

***In vitro*에서 핵산치환인자 BAP이 단백질-분자 샤페론 복합체 해리에 미치는 영향**이명주 · 김동은<sup>1</sup> · 이태호<sup>2</sup> · 정영기<sup>3</sup> · 김영희 · 정경태\*동의대학교 생명융합학과, <sup>1</sup>동의대학교 생명공학과, <sup>2</sup>부산대학교 미생물학과, <sup>3</sup>동아대학교 생명공학과

Received February 1, 2006 / Accepted April 7, 2006

**A Nucleotide Exchange Factor, BAP, dissociated Protein-Molecular Chaperone Complex *in vitro*.** Myoung-Joo Lee, Dong-Eun Kim<sup>1</sup>, Tae Ho Lee<sup>2</sup>, Yong-Kee Jeong<sup>3</sup>, Young-Hee Kim, Kyung Tae Chung\*. Department of Life Science and <sup>1</sup>Biotechnology, Dong-Eui University, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Busan National University, Busan, <sup>3</sup>Dong-A University, Busan, Korea – Molecular chaperones and folding enzymes in the endoplasmic reticulum (ER) associate with the newly synthesized proteins to prevent their aggregation and help them fold and assemble correctly. Chaperone function of BiP, which is a Hsp70 homologue in ER, is controlled by the N-terminal ATPase domain. The ATPase activity of the ATPase domain is affected by regulatory factors. BAP was identified as a nucleotide exchange factor of BiP (Grp78), which exchanges ADP with ATP in the ATPase domain of BiP. This study presents whether BAP can influence folding of a protein, immunoglobulin heavy chain that is bound to BiP tightly. We first examined which nucleotide of ADP and ATP affects on BAP binding to BiP. The data showed that endogenous BAP of HEK293 cells prefers ADP for binding to BiP *in vitro*, suggesting that BAP first releases ADP from the ATPase domain in order to exchange with ATP. Immunoglobulin heavy chain, an unfolded protein substrate, was released from BiP in the presence of BAP but not in the presence of ERdj3, which is another regulatory factor for BiP accelerating the rate of ATP hydrolysis of BiP. The ADP-releasing function of BAP was, therefore, believed to be responsible for immunoglobulin heavy chain release from BiP. Grp170, another Hsp70 homologue in ER, did not co-precipitated with BAP from [<sup>35</sup>S]-metabolic labeled HEK293 lysate containing both overexpressed Grp170 and BAP. These data suggested that BAP has no specificity to Grp170 although the ATPase domains of Grp170 and BiP are homologous each other.

**Key words** – BiP, BAP, Grp170, molecular chaperone, protein folding

**서 론**

소포체(Endoplasmic reticulum, ER)는 세포막의 합성뿐만 아니라 세포막에 존재하거나 세포외로 분비되어야 할 단백질을 합성하는 세포내 소기관이다. 세포질과는 달리 소포체에서 단백질이 새로 합성되어질 경우 disulfide bond가 형성되고 glycosylation 등의 수식이 일어나며 이와 동시에 folding과 assembly과정이 folding enzyme과 molecular chaperone의 도움을 받아 이루어진다[6]. BiP (Immunoglobulin binding protein 또는 Grp78)은 Pre-B cell에서 생산되는 면역글로불린 heavy chain에 결합되어진 단백질로서 발견되었다[11]. BiP은 소포체 내에 존재하는 Hsp70 homologue로서 가장 많이 연구되어진 분자 chaperone 중의 하나로서[7] 다기능을 가지며 ER quality control에 관여하고 있다[2,3,9,15]. BiP의 다기능은 N-terminus쪽의 ATPase domain에 의한 ATP 가수분해가 일어나 C-terminus쪽의 substrate binding domain에 영향을 줌으로서 수행되는 것으로 알려져 있다[8, 18]. ATP가 가수분해되어 발생한 에너지가 ATPase domain의 구조 변형, 연차적으

