

博士論文

ヒト培養細胞におけるタンパク質発現限界
を体系的に測定する実験方法の開発

森 吉弘

目次

概要紹介	2
【細胞を用いたタンパク質の大量生産】	2
【タンパク質による細胞機能への悪影響】	3
【本研究の目的】	4
概要	5
序論	6
実験方法・材料	7
結果	10
【高効率トランスフェクションによる GFP 限界発現量の測定】	10
【ミトコンドリアと ER への局在化が GFP の限界発現量を減少させる】	15
【P2A-GFP を用いた蛍光を持たないタンパク質の限界発現量の測定】	18
【小胞輸送関連タンパク質の限界発現量の測定】	24
【DHFR-MTX 拮抗作用を利用した高コピー数プラスミドを持つ細胞の濃縮】	24
【HELA 細胞におけるタンパク質局在化の影響】	28
考察	30
【酵母と培養細胞における実験手法の違い】	30
【P2A-GFP を用いた標的タンパク質発現量の測定】	31
【低限界発現量のタンパク質を解析する際のプロモーターの問題】	31
【DHFR-MTX 拮抗作用を利用した測定精度の改善効果】	31
【HEK293 細胞株における GFP の生産量】	32
【HEK293 細胞株におけるタンパク質の局在化による影響】	32
【本実験系における課題】	34
【HELA 細胞を用いた実験系の構築】	35
【多種細胞間の比較解析について】	35
【結論】	35
引用参考文献	36
謝辞	41

概要紹介

【細胞を用いたタンパク質の大量生産】

細胞を用いたタンパク質の大量発現は、構造的な研究や機能的な研究だけでなく、有用酵素やバイオ医薬品の製造などの幅広い分野で重要となっている。従来、タンパク質の大量発現には増殖速度が速いことや、培養が容易であること、適用可能な遺伝子操作の技術が多くあることから大腸菌や酵母が宿主として利用されてきたが、近年では哺乳類細胞を用いたタンパク質生産の需要が高まっている (Fakruddin, 2013; Portolano, 2014)。バイオ医薬品の分野においては、1980年代に最初のバイオ医薬品として、ヒト型インスリンが大腸菌を用いて製造された (Baeshen, 2014)。大腸菌を用いたバイオ医薬品の製造には、いくつかの問題点もあった (Rosano, 2014; Gopal, 2013)。例えば、目的のタンパク質がグリコシル化や翻訳後の化学修飾などのプロセッシングを必要とする場合が多いことである。そのため、大腸菌を用いたバイオ医薬品の製造は、翻訳後修飾をする *in vitro* プロセスを必要とし、製造コストがかかることや、最終的な収量が減少する問題がある。そこで、*in vitro* での化学修飾の代わりとして、酵母や昆虫、植物などを宿主として用いるようになった (Daly, 2005; Karbalaei, 2020)。バイオ医薬品の製造に酵母を用いることは、グリコシル化やジスルフィド結合の形成などの翻訳後修飾を行なうだけでなく、多くのヒトタンパク質を生産し、適切に折りたたむことができるなど、多くの利点がある。一方で、哺乳類細胞と異なる糖鎖付加を行うこともある (Borys, 2010)。

近年では、バイオ医薬品の約 40% がチャイニーズハムスター卵 (CHO) 細胞を用いて製造されている。バイオ医薬品の製造において、CHO 細胞を用いることは 1) ヒトと類似したグリコシル化ができること、2) タンパク質の大量性サイレンが可能であること、3) 無血清培地で培養ができ、スケールアップが可能であること、4) 多くのヒトウイルスに抵抗を持つこと、5) バイオ医薬品の製造に関する多くの実績を確立していることなどの利点がある (Chin, 2019)。一方で、CHO 細胞を用いた場合、免疫原性を示す危険が高い N-グリコリルノイラミン酸やガラクトース- α -1,3-ガラクトースグループを糖タンパク質に発生させるといった報告もされている (Ghaderi, 2010; Padler-Karavan, 2008)。そのため、いくつかの製薬企業では、HKE293 細胞を用いて、より安全性が高いバイオ医薬品の大量生産が試みられている (Chin, 2019)。

【タンパク質による細胞機能への悪影響】

タンパク質の大量発現は、時として細胞機能にとって有害となる。理論上、極限まで大量生産したタンパク質は、他のタンパク質を合成するために必要なエネルギーや栄養、リボソーム、シャペロンなどの細胞リソースを枯渇させて細胞増殖に悪影響を与える (Kafri, 2016; Eguchi, 2018)。一方で、タンパク質が細胞機能にとって毒性を持つ場合、細胞リソースを枯渇させる前にタンパク質の毒性によって細胞機能に害がおよぼされる。タンパク質の大量生産による害は、タンパク質の生産を妨げる要因となりえる。例えば、大腸菌の内膜タンパクは細胞機能に高い毒性を示すものが多く、これらのタンパク質の大量生産は、細胞増殖を抑制することが知られている (Wagner, 2007)。そのため、内膜タンパク質は少量しか生産できず、構造的な研究や機能的な研究のボトルネックとなっている。タンパク質の大量発現による害は他にも、神経変性疾患やがんなどの病態にも関連が深い。例えば、変性タンパク質や誤って折りたたまれた構造異常のタンパク質が小胞体 (ER) へ過剰に蓄積すると、ER ストレスが生じ、細胞はやがて死に至る (Lee, 2019; Kaufman, 1999)。ER ストレスは、神経細胞をはじめとする多様な細胞で生じ、代謝障害、免疫症候群、神経変性疾患など様々な疾患と関連する (Gerakis, 2018; Zelinski, 2001)。どのようなタンパク質が、どのようなメカニズムで細胞へ害を与えるかを理解することは、タンパク質の大量生産時のボトルネックの解消や、神経変性疾患やがん等の治療法や新規バイオマーカーの開発へ繋がることを期待できる。

タンパク質の発現系が整備されている大腸菌や酵母では、大量発現が細胞機能に害をなすタンパク質の体系的な取得と解明が試みられている。大腸菌においては、無害なタンパク質を 30% まで発現したところ、細胞周期が停止することが報告されている (Dong, 1997)。酵母においては、タンパク質の大量生産が細胞機能に害を与えるぎりぎりの発現量 (限界発現量) を体系的に評価できる実験系が開発され、酵母の全タンパク質の限界発現量が測定された (Moriya, 2006; Makanae, 2013)。この実験系を用いた研究により、タンパク質の大量発現が有害となるメカニズムの理解が進んだ。例えば、緑色蛍光タンパク質

(GFP) は、様々なタンパク質の中でも最も限界発現量が高い無害なタンパク質であること、GFP をミトコンドリアや小胞体に局在化させようとする、それだけで毒性が生じること、この原因が輸送に必要な細胞内のリソースを枯渇させることによること、などが明らかとなっている (Kintaka, 2016)。さらに、

酵母細胞では輸送関連タンパク質の限界発現量が特に低く、輸送システムがタンパク質の過剰に脆弱であることも示唆されている (Moriya,2006; Makanae, 2013; Moriya, 2015)。

【本研究の目的】

真核生物のモデルである出芽酵母において、タンパク質の大量発現が有毒とするメカニズムの理解は進んだ。一方、酵母はヒトの細胞とは異なる点も多く、上記の研究で得られた知見がヒトの細胞でも適用可能であるとは言い切れない。また、ヒト細胞においてタンパク質の限界発現量について調査している研究はほとんどされていない。そこで本研究では、ヒト培養細胞においても限界発現量を測定できる新規実験系を開発し、これを用いて酵母で得られている知見を検証することを目指した。

概要

タンパク質の大量生産は時として細胞機能に悪影響を与えるが、その根本的なメカニズムは未だに未知である。細胞機能へ害を与えるタンパク質の発現限界は、このメカニズムの有用な指標である。本研究では、標的タンパク質を強力な CMV プロモーターで発現するプラスミドを多コピー同時に細胞へ導入した後、生存した細胞のタンパク質発現量を測定することでヒト培養細胞における標的タンパク質の発現限界を測定する実験系を開発した。蛍光を持たない標的タンパク質の限界発現量は、自己開裂配列 P2A 配列に付加した GFP の蛍光量から間接的に測定した。GFP の限界発現量は総タンパク質量の約 5% 程であり、持続的な GFP の過剰発現は細胞死を引き起こした。また、ミトコンドリア局在化 GFP および小胞体局在化 GFP の限界発現量はそれぞれ総タンパク質量の 1.6% と 0.38% であった。4 つの輸送関連タンパク質の限界発現量は、RFP の限界発現量と比較して非常に低かった。開発されたタンパク質の限界発現量を測定する実験系は毒性タンパク質およびタンパク質の過剰発現の結果を定義するのに有用である。

序論

タンパク質は時として細胞機能に害を与える (Vavouri, 2009; Prelich, 2012)。これらの害が生じる根本的なメカニズムはまだ未知だが、細胞機能への害を引き起こすタンパク質の限界発現量を用いて推定することは可能である (Moriya, 2015; Keren, 2016)。例えば、限界発現量が最も高いタンパク質は無害と考えられ、このタンパク質を極限まで発現させるとタンパク質合成のオーバーロードを引き起こす (Kafri, 2016; Eguchi, 2018)。輸送タンパク質の過剰発現は、タンパク質輸送のリソースに過負荷を与えるため細胞質タンパク質よりも限界発現量は低くなる (Egubhi, 2018; Kintaka, 2016)。

