, D)が、細胞質ドメインを持たない特異な形態をしている。GPI アンカー蛋白質は同様の形態をしているが、Rot1p は GPI アンカー化されないと考える。Rot1p の C 末端に HA タグを融合した場合、Rot1p-HA は機能的であり(図 4B)、存在量は Rot1p と同程度で(データは示さない)、HA タグに対するウェスタンブロッティングで容易に検出できた(図 10)。また、Rot1p の分子量が変化し(GPI アンカー化によって 2kDa ほど分子量が大きくなる)細胞膜に局在するような現象は観察されなかった。Cnelp(出芽酵母 calnexin オーソログ)も同様に膜貫通領域の C 末端側に細胞質ドメインを持たないが、やはり小胞体に局在することが示されている(116)。また、GPI アンカー蛋白質の膜貫通領域に変異を導入して十分な疎水性を持たせれば、GPI アンカー化が起こらずに膜貫通領域がそのまま機能するという報告もある(117)。

sRot1p の解析により、Rot1p の小胞体局在機構に関する手がかりが得られるかもしれない。スクロース密度勾配遠心での sRot1p の分布を見ると、 $+Mg^{2+}$ の実験では小胞体と、やや低密度の膜分画、そして最も軽い細胞質分画に広く分布していた(図 1E)。同じ方法を用いている論文によると、小胞体よりやや低密度の膜分画はゴルジ体(または液胞)にあたる(118)。いずれにせよ、sRot1p

の少なくとも一部は小胞体を出ていることは確かである。便宜上、SDS-PAGEで確認された2本のバンドを sRot1p と総称したが、それらは異なる性質を持つと思われる。片方は N-結合型糖鎖が1本少ない Rot1p(sRot1p-a; Rot1p は糖鎖3本、sRot1p-a は2本)であると推定したが、糖鎖修飾の違いが局在化に影響するのかもしれない。4ヶ所ある N-結合型糖鎖修飾部位の内、最も C 末端側のもの(N229)は膜貫通領域(233-255)のすぐ近傍であるため修飾されず、Rot1p 中央の3ヶ所が修飾されると予想される。しかし、N 末端側の2ヶ所(N103, N107)は近接しているため、片方の修飾効率が悪いのかもしれない。sRot1p のもう片方(sRot1p-b)は、EndoH 処理によって糖鎖を除去すると Rot1p よりも約 5kDa も小さかった(図 1D)。s-Rot1p-b は O-結合型糖鎖修飾が Rot1p, sRot1p-a よりも少ない(但し、Rot1p の O-結合型糖鎖修飾は確認していない)か、C 末端付近でプロテアーゼによる切断を受けているのかもしれない。また、N-結合型糖鎖は通常約 2kDa 分子量を増加させるが、sRot1p-b の EndoH 処理では約 11kDa もの分子量減少が観察された。可能性としては、(1)sRot1p-b は4ヶ所全てで糖鎖修飾を受けている (2)sRot1p-b の糖鎖はゴルジ体で伸長を受けている という2点が考えられる(両方もあり得る)。sRot1p の機能についてのデータは現在全く得られていないが、小胞体以外の場所でも(そして・または 目的の地までの輸送中も)シャペロンとして機能しているのかもしれない。また、sRot1p-b が C 末端付近で切断を受けた Rot1p であるならば、sRot1p-b は可溶性 Rot1p として機能しているのかもしれない。高等真核生物には calnexin の可溶性ホモログ calreticulin が存在し、それぞれ役割を分担して協調している。なぜ *rot1-2* 変異株では *srot1-2p* が見られないのかはわからないが、sRot1p の生産は Rot1p 自身の機能(二量体化?)に依存、制御されている可能性がある。

ROT1 と小胞体品質管理関連遺伝子の遺伝学的相互作用について

Rot1p は calnexin と同様に糖蛋白質の成熟を補助することが示唆され(図 16)、*ROT1* と *CNE1*(calnexin オートログ)は遺伝学的に相互作用していた(図 5A,B)。Cne1p には *in vitro* でのシャペロン活性が確認されている(91)。Rot1p と Cne1p は重複した機能を持つと推定するが、Rot1p には Cne1p にはない機能があることも事実であろう。まず、*ROT1* は必須遺伝子であるが、*CNE1* は破壊してもほとんど表現型がでない。また、*CNE1* 過剰発現によって *rot1-2* 株の増殖遅延は緩和されるものの制限温度での効果はなく(図 5C)、*kar2-1 rot1-2* の合成致死性の抑圧もできない(データは示さない)。Rot1p 自身がシャペロンであるだけでなく、Kar2p と協調して機能することが重要なのであろうと思われる。

ROT1 は *SCJ1*(Hsp40)とも遺伝学的相互作用を示した(図 5A, B)。Rot1p は Kar2p に対してヌクレオチド交換因子様の活性を示したものの、J 蛋白質との協調はみられなかった(図 15)。次に述べる *LHS1*, *SIL1* との関係からも、Rot1p は既知のヌクレオチド交換因子とは違った性質を持った補助因子なのではな

いかと考える。Kar2p-Scj1p 系と Kar2p-Rot1p 系は別個に働いていて、ある程度重複した機能を持っているのだろうと推測する。

LHS1 の過剰発現により *rot1-2* 株は制限温度下でも生育可能であった(図 5B)。そのため、Rot1p と Lhs1p の機能はかなり近いと予想されたが、*LHS1* 過剰発現では $\Delta rot1$ を相補できなかつた(データは示さない)ため、Rot1p と Lhs1p の機能重複はやはり部分的であろうと思われる。また、*rot1-2* 株でさらに *rot1-2* を過剰発現しても生育改善効果はないが、 $\Delta lhs1 rot1-2$ 株で *rot1-2* を過剰発現すると生育が回復し、制限温度下でも生育可能になった(データは示さない)。従って、Lhs1p と Rot1p は重複した機能を持つ一方で競合的でもあるのではないかと考える。Lhs1p は Kar2p のヌクレオチド交換因子であり(25)、Rot1p と Lhs1p が Kar2p に対して競合する可能性もある。しかし、Lhs1p 同様 Kar2p のヌクレオチド交換因子である Sil1p をコードする *SIL1* と *ROT1* の間には遺伝学的相互作用が確認できなかつた。Lhs1p と Sil1p はいずれも新生蛋白質の translocation に重要であり(22, 30)、*LHS1* と *SIL1* の間には強い遺伝学的相互作用が示されている ($\Delta lhs1 \Delta sil1$ は致死; (30))。一方、*rot1-2* 変異株では translocation の傷害は確認できず、また *ROT1* の過剰発現により $\Delta lhs1$ の translocation 傷害は相補できなかつた(データは示さない)。これらのことと *in vitro* での結果を合わせて考え、Rot1p は既知のヌクレオチド交換因子とは異なると考える。Lhs1p は Hsp70 の近縁蛋白質である Hsp110 ファミリーに属し、シャペロン活性を持つと考えられている(96, 119)。Lhs1p がシャペロンとして蛋白質の折り畳みに関与するとき、Rot1p との機能重複と競合が生じるのかもしれない。

ROT1 は ERAD における重要因子 *UBC7* とも遺伝学的相互作用を示した。高温では、 $\Delta ubc7$ によって *rot1-2* 変異が若干抑圧された。 $\Delta ubc7$ 株では ERAD が著しい傷害を受ける。ERAD の抑制によって、折り畳み不全の蛋白質の一部が小胞体から輸送されてしまう例が報告されている(120, 121)。そして、流出した蛋白質が最終目的地に到達し、少なくとも部分的に機能を発揮することがある(120)。*Rot1-2* $\Delta ubc7$ 株でも同様のことが起きているのかもしれない。*Rot-2* 株と *rot1-2* $\Delta ubc7$ 株での HA-Kre6p 局在の比較などによる検証が望まれる。

ROT1 は *IRE1* とも遺伝学的相互作用を示し、*Aire1* と *IRE1* 過剰発現の双方で *rot1-2* 株の生育がある程度改善した(許容温度での部分的生育回復; データは示さない)。UPR によって ERAD の活性化が起こるが、*Aire1* 株ではそれが起こらないため(122)、 $\Delta ubc7$ と同様の効果により生育が改善すると思われる。逆に *IRE1* 過剰発現によって UPR が活性化された際には、*KAR2*, *SCJ1* や *LHS1* の転写活性化がなされるので、こちらでも *rot1-2* 株の生育改善が見られるのだろう。ただし、*Aire1* ではシャペロン群の転写活性化が起こらず、*IRE1* 過剰発現では ERAD の活性化が起こる。いずれの場合も効果を相殺する現象が

起こるため、生育改善効果が弱いと考えられる。

rot1-2 株の顕微鏡観察について

37°Cで培養した *rot1-2* 株では Kar2p 及び rot1-2p の集合体が観察された(図 8B, D)。ERAD そして/または O-結合型糖鎖結合に傷害を受けた変異株に折り畳み不能な分泌蛋白質を(やや多く)発現させた際、Kar2p と異常蛋白質について同様の局在が観察されており、異常蛋白質が凝集していると考えられている((104); O-結合型糖鎖修飾は異常蛋白質の凝集を抑制する効果がある)。Rot1-2 変異株でも、成熟に失敗したポリペプチド鎖が凝集している可能性がある。しかし、Kre5p-HA や HA-Kre6p については凝集は確認されなかった(データは示さない)。Kre5p や Kre6p 以外にも凝集しやすい Rot1p 依存的蛋白質があり、その総量(種類と個々の発現量)は少なくはないと考えられる。

Rot1-2 変異株では、autophagic body の蓄積も観察された(図 8F, H)。β-1,6-グルカン合成についてと同じく、*rot1-2* 変異によって autophagic body 消化に必要な蛋白質が成熟できなくなっていると考えられる。現在までに知られている Autophagic body 消化関連蛋白質は、液胞の Proteinase A(PrA)と PrB、そして Atg15p と Atg22p(それぞれリパーゼとプロテアーゼであると推定される膜蛋白質)である。PrB については 37°Cで 6 時間培養した *rot1-2* 変異株でも成熟型の存在を確認した(むしろ *ROT1* 株より多い; データは示さない)。PrA は PrB 及び PrC(CPY)の成熟に必要であるので PrA も *rot1-2* 変異による影響を受けないと考えられる。従って、Atg15p と Atg22p は、Kre6p 以外の Rot1p 依存性蛋白質の有力候補であり、*rot1-2* 株での解析が待たれる。

kar2-1 rot1-2 二重変異株での CPY の成熟不全について

Kar2-1 rot1-2 二重変異株では、CPY の糖鎖修飾と折り畳みの両方に異常が見られた(図 9B, D)。また、*kar2-1* 変異株でもわずかながら糖鎖修飾不全が認められた。*kar2-1* はペプチド結合領域の変異であり、基質蛋白質への結合に問題を生じていると考えられる(13, 72)。Rot1p は変異 *kar2-1p* の基質(還元型 CPY)への結合を補助していると推測する。*Rot1-2* 変異単独では(還元型)CPY の成熟には異常はみられず(図 9A,C)、*KAR2* 株では Rot1p は(還元型)CPY の成熟には関与していないと考えられる。しかし *kar2-1* 株では、還元型 CPY は Rot1p 依存的に成熟した。Rot1p は通常、一部の蛋白質の成熟にのみ関与していると思われるが、Rot1p は普遍的シャペロン(そして/または Kar2p 補助因子)であり(図 16)、広範な蛋白質の成熟を補助する潜在能力を持つ。異常発生時にはそれを発揮して小胞体内の環境維持・改善に貢献するのだろう。

また、Kar2p の ATPase ドメイン変異株である *kar2-113* と *kar2-159* でも *kar2-1 rot1-2* 二重変異株同様の表現型(還元型 CPY の成熟異常)が観察された(データは示さない)。*kar2-113p* 及び *kar2-159p* は基質に対して結合したまま解離に問

題を生じていることが知られている(17, 72)。基質に対して Kar2p が円滑に結合解離することが折り畳み補助に重要なのであろう。Kar2-1 rot1-2 株においても、Kar2-1p または rot1-2p が還元型 CPY に結合したままになってしまっている可能性もある。

kar2 変異など、シャペロン遺伝子の変異によって N-結合型糖鎖修飾に影響がでることは今まで報告されていなかった。蛋白質の折り畳みと N-結合型糖鎖修飾は同時並行で起こり、時に競合することが示されている(107)。DTT 添加時、CPY は折り畳みが完了しないため Kar2p と結合している状態が続くと考えられる。ここで、Kar2p の結合に問題があると(kar2-1 株)CPY は凝集して糖鎖修飾の対象とはならず、逆に Kar2p が解離しにくい場合(kar2-113/159 株)には結合した Kar2p が糖鎖修飾を妨げてしまうのではないかと推測している。CPY に付加される糖鎖数が 0, 3, 4 のいずれかであり、2, 3 本の修飾が起らない理由は不明である。Oligosaccharide transferase など糖鎖修飾機構の変異によって糖鎖数にばらつきが生じる場合では 2, 3, 4 本など連続した差であり(98)、0 と 3 などの非連続な差が生じる例は(筆者の知る限り)報告されていない。4 本の糖鎖の内 1 本のみ (N 末端側から 2 本目) が CPY の表面に露出せず、CPY の迅速な折り畳みに一定の役割を果たしていることが知られている(123)。蛋白の内側に折り畳まれる部分は疎水性が高いと予想され、Kar2p(または Rot1p)の結合解離不全の影響を受けやすく、後の 3 本は蛋白質表面にあって等価なのではないかと思われる。

Kar2p と Rot1p-HA の複合体形成について

小胞体内に異常蛋白質の蓄積を誘起する薬剤(Tm と DTT)処理により、Kar2p と Rot1p-HA の複合体量が大きく増加した(図 10)。Kar2p と Rot1p が共に異常蛋白質に結合するためであると解釈しているが、新生 Rot1p が折り畳みに失敗して Kar2p に認識されている可能性も否定できない。R-Rot1p 精製の際には小胞体への移行が必要だったことから、糖鎖修飾やジスルフィド結合形成が Rot1p の成熟に必要な可能性は高い。Rot1p には Cys が 3 残基あるが(C24, C90, C127)、C24 はシグナル配列切断部位直前であり、C90S C127S 二重変異は増殖に影響しなかった(データは示さない)ため、DTT により Rot1p の構造に異常が生じることはないと推測する。従って、少なくとも DTT 処理時の Kar2p-Rot1p-HA 複合体量増加は Rot1p が基質として Kar2p に認識されたためではないと考えられる。

Kre5p-HA の Rot1p 依存性について

Rot1-2 株を 23 °C で培養した際、その後 37 °C で 10 分培養した際には

Kre5p-HA の存在量や安定性に問題は見られなかった(図 11B, C)。しかし変異株を 30 °C で継続的に(前培養からの意; 1 日以上)培養した場合には、Kre5p-HA 量は *ROT1* 株の 20 %程度にまで減少していた(図 11B)。従って、*rot1-2* 変異によって Kre5p の成熟は大きな傷害を受け、それが *rot1-2* 株での β -1, 6-グルカン合成不全の最大の要因であると考えられるものの、Kre5p 成熟への Rot1p の関与は間接的であるかもしれない。Rot1p と Kre5p-HA の結合を HA-Kre6p の場合と同様の手法で検証したが、結合は確認できなかった(データは示さない)。Kre5p は 1365 アミノ酸残基からなる大きな蛋白質で、Kre5p-HA では HA タグは C 末端に融合してある。Rot1p が合成中(折り畳み中)の Kre5p-HA にのみ結合しているために、結合が検出できない可能性もある。また、*Rot1-2* 変異株において、23 °C では(必要量)成熟できるが 30 °C では成熟できない(足りない)蛋白質が Kre5p の成熟に必要とされているのではないかと推測する。そのような蛋白質が Rot1p と協力して Kre5p の成熟を補助している可能性もある。パルス-チェイス実験においては Kre5p-HA の糖鎖修飾不全が観察された(図 11C)が、ウェスタンブロットでは確認できなかった(図 11B)。同様の現象は HA-Kre6p についても観察された(図 11D, E)。この違いは、実験条件によると考えている。パルス-チェイス実験では 23 °C で培養した菌体を 37 °C で 10 分培養してからラベルを行っている。ウェスタンブロットでは、菌体を 23 °C または 30 °C で継続的に培養するか、23 °C から 37 °C に移して 2 時間培養している。一方、図 12 に示すように、23 °C から 37 °C に移して 10 分培養した場合にはウェスタンブロットでも HA-Kre6p の糖鎖修飾不全を確認した。従って、Kre5p-HA と HA-Kre6p の *rot1-2* 株での糖鎖修飾不全は 23 °C から 37 °C への温度変化に伴う一過的なものであると考えられる。そして、Kre5p-HA も HA-Kre6p と同様に温度変化直後の影響を受けているため、Rot1p が Kre5p の成熟に直接関与している可能性があると考ええる。

HA-Kre6p の成熟について

HA-Kre6p には 3 つの分子種(A, B, C)が存在していた(図 11D)。*ROT1* 株では B form が主であったが、培養条件の微妙な違いにより 3 種の量比が変化する傾向があった(特に、定常期では C form が増加した; データは示さない)。スクロース密度勾配遠心により HA-Kre6p の局在を調べたところ、A, B form は主にゴルジ体(と考えられる)分画に検出されたが、小胞体分画にも検出された(データは示さない)。また、A, B form の分布は一致していた。そのため、A form から B form への変換は小胞体内腔で起こると推定する。A, B form の違いが N-結合型糖鎖修飾ではないことがわかった(図 11D)が、それが何かはわからない。*Rot1-2* 株では B form への変換効率が悪く、温度シフトに応じてさらに悪化することから、Rot1p はこの過程に直接関与していると考ええる。O-結合型糖鎖修飾が候補として挙げられる。また、C form は細胞膜分画に存在するという

予備的結果を得ている(データは示さない)が、今後の検討が必要である。

Rot-2 Δubc7 株では HA-Kre6p の分解が抑制され、HA-Kre6p 分解が ERAD によることがわかった。しかし、他の ERAD 基質(*in vivo* では既知のもの全て)については *Δubc7* によってより顕著な安定化が報告されている(100)。HA-Kre6p の一部は小胞体を出て液胞で分解されている可能性もある(121)が、既知の ERAD 経路とは若干異なる経路が存在するのかもしれない。HA タグを C 末端に結合した Kre6p-HA は *ROT1* 株においても速やかに分解されてしまい(半減期約 18 分; *rot1-2* 株では約 14 分; データは示さない)、B form への変換はみられなかった。Kre6p は 1 回膜貫通の II 型膜蛋白質で、HA タグの付加により小胞体内腔側での折り畳みや修飾が阻害されてしまったのだろう。Kre6p-HA の分解は *ROT1*, *rot1-2* いずれの場合も *Δubc7* による変化がみられなかったが、MG132 によるプロテアソーム阻害によって抑制されたため ERAD 依存的に(しかし Ubc7p 非依存的に)分解されると考えられる。HA-Kre6p についても、一部は *Δubc7* 非依存的 ERAD により分解されているのかもしれない。

