

実施課題名: かご型金属錯体の孤立空間を活用したタンパク質過渡構造のNMR解析

【背景】有機配位子とパラジウムイオンの自己集合により形成されるかご型の金属錯体は、その一義構造に多様な分子を内包・集積することができる。本研究では、この錯体のナノ空間へタンパク質を内包することで、孤立空間に捕捉されたタンパク質の構造を解析した。特に、錯体の孤立空間を活用してバルク溶液中では過渡的にしか存在しないタンパク質構造をNMRにより詳細に解析することを目的とした。アミロイドタンパク質の凝集中間体や弱い相互作用に基づくタンパク質—リガンド複合体の構造解析を通じて、一義中空ホスト分子が作り出す孤立空間への捕捉が、タンパク質構造解析において有用な新たな手法になると示すことを目指した。

【実施内容】かご型錯体へ内包したタンパク質の構造情報をNMRで取得し、錯体の一義構造内に捕捉された過渡構造を解析した。

1. かご型錯体への単量体の捕捉による多量体タンパク質の界面へのリガンド結合評価 (Fig. 1)

安定二量体タンパク質であるスーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1)の単量体が選択的に錯体へ選択的に内包された。その単量体が天然構造を保っていることをNMRにより解析し、露出した二量体界面に結合するリガンドをSTD NMRを駆使して探索した。

2. 凝集抑制によるアミロイドβ会合二量体構造の解析

錯体への内包による凝集抑制を活用し、アミロイドβ 2分子の会合を評価した。安定同位体標識したアミロイドβ疎水性領域のペプチド2分子を錯体へ内包し、その会合挙動を多次元NMRとNOESYを用いて解析した。

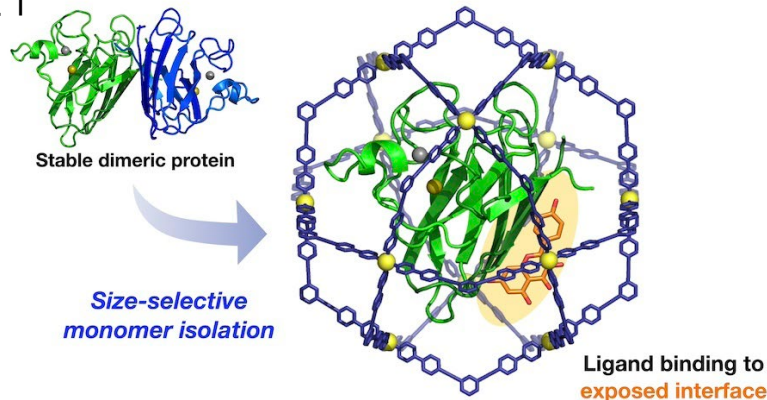
3. 空間捕捉による安定化による氷点下でのタンパク質構造解析

錯体の孤立空間へ内包されたタンパク質は安定化され、有機溶媒と水の混合溶媒でも天然構造を保持することができる。これを活用し、氷点下でタンパク質の構造・ダイナミクスを解析した。

4. 錯体の孤立空間への閉じ込めによる過渡的なタンパク質—リガンド複合体構造の解析 (Fig. 2)

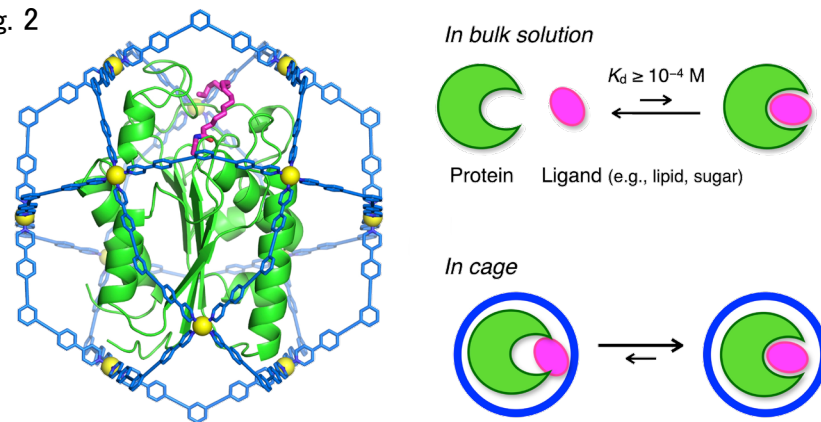
錯体のナノ空間内での近接効果により、溶液中では過渡的にしか形成しないタンパク質—リガンド複合体を錯体内に単離できることを示した。これによりタンパク質—糖鎖複合体とタンパク質—脂質複合体のNMR解析を達成した。

