

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14739

研究課題名(和文)細胞工学を指向した設計ペプチドによる人工分離構造の合理的構築

研究課題名(英文)Rational construction of artificial phase separation for cell engineering with designed peptides

研究代表者

三木 卓幸(Miki, Takayuki)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：20823991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では、タンパク質が自己組織化して集合体を形成する。特に、非膜オルガネラは生化学・細胞生物学において注目されている。我々は、このような細胞内集合体を模倣し人工的に構築するために、シートペプチドタグを利用して人工的なタンパク質集合体を形成させる技術を開発した。本手法は、疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸の繰り返し配列からなるde novoペプチドを、標的タンパク質に遺伝工学的に融合させる。細胞内で発現したタグ融合タンパク質は、自発的に集合してクラスターを形成することを明らかとした。さらに、タグの配列を変更することにより、分配係数や構造体の物理的特性を容易に調整することができることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で開発したペプチドタグ技術は、細胞内でタンパク質集合体を自由自在に設計し、構築する普遍的な手法である。本手法によって、細胞内におけるタンパク質集合体の機能をbottom-upアプローチ研究で調べることが可能となった。実際に、Nck1タンパク質のクラスターを人工的作成でき、クラスター形成における機能発現を細胞内で直接的に評価することに成功した。更に、わずか10残基程度のペプチドをタンパク質に導入するだけのシンプルな手法であることから、容易に多成分の集合体を構築できる。以上のことから、本研究で開発した自己集合性ペプチドタグ技術は、細胞を工学的に改変する基盤的技術になりえる。

研究成果の概要(英文)：In living systems, proteins self-assemble into large bodies, which play fundamental roles. Especially, membraneless organelle draws attention from biochemical and cell biological communities. To mimic and artificially construct these assemblies in living cells, we exploited beta-sheet peptide tags to form artificial polymeric assemblies. In this concept, de novo peptides composed of alternative repeats of hydrophobic and hydrophilic amino acids are genetically fused to the protein of interest. The tag-fused protein expressed in cells spontaneously assembles to form polymeric clusters. Moreover, by modifying the tag sequence, we can easily tune the partition coefficient and the physical properties of the structures.

研究分野：ペプチド工学

キーワード：de novo peptide protein assembly in cell reconstitution cell engineering Nck1 self-sorting

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の複合体形成は、さまざまな細胞内でのイベントの根底にある。例えば、アクチンは重合して細胞骨格を形成し、細胞形態の維持や細胞移動などの機能の一旦を担う。また、相分離液滴は外部刺激や細胞周期などに応じて形成され、特定の細胞機能に関連した蛋白質群が集積することで、反応を局所に集約し機能を発現する。そのため、蛋白質集合体を細胞内で人為的に作成し模倣する合成生物学的な研究は、分子メカニズムの解明や細胞工学に有効的な手法になり得る。人為的に蛋白質複合体を構築する方法として、FKBP や SH3 ドメインなどの蛋白質タグ、coiled-coil ペプチドなどが利用される。細胞内で二量体やオリゴマーを形成する方法として、これらは非常にパワフルなツールである。しかし一方で、高次な構造体を形成する技術は、近年開発がスタートしたばかりであり、未だ発展途上であった。

## 2. 研究の目的

我々は、細胞内で人工的に高次蛋白質複合体を合理的に構築できる技術開発を第一の目的に定めた。その戦略として、 $\beta$ -sheet 設計ペプチドタグの開発を目指した。これは、集積化したい蛋白質にペプチドタグを遺伝子工学的に融合することで、蛋白質が細胞内で自発的に集積化し高次構造体を構築する手法である(図1)。