Rot1p と HA-Kre6p の結合について

Rot1p は(恐らく合成直後の)HA-Kre6p と一過的に複合体を形成した(図 12)。DSP を用いずに非変性条件下で免疫沈降を行った際にも結合を確認できたので、Rot1p と HA-Kre6p の結合は不安定ではないと考えられる(データは示さない)。HA-Kre6p の結合量は、Rot1p に対してよりも *rot1-2p* に対しての方がかなり多かった(図 12)。HA-Kre6p が折り畳みを完了できずに小胞体にとどまっているために *rot1-2p* と結合する機会が増えていると考えられるが、*rot1-2p* は Rot1p よりも HA-Kre6p から解離しにくいという可能性もある。また、*In vitro* の実験では、*r-Rot1p* と *r-rot1-2p* の変性蛋白質凝集抑制活性には大きな差はみられなかった(図 16A)。*Rot1-2p* は基質蛋白質への結合は Rot1p とほぼ同様に行えるものの、Kre6p などの成熟補助にはそれだけでは十分でなく、その後の過程に問題があると推測する。上述したように、Rot1p と Cne1p の違いが Kar2p と協調する能力にあり、Rot1p が Kar2p と共に蛋白質成熟補助を行うのであれば、*rot1-2p* は Kar2p と円滑に協力できないのかもしれない。Rot1p と HA-Kre6p の結合を検証する実験では、DSP と同時にアジ化ナトリウムを添加して細胞内 ATP を枯渇させている。アジ化ナトリウムを添加せずに DSP 処理すると、検出される Rot1p-HA-Kre6p 複合体量が大幅に減少した(データは示さない)。このことより、ATP 枯渇によって Rot1p-基質複合体が安定化されると考えている。Kar2p は ATP 結合型の状態で基質に結合し、ATP 加水分解によって結合を安定化する。Rot1p は基質に結合した状態で Kar2p-ATP と結合し、基質を Kar2p に受け渡すのかもしれない。Hsp70 と Hsp40 が協力して蛋白質折り畳みを行う際には、Hsp40 の二量体化が必要である(124)。Rot1p も二量体化する可能性があり、*r-rot1-2p* の明確な機能損傷は二量体化がみられな

いことであった(図 14)。Rot1-2p は基質に結合したものの二量体化できないために Kar2p への基質受け渡しが円滑に行えないのかもしれない。In vitro の実験による Rot1p の Kar2p 制御機序の解明に加え、in vivo での Rot1p の二量体化や、HA-Kre6p と Kar2p の関係の検証を行うことが必要である。

CHX 添加時、rot1-2p 量が急速に減少することがわかった(図 12)。Rot1-2p に構造異常があつて ERAD により分解されている可能性は否定できない。しかし、r-rot1-2p は変性蛋白質の凝集を抑制できた(折り畳み不全の蛋白質をそのような実験を用いると一緒に凝集してしまう)。また、小胞体内腔側に異常がある蛋白質の半減期は概して 20 分以上であり(100)、rot1-2p の分解はそれよりも速いと思われる。一方、細胞質側に変異を持つ膜蛋白質の ERAD はずっと速い(100)。この差は、内腔側の変異蛋白質が何故か一旦ゴルジ体に送られ、小胞体に戻ってきた後に分解されるために生じていると考えられている。つまり、rot1-2p はゴルジ体への輸送なしに即分解されているように見える。Kre6p-HA や HA-Kre6p の分解が既知の ERAD 経路とは一部異なる経路による可能性があることも合わせ、Rot1p は ERAD 系と何らかの関係があるのかもしれない。Calnexin は EDEM と相互作用することが知られており、蛋白質の折り畳みを補助する一方で異常蛋白質を小胞体にとどめ、ERAD 系に受け渡す役割も果たしている(45, 125, 126)。Rot1p も同様に機能している可能性がある。その際、rot1-2p は基質解離が円滑に行えないなどの機能欠損により、一緒に分解されてしまっているのかもしれない。Rot1p と ERAD 系を構成する蛋白質(Mnl1p/EDEM や Der1p など; Der1p は小胞体膜蛋白質で、E2/E3 複合体をはじめ様々な ERAD 系構成因子が結合することが知られている(127))との関係や、Rot1p と基質の(過剰な)結合による ERAD 誘起などの検証が望まれる。

Rot1p の二量体化について

R-Rot1p は二量体を形成したが、完了には 3 時間以上かかり、異常な反応である。しかし、12 時間以上 30°C で静置してもより大きな複合体や凝集などは認められなかったことと、r-rot1-2p では二量体化が見られなかったことから、この反応は特異的であり Rot1p の本来の機能を反映したものであると考える。恐らく、in vivo では他の蛋白質(そして/または小分子)の結合などにより二量体化が促進されるのではないかと推測する。膜貫通領域が二量体化に貢献する可能性もある。しかし、in vivo での Rot1p の二量体化は免疫沈降法では検出できなかった。DSP を使っても効果がなかったが、in vitro で r-Rot1p 二量体を DSP 処理してもほとんどクロスリンクされなかった(データは示さない)ため、別の原理によるクロスリンカーを使う必要があると思われる。

Rot1p による Kar2p の ATPase サイクル制御について

R-Rot1p は Kar2p に結合した ATP の解離を促進したが、ADP にはほとんど

ど効果が見られなかった(図 15B-D)。反応液中に生理的濃度の無機リン酸(20 mM)を添加すると Hsp70 からの ADP 解離が遅くなり、NEF の効果をより鮮明に示すことが出来るという報告がある(19)。本研究では反応系に無機リン酸を含めずに実験したために、Rot1p の ADP 解離への効果を捕らえ損ねた可能性がある。しかし、既知の NEF は無機リン酸非存在下でも ADP 解離促進効果を示している(21, 25)。また、J 蛋白質によって ATP 加水分解が促進されている Hsp70 に NEF を加えると、ATPase 活性はさらに数倍上昇することが知られているが、Kar2p に J 蛋白質と r-Rot1p を加えても総 ATPase 活性の上昇は見られなかった(図 15A)。従って、Rot1p の NEF 様活性は本当に ATP 特異的なものかもしれない。しかし、Rot1p が ATP 特異的 NEF であると考えれば矛盾が生じてしまう。Rot1p は Kar2p の ATPase 活性を(見かけ上)低下させると予想されるが、Kar2p の総 ATPase 活性、ATP 加水分解速度(single turnover)はともにわずかに上昇していた(図 15A, E)。Rot1p は Kar2p による ATP 加水分解を促進する能力と、ATP 解離を促進する能力を併せ持つと仮定すれば、上記の実験結果は説明可能である。その場合、ATP 加水分解促進能は、ATP 解離促進が同時に起こってしまうことによって低く見積もられてしまっていると思われる。二つの相反する機能を同時に持つ意味はあるのだろうか？。ATP 解離促進能は、ATP 結合阻止能と言い換えられるかもしれない。Hsp70 は ADP 結合型で基質に安定に結合するが、ADP の解離によって基質の解離は起こらず、ATP の結合が基質の解離を誘起する(7)。Rot1p は Kar2p の ATPase 加水分解を促進して基質蛋白質に結合させ、(ADP の解離を促進し?)ADP 解離後に ATP が結合するのを阻害することで、Kar2p-基質複合体を安定化することかもしれない。Hip は Hsp70 からの ADP 解離を抑制し、Hsp70-基質蛋白質複合体を安定化することで基質蛋白質の折り畳み効率を上昇させることが知られている(31)。上記の仮説は Rot1p のとても微弱な活性をもとに組み立てたものであり、本研究では Rot1p の本来の活性を示し得なかった可能性が高い。In vitro での pull down 実験では Kar2p と r-Rot1p(r-rot1-2p)の結合を確認できなかった(データは示さない)。R-Rot1p は Kar2p からの ATP 解離を促進したので、Kar2p と Rot1p は直接相互作用しているはずであるが、親和性がとても低いと考えられる。本研究の実験条件下では Kar2p にしっかり結合できないため、Rot1p は本来の活性を発揮できていない可能性がある。基質蛋白質に Kar2p と Rot1p の双方が結合することで Kar2p と Rot1p の結合が強まるかもしれない。ATPase 活性測定系にグアニジン塩酸で変性した α -Man を加える実験を行ったが、Kar2p がグアニジン塩酸により(ごく低濃度であっても)失活してしまう等の理由により測定できなかった(データは示さない)。また、Rot1p は他の蛋白質と共に Kar2p の制御を行っている可能性もある。その候補蛋白質、Big1p は機能未知の小胞体局在膜蛋白質であり、 $\Delta big1$ は β -1,6-グルカン合成と生育(致死またはほぼ致死)に著しい傷害を与える(86, 111)。BIG1 の過剰発現により rot1-2

株は 37°Cでも生育可能であった(データは示さない)。Big1p の機能解析が Rot1p の Kar2p 補助因子としての機能解明に必要なかもしれない。

Rot1p のシャペロン活性について

R-Rot1p は変性蛋白質の凝集を防ぐシャペロン活性を示した(図 16)。R-Rot1p は N-結合型糖鎖を持つ α -Man に対して高い効果を示す一方で、糖鎖のない CS や糖鎖を除去した α -Man に対しては比較的效果が低く、また糖鎖の添加による競合阻害が確認された。以上より、Rot1p は N-結合型糖鎖とポリペプチド鎖の両方を認識するレクチンシャペロンであると考えられる。N-結合型糖鎖は $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2(\text{G}_3\text{M}_9)$ が付加された後に小胞体で M_8 までの切断を受ける(図 3)。哺乳類細胞の Calnexin/calreticulin が認識するのは G_1M_9 であり、 M_8 を持ち折り畳みの完了していないポリペプチド鎖は ERAD により分解される。Rot1p の機能を解明する上で、Rot1p が本当に糖鎖を認識するのか、認識するならばどの形の糖鎖を好むのか、*in vivo* と *in vitro* の両方で検証する必要がある。それにより、Rot1p が新生蛋白質の折り畳み(及び ERAD)過程のどこで(いつ)機能するのかという疑問に、ある程度の解答が与えられるはずである。*In vivo* での検証には、糖鎖修飾(切断)関連遺伝子を破壊した変異株を用いることが考えられる。例えば Δgls2 株では G_2M_9 からグルコース 2 残基を切断する glucosidase II が失われるので、糖鎖は G_2M_9 のままで切断は進行しない。このように、様々な変異株を用いることで糖鎖の状態を制御してその影響を観察できる(128)。HA-Kre6p は Rot1p 依存的蛋白質であるので、各種変異株での HA-Kre6p の成熟や、Rot1p との結合を検証することで Rot1p の糖鎖認識についての知見が得られるはずである。それと同時に、*in vitro* での r-Rot1p のレクチン活性測定が望まれる。

R-Rot1p の二量体化によってシャペロン活性に若干の変化がみられた(図 16B-D)。1 分子当たりの比較では、単量体よりも二量体の方が高い活性を示し、基質蛋白質への結合能力が上昇した可能性を示唆している。特に、CS に対する効果は大きく上昇したが、糖鎖を除去した α -Man への効果は大きくなかった。また、糖鎖添加による競合阻害効果は単量体と同様に確認されたため、二量体化によって糖鎖への依存性が低くなったとは現時点では判断できない。様々な基質に対して r-Rot1p のシャペロン活性及び二量体化の効果を調べることが望まれる。

5. 図表

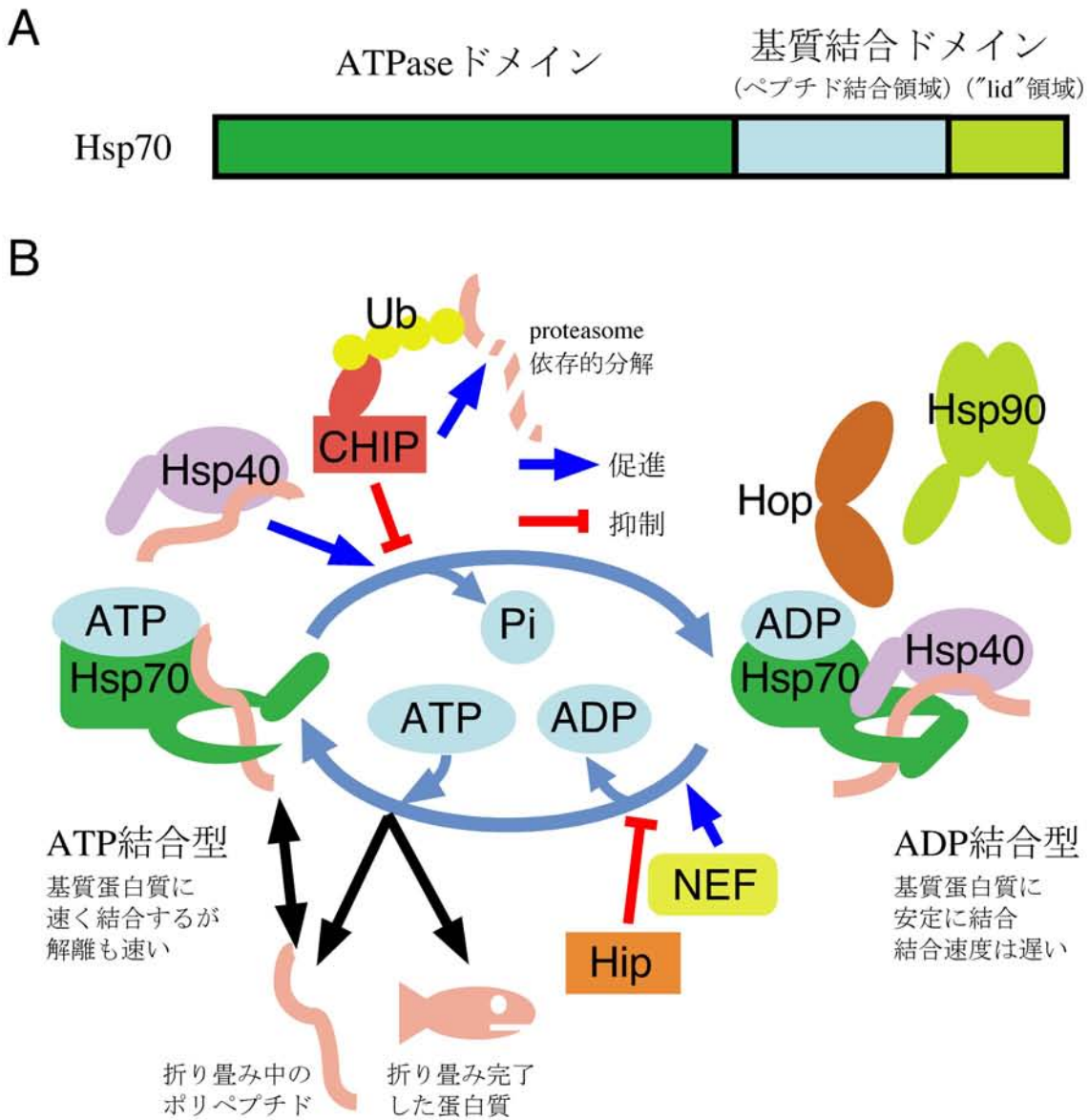


図1 Hsp70と補助因子群 (A)Hsp70のドメイン構造模式図。N末端側約44kDaがATPaseドメイン、C末端側約28kDaが基質結合ドメイン。基質結合ドメインは、約18kDaのペプチド結合領域と約10kDaの"lid"領域に分けられる。(B)Hsp70のATPaseサイクルと、補助因子群による制御。Hsp70はATP加水分解を伴って基質ポリペプチドに結合解離を繰り返す。補助因子群の多くはHsp70のATPaseサイクルを制御することで基質蛋白質への作用を制御する。HopはHsp70とHsp90の両方に結合し、両者の協調を仲介する。NEF, nucleotide exchange factor, Ub; (poly)ubiquitin.

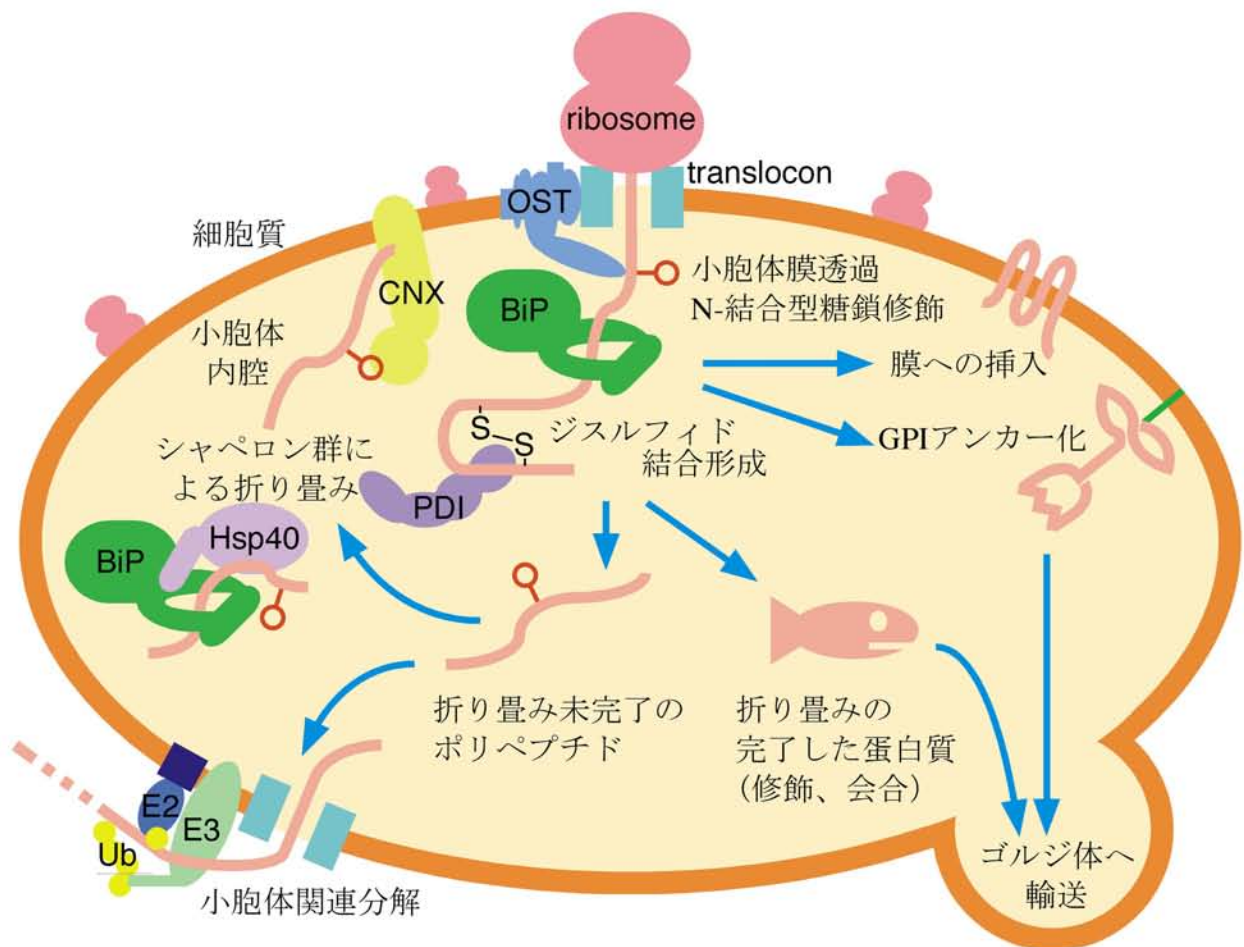


図2 小胞体内腔での蛋白質成熟過程 リボソームで合成された新生ポリペプチド鎖は蛋白質複合体からなる透過孔(translocon)を通過して小胞体内腔に入る。新生蛋白質はN-結合型糖鎖修飾、O-結合型糖鎖修飾、ジスルフィド結合形成などの修飾を適宜受ける。膜蛋白質は小胞体膜に挿入され、GPIアンカー蛋白質はGPIに結合される。小胞体内在性Hsp70、BiPは新生ポリペプチド鎖の膜透過及び折り畳みを補助する。PDIはジスルフィド結合形成と組み換えを行い、calnexin(CNX)は糖蛋白質の折り畳みに寄与する。折り畳みと修飾(場合によっては会合)の完了した蛋白質はゴルジ体へと輸送される。成熟に失敗したポリペプチド鎖は細胞質に逆輸送され、小胞体膜上のE2/E3複合体によりポリユビキチン(Ub)化を受け、プロテアソーム依存的に分解される(小胞体関連分解, ERAD)。OST; oligosaccharide transferase.