Fig. 1



かご型錯体への多量体タンパク質の単量体の捕捉

Fig. 2



錯体への閉じ込めによるタンパク質—リガンド複合体構造の解析

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF24-01-079			
利用課題名	かご型金属錯体の孤立空間を活用したタンパク質過渡構造の NMR 解析			
所属機関	東京大学			
所属部署	大学院工学系研究科			
役職・氏名	役職	助教	氏名	中間貴寛
利用実施時期、及び期間	2024 年 12 月 1 日～2026 年 3 月 31 日 総利用日数: 26 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

本研究は、かご型の金属錯体の一義中空構造にタンパク質を捕捉することで、その過渡構造を NMR により解析することを目的とした。当研究室で開発した自己集合性のかご型の金属錯体は、その内径の 5 nm の一義空間にタンパク質を内包することができる。このかご型錯体の孤立空間への捕捉を活用してタンパク質の構造を解析する手法を開発することを目指す。特に、バルクの溶液中では過渡的にのみ存在するタンパク質構造をナノサイズの孤立空間に捕捉することで、NMR による詳細な構造解析を可能にすることを目指す。具体的には、アミロイドタンパク質の凝集中間体や多量体タンパク質のモノマー構造など、溶液中では速やかに会合・凝集により失われてしまう過渡構造を錯体の孤立空間に捕捉することでその構造の解析を実現する。また、錯体のナノ空間への閉じ込めにより実行濃度を高めることで、弱い相互作用に基づくタンパク質—リガンド複合体の形成を誘起し、その構造を解析する。これらの実証を通じて、一義中空ホスト分子が作り出す孤立空間への捕捉という新たな手法が、タンパク質構造解析において有用であることを示す。

2. 成果の概要

実施内容

かご型錯体へのタンパク質の包接手法(*Chem* 2021, 7, 2672–2683)により、タンパク質をかご型の金属錯体へ内包した。内包したタンパク質の構造情報を NMR で取得し、錯体の一義構造内に捕捉された過渡構造を解析した。特に安定同位体標識したタンパク質を用いることで、バルク溶液中では観測が困難な構造を精密に NMR で解析した。錯体への捕捉効果を活用したタンパク質の構造解析を示すために以下の 4 項目について実施した。

1. かご型錯体への単量体の捕捉による多量体タンパク質の界面へのリガンド結合評価

かご型錯体が形成する一義ナノ空間に選択的に多量体タンパク質の単量体を捕捉できることを活用し、単離された単量体タンパク質の構造とその多量体界面へのリガンドの結合を NMR により解析した。

2. 凝集抑制によるアミロイドβ 会合二量体構造の解析

アミロイドβ をかご型錯体に内包することで、その不溶性アミロイド線維への凝集を抑制することができる。これを活用し、アミロイドβ 2 分子の会合を評価した。

3. 空間捕捉による安定化による氷点下でのタンパク質構造解析

錯体の孤立空間へ内包されたタンパク質は安定化され、有機溶媒と水の混合溶媒でも天然構造を保持することができる。これを活用し、氷点下でタンパク質の構造・ダイナミクスを解析した。

4. 錯体の孤立空間への閉じ込めによる過渡的なタンパク質—リガンド複合体構造の解析

かご型錯体が形成する内径 5–6 nm の一義空間にタンパク質とリガンドを内包することで、両者の実効濃度が大幅に上昇する。この近接効果を活用することで、溶液中では過渡的にしか形成しないタンパク質—リガンド複合体の構造を解析した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

