

- Cancer Res.* 70 : 481-489, 2010
- 8) Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A : *Curr Protoc Cell Biol.* 3 : 1-29, 2006
- 9) Clayton A, Court J, Navabi H et al : *J Immunol Methods.* 247 : 163-174, 2001
- 10) Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S et al : *Science.* 319 : 1244-1247, 2008
- 11) Nakai W, Yoshida T, Diez D et al : *Sci Rep.* 6 : 33935, 2016
- 12) Miyanishi M, Tada K, Koike M et al : *Nature.* 450 : 435-439, 2007
- 13) Baietti MF, Zhang Z, Mortier E et al : *Nat Cell Biol.* 14 : 677-685, 2012
- 14) Savina A, Vidal M, Colombo MI : *J Cell Sci.* 115 : 2505-2515, 2002
- 15) Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S et al : *Nat Cell Biol.* 12 : 19-30, 2010
- 16) Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S et al : *J Cell Biol.* 189 : 223-232, 2010

●財団だより●

平成 30 年度事業内容

本財団は人類の健康増進を図ることを使命とし、主として基礎的な医学医療に関する分野において、研究助成・研究交流その他の研究に関する事業を行い、もって医学医療の振興に寄与することを目的としております。この目的を達成するために次の事業を行います。

- (1) 基礎医学医療に関する研究に対する助成。
- (2) 基礎医学医療に関する研究を行う学会、研究会へわが国の研究者の海外派遣に対する助成。
- (3) 基礎医学医療に関する研究を行う外国人留学生に対する助成。
- (4) 基礎医学医療に関する研究成果の出版に対する助成。
- (5) その他この法人の目的を達成するために必要な事業。

平成 30 年度助成事業募集期間の予定

(A) 第 33 回基礎医学医療研究助成金	6 月 1 日から 7 月 6 日
(B) 第 3 回生体の科学賞	11 月 1 日から 11 月 30 日
(C) 第 33 回研究交流助成金	11 月 1 日から 11 月 30 日
(D) 第 33 回留学生受入助成金	11 月 1 日から 11 月 30 日
(E) 第 32 回研究出版助成金	11 月 1 日から 11 月 30 日
(F) 横地千仞・喜與子日独医学交流基金	6 月 1 日から 5 月 31 日 (11 月 30 日と 5 月 31 日)

公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団

〒113-0033 東京都文京区本郷 1-28-24 IS 弓町ビル 7 階

TEL 03-3815-7801 FAX 03-5800-2722

解説

生体内のタンパク質の発現量は どのような原理で決まっているのか？ プロテオームの拘束条件を探る

守屋 央 朗

Key words : 発現量の拘束条件, タンパク質負荷, リソース過負荷, 過剰発現

はじめに—タンパク質の発現量を定める 需要と拘束

それぞれのタンパク質の発現量は、生体の機能が最も効率よく発揮できるように最適化されていると考えられる。それでは、ある環境での生体にとって最適な発現量を定める背景原理はなんだろうか？ 本稿では、モデル真核細胞として最も理解が進んでいる出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を題材とし、過剰発現により増殖阻害を引き起こすタンパク質の性質を通じて、特にタンパク質の発現量の拘束条件について考える。

タンパク質の発現量を定める原理の一つは、“需要 (demand)” であると考えられる。例えば、解糖系の酵素の発現量は、取り込まれたグルコースを最大の速度で代謝しエネルギーを取り出せる量になっていると考えられる。盛んに増殖している細胞では、タンパク質の新規合成が最大になる量のリボソームが発現しているはずである。しかし、これらのタンパク質が需要だけを求めて無限に作られるわけではない。細胞という空間的拘束があり、タンパク質合成に必要なエネルギーやアミノ酸などの材料にも拘束がある。タンパク質の発現量は需要を最大限に満たしつつも、様々な“拘束 (constraint)” の下にある。あるタンパク質の発現量は、上記に加え、そのタンパク質の物理化学的性質や生理的機能などの様々な拘束条件が