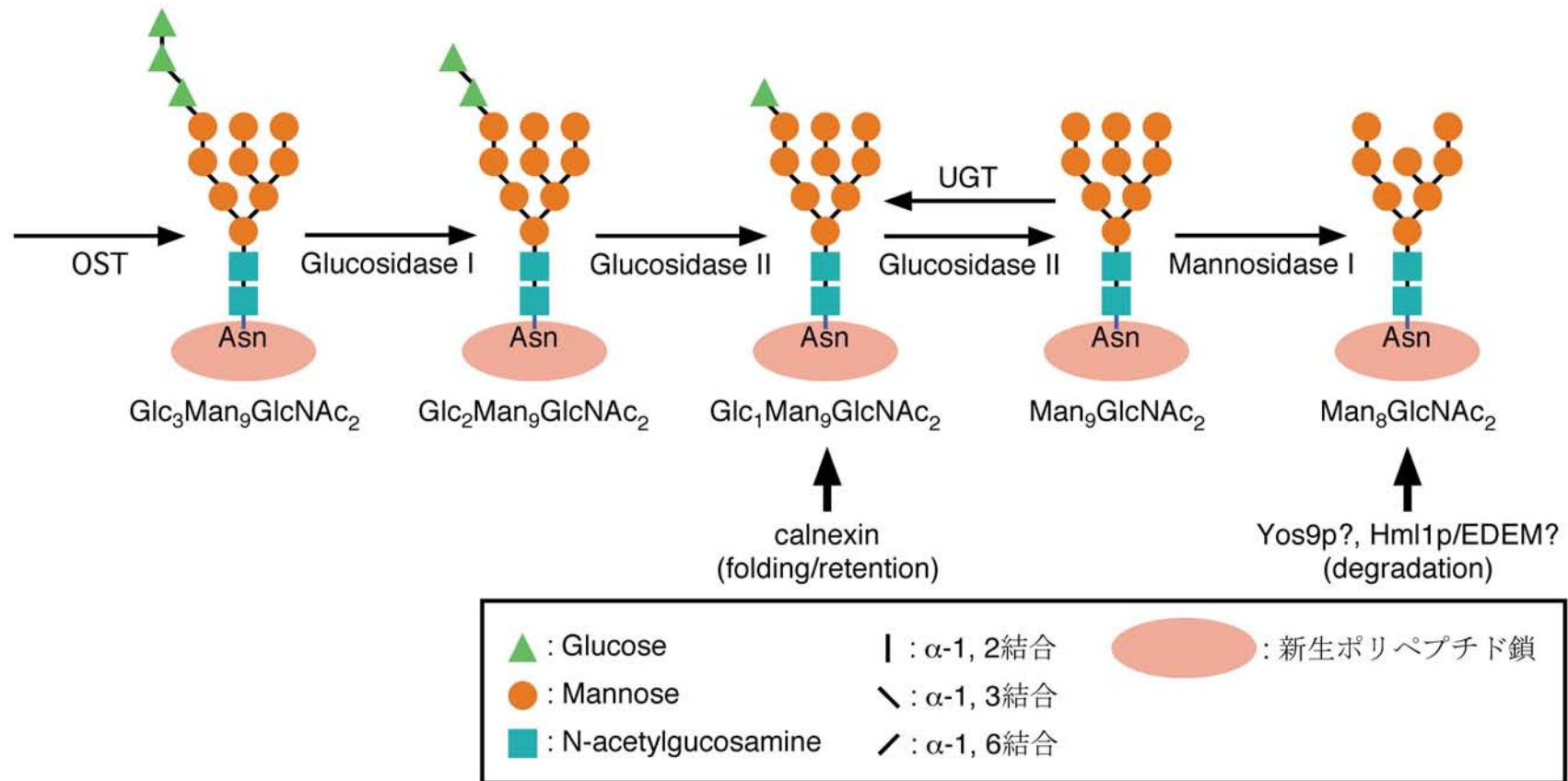


図3 N-結合型糖鎖の小胞体内での修飾

Oligosaccharide transferase (OST)はコア糖鎖($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$)を新生ポリペプチド鎖のコンセンサス配列のAsnに付加する。コア糖鎖末端のグルコース3残基は、glucosidase IとIIによって切断される。続いて、mannosidase Iがマンノース1残基を切断する。Calnexinは $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ の糖鎖を持つ構造不全ポリペプチド鎖を認識して結合、その折り畳みと小胞体残留に寄与する。UDP-glucose:glycoprotein glucosyl transferase (UGT)は、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ の糖鎖を持ち折り畳みを完了していないポリペプチド鎖を認識してグルコース1残基を再付加、calnexinへの再結合を促進する(calnexin cycle)。一方、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ の糖鎖を持つ未成熟ポリペプチドはMnl1p/EDEM and/or Yos9pにより認識され、小胞体関連分解に供される。(文献68より改変)

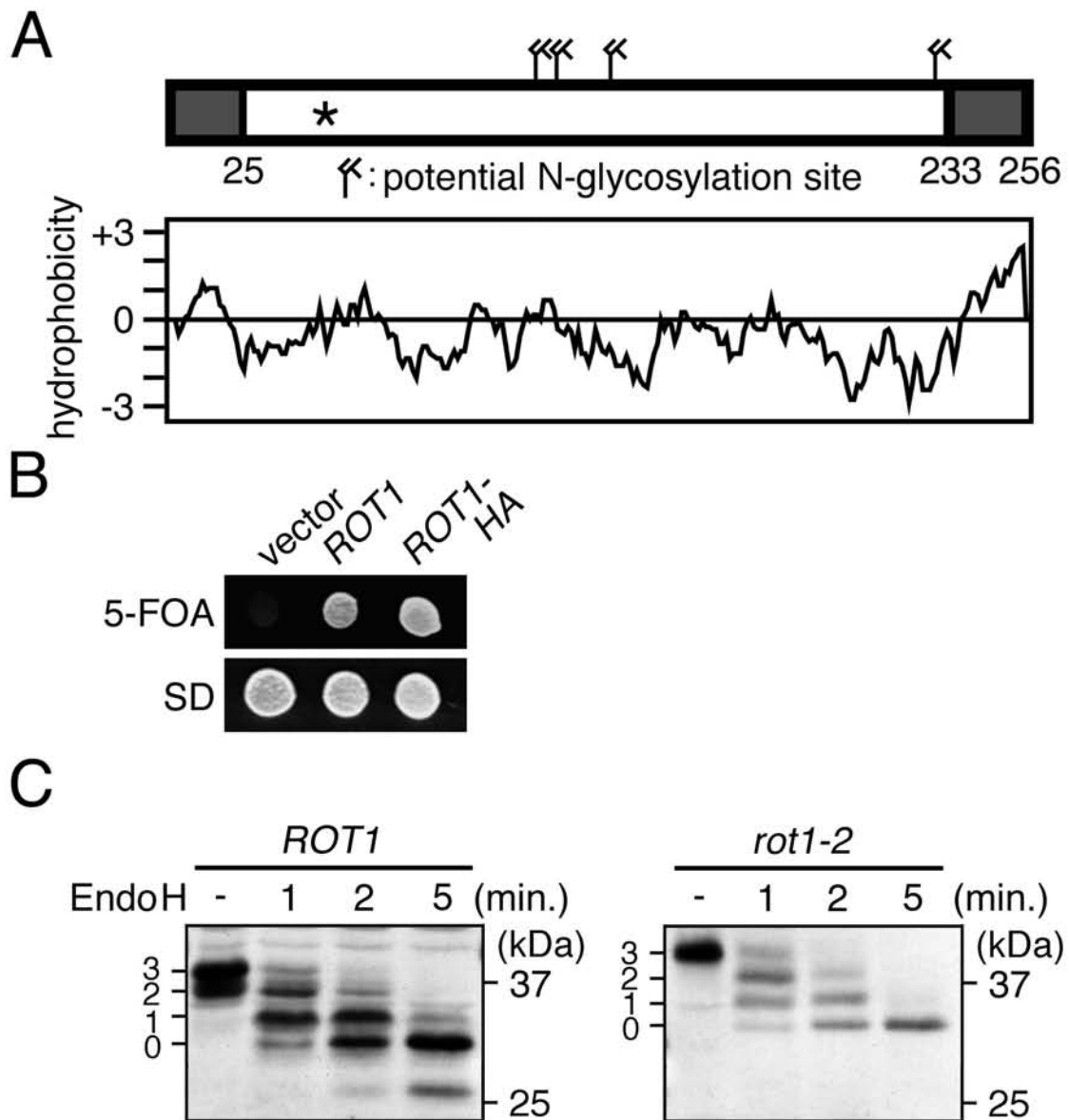


図4 Rot1pは小胞体に局在する膜蛋白質である (A)Rot1pの模式図と疎水性プロット。N末端のシグナル配列とC末端の膜貫通領域を灰色で示す。アスタリスクは*rot1-2*変異の部位を示す(Gly45→Gluの1アミノ酸置換)。(B)*ROT1*は必須遺伝子である。YM12株(pRS316-*ROT1*[*CEN/ARS*, *URA3*, *ROT1*])を保持する Δ *rot1*株)に空ベクターのpRS314(*CEN/ARS*, *TRP1*), pRS314-*ROT1*p, pT-*ROT1*-HA (*CEN/ARS*, *TRP1*, *ROT1*-HA)のいずれかを導入した。形質転換体を液体YPD、30°Cで培養し、SD寒天培地2枚にスポットした。片方のSDプレートは、5-FOA(1mg/ml)を含んでいる。5-FOA含有培地では*URA3*株は生育できず、pRS316-*ROT1*を脱落した場合にのみ生育できる。プレートを30°Cで1日培養した。(C)Rot1pはN-結合型糖鎖修飾を受けている。YM16(*ROT1*)またはYM18(*rot1-2*)細胞抽出液(1% SDSを含む)にEndoH(20 U/ μ l)を加え、37°Cで図に示した時間処理した。抗Rot1p抗血清を用いたウェスタンブロットでRot1pまたは*rot1-2*pを検出した。各パネルの左に、N-結合型糖鎖の数を示す。(図4次ページへ続く)

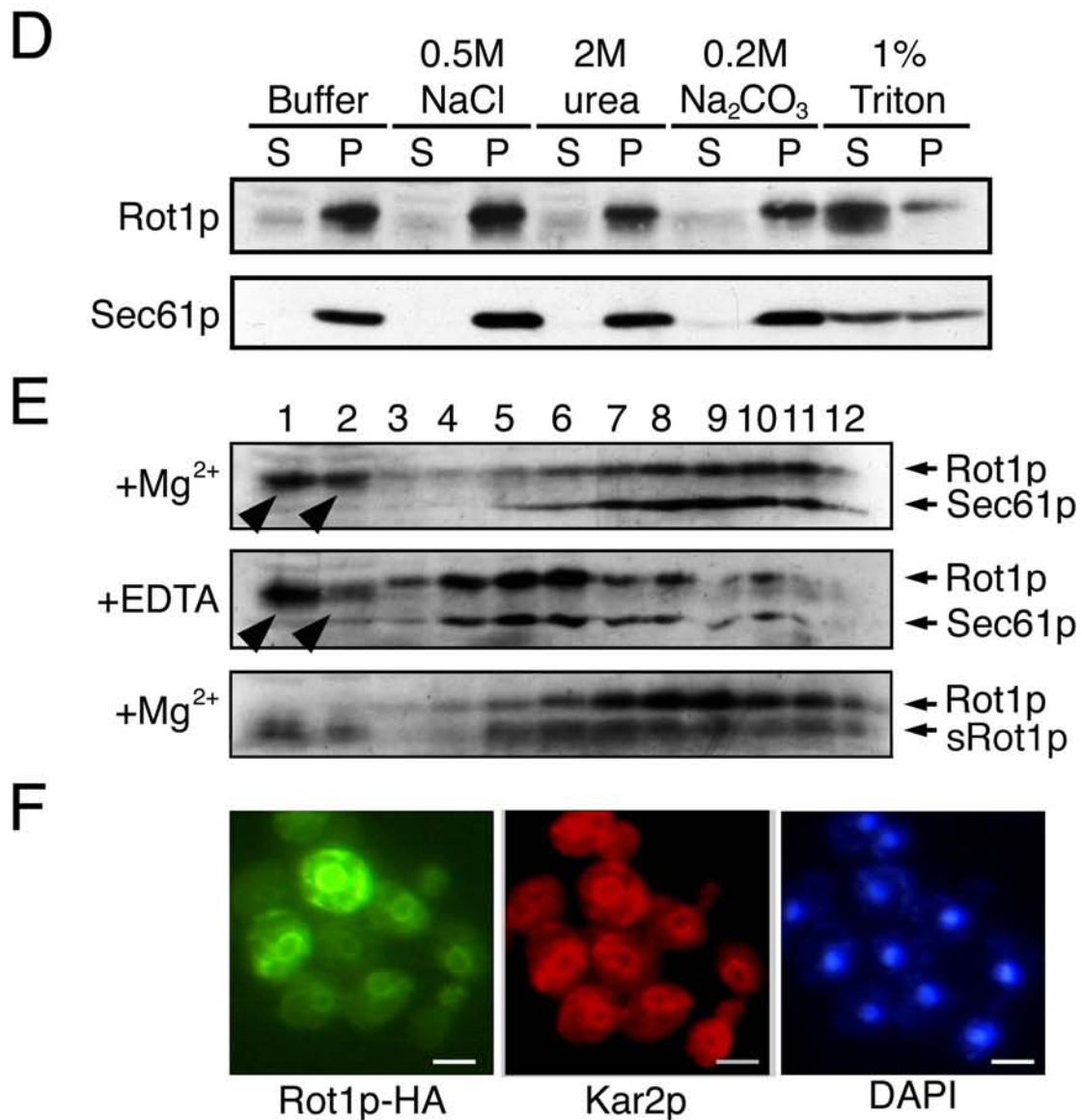


図4 Rot1pは小胞体に局在する膜蛋白質である (D)Rot1pは内在性膜蛋白質である。LE buffer(界面活性剤を含まない)中でYM16株を破碎し、抽出液に0.5 M NaCl, 2 M urea, 0.2 M Na₂CO₃, 1% Triton X-100のいずれかを加え、4℃で1時間静置、遠心分離(100,000 g, 1時間)により可溶性分画と膜分画に分離、ウェスタンブロットによりRot1pとSec61pを検出した。(E)Rot1pは主に小胞体に局在する。LM buffer(+Mg²⁺)またはLE(+EDTA)中で破碎したYM16株抽出液を20-60%スクロース密度勾配超遠心(150,000 g, 8時間)で分画した。各分画について、ウェスタンブロットでRot1p, Sec61pを検出した。下のパネルは、sRot1pの分布を示す。(F)間接蛍光抗体法によるKar2pとRot1pの局在観察。YM13株(Rot1p-HAを発現する $\Delta rot1$ 株)を液体YPD、30℃で培養して固定、抗HA抗体及び抗Kar2p抗体を用いた間接蛍光抗体法でKar2pとRot1p-HAの局在を観察した。核の可視化のため、菌体をさらにDAPIで処理した。Bars, 5 μ m.

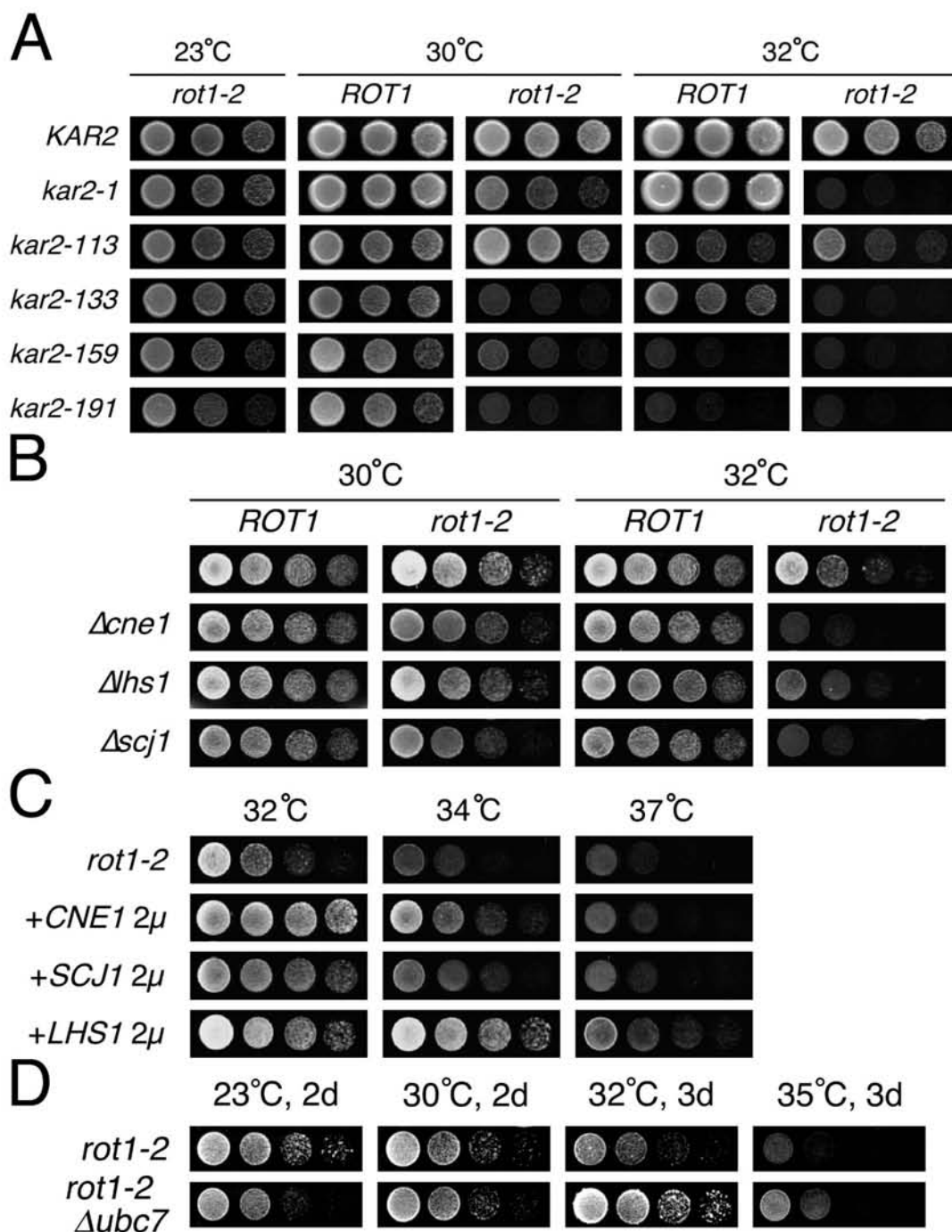


図5 *ROT1*と小胞体品質管理機構関連遺伝子群の遺伝学的相互作用 (A)*kar2*と*rot1-2*の合成致死性は*kar2*のアレル特異的である。YM11株(Δ *kar2* Δ *rot1*)より、plasmid shufflingにより*KAR2*または*kar2*変異アレルのいずれか、そして*ROT1*または*rot1-2*をそれぞれシングルコピープラスミド上に保持する株を作製した。菌体を液体YPD、23°Cで培養し、固体YPDプレートに10倍希釈系列でスポットした。プレートは図に示した温度で2日培養した。(B)*rot1-2*と Δ *cne1*, Δ *lhs1*, Δ *scj1*二重変異による増殖遅延。YM16 (*ROT1*) またはYM18(*rot1-2*)株で*CNE1*, *SCJ1*又は*LHS1*を破壊した。各株を液体YPD、23°Cで培養し、固体YPDプレートに5倍希釈系列でスポットした。プレートは図に示した温度で*ROT1*の株については1日、*rot1-2*の株については2日培養した。(C)*CNE1*, *LHS1*, *SCJ1*の過剰発現による*rot1-2*変異の抑圧。*CNE1*, *LHS1*または*SCJ1*を組み込んだ多コピープラスミドをYM18株に導入、液体SC、23°Cで培養した後(B)と同様に固体YPD上での生育を検定した。(D)*ROT1*と*UBC7*の遺伝学的相互作用。YM18株で*UBC7*を破壊、(B)同様にYPDプレート上での生育を検定した。d, days. 48