1. かご型錯体への単量体の捕捉による多量体タンパク質の界面へのリガンド結合評価

安定な多量体タンパク質から過渡的に解離した単量体を錯体に内包できることを見出した。二量体タンパク質であるスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) を包接した際には、単量体が選択的に内包され、その単量体が二量体中の天然構造を保持していることを NMR により確かめた。天然構造を持つ SOD1 単量体を単離したことで、その露出した二量体界面に結合するリガンドを STD NMR を駆使して探索することができた。錯体への包接を多量体界面へと結合するリガンド探索法として活用できることを示した。

2. 凝集抑制によるアミロイドβ 会合二量体構造の解析

錯体への内包による凝集抑制を活用し、アミロイドβ 2 分子の会合を評価した。安定同位体標識したアミロイドβ 疎水性領域のペプチド 2 分子を錯体へ内包し、その会合挙動を多次元 NMR と NOESY を用いて解析した。溶液中では観測されない過渡的な会合のダイナミクスを観測することができた。

3. 空間捕捉による安定化による氷点下でのタンパク質構造解析

錯体への捕捉による安定化効果により、水とアセトンの混合溶媒中でタンパク質が天然構造を保持することを見出した。この溶媒系を用いることで−30 度までの低温でタンパク質の NMR 構造を解析することができた。この氷点下での解析により、タンパク質のコンフォメーションのダイナミクスを分離して解析するとともに、ヒドロキシ基の交換性プロトンを観測した。

4. 錯体の孤立空間への閉じ込めによる過渡的なタンパク質—リガンド複合体構造の解析

錯体のナノ空間内での近接効果により、溶液中では過渡的にしか形成しないタンパク質—リガンド複合体を錯体内に単離できることを示した。これによりタンパク質—糖鎖複合体とタンパク質—脂質複合体の NMR 解析を達成した。特に脂質との複合体は、溶液中では観測されない未知の複合体構造を解析し、その複合体構造を多次元 NMR および NOESY 解析により明らかにした。

当初の目標を概ね達成するとともに、単量体の捕捉については実験の中で見つけた知見を基に新たな展開を示すことができた。

成果発表

論文

- “Monomer Isolation from Oligomeric Proteins within Coordination Cages to Study Interface Ligand Binding” R. Ebihara, T. Nakama, K. Morishima, M. Yagi-Utsumi, M. Sugiyama, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2026**, *148*, 1872–1880. DOI: 10.1021/jacs.5c19487
- “Proximity-induced saccharide binding to a protein's active site within a confined cavity of coordination cages” T. Nakama, M. Tadokoro, R. Ebihara, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, M. Fujita, *Chem. Sci.* **2025**, *16*, 10549–10554. DOI: 10.1039/D5SC00782H

