

# 革新的分子間相互作用測定技術の創出

吉村 柁彦\*

## Development of an Innovative Measurement Technology for Molecular Interactions

Masahiko YOSHIMURA\*

Weak and transient biomolecular interactions are often difficult to detect and quantify under dilute, bulk-solution conditions. In this study, we develop a novel measurement method that leverages a sequence- and structure-programmed nucleic-acid nanostructure as a confined nanoenvironment to locally concentrate a pair of interacting proteins. By positioning the interaction partners within a narrow internal cavity, the system creates an effectively high local concentration, thereby stabilizing otherwise undetectable weak interactions and enabling downstream detection and quantitative analysis. We anticipate that the approach will be broadly applicable to characterizing weak protein-protein interactions.

### 1. 研究背景と目的

細胞内はタンパク質や核酸など多様な分子がひしめき合う環境であり、互いに相互作用しながらその機能を発揮している。これらの相互作用には、一度結合するとほとんど解離しない強い結合だけでなく、試験管環境では検出すら困難な「極めて弱い結合」も存在する。とくに、細胞内シグナル伝達、天然変性タンパク質の相互作用、連続的な酵素反応といった重要な生命機能は、主に「弱い相互作用」によって形成されるタンパク質複合体に支えられている。しかし、この弱いタンパク質間相互作用は測定・解析がきわめて難しく、その重要性にもかかわらず実態の多くが未解明のままである。その理由は、既存の相互作用測定手法では、結合解離定数が数  $100 \mu\text{M}$  を超えるような「非常に弱い相互作用」を原理的に測定できないためである。実際、既存手法で測定された分子相互作用を俯瞰すると、結合解離定数が数  $100 \mu\text{M}$  を超えるような非常に弱い相互作用領域はほぼデータが欠落しており（図 1）、この領域そのものが既存手法の解析限界によって未踏領域として取り残されていることがわかる<sup>1)</sup>。すなわち、弱い相互作用は生命現象の根幹にあるにもかかわらず、「測れない」という技術的制約のために研究が停滞している。この解析ギャップを埋めることこそが、生命分子のふるまいの理解を次の段階へ押し上げる糸口である。本研究では、従来の相互作用測定手法では原理的に解析できなかった「弱い相互作用」をターゲットとし、その結合強度を定量的に検出・測定できる新規結合測定技術を創出することを目的とした。

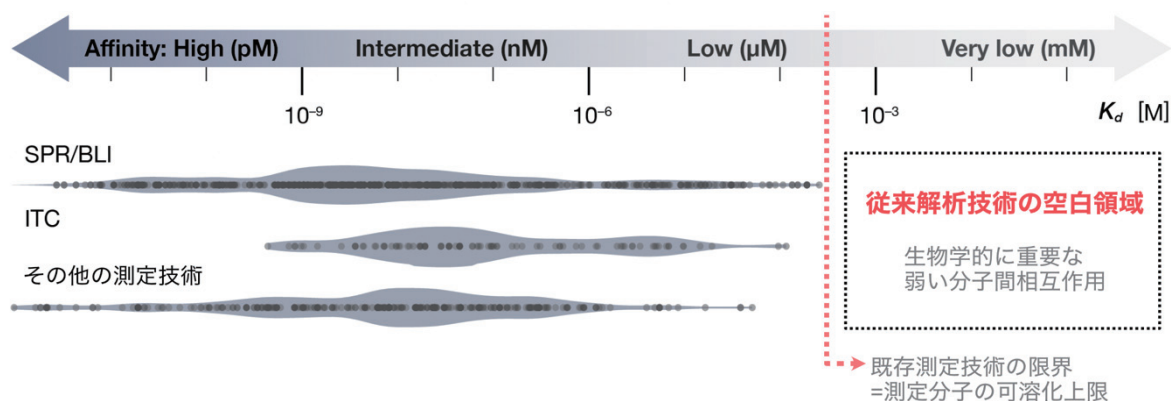


図 1 既存分子相互作用測定法の限界と未踏領域。

2026年3月3日 受理

\* 豊田理研スカラー

京都大学高等研究院物質-細胞統合システム拠点 (WPI-iCeMS)

