

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	タンパク質凝集ストレスを感知してシャペロンが発現する機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	三輪つくみ
Author(English)	Tsukumi Miwa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11672号, 授与年月日:2020年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田口 英樹,岩崎 博史,木村 宏,加納 ふみ,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11672号, Conferred date:2020/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位(専攻分野)： 博士 ( 理学 ) Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	三輪 つくみ		指導教員(主)： 田口 英樹 Academic Supervisor(main)
			指導教員(副)： Academic Supervisor(sub)

### 要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

本論文は大腸菌低分子量熱ショックタンパク質 *IbpA* が、未知の発現制御機構が存在する可能性を提案、検証したものである。*IbpA* は温度依存的な翻訳開始制御として、熱揺らぎによる二次構造の開裂を介した機構が知られている。しかし過去には、タンパク質恒常性を乱すようなストレス条件下において温度非依存的に *IbpA* の発現量が増加することという事例も報告されている。この報告から端を発し、タンパク質凝集と *IbpA* 発現の関連について検証を行った結果、*IbpA* 発現がタンパク質凝集の蓄積に翻訳レベルで応答すること、さらにその機構が自身のオリゴマー形成・共凝集に依存した *ibpA* 翻訳の自己抑制によるものであることが明らかとなった。本論文は 1 章で本研究の背景、2 章で使用した試料や実験方法について説明し、続く 3 章から 8 章では各種検証を行った結果を示している。

3 章では、非ストレス条件下においてもタンパク質凝集の蓄積によって *IbpA* の発現上昇が再現されるか検証した。凝集傾向タンパク質の過剰発現により細胞内にタンパク質凝集を蓄積させ、*IbpA* の発現をプロテオーム解析とウェスタンブロットングによる発現解析を行った結果、タンパク質凝集が蓄積した細胞においては *IbpA* の発現上昇が温度非依存的にも上昇することが明らかとなった。さらに、レポーターアッセイによってその応答が翻訳レベルで引き起こされることを示した。

4 章では、タンパク質凝集の蓄積と *ibpA* 翻訳制御を紐づける現象として、タンパク質凝集への *IbpA* のリクルートに着目した。タンパク質凝集の蓄積時に *IbpA* が細胞質から枯渇することを検証した後 *IbpA* の枯渇が *ibpA* 翻訳上昇を引き起こすという作業仮説を挙げ、検証を行なった。*ibpAB* オペロンの欠損や *IbpA* の過剰発現による細胞内 *IbpA* 量の変化に伴い *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現量が変化したことから、*IbpA* タンパク質が *ibpA* 翻訳を自己抑制することが新たに示された。また、レポーター発現へのタンパク質凝集の蓄積と *ibpAB* オペロン欠損の寄与を調べることで、翻訳の自己抑制がタンパク質凝集蓄積への応答の中心的機構である可能性を示した。さらに再構成型無細胞翻訳系においても *IbpA* による翻訳の自己抑制が再現されたことから、*IbpA* が他の因子に依存せず、直接 *ibpA* 翻訳を抑制していることが明らかとなった。

5 章では *IbpA* とその細胞内ホモログである *IbpB* の同源性が高いことから、*IbpA* と同様の翻訳抑制能を *IbpB* も有しているのではないかと仮説を立て、検証を試みた。*IbpB* 過剰発現によるレポーター発現量変化を確認したところ、*IbpB* は翻訳抑制能を有さないことが示された。また *IbpA* と *IbpB* は 5'UTR においても高い構造の類似性と配列同源性を有していることから、*ibpB* 翻訳も *IbpA* により同様の制御を受けるのではないかと予想し検証を行ったところ、実際に *ibpB* 翻訳も *IbpA* により抑制されることが示された。これにより、*IbpA* が sHsp としての既知の機能のみではなく、*ibpAB* オペロンの翻訳制御因子として機能することが示された。

また 6 章では *IbpA* の翻訳抑制における責任配列の探索を行った。*IbpA* と *IbpA* 変異体の過剰発現が *ibpA* 5'UTR を有するレポーター発現に与える影響を検証した結果、過去にオリゴマー化モチーフとして同定されている IEI モチーフが翻訳抑制に必須であることが示された。

7 章では、*IbpA* が *ibpA* 翻訳を直接抑制するという 4 章の結果を受け、*IbpA* が *ibpA* mRNA と相互作用すると予想し、検証を行った。精製したレポーター mRNA と精製 *IbpA* を用いたゲルシフトアッセイによる検証を行なった結果、*IbpA* と *ibpA* 5'UTR の相互作用が確認された。しかし、*IbpA* と mRNA の相互作用効率が *IbpA* 量に依存しないことが示され、*IbpA* による *ibpA* 翻訳の直接抑制を補助する機構の存在が示唆された。

8 章では、7 章の示唆を受け、*IbpA* による翻訳抑制を増強する因子の探索を行った。探索を行った結果、*IbpA* と相互作用することが知られているリボヌクレアーゼである PNPase が *ibpA* の翻訳抑制を助けていることが示された。

9 章では以上の結果を総括し、本研究で明らかとなった新規 *IbpA* 発現機構を示すとともに、今後の展望として詳細な機構解明のために必要な解析について触れている。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位(専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	三輪 つくみ		指導教員(主)： Academic Supervisor(main)	田口 英樹	
			指導教員(副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

This paper proposes and tests the possibility that the *Escherichia coli* small heat shock protein IbpA has an unknown regulatory mechanism for its expression. Although IbpA is regulated by temperature-dependent translational regulation via mRNA heat fluctuation, previous research reported a temperature-independent increase in the expression of IbpA under stress conditions that disrupt protein homeostasis. The previous reports prompted us to examine the relationship between protein aggregation and the IbpA expression.

This paper is composed of 9 chapters. Chapter 1 is the introduction to the research, chapter 2 is the introduction of the methods used in the research, chapter 3-8 are the results of each verification, and chapter 9 is the conclusion of the research. The results of the validation in chapters 3,4 show that IbpA expression responds to the accumulation of protein aggregation at the translational level, and that the mechanism is due to the self-regulation of the *ibpA* translation. In chapter 5, I applied the same validation to IbpB, a homolog of IbpA. The results showed that IbpB is not capable of translational repression. On the other hand, *ibpB* translation was inhibited by IbpA. In chapter 6, results revealed that the regulation of IbpA is dependent on its own oligomer formation and co-aggregation. In chapter 7,8, the results showed that ribonuclease PNPase assists the regulation.

In chapter 9, I summarize above findings and described the novel mechanism of IbpA expression and discuss the future prospects for further analysis of the mechanism.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).