

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
Type(English)	Doctoral Thesis

令和元年度 学位論文

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

東京工業大学大学院 生命理工学院

生命理工学系 生命理工学コース

三輪 つくみ

指導教員 田口 英樹

目次

略語.....	5
1. 序論.....	6
1.1. タンパク質凝集の蓄積.....	6
1.2. 熱ショックタンパク質.....	8
1.3. 低分子熱ショックタンパク質.....	10
1.4. バクテリア sHsp の発現調節.....	13
1.5. 大腸菌 sHsp.....	15
1.6. IbpA と IbpB の特徴.....	17
1.7. IbpA と IbpB の発現調節.....	19
1.8. IbpA の温度非依存的な発現上昇.....	20
1.9. 本研究の概要.....	20
2. 実験材料と方法.....	22
2.1. 使用した大腸菌株、プラスミド、抗体、プライマー.....	22
2.2. プラスミド作成.....	26
2.3. 凝集傾向タンパク質の可溶性評価.....	27
2.4. プロテオーム解析のサンプル調整.....	30
2.5. IbpA 抗体品質確認.....	33
2.6. 凝集蓄積条件における IbpA の発現量確認.....	35
2.7. mRNA 量確認.....	36
2.8. レポーターアッセイ.....	38
2.9. IbpA-sfGFP の顕微鏡観察.....	39
2.10. IbpA の精製.....	40
2.11. PURE system.....	41
2.12. Native PAGE.....	42
2.13. ショ糖密度勾配遠心.....	44

2.14.	ゲルシフトアッセイ.....	45
2.15.	RNA 安定性解析	46
3.	タンパク質凝集の蓄積と <i>ibpA</i> 翻訳の関係性.....	47
3.1.	序文.....	47
3.2.	タンパク質凝集蓄積条件における <i>IbpA</i> 発現上昇.....	47
3.2.1.	凝集傾向タンパク質の凝集確認.....	48
3.2.2.	プロテオーム解析	49
3.2.3.	<i>IbpA</i> の発現解析.....	52
3.3.	レポーター系による <i>ibpA</i> 翻訳効率の変化.....	56
3.4.	考察.....	57
4.	<i>IbpA</i> タンパク質による <i>ibpA</i> 翻訳阻害.....	59
4.1.	序文.....	59
4.2.	タンパク質凝集蓄積時の細胞質 <i>IbpA</i> 挙動.....	60
4.3.	細胞質 <i>IbpA</i> の枯渇と <i>ibpA</i> 翻訳の関係の検証.....	61
4.3.1.	細胞内 <i>IbpA</i> 量と <i>ibpA</i> 翻訳効率の関係性.....	61
4.3.2.	<i>ibpA</i> 翻訳制御におけるタンパク質凝集応答と <i>IbpA</i> による抑制の寄与	62
4.4.	<i>IbpA</i> タンパク質による直接的な <i>ibpA</i> 翻訳阻害の検証.....	63
4.4.1.	無細胞翻訳系における <i>IbpA</i> タンパク質による <i>ibpA</i> 翻訳阻害.....	63
4.4.2.	<i>ibpA</i> 翻訳阻害の <i>IbpA</i> タンパク質特異性	65
4.5.	考察.....	66
5.	<i>IbpA</i> と <i>IbpB</i> の翻訳抑制能における共通性.....	67
5.1.	序文.....	67
5.2.	<i>IbpB</i> による翻訳抑制能の検証.....	67
5.2.1.	<i>IbpB</i> 存在量と <i>ibpA</i> 翻訳の関係性.....	67
5.2.2.	<i>IbpB</i> 存在量と <i>ibpB</i> 翻訳の関係性.....	68
5.2.3.	無細胞翻訳系における <i>IbpA</i> タンパク質による <i>ibpB</i> 翻訳阻害.....	70
5.3.	考察.....	72
6.	<i>ibpA</i> 翻訳抑制における <i>IbpA</i> 責任領域の特定.....	73
6.1.	序文.....	73
6.2.	<i>IbpA</i> ドメイン欠損変異の翻訳抑制能への影響.....	73

6.3.	IbpA における IbpB への置換変異の翻訳抑制能への影響.....	75
6.4.	IbpA C 末端ドメイン中の重要な残基・モチーフの翻訳抑制能への寄与	76
6.4.1.	細胞内 <i>ibpA</i> 翻訳における既知の残基・モチーフ変異の影響	76
6.4.2.	無細胞翻訳系における AEA 変異体による <i>ibpA</i> 翻訳抑制	77
6.5.	IbpA オリゴマー化と翻訳抑制能の関連性.....	79
6.6.	IbpA の翻訳抑制能と二次構造.....	81
6.7.	考察.....	82
7.	<i>IbpA</i> による <i>ibpA</i> 翻訳抑制機構の検証.....	84
7.1.	序文.....	84
7.2.	<i>IbpA</i> と <i>ibpA</i> mRNA の相互作用解析	84
7.3.	考察.....	87
8.	<i>IbpA</i> による <i>ibpA</i> 翻訳抑制機構についての仮説の検証	89
8.1.	序文.....	89
8.2.	<i>ibpA</i> mRNA の状態と <i>IbpA</i> による翻訳抑制効率の関連性	90
8.3.	RNase による <i>ibpA</i> 翻訳抑制への寄与の検証.....	93
8.3.1.	RNaseE による <i>ibpA</i> 翻訳抑制への寄与の検証	93
8.3.2.	PNPase による <i>ibpA</i> 翻訳抑制への寄与の検証	94
8.4.	考察.....	96
9.	総括	97
9.1.	本研究の総括	97
9.2.	今後の展望.....	98
	参考文献.....	100
	業績.....	103
	謝辞.....	104

略語

Amp	Ampicillin
APS	Ammonium PeroxodiSulphate
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Cm	Chloramphenicol
Ct	Threshold cycle
DTT	Dithiothreitol
EMSA	Electro mobility shift assay
IAA	Iodoacetamide
IbpA	Inclusion Body associated Protein A
IbpB	Inclusion Body associated Protein B
IPTG	Isopropylthiogalactoside
PCR	Polymerase chain reaction
PNPase	Polynucleotide phosphorylase
PURE system	Protein synthesis Using Recombinant Elements system
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription PCR
RNAT	RNA thermometer
SD	Shine-Dalgarno
SDC	Sodium Deoxycholate
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
sfGFP	Super folder green fluorescent protein
SLS	Sodium lauryl sulfate
TCA	Trichloroacetic acid
TFA	Trifluoroacetic acid
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

1. 序論

1.1. タンパク質凝集の蓄積

タンパク質は細胞内の化学反応の触媒や構造の保持を行う、生命維持活動に必須の分子である。タンパク質が細胞内で機能を発揮するには、リボソームにより mRNA にコードされた情報に準じたポリペプチド鎖として合成された後、天然状態と呼ばれる正しい立体構造をとる必要がある。ポリペプチド鎖が天然状態をとる過程はフォールディングと呼ばれ、機能を発揮できる状態となるだけでなくポリペプチド鎖を構成するアミノ酸残基同士の分子内結合による折れ畳み、疎水性アミノ酸残基のパッキングや親水性アミノ酸残基のタンパク質表面への露出などを介して熱力学的に安定な状態となる。多くのタンパク質合成においてはアミノ酸の配列が決定することにより、タンパク質の熱力学的に安定な構造が決定し、自ずとその構造がとられる(1)。この定説は、アンフィンゼンのドグマと呼ばれている。しかし、タンパク質の中には安定な異常構造を取るものや、自発的にフォールディングすることのできないタンパク質が知られている(2)。

フォールディングが失敗したタンパク質や、温度変化や pH 変化、酸化条件などのストレスに晒されたタンパク質は天然状態となることができず変性する(図1)。変性タンパク質は分子シャペロンによるリフォールディングの補助やプロテアーゼによる分解を受けることで細胞内のタンパク質恒常性が保たれる。しかし変性することで疎水性アミノ酸残基がタンパク質表面に露出すると、タンパク質は分子間会合し無秩序な集合体を形成する。タンパク質凝集と呼ばれる無秩序な集合体の形成は、変性タンパク質のリフォールディングや分解の効率を下げるだけでなく、新生されたポリペプチド鎖を巻き込むことで細胞内のタンパク質恒常性を大きく乱すことがわかっている。そのため、どのような生物種も形成されたタンパク質凝集を細胞内の特定の位置に隔離するような機構を備えている(3)。

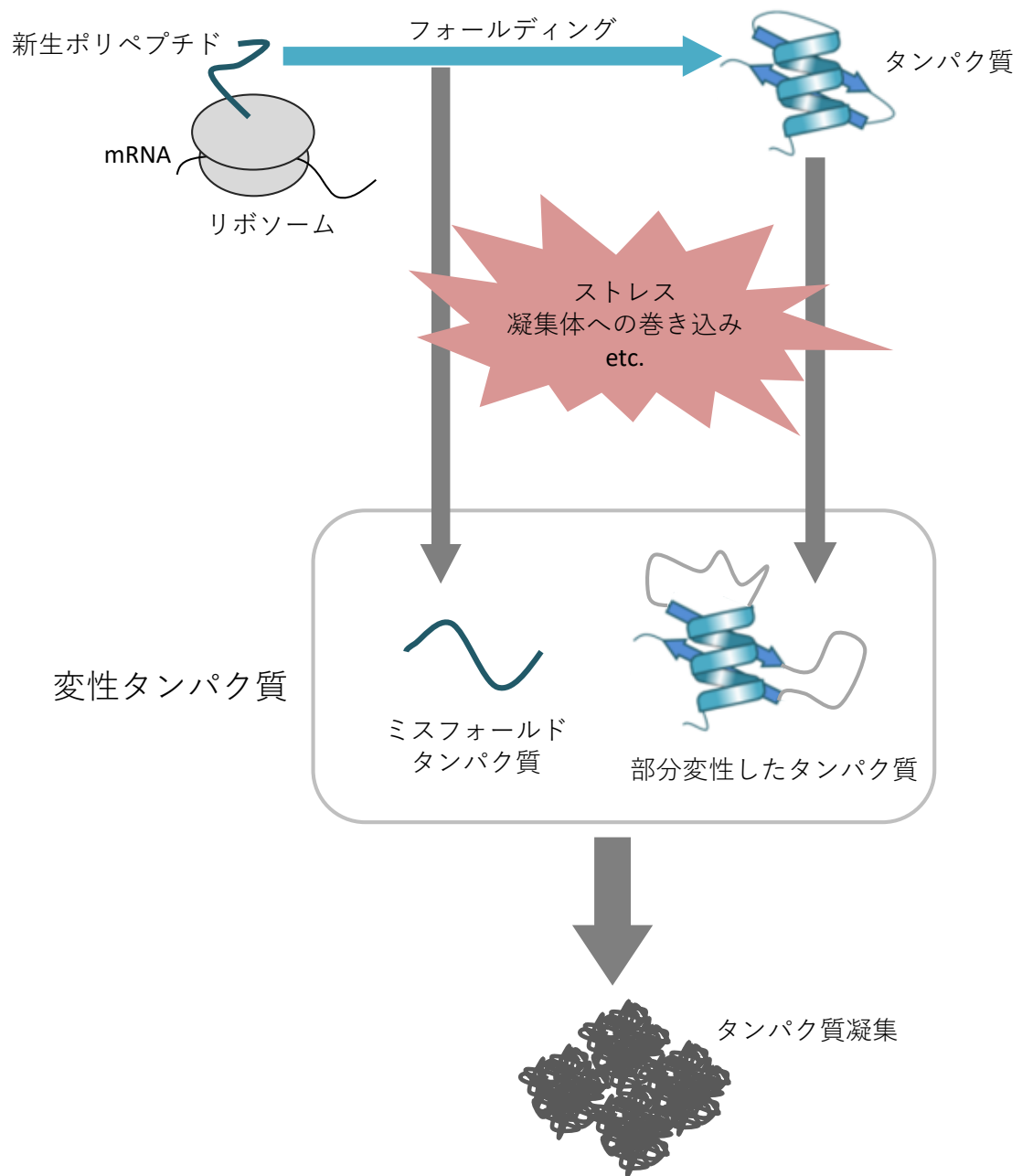


図 1 タンパク質フォールディングとタンパク質凝集の形成
 新生ポリペプチドやタンパク質は変性するとタンパク質凝集を形成する。

1.2. 熱ショックタンパク質

タンパク質の変性やミスフォールディングを引き起こす一般的な環境要因の一つが熱ストレスである。そのため、生物は熱ストレスに晒されることで発現する一群のタンパク質(熱ショックタンパク質:Hsp)を備えることでタンパク質の変性やタンパク質凝集に対処している。Hspは主にシャペロンやプロテアーゼから成り、主要なHspであるHsp40、Hsp60、Hsp70、Hsp90、Hsp100などは多くの生物種において保存されている(3, 4)。また、変性タンパク質との結合解離を行うシャペロンであるHsp70、脱凝集シャペロンであるHsp100の協働においては、処理経路についても生物種をまたいで保存されている(3, 4)。これらのHspはATPに駆動されることで基質となるタンパク質との結合・解離や分解を行うが、中にはATPに駆動されずに変性タンパク質と共凝集することで隔離やリフォールディング・分解の補助を行う例外的なシャペロンも存在している。

主要なHspの中には恒常発現しているものも存在するが、Hspの多くが熱ストレスに応答した転写誘導によって発現する。バクテリアにおいては、Hspの発現はRNAポリメラーゼサブユニット σ^{32} に依存している。非ストレス条件下における σ^{32} は分解による細胞内存在量の制限によって抑制されており、その抑制には大腸菌Hsp70/40であるDnaK/DnaJが関わっている(図2)(5, 6)。 σ^{32} はDnaKの結合サイトを複数有している。そのため、DnaKは σ^{32} の活性抑制因子としてRNAポリメラーゼと競合することが知られており、DnaKと結合した状態の σ^{32} はFtsHプロテアーゼに分解されることが知られている(7, 8)。一方で、熱ストレスなどにより細胞内に変性タンパク質やタンパク質凝集が蓄積した際にはDnaK/DnaJが動員されるため、 σ^{32} と結合するDnaK量が減少する。そのためストレス時には σ^{32} が活性化、また安定化されHspの転写が誘導される(9)。

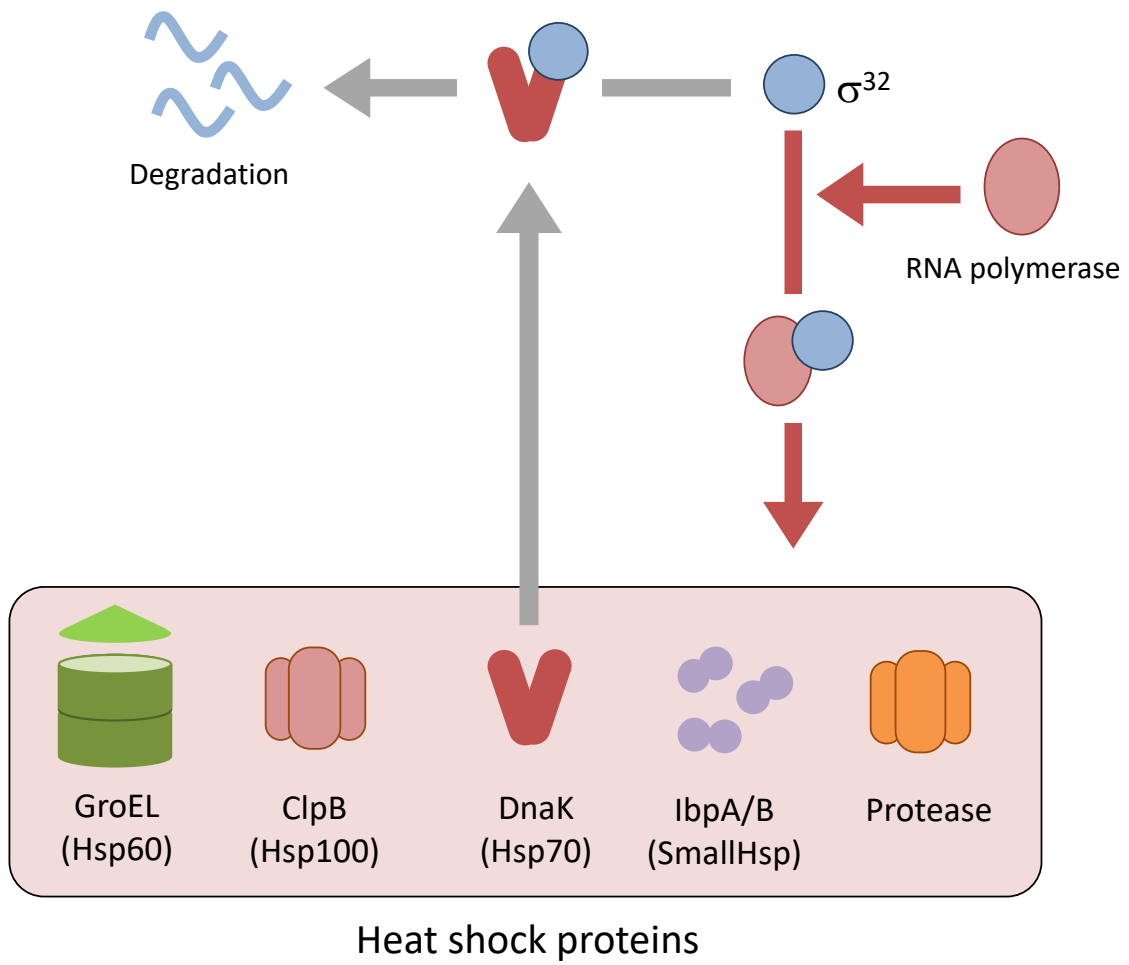


図 2 バクテリア熱ショックタンパク質と σ^{32}
 σ^{32} による熱ショックタンパク質の誘導と DnaK を介した σ^{32} の分解誘導

1.3. 低分子熱ショックタンパク質

低分子熱ショックタンパク質(sHsp)はすべての生物種において保存される Hsp の一種で、機能に際して ATP の駆動を必要としない例外的なシャペロンである(3, 4)。sHsp は Holdase, Sequestrase と呼ばれ、変性タンパク質と共凝集することで細胞内から変性タンパク質を隔離する(10, 11)。また、タンパク質凝集の形成における強固な分子間会合は Hsp による処理効率を大きく減少させるが、sHsp が共凝集したタンパク質凝集では凝集体サイズが減少に伴うシャペロンやプロテアーゼの近接効率の上昇や、sHsp の補助による分解、リフォールディングの促進により処理効率が上昇する(3, 4, 10-12)。このことから近年では sHsp による共凝集がタンパク質凝集処理の第一段階として認識されている(12)。

sHsp による分解、リフォールディングの補助は sHsp 自身がシャペロンやプロテアーゼと相互作用することで行われる。sHsp と Hsp70-Hsp100 リフォールディング系の協働の際には、タンパク質凝集中の sHsp と Hsp70 が交換されることで Hsp70-Hsp100 の協働系が効率よくタンパク質凝集に働きかけることが明らかとなっている(13)。また、プロテアーゼによる分解の際には、sHsp 自身がプロテアーゼに認識、分解されることでタンパク質凝集の分解を補助することがわかっている(図3)(14)。

sHsp は共通して 12~43 kDa と低分子であり、N 末端ドメイン、 α -クリスタリンドメイン、C 末端ドメインの 3 ドメインから成る。中でも構造の核となる α -クリスタリンドメインは約 90-100 アミノ酸残基から成る、sHsp 中で最も大きなドメインである。 α -クリスタリンドメインはバクテリアから哺乳動物まで高い保存性を有しており、 β -サンドイッチ構造と呼ばれる逆平行 β -ストランドからなる構造を有している(10, 15)。N 末端ドメインは sHsp ごとに長さ、配列ともに多様であることが知られているが、共通して構造柔軟性の高い領域であることと、変性タンパク質との結合に重要なドメインであることが明らかとなっている。C 末端ドメインは 20 アミノ酸に満たない短いドメインで、N 末端同様構造柔軟性が高いことが知られている。C 末端ドメインには sHsp が機能する上で重要なオリゴマー形成を担う IX(I/V)モチーフが存在しており、このモチーフが α -クリスタリンドメインの β -ストランド中に存在するポケット部分と相互作用することで sHsp オリゴマーが形成される(図4)(15)。

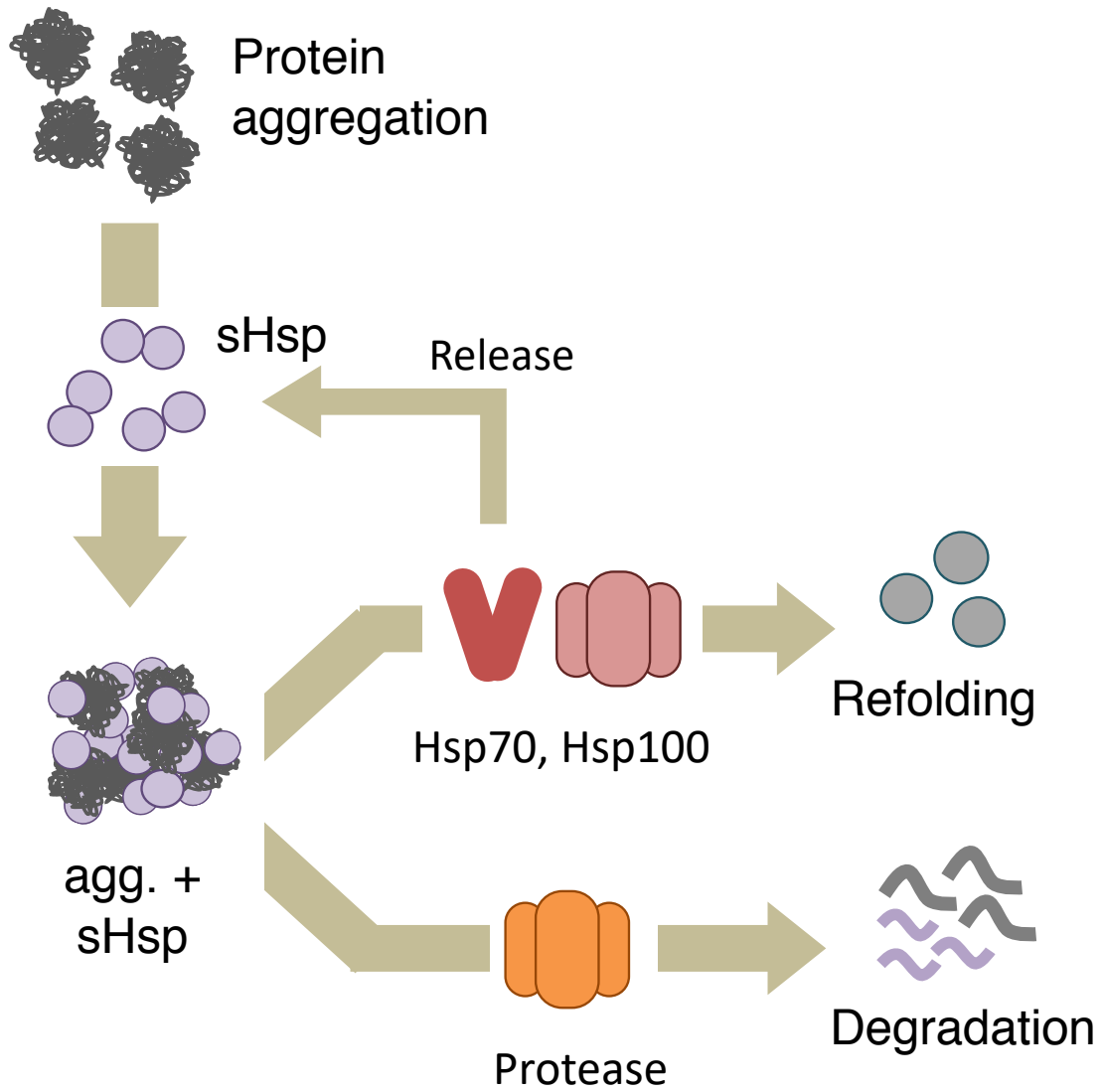


図 3 sHsp の機能

sHsp によるリフォールディング、分解補助。変性タンパク質と共凝集した sHsp は他 Hsp のリクルートを助ける。

sHsp は α -クリスタリンドメイン同士で結合したダイマーを最小単位とし、ダイマー同士が C 末端ドメインの IX(I/V)モチーフと α -クリスタリンドメイン間の相互作用によってオリゴマーを形成する。IX(I/V)モチーフは α -クリスタリンドメインの疎水性ポケットに入り込むことでオリゴマーを形成する(15, 16)。オリゴマー形成に必要な sHsp の数は決まっておらず、約 10~30 分子の間と言われている(15)。また、複数の sHsp を有する生物種では一部の sHsp において複合的なオリゴマーを形成することが報告されており、異なる機能特性を有する sHsp がヘテロオリゴマーとなることで互いに協働や活性調節の役割を果たすことがわかっている(10, 15)。

A

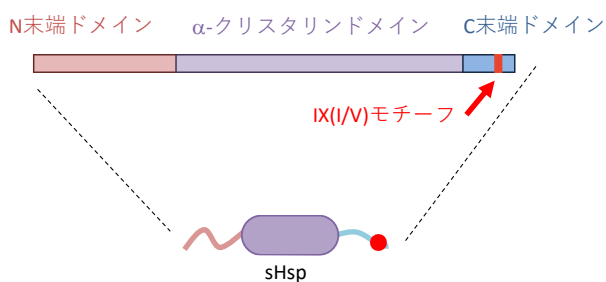


図 4 sHsp の構造とオリゴマー形成

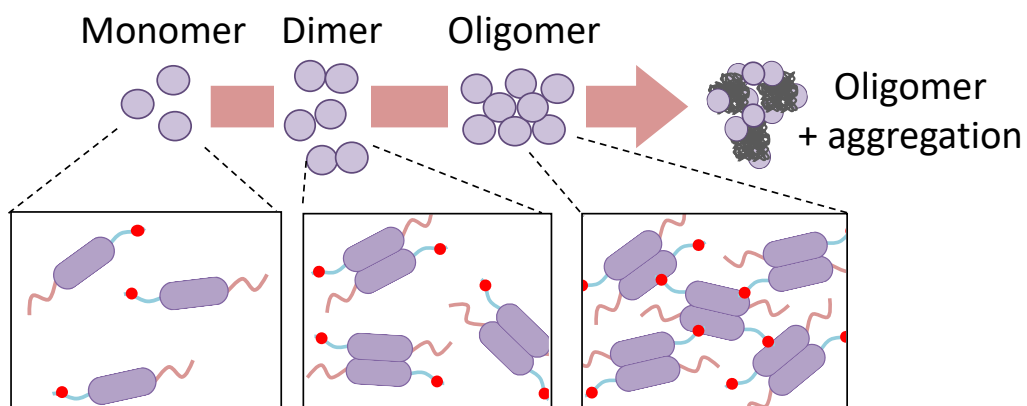
A: sHsp に共通するドメイン構造と保存されたモチーフ

B: sHsp のオリゴマー形成

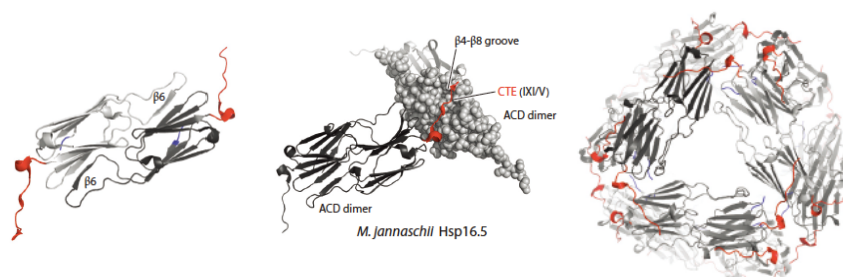
C: sHsp の立体構造(19)

