

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	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>TIP60は60分子のタンパク質が自発的に会合して中空サッカーボール形状に組み上がった分子であり、そのボールの表面には2.4 nm直径の孔が20箇所もあり、小分子化合物は素通りできるような構造を有している。しかし、表面の孔よりも大きい中分子の内包は実現できていなかった。この実現には一度60分子をバラバラに分解し、その後、再びサッカーボール状に会合させる仕組みが必要であった。そこで、60分子が会合できなくなるような変異体の探索を行った。その結果、会合できなくなるK67E変異体が発見された。さらに、この変異体にバリウムイオンを添加すると、元の60量体が得られることが明らかになった。また、同時にDNAなどを添加しておくことで、内部空間に閉じ込められることも明らかにした。</p> <p>こうした分子材料は、一般に調製コストが高くなる傾向があり、結果的に実用化を阻む壁となっている。特にタンパク質の精製では、時間がかかり、かつスケールアップも行いにくいカラムクロマトグラフィーが必要なケースが多く、TIP60も例外ではなかった。そこで、通常の精製方法とは異なる大量精製法の開発に着手し、カラムクロマトグラフィーを利用することなく、従来の10倍以上のTIP60を一段階で獲得できる手法も確立した。</p> <p>一方、独自の膜透過促進ペプチドを用いて、ペプチドや核酸からなる中分子医薬を細胞内にデリバリーするための予備的検討をおこなった。まず、膜透過促進ペプチドと細胞表面受容体に結合する抗体を組み合わせることで、ペプチド医薬を受容体発現細胞選択的に細胞質送達することに成功した。また、核酸医薬として期待されているsiRNAをAgo2との複合体として、膜透過促進ペプチドを用いて細胞質に送達することで、従来法よりも迅速なノックダウンが可能となることを見出した。今後、膜透過促進ペプチド、抗体とTIP60を組み合わせることで、ペプチドや核酸を細胞選択的にデリバリーすることが期待できる。</p> <p>TIP60 is a molecule in which 60 molecules of protein spontaneously associate to form a hollow soccer ball, and the surface of the ball has 20 pores with a diameter of 2.4 nm through which small molecules can pass through. However, encapsulation of middle molecules larger than the pores on the surface has not been realized. To realize this, it was necessary to have a mechanism that once dissociated the 60 molecules and then reassembled them into a soccer ball shape. Therefore, we searched for mutants that could not associate with 60 molecules. As a result, a K67E mutant was discovered that was unable to associate. Furthermore, it was found that addition of barium ions to this mutant yielded the original 60-mer. Furthermore, we demonstrated the encapsulation of single-stranded DNA molecules in the internal space.</p> <p>Such molecular materials generally tend to be expensive to prepare, which is a barrier to their practical application. Protein purification in particular often requires column chromatography, which is time-consuming and difficult to scale up, and TIP60 was no exception. Therefore, we started developing a large-scale purification method that is different from the usual purification method, and established a method that can obtain more than 10 times more TIP60 in a single step without using column chromatography.</p> <p>On the other hand, we conducted preliminary studies for intracellular delivery of middle-molecule drugs composed of peptides or nucleic acids using our membrane-permeation-enhancing peptides. First, by combining a membrane permeation-enhancing peptide and an antibody that binds to a cell surface receptor, we succeeded in selectively delivering a peptide drug to the cytoplasm of receptor-expressing cells. In addition, we found that siRNA, which is expected as a nucleic acid drug, can be knocked down more quickly than conventional methods by complexing siRNA with Ago2 and delivering it to the cytoplasm using a membrane-permeation-enhancing peptide. In the future, it is expected that cell-selective delivery of peptides and nucleic acids will be possible by combining membrane-permeation-enhancing peptides, antibodies, and TIP60.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000011-20220021

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	理工学部	職名	教授	補助額	400	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

TIP60 は 60 分子のタンパク質が自発的に会合して中空サッカーボール形状に組み上がった分子であり、そのボールの表面には 2.4 nm 直径の孔が 20箇所もあり、小分子化合物は素通りできるような構造を有している。しかし、表面の孔よりも大きい中分子の内包は実現できていなかった。この実現には一度 60 分子をバラバラに分解し、その後、再びサッカーボール状に会合させる仕組みが必要であった。そこで、60 分子が会合できなくなるような変異体の探索を行った。その結果、会合できなくなる K67E 変異体が発見された。さらに、この変異体にバリウムイオンを添加すると、元の 60 量体が得られることが明らかになった。また、同時に DNA などを添加しておくことで、内部空間に閉じ込められることも明らかにした。

