

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

公開

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8月25日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）吉川 雅英
（英語）Kikkawa, Masahide

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）東京大学・大学院医学系研究科・教授
（英語）The University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Professor

II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

本事業では、東京大学と理研・生命機能科学研究センターが協力してクライオ電子顕微鏡による構造解析の支援を行って来た。

事業推進の方針としては、研究室・大学・分野の垣根を越えたオープンサイエンスを推進し、技術的進歩の速いクライオ電子顕微鏡による構造解析において、世界と対峙できるような優れた成果が出るようにする事である。また、2019年頃からは、製薬企業もクライオ電子顕微鏡による構造解析に興味を持ち、利用が広がってきたことから、企業利用の推進も行ってきた。

この結果、2018年度に設定したマイルストーン(1)単粒子解析で2.4 Å以上の解像度の達成、(2)単粒子解析の大規模なデータ収集(72時間)を60件、(3)トモグラフィーの支援を5件、のいずれも(1)1.4 Å、(2)215件、(3)21件と、マイルストーン以上を達成した。特に、(2)大規模なデータ収集は、高度化の項目で述べるデータ収集の効率化により、2019年1月以降、それまでの10分の1の8時間程度で終わるようになり、件数は72時間でなく1000枚以上の画像収集とした。従って、1日のサイクルの中でグリッドのスクリーニングと、大規模なデータ収集が可能になった。このため中間評価時点では、本事業終了までの目標として単粒子解析の大規模なデータ収集(1000枚/日以上)を年間120件と改訂し、2020年度は215件、2021年度は327件を達成している。

これらの大規模データによって解かれた構造は、「学会誌・雑誌等における論文一覧」にあるように、国際一流紙への50編以上の論文として出版されている。この中で使われている方法としては、最も普及している単粒子解析法だけでなく、トモグラフィーを用いた細胞内小器官に関する研究、microEDを用いた分子構造の研究が多数含まれている。

「細胞内ネイティブ複合体」を達成するための目標のひとつであるFIB-SEMを用いた細胞内構造の観察についても、方法論として確立した。

(1) 支援

クライオ電子顕微鏡の需要の高まりに応える為に、2018年より稼働したTitan Krios G3i, Talos Arctica G2に加え、2020年7月から東京大学で導入したTitan Krios G4もBINDSの利用者支援に活用されている。2020年度は42課題の利用があり、全利用日数は360日、2021年度は39課題の利用があり、全利用日数は460日であった。以下に利用の内訳を示す。

| コンサルティング数 | 通常支援数 (成果公開) | | | | 企業利用・成果占有利用数 | | | |
|-----------|--------------|------|------|----|--------------|------|------|---|
| | 支援中 | 支援完了 | 支援未達 | 計 | 支援中 | 支援完了 | 支援未達 | 計 |
| 73 | 34 | 6 | 19 | 59 | 5 | 1 | 0 | 6 |
| 19 | 39 | 9 | 5 | 53 | 7 | 0 | 0 | 7 |

(2) 高度化

クライオ電子顕微鏡による分子構造解析は、多くの試料を観察し、より効率的なデータ収集が必要とされている。この目的の為に、単粒子解析法については、高解像度化(1.62 Å → 1.4 Å)と、10倍の効率を達成している。同様に、クライオ電子線トモグラフィーとmicroEDについても、自動化や、高効率化を行ってきた。これによって、以下に述べるような成果が得られた。

- 単粒子解析用・標準試料の作成・高解像度化
- 単粒子解析の高度化：抗菌薬開発への応用
- トモグラフィー用・データ収集の効率化
- microEDの効率化と高解像度化

(3) 連携

●クライオ電子顕微鏡の構造解析については、KEK千田グループと共に、クライオEMネットワークを構築して運用している(2018年の目標を達成)。具体的な内容としては、他施設(E1)でスクリーニングされ、最適化された試料を、東京大学(E2)として年間10件以上受け入れている。

●クライオ電子顕微鏡の普及の為に、slack上にBINDSのフォーラムを作成し、技術情報などの交換の場を作成した。5月5日時点では、144名の参加者がおり、合計13400メッセージと活発な情報交換が行われて居る。

●日本のクライオ電子顕微鏡ハードウェア開発への協力(連携先：大阪大学・難波啓一グループ、筑波大学・岩崎グループ、日本電子)

1. 日本製(JEOLや日立)のクライオ電子顕微鏡は、設置台数、日本製電顕によって解かれた構造の数の点で大きく劣っている。この問題を解決するために、東京大学に設置された電子顕微鏡群を有効に生かすと同時に、日本電子、大阪大学・難波グループと協力しながら、日本電子の電顕についての開発に協力をしている。具体的な例として、Danevグループは日本電子と共同で、FADEと命名された高速にフォーカスを変化させ

ることの出来るデバイスを開発し、これを JEM-F200 に組み込んでテストを行っている (*IUCrJ*2020 7:566-574)。

- また、日本電子ユーザーグループミーティングを 2018 年 1 月に大阪大学で行い、その後も定期的に開催することで、クライオ電子顕微鏡ユーザーからのフィードバックを行っている。
- 2020 年度の補正予算で日本製の電子顕微鏡二台を導入した。

●ヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡による観察(連携先: 東京大学・胡桃坂グループ)

胡桃坂グループは、構造解析ユニット(タンパク質生産領域)で再生クロマチンの提供を行っており、同時に、クライオ電子顕微鏡によるヌクレオソームの構造解析にも長けている。そこで、ヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡による構造解析の外部からの依頼に対して、構造解析を協力して行っている。

