

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



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）クライオ電子顕微鏡による生体分子構造解析の高分解能化と効率化を目指した研究
（プログラム名）（英語） Supporting structural biosciences by technical developments for high-resolution, high-throughput cryoEM image analysis

実施期間：平成29年8月25日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）難波 啓一
（英語） Keiichi Namba

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人大阪大学・大学院生命機能研究科・特任教授
（英語） Specially Appointed Professor, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

II 補助事業の概要

2017～2021年度の創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業では、クライオ電子顕微鏡による生体分子の構造解析で計86件の支援を実施し、うち71件はすでに支援を完了した。解析依頼を受けた試料は、まず100 kV汎用電子顕微鏡による負染色観察により試料の形状や分散を確認したのち試料濃度を調整して急速凍結グリッドを作成し、クライオ電子顕微鏡で数千枚のクライオ電顕像を撮影して解析する流れを確立した。これは我々のグループで長年に渡りクライオ電顕像のデータ収集や解析技術の高度化と効率化を進めた研究開発の成果であり、この5年間で支援実施体制は大幅に進歩した。

日本電子社と共同開発したクライオ電子顕微鏡 CRYO ARM では、2019年初頭に当時のクライオ電顕像解析では世界最高分解能となる1.53 Åを24時間の自動撮影による約900枚の電顕像の画像解析により達成した。2020年以降は電子線制御プログラムの工夫によりビーム傾斜とイメージシフトを組合せ、クライオ電顕像の高分解能情報を犠牲にすることなく撮影速度の高速化を図り、2019年初頭までの1,000枚/日から2020年夏には22,000枚/日、そして2021年春には30,000枚/日へと撮影速度の劇的な高速化を実現するとともに（図1）、15時間のデータ収集にてapoferritinの原子分解能1.29 Åでの構造解析を達成した（図2）。一般的なタンパク質の高分解能構造解析に必要とされるクライオ電顕像数は3,000～4,000枚であるため、試料条件を変えて複数のデータセットを収集しても1～2日のマシンタイムでそのデータ収集は完了し、数日後には複数の高分解能構造が得られるという流れが確立した。こうして構造ベース創薬化合物スクリーニングが実効的に実施可能となり、2021年4月5日の日経新聞朝刊で大きく報道された。

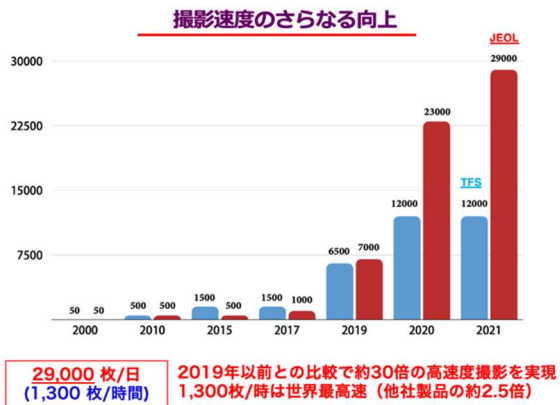


図1 クライオ電顕像撮影速度向上の記録

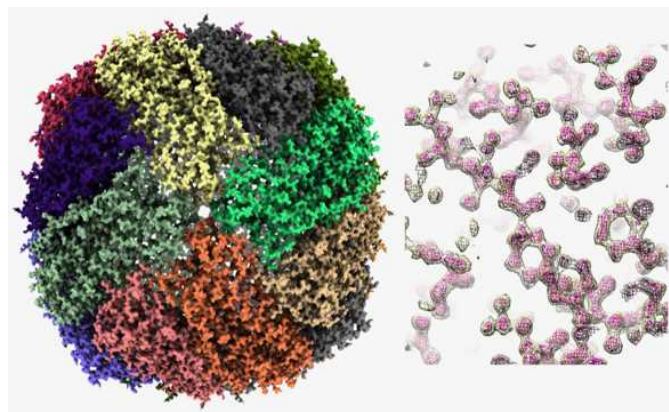


図2 apoferritin の 1.29 Å 分解能の構造

また、2020年以降は酸化修飾グラフェングリッド (EG-grid: Epoxidized Graphene grid) [Fujita et al. 2021 bioRxiv] の開発が進んだことで、少量かつ低濃度のタンパク質試料水溶液でもグラフェングリッド表面に標的試料分子を高密度に吸着でき、クライオ電顕構造解析のさらなる効率化に大きく貢献している (図3)。例えば SARS-CoV-2 スパイクとウイルス中和抗体との複合体など高難度試料でも、構造解析によるエピトープ決定が数日以内ができる [Maeda et al. 2021 bioRxiv] (図4) など、膜タンパク質を含めて構造解析可能な試料の幅が大きく広がった。またこれらと並行して、クライオFIB-SEMで作製した細胞・生体組織のクライオ試料切片試料グリッドをそのまま CRYO ARM に挿入してトモグラフィデータを収集し構造解析するワークフローの確立を目指すための基盤整備を実施した。低分子化合物やタンパク質の極微小結晶の電子線回折 (マイクロ ED) による構造解析についても効率的な自動データ収集と構造解析の技術を確認して支援に供する準備が整いつつある。