左: ダイマー, 中心: ダイマー同士の結合, 右: オリゴマー

B



C



1.4. バクテリア sHsp の発現調節

sHsp は様々な生物種で保存されているが、中でも α -プロテオバクテリア、 γ -プロテオバクテリアの sHsp についてはタンパク質としての特徴だけでなく翻訳制御についても共通の機構を有することが知られている(17-19)。

RNA サーモメーター(RNAT)は Hsp の一部で知られる翻訳制御機構で、mRNA の 5' 非翻訳領域 (UTR)の熱揺らぎに依存した二次構造の開裂を介して対象遺伝子の翻訳開始制御が行われる。過去の調査によって様々な形式の RNAT が知られており、ほとんどの RNAT において、その形式と Hsp の種類に関連性はない。しかし sHsp においては固有の形式が保存されている(17)。

ROSE (Repression Of heat Shock gene Expression)-like エLEMENTは、sHsp で見られる特徴的な RNAT の形式で、共通して2~4本のステムループ構造から成る。最も下流側に位置するステムループのステム部分にはリボソーム結合領域である Shin・

Dalgarno 配列(SD 配列)がマスクされており、低温条件では mRNA へのリボソーム結合が起こらず、翻訳が開始されない。しかし、この最下流のステムループは連続するステムループの中でも最も不安定な構造であり、特に SD 配列はステム中においても塩基対を形成しないことが知られている。そのため熱に晒されるとこのステム部分が開裂し、SD 配列の露出に伴い翻訳開始が可能となる(図5) (17-19)。

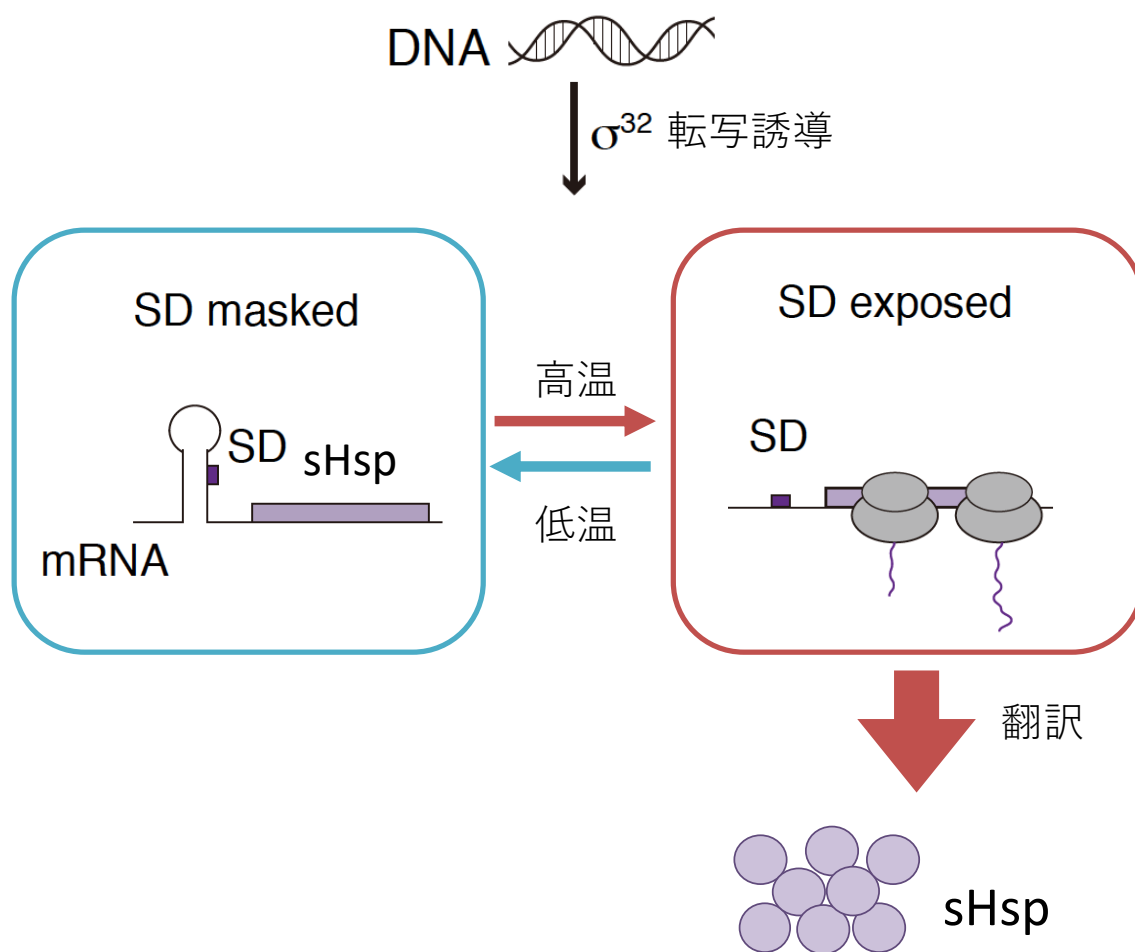


図 5 バクテリア sHsp の発現調節

高温で開裂するステムループによって SD 配列がマスクされているため、温度依存的に翻訳開始が制御されている。

IbpA はオリゴマー形成についてよく調べられており、C 末端ドメイン中のオリゴマー形成のために重要な残基・モチーフが知られている。そのうちの 하나가 133 番目のアルギニン(R133)である。過去のホモロジーモデリングを用いた解析により、この残基はオリゴマーを形成する際に α -クリスタリンドメインのグルタミン酸と相互作用することが示されている(図 7)(16)。また、IbpA における IX(I/V)モチーフであり 134~136 番目に位置する IEI モチーフもオリゴマー形成に重要であるとされている(図 7)(16)。R133 残基や IEI モチーフに含まれるイソロイシンをアラニンに置換することで IbpA の sHsp 活性が消失することが過去の調査により明らかとなっている(16)。

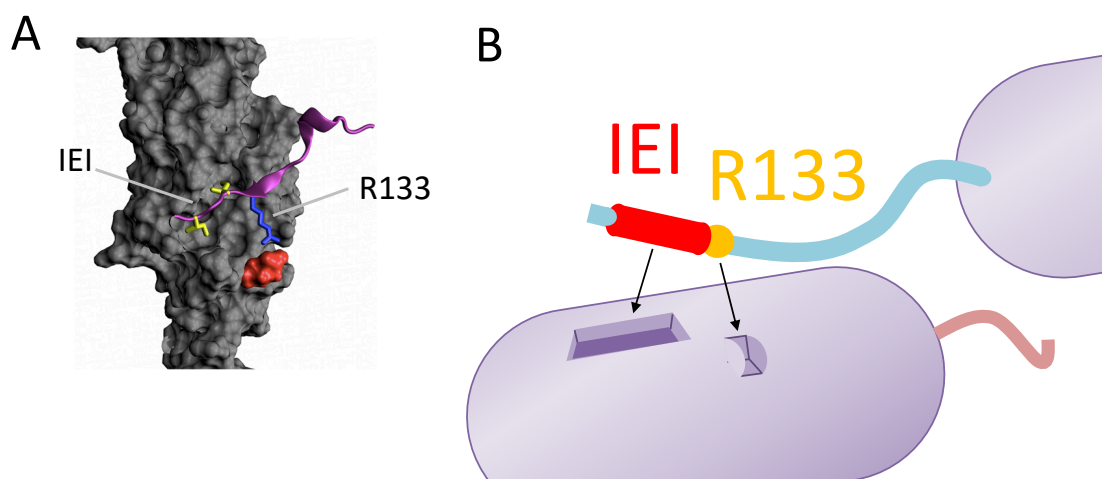


図 7 IbpA におけるオリゴマー化に重要な残基

A: ホモロジーリモデリング解析に基づいた大腸菌 IEI モチーフ、R133 の α -クリスタリンドメインとの相互作用(20)

B: オリゴマー形成時の相互作用模式図

1.6. IbpA と IbpB の特徴

IbpA と IbpB はアミノ酸配列が非常に類似しているが、分解傾向、また凝集傾向に違いがあることが過去の研究によって示されている。

Lon プロテアーゼは IbpA、IbpB の両者において α -クリスタリンドメインを認識し、分解の基質とすることが明らかとなっている。しかし分解効率については IbpB が IbpA よりも高いことが確認されている(22)。さらに、IbpA、IbpB の N 末端ドメインと C 末端ドメインが分解における速度調節の役割を担っていることが示されているが、IbpA においては両ドメインの存在により分解速度が上昇し、IbpB においては両ドメインの存在により分解速度が低下するといったように両ドメインによる寄与は異なっている(22)。

また変性タンパク質との共凝集時には IbpA が変性タンパク質と効率よく結合し、安定な結合が保たれるのに対し、IbpB は変性タンパク質との結合が弱く、不安定であることがわかっている(23)。その一方で、Hsp70-Hsp100 との協働に必要なステップである凝集からの解離は IbpB の方が効率が良く、IbpA は IbpB 非存在下では、豊富に Hsp70 が存在する条件でなければ変性タンパク質に結合し続け、Hsp70-Hsp100 への変性タンパク質の引渡しを阻害する(23, 24)。さらに、IbpA は IbpB 非存在下では高度なオリゴマーを形成することがわかっており、精製 IbpA を単独で高濃度条件下に置くと繊維化することがわかっているが、IbpB ではそのような傾向は見られない(図 8)(16)。

上記のような特徴の違いは、IbpA、IbpB が凝集体処理における役割を分担するように進化してきたことに由来すると予想されている。sHsp は、役割を果たす上で「変性タンパク質との共凝集」と「シャペロンへの変性タンパク質の引渡し」という 2 つの機能が必要とされる。しかし、前者は変性タンパク質との安定した結合が必要であり、後者は変性タンパク質との容易な解離が必要とされる。そのため、sHsp に必要とされる 2 つの機能はトレードオフの関係にあると言える。

これら 2 つの役割を分担するために、IbpA と IbpB は同遺伝起源でありながら異なる特徴を備えるよう分化してきたと考えられている(23)。実際に、IbpA はプロテアーゼによる認識、分解効率が低いが、IbpB 存在下においてはその効率が上昇することが *in vivo*, *in vitro* の両方で確認されている(22)。また IbpA、IbpB 単独では、変性タンパク質のシャペロンへの引渡しや変性タンパク質への安定した結合が行えないが、IbpA、IbpB の両方が存在することによって、sHsp が機能する際の 2 つのステップの両方が効率よく行われるということが *in vivo*, *in vitro* の両方で示されている(図 8)(23)。

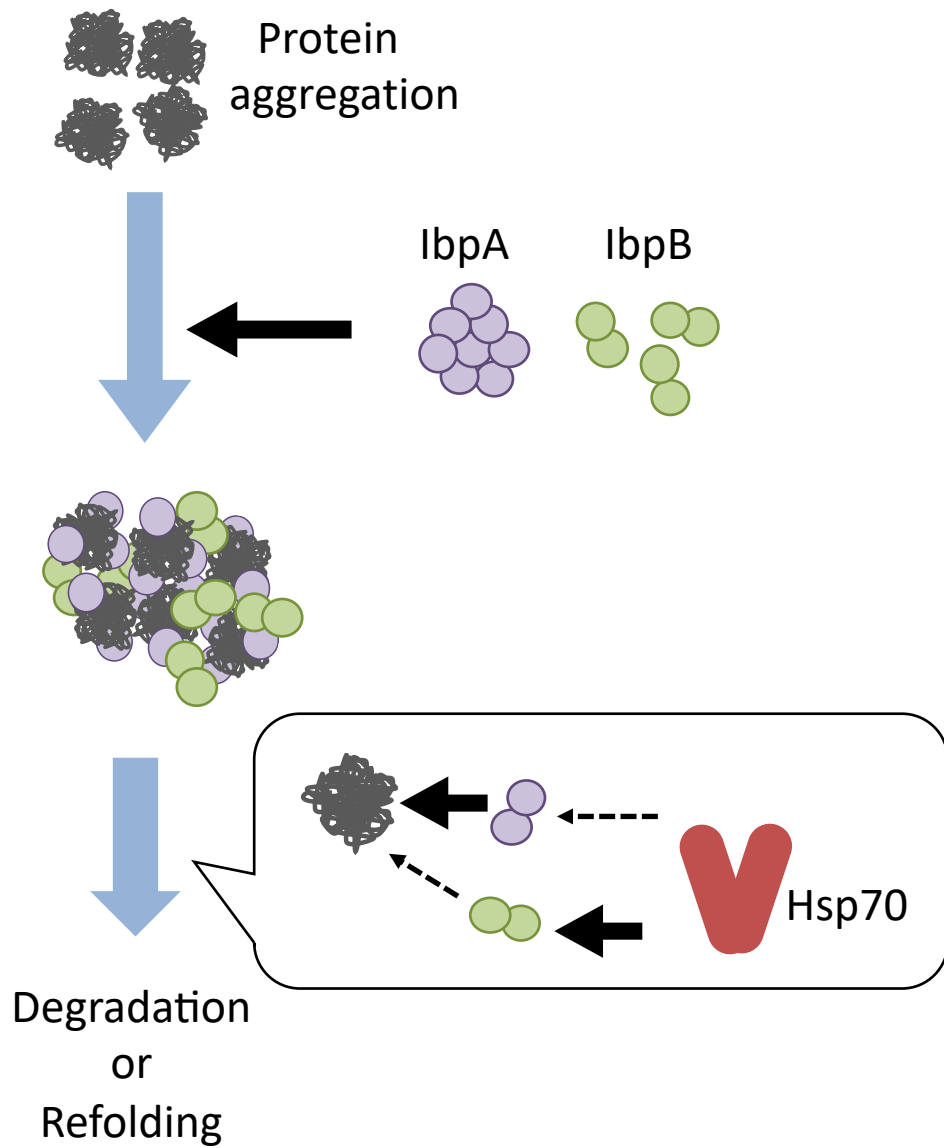


図 8 IbpA と IbpB の役割分担

IbpA と IbpB は凝集体への結合、解離に伴うシャペロンへの変性タンパク質の引き渡しという sHsp が担う 2 つの機能を分担している。

1.7. IbpA と IbpB の発現調節

ibpAB オペロンも他の sHsp と同様に熱ショック転写因子 σ^{32} による転写調節を受けると同時に RNAT による翻訳調節を受けることがわかっており、*in vitro* の実験系によって *ibpA* 5'UTR においては 35°C, *ibpB* 5'UTR においては 40°C 程度の熱に晒されることで、SD 配列をマスクするステムループ構造が開裂することが示されている(図 9)(25, 26)。その一方で *ibpB* には、*ibpA* には存在しない制御系による調節も存在している。*ibpA* と *ibpB* の間はおおよそ 110 塩基離れているが、*ibpB* RNAT のステムループが存在するさらに上流の領域、*ibpA* 遺伝子の 7 塩基下流に、窒素飢餓応答の転写調節因子である σ^{54} のプロモーターを有している(27)。また、*ibpB* 5'UTR と *ibpB* ORF(Open reading frame)は RNaseE による切断を受けることがわかっており、IbpA と IbpB は分解時だけでなく合成においても細胞内において区別されていることが示唆されている(26)。

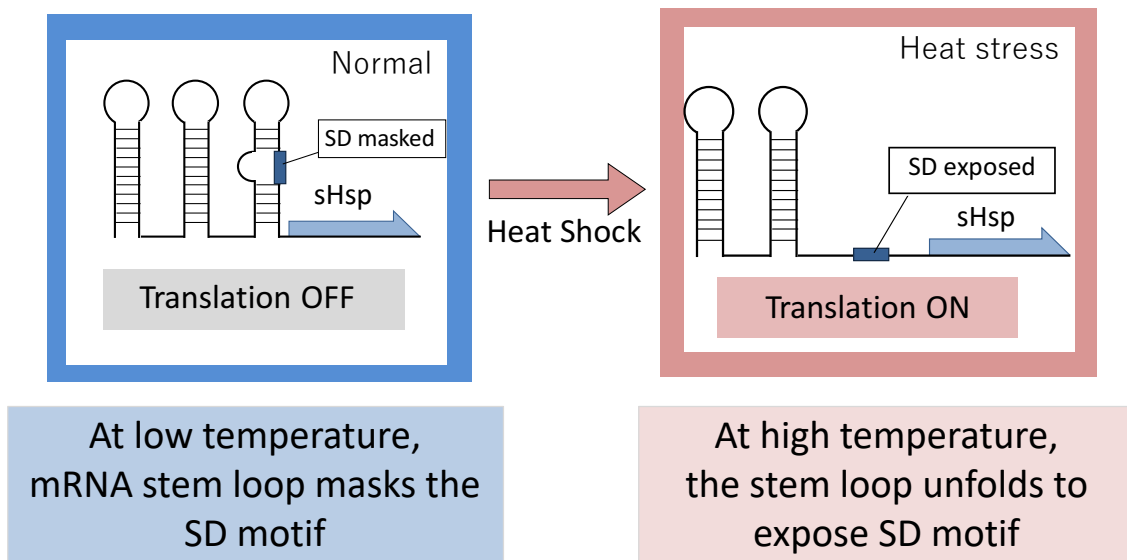


図 9 IbpA, IbpB 発現における熱に依存した翻訳調節

IbpA, IbpB の 5'UTR においては 40°C 程度の熱に晒されることで、SD 配列をマスクするステムループ構造が開裂することが示されている。

1.8. IbpA の温度非依存的な発現上昇

ibpA 翻訳における RNAT の存在は、*in vitro* の mRNA 二次構造解析と *in vivo* のレポーターアッセイによって確認されている。しかし過去の研究において、30°C の生育温度においても DnaK/DnaJ を欠損させた条件で IbpA の発現量が約 50 倍に上昇している様子がプロテオーム解析によって確認されている。また、酸化ストレス条件におけるウェスタンブロットティングの解析においても、生育温度が 30°C であるにも関わらず IbpA の発現量が 10 倍程度に上昇している様子が見られた(28–32)。これらの条件は、大腸菌細胞内のタンパク質の変性とタンパク質凝集の形成・蓄積を引き起こすことが知られている(31, 32)。これらのことは、タンパク質凝集が蓄積する条件において、*ibpA* の RNAT による *ibpA* の翻訳抑制が解除される可能性を示唆している。

1.9. 本研究の概要

本研究では 1.7. で挙げた RNAT による翻訳制御機構が知られる IbpA が、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は温度非依存的に発現量が増加することという過去の報告から端を発し、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。検証の結果、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示された。各検証は以下の通りである。

3 章の検証では、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ティ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確認し、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、タンパク質凝集の蓄積と *ibpAB* オペロンの欠損のレポーター発現へ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 IbpB の相同性が高いことから、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考え、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相同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(IbpA における IX(I/V)モチーフ)が翻訳抑制に必須であることが示された。

IbpA が *ibpA* 翻訳を直接抑制することから、IbpA が *ibpA* mRNA と相互作用すると予想し、7 章では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 (EMSA) による検証を行なった。検証の結果、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。

以上の結果を総括し、9 章では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。

2. 実験材料と方法

2.1. 使用した大腸菌株、プラスミド、抗体、プライマー

表 1 使用した大腸菌株

大腸菌株	遺伝子型	由来
DH5α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_{K-} , m_{K+}), phoA, supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA1	研究室ストック
BW25113	F ⁻ , λ^- , ilvG ⁻ , rfb-50, rph-1	研究室ストック
BW25113_ΔdnaKJ	F ⁻ , λ^- , ilvG ⁻ , rfb-50, rph-1, Δ dnaKJ	研究室ストック
BW25113_ΔibpAB	F ⁻ , λ^- , ilvG ⁻ , rfb-50, rph-1, ibpAB::kan	本研究のため作成
BW25113_Δpnp	F ⁻ , λ^- , ilvG ⁻ , rfb-50, rph-1, pnp::kan	本研究のため作成
MG1655	F ⁻ , lambda ⁻ , rph-1	研究室ストック
MG1655_Δrne	F ⁻ , lambda ⁻ , rph-1, Δ rne, prne(Cm ^r)	研究室ストック
BL21(DE3)	F ⁻ , dcm, ompT, hsdS(r_{B-} m_{B-}), gal, l (DE3)	研究室ストック

表 2 使用したプラスミド

プラスミド	内容	由来
pCA24N-rhodanese	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-serA	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-sfGFP	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-ibpA	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-ibpB	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-ibpA_IAA	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-ibpA_Btail	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-ibpA_R133A	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pCA24N-ibpA_AEA	T5プロモーター、Cm ^r	本研究のため作成
pBAD-ibpA'-sfGFP	BADプロモーター、Amp ^r	本研究のため作成
pBAD-sfGFP	BADプロモーター、Amp ^r	本研究のため作成
pMW-ibpA'-sfGFP	T5プロモーター、Amp ^r	本研究のため作成
pMW-sfGFP	T5プロモーター、Amp ^r	本研究のため作成

表 3 使用した抗体

抗体	用途	由来
IbpA 抗体	IbpA 発現確認	本研究のため作成
mFX75 (GFP 抗体)	レポーター発現確認	Wako から購入
FtsZ 抗体	内在性コントロール	東京滋恵会医科大学 杉本博士から譲渡
Mouse HRP	mFX75 二次抗体	シグマアルドリッチから購入
Rabbit HRP	IbpA,FtsZ 二次抗体	シグマアルドリッチから購入

表 4 使用したプライマー

青い網かけのあるプライマーは研究室の共有プライマーおよび研究室内で個人から譲渡されたものである。

No.	Primer Name	sequence
SG006	ibpA insert Fw	TCTCTACTGTTTCTCCATgtagccgatgaggacgc
SG007	ibpA insert Rv	tgaatccgtaatcatgggtCATAATCAATAGCTCCT
PM0396	pBAD fw	ATGCCATAGCATT TTTTATCC
PM0395	cloning2Para_rv	ATGGAGAAACAGTAGAGAGTTGCGATAAAAAGCG
MW003	sfGFP_Fw	agtaaaggagaagaacttttctactggag
MW004	sfGFP_Rv for pBAD	GCATAGGCCttattgtatagctcatccatgcc
MW005	vec_reporter_Fw for pBAD	GGCCTATGCGGCCGCTAAGGG
MW015	pBAD_Fw_longer	ATGCCATAGCATT TTTTATCCATAAGATTAGCGG
MW031	hisL_1aa_sfGFP_Rv	ctcctttactcataaaagtctctgtgaatgtttattc
MW043	sfGFP_Rv for pBAD_2	GCGGCCGCATAGGCCttattgtatagctc
MW064	pCA24N_sfGFP_Fw	GGAGAAATTA ACTATGagtaaaggagaagaac
MW065	pCA24N_sfGFP_Rv	GGCTGCAGGTCGACCCttattgtatagctcatcc
MW066	pCA24N_vector_Fw	GGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAG
MW069	ibpA10aa_sfGFP_Rv	GGGATAAATCAAAGTTACGCATAATCAATAGCTCCTGAAATC
MW070	ibpA10aa_sfGFP_Fw	CTTTGATTTATCCCCGCTTTACagtaaaggagaagaac
MW071	ibpA_FL_sfGFP_Rv	gttcttctcttactGTTGATTTTCGATACGGCGCG
MW083	sfGFP_Rv	ttgtatagctcatccatgcc
MW094	pCA_Rhodanese_Fw	GAGGAGAAATTA ACTatgggtcatcaggtgc
MW095	pCA_Rhodanese_Rv	GGCTGCAGGTCGACCCtcaaaccaggagccatc
MW128	pCA_serA_Fw	AGGAGAAATTA ACTatggcaaaggtatcgtgg
MW129	pCA_serA_Rv	GGCTGCAGGTCGACCCtagtacagcagacggg
PT0123	QC_pCA24N delta his_rv	CATAGTTAATTTCTCCTCTTTAATGAATT
MW196	pCA_ibpA_Fw	GAGGAGAAATTA ACTatgCGTAACTTTGATTTATC
MW197	pCA_ibpA_Rv	GCTGCAGGTCGACCCttaGTTGATTTTCGATACGGC

MW209	ibpA_R133A_Fw	GCGCgccATCGAAATCAACtaaGGGTCGACCTGCA GCC
MW210	ibpA_R133A_Rv	GATTTTCGATggcGCGCGGTTTTTTTCGCTTCCGGAA TCAC
MW211	ibpA_IEI-AEA_Fw	GTgccGAAgccAACtaaGGGTCGACCTGCAGCCAAG C
MW212	ibpA_IEI-AEA_Rv	ttaGTTggcTTCggcACGGCGCGGTTTTTTTCGCTTC
MW213	pCA_ibpB_Fw	GAGGAGAAATTA ACTATGCGTAACTTCGATTTA TCCCCACTG
MW214	pCA_ibpB_Rv	GCTGCAGGTCGACCCTTAGCTATTTAACGCGGG ACGTTTCGC
MW215	T7pro-ibp_Fw	GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTAGCCGATG AGGACGCGCCTG
MW218	ibpA_alpha_Rv	GCGTTCGAGATCGATATACAGCAAACCATTAC C
MW220	ibpA_tail_ibpB_Rv	CTGCAGGTCGACCCttaGCTATTTAACGCGGGACG TTCGTTGATTTTCGATACGGCGCGG
MW221	ibpA_KKP::IAA_Fw	AGCGATCGCAGCGCGCCGTATCGAAATCAACtaa GGGTCGACCTGCAGCC
MW222	ibpA_KKP::IAA_Rv	GCGCGCTGCGATCGCTTCCGGAATCACGCGTTC GAGATCG
MW225	ibpB_gfp_Fw	CTACTGTTTCTCCATGTAAGGCCGCCTGGCGCG GCCTG
MW229	T7pro-ibpB'_Fw	GGCCTAATACGACTCACTATAGGGTAAGGCCGC CTGGCGCGGCCTG
MW256	from_pBAD _to_pMW_Rv	GAAAGCGGGCAGTGAGTATACTCCGCTATCG CTACGTGAC
MW257	from_pBAD _to_pMW_Fw	GCAATTCTGGAAGAAATAGCGATACCGCTCGCC GCAGCCGAACG
PM0141	pMW_cloning_Rv	CGCTATTTCTTCCAGAATTGCCATG
PM0142	pMW_cloning_Fw	CTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGA
MW259	groL_qRT_Fw	GTGGGTATCAAAGTTGCACTGCGT
MW260	groL_qRT_Rv	TTTGGTTGGATCCAGGATACCCAT
MW261	ibpA_qRT_Fw	CTGTGGCTGGTTTTTGCTGAG
MW262	ibpA_qRT_Rv	CAGGTTAGCACCCACGAACA

