

Title	pH依存的に崩壊する人工タンパク質シェルの開発
Sub Title	Development of pH-dependent disassembly of artificial protein shells
Author	佐々木, 栄太(Sasaki, Eita)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	ウイルスのカプシドに擬した人工タンパク質シェルは、治療薬となりうる機能性タンパク質を標的細胞内へと輸送する新たなDDS担体としての利用が期待される。我々は、これまでに標的とするタンパク質をシェル内に効率良く内包するシステムを構築してきたが、これを放出する技術については未だ確立できていなかった。そこで本研究では、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた人工タンパク質シェルが、エンドソームやリソソームなどの酸性環境下において薬効分子を効率良く放出できるシステムの構築を目指した。具体的には、まず、標的タンパク質を内包可能なルマジン合成酵素変異体AaLS-ST1が形成するタンパク質シェルのpH変化による安定性を検討した。AaLS-ST1を大腸菌内で発現すると、直径約16nmのSシェル (small shell) と直径約29nmのLシェル (large shell) を形成した。またタグ配列と相互作用するドメインを融合した標的タンパク質を共発現することで、それぞれのシェルの中に標的タンパク質を内包可能であることを確認した。次に、SシェルとLシェルのそれぞれをサイズ排除クロマトグラフィーで分離精製し、異なるpHに調整したリン酸緩衝液中でのそれぞれのシェルの安定性を動的光散乱法を用いて評価した。その結果、AaLS-ST1シェル単体では、Sシェル、Lシェルともに、pH6以下の弱酸性環境化でシェルが崩壊し、崩壊したシェルが凝集する様子が観察された。また、内包タンパク質を含有したシェルにおいても弱酸性環境下におけるシェルの崩壊が示唆された。今後は、シェルの崩壊によって内包タンパク質が放出され、その活性を示すことを検証する予定である。弱酸性環境下で崩壊する本シェルシステムは、将来的にがん組織特異的な内包物質の放出やエンドソーム内での内包物質の放出などに利用できると期待される。 Artificial protein shells hold promise for a novel drug delivery system (DDS) capable of transporting functional proteins into target cells. While successful encapsulation of target proteins within these shells has been achieved, the development of techniques for their controlled release remains a challenge. In this study, we aimed to design a system wherein artificial protein shells, internalized by cells through endocytosis, could efficiently release therapeutic molecules within acidic environments such as endosomes or lysosomes. We assessed the stability of the AaLS-ST1 shell, which is a mutant of lumazine synthase from Aquifex aeolicus designed to encapsulate target proteins. Expression of AaLS-ST1 in Escherichia coli led to the formation of two distinct shell types: S shells (small shell) with a diameter of approximately 16 nm and L shells (large shell) with a diameter of approximately 29 nm. Through co-expression of target proteins fused with the shell-interacting domain, we validated the encapsulation capability of each shell for target proteins. Subsequently, S shells and L shells were purified through size exclusion chromatography, and the stability of each shell variant was assessed using dynamic light scattering in phosphate buffer solutions adjusted to different pH values. Notably, both S shells and L shells collapsed and aggregated in weakly acidic environments with a pH below 6. Furthermore, this collapse phenomenon was also evident in shells containing encapsulated proteins. We now aim to confirm that the encapsulated proteins are released as a result of the shell collapsing and to demonstrate their activity. The potential utilization of this pH-dependent disassembly system is anticipated in the future for the targeted release of cargo substances within cancer tissues or endosomes, where weakly acidic environments are present.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230168

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.

2023年度 学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

研究代表者	所属	薬学部	職名	専任講師	補助額	300千円 (A)
	氏名	佐々木 栄太	氏名（英語）	Eita Sasaki		
研究課題（日本語）						
pH依存的に崩壊する人工タンパク質シェルの開発						
研究課題（英訳）						
Development of pH-dependent disassembly of artificial protein shells						
1. 研究成果実績の概要						
ウイルスのカプシドに擬した人工タンパク質シェルは、治療薬となりうる機能性タンパク質を標的細胞内へと輸送する新たなDDS担体としての利用が期待される。我々は、これまでに標的とするタンパク質をシェル内に効率良く内包するシステムを構築してきたが、これを放出する技術については未だ確立できていなかった。そこで本研究では、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた人工タンパク質シェルが、エンドソームやリソソームなどの酸性環境下において薬効分子を効率良く放出できるシステムの構築を目指した。具体的には、まず、標的タンパク質を内包可能なルマジン合成酵素変異体AaLS-ST1が形成するタンパク質シェルのpH変化による安定性を検討した。AaLS-ST1を大腸菌内で発現すると、直径約16 nmのSシェル (small shell) と直径約29 nmのLシェル (large shell) を形成した。またタグ配列と相互作用するドメインを融合した標的タンパク質を共発現することで、それぞれのシェルの中に標的タンパク質を内包可能であることを確認した。次に、SシェルとLシェルのそれぞれをサイズ排除クロマトグラフィーで分離精製し、異なるpHに調整したリン酸緩衝液中でのそれぞれのシェルの安定性を動的光散乱法を用いて評価した。その結果、AaLS-ST1シェル単体では、Sシェル、Lシェルともに、pH 6以下の弱酸性環境化でシェルが崩壊し、崩壊したシェルが凝集する様子が観察された。また、内包タンパク質を含有したシェルにおいても弱酸性環境下におけるシェルの崩壊が示唆された。今後は、シェルの崩壊によって内包タンパク質が放出され、その活性を示すことを検証する予定である。弱酸性環境下で崩壊する本シェルシステムは、将来的にがん組織特異的な内包物質の放出やエンドソーム内での内包物質の放出などに利用できると期待される。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
Artificial protein shells hold promise for a novel drug delivery system (DDS) capable of transporting functional proteins into target cells. While successful encapsulation of target proteins within these shells has been achieved, the development of techniques for their controlled release remains a challenge. In this study, we aimed to design a system wherein artificial protein shells, internalized by cells through endocytosis, could efficiently release therapeutic molecules within acidic environments such as endosomes or lysosomes. We assessed the stability of the AaLS-ST1 shell, which is a mutant of lumazine synthase from Aquifex aeolicus designed to encapsulate target proteins. Expression of AaLS-ST1 in Escherichia coli led to the formation of two distinct shell types: S shells (small shell) with a diameter of approximately 16 nm and L shells (large shell) with a diameter of approximately 29 nm. Through co-expression of target proteins fused with the shell-interacting domain, we validated the encapsulation capability of each shell for target proteins. Subsequently, S shells and L shells were purified through size exclusion chromatography, and the stability of each shell variant was assessed using dynamic light scattering in phosphate buffer solutions adjusted to different pH values. Notably, both S shells and L shells collapsed and aggregated in weakly acidic environments with a pH below 6. Furthermore, this collapse phenomenon was also evident in shells containing encapsulated proteins. We now aim to confirm that the encapsulated proteins are released as a result of the shell collapsing and to demonstrate their activity. The potential utilization of this pH-dependent disassembly system is anticipated in the future for the targeted release of cargo substances within cancer tissues or endosomes, where weakly acidic environments are present.						
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)	
佐々木栄太, 竹田彩華, 滝野哲也, 花岡健二郎		DDSへの応用を目指した人工タンパク質シェルの開発		第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム	2023年7月	
佐々木栄太, 竹田彩華, 滝野哲也, 花岡健二郎		標的タンパク質の内包と放出を可能とする人工タンパク質シェルの開発		第17回バイオ関連化学シンポジウム	2023年9月	