

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

補助事業課題名:

(日本語) 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 (SPring-8/SACLA におけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化)
(英語) Correlative Structural Analysis Platform for Drug Discovery and Life Sciences (Support and R&D of Protein 3D Structure Analysis at SPring-8/SACLA)

実施期間:平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 山本 雅貴
(英語) Masaki Yamamoto

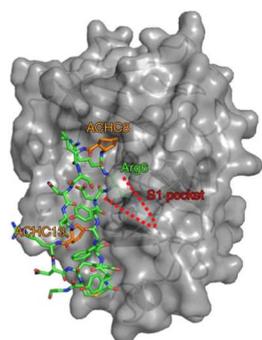
補助事業担当者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター 利用システム開発研究部門・部門長
(英語) RIKEN SPring-8 Center, Advanced Photon Technology Division: Division Director

II 補助事業の概要

ビームライン利用による支援と顕著な成果と意義

理化学研究所では JASRI・京都大学と連携し、放射光ビームラインを主軸とした構造生物学者もしくは構造情報を必要とする研究者の支援とそのための高度化を進めた。タンパク質結晶回折実験用ビームライン4本(BL26B1/B2、BL32XU、BL41XU)と溶液散乱実験用ビームライン2本(BL45XU/BL38B1)を支援に提供した。各ビームラインで BINDS 専用ビームタイムを確保し、プラットフォーム機能最適化ユニットとの連携の下でビームタイムのオンライン予約システムを運用し、採択課題に対してビームタイム配分を実施する体制を整え利用・解析支援を継続して実施した。また、より高度な技術教育を目的として、本事業の実施期間を通してタンパク質結晶構造解析初級者と中級者以上の各々に対し研修会・講習会を定期的で開催した。これらの講習会を通して利用者の測定技術向上を促進するとともに測定上の課題を共有することで、本事業での支援拡大と支援および高度化ニーズの集約を図った。



ヒト第XIIa因子と環状βアミノ酸を含む大環状ペプチド複合体の構造

第XIIa因子の酵素反応阻害活性を有する環状ペプチドはセリンプロテアーゼ阻害剤と類似した構造で作用することが明らかになった

↓
生体内で安定な環状βアミノ酸を含有したペプチドによる創薬のプラットフォームになることが期待される

SPring-8/SACLA の高フラックス微小ビームを利用した高分解能・ハイスループット・高難度構造解析の支援の顕著な成果として、「ヒト第 XIIa 因子と環状 β アミノ酸を含む大環状ペプチド複合体の高分解能構造解析」(DOI: 10.1038/s41557-020-0525-1) (左図)、「古細菌のヘリオロドプシンの高分解能構造解析」(DOI: 10.1038/s41586-019-1604-6)、「M2 ムスカリン受容体のアンタゴニスト結合型高分解能構造解析」(DOI: 10.1038/s41589-018-0152-y)、「プロスタグランジン受容体の高分解能構造解析」(DOI: 10.1038/s41589-018-0171-8)などが挙げられる。基礎生物学的な重要性の非常に高い構造解析から医薬品開発へ応用が期待される標的

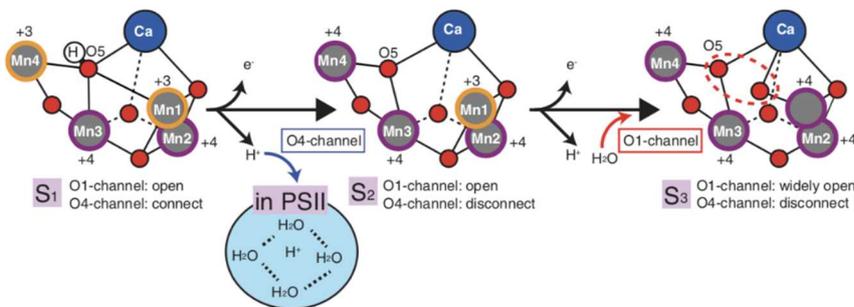
試料の高分解能構造まで幅広い支援の成果がハイインパクトジャーナルに掲載された。これらの成果は SPring-8 で開発した自動測定システム ZOO が本事業を通じて汎用的な技術として成熟し、高度化によってさらなる高難度試料へと適用範囲を広げ、世界に先駆けて次々にそれらの高分解能構造解析を実現したことを意味している。本課題による幅広い解析ターゲットへの支援と高度化は、ライフサイエンスにおいて精緻な構造情報の利用を促進し、創薬研究・ライフサイエンス研究を大幅に加速した。

