

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）小川 治夫
（英語）Haruo Ogawa

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人京都大学・大学院薬学研究科・准教授
（英語）Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Associate Professor

II 補助事業の概要

[本事業の意義] ヒト膜タンパク質の立体構造情報は創薬へと直結するため、その構造決定には大きな社会的要請があるが、その構造決定は極めて困難である。その主要因は「簡便で効率的な生産系の欠如」と「精製の困難さ」である。本事業の主目的の1つは、我々が有する哺乳類培養細胞を用いた独自大量発現・精製技術を結集することで、「立体構造に興味があるものの自身では研究を遂行できない研究者」に対して構造解析への道を拓くことである。さらに所持する技術の高度化により、「巨大膜タンパク質複合体等の構造解析」を可能にした。一方、膜タンパク質発現細胞を単なる「タンパク質生産工場」としてのみならず、「新規薬剤スクリーニング系」として活用するためのプラットフォームの構築にも成功した。本事業の以上の成果は、新規医薬品の効率的な開発に向けて大きな貢献をすることが期待される。

[支援の成果] 創薬へと直結し大きな社会的要請がある哺乳類膜タンパク質の立体構造の構造決定へ向け、独自技術である「VSVG 組換えバキュロウイルスによるヒト膜タンパク質発現系」、「哺乳類培養細胞を用いた超巨大膜タンパク質の大量生産の支援」、「HaloTag/改変 GFP を用いた膜タンパク質の大量精製の支援」、膜タンパク質に脂質を加える独自の結晶化手法による「膜タンパク質結晶化の支援」の4つの支援に取り組んだ。

多くの支援に対応するために手法の効率化を図った結果、「VSVG バキュロウイルス発現系」ないし「HEK293 細胞安定発現系」による大量発現と、安価に精製可能な「改変 GFP タグを用いた精製系」を組み合わせた系を確立した（図1）。この系の利点は、哺乳類細胞を使用することで翻訳後修飾等が生体と極めて近いこと、

バキュロウイルスまたは安定発現系により大量のタンパク質を発現できることと、発現から精製に至る各ステップにおいて GFP 蛍光を用いて発現量や精製度を簡便にチェックができること、である。最終的には、大規模の接着細胞による生産（150 mm ディッシュ 120 枚）、もしくは高度化で開発した浮遊培養系を用い、精製標品の支援者への提供を行った。以上の実質的作業は、京都大学の小川グループ（2020 年度までは東京大学）と順天堂大学の村山グループにより遂行された。

