

Title	AIによるタンパク質立体構造予測を利用した細胞内mTORシグナルセンサーの開発
Sub Title	Development of genetically encoded mTOR sensor using AI based protein structure prediction
Author	新藤, 豊(Shindo, Yutaka)
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	本研究では、既存の遺伝子コード型mTORシグナルセンサーよりも性能が良いセンサーの開発を、AIによるタンパク質構造予測プログラムであるAlphaFold2を用いて効率的に行うことを目指した。mTORのターゲットタンパク質の一つである4E-BP1を、CFPおよびYFPの2種類の蛍光タンパク質の組み合わせることで、FRET型のセンサーを設計した。この場合、4E-BP1のリン酸化による構造変化で、その両端に付けたCFP-YFPの位置関係が大きく変化すれば、mTORシグナルをCFP-YFPの蛍光比の大きな変化に変換することができる。まず、4E-BP1の中でもmTORによりリン酸化を受ける部位と、その影響で構造が変化する部位の周辺のみを使用することを考え、どの部位を使用することで効率よくCFP-YFP位置関係を偏差させることができるかをAlphaFold2による構造予測で評価した。また、蛍光タンパク質の種類による違いも評価した。20種類程度のパターンについて評価を行い、予測結果が良いものを絞り込んだ後、そのうち上位6種類について実際にそのセンサーをコードするプラスミドDNAの作製を試みた。その中で、作製に成功したプラスミドDNAをHeLa細胞に導入してセンサーを発現させ、mTOR活性化剤およびmTOR阻害剤をかけた時の応答を観察することでセンサーの応答を評価した。AlphaFold2による予測では一番応答が良いと思われた候補では実際にはあまり良い応答は得られなかったものの、作った候補の中には既存のmTORセンサーと同等以上に応答するものが含まれていた。AIツールを用いたセンサー候補の予測精度はまだあまり高くないものの、少ない候補の中から実際に機能するものが得られたことを考えると、こういったアプローチはある程度の絞り込みには使えるという結果が得られた。 We aimed to develop a sensor with better performance than certain genetically encoded mTOR sensors using AlphaFold2, an AI-based protein structure prediction program. A FRET-type sensor was designed by combining 4E-BP1, one of the target proteins of mTOR, with two fluorescent proteins, CFP and YFP. In this case, the structural change caused by phosphorylation of 4E-BP1 causes a large change in the relative position of CFP and YFP, and the mTOR signal can be converted into a large change in the fluorescence ratio of CFP and YFP. In the 4E-BP1, we used only the site that is phosphorylated by mTOR and the area around the site where the structure changes due to this influence. We evaluated which site and which fluorescent proteins can be used to efficiently deviate the CFP-YFP positional relationship through structural prediction using AlphaFold2. After evaluating about 20 patterns with AlphaFold2, we attempted to create plasmid DNA that actually encodes the sensors for the top six patterns. Among them, the successfully created plasmid DNA was induced into HeLa cells to express the sensor, and the response of the sensor was evaluated by observing the response when applied with an mTOR activator and an mTOR inhibitor. Although the candidate that AlphaFold2 predicted to be the best response actually did not have a very good response, some of the candidates created responded as well as or better than existing mTOR sensors. This indicate that the prediction accuracy of sensor design using AI tools is still not very high. However, considering that we were able to obtain a sensor candidate that actually works from a small number of candidates, the results show that this approach can be used as a first screening of the sensor candidates.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230071

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	理工学部	職名	専任講師（有期）	補助額	1,000千円 （特A）
	氏名	新藤 豊	氏名（英語）	Yutaka Shindo		
研究課題（日本語）						
AIによるタンパク質立体構造予測を利用した細胞内mTORシグナルセンサーの開発						
研究課題（英訳）						
Development of genetically encoded mTOR sensor using AI based protein structure prediction						
1. 研究成果実績の概要						
本研究では、既存の遺伝子コード型mTORシグナルセンサーよりも性能が良いセンサーの開発を、AIによるタンパク質構造予測プログラムであるAlphaFold2を用いて効率的に行うことを目指した。mTORのターゲットタンパク質の一つである4E-BP1を、CFPおよびYFPの2種類の蛍光タンパク質の組み合わせることで、FRET型のセンサーを設計した。この場合、4E-BP1のリン酸化による構造変化で、その両端に付けたCFP-YFPの位置関係が大きく変化すれば、mTORシグナルをCFP-YFPの蛍光比の大きな変化に変換することができる。まず、4E-BP1の中でもmTORによりリン酸化を受ける部位と、その影響で構造が変化する部位の周辺のみを使用することを考え、どの部位を使用することで効率よくCFP-YFP位置関係を偏差させることができるかをAlphaFold2による構造予測で評価した。また、蛍光タンパク質の種類による違いも評価した。20種類程度のパターンについて評価を行い、予測結果が良いものを絞り込んだ後、そのうち上位6種類について実際にそのセンサーをコードするプラスミドDNAの作製を試みた。その中で、作製に成功したプラスミドDNAをHeLa細胞に導入してセンサーを発現させ、mTOR活性化剤およびmTOR阻害剤をかけた時の応答を観察することでセンサーの応答を評価した。AlphaFold2による予測では一番応答が良いと思われた候補では実際にはあまり良い応答は得られなかったものの、作った候補の中には既存のmTORセンサーと同等以上に応答するものが含まれていた。AIツールを用いたセンサー候補の予測精度はまだあまり高くないものの、少ない候補の中から実際に機能するものが得られたことを考えると、こういったアプローチはある程度の絞り込みには使えるという結果が得られた。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
We aimed to develop a sensor with better performance than certain genetically encoded mTOR sensors using AlphaFold2, an AI-based protein structure prediction program. A FRET-type sensor was designed by combining 4E-BP1, one of the target proteins of mTOR, with two fluorescent proteins, CFP and YFP. In this case, the structural change caused by phosphorylation of 4E-BP1 causes a large change in the relative position of CFP and YFP, and the mTOR signal can be converted into a large change in the fluorescence ratio of CFP and YFP. In the 4E-BP1, we used only the site that is phosphorylated by mTOR and the area around the site where the structure changes due to this influence. We evaluated which site and which fluorescent proteins can be used to efficiently deviate the CFP-YFP positional relationship through structural prediction using AlphaFold2. After evaluating about 20 patterns with AlphaFold2, we attempted to create plasmid DNA that actually encodes the sensors for the top six patterns. Among them, the successfully created plasmid DNA was induced into HeLa cells to express the sensor, and the response of the sensor was evaluated by observing the response when applied with an mTOR activator and an mTOR inhibitor. Although the candidate that AlphaFold2 predicted to be the best response actually did not have a very good response, some of the candidates created responded as well as or better than existing mTOR sensors. This indicate that the prediction accuracy of sensor design using AI tools is still not very high. However, considering that we were able to obtain a sensor candidate that actually works from a small number of candidates, the results show that this approach can be used as a first screening of the sensor candidates.						
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）			