

Title	人工タンパク質シェルを用いた新規タンパク質機能制御システムの開発
Sub Title	Development of a novel protein function control system using artificial protein shells
Author	佐々木, 栄太(Sasaki, Eita)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2024
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	生体内において、タンパク質の機能は遺伝子の発現レベルや細胞小器官への局在などによって巧みに制御されている。したがって、タンパク質の機能を人工的に制御することができれば、疾患を含めたさまざまな生命現象の解明や治療方法の研究に役立つはずである。しかし、酵素や抗体などの任意のタンパク質の機能を一元的に制御可能な技術はこれまでに確立されていない。そこで本研究では、人工改変した非ウイルス性のタンパク質シェルを用いて、外部刺激応答性の新規タンパク質機能制御システムを開発することを目的とした。そのために、まずは多くの細菌が有するBMC (bacterial microcompartment) と呼ばれる巨大なタンパク質シェル複合体に着目し、任意の標的タンパク質を内包可能な多様な人工タンパク質シェル群の創出を試みた。具体的には、BMCシェル形成タンパク質として知られるEutSとPduUに負電荷のアミノ酸変異を導入し、error prone PCR (epPCR) を用いてランダムな変異を導入したライブラリを構築したのち、正電タグを付与した毒性タンパク質を大腸菌内で共発現させ、生育した大腸菌を選別した。このようにして、毒性低減に働くよう進化したPduU変異体を精製したところ、直径約30、50、70 nmのシェル構造を形成することが明らかとなった。また、encapsulinと呼ばれる細菌由来のタンパク質シェルのループ構造に、HiBit (11 aa), Spytag (13 aa), FP11(16 aa)と呼ばれる3種類のsplit proteinsの部分構造 (ペプチド断片) を導入したシェルタンパク質を設計した。さらに、これらencapsulin改変体が大腸菌内で発現し、ゲル濾過クロマトグラフィー (SEC) で精製することによって、シェルの形成を確かめた。また、split proteinsの部分構造と相互作用するメイン構造 (外部刺激因子) を別に調製しておき、溶液中で混合することによって、split proteinsの相互作用と、それに伴うシェルの崩壊をSECおよび動的光散乱によって検討した。 In living organisms, protein functions are intricately regulated by several factors such as gene expression levels and cellular organelle localization. While artificial control of protein functions holds promise for elucidating biological phenomena and disease mechanisms, a unified technology capable of controlling the function of arbitrary proteins, such as enzymes or antibodies, has not yet been established. Thus, this study aimed to develop a novel protein function control system responsive to external stimuli using artificially modified non-viral protein shells. To achieve this goal, we first decided to create a diverse group of artificial protein shells capable of encapsulating target proteins by utilizing bacterial microcompartment (BMC) shell-forming proteins. We introduced negatively charged amino acid mutations into BMC shell-forming proteins, EutS and PduU, and constructed libraries with random mutations using error-prone PCR (epPCR). Subsequently, we co-expressed toxic proteins tagged with positive charges in Escherichia coli and screened for bacterial growth. Through this process, we identified PduU mutants that had evolved to reduce toxicity by forming shells with diameters of approximately 30, 50, and 70 nm around the toxic proteins. Additionally, we introduced peptide fragments of three split proteins, HiBit (11 aa), Spytag (13 aa), and FP11 (16 aa), into loop structures of an encapsulin, which is a bacterial-derived protein shell. We expressed these modified encapsulins in E. coli and confirmed shell formation by size-exclusion chromatography (SEC). Moreover, we separately prepared the remaining structures of the split proteins (external stimuli factors) and examined their interactions with the peptide fragments in the modified encapsulins. We are currently investigating whether these interactions can induce shell collapse, using SEC and dynamic light scattering.
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20230001-0025