酵母を用いた先行研究では、酵母の標的タンパク質の発現限界を体系的に推定する遺伝子綱引き法 (gTOW 法) が開発されている (Moriya, 2006; Moriya, 2011; Moriya, 2012)。この実験法で得られた限界発現量は、タンパク質の大量生産により引き起こされる害のメカニズムを分類するのに有用であった (Moriya, 2015; Makanae, 2013)。本研究では、ヒト培養細胞において 1) 目的の蛋白遺伝子 (cDNA) を強力な CMV プロモーターから発現させるプラスミドを、2) 高効率のトランスフェクションにより多コピー同時に細胞へ導入し、3) 生存した細胞の目的タンパク質発現量から限界発現量を測定する実験系 を開発した。

モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (GFP) とその誘導体の発現限界を比較した。また、蛍光を持たないタンパク質の限界発現量を、自己開裂配列 P2A を用いて GFP 蛍光量で間接的に評価した。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) とその阻害剤 (MTX) の拮抗作用を利用して、標的タンパク質の発現量が多い細胞を濃縮し、限界発現量の測定精度がわずかに改善した。

実験方法・材料

【細胞培養】

HEK293 細胞及び HeLa 細胞は研究室で所持していたものを使用した。これらの細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Welgene) に 10 % 牛胎児血清 (GBS; Gibco)を加えて培養を行った。次に、トランスフェクションの前日、細胞を 6 well カルチャープレートに翌日コンフルエントになるように播き、1 well あたり 1.5 mL になるように培地を追加した。その後、CO₂ インキュベータで一晩培養を行った。500 µL DMEM 中でプラスミド DNA と PEI max (1mg / mL)を重量比率 1:3 で混合し、室温で 20 min インキュベートした。その後、混合液を各 Well に滴下し、再度細胞を CO₂ インキュベータで培養した。

【プラスミド】

本研究で使用したプラスミドリストを表 1 に示す。これらのプラスミドは酵母に中の相同組み換え活性を利用して構築された。CMV-pro, moxGFP, SV40 polyA シグナルは moxGFP プラスミドに含まれていた(plasmid #68070; Addgene, Watertown, MA, USA)。

【フローサイトメトリー】

トランスフェクション効率、GFP 発現レベル、および死細胞の数は、Cell Lab Quanta フローサイトメーター (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を使用したフローサイトメトリーにより測定した。HEK293 細胞を 2300 g で 2 分間遠心分離し、500µL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、14249-95) に再懸濁した。サンプルごとに最大 20,000 の細胞が分析された。GFP 蛍光は FL1 チャンネルを使用して検出した。

【顕微鏡観察】

図1の細胞画像では、培養細胞をオリンパスの20倍対物レンズ顕微鏡（オリンパス、日本）で直接観察した。GFPフィルターキューブを使用して、蛍光画像を観察した。図2および3で使用されている細胞の画像は、DMI6000 B顕微鏡およびLeica Application suite X（Leica Microsystems、Wetzlar、ドイツ）を使用して取得した。GFPおよびRFPフィルターキューブによって取得された各細胞のGFPおよびRFP蛍光強度は、CellProfilerソフトウェアパイプライン（<http://cellprofiler.org>）を使用して算出した。

【DHFR-発現 HEKS93 細胞株の MTX 処理】

HEK293細胞にDHFRが組み込まれたプラスミドをトランスフェクトし、CO₂インキュベーターで24時間培養した。培地を除去し、細胞を1 mLのPBSで洗浄し、培地とMTX（139-13571）をwellに加えた。細胞を再びCO₂インキュベーターで48時間培養した。最後に、フローサイトメトリーとウェスタンブロットティングを使用して細胞を分析した。

【タンパク質の解析】

4x NuPAGE LDS サンプルバッファー（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を使用して、遠心分離されたHEK293細胞から総タンパク質を抽出した。総タンパク質を視覚化するために、抽出されたタンパク質をメーカーのマニュアルに従ってEzlabel FluoroNeo 蛍光色素（ATTO Technology、Amherst、NY、USA）で標識し、NuPAGE 4%-12%Bis-Tris Gel（Thermo Fisher 科学）でタンパク質を分離した。タンパク質はLAS-4000 イメージアナライザー（GE Healthcare、Chicago、IL、USA）を使用してSYBR 緑色蛍光検出モードで検出し、ImageQuant TL ソフトウェア（GE Healthcare）を使用して強度を測定した。

ウェスタンブロット法でGFPを検出するに、抗GFP抗体（11814460001; Roche Holding AG、Switzerland）、ペルオキシダーゼ結合二次抗体（414151F; Nichirei Biosciences、Tokyo、Japan）、および化学発光試薬（34095; Thermo Fisher Scientific）を用いた。化学発光検出モードでLAS4000を使用して化学発光画像を取得し、ImageQuant TL ソフトウェア（GE Healthcare）を使用して強度を測定した。

【統計解析】

FlowJo ソフトウェアバージョン 8.8.7 (FlowJo, Ashland, OR, USA) を使用してデータを分析した。GFP ポジティブ細胞の GFP 蛍光強度の平均と SD は 3 回実験を行い、そのデータをもとに算出した。統計的検定には、両側スチューデントの t 検定を用いた。

結果

【高効率トランスフェクションによる GFP 限界発現量の測定】

タンパク質の限界発現量を体系的に測定する実験系を開発するために、蛍光量で発現量を容易に評価できる標的タンパク質として GFP を用いた。本研究では、迅速にフォールディングされ、小胞体 (ER) でミスフォールドしない moxGFP を使用した (Constantini, 2015)。酵母細胞では、GFP は無害なタンパク質であると考えられており (Shen, 2017; Shemiakina, 2012; Strack, 2008)、限界発現量は総タンパク質量の約 15%であった。これは、酵母細胞において最も高い発現量である (Eghuchi, 2018; Kintaka, 2016)。そのため、GFP の限界発現量を測定できる実験条件を確立できれば、GFP よりも限界発現量が低いタンパク質にも適用が可能となる。

図 1-A に実験系の概要図を示す。トランスフェクションにより多様なプラスミドコピー数を持つ細胞集団が形成され、その結果、標的タンパク質の発現量が多様な細胞集団が形成される。トランスフェクション効率が十分に高ければ、トランスフェクションされた細胞集団は、標的タンパク質の限界発現量に近い、あるいは限界発現量を超えた発現量の細胞が含まれる。標的タンパク質を限界発現量を超えて発現している細胞は、細胞増殖が抑制されるため、細胞集団から除外されると考えられる。したがって、トランスフェクションから一定期間生存した細胞集団で最も高い蛍光量を示す細胞から限界発現量が測定できると考えられる。本研究では、最初にトランスフェクション試薬 Polyethyleneimine (PEI)-max を用いたトランスフェクションの効率が非常に高い HEK293 細胞を用いて実験を行った。標的タンパク質を発現させるために、培養細胞において強力なプロモーターとして広く認識されている CMV プロモーター (CMV-pro) を利用した (Kronman, 1992; Liu, 1997)。本研究で用いたプラスミド pTOW-CMV-pro の基本的な構造を図 1-B に示す。

トランスフェクションに用いるプラスミド DNA の量および解析を行うタイミングの最適化を行った。より高い GFP 蛍光量を示す細胞の割合は、トランスフェクションに用いる DNA 量の増加に伴って上昇した (図 1-C)。5 µg 以上のプラスミド DNA を使用しても最も高い蛍光量は変化しなかった (図 1-D)。トランスフェクション効率 (解析に用いた細胞 20000 個に対する GFP ポジティブ細胞の割合) も使用するプラスミド DNA 量の増加に伴って上昇した (図 1-E)。しかし、6 µg 以上使用しても殆ど変化しなかった (1-D)。したがっ

て、DNA が 5 μg を超えると十分なプラスミド量が細胞へ導入され、GFP の限界発現量が得られたと考えられる。細胞の GFP 蛍光量はトランスフェクションから 18 h 後に最高値に達した後、蛍光量は維持された (図 1-F)。以上の結果から、本研究では 1) トランスフェクションに 6 μg の DNA を用い、2) トランスフェクションから 24 h 後の細胞を解析することとした。