複合的に作用して決まっていると考えられる。

I プロテオームの構成原理を摂動実験 により探る

タンパク質の発現量が拘束されていることは、拘束が破綻した状態が生体に悪影響を与える例が多数観察されていることからわかる。例えば、癌やダウン症候群などの染色体増加を特徴とする疾患では、タンパク質の発現量の増加が原因となって生じる拘束の破綻がその生理状態の特徴となって現れる。人為的な過剰発現実験でみられる様々な表現型は、タンパク質には決まった量があり、その変動が生体に異常を引き起こすことを示している。ただし、通常これらの実験はタンパク質の機能や生体のメカニズムを知るために行われ、どれくらい発現量を変えたときに異常が現れるかにはほとんど注意が払われていない。タンパク質の発現量を定める原理を明らかにするためには、どれくらいの発現変動が生体に悪影響を及ぼすのかを知る“摂動実験 (perturbation analysis)” を体系的に行う必要がある。

Keren らは、酵母でタンパク質の発現量を変動させたときに増殖にどう反映されるかを体系的に調査した¹⁾。まず、対象タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターを、発現強度が 500 倍の範囲で異なる 130 種類の人工プロモーターのそれぞれで置換した株を構築した。これら 130 種類の株

Constraints of expression levels of intracellular proteins

Moriya Hisao : 岡山大学 異分野融合先端研究コア (〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1)

0370-9531/02/¥500/論文/JCOPV

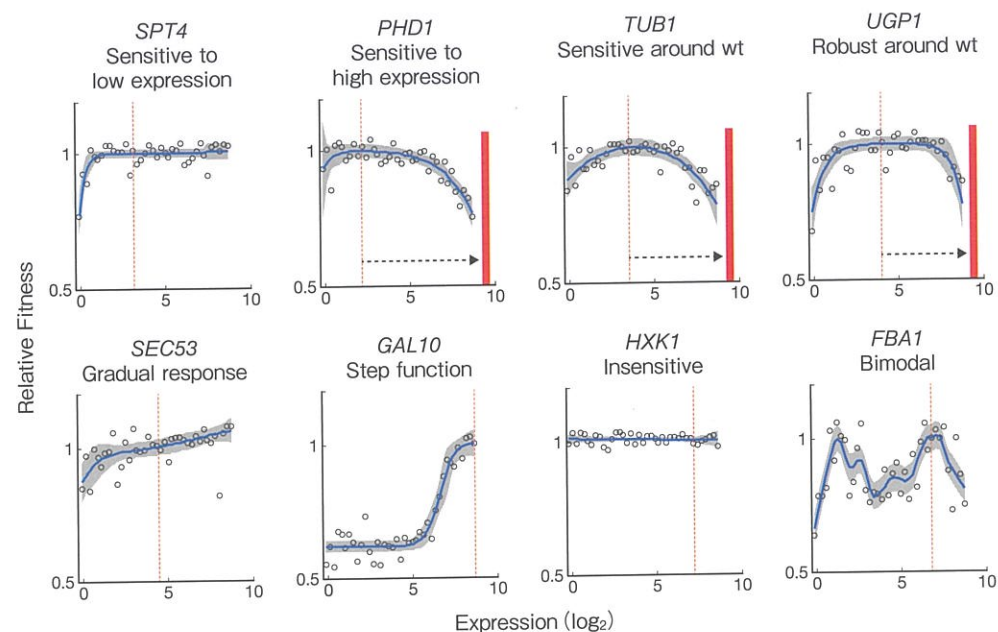


図1 酵母遺伝子の発現量-適応度関係 (文献1より許可を得て転載)

横軸はそれぞれのタンパク質の発現量を、縦軸は相対的適応度(≒増殖速度)を表している。赤い点線は通常の発現量を表している。PHD1、TUB1、UGP1のグラフに示した点線矢印と太い赤線は、gTOW法で調べられる過剰発現の限界を模式的に表している。