MW263	EF-Tu1_qRT_Fw	CTGTCCAAAGATGAAGGCGG
MW264	EF-Tu1_qRT_Rv	ATCGGGTGGATCAGGGTAAC
MW265	ftsZ_qRT_Fw	GTCGCTGAAGTGGCAAAAGA
MW266	ftsZ_qRT_Rv	TTCAGCAGTTTGTTCGTTTCGG

2.2. プラスミド作成

2.2 に示した各プラスミドは PCR 反応によりクローニングを行った。クローニングした産物は配列解析により確認を行った。PCR に用いた条件は以下に示す。

表 5 PCR 反応液組成

Template	(10 ng)	1 μ l
Each Primers	(5 μ M)	0.6 μ l
2x Gflex PCR buffer		5 μ l
Tks Gflex	(1.25 units/ μ l)	0.2 μ l
MilliQ		Up to 10 μ l

表 6 PCR 反応条件

	Cycle	Temperature($^{\circ}$ C)	Time(sec)
SEG1	1	95	1
		95	10
SEG2	30	55	15
		68	30 /kb
SEG3	1	65	120
		4	Forever

2.3. 凝集傾向タンパク質の可溶性評価

凝集傾向タンパク質の可溶性評価は対象タンパク質の存在量が菌体破碎液の上清画分と沈殿画分のどちらに多いかを評価することにより行った。検出は SDS PAGE による分離と CBB 染色により行った。独立した実験を 3 回繰り返し行った。

2.3.1. サンプルング

1. pCA24N-rhodaese / pCA24N-serA をコンピテントセル BW25113 に形質転換した。
2. 得られたコロニーを LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. 前培養液を LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 1.5 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
4. 菌体培養液に IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記の条件でさらに 1 h 培養を行った。
5. 菌体培養液を 1.76 / OD660 (ml)を遠心分離(室温, 10,000G, 3 min)により集菌し、STE Buffer 440 μ l で再懸濁した。
6. 超音波破碎(Branson sonifier)を用いて Power 3.5, ON 1 秒, OFF 2 秒, 破碎時間 1 分の条件で菌体を破碎した。
7. 得られた菌体破碎液を 100 μ l 回収し、残った破碎液を遠心分離(4°C, 20,000 G 30 min)した。
8. 遠心上清を 100 μ l 回収し、残りを破棄した。
9. チューブに残った沈殿を 1x SDS sample Buffer 400 μ l で再懸濁した。
10. 回収した菌体破碎液、遠心上清に 2x SDS sample buffer を加え、懸濁した。
11. SDS sample buffer を加えた菌体破碎液、遠心上清、沈殿を 95°C, 5 min 加熱し、SDS PAGE のサンプルとした。

表 7 SDS sample buffer 組成

	2x sample buffer	1x sample buffer
Tris-HCl (pH 6.8)	100 mM	50 mM
SDS	4.6%	2.3%
β -mercaptoethanol	10%	10%
Glycerol	20%	10%
Bromophenol blue	0.01%	0.005%

2.3.2. SDS PAGE

1. 組成に従い試薬を混合し、ポリアクリルアミドゲルを作製した。
2. 作製したゲルを電気泳動槽にセットし、SDS-PAGE Running Buffer に浸した。
3. サンプルをゲルのウェルに添加し、200 V, 40 minの条件で泳動した。

表 8 SDS PAGE アクリルアミドゲル組成

	Separating Gel	Stacking Gel
アクリルアミド	12%	5%
Tris-HCl	0.375 mM (pH 8.8)	0.125 mM (pH 6.8)
APS	0.1%	0.1%
SDS	0.1%	0.1%
tetramethylethylenediamine	1/1000量 _	1/1000量 _

表 9 SDS-PAGE Running Buffer 組成

SDS PAGE Running Buffer	
Tris	25 mM
Glycine	200 mM
SDS	1%

2.3.3. CBB染色

1. 電気泳動したゲルをCBB 染色液Iに浸し、15分間振盪した。
2. 振盪したゲルをCBB 染色液IIに浸し、1時間振盪した。
3. 脱染液に浸して1 時間程度振盪した。
4. 一眼レフカメラで撮影した。

表 10 染色液組成

	染色液 I	染色液 II
CBB-R	90 mg	90 mg
酢酸	200 ml	200 ml
2-propanol	500 ml	—
MilliQ	Up to 2l	Up to 2l

表 11 脱染液組成

Methanol	100 ml
酢酸	100 ml
MilliQ	Up to 1l

2.4. プロテオーム解析のサンプル調整

2.4.1. 培養

1. pCA24N-rhodaese / pCA24N-serA をコンピテントセル BW25113 に形質転換した。
2. 得られたコロニーを LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. 前培養液を LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
4. OD₆₆₀ = 0.6 となった時点で菌体培養液に IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記の条件でさらに 1 h 培養を行った。
5. 菌体培養液 2 ml を遠心分離(室温, 10,000G, 3 min)により集菌した。

2.4.2. タンパク質の抽出

1. 200 μ L の PTS 溶液で細胞を懸濁した。
2. 95°Cで 5 分加熱を行った。
3. -80°Cで 10 分放置し凍結させた。
4. 26G の注射針を10回程度通した。
5. 20 分、超音波を当てた(on ice)。
6. タンパク定量を行い、各サンプルのタンパク質量が 50 μ g/50 μ L となるように PTS 溶液で希釈した。

表 12 PTS 溶液組成

	μ l/1ml
MilliQ	670
120 mM SDC	100
120 mM SLS	100
1M Tris (pH 9.0)	100

2.4.3. タンパク質の消化

1. 1 M DTT in 50 mM ammoniumbicarbonate (ABC) buffer を 0.5 μ l 加え、室温で 30 分放置した。
2. 1M IAA in 50 mM ABC buffer を 2.5 μ l 加え、遮光して室温で 30 分放置した。
3. 200 μ l の 50 mM ABC buffer を加えて、5 倍希釈を行った。
4. Lys-C (0.5 μ g/ μ l) を 0.5 μ l (0.5 μ g / 50 μ g protein) 添加して、室温で 3 時間放置した。
5. Trypsin (0.5 μ g/ μ l) を 2.0 μ l (1.0 μ g / 50 μ g protein) 添加して、37°Cで一晩インキュベートした。

2.4.4. PTS 除去

1. 試料溶液と同量の酢酸エチルを添加し、10% TFA を終濃度 0.5%(20 倍希釈)となるように加えた。
2. Vortex を 2 分間行った。
3. 15,700 G で遠心分離(15,700 G, 2min)を行った。
4. 上層の酢酸エチル層を除去した。
5. 下層に含まれる酢酸エチルを除くため、Speed Vac による真空乾燥を 3 時間程度行った。
6. 200 μ l の Buf.A で再懸濁し、Stage Tip にアプライした。
7. 200 μ l の Buf.A で洗いこみを 2 回行った。

表 13 Buf. A, B 組成

	Buf. A	Buf. B
Volume	3.5 ml /samples	2 ml /samples
TFA	0.1%	0.1%
Acetonitrile	2%	80%

2.4.5. 脱塩

1. 1000 μ lのBuf.Bを加えて遠心分離(1000 G, 2 min)した。
2. 1000 μ lのBuf.Aを加えて遠心分離(1000 G, 2 min)した。
3. サンプル全量を加えて遠心分離(500 G, 4 min)した。
4. 1000 μ lのBuf.Aを加えて遠心分離(1000 G, 2 min)した。
5. 500 μ lのBuf.Aを加えて遠心分離(1000 G, 2 min)した。
6. Stage Tipを新しいチューブに移し、300 μ lのBuf.Bを加えて遠心分離(500 G, 2 min)した。
7. 溶液を1.5 mlチューブに回収し、Speed Vacによる真空乾燥を1時間程度行った。
8. 50 μ lのBuf.Aで再溶解させた。
9. 遠心分離(20000 G, 5 min)して上清を回収し、LC/MS用のバイアルに移した。

2.5. IbpA 抗体品質確認

2.5.1. サンプルング

1. pCA24N-ibpA / pCA24N-ibpB をコンピテントセル BW25113 に形質転換した。
2. 得られたコロニーを LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. 前培養液を LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 1.5 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
4. 菌体培養液に IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記の条件でさらに 1 h 培養を行った。

2.5.2. TCA 沈殿

1. 菌体培養液 250 μ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し、10% 冷 TCA を加え vortex した後氷上で 10 min 静置した。
2. 遠心分離(4°C, 20000 G, 3 min)した。
3. 上清破棄後、冷アセトン 1 ml を加え vortex した。
4. 遠心分離(4°C, 20000 G, 3 min)した。
5. 3.の操作と 4.の操作を再度行った。
6. 菌体回収 OD₆₆₀ x100 μ l の 1x sample buffer 加えて vortex した。
7. 振盪 (37°C, 1400 rpm, 15 min)を行った。

2.5.3. SDS PAGE

2.3.2.と同様

2.5.4. ウェスタンブロットティング

1. PVDF メンブレンをメタノールに 5 分間浸した。
2. メンブレンとろ紙を Blotting Buffer に 5 分間浸した。
3. 電気泳動したゲルを、Trans-BlotSD/Semi-Dry Transfer cell (Bio-Rad)を用いて、転写(100 mA, 1 時間)を行った。
4. 転写後のメンブレンをスキムミルク溶液に浸し、1 時間振盪した。
5. メンブレンを TBS-T Buffer で洗浄、10 分間振盪する操作を 2 回行った。
6. 一次抗体を適当な濃度になるように加え、攪拌したスキムミルク溶液に、メンブレンを浸し、1 時間振盪した。
7. 操作 5.を再度行った。
8. 二次抗体を適当な濃度になるように加え、攪拌したスキムミルク溶液に、メンブレンを浸し、1 時間振盪した。
9. 操作 5.を再度行った。
10. Immobion Western HRP Chemiluminescent Substrate(Millipore) の Luminol Regent と Peroxide Solution を当量混合し、メンブレンに滴下、行き渡らせた。
12. LAS-4000 MC (FUJIFILM) によって撮影した。
検出条件 mode: Standard, 感度: High

表 14 TBS-T Buffer 組成

20mM Tris HCl(pH7.4)
140mM NaCl
0.2% TWEEN20

2.5.5. CBB 染色

2.3.3.と同様

2.6. 凝集蓄積条件における IbpA の発現量確認

2.6.1. 菌体培養

1. BW25113 野生型株、BW25113_ΔdnaKJ、pCA-rhodanese/pCA-serA/pCA-rpoH を導入した BW25113 野生型株のコロニーを LB 液体培地(pCA プラスミドを導入した野生型株のみ+Cm)に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
2. 前培養液を LB 液体培地(pCA プラスミドを導入した野生型株のみ+Cm)に植菌し、37°C, 1.5 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. プラスミドを導入した菌体培養液にのみ IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記条件でさらに 45 min 培養を行った。
4. 熱ショック条件サンプルのみ 42°C の振盪培養機に移し、さらに 15 min 培養を行った。

2.6.2. TCA 沈殿

2.5.2.と同様

2.6.3. SDS PAGE

2.3.2.と同様

2.6.4. ウェスタンブロットニング

2.5.4.と同様

2.7. mRNA 量確認

2.7.1. 菌体培養

2.6.1.と同様の操作で行なった。

2.7.2. Total RNA 抽出

2.7.2.1. Tripure を用いた RNA 抽出

1. 氷を容量の半分程度まで入れた 15 ml チューブに培養液 5 ml を入れ、遠心分離 (4°C, 4000 G, 5 min)した。
2. 上清を破棄し、Tripure Isolation reagent(シグマアルドリッチ)を 500 µl 添加した。
3. 室温で 5 min 静置した。
4. クロロホルムを 100 µl 添加し vortex したのち、室温で 5 min 静置した。
5. 遠心分離(4°C, 20000 G, 5 min)し、水層を分取した。
6. クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1 溶液を等量添加し vortex した。
7. 遠心分離(4°C, 20000 G, 5 min)し、水層を分取した。
8. 等量のイソプロパノールを添加し、転倒混和したのち室温で 15 min 静置した。
9. 遠心分離(4°C, 20000 G, 15 min)し、上清を破棄した。
10. 75%エタノールでリンスし、遠心分離(4°C, 20000 G, 5 min)し、上清を破棄した。
11. ペレットを乾燥させ、90 µl の MilliQ で再懸濁した。

2.7.2.2. DNase 処理

1. 抽出した Total RNA に Recombinant DNaseI(タカラバイオ) 1µl、付属の 10x DNase buffer 10µl を添加した。
2. 37°C, 30 min 静置した

2.7.2.3. RNeasy mini kit を用いた RNA 精製

1. DNase 処理を行なった RNA 溶液を RNeasy mini kit (キアゲン)の protocols に従って精製した。
2. 精製 RNA 濃度を Nanodrop (サーモフィッシャー)で測定した。

2.7.3. qRT-PCR

1. Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB)の protocols に従い反応液調製を行なった。
2. Mx3000P(Agilent technology)により PCR 反応を行なった。解析ソフトウェアには MxPro を用いた。
3. 得られた Threshold Cycle 値(Ct)を元に、比較 Ct 法による計算を行い比較定量値を算出した(33)。標準偏差に基づきエラーバーを求めた。

2.8. レポーターアッセイ

サンプリングより後の行程は 2.6.2.~2.6.4.と同様

2.8.1. サンプリング

1. BW25113 野生型株と各欠損変異株、もしくは pCA プラスミドを導入した BW25113 株に pBAD-ibpA'-sfGFP/pBAD-sfGFP/pBAD-ibpB'-sfGFP を形質転換した。
PNPase 欠損株を用いた実験では、pMW-ibpA'-sfGFP/pMW-sfGFP を用いた。
2. 得られたコロニーを LB 液体培地(+Amp、pCA プラスミド導入菌株の場合はさらに +Cm、RNaseE 枯渇変異株では+0.2% Arabinose)に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. 前培養液を LB 液体培地(+Amp、pCA プラスミド導入菌株にはさらに+Cm)に植菌し、37°C, 1.5 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
4. pCA プラスミド/pMW プラスミドを導入した菌体培養液にのみ IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記条件でさらに 1 h 培養を行った。

2.9. IbpA-sfGFP の顕微鏡観察

2.9.1. 菌体培養

1. BW25113 野生型株、BW25113- Δ dnaKJ、pCA-rhodanese を導入した BW25113 野生型株に pBAD-ibpA_{fl}-sfGFP を形質転換した。
2. 得られたコロニーを LB 液体培地(pCA プラスミドを導入した野生型株のみ+Cm)に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. 前培養液を LB 液体培地(pCA プラスミドを導入した野生型株のみ+Cm)に植菌し、37°C, 1.5 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った
4. プラスミドを導入した菌体培養液にのみ IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記条件でさらに 1 h 培養を行った。

2.9.2. 顕微鏡観察

1. 回収した菌体を 5 μ l スライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて 3 min 静置した。
2. 倒立型顕微鏡 IX71 (Olympus)による観察を行なった。対物レンズは UPlanApo x100 / 1.34 Oil Iris (Olympus)、接眼レンズは WH10x/22 (Olympus) を用いた。GFP の蛍光観察には、水銀ランプと GFP フィルターを用いた。カメラは electron multiplying CCD camera iXon DV897 (Andor)を使用し、撮影には付属のソフトウェアである Andor SOLIS (Andor)を用いた。

2.10. IbpA の精製

1. BL21(DE3)株を pCA-IbpA で形質転換した。
2. 得られたコロニーを LB 液体培地(+Cm) に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. 前培養液を LB 液体培地(+Cm) に植菌し、37°C, 4 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
4. IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記条件でさらに 2 h 培養を行った。
5. 菌体培養液を回収し、遠心分離(4°C, 5000 G, 15 min)した。
6. 上清を破棄し、STE バッファー 50 ml で再懸濁した。
7. 超音波破碎(Branson sonifier)を用いて Power 3.5, ON 1 秒, OFF 2 秒, 破碎時間 10 分の条件で菌体を破碎した。
8. 遠心分離(4°C, 20000 G, 30 min)を行い、上清を破棄した。
9. Tris-HCl (pH 8.0)に Urea を終濃度 2 M で加え、懸濁したのち 30 min 静置した。
10. 遠心分離(4°C, 20000 G, 30 min)を行い、上清を破棄した。
11. Tris-HCl (pH 8.0)に Urea を終濃度 4 M で加え、懸濁したのち 30 min 静置した。
12. 遠心分離(4°C, 20000 G, 30 min)を行い、上清を破棄した。
13. Tris-HCl (pH 7.4)に Urea を終濃度 6 M で加え、懸濁したのち 30 min 静置した。
14. 遠心分離(4°C, 20000 G, 30 min)を行い、上清を平衡化した Q-sepharose high quality カラム(GE ヘルスケア)にアプライした。
15. 同バッファー+6 M Urea, 100 mM KCl で 10 C.V.分 Wash を行った。
16. 溶出操作を 200 mM, 250mM, 300mM KCl で三段階に分け、それぞれ 10C.V.分を行った。
17. SDS PAGE により適当なフラクションを定め、透析幕に回収した。
18. 透析操作は四段階に分けて行い、Urea を 4 M, 2 M, 1 M, 0 M 添加したバッファーで 4°C, 3 h, それぞれ 2 l の容量で行った。
19. 回収した透析後サンプルを Amicon Ultra-15 5k (メルク)にアプライし、遠心分離(4°C, 5000 G, 45 min)することで限外濾過を行った。

2.11. PURE system

2.11.1. サンプル調製

1. PCR 反応により T7promoter-*ibpA* 5'UTR-sfGFP/ T7promoter-pCA 5'UTR- sfGFP 断片を作成した。
2. 反応液を調製し、翻訳反応を行った (37°C, 2 h)。
3. 翻訳後、2x SDS PAGE sample beffer と等量混合し、95°C, 5 min 加熱した。

表 15 PURE system 反応液組成

テンプレート	30 ng
sol1-buf.	7.5 μ l/ 15 μ l
sol2-Ez	0.75 μ l/ 15 μ l
sol3-Ribosome	0.75 μ l/ 15 μ l
IbpA	2.0 μ M
Cy5-fMet-tRNA	1 Abs/ml
MilliQ	Up to 15 μ l

2.11.2. SDS PAGE

2.3.2 と同様の操作で行なった。

蛍光検出は FLA2000 (FUJIFILM) の 633nm 検出系で行い、解析は Multi Gauge(FUJIFILM)にて行った。標準偏差に基づきエラーバーを求め、Student の t 検定により定量値の検定を行った。

2.12. Native PAGE

2.12.1. サンプルング

1. pCA24N-rhodaese / pCA24N-serA をコンピテントセル BW25113 に形質転換した。
2. 得られたコロニーを LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. 前培養液を LB(+Cm)液体培地に植菌し、37°C, 1.5 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
4. 菌体培養液に IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記の条件でさらに 1 h 培養を行った。
5. 菌体培養液を 1.76 / OD660 (ml)を遠心分離(室温, 10,000G, 3 min)により集菌し、STE Buffer 440 μ l で再懸濁した。
6. 超音波破碎 (Branson sonifier) を用いて Power 3.5, ON 1 秒, OFF 2 秒, 破碎時間 1 分の条件で菌体を破碎した。
7. 回収した菌体破碎液に 2x Native PAGE sample buffer を加え、懸濁した。

表 16 2x Native PAGE sample buffer 組成

Tris-HCl (pH 6.8)	100 mM
β -mercaptoethanol	10%
Glycerol	20%
Bromophenol blue	0.01%

2.12.2. 電気泳動

以下のゲル、溶液を用いて 2.3.2.と同様の操作を行った。

表 17 Native PAGE アクリルアミドゲル組成

	Separating Gel	Stacking Gel
アクリルアミド	12%	5%
Tris-HCl	0.375 mM (pH 8.8)	0.125 mM (pH 6.8)
APS	0.1%	0.1%
tetramethylethylenediamine	1/1000量 _	1/1000量 _

表 18 Native PAGE Running Buffer 組成

SDS PAGE Running Buffer	
Tris	25 mM
Glycine	200 mM
SDS	1%

2.12.3. CBB 染色

2.3.3.と同様の操作を行った。

2.13. ショ糖密度勾配遠心

1. 精製 IbpA, IbpA 変異体をそれぞれ 15 μ M に調整し、37°C 30 min 静置した。
2. プラスチック試験管に 50% Sucrose(Tris HCl(pH 7.4))を 5.5 ml 入れ、15% Surose(Tris HCl(pH 7.4))を上層させた。
3. キャップをはめ、グラジエントマスター(コスモバイオ)により密度勾配溶液を作成した。
4. 密度勾配溶液に IbpA 溶液を 300 μ l アプライし、遠心(4°C, 16000 G, 80 min)を行った。
5. フラクシオンコレクター(コスモバイオ)を用いてフラクシオン分画を行った。
6. 各フラクシオンを 2.5.2.と同様の操作で TCA 沈殿した。
7. 2.3.2.と同様の操作で SDS PAGE を行なった。
8. 2.5.4.と同様の操作でウェスタンブロッティングを行なった。

2.14. ゲルシフトアッセイ

2.14.1. In vitro transcription

4. PCR 反応により T7promoter-*ibpA* 5'UTR-sfGFP/ T7promoter-pCA 5'UTR- sfGFP 断片を作成した。
5. CUGA 7 in vitro Transcription Kit の反応プロトコルに従い反応と DNase による反応停止操作を行った。
6. RNeasy mini column kit のプロトコルに従い RNA 精製を行った。

2.14.2. ゲルシフト

1. 精製した RNA と精製 IbpA を決定した濃度に希釈し、混合した。
2. 37°C, 30min 静置した。
3. 静置後のサンプルに Roding buffer を 1/10 量混合した。

2.14.3. 電気泳動

1. 作成した TBE-ポリアクリルアミドゲルにサンプルをアプライした。
2. 定電圧条件, 200V, 80 min の条件で電気泳動を行なった。
3. ゲルを TBE バッファーに浸し、1/20000 量の Sybr Gold を添加した。
4. 5 min 振盪後、トランスイルミネーターによる検出を行なった。

表 19 TBE アクリルアミドゲル組成

アクリルアミド	5%
APS	0.1%
tetramethylethylenediamine	1/1000量
TBE buffer	Up to 15ml

2.15. RNA 安定性解析

2.15.1. 菌体培養

1. BW25113 野生型株、BW25113_ΔdnaKJ、pCA-rhodanese/pCA-serA/pCA-rpoH を導入した BW25113 野生型株のコロニーを LB 液体培地(pCA プラスミドを導入した野生型株のみ+Cm)に植菌し、37°C, 16 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
2. 前培養液を LB 液体培地(pCA プラスミドを導入した野生型株のみ+Cm)に植菌し、37°C, 1.5 h, 180 rpm の条件で振盪培養を行った。
3. プラスミドを導入した菌体培養液にのみ IPTG を終濃度 0.1 mM で添加し、上記条件でさらに 45 min 培養を行った。
4. 培養液に Rifampicin 250µg/ml を添加し、0 min, 2 min, 5 min 後に培養液を回収した。

2.15.2. Total RNA 調製

2.7.2 と同様の操作で行なった。

2.15.3. qRT-PCR

2.7.3.と同様の操作で行なった。

3. タンパク質凝集の蓄積と *ibpA* 翻訳の関係性

3.1. 序文

ibpA 翻訳は RNAT と呼ばれる mRNA の二次構造を介した翻訳制御によって調節されている。*ibpA* の SD 配列は mRNA の二次構造によりリボソームの接近を阻害されており、熱揺らぎによって mRNA 二次構造が崩壊すると SD 配列が露出し翻訳可能な状態となる(25)。しかし過去の研究において、mRNA の二次構造の崩壊が不十分であると考えられる温度においても、タンパク質凝集の蓄積を伴うストレス条件下において IbpA の発現量が上昇することが報告された(28-32)。そこで、本章ではタンパク質凝集が温度非依存的に IbpA の発現を上昇させる可能性を検証した。凝集傾向タンパク質の過剰発現によりストレスを伴わないタンパク質凝集蓄積を引き起こし、IbpA の発現量変化を検証した結果、IbpA がタンパク質凝集に応答して発現が上昇することが示された。また、続けて行った *ibpA* 5'UTR を有するレポーターを用いた検証により、その応答が翻訳レベルで行われていることが示された。

3.2. タンパク質凝集蓄積条件における IbpA 発現上昇

過去の調査により、温度非依存的に IbpA の発現上昇が見られた DnaK/DnaJ 欠損、酸化ストレスといった条件は、大腸菌細胞内のタンパク質の変性とタンパク質凝集の形成・蓄積を引き起こすことが知られている(31, 32)。そのため、IbpA の発現上昇が見られた原因として、タンパク質凝集の蓄積により引き起こされた可能性と、細胞内の IbpA 発現に関連するタンパク質が変性したことにより引き起こされた可能性の 2 通りが考えられる。これらを区別するため、大腸菌細胞内において凝集傾向であるタンパク質を過剰発現させたタンパク質凝集蓄積条件と IbpA 発現量の間を検証した(図 10)。

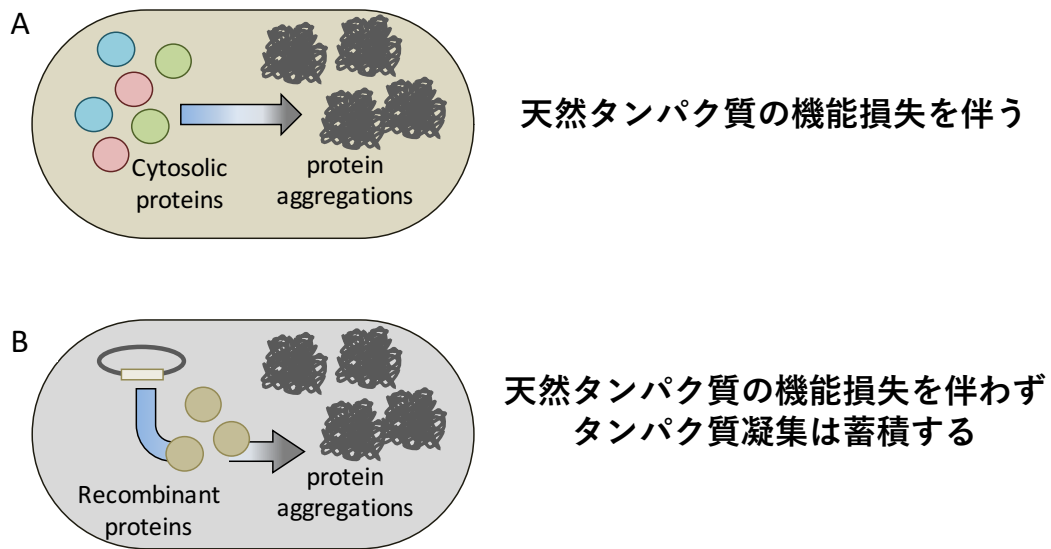


図 10 タンパク質凝集の蓄積条件

- A. 過去に温度非依存的に IbpA の発現上昇が見られた条件 (DnaK/DnaJ 欠損、酸化ストレス) は、細胞質中のタンパク質の変性を引き起こすためタンパク質凝集の蓄積とともに細胞内タンパク質の機能損失を引き起こす。
- B. 凝集傾向タンパク質の過剰発現による凝集蓄積条件は細胞質内のタンパク質の変性は引き起こさないため、タンパク質凝集による影響のみを検証することができる。