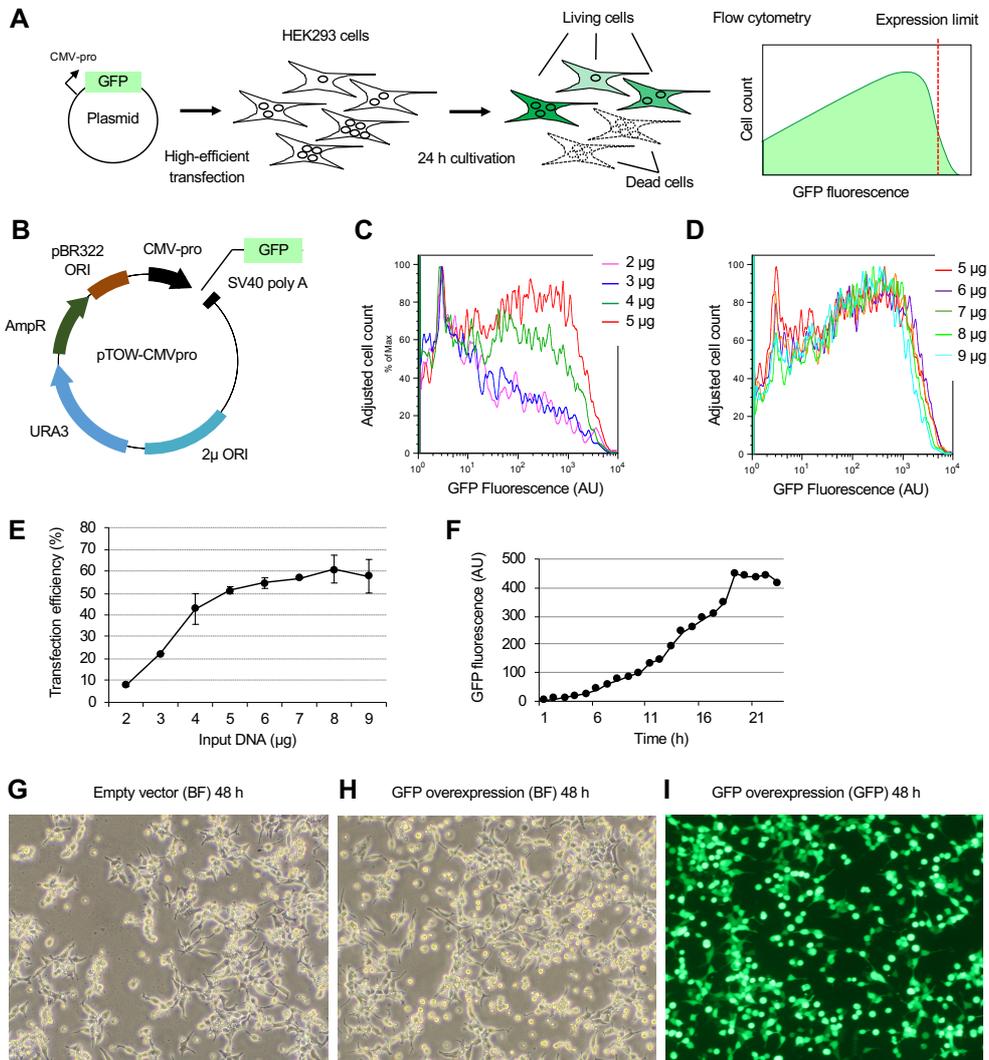


図 1 哺乳類細胞におけるトランスフェクション条件の最適化

図 1-A 実験系の概要

HEK239 細胞を高効率トランスフェクションにより GFP 発現プラスミドでトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 24 h 後に生存した細胞をフローサイトメトリーで解析した。プロモーターの強さやトランスフェクション効率が十分に高ければ、トランスフェクションされた細胞の GFP 発現量は限界発現量に達すると考えられる。

図 1-B 本研究で用いたプラスミドの基本構造

一過性のトランスフェクションを行うために、プラスミドは培養細胞の複製起点を持たない。出芽酵母 *S.cerevisiae* を用いた相同組み換えを用いたプラスミド構築を行うために、URA3 と 2 μ ORI が組み込まれている。大腸菌 *E.coli* でプラスミドを選択および増殖させるために、AmpR と pBR322ORI も組み込んでい。これらの要素は、培養細胞では特に機能を持たない。標的遺伝子 (ここでは GFP) は CMV プロモーターで発現される。

図 1-C, D トランスフェクション細胞の GFP 発現量と DNA 量の関係

トランスフェクションから 24 h 後の細胞集団の GFP 蛍光強度 (AU) をフローサイトメトリーで解析した。トランスフェクションで使用したプラスミド DNA の量を右上に示した。

図 1-E トランスフェクション効率とプラスミド DNA 量の関係

トランスフェクション効率を図 1-C, D に示したヒストグラムから、解析に用いた 20,000 細胞にたいする GFP ポジティブ細胞数の比率で算出した。平均値と SD (エラーバー) を示した。

図 1-F トランスフェクション細胞の GFP 発現量の経時変化

6 μ g プラスミド DNA でトランスフェクションを行い、1 h おきに GFP 蛍光をフローサイトメトリーで解析した。細胞集団の GFP 蛍光強度の平均値を示した。

図 1-G, H, I 空ベクターおよび GFP 発現プラスミドでトランスフェクションした細胞の顕微鏡写真

空ベクターでトランスフェクションした細胞株の顕微鏡写真 (pTOW-CMV-pro, G)と GFP 発現プラスミドでトランスフェクションした細胞株の顕微鏡写真 (pTOW-CMV-pro-GFP, H と I)を示す。BF と GFP は明視野と GFP 蛍光を示している。細胞は 20 倍の対物レンズで観察している。

【ミトコンドリアと ER への局在化が GFP の限界発現量を減少させる】

酵母を用いた実験では、GFP へ局在化シグナルを付加した結果、GFP の限界発現量が減少することが報告されている (Kintaka, 2016)。この結果は、局在化の過負荷によるものであると考えられる。本研究では、HEK293 細胞においても局在化が GFP の発現量を減少させるかを調査した。この目的のために、ミトコンドリア標的シグナルを N 末端に付加してミトコンドリア局在化 GFP (MTS-GFP)、ER 局在化シグナルを N 末端に、ER 保留シグナルを C 末端に付加して ER 局在化 GFP (ER-GFP) を構築した (図 2-A)。MTS-GFP、ER-GFP を組み込んだプラスミドでトランスフェクションした細胞株は、GFP を組み込んだプラスミドでトランスフェクションした細胞株と比較して最大 GFP 蛍光量が減少していることが明らかとなった。GFP 蛍光強度の平均は、GFP、MTS-GFP、ER-GFP の順番で高かった (図 2-B, C, D)

蛍光標識した全タンパク質を SDS-PAGE で分離した際、発現した GFP は可視バンドとして検出された (図 2-E、赤矢印)。バンドの蛍光強度から、GFP 発現量を算出したところ、総タンパク質量の約 4.95% であった。GFP 抗体でウェスタンブロットを行ったところ、GFP および MTS-GFP、ER-GFP のバンドが検出された。バンドの蛍光強度から、MTS-GFP と ER-GFP の発現量はそれぞれ GFP の発現量の 32%、7.6% であった。したがって、それぞれの発現量は、全タンパク質の 1.58% と 0.38% であると推定できる (図 2-F, G)。ウェスタンブロットで MTS-GFP に MTS-GFP 前駆体のバンドが確認できた (図 2-F)。これは、本研究で MTS-GFP の発現量が確かにミトコンドリア輸送経路の限界を超えたことを示唆している。酵母細胞で観察された結果と同様に、GFP のミトコンドリアと ER への局在化は発現限界を減少させた。

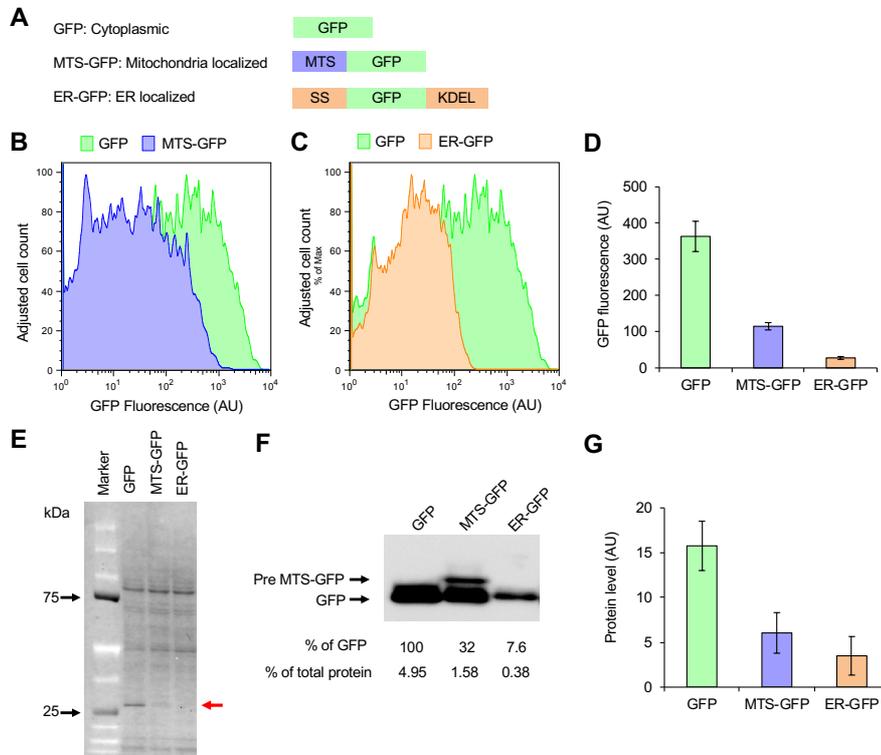


図 2 局在化シグナルの付加が GFP 限界発現量を減少させる。

図 2-A 実験に用いた遺伝子

ヒト由ミトコンドリアタンパク質 Cox8 の MTS、Trypanosoma brucei EP protein 由来 SS 配列、ER 保留シグナル KDEL 配列を GFP に付加した。

