【報告様式A】

作成／更新日：令和４年５月３１日
課題管理番号：21am0101071j0005

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支援基盤事業
（プログラム名）（英　語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

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）千田　俊哉
（英　語）Toshiya Senda

補助事業担当者　所属機関・部署・役職：
（日本語）大学共同利用機関法人　高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授
（英　語）High Energy Accelerator Research Organization, Institute of Materials Structure Science, Professor

II 補助事業の概要

（１）支援

コンサルティング数	通常支援数(成果公開)			企業利用・成果占有利用数		
	支援中	支援完了	計	支援中	支援完了	計
214(28)	42(7)	158(16)	200(23)	0	9	9

() 内は筑波大による支援

高エネルギー加速器研究機構(KEK)と分担機関の北大では、構造生物学を専門としない研究者を主な対象として、構造解析や相関構造解析の支援を行った。課題担当責任者としての支援は、PDIS 事業からの継続支援の 25 件と、KEK 生産領域(課題代表:加藤龍一)との共同支援を含めて 209 件(成果公開 200 件、成果占有 9 件)である。この中で、精製や結晶化から支援するものが 70 件であった。また、結晶構造解析の支援では、ビームタイム利用支援を含め、57 件を受け持った。溶液散乱の支援は 41 件であり、課題のほとんどは相関構造解析支援を目的とするものであった。

フォトンファクトリー(以下 PF)の 5 本の結晶構造解析ビームライン(BL-1A, 5A, 17A, AR-NW12A, AR-NE3A)と 2 本の溶液散乱ビームライン(BL-10C, BL-15A2)においては、502.3 日のビームタイムを確保し、測定支援・

講習会に 236.2 日、残りを高度化目的で使用した。KEK の基本姿勢は、申請者研究室への技術移転を行い、申請者の研究室で自ら構造に基づく研究が進められるように支援するというものである。支援研究者が実際に滞在してディスカッションや実験を行う支援体制が整備され、毎年 150 名以上（コロナ感染症の影響のため 2019 年は例外的に 30 名程度)の研究者が KEK を訪れた。コロナ感染症の蔓延に伴うリモート化の促進以降は Zoom などの Online 会議ツールを用い、コミュニケーション を取りながらリモート測定するなど、滞りなく支援が進むように配慮し、現在でもこの方式が主流になっている。

2017 年度末にクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica が導入され、これを用いた単粒子解析の支援体制を確立した。一般ユーザーへの支援は 2018 年 10 月より開始し、ユーザータイム・講習会に 789 日、高度化目的に 99 日を使用した(残りはメンテナンスに使用)。これまで 81 件の課題を支援した。企業ユーザーも積極的に受け入れており、トライアルユースを行った企業の一部は、化合物との複合体の単粒子解析に取り組んだ。KEK のクライオ電顕は利用状況を WEB で公開し、公平性と透明性を保ち運営している。

分担機関の北大では、7 件の構造解析支援事前相談と支援を行った。構造解析を支援しているグループに対して結晶化の技術移転と指導を行った結果、支援先の研究室において結晶化が行われるようになった。溶液フリー結晶マウント法の普及に向けての技術指導と共に、装置の使用説明・見学会を定期的に実施した。

