

Title	中分子医薬のデリバリーのための膜透過性人工タンパク質ナノ粒子の開発
Sub Title	Development of artificial protein nanoparticles with membrane-permeability for delivery of middle-molecule drugs
Author	土居, 信英(Doi, Nobuhide)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2022
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>中空タンパク質ナノ粒子TIP60を機能性分子カプセルとするため、TIP60への異種分子の内包と、内包したTIP60の外部表面の化学修飾という2段階の機能化について検討した。まず、TIP60に異なるタンパク質分子を内包できる可能性を検討した。大腸菌内でTIP60と内包したいタンパク質を共発現させた結果、様々なタンパク質を内包できることが明らかになった。小角X線散乱分析により、内包分子のTIP60の内部空間占有率がほぼ100%となるケースも確認され、高密度に異種タンパク質を内包できることがわかった。この手法を用いて蛍光タンパク質(tdTomato)のTIP60への内包にも成功し、従来のTIP60と同様に精製することができた。この蛍光タンパク質内包型TIP60の外部表面にあるシステインチオールを対象として、FITC標識した膜透過促進ペプチドを修飾した。修飾条件は事前検討で最適化した、1分子のTIP60に対して2分子のペプチドを修飾する条件とした。その結果、蛍光タンパク質内包型TIP60も同様に修飾することができた。調製したtdTomato内包型TIP60をヒト培養細胞に添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した結果、tdTomatoを内包したFITC標識TIP60が細胞内に取り込まれていることを確認できた。このとき添加後から数時間経過しても、tdTomatoの蛍光とFITCの蛍光はほぼ共局在したままであったことから、細胞内でTIP60が速やかに分解されてtdTomatoが漏出しているということはないことが示唆された。さらに、次年度の細胞選択的に送達する方法の検討に向けて、TIP60の表面に連結する予定の、標的細胞固有の受容体に結合するpH応答性抗体をmRNAディスプレイ法により試験管内選択することに成功した。現在、この抗体や天然の受容体リガンドを膜透過促進ペプチドを組み合わせることで、細胞選択的なデリバリーを実現可能か検討をおこなっている。</p> <p>In order to make the hollow protein nanoparticles TIP60 into a functional molecular capsule, we investigated two-step functionalization: inclusion of foreign molecules in TIP60 and chemical modification of the outer surface of TIP60. First, we investigated the possibility that TIP60 could contain different protein molecules. As a result of co-expressing TIP60 and the protein to be encapsulated in <i>E. coli</i>, we found that various proteins can be encapsulated into TIP60. By small-angle X-ray scattering analysis, we confirmed that the internal space occupancy of TIP60 in the inclusion molecule was almost 100%, and found that heterologous proteins could be included in TIP60 at high density. Using this method, we succeeded in encapsulating the fluorescent protein (tdTomato) in TIP60, and purified it in the same manner as the conventional TIP60. The FITC-labeled membrane permeation-promoting peptide was modified for cysteine thiol on the outer surface of this fluorescent protein-encapsulating TIP60. The modification conditions were optimized in advance to modify two molecules of peptide with respect to one molecule of TIP60. As a result, the fluorescent protein-encapsulating TIP60 could be modified in the same manner as the conventional TIP60. We added the prepared tdTomato-encapsulating TIP60 to human cultured cells and observed its localization with a confocal fluorescence microscope. As a result, we confirmed that the FITC-labeled TIP60 containing tdTomato was incorporated into the cells. At this time, the fluorescence of tdTomato and the fluorescence of FITC remained almost co-localized even several hours after the addition, suggesting that TIP60 was not rapidly degraded in the cells and tdTomato was not leaked out. In addition, pH-responsive antibodies that bind to target cell-specific receptors to be linked to the surface of TIP60 were selected in vitro by the mRNA display method for the study of cell-selective delivery methods in the second year of the plan. Currently, we are investigating whether cell-selective delivery can be achieved by combining this antibody or a natural receptor ligand with the membrane permeation-promoting peptide.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000004-20210016">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000004-20210016</a>