を競合培養したのち、集団中の各株の割合をハイスループットシーケンサーで解析することで、対象タンパク質の発現量-適応度関係(expression-fitness curve)を取得した。このようにして得られた発現量-適応度関係はタンパク質によって異なったパターンを示す(図1)。例えば、HXK1の発現変動は増殖にほとんど影響を与えないが、TUB1の発現は増加・減少とも増殖に悪影響を与える。前者の発現量は(少なくともこの培養条件では)拘束の下になく、後者は拘束の下にあると言える。この研究は、一群のタンパク質について発現量の拘束を詳しくした研究として価値が高い。一方で、対象ごとに130種類の株を構築しなければならず、81種類のタンパク質の解析しか行われていない。拘束の強弱やそれを決めるメカニズムを考察するには解析対象を更に拡大する必要がある。

発現量が強く拘束されたタンパク質を探索する別の摂動実験として、筆者らは、「遺伝子つなひき(gTOW)法」による解析を行ってきた²⁾。gTOW法では、発現量-適応度関係のような細密な情報

は得られない代わりに、対象タンパク質をどれだけ過剰にしたら増殖が阻害されるか(発現量の上限、図2の3本の太い赤線)を、よりハイスループットに調査できる。gTOW法では、対象タンパク質をコードする遺伝子をネイティブな制御領域ごとプラスミドに組み込み、そのコピー数を増殖が阻害される限界まで上げ、そのコピー数(限界コピー数)を測定する。ネイティブな制御領域を持つ遺伝子のコピー数が上昇すると、それに比例してタンパク質の発現量も上昇すると期待される。したがって限界コピー数は、「対象タンパク質がネイティブなレベルから何倍過剰になったら増殖が阻害されるか」を間接的に示すことになる。

酵母が持つ約6,000種類の遺伝子のコピー数限界をgTOW法により測った結果³⁾、全体の80%程度については、コピー数を100倍に上げて酵母の増殖は阻害されなかった。このことは、酵母の大半のタンパク質の発現量は、発現上昇について強い拘束を受けていないことを示している。一方、115種類の遺伝子は10コピー以下の限界コピー数を持っていた。これら「量感受性遺伝子(dosage