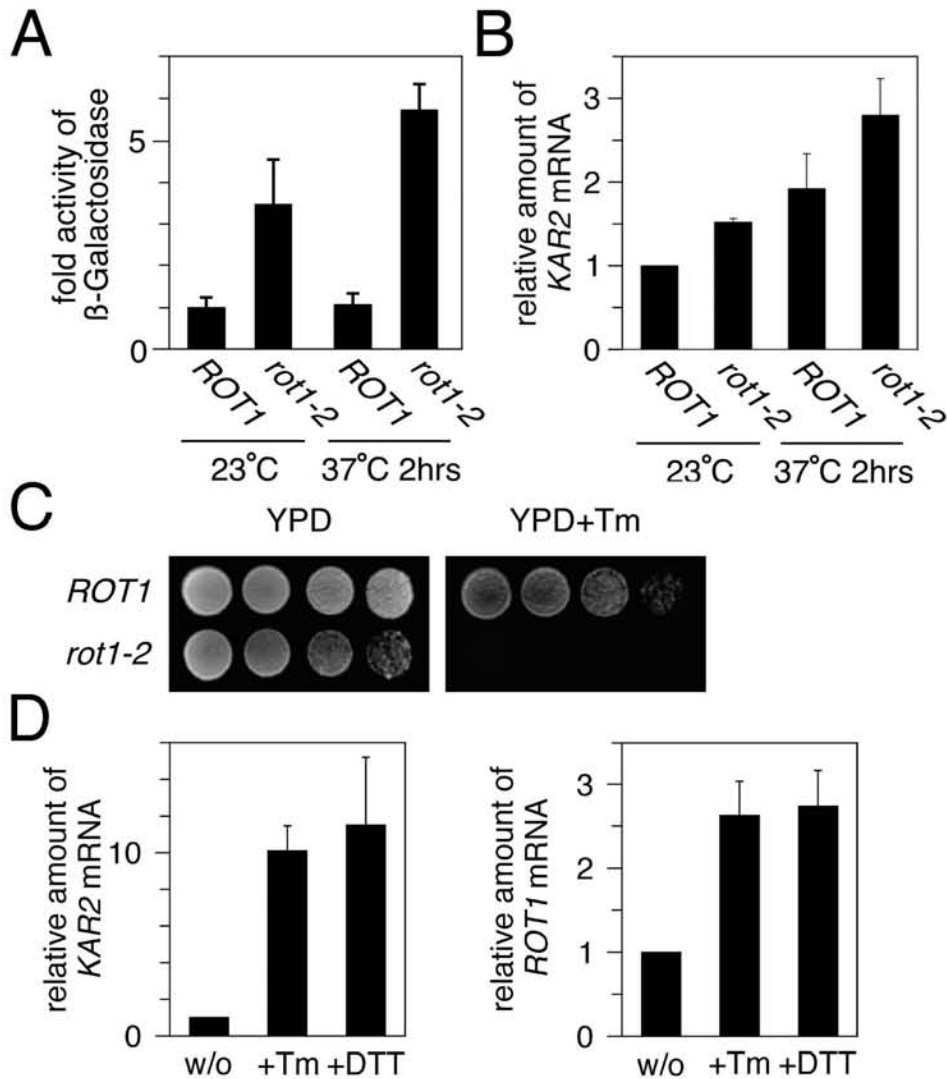


図6 *ROT1*と小胞体ストレスの関係 (A)*rot1-2*変異株ではUPRが活性化されている。YM16 (*ROT1*) または YM18(*rot1-2*)株にレポータープラスミドpCZY1(UPR element-*CYC1p-lacZ*)を導入、形質転換体を液体SC、23 °Cで培養した。一部はさらに37 °Cで2時間培養した。菌体を回収、溶解、細胞内の β -galactosidase活性を測定した。独立した10試行の β -galactosidase活性平均値を、YM16株23 °Cの値を1として示す。(B)*rot1-2*株では*KAR2* mRNA量が増加している。シングルコピープラスミド上に*ROT1*又は*rot1-2*を持つ*ROT1*破壊株(YM19, 20)を液体YPD、23 °Cで培養し、一部は37 °Cで2時間培養した。菌体から総RNAを抽出、ノザンブロットにより*KAR2*及び*ACT1* mRNA量を測定した。23 °Cで培養したYM19の*KAR2* mRNA量(*ACT1* mRNA量を内部標準とした相対値)を1として、*KAR2* mRNAの相対量を示す。3回の独立した実験の平均値とSDを示す。(C)*rot1-2*株はTmに高感受性である。YM16, YM18株を液体YPD、23°Cで培養後、Tm(0.5 μ g/ml)を含む(または含まない)固体YPDに5倍希釈系列でスポットした。プレートを30 °Cで3日培養して、菌体の生育を検定した。(D)小胞体ストレスにより*ROT1*の発現量が上昇する。野生型株(FY23)を液体YPD、30 °Cで培養、Tm(10 μ g/ml)またはDTT(10 mM)を加えてさらに2時間培養した。菌体から総RNAを抽出し、*KAR2*, *ROT1*及び*ACT1* mRNAをノーザンブロットにより検出した。*ACT1* mRNA量を内部標準として用いた。未処理菌体の*KAR2*と*ROT1* mRNA量を1として、薬剤処理菌体でのそれぞれの相対量を示す。4回の独立した実験の平均値とSDを示す。

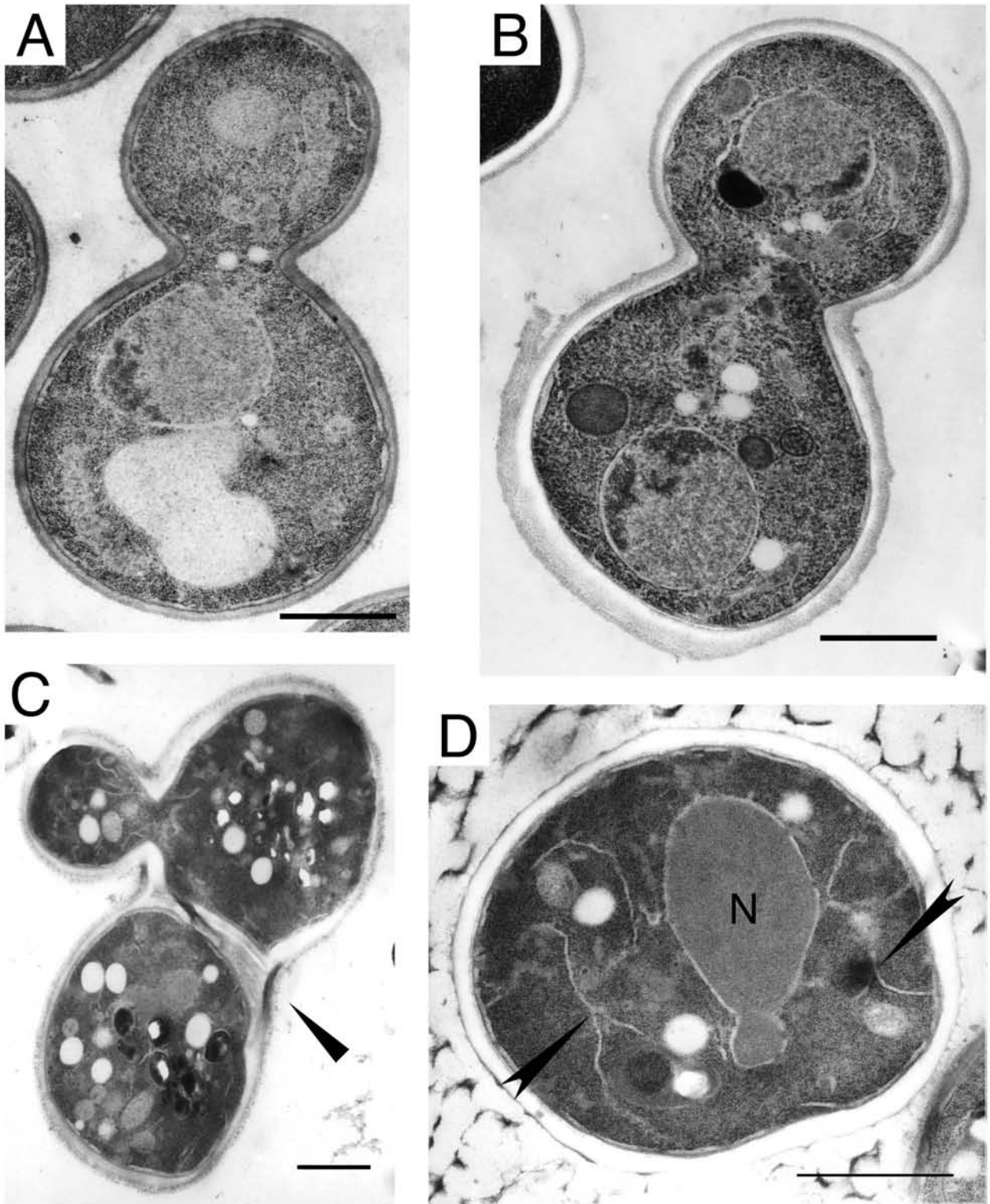


図7 *rot1-2*変異株の電子顕微鏡観察 YM16 (*ROT1*) またはYM18(*rot1-2*)株を液体YPD、23 °Cで培養(A, B)し、さらに37 °Cで2時間(C, D)培養したのち、電子顕微鏡観察に供した。Cの矢印, 分離不全のセプタ; bars, 1 μ m.
(図7次ページに続く)

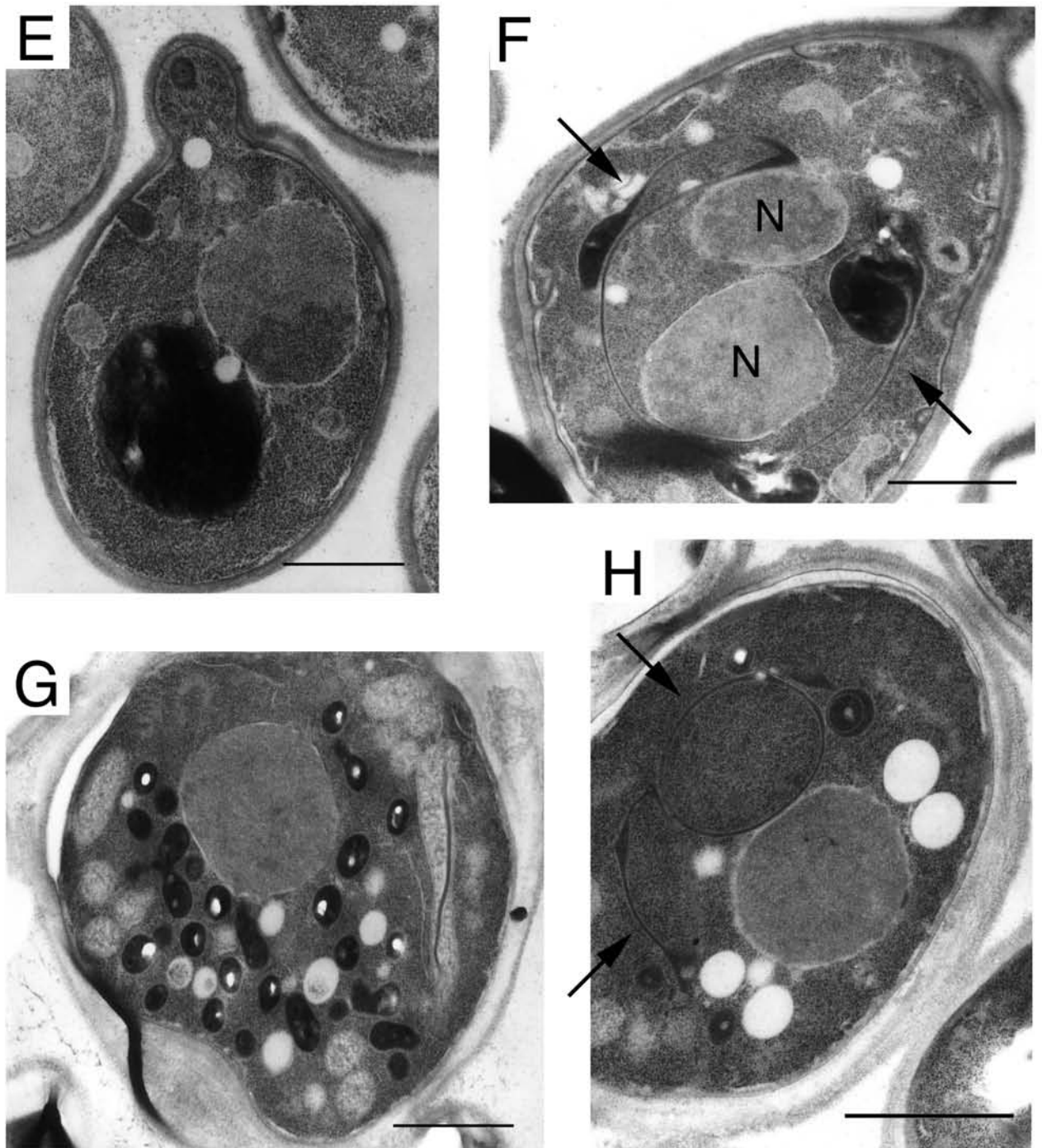


図7 *rot1-2*変異株の電子顕微鏡観察 YM16 (*ROT1*) またはYM18(*rot1-2*)株を液体YPD、23 °Cで培養し、さらに37 °Cで2時間(E, F)または6時間(G, H)培養したのち、電子顕微鏡観察に供した。Eの矢印、小胞体; Fの矢印、伸展した高電子密度の細胞内小器官; bars, 1 μ m.

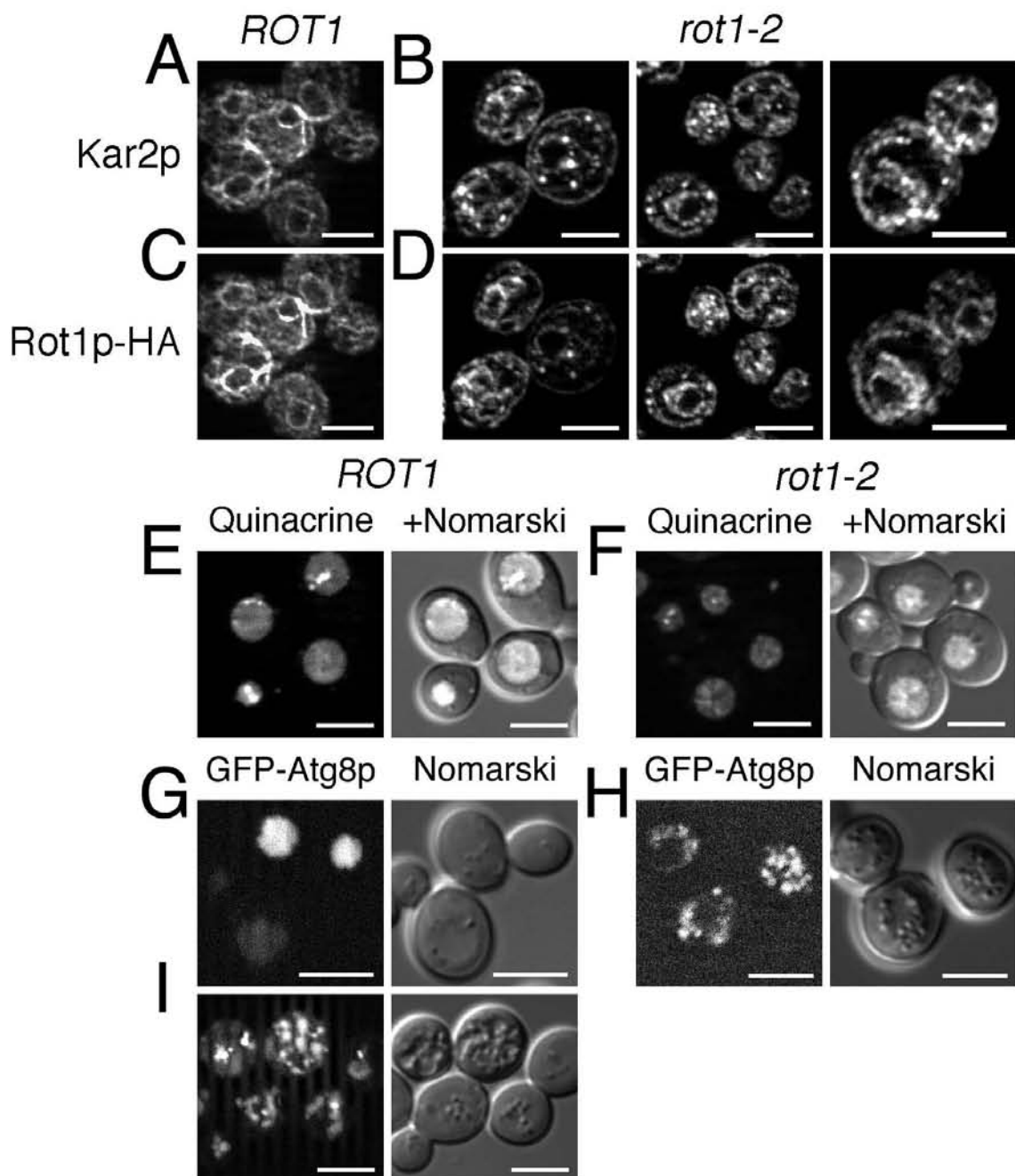


図8 *rot1-2*株の蛍光顕微鏡観察 (A-D)Kar2pとrot1-2pは共にドット状構造に集合する。YM13($\Delta rot1$ でRot1p-HAを発現)またはYM14($\Delta rot1$ でrot1-2p-HAを発現)を液体YPD、23℃で培養の後37℃で6時間培養、固定して抗Kar2p抗体及び抗HA抗体を用いた間接蛍光抗体法観察に供した(同時染色)。(E, F)*rot1-2*株の液胞は野生型株同様に単一で、酸性化されている。YM16 (*ROT1*) またはYM18(*rot1-2*)株を(A-D)同様に培養(37℃5.5時間)、リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)とキナクリンを終濃度いずれも50 mMで加え、30分培養した。キナクリンの蛍光をFITCフィルターを用いて観察した。右側のパネルでは、微分干渉像を重ねた。(G-I)*rot1-2*変異株では、autophagic bodyが蓄積している。pL-GFP-ATG8を導入したYM16(G)またはYM18(H)株を液体SC、23℃で培養の後さらに37℃で6時間培養、GFPの蛍光を観察した。右側のパネルでは、微分干渉像を重ねた。(I)では、pL-GFP-ATG8を導入したYM16株を硫酸アンモニウム不含で1mM PMSFを加えたSCで30℃、6時間培養してGFP蛍光を観察した。Bars, 5 μm.