図 2-B, C GFP と各局在化 GFP の GFP 発現量の比較

トランスフェクションした細胞の GFP 発現量をフローサイトメトリーで解析した。解析の結果得られた GFP 発現細胞株のヒストグラムと MTS-GFP、ER-GFP 発現細胞株のヒストグラムの比較を示した。

図 2-D 各細胞株の GFP 発現量の比較

図 2-B,C で示したヒストグラムから算出した GFP 蛍光強度の平均値および SD を示した。

図 2-E SDS-PAGE によるタンパク質発現量の確認

各トランスフェクション細胞から抽出した総タンパク質を SDS-PAGE で分離した。赤矢印は GFP のバンドサイズを示している。

図 2-F, G ウェスタンブロットによる GFP 発現量の確認

GFP 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した各細胞株の GFP バンドを示した。MTS-GFP 前駆体のサイズに対応するバンドが確認された。これを Pre-MTS-GFP として示す。図 2-F で検出された GFP バンドの蛍光強度を、図 2-E で得たバンドの蛍光強度で補正し、GFP 発現量を算出した。その結果を図 2-G に示す。

【P2A-GFP を用いた蛍光を持たないタンパク質の限界発現量の測定】

ウイルス由来の P2A 配列は翻訳時にタンパク質の開裂を引き起こす (Matsuda, 2019; Kim, 2011; Liu, 2017)。開裂したタンパク質は同じリボソームで翻訳されているため、同じ分子数で合成される。そのため、P2A 配列の C 末端に GFP を付加することで、N 末端に付加した標的タンパク質の発現量を、GFP の発現量から間接的に測定することができる。N 末端に付加した標的タンパク質の発現量を P2A-GFP で測定ができるかを確認するために、まずは赤色蛍光タンパク質 (RFP) mCherry の限界発現量を P2A-GFP を用いて測定した (図 3-A)。トランスフェクションした細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP 蛍光と RFP 蛍光には高い相関があることが明らかとなった (図 3-B, C)。ウェスタンブロットを行った結果、非開裂タンパク質のバンドが確認できなかったため、この高い相関は非開裂タンパク質によるものではないことが確認できた (図 3-D, E)。これらの結果から、P2A-GFP の N 末端に付加した標的タンパク質の限界発現量を、GFP 蛍光量で測定できることが確認できた。非開裂 P2A 変異体 (P2A*) を用いた場合、僅かではあるが有意に GFP 発現が減少していた (図 16, $P=0.04$)。これは、融合タンパク質の発現と比較して、開裂タンパク質は発現システムに与える摂動が少ないことを示唆している。

次に、蛍光を持たない標的タンパク質として分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) とヒト型アルブミン (HSA) の限界発現量を測定した (図 4-A, B, C)。SEAP プラスミドおよび HSA プラスミドでトランスフェクションした細胞株の GFP 蛍光は、RFP プラスミドでトランスフェクションした細胞株の GFP 蛍光の 54% および 5% であった。各細胞株を蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP の発現は細胞質全体に確認でき、輸送経路への局在は確認できなかった (図 4-D)。そのため、各細胞株の GFP 蛍光の減少は GFP の局在化による影響でないと考えられる。この結果は、結合したタンパク質の局在化を P2A が効率的に分離するという報告と一致している (Kim, 2011)。そのため、C 末端の GFP は、オルガネラへ局在化する N 末端の標的タンパク質がどれだけ生産されたかの指標となる。これらの結果は、SEAP および HAS の限界発現量が RFP と比較して低いこと、HSA の限界発現量は SEAP のたった 10% ほどであることを示唆している。

SEAP の発現限界が輸送によって制限されているのかを調べるために、SEAP の局在化シグナルを欠損させた SEAP Δ SS を P2A-GFP へ付加し、限界発現量を

測定した (図 4-A)。SEAP Δ SS プラスミドでトランスフェクションした細胞株の GFP 蛍光は、SEAP プラスミドでトランスフェクションした細胞株と比較して有意に増加した (図 4-E, F)。この結果から、タンパク質の局在化がタンパク質の発現限界を減少させることについて、さらなる確証を得た。

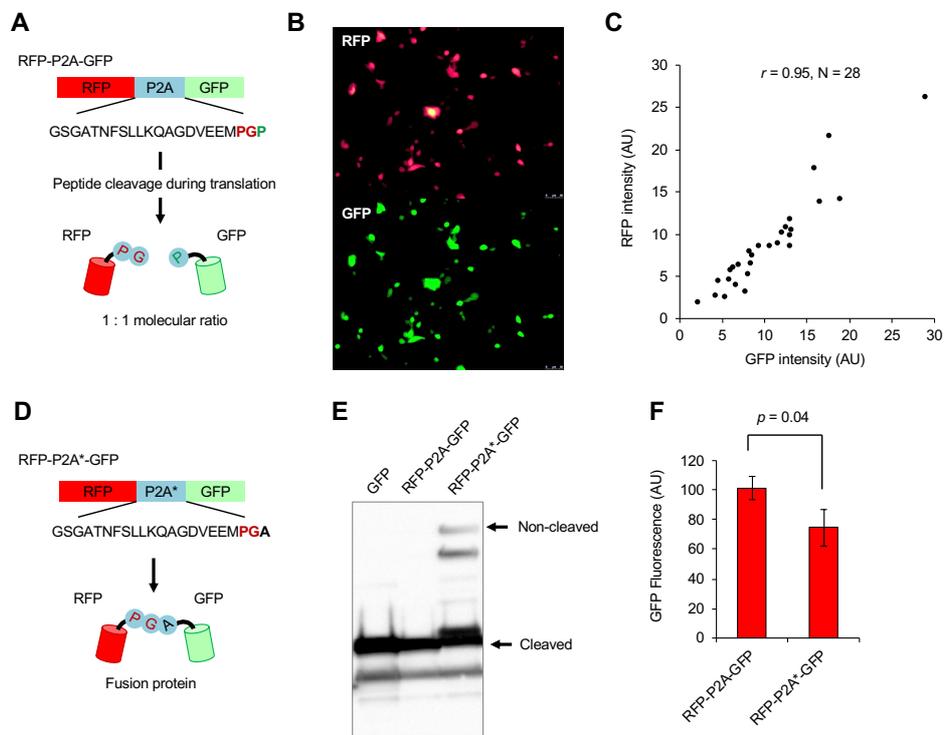


図 3 N 末端の標的タンパク質の原価発現量を測定するための P2A-GFP の利用

図 3-A P2A 配列を用いた実験系の概要

P2A 配列を用いて等量発現が可能となる。そのため、N 末端の標的タンパク質 (ここでは RFP) の発現量を P2A 配列の C 末端につけた GFP の発現量で間接的に測定が可能である。

図 3-B トランスフェクションした HEK293 細胞株の蛍光顕微鏡観察

RFP と GFP の蛍光イメージを蛍光顕微鏡で撮影した。

図 3-C RFP 蛍光強度と GFP 蛍光強度の比較

図 3-B で撮影した画像をもとに、画像処理ソフト Cell Profiler で RFP と GFP の蛍光強度を算出し、両者の相関関係を調べた。

図 3-D P2A 変異体のコンストラクト

開裂せずに融合タンパク質が生産される P2A 配列変異体 (RFP-P2A*-GFP) を作成した。

図 3-E ウェスタンブロットによる開裂の確認

GFP、RFP-P2A-GFP, RFP-P2A*-GFP 発現細胞株から抽出した GFP を、ウェスタンブロットで検出した。GFP と非開裂 RFP-P2A-GFP の分子量を矢印で示し、それぞれ Cleaved と Noncleaved と表記した。