로 substrate domain의 구조 변형으로 전달되며, 이 전달된 에너지는 substrate domain이 결합되어 있는 unfolded 단백질에 영향을 줌으로서 unfolded 단백질에서 folded 단백질로의 전환을 일으킨다고 추측되어지나 아직 정확한 연구결과는 보고되어 있지 않다. 따라서 BiP의 chaperone기능은 ATPase domain 기능에 의해 조절된다고 할 수 있는데 이 조절작용에 대한 연구는 최근에야 활발하게 진행되고 있다. 그 이유로는 Hsp70과는 달리 BiP의 조절인자는 오랫동안 ATP hydrolysis를 촉진하는 DnaJ homologue인 ERdj를 제외하고는 다른 조절인자가 전혀 밝혀져 있지 않았으며[14], 새로운 조절인자로는 최근에 BAP이 처음으로 발견되었기 때문이다. BAP (BiP Associated Protein)은 BiP의 핵산치환조절인자로서 yeast-two hybrid 방법을 통하여 BiP의 ATPase domain과 결합하는 단백질로 분리되었다[4]. BAP은 BiP의 ATPase domain에 결합되어져 있는 ADP를 ATP로 치환하는 기능을 가지며, 이 치환의 결과로 ATP 가수분해가 촉진되는 것으로 현재 알려져 있다. BAP에 돌연변이가 유발되면 BAP의 돌연변이가 세포내 단백질 축적으로 세포 병리적 현상을 유발하는 것으로 보고되어 BAP의 세포내 기능의 중요성을 유추할 수 있다. BAP의 핵산치환 기능은 BiP과 단백질 기질이 결합되어 있을 때 단백질 기질의 folding에 영향을 줄 것이라고 생각이 되어진다. 그 이유는 BiP에 결합되어져 있는 ADP를 친화도에 따라

**\*Corresponding author**

Tel : +82-51-890-1520, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : kchung@mail.deu.ac.kr

치환시키는 ATP 포화 상태에서 unfold 기질 단백질이 BiP으로부터 해리되어 성숙되지 못한 상태에서 응집되는 것으로 보고되어 있기 때문에 핵산의 치환이 단백질의 성숙과 직접적인 관련이 있을 것으로 여겨진다[17]. 그러나 현재까지 BAP에 의한 핵산치환이 unfold 기질 단백질의 해리를 유발하는지에 대한 연구는 보고되어 있지 않다.

본 연구는 B lymphoma와 COS-1 세포에서 생산한 면역글로블린 heavy chain-BiP 복합체를 사용하여 BAP이 unfold 단백질인 면역글로블린 heavy chain을 BiP으로부터 해리시킬 수 있다는 결과를 보여주고 있다. Grp170은 BiP과 같이 ER에 존재하는 또 하나의 Hsp70 homologue로 면역글로블린 heavy chain과 단백질 복합체를 형성하며[12], ATPase domain을 가지고 있다[5]. 그러나 다른 Hsp70 homologue chaperone과는 달리 Grp170의 기능적 연구는 매우 부족하다. 따라서 Grp170의 기능 연구를 위하여 BiP과 결합을 하는 BAP이 BiP 상동성 molecular chaperone인 Grp170과의 결합 특이성이 있는지에 대한 연구결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### Cell lines

본 실험에서는 mammalian cell line HEK293, mouse B lymphoma Ag8(8), COS-1을 사용하였다. HEK293과 COS-1 cell은 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 unit/ml penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 완전 배지를 사용하였고, Ag8(8)은 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 unit/ml penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI-1640 완전배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다.

### In vitro에서 BAP의 핵산 의존적 BiP과의 결합

Histidine tag이 붙은 recombinant BiP 2 µg [7,18]과 20 µl Ni<sup>2+</sup>-agarose bead (Qiagen, Germany)를 섞은 후에 각각 10 µM의 ATP와 ADP를 첨가하여 4°C에서 1시간 반응시켰다. COS-1 세포를 500 µl HEPES 완충액(20 mM Hepes, 0.5% Triton X-100, 5% glycerol, pH 7.2)으로 파쇄하고 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 세포파쇄액 200 µl에 10 mM ATP와 ADP를 첨가한 후 recombinant BiP이 결합된 Ni<sup>2+</sup>-agarose bead에 첨가하여 세포 내 BAP이 BiP에 결합되도록 4°C에서 1시간 더 반응시켰다. 반응 후 100 µM ATP 또는 ADP 함유 HEPES 완충액으로 bead를 3번 세척한 후 SDS-PAGE로 단백질 분리하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 transfer하여 토끼 anti-BiP과 anti-BAP 항체로 western blot을 하였다.