以上、KEK と北大の支援の結果として、119 報の論文を発表している。その他にもビームタイム支援などにより、補助事業者が著者に含まれない論文が 94 件(クライオ電顕ではマシンタイム供与が 1 件)や、X 線結晶構造解析では 223 件、クライオ電子顕微鏡では 19 件の PDB 登録数、X 線小角散乱では、SASBDB に 11 件の登録があった。それらの中にはハイインパクトな国際誌に掲載されたものもある。メロテルペノイド生合成に関わる酸素添加酵素の反応機構を明らかにした支援(Nakashima et al. Nat. Commun. 2017, J. Am. Chem Soc. 2018) のほか、相関構造解析に分類される支援でも顕著な結果が得られている(相関構造解析の項を参照) 。また、ヒストンシャペロン HIRA の立体構造から、構造と生物学活性との関連を解明した成果 (Ray-Gallet et al. Nat. Commun. 2018)や、多剤耐性輸送体の薬剤輸送に伴う構造変化についての成果(Nagarathiam et al. Nat. Commun. 2018)のように、海外研究者との共同研究も行われている。また支援する前は独立に進んでいた研究が、支援者を通し結びつき、PX や Cryo 電顕を利用し、C-C 結合を切断する酵素の発見と構造に基づいた機能解析した例(Mori et al. *Nat.Commun*, Kumano et al. *PNAS* 2021) もある。ビームタイム支援からも、麻疹ウィルス膜融合タンパク質とその阻害剤の複合体の構造 (Hashiguchi et al. PNAS. 2018)や 、オートファゴソーム前駆体へのリン脂質供給の仕組みの解明(Osawa et al. Nat. Struct. Mol Biol. 2019) 、DNA メチル化酵素とヒストン H3 の複合体構造よりメチル化酵素の集積機構を解明した例 (Ishiyama et al. Mol Cell. 2018)や、放射光施設を横断利用し概日時計周期を延長させる化合物とその作用メカニズムの発見した研究(Miller et al. Nat. Chem Biol. 2020) など、構造情報を基軸とした生命現象の解明に貢献した成果が出ている。

産業界への支援も積極的に行ってきた。企業から結晶構造解析および溶液散乱に対する相談を多数受け、うち 9 社から BINDS への申請があった。これらは、成果公開はできない等の理由で BINDS としての支援は完了し、企業間と契約を結んだ上で支援を行った。残りの企業も KEK の施設利用の制度を利用した。クライオ電顕においても多くの相談があり、トライアルユースを経て施設利用の制度を使って利用した。

講習会・トライアルユースの開催および広報活動：

結晶構造解析：KEK のタンパク質生産領域と合同でタンパク質結晶構造解析初心者講習会を毎年開催した。構造解析の経験者に対しては中級者講習会を毎年行った。毎年 3 月には、PF タンパク結晶ユーザーグループミーティングを開催し、BINDS 事業での高度化ビームラインをより効率良く利用できるように開発状況の周知に努めた。

溶液散乱：2017 年にタンパク質 X 線溶液散乱講習会を開催し、講義、解析実習、希望者のテスト測定を行った。2018 年度には相関構造解析を睨んだ PF 研究会を開催した。2018 年以降テスト測定主体の講習会(トライアルユース)を定期的に開催し、BINDS への課題申請を促進した。2019 年 4 月には SEC-SAXS データの全自動解析ソフトウェア Serial Analyzer(現:MOLASS)に特化した講習会を開催した。

クライオ電顕：アカデミアに向けて初期トレーニングを定期的に開催し、課題申請を促進した。その際に作成したテキストは web 上で公開しており、東大の吉川研を始め新人教育に利用されている。企業向けにはトライアルユースを行い、そのうち 3 社と 2019 年度の年間契約に至った。2018 年 9 月には PF 研究会を開催した。定期的にクライオ電顕解析初心者講習会も開催した。また、ユーザーグループによる会合の開催を支援し、クライオ電顕ネットワークを中心として、国内のクライオ電顕の利用が活性化するように努めた。

広報活動：分子生物学会年会において展示ブースを設置した。訪問者の中から BINDS への課題申請へ繋がったものもある。また、世界の製薬企業の構造生物研究者が集まる学会 PSDI に毎年参加し、口頭発表と展示ブースで海外にも BINDS での活動を発信した。

（2）高度化

結晶構造解析

新たに 2 台の高性能ピクセルアレイ型X線検出器(PAD)を導入し、全てのビームラインで PAD による高速・高精度測定が可能となった。X 線ビームによって試料の位置決めを行うラスタースキャンが実用化され、ソフトウェア SIROCC の開発により全自動測定の利用が大幅に増加した。SPring8 から移設したレーザー結晶加工機を整備し Native-SAD 測定や顕微分光測定に利用できるようにした(Kawano et al. Acta Cryst. F, 2022)。Native SAD 測定に関しては結晶の事前評価、レーザー加工、低エネルギーX 線による低線量多数データセット測定、という測定パイプラインが確立した。in-situ 測定を膜タンパク質結晶へ適用し、KEK タンパク質生産領域と連携して、結晶化スクリーニングから迅速な回折能評価、そして回折データ収集から構造解析までを一貫して行うことが出来るようにした。また、精密湿度気流下での室温測定環境も整備された。