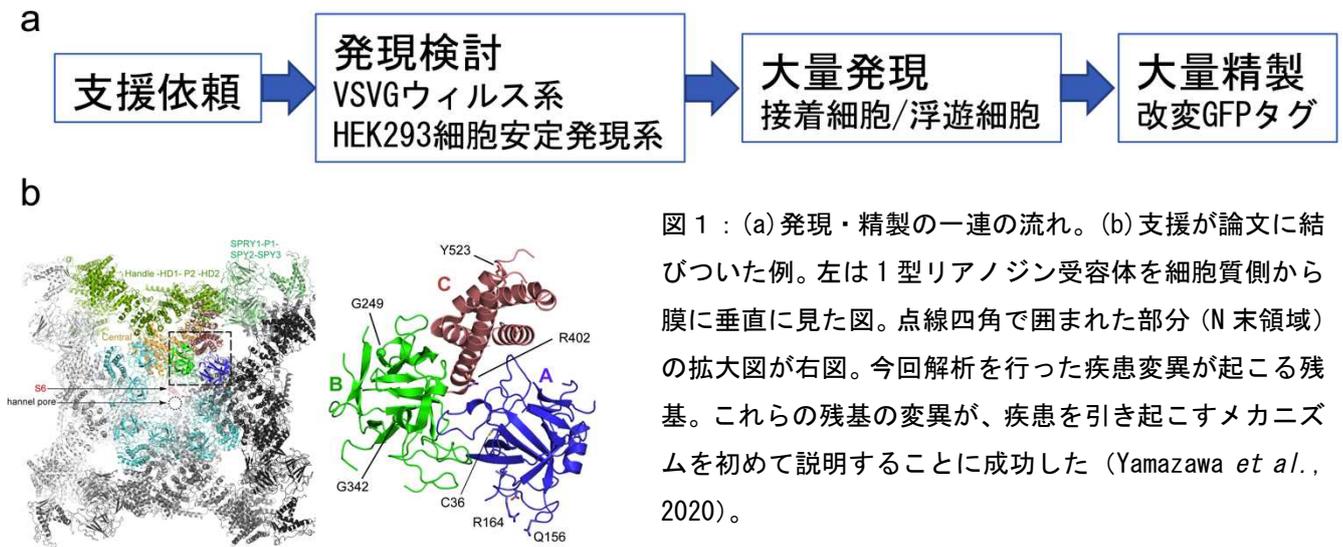


図 1 : (a) 発現・精製の一連の流れ。(b) 支援が論文に結びついた例。左は 1 型リアノジン受容体を細胞質側から膜に垂直に見た図。点線四角で囲まれた部分 (N 末領域) の拡大図が右図。今回解析を行った疾患変異が起こる残基。これらの残基の変異が、疾患を引き起こすメカニズムを初めて説明することに成功した (Yamazawa *et al.*, 2020)。

期間全体で 20 件以上のコンサルティングと支援を行なった。VSVG 組換えバキュロウイルスの作製、発現条件の最適化、大量発現、大量精製といった一連の作業は専門知識と大変な労力を必要とするが、可能な限り支援を受け入れ、着実に精製サンプルを支援依頼者の元へ送付した。支援依頼先の全てが医学部または薬学部からのものであり、多くの論文の発表に至った。これらは新技術の創出や医療分野の進展に資すると考えられる。

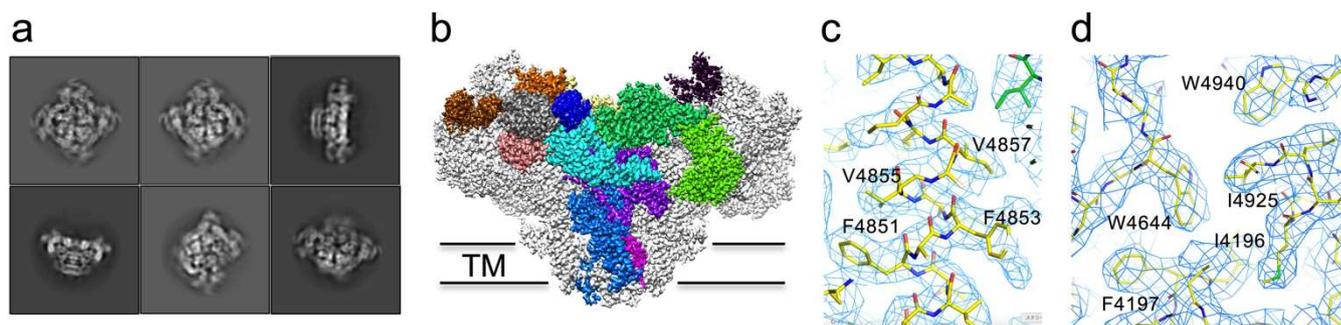
[高度化の成果] 「発現細胞の浮遊化/至適化」、「クライオ電子顕微鏡/単粒子解析へ向けたパイプラインの構築」、「新規薬剤スクリーニング系の構築」、等に取り組んだ。

現在、哺乳類由来膜タンパク質の発現で最もよく用いられる手法は、CMV プロモーターを組み込んだバキュロウイルスを浮遊の HEK293GnT1⁻細胞へ感染させるものである。この方法は昆虫用のバキュロウイルスを用いているため、血清存在下では哺乳類由来培養細胞への感染力の極端な低下が起こる。そのため、高価な専用無血清培地を使用する必要があるが、大きな経済的負担を伴っていた。我々の独自技術である VSVG 組換えバキュロウイルス発現系は、浮遊細胞のみならず種々の接着細胞にも感染可能で、通常 (10%) の血清含有培地でも高率に感染が可能である。本高度化の「発現細胞の浮遊化/至適化」により本技術を至適化するための方策に取り組みその実用化に成功し、速やかに支援への転用を行った。