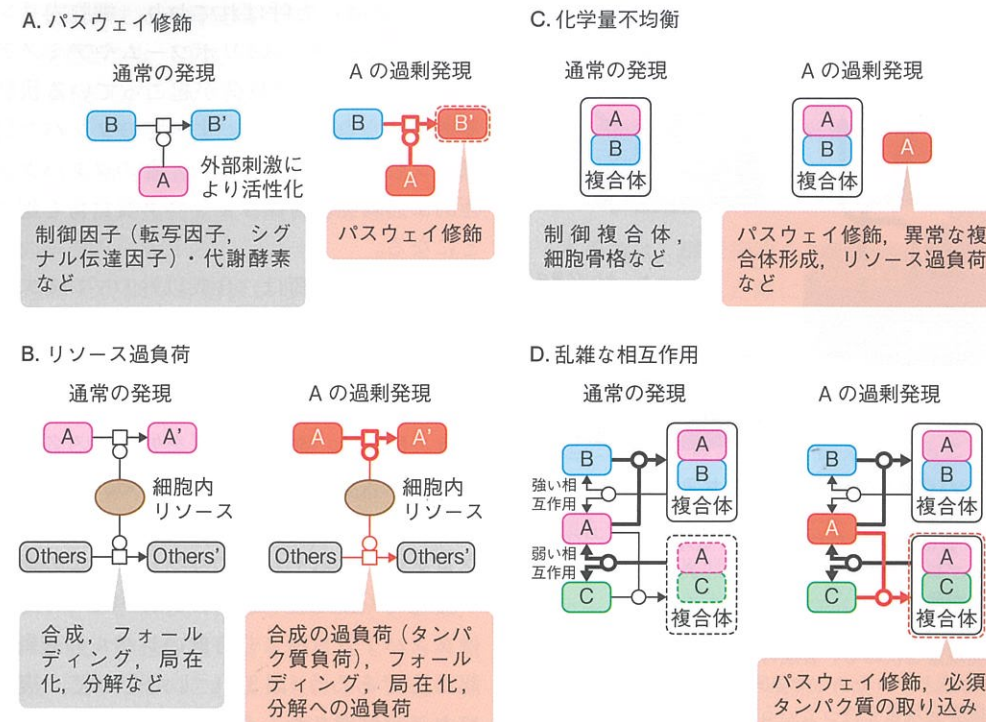


図2 過剰発現により増殖阻害を引き起こす4つのメカニズム

詳細は本文で解説した。これらは、タンパク質の発現量の上限に対する拘束条件と考えることもできる。

sensitive gene ; DSG)”の発現量は強い拘束の下にあると考えられることから、筆者らはこれらDSGを足がかりに発現量を拘束するメカニズムにアプローチしている。

II タンパク質の発現量を拘束する4つのメカニズム

本稿ではDSGの解析についての詳述は避け、筆者らや他のグループの研究成果を整理した、過剰発現が引き起こす増殖阻害の4つの一般的メカニズム⁴⁾(図2)について次に解説する。これらは、言い方を変えれば、発現量の上限を拘束する条件とも言える。“パスウェイ修飾(pathway modulation)”は、転写やシグナル伝達の制御因子や代謝酵素などの過剰が引き起こすパスウェイの異常な活性化・不活性化である。“リソース過負荷(resource overload)”は、合成、フォールディング、局在化、分解などの細胞内共有リソースが、過剰発現したタンパク質に独占され枯渇する(過負荷が起こる)状態である。“化学量不均衡(stoichiometry

imbalance)”は、制御複合体や細胞骨格などの複合体のサブユニットが過剰発現することで複合体の構成バランスが乱れ、パスウェイ修飾や異常な凝集体形成、リソース過負荷が起こる状態である。“乱雑な相互作用(promiscuous interaction)”は、過剰発現による質量作用で弱い相互作用が増強され、パスウェイ修飾や異常なタンパク質複合体の形成が起こる状態を表す。

これらのなかで、パスウェイ修飾はタンパク質の生理機能と、乱雑な相互作用はタンパク質の凝集と関連がある。化学量不均衡はタンパク質が複合体を構成するか、リソース過負荷はタンパク質がどのような細胞内リソースを利用するかと関連がある。対象タンパク質のこれらの性質から拘束条件が予測できる場合には、実験による検証がある程度可能である。例えば、プロテインキナーゼや代謝酵素などの酵素であれば、活性中心への変異の影響をみることでパスウェイ修飾を起こしているかを検証できる。複合体のサブユニットの場合、相手方のサブユニットを同時に過剰にして増

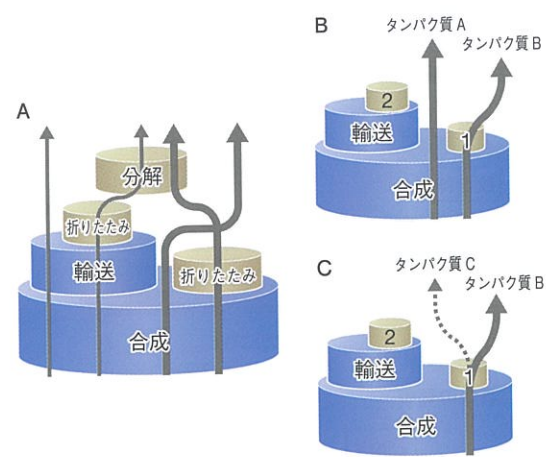


図3 タンパク質を処理する各プロセスのリソースを表した概念図

A. タンパク質は様々なプロセスにより処理される(矢印)。それぞれのプロセスのリソースは決まった量があり、合成のリソースが最も多い。

B. リソースの大きさが各プロセスで処理されるタンパク質の限界発現量を決定する。合成のみで処理されるタンパク質Aは、合成とプロセス1で処理されるタンパク質Bよりも高い限界発現量を持っている。

C. リソースの限界発現量は、そこで処理されるタンパク質の発現限界から見積もることができる。プロセス1の限界発現量はタンパク質Bの発現限界から見積もれる。

殖阻害が抑圧されるかを調べることで、化学量不均衡を起こしているかを確かめられる³⁾。凝集性の配列を持つタンパク質が乱雑な相互作用を起こすかどうかは、過剰発現での凝集体形成が1つの指標となるが、まだ体系的な検証法はない。