3.2.1. 凝集傾向タンパク質の凝集確認

タンパク質凝集蓄積を引き起こすための凝集傾向タンパク質として、過去の報告により大腸菌細胞内において強い凝集性を示すことが知られているウシ由来 Rhodanese(34)と内在性の酵素である D-3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(SerA)を採用した(31)。これらのタンパク質の凝集傾向が本研究で用いる条件においても再現できるか確認するため、初めに可溶性評価を行った。大腸菌野生型株において発現させたこれらのタンパク質が、菌体破砕液の上清画分と沈殿画分のどちらに濃縮されるか確認することによって、可溶傾向にあるか凝集傾向にあるかを評価した。可溶性評価の結果、過剰発現させたこれらのタンパク質は菌体破砕液の全画分で確認され、なかでも沈殿画分へ濃縮されている様子が見られた(図 11)。どちらのタンパク質においても沈殿画分への濃縮が本研究で用いる条件においても凝集傾向にあると判断できる程度であったため、今後の検証に用いることにした。

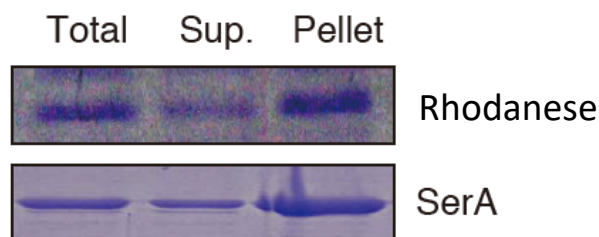


図 11 凝集傾向タンパク質の可溶性評価

Total : 菌体破碎液

Sup. : 菌体破碎液上清画分

Pellet : 菌体破碎液沈殿画分

3.2.2. プロテオーム解析

タンパク質凝集の蓄積と *IbpA* 発現量変化の関連について検証するため、比較定量プロテオミクスを用いた解析を行った。大腸菌野生型株において、凝集傾向タンパク質を過剰発現させた条件と、可溶性が高く、過剰発現させてもタンパク質凝集とならない *super folder GFP (sfGFP)* を過剰発現させた条件における発現量を比較し、*IbpA* の発現がタンパク質凝集の蓄積に依存して増加するかどうかを確認した。また、タンパク質として同定されていると判断する際の基準として、アミノ酸配列中の3カ所以上がペプチドとして検出されていることを条件とした。検証の結果、*IbpA* の発現がタンパク質凝集の蓄積に伴って上昇している様子が見られた(図 12)。このことから、*IbpA* はストレスに伴う発現関連タンパク質の変性ではなく、タンパク質凝集の蓄積に呼応して発現量が増加するということが示された。また、他の主要な *Hsp* についてもアミノ酸配列中の3カ所以上がペプチドとして検出されたものについて発現量を確認したところ、*ClpB* が *Rhodanese* 過剰発現条件において2倍以上に発現量が増加していたほか、*ibpA* と同オペロン上に遺伝子が存在する *IbpB* でも *Rhodanese*、*SerA* 両方の過剰発現条件において発現量の増加が見られた(表 16)。*IbpA*、*IbpB* でのみ両タンパク質凝集蓄積条で発現上昇が見られたことから、この発現量増加が通常の熱ショック応答ではなく、*ibpAB* オペロンでのみ見られる応答であることが示唆された。

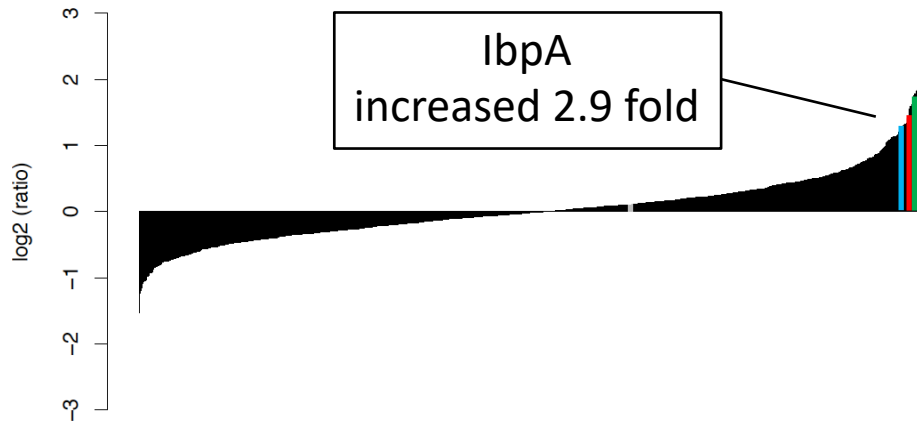
表 20 タンパク質凝集蓄積による Hsp の発現量変化

	Rhodanese ++	SerA++
IbpA	2.9	3.7
IbpB	3.5	4.2
DnaK	1.7	1.4
DnaJ	1.2	1.0
ClpB	2.5	1.4
HslU	1.5	0.9
GroEL	1.6	1.0
GroES	1.5	1.4
Trigger factor	0.7	1.0

タンパク質凝集蓄積条件におけるプロテオーム解析により同定された主要な Hsp の発現量変化。数字は Fold change の値を示す。

Rhodanese++: Rhodanese 過剰発現条件, SerA++: SerA 過剰発現条件

A Rhodanese⁺⁺/ sfGFP⁺⁺



B SerA⁺⁺/ sfGFP⁺⁺

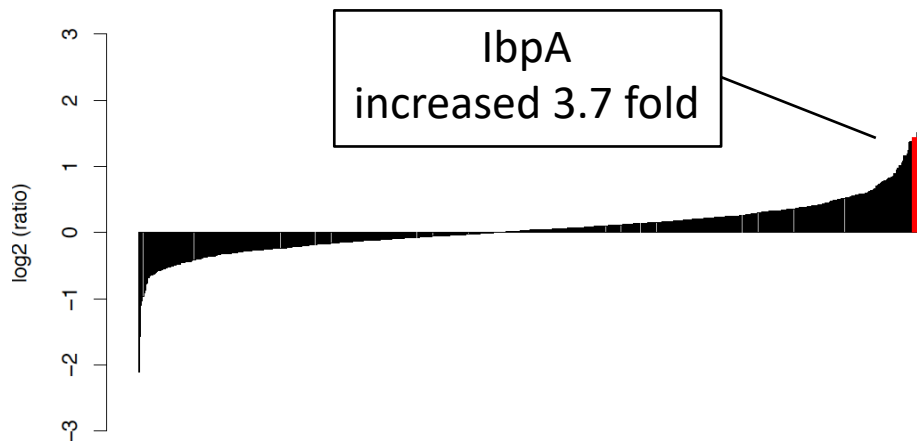


図 12 タンパク質凝集蓄積条件におけるプロテオーム解析

A. Rhodanese 過剰発現条件におけるタンパク質発現量変化のバープロット。

赤:IbpA、緑:IbpB、青:ClpB

B. SerA 過剰発現条件におけるタンパク質発現量変化のバープロット。

赤:IbpA、緑:IbpB

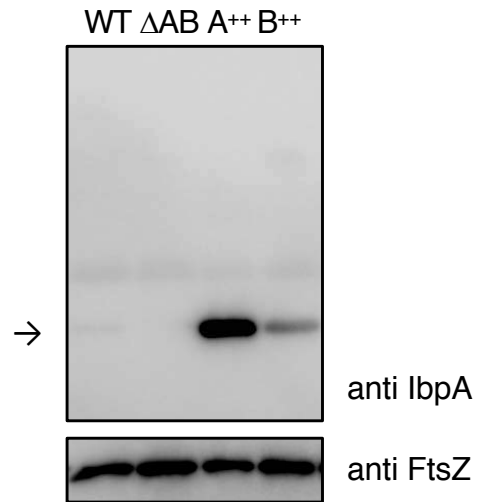
3.2.3. IbpA の発現解析

タンパク質凝集が蓄積すると、その処理のために細胞内のシャペロンが動員される。Hsp70 である DnaK は、Hsp の転写制御を行う σ^{32} RNA ポリメラーゼサブユニットの分解に寄与している(7, 8)。そのため DnaK が凝集処理に動員されることで σ^{32} が安定化し、*ibpA* を含め多くの Hsp の転写が活性化される(9)。3.2.2 の結果において、IbpA の発現上昇が細胞内タンパク質の機能損失によるものではなくタンパク質凝集の蓄積に起因することが示された。このタンパク質凝集への応答が転写によるものであるか、未知の機構による翻訳抑制の解除によるものであるかを区別するためにはさらなる検証が必要である。そこで、タンパク質凝集の蓄積条件の他に熱ショック条件、転写促進条件における IbpA の発現量変化を行い、タンパク質凝集の蓄積に伴う IbpA の発現上昇が既知の熱ショック応答と異なるものであるかどうかの確認を行った。

3.2.3.1. IbpA 抗体の確認

IbpA 発現についてのさらなる解析はウェスタンブロットティングにより行った。それに際し、作成した IbpA 抗体の品質確認を行った。大腸菌は IbpA の相同性の高いホモログである IbpB を有している。そこで、作成した IbpA 抗体が IbpA 特異的であるか IbpB も認識するのかが確認した。確認は、大腸菌野生型株、*ibpAB* オペロン欠損株、*ibpAB* オペロン欠損株、*ibpAB* オペロン欠損株にプラスミドから IbpA, IbpB をそれぞれ発現させた条件で、ウェスタンブロットティングにより行った。IbpA 抗体を用いたウェスタンブロットティングを行なった結果、野生型株(WT)でごく低強度のバンドが検出され、*ibpAB* オペロン欠損株(ΔAB)においてはバンドが検出されなかった(図 13)。また、 ΔAB においてもプラスミドからの発現誘導により IbpA を補完した場合(A^{++})にはバンドが検出され、IbpB を発現誘導した場合(B^{++})も低強度のバンドが検出された(図 13A)。CBB 染色による発現確認により IbpA, IbpB が同程度に発現している様子が見られた(図 13B)。そのため、作成した IbpA 抗体が IbpA と IbpB で特異性は異なるが、実際の検証においては両者に由来した発現量変化を検出することが予想された。

A



B

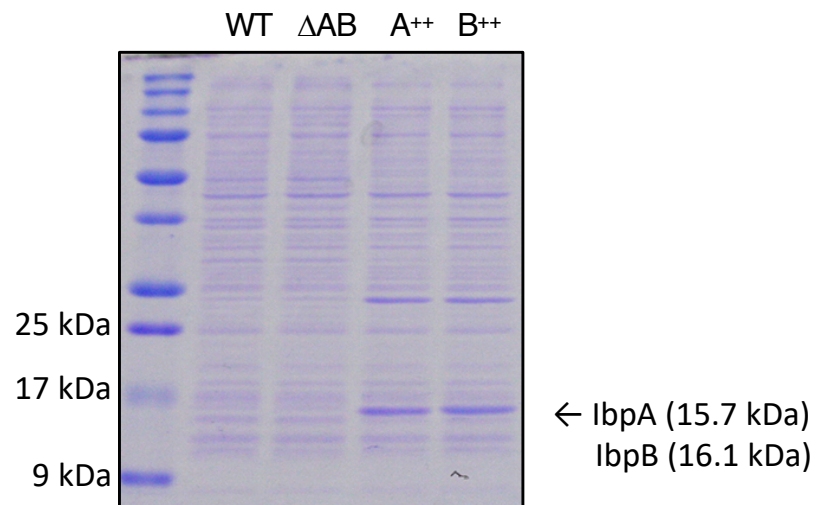


図 13 IbpA 抗体の品質確認

- A. IbpA 抗体を用いたウェスタンブロッティング(上段)とFtsZ抗体を用いたアプライ量確認(下段)
 矢印: IbpA, IbpB, FtsZ: 恒常発現タンパク質、WT: 野生型株、ΔAB: *ibpAB* オペロン欠損株、
 A⁺⁺: *ibpAB* オペロン欠損株 IbpA 過剰発現、B⁺⁺: *ibpAB* オペロン欠損株 IbpB 過剰発現
- B. CBB 染色による IbpA, IbpB 発現確認。矢印: IbpA、IbpB のバンド位置である。

3.2.3.2. IbpA の発現量の確認

3.2.3.1.で品質確認を行った IbpA 抗体を用い、ウェスタンブロッティングによる IbpA 発現変化の確認を行った。発現を確認するにあたり、通常 conditions で生育させた野生型株と、熱ショック、DnaK/DnaJ 欠損株、タンパク質凝集蓄積条件(Rhodanese 過剰発現)、転写誘導条件(σ^{32} RNA ポリメラーゼサブユニット過剰発現)の 4 条件との比較を行った。また既知の熱ショック応答と比較するため、主要な Hsp である GroEL の発現確認も同様に行った。熱ショック条件(図中 WT 42°C)、DnaK/DnaJ 欠損条件(図中 Δ KJ)においては IbpA、GroEL の両方で発現量の上昇が見られたが、タンパク質凝集蓄積条件(図中 Rho⁺⁺)においては IbpA でのみ発現上昇が見られ、転写誘導条件(図中 σ^{32++})においては GroEL においてのみ発現上昇が見られた。また、タンパク質凝集蓄積条件として SerA を過剰発現させた際にも同様の傾向が見られた(図中 SerA⁺⁺)。このことから、IbpA が特異的にタンパク質凝集に応答することが示された。

A

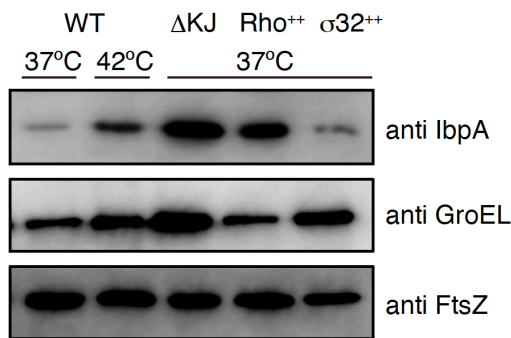


図 14 IbpA 発現量の確認

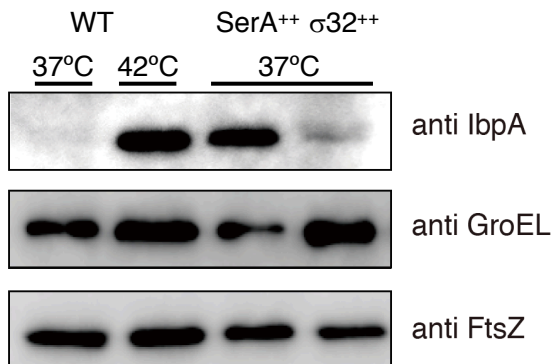
A. 各条件における IbpA 発現確認

WT: 野生型株、 Δ KJ: DnaK/DnaJ 欠損株、Rho⁺⁺: Rhodanese 過剰発現、 σ^{32++} : σ^{32} 過剰発現

B. タンパク質凝集蓄積条件として SerA 過剰発現を用いた IbpA 発現確認

SerA⁺⁺: SerA 過剰発現

B



これらのストレス条件において、転写上昇による通常の熱ショック応答が起こっているかどうかを確認するために、qRT-PCRを用いた mRNA の定量を行った。IbpA と GroEL、FtsZ の mRNA をそれぞれのストレス条件で定量し、*ftsZ* mRNA 量を基準とした比較 Ct 法にて株間の mRNA 量を相対比較した。その結果、野生型株と比較して Δ KJ においては IbpA で 8 倍、GroEL では 18 倍の mRNA 量の増加が見られ、Rho⁺⁺条件においても IbpA で 2 倍、GroEL では 11 倍の増加が見られた。さらに、 σ^{32++} 条件においても、IbpA で 10 倍、GroEL では 43 倍もの顕著な増加が見られた(図 15)。このように、ウェスタンブロッティングで IbpA の発現上昇が確認された Δ KJ、Rho⁺⁺条件においても、発現上昇がみられなかった σ^{32++} 条件において IbpA の mRNA 量は共通して上昇していることが示された。これは IbpA 発現において、転写後調節が主要な制御であることを示している。

また、HS 条件では IbpA で 0.04 倍と mRNA 量が大幅に減少し、GroEL ではほとんど変化が見られないという結果が得られた(図 15)。大腸菌における熱ショック応答は継続した熱ショック下においても 5 分ほどで収束することが知られている(35)。そのため HS 条件の結果はサンプリング中に熱ショック応答による転写量の上昇が終了し、mRNA が分解されつつある細胞内の状態を反映した定量結果になったと考えられる。

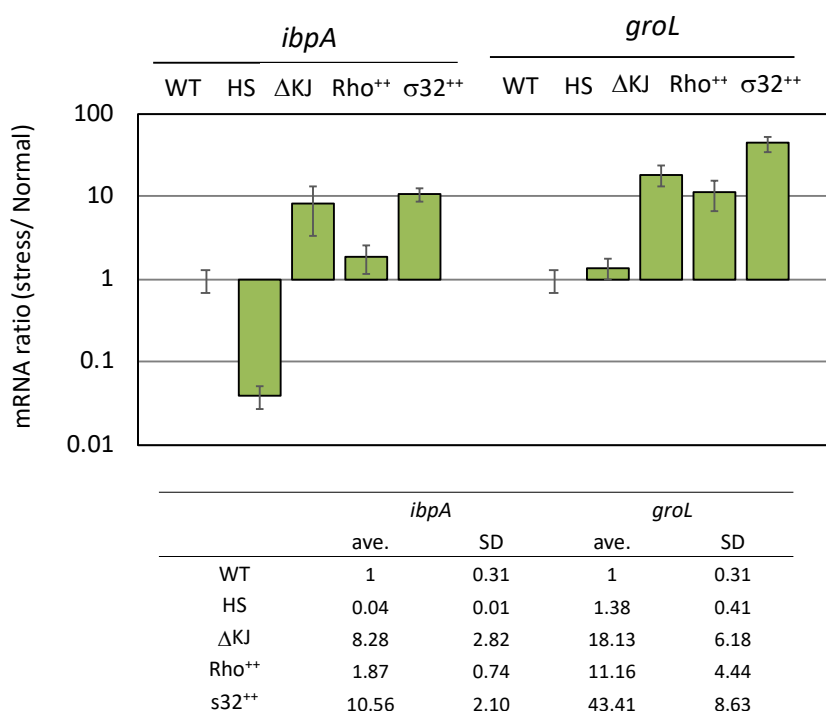


図 15 qRT-PCR による mRNA 定量

比較 Ct 法による相対定量結果

WT:野生型株、DKJ:DnaK/DnaJ 欠損株、Rho⁺⁺:Rhodanese 過剰発現、 σ^{32++} : σ^{32} 過剰発現、*ibpA*: *ibpA* mRNA 結果、*groL*: GroEL mRNA 結果

3.3. レポーター系による *ibpA* 翻訳効率の変化

前項の結果より、*IbpA* の発現がタンパク質凝集の蓄積に呼応すること、転写後の調節が *IbpA* 発現量に重要であることが示された。この応答が翻訳レベルで起こっているものであるかを確認するために、レポーター系を利用した翻訳効率の確認を行った。ここでは、*ibpA* 5'UTR を有するレポーター(sfGFP)をアラビノース誘導プラスミドより発現させ、発現効率をウェスタンブロッティングにより確認した。タンパク質凝集を伴う条件として、前項で用いた *DnaK/DnaJ* 欠損条件(ΔKJ)と凝集傾向タンパク質の過剰発現条件(Rho^{++})を用いた。検証の結果、*ibpA* 5'UTR を有するレポーター特異的にタンパク質凝集蓄積条件での発現上昇が見られた一方で、プラスミド由来の 5'UTR を有するレポーターでは発現上昇が見られなかった(図 16A)。また、*SerA* の過剰発現においても同様の結果が得られた(図 16B)。本実験は全条件において転写をアラビノース誘導により揃えているため、レポーター発現量の差は翻訳効率の違いに由来すると考えられる。このことから、*IbpA* 発現におけるタンパク質凝集蓄積に対する応答は、翻訳レベルで起こっていることが示された。

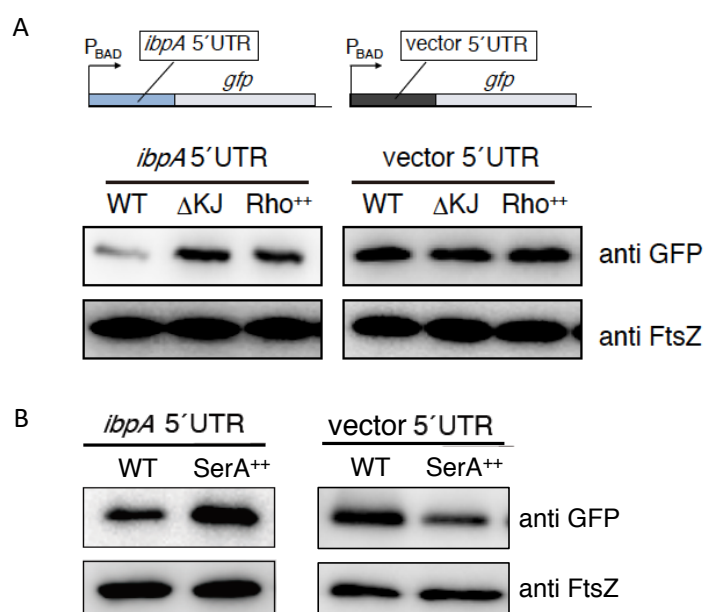


図 16 レポーター系による *ibpA* 翻訳効率の確認

A. 検証に用いたコンストラクト (上段) とウェスタンブロッティング結果(下段)

WT : 大腸菌野生型株、 ΔKJ :*DnaK/DnaJ* 欠損株、 Rho^{++} :*Rhodanese* 過剰発現

B. タンパク質凝集蓄積条件として *SerA* 過剰発現を用いた *ibpA* 翻訳効率の確認

3.4. 考察

過去の報告により示唆されていた *IbpA* 発現上昇とタンパク質凝集の蓄積の関連性について検証した結果、*IbpA* の発現がタンパク質凝集により上昇することが示された。また、この応答は他の *Hsp* では見られず、*IbpA* 特異的に見られることが示された。しかしながら、今回比較定量プロテオミクスにより示された *IbpA* における約 3~4 倍の発現上昇は、過去に報告された *DnaK/DnaJ* 欠損条件における約 50 倍の発現上昇、酸化ストレスによる約 10 倍の発現上昇と比較すると、顕著な発現上昇とは言えない(図 12)。この発現上昇度合いの差が見られる原因として、*DnaK/DnaJ* 欠損条件・酸化ストレス条件における *IbpA* の転写誘導が考えられる。*IbpA* の転写制御を行う σ^{32} は、通常時は *DnaK* を介した分解促進により細胞内での σ^{32} 存在量を調節されている。そのため、*DnaK* の欠損は σ^{32} を安定化し、転写レベルでの熱ショック応答を引き起こすことが知られている(7, 8)。また、酸化ストレスは新生タンパク質のミスフォールディングとタンパク質凝集形成を促進し、*DnaK* がタンパク質凝集にリクルートされることから σ^{32} の分解促進が起こらず、その結果熱ショック応答を引き起こすことが知られている(36)。このことから、*DnaK/DnaJ* 欠損条件・酸化ストレス条件においては *IbpA* の発現上昇が強い転写促進、翻訳抑制の解除と、相乗的な促進を受けていると考えられる。

その一方でタンパク質凝集の蓄積条件においては 3.2.3.2.における mRNA の比較定量において、*DnaK/DnaJ* 欠損や σ^{32} の過剰発現による転写誘導と比較して mRNA 増加の程度が弱い様子が見られた。そのため、転写レベルでの発現促進が弱いタンパク質凝集蓄積条件における *IbpA* 発現量変化は、過去に報告された条件と比較して低い程度となったと考えられる。

また、同解析では *IbpA* だけでなく *IbpB* でも発現が上昇している様子が見られた。本章の解析によって転写、翻訳の両段階において発現が促進されていることが示唆された *IbpA* と同等以上の発現上昇が *IbpB* で見られたことから、*IbpB* の発現制御においても転写、翻訳の両段階で促進を受けている可能性が考えられる。

IbpA の発現解析においては、3.2.3.1.の確認により、*IbpA* 抗体が *IbpA* だけでなく *IbpB* も認識することが示された。このことから、3.2.3.2.のウェスタンブロッティングによる *IbpA* 発現量の検証は *IbpB* の発現量も反映した結果となっていることが考えられる。しかし、*ibpA* と *ibpB* は同オペロンに存在しており、*ibpA* mRNA 量が増加していた σ^{32++} 条件においては *ibpB* mRNA 量も増加していると考えられる。しかしながら、同程度の *ibpA* mRNA 増加が見られ、かつウェスタンブロッティングによる発現上昇が確認された ΔKJ と比較して、 σ^{32++} 条件のウェスタンブロッティングの結果は野生型株と同程度に少なかった(図 14, 15)。なお、*ibpB* mRNA については σ^{54} 制御による転写開始も知られている(27)。 σ^{54} 制御プロモーターは窒素枯渇によって機能することが知られているが、*DnaK/DnaJ* の欠損により窒素枯渇が引き起こされるというような報告は過去になく、ま

た過去の調査では DnaK 機能の有無は窒素枯渇応答と関連していないことが示されている(37)。これらのことから、3.2.3.2.の結果は IbpB の発現量を加味したものであっても、タンパク質凝集蓄積に対する転写後応答の存在を強く示唆するものであると言える。実際に 3.3.で行なった、転写を調節した条件でのレポーターアッセイにおいても 3.2.3.2.の結果と同様のタンパク質凝集への応答が見られている (図 16)。

4. IbpA タンパク質による *ibpA* 翻訳阻害

4.1. 序文

前章において IbpA 発現がタンパク質凝集蓄積に応答すること、さらにその応答が翻訳レベルで引き起こされることが示された。そこで次にタンパク質凝集蓄積がどのようにして *ibpA* 翻訳効率を上昇させるのか調べるため、これら二つの現象を結びつける因子・現象の検討を行った。

細菌においてタンパク質凝集は細胞の極へと輸送されることが知られている(3)。これに伴い細胞質中の IbpA が極へとリクルートされることがわかっている(38, 39)。これは、タンパク質凝集蓄積時に細胞質 IbpA が枯渇する可能性を示唆している。これを受け、本章ではまず IbpA の枯渇と *ibpA* 翻訳上昇に関連があるのではないかという作業仮説を立てた(図 17)。