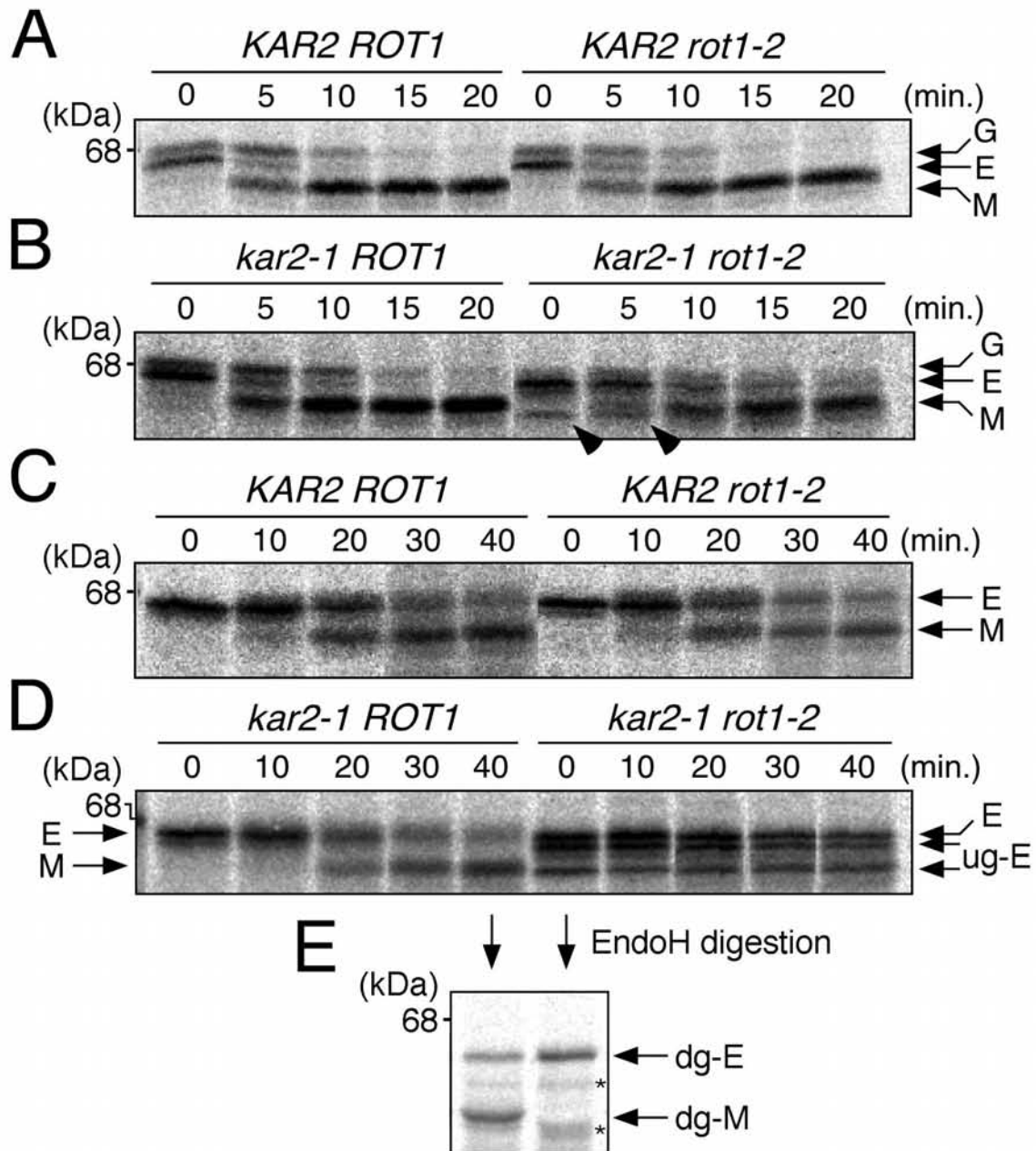


図9 *kar2-1 rot1-2*二重変異株では、還元型CPYの成熟が傷害を受ける (A, B)図5で用いた各株をMet/Cys不含液体SC、23 °Cで培養、37 °Cで30分培養の後 ^{35}S -[Met/Cys]で5分間ラベルし、図に示した時間チェイスした。菌体抽出液に対して抗CPY抗体で免疫沈降を行い、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーでCPYを検出した。(C, D)菌体を37°Cで15分培養、DTTを終濃度5 mMで加えさらに15分培養した。10分間のラベル後、培地交換によりDTTを除去してチェイスを開始した。(E)(D)の*kar2-1 ROT1*株チェイス40分および*kar2-1 rot1-2*チェイス0分のCPYをEndoH消化、同様に検出した。E, ER form; G, Golgi form, M, 成熟型CPY; (B)の矢尻, 糖鎖修飾を受けていないproCPY; ug-E, 糖鎖修飾の不完全なER form (proCPY); dg-E, 糖鎖を除去したER form; dg-M, 糖鎖を除去した成熟型CPY; (E)のastarisk, 非特異的シグナル。

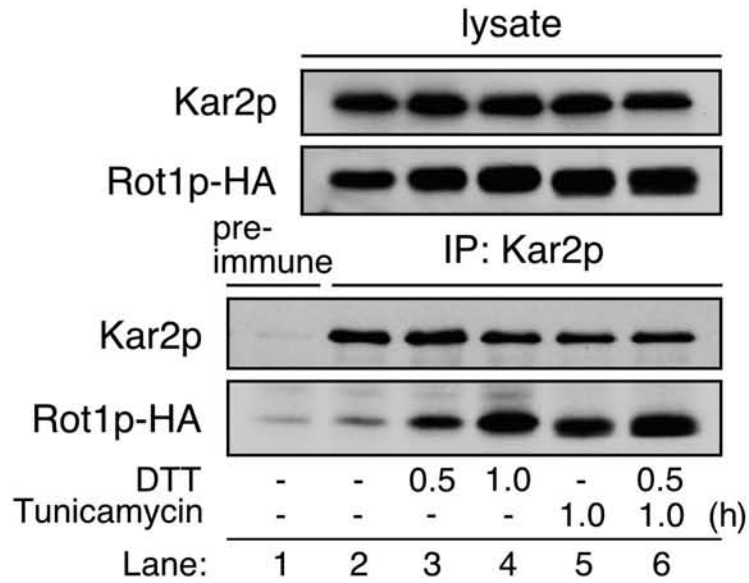


図10 Rot1pはKar2pと *in vivo*で複合体を形成する Rot1p-HAを発現する $\Delta rot1$ 株を液体YPD、30°Cで培養、細胞抽出液に対して抗Kar2p抗体を用いた非変性条件での免疫沈降を行った。免疫沈降物はEndoHで処理し、ウェスタンブロットによりKar2pと共沈降したRot1p-HAを検出した。DTT(10mM)やTm(10 μ g/ml)処理は、図に示した時間行った。

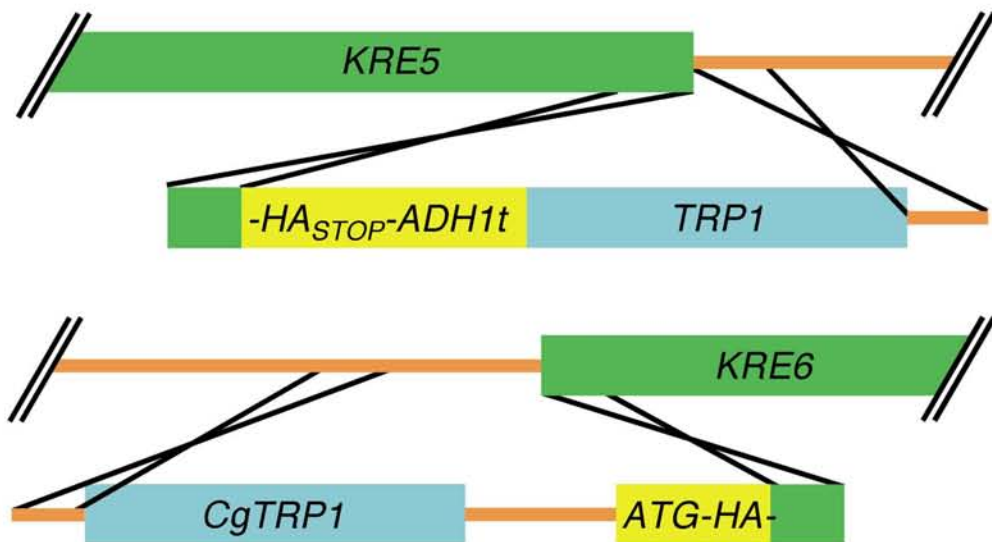


図11 Kre6pの成熟はRot1p依存的である (A)Kre5p-HA, HA-Kre6p発現株作製の概念図。(Cg)TRP1遺伝子をマーカーとした相同組み換えにより、染色体上のKRE5, KRE6遺伝子をそれぞれKRE5-HA-HDEL, HA-KRE6に入れ換え、それぞれのnative promoterから発現させるよう設計した。CgTRP1, *Candida glabrata* TRP1. (図11次ページへ続く)

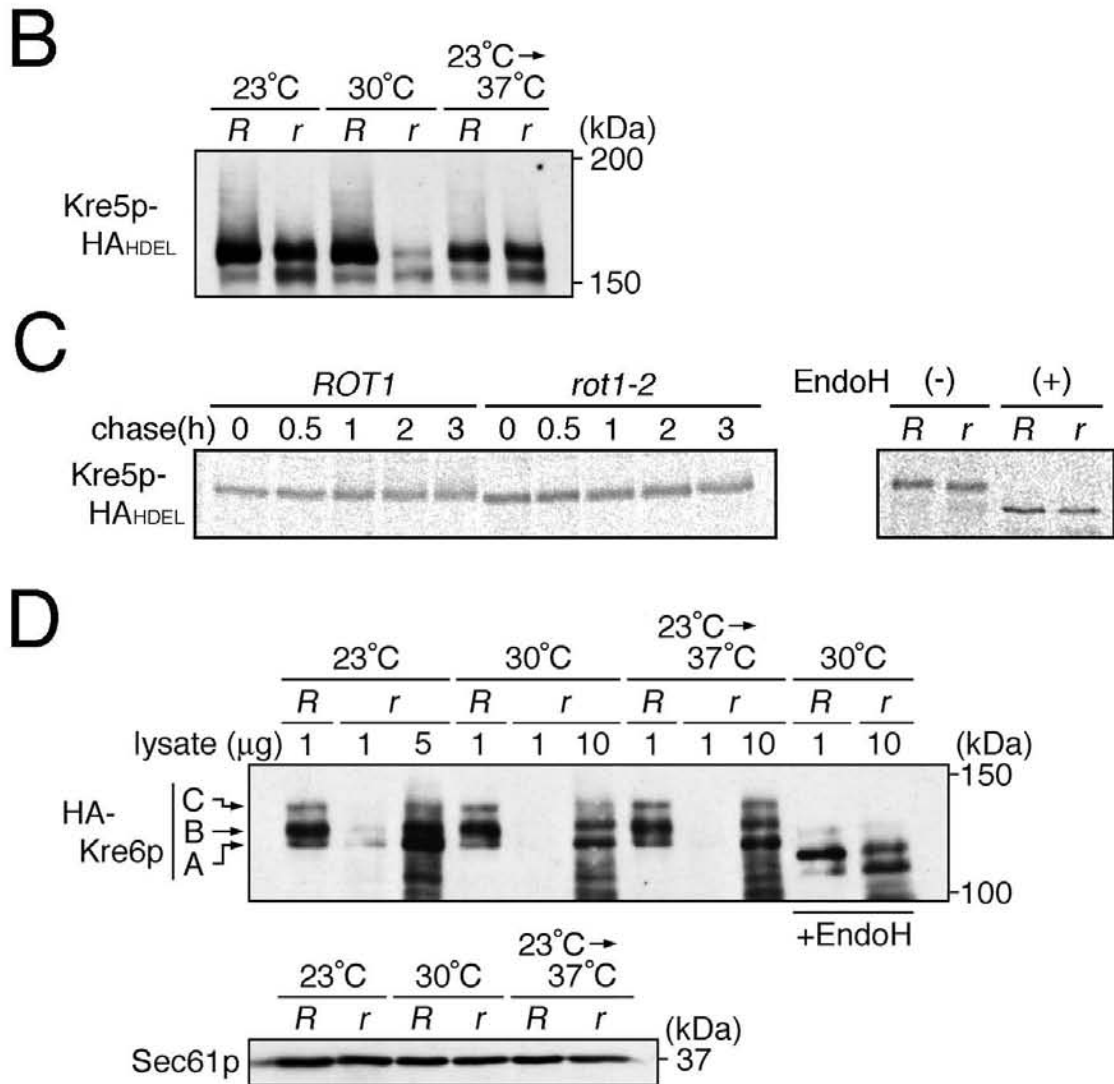
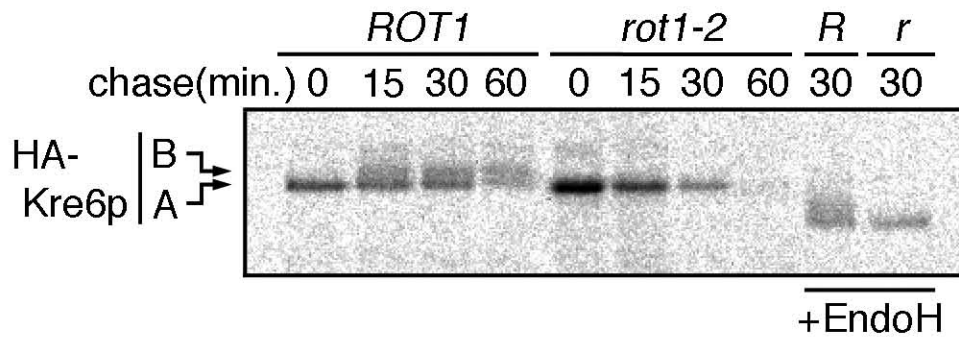


図11 Kre6pの成熟はRot1p依存的である (B) *rot1-2*変異株でのKre5p-HA量変化。Kre5p-HAを発現する*ROT1*株(YM27)及び*rot1-2*株(YM28)を液体YPDで23°C、30°Cで継続的に培養、または23°Cから37°Cに温度を変えて2時間培養した。菌体抽出液(それぞれ蛋白質5 μg分)のウェスタンブロット像を示す。R, *ROT1*株; r, *rot1-2*株。(C)パルス-チェイス実験によるKre5p-HAの安定性の検証。(左パネル)YM27及びYM28株をMet/Cys不含液体SC、23°Cで培養、37°Cで10分培養の後³⁵S-[Met/Cys]で10分間ラベルし、図に示した時間チェイスした。菌体抽出液に対して抗HA抗体で免疫沈降を行い、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーでKre5p-HAを検出した。(右パネル)同様に菌体を培養、ラベルしてKre5p-HAを免疫沈降した。半分をEndoH消化してSDS-PAGE、オートラジオグラフィーを行った。(D)HA-Kre6p量は*rot1-2*変異株で激減している。HA-Kre6pを発現する*ROT1*株及び*rot1-2*株を液体YPD、図に示した温度で培養した。図に示した蛋白質量に相当する細胞抽出液をウェスタンブロットに供し、HA-Kre6pを検出した。また、下のパネルには20 μgの細胞抽出液についてSec61pを検出し、loading controlとして示す。A, A form; B, B form; C, C form.(図11次ページに続く)

E



F

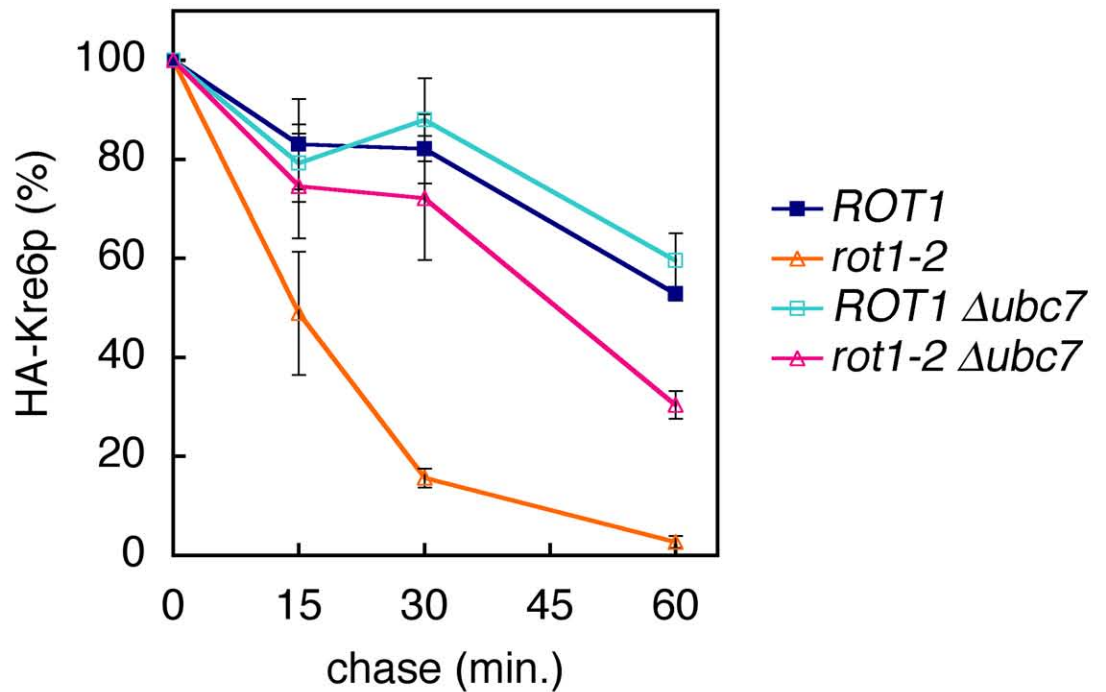
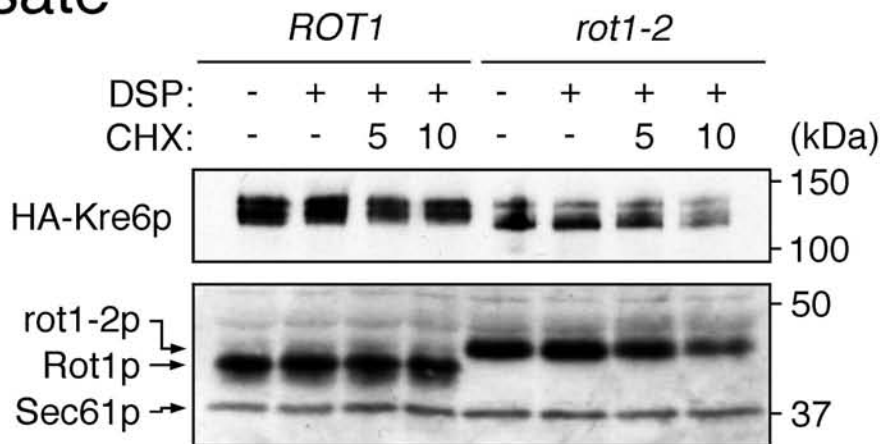