研究代表者	所属	理工学部	職名	教授	補助額	1,000 千円
	氏名	土居 信英	氏名（英語）	Nobuhide Doi		
研究課題（日本語）						
中分子医薬のデリバリーのための膜透過性人工タンパク質ナノ粒子の開発						
研究課題（英訳）						
Development of artificial protein nanoparticles with membrane-permeability for delivery of middle-molecule drugs						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
土居 信英 (Nobuhide Doi)		理工学部・生命情報学科・教授				
川上 了史 (Norifumi Kawakami)		理工学部・生命情報学科・専任講師				
1. 研究成果実績の概要						
<p>中空タンパク質ナノ粒子 TIP60 を機能性分子カプセルとするため、TIP60 への異種分子の内包と、内包した TIP60 の外部表面の化学修飾という 2 段階の機能化について検討した。まず、TIP60 に異なるタンパク質分子を内包できる可能性を検討した。大腸菌内で TIP60 と内包したいタンパク質を共発現させた結果、様々なタンパク質を内包できることが明らかになった。小角 X 線散乱分析により、内包分子の TIP60 の内部空間占有率がほぼ 100%となるケースも確認され、高密度に異種タンパク質を内包できることがわかった。この手法を用いて蛍光タンパク質(tdTomato)の TIP60 への内包にも成功し、従来の TIP60 と同様に精製することができた。この蛍光タンパク質内包型 TIP60 の外部表面にあるシステインチオールを対象として、FITC 標識した膜透過促進ペプチドを修飾した。修飾条件は事前検討で最適化した、1 分子の TIP60 に対して 2 分子のペプチドを修飾する条件とした。その結果、蛍光タンパク質内包型 TIP60 も同様に修飾することができた。調製した tdTomato 内包型 TIP60 をヒト培養細胞に添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した結果、tdTomato を内包した FITC 標識 TIP60 が細胞内に取り込まれていることを確認できた。このとき添加後から数時間経過しても、tdTomato の蛍光と FITC の蛍光はほぼ共局在したままであったことから、細胞内で TIP60 が速やかに分解されて tdTomato が漏出しているということはないことが示唆された。さらに、次年度の細胞選択的に送達する方法の検討に向けて、TIP60 の表面に連結する予定の、標的細胞固有の受容体に結合する pH 応答性抗体を mRNA ディスプレイ法により試験管内選択することに成功した。現在、この抗体や天然の受容体リガンドを膜透過促進ペプチドを組み合わせることで、細胞選択的なデリバリーを実現可能か検討をおこなっている。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>In order to make the hollow protein nanoparticles TIP60 into a functional molecular capsule, we investigated two-step functionalization: inclusion of foreign molecules in TIP60 and chemical modification of the outer surface of TIP60. First, we investigated the possibility that TIP60 could contain different protein molecules. As a result of co-expressing TIP60 and the protein to be encapsulated in <i>E. coli</i>, we found that various proteins can be encapsulated into TIP60. By small-angle X-ray scattering analysis, we confirmed that the internal space occupancy of TIP60 in the inclusion molecule was almost 100%, and found that heterologous proteins could be included in TIP60 at high density. Using this method, we succeeded in encapsulating the fluorescent protein (tdTomato) in TIP60, and purified it in the same manner as the conventional TIP60. The FITC-labeled membrane permeation-promoting peptide was modified for cysteine thiol on the outer surface of this fluorescent protein-encapsulating TIP60. The modification conditions were optimized in advance to modify two molecules of peptide with respect to one molecule of TIP60. As a result, the fluorescent protein-encapsulating TIP60 could be modified in the same manner as the conventional TIP60. We added the prepared tdTomato-encapsulating TIP60 to human cultured cells and observed its localization with a confocal fluorescence microscope. As a result, we confirmed that the FITC-labeled TIP60 containing tdTomato was incorporated into the cells. At this time, the fluorescence of tdTomato and the fluorescence of FITC remained almost co-localized even several hours after the addition, suggesting that TIP60 was not rapidly degraded in the cells and tdTomato was not leaked out. In addition, pH-responsive antibodies that bind to target cell-specific receptors to be linked to the surface of TIP60 were selected in vitro by the mRNA display method for the study of cell-selective delivery methods in the second year of the plan. Currently, we are investigating whether cell-selective delivery can be achieved by combining this antibody or a natural receptor ligand with the membrane permeation-promoting peptide.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
J. Obata, N. Kawakami, A. Tsutsumi, E. Nasu, K. Miyamoto, M. Kikkawa, R. Arai	Icosahedral 60-meric porous structure of designed supramolecular protein nanoparticle TIP60	Chemical Communications	2021年10月			
Suzuki M, Iwaki K, Kikuchi M, Fujiwara K, Doi N	Characterization of the membrane penetration-enhancing peptide S19 derived from human syncytin-1 for the intracellular delivery of TAT-fused proteins	Biochemical and Biophysical Research Communications	2022年1月			
N. Kawakami, K. Hayashi, N. Ohara, J. Obata, R. Arai, K. Miyamoto	Incorporation of proteins in the artificially designed hollow protein nanoparticle, TIP60	The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies	2021年12月			

M. Yamashita, N. Kawakami, K. Miyamoto	Encapsulation of hydrophobic molecules in hollow protein nanoparticle TIP60	The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies	2021年12月
E. Nasu, N. Kawakami, K. Miyamoto	Dual surface functionalization of an artificial porous protein nanoparticle TIP60	The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies	2021年12月
Kumeno, Y., Sudo, K., Fujiwara, K., Doi, N.	Second extracellular loop of human CD9 is a cell-penetrating peptide	The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies	2021年12月
Furuya, T., Fujiwara, K., Doi, N.	Application of human syncytin1-derived fusogenic peptide to direct intracellular delivery of Cas9 protein-gRNA complex	The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies	2021年12月
N. Ohara, N. Kawakami, R. Arai, K. Miyamoto	Barium ion responsive reversible assembly of protein supramolecule TIP60	第21回日本蛋白質科学会年会	2021年6月
那須英里圭, 川上了史, 宮本憲二	人工タンパク質ナノ粒子 TIP60 の多孔性を利用した内外表面のヘテロ修飾	第21回日本蛋白質科学会年会	2021年6月
明石尚之, 清野真梨子, 藤原慶, 土居信英	がん細胞選択的 DDS に向けた EGFR に対する環境応答性単一ドメイン抗体の創出	第44回日本分子生物学会年会	2021年12月
川上了史, 林慶一, 北村真緒, 宮本憲二	人工タンパク質ナノケージ TIP60 への異種タンパク質の内包	日本化学会第102春季年会	2022年3月
N. Ohara, N. Kawakami, R. Arai, N. Adachi, T. Moriya, M. Kawasaki, T. Senda, K. Miyamoto	Re-design of an artificial protein nanocage TIP60: structural analysis of a mutant assembled by responding to metal ions	日本化学会第102春季年会	2022年3月
山下舞佳, 川上了史, 宮本憲二	疎水性分子の選択的内包に向けた中空タンパク質ナノ粒子 TIP60 の内部空間の設計	日本化学会第102春季年会	2022年3月