

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14640

研究課題名（和文）超分子球状錯体への共包接によるタンパク-リガンドの弱い相互作用の構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of protein-ligand weak interactions through co-encapsulation into a self-assembled spherical cage

研究代表者

中間 貴寛（Nakama, Takahiro）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・特任助教

研究者番号：30884192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生命現象で重要なタンパク質-リガンド間の弱い相互作用を解明するために、超分子球状錯体への空間捕捉を用いた新たな構造解析手法を開発した。自己組織化により組み上がる巨大中空錯体ケージにタンパクとリガンドを共包接し、空間的に閉じ込めることで弱い相互作用を強制的に発現させる。これにより従来は解析不能であったタンパク質-リガンド相互作用を構造的に明らかにする手段の創出した。タンパク質とリガンドの錯体への閉じ込めにより、その実効濃度が飛躍的に上昇し見かけの解離定数が千倍以上強くなることを実証した。これを用いて実際にタンパク質と脂質の弱い相互作用をNMRで解析し、その複合体構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質とそれに結合するリガンド分子との間の弱い相互作用は生体機序における重要性にもかかわらず、その弱い相互作用に基づく複合体構造を解析する手法は限定的である。本研究では、ホストゲスト化学で培われた分子の空間捕捉効果の概念をもって新たな方法論を提示し、未解明のタンパク-リガンド相互作用を網羅的に解析する手法の基盤を確立した。超分子錯体を用いたかご型錯体への閉じ込めを活用することで従来法では解析できない弱い相互作用に基づく複合体構造が原子分解能で解析できる。これにより、未解明のタンパク質-リガンド相互作用を網羅的に解析することで、隠された生命機構の原理を明らかになっていくと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a method to analyze weak interactions between a protein and a ligand by confinement in supramolecular spherical metal complexes. By encapsulation in a confined space of the metallo-cages, protein-ligand weak interactions can be induced through the proximity effect, allowing for structural analysis of such biologically important weak interactions. We have demonstrated that confinement of a protein and ligands such as saccharides and lipids in the spherical cage dramatically increases their effective concentrations, resulting in an increase in their apparent affinity by a factor of more than 1,000. We have thus successfully analyzed protein-lipid weak complex structures by NMR spectroscopy.

研究分野：超分子化学・生体関連化学

キーワード：弱い相互作用 タンパク質 リガンド 超分子錯体 ホストゲスト 分子閉じ込め 脂質 構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパクとそれに結合するリガンドの間の相互作用には、定量的・不可逆的な強い結合だけでなく、局所濃度が高まることで会合する動的な弱い結合が存在する。この弱い相互作用がシグナル伝達など多くの生命現象において重要だと判明しつつあり、その構造生物学的な理解が望まれている。しかしながら、弱い相互作用を構造解析する手段はほぼ皆無であり、いかにして弱い相互作用を解析し、分子レベルでの理解を得るかが課題となっていた。

### 2. 研究の目的

超分子中空錯体への共包接を駆使した弱いタンパク-リガンド相互作用の構造解析法の創出を本研究の目的とした。タンパクとリガンドを空間的に捕捉して実効濃度を高めることで、従来法では解析できない弱い相互作用を強制的に発現させた。錯体ケージ内の複合体を解析することで、生命現象を司る弱い相互作用を構造的に調べる手法を開発した。

### 3. 研究の方法

はじめに、超分子錯体ケージ内部へタンパクとリガンドを共包接する手法を開発した。Pd<sup>II</sup> イオンと金属配位子の自己組織化により形成する巨大中空錯体は、配位子に接合させることで分子、タンパクを内包することができる。タンパク、リガンドをそれぞれ配位子につなげ、超分子錯体を組み上げることで共包接を行なった。タンパク-リガンド相互作用によらない共包接を実証するために、最初に蛍光タンパクと蛍光分子を用いる。これらが共包接されたことは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって評価した。さらに NMR の DOSY (diffusion ordered spectroscopy) により内包を実証した。

続いて、錯体内でタンパク質とリガンド間の実効濃度の上昇により弱い相互作用が誘起されていることを実証した。リゾチームとそれに弱く結合する糖鎖をかご型錯体に内包し、リゾチームの酵素活性を測定した。弱い相互作用の誘起による酵素活性の低下を定量し、見かけの結合能の変化を評価した。

以上の結果をもとに弱い相互作用に基づくタンパク質と脂質の複合体構造を NMR で解析した。安定同位体標識したタンパク質を用いた NMR 解析により残基単位で脂質の結合に伴う構造変化、複合体構造の解析を行なった。

### 4. 研究成果

タンパク質に弱い相互作用で結合するリガンド分子として特に糖鎖と脂質に着目し、タンパク質とリガンドを超分子金属錯体へ共包接する手法を確立した。錯体を構成するビスピリジン配位子に対象となる糖鎖や脂質を縮合した分子を系統的に合成するスキームを開発した。これを用いることで、様々なタンパク質と糖鎖や脂質などのリガンド分子をかご型の錯体に内包することができた。

