

Title	人工タンパク質シェルを用いた標的細胞特異的な機能性タンパク質導入法の開発
Sub Title	Development of artificial protein shells for the internalization of functional proteins into specific target cells
Author	佐々木, 栄太(Sasaki, Eita)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>我々はこれまでに、ウイルスのカプシドに擬した非ウイルス性のタンパク質シェルを人工的に改変することで、標的とするタンパク質をシェル内に内封するシステムを構築してきた。本研究では、標的とする腫瘍細胞特異的に発現している受容体を抗原とする抗体ミメティックな分子を選択し、これを人工タンパク質シェルの外側に提示することで、特定の細胞表面に結合し、それに続くエンドサイトーシスによって細胞内に導入する系の構築を試みた。具体的な抗体ミメティック分子として、様々なガン細胞において過剰発現していることが知られている上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合することが報告されているVHH抗体7D12およびEgA1を選択した。また、人工タンパク質シェルとして、180個のモノマーが自己集合することによって中空の球状構造を形成するAaLS-negを用いた。AaLS-negシェルの外側表面にVHH抗体を提示するため、(1) AaLS-negモノマーとVHH抗体をリンカーで繋いだ融合タンパク質、または(2) AaLS-negモノマーに13アミノ酸からなるSpyTag配列を導入し、これと特異的に結合するSpyCatcherドメインを融合したVHH抗体の作成、という2つの手法を試みた。(1)の融合タンパク質は、シェルの発現や形成が著しく阻害されてしまった。一方(2)では、AaLS-negと同様の大きさのシェルをゲル濾過クロマトグラフィーで精製することに成功した。さらに、7D12-SpyCatcher、EgA1-SpyCatcherの発現と精製にも成功した。現在は、これらを混合することで、適切な数のVHH抗体をAaLS-negシェル外側へ結合することを検討している。さらに、シェルに提示したVHH抗体の数や種類の組み合わせが、EGFR過剰発現細胞内への取り込みにどのような効果をもたらすかという詳細を明らかにする予定であり、将来的には治療薬となりうる酵素や抗体などの機能性タンパク質を標的細胞特異的に届ける技術の開発へとつなげることを目指している。</p> <p>We have developed artificial proteinaceous shell systems for encapsulating specific target proteins by engineering non-viral virus-like particles. Here, we proposed to construct artificial protein shells displaying antibody mimetics, which bind a specific receptor on the target cell surface, in order to develop a method for internalizing the protein shell complex into the target cells via endocytosis. Specifically, we selected VHH antibodies 7D12 and EgA1, which are reported to bind epidermal growth factor receptor (EGFR) expressed on the surface of various cancer cells, as the antibody mimetics and AaLS-neg, which self-assembles into 180-mer hollow spherical shells, as the non-viral protein shells. To display the VHH antibodies on the AaLS-neg shell surface, we designed (1) AaLS-neg:VHH antibody fusion proteins and (2) a combination of an AaLS-neg:SpyTag fusion protein and VHH antibody:SpyCatcher fusion proteins, which could later be used to form the desired complex via specific binding between SpyTag and SpyCatcher. Although the first approach resulted in poor protein expression and shell formation, we succeeded in obtaining the protein shell with SpyTag, which showed a size close to that of the original AaLS-neg shell, by size-exclusion chromatography. We also obtained 7D12:SpyCatcher and EgA1:SpyCatcher. By simply mixing them, we are now trying to display appropriate number and combination of antibody mimetics on the surface of the AaLS-neg shell. In addition, we are going to investigate the effect on internalization into the EGFR-overexpressing cells. The artificial protein shells developed in this research may lead to a novel technique to deliver therapeutic enzymes or antibodies to specific target cells in the future.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220177">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220177</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	補助額	300 (A) 千円