図 3-F RFP-P2A-GFP および RFP-P2A*-GFP の発現量の比較

RFP-P2A-GFP および RFP-P2A*-GFP 発現細胞株をフローサイトメトリーで解析した。その後、GFP 蛍光の平均を算出した。

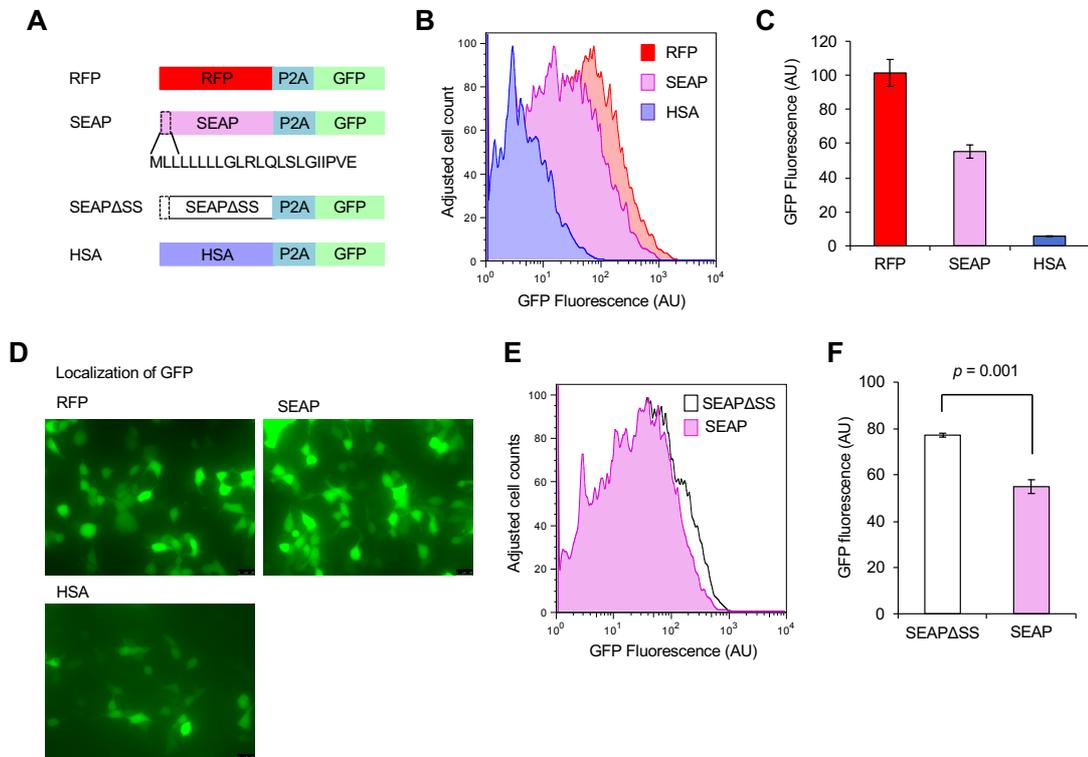


図 4 分泌タンパク質 SEAP と HSA の限界発現量の測定

図 4-A 実験に用いた遺伝子

実験に用いた遺伝子の配列を示した。また、SEAP のシグナル配列部分のアミノ酸配列を示した。SEAP Δ SS は SEAP からシグナル配列を欠損したことを示している。

図 4-B SEAP および HSA 発現細胞株のヒストグラムの比較

SEAP および HSA プラスミドでトランスフェクションした細胞のタンパク質発現量をフローサイトメトリーで解析して得られたヒストグラムを比較した。

図 4-C GFP 蛍光強度の比較

SEAP および HSA 発現細胞株の蛍光強度の平均値を比較した。

図 4-D SEAP および HSA 発現細胞株の蛍光観察

SEAP および HSA 発現細胞株の蛍光イメージを示す。細胞ごとに GFP 蛍光の明るさが異なるため、コントラストを強調している。

図 4-E, F SEAP と SEAP Δ SS 発現細胞株の発現量の比較

SEAP と SEAP Δ SS 発現細胞株をフローサイトメトリーで解析して得られたヒストグラムの比較図と、GFP 蛍光強度の平均値を示す。

【小胞輸送関連タンパク質の限界発現量の測定】

酵母において Sec24、Sec31、Arf1 および Arf2 のような小胞輸送関連タンパク質は過剰発現をした際、非常に高い特性を示すことが報告されている (Makanae, 2013)。これらの遺伝子のヒトホモログタンパク質 (Sec24、Sec31、Rab1、Rab5) も毒性を示すかを確認するために、これらのホモログタンパク質の限界発現量を P2A-GFP を用いて測定した (図 5-A)。Sec24、Sec31、Rab1、Rab5 プラスミドでトランスフェクションした細胞株の GFP 蛍光は、RFP または SEAP プラスミドでトランスフェクションした細胞株の GFP 蛍光の 1/10 以下であった (図 5-B, C)。さらに、Sec24、Sec31 プラスミドでトランスフェクションした際、GFP ポジティブ細胞の生存数は、RFP プラスミドでトランスフェクションした際の 10% 以下であった (図 5-D)。これらの結果は、実験に用いた 4 つの輸送関連タンパク質の限界発現量は非常に低く、かつ過剰発現は高い毒性を示すことが示唆された。この結果は、酵母で得た知見とも一致している。

【DHFR-MTX 拮抗作用を利用した高コピー数プラスミドを持つ細胞の濃縮】

これまでは高効率トランスフェクションでタンパク質の限界発現量を測定してきた。しかし、これらの細胞集団は、限界発現量に達しない低コピー数でトランスフェクションされた細胞も含まれている。したがって、これまでに解析した GFP 発現量の平均は、実際のタンパク質の原価発現量よりも低い (図 6-A 左)。

そこで、DHFR-MTX 拮抗作用を利用して ((Lucas, 1996)、実際の限界発現量により近いタンパク質発現量の細胞を濃縮する試みを行った。この実験のために、EF1 α プロモーターとマウス由来 Dhfr 遺伝子を pTOW-CMV-pro-D に挿入した。このプラスミドの構造を図 6-B に示した。低コピープラスミドでトランスフェクションされた細胞は MTX の添加により、選択的に除外される。その結果、生存細胞の GFP 発現量の平均はより実際の限界発現量に近づく (図 6-A 右)。予備実験の結果では、HEK293 細胞株は 200 μ M MTX での処理によって、24 h 後ほとんどの細胞の増殖が阻害されていた (No data)。そのため、次の実験でも 200 μ M MTX を使用した。

図 6-C, D, E に示すように、DHFR-GFP プラスミドでトランスフェクションした細胞株は 200M MTX 処理で、GFP 発現量が低い細胞集団がわずかに減少した。その結果、GFP 蛍光量の平均値とウェスタンブロットにより算出する GFP 発現量がわずかに改善した。前者は統計的に有意な改善であった ($P=0.006$)。これらの結果は DHFR-MTX 拮抗作用はタンパク質の限界発現量の測定精度を高めるために、利用できる可能性があることが示唆される。

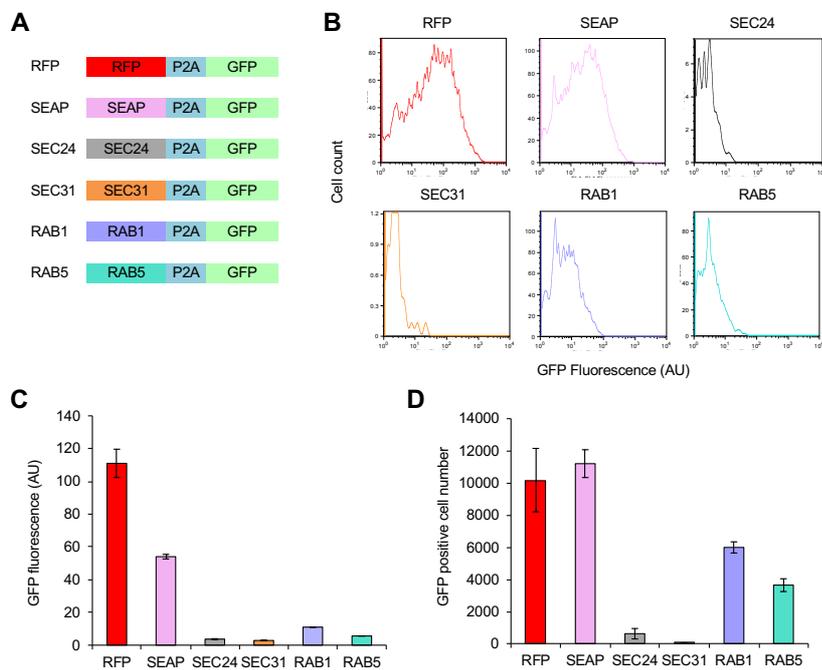


図 5 小胞輸送関連タンパク質の限界発現量の測定

図 5-A 実験に用いた標的遺伝子

本実験に用いた標的遺伝子を示す。

図 5-B フルーサイトメトリー解析で得られたヒストグラム

Sec24、Sec31、Rab1、Rab5 でそれぞれトランスフェクションした細胞株のフローサイトメトリーで得られたヒストグラムを示す。

図 5-C GFP 蛍光強度の比較

Sec24、Sec31、Rab1、Rab5 でそれぞれトランスフェクションした細胞株のフローサイトメトリーで解析し、各細胞株の GFP 蛍光強度の平均値を算出した。