図11 Kre6pの成熟はRot1p依存的である (E)*rot1-2*株では、HA-Kre6pはERADにより速やかに分解される。HA-Kre6pを発現する*ROT1*株及び*rot1-2*株およびそれぞれの*UBC7*破壊株について、(B)同様にパルス-チェイス実験を行いHA-Kre6pを検出した。A, A form; B, B form; C, C form.(F)(E)の定量結果。A form、B form量を合算、独立した3回以上の実験の平均値とSDを示す。

lysate



IP

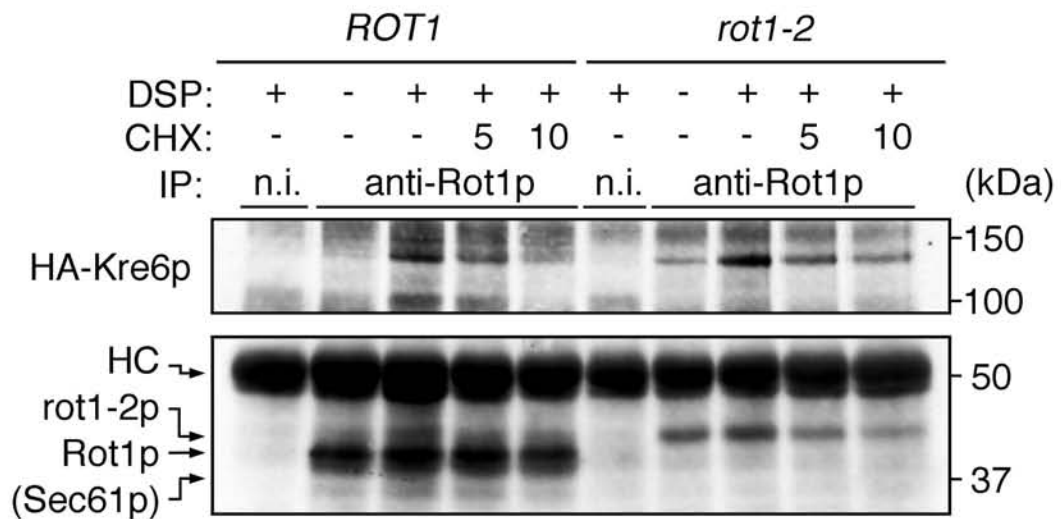


図12 *Rot1*はHA-Kre6pと一過的に相互作用する HA-Kre6pを発現する *ROT1*株及び*rot1-2*株を液体YPD、23℃で培養し、A600=1.0の時点から37℃で10分間培養した。アジ化ナトリウムとDSPを終濃度それぞれ15 mMと0.5 mMになるよう加え、37℃で5分間処理、Tris(pH8.0)を終濃度50~100 mMまで加えてDSPの反応を停止した。シクロヘキシミド処理時には、37℃10分の培養してから終濃度0.1 mg/mlで5分又は10分処理、続いてDSPを加えた。菌体を変性条件下での抗Rot1p抗体による免疫沈降を行った。細胞抽出液中の各蛋白質の検出には、HA-Kre6pには0.005 O.D. cells、Rot1p, rot1-2p, Sec61pには0.02 O.D. cellsに相当する細胞抽出液を用いた。また、*ROT1*株の免疫沈降には5 O.D. cells、*rot1-2*株には1 O.D. cells分の抽出液を用いた。CHX, cycloheximide; HC, immunoglobulin heavy chain; n.i., non-immune serum, (Sec61)は、Sec61pが検出されると予想される位置を示す。

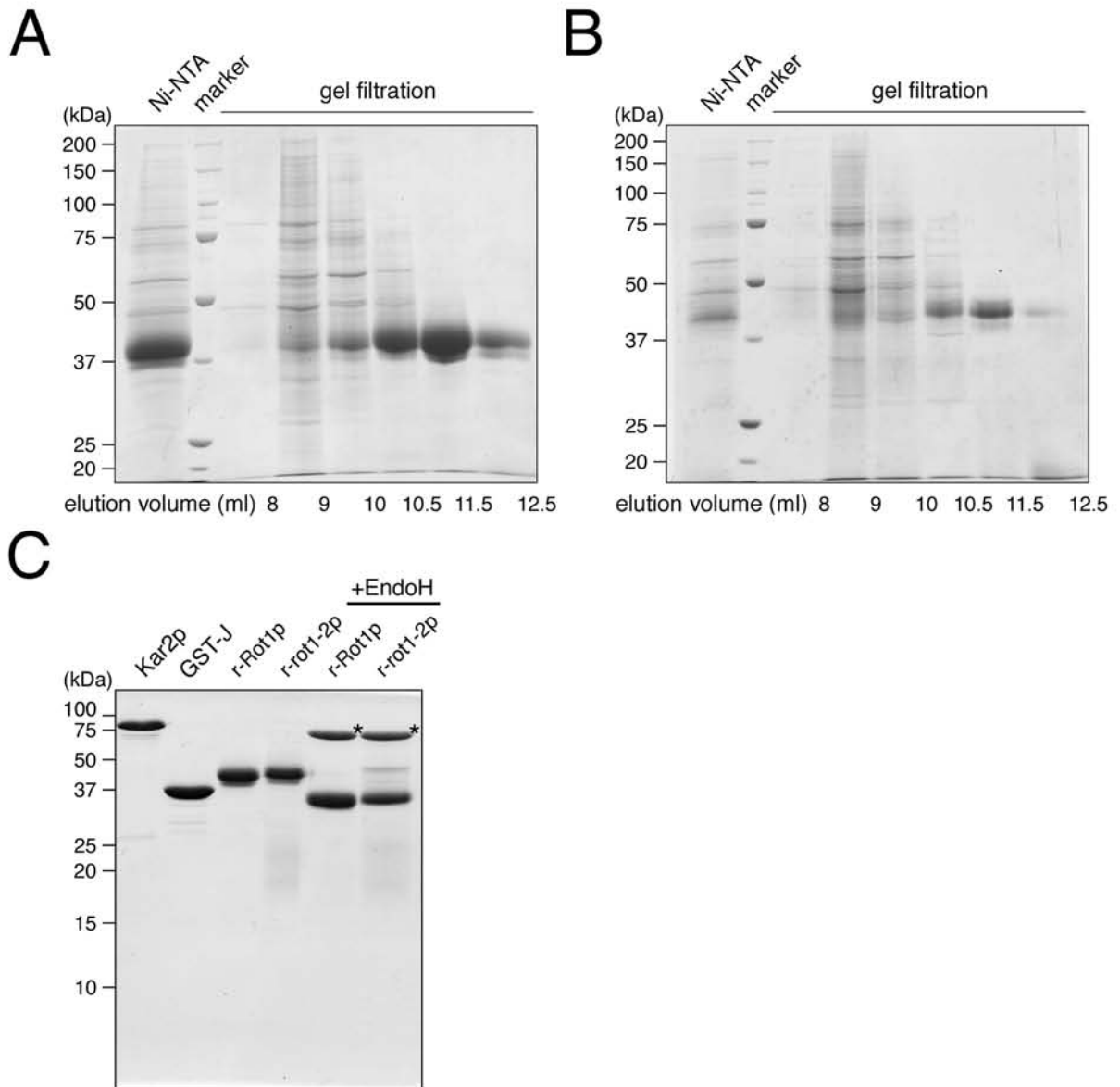


図13 組み換えRot1蛋白質の精製 (A)r-Rot1pの精製。酵母に発現させた Rot1p(1-231)HAHis₆(r-Rot1p)を酵母抽出液からNi-NTAで精製、続いてゲル濾過 (superdex75)で精製した。Ni-NTAからの溶出液およびゲル濾過の分画の一部(パネル下部に分離開始からの流出量を示す)をSDS-PAGEで展開し、Coomassie Brilliant Blue(CBB)で染色した。(B)r-rot1-2pの精製。(C)本研究で用いた精製蛋白質。His₆-Kar2pとGST-Jは大腸菌で発現させ、精製した。精製蛋白質をそれぞれ3 μgをSDS-PAGEで展開、CBB染色した。また、R-Rot1p及びr-rot1-2pの EndoH消化を行い、N-結合型糖鎖修飾を確認した(+EndoH)。astarisk, EndoHf.

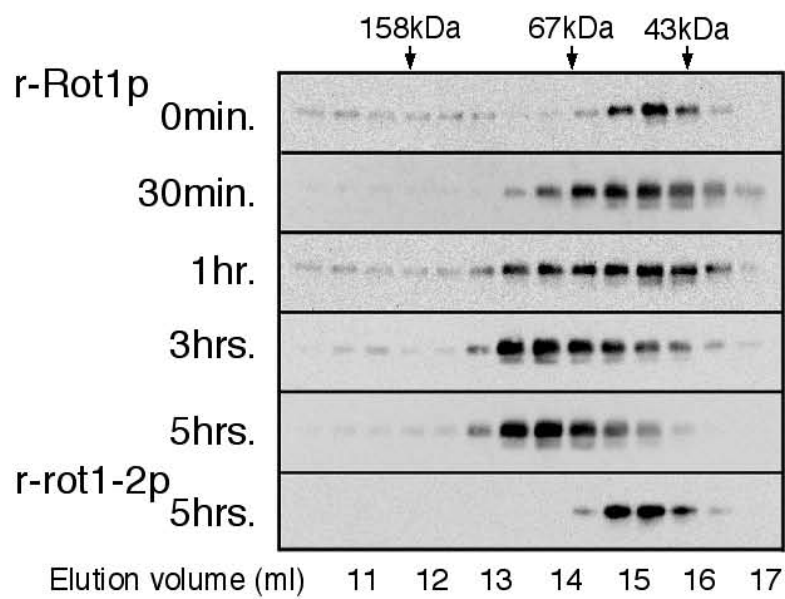


図14 R-Rot1pは二量体を形成する R-Rot1pまたはr-rot1p(5 μ M)を30 $^{\circ}$ Cで図に示した時間静置、ゲル濾過(Superdex200)により分画、ウェスタングロットにより検出した。パネル左に30 $^{\circ}$ Cでの反応時間、上部にマーカー蛋白質(aldolase, 158kDa; BSA, 68kDa; ovalbumin; 43kDa)の流出ピークを示す。

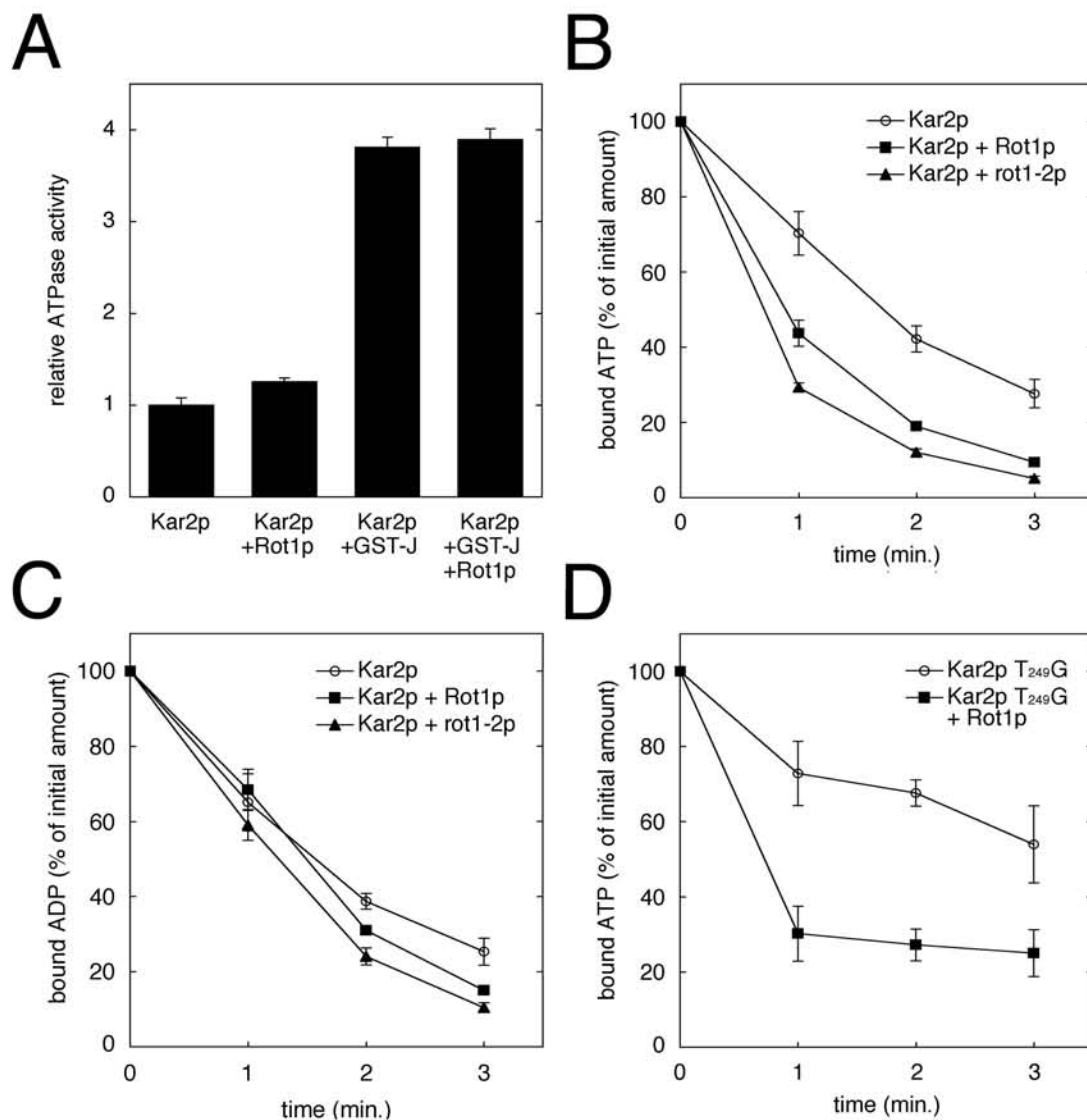
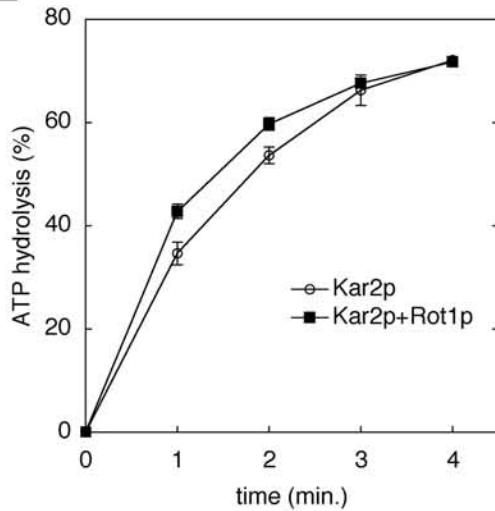


図15 R-Rot1pはKar2pに結合したATPの解離を促進する (A)Kar2pの総ATPase活性へのRot1pの効果。Kar2p(1 μ M)を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ を含むATP(200 μ M, 2.5 nCi/ml)と30 $^{\circ}\text{C}$ で反応させ、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ から $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ADP}$ への変換を測定した。また、r-Rot1p(5 μ M) and/or GST-J(0.5 μ M)も加えた反応も行った。5回以上の独立した実験の平均値とSDを示す。Kar2pのみでの活性は $0.60 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ であった。(B,C)Rot1pはKar2pに結合したATP量の減少を加速する。Kar2p(20 μ M)を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ と4 $^{\circ}\text{C}$ で反応、Kar2p- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ (ADP)複合体を形成させた。遊離ヌクレオチドをゲル濾過(spin column式)により除去、通り抜け分画のKar2p($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ or ADP複合体)を終濃度1 μ Mで過剰量のATP(2 mM, cold)と20 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。図に示した時間毎に一部を取って再度ゲル濾過を行い、遊離ヌクレオチドを除去した。同様に、Kar2p- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ (ADP)複合体をr-Rot1pまたはr-rot1-2p(それぞれ5 μ M)存在下で反応させた。Kar2pに結合した $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ヌクレオチド}$ を薄層クロマトグラフィーで展開、オートラジオグラフィー(BAS2500システム)で検出、定量した。Bには $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ 量、Cには $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ADP}$ 量を示す(3回以上の独立した実験の平均値とSD)。Kar2p- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ 複合体形成中、精製中に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ の一部は加水分解を受け、0分の時点でKar2pに結合した $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ヌクレオチド}$ の15-20%は $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ADP}$ であった。(D)Rot1pはKar2p T249GからのATP解離を促進する。Kar2p T249Gからの $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ATP}$ 解離を(B)同様に測定した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-}]\text{ADP}$ は検出されなかった。(図15次ページへ続く)

E



F

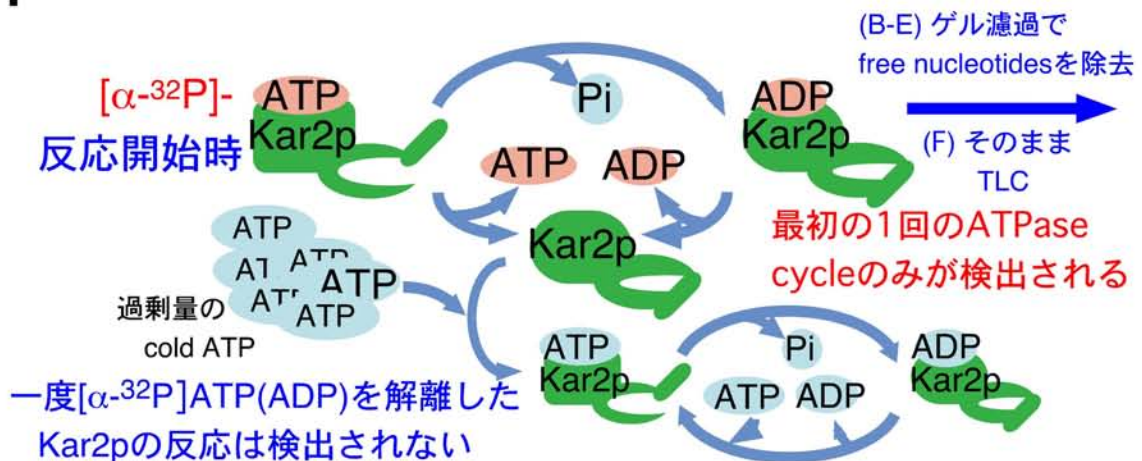


図15 R-Rot1pはKar2pに結合したATPの解離を促進する (E)Single turnover条件でのKar2pのATP加水分解。Kar2p-[α-³²P]-ATP(ADP)複合体(1 μM)を過剰量のATP(2 mM, cold)の存在下、20 °Cで反応させ、[α-³²P]-ATPから[α-³²P]-ADPへの変換を測定した。また、同様の実験をr-Rot1p(5 μM)存在下で行った。3回以上の独立した実験の平均値とSDを示す。(F)Single turnover実験の概念図。Kar2p-[α-³²P]-ATP(ADP)を過剰量のATP(cold)中で反応させるため、一度Kar2pから解離した[α-³²P]-ヌクレオチドは再びKar2pに結合することはほぼないとみなせる。(B-D)では再度ゲル濾過を行い遊離ヌクレオチドを除去することで、反応開始時からKar2pに結合したままの[α-³²P]-ヌクレオチド量を測定することができる。(D)では、Kar2pから解離したものも含めて[α-³²P]-ATP, [α-³²P]-ADP量を測定している。反応開始時にKar2pに結合していた[α-³²P]-ATPの加水分解のみが検出される(ATP解離には影響されるが、ADPからATPへの交換反応には影響されない)。