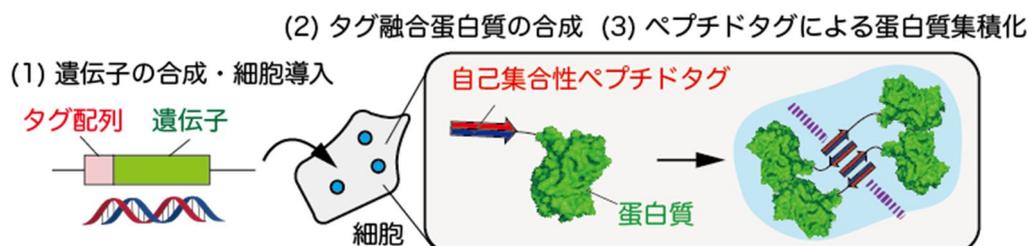


図1. 自己集合化ペプチドタグによる細胞内での蛋白質高次構造体の作成

また、この人工的な自己集合性ペプチドタグ技術を用いて、細胞内での解析が困難であった高次構造体と機能発現の関連を合成生物学アプローチによって解析することを本研究の2つ目の目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞内で任意の蛋白質を集積化する技術として、自己集合性ペプチドに着目した。自己集合性ペプチドは、世界的に精力的に研究され尽くしてきた成熟した分野の1つである。様々な配列のペプチドが開発されてきたが、その中で筆者の所属する三原研究室では、カノニカルな20種類のアミノ酸で構成されるペプチドを開発してきた。例えば、E1Y9 ペプチド (EY EY K Y E Y K Y) は、疎水性のチロシン(Y)と親水性のグルタミン酸(E)とリシン(K)を繰り返した、極めてシンプルな人工ペプチドである。これは  $\beta$ -strand 構造を形成した際に、片面にチロシンが配列した疎水面を、もう片面に電荷をもったアミノ酸が配列した親水面をもつ。その両親媒性の特徴から、それぞれが自己集合して、アミロイド様の Thioflavin 陽性のファイバー構造となる。そこで我々は、Y9 ペプチドを基本骨格として細胞内での集合化するペプチドタグの開発を行うことにした。

## 4. 研究成果

### (4-1) 自己集合性ペプチド Y15 タグの開発

細胞内は、多様な蛋白質等の生体分子が高濃度で混在する夾雑な環境である。さらに、細胞内で発現する蛋白質は  $\mu\text{M}$  以下と低濃度である。その為、ペプチド間相互作用には、高い特異性および親和性が必要と思われる。これらを満たすペプチドを開発する為、YEYK の繰り返し配列で構成される Yn ペプチドを基本骨格とし、鎖長の異なる4つのペプチド(Y9, Y11, Y13, Y15)を合成し、その自己集合性について評価した(図 2a, b)。アミロイド様構造体の形成量を Thioflavin T の蛍光強度で評価したところ、低濃度(25  $\mu\text{M}$ )条件において、Y13以上の鎖長が自己集合体形成に必須であることが分かった(図 2c)。また、IR スペクトルから、これらのペプチドは  $\beta$ -sheet 構造を形成することが判明し、TEM 観察から Y13 および Y15 ペプチドはナノファイバーを形成することが明らかとなった(図 2d)。

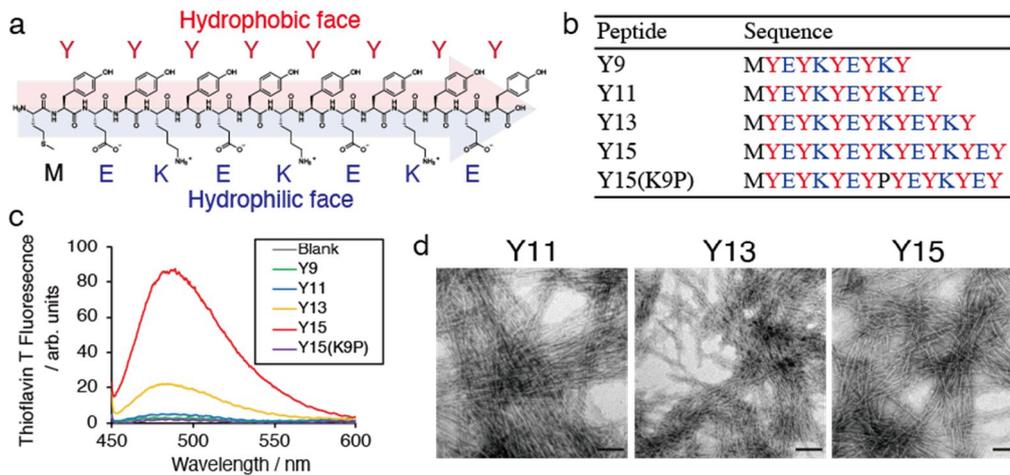


図 2. Yn ペプチドの自己集合. (a) Y15 ペプチドの分子構造. (b) 本検討で用いた鎖長の異なる Yn ペプチド. (c) Thioflavin-T 蛍光によるペプチド自己集合の評価. (d) Yn 自己集合ペプチドの TEM 観察

