

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	様々なタンパク質の細胞内機能を制御できるタンパク質凝集タグの進化工学を用いた創製				
研究テーマ (欧文) AZ	Creation of the protein aggregation peptides enabling regulation of protein function in the cell				
研究氏 代 表 名 者	カカナ CC	姓)カワイ (ノマ)	名)シゲコ	研究期間 B	2017 ~ 2019 年
	漢字 CB	河合 (野間)	繁子	報告年度 YR	2019 年
	ローマ字 CZ	Kawai-Noma	Shigeko	研究機関名	千葉大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	千葉大学 大学院 工学研究院 助教				
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。) 本研究では、多様なタンパク質の機能を任意のタイミングで制御可能なタンパク質凝集タグの創製を目的とした。以下の項目について報告する。 報告 1) 酵母プリオン凝集配列融合タンパク質の機能評価 出芽酵母のプリオンタンパク質である New1 の凝集ドメインを赤色蛍光タンパク質 mRFP と融合し、大腸菌 MG1655 株に発現させると、細胞内に巨大な凝集体を形成させることに成功した。さらに凝集ドメインを転写抑制因子 BetI に融合すると (New1-BetI), BetI のみと比較して、過剰発現条件下で BetI のリプレッサー機能がわずかに低下した。New1 による凝集化が BetI の転写抑制能低下を導いたと考えられる。より機能スイッチ性能を向上させるため、進化工学により凝集タグ配列の凝集能を向上させる必要がある。 報告 2) ヌクレオシドキナーゼを用いた機能選択系の改良 我々はヌクレオシドキナーゼ HsvTK と変異原性ヌクレオシド dP を使ったネガティブ選択系をすでに報告している (Tashiro, <i>NAR</i> (2011))。本選択系を用いた凝集配列の進化工学を行い、高凝集能化した凝集配列の取得を目指す。その前段階として、本選択系に残されていた問題点の解決が不可欠であった。その問題点とは、現在選抜に用いている dP 濃度 (1 μM) は宿主内の変異頻度を増大させるという点である。dP 濃度を 100 nM にできれば、自然変異発生率とほぼ同等にまで変異頻度を下げられることがわかった (Tominaga, <i>PLoS One</i> (2015))。そこで、dP のゲノム取り込みを向上させるべく、ゲノム取り込みに関わり得る遺伝因子を洗い出し、過剰発現および欠損株解析を行ったところ、外膜トランスポーター-Tsx、内膜トランスポーター-NupC、キナーゼ Ndk の共過剰発現によって、100 nM dP でも細胞の突然変異頻度を大きく変化させずに選抜実験が可能となった。低濃度 dP で選抜可能となった本系を用いて、今後は凝集配列の凝集能向上を目指す。本項目の結果は、3/3 に Journal of Bioscience and Bioengineering に受理された。					
キーワード FA	タンパク質凝集	プリオン	ネガティブ選択	ヌクレオシドキナーゼ	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Improvement of the dP-nucleoside-mediated HsvTK negative-selection system by manipulating dP metabolism genes							
	著者名 ^{GA}	Shigeko Kawai-Noma et al.	雑誌名 ^{GC}	Journal of Bioscience and Bioengineering					
	ページ ^{GF}	印刷中	発行年 ^{GE}	2	0	2	0	巻号 ^{GD}	印刷中
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

The purpose in this study is to create protein aggregation system enabling regulation of protein function. We report below.

1) The evaluation of function of yeast prion domain fusion protein

We succeeded the construction of yeast prion aggregation in *E.coli* strain MG1655 using New1 prion domain conjugated with red fluorescent protein mRFP. To test the switching ability of New1 prion domain for repressor protein BetI, we created the fusion protein of New1-BetI. Compared to the function of only BetI in *E.coli*, repression efficiency of New1-BetI became slightly low, suggesting that aggregation of New1 could cause lowered function of BetI.

2) Improvement of negative selection using nucleoside kinase and the mutagenic nucleoside dP

We previously reported a powerful negative-selection system using Herpes Simplex Virus thymidine kinase (HsvTK) and the mutagenic nucleoside analog dP. Upon addition of 1000 nM dP, cells expressing HsvTK quickly die, with unprecedented efficacy. However, this selection procedure elevates the spontaneous mutation rate of the host cells by 10-fold due to the mutagenic nature of dP. To decrease the operative concentration of dP required for negative selection, we systematically created the strains of *Escherichia coli* either by removing or overexpressing genes involved in DNA/RNA metabolism. We found that over-expression of NupC and NupG (nucleoside uptake-related inner membrane transporters), Tsx (outer membrane transporter), NdK (nucleotide kinase) sensitized *E. coli* cells to dP. Simultaneous overexpression of these three genes (*ndk-nupC-tsx* significantly improved the dP-sensitivity of *E. coli*, lowering the necessary operative concentration of dP for negative selection by 10-fold. This enabled robust and selective elimination of strains harboring chromosomally-encoded *hsvtk* simply by adding as low as 100 nM dP, which causes only a modest increase in the spontaneous mutation frequency as compared to the cells without *hsvtk*.