

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）中川敦史
（英語）Atsushi NAKAGAWA

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人大阪大学・蛋白質研究所・教授
（英語）Osaka University・Institute for Protein Research・Professor

II 補助事業の概要

大阪大学・蛋白質研究所が有する、SPring-8の放射光ビームライン（蛋白研ビームライン：BL44XU）、最先端クライオ電子顕微鏡、超高磁場溶液および固体NMR装置群を活用し、各技術の高度化・支援を行うとともに、それぞれの技術を相補的に利用しより高度な構造情報を得ることを目指した相互連携を行い、創薬等ライフサイエンス研究のための多層階構造生命科学解析技術の支援と高度化を行った。

(1) 支援

1-1) 蛋白研ビームラインの利用と支援

大阪大学蛋白質研究所がSPring-8に設置・運営している生体超分子複合体構造解析ビームライン(BL44XU)（蛋白研ビームライン）の特長を生かし、格子定数が400Åを超える結晶や分解能の低い結晶を持つ利用者を中心としたプロジェクト課題に対してビームタイム配分を含む支援を行うとともに、そのようなサンプルを持つ研究者あるいはポテンシャルユーザーに対してデータ収集法や解析法に関する情報提供や研究支援を行うことを進めた。具体的には、全ユーザータイムの約10%を本事業に提供し、それぞれのユーザーに対して、これまでの経験で培ってきたデータ収集・データ処理のノウハウをオンサイトで個別に提供し、生体超分子複合体からの高精度な回折強度データ収集と構造解析を支援した。さらに、構造解析支援について、18課題の構造解析支援依頼に対し、17件についてコンサルティングを行った後に、11課題を利用支援に移行し支援を行った。その他、

ビームタイム利用課題 4 件についての支援を行った。

1-2) 最先端クライオ電子顕微鏡の利用と支援

合計 68 件のコンサルティングを行い、64 件の支援を行った。支援初期の段階から、特に企業への支援において、2.1Å分解能解析に成功し、なおかつ分子量が 500 未満の低分子が結合している様子を可視化できた。低分子薬は、分子量 500 未満であることが一つの目安である。本支援成果によって創薬への利用が可能であることが確かめられた。その他多くの構造解析に成功し、Nature、Cell 等著名な雑誌へ掲載された結果に対し貢献することができた。

特記事項として、2018 年に発生した大阪北部地震により、大阪大学超高压電子顕微鏡センターの電子顕微鏡施設が損傷を受け、同施設が文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業を通して行っているクライオ電子顕微鏡支援が行えなくなった案件を 3 課題本事業で引き受けた。

1-3) 高磁場高分解能 NMR 利用と支援

リガンドスクリーニングや自動解析が可能な超高磁場高分解能溶液 NMR 装置と 1mm ローターや DNP 法により高感度化した高分解能固体 NMR 装置について、装置稼働時間の 10%程度を配分し、これら特徴を活用できる同位体標識生体系試料を持つ研究者に対して、NMR 試料調製法、NMR 実験法、スペクトル解析法の情報提供と支援を行った。これまでに 18 件のコンサルティングを行い、蛋白研の超高磁場・高分解能溶液 NMR の特徴が貢献できる支援申請 11 件と固体 NMR による支援申請 2 件（計 13 件）について、同位体標識生体系試料の NMR 実験および NMR スペクトル解析の支援を実施した。

1-4) 相互連携による相関構造解析支援

放射光、クライオ電子顕微鏡、溶液および固体 NMR を連携して利用する相関構造解析支援体制を整え支援を進めた。

(2) 高度化

2-1) 蛋白研ビームラインの高度化

格子定数が 400 Åを超える結晶や分解能の低い結晶からの回折データを高精度に収集できるような開発を行った。具体的には、高位置分解能光子検出型二次元検出器および多軸ゴニオメータの導入とデータサーバーを含む周辺環境の整備、結晶マウントロボット SPACE の高度化（ツインアーム・長軸化）によるデータ収集の大幅な効率化を行い、巨大格子定数の結晶からの高精度かつ高効率のデータ収集システムを完成させた。さらに、ポストコロナ・ウィズコロナ時代に対応するためにリモート測定システムを立ち上げた。

