

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4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）大嶋篤典
（英語）Atsunori Oshima

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）名古屋大学 細胞生理学研究センター 教授
（英語）Cellular and Structural Physiology Institute, Nagoya University, Professor

II 補助事業の概要

本課題では、多様な膜タンパク質複合体の発現支援に対応するための発現系を確立し、精製標品の評価、クライオ電子顕微鏡用試料調製の最適化といった手法の開発を行うとともに、画像解析システムの高度化とフィードバックに基づくクライオ電顕の構造解析の体制を築いた。迅速な試料交換装置を備えたクライオ電子顕微鏡を用いた試料調製によって、本課題が作製する凍結グリッドからは90%以上の確率で高分解能構造解析を行うことができ、構造解析の確実な進捗を可能とした。試料調製技術はnanodiscを用いた脂質に再構成する手法を確立して複数の新規膜タンパク質に適用し、高分解能クライオ電顕構造解析に成功した。また、支援研究ではタンパク質発現、負染色電子顕微鏡観察、迅速な試料交換に基づくクライオ電子顕微鏡試料調製技術の提供を行い、複数の論文発表に結びついた。具体的には以下の研究成果が得られた。

（1）高度化研究

a) P-type ATPase の構造研究

電子線結晶学により得られた胃酸抑制剤結合構造を用いたドッキングシミュレーションを行い、胃酸抑制剤の結合状態を推定した。哺乳動物細胞で発現、精製した H^+,K^+ -ATPaseのX線結晶構造解析に成功し、 H^+,K^+ -ATPaseがどのようにして胃の中にpH1もの強酸性溶液を作り出しているかが理解できた。哺乳動物細胞で発現した胃プロトンポンプ H^+,K^+ -ATPaseが K^+ を閉塞した状態でのX線結晶構造解析に成功し、一度に輸送できる K^+ イオンの数は一つであることが明らかとなった。さらに変異体の結晶構造解析を進めることで、P2-type ATPaseによる K^+ 認識機構について明らかにした。胃プロトンポンプと複数の胃酸抑制剤との結合構

造を解析し、それらのファーマコフォアを定義し化合物改善の為の提言をした。結腸や気道上皮に発現し細胞性線維症の一因ともなる胃プロトンポンプと近縁の isoform の結晶構造並びに Cryo-EM 構造を複数決定し、このポンプがどのように弱酸性環境を作り出すのかが理解できた。さらに複数の変異体の構造解析によりナトリウムポンプとプロトンポンプのイオンの選択性について理解することができた。哺乳動物細胞で発現した脂質フリッパーゼ ATP11C の X 線結晶構造解析からリン脂質の通り道を構造-機能的に同定した。また、BINDS クライオ電子顕微鏡ネットワークを利用し、ATP11C のクライオ電子顕微鏡構造解析によって、3 つの脂質結合構造を含む 5 つの異なる反応中間体、合計 6 つの構造を解析した。ATP11C を脂質 nanodisc に再構成する効率的な方法を開発し、得られた複合体の構造解析を通して、脂質の排出に関するモデルを提唱した。

b) クライオ電子顕微鏡用試料調製の高度化

脂質二重膜内での構造解析を目的とした nanodisc 再構成技術を確立した。また、界面活性剤除去の為にインキュベーション時間を大幅に短縮できる、迅速かつ効率的な nanodisc 再構成法を確立し、脂質フリッパーゼ再構成構造解析に適用した。グリッドの凍結はセミオートマチック凍結ロボットのほか、マニュアルブロッティングを適用し、グリッドの中で粒子の配向の分散性を向上した。ギャップ結合関連タンパク質 Pannexin-1 は、界面活性剤を amphipol で置換した試料調製に成功したが、クライオ電顕用のグリッド凍結時において、粒子がつぶれる問題を解決できなかったため、nanodisc 再構成に方針を転換し、原子構造の解析に至った。amphipol の手法自体は確立したため、今後の膜タンパク質の構造解析に選択肢の一つとして適用できる。

c) ギャップ結合チャネル及び関連タンパク質のクライオ電子顕微鏡構造研究

Innexin-6 の undock ヘミチャネルを nanodisc に再構成した状態でクライオ電子顕微鏡構造解析を行い、チャネル通路に脂質が入り込んで N 末端の構造変化を引き起こす「脂質ゲーティング」モデルを示した。哺乳動物細胞で発現した ATP 放出チャネルの Pannexin-1 を nanodisc に再構成し、クライオ電子顕微鏡構造解析を行った。N 末端領域のコンフォメーションが異なる構造が得られ、脂質ゲーティング機構を議論した。高等動物が持つギャップ結合チャネルの単粒子解析を行い、近原子分解能の三次元再構成を得た。それぞれ GraDeR で調製した可溶化状態と、nanodisc 再構成された状態の、合計 6 つの原子構造を構築し、細胞質ドメインが動的であることを明らかにした。

d) GraDeR を用いて調製した膜タンパク質の構造研究

GraDeR で調製した F_0F_1 -ATP 合成酵素を脂質二重膜に再構成し、ミトコンドリアが示すチャネル透過性を F_0F_1 -ATPase が担っていることを明らかにした。シアノバクテリア由来 PSI モノマーを GraDeR を利用して調製し、高分解能構造解析に成功した。BINDS クライオ電子顕微鏡ネットワークの利用によりデータ収集がなされた。

e) 自動トモグラムセグメンテーションツールの開発

二次元結晶としては解析が難しい膜タンパク質の再構成膜でも、サブトモグラムアベレーシングを行って三次元再構成を計算できるが、contour edge を認識するアルゴリズムが開発され、トモグラムにおける sub-complex を自動でセグメンテーションを行うツール (RAZA 法) として論文に発表した。

