

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03618

研究課題名(和文) 過剰発現により輸送リソースの過負荷を引き起こすタンパク質の体系的解析

研究課題名(英文) Systematic analysis of proteins that cause overload of transport resources due to overexpression

研究代表者

守屋 央朗 (Moriya, Hisao)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：60500808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：特定のタンパク質の過剰発現は細胞増殖を阻害する。しかし、そのメカニズムはほとんどわかっていない。私たちの先行研究から、細胞内で輸送されるタンパク質の過剰により必要な因子が枯渇する現象、輸送の過負荷が過剰発現による増殖阻害の大半を説明する可能性が見えてきた。本研究では、輸送への過負荷を引き起こすタンパク質と過負荷の標的となる制限因子の同定を通じて、輸送の過負荷による増殖阻害のメカニズムを解明することを目的とした。その結果、特に核外輸送の制限因子の候補を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、特定のオルガネラや細胞内にタンパク質を大量生産したい場合の、積み荷タンパク質や宿主細胞の改変に利用できる可能性がある。また、癌細胞で過剰発現しているタンパク質の性質から輸送の制限因子への過負荷を予測できれば、その制限因子を標的とすることで癌細胞のみを選択的に死滅させるような、新しい治療方法を提案できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of certain proteins inhibits cell proliferation. However, the mechanism of this is largely unknown. Our previous studies have shown that the depletion of essential factors due to an overload of proteins transported in the cell--transportation overload--may explain most of the growth inhibition caused by overexpression. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of growth inhibition by transport overload through the identification of proteins that cause transport overload and restriction factors that are targets of overload. As a result, we identified several candidate limiting factors for nuclear transport in particular.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：細胞 過剰発現 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質が最適な量から逸脱して過剰発現すると細胞の生理に多様な影響を及ぼす。癌細胞では様々なタンパク質が過剰発現しており、これが薬剤感受性などの生理状態に反映されている。しかし、過剰になった際に細胞機能に強い影響を与えるタンパク質の特徴や、そのメカニズムはほとんど分かっていない。

報告者らは、出芽酵母を用いて過剰発現が引き起こす増殖阻害のメカニズムを調べてきた。具体的には、過剰発現の限界を調べることができる genetic tug-of-war (gTOW) 法により酵母のすべての遺伝子を解析し、過剰発現により増殖阻害を引き起こす 750 の量感受性遺伝子 (DSG) を同定した (Makanae et al. Genome Res. 2013)。報告者はさらに DSG による増殖阻害のメカニズムの解明を続け、化学量不均衡・リソース過負荷・パスウェイ修飾・乱雑な相互作用にそれらを分類した (Moriya MBoC 2015)。しかし、DSG の大半がどのようなメカニズムで増殖阻害を引き起しているのかはまだ説明できていない。

報告者らは、核内・核外・ミトコンドリア・小胞・細胞膜への輸送にかかわるシグナル配列を付加した緑色蛍光タンパク質 (局在化 GFP) の過剰発現が、各輸送プロセスに特異的に障害を与えることで細胞増殖を阻害することを明らかにした (Kintaka et al. Sci. Rep. 2016)。さらに、核外輸送 GFP の過剰が、輸送因子 Crm1 の枯渇を引き起こしている実験的証拠を得た (Kintaka et al. Sci. Rep. 2016)。これは、輸送されるタンパク質の過剰が輸送因子を枯渇させ増殖を阻害する現象-輸送の過負荷を初めて捉えた例だと報告者らは考えている。また、局在化 GFP の解析をさらに進め、輸送の過負荷の標的となる複数の制限因子を同定しつつある。この結果を踏まえ、改めて DSG がコードするタンパク質をデータベースで調べたところ、その 90% が、小胞体やミトコンドリアなどオルガネラに関連しているものだった (未発表)。これらのオルガネラでタンパク質が働くためには、当然ながらそこにタンパク質が輸送されなければならない。輸送されるタンパク質の過剰が共通して引き起こす状況は、輸送の過負荷だと考えられる。このことから報告者らは、過剰発現による増殖阻害の大半が、輸送の過負荷で説明できるかも知れないと考えた。

2. 研究の目的

以上を踏まえ本研究では、出芽酵母の中で過剰発現により輸送の過負荷を引き起こすタンパク質 (高負荷な積み荷タンパク質) とその標的となる制限因子の全容を明らかにし、それを通じて過剰発現による増殖阻害の大半を輸送の過負荷が説明する可能性を検証することを目的とした。

