

# 博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第 39 号

2015 年 9 月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 27 年 9 月 19 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

---

---

# 目 次

---

---

## 課程博士

1 . Shcherbakova	<small>シェルバコーワ</small> Ksenia <small>キセニア</small> [ 博士 ( 生物工学 ) ]	.....	1
------------------	---	-------	---

氏名（本籍）	シエルバコーワ キセニア Shcherbakova Ksenia（ロシア）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第19号
学位授与年月日	平成27年9月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Role of 100S ribosomes in protein turnover （タンパク質のターンオーバーにおける100Sリボソームの役割）
論文審査委員	主 査 嶋本 伸雄 教授 副 査 津下 英明 教授 " 千葉 志信 教授

## 論文内容の要旨

Protein turnover is composed of protein degradation and synthesis or translation. It has been shown to exist in a growing bacterial cell. Therefore, it has been believed to exist as a more essential process in the stationary phase and the following decay period where no supply of amino acids from nutrients is expected. When nutrients become deficient, the amino acids supplied by protein turnover could be critical for survival. Among the amino acid sources in protein turnover, ribosomes are the largest, and their involvement in protein turnover could play an important role.

In stationary state, 70S ribosomes are dimerized to be 100S ribosomes that are transnationally inactive. However, few studies deal the relationship among 100S formation, protein turnover, even the existence of protein turnover in stationary state and later. This study focuses on the role of 100S ribosomes in protein turnover in stationary phase and decay period.

In this study, ribosomal proteins S10 and S2 were each fused with GFP to track the fates of these proteins in the stationary growth phase and the following decay period in *E. coli*. The fused proteins localized mainly in the cytoplasm, and their amounts were proportional to the colony-forming unit. S10-GFP strains that lacked genes responsible for regulating 100S ribosomes and S2-GFP strain that were unable to form 100S both showed shortened stationary phases. This result indicates that these strains exhibit earlier death in the absence of 100S formation (S2-GFP, S10-GFP $\Delta$ *rmf*, and S10-GFP $\Delta$ *hpf*) and breakdown (S10-GFP $\Delta$ *yfiA*). Therefore, in addition to the mere presence of 100S, the correct timing of 100S formation and breakdown is required to maintain viability. This result also showed the presence of a time-consuming process that controls viability and the degradation of ribosome after 100S ribosomes have been dissociated. Whether or not 20 amino acids are effective to maintain viability was measured by supplying 20 amino acids at several time points. The results showed the correlation between the amino-acid deficiency, degradation of ribosome, and viability.

The obtained results cannot be interpreted just by the simple actions of 100S ribosomes and specific to stationary-state specific proteins but suggested the contribution of a synthetic cellular process. I here propose a model in which 100S acts as a tentative repository of ribosomes that are protected from degradation and provide a source of amino acids in later growth period.

A new GFP that had been invented by my colleagues, B-maggio, was used in this study. Its brightness and especially the 100-fold resistance against photobleaching enabled semi-quantitative analysis for the first time by fusing *gfp* gene with chromosomal genes. In addition, the classic mixing-diluting method was improved to measure the colony-forming unit more accurately. This improved accuracy enabled the comparison between the unit with the amount of ribosome and the detection of amino acid deficiency at a stage of bacterial growth.

## 論文審査結果の要旨

2015年8月25日午後二時から学位公聴会をおこなった。45分の英語での発表に続き、質疑応答を行った。英語は十分な能力があり、日本語での質問も理解することが出来る優れた言語能力であった。査読を経た出版論文は、すでに Genes to Cells の電子版に掲載されている参考論文の他にも1報ある。