(2) 支援研究

天然変性タンパク質が、アミロイド β ペプチドの線維化を阻害することを負染色電子顕微鏡観察で確認し、

論文データとして使用された。昆虫細胞を用いた哺乳類の時計タンパク質の大量発現を支援し、調製したタンパク質と化合物の複合体の X 線結晶構造解析に至った。細菌細胞骨格蛋白質の一種の精製、重合、線維の負染色観察に成功している試料をクライオ電子顕微鏡で解析するための、試料作製の条件検討を行い、論文データとして使用された。小胞型輸送体の構造解析に向けた試料の評価、研究方針のサポートを行った。オンラインによる議論と、発現用ベクターの配布を行った。細胞骨格と結合する抗腫瘍性天然物と細胞骨格との複合体の構造解析を行うため、負染色電子顕微鏡による試料の観察と、クライオ電子顕微鏡を用いたスクリーニングを支援した。2018 年に韓国で上市された tegoprazan をはじめ、臨床検査中の複数の薬剤の結合構造解析の依頼を受け、動物細胞でのタンパク質の発現から結晶構造解析や Cryo-EM 構造解析を請け負っている。現在 3 つの薬剤との複合体構造を X 線によって (分解能 3.0~3.4 Å)、結晶化が難しかった化合物の構造を Cryo-EM によって (2.8 Å) 解析し、その構造情報を支援者へ報告した。機能解析と併せて、これらの構造解析結果は論文として取りまとめ、現在投稿中である。細胞機能に関わるナトリウムポンプ変異体の構造解析の依頼を受け、合計 4 つの Cryo-EM 構造を解析した。被支援者による細胞生物学実験と併せて論文として取り纏め、現在投稿中である。

補助事業研究開発成果の意義

本事業により、主に膜タンパク質のクライオ電子顕微鏡を用いた構造研究における、高確率、高効率な構造解析の技術基盤を確立することができた。特に試料調製法において、nanodisc 再構成を再現性良く実現でき、脂質環境下における膜タンパク質の高分解能構造解析を実現することができた。迅速な試料交換が凍結試料のクオリティチェックを容易にし、確実に構造解析に至る試料を予め確認することができる。この技術は支援研究にも展開され、構造研究に結実した。本事業における技術開発は創薬と関係の深い膜タンパク質の構造研究に幅広く応用が可能で、生体内における機能の理解に基づく新規医薬品開発が期待されるものである。

In this project, we established an expression system for various membrane protein complexes, developed methods for evaluation of purified samples and optimization of sample preparation for cryo-EM, and established a system for structural analysis of cryo-EM based on the advancement of image analysis systems and feedback. We established a method for nanodisc reconstitution of membrane proteins into phospholipids, applied it to several membrane proteins, and succeeded in high-resolution cryo-EM structural analysis. We supported protein expression, negative staining electron microscopy, and cryo-EM sample preparation based on rapid sample exchange, leading to several publications. The technological development in this project can be widely applied to structural studies of membrane proteins, which are closely related to drug discovery, and is expected to lead to the development of new drugs based on an understanding of their functions *in vivo*.

The following is a summary of the R&D and supporting research advanced in this project.

R&D

- a) We determined the X-ray crystal structures of H⁺,K⁺-ATPase, which allowed us to understand how to generate a highly acidic environment in the stomach as high as pH 1 and cation selectivity. Cryo-EM analysis of non-gastric proton pump demonstrated how to generate a weakly acidic environment and ion selectivity. The X-ray and cryo-EM structures of ATP11C in different states of the transport cycle provide a molecular basis of how phospholipid traverses the membrane coupled with ATP-hydrolysis.
- b) We established nanodisc reconstruction techniques. We also established a rapid and efficient nanodisc reconstruction method that significantly reduced the incubation time for detergent removal and applied it to the structure determination of lipid flippase. For the sample preparation for cryo-EM, manual blotting was applied as well as a semi-automatic freezing robot to improve the particle orientation preference problem.
- c) The structures of Innexin-6 undock hemichannels and human Pannexin-1 large pore channels were determined by cryo-EM with nanodisc reconstitution. From these studies, a "lipid gating" model was demonstrated, in which lipid enters the channel passage and causes a conformational change in the N-terminus.
- d) We established a novel lipid bilayer reconstitution method that allows the rapid and efficient production of liposomes reconstituted with mammalian FoF1-ATP synthase. This enabled us to show that the FoF1-ATPase is the molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore (mtPTP), an active drug target for mitochondrial diseases. The high-resolution structure of PSI monomers from cyanobacteria was determined by cryo-EM using GraDeR.
- e) We developed an automated tomogram segmentation tool, termed RAZA, which is an algorithm that recognizes contour edges. This allows subtomogram averaging from automatically segmented sub-complexes in tomograms.

Research Support.

- a) Negative staining electron microscopy observation to confirm that intrinsically disordered proteins inhibit fibrosis of amyloid- β peptide.
- b) The overexpression of mammalian clock proteins using insect cells for X-ray crystallography.
- c) Quality check of cryo-EM sample preparation of the bacterial cytoskeleton proteins that have been successfully purified, polymerized, and observed in negative staining of fibers.
- d) Observation using negative staining electron microscopy and cryo-EM to analyze the binding mode of antitumor natural products to their target proteins.
- e) X-ray and cryo-EM structures of the gastric proton pump in complex with four different inhibitors.
- f) Structural analysis of a sodium pump mutant that is related to an important cellular process.
- g) Proteoliposome formation of human membrane transporters for drug screening purposes.