

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Development of self-assembling peptide tags for studying intracellular protein supramolecules
著者(和文)	橋本匡浩
Author(English)	Masahiro Hashimoto
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12750号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:三原 久和,丸山 厚,田口 英樹,神谷 真子,堤 浩
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12750号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of (工学)
学生氏名： Student's Name	橋本 匡浩		審査員主査： Chief Examiner 三原 久和

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

細胞内では、タンパク質同士が非共有結合を介して集積化し、細胞骨格やシグナル伝達複合体、メンブレンレスオルガネラなど機能的な超分子システムを形成する。このようなタンパク質超分子を細胞内で人工構築して模倣することで、その構造形成や機能発現の本質を理解し、人工的な機能性システム構築へと応用することができる。本研究では、細胞内でタンパク質を人工的に集積化させ、超分子システムを形成させるためのビルディングブロックとして自己集合性ペプチドに注目した。従来の研究において盛んであったタンパク質工学ベースの集積化タグと比較して、自己集合性ペプチドは集積化タグとしてサイズが小さく、配列を変更することで物性を調整しやすい利点をもつ。先行研究にて開発された自己集合性 Y15 ペプチドタグ (YEYKYEYKYEYKYEY) は、標的タンパク質に対して遺伝子工学的に融合して発現させることで、哺乳類細胞内で標的タンパク質を人工的に集積化できる。そこで本研究では、Y15 ペプチドタグを基軸とした自己集合性ペプチドタグを用いて細胞内でタンパク質を人工的に集積化することで、タンパク質超分子を構築するタンパク質間の相互作用の同定・解析など、タンパク質超分子を研究するための技術開発を目指した。

第1章では、細胞内でタンパク質を集積化させるための技術として、従来の主流であったタンパク質工学ベースの集積化タグやコイルドコイルペプチドタグの特徴や欠点について解説し、自己集合性ペプチドタグの有用性について述べた。

第2章では、細胞内でタンパク質のクラスター内への分配係数を定量的に制御できるガイドタグシステムを開発した。これは、標的タンパク質に鎖長の異なる Yn タグ (ガイドタグ) を融合し、分配係数の異なるタンパク質クラスターを細胞内に人工構築することで、下流のクライアントタンパク質がどのようにクラスターに濃縮されるかを詳細に調べることができる技術である。この技術を用いて Nck1 -N-WASP ペアおよび Grb2 -SOS1 ペアのタンパク質相互作用の解析を行った。その結果、タンパク質ペアによってクライアントタンパク質の濃縮の仕方やクラスター内部でのクライアントタンパク質の流動性が異なることを明らかにした。

第3章では、IPRAG (Identification of Proteins Recruited in Artificial Granules) プラットフォームを開発した。これは、Y15 ペプチドタグを用いて人工構築した標的タンパク質のクラスターに自発的に濃縮した細胞内在性のクライアントタンパク質を、ビオチンリガーゼ TurboID によってラベル化し、LC-MS/MS 解析によって同定できる技術である。Nck1 を標的タンパク質として本技術を適用し、Nck1 クラスターにリクルートされたクライアントタンパク質を同定し、IPRAG の妥当性および未知の生命現象の解明に貢献できる可能性を示した。

第4章では、細胞内で流動性のある相分離液滴の人工構築が可能な YK ペプチドタグを開発した。化学合成した YK ペプチドや、発現・精製した YK ペプチド融合タンパク質を用いて YK ペプチドの自己集合メカニズムについて調べた。その結果、ATP など細胞内に存在するポリアニオンによって YK ペプチド同士が架橋され、自己集合してナノフィブリルを形成することを明らかにした。また、ATP に依存した自己集合には可逆性があり、可逆的なフィブリル形成が細胞内での液滴形成に貢献している可能性を見出した。

第5章では、液滴形成が既知な天然変性領域 (IDR) に YK タグを融合すると細胞内で液滴に成熟した一方で、液滴形成能の無い IDR 変異体に YK タグを融合すると細胞内で分散したままであることを見出した。このことから、YK タグは細胞内でのタンパク質の相分離液滴形成のポテンシャルを簡単に評価することができる結論づけた。この特徴を用いて、コシャペロン HOP が YK タグの融合によって細胞内で液滴形成することを見出し、さらに液滴形成に必要なドメインを同定した。さらに、HOP 液滴の流動性が、HOP の相互作用パートナーである Hsp70 や Hsp90 によって制御されることを明らかにした。

第6章では、本論文の結論を述べた後、開発した技術の有用性や応用可能性、自己集合性ペプチドタグの細胞内利用における発展性、今後の研究展開について述べた。本研究において開発されたガイドタグと IPRAG を組み合わせることで、細胞内でクラスター形成を伴うタンパク質間相互作用に関する理解をより深めることができると考えられる。また、YK ペプチドタグは相分離液滴を形成するタンパク質を新たに発見することに大きく貢献でき、多くの生命現象の解明に繋がると考えられる。さらに、開発したこれらの技術は、ペプチドタグの小ささや、鎖長や配列を変えることによる合理的な相互作用の調整といった設計ペプチドの利点を活かしており、本論文は自己集合性ペプチドの細胞内利用におけるポテンシャルの高さを示したものである。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位(専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	橋本 匡浩		審査員主査： Chief Examiner	三原 久和

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

In living cells, proteins assembling via non-covalent interactions forms functional supramolecular systems. The mimicry of protein supramolecules through artificial construction leads to understanding the essence of their structure formation and functional expression, and applying them to the construction of artificial functional systems. This study explored the applicability of self-assembling peptides for the artificial construction of intracellular protein assembly, advancing the understanding of protein supramolecules.

Chapter 1 emphasized the utility of self-assembling peptide tags for artificial protein assembly in cells, compared to protein-engineering-based tags and coiled-coil peptide tags, which are the prevalent tags.

Chapter 2 introduced a guide tag system allowing quantitative control of the partition coefficient of target proteins within protein clusters. By fusing Yn tags with varying chain lengths to target proteins, different partition coefficients are achieved, enabling detailed investigations into how client proteins concentrate in these artificial clusters. The technique is applied to analyze protein-protein interactions between Nck1-N-WASP and Grb2-SOS1 pairs, and revealed that different protein pairs showed different relationships of partition coefficient between target and client proteins.

Chapter 3 introduced the IPRA platform, which is designed to identify endogenous client proteins recruited into clusters of target proteins. This platform involves the construction of artificial protein granules in living cells using a Y15 peptide tag. Subsequently, proximity labeling is applied to label endogenous client proteins within the target clusters, enabling their identification through LC-MS/MS analysis.

Chapter 4 focused on developing YKn peptide tags for the artificial construction of liquid droplets in mammalian cells. The YK peptide was cross-linked with ATP, which induces reversible nanofibril formation, potentially serving as the driving force for the formation of liquid droplets.

Chapter 5 highlighted that YK tag easily assessed the propensity of droplet formation. Co-chaperone protein HOP was found to form liquid droplets with YK tagging. Furthermore, Hsp70 and Hsp90 were found to play a crucial role in maintaining the fluidity of reconstructed HOP droplets.

Chapter 6 concluded this study, highlighting the utility, applicability, and future prospects of the developed technologies.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).