

氏名	森 吉弘		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博甲第	6262	号
学位授与の日付	2020年 9月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 生命医用工学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	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		
論文審査委員	准教授 佐藤 あやの	教授 徳光 浩	准教授 守屋 央朗
<b>学位論文内容の要旨</b>			
<p>タンパク質の大量発現が引き起こす細胞機能への障害は、タンパク質の大量生産を妨げる要因となる他、神経変性疾患やがんなどの病態とも関わりが深い。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その原因となるメカニズムの解明が試みられている。特に酵母では、増殖の障害を引き起こすぎりぎりの発現量（限界発現量）を評価する実験系が開発され、大量発現が引き起こす障害のメカニズムの理解が進んだ。一方、ヒトを初めとする哺乳類の細胞では、これまでに限界発現量を評価する実験系は構築されていない。そこで本研究では、ヒト培養細胞で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が哺乳細胞でも適用可能かを検証した。</p> <p>本研究では、HEK293 細胞と HeLa 細胞を用いて限界発現量を測定する実験系を構築した。この実験系では、目的のタンパク質遺伝子（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、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に導入し、目的タンパク質を最も多く発現している細胞での目的タンパク質の発現量を測定する。はじめに、蛍光により発現量を評価できる緑色蛍光タンパク質（GFP）を解析対象とした。GFP の発現量は、トランスフェクション後の細胞集団をフローサイトメトリーにより解析し、GFP の蛍光量により評価した。トランスフェクションの条件を最適化した結果、GFP をそれ以上発現できない限界量まで発現した細胞を得ることに成功した。次に、GFP にミトコンドリアと小胞体への輸送シグナルを付加し上記の実験系で調査したところ、GFP よりも有意に低い限界発現量を示した。この結果は、輸送されるタンパク質の大量発現が細胞機能に悪影響を与えるという酵母での知見と一致する。</p> <p>次に、蛍光を持たないタンパク質の限界発現量を測定するために、目的タンパク質と GFP の間に自己開裂配列（P2A 配列）を挿入した。これにより、目的タンパク質と GFP を等量発現させ GFP の蛍光により目的タンパク質の発現量を見積ることができる。目的タンパク質のモデルとして赤色蛍光タンパク質（RFP）と GFP が等量発現することを確認した後、分泌型アルカリフォスファターゼとヒト型アルブミン、酵母での大量発現が著しい毒性を示す輸送関連タンパク質のホモログ（Sec24, Sec31, Rab1, および Rab5）の限界発現量の測定を行った。その結果、RFP と比較してこれらのタンパク質の限界発現量は有意に低かった。さらに Sec24 や Sec31 を発現した場合、生存細胞の数が著しく少なかったことから、これらのタンパク質の大量発現は酵母の場合と同様に非常に毒性が高いことが示唆された。</p> <p>以上のように、ヒト培養細胞で様々なタンパク質を対象として、大量発現が細胞に及ぼす影響を調査する実験系が完成した。</p>			

## 論文審査結果の要旨

申請者は、本研究科大学院後期課程において、ヒト培養細胞におけるタンパク質発現限界を体系的に推定する実験方法の開発を行い、その結果を学位論文にまとめた。

タンパク質の過剰発現は細胞障害を引き起こすことがあるが、その根本的なメカニズムはまだ解明されていない。細胞障害の引き金となるタンパク質の発現限界は、そのメカニズムを知る上で有用な指標となる。

本研究では、ヒト胚性腎細胞株HEK293において、強いサイトメガロウイルスプロモーターの下でタンパク質を発現させたプラスミドDNAを利用し、このプラスミドを高コピー導入した後に生き残った細胞におけるタンパク質の発現量を測定することにより、標的タンパク質の発現限界を推定する実験方法を開発した。モデルタンパク質である緑色蛍光タンパク(GFP)の発現限界は全タンパク質の5.0%程度であり、持続的にGFPを過剰発現させると細胞死を引き起こした。ミトコンドリア標的シグナルを持つGFPの発現限界は1.6%、小胞体局在シグナルを持つGFPの発現限界は0.38%であった。小胞体トラフィッキングに関与する4つのタンパク質の発現限界は、はるかに低かった。

開発したタンパク質発現限界推定法は、毒性のあるタンパク質の定義や過剰発現の影響を評価する上で有用であると考えられる。タンパク質の大量発現は、細胞毒性が高く、バイオ医薬品製造におけるボトルネックであると認識されているため、本法はこのようなボトルネックを解決する方法を探索する上で、有用な手法となり得る。

これらの研究成果は、生命医用工学にとって有用な知見と方法論を提供するものだと考え、分子生物学、生化学、細胞生物学を専門とする審査員から構成される学位審査委員会は、学位論文の内容、公聴会による発表内容等を総合的に判断し、本論文は博士(工学)に値するものと判定した。