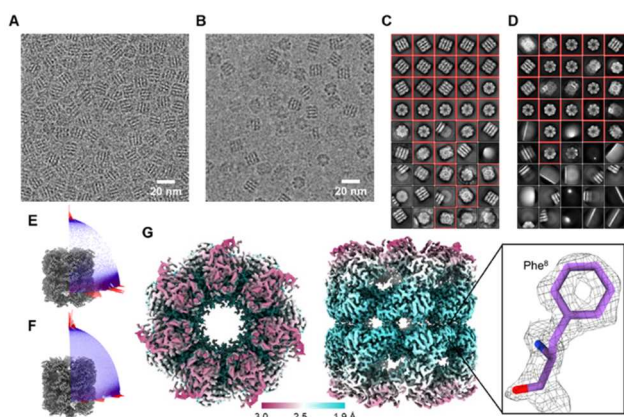
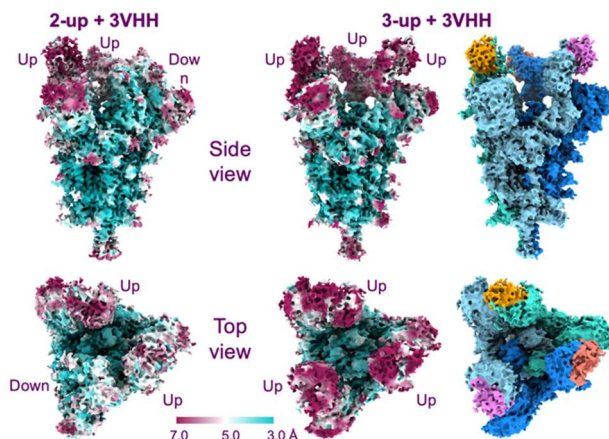


図3 EG-gridによるGroELの構造解析。(A)はEG-grid、(B)はプラズマ親水化CVDグラフェン搭載グリッドによる凍結試料のクライオ電顕像。(C)(D)は其々の2Dクラス平均像。(E)(F)は其々の分子配向分布。(G)は3次元再構成像 (1.98 Å 分解能) のトップビューとサイドビュー。



Maeda, Fujita, Makino et al (2021)
CogNano 伊村G, 阪大薬学 井上研, 阪大微研 松浦研
データ収集6時間、画像解析2~3日間

図4 EG-gridを活用した新型コロナウイルス・スパイクタンパク質とウイルス中和活性を持つVHH抗体のクライオ電顕構造解析の事例。

Summary of our study over the past 5 years of the AMED BINDS program

We have over 30 years of experience in electron cryomicroscopy (cryoEM) and image analysis for macromolecular structural analysis, including its technological development. We have utilized 6 electron microscopes, of which 3 are high-end electron cryomicroscopes (cryoTEM) to advance cryoEM technologies for high-resolution and high-throughput macromolecular structural analysis as well as for collaborative studies with and support of other research groups in academia and industry with our cryoEM technologies. We have supported 86 projects over the last 5 years of the AMED BINDS program and already completed 75 of them.

We have established an efficient workflow of cryoEM structural analysis, starting from negative stain EM observation to examine the shape and monodispersity of specimens, making cryo-grids by quick freezing and collecting a few to several thousands of cryoEM images to carry out image analysis for 3D reconstruction, followed by model building based on the 3D maps.

In early 2019, we attained 1.53 Å, a world record of high-resolution at the time, from about 900 images of apoferritin automatically collected over 24 hours. For this work, we used JEOL CRYO ARM 300, a cryoTEM that we co-developed with JEOL over 10 years, and its cold field emission gun that emits highly coherent electron beam greatly contributed to the high resolution. After 2020, we devised a TEM control software for electron optics of CRYO ARM 300 to speed up the imaging process without sacrificing high resolution, and the imaging speed was increased from 1,000 images/day to 22,000 images/day in the summer of 2020, and to 30,000 images/day in the spring of 2021. Since the number of images required for high-resolution structural analysis is 3,000 to 4,000 in average, collection of several datasets can now be completed within a day or two. Structure-based drug screening can be carried out quite efficiently now, and this was on the Nikkei News Paper of April 5, 2021.

We also developed an epoxidized graphene grid (EG-grid) that effectively immobilizes protein particles by applying an oxidation reaction using photoactivated ClO_2^* and further chemical modification. The EG-grid is useful because it adsorbs proteins on the grid surface at high density even from an extremely small amount of sample solutions with low protein concentrations. For example, we were able to determine the epitopes of SARS-CoV-2 virus neutralizing VHH antibodies within a few days by determining the structure of spike-antibody complexes, and thus the EG-grid has widened the applicable targets of cryoEM, including membrane proteins. We will further develop cryoEM technologies and apply them to support any projects to contribute to the advances in life science and drug discovery.