

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03242

研究課題名（和文）変異タンパク質の限界発現量から探る過剰発現による増殖阻害のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of growth inhibition by overexpression explored from the expression level of the limiting mutant protein

研究代表者

守屋 央朗（Moriya, Hisao）

岡山大学・環境生命自然科学学域・教授

研究者番号：60500808

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の過剰発現は様々な方法で細胞に害をなす。私たちはこれまで真核細胞のモデルである出芽酵母を用いて、過剰発現により増殖阻害を引き起こすようなタンパク質集団が持つ特性について調査し、増殖阻害発生のメカニズムを分類してきた。本研究では増殖阻害を起こすようなタンパク質に変異を導入することで、毒性のメカニズムをさらに追求した。その結果、特定のアミノ酸を持つことが増殖阻害の原因となったり、タンパク質の活性が増殖阻害を引き起こす原因となっていることなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでほとんど分かっていないタンパク質の発現を制約するメカニズムの解明につながり、基礎生物学的な知識の拡張に繋がる。また、ここで得られた知識は、細胞にタンパク質が蓄積することにより生じる疾患、癌や神経変性疾患などの細胞の生理状態の理解と創薬へと繋がるとともに、細胞工学において特定のタンパク質を大量発現させたいときのタンパク質デザインの指針となる。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of proteins can harm cells in various ways. Using budding yeast as a model for eukaryotic cells, we have investigated the characteristics of protein groups that cause growth inhibition when overexpressed and have classified the mechanisms of growth inhibition. In this study, we further explored the toxicity mechanisms by introducing mutations into proteins that cause growth inhibition. As a result, we revealed that the presence of specific amino acids or the activity of the protein itself can lead to growth inhibition.

研究分野：システム生物学

キーワード：酵母 過剰発現 タンパク質 細胞毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の過剰発現は、時として細胞の機能に悪影響を与える。タンパク質の過剰発現による悪影響を知ることは、「細胞内のタンパク質の発現量がどのような原理に基づいて決まっているか」という基礎生物学的な知識を与える。それに加え、染色体数の増加を特徴とする癌細胞の生理状態や、毒性のあるタンパク質の過剰な蓄積により生じる神経変性疾患の発生メカニズムを理解する際、あるいは異種タンパク質の大量発現や、異種・同種のタンパク質を発現させて細胞機能の改変を目指す際の基盤的知識となる。

これまでに過剰発現により生命機能に異常を引き起こすタンパク質が様々な生物種で同定されている。特にモデル真核細胞の出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、報告者らを含めた複数のグループにより、過剰発現により増殖阻害を引き起こす多数のタンパク質が同定されている。従来、過剰発現による影響は、過剰になったタンパク質の生理機能の亢進として説明されてきた。例えば、代謝酵素の過剰はその酵素の触媒作用により生じる代謝産物の異常蓄積を引き起こすし、転写因子の過剰はターゲット遺伝子群の不時の発現を引き起こすことが予測される。しかし、過剰発現により増殖阻害を引き起こすタンパク質の同定は30年前から行われているにもかかわらず、現在においても増殖阻害のメカニズムがそれらの生理機能からほとんど説明できない。この大きな原因は、タンパク質の過剰が、実際には生理機能の亢進以外の様々な帰結を生むことにありと報告者は考えている。例えば、輸送されるタンパク質の過剰は輸送装置の不全を起こすし、凝集性のタンパク質の過剰は毒性のある凝集体を作ることがある。あるタンパク質の過剰が引き起こす増殖阻害のメカニズムを理解するには、そのタンパク質がどんな機能を担っているか、どんな処理を受けているか、どんな要素と(潜在的に)相互作用するか、そしてどんな物理化学的特性を持っているかを統合的に考慮しなければならない。

過剰発現の影響はこれまで生理機能の亢進を中心に考えられてきた。この理由は、それが唯一、予想と検出が可能な事象であり、それ以外のメカニズムによる影響は、「予測不可能な副作用」と扱うしかなかったからである。近年蓄積した生物情報と定量的なデータはこの状況を変えはじめた。特に報告者らは、遺伝子つなひき (gTOW) 法という、増殖阻害を起こす限界の過剰発現量(限界発現量)を測定できる実験手法を独自に開発し、これにより出芽酵母がもつ約5,800のタンパク質すべての限界発現量を測定した。そこで同定された、わずかな過剰により増殖阻害を起こす115種類の量感受性タンパク質の特性を手がかりとして、機能の亢進によらない複数の増殖阻害のメカニズムを見だし、それらのいくつかに関しては実際の実験による検証も行った。それにより、「機能の亢進は過剰発現による増殖阻害の一部にすぎず、その大半が、副作用と捉えられていた機能の亢進以外のメカニズムにより発生するのではないか？」という研究課題の核心をなす学術的「問い」となる仮説に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では上記の仮説の検証を行うことを通じて、過剰発現による増殖阻害のメカニズムをタンパク質の特性と結びつけて整理・体系化することを目的とした。このために、報告者らが同定