### BiP으로부터 면역글로블린 heavy chain 해리 분석

B lymphoma Ag8(8) 세포 또는 BiP과 면역글로블린 heavy

chain cDNA를 갈습침전방법으로 transfection한 COS-1 세포를 1 ml NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 0.5% Nonidet P-40)를 사용하여 파쇄하였다. 세포파쇄액에 10 µl protein A-agarose bead (50% w/v)를 첨가하여 BiP-면역글로블린 heavy chain 복합체를 침전시켰다. 침전된 복합체에 본문에서 명기한 여러 조절인자들을 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 SDS-PAGE로 복합체를 분리하고 Coomassie blue 염색을 하여 BiP-면역글로블린 heavy chain 복합체의 변화를 분석하였다.

### Ca 침전에 의한 DNA transfection

HEK293 세포 3×10<sup>6</sup> cells을 100 mm 배양접시에 배양하여 1.8 ml Hepes buffered saline (pH 7.11), 6 µg DNA, 50 µg carrier DNA (salmon testes DNA, Sigma), 120 µl 2 M CaCl<sub>2</sub>를 혼합한 후 30분 동안 실온에 둔 뒤 배양세포에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 48시간 후에 세포를 회수하여 실험에 사용하였다[1].

### Metabolic labeling과 cross-link

HEK293 세포를 상기의 방법과 같이 transfection 한 후 18 시간 동안 pro-mix L-[<sup>35</sup>S] in vitro cell labeling mix (300 µCi, Amersham-Pharmacia)를 사용하여 metabolic labeling을 하였다. [<sup>35</sup>S] labeling이 된 cell을 PBS로 3회 세척 후 30 µl cross-linking agent인 Dithiobis[succinimidyl]propionate (DSP, 5 mg/ml, Pierce, USA)를 넣은 후 1시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 100 µl 1 M glycine을 첨가하여 4°C에서 15분 동안 cross-linking을 종결하였다. Cross-linking이 종결된 세포를 1 ml NP-40 lysing buffer에 현탁하여 20분간 4°C에서 방치하여 파쇄한 후 13,000 rpm으로 원심분리를 하여 세포파쇄액을 회수하였다.

### BAP과 Grp170 결합분석

DSP 처리 후 얻은 세포파쇄액을 본 실험실에서 제조한 10 µl 토끼 anti-BAP과 anti-Grp170 항체를 사용하여 4°C에서 2 시간 동안 면역침강을 실시하였다. 면역침강된 단백질을 10% SDS polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 하고, 분리된 단백질을 150 mA 조건에서, 3시간동안 nitrocellulose membrane에 흡착시킨 후 X-ray film에 노출하였다. 또한 whole cell lysate는 SDS-PAGE로 분리한 후 동일한 항체를 사용하여 western blot 방법으로 BAP과 Grp170의 발현을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### BiP과 Grp170에 대한 BAP의 결합특이성

