

Title	人工タンパク質の幾何学対称性を利用した微生物集積法の開発
Sub Title	Development of a microbial aggregation method utilizing the geometric symmetry of an artificial protein nanocage
Author	川上, 了史(Kawakami, Norifumi)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2025
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	特定の微生物を選択的に捕集する仕組みの開発を目的とした研究を進めてきた。簡単には、申請者が設計した中空球状タンパク質TIP60をベースとして、その表面に微生物に結合するペプチド(バインダー)を提示することで、微生物を捕集する仕組みである。微生物のモデルとして大腸菌を選び、大腸菌べん毛に特異的に結合するバインダーを設計し、これをTIP60に融合、提示した。さらに、その大腸菌の捕集能も検討した。 すでにTIP60にバインダーを融合した分子は得られていたが、実際に正しく立体構造を形成できることは確認できていなかった。そこでこれを小角X線散乱分析を行い、本来の球状構造を形成していることを確認した。また、予備検討では、目視での微生物捕集能を検討していたが、こちらは大きな変化は認められなかった。そこで、試料を顕微鏡下で観察をすると、タンパク質分子の添加の有無で、細胞の密度が異なるような画像が得られた。他方で、TIP60のみでも同様のパターンも認められており、これがバインダーによる影響であることを明瞭に示すことはできなかった。そこで、分子レベルで解析をするために、べん毛タンパク質を個別に調製し、バインダーを融合したTIP60と混合することで結合を試験管内で検証する系の構築に着手した。こちらの結果も一部でTIP60とべん毛タンパク質が結合している可能性が示唆された。しかし、精製したべん毛タンパク質は、多様な構造を有しており、正しい構造を有するべん毛タンパク質と特異的な結合をしているところまで示すことができなかった。 一連の分析から仮に結合しても結合を検証する手法が不十分であることが課題となることが予想された。次年度は、これを開発するためにTIP60の機能化研究を行い、相互作用の検出手法の開発に移行する計画である。 We have been conducting research aimed at developing a mechanism for selectively capturing specific microorganisms. We designed a hollow, spherical protein, TIP60, and engineered its surface to display peptides (binders) that bind to microorganisms, thereby enabling their capture. As a model microorganism, we selected <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) and designed a binder that specifically binds to the <i>E. coli</i> flagellum. This binder was fused to TIP60 and displayed on its surface. Additionally, we evaluated its capability to capture <i>E. coli</i>. Although the binder-fused TIP60 molecule had already been obtained, its proper three-dimensional structural formation had not been confirmed. Therefore, small-angle X-ray scattering analysis was conducted, confirming that TIP60 retained its original spherical structure. In preliminary evaluations, the microbial capture ability was assessed visually, but no significant changes were observed. Consequently, microscopic observations were conducted, revealing differences in cell density depending on the presence or absence of the protein molecules. However, a similar pattern was observed even with TIP60 alone, making it difficult to conclusively attribute the effect to the binder. To analyze the interaction at the molecular level, we prepared purified flagellar proteins separately and established an in vitro assay system by mixing them with TIP60 fused with the binder to evaluate binding. The results suggested that TIP60 and the flagellar protein interacted in some cases. However, since the purified flagellar proteins exhibited diverse structures, it was not possible to clearly demonstrate specific binding between TIP60 and correctly structured flagellar proteins. Based on these data, we anticipated that even if binding occurred, the current methods for verifying the interaction were insufficient. Therefore, in the next phase of research, we plan to functionalize TIP60 and develop improved detection methods for interactions.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2024000001-20240108

