

## 論文内容の要旨

申請者氏名 竹内雅人

DNA の遺伝情報から機能的な蛋白質を作るためには、正確な転写と翻訳に続き、ポリペプチド鎖の適切な三次元構造形成(折り畳み)が必要である。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。細胞内では、分子シャペロンと総称される多様な蛋白質群が新生ポリペプチド鎖の成熟を補助している。

Hsp70(heat shock protein of 70kDa)ファミリー蛋白質は最も主要な分子シャペロンであり、様々な補助因子と協調することで多彩な機能を発揮する。小胞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、小胞体内在性 Hsp70(BiP/Kar2p)の果たす役割は数多いと考えられる。しかし、BiP/Kar2p の補助因子に関する知見は乏しい。本研究は小胞体内腔での蛋白質折り畳み補助機構の解明を目指し、Kar2p の新規補助因子の同定を試み、候補蛋白質 Rot1p の機能解析を行った。

まず出芽酵母遺伝学を用いて Kar2p 新規補助因子の同定を試みた。Kar2p のペプチド結合領域の変異である *kar2-1* と合成致死を示す変異株のスクリーニングを行い、8 クローンの合成致死変異株を取得、そのなかで小胞体シャペロン関連としては新規な遺伝子である *ROT1* についての詳細な解析を行った。Rot1p は全長 256 アミノ酸残基からなる小胞体内腔に局在する糖蛋白質で、本研究で取得した *rot1-2* 変異株では、unfolded protein response が恒常的に活性化されていた。さらに、*ROT1* は *KAR2* の他にも幾つかの小胞体品質管理機構遺伝子と遺伝学的相互作用を示し (*CNE1*, *LHS1*, *SCJ1*, *UBC7*)、*rot1-2* 変異株の電子顕微鏡観察を行ったところ、細胞壁が肥厚化し、小胞体が増加していた。このことから細胞壁の  $\beta$ -1,6-グルカン合成に重要な蛋白質である Kre5p, Kre6p の成熟に関与する可能性が示唆された。*rot1-2* 変異株では Kre5p, Kre6p が共に激減していた。pulse-chase 実験により、Kre6p が小胞体関連分解経路により合成直後に分解されていること、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 は小胞体で少なくとも Kre6p の分子シャペロンとして機能していると考えられる。

次に組み換え 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-His<sub>6</sub> タグと入れ換えた Rot1p(1-235)-HAHis<sub>6</sub> を酵母で過剰発現させ、細胞抽出液から Ni-NTA 及びゲル濾過を用いて精製した。 $\alpha$ -Mannosidase( $\alpha$ -Man)を基質として、変性蛋白質の凝集を防ぐシャペロン活性を測定したところ、Rot1p は効率よく変性  $\alpha$ -Man の凝集を防止した。Citrate synthase を基質とした場合にも Rot1p はシャペロン活性を示したが、 $\alpha$ -Man の場合よりも低効率であった。

本研究は、遺伝学的手法により Kar2p と共に蛋白質成熟を補助する新規因子を探索し、細胞の増殖にとって必須な遺伝子 *ROT1* を同定した。そして、機能未知であった Rot1p 自身が小胞体局在の分子シャペロンであることを示した。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 竹内雅人

本論文は、小胞体内腔での蛋白質のフォールディングに関し大きな役割を果たしている小胞体シャペロン BiP/Kar2p の補助因子を酵母遺伝学を利用して探索し、新しい機能未知の Rot1p を同定するとともに、Rot1p が小胞体局在の分子シャペロンであり、代表的な小胞体シャペロンである BiP/Kar2p と協調して働く補助因子でもあることを示したものである。申請者は以下の3点を明らかにした。

- (1) 主要な小胞体シャペロン BiP/Kar2p の高温感受性変異株 *kar2-1* と合成致死を示す変異株のスクリーニングを行い、*ROT1* 変異株を取得した。*ROT1* 遺伝子は増殖に必須な小胞体に局在する膜蛋白質で、他の小胞体シャペロン遺伝子 (*CNE1*, *LHS1*, *SCJ1*, *UBC7*) とともに遺伝学的相互作用を示すこと、*rot1-2* 変異株では、UPR(unfolded protein response) が恒常的に活性化されていること、細胞壁が肥厚化し小胞体が増加していること、小胞体の異常な構造が観察されること、などから Rot1p が小胞体品質管理機構に関与していることが示唆された。
- (2) 細胞壁の  $\beta$ -1,6-グルカン合成に重要な蛋白質 Kre6p の成熟を調べたところ、*rot1-2* 変異株では Kre6p が小胞体関連分解により激減していること、Rot1p は Kre6p に一過的に結合していることから、Rot1p は Kre6p の分子シャペロンとして働いている可能性が高いことを示した。
- (3) さらに組換え Rot1p を酵母から精製し *in vitro* の機能解析を行ったところ、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様シャペロンの1つであることを支持する結果を得た。

以上のように、本論文は小胞体内で働く新規のシャペロンであり、BiP/Kar2p の補助因子ともなる Rot1p の機能を初めて明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。