

両親媒性ペプチドタグ融合による蛋白質の細胞内集積化 1 : Y15 ペプチドタグの開発

(東工大生命理工¹) ○中井 太一¹・三木 卓幸¹・橋本 匡浩¹・堤 浩¹・三原 久和¹
Intracellular Protein Integration by Amphiphilic Peptide Tag Fusion 1 : Development of Y15 Peptide Tag (¹ School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) ○Taichi Nakai¹, Takayuki Miki¹, Masahiro Hashimoto¹, Hiroshi Tsutsumi¹, Hisakazu Mihara¹

In the living cells, various proteins express biological functions by assembling each other. To understand the mechanism, a method of constructing and evaluating the protein assemblies artificially and bottom-up in the cell is required. Therefore, we aimed to develop a novel technology for integrating arbitrary proteins easily in cells. As the tool, we focused on amphiphilic peptides. The peptides have hydrophilic and hydrophobic regions in the molecule and self-assemble one-dimensionally as β -sheet structures in an aqueous solution to form supramolecular fibers. Because of this feature, amphiphilic peptides have traditionally been used as biomaterials such as hydrogels. By fusing an amphiphilic peptide to proteins as a tag, it is expected that the proteins could be integrated in the cell. Here, we designed Y9, Y11, Y13, and Y15 peptides with different chain lengths referring to the Y9 peptide developed in our laboratory. First, we synthesized these peptides on solid-phase and examined their assembling property in an aqueous solution. As the result, it was found that they became to have high self-assembling property in a chain length-dependent manner, and that Y13 and Y15 peptides self-assembled even at 10 μ M. Next, sfGFP was used as a model protein to examine whether these peptides could be used as protein integration tags. Y15-sfGFP, which was sfGFP fused with Y15 peptide at the N-terminal, was found to self-assemble into fibers from TEM observation. Furthermore, it was observed that Y15-sfGFP self-assembled even in COS-7 cells by evaluating the decrease in fluorescence anisotropy derived from homo-FRET.

Keywords : amphiphilic peptide; protein assembly; in cell

生体内において、様々な蛋白質は互いに集積化することで生体機能を発現する。そのメカニズム解明には、細胞内で人工的にかつボトムアップ式に蛋白質集積体を構築し評価する手法が求められる。そこで、本研究では細胞内で任意の蛋白質を簡便に集積化する技術開発を目的とした。

その戦略として我々は、両親媒性ペプチドに着目した。このペプチドは、分子内に親水性および疎水性領域を有し、水溶液中で β -sheet 構造によって一次的に相互作用して超分子ファイバーを形成する。この特徴から従来、両親媒性ペプチドはヒドロゲルなどのバイオマテリアルとして用いられてきた。この両親媒性ペプチドを、タグとして任意の蛋白質に融合することで、細胞内で蛋白質を集積化できると考えた。

具体的には、まず当研究室で開発された Y9 ペプチドを基本骨格として、鎖長の異なる Y9, Y11, Y13, Y15 ペプチドを設計した。これらのペプチドを固相合成し、水溶液中での集合性について検討を行ったところ、鎖長依存的に集合化能が高まり、Y13 および Y15 ペプチドは 10 μ M でも集合化することが判明した。続いて、これらのペプチドが蛋白質集積化タグとして利用できるかを、sfGFP をモデル蛋白質として検討した。sfGFP の N 末端に Y15 ペプチドを融合した Y15-sfGFP は、TEM 観察からファイバー状に集合化する様子が観察できた。また、homo-FRET に由来する蛍光異方性の低下を指標とした評価により、COS-7 細胞内でも Y15-sfGFP は集合化することが分かった。