

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）加藤 龍一
（英語）Ryuichi Kato

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）村田 武士 千葉大学・理学研究院・教授
（英語）Takeshi Murata, Chiba University, Graduate School of Science, Professor
（日本語）姚 閔 北海道大学・先端生命科学研究院・教授
（英語）Yao Min, Hokkaido University, Faculty of Advanced Life Science, Professor

II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

構造生命科学研究において、X線結晶構造解析は今なお最も重要な手法であるが、良質な試料調製と結晶化条件の探索が未だにボトルネックである。本研究開発事業においては、結晶化スクリーニングを高速かつ高効率で行う全自動結晶化観察システムの運営と高度化を行い、それを利用者の支援に供することでボトルネックの解消をはかることを行った。具体的には、研究代表者の加藤が中心となって開発運営している高エネ機構に設置の全自動結晶化観察システムを用い、本事業の生産領域内の各機関およびそれ以外で生産されたタンパク質ならびにその複合体を広く受け入れて、それらの結晶化スクリーニング支援を行った。得られた結晶は、同一キャンパス内にある高エネ機構の Photon Factory や理研播磨の SPring-8 の放射光ビームラインでX線回折実験を行うことにより、効率的な結晶構造解析に寄与した。

高エネ機構では全体として以下の支援内容を実施した。主な支援として、精製サンプルの大規模結晶化スクリーニングを行い、結晶化条件を迅速に見出すことを行った。測定可能なサイズの結晶についてはそれを直接X線回折実験に供し、回折実験に用いることができない多結晶や微結晶については得られた結晶化条件からより良い結晶化条件の探索を行うこともした。このような結晶化実験の他に、支援申請者では困難な結晶化用の高純度サンプルの大量発現から精製、また得られたサンプルの性状評価等も実施した。それらを結晶化実験にフィードバックすることにより、結晶構造解析に成功した事例や研究プロジェクトの組み直しに発展した例が多々ある。また、結晶化を直接の目的としないが、病気の新しい診断法の開発につながるタンパク質性状評価を実施した例もある。対象となったタンパク質は、可溶性タンパク質だけでなく、膜タンパク質も含まれた。本事業開始時には、全自動結晶化観察システムは膜タンパク質に対応していなかったが、後述の高度化によりバイセル法および Lipidic Cubic Phase (LCP) 法に対応するようになり、それによって全自動結晶化観察システムによる膜タンパク質の結晶化スクリーニングを実施することができた。また、BINDS 枠としての企業利用としては計上されないが、全自動結晶化観察システムを利用した企業が複数社あり、同システムの有効利用が行われた。

千葉大学においては、膜タンパク質の事前性状評価や結晶化を促進する立体構造認識抗体の作製、結晶化スクリーニング支援を実施した。性状評価としては、独自の理論的耐熱化予測法を適応することによって、より熱安定な変異体タンパク質を高い確率で得ることができ、それをを用いることによって結晶構造解析の成果が得られている。また、BINDS 枠としての企業利用としては計上されないが、膜タンパク質の理論的耐熱化予測法を利用した企業が複数社あった。

高度化については以下を行った。2017年度に、高エネ機構の全自動結晶化観察システムを膜タンパク質の結晶化法のひとつであるバイセル法に対応させる高度化研究を行い、設定したマイルストーン通りにこれを達成した。具体的には、バイセル法による結晶化のプロトコルを最適化することにより、これまで蒸気拡散法で用いていた結晶化プレートをそのまま利用して、結晶化ドロップの作成から観察まで全自動で行えるようになった。2017年度末から実際に支援に供することができ、それにより膜タンパク質の結晶構造決定に成功した支援課題もある。また、実際に運用を進める中で、バイセル法でホストとして用いる脂質の種類と組成を変えることが結晶化に有効であることを2018年度に示すなど、マイルストーンに記した以上の成果を上げることができた。膜タンパク質の結晶化法の主流であるLCP法については、高エネ機構の全自動結晶化観察システムで運用できるようにするための検討を2017年度から開始した。問題点を洗い出し解決法を検討した結果、2018年度に新しいデザインのLCPプレートを開発し、マイルストーンを達成した。このプレートを用いることで、結晶化ドロップの自動作成と、作成した結晶化ドロップを偏光板の角度を変えて自動観察することを可能にした。2018年度にテスト運用を行い2019年度に観察インターフェースの開発を行って、2019年度末より支援を開始した。これらの全自動結晶化観察システムの高度化については、国内外の学