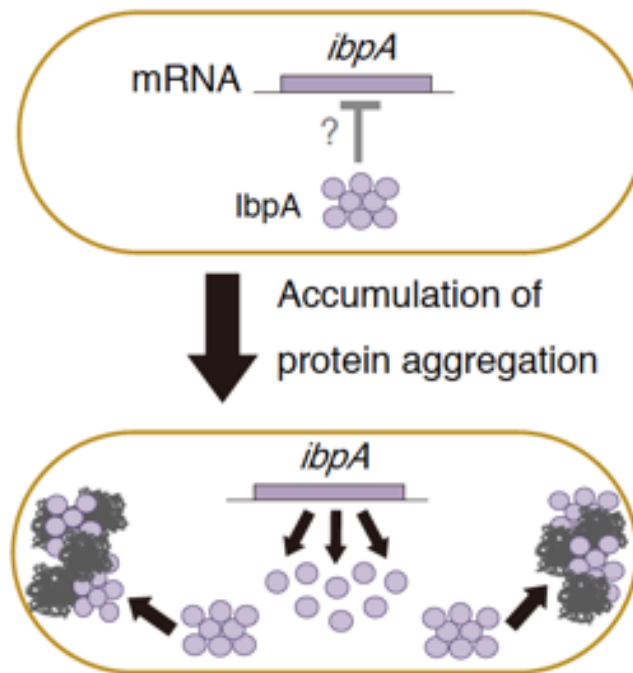


図 17 IbpA による *ibpA* 翻訳の自己抑制仮説

遊離の IbpA が細胞質中に存在していると *ibpA* 翻訳が抑えられ、タンパク質凝集の蓄積に伴う遊離 IbpA の減少に伴い *ibpA* 翻訳効率が上昇する。

仮説を検証するにあたり、まず前章で *ibpA* 翻訳上昇が見られた条件においても IbpA が極へ局在することを顕微鏡観察により確認し、次に IbpA の欠損や過剰発現により細胞内の IbpA 量を変化させた条件において前章でも用いた *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現量変化を検証した。その結果、細胞内 IbpA 量とレポーターの発現量は負の相関関係にあることが示され、さらに前章で見られたタンパク質凝集への応答が同一の機構であるという示唆が得られた。これにより作業仮説が強く支持された。また、翻訳に必要な最低限の因子のみを含む再構成型無細胞翻訳系を用いたレポーターアッセイにおいても IbpA による *ibpA* 翻訳抑制が起こることが示され、この翻訳抑制が IbpA により直接行われるものであることが示された。

4.2. タンパク質凝集蓄積時の細胞質 IbpA 挙動

sfGFP 融合 IbpA を発現させた大腸菌野生型株(Normal)、DnaK/DnaJ 欠損株(Δ KJ)、タンパク質凝集蓄積条件(Rho⁺⁺)において顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察の結果、大腸菌野生型株において細胞質全体に分布している様子が見られた GFP 蛍光が、 Δ KJ 条件、Rho⁺⁺条件においては細胞の端の位置でのみ見られた。このことからタンパク質凝集が蓄積するストレス時において IbpA が極にリクルートされ、細胞質から枯渇することが示された(図 18)。

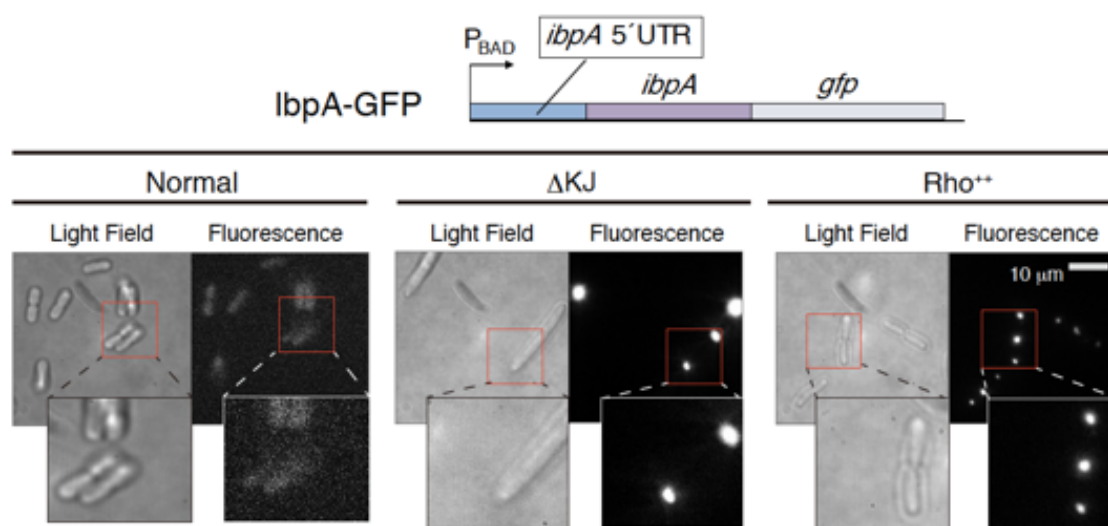


図 18 GFP 融合 IbpA の局在観察

用いたコンストラクト(上段)と IbpA-sfGFP の顕微鏡観察(下段)

Normal: 大腸菌野生型株, Δ KJ: DnaK/DnaJ 欠損株, Rho⁺⁺: Rhodanese 過剰発現

4.3. 細胞質 IbpA の枯渇と *ibpA* 翻訳の関係の検証

前項の検証によりタンパク質凝集蓄積条件における細胞質から IbpA 枯渇が確認された。これを受け、細胞内 IbpA の存在量と *ibpA* 翻訳の関連性の検証を行った。検証するにあたり、IbpA を枯渇させた条件として大腸菌 *ibpAB* 欠損株を用い、細胞質中 IbpA 量が過剰となる条件として IbpA の過剰発現を用いた。

4.3.1. 細胞内 IbpA 量と *ibpA* 翻訳効率の関係性

ibpAB 欠損株と IbpA 過剰発現条件を用い、レポーターアッセイによる *ibpA* 翻訳効率の比較を行った。使用したレポーター系は前章で用いたものと同様である。大腸菌野生型株(WT)と比較して、IbpA 枯渇条件(ΔAB)におけるレポーター発現効率は大きく上昇した(図 19)。また、IbpA 過剰条件(IbpA⁺⁺)におけるレポーター発現効率は、大腸菌株によらず大きく減少した(図 19)。

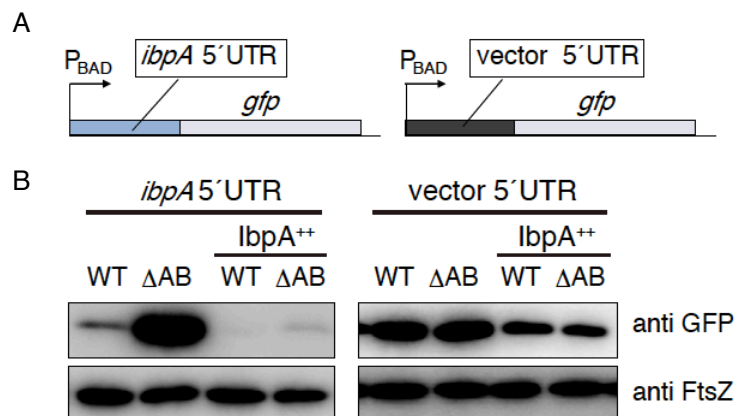


図 19 IbpA 存在量と *ibpA* 翻訳効率

WT: 大腸菌野生型株, ΔAB : IbpA 枯渇条件, IbpA⁺⁺: IbpA 過剰条件

A: レポーターのコンストラクト

B: ウェスタンブロットティング結果

4.3.2. *ibpA* 翻訳制御におけるタンパク質凝集応答と IbpA による抑制の寄与

前項により細胞内 IbpA 量と *ibpA* 翻訳の負の相関関係が示された。しかし、作業仮説を支持するためには IbpA の枯渇に起因する *ibpA* 翻訳上昇とタンパク質凝集の蓄積に起因する *ibpA* 翻訳上昇が、同一経路の応答であることを示す必要がある。*ibpA* 翻訳抑制が作業仮説のように IbpA を中心とした同一経路による抑制であるならば、*ibpAB* 欠損株における *ibpA* 翻訳が最も翻訳効率の高い状態であり、タンパク質凝集の蓄積が *ibpA* 翻訳効率に加算的に寄与することはないと考えられる。

そこで、レポーターアッセイによる検証を行った。その結果、大腸菌野生型株(WT)で見られる Rhodanese 過剰発現(Rho⁺⁺)によるレポーター発現上昇が、*ibpAB* 欠損株(ΔAB)においても見られるか確認を行ったところ、ΔAB 条件においてタンパク質凝集による加算的な寄与は見られなかった(図 20)。このことからタンパク質凝集と IbpA 枯渇は *ibpA* 翻訳上昇に個別の機構に寄与するのではなく、同一の *ibpA* 翻訳上昇機構の一部であること、またΔAB による寄与が中心的であることが示された。

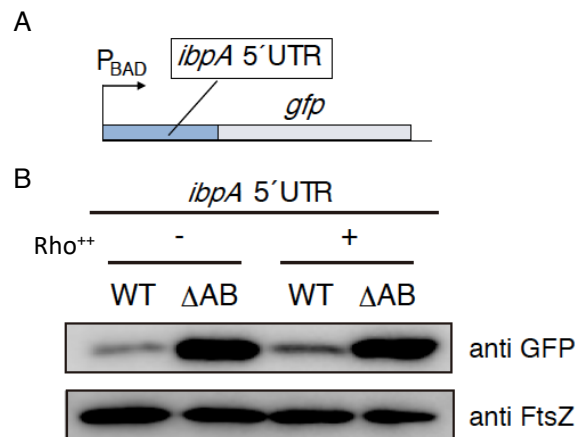


図 20 IbpA 枯渇条件における *ibpA* 翻訳上昇へのタンパク質凝集の寄与

WT: 大腸菌野生型株, ΔAB: IbpA 枯渇条件, IbpA⁺⁺: IbpA 過剰条件,

Rho⁺⁺: Rhodanese 過剰発現条件

A: 用いたコンストラクト

B: ウェスタンブロッティング結果

4.4. IbpA タンパク質による直接的な *ibpA* 翻訳阻害の検証

4.4.1. 無細胞翻訳系における IbpA タンパク質による *ibpA* 翻訳阻害

前項では、細胞内 IbpA によって *ibpA* 翻訳が抑制されることが示された。この抑制が IbpA 自身の機能によるものか、他の因子を介して行われているものかを区別するため、再構成型無細胞翻訳系で検証を行った。PURE system と呼ばれる翻訳に必要な最低限の因子を含む無細胞翻訳系にて *ibpA* 5'UTR を有するレポーターを発現させ、IbpA 添加により前項でみられたようなレポーター発現効率の低下が見られるか検証した。検証の結果、*ibpA* 5'UTR を有するレポーターでは IbpA の添加によりレポーターの翻訳効率が 0.52 ± 0.071 倍に減少した一方で、プラスミド由来の 5'UTR を有するレポーターにおいては 1.04 ± 0.16 倍と変化が見られなかった。また、t 検定の結果、前者においては有意差が確認された(図 21)。この結果から、IbpA による *ibpA* 翻訳抑制が他の因子を介さず直接行われていることが示された。

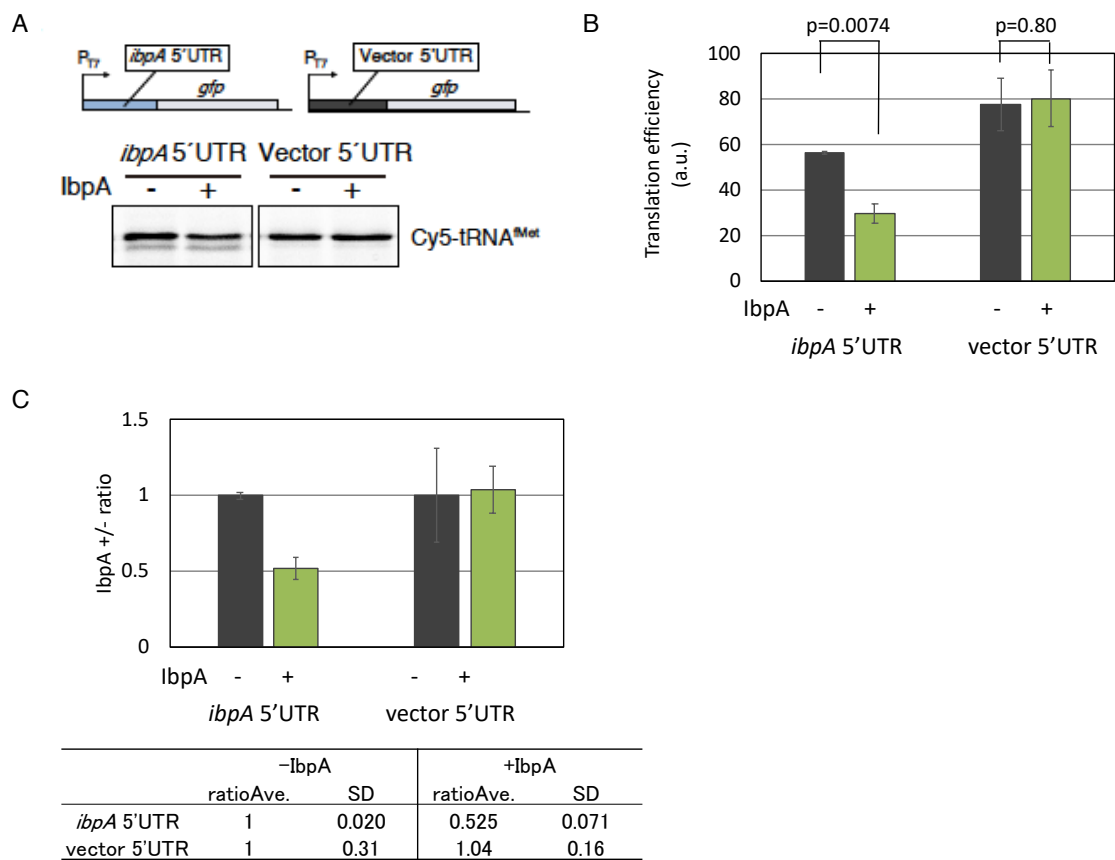


図 21 PURE system における IbpA による *ibpA* 翻訳抑制

IbpA-: IbpA 添加なし, IbpA+: IbpA 添加あり

A: 用いたコンストラクト(上段)と蛍光検出結果(下段)

B: 翻訳効率の定量値

C: IbpA 添加なしを 1 とした時の定量値の比

4.4.2. *ibpA* 翻訳阻害の IbpA タンパク質特異性

IbpA 添加により見られた *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの翻訳効率減少が、IbpA 添加特異的に見られるものであるかどうか検証を行った。前項と同様の実験を IbpA ではなく精製 GFP を添加して行ったところ、*ibpA* 5'UTR を有するレポーターでは翻訳効率が 0.92 ± 0.086 倍、またプラスミド由来の 5'UTR を有するレポーターにおいては 1.04 ± 0.21 倍と変化が見られなかった(図 22)。このことから、*ibpA* 5'UTR を有するレポーターで見られた翻訳効率減少は IbpA 添加特異的に見られるものであることが示された。

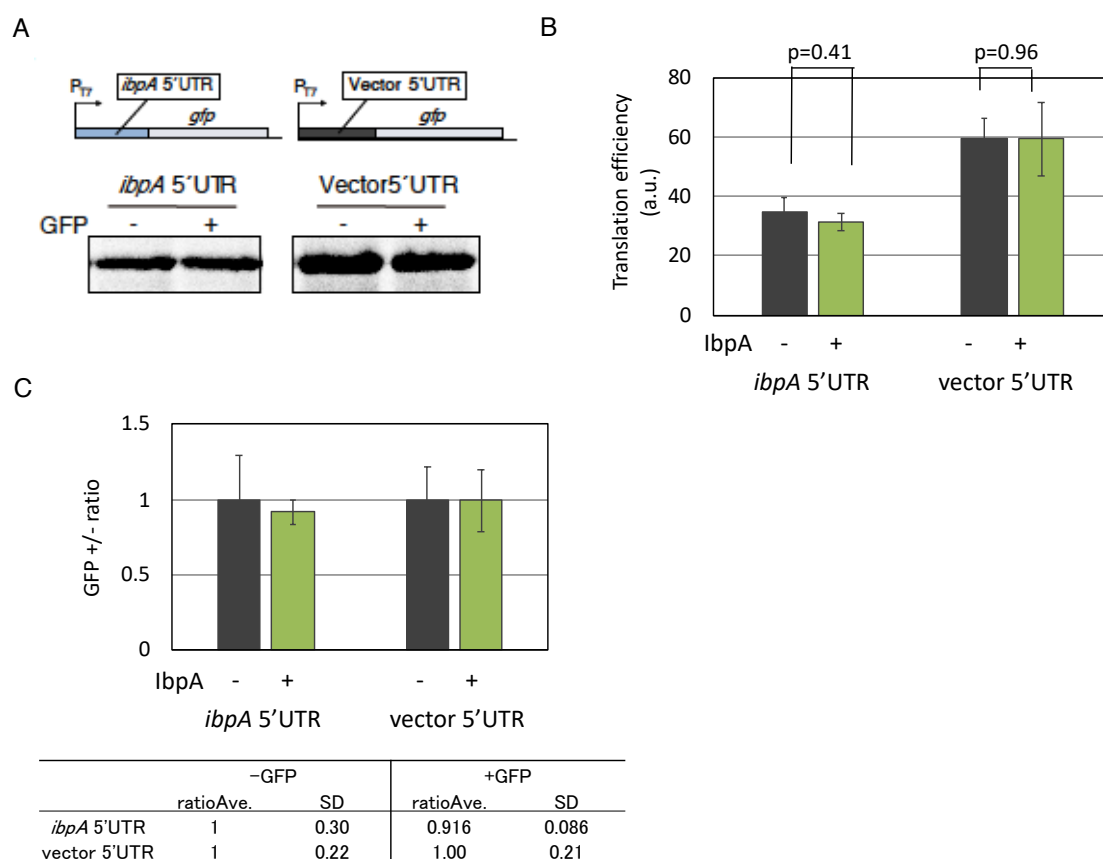


図 22 PURE system における GFP 添加の *ibpA* 翻訳に与える影響

GFP-: GFP 添加なし, GFP+: GFP 添加あり

A: 用いたコンストラクト(上段)と蛍光検出結果(下段)

B: 翻訳効率の定量値

C: IbpA 添加なしを 1 とした時の定量値の比

4.5. 考察

本章では細胞質中の IbpA が *ibpA* 翻訳を調節するという作業仮説を立て、その検証を行った。レポーターアッセイによる検証によりこの仮説は支持され、IbpA による *ibpA* 翻訳の自己抑制機構の存在が示された。

4.2.ではタンパク質凝集蓄積条件において IbpA が細胞質から枯渇する様子を顕微鏡観察した。ここで使用した GFP 融合 IbpA は、全条件において同様のプラスミドから一定のアラビノース濃度で転写誘導を行なっている。しかし、野生型株と比較してタンパク質凝集が蓄積する条件において高い蛍光強度となった。この差が生じた原因として、細胞質中の IbpA が極に集中したことと、タンパク質凝集による *ibpA* 翻訳効率上昇が考えられる。

4.3.では IbpA 欠損株、IbpA 過剰発現を利用し IbpA 存在量と *ibpA* 翻訳の関係を検証し、4.4.では PURE system を用い、IbpA による *ibpA* 翻訳の自己抑制機構の存在を示した。4.4.における IbpA 非添加、添加条件はそれぞれ 4.3.における *ibpAB* 欠損株の IbpA 過剰発現無し/有り条件に対応する。しかしながら、4.3.と4.4.では IbpA タンパク質による *ibpA* 翻訳の抑制効率が異なった。4.3.においては IbpA の過剰発現によりレポーターのバンドがほとんど消失しており、高い翻訳抑制効率が見られた。しかし4.4.では IbpA の添加によりレポーター翻訳効率は半分程度と強い抑制は見られなかった。このことは、IbpA が単独で *ibpA* 翻訳を抑制できるが、IbpA のみでは十分な抑制効率を発揮できないということを示唆している。そのため、細胞内では IbpA による *ibpA* 翻訳を補助する因子の存在が考えられる。

5. IbpA と IbpB の翻訳抑制能における共通性

5.1. 序文

大腸菌 sHsp には IbpA と IbpB の二種類が存在する。両者は協働して変性タンパク質との共凝集、リフォールディングや分解の補助を行うだけでなく、約 50% の高いアミノ酸相同性を有する細胞内ホモログである(22, 23)。そこで、IbpA と類似している IbpB も翻訳抑制能を有している可能性があると考え、本章ではその可能性の検証を行なった。前章と同様のレポーターアッセイを用い、IbpB の過剰発現が *ibpA* 翻訳に与える影響について検証を行なったところ、IbpB は IbpA のような翻訳抑制能は有さないことが示された。

また *ibpA* と *ibpB* は 5'UTR においても高い相同性を有しており、RNAT 領域を有する(26)。このことから、*ibpB* の翻訳も *ibpA* と同様の制御を受ける可能性があると考え、検証を行った。レポーターを用いた検証の結果、IbpA によって *ibpB* 5'UTR 依存的にレポーター発現が抑制された。このことから、IbpA は *ibpB* 翻訳も抑制することが示された。

5.2. IbpB による翻訳抑制能の検証

5.2.1. IbpB 存在量と *ibpA* 翻訳の関係性

前章でも用いた *ibpAB* 欠損株(ΔAB)と IbpB の過剰発現条件(IbpB⁺⁺)を用い、レポーターアッセイによる *ibpA* 翻訳効率の比較を行った。検証の結果、*ibpAB* 欠損株については前章の検証と同様にレポーターの発現上昇が見られ、IbpB の過剰発現についてはレポーターの発現を抑制しなかった(図 24)。このことから、IbpB は IbpA が有するような *ibpA* 翻訳抑制能を持たないことが示された。

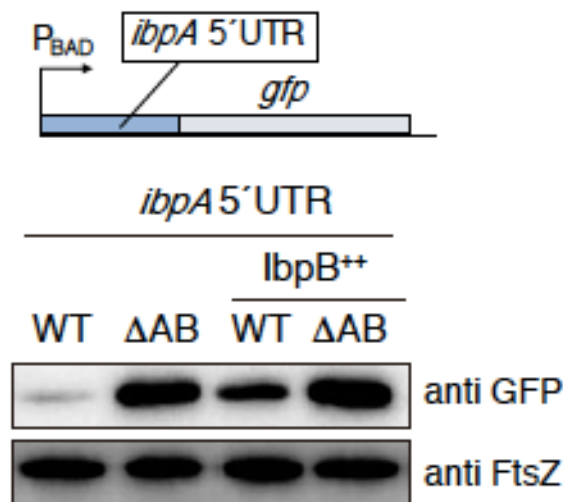


図 23 IbpB による *ibpA* 翻訳への影響

A: レポーターのコンストラクト

B: ウェスタンブロッティング結果

野生型株: WT, IbpAB 枯渇条件: ΔAB , IbpB 過剰条件: *IbpB⁺⁺*

5.2.2. IbpB 存在量と *ibpB* 翻訳の関係性

ibpB の 5'UTR も熱ゆらぎによって変換する mRNA 二次構造を有しており、その領域が *ibpA* と同様に RNAT として機能することが知られている(図 25)(26)。このことから、*ibpB* の翻訳も *ibpA* と同様の制御を受ける可能性があると考えた。IbpA, IbpB が *ibpB* の翻訳抑制に関わるか検証するため、大腸菌野生型株(WT)と *ibpAB* 欠損株(ΔAB)、IbpA 過剰発現条件(*IbpA⁺⁺*)、IbpB 過剰発現条件(*IbpB⁺⁺*)において *ibpB* 5'UTR を有するレポーター発現量の比較を行った。比較した結果、*ibpB* 5'UTR を有するレポーターの発現は *ibpA* 5'UTR を有するレポーターと同様に、*ibpAB* 欠損株においては著しい発現上昇が見られ、IbpA 過剰発現によって強い抑制が見られた。さらに、IbpB の過剰発現は *ibpB* 翻訳においても抑制する様子は見られなかった(図 26)。このことから、IbpA が *ibpAB* オペロンの翻訳調節を行うことが示され、その調節機能は *ibpAB* オペロンの中でも IbpA のみが担っていることが示された。

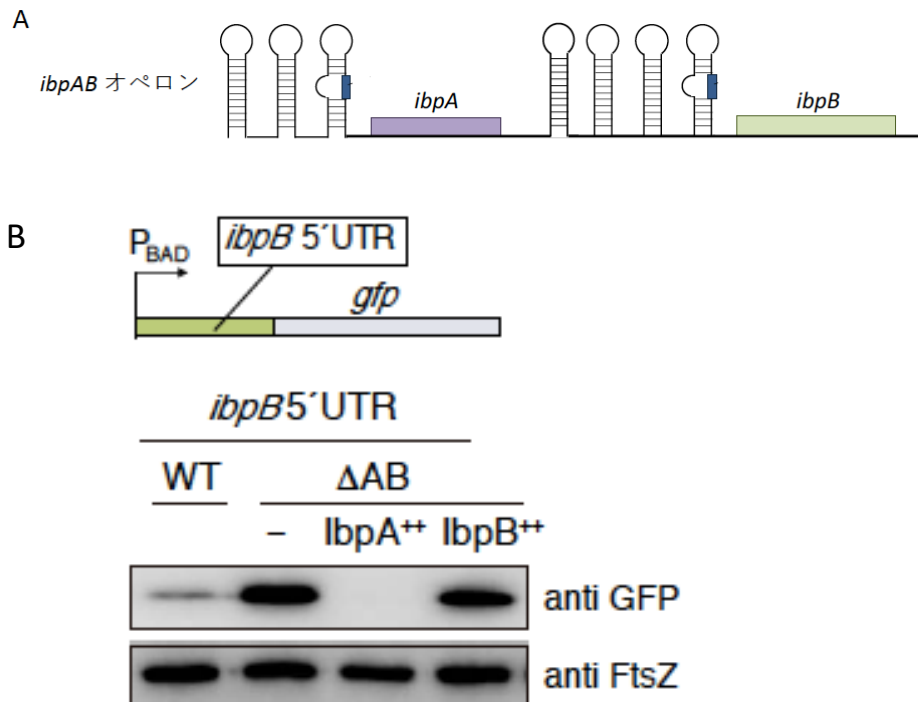


図 25 Ibp タンパクによる *ibpB* 翻訳への影響

A: *ibpAB* オペロン模式図

B: 用いたコンストラクト(上段)とウェスタンブロッティング結果(下段)