錯体への内包は、DOSY NMR での拡散係数の測定により実証した。<sup>1</sup>H または、<sup>19</sup>F のシグナルの減衰から分子の見かけの大きさを見積ると、包接によりかご型錯体と見かけの大きさが同一になったことから、錯体への内包が示された。さらに、FRET の測定により直径 5 nm の錯体への内包に対応するタンパク質とリガンド分子の平均距離が算出され、錯体内でタンパク質とリガンドが近接し、実効濃度が高まっていることが示された。

この錯体の孤立空間内での近接効果により、タンパク質とリガンドの間の相互作用が誘起されたことはリゾチームの活性阻害実験により明らかにした。糖鎖と共包接したリゾチームの酵素活性を測定すると、錯体内部内部で糖鎖が酵素活性部位に結合することにより活性の低下が観測された。活性阻害率から、糖鎖との結合を算出すると遊離の状態での結合よりも 1,000 倍以上も見かけの解離定数が低下し、結合が強くなっていることが示された。

球状錯体への内包による相互作用の誘起を活用してタンパク質と脂質の弱い相互作用の NMR を行なった。脂質エステルの加水分解酵素である cutinase-like enzyme (CLE) と脂質アミドを球状錯体に共包接すると、錯体内で脂質の結合・解離に伴うタンパク質の素早いコンフォメーションの変化が観測された。この構造変化は、バルク溶液中でタンパク質と脂質を混合した際には観測されない弱い相互作用であり、錯体への共包接により弱い相互作用を誘起したことが示された。タンパク質の残基ごとのシグナルを定量的に評価すると、タンパク質の活性部位に特異的に脂質分子が結合している様子を明らかにすることができた。さらに NOESY NMR 測定により、タ

ンパク質と脂質分子の近接を評価することで、その複合体構造を明らかにすることができた。このようにバルク溶液中では観測できない、脂質をはじめとするタンパク質とリガンドの弱い相互作用を超分子球状錯体への閉じ込めによつ解析できることを実証した。

本研究では、ホスト-ゲスト化学で培われた「分子の空間捕捉効果」の概念をもって、現在の解析技術の限界を打ち破る新たな方法論を提示した。超分子錯体にタンパクとリガンドを共包接し空間的に捕捉することで、弱い相互作用を発現させ、未解明のタンパク-リガンド相互作用を網羅的に解析する方法論を確立した。本研究の成果は、弱い相互作用への基礎的な理解を深めることで、創薬におけるリガンド設計指針を示す手法として活用されていくことでライフサイエンス全般に波及効果をもたらすと予想される。