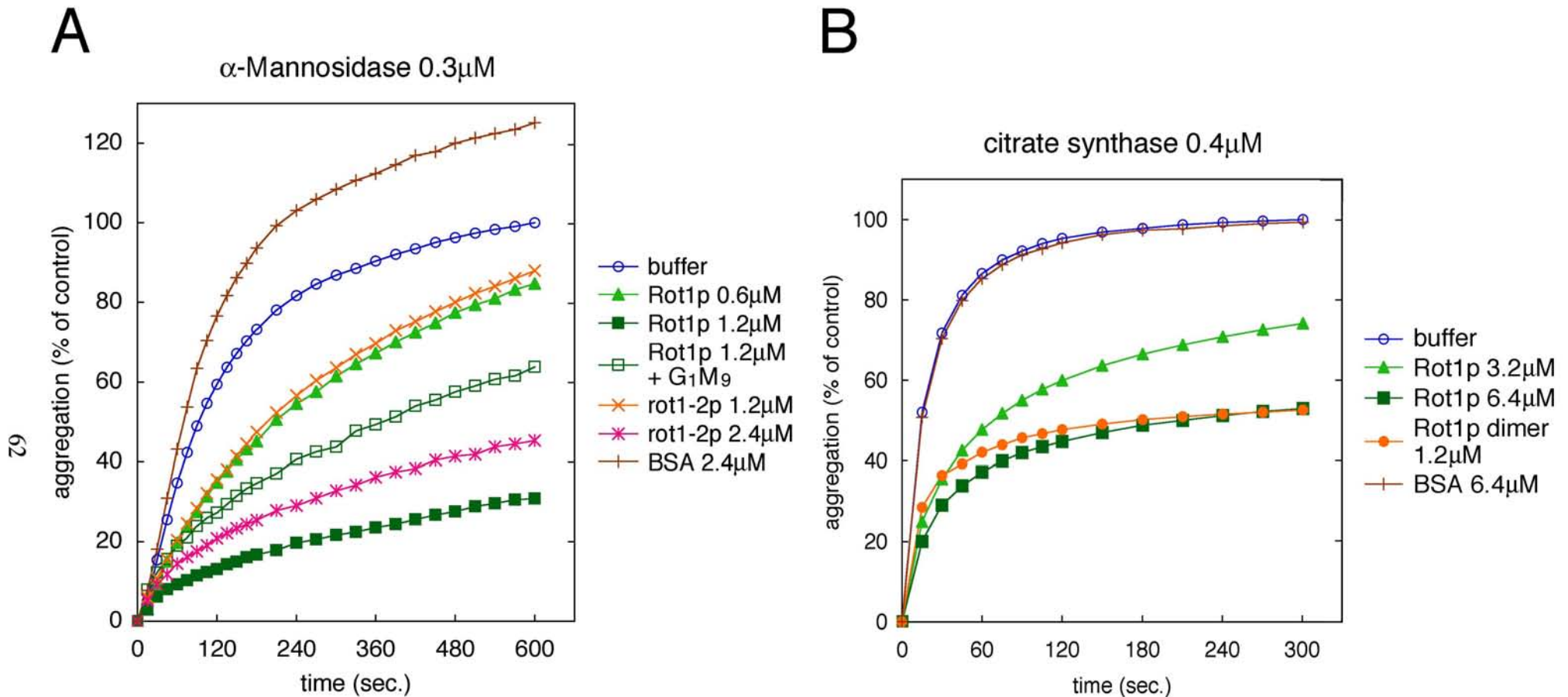


図16 R-Rot1pは変性蛋白質の凝集を抑制する (A, B)r-Rot1pによる変性 α -Mannosidase (α -Man)及び変性citrate synthase (CS)の凝集抑制。 α -Man(A)またはCS(B)を4Mグアニジン塩酸により変性させ、それぞれ終濃度0.3 μ M, 0.4 μ Mに希釈した(50倍希釈)。室温で A_{320} の上昇を測定した。図に示した濃度のr-Rot1p, r-rot1-2pまたはBSA溶液を用いて測定を行った。またGlc₁Man₉GlcNAc₂(G₁M₉; 60 μ M)を加えた反応も行った。G₁M₉自体は α -Manの凝集に影響しなかった(データは示さない)。 A_{320} を凝集度(aggregation)として、蛋白質を含まない緩衝液に希釈後600秒(α -Man)または300秒(CS)経過時の凝集度を100%とした値を示す。3回以上の実験の平均値を示す。(図16次ページへ続く)

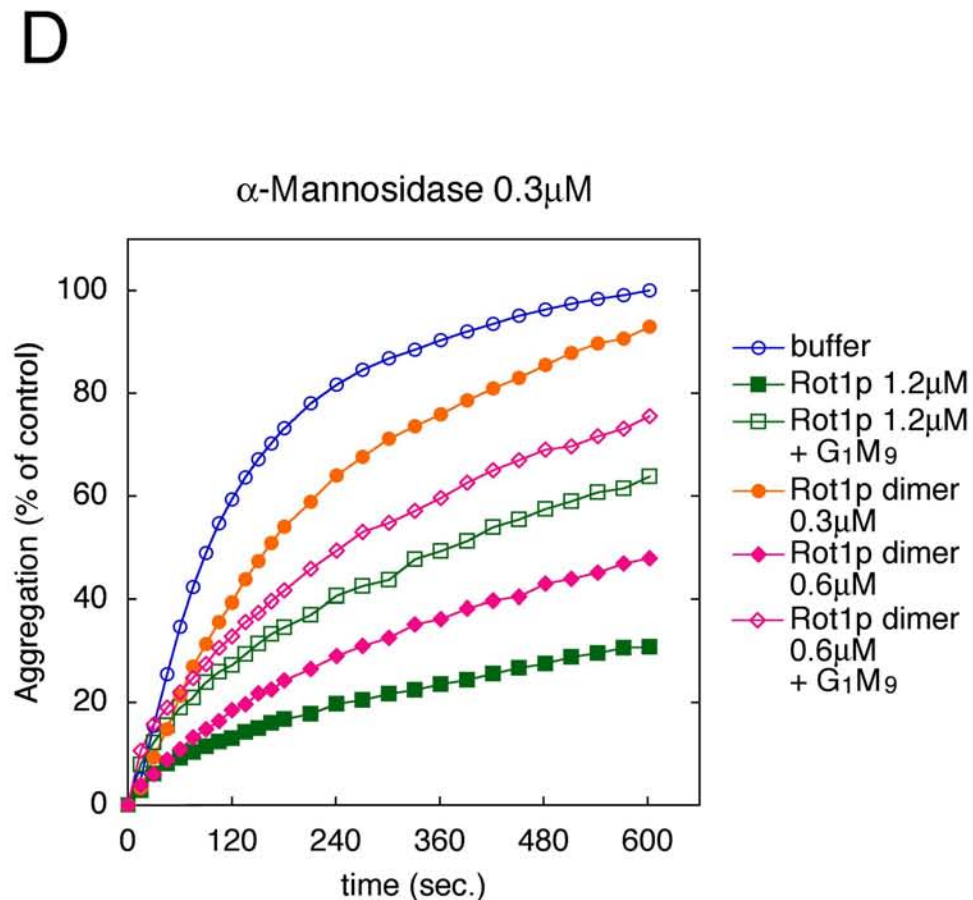
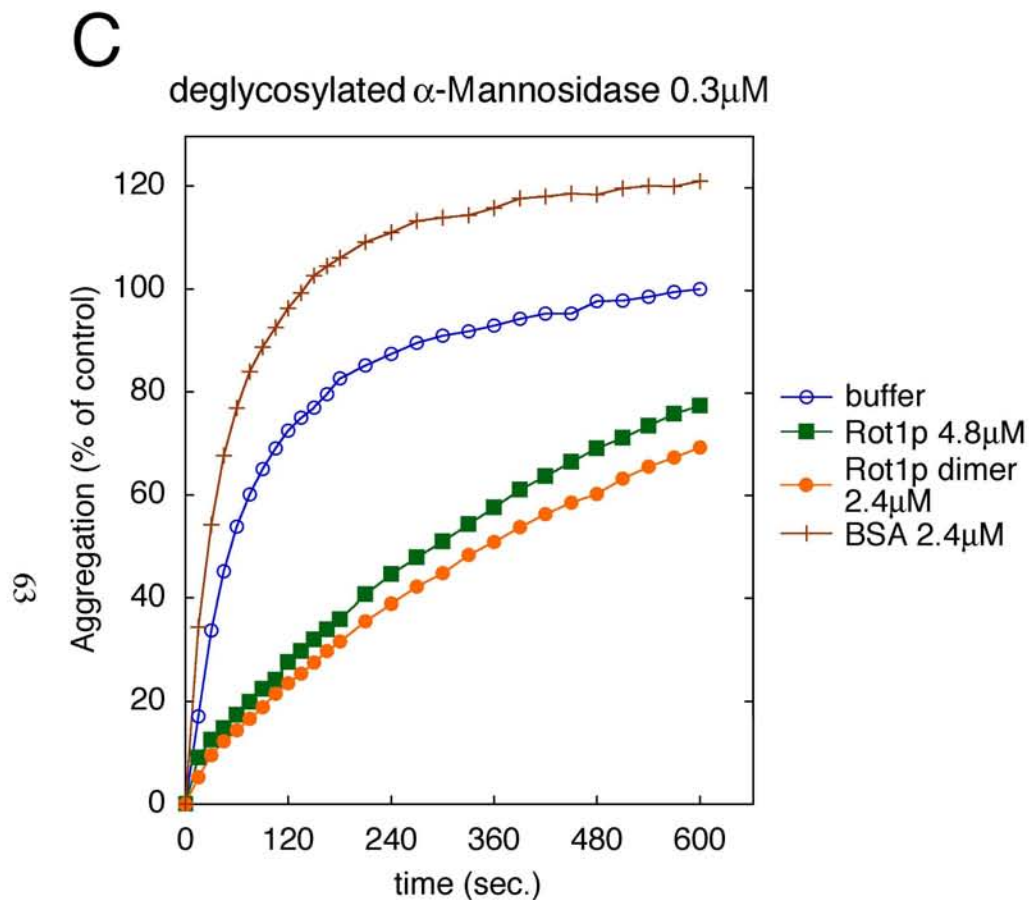


図16 R-Rot1pは変性蛋白質の凝集を抑制する (C)糖鎖を除去した α -Manの凝集阻止効果検定。 α -ManをEndoH処理後、(A)同様に凝集を測定した。(D)r-Rot1p二量体化の効果。r-Rot1p($10\mu\text{M}$)を 30°C で5時間静置して二量体を形成させ、(A)同様に α -Man凝集抑制活性を測定した。

表 1. 本研究に用いたプラスミド

Name	Backbone (cloning sites)	Cloned fragment(s)
pK2D2	pRS305 ^a (<i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII)	<i>KAR2</i> (-1934~+33 ^b ; <i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I) (+2079~3161; <i>Xba</i> I/ <i>Hin</i> dIII)
pCUA3K2	pCH1122 ^c (<i>Sal</i> I)	<i>KAR2</i> (-1282~+3935)
pRS314- <i>KAR2</i> ^c	pRS314 ^a (<i>Sac</i> I/ <i>Xho</i> I)	<i>KAR2</i> (-1282~+3935; <i>Sac</i> I/ <i>Sal</i> I)
pCL2	pBluescript II SK(-) ^e (<i>Nae</i> I)	<i>CEN/ARS</i> cassette ^f and <i>LYS2</i> (-295~+4335)
pCL2- <i>kar2-1</i>	pCL2 (<i>Sac</i> I/ <i>Sal</i> I)	<i>kar2-1</i> (-1282~+3935)
pRS314- <i>ROT1</i>	pRS314 (<i>Eco</i> RV)	<i>ROT1</i> (-508~+1022)
pRS316- <i>ROT1</i>	pRS316 (<i>Sac</i> I / <i>Sal</i> I)	<i>ROT1</i> (-508~+1022)
pCL2- <i>ROT1</i>	pCL2 (<i>Spe</i> I/ <i>Cla</i> I)	<i>ROT1</i> (-484~+1117)
pCL2- <i>rot1-2</i>	pCL2 (<i>Spe</i> I / <i>Cla</i> I)	<i>rot1-2</i> (-484~+1117)
pT- <i>ROT1-HA</i>	pGCT10 ^g (<i>Spe</i> I / <i>Pst</i> I)	<i>ROT1</i> (-484~+768)-3HA-stop
pT- <i>rot1-2-HA</i>	pGCT10 (<i>Spe</i> I / <i>Pst</i> I)	<i>rot1-2</i> (-484~+768)-3HA-stop
pRD2	pRS305 (<i>Hin</i> dIII/ <i>Spe</i> I / <i>Sac</i> II)	<i>ROT1</i> (-1764~-114; <i>Spe</i> I/ <i>Hin</i> dIII) (+1023~+2266; <i>Eco</i> RV/ <i>Spe</i> I)
pKCH	pRS303 ^a (<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	<i>CNE1</i> (-1838~-23; <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI) (+1546~+2903; <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)
pKSJH	pRS303 (<i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)	<i>SCJ1</i> (-1200~-1; <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI) (+2270~+3300; <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I)
pLD2	pRS305 (<i>Apa</i> I/ <i>Hin</i> dIII/ <i>Sma</i> I)	<i>LHS1</i> (-1093~-580; <i>Hin</i> dIII/ <i>Apa</i> I) (+1630~+2500; <i>Hpa</i> I/ <i>Hin</i> dIII)
pRS426- <i>CNE1</i>	pRS426 ^a (<i>Not</i> I)	<i>CNE1</i> (-330~+1830)
pRS426- <i>SCJ1</i>	pRS426 (<i>Not</i> I)	<i>SCJ1</i> (-260~+1570)
pL- <i>GFP-ATG8</i>	pANL10 ^b (<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI)	<i>ATG8</i> (+1~+354)
pB- <i>KRE5HA-TRP1</i>	pBluescript II KS+ (<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I)	<i>KRE5</i> (+3628~5095)-3HA-stop- <i>ADH1t-TRP1</i> ^h - <i>KRE5</i> (++)19 ⁱ ~635)
pB- <i>HA-KRE6-CgTRP1</i>	pBluescript II KS+ (<i>Sac</i> I/ <i>Xho</i> I)	<i>KRE6</i> (-1274~-715)- <i>CgTRP1</i> ⁱ - <i>KRE6</i> (-639~-1)- <i>ATG-3HA- KRE6</i> (+1~1485)
pQE- <i>KAR2</i>	pQE80L ^j (<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I)	<i>KAR2</i> (+127~2049)

pQE- <i>ROT1</i>	pQE80L (<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I)	<i>ROT1</i> (+73~+693)
pYEX- <i>RHH</i>	pYEX4T ^c (<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I)	<i>TDH3p</i> (-1037~-7)- <i>ROT1</i> (+1~+693)- <i>HA-His₈-stop</i> - <i>TDH3t</i> (+1967~+2107)

^a 文献(129), ^b First ATG の A を+1、その 5'側の塩基を-1 とする, ^c 文献(130), ^d pRS314-*KAR2* の *KAR2* を *Xho* I で切り出し PCR 増幅した *kar2-1* と入れ換えて pRS314-*kar2-1* とする, ^e Stratagene, ^f pRS314 より PCR で増幅, ^g 文献(131), ^h *ADH1t-TRP1* は pGCT10 より, ⁱ ストップコドン最初の T を++1 とする, ^j *Candida glabrata* の *TRP1* 遺伝子(-631~++148), ^k Qiagen

表 2 本研究に用いた酵母菌株

Strain	Genotype
CH1462 ^a	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 ura3</i>
FY23 ^b	<i>Mata leu2 trp1 ura3</i>
W303-CQ	<i>Mata ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 prc1 ubc7Δ::LEU2</i>
YM5	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2Δ::LEU2</i> (pCUA3K2 ^d)
YM6	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2Δ::LEU2</i> (pCUA3K2)
YM7	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2Δ::HIS3</i> (pCUA3K2, pCL2- <i>kar2-1</i> ^c)
YM8	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2Δ::HIS3</i> (pCUA3K2, pCL2- <i>kar2-1</i>)
YMS58	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2Δ::HIS3 rot1-2</i> (pCUA3K2, pCL2- <i>kar2-1</i>)
YM11	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 kar2Δ::HIS3</i> <i>rot1Δ::LEU2</i> (pCUA3K2, pRS314- <i>ROT1</i> ^f)
YM12	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1Δ::LEU2</i> (pRS316- <i>ROT1</i> ^g)
YM13	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1Δ::LEU2</i> (pGCT10- <i>ROT1-HA</i> ^h)
YM14	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1Δ::LEU2</i> (pGCT10- <i>rot1-2-HA</i>)
YM16	<i>Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i>
YM18	<i>Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1-2</i>
YM19	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1Δ::LEU2</i> (pCL2- <i>ROT1</i>)
YM20	<i>Mata ade2 ade3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1Δ::LEU2</i> (pCL2- <i>rot1-2</i>)
YM27	<i>Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i> <i>KRE5::KRE5-HA-HDEL::TRP1</i>
YM27	<i>Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1-2</i> <i>KRE5::KRE5-HA-HDEL::TRP1</i>
YM41	<i>Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3</i> <i>KRE6::ATG-HA-KRE6::CgTRP1</i>
YM42	<i>Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1-2</i>

KRE6::ATG-HA-KRE6::CgTRP1
 YM43 *Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 ubc7Δ::LEU2*
KRE6::ATG-HA-KRE6::CgTRP1
 YM42 *Mata ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 rot1-2 ubc7Δ::LEU2*
KRE6::ATG-HA-KRE6::CgTRP1

^a from E. Hurt, ^b from F. Winston, ^c from D. Wolf 文献(99), ^d pCUA3K2 (*CEN/ARS ADE3 URA3 KAR2*), ^e pCL2-*kar2-1* (*CEN/ARS LYS2 kar2-1*), ^f pRS314-*ROT1* (*CEN/ARS TRP1 ROT1*), ^g pRS316-*ROT1* (*CEN/ARS URA3 ROT1*), ^h pT-*ROT1-HA* (*CEN/ARS TRP1 ROT1-HA*)

