

## 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）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8月25日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）谷 一寿  
（英語）Kazutoshi Tani

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）国立大学法人三重大学・医学系研究科・特任教授  
（英語）Mie University, Graduate school of medicine, Appointed Professor

### II 補助事業の概要

#### 研究科題名：クライオ電子顕微鏡を用いた膜タンパク質の高分解能動的構造解析と技術人材育成支援

医薬品ターゲットの約半数以上が膜タンパク質であるため、結晶の作製なしに高分解能構造情報の取得が可能なクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法を多くの研究者に利用できるようにすることは、膜タンパク質の構造に基づく医薬品開発という新規創薬戦略の実現促進に向けて大きなアドバンテージがある。プロジェクト開始当初は、立体構造に指南された創薬研究を推進するうえで、次の2点が大きな問題となっていた。①創薬研究を進める上で3.0Å分解能を超える構造情報が必須となるが、国内のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析では論文報告にまで至っていない。②化合物結合に伴う複数の膜タンパク質の状態およびその結果生じる動的な構造学的分離の難易度は高い。当時、これらの問題を克服するよう様々な試料調整技術・解析プログラムを含め改善が進みつつあったが、高分解能のクライオ電子顕微鏡構造解析は容易ではなかった。その理由として、構造決定のフローが各ステップにおける掛算的な成功因子として影響してくるため、独立に最適化できるものではないところにあった。そこで構造解析まで含めた統合的なパイプラインとして結果をフィードバックさせながら進められるように、本申請では以下の3要素を柱として行なうことで、クライオ電子顕微鏡を用いた膜タンパク質の高分解能動的単粒子解析の高度化と研究支援にフォーカスして進めた。

1. 膜タンパク質の高分解能構造解析技術の確立
2. 膜タンパク質の動的構造状態の分離技術の確立
3. 上記2要素をベースに技術支援および人材育成のための体制構築

成果: 本課題遂行により、クライオ電子顕微鏡によって試料調整からデータ収集・構造解析までをパイプラインとして実現するとともに、これらの技術を生かせる人材育成を行うことで、創薬研究で期待される膜タンパク質の高分解能動的立体構造情報を獲得できる技術支援体制を整えることができた。プロジェクト開始前から既に発足していた名古屋大学の嶋篤典先生のタンパク質生産ユニットの課題は、クライオ電子顕微鏡の共用ネットワークを構築する上での試料提供のための基礎部分にあたり、本プロジェクトと組みあわされることで車の両輪として効率のよい体制も提供できた(論文 1, 2 他)。若手研究者を主なターゲットとした実習を含む講習会を毎年実施し、企業からの出向者に対して博士号取得の支援といったクライオ電子顕微鏡技術の普及・発展に貢献した。高分解能構造解析のためのクオリティ評価と最適化が進めることができ、膜タンパク質(論文 1,2,5-7)だけでなく水溶性の複合体タンパク質(論文 4)にも適用できる技術として高度化に成功し、特に AI を導入した構造決定解析法の開発による解析期間の短縮効果により、課題期間内に膜タンパク質・複合体タンパク質やその動的構造状態を含み合計 5 2 個の立体構造を決定することができた。また、機会学習を用いたクライオ電子顕微鏡の撮影効率化を東京大学の寺田透先生たちと共同で進めることで、アルゴリズムや実施例を示した論文発表(論文 3)を行うことができ順調な成果を挙げることができた。日本電子製、Thermo Fisher 社製どちらのクライオ電子顕微鏡を用いても原子レベルでの高分解能立体構造を決定できる技術経験を持ち合わせている私たちのグループが、高度化した技術で外部支援するだけにとどまらず人材育成も精力的に行ったことで、国内のクライオ電子顕微鏡を用いた研究の活性化にも貢献できた。

