

# 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）岩田 想  
（英語）So Iwata

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）京都大学 大学院医学研究科 教授  
（英語）Graduate School of Medicine, Kyoto University; Professor

## II 補助事業の概要

膜タンパク質の精密立体構造をシステマティックかつ網羅的に解明し、その機能を人為的に制御する方策を確立することは、基礎生命科学への貢献として重要であるだけでなく、がん、免疫・アレルギー疾患、生活習慣病、精神・神経疾患、ウイルス感染症等に効果のある医薬品開発への展開が期待されるため社会的要請も大きい。

膜タンパク質構造研究の分野では、過去10年間にX線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡単粒子解析の技術革新が国内外で急速に進み競争が激化した。Gタンパク質共役受容体(GPCR)については、膜貫通ヘリックス部分への安定化変異導入、結晶性の高い可溶性タンパク質BRILを細胞内ループ等に融合するタンパク質工学技術等を駆使して、安定性や結晶性の改善に成功した場合にはX線結晶構造解析が比較的スムーズに進められる状況になっている。また大きな膜外ドメインがあり、かつ対称性の高いオリゴマー構造を持つ高分子量膜タンパク質のクライオ電子顕微鏡単粒子解析の成功例もこの3～4年で急増した。クライオ電子顕微鏡単粒子解析が第一選択の手法として選ばれる傾向が強くなってきている。

しかしながら、まだ構造が解かれていないGPCRやトランスポーターなどの創薬ターゲット膜タンパク質の多くは分子量が40~60kDaと小さく、膜外ドメインが小さいため、最新のクライオ電子顕微鏡単粒子解析技術を用いてもその精密立体構造決定は依然として難度が非常に高い。このボトルネックを解消できる普遍的かつ迅速・簡便な技術を開発することが、膜タンパク質構造研究に携わる多くの研究者にとっての喫緊の課題として残されている。次世代型の膜タンパク質構造研究の開拓のためにさらなる技術革新が必要であるというのが、当該分野の研究者の一致した見解である。

本事業の高度化においてわれわれは、世界最高水準の研究者たちと競争・協力しつつ、膜タンパク質の親水性

表面の立体構造を特異的に認識する抗体（構造認識抗体）を高効率で作製する独自の技術を確立し、抗体を用いた膜タンパク質構造解析で多くの実績を上げた。とくに創薬研究における最重要ターゲットである GPCR の X 線結晶構造解析・クライオ電子顕微鏡単粒子解析を進め、各種受容体の不活性型・活性型コンフォメーションを包括的に構造解析可能な基盤技術を確立した。構造認識抗体と GPCR 安定化変異体作製技術を用いて 8 種以上の GPCR の新規構造を解明した（図 1）。

複数の製薬企業との共同研究において、企業が合成した新規薬理活性化合物と GPCR の複合体の X 線結晶構造を数件解明し、構造ベースの医薬品分子設計に貢献した（成果非公開）。また、GPCR-G タンパク質三量体複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析（図 1 右上）に成功したほか、アゴニスト結合の不活性型 GPCR-bRIL 融合体の系統的な X 線・電顕解析に有用な bRIL 抗体を企業と共同で開発した（特許出願済み）。

また、分子サイズが小さく（40-60kDa）、分子の対称性がないモノマー型の創薬ターゲット膜タンパク質をクライオ電子顕微鏡単粒子解析で構造決定することは、現在の技術水準では難度がきわめて高いが、立体構造認識抗体作製技術を活用して、分子量

40kDa のトランスポーター-NTCP をモデルとして構造解析技術の高度化を展開した。「ターゲット膜タンパク質に構造認識抗体を結合させた場合、抗体がクライオ電子顕微鏡単粒子画像の正確かつ効率のよいアライメントを可能にするマーカー (fiducial marker) として機能するため、膜タンパク質の構造解析の成功率が飛躍的に向上する」という概念実証 (POC) を確立し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析における構造認識抗体の有用性を立証した (Nature, 2022; 図 2)。

さらに、本事業の支援の枠組みではこの抗体技術を広く外部研究者に供用し、10 件以上の膜タンパク質の X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡単粒子解析に成功した (Nagarathinam et al., Nat. Commun., 2018 ; Umeda et al., Nat. Commun., 2020; Matoba et al., Nat. Struc. Mol. Biol., 2020; Okamoto et al., Nat. Struc. Mol. Biol., 2021; Ghilarov et al., Science Adv., 2021; Neville et al., Science Adv., 2021; Kishi et al., Cell, 2022 ほか ; 図 3)。