세포체 내에는 BiP 외에도 다른 Hsp70 homologue인 Grp170이 존재한다. 두 chaperone은 같은 Hsp70 family로서

ATPase domain의 상동성이 높다. 따라서 BAP이 BiP에 결합하듯이 Grp170에도 결합할 가능성이 높다고 생각할 수 있다. Grp170을 BAP과 함께 HEK293 cell에 co-transfection시키고 세포내에서 형성되었을 단백질 복합체를 안정하게 분리하기 위하여 [<sup>35</sup>S]로 metabolic labeling을 한 후 DSP를 사용하여 cross-linking을 하고 세포를 파쇄하였다. 토끼 anti-Grp170과 anti-BAP 항체를 사용하여 면역침강되어진 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer하여 그 membrane을 X-ray film에 노출시켜 BAP과 Grp170이 서로 결합하는지를 알아보았다(Fig. 1). Negative control로 사용한 벡터만을 transfection 한 경우(Fig. 1A, lane 1) endogenous Grp170이 아주 희미하게 나타났으며, Grp170과 BAP만을 각각 transfection시킨 후 anti-Grp170과 anti-BAP 항체를 각각 사용하여 면역침강 하였을 경우(lane 2, 5) Grp170과 BAP이 침강되었다. Grp170과 BAP을 함께 co-transfection시켜 얻은 세포파쇄액을 anti-Grp170 또는 anti-BAP 항체를 각각 사용하여 침강하였을 경우 Grp170과 BAP

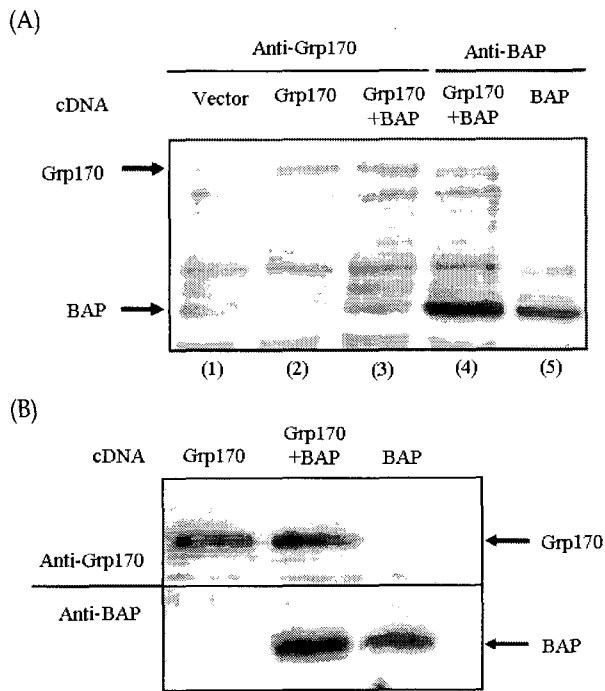


Fig. 1. Co-immunoprecipitation assay of Grp170 and BAP. (A) cDNAs of BAP and Grp170, a Hsp70 homologue in ER, were co-transfected in HEK293 cells. Transfected cells were metabolic-labeled with 300  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S] for 18 hrs. Immunoprecipitation was done with rabbit anti-Grp170 and anti-BAP polyclonal antibodies. Precipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane which was then autoradiographed. (B) Western blot analysis of whole cell lysates. Whole cell lysates, which were obtained from indicated cDNA transfected cells, were analyzed with anti-Grp170 and anti-BAP antibodies.

이 동시에 나타나지 않았다(lane 3, 4). Fig. 1B에서 보는 것과 같이 western blot 하였을 때 co-transfection한 세포에서 Grp170과 BAP의 발현이 정상임을 확인할 수 있었다. 따라서 소포체 내에 존재하는 Hsp70 homologue인 BiP과 Grp170은 ATPase domain에 상동성을 가지고 있으나 BAP은 Grp170과는 결합을 하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이는 Grp170의 ATPase는 아마도 BAP과는 다른 조절인자가 필요하다는 가능성을 열어두며 Grp170과 BiP의 기능 및 조절작용이 다를 수 있다.