Y15 ペプチドタグによる蛋白質集積化について検討するため、蛍光蛋白質 sfGFP をモデル蛋白質とし、Y15-sfGFP を大腸菌で発現し精製した (図 3a)。DLS 測定の結果、Y15-sfGFP は 60 nm 程度の集合体として観察された (図 3b)。これらから、Y15 ペプチド融合によってクラスターを形成することが明らかとなった。また、Y15-sfGFP を TEM 観察したところ、幅 13 nm の湾曲したファイバー構造が観察された (図 3c)。この幅は、anti-parallel  $\beta$ -sheet を形成した場合の幅と良く一致しており、想定した Y15 ペプチド間の相互作用によって集積していることが示された。Y15-sfGFP の蛍光異方性は sfGFP と比べて 1.7 倍低下し、クラスター形成に伴った homo-FRET の影響が観察された (図 3d)。

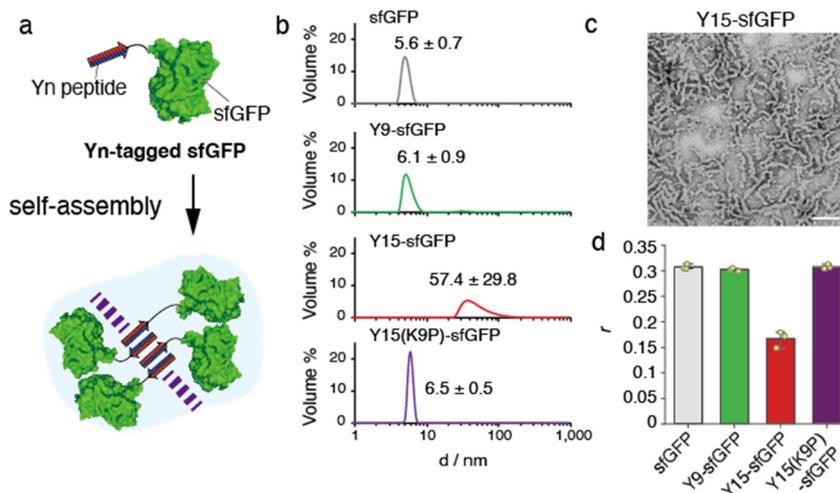


図 3. Yn-sfGFP の自己集合. (a) Yn タグによる sfGFP の自己集合スキーム. (b) Yn-sfGFP 水溶液の DLS 解析結果. (c) Y15-sfGFP の TEM 画像. (d) Yn-sfGFP 溶液の蛍光異方性

次に、細胞内で Y15 ペプチドタグによる蛋白質のクラスター形成を検討した。HEK293 細胞に Y15-sfGFP を発現し、蛍光観察すると顆粒状に観察された (図 4a)。anti-HA 抗体を用いて Pull-down アッセイを行ったところ、双方の蛍光蛋白質に Y15 ペプチドを融合した時のみ sfGFP が共沈降した (図 4b)。試験管での検討と同様に Y15 融合によって蛍光異方性の低下がみられ、クラスター形成が示唆された (図 4c)。この結果から細胞内でも Y15 ペプチド間で相互作用をすることが示された。更に、四量体 AG (AzamiGreen) 蛍光蛋白質に Y15 を融合した場合、明瞭な顆粒状の集合体が細胞内で形成された (図 4d)。光電子顕微鏡法で詳細に観察すると、100 nm スケールの集合体が集まって  $\mu\text{m}$  スケールの構造になっていることが分かった (図 4e)。これを人工的な足場として、機能性の蛋白質を濃縮すれば、合理的に集合体を作れると考えた。実際に、サイズに小さい SOD1 や大きい HSP70 等に Y15 タグを融合し Y15-AG と共に発現すると、これらを細胞内で集積できた。