図 5-D 各細胞株の GFP ポジティブ細胞の比較

Sec24、Sec31、Rab1、Rab5 でそれぞれトランスフェクションした細胞集団に含まれる GFP ポジティブ細胞の数を示す。

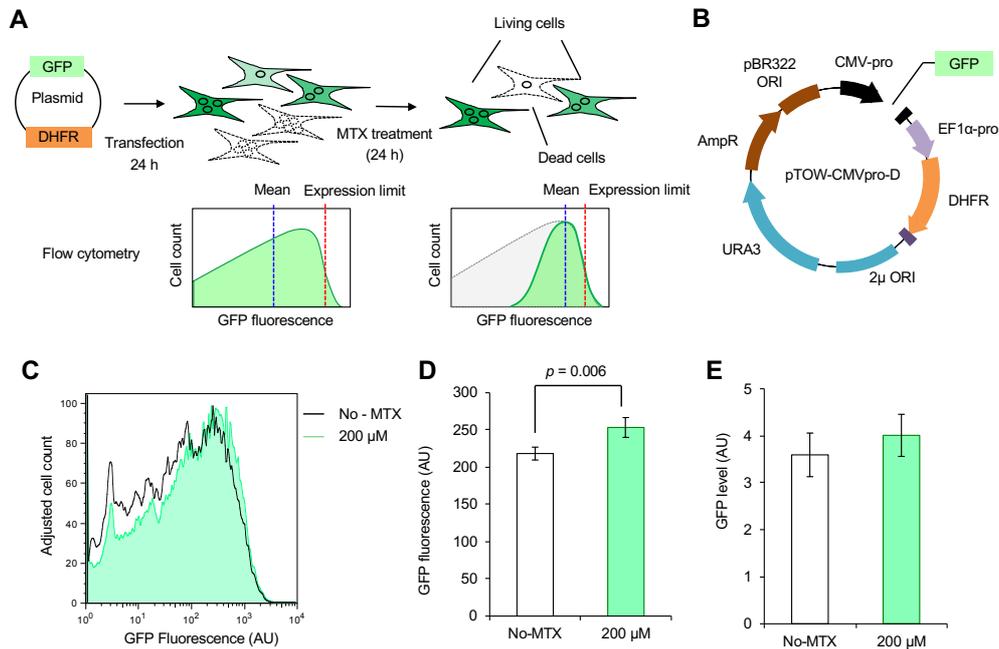


図 6 DHFR-MTX 拮抗作用を利用した高コピー数プラスミドを持つ細胞の濃縮

図 6-A,B 実験系の概要

実験の概要を図 6-A に図示した。図 6-B で示すプラスミドで細胞をトランスフェクションし、24 h 後に MTX で処理を行う。その結果、高コピー数のプラスミドを持つ細胞のみが選択される。各ステップで予想されるヒストグラムのイメージ図を示した。

図 6-C, D MTX 処理によるフローサイトメトリー解析の改善結果

図 6-C には、GFP-DHFR をトランスフェクトした細胞のヒストグラムの比較図を示した。黒い線のグラフと塗りつぶされた緑のグラフは、それぞれ MTX 未処理および 200 μ M MTX で処理された細胞集団を示している。図 6-D は GFP 蛍光強度の平均値を示した。

図 6-E MTX 処理によるウェスタンブロットによる解析結果

DHFR-GFP でトランスフェクション後、200 μ M MTX で処理された細胞集団の GFP 発現量の平均値をしめした。GFP 発現量はウェスタンブロットによる解析結果から算出した。

【HeLa 細胞におけるタンパク質局在化の影響】

ここまでは、HEK293 細胞株を対象として実験系の構築および解析を行った。本研究で構築した実験系は単一プラスミドと高効率トランスフェクション、蛍光による発現量評価を組み合わせたシンプルな系である。したがって、多様な細胞に適用が可能であると考えた。そこで、HEK293 細胞と同様に汎用されている HeLa 細胞を用いて、構築した実験系が他細胞種へも適用可能かを調査した。pTOW-CMV-pro-GFP を用いてトランスフェクションの最適化を行った結果、HeLa 細胞に対しては、プラスミド DNA 8 μg 、PEI max 24 μg を用いることとした。次に、GFP、MTS-GFP、ER-GFP 発現プラスミドでトランスフェクションした細胞集団の GFP 蛍光量をフローサイトメトリーで解析した(図 7-A, B, C)。MTS-GFP および ER-GFP は GFP の蛍光量よりも減少していた (図 7-D)。この結果は、酵母細胞や HEK293 細胞で得た結果と一致する。この結果は、最初にトランスフェクションに用いる DNA 量および PEI max 量の最適化を行う必要はあるが、本実験系は多様な細胞種に適用可能であることを示唆している。

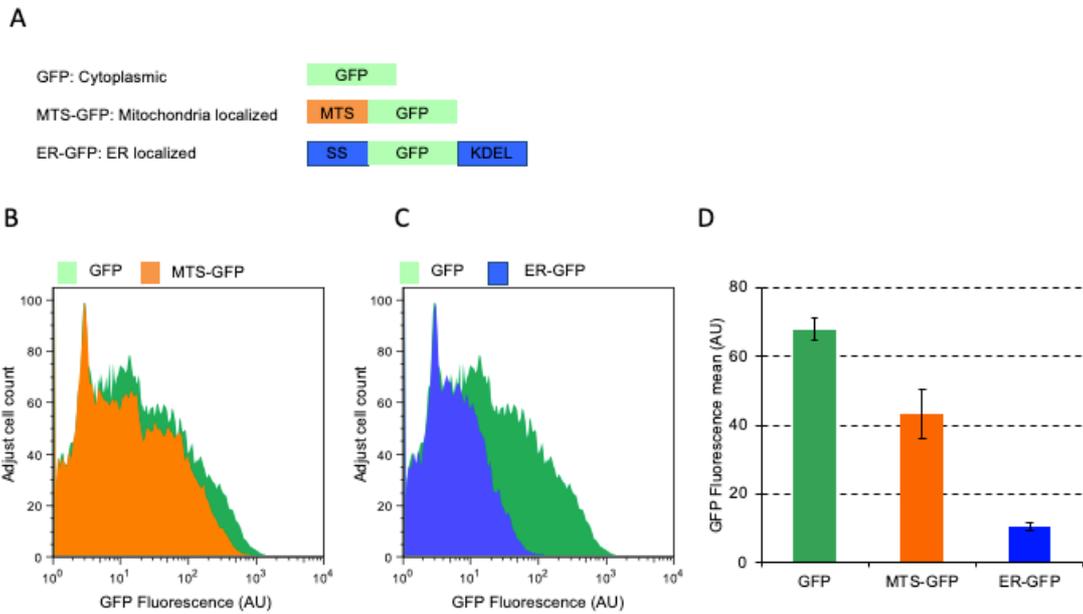


図 7 HeLa 細胞において局在化は GFP の発現限界を減少させる

図 7-A 本実験で用いた遺伝子

本実験に用いた遺伝子を示す。

図 7-B, C トランスフェクションされた細胞株のヒストグラムの比較図

フローサイトメトリーで得られた GFP 発現細胞株と MTS 発現細胞株のヒストグラムの比較図 (B) と GFP 発現細胞株と ER-GFP 発現細胞株のヒストグラムの比較図を示す。

図 7-D 各細胞株の GFP 蛍光量の比較

フローサイトメトリーで得られたデータから算出した各細胞株の GFP 蛍光量の平均値をグラフとして示す。

考察

【酵母と培養細胞における実験手法の違い】

タンパク質の大量生産は細胞機能に対して様々な悪影響を与えるが、そのメカニズムはほとんど解明されていない。このメカニズムとタンパク質の過剰発現は本質的に関連している。したがって、細胞機能に悪影響を与えるタンパク質量を知る必要がある。

酵母を用いた研究では、酵母におけるタンパク質の限界発現量を体系的に測定できる遺伝子綱引き法 (gTOW 法) が開発されている(Moriya, 2006; Moriya, 2011; Moriya, 2012)。gTOW 法では、マルチコピープラスミドの特性を利用してタンパク質の限界発現量を測定できる。タンパク質の限界発現量の測定は正確ではないが、分散を利用し、またシンプルなため、多くの異なるサンプルの解析に利用可能である。酵母における gTOW 法では、高コピー数プラスミドを持つ酵母が選択マーカー遺伝子による選択圧を利用して濃縮される。一方で、哺乳細胞などの培養細胞は酵母と比較して細胞周期が長いいため、選択圧を用いた高コピーのプラスミドを持つ細胞の濃縮は実用的ではない。そのため、本研究では高効率トランスフェクションの分散を直接利用することにした。gTOW 法では、ネイティブプロモーターとターミネーターを含む標的遺伝子を利用しており、プラスミドコピー数を測定することで限界発現量をネイティブなレベルの何倍かで評価することができる(Moriya, 2015)。この方法は、遺伝子のプロモーター領域の特定が比較的簡単で、遺伝子大きなイントロンを含んでいないなどゲノム構造がコンパクトな微生物にのみ適用可能である。哺乳類のような高等真核生物では、ゲノム構造は非常に複雑でありゲノムサイズもプラスミドでクローニングするには巨大すぎる。そのため、多くの標的遺伝子の相対的なタンパク質発現レベルの体系的な測定は実用的でない。

【P2A-GFP を用いた標的タンパク質発現量の測定】

本研究では、標的タンパク質の過剰発現レベルの測定および比較する実験系を開発した。この実験系では、マーカータンパク質 GFP と標的タンパク質のタンパク質合成レベルが 1:1 となる自己開裂配列 P2A 配列を利用した。ここで、標的タンパク質の分解による実験系への影響について考える。GFP は最も安定なタンパク質の一つとされており、半減期は長い。そのため、標的が分解速度の早いタンパク質で発現後すぐに分解した場合も、P2A 配列により標的タンパク質と等量発現した GFP は、分解されず細胞質にしばらく残る。したがって、GFP 発現量の測定で、標的タンパク質がどれくらい発現されたかを推察することが可能だと考えられる。

