

氏名	金高 令子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第5540号
学位授与の日付	平成29年 3月24日
学位授与の要件	自然科学研究科 地球生命物質科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	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)
論文審査委員	教授 沓掛和弘 教授 多賀正節 准教授 阿保達彦 准教授 守屋央朗

### 学位論文内容の要旨

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、局在化シグナル配列を持つことで、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。

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が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 と遺伝的に負に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輸送因子の候補として、局在化シグナルに関連したトランスポーターが取得された。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。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。

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。

## 論文審査結果の要旨

細胞小器官で働くタンパク質は、特異的な輸送装置によって運ばれ、標的の細胞小器官に局在化する。輸送装置は限られたリソースであるため、局在化するタンパク質を高発現すると輸送装置を枯渇させ、細胞の増殖に悪影響を及ぼすと考えられる。しかし、タンパク質局在化過程への過負荷が実際に増殖に悪影響を及ぼすのか、過負荷により引き起こされる細胞の生理状態はどのようなものか、過負荷により枯渇する輸送因子は何かなどの問題は、これまで体系的に調べられたことはなかった。

本研究では、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、様々な局在化シグナルを付加した緑色蛍光タンパク質 (GFP) を高発現させる実験系を用い、タンパク質局在化過程への過負荷が細胞増殖に悪影響を与えるか否かを解析した。さらに、過負荷が生じている細胞内の転写応答をマイクロアレイにより解析したり、各局在化過程への過負荷でより強い増殖の遅延が起きるような変異体をSynthetic genetic array法を用いて組織的に探索したりすることで、局在化過程への過負荷が引き起こす生理状態や過負荷の標的となる輸送因子を明らかにすることを試みた。その結果、局在化シグナルが付加されたGFPの高発現はシグナルを持たないGFPの高発現よりも強い増殖阻害を引き起こすこと、ミトコンドリア局在や小胞輸送されるGFPの高発現は標的となる細胞小器官の機能障害を引き起こすこと、核外輸送の過負荷の標的はエクスポーチンCrm1であることなどの証拠を得た。また、局在化過程に過負荷がかかっていると必須タンパク質の輸送の滞りや細胞小器官への蓄積が引き起こされ、それが原因で増殖阻害が誘発される可能性が示唆された。

以上の研究成果は、タンパク質局在化過程への過負荷が細胞の生理機能にどのような影響をおよぼすのかを初めて組織的に解明したものであり、分子遺伝学分野の発展に寄与し、学術上の貢献が大きいものであると評価される。したがって、審査員一同は、本論文を博士（理学）の学位論文に値するものであると判断した。