### BAP의 ADP 의존적 BiP과의 결합

3개의 histidine이 BiP의 N-terminus에 연결된 recombinant BiP 단백질을 Ni<sup>2+</sup>-agarose bead에 흡착시켜 ATP와 ADP를 BiP의 농도보다 과량으로 첨가하여 BiP이 ATP 또는 ADP와 포화상태로 결합하도록 하였다. ATP-BiP 또는 ADP-BiP에 COS-1 세포파쇄액을 첨가하여 세포내에 존재하는 BAP이 ATP 또는 ADP가 결합된 어떤 BiP과 더 잘 결합하는지를 조사하였다. Ni<sup>2+</sup>-agarose bead에 흡착된 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후 anti-BAP 항체를 사용하여 결합된 BAP의 상대적 양을 비교하였다. Ni<sup>2+</sup>-agarose bead에 흡착된 BiP의 양은 비슷하나 대조적으로 포화 ADP-BiP의 경우가 ATP-BiP의 경우보다 더 많은 BAP과 결합되었다(Fig. 2). 이 결과는 BAP은 BiP에 결합된 ADP를 ATP와 치환하기 위하여 ADP-BiP과 더 잘 결합하는 것으로 생각된다. 이 실험에서 비특이적 단백질이 Ni<sup>2+</sup>-agarose bead에 고농도로 흡착되어기 때문에 검출된 것으로 여겨진다.

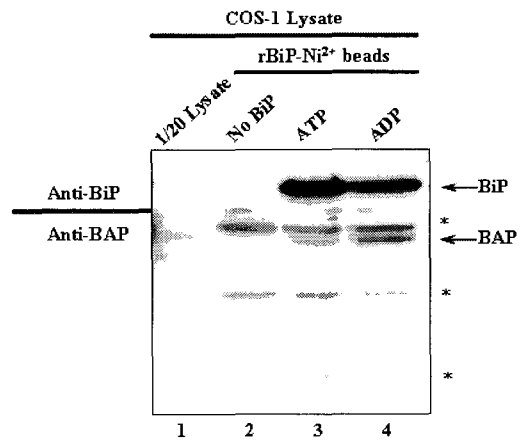


Fig. 2. BAP prefers ADP for BiP binding. Lysate from COS-1 cells was run alone (1), incubated with empty Ni<sup>2+</sup>-agarose beads (2), or incubated with Ni<sup>2+</sup>-agarose beads, which had recombinant BiP bound in the presence of 10  $\mu$ M ATP (3) or 10  $\mu$ M ADP (4) at 4 $^{\circ}$ C for 1 h. After washing the beads, the bound proteins were separated by SDS-PAGE and transferred for probing with rabbit anti-BAP and rodent anti-BiP antisera. Asterisk (\*) indicates non-specific bands. rBiP :recombinant BiP.

***In vitro*에서 BAP는 BiP로부터 unfolded 면역글로블린 heavy chain을 해리**

Lymphoma Ag8(8) 세포는 면역글로블린 light chain을 생산하지는 못하나 heavy chain을 생산하므로 BiP-heavy chain 복합체를 형성한다. 이 BiP-heavy chain 복합체는 protein A-agarose bead를 사용하여 용이하게 분리할 수 있다. Ag8(8) 세포에서 분리된 BiP-heavy chain 복합체에 ATP, BAP, BiP의 ATP 가수분해율을 촉진시키는 것으로 알려진 ERdj3과 ERdj4를 첨가하여 BiP과 heavy chain 결합의 변화를 보았다. Fig. 3에서 나타난 것처럼 조절인자를 넣지 않은 경우(lane 1)에서는 보고된 결과와 동일하게 BiP과 heavy chain이 복합체를 유지하고 있었다. Negative control로 사용된 bovine serum albumin (BSA)을 넣어준 경우(lane 2) 역시 동일하게 두 개의 band가 나타나 BiP-heavy chain complex에 아무런 변화가 없음을 알 수 있었다. ATP를 첨가하는 경우 BiP이 ATP와 결합을 하면 결합되어 있던 기질을 방출하는 것으로 알려져 있다[10]. 본 실험에서도 기존의 보고된 결과와 동일하게 ATP에 의해 BiP-heavy chain 복합체가 분리되어 면역글로블린 heavy chain만이 protein A와 함께 침전된 것을 보여주어 recombinant BiP이 기능적으로 정상 단백질임을 알 수 있다(lane 4). Hsp70의 ATP 가수분해 촉진조절인자로 알려진 DnaJ homologue 단백질은 가수분해 산물인 ADP와 Hsp70과의 결합을 안정화시켜 Hsp70과 기질 단백질 복합체를 유지시킨다고 보고되어 있다[13]. ER에 존재하는 DnaJ homologue 단백질인 ERdj3과 ERdj4는 최근에 발견되어 BiP의 ATP 가수분해를 촉진시키는 기능을 가진 것으로 알려져 있으나 BiP과 기질단백질 복합체에 끼치는 영향에 관한 연구 결과는 보고되어 있지 않다[14]. BiP-heavy chain complex에 ERdj3과 ERdj4를 넣어준 경우(lane 5와 6) BiP-