会で発表すると共に、査読付き論文としても発表し (Kato R *et al.* (2021) *Acta Cryst.* F77, 29-36)、また日本結晶学会誌にも総説として発表した (加藤龍一 (2021) *日本結晶学会誌* 63, 212-215)。

膜タンパク質を LCP 法で結晶化する際、通常ハーベストが難しいとされるスポンジ相に形成される結晶に対して、上記の LCP プレートで結晶をハーベストすることなく、そのまま Photon Factory 放射光ビームライン BL-17A でプレートごと X線照射をする (*in situ* 測定) ことで回折能を評価できる技術開発を、解析領域 (高エネ機構の千田チーム) との連携のもと行い、マイルストーンに記した以上の成果を上げることができた。このシステムを用いて目的タンパク質の回折能の評価に成功したユーザー、さらに構造決定に成功したユーザーなど、成果を上げることができた。

結晶化成功率向上のため、高エネ機構では結晶化ドロップ画像解析による結晶のスコアリング開発を行った。2017 年度から、高エネ機構の全自動結晶化観察システムによって取得された結晶化ドロップ画像の集積を行い、*deep learning* の手法でクリアドロップ・結晶・凝集物の区別をほぼ完全にできるようになった。2018 年度には引き続きその開発を行い、テスト評価を行うためのプロトコルとプログラムの作成を行った。一方、それと平行して、別の画像解析手法による評価プログラムについても検討を行い、そちらでもクリアドロップ・結晶・凝集物を区別できるプロトコルを開発することができた。2018 年度から 2019 年度にかけて、上記 2 つの手法の比較検討を行い、実現可能性が高いと判断した前者を採用することとした。2020 年度にその実装を行ったところ、予想以上に処理時間を要することが明らかになったため、同年度の追加予算配分で複数 (12 台) の GPU 計算機を整備し、それらによる並行処理で処理時間の短縮を行った。

事業開始当初は参加していなかった北海道大学は、3 年度目 (2019 年度) から本チームに加わった。彼らが独自に新規開発した結晶核形成促進材料 (核剤) が結晶化成功率を改善するという結果が一般的かどうかの検証と改善、および核剤を高エネ機構の全自動大規模結晶化システムに適応できるかについての検討を進めた。まず、特異なナノ構造 BLL を持つ核剤の使用法の検討を行い、粉末、溶液、結晶化プレート塗布、の 3 つの使用法の比較と使用条件の最適化の検討を行った。そして、膜タンパク質を含む 3 つの結晶化に問題があるサンプル (Mps3NTD、BscC-C、AOD) の結晶化に成功し、2020 年 10 月にアメリカへの国際特許出願をした (US 17/079739)。そのうちの 1 つについては、さらに解析領域 (高エネ機構の千田チーム) と連携して立体構造決定に向けて支援を行った。プレート塗布法については、高エネ機構の全自動結晶化観察システムで自動観察への影響を抑える条件を見出し、実際に運用することでそれまで結晶を得ることができなかった新規の 3 種類のタンパク質の初期結晶を得ることができ、うち 1 つについては結晶構造解析にも成功した。また、この核剤による結晶化率向上の分子機構を明らかにするため、モデルタンパク質を用いた結晶化を観察することにより、タンパク質の結晶化溶液を早めに過飽和させることによって核形成を促進しているということを明らかにした。一連の検討を通じて、核剤の添加によって低濃度のタンパク質濃度で結晶が得られることも明らかにし、これは必要なタンパク質量が半分から四分の一に低減できることになり、結晶構造解析にとって非常に有用であることを見出した。