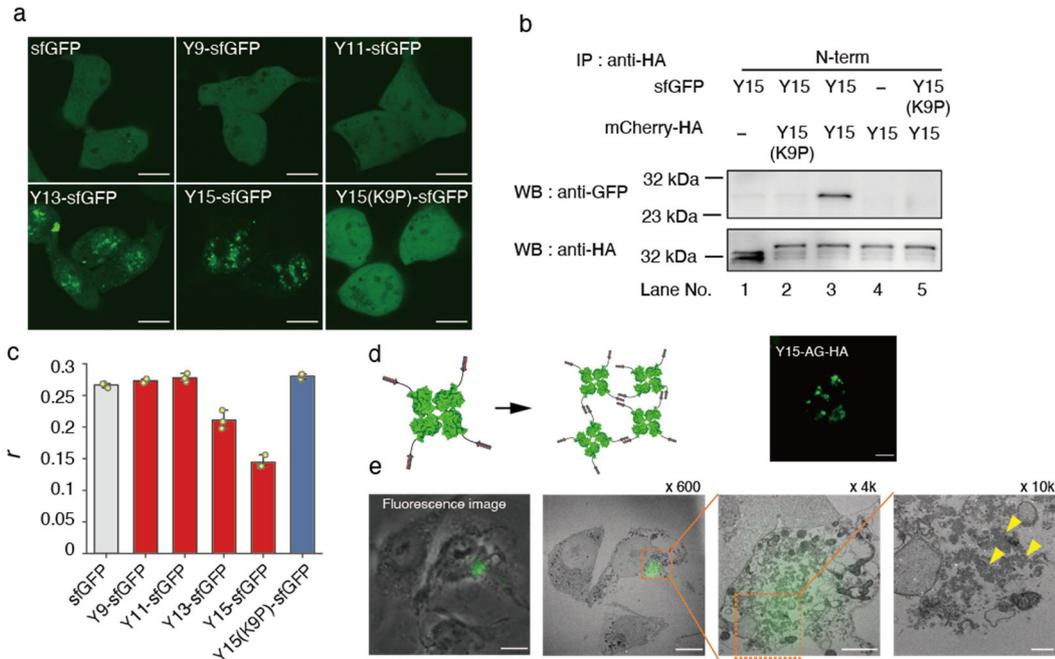


図4. Yn-sfGFP の細胞内での自己集合. (a) Yn-sfGFP 発現 HEK293 細胞の共焦点顕微鏡観察. (b) Yn-sfGFP と Yn-mCherry-HA の Pull down 実験結果. (c) 細胞内での Yn-sfGFP 由来の蛍光異方性評価. (d) Y15-AG 蛋白質による細胞内の顆粒形成. (e) 光電子相関顕微鏡法による Y15-AG の自己集合体イメージング観察.

#### (4-2) Y15 タグを用いた細胞内での Nck1 集合体の作成とアクチン重合反応の解析

Y15 によって生理的機能をもつ人工的な集合体を作成できるかを実証するため、筆者はアクチン重合に関わる Nck1 蛋白質に着目した。Nck1 はクラスター化することで、N-WASP や Arp2/3 complex などと相互作用してアクチン重合を促進することが知られる。Y15 ペプチドの融合によって Nck1 を Y15-AG からなる顆粒に集積した結果、人工構造を起点としてアクチンフィブリルが伸長していた (図 5a, b)。本手法は、容易に集合体の組成をコントロールできることが 1 つの長点である。Nck1 の密度の異なる集合体を作成しアクチン重合量を比較すると、アクチン重合に最適な Nck1 密度が存在することが判明した (図 5c)。これは、試験管内で観察されていた現象とよく一致する結果であった。本研究で、細胞内環境でも同様な傾向があることを見出せた。

