

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	環境生命科学研究科
専攻 Division	農生命科学専攻
学生番号 Student No.	77427604
氏名 Name	江口 優一

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)

Studies on expression limits of proteins and their determinants in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*
(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)

細胞内では遺伝子・タンパク質・代謝産物などが分子間ネットワークを形成している。それらが複雑に組織化することで、細胞はシステムを形成している。細胞システムは、内在的・外在的な摂動に対して、安定性や堅牢性（ロバストネス）といった、ある一定の生理状態を保つ性質を備えている。この性質は、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。

細胞システムの状態空間の制約は、遺伝子・タンパク質・代謝産物などのネットワーク構造にも存在する他、それら分子自体の量的・質的な性質にも存在する。つまり、細胞システムに存在するすべての分子間ネットワーク及び分子自体にも制約は存在することから、細胞システムの状態空間には非常に多くの制約が存在すると言える。それら制約の中で、出芽酵母において遺伝子の量的な制約については報告されているが、ほとんどの制約は不明である。

そこで本研究では、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。

(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。解糖系タンパク質をモデルタンパク質とした理由として、1) 解糖系タンパク質は出芽酵母のタンパク質の中で最も発現量が高い部類のタンパク質群であり、タンパク質の発現量の最大値を見積もるのに最適であると考えられたため、2) 解糖系タンパク質は知見の集積が集中的に行われてきたタンパク質群であり、タンパク質の機能改変が容易であるため 3) 解糖系タンパク質は酵素タンパク質であり、その限界発現量はタンパク質と代謝双方のネットワークに影響されると予想されたことから、限

界発現量を規定する要因が複雑性を有していると考えられたためである。解糖系タンパク質の限界発現量を測定した結果、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) まで発現可能であった。また 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 の発現量の限界値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と考えられる。

(2) では SDS-PAGE により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。第 I 染色体にコードされるタンパク質を測定した理由として、1) 体系的にタンパク質の限界発現量を調べることで、一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が明らかになると考えられたため、2) ノンバイアスにタンパク質の限界発現量を調べることで、限界発現量を規定する新たな要因が明らかになると考えられたためである。TOW-Fu 法によって出芽酵母の第 I 染色体にコードされるタンパク質の限界発現量を測定した結果、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。

本研究から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一端が明らかとなった。制約を明らかにすることで、細胞システムの状態空間を狭め、その生物をその生物とたらしめている根源的な理由に迫ることができると確信している。また本研究の成果は、細胞シミュレーションなどの数理モデルにおいて、細胞の生理状態の予測精度を向上させる基礎的な情報となりえる。しかしながら、本研究で明らかとなった制約だけでは、細胞をシステムとして捉え、生命現象を理解するには圧倒的に不十分である。例えばタンパク質の発現量の最小値はどの程度に制約されているのか、個々のタンパク質の発現量の変動性には制約が存在するのか、細胞システムの状態空間は外在的な影響（環境変化によるストレスなど）にどれほど制約を受けているのかなど、細胞システムの状態空間に内在・外在する制約に関してほとんどが未知である。また出芽酵母以外の生物の細胞システムの状態空間にも、本研究で明らかとなったタンパク質の発現量の制約は存在するのかなど興味もたれる。