

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640115

研究課題名(和文) 酵母におけるプロセス負荷の原理の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of process burdens in yeast

研究代表者

守屋 央朗 (Hisao, Moriya)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・准教授

研究者番号：60500808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内でタンパク質を大量に発現すると、細胞の機能に様々な悪影響を与えることが知られている。しかし、どのようなタンパク質がどれくらい過剰になると、どのようなメカニズムにより細胞の機能にどんな悪影響が及ぼされるのかは、体系的に理解されていない。本研究により、細胞内の様々なコンパートメントにタンパク質を大量に局在化させようとする、その局在化というプロセス自身が細胞機能につよい悪影響(負荷)をかけることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Strong expression of a protein in a cell sometimes causes cellular defects. However, it is not systematically understood the mechanisms causing the defects. In this study, we discovered that the strong expression of proteins localized to intracellular compartments caused cellular defects due to the burdens for protein localization processes themselves.

研究分野：システム生物学

キーワード：酵母 タンパク質過剰 プロセス負荷 局在化

1. 研究開始当初の背景

「どんなタンパク質でも細胞内で大過剰につくらせれば、細胞にとって負荷になり、細胞にとって毒になる。」これはタンパク質負荷 (Protein burden) とよばれる現象で、1957年に発見された。しかし、タンパク質負荷の原理がリボソームの枯渇であることがわかったのは最近のことである。一方、上記はバクテリアでの研究であり、細胞内が高度にコンパートメント化されている真核細胞におけるタンパク質負荷はほとんど知られていない。私たちは、酵母において遺伝子/タンパク質の限界発現量を測ることができる「遺伝子つなひき (gTOW) 法」を開発している。私たちは最近、gTOW法をもちいて、酵母の細胞機能に関係のないクラゲの緑色蛍光蛋白質 (GFP) がひきおこすタンパク質負荷を観察することに成功した。私たちはこれをさらに発展させ、ミトコンドリア局在シグナル、小胞輸送シグナル、核内輸送/核外輸送シグナルなど、さまざまな細胞内局在化シグナルを付加した GFP の限界発現量を測定した。その結果、それぞれがまったく異なった限界発現量 (= 毒性) をもっていることがわかった。私たちは、この結果が「細胞内にコンパートメントをもつ真核細胞に特異的なタンパク質負荷 = プロセス負荷」のはじめての発見であると考えている。

2. 研究の目的

上記の発見をうけて、私たちは本研究でプロセス負荷の原理をあきらかにすることを目的とする。具体的には、(1) オミックス解析によりプロセス負荷のかかった細胞の生理応答をあきらかにし、(2) 復帰変異や多コピー抑圧遺伝子の解析により、細胞システムがプロセス負荷をどのように回避できるのかをあきらかにする。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、本研究では3つの解析を行なう。解析1では、さまざまな局在化シグナルを付加した GFP の限界発現量を gTOW 法により測定し、プロセス負荷を発見し、プロセス負荷をかかえている細胞を用意する。解析2では、解析1で用意された細胞についてオミックス解析をお

こない、どのような代謝産物・タンパク質・遺伝子発現がプロセス負荷により影響を受けているのかをあきらかにすることで、プロセス負荷の原理をあきらかにする。解析3では、解析1で用意された細胞をもちいて、プロセス負荷の状態から復帰した変異を取得したり、多コピーで抑圧する遺伝子の取得をおこない、別のアプローチからプロセス負荷の原理をあきらかにする。この解析では同時に、細胞システムがどのようにしてプロセス負荷を回避しうるかを知ることができ、プロセス負荷を制御するためのヒントを得ることができる。本研究の解析は、代表者グループが中心となつて行ない、オミックス解析は共同研究や外部委託で遂行する。