こうした分子材料は、一般に調製コストが高くなる傾向があり、結果的に実用化を阻む壁となっている。特にタンパク質の精製では、時間がかかり、かつスケールアップも行いにくいカラムクロマトグラフィーが必要なケースが多く、TIP60 も例外ではなかった。そこで、通常の精製方法とは異なる大量精製法の開発に着手し、カラムクロマトグラフィーを利用することなく、従来の 10 倍以上の TIP60 を一段階で獲得できる手法も確立した。

一方、独自の膜透過促進ペプチドを用いて、ペプチドや核酸からなる中分子医薬を細胞内にデリバリーするための予備的検討をおこなった。まず、膜透過促進ペプチドと細胞表面受容体に結合する抗体を組み合わせることで、ペプチド医薬を受容体発現細胞選択的に細胞質送達することに成功した。また、核酸医薬として期待されている siRNA を Ago2 との複合体として、膜透過促進ペプチドを用いて細胞質に送達することで、従来法よりも迅速なノックダウンが可能となることを見出した。今後、膜透過促進ペプチド、抗体と TIP60 を組み合わせることで、ペプチドや核酸を細胞選択的にデリバリーすることが期待できる。

2. 研究成果実績の概要（英訳）

TIP60 is a molecule in which 60 molecules of protein spontaneously associate to form a hollow soccer ball, and the surface of the ball has 20 pores with a diameter of 2.4 nm through which small molecules can pass through. However, encapsulation of middle molecules larger than the pores on the surface has not been realized. To realize this, it was necessary to have a mechanism that once dissociated the 60 molecules and then reassembled them into a soccer ball shape. Therefore, we searched for mutants that could not associate with 60 molecules. As a result, a K67E mutant was discovered that was unable to associate. Furthermore, it was found that addition of barium ions to this mutant yielded the original 60-mer. Furthermore, we demonstrated the encapsulation of single-stranded DNA molecules in the internal space.

Such molecular materials generally tend to be expensive to prepare, which is a barrier to their practical application. Protein purification in particular often requires column chromatography, which is time-consuming and difficult to scale up, and TIP60 was no exception. Therefore, we started developing a large-scale purification method that is different from the usual purification method, and established a method that can obtain more than 10 times more TIP60 in a single step without using column chromatography.

On the other hand, we conducted preliminary studies for intracellular delivery of middle-molecule drugs composed of peptides or nucleic acids using our membrane-permeation-enhancing peptides. First, by combining a membrane permeation-enhancing peptide and an antibody that binds to a cell surface receptor, we succeeded in selectively delivering a peptide drug to the cytoplasm of receptor-expressing cells. In addition, we found that siRNA, which is expected as a nucleic acid drug, can be knocked down more quickly than conventional methods by complexing siRNA with Ago2 and delivering it to the cytoplasm using a membrane-permeation-enhancing peptide. In the future, it is expected that cell-selective delivery of peptides and nucleic acids will be possible by combining membrane-permeation-enhancing peptides, antibodies, and TIP60.

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)
Nakamura, M., Fujiwara, K., Doi, N.	Cytoplasmic delivery of siRNA using human-derived membrane penetration-enhancing peptide.	J. Nanobiotechnol.	2022年10月
Ide, M., Tabata, N., Yonemura, Y., Shirasaki, T., Murai, K., Wang, Y., Ishida, A., Okada, H., Honda, M., Kaneko, S., Doi, N., Ito, S., Yanagawa, H.	Guanine nucleotide exchange factor DOCK11-binding peptide fused with a single chain antibody inhibits Hepatitis B Virus infection and replication.	J. Biol. Chem.	2022年7月

M. Yamashita, N. Kawakami, K. Miyamoto	Hydrophobization of a TIP60 Protein Nanocage for the Encapsulation of Hydrophobic Compounds	ChemPlusChem	2023 年 3 月
E. Nasu, N. Kawakami, N. Ohara, K. Hayashi, K. Miyamoto	Column-free purification of an artificial protein nanocage, TIP60	Protein Expression and Purification	2023 年 1 月
N. Ohara, N. Kawakami, R. Arai, N. Adachi, T. Moriya, M. Kawasaki, K. Miyamoto	Reversible Assembly of an Artificial Protein Nanocage Using Alkaline Earth Metal Ions	Journal of the American Chemical Society	2023 年 1 月