これらの研究開発の成果を統合し、構造ベースの創薬研究・基礎生命科学を先導して次世代型の新たな潮流を創出した。

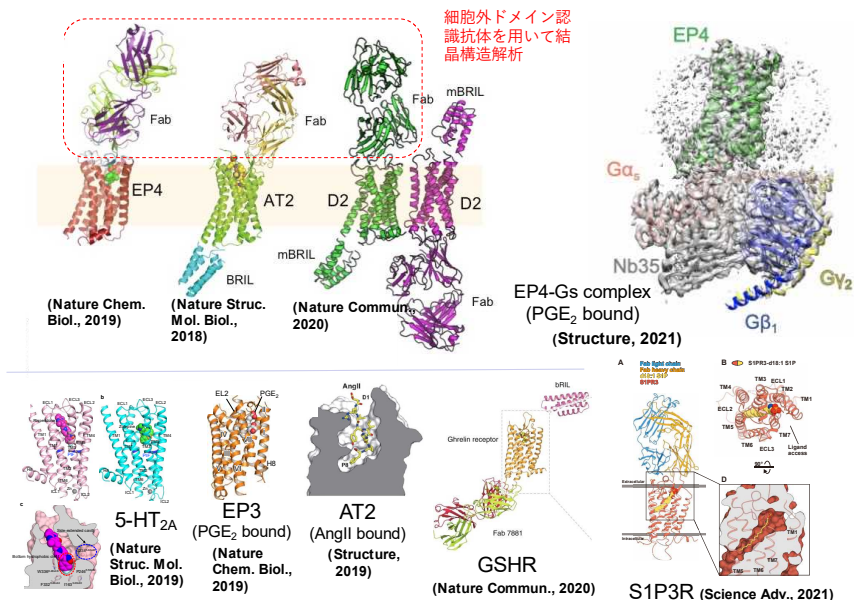


図1. BINDS高度化研究において実施したGPCRの構造解析

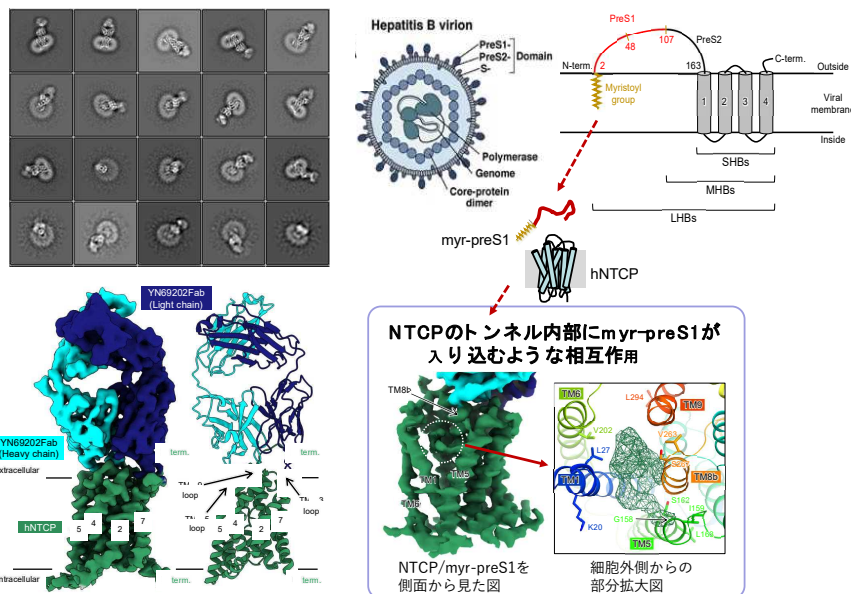


図2. ヒト細胞膜上にあるB型肝炎ウイルスの侵入受容体NTCPのクライオ電子顕微鏡単粒子解析 (Nature, 2022)