	氏名	佐々木 栄太	氏名 (英語)	Eita Sasaki		
研究課題 (日本語)						
人工タンパク質シェルを用いた標的細胞特異的な機能性タンパク質導入法の開発						
研究課題 (英訳)						
Development of artificial protein shells for the internalization of functional proteins into specific target cells						
1. 研究成果実績の概要						
<p>我々はこれまでに、ウイルスのカプシドに擬した非ウイルス性のタンパク質シェルを人工的に改変することで、標的とするタンパク質をシェル内に内封するシステムを構築してきた。本研究では、標的とする腫瘍細胞特異的に発現している受容体を抗原とする抗体ミメティックな分子を選択し、これを人工タンパク質シェルの外側に提示することで、特定の細胞表面に結合し、それに続くエンドサイトーシスによって細胞内に導入する系の構築を試みた。具体的な抗体ミメティック分子として、様々なガン細胞において過剰発現していることが知られている上皮成長因子受容体(EGFR)に結合することが報告されている VHH 抗体 7D12 および EgA1 を選択した。また、人工タンパク質シェルとして、180 個のモノマーが自己集合することによって中空の球状構造を形成する AaLS-neg を用いた。AaLS-neg シェルの外側表面に VHH 抗体を提示するため、(1) AaLS-neg モノマーと VHH 抗体をリンカーで繋いだ融合タンパク質、または(2) AaLS-neg モノマーに 13 アミノ酸からなる SpyTag 配列を導入し、これと特異的に結合する SpyCatcher ドメインを融合した VHH 抗体の作成、という2つの手法を試みた。(1)の融合タンパク質は、シェルの発現や形成が著しく阻害されてしまった。一方(2)では、AaLS-neg と同様の大きさのシェルをゲル濾過クロマトグラフィーで精製することに成功した。さらに、7D12-SpyCatcher、EgA1-SpyCatcher の発現と精製にも成功した。現在は、これらを混合することで、適切な数の VHH 抗体を AaLS-neg シェル外側へ結合することを検討している。さらに、シェルに提示した VHH 抗体の数や種類の組み合わせが、EGFR 過剰発現細胞内への取り込みにどのような効果をもたらすかという詳細を明らかにする予定であり、将来的には治療薬となりうる酵素や抗体などの機能性タンパク質を標的細胞特異的に届ける技術の開発へとつなげることを目指している。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>We have developed artificial proteinaceous shell systems for encapsulating specific target proteins by engineering non-viral virus-like particles. Here, we proposed to construct artificial protein shells displaying antibody mimetics, which bind a specific receptor on the target cell surface, in order to develop a method for internalizing the protein shell complex into the target cells via endocytosis. Specifically, we selected VHH antibodies 7D12 and EgA1, which are reported to bind epidermal growth factor receptor (EGFR) expressed on the surface of various cancer cells, as the antibody mimetics and AaLS-neg, which self-assembles into 180-mer hollow spherical shells, as the non-viral protein shells. To display the VHH antibodies on the AaLS-neg shell surface, we designed (1) AaLS-neg:VHH antibody fusion proteins and (2) a combination of an AaLS-neg:SpyTag fusion protein and VHH antibody:SpyCatcher fusion proteins, which could later be used to form the desired complex via specific binding between SpyTag and SpyCatcher. Although the first approach resulted in poor protein expression and shell formation, we succeeded in obtaining the protein shell with SpyTag, which showed a size close to that of the original AaLS-neg shell, by size-exclusion chromatography. We also obtained 7D12:SpyCatcher and EgA1:SpyCatcher. By simply mixing them, we are now trying to display appropriate number and combination of antibody mimetics on the surface of the AaLS-neg shell. In addition, we are going to investigate the effect on internalization into the EGFR-overexpressing cells. The artificial protein shells developed in this research may lead to a novel technique to deliver therapeutic enzymes or antibodies to specific target cells in the future.</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)
竹田 彩華, 佐々木 栄太, 山 田 創太, 花岡 健二郎		標的タンパク質を特異的に内包可 能な人工タンパク質シェルの開発		日本薬学会第 143 年会		2023 年 3 月