

研究助成 2023 – がん領域 –

研究成果報告書（最終） <概要>

現 所 属	東京大学 生産技術研究所
氏 名	坪山幸太郎
研 究 テーマ	細胞膜透過性を兼ね備える人工タンパク質の設計技術開発
<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。 ● 構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果等 1 ページにまとめること。 (図表、写真等の貼付を含む) 	
<p>本研究では、タンパク質の細胞内移行性を規定する配列・構造要因を探索することで、細胞質へ到達可能な「人工ミニタンパク質」を体系的に創出することを目的とする。がん領域における重要な標的の多くは、細胞内のタンパク質間相互作用であるが、従来の低分子医薬では平坦な相互作用面を十分に阻害できない。一方、抗体や一般的なタンパク質は細胞膜を透過できず細胞内へ到達できないため、細胞質送達が可能で次世代のタンパク質医薬プラットフォームの確立が急務となっている。そこで本研究では、30～60 アミノ酸程度で安定な三次構造を形成する人工ミニタンパク質を創薬候補として設計し、「細胞質到達性」を設計可能な性質へと転換することを目指している。</p> <p>エンドサイトーシスによって取り込まれた分子の大部分がエンドソームから脱出できないため、最大の課題は、エンドソームから細胞質へ移行するための分子の特徴量を解明することにある。移行効率は、電荷、電荷分布、疎水性、二次構造配置、表面極性パターンなどの複合的要因に規定されると考えられるが、従来の経験則では設計の再現性が不十分であった。そこで、本研究では、細胞質への移行性を並列定量し、移行性を予測するモデルを構築するためのデータ基盤を構築する。構築された予測モデルによる人工タンパク質設計と移行性の評価を反復することで、移行性を高める設計指針を確立し、細胞内のタンパク質相互作用を阻害する分子設計を加速させる。</p> <p>細胞質へ到達したタンパク質を同定するために、Split-GFP 技術を採用した。細胞質で GFP1-10 を発現する細胞を用い、候補タンパク質に GFP11 を融合させることで、細胞質到達時にのみ完全長 GFP が再構成される系を構築した。再構成 GFP を特異的に捕捉することで、エンドソーム内の分子と細胞質に到達した分子を明確に区別している。計画開始時点では多数の分子を並列的に同定・定量するために cDNA display 法を活用する計画であったが、タンパク質と核酸が連結した複合体は、大きな分子量と強い負電荷を持つため、細胞質への移行を阻害してしまい、候補分子自体の物性評価を歪める懸念が浮き彫りとなった。そのため、cDNA display 法は本研究には最適ではないと判断し、並列定量の主軸を質量分析による「ペプチドバーコード法」へと移行した。この手法では、タンパク質ごとに複数のペプチドバーコードを付与して、先述の Split-GFP により回収した細胞質画分を LC-MS/MS で分析することで、各タンパク質の細胞質への到達量を並列的に定量する。一つの候補タンパク質あたり、複数のペプチドバーコードを付与することで、質量分析の定量性の低さをカバーしている。</p> <p>Split-GFP 系を用いた検証では、細胞の作製と導入条件の最適化を完了した。加えて、数万種類のバーコードペプチドの検出にも成功し、十分な定量性を担保できることも確認した。核酸増幅工程を介さず、バーコード自体の分子量も小さいため、読み出し時のバイアスを低減できる点が大きな利点である。今後は既知の細胞質移行性をしめすタンパク質（ポジティブコントロール）を活用した検証を実施し、最終的には、細胞質への移行性の定量、特徴量解析と候補タンパク質再設計を反復し、細胞内標的に作用するタンパク質医薬品プラットフォームの実用化へと展開する計画である。</p>	

様式 4-3①

研究助成 2023 – がん領域 –
研究成果報告書（最終） <発表実績/予定一覧>

現 所 属	東京大学
氏 名	坪山幸太郎
<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。 ● 欄が足りない場合は増やして記入すること。 	
1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入すること。なお、著者名は省略せず全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引くこと。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入し、投稿中の論文および学会のアブストラクトは含めないこと。 	
1	該当なし
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

様式 4-3②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入すること。 ● 国内外を問わない。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1		該当なし
2		
3		
4		
5		
6		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2026 年	Nature Methods 誌 (メソッドペーパー)
2	2026 年	生物物理学会
3		
4		
5		
6		
7		