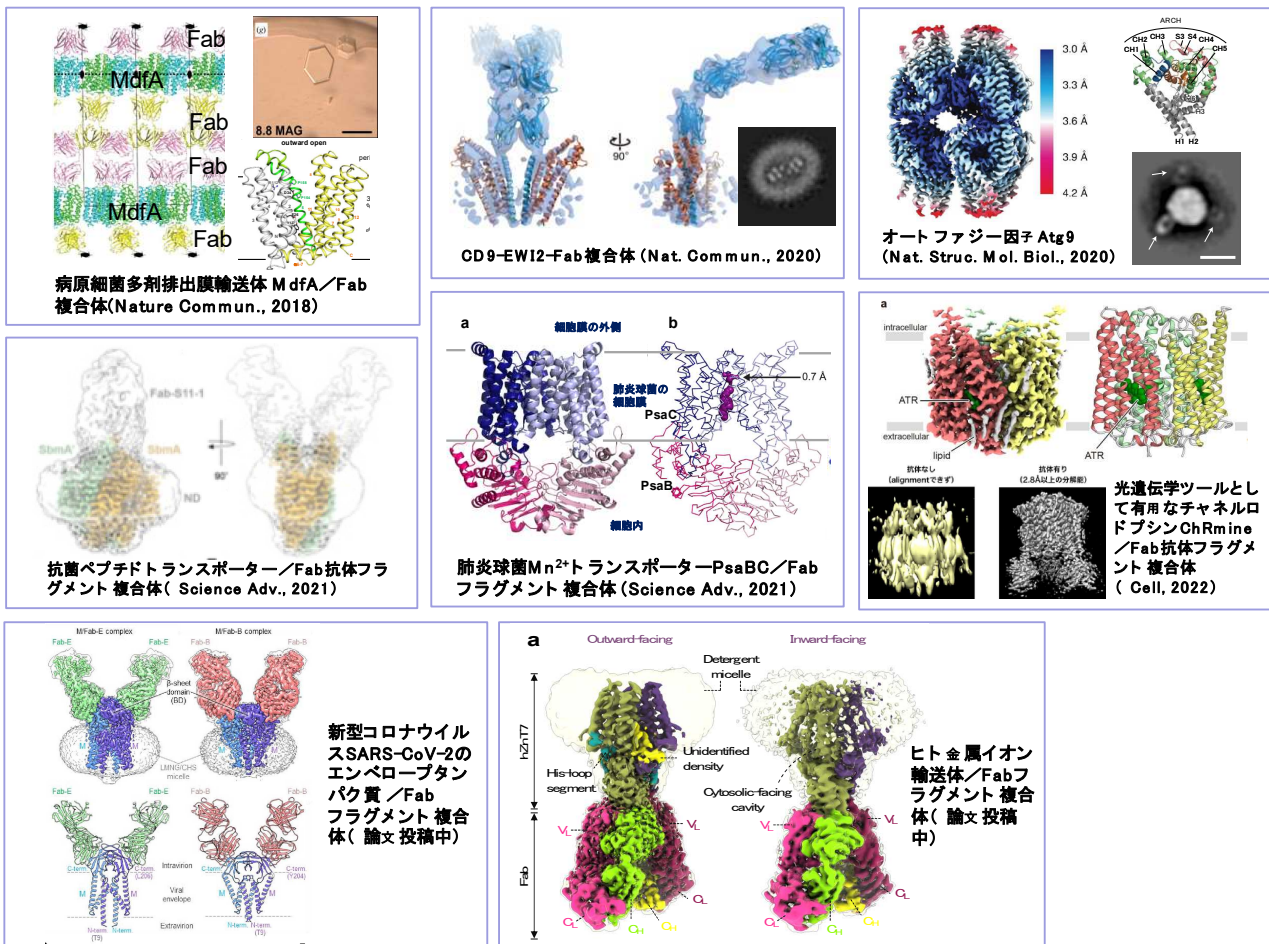


図3 . BINDS支援において実施した抗体を用いた膜タンパク質の構造解析



Structural studies of membrane proteins could potentially lead us to discover potent compounds with less side effects for various disease conditions including cancer, immunological and allergic diseases, lifestyle-related diseases, psychiatric and neurological diseases, and virus infections. However, such structure-based drug discoveries remain stagnant, because it is still challenging to perform systematic structural analysis of human membrane proteins.

In this research program, one half of our R&D efforts devoted to “technical innovation” for next-generation membrane protein structural biology, which includes development of highly versatile antibody-aided methods for X-ray crystallography and cryo-electron microscopy (cryo-EM) single particle analysis of membrane proteins. In the structural study of G protein-coupled receptors (GPCRs), which are the most important targets for drug discovery research, we established a basic technology that enables comprehensive structural analysis of the inactive and active conformations of various receptors. Using the newly developed technologies, we succeeded in determining the novel structures of more than eight GPCRs (Fig.1). In joint research with several pharmaceutical companies, we determined X-ray crystal structures of many GPCRs complexed with novel seed compounds synthesized and developed by the companies, contributing to structure-based molecular design of drugs (results not disclosed).