6. 謝辞

研究を行うに当たり、数多くの皆様のお世話になりました。言に表しきれないほどの恩を受けました。ごく簡単な謝辞に済まされるようなことでは到底ないのですが、これからどのような道を歩むにしても河研での日々と数々のご恩を忘れぬよう、記します。

特に河 教授には、自 なる研究環境と 外なまでに多大なご支援を えて頂きました。先生はどんなときにも、忍耐と寛恕の心を持って私を見守り、 まして下さいました。 い研究をすることだけを思っ て みました が、結果的に先生のご厚意に甘えたままご恩 しても出 ず、 当に申し なく思います。

行 先生にも、折りに触れて色々とお気遣い頂きました。特に 作成にあたっては大 お世 になり、多くを学ばせて頂きました。

また、河 研の構成員皆さんのおかげで楽しんで研究を進めることができました。 い仲間に恵まれて幸せでした。特に細田章君は長年の仲間でした、色々ありがとうございます。技術 佐の前川 美さん、松村美樹さんらには実験 助の でも大 お世 になりました。増田尚代さんには、抗体作製に当たってご尽 頂きました。影山浩司君は *kar2-1* 合成致死 異株の 異遺伝子同定を行ってくれました。十 なる指導が出 ず申し なく思います。

電子顕微鏡観察は東京大学大学院新 域創成科学研究科の 田愛子先生にお願いしました。また、精製 N-結合型糖鎖は 古屋市 大学の加藤晃一先生にご供 いただきました。

(株)飯田 会長 飯田祐子様には、苦境に陥った際に住居を御貸与頂きました。ご厚意で文字通り救われました。

こんな息子のありのままを認めてくれる に感謝します。

みなさんのご恩を忘れずに励みます。ありがとうございました。

7. 参 考 献

1. Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
2. Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-9.
3. Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-8.
4. Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-66.
5. Rassow, J., Von Ahsen, O., Bomer, U., and Pfanner, N. (1997) Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends Cell Biol* 7, 129-133.
6. Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., and Hendrickson, W.A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-14.
7. Wei, J., Gaut, J.R., and Hendershot, L.M. (1995) In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 270, 26677-82.
8. Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M., and Sousa, R. (2005) Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell* 20, 513-24.
9. Kelley, W.L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* 23, 222-7.
10. Cyr, D.M., Langer, T., and Douglas, M.G. (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* 19, 176-81.
11. Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J* 20, 1042-50.
12. Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5452-7.
13. Misselwitz, B., Staeck, O., and Rapoport, T.A. (1998) J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell* 2, 593-603.
14. Lu, Z. and Cyr, D.M. (1998) The conserved carboxyl terminus and zinc

- finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J Biol Chem* 273, 5970-8.
15. Corsi, A.K. and Schekman, R. (1997) The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 137, 1483-93.
 16. Brodsky, J.L., Goeckeler, J., and Schekman, R. (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9643-6.
 17. Simons, J.F., Ferro-Novick, S., Rose, M.D., and Helenius, A. (1995) BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J Cell Biol* 130, 41-9.
 18. Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-64.
 19. Brehmer, D., Rudiger, S., Gassler, C.S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2001) Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol* 8, 427-32.
 20. Chung, K.T., Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2002) BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* 277, 47557-63.
 21. Kabani, M., McLellan, C., Raynes, D.A., Guerriero, V., and Brodsky, J.L. (2002) HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS Lett* 531, 339-42.
 22. Kabani, M., Beckerich, J.M., and Gaillardin, C. (2000) Sls1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 20, 6923-34.
 23. Kabani, M., Beckerich, J.M., and Brodsky, J.L. (2002) Nucleotide exchange factor for the yeast hsp70 molecular chaperone ssa1p. *Mol Cell Biol* 22, 4677-89.
 24. Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.C., Tzvetkov, N., Young, J.C., Brodsky, J.L., Guerriero, V., Hartl, F.U., and Bracher, A. (2005) Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol Cell* 17, 367-79.
 25. Steel, G.J., Fullerton, D.M., Tyson, J.R., and Stirling, C.J. (2004) Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science* 303, 98-101.
 26. Takayama, S. and Reed, J.C. (2001) Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol* 3, E237-41.

27. Hohfeld, J. and Jentsch, S. (1997) GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *Embo J* 16, 6209-16.
28. Gassler, C.S., Wiederkehr, T., Brehmer, D., Bukau, B., and Mayer, M.P. (2001) Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem* 276, 32538-44.
29. Terada, K. and Mori, M. (2000) Human DnaJ homologs dj2 and dj3, and bag-1 are positive cochaperones of hsc70. *J Biol Chem* 275, 24728-34.
30. Tyson, J.R. and Stirling, C.J. (2000) *LHS1* and *SIL1* provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 19, 6440-52.
31. Hohfeld, J., Minami, Y., and Hartl, F.U. (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83, 589-98.
32. Nollen, E.A., Kabakov, A.E., Brunsting, J.F., Kanon, B., Hohfeld, J., and Kampinga, H.H. (2001) Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. *J Biol Chem* 276, 4677-82.
33. Irmer, H. and Hohfeld, J. (1997) Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone Hip. *J Biol Chem* 272, 2230-5.
34. Velten, M., Gomez-Vrielynck, N., Chaffotte, A., and Ladjimi, M.M. (2002) Domain structure of the HSC70 cochaperone, HIP. *J Biol Chem* 277, 259-66.
35. Frydman, J. and Hohfeld, J. (1997) Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci* 22, 87-92.
36. Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D., and Toft, D.O. (1998) Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem* 273, 3679-86.
37. Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y., and Patterson, C. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 19, 4535-45.
38. Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J., and Patterson, C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3, 93-6.
39. Demand, J., Alberti, S., Patterson, C., and Hohfeld, J. (2001) Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* 11, 1569-77.
40. Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Hohfeld, J., and Patterson, C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase:

- identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 276, 42938-44.
41. Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3, 100-5.
 42. Dai, Q., Qian, S.B., Li, H.H., McDonough, H., Borchers, C., Huang, D., Takayama, S., Younger, J.M., Ren, H.Y., Cyr, D.M., and Patterson, C. (2005) Regulation of the cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J Biol Chem* 280, 38673-81.
 43. Alberti, S., Bohse, K., Arndt, V., Schmitz, A., and Hohfeld, J. (2004) The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* 15, 4003-10.
 44. Hohfeld, J., Cyr, D.M., and Patterson, C. (2001) From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* 2, 885-90.
 45. Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-91.
 46. Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-8.
 47. Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S., and Brodsky, J.L. (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35, 149-91.
 48. Sitia, R. and Braakman, I. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891-4.
 49. Hammond, C. and Helenius, A. (1994) Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* 266, 456-8.
 50. Kim, P.S. and Arvan, P. (1995) Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 128, 29-38.
 51. Kuznetsov, G., Chen, L.B., and Nigam, S.K. (1997) Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 272, 3057-63.
 52. Kowarik, M., Kung, S., Martoglio, B., and Helenius, A. (2002) Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 10, 769-78.
 53. Melnick, J., Dul, J.L., and Argon, Y. (1994) Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic

- reticulum. *Nature* 370, 373-5.
54. Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T., and Hendershot, L.M. (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 13, 4456-69.
 55. Muresan, Z. and Arvan, P. (1997) Thyroglobulin transport along the secretory pathway. Investigation of the role of molecular chaperone, GRP94, in protein export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 272, 26095-102.
 56. Stronge, V.S., Saito, Y., Ihara, Y., and Williams, D.B. (2001) Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J Biol Chem* 276, 39779-87.
 57. Tatu, U. and Helenius, A. (1997) Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 136, 555-65.
 58. Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.N., and Simons, J.F. (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* 7, 193-200.
 59. Ihara, Y., Cohen-Doyle, M.F., Saito, Y., and Williams, D.B. (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol Cell* 4, 331-41.
 60. Ritter, C., Quirin, K., Kowarik, M., and Helenius, A. (2005) Minor folding defects trigger local modification of glycoproteins by the ER folding sensor GT. *EMBO J* 24, 1730-8.
 61. Freedman, R.B., Klappa, P., and Ruddock, L.W. (2002) Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO Rep* 3, 136-40.
 62. Hosoda, A., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2003) JPDI, a novel endoplasmic reticulum-resident protein containing both a BiP-interacting J-domain and thioredoxin-like motifs. *J Biol Chem* 278, 2669-76.
 63. Kalies, K.U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kroger, H., and Romisch, K. (2005) The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* 24, 2284-93.
 64. Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2, 415-22.
 65. Nakatsukasa, K., Nishikawa, S., Hosokawa, N., Nagata, K., and Endo, T.

- (2001) Mnl1p, an alpha -mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J Biol Chem* 276, 8635-8.
66. Buschhorn, B.A., Kostova, Z., Medicherla, B., and Wolf, D.H. (2004) A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett* 577, 422-6.
 67. Szathmary, R., Biemann, R., Nita-Lazar, M., Burda, P., and Jakob, C.A. (2005) Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell* 19, 765-75.
 68. Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J., and Aebi, M. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* 142, 1223-33.
 69. Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* 57, 1223-36.
 70. Rose, M.D., Misra, L.M., and Vogel, J.P. (1989) KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* 57, 1211-21.
 71. Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goekeler, J.L., Kruse, K.B., and McCracken, A.A. (1999) The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* 274, 3453-60.
 72. Kimata, Y., Kimata, Y.I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I.C., Takeuchi, M., Rose, M.D., and Kohno, K. (2003) Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell* 14, 2559-69.
 73. Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004) A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol* 167, 445-56.
 74. Plemper, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-5.
 75. Simons, J.F., Ebersold, M., and Helenius, A. (1998) Cell wall 1,6-beta-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J* 17, 396-405.
 76. te Heesen, S. and Aebi, M. (1994) The genetic interaction of kar2 and wbp1 mutations. Distinct functions of binding protein BiP and N-linked

- glycosylation in the processing pathway of secreted proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 222, 631-7.
77. Shen, Y., Meunier, L., and Hendershot, L.M. (2002) Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem* 277, 15947-56.
 78. Skowronek, M.H., Rotter, M., and Haas, I.G. (1999) Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol Chem* 380, 1133-8.
 79. Kaiser, C., Michaelis, S., and Mitchell, A., *Methods in Yeast Genetics*. 1994, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 234.
 80. Russell, D.W., Jensen, R., Zoller, M.J., Burke, J., Errede, B., Smith, M., and Herskowitz, I. (1986) Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* HO gene and analysis of its upstream regulatory region. *Mol Cell Biol* 6, 4281-94.
 81. Higashio, H., Kimata, Y., Kiriyama, T., Hirata, A., and Kohno, K. (2000) Sfb2p, a yeast protein related to Sec24p, can function as a constituent of COPII coats required for vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 17900-8.
 82. Scidmore, M.A., Okamura, H.H., and Rose, M.D. (1993) Genetic interactions between *KAR2* and *SEC63*, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 4, 1145-59.
 83. Takatsuki, A., Kohno, K., and Tamura, G. (1975) Inhibition of biosynthesis of polyisoprenol sugars in chick embryo microsomes by tunicamycin. *Agric. Biol. Chem.* 39, 2089-2091.
 84. Paidhungat, M. and Garrett, S. (1998) Cdc1 and the vacuole coordinately regulate Mn²⁺ homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 1787-98.
 85. Montijn, R.C., Vink, E., Muller, W.H., Verkleij, A.J., Van Den Ende, H., Henrissat, B., and Klis, F.M. (1999) Localization of synthesis of beta1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 7414-20.
 86. Bickle, M., Delley, P.A., Schmidt, A., and Hall, M.N. (1998) Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *Embo J* 17, 2235-45.
 87. Machi, K., Azuma, M., Igarashi, K., Matsumoto, T., Fukuda, H., Kondo, A., and Ooshima, H. (2004) Rot1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6-beta-glucan. *Microbiology* 150, 3163-73.

88. YaDeau, J.T., Klein, C., and Blobel, G. (1991) Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the *SEC11* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 517-21.
89. Baxter, B.K., James, P., Evans, T., and Craig, E.A. (1996) *SS11* encodes a novel Hsp70 of the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 16, 6444-56.
90. Song, Y., Azakami, H., Shamima, B., He, J., and Kato, A. (2002) Different effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of two glycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Lett* 512, 213-7.
91. Xu, X., Kanbara, K., Azakami, H., and Kato, A. (2004) Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a calnexin homologue. *J Biochem (Tokyo)* 135, 615-8.
92. Nishikawa, S. and Endo, T. (1997) The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion. *J Biol Chem* 272, 12889-92.
93. Nishikawa, S.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., and Endo, T. (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* 153, 1061-70.
94. Nishikawa, S. and Endo, T. (1998) Reinvestigation of the functions of the hydrophobic segment of Jem1p, a yeast endoplasmic reticulum membrane protein mediating nuclear fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 785-9.
95. Craven, R.A., Egerton, M., and Stirling, C.J. (1996) A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J* 15, 2640-50.
96. Saris, N., Holkeri, H., Craven, R.A., Stirling, C.J., and Makarow, M. (1997) The Hsp70 homologue Lhs1p is involved in a novel function of the yeast endoplasmic reticulum, refolding and stabilization of heat-denatured protein aggregates. *J Cell Biol* 137, 813-24.
97. Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R., and Silver, P.A. (1995) A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol* 129, 979-88.
98. Silberstein, S., Schlenstedt, G., Silver, P.A., and Gilmore, R. (1998) A role for the DnaJ homologue Scj1p in protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 143, 921-33.
99. Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M., and Wolf, D.H. (1996) ER

- degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-8.
100. Vashist, S. and Ng, D.T. (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 165, 41-52.
 101. Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J., and Mori, K. (1993) The promoter region of the yeast *KAR2* (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 13, 877-90.
 102. Schroder, M., Clark, R., and Kaufman, R.J. (2003) *IRE1*- and *HAC1*-independent transcriptional regulation in the unfolded protein response of yeast. *Mol Microbiol* 49, 591-606.
 103. Kimata, Y., Lim, C.R., Kiriya, T., Nara, A., Hirata, A., and Kohno, K. (1999) Mutation of the yeast epsilon-COP gene *ANU2* causes abnormal nuclear morphology and defects in intracellular vesicular transport. *Cell Struct Funct* 24, 197-208.
 104. Nakatsukasa, K., Okada, S., Umebayashi, K., Fukuda, R., Nishikawa, S., and Endo, T. (2004) Roles of O-mannosylation of aberrant proteins in reduction of the load for endoplasmic reticulum chaperones in yeast. *J Biol Chem* 279, 49762-72.
 105. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119, 301-11.
 106. Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* 147, 435-46.
 107. Holst, B., Bruun, A.W., Kielland-Brandt, M.C., and Winther, J.R. (1996) Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 15, 3538-46.
 108. Stevens, T., Esmon, B., and Schekman, R. (1982) Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell* 30, 439-48.
 109. Orlean, P., *Biogenesis of Yeast Wall and Surface Components*, in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, P.J. R., B.J. R., and J.E. W., Editors. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 229-362.
 110. Levinson, J.N., Shahinian, S., Sdicu, A.M., Tessier, D.C., and Bussey, H. (2002) Functional, comparative and cell biological analysis of

- Saccharomyces cerevisiae* Kre5p. *Yeast* 19, 1243-59.
111. Azuma, M., Levinson, J.N., Page, N., and Bussey, H. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* Big1p, a putative endoplasmic reticulum membrane protein required for normal levels of cell wall beta-1,6-glucan. *Yeast* 19, 783-93.
 112. 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, 843-56.
 113. Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A., and Bussey, H. (1994) Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol* 127, 567-79.
 114. Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., and Yura, T. (2000) mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4660-5.
 115. Kimura, Y., Hess, D., and Sturm, A. (1999) The N-glycans of jack bean alpha-mannosidase. Structure, topology and function. *Eur J Biochem* 264, 168-75.
 116. Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J.J., and Thomas, D.Y. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem* 270, 244-53.
 117. Dalley, J.A. and Bulleid, N.J. (2003) The endoplasmic reticulum (ER) translocon can differentiate between hydrophobic sequences allowing signals for glycosylphosphatidylinositol anchor addition to be fully translocated into the ER lumen. *J Biol Chem* 278, 51749-57.
 118. Roberg, K.J., Rowley, N., and Kaiser, C.A. (1997) Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 137, 1469-82.
 119. Hamilton, T.G., Norris, T.B., Tsuruda, P.R., and Flynn, G.C. (1999) Cer1p functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 5298-307.
 120. Egan, M.E., Pearson, M., Weiner, S.A., Rajendran, V., Rubin, D., Glockner-Pagel, J., Canny, S., Du, K., Lukacs, G.L., and Caplan, M.J. (2004) Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304, 600-2.

121. Spear, E.D. and Ng, D.T. (2003) Stress tolerance of misfolded carboxypeptidase Y requires maintenance of protein trafficking and degradative pathways. *Mol Biol Cell* 14, 2756-67.
122. Ng, D.T., Spear, E.D., and Walter, P. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol* 150, 77-88.
123. Winther, J.R., Stevens, T.H., and Kielland-Brandt, M.C. (1991) Yeast carboxypeptidase Y requires glycosylation for efficient intracellular transport, but not for vacuolar sorting, *in vivo* stability, or activity. *Eur J Biochem* 197, 681-9.
124. Sha, B., Lee, S., and Cyr, D.M. (2000) The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. *Structure Fold Des* 8, 799-807.
125. Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P., and Paganetti, P. (2003) Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299, 1397-400.
126. Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., and Nagata, K. (2003) EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299, 1394-7.
127. Schubert, C. and Buchberger, A. (2005) Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7, 999-1006.
128. Jakob, C.A., Burda, P., te Heesen, S., Aebi, M., and Roth, J. (1998) Genetic tailoring of N-linked oligosaccharides: the role of glucose residues in glycoprotein processing of *Saccharomyces cerevisiae in vivo*. *Glycobiology* 8, 155-64.
129. Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
130. Wimmer, C., Doye, V., Grandi, P., Nehrbass, U., and Hurt, E.C. (1992) A new subclass of nucleoporins that functionally interact with nuclear pore protein NSP1. *EMBO J* 11, 5051-61.
131. Iha, H. and Tsurugi, K. (1998) Shuttle-vector system for *Saccharomyces cerevisiae* designed to produce C-terminal-Myc-tagged fusion proteins. *Biotechniques* 25, 936-8.

論文目録

推薦教員	バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座 河野 憲二 教授		
氏名	竹内 雅人	提出	平成18年 1月30日
学位論文の主たる部分を公表した論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)			
<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rot1p is an ER-localized membrane protein that may function with BiP/Kar2p in protein folding.</p> <p>Masato Takeuchi, Yukio Kimata, Aiko Hirata, Masahiro Oka and Kenji Kohno. 2006. <i>Journal of Biochemistry</i>. 139 (3) in press.</p>			
参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)			
<p>Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins.</p> <p>Yukio Kimata, Yuki I. Kimata, Yusuke Shimizu, Hiroshi Abe, Ileana C. Farcasanu, Masato Takeuchi, Mark D. Rose, Kenji Kohno. 2003. <i>Molecular Biology of the Cell</i>. 14 (6) 2559-2569.</p> <p>An essential dimer-forming subregion of the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1.</p> <p>Daisuke Oikawa, Yukio kimata, Masato Takeuchi and Kenji Kohno. 2005. <i>Biochemical Journal</i>. 391 Pt1 135-142</p>			