

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19300

研究課題名(和文) タンパク質の限界発現量から探る細胞の処理能力

研究課題名(英文) Cell processing capacity explored by expression limits of proteins

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質はその機能発現の過程で、合成・折りたたみ・輸送・分解など様々なプロセスで処理を受ける。これらのプロセスは、そこに割かれている資源の量に依存して、異なった処理能力を持っていると考えられる。しかし、これまで細胞内プロセスの処理能力が調べられたことはない。本研究では、申請者らが開発してきた、タンパク質の限界発現量(増殖を阻害するぎりぎりの発現量)が測れる遺伝子つなひき法とタンパク質量により、出芽酵母の特定のプロセスで処理されるタンパク質のうち最も高い限界発現量を持つものを同定し、それを指標タンパク質とすることで、細胞内のプロセス、特にタンパク質合成と輸送プロセスの処理能力を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞がタンパク質生産工場である限り、原理的には、どんなタンパク質でも究極的に大量発現するとプロセスの負荷が生じ、増殖阻害を起こすはずである。一方、これまで過剰発現による増殖阻害のメカニズムは、細胞の処理能力をまったく加味せず議論されてきた。あるタンパク質の過剰が増殖阻害を起こすことが見つかった時、それが処理能力に過負荷をかけていない事が分かって初めて、そのタンパク質に特異的なメカニズムを議論することができる。したがって、本研究の成果は過剰発現の考え方を根底から変える可能性がある。

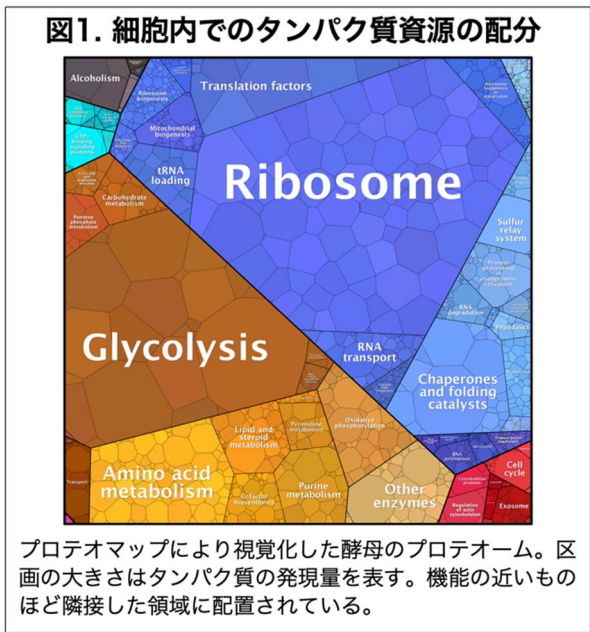
研究成果の概要(英文)：In the process of expressing their functions, proteins undergo various processes such as synthesis, folding, transport, and degradation. These processes are thought to have different processing capacities, depending on the amount of resources devoted to them. However, the processing capacity of intracellular processes has never been investigated before. In this study, we identified the proteins that are processed by specific processes in budding yeast with the highest critical expression levels by using the genetic tug-of-war method, which measures the critical expression level of proteins, and protein quantification. By using these proteins as indicator proteins, the ability to process intracellular processes, especially protein synthesis and transport processes, was clarified.

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 酵母

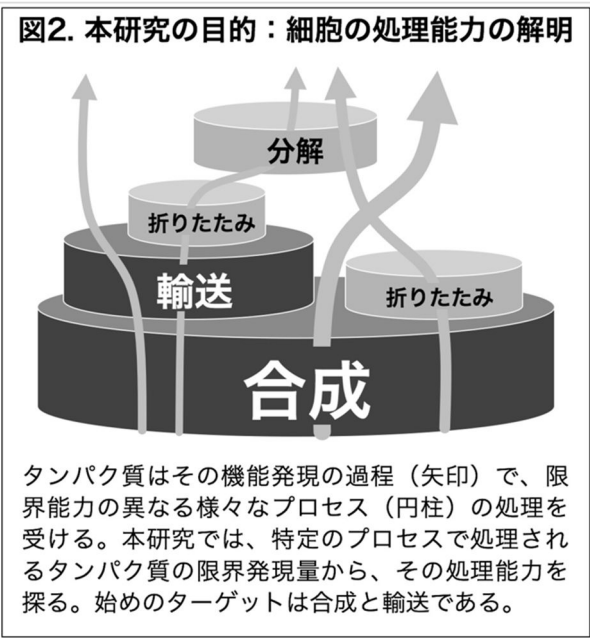
### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内で働く様々なタンパク質の発現量が正確に分かるようになってきた(図1)。この、プロテオーム解析が明らかにしたことの一つに、細胞内でのタンパク質の資源の分配がある。資源の半分以上はタンパク質の合成系に使われており、タンパク質の生産工場としての姿が見えてきた。タンパク質は合成されるだけでなく、折りたたみを受け、輸送され、そして分解される。これらのプロセスは、そこに割かれている資源の量に依存して異なった処理能力を持っていると考えられる。この処理能力は、様々なタンパク質の発現変化 特に過剰発現を、細胞システムがどれくらい受け入れられるかに反映される。処理能力の小さなプロセスを必要とするタンパク質がわずかでも過剰になると、細胞内のタンパク質バランスが大きく乱れ、細胞システムに強い影響を与えるだろう。