溶液散乱

BL-15A2 の光学径路、差動排気システムの改修と共にビームポジションモニターを導入して制御系を整備することで、ビームの長期安定性を向上させた。また、多成分平衡状態にある分子間相互作用システムの解析を目指し、μ 流路セルを利用した滴定 SAXS 測定システムの開発と利用支援を行った。SEC-SAXS 解析に関しては、連続的に計測されるデータを情報科学的手法により全自動で解析可能なソフトウェア MOLASS（旧: Serial Analyzer）を開発し公開した。

クライオ電子顕微鏡の立ち上げ・高度化

国内外から情報を収集して電顕室や操作室などの環境整備を行った上でクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica を導入し、グリッド作成からデータ測定までを可能とするクライオ電顕実験設備を立ち上げた。単粒子解析の解析環境としては、Relion を始めとするソフトウェアが利用可能な解析環境を実現した。クライオ電顕のある研究棟と解析環境のある研究棟を高速ネットワークで結び、測定直後にデータの初期解析を行う On-the-fly 解析の環境を整えた。その他、**1)**タンパク質を氷包埋するのに有効なタグを見出し、タグを付加することで効率的に良質なグリッドを作製する技術開発を行った。**2)**撮影スループットを向上させるため、Linear mode で 4300 枚/日を実現する測定技術を導入した。

データベース・ネットワーク

結晶構造解析と溶液散乱解析ビームライン、クライオ電子顕微鏡施設を結ぶ高速ネットワークを整備し、データベースやファイルストレージなどのリソースを全施設で共有する事が可能になった。タンパク質結晶構造解析ビームラインでは、ビームタイムと連動した認証システムを導入し、安全性の高いリモート操作(所外からの操作)システムを構築した。

クラウドを利用した高度解析環境構築

2018 年度に産学連携による技術支援基盤の高度化研究として、「クラウドスペースにおけるオンデマンド型高度構造解析環境の構築」が採択され、アマゾンウェブサービス(AWS)を用いた解析環境構築を行った。これにより適切なセキュリティのもと実験データが AWS 上のストレージにアップロードされ、解析の種類に応じて最適な計算リソースを選択して構造解析計算が行えるようになった。

分担機関(北大)における高度化

Native-SAD の構造解析成功率を向上させるため、ユーザー側の技術の高度化に絞って開発を行った。高精度データ測定のために開発した溶液フリーループの実用化と普及のため、簡易吸引装置と自動吸引凍結ロボット（AFERO）を開発した。高精度回折データの自動測定と評価法の開発では KEK のグループと連携し、測定方法のアドバイスをユーザーへ提案する自動データ処理・評価・測定法の助言システム DEPNAS(**D**ata and **E**valuation **P**rocess system for **Na**tive-**S**AD)を開発した。大量データの時代に対応するため、人工知能を取り

入れた AI-DEPNAS を実装し、教師データとして整理した大量の Native-SAD データを用いてトレーニングした。ユーザーインターフェースを制作し、ビームラインへ導入可能となった。

（3）連携

支援システムの構築と最適化ユニットとの連携

プラットフォーム機能最適化ユニットと協力し、構造解析領域の事業の課題情報の共有や放射光ビームタイム利用支援のシステムの確立、BT 予約サイト、コンサルティングサイトの開設を行った。解析領域の SPring-8、 阪大と共に放射光 BT 利用調整委員会を構成し、機能最適化ユニットと連携してビームタイムの管理、ユーザーへの周知などの運営を行った。

解析ユニット内連携

生産領域とは、KEK の生産領域を中心として 70 件の連携支援を行っており、タンパク質の発現・精製の指導から、結晶化、さらには構造解析まで一貫した支援を提供した。他にも、阪大高木研の抗体 Fv-clasp 技術を用いた共同支援や(#717 大分大宇田博士)、溶液散分野でも理研白水グループ(#1276 理研小嶋博士)と連携支援を行っている。また、毎年一度（コロナ禍前)、夏季に解析領域の実施者の測定技術交流会を行い、放射光を用いた結晶構造解析、溶液散乱解析、クライオ電顕の単粒子解析などの技術開発状況を議論するとともに、今後の測定技術の開発方針について検討した。