した 115 種類の量感受性タンパク質の過剰が、機能の亢進による増殖阻害を起こしているのか、それ以外のメカニズムによるのかを分離することを試みた。具体的には、それぞれのタンパク質に対して一連の変異体を作成し、それらが野生型と同じ限界発現量を持っているかを調べる。変異により増殖阻害効果が失われ限界発現量が上がった場合には、その変異で失われる機能が増殖阻害に関係しており、増殖阻害効果が変わらず野生型と同じ限界発現量であった場合には、その機能は増殖阻害とは無関係であると考えられる。これに加え、過剰発現下にある細胞の生理状態の解析も行う。本研究が達成すれば、過剰発現による増殖阻害のメカニズムに対する考えが大きく転換するだけでなく、その理解が大きく進むことになる。

報告者らの知る限り、gTOW 法は、標的タンパク質をどこまで過剰にしたら増殖阻害を起こすかという定量データ（限界発現量）を体系的に測定できる唯一の実験法である。この研究は、gTOW 法のデータから見いだした機能の亢進以外の複数のメカニズムを丹念に検証してきた独自の研究の延長線上にある。本研究では、報告者が考えるこれらのメカニズムが、報告者が取得した量感受性タンパク質のどれに適用されるのかを、独自の実験系により体系的に調査するものである。本研究では、生理機能の異なる一群のタンパク質に対して、既存の情報を整理しつつ活性・局在・結合能変異体を体系的に作成し、その生理機能への影響を調査することになる。報告者らの知る限りこのような研究は今まで行われておらず、本研究が成功すれば、情報統合と機能アッセイを大規模・体系的に行う新しい研究フレームワークの先駆的な例にもなる。

### 3 . 研究の方法

本研究は、115 種類の量感受性タンパク質に順次変異を導入し（ ）その変異タンパク質を限界発現量まで発現した細胞を gTOW 法により準備し、その細胞における変異タンパクの限界発現量や局在、その細胞の生理状態を解析し変異を評価する（ ）というフレームワークで行う。

変異の導入:標的である量感受性タンパク質のほとんどは、その機能解析がよく進んでいる。そのうち、触媒活性を持つものは 54 種類、局在性シグナルをもつものは 48 種類、結合性のあるものは 27 種類ある。触媒活性を持つものには活性中心アミノ酸に、局在性のものにはシグナル配列に、結合性のあるものには結合部位に欠失やアミノ酸置換の変異を導入していく。変異部位の選定は文献情報やデータベース、配列予測ツールやオーソログの保存性などを統合して行う。例えば、代謝酵素の変異情報は BRENDA データベースから入手する。局在配列の存在は SignalP や Mitofates などのソフトウェアにより予測する。また、オーソログの解析により機能に重要な保存された領域の特定を行う。量感受性タンパク質は共通の構造や機能を有しているわけではない。変異の設計とその影響の確認はそれぞれのタンパク質ごとに注意深く行う必要がある。活性中心への変異がそのタンパク質の他の特性（安定性や結合性、局在など）に影響を与えたり、ドミナントネガティブな影響を生じさせたりする可能性もある。生理機能のみを特異的に不活化できないケースもあるだろう。これらの事象を現時点では予測することは難しい。上記の情報をもとにタンパク質ごとに特性情報を整理しデータベース化した上で変異導入を行い、様々な可

能性を考慮しつつ実験データを精査し、次の実験デザインを練っていく計画である。

変異の評価(1) 限界発現量の測定: gTOW 法では、標的タンパク質をコードする遺伝子をネイティブなプロモーターごと gTOW 用のプラスミドに組み込み、プラスミド上昇の選択圧を利用して、その遺伝子のコピー数を増殖阻害が起きるぎりぎりまで上げられる。これまでの報告者らの研究から、酵母の 90% 程度のタンパク質では遺伝子コピー数とタンパク質の発現量に直線的な関係があると試算されている。従って、gTOW プラスミドのコピー数(リアルタイム PCR で測定)や、増殖速度で限界発現量を簡便に評価することができる。さらに gTOW により標的が限界まで発現している状態の細胞を回収し、標的タンパク質の発現量を SDS-PAGE やウエスタンブロットリングで測れば、標的タンパク質の限界発現量を知ることができる。変異導入による限界発現量への影響は、まずは gTOW 法によるコピー数と増殖速度の変化で捉える。さらにタンパク質の発現量や局在化への影響があるかを、タグもしくは蛍光タンパク質融合タンパク質によるウエスタンブロットリングならびに局在解析により検討する。

変異の評価(2) 細胞の生理状態の解析: 過剰発現による細胞機能への影響は、顕微鏡観察とソフトウェア CalMorph による細胞の形態情報、ならびにトランスクリプトーム解析により検討する。この解析により、野生型タンパク質の過剰が引き起こす生理状態がその生理機能の亢進として捉えられるか、生理機能を失った変異タンパク質の過剰が野生型と同様の生理状態を引き起こすかを調査する。さらにこれらの解析から、さまざまな特性をもつタンパク質の過剰発現が引き起こす共通の細胞応答が発見できる可能性もある。この解析で、報告者らが以前に行ったように、過剰発現による増殖阻害のメカニズムを分離できる可能性もある。