4. 研究成果

本研究の研究期間では、以下の4つの研究テーマを推進した。その中で2-4は、研究を進めるうちに新たに始めた研究テーマである。

1) 局在化させたモデルタンパク質 GFP をもちいたプロセス負荷の原理の解明

本テーマでは、モデルタンパク質である GFP に、核、核外、ミトコンドリア、小胞輸送、細胞膜などへの局在化に必要なシグナル配列を付加し、gTOW法を用いてその限界発現量を評価する。これまでの研究で、核外やミトコンドリア、小胞輸送のシグナルを負荷した GFP の細胞内での発現は強く制限される (細胞内の各プロセスに強い負荷を与える) ことがわかっている。本研究では、この原因となっている背景原理 (分子メカニズム) を明らかにすることを目指した。

これらの局在化 GFP を大量発現している細胞の生理を理解するために、マイクロアレイ解析や顕微鏡観察の解析をおこなった。マイクロアレイ解析の結果は、局在化 GFP がそれぞれの局在部位に応じてオルガネラの損傷やストレスを生じさせていることを示していた。顕微鏡観察の結果、局在化 GFP は時として細胞内に巨大な凝集体を構成していることがわかった。これらの凝集体が細胞毒性の原因であることが示唆された。

また、局在化させる分子の大きさ自身も

細胞毒性と発現限界に大きな影響を与えることが分かった。GFPは26kDa前後と比較的小さなタンパク質であるが、これを三分子タンデムに結合させて同じように局在化シグナルを付加した場合、細胞毒性とタンパク質の発現量が、一分子のGFPの場合と比べて大きく変化した。

さらに、局在化GFPの大量発現がもたらす負荷を、大量発現により回避できる別の遺伝子の同定を、マルチコピーサプレッサーのスクリーニングにより単離することを試みた。結果として、10程度の遺伝子を同定することが出来た。現在、これらの結果をまとめた論文の投稿を準備している。

2) モデルタンパク質 GFP の N 末端に付加したランダムな 10 アミノ酸 (N10) の効果の解析

タンパク質のN末端には、しばしば細胞内局在化シグナル配列が存在している。このシグナル配列は、上記1で述べたように細胞内でのタンパク質の発現限界を規定する。またN末端の配列が、タンパク質の発現量に影響を与えることも近年報告された。そこで、本研究ではモデルタンパク質 GFP の N 末端にランダムな 10 アミノ酸の配列 (N10) を構成した時に、それが GFP の発現にどのような影響を与えるかをシステムティックに調査した。N10 を付加した GFP (N10-GFP) 約 100 種類の発現限界と細胞に対する毒性を gTOW 法により評価した。

その結果、N 10-GFP の発現量はそれぞれ 30 倍以上異なること、細胞毒性が 5 倍以上異なることがわかった。また、野生型の GFP 以上に強く発現させられる N10 配列は見つからなかった。さらに、発現量が低くなった N10-GFP では、N10 部分のコドン最適化することで発現が上昇した。現在、これらの結果をまとめた論文を執筆中である。

3) アルコール発酵酵素群をモデルとした、細胞の生合成マシナリー合成キャパシティの測定とその原理の解明

酵母の細胞内で最も大量に発現している一群のタンパク質は、アルコール発酵に関わる酵素群である。これらのタンパク質は細胞内で大量に生産できる(負荷を起こしにくい)設計になっていることが考えられ

る。そこで、その原理を探るために gTOW 法を用いてアルコール発酵に関わるタンパク質(約 30)の限界発現量を測定し、限界発現量が高いものと低いものに分類した。

その結果、大量発現しようとする毒性を発揮する酵素はミトコンドリアや細胞膜に局在するタンパク質であることがわかった。これは、局在化 GFP を用いたこれまでの私たちの研究を支持する結果である。また、大量発現させようとしてもタンパク質が作られてこない一群の酵素も同定した。これらは翻訳効率が他の酵素群と異なっている可能性が示唆されたため、現在さらに解析を進めている。