## 2. 研究方法および研究結果

本研究では、高度に配列および構造を設計した巨大核酸ナノ構造体 (30–40 nm) を合成する。次に、このナノ構造体の狭い内部空間にタンパク質相互作用ペアを配置し、局所的に高濃度な環境を創出する。これにより、これまで検出が困難であった極めて弱いタンパク質間相互作用を安定化し、定量的な検出・測定することを目指す。なお、狭い内部空間を有する核酸ナノ構造体については、研究期間中に高効率・高収率での合成に成功し、Cryo 電子顕微鏡測定により構造を確認した (図2)。

さらに、ナノサイズの微小空間内において、配列選択的な核酸の相補鎖形成反応を利用し、タンパク質を任意の位置へ定量的に配置することにも成功した。本技術により、(1) ナノサイズの微小空間内におけるタンパク質の配置位置、(2) ナノ空間中での可動域や運動性、(3) 配置するタンパク質の数と種類といった要素を設計パラメータとして扱える見通しを得た。現在は、微小空間内に測定対象のタンパク質相互作用ペアを1分子ずつ配置する最もシンプルな条件を基本として、評価を進めている。

本技術を活用して弱い相互作用の検出を行った。具体的にはモデルタンパク質として分割発光酵素 (LgBiT–SmBiT) を用い、相互作用を発光強度として読み出すことで定量評価を行った。このモデルタンパク質については、SmBiTのアミノ酸配列を改変することで相互作用強度の異なる多様な相互作用ペアを創出することができ、SmBiT 誘導体群の中には既存の測定手法では検出・測定が困難なほど弱い相互作用ペアも存在する<sup>2)</sup>。

これら多様な結合強度をもつ相互作用ペアを核酸ナノ構造体内部に閉じ込めることで、相互作用ペアを局所的に高濃度な環境に置くことができ、希薄な水溶液環境と比較して、その相互作用がはるかに安定化されることが明らかとなった。例えば、sub-mM レベルの相互作用ペアと既存手法では測定が困難な極めて弱い相互作用ペアについて飛躍的な安定化効果が確認でき、定量的な相互作用の検出に成功した。

加えて、分割発光酵素以外のタンパク質にも適用範囲を拡大するため、相互作用頻度を発光で読み取る系に加え、蛍光エネルギー移動 (FRET) 効率によって相互作用を読み出せる機能性核酸ナノ構造体の合成にも取り組んだ。FRET 機能を有する核酸ナノ構造体を用いることで、内部に導入した相互作用ペアの結合強度に応じて FRET 効率に変化することを確認した。

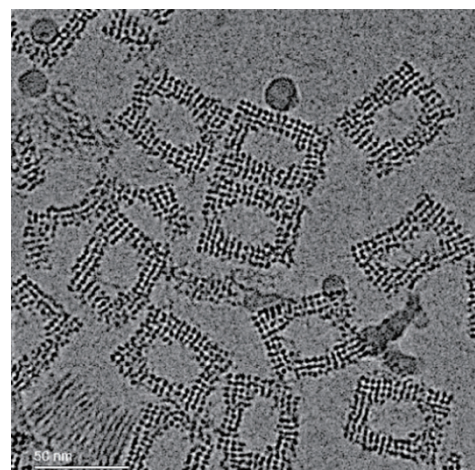


図2 核酸ナノ構造体の Cryo 電子顕微鏡像。

## 3. まとめ

本研究では、配列・構造を高度に設計した核酸ナノ構造体 (30–40 nm) を用い、狭い内部空間でタンパク質相互作用ペアを局所的な高濃度環境におくことで弱い相互作用を安定化・定量する測定基盤を構築した。モデル系として分割発光酵素 (LgBiT–SmBiT) を用いた評価では、ナノ空間への閉じ込めにより弱い相互作用が安定化し、従来法では検出が困難な相互作用の検出にも成功した。加えて、分割発光酵素に依存しない読み出し系として、FRET 効率で相互作用を評価できる機能性核酸ナノ構造体を開発し、結合強度に応じて FRET 効率に変化することを確認した。これにより、本手法の適用範囲拡大に向けた基盤を得た。

## REFERENCES

- 1) H. Liu, P. Chen, X. Zhai, K.-G. Huo, S. Zhou, L. Han and G. Fan, *Scientific Data*, **11** (2024) 1316.
- 2) A. S. Dixon, M. K. Schwinn, M. P. Hall, K. Zimmerman, P. Otto, T. H. Lubben, B. L. Butler, B. F. Binkowski, T. Machleidt, T. A. Kirkland, M. G. Wood, C. T. Eggers, L. P. Encell and K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.*, **11** (2016) 400.