WT: 大腸菌野生型株, ΔAB: *ibpAB* 欠損株, IbpA: IbpA 過剰発現条件⁺⁺,

IbpB 過剰発現条件: IbpB⁺⁺

5.2.3. 無細胞翻訳系における IbpA タンパク質による *ibpB* 翻訳阻害

ibpB 5'UTR を有するレポーターで見られた IbpA による抑制が、直接的であるか他の因子を介した間接的なものであるかの検証を行った。検証は 4.4.1.同様に PURE system を用い、IbpA の添加に伴う翻訳効率変化を確認することで行った。検証の結果、*ibpB* 5'UTR を有するレポーターでは IbpA の添加によりレポーターの翻訳効率が 0.56 ± 0.085 倍に減少した一方で、プラスミド由来の 5'UTR を有するレポーターにおいては 1.2 ± 0.44 倍と変化が見られなかった。また、t 検定の結果、有意差が確認された(図 27)。この結果から、IbpA による翻訳抑制は *ibpB* においても直接行われていることが示された。

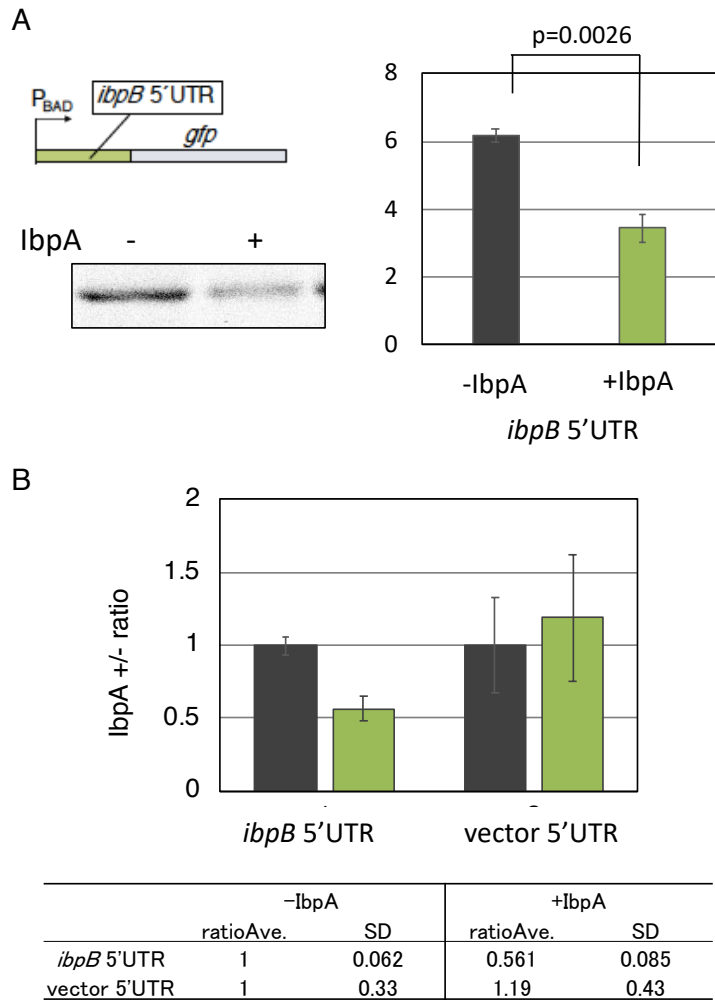


図 26 IbpA 添加による *ibpB* 翻訳への影響

IbpA-: IbpA 添加なし, IbpA+: IbpA 添加あり

A: 用いたコンストラクト(上段)と蛍光検出結果(下段)

B: 翻訳効率の定量値

C: IbpA 添加なしを 1 とした時の定量値の比

5.3. 考察

本章では、前章で見られた *IbpA* による *ibpA* 翻訳抑制と同様の抑制が *IbpA* ホモログである *IbpB* によっても見られるか、また *ibpA* 5'UTR と同様の翻訳調節機構を有する *ibpB* 5'UTR でも *IbpA*, *IbpB* による翻訳抑制が見られるか検証を行った。その結果、5.2.2.において翻訳抑制能は *IbpA* のみが有していることが示された。*IbpA* と *IbpB* は約 50%ものアミノ酸相同性を有するタンパク質であり、タンパク質全体のドメイン構成も構造を持たない N 末端ドメイン、構造の核となる α -クリスタリンドメイン、短い C 末端ドメインと類似している。しかし、変性タンパク質と共凝集し、その処理を補助する際に *IbpA* と *IbpB* はそれぞれ異なる役割を果たすということがわかっている(23, 24)。*IbpA* は変性タンパク質と迅速に、強く結合することで変性タンパク質を細胞内で隔離する役割を果たす一方で、他シャペロンやプロテアーゼへの変性タンパク質引き渡し効率が低く、むしろ引き渡し・処理を阻害するということがわかっている(23, 24)。*IbpB* については、変性タンパク質との結合効率が低く、タンパク質凝集形成の阻害はできない一方で、他シャペロンやプロテアーゼとの結合効率が高く、変性タンパク質の処理段階の効率を大幅に上昇させる(24)。このような機能の差異と、今回 *IbpA*, *IbpB* 間で新たに見出された違いである翻訳抑制能の有無との間に関連性がある可能性も考えられる。また、同検証において、*IbpB* の共発現は大腸菌野生型株では *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現を促進する様子が見られた(図 24)。これは、細胞内において *IbpA* と *IbpB* がヘテロオリゴマーを形成することから、*IbpB* の過剰発現が細胞質中の *IbpA* をヘテロオリゴマー中にリクルートすることが遊離 *IbpA* の枯渇を引き起こしたためであると考えられる。

また、5.2.3.では *ibpB* の翻訳が *ibpA* 翻訳同様に *IbpA* によって抑制されることが示された。この結果は 3.2.3.2.における、*IbpB* の発現が加味された *IbpA* 発現解析の結果と一致する。これにより *IbpA* が sHsp としての役割だけでなく、大腸菌 sHsp の発現を調節する役割も有していることが示唆された。*ibpB* の mRNA は *ibpA* mRNA と同様に 5'UTR 中にステムループの連続した RNAT として機能するを有しており、配列についても両者間で約 65%の相同性が見られる。構造・配列共に類似しているため、*IbpA* がどちらを認識し、*ibpA*, *ibpB* 翻訳を抑制しているのかについては更に検証を行う必要がある。

6. *ibpA* 翻訳抑制における IbpA 責任領域の特定

6.1. 序文

4章、5章において、IbpAによる*ibpA*、*ibpB*翻訳抑制が示され、その機能がIbpA特異的なものであることが示された。4.4.1.と5.2.4.の結果より、IbpAによる翻訳抑制が翻訳関連因子の阻害ではなく*ibpA*、*ibpB* 5'UTRを有するmRNAにおいてのみ翻訳を阻害することが示された。このことから、IbpAがmRNAを介して抑制対象の認識、翻訳抑制を行なっていることが示唆されたが、過去の調査においてIbpAのアミノ酸配列中にmRNAを認識できるようなドメイン・モチーフは同定されていない。そこで本章ではIbpAがどのようにして5'UTR依存的に翻訳抑制を行うのか予想するための足がかりとすることを目的として、IbpAの翻訳抑制における責任配列の決定を行った。

責任配列の決定はIbpA変異体を共過剰発現させたレポーターアッセイによる検証により行い、まず翻訳抑制に必須のドメインを決定したのちに、翻訳抑制に必須であることが明らかとなったC末端ドメイン中のIbpA特異的な配列や既知の重要な残基を対象に変異体解析を行った。その結果、IbpAのIX(I/V)モチーフであるIEIモチーフが翻訳抑制の責任配列であることが示された。

6.2. IbpAドメイン欠損変異の翻訳抑制能への影響

IbpAは構造を持たないN末端ドメイン、構造の核となる α -クリスタリンドメイン、短いC末端ドメインからなり、sHspとしての機能はそれぞれN末端ドメインが基質との結合を、C末端ドメインがオリゴマー化による共凝集の保持を担っている(図28A)(15)。そこで、IbpAのN末端ドメイン、C末端ドメインについて欠損変異体を作成し、4.3.1.2.と同様に*ibpA*翻訳への影響を確認した。

通常の上bpA、IbpA欠損変異体のそれぞれを*ibpA* 5'UTRを有するレポーターと共発現させて翻訳抑制能の検証を行った結果、N末端ドメイン欠損変異体では通常の上bpAと同様に翻訳抑制能が見られた一方で、N、C両末端欠損変異体とC末端欠損変異体については翻訳抑制能が消失している様子が見られた(図28B)。また、CBB染色による各欠損変異体の細胞内への蓄積を確認したところ、N、C両末端欠損変異体についてはバンドがごく薄く、蓄積が弱い様子が見られたが、レポーター系において同様の傾向が見られたC末端欠損変異体については細胞内に蓄積している様子が見られた(図28C)。そのため、図28Aで見られた翻訳抑制能の消失はIbpAが発現・蓄積していないからではないと言える。これらのことから、IbpAの翻訳抑制能はC末端ドメインが担っていることが示された。

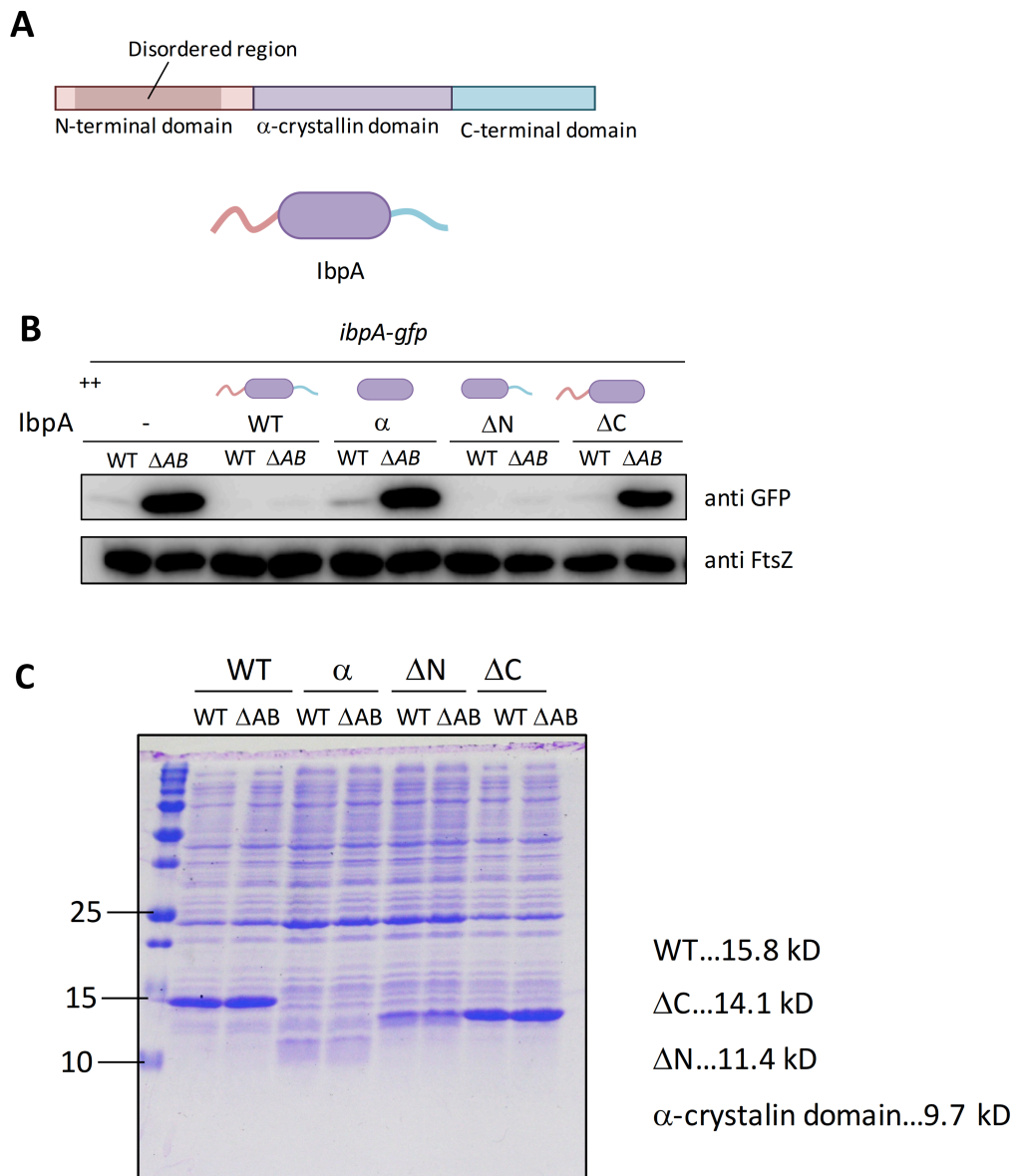


図 27 IbpA ドメイン欠損と *ibpA* 翻訳抑制能の関係

A: IbpA のドメイン構造

B: ウェスタンブロットティング結果

C: CBB 染色結果

WT: 大腸菌野生型株, ΔAB : *ibpAB* オペロン欠損株, IbpA-: IbpA 過剰発現なし, IbpA WT: 野生型 IbpA 過剰発現, IbpA α : ΔN 末端ドメイン, C 末端ドメイン IbpA 過剰発現, IbpA ΔN : ΔN 末端ドメイン IbpA 過剰発現, IbpA ΔC : ΔC 末端ドメイン IbpA 過剰発現

6.3. IbpA における IbpB への置換変異の翻訳抑制能への影響

前章において IbpA とそのホモログである IbpB で翻訳抑制能の有無という差異が見出された。また前項においては IbpA の C 末端ドメインが翻訳抑制に重要であることが示された。そこで、IbpA の C 末端ドメインの一部を IbpB のものに置換し、翻訳抑制への寄与を確認した。

検証を行うにあたり、IbpA, IbpB の C 末端ドメイン中の大きく特徴が異なる領域に着目し、2 種類の IbpA::IbpB 変異体を作成した(図 29A)。1つ目が、IbpA の KKP 領域を IbpB の IAA に置換した変異体である。この領域は IbpA においては正電荷が連続しているが IbpB ではその傾向が見られないことから、IbpA が 5'UTR を認識し、翻訳抑制を行う際に寄与している可能性があると考え着目した。2つ目が C-tail 付加変異体である。IbpA と IbpB では C 末端ドメインの長さが異なり、IbpB には 7 アミノ酸の構造を持たない尾部が存在する。尾部による構造的特徴が IbpA と IbpB の翻訳抑制能の有無を分けている可能性を考え、IbpA にこの尾部を付加した C-tail 変異体を作成した。

通常の IbpA、IbpA 欠損変異体のそれぞれを *ibpA* 5'UTR を有するレポーターと共発現させて翻訳抑制能の検証を行った結果、両変異体において翻訳抑制能への寄与が見られなかった(図 29B)。このことから、IbpA でのみ見られる翻訳抑制能は IbpA のみで見られる正電荷や C 末端領域の短さといった特徴によるものではないということが示された。

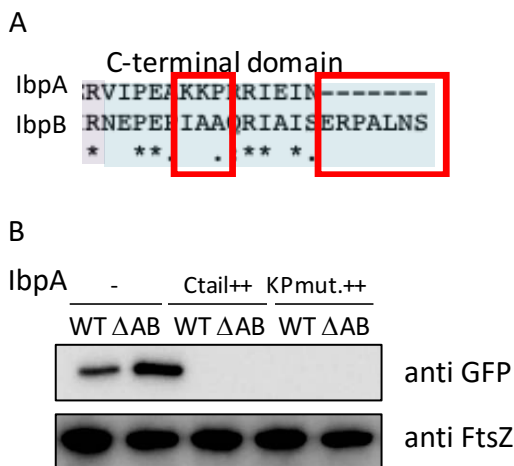


図 28 IbpA の部分置換変異と *ibpA* 翻訳抑制の関連性

A: C 末端ドメインの配列アライメント

赤枠: 着目した領域

B: ウェスタンブロッティング結果

WT: 大腸菌野生型株, ΔAB: *ibpAB* オペロン欠損株, IbpA-: IbpA 過剰発現なし,

IbpA C-tail++: IbpA C-tail 変異体過剰発現,

IbpA KKPmut.++: KKP::IAA 変異体過剰発現

6.4. IbpA C 末端ドメイン中の重要な残基・モチーフの翻訳抑制能への寄与

IbpA では 133 番目のアルギニンと 134~136 番目に位置する IEI モチーフがオリゴマー形成に重要であるとされており、実際に変異導入によって IbpA の sHSP 活性が消失することがわかっている(16)。そこで、これらの残基が翻訳抑制に寄与するかどうかを検証するため、IbpA 変異体を用いて前項と同様の検証を行った。

過去の研究により、これらの残基においては 133 番目のアルギニン、IEI モチーフのイソロイシンをそれぞれアラニンに置換することで sHsp としての機能を発揮できなくなることがわかっている(16)。そこで、これら既知の変異体が翻訳抑制能を有しているかどうかを検証を行った。

6.4.1. 細胞内 *ibpA* 翻訳における既知の残基・モチーフ変異の影響

R133、IEI モチーフの変異による翻訳抑制能への影響を確認するために、通常 IbpA、IbpA 変異体のそれぞれを *ibpA* 5'UTR を有するレポーターと共発現させて翻訳抑制能の検証を行った。その結果、R133 をアラニンに変異させた IbpA(R133A 変異体)は通常 IbpA と同様の翻訳抑制能が見られた一方で、IEI モチーフを AEA に変異させた IbpA(AEA 変異体)においては翻訳抑制能の消失が見られた(図 30)。このことから、IEI モチーフが IbpA による翻訳抑制における責任配列であることが示された。

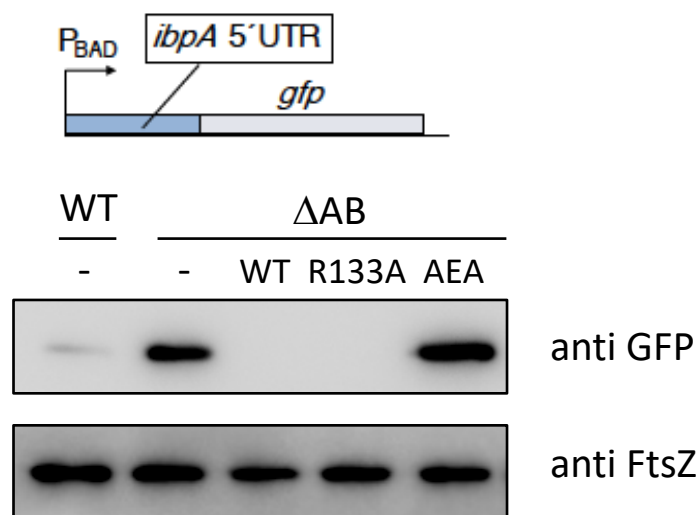
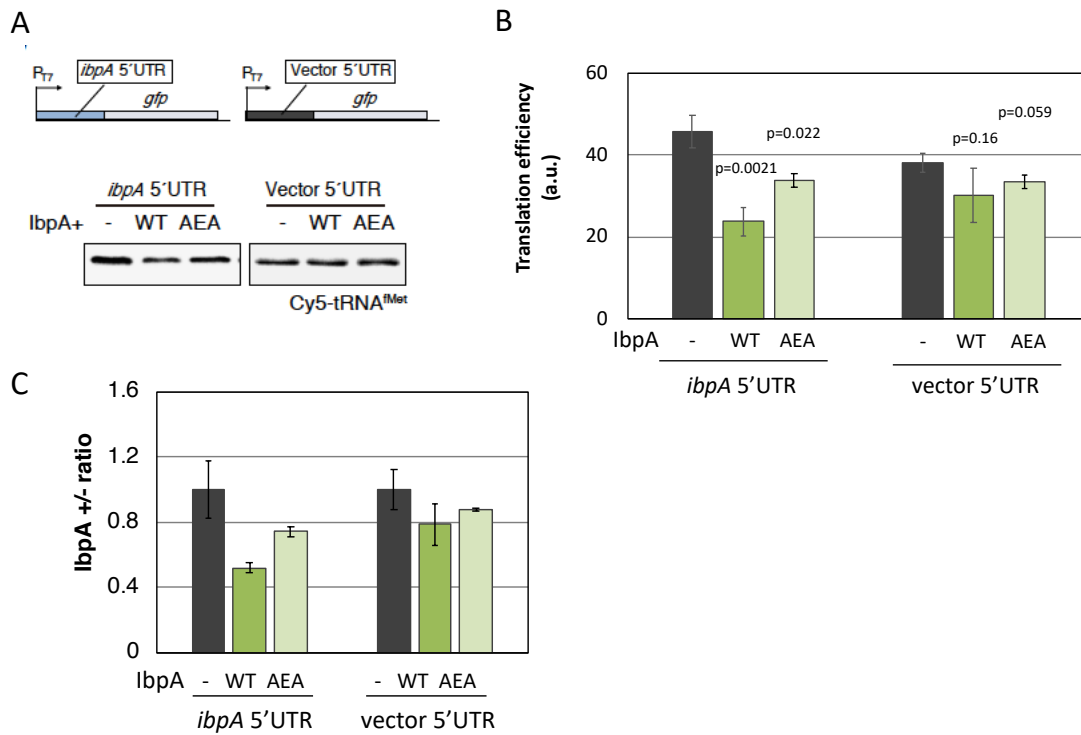


図 29 IbpA オリゴマー化残基への変異と *ibpA* 翻訳抑制能の関連性
用いたコンストラクト(上段)とウェスタンブロッティング結果(下段)

WT: 大腸菌野生型株, Δ*AB*: *ibpAB* オペロン欠損株, IbpA⁻: IbpA 過剰発現なし,
IbpA WT: 野生型 IbpA 過剰発現, IbpA R133A: R133A 変異体過剰発現,
IbpA AEA: IEI::AEA 変異体過剰発現

6.4.2. 無細胞翻訳系における AEA 変異体による *ibpA* 翻訳抑制

IEI モチーフへの変異が *IbpA* による直接的な翻訳抑制の責任配列であるかどうかを確認するため、AEA 変異体の PURE system における翻訳抑制能を検証した。その結果、通常の *IbpA* を添加した場合はレポーターの発現効率が 0.52 ± 0.029 倍と減少し、変異体を添加した場合にも 0.74 ± 0.028 倍と減少が見られた(図 31C)。しかし、t 検定を行ったところ前者では p 値が 0.002 と強い有意差が見られた一方で、後者では 0.01 と程度の弱い有意差が見られたことから IEI モチーフの変異によって *IbpA* の有する直接的な翻訳抑制能が弱まることが示された。また、*ibpA* 5'UTR を持たないレポーターでも通常の *IbpA* を添加した場合は翻訳効率が 0.79 ± 0.13 倍、変異体を添加した場合には 0.88 ± 0.010 倍と両方で程度の弱い減少が見られた(図 31C)。このことから、AEA 変異体の添加が *ibpA* 5'UTR 依存的な翻訳抑制能を有していないと考えられる。



	-IbpA		+IbpA WT		+IbpA AEAmut.	
	ratioAve.	SD	ratioAve.	SD	ratioAve.	SD
<i>ibpA</i> 5'UTR	1	0.18	0.519	0.029	0.741	0.028
vector 5'UTR	1	0.31	0.787	0.13	0.879	0.010

図 30 PURE system における IbpA AEA 変異体の *ibpA* 翻訳への影響

IbpA-: IbpA 添加なし, IbpA WT: 野生型 IbpA 添加, AEA: AEA 変異体添加

A: 用いたコンストラクト(上段)と蛍光検出結果(下段)

B: 翻訳効率の定量値

C: IbpA 添加なしを 1 とした時の定量値の比

6.5. IbpA オリゴマー化と翻訳抑制能の関連性

IbpA における IX(I/V)モチーフである IEI モチーフは *ibpA* 翻訳抑制に必須であることが示された。その一方で、過去にオリゴマー形成に重要であるとされた 133 番目のアルギニンについては変異導入と翻訳抑制能との関連性が見出されなかった。しかしこれらの変異は、sHsp としての消失を引き起こすこと、他の生物種のオリゴマー形成に重要な残基と相同性があることが過去に示されているものの、実際にこれらの変異が IbpA におけるオリゴマー形成能消失を引き起こすかどうかは示されていない。

そこで、Native PAGE によって AEA 変異体、R133A 変異体のオリゴマー形成能を確認し、オリゴマー形成能と翻訳抑制能との関連性の有無を検証した。

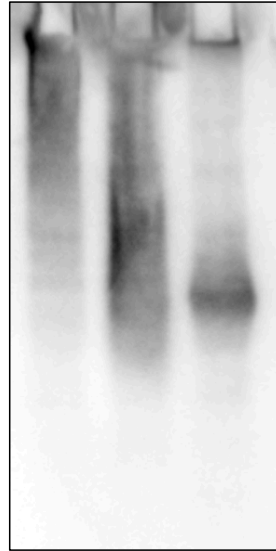
まず、野生型 IbpA、AEA 変異体、R133A 変異体のそれぞれを過剰発現させた大腸菌破砕サンプルを Native PAGE によって分離し、IbpA 抗体を用いたウェスタンブロッティングによってオリゴマー状態の確認を行った。検出の結果、AEA 変異体においては高分子量帯にシグナルが見られず、オリゴマー形成能の消失が見られた(図 32A)。その一方で、R133A 変異体においては低分子量帯から通常の IbpA が位置する高分子量帯までスミア状のシグナルが確認され、オリゴマー形成能が弱まっている様子は見られたが、消失は確認されなかった(図 32A)。

また、精製した野生型 IbpA、AEA 変異体をショ糖密度勾配遠心により分画し、ウェスタンブロッティングによって各フラクションの検出を行ったところ、野生型 IbpA は各フラクションから検出され、その一方で AEA 変異体は上層画分のみで確認された(図 32B)。これは野生型 IbpA が分子数の定まらないオリゴマーを形成する一方で、AEA 変異体ではオリゴマー形成能が消失し、検出される分子サイズが一定であることを示している。

これらの結果から、IbpA のオリゴマー形成能と翻訳抑制能の間に相関関係が強く示唆された。

A

IbpA WT R133A AEA



anti IbpA

B

Sucrose density

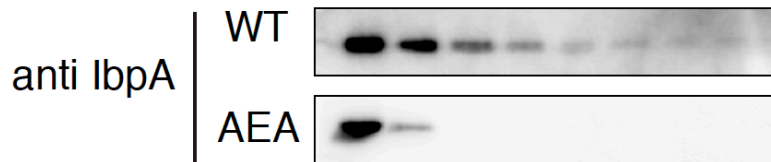


図 31 IbpA のオリゴマー形成能と翻訳抑制能の関連性

A: Native PAGE によるオリゴマーサイズの比較

WT: 野生型 IbpA, R133A: R133A 変異体, AEA: IEI::AEA 変異体

B: 精製 IbpA を用いた SDG 結果

WT: 野生型 IbpA, AEA: IEI::AEA 変異体

6.6. IbpA の翻訳抑制能と二次構造

本章で用いた変異体群を、翻訳抑制能を有したままの IbpA 変異体群と翻訳抑制能が消失した IbpA 変異体群に分類し、これらの変異体群の二次構造に共通した特徴がみられるかどうかを確認した。CRNPRED (<https://pdj.org/crnpred/>)の二次構造予測を用いて解析を行った結果、IbpA 野生型、変異体、また IbpB 間で予測された二次構造の種類、位置、長さが一致し、翻訳抑制能特異的な特徴はみられなかった(図 33)。唯一見られた野生型の IbpA と変異体群、IbpB 間での変化として、100~110 アミノ酸の位置に短い α -ヘリックスが見られた。しかしこの α -ヘリックス領域は翻訳抑制能の有無によらず見られたことから、IbpA の翻訳抑制能とは関連性がないと思われる。

