

氏 名	難波 匠太郎		
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	7 3 2 1	号
学位授与の日付	2 0 2 5 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	環境生命自然科学研究科 環境生命自然科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Analysis of Protein Toxicity and Cellular Phenotypes Triggered by the Maximum Overexpression of Proteins in Yeast (タンパク質の限界発現により引き起こされるタンパク質毒性と細胞表現型の解析)		
論文審査委員	教授 田村 隆	教授 守屋 央朗	教授 前田 恵
学位論文内容の要旨			
<p>The functionality of a cell is determined by the types and amounts of proteins. Proteins perform essential roles in cellular processes, including metabolism, structural maintenance, and signal transduction, and their expression levels are tightly regulated to maintain cellular homeostasis. Disruptions to this balance—particularly through protein overexpression—can result in cellular toxicity. Mechanisms underlying this toxicity include resource overload, stoichiometric imbalances, promiscuous interactions, and pathway modulation. Understanding the constraints that determine which proteins can be expressed and to what extent is crucial for uncovering the factors shaping the proteome and the underlying cellular systems.</p> <p>To investigate the constraints on protein expression, I focused on systematically evaluating the effects of protein overexpression on cellular fitness. Overexpression experiments are a direct and powerful approach to identify the levels of expression that cells can tolerate and to identify the causes of toxicity.</p> <p>In this study, I first explored the role of protein aggregation in cellular toxicity by comparing two structurally similar proteins: triply tagged green fluorescent protein (3×GFP) and a non-aggregating control, 3×MOX. While both proteins share nearly identical structures, 3×GFP formed aggregates under overexpression conditions, whereas 3×MOX did not. Notably, cells tolerated 3×MOX at expression levels four times higher than 3×GFP, demonstrating that aggregation significantly contributes to protein toxicity. Our findings suggest that misfolded proteins are managed through protective aggregation, which reduces their harmful effects. This observation is consistent with the results of studies of polyQ and TDP-43 proteins.</p> <p>Next, to investigate expression limits for a larger number of proteins, we developed gTOW2.0, an overexpression system capable of quantifying expression levels that cause growth defects over a wide dynamic range. Applying this system to 80 proteins encoded on chromosome I of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, I observed that nearly all proteins induced growth defects when expressed at sufficiently high levels. By comparing expression levels and toxicity, I found that proteins with large intrinsically disordered regions (IDRs) exhibited higher toxicity, whereas proteins with stable, structured proteins were better tolerated. This result highlights the role of protein structure in determining cellular limits to overexpression.</p> <p>During this analysis, I also identified a novel phenotype caused by the overexpression of Pex22, a peroxisomal membrane protein. Overexpression of Pex22 led to the formation of extensive tubular membrane structures occupying a significant portion of the cell, which I termed “Gorgon.” This observation is an example of how maximum overexpression of a protein can reveal a previously unobserved phenotype.</p> <p>In summary, this study reveals that protein overexpression serves as a valuable approach for probing cellular constraints. By systematically assessing the limits of protein expression through overexpression, the study revealed the characteristics of proteins that cells are likely to express and those that they are unlikely to express. Such insights contribute to a deeper understanding of how cells maintain homeostasis and respond to perturbations, providing a foundation for future studies on cellular adaptability and protein function.</p>			

論文審査結果の要旨

申請者は、タンパク質の過剰発現が細胞の生存や成長に及ぼす影響を系統的に評価し、細胞が許容するタンパク質発現量の制約を明らかにすることを目的とした。細胞内では、タンパク質の発現量が厳密に制御されており、そのバランスが崩れると細胞毒性が生じる。特に、リソースの過負荷、ストイキオメトリの不均衡、非特異的相互作用、およびシグナル伝達経路の破綻が毒性の主要因と考えられる。

申請者は、まずタンパク質の凝集が細胞毒性に与える影響を調査するため、構造的に類似した3×GFPと3×MOXを比較した。3×GFPは過剰発現により凝集体を形成したのに対し、3×MOXは凝集せず、より高レベルの発現が許容された。これにより、凝集がタンパク質毒性の重要な要因であることが示された。

さらに、新たに開発したgTOW2.0システムを用い、*Saccharomyces cerevisiae* の第1染色体にコードされる80種類のタンパク質の過剰発現が細胞成長に与える影響を評価した。その結果、大部分のタンパク質が一定以上の発現量で成長阻害を引き起こすことが明らかになった。また、構造的に無秩序領域（IDR）が多いタンパク質ほど毒性が高く、安定した構造を持つタンパク質の方が細胞に許容されやすいことが示された。

加えて、申請者は過剰発現による新たな細胞内表現型として、ペルオキシソーム膜タンパク質Pex22の異常な膜構造形成（“Gorgon”）を発見した。これは、過剰発現が細胞内部の構造変化を引き起こす可能性を示すものであり、タンパク質特異的な毒性メカニズムの理解を深める新たな知見となる。

申請者の研究成果は、タンパク質発現の制約を理解し、細胞がプロテオームの組成をどのように調整して恒常性を維持しているのかを解明する基盤を提供するものである。以上のことから、本研究は学術の進展に大いに貢献すると考えられ、博士の学位に値すると判断した。