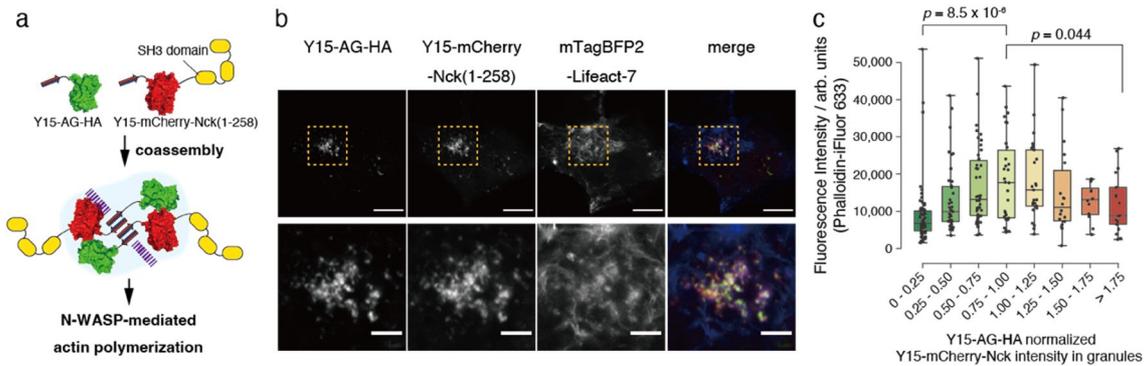


図5. Nck1(1-258)集積化による細胞内アクチン重合. (a) Y15-AG と Y15-mCherry-Nck(1-258) の共発現による Nck1 クラスターの形成. (b) Nck1(1-258) クラスター形成に伴ったアクチン重合. (c) クラスター内の Nck1(1-258) 密度におけるアクチン重合反応への影響.

#### (4-3) 直交的に self-sorting するペプチドタグの開発

ペプチドタグ技術の開発において、ペプチド配列と細胞内での自己集合の関連を明らかにする必要があった。そこで、Y15 配列を基本骨格として疎水性残基や親水性残基を変え、細胞内での自己集合の評価を行ったところ、疎水性の高いアミノ酸残基が自己集合を促進する傾向があった。同時に、融合した蛋白質の folding への影響が顕著になることも判明した。

その過程で偶然にも、トリプトファン(W)を疎水基に用いた W13 ペプチド と Y15 ペプチドは、それぞれ細胞内で独立して集合することが判り、2 種の集合体を同一細胞内で作成できた (図 6a, b)。これらのペプチドは試験管内でも直交的に自己集合することが CD スペクトルの結果からサポートされた (図 6c)。

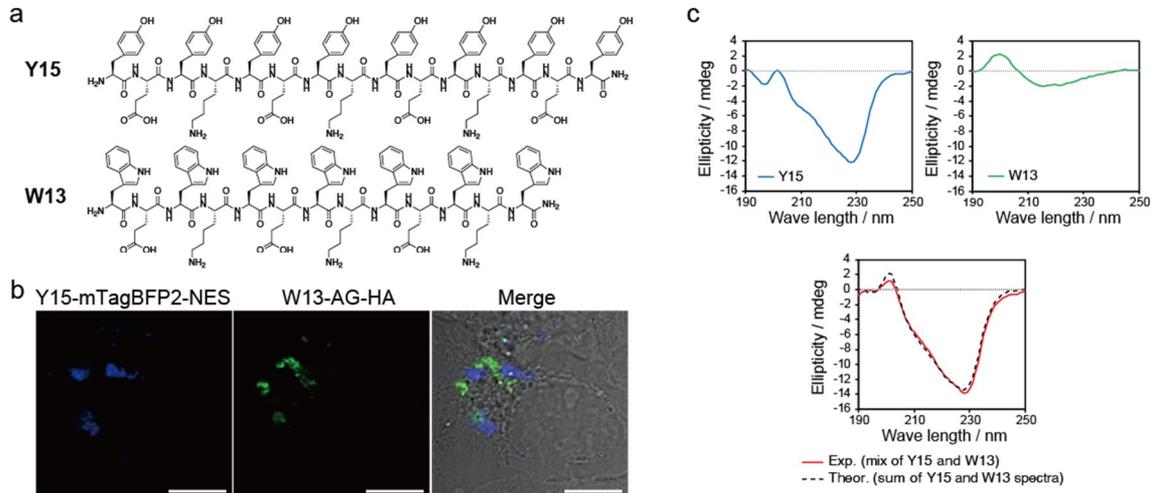


図 6 . Yn-sfGFP の細胞内での自己集合 . (a) Y15 ペプチドと W13 ペプチドの化学構造 . (b) ペプチド溶液の CD スペクトル . (c) 細胞内での Y15-mTagBFP2-NES と W13-AG-HA の直交的な集合体形成