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 福澤基金研究補助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	1,500千円
	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新規タンパク質機能制御システムの開発						
研究課題（英訳）						
Development of a novel protein function control system using artificial protein shells						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
佐々木栄太（Eita Sasaki）		薬学部・専任講師				
1. 研究成果実績の概要						
生体内において、タンパク質の機能は遺伝子の発現レベルや細胞小器官への局在などによって巧みに制御されている。したがって、タンパク質の機能を人工的に制御することができれば、疾患を含めたさまざまな生命現象の解明や治療方法の研究に役立つはずである。しかし、酵素や抗体などの任意のタンパク質の機能を一元的に制御可能な技術はこれまでに確立されていない。そこで本研究では、人工改変した非ウイルス性のタンパク質シェルを用いて、外部刺激応答性の新規タンパク質機能制御システムを開発することを目的とした。そのために、まずは多くの細菌が有するBMC（bacterial microcompartment）と呼ばれる巨大なタンパク質シェル複合体に着目し、任意の標的タンパク質を内包可能な多様な人工タンパク質シェル群の創出を試みた。具体的には、BMCシェル形成タンパク質として知られるEutSとPduUに負電荷のアミノ酸変異を導入し、error prone PCR（epPCR）を用いてランダムな変異を導入したライブラリを構築したのち、正電タグを付与した毒性タンパク質を大腸菌内で共発現させ、生育した大腸菌を選別した。このようにして、毒性低減に働くよう進化したPduU変異体を精製したところ、直径約30、50、70 nmのシェル構造を形成することが明らかとなった。また、encapsulinと呼ばれる細菌由来のタンパク質シェルのループ構造に、HiBit（11 aa）、Spytag（13 aa）、FP11（16 aa）と呼ばれる3種類のsplit proteinsの部分構造（ペプチド断片）を導入したシェルタンパク質を設計した。さらに、これらencapsulin改変体を大腸菌内で発現し、ゲル濾過クロマトグラフィー（SEC）で精製することによって、シェルの形成を確かめた。また、split proteinsの部分構造と相互作用するメイン構造（外部刺激因子）を別に調製しておき、溶液中で混合することによって、split proteinsの相互作用と、それに伴うシェルの崩壊をSECおよび動的光散乱によって検討した。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
In living organisms, protein functions are intricately regulated by several factors such as gene expression levels and cellular organelle localization. While artificial control of protein functions holds promise for elucidating biological phenomena and disease mechanisms, a unified technology capable of controlling the function of arbitrary proteins, such as enzymes or antibodies, has not yet been established. Thus, this study aimed to develop a novel protein function control system responsive to external stimuli using artificially modified non-viral protein shells. To achieve this goal, we first decided to create a diverse group of artificial protein shells capable of encapsulating target proteins by utilizing bacterial microcompartment (BMC) shell-forming proteins. We introduced negatively charged amino acid mutations into BMC shell-forming proteins, EutS and PduU, and constructed libraries with random mutations using error-prone PCR (epPCR). Subsequently, we co-expressed toxic proteins tagged with positive charges in Escherichia coli and screened for bacterial growth. Through this process, we identified PduU mutants that had evolved to reduce toxicity by forming shells with diameters of approximately 30, 50, and 70 nm around the toxic proteins. Additionally, we introduced peptide fragments of three split proteins, HiBit (11 aa), Spytag (13 aa), and FP11 (16 aa), into loop structures of an encapsulin, which is a bacterial-derived protein shell. We expressed these modified encapsulins in E. coli and confirmed shell formation by size-exclusion chromatography (SEC). Moreover, we separately prepared the remaining structures of the split proteins (external stimuli factors) and examined their interactions with the peptide fragments in the modified encapsulins. We are currently investigating whether these interactions can induce shell collapse, using SEC and dynamic light scattering.						
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）
藤井惇嗣, 佐々木栄太, 花岡健二郎		BMCタンパク質の分子進化による新規シェル構造体の創出		第23回日本蛋白質科学会年会		2023年7月

Eita Sasaki, Atsushi Fujii, Kenjiro Hanaoka	Creation of Novel Proteinaceous Shell Structures through Molecular Evolution of Bacterial Microcompartment (BMC) Shell Proteins	12th Annual Conference of the International Chemical Biology Society	2023年10 月
--	--	--	--------------