

人工タンパク質ナノケージの再設計を通じた会合制御と 機能化に向けた分子基盤の構築

2024 年度

大原 直也

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	㊦ 乙 第	号	氏 名	大原直也
主 論 文 題 名 : 人工タンパク質ナノケージの再設計を通じた会合制御と機能化に向けた分子基盤の構築				
(内容の要旨) タンパク質ケージは、複数のタンパク質が自発的に会合して形成されるナノ粒子である。その中空の構造を利用して様々な機能化が検討されてきた。しかし、タンパク質の会合状態を制御するような仕組みを利用する機能化は、難易度の高さからほとんど行われていない。著者の所属する研究室では、人工的に設計したタンパク質が 60 分子会合することでできるナノケージ TIP60 を構築することに成功した。本論文では、その解離と会合の制御手法を中心に、機能化に向けた基盤技術の開発を行った。 第一章では、本研究の内容と目的をまとめた。 第二章では、金属イオンの添加に応答して会合解離する変異体 mTIP60 の構築を行った。ここではまず、会合に重要な残基に対する変異導入により、60 量体を形成できない変異体 (K67E) を構築した。ここで、K67E の側鎖を含め複数の酸素原子がサブユニット界面に集中していたことに着目し、それらと相互作用しやすいアルカリ土類金属イオンによりサブユニット間を再度架橋する事ができると考えた。実際、変異体に Ca や Ba イオンを添加すると高い効率で 60 量体が形成された。さらに、金属による会合解離を利用し、ssDNA 分子の内包と放出についても実証した。 第三章では、TIP60 ケージの内部表面に、機能化に利用しやすい N 末端や C 末端を配置することを目的として、鋳型のサブユニットを分割する split protein system を適用した。得られたフラグメントを大腸菌で共発現させた場合、フラグメントを個別に精製して試験管内で混合した場合の両者で TIP60 と同様の構造が形成されることを突き止めた。さらに、K67E 変異体を鋳型にして同様の分割を行うと、フラグメントは自動的に会合することはなく、TIP60 と同様の構造を形成するのにアルカリ土類金属イオンが必要であることも明らかになった。 第四章では、一連の研究で明らかになった点をまとめた他、将来展望として、金属イオン依存的な会合の仕組みとフラグメント化により導入された新たな末端を修飾する技術を組み合わせることで、様々な機能性ペプチドやタンパク質の効率的な内包ができる可能性を論じた。				

Thesis Abstract

No. _____

Registration Number	☒ "KOU" ☐ "OTSU" No. _____ *Office use only	Name	Naoya Ohara
Thesis Title Re-design of an artificial protein nanocage for the controllable assembly and functionalization			
Thesis Summary The hollow protein nanoparticles, also known as nanocages, are produced through the association of multiple protein molecules and hold promise for various applications. Although many approaches for applications have been developed thus far, the applications based on controlling association and dissociation of proteins are not often reported. In this paper, I designed metal dependent association and dissociation system of protein nanocage based on TIP60 that is an artificially designed 60-mer protein nanocage. Furthermore, this system can be used in conjunction with a split protein system that introduces new N- and C-termini of the protein. In Chapter 1, I introduced research background and TIP60, In Chapter 2, I have designed a metal-induced assembly of TIP60. Initially, I introduced mutation (K67E) at the subunit interface region so that the mutant cannot spontaneously form a 60-mer. Because the mutant has multiple oxygen atoms at the subunit interface, I hypothesized that alkaline earth metal ions, which preferentially interact with these oxygen atoms, could again crosslink the subunits. As a result, the addition of Ca, Sr, and Ba ions efficiently induced the formation of the 60-mer. In Chapter 3, I introduced new termini into the internal surface of the TIP60 cage by splitting the subunit. Co-expression of the two fragments in cells resulted in the formation of cage structure as the same as before splitting. The re-assembly of the separately purified fragments were also observed in test tube. Interestingly, splitting the K67E mutant give no cage structure unless metal ions were supplemented. Cryo-EM analysis revealed that the newly introduced termini were on the internal surface of the cage as designed. In Chapter 4, the research findings are summarized, and the future prospects, particularly those related to the combination of the metal-induced assembly system and the split protein system, are discussed.			