本研究により、輸送の過負荷というこれまでになかった視点から見た細胞像が明らかになる可能性がある。真核細胞は、機能を担うタンパク質を各オルガネラに正確に効率よく輸送するため、複雑で巧妙なシステムを作り上げ、その維持と管理に膨大なリソースを割いていると考えられる。このシステムは積み荷の過剰でどのように崩壊するのだろうか、生物はそれにどう対応しているのだろうか、それを明らかにするのが本研究の目

的である。さらに本研究で、過剰発現による増殖阻害の主要なメカニズムが明らかになる可能性がある。これまで輸送などのリソースの過負荷は、過剰発現による増殖阻害のメカニズムとして考慮されてこなかった。本研究は、過剰発現がもたらす細胞システムへの影響の議論を転換させる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究は、高負荷な積み荷の探索、制限因子の同定、特徴抽出・改変の3つの解析からなる。では、高負荷な積み荷タンパク質をgTOW法と顕微鏡観察により網羅的に探索する。ではGFPをモデルタンパク質として、輸送の過負荷の標的となる制限因子を探索・分類する。さらにで得られた高負荷な積み荷タンパク質が、どの制限因子に負荷をかけているのか関係性を調査する。では、での関連性の情報も含め、情報学的解析から特定の制限因子に負荷をかけるタンパク質の特徴抽出に挑む。この結果をもとに積み荷や酵母を改変し負荷を回避できるか検証する。平成29年度はとを、それ以降は～を行う計画である。生物学実験全般を研究代表者のグループが、情報解析全般を研究分担者が行う。

4. 研究成果

本研究の成果は主に5つある。これらのうち4つは論文として発表し、残りの1つ(以下の2)は現在論文を投稿中(リバイス中)である。それぞれを以下に述べる。

1. 解糖系タンパク質の解析: 積み荷タンパク質の探索の過程で、高負荷な積み荷タンパク質を得るために、まず「細胞内プロセスに負荷をかけないタンパク質」を定義する必要があることを認識した。解糖系タンパク質は一般的に発現量が高く、負荷をかけにくいタンパク質である可能性が考えられた。そこで29種類の解糖系関連タンパク質を選定し、それらの発現限界を測定した。その結果、細胞内プロセス負荷をかけない数種類のタンパク質を同定した。さらにこれらの負荷をかけないタンパク質を指標とすることで、ミトコンドリア局在タンパク質 Adh3 が高負荷な積み荷タンパク質の候補になり得ること、Adh3 のミトコンドリア局在化シグナルをモデルタンパク質 GFP に結合させることで制限因子の同定が可能になることが示唆された。

2. 変異体の体系的スクリーニングによる制限因子の同定: トロント大学の Charles Boone 教授との共同研究により、細胞内プロセスへの負荷の標的となる制限因子の変異体の体系的取得を行った。その結果、このうち、タンパク質合成プロセスと核外輸送プロセスの制限因子について多数の変異体を取得できた。

3. 負荷を回避できる変異体の解析: 2 では、合成プロセスへの過負荷を回避できる変異体も取得することができた。そこでこの変異体についてさらに詳細に解析した結果、ヒストンリモデリング因子に変異が入ったことで多数の輸送されるタンパク質の発現が特異的に減少し、結果として負荷を許容できるようになったことが示唆された。

4. ヒト培養細胞における輸送の過負荷の検討: これまでの過剰発現による増殖阻害の

解析は、主に出芽酵母を用いて申請者らが開発した gTOW 法により行ってきた。本研究では酵母の発見の普遍性を評価できるよう、ヒト培養細胞（HEK293 細胞、HeLa 細胞）において gTOW 法と同等な、過剰発現の限界を測定できる実験の開発を行った。その結果、モデルタンパク質である GFP や積み荷タンパク質、輸送関連タンパク質の発現限界を効率よく取得することが可能になった。ヒト培養細胞においても、酵母細胞と同様に小胞輸送やミトコンドリア輸送されるタンパク質は細胞プロセスに負荷をかけることが分かった。

5. 高負荷タンパク質の人工的作成の試み：輸送されるタンパク質の多くは N 末端に輸送に必要なシグナル配列を持っている。本研究では GFP の N 末端にランダムな 10 アミノ酸の配列（N10 配列）を付加し、それらの限界発現量を gTOW 法で評価することで、従来負荷の小さな GFP を高負荷なタンパク質へと変換させる N10 配列を探索した。その結果、システインや疎水性残基の存在が GFP を高負荷なタンパク質へと変換させることを見いだした。