2024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	補助額	1,000千円 (特A)
	氏名	川上 了史	氏名(英語)	Norifumi Kawakami		
研究課題(日本語)						
人工タンパク質の幾何学対称性を利用した微生物集積法の開発						
研究課題(英訳)						
Development of a microbial aggregation method utilizing the geometric symmetry of an artificial protein nanocage						
1. 研究成果実績の概要						
特定の微生物を選択的に捕集する仕組みの開発を目的とした研究を進めてきた。簡単には、申請者が設計した中空球状タンパク質TIP60をベースとして、その表面に微生物に結合するペプチド(バインダー)を提示することで、微生物を捕集する仕組みである。微生物のモデルとして大腸菌を選び、大腸菌べん毛に特異的に結合するバインダーを設計し、これをTIP60に融合、提示した。さらに、その大腸菌の捕集能も検討した。 すでにTIP60にバインダーを融合した分子は得られていたが、実際に正しく立体構造を形成できることは確認できていなかった。そこでこれを小角X線散乱分析を行い、本来の球状構造を形成していることを確認した。また、予備検討では、目視での微生物捕集能を検討していたが、こちらは大きな変化は認められなかった。そこで、試料を顕微鏡下で観察をすると、タンパク質分子の添加の有無で、細胞の密度が異なるような画像が得られた。他方で、TIP60のみでも同様のパターンも認められており、これがバインダーによる影響であることを明瞭に示すことはできなかった。そこで、分子レベルで解析をするために、べん毛タンパク質を個別に調製し、バインダーを融合したTIP60と混合することで結合を試験管内で検証する系の構築に着手した。こちらの結果も一部でTIP60とべん毛タンパク質が結合している可能性が示唆された。しかし、精製したべん毛タンパク質は、多様な構造を有しており、正しい構造を有するべん毛タンパク質と特異的な結合をしているところまで示すことができなかった。 一連の分析から仮に結合しても結合を検証する手法が不十分であることが課題となることが予想された。次年度は、これを開発するためにTIP60の機能化研究を行い、相互作用の検出手法の開発に移行する計画である。						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
We have been conducting research aimed at developing a mechanism for selectively capturing specific microorganisms. We designed a hollow, spherical protein, TIP60, and engineered its surface to display peptides (binders) that bind to microorganisms, thereby enabling their capture. As a model microorganism, we selected Escherichia coli (E. coli) and designed a binder that specifically binds to the E. coli flagellum. This binder was fused to TIP60 and displayed on its surface. Additionally, we evaluated its capability to capture E. coli. Although the binder-fused TIP60 molecule had already been obtained, its proper three-dimensional structural formation had not been confirmed. Therefore, small-angle X-ray scattering analysis was conducted, confirming that TIP60 retained its original spherical structure. In preliminary evaluations, the microbial capture ability was assessed visually, but no significant changes were observed. Consequently, microscopic observations were conducted, revealing differences in cell density depending on the presence or absence of the protein molecules. However, a similar pattern was observed even with TIP60 alone, making it difficult to conclusively attribute the effect to the binder. To analyze the interaction at the molecular level, we prepared purified flagellar proteins separately and established an in vitro assay system by mixing them with TIP60 fused with the binder to evaluate binding. The results suggested that TIP60 and the flagellar protein interacted in some cases. However, since the purified flagellar proteins exhibited diverse structures, it was not possible to clearly demonstrate specific binding between TIP60 and correctly structured flagellar proteins. Based on these data, we anticipated that even if binding occurred, the current methods for verifying the interaction were insufficient. Therefore, in the next phase of research, we plan to functionalize TIP60 and develop improved detection methods for interactions.						
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)	
土方太陽、川上了史、新井亮一、宮本憲二		非共有結合で細胞間を連結するための新規分子設計		第50回生体分子科学討論会	2024年6月	
土方太陽、川上了史、新井亮一、宮本憲二		微生物を連結するタンパク質の設計		第76日本生物工学会	2024年9月	

土方太陽、川上了史、新井亮一、宮本憲二	大腸菌鞭毛を連結する人工タンパク質ナノケー ジの作成：計算機によ るバインダー設計と実 験的評価	日本化学会第105回春 季年会	2025年3月
---------------------	---	--------------------	---------