多くのタンパク質の特性は完全にはわかっていないため、特定のタンパク質の発現量がどんな拘束を受けているのかを予測することは難しい。そのなかで、リソース過負荷は、潜在的にすべてのタンパク質が引き起こすものである一方、対象タンパク質の性質や発現量からその発生が比較的容易に予測できる。したがって、まずはそのタンパク質の過剰がリソース過負荷を起こすかどうかを調べ発現量の拘束条件を切り分けるべきであろうと筆者は考えている。

III リソース負荷を起こす限界(過負荷限界)を知り発現量の拘束条件を切り分ける

細胞内で無償のタンパク質を大量発現すると増殖阻害が起こる現象は、“タンパク質負荷(protein

burden/cost)”と呼ばれており、細胞内リソースのうち合成リソース(リボソームやアミノアシルtRNAなど)への過負荷が起こっている状態であると考えられている⁵⁾。すべてのタンパク質は合成リソースを使うことから、どのタンパク質も究極的に過剰発現すればタンパク質負荷を起こすことになる。

リソース過負荷は、合成以外のプロセスでも起こり得る。積極的なフォールディングや輸送、分解などの処理を受けるタンパク質の過剰は、それらのリソースに過負荷をかけ増殖を阻害するであろう。図3は、タンパク質を処理する各プロセスのリソースを表した概念図である。すべてのタンパク質を処理する合成に比べ、より少数のタンパク質を処理するそれらのリソースはより限られているため(図3A)、これらのリソースへの過負荷はタンパク質負荷よりも低いレベルの過剰発現で起こるのである(図3B)。したがって、複数のプロセスで処理されるタンパク質の発現限界は、最も小さなリソースしか持たないプロセスによって決められるであろう。

細胞当たりの各プロセスのリソース量は一定なので、各リソースに過負荷をかけるタンパク質発現量(過負荷限界)も一定のはずである。増殖阻害を起こす発現量がこの過負荷限界に達しているなら、増殖阻害はそのリソースの過負荷により引き起こされたと考えられる。逆にその発現量が過負荷限界よりもはるかに低ければ、増殖阻害は別のメカニズムにより引き起こされたと考えられる。つまり、過負荷限界を知ることは、増殖阻害のメカニズムを切り分けるために重要な意味を持つことになる。過負荷限界は、対象プロセスで処理されることがわかっているタンパク質の発現限界から推し量ることができる(図3C)。

筆者らは、緑色蛍光タンパク質(GFP)をモデルタンパク質として、酵母内での各リソースの過負荷限界を調べた。GFPは酵母内で機能を持たない無償のタンパク質であり、細胞質で発現し自己フォールディングする。したがって、修飾のないGFPは合成の過負荷限界まで、小胞輸送(SS)、ミトコンドリア輸送(MTS)、核外輸送(NES)の各シグナル配列を付加したGFPはそれぞれの輸

送の過負荷限界まで過剰発現できると期待される。測定してみたところ、GFP、SS-GFP、MTS-GFP、ならびにNES-GFPは、それぞれ全タンパク質の15%、0.7%、4%、ならびに1%程度まで発現すると細胞の増殖を阻害した⁶⁾。この結果は、輸送が合成よりも低い過剰発現で過負荷を起こすという前述の予想と一致する。