クライオ電顕ネットワーク

国内のクライオ電顕の利用効率化と連携を促進するため、放射光を使った支援において長年の実績をもつ KEK の千田俊哉を委員長とする運営委員会を立ち上げてクライオ電顕ネットワークの運営を開始した。クライオ電顕のエキスパートから構成される E2 課題審査委員会(委員長：岩崎憲治(筑波大学))を組織した。2018 年度から、国内のハイエンドクライオ電顕装置の効率的な利用を実現するため、課題申請および審査をウェブ上で開始した。単粒子解析を行う支援依頼者の増加に対応し、施設とユーザーが協力し分野を発展させることを目的としたユーザーグループを立ち上げ(代表：田中良和(東北大学))、定期的にユーザーミーティングを共同開催した。

ユニット間連携

ケミカルシーズ･リード探索ユニット、ライブラリー･スクリーニング領域の東大創薬機構と共に、医薬、農薬開発のターゲットとなるタンパク質と阻害剤の複合体の構造解析や、それを基にした Structure based drug design(SBDD)を進めている。北大ライブラリー･スクリーニング領域の#1275 前仲博士が取り扱う創薬ターゲット分子の構造解析や、インシリコ領域とは MD や in silico Docking などの領域間連携支援も行い、相関構造解析に成功した例もある。また KEK の課題実施者が支援依頼者となり、インシリコ領域の寺田博士やタンパク生産領域の岩田博士と協力し、多剤排出輸送体について連携研究を行った例もある(Nagarathiam et al. Nat. Commun. 2018, インシリコ領域: # 810、生産領域:高度化課題)。

他事業や産業界との連携

細胞内 GTP センサーの機能解析を目的とした産総研竹内博士の課題(#586)では、筑波大の創薬プロジェクト T-CreDO に採択され創薬研究を発展させており、化合物特許も申請中である。また、創薬に重要な化合物毒性／薬物動態に関連する膜タンパク質の構造解析をクライオ電顕で行うために、AMED の支援のもと、製薬企業 4 社が連携してクライオ電顕勉強会を発足させた。千葉大村田博士が分担者として 2019 年度より本課題に参画し、勉強会の成果として標的膜タンパク質の構造解析に成功し論文化まで行った。

（4）人材育成についての実績及び成果

KEK 構造生物学研究センター (SBRC)に所属し BINDS 事業に関わった博士研究員は、学会や研究会に積極的に参加し研究発表を行うよう活動してきた。これまでアカデミアに 3 名がスタッフとして(助教, 任期付准教授)、また 5 名が研究員として別大学に異動した。また産業界にも研究員として 5 名が製薬ならびに技術系の企業に進み、アカデミアのみならず企業にも様々な人材を送り出している。また、施設外部においても、構造解析に関わる人材育成のため講習会を定期的に行い、またその内容に関しても可能な限り公開して、研究者の育成に努めている。

1. KEK が主催したタンパク質結晶構造解析中級者講習会の講義や、解析手法についてスライドを外部向け PF-UA のサイトに公開。URL: http://research.kek.jp/group/pxpfug/
2. クライオ電子顕微鏡の電子顕微鏡の操作、データ収集に関する初期トレーニングテキストの公開。URL: https://www2.kek.jp/imss/sbrc/beamline/cryoem/190411_TrainingText_v24.pdf
3. SBRC Internatinoal Cryo-EM Seminar シリーズの開催
4. クライオ電顕解析初心者講習会 URL: http://pfwww.kek.jp/sbrc-cryoem/workshop/1st.html
5. SEC-SAXS/MALS 測定解析のためのマニュアルの公開。URL: http://pfwww.kek.jp/saxs/PF-SAXS_beamline_Information.html
6. SAXS データ解析ソフトウェア SAngler 及び、MOLASS をマニュアルと共に公開。URL: http://pfwww.kek.jp/saxs/SAngler.html, http://pfwww.kek.jp/saxs/MOLASS.html