The structure determination of monomeric membrane proteins with small molecular size (40-60 kDa) and no molecular symmetry by cryo-EM single-particle analysis is still extremely difficult at the current technical level. To test a proof of concept that “Binding of structure-recognition antibodies to target membrane proteins dramatically increases the success rate of structural analysis of membrane proteins because the antibodies act as fiducial markers that enable accurate and efficient alignment of cryo-EM single-particle images”, we applied our proprietary antibody technology to the structure determination of a model protein, NTCP, which is an 9-TM an sodium-dependent bile acid symporter belonging to the solute carrier superfamily (SLC10A1) exclusively expressed on the basolateral membrane of hepatocytes and also known to function as the entry receptor of hepatitis B virus (HBV). We successfully obtained the antibody-aided cryo-EM structures of human, bovine, and rat NTCPs and provided structural framework for HBV recognition and for mechanistic understanding of sodium-dependent bile acid translocation by mammalian NTCPs (Asami et al., Nature, 2022; Park et al., Nature, 2022).

The rest of our efforts devoted to “technical support” activities, in which we offered external investigators opportunities for collaboration, knowledge sharing, and joint use

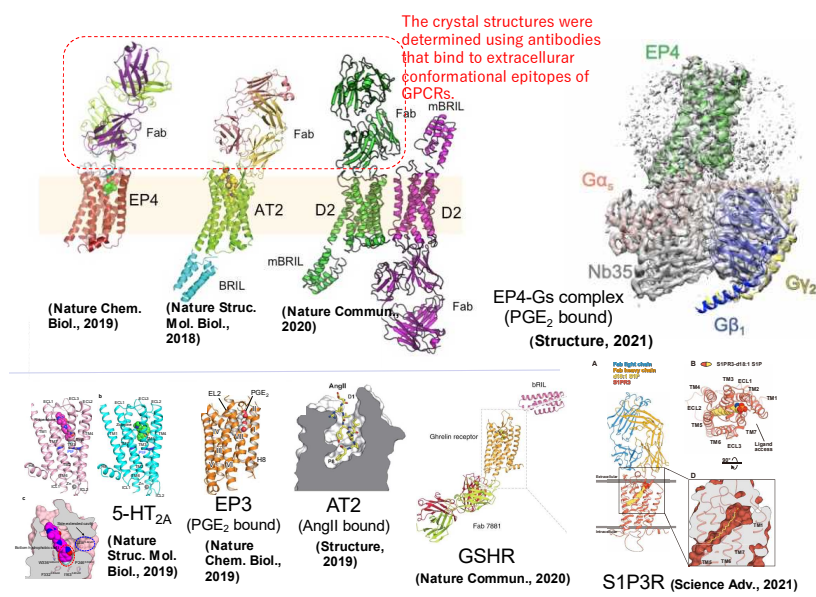


Fig. 1. GPCR structures newly determined in the “technical innovation” section

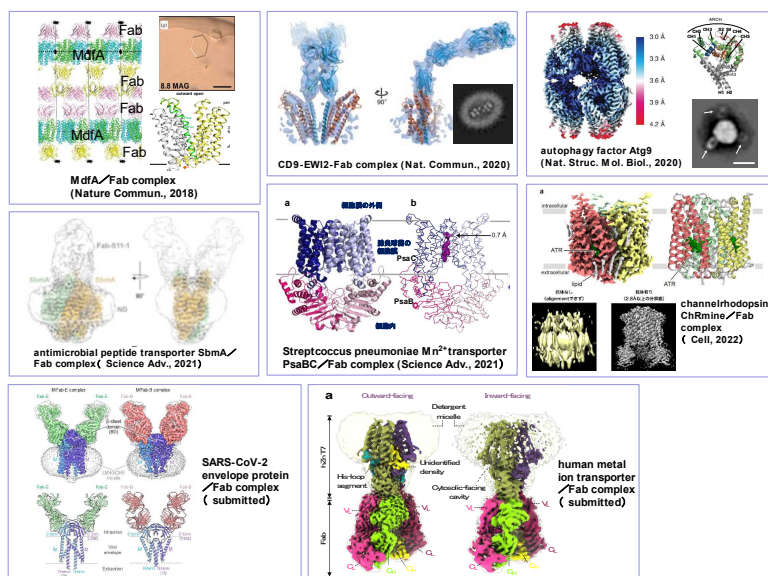


Fig. 2. Examples of membrane protein structures newly determined in the “technical support” section

of facilities on antibody-aided structure determination of membrane proteins. We made this antibody technology widely available to external researchers and succeeded in X-ray crystallography and cryo-EM single particle analysis of more than 10 membrane proteins (e.g. Nagarathinam et al., Nat. Commun., 2018 ; Umeda et al., Nat. Commun., 2020; Matoba et al., Nat. Struc. Mol. Biol., 2020; Okamoto et al., Nat. Struc. Mol. Biol., 2021; Ghilarov et al., Science Adv., 2021; Neville et al., Science Adv., 2021; Kishi et al., Cell, 2022; Fig. 2).