学会発表

- “Entrapment of Protein-Lipid Transient Complex within a Coordination Cage for its NMR Study” Takahiro Nakama, Miri Tadokoro, Hongkun Liu, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Makoto Fujita, The International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC2025), 2025 年 5 月
- “Encapsulation of single proteins within isolated cavities of spherical metallo-cages for their stabilization” Risa Ebihara, Takahiro Nakama, Ken Morishima, Maho Yagi-Utsumi, Masaaki Sugiyama, Makoto Fujita, The International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC2025), 2025 年 5 月
- 「中空金属錯体への包接による氷点下でのタンパク質 NMR 構造解析」海老原梨沙, 中間貴寛, 田所美璃, 矢木真穂, 三橋隆章, 加藤晃一, 藤田誠, 日本化学会第 106 春季年会, 2026 年 3 月
- 「球状金属錯体への疎水性ペプチドの集積による凝縮体模倣環境でのタンパク質構造解析」渡邊健穂, 中間貴寛, 矢木真穂, 三橋隆章, 加藤晃一, 藤田誠, 日本化学会第 106 春季年会, 東京, 2026 年 3 月 19 日, H936-3vn-03
- “Isolation of Monomers of Oligomeric Proteins within Coordination Cages to Analyze Ligand Binding at Their Interface” Risa Ebihara, Takahiro Nakama, Ken Morishima, Masaaki Sugiyama, Maho Yagi-Utsumi, Makoto Fujita, 錯体化学会第 75 回討論会, 2025 年 9 月
- 「球状錯体への包接によるアミロイド β 疎水性断片の二量体の構造解析」小野寺悠太, 中間貴寛, 矢木真穂, 加藤晃一, 藤田誠, 日本化学会第 105 春季年会, 大阪, 2025 年 3 月
- 「球状金属錯体への捕捉によるタンパク質—脂質複合体の過渡構造の解析」中間貴寛, 田所美璃, Hongkun Liu, 矢木 真穂, 加藤晃一, 藤田誠, 日本化学会第 105 春季年会, 2025 年 3 月
- 「中空金属錯体の孤立空間への閉じ込めによる安定二量体タンパク質のモノマー単離」海老原梨沙, 中間貴寛, 守島健, 杉山正明, 藤田誠, 日本化学会第 105 春季年会, 大阪, 2025 年 3 月

今後の展開

本研究を通じてかご型錯体への包接をタンパク質の構造解析に活用できることを示した。今後は、今回検証した手法を用いて、生物学的に重要性の高いタンパク質の構造解析、未踏構造の解明へと展開していく予定である。例えば、タンパク質—リガンド複合体の解析では、従来では解析が困難とされる弱い相互作用に基づく過渡的な構造を解析できるため、シグナル伝達に関与する複合体構造の解析へと展開することを考えている。これまでに確立した NMR 解析手法を活用していくとともに、CPMG 法を用いた緩和測定などの NMR 測定法と組み合わせることでさらに複合体の詳細な構造解析を行うことも目指す。また、単量体タンパク質の捕捉による多量体界面へのリガンド結合評価を創薬探索のスクリーニング手法へと展開することも検討している。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本研究により、孤立空間への捕捉という手法がタンパク質の構造解析、特に過渡構造の解析に有効であることが示された。単量体の捕捉は、その過渡構造の解析とともに、多量体界面に結合するリガンド探索に活用できることを示した。また、アミロイド β をはじめとするアミロイド体の初期構造の解析は、多くの病理に関連した重要なタンパク質構造である。これまでその凝集性、過渡性のために解析が困難なこれらの会合体を解析する新たな手法を示した。弱い相互作用に基づくタンパク質—リガンド複合体もシグナル伝達などの生体の機構を理解する上で重要であるが、未踏の過渡構造である。これに対してもナノ空間への閉じ込めという新たな手法により、その過渡構造の詳細な NMR 解析を可能にした。このようにホスト—ゲスト化学で培われた空間捕捉の概念をタンパク質へと拡張することで、新たな構造解析手法を提示するに至った。本研究で検証した概念をもとに新たなタンパク質構造解析の方法論が拓けてくると期待される。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

生命創成探究センターの NMR は、以前から加藤教授、矢木准教授のご支援のもと使用させていただいてい
たため、円滑に測定を進めることができた。サンプル送付での測定も滞りなく行うことができた。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

構造生物学に限らず、化学の分野においても高度な NMR 解析に対する支援が広がるとありがたいです。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

生命創成探究センター

溶液 800MHz

利用期間 1: 2025 年 3 月 21 日～2025 年 3 月 22 日

利用期間 2: 2025 年 4 月 9 日～2025 年 4 月 10 日

利用期間 2: 2025 年 6 月 5 日～2025 年 6 月 6 日

利用期間 2: 2025 年 6 月 19 日～2025 年 6 月 20 日

利用期間 2: 2025 年 7 月 28 日～2025 年 8 月 4 日

利用期間 2: 2026 年 1 月 8 日～2025 年 1 月 9 日

利用期間 2: 2026 年 1 月 22 日～2025 年 1 月 30 日

9. その他の利用施設

なし