(1) Support
KEK and Hokkaido University, a collaborating institution, supported structural analysis and correlation structure analysis, mainly for researchers who do not specialize in structural biology. As the project manager, we have supported 209 projects (200 for non-profitable and 9 for profitable agents). 70 cases were supported from protein production in collaboration with the protein production project in KEK. 57 cases were for crystal structure analysis including beamtime (BT) usage support. Solution scattering support was provided for 41 projects, most of which were aimed at supporting correlation structure analysis. 502.3 days of BT were allocated for user support and development at five protein crystallography (PX) and two solution scattering beamlines in PF. KEK's basic policy is to transfer technology to the applicant's laboratory. To accomplish this aim, BINDS applicants stayed at KEK and conducted experiments together (~150 researchers visit KEK annually). A cryo-electron microscope (Cryo-EM) was introduced at the end of FY2017, and started user support of single particle analysis in October 2018, 88 % of the running time is allocated for users (in total 81 projects) . KEK also supports industrial users: five pharmaceutical companies collaborated to establish a cryo-EM study group under the support of AMED to perform structural analysis of membrane proteins related to compound toxicity/pharmacokinetics (with Chiba University since 2019). We successfully analyzed the target (hERG) with an off-target compound (Asai et al. 2020). We conducted PX, solution scattering, and Cryo-EM workshops every year to promote the use of structural biology methods.

(2) Advancement
PX: Two new high-performance pixel array X-ray detectors were installed, enabling high-speed and high-precision measurements at all the PX beamlines; raster scan by X-ray was put into practical use, and the development of SIROCC software greatly increased the use of fully automated measurements. With the laser crystal processor, relocated from SPring8, a measurement pipeline for native SAD has been established. AI-DEPNAS, developed by Hokkaido Univ., suggests the strategy of data collection. In-situ measurements were applied to membrane protein crystals to enable integrated processes from crystallization screening to structural analysis.
Solution Scattering: The BL-15A2 was upgraded: a new optical path, pumping system, and beam position monitor are installed. We developed a measurement system with a microfluidic cell to analyze molecular interaction in a multi-component equilibrium state and started user support. For SEC-SAXS analysis, we developed and released Serial Analyzer (now updated as MOLASS), software that enables fully automated analysis of continuously measured data using informatics methods.
Cryo-EM: A cryo-EM facility was set up to enable everything from grid preparation to data measurement. The cryo-EM facility and the building with the analysis environment were connected by a high-speed network to provide an environment for on-the-fly analysis, in which the initial analysis of data is performed immediately after measurement. In addition, we found effective tags for ice-embedding of proteins and developed a technology to produce high-quality grids by adding the tags.

119 papers have been published as a result of the support and development from KEK and Hokkaido University. In addition, there were 94 other papers resulting from BT usage support in which the grantee was not included as an author. We achieved 223 PDB registrations in X-ray crystallography, 19 in cryo-EM, and 11 registrations to the SASBDB in small angle X-ray scattering.

(3) Cooperation
We organized BT utilization committee with SPring-8 and Osaka University, and managed PX and solution scattering BT in cooperation with the program coordination Unit. We held a member meeting in the summer to discuss the technological development status in PX, solution scattering, and cryo-EM, and to exchange ideas for the future development and user support of the correlation structure analysis.
The Cryo-Electron Microscopy Network (Chairman: Toshiya Senda) was established to improve the efficiency and technology of cryo-EM use in Japan. In addition, a user group was established in response to increasing requests for assistance in the single-particle analysis, and regular joint meetings were being held.
Together with the Chemical seeds and lead compound discovery and Library screening Units (Univ. Tokyo and Hokkaido Univ.), we performed structural analysis of protein-inhibitor complexes targeted for drug discovery. By interdisciplinary collaboration with *in-silico* units (Univ. Tsukuba, Hoshi Univ, and RIKEN), we supported several research projects on drug and agrochemical discovery by elucidating substrates/inhibitors' binding or reaction mechanism using MD, docking, and fragment molecular orbital (FMO) methods.