本研究の成果は、特定のオルガネラや細胞内にタンパク質を大量生産したい場合の、積み荷タンパク質や宿主細胞の改変に利用できる可能性がある。また、癌細胞で過剰発現しているタンパク質の性質から輸送の制限因子への過負荷を予測できれば、その制限因子を標的とすることで癌細胞のみを選択的に死滅させるような、新しい治療方法を提案できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Eguchi Yuichi, Makanae Koji, Hasunuma Tomohisa, Ishibashi Yuko, Kito Keiji, Moriya Hisao	4. 巻 7
2. 論文標題 Estimating the protein burden limit of yeast cells by measuring the expression limits of glycolytic proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e34595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.34595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Scharff-Poulsen Peter, Moriya Hisao, Johnston Mark	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic Analysis of Signal Generation by the Rgt2 Glucose Sensor of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 G3	6. 最初と最後の頁 2685 ~ 2696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1534/g3.118.200338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Moriya Hisao, Graduate School of Environmental and Life Sciences, Research Core for Interdisciplinary Sciences, Okayama University	4. 巻 7
2. 論文標題 The expression level and cytotoxicity of green fluorescent protein are modulated by an additional N-terminal sequence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIMS Biophysics	6. 最初と最後の頁 121 ~ 132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3934/biophy.2020010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Abe-Kanoh Naomi, Kunisue Narumi, Myojin Takumi, Chino Ayako, Munemasa Shintaro, Murata Yoshiyuki, Satoh Ayano, Moriya Hisao, Nakamura Yoshimasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Yeast screening system reveals the inhibitory mechanism of cancer cell proliferation by benzyl isothiocyanate through down-regulation of Mis12	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45248-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mori Yoshihiro, Yoshida Yuki, Satoh Ayano, Moriya Hisao	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an experimental method of systematically estimating protein expression limits in HEK293 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61646-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto Michiko, Iwaki Sayako, Moriya Hisao, Monden Yuki, Tamura Takashi, Inagaki Kenji, Mayama Shigeki, Obuse Kiori	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparative Gene Analysis Focused on Silica Cell Wall Formation: Identification of Diatom-Specific SET Domain Protein Methyltransferases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-020-09976-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saeki Nozomu, Eguchi Yuichi, Kintaka Reiko, Makanae Koji, Shichino Yuichi, Iwasaki Shintaro, Kanno Manabu, Kimura Nobutada, Moriya Hisao	4. 巻 -
2. 論文標題 N-terminal deletion of Swi3 created by the deletion of a dubious ORF YJL175W mitigates protein burden effect in <i>S. cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) -	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 江口優一、守屋央朗
2. 発表標題 Defining harmful yeast oroteins by mesuring overexpression limits
3. 学会等名 2018 Yeast Genetics Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守屋央朗、加藤有香
2. 発表標題 タンパク質の限界発現量から探る細胞の処理能力
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯望、江口優一、堀内智司、Herbst Konrad、Kirrmaier Daniel、Knop Michael、守屋央朗
2. 発表標題 多コピー化が増殖に有利に働く酵母遺伝子のハイスループットスクリーニング
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江口優一、守屋央朗
2. 発表標題 タンパク質の発現限界を測る遺伝学的手法TOW-Fu
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守屋央朗、江口優一、蒔苗浩司、加藤有香
2. 発表標題 過剰発現の限界から探る細胞の処理能力
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守屋央朗
2. 発表標題 過剰発現が適応的に働く遺伝子の体系的同定
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金高令子、Charlie Boone、守屋央朗
2. 発表標題 Genetic profiling of protein burden and nuclear export overload
3. 学会等名 ICYGMB 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯望、守屋央朗
2. 発表標題 Systematic Identification of Genes whose Overexpression Positively Affect Fitness in Various Environments
3. 学会等名 ICYGMB 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 守屋央朗
2. 発表標題 過剰発現実験により探るプロテオームの拘束条件
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯望、守屋央朗
2. 発表標題 Systematic Identification of Genes Whose Overexpression Works Adaptively Using the ADOPT System
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学異分野融合先端研究コア・システム細胞学研究室 https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HMlab/ 岡山大学異分野融合先端研究コア・システム細胞学研究室 https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HMlab/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	牧野 能士 (Makino Takashi) (20443442)	東北大学・生命科学研究所・教授 (11301)	