この過剰発現限界を指標にして、DSGのどれがリソース過負荷を起こしているかを予測する。DSGのうち、プロテオーム解析により得られているネイティブな発現量⁷⁾から10倍の過剰発現が起こったと仮定した際に、全タンパク質の15%以上の発現が起こるものはTdh3のみであり、小胞輸送されるタンパク質のうち同様に0.7%に達するものはBgl2、Scs2、Kar2、ならびにPep4の4つとなる。これらのタンパク質は、それぞれ合成、輸送の過負荷を起こしている可能性が高く、このほかのこれよりもはるかに低い発現量しかないDSGは、リソース過負荷以外の理由で増殖阻害を起こしているのだと考えることができる。実際、DSGのうちパスウェイ修飾を起こしていると考えられる転写因子やシグナル因子の発現量は、過負荷限界よりもはるかに低い発現量しか持っていない。

リソース過負荷による拘束は、タンパク質の運命それ自身が決める発現量の拘束とも言える。ただ、通常の細胞内でこの拘束を受けているタンパク質はそう多くなさそうである。合成、輸送の処理能力の限界に達するには、そこで処理されるタンパク質がそれぞれ全プロテオームの15%、0.7%まで発現する必要があるが、酵母のほとんどのタンパク質は、たとえ100倍に過剰発現してもこのレベルに達しない。細胞内のリソースは、発現量が多少変動しても直ちに増殖阻害につながらない程度の余裕があり、ネイティブな発現量が高い一部のタンパク質のみがこの拘束を受けているようである。これは需要とリソース過負荷による拘束のトレードオフとも言える。

タンパク質は様々なプロセスにより処理を受けるが、現在のところGFPを用いて見積もられているのは合成と一部の輸送リソースのみである。

今後、それぞれのタンパク質がどんなプロセスの処理を受けるのかが明確になり、それらのリソースの過負荷限界が明らかになるにつれて、発現量の拘束条件がより詳細にわかってくるであろう。

おわりに—タンパク質発現量の拘束条件

本稿では、酵母細胞をモデルとして個別のタンパク質を過剰にした際にみられる増殖阻害のメカニズムからタンパク質発現量の拘束条件、そのなかで特にリソースへの負荷に注目した。酵母細胞での過剰発現による増殖阻害は、人工的条件で引き起こされた異常状態と捉えられることも多いが、通常の条件の細胞内での“見えない拘束条件”が顕在化したものと考えられることができる。一方、疾患細胞など異常状態にある細胞では、このプロテオームの拘束条件の破綻がその生理に反映されている可能性がある。実際に、癌やダウン症候群、老化細胞などの異数性細胞では、タンパク質の過剰発現による化学量不均衡やリソース過負荷がその生理的特徴を決めていることが知られている⁸⁾。

あるタンパク質の発現量の拘束条件を知るためには、そのタンパク質がどんな物理化学的・生化学的性質を持っており、それが細胞内環境とどのように相互作用するのかを理解する必要がある。「生体内のタンパク質の発現量はどのような原理で決まっているのか?」、この一見単純な問いの答えは、タンパク質と細胞の完全なる理解を内包しており、実はそう簡単ではない。

●文 献

- 1) Keren L, Hausser J, Lotan-Pompan M et al : *Cell*. 166 : 1282-1294, 2016
- 2) Moriya H, Shimizu-Yoshida Y, Kitano H : *PLoS Genet*. 2 : e111, 2006
- 3) Makanae K, Kintaka R, Makino T et al : *Genome Res*. 23 : 300-311, 2013
- 4) Moriya H : *Mol Biol Cell*. 26 : 3932-3939, 2015
- 5) Kafri M, Metz-Raz E, Jona G, Barkai N : *Cell Rep*. 14 : 22-31, 2016
- 6) Kintaka R, Makanae K, Moriya H : *Sci Rep*. 6 : 31774, 2016
- 7) Kulak NA, Pichler G, Paron I et al : *Nat Methods*. 11 : 319-324, 2014
- 8) Oromendia AB, Amon A : *Dis Model Mech*. 7 : 15-20, 2014