相関構造解析利用支援による顕著な成果と意義

相関構造解析支援は異なる構造解析手法を組み合わせた支援の提供である。異なる試料環境および観測手法で得られた解析結果の統合は、1つの観測手法だけでは難しい生体高分子の機能する様子の議論を可能にする。また汎用性の高い放射光での X 線結晶解析による静的高分解能構造を軸に、マシンタイムが限られた XFEL 施設 SACLA の時分割結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡の単粒子解析の成功確率を飛躍的に高めたりできる。本課題の支援では、放射光 X 線結晶構造解析を核とし、これまで踏み込むことのできなかつたフェムト秒時間分解能構造解析を実現した SACLA の X 線自由電子レーザーをプローブとしたフェムト秒時分割構造解析を組み合わせた支援、近年急速に解析分解能を向上させ「試料の構造多様性に関する情報収集」への展開も期待されるクライオ電子顕微鏡による構造解析を組み合わせた支援、独自に開発している生体内の環境に近い常温環境作出技術 HAG 法と組み合わせた支援、同じく生体内の環境に近い溶液中の生体高分子の構造解析が可能な小角 X 線散乱構造解析を組み合わせた支援の体制を構築して「相関構造解析」支援を実施した。

科学の発展にとって顕著な研究成果が相関構造解析支援から創出された成果として、本課題の補助事業課題名にも掲げる「SPring-8/SACLA」の両方を活用した支援成果として Science 誌に掲載された (DOI: 10.1126/science.aax6998) 課題#0196 (申請者: 菅倫寛 (岡山大)、支援責任者: 平田邦生 (理研)、課題名「人工光合成能を持つ触媒の創出を目指した光化学系 II 複合体の反応中間体の結晶構造解析」) を特記する。光合成の鍵酵素である光化学系 II は光合成のエネルギー源となるチラコイド膜を跨いだ電荷分離を行う。この電荷分離過程で光化学系 II は光エネルギーを使い S_0 から S_4 の 5 つの状態変化を経る水分解反応を触媒する。この酵素による触媒反応の正確な描写は、光による電荷分離機構の理解へと繋がり人工光合成触媒を考案する道しるべとなる。

この研究では SPring-8 のビームライン BL32XU/BL41XU とレーザー励起と凍結装置を組み合わせたコールドトラップ技術の支援により触媒過程の各々の S 状態にある結晶試料を効果的に作出する条件検討が行われた。次いで作出した各々の S 状態の結晶について SACLA の支援によって、サブ Å の原子間距離の変化を正確に検出できる高い精度の構造を決定した。光化学系 II の触媒中心は測定中に発生する水和電子で容易に還元される。このため放射線の影響のない高精度構造解析にはフェムト秒時間分解能測定ができる SACLA での支援が不可欠であった。この構造解析の結果、基質となる水分子が触媒中心である金属クラスターに取り込まれる S 状態の確定、 S 状態間での金属クラスターの構造変化、水分解の結果発生するプロトンの移動経路等の光化学系 II による電荷分離機構の詳細が明らかになった。



光化学系 II 複合体・酸素発生中心の反応中間体の結晶構造解析

光化学系 II の触媒中心は測定中に発生する水和電子で容易に還元される。このため放射線の影響のない高精度構造解析にはフェムト秒時間分解能測定ができる SACLA での支援が不可欠であった。この構造解析の結果、基質となる水分子が触媒中心である金属クラスターに取り込まれる S 状態の確定、 S 状態間での金属クラスターの構造変化、水分解の結果発生するプロトンの移動経路等の光化学系 II による電荷分離機構の詳細が明らかになった。

ビームタイム前後のウェット支援

ビームラインでの支援課題について、データ取得後に思うように回折分解能が得られず構造決定が難しい場合には、その実験結果からフィードバックを受け結晶化スクリーニングの再検討や結晶化条件の最適化、結晶凍結保護溶液の探索、HAG 法による凍結条件検討と分解能向上、in situ プレート回折による最適条件探索と連携した結晶化条件検討を実施した。また、位相決定のための重原子置換結晶の調製ならびに技術指導も実施した。これら構造決定での問題解決に向けた支援を実施することで本課題の成果創出に貢献するとともに、放射光施設等のデータ取得前後でのウェット実験へのフィードバックの重要性について見直す多くの機会を得た。

高度化により得られた成果と意義

支援の目的達成をゴールに見据えた効率の良い高度化を着実に進め、支援課題の実施に大きく貢献した。自動データ収集システム ZOO の高機能化、結晶化プレートのスキャン、マイクロ流路によるリガンド溶液ソーキング、偏向電磁石ビームラインの高輝度化、ピクセルアレイ検出器導入と測定システム構築、高性能解析計算機の導入、試料交換ロボットの高速化は、いずれもデータ収集・構造解析を高速化・自動化するために必須な高度化要素であり、全て順調に高度化を進めることができた。