我々の大量発現・精製技術と努力により多彩な精製標品を得ることが可能になった。そこで、これらの精製標品をクライオ電子顕微鏡での解析へと円滑に結びつけるためのプロトコル化「クライオ電子顕微鏡/単粒子解析へ向けたパイプラインの構築」を遂行した。現在のところ、我々の持つ 6 種類の異なる膜タンパク質標品の構造解析に成功している。特筆すべき成果として、心筋小胞体 Ca²⁺チャネルである 2 型リアノジン受容体 (RyR2) のクライオ電子顕微鏡/単粒子解析により、Ca²⁺の結合によって起こるチャネル開口メカニズムを明らかにすることに世界で初めて成功した (図 2)。不整脈疾患に対する全く新しい診断法、治療薬や予防

薬の開発に貢献すると期待される。本成果は Nature Communication 誌に掲載された (Kobayashi *et al.*, in press)。

図 2. RyR2 のクライオ電子顕微鏡・単粒子解析。(a) 2D class average 像。様々な向きを向いた分子像が得られ



ていることが分かる。(b)最終的なマップ。RyR チャンネルは 4 量体で、そのうちの 1 サブユニットをドメインごとに色分けした。(c) チャンネルポアを構成する S6 ヘリックス周辺と (d) カフェイン結合部位のマップ。アミノ酸側鎖が疑いなくマップに入っているのが分かる。

以上の一連の構造解析研究とは別に、我々の哺乳類細胞発現系の特長を活かし、膜タンパク質発現細胞を単なる「タンパク質生産工場」としてのみならず、新規薬剤スクリーニング系として活用するためのプラットフォームの構築を行う、「新規薬剤スクリーニング系の構築」を実施した。その結果、リアノジン受容体をモデルとして、「阻害薬スクリーニング系の開発」、「複数の阻害薬の同定」、「構造展開による既存薬を上回る新規化合物を得ること」に成功した (図 3)。本化合物は悪性高熱症モデルマウスに対して強力な治療効果を示し、短い血中半減期を示すことから、既存薬の欠点を改善した新しい悪性高熱症治療薬としての開発が期待される。本成果は 2021 年の Nature Communications 誌に掲載された。

