

氏名	江口 優一		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	学 術		
学位授与番号	博甲第	5985	号
学位授与の日付	平成31年 3月25日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学 専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Studies on expression limits of proteins and their determinants in the budding yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母におけるタンパク質の限界発現量とその規定要因に関する研究)		
論文審査委員	教授 田村 隆	准教授 守屋 央朗	教授 稲垣 賢二
<b>学位論文内容の要旨</b>			
<p>細胞は、遺伝子、タンパク質、代謝産物などの分子間ネットワークが複雑に組織化したシステムである。細胞システムの取りうる状態の集合（状態空間）が制約されることで、細胞システムから生じる細胞の生理状態はある一定の値に収束する。細胞システムの状態空間が無限である場合、もしくは制約を超え細胞システムが破綻した時、生理状態は発散し、細胞は「死」を迎える。つまり制約なしに生命は生命として存在しえない。すなわち制約こそが生命現象の根底にある重要な原理であると言える。</p> <p>本研究では、細胞システムの状態空間に存在するタンパク質の発現量の制約の理解を目指し、出芽酵母を用いて細胞システムが破綻する（増殖阻害が引き起こされる）寸前までタンパク質を大量発現させることで、(1) タンパク質の限界発現量（増殖阻害が引き起こされる寸前の発現量）の最大値はどの程度に制約されているのか、(2) タンパク質の限界発現量はどんな要因により規定されているのか、(3) 全般的にタンパク質の限界発現量はどの程度に制約されているのか、を明らかにした。</p> <p>(1)では出芽酵母の29種の解糖系タンパク質及び緑色蛍光タンパク質（GFP）を対象に、マルチコピープラスミドと強力なプロモーターにより、それらタンパク質を大量発現させ、SDS-PAGEにより定量を行った。その結果一部のタンパク質では細胞内で発現している総タンパク質の約15%（700万分子）まで発現可能であり、GFPの限界発現量も同等のレベルであった。GFPは細胞の機能とは無関係のタンパク質であることから、GFPの限界発現量は単純に細胞のタンパク質合成能力の限界値によって規定されていると考えられる。このことから、タンパク質の限界発現量の最大値は総タンパク質の15%（700万分子）程度に制約されていることを明らかにした。(2)では解糖系タンパク質の変異体の限界発現量の定量を行い、限界発現量は酵素活性・局在性・コドン最適化度・S-S結合を介した凝集性により規定されることを明らかにした。(3)ではタンパク質の限界発現量を最大増殖速度から体系的に評価できるTOW-Fu（Tug-Of-War within a Fusion protein）という新しい実験系を開発し、TOW-Fu法により出芽酵母の第I染色体にコードされる84種のタンパク質の限界発現量を測定した。その結果、第I染色体にコードされる約8割のタンパク質の限界発現量は細胞内で発現している総タンパク質の約0.6%（28万分子）以下に制約されていることを明らかにした。</p> <p>本研究では、細胞システムの状態空間には、いかなるタンパク質も超えられない発現量の制約が存在し、ほとんどのタンパク質は制約の許す限界まで発現できないことを見出した。またタンパク質の限界発現量は酵素活性・局在性・コドン最適化度・S-S結合を介した凝集性により規定されることを明らかにした。本研究の成果は、細胞の生理状態の予測精度を向上させ、生命現象を根本的に理解するための一助となりえる。</p>			

## 論文審査結果の要旨

本論文は、細胞内で過剰発現した際に細胞増殖を阻害するタンパク質が持つ性質を明らかにし、タンパク質発現量がどのような制約を受けているかを解明することを目的として行われた研究である。

このために、まず出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のアルコール発酵に関わる29種類のタンパク質の限界発現量(どれくらい過剰発現したら細胞増殖を阻害するか)の定量が行われ、Pgk1, Gmp1, Eno1ならびにEno2が全細胞タンパク質の15%以上発現すると増殖阻害を起こすことが見いだされた。これらのタンパク質は、無害なタンパク質の究極的過剰発現が引き起こす「タンパク質負荷」というメカニズムにより増殖阻害を起こすタンパク質群であると考察した。それに加えて、これらのタンパク質よりも低い限界発現量で増殖阻害を起こすタンパク質群について、その原因となるメカニズムの特定が試みられた。その結果、Pfk1とPfk2はその代謝活性により、Adh3はミトコンドリアへの局在により、Tpi1はジスルフィド結合を介した凝集体の形成により限界発現量が低くなっていることが実験的に明らかにされた。これらの結果は、限界発現量をもとにタンパク質過剰による増殖阻害のメカニズムを解明した初めての例といえる。

本論文ではさらに、タンパク質の限界発現量を増殖速度で評価する新しい実験手法TOW-Fuを構築した。ジヒドロ葉酸リダクターゼを利用したTOW-Fuにより、出芽酵母の第一染色体上にコードされたタンパク質の限界発現量の評価が行われ、ほとんどのタンパク質が全タンパク質の0.6%以下で増殖阻害を引き起こすことが示された。これは大半のタンパク質の発現量が強い制約を受けていることを示唆する結果である。

前半の研究内容についてはeLIFE誌にすでに掲載され、後半の内容についても複数の学会発表と学術誌への投稿準備が進んでいることから、博士(学術)の学位に見合う成果であると判断できる。