従来の構造解析技術では対応できない支援課題を通して、膜タンパク質 LCP 結晶用の in situ クライオ測定ツールの高度化、嫌気-温度制御が可能な HAG 法の高度化 (右図: 支援の例 (DOI: 10.1073/pnas.1811837116)) など、高難度構造解析に向けた解析技術の研究開発を実現した。関連して

SPring-8にて常温・極低温状態でのSSROX技術を確立することで、SACLAの高速時分割解析(京大)より長い時間スケールの構造変化を追跡する技術開発を行い、幅広い時間幅での時分割構造情報を提供し支援に貢献した。またBL41XUは世界でも他に類を見ない高エネルギーX線を活用した超高分解能測定に関する支援を早期に可能にした。京都大学ではXFEL施設SACLAと連携し試料特性や様々な機能解析に対応できるよう種々の時分割実験系を立ち上げ、高度化を行い触媒反応追跡など放射光と連携した時分割結晶構造解析の環境整備を整えた。高度化に関する論文は事業開始後41報発表した。SACLAでは開発中の時分割測定システム(温度ジャンプ・ベルトコンベア)について実証実験に成功した。

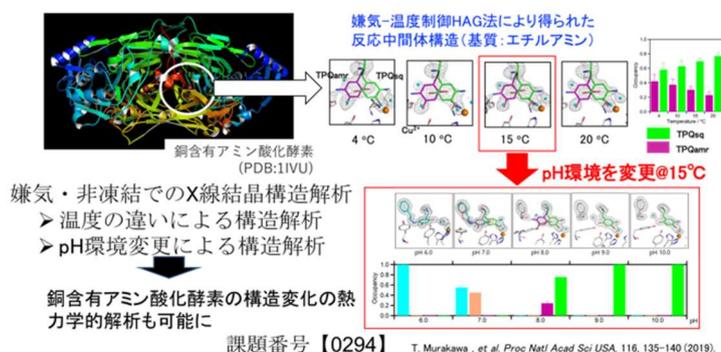
高度化は支援の基盤であるが、我々は支援課題を通して特に問題解決に必要とされる実効性の高い高度化を優先して実施し、常に解析ターゲットの構造決定を最優先とした。本事業期間内には支援に供するに至らなかった高度化項目もあるが次世代のさらなる高度な測定や解析支援に向けた基盤開発シーズとして大きな意味を有している。

連携により得られた成果と意義

研究期間を通じてSPring-8およびSACLAにおける立体構造解析を中心として、異なる観測手法との組み合わせやユニットの枠を超えた連携により関連構造解析の新しい研究成果が創出された。放射光との組み合わせが質的に異なるプローブであるXFEL光による解析の基盤となっており、SPring-8とSACLAが一体となった支援体制が活かされた。さらに高分解能構造解析が可能な2つの観測手法であるクライオ電子顕微鏡とX線結晶構造解析の組み合わせからいくつかの研究成果が創出され、この組み合わせが構造生命科学の強力な道具であることが示された。さらにそれらの成果はインシリコユニットとの連携によるMDシミュレーションも含まれているだけでなく、X線結晶解析支援に加え、標的タンパク質と化合物との相互作用評価に物理化学的解析を適用したケミカルシーズ・リード探索ユニットとの連携支援による成果でもある。

さらに、AMED/BINDS構造展開領域の山口雅彦教授と酵素阻害剤開発での連携により化合物合成展開を進めている支援課題に対し、本課題による構造解析支援を組み合わせたユニット間連携支援を行った。本課題で標的となるタンパク質と化合物の共結晶化を高効率で実施するために、大量かつ安定な標的タンパク質の調製システムを構築した。構造展開ユニットにより合成された化合物のうち、これまでに阻害活性を示している数種類について共結晶化を行い、そのうち1種類についてはビームラインにおける回折実験を実施するなど、構造展開ユニットによる化合物合成展開、構造解析ユニットによる結晶構造解析を組み合わせたユニット間連携による支援を実施した。多種類の化合物との複合体結晶を作成するため昆虫細胞発現系によるタンパク質調製システムの更なる効率化と自動処理に適した結晶化条件を確定し、阻害活性を示した化合物数種類との複合体結晶の作成を実施した。

他にも産学連携高度化課題として進めているマイクロ流路デバイス開発においては、北海道大学との共同研究および8社の製薬企業の研究者をアドバイザーとして迎え、化合物スクリーニングのハイスループット化を目指した新規デバイスの開発を行った。定期的に報告会を開催するとともに、随時企業からの意見収集やテストサンプル提供等を受けて現場ニーズを開発に反映した。これまでに実証実験の結果を論文化し(DOI: 10.1039/D0SC02117B)、デバイスの改良や実験の自動化など実用化に向けた開発に取り組んでいる。またクライオ電顕ネットワークでの連携として、他機関と協力したワークショップ、講習会の開催を行った。また、生理研研究会ほか学術講演会での関連セッションに参加し、クライオ電顕による構造解析の実施例の紹介を行った。また、クライオ電顕ユーザーグループミーティングに参加し、ユーザーとコミュニケーションをはかり、情報発信を行った。