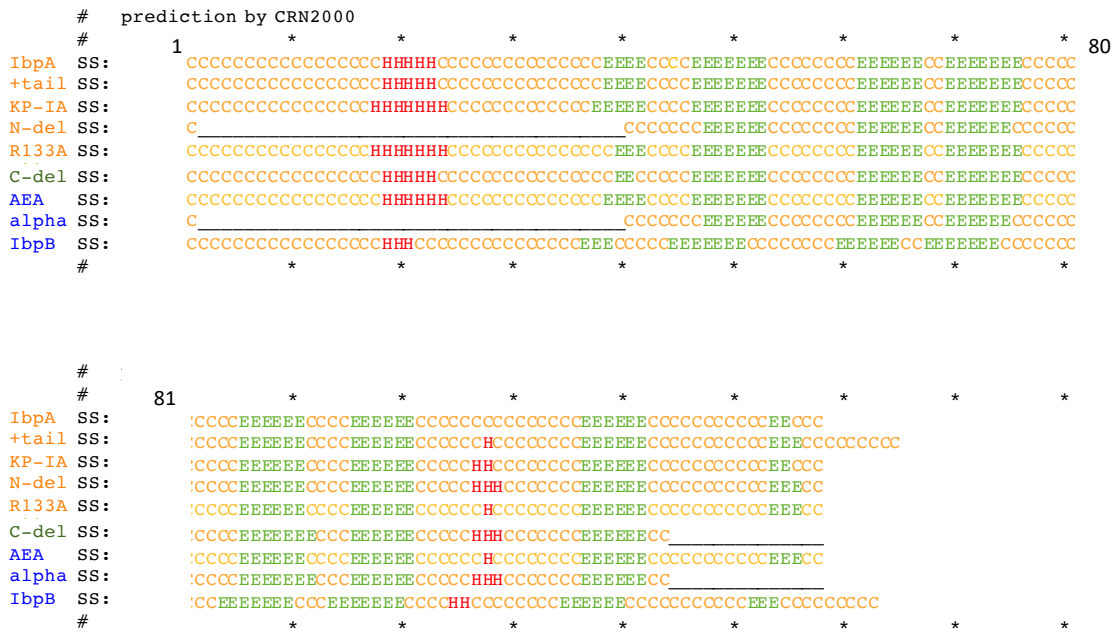


図 32 IbpA, IbpB のアミノ酸二次構造予測

C: coil, H: α -ヘリックス, E: β -シート

名前がオレンジ色で記載された変異体群: 翻訳抑制能あり

名前が青で記載された変異体群: 翻訳抑制能消失

6.7. 考察

本章では、IbpA の変異体解析により *ibpA* 翻訳抑制における責任領域の特定を行った。その結果、オリゴマー形成モチーフである IEI モチーフが翻訳抑制能にも必須であることが示された。

本章ではじめに行ったドメイン欠損変異では、N 末端ドメインが翻訳抑制において必須でないことが示された。構造を持たない N 末端ドメインは、変性タンパク質との結合に必要であることがわかっている。しかし、翻訳抑制において必須でなかったことから、IbpA は翻訳抑制において変性タンパク質とは異なる様式でターゲットを認識し、結合していることが示唆された。

4.4. では IbpA が無細胞翻訳系においても *ibpA* 5'UTR を有するレポーターでのみ翻訳抑制が見られたことから、IbpA による翻訳抑制は mRNA 依存的に行われることが示唆された。しかし、6.3. で行った IbpA の一部を IbpB の領域と置換した 2 種類の変異体を用いた解析では、IbpA の正電荷領域を IbpB の電荷を持たない配列に置換させた KKP 変異体で翻訳抑制能に変化が見られなかった。このことは、IbpA が電荷依存的に翻訳抑制を行っているわけではないことを示唆している。さらに 6.4.、6.5. では IbpA のオリゴマー形成能と翻訳抑制能の間に相関関係を示す結果となった。これらは IbpA が mRNA との静電相互作用ではなくオリゴマー形成を介した翻訳抑制を行っていることを示唆している。

また、6.2. においてドメイン欠損変異体の発現確認において変異体ごとに細胞への蓄積状態がことなる様子が見られたが、これは変異体ごとに分解傾向が異なるためであると考えられる。IbpA は両末端ドメインの欠損によって Lon プロテアーゼによる分解効率が上昇することが明らかとなっている(22)。そのため α -クリスタリンドメインのみにした変異体では細胞内での蓄積が見られなかったと考えられる。また、IbpA の N 末端と C 末端の分解に対する寄与については未だ明らかとなっていない。今回の発現確認では N 末端ドメイン欠損変異体においても蓄積が弱い様子が見られた。このことから、IbpA の分解効率は N 末端ドメインによって調節されていると考えられる。

6.4と6.5の結果から、IEIモチーフが翻訳抑制能に必須であることが示された。IEIモチーフがオリゴマー形成モチーフでもあることから、IbpAによる翻訳抑制能にオリゴマー形成が必要であることが示唆された。その一方で、オリゴマー形成能ではなく、モチーフのアミノ酸配列依存である可能性も考えられる。しかし4章で行なったPURE systemによる検証によって、IbpAが*ibpA* 5'UTRを有するmRNAに直接働きかけている可能性が高いという結果が得られている。そのため、疎水性アミノ酸と酸性アミノ酸によって構成されるIEIモチーフの配列に翻訳抑制能が依存している可能性は低いと予想される。

7. IbpA による *ibpA* 翻訳抑制機構の検証

7.1. 序文

4.4.、6.3.において IbpA の翻訳抑制が直接的かつ 5'UTR 依存的であること、また静電相互作用ではなくオリゴマー形成を介することが示された。このことから、IbpA のオリゴマー形成能が *ibpA* 5'UTR の認識に関係することを予想し、本章では野生型 IbpA と AEA 変異体の mRNA 結合能を検証した。ゲルシフトアッセイ(EMSA)による検証を行った結果、IbpA が IEI モチーフ依存的に *ibpA* 5'UTR を有する mRNA と結合することが確認された。それと同時に、IbpA による mRNA との結合効率が IbpA 依存的に決定されなかったことから、IbpA と mRNA の結合と翻訳抑制を結びつける更なる機構の存在が示唆された。

7.2. IbpA と *ibpA* mRNA の相互作用解析

IbpA の mRNA 結合能を検証するため、精製した IbpA と *in vitro* 転写により作成した mRNA を用いた EMSA を行った。mRNA の電気泳動と染色を行い、mRNA のみの場合と IbpA を添加した場合で泳動度を比較したところ、*ibpA* 5'UTR を有するレポーターにおいて、IbpA 添加依存的に低泳動度のバンドが見られた(図 34)。また、前項でも用いた AEA 変異体を添加した場合には *ibpA* 5'UTR を有した mRNA においても泳動度の異なるバンドは見られなかった。さらに、*ibpA* 5'UTR を持たないコントロールでは泳動度の異なる mRNA 集団は検出されなかったことから、低泳動度のバンドは IbpA IEI モチーフ依存的かつ *ibpA* 5'UTR 依存的であることが示された。

低泳動度の mRNA 集団は、IbpA と相互作用することで分子量が増加していると考えられる。実際にウェスタンブロッティングにより IbpA を検出したところ、*ibpA* 5'UTR を有する mRNA でのみ、低泳動度の集団と同程度の泳動位置で IbpA が検出された(図 34)。

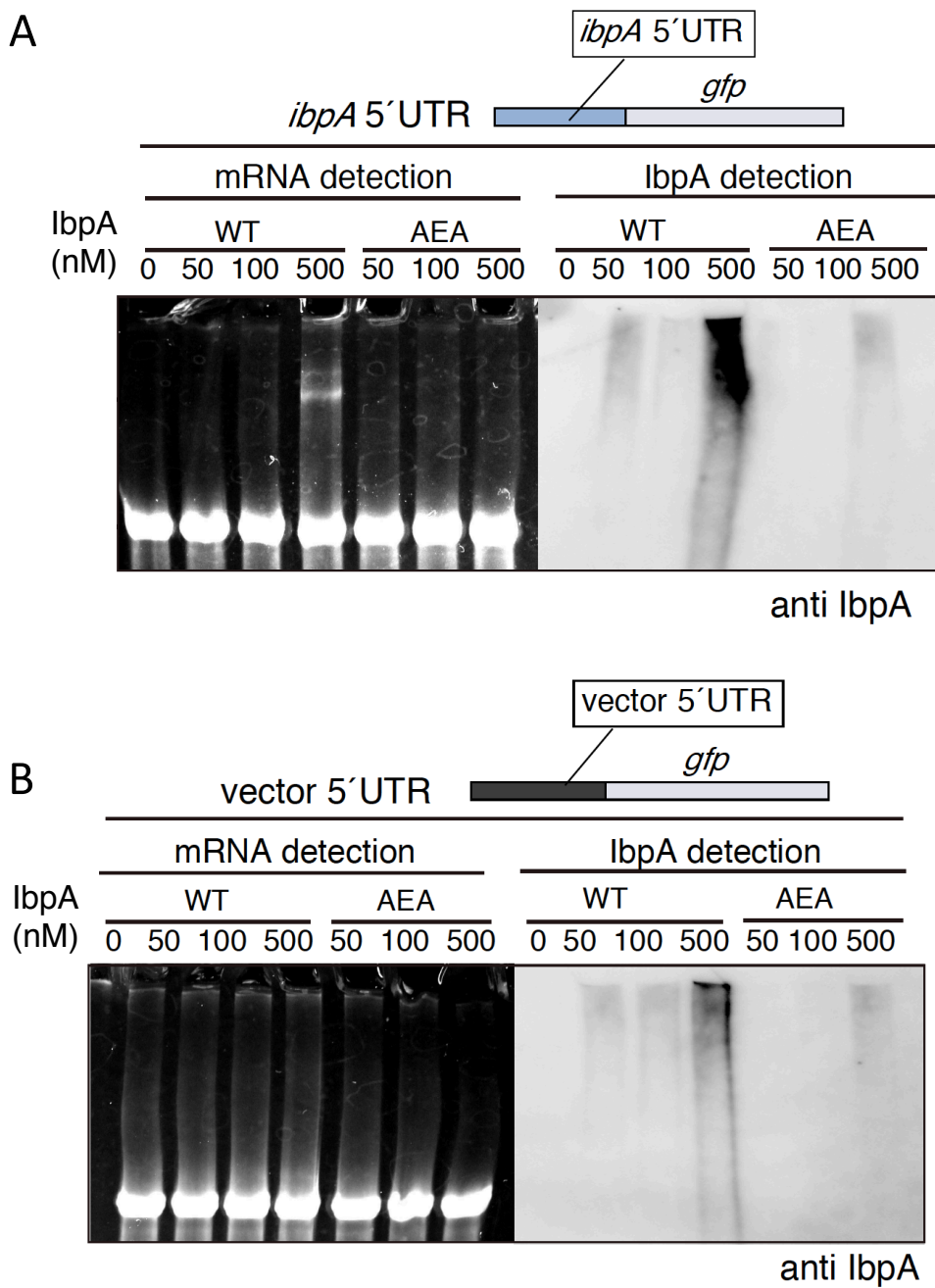


図 33 IbpA と mRNA の結合解析

野生型 IbpA: WT, IEI::AEA 変異体: AEA

A: *ibpA* 5'UTR を有するレポーター-mRNA を用いた EMSA 結果

B: プラスミド由来の 5'UTR を有するレポーター-mRNA を用いた EMSA 結果

次に、*ibpA* 5'UTR を有する mRNA と IbpA の結合が一定量比であるかどうかを調べた。一定量比であれば、IbpA 添加量の変化に伴い低泳動度のバンド強度が変化すると予想し、IbpA 添加量 0, 0.25, 5.0, 15 μ M の四通りで mRNA の泳動度変化を比較したところ、予想に反し IbpA の添加量に伴う泳動度変化の割合に変化が見られなかった(図 35)。これにより、mRNA と IbpA 結合が一定量比でないことが示された。

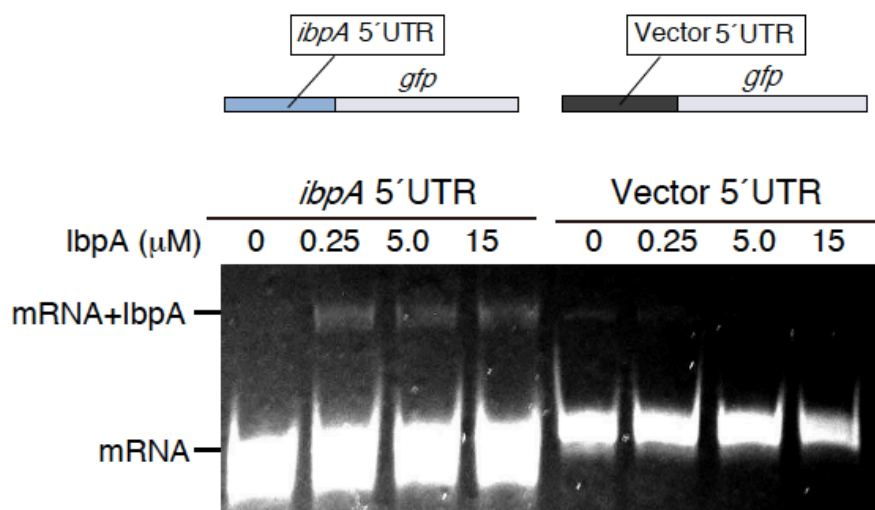


図 34 IbpA 添加量と RNA バンドシフトの関係
用いたコンストラクト(上段)と EMSA 結果(下段)

7.3. 考察

本章では IbpA が *ibpA* 翻訳を直接抑制することから、IbpA と *ibpA* mRNA の間に相互作用があると仮定しその検証を行った。

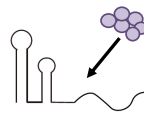
ibpA 5'UTR を有する mRNA では IbpA 添加依存的に低泳動度のバンドが見られ、実際に同泳動位置に IbpA が検出されたことから、IbpA は *ibpA* 5'UTR 依存的に mRNA と相互作用することが示唆された。また、IbpA と mRNA の結合は、*ibpA* 5'UTR 依存的であると同時に IEI モチーフ依存的であることが示された。両者は翻訳抑制においても必須であることが前章までの結果で明らかとなっている。このことから、IbpA による翻訳抑制と mRNA への結合は同一の機構であることが考えられる。

また、本実験ではプラスミド由来の 5'UTR を有するコントロールでは低泳動度の mRNA が見られなかっただけでなく、低泳動度の IbpA も検出されなかった。これにより、IbpA が mRNA 依存的に高分子量のオリゴマーを形成することが示唆された。

図 35 の EMSA では、IbpA 濃度に大きく勾配をつけ mRNA の泳動度変化を調べた。本実験で採用した最低濃度 0.25 μM と最大濃度 15 μM は 60 倍もの濃度比だが、mRNA 中の低泳動度バンド強度には変化が見られなかった。このことから、IbpA と mRNA の結合が一定の数量関係ではないことが示唆された。この結果を受け、IbpA による *ibpA* 翻訳の抑制機構について 2 つの可能性が考えられる。

一つ目は、*ibpA* mRNA のうち、一部の集団のみが IbpA による抑制をうけるという可能性である。低泳動度のバンド強度が IbpA の量に依らないことから、本実験で一定としていた mRNA 量に依存していることが示唆された。このことから、*ibpA* 5'UTR を有する mRNA の中に IbpA が結合できる mRNA とできない mRNA が存在することが考えられる。*ibpA* の 5'UTR は全体にわたり RNAT として機能するステムループ領域であり、3 連続のステムループのうち上流側の 2 つは 45°C の熱条件でも開裂しない非常に安定な構造であることがわかっている(25)。そのため、もっとも下流に存在するステムループ構造の切り替わりによって mRNA の集団が区別されているのではないかと考えた。また IbpA が翻訳抑制を行うことから、IbpA が結合する mRNA 集団は翻訳抑制に IbpA を必要とする、つまり、二次構造が不安定化している mRNA 集団であると予想した。

IbpAが結合・翻訳抑制する
ibpA mRNA



翻訳抑制に
IbpAを必要としない
ibpA mRNA



図 35 仮説1. mRNA 集団の違いとIbpA の結合性

IbpA が結合できる mRNA 集団(上段)とIbpA が結合できない mRNA 集団(下段)

二つ目は、IbpA の mRNA との結合が不安定なものである可能性である。前章でも述べたように、IbpA には核酸と結合できるモチーフは知られておらず、6.3.におけるIbpA 中の正電荷を有する領域の変異導入は翻訳抑制能に影響を与えなかった。このことから、IbpA は mRNA と静電的な相互作用はしないことが予想できる。実際に、図 34 で検出された IbpA はスミアとなっており、泳動中に mRNA から IbpA が解離することが示唆された。さらに、IbpA は 4.3.で行った *in vivo* でのレポーターアッセイにおいてはレポーターの翻訳を検出できない程度まで抑制したのに対し、4.4.で行った *in vitro* の PURE system を用いたアッセイではレポーター発現を半分程度に抑えるのみだった。このことから、細胞内には IbpA と *ibpA* mRNA の結合を増強する因子、または IbpA と *ibpA* mRNA の弱い結合を介して *ibpA* 翻訳抑制自体を増強する因子が存在すると考えられる。

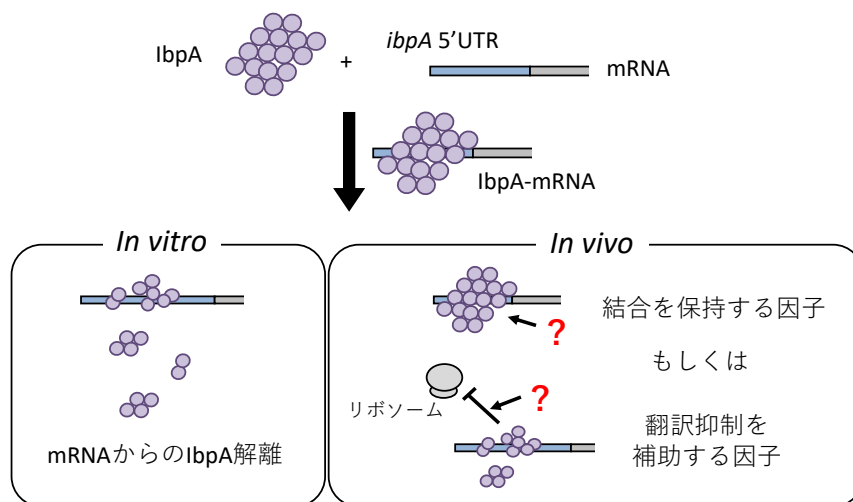


図 36 仮説 2. IbpA と mRNA の弱い結合

細胞内(右)では補助因子によって IbpA-mRNA の結合、もしくは IbpA による翻訳抑制が助けられている。

8. IbpA による *ibpA* 翻訳抑制機構についての仮説の検証

8.1. 序文

前章の検証により IbpA が *ibpA* 5'UTR を有する mRNA と相互作用することが示されたが、その効率については IbpA の濃度に依存しないことがわかった。これを受け、IbpA による *ibpA* 翻訳抑制機構について 2 つの仮説を予想した。

仮説 1.

ibpA mRNA のうち、ステムループ構造が不安定化している mRNA 集団のみが IbpA と結合し、翻訳抑制をうける。

仮説 2.

IbpA の mRNA との結合が不安定なものであり、細胞内には IbpA と *ibpA* mRNA の結合を増強する因子、または IbpA と *ibpA* mRNA の弱い結合を介して *ibpA* 翻訳抑制自体を増強する因子が存在する。

本章ではレポーターアッセイによって上記仮説の検証を行った。検証の結果、温度変化によってステムループ構造の安定性を変化させた状態で、IbpA による翻訳抑制効率の比較を行ったところ翻訳抑制効率に変化が見られなかったため、仮説 1. は否定された。一方で過去に IbpA と関連性が示された RNase に着目し、それらの枯渇・欠損変異株を用いたレポーターアッセイを行ったところ、PNPase による *ibpA* mRNA 分解への寄与が示されたことから、仮説 2. における IbpA と *ibpA* mRNA の弱い結合を介して *ibpA* 翻訳抑制自体を増強する因子が存在するという予想が立証された。

8.2. *ibpA* mRNA の状態と IbpA による翻訳抑制効率の関連性

仮説 1.を検証するにあたり、温度変化によりステムループ安定性が変化することに着目した。IbpA による結合・翻訳抑制が RNAT として機能するステムループの状態に依存するのであれば、温度変化に伴って IbpA が結合・翻訳抑制できる mRNA 集団の割合も変化すると予想した(図 38)。

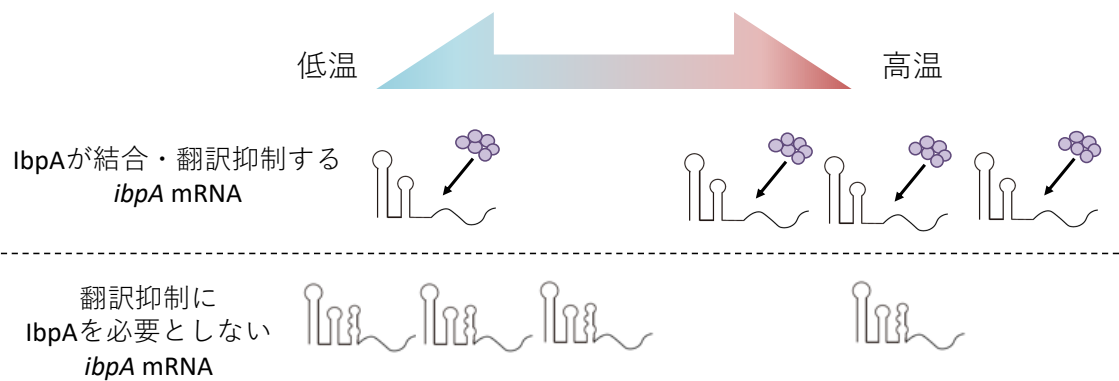


図 37 温度変化に伴う *ibpA* ステムループ構造の切り替わりと IbpA 結合の関係予想
温度変化に伴い IbpA が結合できる mRNA 集団の割合が変化すると予想した。

そこで、過去に調べられた *ibpA* 5'UTR の最下流に存在するステムループが安定である温度(30°C)と不安定化する温度(HS 条件; 42°C 15 min) (25)、通常の生育条件(37°C)でレポーターアッセイを行なった。アッセイの結果、30, 37°C では *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現が IbpA に強く抑制されたが、熱ショック条件(HS)では仮説と反し、IbpA の翻訳抑制効果が弱まった様子が見られた(図 39)。

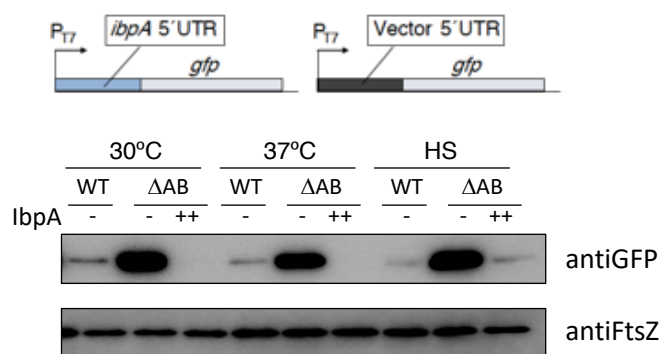


図 38 細胞内における温度変化と IbpA による翻訳抑制能の関連性

ウェスタンブロッティング結果

WT: 大腸菌野生型株, ΔAB: *ibpAB* オペロン欠損株, IbpA-: IbpA 過剰発現なし,

IbpA++: IbpA 過剰発現あり

さらに、PURE system を用いて同様に温度変化と IbpA による翻訳抑制の関係を調べたところ、30, 37°C では *in vivo* の結果と同様に *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現が IbpA に強く抑制された(図 40D)が、熱ショック条件(HS)においては IbpA を添加によりレポーター発現が上昇する様子が見られた(図 40D)。しかし、*in vitro* の HS 条件で見られたレポーター翻訳効率の上昇は、*ibpA* 5'UTR を持たないコントロールでも同様の傾向が見られた(図 40B)。このことから、*ibpA* 5'UTR 特異的な翻訳抑制とは無関係であると思われる。これらの結果から、*ibpA* 5'UTR のステムループ構造の不安定化と IbpA による翻訳抑制は相関しないことが示された。よって、仮説 1.は否定された。

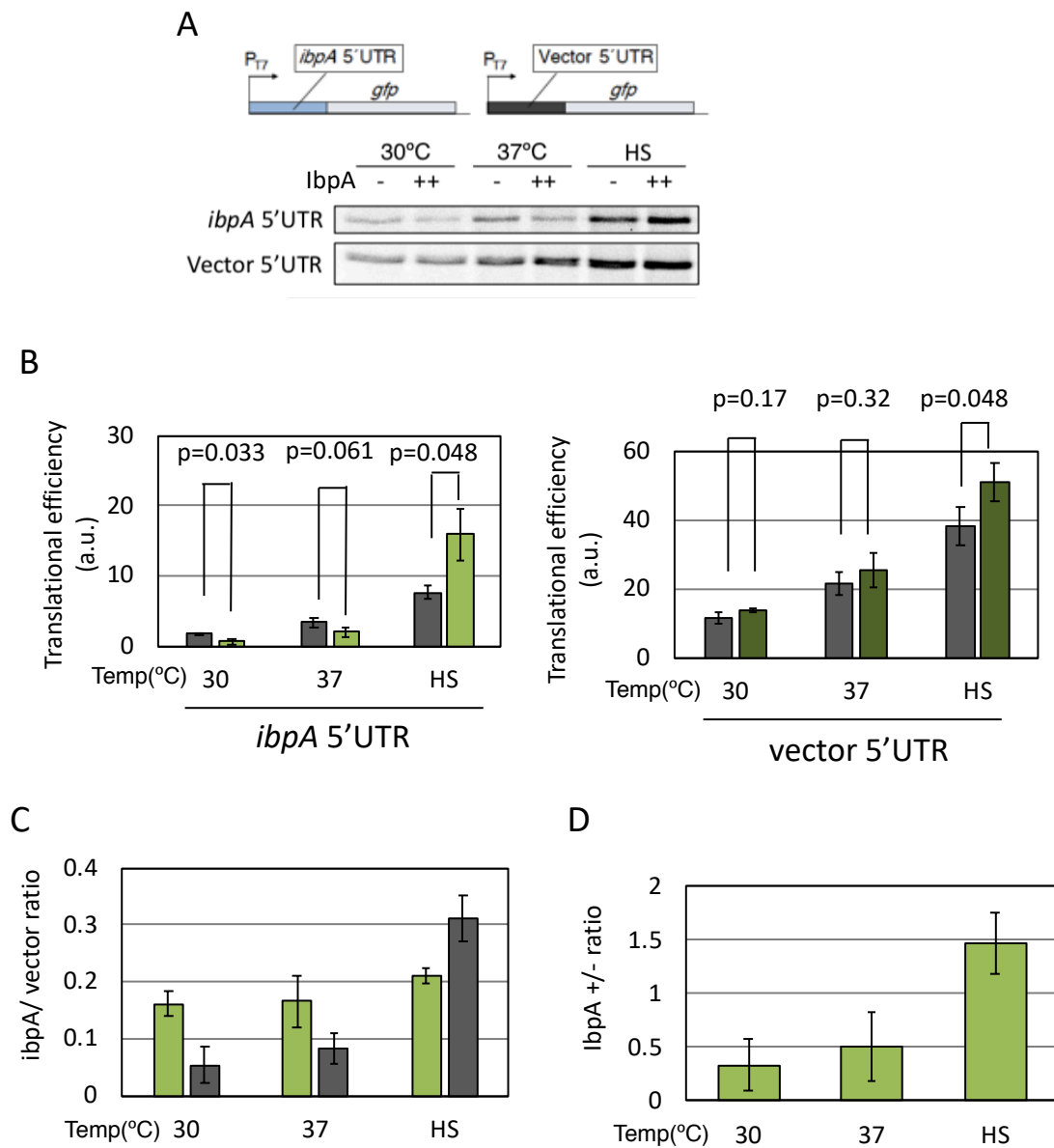


図 39 温度変化と IbpA による翻訳抑制能の関連性

IbpA-: IbpA 添加なし, IbpA++: IbpA 添加あり

A: 用いたコンストラクト(上段)と PURE system を用いた蛍光検出結果(下段)