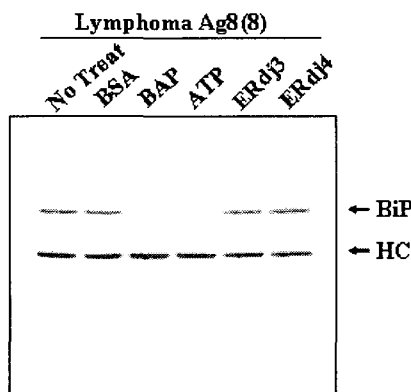


Fig. 3. Immunoglobulin heavy chain:BiP complexes were isolated from Ag8(8) lymphoma cells with protein A sepharose. Complexes were incubated with 1 μM BSA, recombinant BAP, ATP, or recombinant J domain of ERdj3 or ERdj4 for 30 min at 30°C. Proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by coomassie staining. HC :Immunoglobulin Heavy Chain.

heavy chain complex가 유지되어 기존의 보고된 결과와도 일치하였다[14]. 그러나 ATP가 존재하지 않고 조절인자 BAP을 첨가한 경우(lane 3) heavy chain만이 protein A에 의해 침전되어 BiP이 반응기간 동안 해리된 것을 알 수 있다. 본 실험에서 ATP에 의한 BiP 해리와 동일한 결과가 BAP에 의해 얻어진 것은 BAP이 *in vitro*에서 BiP을 unfolded 단백질인 heavy chain으로부터 해리시켰다는 것을 뜻한다. 이 같은 결과를 확인하기 위하여 COS-1 세포에서 동일하게 실험하였다(Fig. 4). Wild type BiP 또는 ATPase 기능이 상실된 돌연변이 BiP (T37G BiP)[7, 18]을 면역글로블린 heavy chain과 함께 COS-1 세포에서 발현시켜 BiP-heavy chain complex를 형성되도록 하고 Ag8(8) 세포와 동일한 과정으로 BiP-heavy chain complex를 분리하였다. WT BiP-heavy chain complex에 아무런 조절인자를 넣지 않았거나 BSA를 넣은 경우 BiP과 heavy chain의 두 밴드가 나타나 BiP-heavy chain 복합체에 아무런 영향을 미치지 않았다. ERdj3과 ADP 역시 BiP과 heavy chain의 결합에 영향을 주지 않았다. 그러나 BAP과 ATP를 첨가하였을 경우 Ag8(8)의 결과와 비슷하게 결합된 BiP의 양이 감소된 것으로 보아 상당한 양의 BiP이 복합체로부터 해리되었음을 알 수 있었다. T37G BiP은 ATPase의 기능 상실과 핵산에 따른 구조변화가 일어나지 않아 기질을 해리할 수 없는 돌연변이로서[7, 18], BSA와 ERdj3 첨가 시에도 wild type과 마찬가지로 복합체에 아무런 변화가 없었으며, ATP에 의해서도 BiP의 해리가 이루어지지 않았다. 그러나 흥미롭게도 BAP에 의해 T37G BiP이 heavy chain으로부터 부분적으로 해리되었다. 이는 BAP이 T37G BiP에 결합되었을 때 약한 T37G BiP의 구조적 변화가 일어나며, 이 구조적 변화로 인하여 T37G BiP이 heavy chain과의 결합력이 약화된 것으로 추정되나 추가적인 실험을 통하여 밝혀져야 한다고 생각한다. 본 연구 결과와 알려져 있는 BiP의 ATP 분해