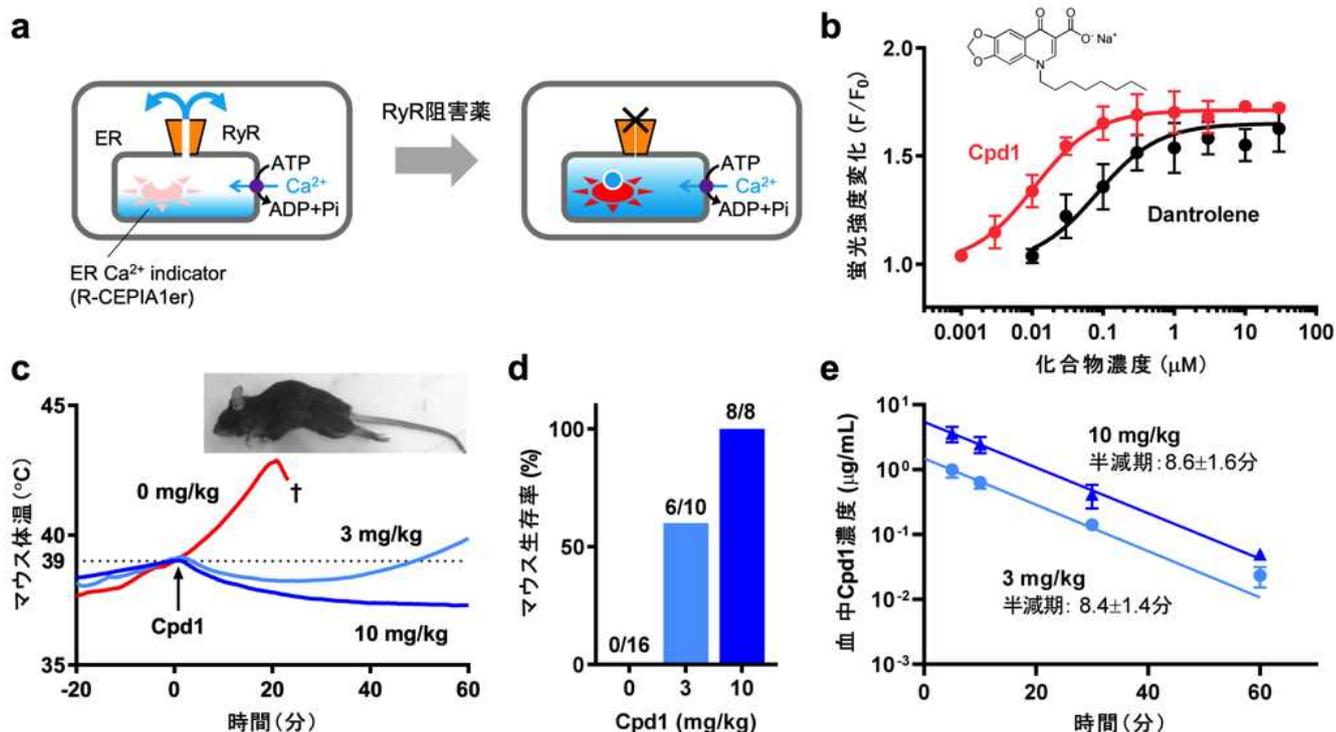


図 3. 新規 RyR1 阻害薬の開発。(a) 小胞体内 Ca^{2+} 濃度測定を利用したリアノジン受容体 (RyR) 阻害薬の探索法。RyR を発現すると Ca^{2+} リークにより小胞体内 Ca^{2+} 濃度が低下する。RyR 阻害薬はリークを止めて Ca^{2+} 濃度を増大する。(b) 新規 RyR1 阻害薬 (Cpd1) は既存薬のダントロレンよりも高い親和性を示した。(c), (d) 悪性高熱症モデルマウス

スはイソフルラン麻酔により体温上昇と筋拘縮（写真）を起こして死亡する。Cpd1 は体温上昇を抑制し、救命した。(e) Cpd1 は血中半減期が約 10 分と非常に短かった。

The high-resolution 3D structures of human membrane proteins have direct relevance to the development of new drugs, therefore, determination of such structures has eagerly been long-awaited. However, most of the structures in PDB are those from prokaryotes and very few of them are from mammals. The lack of an efficient large-scale production system, and difficulty in their purification, are the major causes of this problem.

One of our missions of this project was to support “researchers who are interested in the 3D structure of such molecules but cannot carry out research by themselves” by using our unique expression and purification systems using cultured mammalian cells. The second mission of the project was the advancements of our technologies for the future. These advancements enable the structural determinations of highly difficult proteins, such as large membrane protein complexes. In addition, we constructed platforms for utilizing membrane protein-expressing cells not only as of the “protein production factory” but also as new drug screening systems. Thus, it is obvious that our project leads to the structural analysis of difficult proteins, thereby leading to the development of novel drugs.

As one of the notable achievements, we have successfully revealed the channel opening mechanism of cardiac ryanodine receptor (RyR2) caused by Ca^{2+} binding using cryo-electron microscopy/single-particle analysis (Kobayashi et al., Nature Communication, in press). Our achievement is expected to contribute to the development of completely new diagnostic methods, therapeutic agents, and preventive agents for arrhythmogenic heart diseases. We have also succeeded in developing an inhibitor screening system. Using the system, we have screened and identified multiple inhibitors to the ryanodine receptor and succeeded in obtaining a new compound that surpasses existing drugs by structural development. Since this compound shows a strong therapeutic effect on malignant hyperthermia model mice and has a short plasma half-life, it is expected to be developed as a new therapeutic agent for malignant hyperthermia that improves the disadvantages of existing drugs (Yamazawa et al., Nature Communications, 2021).