

## 学位論文の要旨

## Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	地球生命物質科学専攻
学生番号 Student No.	51424205
氏名 Name	金高 令子

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

Cell growth defects triggered by overloads on protein localization processes  
(タンパク質局在化過程への過負荷によって誘発される細胞増殖阻害)

## 学位論文の要旨 Abstract of Thesis

真核細胞は、核、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞小器官から構成されている。これらの細胞小器官の維持、成長、機能には、それぞれの細胞小器官で働くタンパク質を合成、輸送し、目的の細胞小器官に局在させることが不可欠である。一般的に、局在化されるタンパク質は、分子内に 3～60 アミノ酸程度の「局在化シグナル配列」と呼ばれる輸送・局在化を指示する構造を持つ。シグナル認識分子がこのシグナル配列を認識し、タンパク質を目的地となる細胞小器官に移行させる。細胞小器官は、脂質二重膜とタンパク質からなる境界膜でおおわれているため、局在化されるタンパク質は、複数のトランスロケーター（膜透過装置）やシャペロンを介して細胞小器官の中に移行する。このように、局在化されるタンパク質は、シグナル認識分子、トランスロケーター、シャペロンなどの輸送因子を消費するプロセスを介して、目的の細胞小器官に局在する。一方で、これらの輸送因子は量が限られているので、局在化されるタンパク質の過剰発現は輸送因子を枯渇させ、それによって他の必須タンパク質の輸送を妨げ、細胞増殖に悪影響を与えることが予想される。実際に、ミトコンドリアや小胞体に局在するいくつかのタンパク質について、過剰発現が増殖阻害を引き起こすことが報告されている。しかし、相対的に比較することは難しいため、局在化プロセスの過負荷について、組織的に解析を行う有効な手立てはこれまでなかった。

本研究では、真核細胞のモデルである出芽酵母において、緑色蛍光タンパク質 (GFP) にさまざまな局在化シグナルを付加した局在化 GFP シリーズを作成し、「遺伝子つなひき法」で細胞が死ぬ限界まで過剰発現することで、どの局在化プロセスがどれくらいの負荷で増殖阻害を引き起こすのか、組織的かつ定量的に測定した。具体的には、核外輸送 (NES-GFP)、核内輸送 (NLS-GFP)、ミトコンドリア輸送 (MTS-GFP)、小胞輸送 (SS-GFP)、細胞質膜輸送 (GFP-CC) について、測定を行った。その結果、NES-GFP、SS-GFP、MTS-GFP は、わずかな過剰発現で細胞の増殖を著しく遅延させることが判明した。これらの局在化 GFP の過剰発現が引き起こす細胞増殖への影響は、ミスフォールド変異を GFP に導入した GFPm3 と同等程度であった。ミスフォールド変異は、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因として知られており、GFPm3 の過剰発現は非常に強い細胞増殖阻害を引き起こすことが報告されている。以上の結果から、局在化されるタンパク質の過剰発現は著しい細胞増殖阻害を引き起こすことが示唆された。

次に、局在化GFPを過剰発現させたときの細胞の転写応答をトランスクリプトーム解析で調べた。その結果、SS-GFPでは小胞体ストレスに関連した遺伝子の発現が増加し、MTS-GFPではミトコンドリアがコードする遺伝子の発現が減少していることが示された。このように、付加されたシグナルに対応したプロセスに関連する遺伝子の転写量が変化していた。

さらに、負荷のかかっているプロセスを明らかにするため、それぞれの局在化GFPをSynthetic genetic arrayを用いて遺伝子破壊株と温度感受性変異株コレクションに導入し、局在化GFPと遺伝的に負の相互作用する遺伝子を組織的に検索した。その結果、局在化されるタンパク質の過剰により枯渇する因子の候補の遺伝子が複数取得された。中でも特に重要なものとして、局在化シグナルに関連したトランスポーターの遺伝子が取得された。具体的には、NES-GFPではインポーチンCrm1、NLS-GFPではイクスポーチンKap95、GFP-CCではエキソサイトシスを行うSec8/Sec10/Sec15をコードする遺伝子が取得された。また、これらのトランスポーターの積荷タンパク質をコードする遺伝子も取得された。具体的には、NES-GFPでは核内外のチューブリン動態を制御するStu2、NLS-GFPでは有糸分裂時に核内でモータータンパク質として機能するCik1/Kar3、GFP-CCでは極性成長時に娘細胞に輸送されるロイシン透過酵素Bap2をコードする遺伝子が取得された。これらの結果は、過剰な局在化タンパク質がトランスポーターを独占し、それによって必須タンパク質の輸送が十分にできなくなることで、細胞増殖阻害を引き起こすことを示唆している。特に、細胞分裂のような、特定のタイミングで必要なタンパク質を目的の細胞小器官に局在させなくてはならない状況下では、この影響を受けやすいと考えられる。

これに加えて、タンパク質の蓄積に応答する遺伝子の候補が複数取得された。具体的には、SS-GFPでは小胞体でのタンパク質の停滞が引き起こす小胞体の損傷応答(EOR)に関わる遺伝子が取得された。また、MTS-GFPではミトコンドリアタンパク質が細胞質へ局在することで引き起こされるアンフォールドタンパク質応答(UPRam)に関わる遺伝子が取得された。これらの結果は、局在化タンパク質の過剰は、それが細胞小器官へ蓄積することで機能損傷を引き起こす可能性を示唆している。

最後に、細胞の局在化GFPの過剰発現の限界量を推定した。その結果、GFPは細胞内の総タンパク質の15%の量まで、そしてNES-GFP、SS-GFP、MTS-GFPはそれぞれ1%、0.7%、4%の量までが過剰発現できる限界であることが分かった。これらの限界量は、局在化シグナルをもつタンパク質の過剰発現に対するそれぞれの局在化プロセスの許容能力の大きさを反映しているものと考えられる。

本研究では、細胞に共通するメカニズムであるタンパク質の細胞輸送と局在化について、過剰発現に対する頑健性と脆弱性という新しい視点から解析した。その結果、タンパク質の特定の局在化プロセスへの過負荷が細胞増殖阻害を引き起こすことが見出された。タンパク質の過剰発現によって引き起こされる細胞増殖阻害の原因について解析することは、ダウン症候群やがんなどで余分に増加した染色体から過剰に発現するタンパク質によってもたらされる病態の理解に役立つと考えられる。