

## 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

(東工大生命理工<sup>1)</sup>) ○三木 卓幸<sup>1</sup>・高橋 広樹<sup>1</sup>・橋本 匡浩<sup>1</sup>・梶原 圭悟<sup>1</sup>・中山 彩恵<sup>1</sup>・三原 久和<sup>1</sup>

Development of peptide tags self-assembling in cells 2: Design and construction of highly-ordered protein assemblies (<sup>1</sup>*School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology*) ○Takayuki Miki<sup>1</sup>, Hiroki Takahashi<sup>1</sup>, Masahiro Hashimoto<sup>1</sup>, Keiko Kajiwar<sup>1</sup>, Sae Nakayama<sup>1</sup>, Hisakazu Mihara<sup>1</sup>

More than 25% of the proteins encoded in the human genome express their functions by forming assemblies. Therefore, a technology to artificially design and construct protein assemblies in the cell will not only provide an approach to elucidate the molecular mechanisms in the cell, but also have potential engineering applications. In recent years, we have developed a Y15 self-assembling peptide tag that can integrate arbitrary proteins.<sup>1</sup> Y15 tag is consisting of alternative repeats of hydrophobic Tyr and hydrophilic Glu and Lys, and its amphiphilic nature promotes the self-assembly of Y15 into fibers. However, it is difficult to rationally design the subcellular localization and rigidity of the assemblies due to the lack of insight into peptide sequences suitable for protein assembly. In this study, we systematically modified the hydrophobic and hydrophilic residues of Y15 tag to investigate the effect on self-assembly. For this purpose, peptides were genetically fused to sfGFP (superfolder GFP), which was then expressed in COS-7 cells. We investigated the intracellular assembly of the peptide-fused GFPs by fluorescence imaging and fluorescence anisotropy.

**Keywords :** *Self-assembling peptide; Liquid-liquid phase separation; Living cells*

ヒトゲノムにコードされた 25%以上もの蛋白質は集合体を形成して機能を発現する。そのため、人工的に蛋白質集合体を設計し細胞内で構築する手法は、複雑な細胞内の分子メカニズムを解明する契機になるだけでなく、工学的な応用も期待できる。そこで近年、我々は任意の蛋白質を集積化できる自己集合性 Y15 ペプチドタグを開発した<sup>1</sup>。Y15 は、疎水性の Tyr と親水性の Glu と Lys を交互に繰り返したペプチドであり、その両親媒性の特徴から水溶液中でファイバー状に集積する。Y15 タグを融合した蛋白質もファイバー状に集積化し、細胞内でも同様な集合体が観察された。

しかし、細胞内での蛋白質集積化に適したペプチドタグ配列に関する知見に乏しく、集合体の細胞内局在や剛直性等の合理的設計が困難であった。そこで、本研究では Y15 タグを基本配列として疎水性および親水性残基を体系的に変更することで、細胞内での自己集合への影響を調べた。遺伝子工学的にペプチドを sfGFP (superfolder GFP) に融合し、COS-7 細胞に発現した。sfGFP の細胞内での集合体形成を蛍光イメージングや蛍光異方性などから評価した。本講演で、これらの結果について報告する。

1) T. Miki, T. Nakai, M. Hashimoto, K. Kajiwar, H. Tsutsumi & H. Mihara, *Nat. Commun.* **12**, 3412 (2021)