### 2. 研究の目的

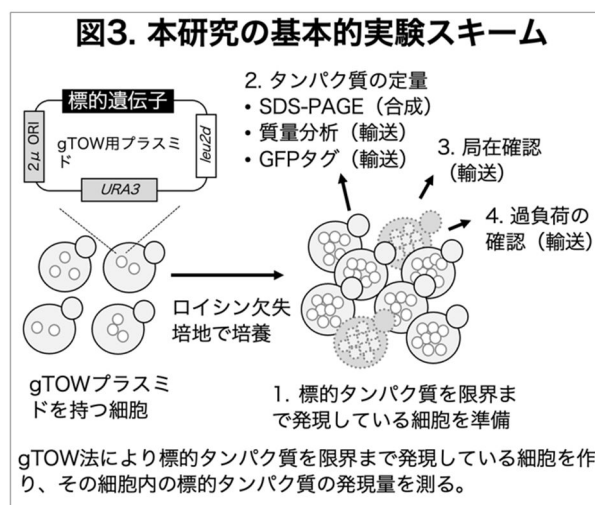
タンパク質処理の各プロセスの能力は、しかし、これまで一度も調べられたことがない。この大きな理由は、これまで細胞の処理能力を評価する実験系がなかったためである。本研究では特定のプロセスで処理されるタンパク質の限界発現量(増殖が阻害されるぎりぎりの発現量)から、そのプロセスの処理能力を明らかにする(図2)。これは、申請者らが開発してきた、タンパク質の発現量の限界を測れる、遺伝子つなひき(gTOW)法を用いることではじめて可能となる。本研究では、細胞の処理能力を知る第一歩として、真核細胞のモデルである出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の、タンパク質合成と輸送の処理能力を明らかにする。



### 3. 研究の方法

合成と輸送の処理能力を推定するために、これらのプロセスで処理されるタンパク質の限界発現量を、gTOW法を用いて測る(図3)。合成の処理能力は、酵母のすべてのタンパク質の中で、最も高い限界発現量を持つものを同定し、これを指標タンパク質とすることにより推定する。輸送の処理能力は、小胞輸送とミトコンドリア輸送により処理されるタンパク質に絞って同様の解析を行う。候補タンパク質として、対象カテゴリーのタンパク質の中で通常の発現量が高いものを上位から調査していく。予備的知見から、合成の処理能力は細胞あたりタンパク質700万分

子以上、輸送の処理能力は同 100 万分子以下と推定される。発現レベルの異なるタンパク質の同定のため、前者は蛍光標識した全タンパク質を電気泳動で分離することで、後者は質量分析で定量する。さらに、タンパク質が正しく輸送されているか、予想される生理応答が起きているかを確認する。



#### 4 . 研究成果

研究成果が発表された論文の内容について解説する。

Eguchi Y, Makanae K, Hasunuma T, Ishibashi Y, Kito K, Moriya H., Estimating the protein burden limit of yeast cells by measuring the expression limits of glycolytic proteins., *Elife*. 2018 Aug 10;7. pii: e34595.

この論文では、特に合成の処理能力を明らかにする目的で、出芽酵母において発現量が最も高いタンパク質群である解糖系タンパク質を選び、その限界発現量を測定した。その結果、解糖系酵素 Gpm1 の限界発現量が、酵母の全タンパク質の 15%程度と最も高いこと、また Gpm1 の限界発現量は酵素活性とは無関係に決まっていることが明らかとなった。また、クラゲの緑色蛍光タンパク質(EGFP)も Gpm1 とほぼ同様の限界発現量を持っていることが分かった。これらの結果は、酵母の合成キャパシティは全タンパク質の 15%程度余剰のタンパク質が発現すると飽和することを意味している。この論文では、さらにミトコンドリアへの局在化やタンパク質にシステインが存在することが限界発現量を下げる要因、すなわち細胞のキャパシティを逼迫させる要因となりうることを明らかにした。

Mori Y, Yoshida Y, Satoh A, Moriya H., Development of an experimental method of systematically estimating protein expression limits in HEK293 cells., *Sci Rep*. 2020 Mar 16;10(1):4798.