### 経過

1. イントロダクションとして、protein turnover, 100S ribosome, cell viability と colony forming unit の概念の紹介があり、stationary state と decay period におけるこれらの関係を求めるという研究目的の説明があった。
2. それに続いて、実験系の説明があり、新規 GFP を用いて、リボソームタンパク質 S10-GFP や S2-GFP 融合タンパク質を作製し、観測に成功、さらにリボソームの存在様式と半定量的分析の紹介と、その基盤となる実験群が説明された。主な新規性は、(1)染色体レベルでの GFP との融合で蛍光観察出来たこと、(2)蛍光基の成熟が完了している可能性が高く、GFP の蛍光により特定のタンパク質の増減を細胞内観察で半定量的分析出来る方法論、(3)定量的 Colony Forming Unit 測定法の3つであり、汎用性が高い。
3. S10-GFP 株と S2-GFP 株の上記の方法論を用いた解析から、大腸菌増殖から死滅までの各時期における、GFP の蛍光を元にしたリボソームの可溶性画分と SDS 存在下で抽出される画分との半定量分析によって、100S の形成の促進と阻害が共に定常期を10時間以上短縮して死滅することを発見、100S の存在だけでは無く、100S が形成される時期が定常期の維持に重要である発見が報告された。今までの100Sの役割の議論にはなかった興味深い発見である。
4. 定量的に測定された CFU と ribosome の総量と考えることが可能な S10-GFP の量には、増殖時期に依存しない比例関係があることが発見された。このことから生細胞での ribosome 量は増殖時期に依存せずほぼ一定となる可能性が示された。ただしこの比例関係は、100S 形成に必須の *rmf* と *hpf* 遺伝子をそれぞれ欠損させた S10-GFP $\Delta$ *rmf* 株と S10-GFP $\Delta$ *hpf* 株では崩れており、*rmf* と *hpf* の未知の機能によるのかもしれない。また、アミノ酸の枯渇を時期的に分析し、その枯渇が細胞死を誘導する時期は S10-GFP 株では、decay period だけであること、100S 形成が不可能な S2-GFP 株、100S 形成が促進・延長されている S10-GFP $\Delta$ *yfiA* 株では他の時期にまで広がっていることが観察された。
5. これらの発見は、100S が存在する時期よりその効果が出る時期が遅れることから、従来示されてきた ribosome の貯蔵のような 100S の単一機能に帰着させることは不可能であり、protein turnover のような細胞生物学的過程が介在する可能性が高い。しかし得られた結果から一義的に機構を決定することは現状では出来ない。そこで、protein turnover を組み込んだ consistent model の例が提案された。

6. 顕微鏡を用いた 1 細胞生物学により、ribosome の分布による生死の推定など興味深い現象の報告がなされた。

#### 主な質疑応答の内容

(問) タイトルに protein turnover が含まれているが、傍証のみで、分解と合成が行われている微視的証拠が提出されていないのではないかと、この批判があった。

(答) この批判は正しく、本研究では、protein turnover が含まれていることは証明できていない。100S の存在が生存維持の直接の原因とはなり得ず、ribosome 分解を含む、時間がかかる細胞生物学的過程の関与が必要であることは明らかになった。出版論文の水準を満たすためには、実際に結果を説明できるモデルを最低 1 つ示す必要があり、明確なモデルを提案して、今後の機構解明に資する問題提起をしたのがこの論文の意味と重要性である。

(問) 確かに、いままで可能であったモデルで排除出来るものが明らかになった。しかし、論文の質をもう一段上げるには、分解と合成が行われている微視的証拠が必要。

(答) その通りであるが、時間切れとなってしまった。

(問) Thesis には、モデルが複数上がっていたが、発表では 1 つとなっていた。

(答) Thesis では、可能性を絞り込む論理を記述したが、発表では、自分が提案するモデルのみに絞り込んだ。

(コメント) GFP がいい加減に扱われている中で、さまざまな測定を行って、定量性を出し、巧みに GFP を用いた点、染色体上で GFP との融合を行って、遺伝学的にクリーンな状態で GFP を用いた点に独創性があり、博士の水準をみたましている仕事である。

(コメント) 少し触れられていた、1 細胞観察は、非常に興味深く、これでまとまらなかったのは残念である。

#### 結論

これらの研究は、ほぼ妥当な手法と論理に基づいており、特に新規性の高い方法論の有用性の価値により、学位に求められる水準に達していると本審査委員会は結論した。