このように、人工配列によるペプチドを使った「細胞内超分子化学」の新たな研究領域を開拓できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miki Takayuki, Nakai Taichi, Hashimoto Masahiro, Kajiwara Keigo, Tsutsumi Hiroshi, Mihara Hisakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Intracellular artificial supramolecules based on de novo designed Y15 peptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23794-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miki Takayuki, Hashimoto Masahiro, Nakai Taichi, Mihara Hisakazu	4. 巻 57
2. 論文標題 A guide-tag system controlling client enrichment into Y15 peptide-based granules for an in-cell protein recruitment assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11338 ~ 11341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1CC03450B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miki Takayuki, Kajiwara Keigo, Nakayama Sae, Hashimoto Masahiro, Mihara Hisakazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of Hydrophobic Residues on the Intracellular Self-Assembly of De Novo Designed Peptide Tags and Their Orthogonality	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2144 ~ 2153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.2c00058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 5件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 三木 卓幸・橋本 匡浩・高橋 広樹・梶原 圭悟・中山 彩恵・中井 太一・三原 久和
2. 発表標題 両親媒性ペプチドによる細胞内での蛋白質高次構造体の形成
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Miki, Masahiro Hashimoto, Taichi Nakai, Keigo Kajiwara, Hisakazu Mihara
2. 発表標題 INTRACELLULAR RECONSTITUTION AND ANALYSIS OF PROTEIN COMPLEXES BY YN SELF-ASSEMBLING PEPTIDE TAGS
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Miki, Taichi Nakai, Masahiro Hashimoto, Keigo Kajiwara, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara
2. 発表標題 Development of -sheet Y15 peptide for integrating protein in cells
3. 学会等名 The international chemical congress of pacific basin societies 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 匡浩・三木 卓幸・中井 太一・丹羽 達也・三原久和
2. 発表標題 細胞内で自己集合するペプチドタグ開発1：クラスター形成を伴う蛋白質間相互作用解析
3. 学会等名 日本化学会 第102回 春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 卓幸・高橋 広樹・橋本 匡浩・梶原 圭悟・中山 彩恵・三原久和
2. 発表標題 細胞内で自己集合するペプチドタグ開発2：蛋白質高次構造体の設計と構築
3. 学会等名 日本化学会 第102回 春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 卓幸
2. 発表標題 細胞内で液-液相分離を作る設計ペプチドの開発
3. 学会等名 ライフサイエンス部会材料分科会とLiHubの若手交流会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Miki
2. 発表標題 Development of self-assembling peptide tag for intracellular reconstitution of protein assembly
3. 学会等名 2022 PSK Annual Spring Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 卓幸・橋本 匡浩・中井 太一・梶原 圭悟・高橋 広樹・中山 彩恵・
2. 発表標題 自己集合性ペプチドタグによる超分子の細胞内構築
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 卓幸・橋本 匡浩・高橋 広樹・中山 彩恵・三原久和
2. 発表標題 YKペプチドタグによる細胞内での人工相分離液滴モデルの形成
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Miki・Masahiro Hashimoto・Hiroki Takahashi・Sae Nakayama・Hisakazu Mihara
2. 発表標題 Design of self-assembling peptide tags for protein-based supramolecular construction in living cells
3. 学会等名 The 59th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Miki
2. 発表標題 Construction of intracellular protein supramolecular structures using self-assembling peptide tags
3. 学会等名 Syracuse University, USA (Host: Prof. Ivan Korendovych) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Miki
2. 発表標題 Development of self-assembling peptide tags fabricating protein clusters in living cells
3. 学会等名 Special Seminar Lecture UC Berkeley, USA (Faculty Host: Prof. Chris Chang) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 卓幸
2. 発表標題 De novoペプチドによる相分離液滴の設計と細胞内構築
3. 学会等名 化生セミナー 東京大学 (Faculty Host: 山東教授) (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------