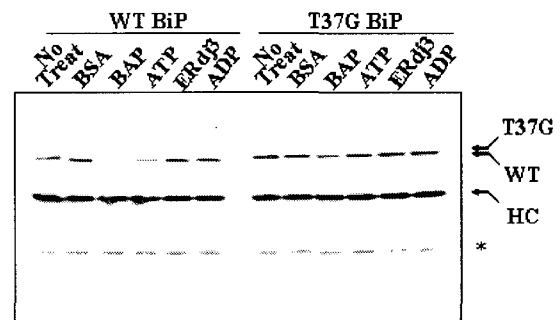


Fig. 4. COS-1 cells were transfected with cDNAs of immunoglobulin heavy chain and either wild type hamster BiP or the T37G BiP mutant. BiP:heavy chain complexes were isolated and treated as in Fig. 3. Proteins were subjected to SDS-PAGE analysis and visualized by coomassie staining. HC :Immunoglobulin Heavy Chain, T37G: BiP mutant T37G. Asterisk (\*) indicates non-specific band.

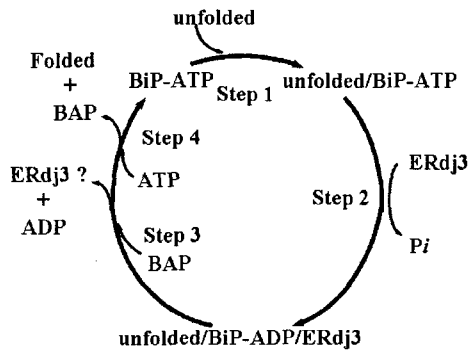


Fig. 5. A proposed model for regulation of BiP's ATPase. Step 1. BiP binds to unfolded substrate proteins when it is in the ATP bound form. Step 2. Addition of ERdj to the complex increases the rate of ATP hydrolysis, thus stabilizing the binding of BiP to the unfolded protein. Step 3. Interaction of BAP with the complex catalyzes the release of ADP, allowing substrate release from BiP. If the substrate does not fold or aggregate, it can rebind BiP and the cycle begins again. Step 4. ATP rebinding to BiP-BAP complex dissociates BAP from BiP and is enable BiP to bind the unfolded substrate, allowing it to be folded.

cycle과 종합하여 새로운 BiP의 ATP 분해 cycle[3]을 BAP과 ERdj 기능을 포함시켜 Fig. 5에 제시하였다. BiP이 ATP와 결합하게 되면 unfolded substrate를 인식하여 약한 결합의 unfolded substrate-BiP-ATP 복합체를 이루게 된다(step 1). ATP 가수분해 촉진인자인 ERdj3가 BiP의 ATP에서 ADP로 가수분해를 촉진시켜 unfolded-BiP-ADP-ERdj3의 복합체를 형성하게 된다(step 2). 이 복합체는 단단한 결합을 하고 있으며 여기에 BAP이 첨가되면 ADP는 방출이 된다(step 3). 방출된 ADP는 ATP로 치환이 일어나게 되면 BAP은 역할을 다하여 방출되고 BiP은 새로운 ATP와 결합을 하게 된다(step 4). ADP가 방출이 되면서 ERdj3 역시 방출될 것이라 생각되지만 아직 실험적 data는 존재하지 않는다. ATP 치환이 일어날 때 ERdj3가 방출이 되고 단백질 folding이 되는 과정이 ATP로 치환될과 동시에 일어나는지 치환되기 전인지 후인지는 아직 불확실하다. 본 연구 결과 BAP은 ATP보다 ADP가 결합되어 있는 BiP과 더 잘 결합을 하는 것으로 나타났으며, 이는 BAP이 ADP를 방출하는 기능을 수행하기 위한 것으로 생각된다. *In vitro*에서 BAP은 BiP에 결합되어 있는 unfolded 단백질인 면역글로불린 heavy chain을 BiP으로부터 해리시킴으로서 세포내에서 단백질의 성숙에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