2-2) 構造解析の自動精密化パイプラインの開発

X線結晶構造解析の自動精密化パイプラインの開発を進めた。複数のプログラムの並列利用と判定基準の確立を行う事で、リガンドフィッティングを含め PDB に登録できる基準にまで自動で精密化するパイプラインを構築した。

2-3) クライオ電子顕微鏡法の高度化

2018 年に Titan Krios に K3 カメラを導入し、それまで撮影に利用してきた FalconIII に比べて 10 倍以上の高速撮影が可能となった。そこで、試料ステージを動かすことなく近隣の場所を撮影できる multi shot 撮影が可能な SerialEM を導入し、高速撮影を実現した。これにより 1 日に撮影できる画像の枚数は 1100 枚から 7000 枚まで増加した。同様にスクリーニング用の電子顕微鏡である Talos Arctica も撮影に時間がかかる FalconIII が導入されていたが、2021 年に K2 カメラを導入することで従来の 5 倍以上の高速撮影が可能となった。両装置に撮影と同時に画像処理が可能な on-the-fly システムを導入し、撮影開始から 1 時間程度でグリッドの良し悪し

を判断できるような環境が整っている。

2-4) 共有結合によってタンパク質を固定化するグラフェングリッドの作製

クライオ電子顕微鏡観察は電子顕微鏡グリッドに溶液試料を滴下し、余分な水分をろ紙で吸い取って薄膜化した後に液体エタンで凍結させる。その際大きな問題になるのが、気液界面におけるタンパク質の変性と、どの分子も氷の中で同じ向きを向いてしまう preferred orientation である。その問題を解決するために、大阪大学大学院薬学研究科・井上 PO、大阪大学大学院生命機能研究科・難波グループと共同でタンパク質を共有結合で固定する特殊なグラフェングリッドの作製を行った。この方法はグラフェン表面を ClO₂ ガスによって部分的に酸化し、エピクロロヒドリン処理をすることでグラフェン表面にエポキシ基を導入する。その表面にタンパク質溶液を展開するとタンパク質のアミノ基とグラフェン表面のエポキシ基が共有結合によって固定化される。この方法によってこれまで preferred orientation によって構造解析できなかった V-ATPase の構造解析に成功した。

2-4) 先端高分解能 NMR 検出技術の高度化

コア技術である、人工脂質二重膜ナノディスクに再構成した膜蛋白質調製法、生細胞内にある標的蛋白質や化合物を測定できる in-cell NMR 法、自動 NMR 解析プログラム Deep-MagRO、¹⁹F 化合物ライブラリーを用いた ¹⁹F-NMR 法によるリガンドスクリーニング法、高度安定同位体標識技術による蛋白質の相互作用・動態構造解析法、DNP 固体 NMR 超高感度法の開発を行った。人工脂質二重膜ナノディスクに再構成した膜蛋白質調製法では、二重膜に結合する蛋白質の溶液 NMR 相互作用解析を実用化して、支援にも貢献した。自動 NMR 解析プログラム Deep-MagRO では、NMR 構造決定の律速段階であった NMR 実験終了後の NMR 信号の化学シフトへの帰属、距離情報を与える NOE 信号の帰属、および立体構造決定を深層学習の技術を用いて自動化した。これにより、数か月を要した解析を 1 日で可能にした。DNP 固体 NMR 超高感度法では、NMR 感度を約 5000 倍向上させることによって安定同位体標識せずにタンパク質構造を解析できることを示した。

(3) 連携

ユニット内連携として、理化学研究所、物質構造科学研究所、横浜市立大学と協力して、創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化を進め、さらに、ユニット間との緊密な連携や他の AMED 事業と連携してプロジェクトを進めた。

We have been providing three key technologies for structural biology; X-ray crystallography using the synchrotron radiation beamline at SPring-8, cryo-electron microscopy using the state-of-the-art cryo-electron microscopes and NMR spectroscopy using the ultra-high-field solution NMR instruments and the solid-state NMR instruments with dynamic nuclear polarization (DNP) technique, to the AMED-BINDS project. In addition to providing support for structure determination of target protein molecules, we have been developing new technologies/methodologies for structural biology using these techniques. Combining these techniques enable us to develop a new scientific field, multi-scale structural life sciences.