4) タンパク質複合体の構成バランスの乱れが引き起こすタンパク質分解のメカニズムの解明

これまでの私たちの研究から、gTOW 法により遺伝子コピー数を増やしてタンパク質を大量産生させようとしても、発現量が増えない(量補正を受ける)タンパク質を見出している。この原因として、タンパク質複合体の構成バランスが乱れたことにより、タンパク質分解が亢進されている可能性に着目した。出芽酵母内でのいくつかのタンパク質複合体の発現バランスを gTOW 法により乱してやり、それらのタンパク質のユビキチン-プロテアソーム系における分解を調査した。

その結果、プロテアソームの欠損株では遺伝子コピー数が乱れても量補正が起きないこと、これがユビキチン化により引き起こされている証拠を得た。このことは複合体のバランスの乱れという負荷に対して、積極的なタンパク質分解を起こすことで細胞が負荷の軽減をおこなっていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件) すべて査読あり

- ① Bonney ME, Moriya H, Amon A., Aneuploid proliferation defects in yeast are not driven by copy number changes of a few dosage-sensitive genes., Genes Dev.

2015 May 1;29(9):898-903.

- ② Makanae K, Kintaka R, Ishikawa K, Moriya H., Small Toxic Protein Encoded on Chromosome VII of *Saccharomyces cerevisiae.*, PLoS One. 2015;10(3):e0120678.
- ③ Sasabe M, Shintani S, Kintaka R, Kaizu K, Makanae K, Moriya H., Evaluation of the lower protein limit in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* using TIPI-gTOW., BMC Syst Biol. 2014 Jan 7;8(1):2.
- ④ Tsunematsu Y, Ishikawa N, Wakana D, Goda Y, Noguchi H, Moriya H., Hotta K, Watanabe K., Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk., Nat Chem Biol. 2013 Dec;9(12):818-25.
- ⑤ Chino A, Makanae K, Moriya H., Relationships between Cell Cycle Regulator Gene Copy Numbers and Protein Expression Levels in *Schizosaccharomyces pombe.*, PLoS One. 2013;8(9):e73319.
- ⑥ Naito T, Yatsunami A, Kaji N, Ando T, Sato K, Moriya H., Kitano H, Yasui T, Tokeshi M, Baba Y., Parallel Real-Time PCR on a Chip for Genetic Tug-of-War (gTOW) Method., Anal Sci. 2013;29(3):367-71.
- ⑦ Yamanishi M, Ito Y, Kintaka R, Imamura C, Katahira S, Ikeuchi A, Moriya H., Matsuyama T., A Genome-Wide Activity Assessment of Terminator Regions in *Saccharomyces cerevisiae* Provides a "Terminatome" Toolbox., ACS Synth Biol. 2013;2(6):337-47.

[和文総説] (計 5 件)

- ① 守屋央朗、蒔苗浩司 「酵母の組換え能を利用した簡便・高効率なプラスミドの構築」(クローズアップ実験法) 実験医学 2014 年 8 月号
- ② 守屋央朗 「生命システムのロバストネスとは何か？」 細胞工学 2014 年 1 月号特集 (監修)
- ③ 守屋央朗 「タンパク質の発現量の変化に対する細胞システムのロバスト

ネスを測る」 細胞工学 2014 年 1 月号 pp19-25

- ④ 守屋央朗 「酵母の持つすべての遺伝子の限界コピー数の計測」 生物物理 vol.53 No.6 pp323-326, 2013
- ⑤ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 「酵母のすべての遺伝子の「限界コピー数」を測る」 実験医学 2013 年 6 月号 pp1401-1405

[学会発表] (計 20 件)