#### 4. 研究成果

本研究に関連する成果は 7 報の論文として発表した。これらの研究による主要な発見は、タンパク質の生理機能とは関係なく、ミスフォールディングにより生じる凝集体の分解が細胞機能に悪影響を及ぼすこと、凝集体の悪影響を緩和させるために熱ショック応答が誘導され、その結果発現するシャペロン Hsp70 と凝集体との相互作用により巨大凝集体が形成されること、凝集体形成そのものは必ずしも細胞機能に悪影響を及ぼさないが、そこに細胞内の必須タンパク質が特異的、非特異的に捕獲されることで増殖阻害効果を及ぼすことである。また、システイン残基を含むタンパク質の大量発現は、タンパク分解マシナリーであるプロテアソームの機能を阻害することで細胞形態の異常を引き起こすことも明らかとなった。

この他に、過剰発現をこれまでにないレベルで達成できるプロモーターの開発に成功した。また、蛍光タンパク質の活性中心に変異を入れることで蛍光タンパク質の過剰発現による増殖阻害効果が飛躍的に減少すること、この光らない蛍光タンパク質を極限まで過剰発現させると細胞が栄養の飢餓状態を起こすこと、リボソームや解糖系酵素の減少、発酵から酸素呼吸へのエネルギーシフト、細胞内タンパク質の希釈による核小体の形成不全が起きることを発見した。これらの結果は、現在論文として投稿中である。さらに、蛍光タンパク質に余計なアミノ酸を負荷したと

きに生じる細胞機能への影響を体系的に評価し、特定のアミノ酸が連続すると細胞機能に強い悪影響を生じさせること、逆に特定のアミノ酸の付加は蛍光タンパク質の過剰発現による増殖阻害効果を低減させることを見いだした。これらの結果は投稿準備中である。

以上の結果は、すべての報告者の研究により明らかになった独自性の高いものであり、今後、タンパク質の過剰発現が生む細胞への悪影響を考える上で重要な基礎的知見になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Namba Shotaro, Moriya Hisao	4. 巻 in press
2. 論文標題 Toxicity of the model protein 3×GFP arises from degradation overload, not from aggregate formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.261977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi Rina, Fujita Yuri, Moriya Hisao	4. 巻 -
2. 論文標題 Improving the Z <sub>3</sub> EV promoter system to create the strongest yeast promoter	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2024.05.24.595832	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saeki Nozomu, Yamamoto Chie, Eguchi Yuichi, Sekito Takayuki, Shigenobu Shuji, Yoshimura Mami, Yashiroda Yoko, Boone Charles, Moriya Hisao	4. 巻 19
2. 論文標題 Overexpression profiling reveals cellular requirements in the context of genetic backgrounds and environments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1010732	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 Ono Ryota, Saeki Nozomu, Kojima Keiichi, Moriya Hisao, Sudo Yuki	4. 巻 677
2. 論文標題 Demonstration of iodide-dependent UVA-triggered growth inhibition in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells and identification of its suppressive molecules	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Saku, Schlarmann Philipp, Hanaoka Kazuki, Nishii Hinako, Moriya Hisao, Mu?iz Manuel, Funato Kouichi	4. 巻 598
2. 論文標題 Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum dominates Golgi biogenesis in budding yeast	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 548 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010732	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 Namba Shotaro, Kato Hisaaki, Shigenobu Shuji, Makino Takashi, Moriya Hisao	4. 巻 12
2. 論文標題 Massive expression of cysteine-containing proteins causes abnormal elongation of yeast cells by perturbing the proteasome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	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) 10.1002/yea.3685	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 Horiuchi Satoshi, Namba Shotaro, Saeki Nozomu, Satoh Ayano, Moriya Hisao	4. 巻 39
2. 論文標題 Identification of uncharacterized proteins potentially localized to mitochondria (UPMs) in Saccharomyces cerevisiae using a fluorescent protein unstable in the cytoplasm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Yeast	6. 最初と最後の頁 303 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/yea.3685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学 細胞システム化学 守屋研究室  
<https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HMlab/>  
 酵母とシステムバイオロジー  
[https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM\\_blog/](https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM_blog/)  
 岡山大学システム細胞学研究室  
<https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HMlab/>  
 酵母とシステムバイオロジー（ブログ）  
[https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM\\_blog/](https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM_blog/)

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  (Makno Takashi)  (20443442)	東北大学・生命科学研究科・教授    (11301)	

	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
研究協力者	難波 匠太郎  (Namba Shotaro)	岡山大学・環境生命自然科学研究科・博士後期課程2年   (15301)	
研究協力者	藤田 祐梨  (Fujita Yuri)	岡山大学・環境生命自然科学研究科・博士後期課程1年   (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関