## 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 2件）

1. 著者名 Nakama Takahiro, Rossen Anouk, Ebihara Risa, Yagi-Utsumi Maho, Fujita Daishi, Kato Koichi, Sato Sota, Fujita Makoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Hysteresis behavior in the unfolding/refolding processes of a protein trapped in metallo-cages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 2910 ~ 2914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2SC05879K	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 Fujita Daishi, Suzuki Ryoto, Fujii Yuya, Yamada Mayu, Nakama Takahiro, Matsugami Akimasa, Hayashi Fumiaki, Weng Jing-Ke, Yagi-Utsumi Maho, Fujita Makoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Protein stabilization and refolding in a gigantic self-assembled cage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem	6. 最初と最後の頁 2672 ~ 2683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chempr.2021.08.005	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 Tamura Hiroyuki, Nakama Takahiro, Rossen Anouk, Ishikita Hiroshi, Fujita Makoto	4. 巻 53
2. 論文標題 Organic solvent-induced structural changes in a protein confined in a giant coordination cage	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/chemle/upae101	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31件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takahiro Nakama, Makoto Fujita
2. 発表標題 Confinement of unfolding and refolding proteins in an M12L24 coordination cage
3. 学会等名 The Asian Conference on Coordination Chemistry 8 (ACCC8) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中間貴寛、竹内絵里奈、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 M12L24中空錯体への包接によるアミロイド 凝集集合構造の観測
3. 学会等名 第19回 ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原梨沙、中間貴寛、矢木真穂、藤田大士、藤田誠、
2. 発表標題 Enzyme reactions within a confined space of M12L24 spherical complexes
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Anouk Rossen、中間貴寛、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 NMR analysis of transient unfolding/refolding protein structures by encapsulation in a self-assembled cage
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 田所美璃、中間貴寛、藤田誠
2. 発表標題 弱い相互作用の解析を目指したタンパク質とリガンド分子の自己集合球状錯体への共包接
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 舟見進吾、中間貴寛、藤田誠
2. 発表標題 M12L24巨大球状錯体に包接されたタンパク質の結晶化
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Anouk Rossen、中間貴寛、矢木真穂、藤田大土、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 NMR Observation of Hysteretic Behaviour in Solvent-Induced Protein Unfolding/Refolding Processes via Encapsulation in a Coordination Cage
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海老原梨沙、中間貴寛、藤田誠
2. 発表標題 巨大中空錯体に包接された酵素の基質特異性
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 巨大中空錯体への閉じ込めにより誘起されたタンパク質 - 糖鎖の弱い相互作用の評価
2. 発表標題 田所美璃、中間貴寛、藤田誠
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野寺悠太、中間貴寛、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 自己集合球状錯体に包接したアミロイド 疎水性断片二量体のNMR 構造解析
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海老原梨沙、中間貴寛、藤田大士、藤田誠
2. 発表標題 拡張された自己集合中空錯体へのタンパク質の包接
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 Anouk Rossen、中間貴寛、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 NMR analysis of solvent-induced protein unfolding via encapsulation in a giant self-assembled cage
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内絵里奈、中間貴寛、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 自己組織化中空錯体への閉じ込めによるアミロイド 疎水性断片の凝集初期構造解析
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原梨沙、中間貴寛、矢木真穂、藤田大士、藤田誠
2. 発表標題 自己集合中空錯体の孤立空間への捕捉によるタンパク質の安定化
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舟見進吾・中間貴寛・藤田大士・藤田誠
2. 発表標題 自己組織化中空錯体への空間捕捉を利用した画一的条件でのタンパク質結晶化
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 弱い相互作用の解析を目指したタンパク質とリガンド分子の自己集合球状錯体への共包接
2. 発表標題 田所美璃、中間貴寛、藤田誠
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中間貴寛、海老原梨沙、Anouk Rossen、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 M12L24球状錯体に内包されたタンパク質のヒステリシスを伴う変性-リフォールディング
3. 学会等名 第20回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 小野寺悠太、竹内絵里奈、中間貴寛、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 巨大球状金属錯体への閉じ込めによるアミロイド 疎水性領域の会合初期過程の構造解析
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海老原 梨沙, 中間貴寛, 矢木真穂, 藤田大士, 藤田誠
2. 発表標題 巨大中空錯体への一分子包接によるタンパク質の安定化
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hongkun Liu, Takahiro Nakama, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Makoto Fujita
2. 発表標題 Isolation of Amyloid Monomer in Aqueous Environments by Encapsulation in Gigantic M12L24 Coordination Cages
3. 学会等名 錯体化学会第 73 回討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田陽紀、中間貴寛、藤田誠
2. 発表標題 動的イミン結合を用いた $\beta$ -ヘアピンペプチドの構築
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中間貴寛、海老原梨沙、Anouk Rossen、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 中空金属錯体への閉じ込めによるタンパク質の変性 - リフォールディング解析
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中間貴寛、小野寺悠太、竹内絵里奈、矢木真穂、藤田大士、加藤晃一、藤田誠
2. 発表標題 巨大中空錯体への包接によるアミロイド 断片二量体の構造解析
3. 学会等名 第33回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miri Tadokoro, Takahiro Nakama, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Makoto Fujita
2. 発表標題 Investigation of Protein-Sugar Weak Interactions by Confinement in Self-assembled M12L24 Cages
3. 学会等名 錯体化学会第 73 回討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hongkun Liu, Takahiro Nakama, Makoto Fujita
2. 発表標題 Protein Encapsulation in Crystals of M12L24 Coordination Cages for Heterogeneous Enzymatic Catalysis
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小野寺悠太・竹内絵里奈・中間貴寛・矢木真穂・藤田大士・加藤晃一・藤田誠
2. 発表標題 巨大球状錯体への包接によるアミロイド 疎水性断片の二量化のNMR解析
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田所美璃・中間貴寛・矢木真穂・加藤晃一・藤田誠
2. 発表標題 球状錯体の孤立空間への閉じ込めによるタンパク質 - 脂質相互作用のNMR構造解析
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 海老原梨沙, 中間貴寛, 守島健, 杉山正明, 矢木真穂, 藤田誠
2. 発表標題 Single protein encapsulation in well-defined cavities of spherical complexes
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中間貴寛
2. 発表標題 巨大かご型錯体への空間捕捉を活用したタンパク質構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takahiro Nakama, Daishi Fujita, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Makoto Fujita
2. 発表標題 Protein refolding by isolation in a gigantic coordination cage
3. 学会等名 The International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Risa Ebihara, Anouk Rossen, Takahiro Nakama, Maho Utsumi-Yagi, Daishi Fujita, Makoto Fujita
2. 発表標題 NMR analysis of transient structures in protein unfolding/refolding by encapsulation within spherical metallo-cages
3. 学会等名 The International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC2023) (国際学会)
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
---------	---------