B: 翻訳効率の定量値

C: *ibpA* 5' UTR レポーターの翻訳効率をコントロールで基準化した結果(左)

D: 基準化後の数値を用いて IbpA の有無による比を算出した結果(右)

8.3. RNase による *ibpA* 翻訳抑制への寄与の検証

過去の研究によって、*ibpA-ibpB* オペロンを基質とする RNase や IbpA との相互作用が示された RNase が存在する。そこで、これらの RNase が *ibpA* mRNA の分解を介して *ibpA* 翻訳抑制に寄与しているのではないかと考え、検証を行った。検証は RNase の枯渇・欠損変異株を用い、*ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現効率をウェスタンブロッティングで確認することで行った。

8.3.1. RNaseE による *ibpA* 翻訳抑制への寄与の検証

ibpA-ibpB オペロンは RNaseE により切断されることが過去に知られている(26)(図 40A)。RNaseE は *ibpA-ibpB* 間と *ibpB* を切断し、*ibpA* 配列中は切断しないことが明らかとなっているが、mRNA が不安定化する可能性がある。そこで、*ibpA* の翻訳抑制に RNaseE が寄与する可能性を検証した。RNaseE の枯渇変異株(Δrne)を用いて検証を行ったところ、*ibpA* 5'UTR の有無によらずレポーター発現効率に変化は見られなかった(図 41B)。そのため、RNaseE による *ibpA* 翻訳抑制への寄与は無いと結論づけた。

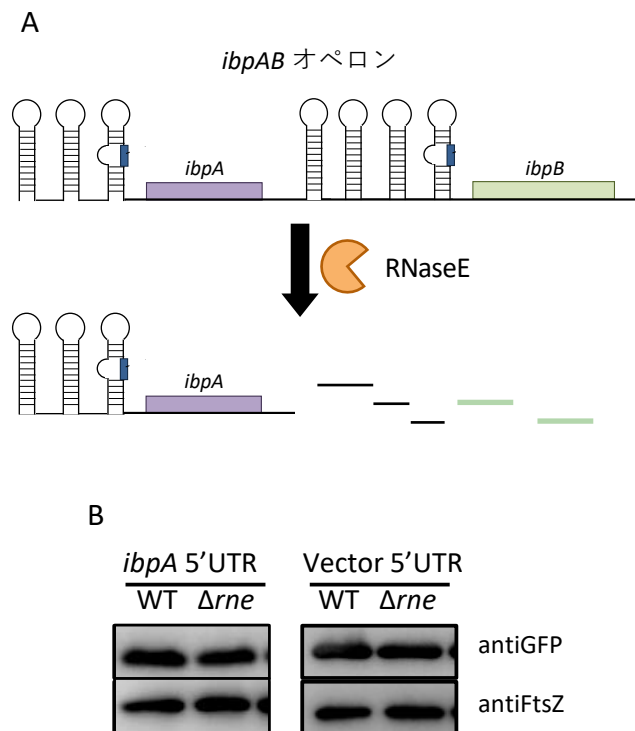


図 40 RNaseE の *ibpA* 翻訳への寄与

A: RNaseE による *ibpAB* オペロン切断の模式図

B: ウェスタンブロッティング結果

WT: 大腸菌野生型株, Δrne : RNaseE 枯渇変異株

8.3.2. PNPase による *ibpA* 翻訳抑制への寄与の検証

PNPase は過去の大腸菌タンパク質を対象とした網羅的なインタラクトーム解析によって IbpA との相互作用が示されている(40)。そこで、IbpA と *ibpA* mRNA の結合を介した翻訳抑制に寄与しているのではないかと予想し、PNPase 欠損株(Δpnp)を用いて検証を行った。検証の結果、 Δpnp において *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現上昇がみられた(図 42)。

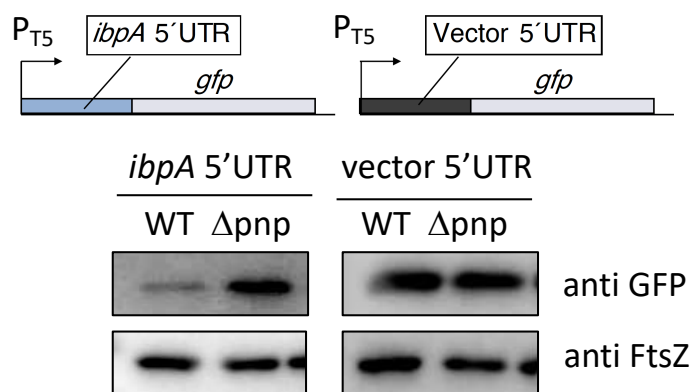


図 41 PNPase の *ibpA* 翻訳への寄与

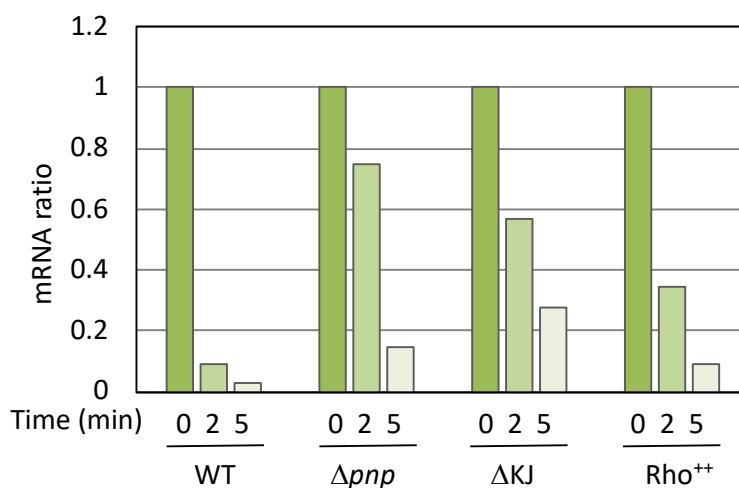
用いたコンストラクト(上段)とウェスタンブロットング結果(下段)

WT: 大腸菌野生型株, Δpnp : PNPase 欠損株

PNPase によって *ibpA* mRNA が分解されているか検証するため、Rifampicin 添加による転写阻害を行ない、添加直後(0 min)、2 min、5 min 後の *ibpA* mRNA を qRT-PCR によって比較定量した。転写阻害時点からの mRNA 減少割合を比較することで条件間での *ibpA* mRNA 安定性を比較した。その結果、大腸菌野生型株(WT)における *ibpA* mRNA は、迅速に分解され 2 min 後には 10%以下に減少しているのに対し、PNPase 欠損株(Δpnp)では 2 min 後には 80%程度残存しており、5 min 後でも約 15%残存していた(図 42)。以上の結果から、細胞内においては PNPase を介した *ibpA* mRNA の分解が IbpA による *ibpA* 翻訳抑制を増強していると考えられる。

さらに、IbpA による翻訳抑制が弱まるタンパク質凝集が蓄積する条件(DnaK/DnaJ 欠損株: ΔKJ 、Rhodanese 過剰発現によるタンパク質凝集蓄積条件: Rho^{++})でも *ibpA* mRNA の安定性を確認したところ、*ibpA* mRNA は ΔKJ において 2 min 後には約

60%、5 min 後には約 30%残存しており、Rho⁺⁺条件でも 2 min 後には約 30%、5 min 後には約 10%残存している様子が見られ、 Δpnp と同様 *ibpA* mRNA が安定化している様子が見られた(図 43)。このことから、PNPase により *ibpA* mRNA が分解されていること、さらに、タンパク質凝集蓄積時にも同現象が見られることが示された。



	0 min	2 min	5 min
wt	1	0.090	0.027
pnp	1	0.75	0.15
kj	1	0.57	0.28
Rho ⁺⁺	1	0.35	0.091

図 42 PNPase 欠損、タンパク質凝集蓄積による *ibpA* mRNA の安定化

WT:野生型株、 Δpnp :PNPase 欠損株、 ΔKJ :DnaK/DnaJ 欠損株、Rho⁺⁺:Rhodanese 過剰発現

8.4. 考察

本章では前章で考察した仮説の検証を行うことで、IbpA による *ibpA* 翻訳抑制を補助する因子を探索した。

IbpA と *ibpA* mRNA 結合が *ibpA* 5'UTR のステムループ開裂を必要とする可能性を検証するため過去の研究でステムループが安定化/不安定化するとされている温度条件においてレポーターアッセイを行なったが、IbpA による抑制の寄与が強まっている様子は見られず、*in vivo* の結果では IbpA による抑制が弱まっている結果が得られた。このことから、IbpA による *ibpA* mRNA への働きかけが、安定化しているステムループ構造を介している可能性が示唆された。しかしこの結果は、熱ショックによって細胞内に生じたタンパク質凝集に、過剰発現させた IbpA がリクルートされたためである可能性も考えられる。そのため、*ibpA* mRNA の構造と IbpA による翻訳抑制の関係についてはさらなる検証が必要である。

また、qRT-PCR による比較定量実験によって、タンパク質凝集の蓄積が起こる条件では *ibpA* mRNA の PNPase による分解が起こらないことが示された。PNPase を仮説 2. で予想した IbpA による *ibpA* 翻訳抑制の補助因子として 8.3.2. の結果をまとめると、以下のような模式図が予想できる。IbpA の *ibpA* mRNA との結合は、翻訳を直接抑制すると同時に PNPase を介した mRNA 分解を促進する。そのため遊離の IbpA が存在する非ストレス条件下において *ibpA* 翻訳は強い抑制を受ける。その一方で細胞内にタンパク質凝集が蓄積し IbpA がリクルートされると *ibpA* 翻訳が抑制されないだけでなく、mRNA 自体が安定化されるため翻訳効率が大きく上昇する(図 44)。

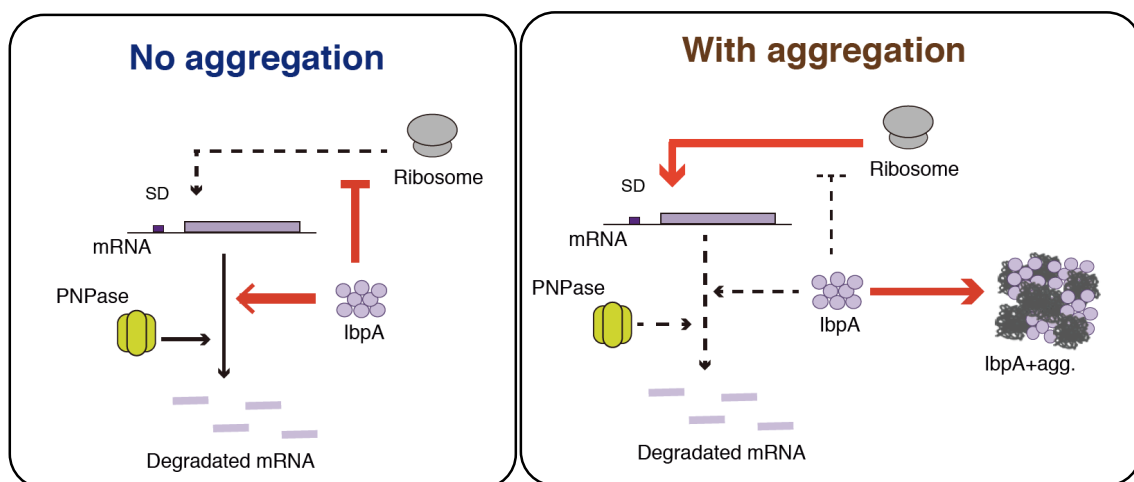


図 43 PNPase に補助される *ibpA* 翻訳抑制模式図

9. 総括

9.1. 本研究の総括

本研究は温度依存的な翻訳制御機構が知られる **IbpA** が、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は温度非依存的に発現量が増加することという過去の報告から端を発し、未知の発現制御機構が存在する可能性を検証し、その機構に迫ったものである。

3章の検証によって **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が示され、4章においてはそれが **IbpA** による翻訳の自己抑制であることが示された。また5章、6章では翻訳抑制能が **IbpA** 固有の機能であること、オリゴマー化モチーフが翻訳抑制に必須であることが明らかとなり、**IbpA** オリゴマーによる *ibpA* 翻訳抑制機構が見出された。さらに、7章で示唆された翻訳抑制の増強因子を検証した結果、8章において新たに **PNPase** が見出された。以上の結果を総括し、タンパク質凝集を感知する新規 *ibpA* 翻訳制御機構を提唱する(図 45)。

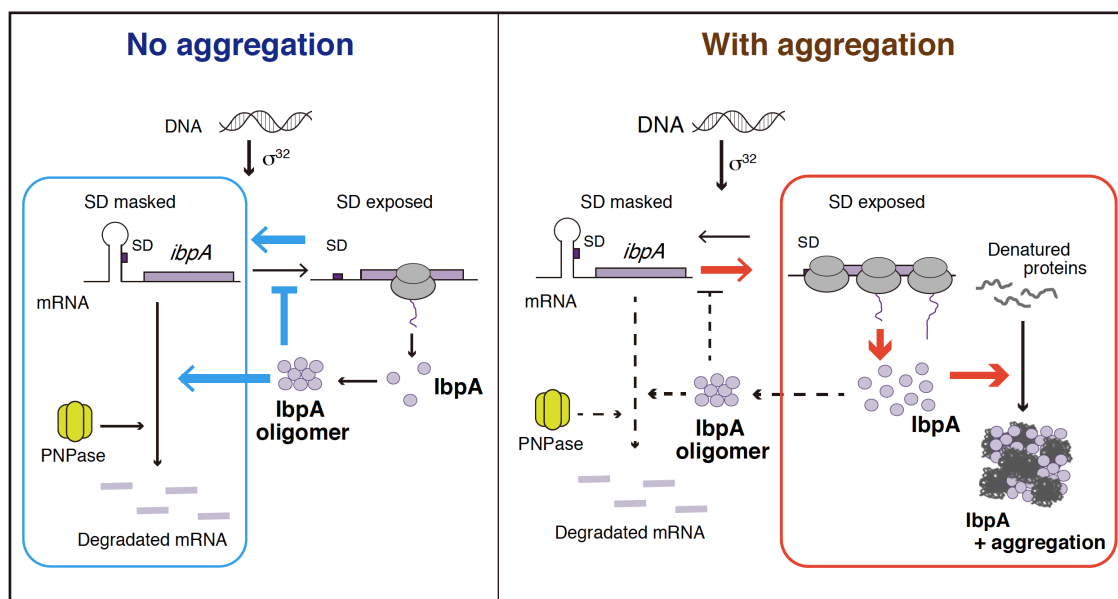


図 44 **IbpA** 発現制御スキーム図

青枠: 非ストレス条件において主となる制御

赤枠: タンパク質凝集蓄積条件において主となる制御

9.2. 今後の展望

本研究により新規制御機構の存在を明らかにすることができたが、さらなる検証を必要とする点が存在する。以下の点は新規機構の詳細な機構の解明につながるだけでなく、本研究の拡張性や重要性にも関わる点であり、今後明らかにしていきたい。

・ RNAT の解除機構

ibpA 5'UTR には SD 配列をマスクするステムループ構造が存在するため、タンパク質凝集蓄積に伴う IbpA による翻訳抑制の解除には、ステムループ構造の開裂が伴うことが考えられる。過去の *ibpA* mRNA の二次構造解析では、35°C 付近の温度帯でステムループ構造が開裂し始めることが示されているため、非ストレス条件下では IbpA がステムループ構造を保持するよう働きかけ、IbpA がタンパク質凝集にリクルートされることでステムループが開裂するという可能性が考えられる(25)。しかし、本研究 8.2.において、ステムループ構造が開裂しないとされている 30°C においても *ibpAB* オペロンの欠損により *ibpA* 5'UTR を有するレポーターの発現効率を上昇させることが示された。このことは、IbpA の解離に伴うステムループの開裂、すなわち *ibpA* の翻訳開始が熱揺らぎに依存せず起こることを示唆している。これは過去の二次構造解析と矛盾する示唆となるが、過去の解析は精製 mRNA を用いた *in vitro* の解析であるため、細胞内における温度変化と二次構造の関係を再現できていない可能性がある。IbpA の働きかけ、またリクルートによる解離が *ibpA* mRNA の二次構造にどのような影響を与えるか調べるためには、DMS (硫酸ジメチル)を利用した *in vivo* 二次構造解析などにより細胞中の *ibpA* mRNA の状態を確認する必要がある。

・IbpA による mRNA の認識機構

IbpA による翻訳抑制は *ibpA* だけでなく *ibpB* でも見られることが 5.2.4.によって明らかとなったが、両者は RNA 二次構造、配列共に類似しているため、IbpA がどちらを認識しているのかは特定できない。どちらを認識しているのかが明らかになれば、IbpA により制御を受ける他の遺伝子を探索する一助となる。

・PNPase と IbpA の協働

過去に IbpA との相互作用が見られたことを発端に PNPase を翻訳抑制の増強因子として見出したが、実際に IbpA と協働して *ibpA* 翻訳抑制を行なっている様子は確認できていない。これは、PNPase 欠損株の特徴として特定の ori を持つプラスミドでしか形質転換できないため、IbpA の共過剰発現実験ができないこと、また、多重欠損株を

得ることが難しく、未だ PNPase/*ibpAB* オペロンの多重欠損株が作成できていないことが障害となっているためである。これらはどちらも技術的な障害であるため、研究室に新たなプラスミドを導入することや、欠損株作成法の検討などにより早期に解消が可能であると考えられる。

参考文献

1. Anfinsen CB (1973) Principles that govern protein folding. *Science* (80-) 181(4096):223–230.
2. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2016) In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* (80-) 353(6294). doi:10.1126/science.aac4354.
3. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(11):777–788.
4. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475(7356):324–332.
5. Gamer J, et al. (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the Escherichia coli heat shock transcription factor sigma32. *EMBO J* 15(3):607–617.
6. Gamer J, Bujard H, Bukau B (1992) Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ 32. *Cell* 69(5):833–842.
7. Liberek K, Georgopoulos C (1993) Autoregulation of the Escherichia coli heat shock response by the DnaK and DnaJ heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):11019–11023.
8. Miyazaki R, et al. (2016) A Novel SRP Recognition Sequence in the Homeostatic Control Region of Heat Shock Transcription Factor σ 32. *Sci Rep* 6(April):1–11.
9. Bukau B (1993) Regulation of the Escherichia coli heat-shock response. *Mol Microbiol* 9(4):671–680.
10. Mogk A, Ruger-Herreros C, Bukau B (2019) Cellular Functions and Mechanisms of Action of Small Heat Shock Proteins. *Annu Rev Microbiol* 73(1):1–22.
11. Mogk A, Bukau B (2017) Role of sHsps in organizing cytosolic protein aggregation and disaggregation. *Cell Stress Chaperones* 22(4):493–502.
12. Haslbeck M, Vierling E, Science L (2016) A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol* 427(7):1537–1548.
13. Źwirowski S, et al. (2017) Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *EMBO J* 36(6):783–796.
14. Mogk A, Bukau B, Kampinga HH (2018) Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Mol Cell* 69(2):214–226.
15. Haslbeck M, Weinkauff S, Buchner J (2019) Small heat shock proteins:

- Simplicity meets complexity. *J Biol Chem* 294(6):2121–2132.
16. Stróżecka J, et al. (2012) Importance of N- and C-terminal regions of IbpA, *Escherichia coli* small heat shock protein, for chaperone function and oligomerization. *J Biol Chem* 287(4):2843–2853.
 17. Krajewski SS, Narberhaus F (2014) Temperature-driven differential gene expression by RNA thermosensors. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1839(10):978–988.
 18. Krajewski SS, Nagel M, Narberhaus F (2013) Short ROSE-Like RNA Thermometers Control IbpA Synthesis in *Pseudomonas* Species. *PLoS One* 8(5). doi:10.1371/journal.pone.0065168.
 19. Kortmann J, Narberhaus F (2012) Bacterial RNA thermometers: Molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol* 10(4):255–265.
 20. Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK, Easton AM (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174(21):6938–47.
 21. Laskowska E, Wawrzynów A, Taylor A (1996) IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie* 78(2):117–122.
 22. Bissonnette SA, Rivera-Rivera I, Sauer RT, Baker TA (2010) The IbpA and IbpB small heat-shock proteins are substrates of the AAA+ Lon protease. *Mol Microbiol* 75(6):1539–1549.
 23. Obuchowski I, Liberek K (2017) Duplicate divergence of two bacterial small heat shock proteins reduces the demand for Hsp70 in refolding of substrates. 1–29.
 24. Ratajczak E, Zietkiewicz S, Liberek K (2009) Distinct Activities of *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB Promote Efficient Protein Disaggregation. *J Mol Biol* 386(1):178–189.
 25. Waldminghaus T, Gaubig LC, Klinkert B, Narberhaus F (2009) The *Escherichia coli* ibpA thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. *RNA Biol* 6(4). doi:10.4161/rna.6.4.9014.
 26. Gaubig LC, Waldminghaus T, Narberhaus F (2011) Multiple layers of control govern expression of the *Escherichia coli* ibpAB heat-shock operon. *Microbiology* 157(1):66–76.
 27. Kuczyńska-Wisńik D, Laskowska E, Taylor A (2001) Transcription of the ibpB heat-shock gene is under control of σ_{32} - and σ_{54} -promoters, a third regulon of heat-shock response. *Biochem Biophys Res Commun* 284(1):57–64.

28. Zhao L, et al. (2019) The Hsp70 Chaperone System Stabilizes a Thermo-sensitive Subproteome in *E. coli*. *Cell Rep* 28(5):1335-1345.e6.
29. Calloni G, et al. (2012) DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. *Cell Rep* 1(3):251–264.
30. Matuszewska E, Kwiatkowska J, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E (2008) *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology* 154(6):1739–1747.
31. Mogk A (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J* 18(24):6934–6949.
32. Yang G, Sau C, Lai W, Cichon J, Li W (2015) Protein Quality Control Under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One* 10(6):1–11.
33. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4):402–408.
34. Ewalt KL, Hendrick JP, Houry WA, Hartl FU (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90(3):491–500.
35. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma32_ (1987).
36. Müller A, et al. (2013) Nonnative disulfide bond formation activates the σ 32-dependent heat shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195(12):2807–2816.
37. Spence J, Cegielska A, Georgopoulos C (1990) Role of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK and HtpG (C62.5) in response to nutritional deprivation. *J Bacteriol* 172(12):7157–7166.
38. Govers SK, Mortier J, Adam A, Aertsen A (2018) *Protein aggregates encode epigenetic memory of stressful encounters in individual Escherichia coli cells* doi:10.1371/journal.pbio.2003853.
39. Pu Y, et al. (2019) ATP-Dependent Dynamic Protein Aggregation Regulates Bacterial Dormancy Depth Critical for Antibiotic Tolerance. *Mol Cell* 73(1):143-156.e4.
40. Applied G, et al. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* 433(February):531–537.

業績

学術論文

○Tsukumi Miwa, Yuhei Chadani, Hideki Taguchi,
Aggregation-mediated translational control of small heat shock protein IbpA to self-regulate its own expression, to be submitted

学会発表

○三輪 つくみ、茶谷 悠平、田口 英樹、バクテリアにおける uORF 翻訳を介した凝集体蓄積の感知機構の解析、第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年 7 月、富山

○三輪 つくみ、凝集体の蓄積をトリガーとした新規シャペロン発現制御機構の解明、新学術領域研究「新生鎖の生物学」若手ワークショップ、2017 年 8 月、山形

○三輪 つくみ、uORF mediated sensing of misfolded protein accumulation、新学術領域研究「新生鎖の生物学」若手ワークショップ、2018 年 5 月、山形

○Tsukumi Miwa, Yuhei Chadani, Hideki Taguchi, uORF mediated translation regulation of small Hsp IbpA in *Escherichia coli*、新学術領域研究「新生鎖の生物学」国際シンポジウム、2018 年 8 月、京都

○三輪 つくみ、丹羽 達也、茶谷 悠平、田口 英樹、Novel mechanism to sense unfolded protein accumulation in chaperone translation、第 19 回日本蛋白質科学会年会、2019 年 6 月 25 日、神戸 (ポスター賞受賞)

謝辞

本研究を行なうにあたり、多くのご指導、ご助言をいただきました田口英樹教授に心よりお礼を申し上げます。相談に何うたびに快く応じてくださり、親身になってディスカッションに応じてくださいました。また研究だけではなく、研究を人に伝える技術についても多くの助言をいただきました。

田口研究室に入ることができたこと、また田口研究室で5年間研究できたことは、私にとって何よりの幸いであり財産であると感じています。

プロテオーム解析や顕微鏡観察などの重要な相談から、実験のコツなどの些細な知識に至るまで、多くの助言をいただきました丹羽達也助教に心よりお礼を申し上げます。

当研究室でIbpAに着目するきっかけを作っていただき、さらに多くの鋭い助言をいただきました茶谷悠平特任助教に心よりお礼を申し上げます。

FtsZ抗体を譲っていただきました、東京滋恵会医科大学 杉本博士にお礼を申し上げます。

最後に田口研究室の皆様には心から感謝しております。学年問わず全員が頼りになり、気軽に意見を交わすことができる雰囲気の中で研究室生活を送れたことは非常に学び多く、財産となりました。本当にありがとうございました。