(1) Support

1-1) Synchrotron Radiation Beamline (BL44XU)

The synchrotron radiation beamline at SPring-8 (BL44XU) is designed to collect high-precision diffraction data from large unit cell crystals or poorly diffracting crystals. We provided ~10% of user time to the project

and provided each user with data collection and data processing know-how we accumulated over the years. We supported 11 projects from crystallization to structure analysis and provided beamtime to 4 projects.

1-2) Cryo-electron microscopes

We have supported 64 projects (from 68 projects consulted) and succeeded to solve many of the structures. These results were published in the top journals, such as Nature, Cell etc. Notably, we succeeded to obtain 2.1Å resolution structure map which could visualize small molecule of which molecular weight was smaller than 500 in the early stage of the project. This result has confirmed the feasibility of its use of cryo-electron microscopy in drug development.

1-3) NMR instruments

We provided ~10% of machine time of the ultra-high-magnetic-field solution NMR instruments, which can be used for ligand screening and automatic data analysis, and the high-resolution solid-state NMR instruments with DNP technique together with 1mm rotor to the project. We also provided sample preparation, data collection, data analysis know-how we accumulated over the years. We supported 13 projects (11 for solution NMR and 2 for solid-state NMR).

(2) Upgrading

2-1) Upgrading the IPR beamline

We have installed a high-resolution photon-counting type area detector and a multi-axis goniometer to enable diffraction data collection from large unit cell crystals (>400 Å) or poorly diffracting crystals with high-precision. In addition, the improvement of the peripherals including a large data server, and a new crystal mount robot SPACE-II were performed. During the project, we have made significant improvements in the beamline and completed a highly precision and highly efficient data collection system from crystals with large unit cell or poor diffraction crystals.

2-2) Development of automatic refinement pipeline for high throughput structural analysis

We have developed the automatic refinement pipeline for X-ray structure analysis for high throughput structural analysis.

2-3) Upgrading the cryo-electron microscopes

High-speed direct electron detectors, a K3 camera and a K2 camera, were installed on the Titan Krios and Talos Arctica, respectively. The K3 camera equipped with the Titan Krios can collect more than 6 times images than FalconIII which was initially installed, using SerialEM software. The K2 camera equipped with the Talos Arctica can collect more than 5 times images than FalconIII. Automated data acquisition and on-the-fly image processing systems are installed on both microscopes, and sample screening can be performed within one hour.

2-4) Development of novel sample grid for cryo-electron microscopy

Preparation of sample grids are sometimes seriously problematic because of denaturation of sample at the water-air interface and/or preferred orientation of molecules on a sample grid. Our novel sample grid preparation technique, which oxidize graphene surface of the sample grid by ClO₂ gas and then epoxidized by epichlorohydrin, solved these problems, since the molecules are covalently attached on the grid surface in a random orientation. Using this novel sample grid, we have succeeded to solve atomic structure of V-ATPase, which had not been solved because of “preferred orientation problem” on a conventional sample grid.

2-5) Advanced high-resolution NMR technologies

We have developed the core technologies for NMR experiments, including preparation of membrane

proteins using artificial lipid bilayer nanodiscs, in-cell NMR for detecting target proteins or compounds in a cells, automatic NMR spectral analysis program Deep-MagRO based on deep learning, high throughput ligand screening with ^{19}F -labeled compound library, protein-protein interaction and dynamics analysis with advanced isotope labeling technique, development of novel DNP technique for the sensitivity enhancement of solid-state NMR.