この論文では、ヒト培養細胞 (HEK293) において限界発現量を測定できる実験系を開発した。その結果、酵母と同様に EGFP の限界発現量がミトコンドリアや小胞輸送により減少することが確かめられた。

Moriya H., The expression level and cytotoxicity of green fluorescent protein are modulated by an additional N-terminal sequence., *AIMS Biophysics* 2020, 7(2): 121-132

この論文では、EGFP の N 末端に付加することで限界発現量が下がるようなアミノ酸配列を同定した。その結果、システインの付加が限界発現量を下げる可能性を見いだした。

Saeki N, Eguchi Y, Kintaka R, Makanae K, Shichino Y, Iwasaki S, Kanno M, Kimura N, Moriya H., N-terminal deletion of Swi3 created by the deletion of a dubious ORF YJL175W mitigates protein burden effect in *S. cerevisiae*., *Sci Rep*. 2020 Jun 11;10(1):9500.

この論文では、酵母の変異体の探索の結果から、YJL175W 遺伝子座の欠失が、EGFP の限界発現量を上げる、すなわち合成のキャパシティを上げることができることを見いだした。この欠失は、

実際にはクロマチンリモデリング因子 Swi3 の N 末端の欠失を生じさせ、酵母の特定のタンパク質の発現量が低下することで、合成キャパシティに余剰が生まれたことが示唆された。

Kintaka R, Makanae K, Namba S, Kato H, Kito K, Ohnuki S, Ohya Y, Andrews BJ, Boone C, Moriya H., Genetic profiling of protein burden and nuclear export overload., *Elife*. 2020 Nov 04;9:e54080

この論文では、EGFP、及び 3xEGFP, NES (核外輸送シグナル) -3xEGFP が過剰発現した際に、増殖が悪くなる / 良くなる変異株の網羅的探索を行った。その結果、EGFP の過剰はアクチンの変異体の増殖を増悪させる、3xEGFP はプロテアソームの変異株の増殖を増悪させる、NES-3xEGFP の過剰は核外輸送装置の変異体の増殖を増悪させることが分かった。3xEGFP の過剰は、分子量が大きいことのために異常な凝集体を細胞内で構築し、これが細胞内の分解キャパシティ(プロテアソーム)を逼迫させる可能性が明らかとなった。また、核外輸送 (NES) されるタンパク質の過剰は、核外輸送装置のキャパシティを逼迫させていることを確認することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

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 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 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 Kintaka Reiko、Makanae Koji、Namba Shotaro、Kato Hisaaki、Kito Keiji、Ohnuki Shinsuke、Ohya Yoshikazu、Andrews Brenda J、Boone Charles、Moriya Hisao	4. 巻 9
2. 論文標題 Genetic profiling of protein burden and nuclear export overload	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e54080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.54080	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 Ishikawa Koji、Ishihara Akari、Moriya Hisao	4. 巻 16
2. 論文標題 Exploring the Complexity of Protein-Level Dosage Compensation that Fine-Tunes Stoichiometry of Multiprotein Complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009091	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 10
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 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66307-z	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16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 8件)

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)(国際学会)
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(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 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

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 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 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 守屋央朗、佐伯望
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22回オンライン大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤寿明、守屋央朗
2. 発表標題 システインを含むタンパク質の過剰発現は出芽酵母の形態異常をもたらす
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐伯望、守屋央朗
2. 発表標題 多コピー化が高塩ストレス下で適応的にはたらく遺伝子の体系的探索
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難波匠太郎、金高令子、守屋央朗
2. 発表標題 3XGFPの過剰発現が引き起こす増殖阻害現象
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐伯望
2. 発表標題 高塩ストレス下で多コピー化が適応的に機能する出芽酵母遺伝子の体系的探索
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守屋央朗
2. 発表標題 出芽酵母のデノボ遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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/>  
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	紀藤 圭治  (Kito Keiji)  (40345632)	明治大学・農学部・専任准教授    (32682)	

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
---------	---------