**요 약**

소포체는 세포막의 합성뿐만 아니라 세포막에 존재하거나 세포외로 분비되어야 할 단백질을 합성하는 세포내 소기

관이다. 소포체에서 단백질이 합성되어질 경우 이황화결합이 형성되고 glycosylation 등의 수식이 일어나며, 이와 동시에 folding과 assembly과정을 거쳐 삼차원적 구조로 성숙이 되는데 이 과정은 folding enzyme과 molecular chaperone의 도움을 받아 이루어진다. 소포체 내에 존재하는 molecular chaperone 중 가장 잘 알려진 것으로 BiP이 있다. BiP의 기능은 N-terminus의 ATPase domain에 의해 조절되고 ATPase domain은 이것과 선택적으로 결합하는 조절인자에 의해 ATPase의 활성이 영향을 받는다. BiP의 핵산치환조절인자로서 발견된 BAP은 ATPase domain에 결합된 ADP를 ATP로 치환하는 것으로 기능이 알려져 있다. 이 BAP의 핵산치환기능이 BiP의 샤페론 작용에 어떤 영향을 미치는지를 *in vitro*에서 항체 heavy chain을 이용하여 알아보았다. BAP은 ATP보다 ADP가 결합되어 있는 BiP과 더 잘 결합을 하며, *in vitro*에서 BiP과 결합하고 있는 unfolded 단백질을 BAP은 BiP으로부터 해리하였다. 또한 소포체내에 존재하는 Hsp70 homologue chaperone인 BiP과 Grp170에 대한 BAP의 결합특이성을 anti-Grp170과 anti-BAP 항체로 co-immunoprecipitation을 하여 확인한 결과 BAP은 Grp170과 결합을 하지 않았다. 따라서 BAP은 ER 내에 존재하는 동일한 family group에 속하는 Grp170과 BiP에 대하여 BiP에만 특이성을 갖는 것으로 나타났다.

**감사의 글**

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었습니다. (KRF-2003-002-C0022)

**참 고 문 헌**

1. Kingston, R. E., C. A. Chen, H. Okayama and J. K. Rose. 2002. Transfection of DNA into Eukaryotic Cells. 9.1.4-9.1.11, In Ausubel, F. M., Brent, R., Kinston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith J. A., Struhl, K.(eds.) *Current Protocols in Molecular Biology* Vol 2, John Wiley & Sons, Inc.
2. Bertolotti, A., T. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding and D. Ron. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326-332.
3. Brodsky, J. L., E. D. Werner, M. E. Dubas, J. L. Goekeler, K. B. Kruse and A. A. McCracken. 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, 453-3460.
4. Chung, KT, Y. Shen, and L. M. Hendershot. 2002. BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J. Biol. Chem.* 277, 47557-47563.

5. Easton, D. P., Y. Kaneko and J. R. Subjeck. 2000. The hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones*. **5**, 276-290.
6. Ellgaard, L., M. Molinari and A. Helenius. 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*. **286**, 1882-1888.
7. Gaut, J. R. and L. M. Hendershot. 1993. Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain. *J. Biol. Chem.* **268**, 7248-7255.
8. Gething M. and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*. **355**, 33-45.
9. Hamman, B. D., L. M. Hendershot and A. E. Johnson. 1998. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*. **92**, 747-758.
10. Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. **381**, 571-579.
11. Haas, I. and M. Wabl. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*. **306**, 387-389.
12. Laurent, M., Y. K. Usherwood, K. Chung and L. Hendershot. 2002. A Subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol. Biol. Cell*. **13**, 4456-4469.
13. Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos and M. Zylicz. 1991. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **188**, 2874-2878.
14. Shen, Y., L. Meunier and L. M. Hendershot. 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.* **227**, 15947-15956.
15. Schroder, M. R. and J. Kaufman. 2005 The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 739-789.
16. Sender, J. and M. Krieger. 2005. Mutation in SIL1 cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat. Genet.* **37**, 1312-1324
17. Vanhove, M., Y. K. Usherwood and L. M. Hendershot. 2001. Unassembled Ig heavy chains do not cycle from BiP in vivo but require lightchains to trigger their release. *Immunity*. **15**, 105-114.
18. Wei, J., J. R. Gaut and L. M. Hendershot. 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**, 26677-26682.
19. Zhao, L. 2005. Protein accumulation and neurodegeneration in the Woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat. Genet.* **37**, 974-979