人材育成についての実績及び成果

●クライオ電顕勉強会

学内では、2018 年より継続的に、学生(大学院生+学部生)主体のクライオ電子顕微鏡講習会を行っており、10~15 回/セメスターのコースを、3 回行ってきた。参加する研究室も最初の三研究室から、七研究室に拡大しており、参加者はおよそ 60 人。

●クライオ電子顕微鏡によるタンパク質構造解析講習会(4 日間の講義および実習)

学内外から参加者を募集し、クライオ電子顕微鏡に関する講義および実習を行った、参加人数は 12~19 名(2018 年度~2020 年度)で、大学、研究機関、民間企業などから参加があった。電子顕微鏡の基礎的な原理、単粒子解析法の基礎、トモグラフィーの原理と応用について講義を行い、染色試料の作製、凍結試料の作製、クライオ電顕の操作および観察などの実習を行い、最後にスーパーコンピュータを用いたデータ解析を行った。講習会後のアンケート回答では高い満足度(10 点満点中 9.5 点)が得られており、今後も継続して開催したい。

●国際シンポジウムの開催(2018 年 10 月 25 日(木)、東京大学)

クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析や将来的な発展に関する国際シンポジウムを開催した。

参加者総数は 170 名(企業 24 名、大学等研究者 89 名、学生 43 名、講演者等 14 名)であった。

●人材育成

- 本プロジェクトで雇用された特任助教二人が製薬企業に就職し、その後もクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を通じて、創薬に貢献している。
- また、P4 ATPase の構造を解いた論文(*Science*, 2019)の筆頭著者は、製薬企業の研究員であり、濡木研究室の社会人博士課程にて今回の研究を行った。

Summary of the project

In this project, the University of Tokyo and the RIKEN Center for Biosystem Dynamics Research worked together to support structural analysis using a cryo-electron microscope (cryo-EM). We promoted open science that transcends the boundaries of laboratories, universities, and fields. In addition, from around 2019, we have been promoting corporate use and as a result, pharmaceutical companies started using cryo-EM for their research and development.

As a result, the milestones set in 2018 were achieved as follows: (1) Resolution of 2.4 Å by single particle analysis → 1.4 Å, (2) 60 large-scale data collection (72 hours) for single particle analysis → 215, (3) Five tomography projects per year → 21 projects. In particular, (2) large-scale data collection will be completed in about 8 hours, which is one-tenth of the previous period

The structure solved by these large-scale data has been published in more than 50 papers in internationally prestigious journals. The methods used in this study include not only the most popular single particle analysis method but also many studies on cellular organelles using tomography and molecular structure studies using microED. Observation of the intracellular structure using FIB-SEM, which is one of the goals to achieve the "intracellular native complex", was also established as a methodology.

(1) Number of supported projects.

Demand for cryo-electron microscopes In addition to the Titan Krios G3i and Talos Arctica G2, which started operation in 2018, the Titan Krios G4 was introduced at the University of Tokyo from July 2020 is also being used to support BINDS users. In FY2020, 42 tasks were used, and the total number of days used was 360 days. In FY2021, 39 tasks were used, and the total number of days used was 460 days. The breakdown of usage is shown below.

| consulting Number of | normal support (results disclosed) Number of | | | | corporate use / results occupancy usage | | | |
|-------------------------|--|-----------------------|------------------------|-------|---|-----------------------|------------------------|-------|
| | Supporting | support Completion | support Not reached | Total | support | Support completion | support Not reached | Total |
| 73 | 34 | 6 | 19 | 59 | 5 | 1 | 0 | 6 |
| 19 | 39 | 9 | 5 | 53 | 7 | 0 | 0 | 7 |

(2) Technical Development for cryo-EM.

cryo-electron microscope requires observation of many samples and more efficient data collection. For this purpose, the single particle analysis method has achieved high resolution (1.62 Å → 1.4 Å) and 10 times the efficiency. Similarly, we have been automating and improving the efficiency of cryo-electron tomography and microED.

(3) Inter-group projects

- For structural analysis of cryo-electron microscope, we established a cryo-EM network together with the KEK Specifically, the University of Tokyo (E2) accepts more than 10 samples a year that have been screened and optimized at another facility (KEK).
- In order to popularize [BINDS forum on slack](#) was created.
- Cooperation in the development of cryo-electron microscope hardware in Japan (Collaboration: Keiichi Namba Group, University of Osaka, Iwasaki Group, Tsukuba University,
- Observation of nucleosomes with a cryo-electron microscope (Collaboration partner: The University of Tokyo, Kotosaka Group)

Achievements and achievements in human resource development

• **Cryo Electron Microscopy Study Group:** Since 2018, we have been holding cryo-electron microscope training sessions mainly for students (graduate students + undergraduate students) 10 to 15 times/semester. The number of participating laboratories has expanded from the first three laboratories to seven laboratories, with approximately 60 participants.

• Protein structure analysis class using cryo-electron microscope (4 days of lecture and practical training)

• Holding an international symposium (Thursday, October 25, 2018, The University of Tokyo)

The total number of participants was 170 (24 companies, 89 researchers from universities, 43 students, 14 speakers, etc.).

• Human resource development

Two assistant professors in this project got a job at a pharmaceutical company and have continued to contribute to drug discovery through structural analysis using a cryo-electron microscope.