銅含有アミン酸化酵素生理活性条件下で
酵素タンパク質のコンフォメーション変化を明らかに

< 英語 >

In collaboration with JASRI and Kyoto University, RIKEN has supported structural biologists or researchers who need structural information using synchrotron radiation beamlines as the main axis and promoted their upgrading. In addition, training sessions and seminars were held regularly for beginners and intermediate level users of protein crystallography for the purpose of providing more advanced technical education. Through these workshops, we promoted the improvement of users' measurement techniques and shared measurement issues to expand support and consolidate support and advancement needs in this project.

One of the most notable results of the support for high-resolution, high-throughput, and high-difficulty structural analysis using the high-flux microbeams of SPring-8 is "High-resolution structural analysis of a macrocyclic peptide complex containing human factor XIIa and cyclic β -amino acids" (DOI: 10.1038/s41557-020-0525-1), "High-resolution structural analysis of archaeal heliorhodopsin" (DOI: 10.1038/s41586-019-1604-6), "Antagonist-bound high-resolution structure of the M2 muscarinic receptor" (DOI: 10.1038/s41589-018-0152-y), and "High-resolution structural analysis of the prostaglandin receptor" (DOI: 10.1038/s41589-018-0171-8). Our support and advancement have promoted the use of sophisticated structural information in the life sciences and greatly accelerated drug discovery and life science research.

As an example of the remarkable research results for the development of science that have been produced through the support of correlation structure analysis, the results of the support using both SPring-8 and SACLA, which are also listed in the title of this grant project, were published in *Science* (DOI: 10.1126/science.aax6998). Combining synchrotron and XFEL measurements, details of the charge separation mechanism by photosystem II were clarified.

Wet support before and after beamtime for the support issues at the beamline, when the diffraction resolution is not as good as expected after data acquisition and structure determination is difficult. We had many opportunities to reevaluate the importance of feedback to experiments before and after the use of synchrotron radiation facilities.

The following improvements were made for high-throughput and automation: the automatic data acquisition system ZOO, scanning of crystallization plates, ligand solution soaking using microfluidic channels, enhancement of the brightness of the bending magnet beamline, introduction of a pixel array detector and construction of a utilization system, introduction of a high-performance computer, and acceleration of sample exchange robot operation.

Through the support tasks that require difficult structural analysis, research and development of analytical techniques for highly difficult structural analysis were realized, such as upgrading the in situ cryo measurement tool for membrane protein LCP crystals and upgrading the HAG method that enables anaerobic-temperature control. Relatedly, SSROX technology was established at SPring-8 at room and cryogenic temperatures to track structural changes over longer time scales, and in collaboration with the XFEL experiment (Kyoto University), additional (time) information was provided for time-resolved structural analysis, contributing to support. In collaboration with the XFEL facility at Kyoto University, various time-resolved experimental systems were established and upgraded to support sample characterization and various functional analyses, and an environment for time-resolved crystal structure analysis in conjunction with synchrotron radiation, such as catalytic reaction tracking, was established. Since the start of the project, we have published thirteen papers related to the upgrading, and have successfully demonstrated the time-resolved measurement system (temperature jump and conveyor belt) under development at XFEL.

New research results in correlation structure analysis were generated throughout the research period, mainly in three-dimensional structure analysis at SPring-8 and SACLA, in combination with XFEL, cryo-EM, and MD simulations. These were achieved through collaboration with the other units in BINDS project. Furthermore, we collaborated with Prof. Masahiko Yamaguchi of the AMED/BINDS Structural Development Unit on the development of enzyme inhibitors.

In the development of microfluidic devices, which has been promoted as an advanced industry-academia collaboration project, we developed new devices for high-throughput compound screening in collaboration with Hokkaido University and with researchers from eight pharmaceutical companies as advisors. Through periodic debriefing sessions, the project has been promoted by collecting opinions from companies and receiving test samples as needed, and making use of the needs of the field in the development of the device. We have published the results of our demonstration experiments (DOI: 10.1039/D0SC02117B), and are working on further development toward practical application, such as device improvement and automation of experiments. In addition, as part of the collaboration in the cryo-EM network, workshops and seminars were held in cooperation with other institutions. In addition, we have participated in related sessions at the Institute of Physiological Sciences and other scientific meetings, and introduced examples of structural analysis using cryo-electron microscopy. We also participated in cryo-EM user group meetings to communicate with users and disseminate information.