【低限界発現量のタンパク質を解析する際のプロモーターの問題】

タンパク質を過剰発現させるために、培養細胞中で最も強力なプロモーターの一つである CMV プロモーターを利用した。Sec24、Sec31 のタンパク質限界発現量を測定するための実験では、GFP ポジティブ細胞がほとんど検出されなかった。これは、CMV プロモーターがこれらのタンパク質の限界発現量を測定するには強力過ぎたことが示唆している。したがって、過剰発現が非常に高い毒性を示すタンパク質の測定にはより弱いプロモーターを使用すべきである。

【DHFR-MTX 拮抗作用を利用した測定精度の改善効果】

高コピー数のプラスミドを持つ細胞を濃縮するために、DHFR-MTX 拮抗作用の利用を試みた。しかし、この方法では、測定制度はわずかにしか改善しなかった。DHFR-MTX システムは安定高発現細胞株を生産するために確立されており、長期間の選択が必要である (Kim, 2011)。本研究で開発した実験系のよう、一過性のトランスフェクションを利用する系では十分に機能しないと考えられる。

【HEK293 細胞株における GFP の生産量】

本研究の興味深い発見は、HEK293 細胞株における GFP の限界発現量である。本研究では、GFP の発現限界は総タンパク質量の約 5%と推定した。これは、酵母細胞で推定された限界発現量 (総タンパク質量の 15%) よりも低かった。しかし、現在この違いが細胞種の違いによるものか、実験系の違いによるものかは結論付けることはできない。機能を持たない無害なタンパク質である GFP の大量発現がどのように細胞機能に影響を与えるのだろうか？タンパク質生産のための細胞リソースは限られており、極端な GFP の大量生産は細胞リソースに過負荷を与える。微生物では、この状態を *protein burden / cost* と呼ばれており、細胞増殖が観察されている。本研究では、GFP を発現した HEK293 細胞株は dish の底から剥がれて丸くなり、その殆どが死に至った。この結果は、他の研究者の報告とも一致している (Liu, 1999)。次に興味深い疑問は、タンパク質の過剰発現による過負荷にたいする固有の検知システムがあるのかである。このようなシステムは、ウイルス感染または癌の発生時にプログラムされた自殺システムとして機能する可能性があり、タンパク質の大量生産は細胞機能とは無関係である。

【HEK293 細胞株におけるタンパク質の局在化による影響】

HEK293 細胞株および HeLa 細胞株においても GFP への局在化シグナルが発現限界を減少させた。これらの結果は、酵母で得られた知見と一致している。この発見は、培養細胞でも同様に局在化による負担がタンパク質の限界発現量を決定するという考えを支持した。加えて、HEK293 細胞を宿主とした GFP 発現細胞株および各局在化 GFP 発現細胞株の GFP 発現量をウェスタンブロットで解析したところ、MTS-GFP 発現細胞株から抽出したサンプルでは MTS-GFP 前駆体が確認できた。ミトコンドリア局在タンパク質が大量生産された際、ミトコンドリアへ入りきれなかった前駆体が細胞毒性を示すことが報告されている (Wrobel, 2015; Wang, 2015)。酵母を用いた実験でも MTS-GFP 株から抽出したサンプルをウェスタンブロットで解析したところ、同様に MTS-GFP 前駆体が確認されており、これが GFP の限界発現量を減少させた要因であると考えられた (Kintaka, 2016)。これらの結果から、HEK293 細胞におけるミトコンドリア局在化による GFP の限界発現量の減少は、同様に MTS-GFP 前駆体の毒性によるものであると考えられる。

HEK293 細胞株において、ER への局在化も GFP の限界発現量を減少させた。これは、小胞輸送に関するリソースへの過負荷を与えた結果だと考えられる。また、タンパク質の大量発現は小胞体内で凝集体を形成し、ER ストレスを誘導することがある。しかし、本研究で用いた GFP は、ER 内で凝集体を形成しないことが *moxGFP* である。したがって、ER 局在化 GFP の限界発現量の低下は、ER ストレスによる影響ではない。

本実験では、タンパク質の局在化が限界発現量を下げることの確証をさらに得るために、SEAP と分泌シグナルを欠損させた SEAP Δ SS の限界発現量を P2A-GFP の蛍光量で間接的に測定し、比較した。その結果、SEAP と比較して SEAP Δ SS の限界発現量は約 40% 改善された。このことから、タンパク質の局在化が限界発現量を下げることの要因であることが確証を得られた。また、SEAP Δ SS の限界発現量は、同様に P2A-GFP の蛍光量で間接的に測定した RFP の限界発現量の約 75% であった。RFP も GFP と同様に最も発現限界が高いタンパク質の一つであると考えられる。すべてのタンパク質は、理論上このことから、SEAP Δ SS は限界発現量がタンパク質の局在化以外の要因で減少していると考えられる。遺伝子綱引き法 (gTOW 法) を用いた研究により、酵母の全タンパク質の限界発現量が明らかとなった (Makanae, 2013)。その結果、ほとんどのタンパク質が 100 倍近くまで発現できることが明らかとなった。一方で、わずかに発現量が上昇しただけで細胞機能にとって害となる 115 個のタンパク質の存在も明らかとなった。この 115 個には輸送関連タンパク質が多く含まれていた。本実験では、酵母の輸送関連タンパク質 Sec24、Sec31、Atr1、Atr5 のヒトホモログタンパク質 (Sec24、Sec31、Rab1、Rab5) を標的とし、P2A-GFP の蛍光量で間接的に限界発現量を測定した。その結果、いずれのタンパク質の限界発現量も、RFP の限界発現量の 10% 以下であった。これらの結果から、酵母で限界発現量が極めて低いタンパク質のヒトホモログタンパクも同様に限界発現量が極めて低いことが明らかとなった。

これらの結果から、1)タンパク質の局在化が細胞リソースに過負荷をかけて限界発現量を減少させること、2)酵母で限界発現量が著しく低いタンパク質のヒトホモログタンパク質は、ヒト培養細胞 HEK293 でも同様に限界発現量が低いことなど、酵母で得られた知見と一致することが明らかとなった。

【本実験系における課題】

本研究では、GFP 蛍光量からヒト培養細胞におけるタンパク質の限界発現量を測定する実験系を開発した。将来的に解決すべき課題もいくつかある。例えば、酵母を用いた研究では、過剰なタンパク質の分解も限界発現量を減少させることが明らかとなっている。例えば、EGFP と degron を付加した EGFP の限界発現量を比較したところ、EGFPdeg の限界発現量の方が低いことが明らかとなった (Makanae, 2013)。これは、タンパク質を分解するためにプロテアソームやエネルギーなどの細胞リソースへの過負荷が原因だと考えられた (Makanae, 2013)。同様の結果は、金高らの研究でも確認されている。(Kintaka, 2016)。本研究で構築した実験系だけでは、ヒト培養細胞において degron 付加タンパク質の大量発現が酵母と同様に限界発現量を減少させるかを確認することは難しいと考える。例えば、GFP と degron を付加した GFP (GFPdeg)の限界発現量を測定した場合、GFPdeg の限界発現量は GFP の限界発現量よりも減少することが予想される。しかし、その結果が GFP の分解による GFP 蛍光量の減少が原因である可能性は除外できない。

上記の改題を解消するために、プラスミドコピー数の測定を行なう必要があると考えた。実際に、トランスフェクションから 24 h 後の GFP 発現株および MTS-GFP 発現細胞株、ER-GFP 発現細胞株からゲノム DNA およびプラスミド DNA を回収し、リアルタイム PCR で各細胞株のゲノム DNA に対するプラスミドコピー数を測定しようと試みた。結果は、サンプルごとにプラスミドコピー数のばらつき激しく、正確な測定には至らなかった (No data)。原因として 1) 哺乳類細胞のゲノムが複雑であること、2) 目的タンパク質の発現量大きく異なる細胞から DNA を抽出していること、3) 細胞全体から DNA を抽出していることなどが考えられた。これらの問題を解決し、プラスミドコピー数の測定方法を確立させることが、本研究の今後の大きな課題である。

【HeLa 細胞を用いた実験系の構築】

本実験系では、はじめに HEK293 細胞を用いてタンパクの限界発現量を測定する実験系の構築を行った。この実験系が HEK293 細胞以外の培養細胞でも適用可能であるかを確認するために、HeLa 細胞を用いて実験を行った。GFP、MTS-GFP、ER-GFP の限界発現量を測定したところ、MTS-GFP および ER-GFP の限界発現量は、GFP の限界発現量と比較して減少していることが明らかとなった。この結果は、酵母や HEK293 細胞株の結果と一致している。このことから、本研究で開発した実験系は、多種類の細胞で適用が可能であると考えられる。