- ① 守屋央朗 「細胞の持つタンパク質発現のキャパシティーを測る」(口頭発表・招待発表) 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 29 日(岡山県・岡山市)
- ② 石川浩史、蒔苗浩司、杉本育代、守屋央朗 「Systematic identification of proteins whose expressions are compensated upon expression perturbation in *Saccharomyces cerevisiae*」(ポスター発表) Cold Spring Harbor Meeting Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression 2015 2015 年 1 月 28 日~2 月 1 日 (Commonwealth of Puerto Rico, USA)
- ③ 守屋央朗 「生合成キャパシティーの拡大」(ポスター発表) 生合成マシナリー: 生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御 第 8 回公開シンポジウム 2014 年 12 月 5 日(東京都・文京区)
- ④ 石川浩史、蒔苗浩司、杉本育代、守屋央朗 「出芽酵母における遺伝子発現量の乱れを補正する機構のシステムマティックな解析」(ポスター発表) 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日-27 日(横浜市・西区)
- ⑤ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 「タンパク質過剰がもたらす細胞毒性のモデルタンパク質を用いた解析」(ポスター発表) 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日-27 日(横浜市・西区)
- ⑥ 石川浩史、蒔苗浩司、杉本育代、守屋央朗 「出芽酵母における遺伝子発現量の乱れを補正する機構のシステムマティックな解析」(ポスター発表) 第

- 32回 Yeast Workshop 2014年11月14日-15日(広島県・呉市)
- ⑦ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 「タンパク質過剰がもたらす細胞毒性のモデルタンパク質を用いた解析」(ポスター発表) 第32回 Yeast Workshop 2014年11月14日-15日(広島県・呉市)
- ⑧ 守屋央朗 「タンパク質発現量の限界を決める要素は何か?」(口頭発表・招待発表) 細胞を創る研究会 7.0 2014年11月14日(東京都・文京区)
- ⑨ 守屋央朗 「細胞システムのロバストネスを測る」(口頭発表・招待発表) 第87回に本生化学会大会 2014年10月15日(京都府・京都市)
- ⑩ 守屋央朗 「細胞システムのロバストネスを測る」(口頭発表・招待発表) 制御・情報理論による生物システムのロバストネス解析と設計」第1回公演会 2014年9月18日(東京都・文京区)
- ⑪ 石川浩史、蒔苗浩司、杉本育代、守屋央朗 「遺伝子発現量の乱れを補正する機構のシステムマティク解析」(ポスター発表) 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 2014年9月1日~9月3日(東京都・文京区)
- ⑫ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 (口頭発表) 「タンパク質過剰がもたらす細胞毒性のモデルタンパク質を用いた解析」 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 2014年9月1日(東京都・文京区)
- ⑬ 守屋央朗 「出芽酵母ゲノムに(たまたま)コードされていた、毒性のある小さなタンパク質」(口頭発表) 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 2014年9月1日(東京都・文京区)
- ⑭ 金高令子、蒔苗浩司、守屋央朗 (ポスター発表) 「Evaluation of cytotoxicity caused by overproduction of localized signal attached GFPs」 Yeast genetics meeting 2014 2014年7月29日-8月3日 (Washington, Seattle)
- ⑮ 守屋央朗 「タンパク質の発現量の限界を測る。」(口頭発表・招待発表) 日本プロテオーム学会 2014年 2014年7月17日(茨城県・つくば市)
- ⑯ 守屋央朗 「酵母の生合成キャパシティの拡大」 生合成マシナリー第7回公開シンポジウム(ポスター発表) 2014年6月21日(東京都・目黒区)
- ⑰ 雀部正毅、進谷紗弓、守屋央朗 「TIPI-gTOW法によるタンパク質発現の下限限定の試み」(口頭発表) 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会 2013年9月8日(仙台市青葉区)
- ⑱ 蒔苗浩司、守屋央朗 「出芽酵母における misfoldedGFP の過剰発現による細胞毒性の発揮メカニズムの解析」(ポスター) 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会 2013年9月8日(仙台市青葉区)
- ⑲ 守屋央朗 「酵母だから測れる(?)、過剰発現のコピー数限界」(口頭発表) 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3日(兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

守屋央朗 (MORIYA HISAO)

岡山大学・異分野融合先端研究コア・准教授

研究者番号: 60500808

(2)研究分担者

紀藤圭治 (KITO KEIJI)

明治大学・農学部・講師

研究者番号: 40345632