#### 主要論文リスト:

1. Burendei B, Shinozaki R, Watanabe M, Terada T, Tani K, Fujiyoshi Y, Oshima A, Cryo-EM structures of undocked innexin-6 hemichannels in phospholipids, *Science Advances*, 2020, 6, eaax3157
2. Tani K, Kanno R, Makino Y, Hall M, Takenouchi M, Imanishi M, Yu L-J, Overmann J, Madigan MT, Kimura Y, Mizoguchi A, Humbel BM, Wang-Otomo ZY, Cryo-EM structure of a Ca<sup>2+</sup>-bound photosynthetic LH1-RC complex containing multiple  $\alpha\beta$ -polypeptides, *Nature Communications*, 2020, 11: 4955
3. Yokoyama Y, Terada T, Shimizu K, Nishikawa K, Kozai D, Shimada A, Mizoguchi A, Fujiyoshi Y, Tani K, Development of a deep learning-based method to identify “good” regions of a cryo-electron microscopy grid, *Biophysical Reviews*, 2020, 12, 349-354
4. Hiragi K, Nishio K, Moriyama S, Hamaguchi T, Mizoguchi A, Yonekura K, Tani K, Tsunehiro Mizushima, Structural insights into the targeting specificity of ubiquitin ligase for *S. cerevisiae* isocitrate lyase but not *C. albicans* isocitrate lyase., *Journal of structural biology*, 2021, 213: 107748-107748
5. Tani K, Nagashima KVP, Kanno R, Kawamura S, Kikuchi R, Hall M, Yu L-J, Kimura Y, Madigan MT, Mizoguchi A, Humbel BM, Wang-Otomo ZY, A previously unrecognized membrane protein in the *Rhodobacter sphaeroides* LH1-RC photocomplex, *Nature Communications*, 2021, 12: 6300
6. Kuzuya M, Hirano H, Hayashida K, Watanabe M, Kobayashi K, Terada T, Mahmood MI, Tama F, Tani K, Fujiyoshi Y, Oshima A, Structures of human pannexin-1 in nanodiscs reveal gating mediated by dynamic movement of the N terminus and phospholipids., *Science signaling*, 2022, 15: eabg6941
7. Tani K, Kanno R, Kikuchi R, Kawamura S, Nagashima KVP, Hall M, Takahashi A, Yu L-J, Kimura Y, Madigan MT, Mizoguchi A, Humbel BM, Wang-Otomo ZY, Asymmetric structure of the native *Rhodobacter sphaeroides* dimeric LH1-RC complex., *Nature communications*, 2022, 13: 1904-1904

## **Project Title: High-resolution structure determination of the multiple conformations of membrane proteins using single-particle analysis and cryo-EM.**

More than 50% of the commercially available drugs target membrane proteins. The crystallization step has been the primary bottleneck in the structure determination of membrane proteins. Recently, single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) has accelerated this process because it does not involve the rate limiting step of crystal growth. However, single-particle analysis for rational structural drug design faces *the following two challenges*: **1. Obtaining high-resolution structures above 3.0 Å resolution**, which is required for structure-based drug design. **2. Distinguishing the multiple conformations of membrane proteins** in the presence/absence of compounds. Recent research has addressed these problems using tools such as lipid nanodiscs and software packages based on maximum likelihood estimation. In addition, expression, purification, and sample preparation of membrane proteins at the scale required for cryo-EM structural analysis remains highly challenging. Optimization of all three steps crucially depends on mutual feedback from each step. Here we propose a mutual feedback pipeline system for structure determination of membrane proteins at the atomic level by single-particle cryo-EM, based on the following three metrics:

**(1) High-resolution single-particle cryo-EM**

**(2) Dynamic structural information using single-particle analysis**

**(3) Cryo-EM services for structure determination and educational support**

### **Achievements:**

Our project provided a seamlessly connected pipeline for sample preparation, cryo-EM data collection, and structural analysis of highly challenging drug targets. Mutual feedback at all steps enabled quick determination of problems in the dynamic single-particle analysis of novel membrane proteins, allowing their optimized production for structure-guided drug design. These techniques were also successfully applied to determine high-resolution structures of soluble protein complexes. Such experiences also trained many of our collaborators in performing cryo-EM. The practical and educational services offered by our project stimulated research in the fields of cryo-EM and drug development.

### **Major Publication List:**

1. Burendei B, et al., Cryo-EM structures of undocked innexin-6 hemichannels in phospholipids. *Science Advances*. 2020, 6: eaax3157
2. Tani K, et al., Cryo-EM structure of a Ca<sup>2+</sup>-bound photosynthetic LH1-RC complex containing multiple  $\alpha\beta$ -polypeptides, *Nature Communications*, 2020, 11: 4955
3. Tani K., et al., A previously unrecognized membrane protein in the *Rhodobacter sphaeroides* LH1-RC photocomplex, *Nature Communications*, 2021, 12: 6300
4. Kuzuya M. et al., Structures of human pannexin-1 in nanodiscs reveal gating mediated by dynamic movement of the N terminus and phospholipids., *Science signaling*, 2022, 15: eabg6941
5. Tani K, et al., Asymmetric structure of the native *Rhodobacter sphaeroides* dimeric LH1-RC complex., *Nature communications*, 2022, 13: 1904-1904