【多種細胞間の比較解析について】

多種細胞で実験系が適応できるのであれば、HEK293 細胞や HeLa 細胞を含む多種間で比較解析を行い、細胞の特性について理解を深めることが可能であると考えられる。例えば、本実験系では、タンパク質の局在化による影響を HEK293 および HeLa 細胞を用いて調査した。結果、HEK293 細胞と比較して HeLa 細胞は 1)タンパク質発現量が低い、2)GFP と MTS-GFP の限界発現量の差が小さいなどの違いが確認できた。特に、MTS-GFP と GFP の限界発現量の差についての発見は興味深い。もしかしたら、HeLa 細胞は、HEK293 細胞と比較して堅牢なミトコンドリア輸送経路があるのかもしれない。また、細胞間の比較解析は、疾患治療の分野にも応用が可能であると考えられる。例えば、正常細胞と疾患細胞の間で行い、疾患細胞のみ限界発現量が低いタンパク質が発見されれば、疾患細胞に特異的な脆弱点であると考えられる。そのタンパク質を標的とした、新規バイオマーカーや新規治療法などにつなげることが可能だと考える。

【結論】

本研究で開発した実験系は、単一プラスミドと高効率トランスフェクション、傾向による発現量評価を組み合わせたシンプルな実験系である。微生物での大量発現実験のように、体系的な解析に適用可能であり、ヒト培養細胞で様々なタンパク質を対象として大量発現細胞に及ぼす影響を調査することが可能となった。

引用参考文献

- 1 Baeshen, N. A. *et al.* Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact* **13**, 141, doi:10.1186/s12934-014-0141-0 (2014).
- 2 Borys, M. C. *et al.* Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnol Bioeng* **105**, 1048-1057, doi:10.1002/bit.22644 (2010).
- 3 Chin, C. L. *et al.* A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. *Sci Rep* **9**, 16768, doi:10.1038/s41598-019-53391-z (2019).
- 4 Costantini, L. M. *et al.* A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. *Nat Commun* **6**, 7670, doi:10.1038/ncomms8670 (2015).
- 5 Daly, R. & Hearn, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* **18**, 119-138, doi:10.1002/jmr.687 (2005).
- 6 Dong, H., Nilsson, L. & Kurland, C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* **177**, 1497-1504, doi:10.1128/jb.177.6.1497-1504.1995 (1995).
- 7 Eguchi, Y. *et al.* Estimating the protein burden limit of yeast cells by measuring the expression limits of glycolytic proteins. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.34595 (2018).
- 8 Fakruddin, M., Mohammad Mazumdar, R., Bin Mannan, K. S., Chowdhury, A. & Hossain, M. N. Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnol* **2013**, 590587, doi:10.5402/2013/590587 (2013).
- 9 Gerakis, Y. & Hetz, C. Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *FEBS J* **285**, 995-1011, doi:10.1111/febs.14332 (2018).

- 10 Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S. & Varki, A. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nat Biotechnol* **28**, 863-867, doi:10.1038/nbt.1651 (2010).
- 11 Gubellini, F. *et al.* Physiological response to membrane protein overexpression in *E. coli*. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111.007930, doi:10.1074/mcp.M111.007930 (2011).
- 12 Kafri, M., Metzler-Raz, E., Jona, G. & Barkai, N. The Cost of Protein Production. *Cell Rep* **14**, 22-31, doi:10.1016/j.celrep.2015.12.015 (2016).
- 13 Karbalaei, M., Rezaee, S. A. & Farsiani, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*, doi:10.1002/jcp.29583 (2020).
- 14 Kaufman, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**, 1211-1233, doi:10.1101/gad.13.10.1211 (1999).
- 15 Keren, L. *et al.* Massively Parallel Interrogation of the Effects of Gene Expression Levels on Fitness. *Cell* **166**, 1282-1294.e1218, doi:10.1016/j.cell.2016.07.024 (2016).
- 16 Kim, J. H. *et al.* High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* **6**, e18556, doi:10.1371/journal.pone.0018556 (2011).
- 17 Kintaka, R., Makanae, K. & Moriya, H. Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes. *Sci Rep* **6**, 31774, doi:10.1038/srep31774 (2016).
- 18 Kronman, C. *et al.* Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene* **121**, 295-304, doi:10.1016/0378-1119(92)90134-b (1992).

- 19 Lee, D. *et al.* ER Stress Induces Cell Cycle Arrest at the G2/M Phase Through eIF2 α Phosphorylation and GADD45 α . *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20246309 (2019).
- 20 Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H. & Ke, N. J. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 712-717, doi:10.1006/bbrc.1999.0954 (1999).
- 21 Liu, Z., Cashion, L. M. & Twu, J. J. A systematic comparison of relative promoter/enhancer activities in mammalian cell lines. *Anal Biochem* **246**, 150-152, doi:10.1006/abio.1997.2015 (1997).
- 22 Liu, Z. *et al.* Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep* **7**, 2193, doi:10.1038/s41598-017-02460-2 (2017).
- 23 Lucas, B. K. *et al.* High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res* **24**, 1774-1779, doi:10.1093/nar/24.9.1774 (1996).
- 24 Makanae, K., Kintaka, R., Makino, T., Kitano, H. & Moriya, H. Identification of dosage-sensitive genes in *Saccharomyces cerevisiae* using the genetic tug-of-war method. *Genome Res* **23**, 300-311, doi:10.1101/gr.146662.112 (2013).
- 25 Matsuda, T. & Oinuma, I. Optimized CRISPR/Cas9-mediated in vivo genome engineering applicable to monitoring dynamics of endogenous proteins in the mouse neural tissues. *Sci Rep* **9**, 11309, doi:10.1038/s41598-019-47721-4 (2019).
- 26 Mori, Y., Yoshida, Y., Satoh, A. & Moriya, H. Development of an experimental method of systematically estimating protein expression limits in HEK293 cells. *Sci Rep* **10**, 4798, doi:10.1038/s41598-020-61646-3 (2020).
- 27 Mori, Y., Yoshida, Y., Satoh, A. & Moriya, H. Development of an experimental method of systematically estimating protein expression limits in HEK293 cells. *Sci Rep* **10**, 4798, doi:10.1038/s41598-020-61646-3 (2020).

- 28 Moriya, H. Quantitative nature of overexpression experiments. *Mol Biol Cell* **26**, 3932-3939, doi:10.1091/mbc.E15-07-0512 (2015).
- 29 Moriya, H., Chino, A., Kapuy, O., Csikász-Nagy, A. & Novák, B. Overexpression limits of fission yeast cell-cycle regulators in vivo and in silico. *Mol Syst Biol* **7**, 556, doi:10.1038/msb.2011.91 (2011).
- 30 Moriya, H., Makanae, K., Watanabe, K., Chino, A. & Shimizu-Yoshida, Y. Robustness analysis of cellular systems using the genetic tug-of-war method. *Mol Biosyst* **8**, 2513-2522, doi:10.1039/c2mb25100k (2012).
- 31 Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y. & Kitano, H. In vivo robustness analysis of cell division cycle genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **2**, e111, doi:10.1371/journal.pgen.0020111 (2006).
- 32 Padler-Karavani, V. *et al.* Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease. *Glycobiology* **18**, 818-830, doi:10.1093/glycob/cwn072 (2008).
- 33 Portolano, N. *et al.* Recombinant protein expression for structural biology in HEK 293F suspension cells: a novel and accessible approach. *J Vis Exp*, e51897, doi:10.3791/51897 (2014).
- 34 Prelich, G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics* **190**, 841-854, doi:10.1534/genetics.111.136911 (2012).
- 35 Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* **5**, 172, doi:10.3389/fmicb.2014.00172 (2014).
- 36 Shemiakina, I. I. *et al.* A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nat Commun* **3**, 1204, doi:10.1038/ncomms2208 (2012).

- 37 Shen, Y., Chen, Y., Wu, J., Shaner, N. C. & Campbell, R. E. Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *PLoS One* **12**, e0171257, doi:10.1371/journal.pone.0171257 (2017).
- 38 Strack, R. L. *et al.* A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Methods* **5**, 955-957, doi:10.1038/nmeth.1264 (2008).
- 39 Vavouri, T., Semple, J. I., Garcia-Verdugo, R. & Lehner, B. Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity. *Cell* **138**, 198-208, doi:10.1016/j.cell.2009.04.029 (2009).
- 40 Wagner, S. *et al.* Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1527-1550, doi:10.1074/mcp.M600431-MCP200 (2007).
- 41 Wrobel, L. *et al.* Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature* **524**, 485-488, doi:10.1038/nature14951 (2015).
- 42 Zelinski, D. P., Zantek, N. D., Stewart, J. C., Irizarry, A. R. & Kinch, M. S. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res* **61**, 2301-2306 (2001).

謝辞

本研究は、岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科の佐藤あやの先生並びに岡山大学異分野融合コア守屋研究室の守屋央朗先生にご指導をして頂き遂行することができました。

本研究の实地および論文作成にあたり、多くのご指導ご鞭撻を承りました守屋先生、佐藤先生に厚くお礼を申し上げます。学部生の頃にご縁ができて以来、研究や実験の面では多大なご助力を賜り、大学院進学時には進路についてアドバイスを頂くなど、先生方への感謝は言葉では言い尽くせません。

また、実験補助をしていただいた池田圭吾さん、守屋綾子さんにも感謝をしています。

最後に、守屋研究室および佐藤研究室のメンバー一同に心より感謝をしています。