千葉大学の村田らが開発した「エントロピー基盤法」では、膜タンパク質の膜貫通部分のみを取り出し理論計算を行っていた。そこで、膜タンパク質の水溶性部分を含めた領域での理論計算を行うことで予測結果の精度の向上をはかる方法の検討を行った。膜タンパク質の膜内部分と膜外部分では理論計算で用いる数値パラメーターが異なるため、この 2 つの領域を正確に決定するために MD シミュレーションを用いた。これにより、アミノ酸配列から予測した領域だけのものよりも精度よく領域決定できるようになった (Kajiwara Y *et al.* (2018) *J. Phys. Chem. B*, 122, 4418-4427)。さらに、「エントロピー基盤法」を拡張し、添加剤による膜タンパク質の耐熱化効果の理論予測法の開発を行った。実験結果を理論計算にフィードバックすることで、理論計算の数値パラメーターを決定した。添加剤 (各種アルコールと糖) による耐熱化効果の理論予測結果は実験結果と一致し、Mannitol や Sucrose 添加による膜タンパク質の耐熱性向上が理論的に導かれた (Yasuda S *et al.* (2020) *J. Mol. Liq.* 301, 112403-11)。

これら支援と高度化を通じ、解析領域の放射光X線結晶構造解析線結晶構造解析チーム(千田、山本課題)とも連携することにより、シームレスな「事前評価ー結晶化スクリーニングー構造解析」パイプラインを構築することができ、創薬ターゲットとなる膜タンパク質を含め多くのサンプルの結晶構造解析の進展に寄与することができた。

X-ray crystallography is still the most important method in structural life science research, but the preparation of high-quality samples and the search for crystallization conditions are still bottlenecks. In this project, we operated and upgraded a fully automatic crystallization and observation system that performs crystallization screening at high speed and efficiency. And we tried to eliminate the bottleneck by providing it to the support of users. Specifically, using the fully automated crystallization and observation system which has been developed and operated by the principal researcher, Dr. Kato, at High Energy Acceleration Research Organization (KEK), we supported the crystallization screening of proteins and their complexes which were produced at each institution. The obtained crystals were subjected to X-ray diffraction experiments at synchrotron radiation beamlines at Photon Factory in KEK and SPring-8 in RIKEN-Harima. We also supported pre-evaluation of protein samples such as purity, monodispersity and thermal stability in solution, and also supported to improve the crystallization success rate. In particular, Dr. Murata (collaborative researcher) of Chiba University, who has a unique technology and significant achievements, took the lead in supporting the prediction of heat resistance of membrane proteins.

In parallel, improvements of the fully automatic crystallization and observation system were promoted, and those that could be implemented were sequentially provided for user-support. Specifically, we strengthened our response to membrane proteins, which are highly requested from users. The fully automatic crystallization and observation system has been modified to support not only the vapor diffusion method but also both of the Bicelle and the lipidic cubic phase (LCP) methods. We also improved the prediction procedure of heat resistance of membrane proteins. These have been realized and provided for user-support. In order to further improve the success rate of crystallization, we analyzed the images of the acquired crystallization drops and developed an automatic scoring function for crystallization drops by machine learning. The function was implemented in the observation interface of the fully automated crystallization and observation system to provide user-support. Furthermore, a new crystallization accelerator compound which was developed at Hokkaido University was introduced into a fully automatic crystallization and observation system at KEK to improve the crystallization success rate, and the conditions to use the compound were optimized at Hokkaido University. In addition, we conducted to develop new compounds.

Through these user-support and improvements, and with tight collaboration between synchrotron radiation facilities (Senda team at Photon Factory and Yamamoto team at SPring-8) we could achieve to construct a “seamless pipeline of preliminary evaluation-crystallization screening-structural analysis.” It contributed to the progress of crystal structural analysis of many samples including membrane proteins that are targets for drug discovery.