

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 拡張結晶スポンジ法によるタンパク質の革新的分子構造解析
(英語) Extended Crystalline Sponge Method for Advanced Protein Structural Analysis

研究開発実施期間: 令和元年 10 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 藤田大士
(英語) Daishi Fujita

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 京都大学・高等研究院・准教授
(英語) Kyoto University・Institute for Advanced Study・Associate Professor

II 研究開発の概要

研究開発の概要

本研究開発課題「拡張結晶スポンジ法によるタンパク質の革新的分子構造解析」は、既存の結晶スポンジ法（CS 法）をタンパク質複合体解析へと拡張することを目指し、国立大学法人京都大学を主幹機関として、国立大学法人東京大学および関西医科大学と連携して実施された。研究期間は令和元年 10 月 1 日から令和 6 年 3 月 31 日までである。本研究開発の目的は、分子ケージ内部における弱いタンパク質間相互作用の安定化および評価技術の確立である。

本課題の背景としては、タンパク質複合体の解析が製薬業界で重要な課題となっている点が挙げられる。従来の CS 法は低分子の解析に革命をもたらしたが、これをタンパク質などのマクロ分子にまで拡張することで大きな進展が期待されていた。

研究開発の成果およびその意義

主要な成果として、分子ケージ内部の空間を利用して弱いタンパク質複合体の安定化に成功したことが挙げられる。特に、解離定数 (Kd) がサブ mM という非常に低親和性の複合体ペアを安定化することができた。これにより、弱い分子間相互作用に対するシグナル/バックグラウンド比 (S/B 比) を大幅に改善する結果が得られ、創薬基盤技術としての応用可能性が高まった。さらに、新しく確立した物理化学理論に基づき、狙った通りの強さで安定化できるように設計可能で取り扱いやすい技術となったことも特筆に値する。これにより、実験結果を予測できる簡易的なシミュレーションプログラムを作成し、その結果が実験とよく一致することも確認された。

本研究では、タンパク質複合体の評価とデータ収集を目的としたプラットフォームの改良が順調に進み、タンパク質複合体の安定化とその効果を定量評価する技術の確立に至った。特に、各種核酸構造体の設計とその集積性の評価を通じて、従来の方法では評価が困難であった低親和性のタンパク質間相互作用を定量的に示すことが可能となった。これにより、技術の汎用性が高まった。

また、核酸構造体を自在に設計可能なコンピュータ設計プログラムの開発にも取り組み、そのプロトタイプは完成した。これにより、指定した形状と空間サイズを有する構造体の簡便な設計、オリゴ注文、合成までを短期間で行うことが可能となり、低コストで高精度な相互作用解析が実現した。さらに、化学ケージを用いた系では、包接されたタンパク質の著しい安定化効果とリフォールディング効果が観測された。また、核酸構造体を用いた薬物候補分子のスクリーニングデモンストレーションを行い、技術導出に向け有利となる実施例データを取得した。この実施例データは、技術の将来性を高め、技術導出に有利な条件を整えるための重要な成果である。

本研究では、低温電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた評価手法の開発と実証も行った。新たに設計された楕円体型の中心空隙を有する構造体を使用し、タンパク質複合体のデータ取得と解析を行った。これにより、従来の評価法 (例えば SPR 法など) では評価できなかった弱いタンパク質間相互作用を定量的に評価することが可能となり、その点に多くの需要があることが確認された。

これまでの研究成果として、弱いタンパク質間相互作用の安定化および評価技術の確立に向けて多くの進展が見られた。特に、課題期間内に得られたデータは、従来の評価技術では不可能だった微弱な相互作用の定量評価を可能にし、科学界および創薬業界に大きなインパクトを与えるものとなった。

今後の展開

本研究開発の成果は、基礎科学としての大きな進展だけでなく、創薬業界への貢献も大いに期待される。特に、弱いタンパク質間相互作用の評価技術の確立は、新しい創薬ターゲットの発見や評価において非常に有利となる。また、この技術は評価/スクリーニング、相互作用解析をシームレスに行うことができるプラットフォームとしても機能することから、創薬プロセス全体の効率性と精度を向上させる可能性がある。

今後は、産業界との連携を深め、得られた技術の実用化と大規模展開に向けた努力を続ける。特に、産業界からのフィードバックを元に技術の改良と最適化を進め、高精度な解析技術の確立を目指す。また、これまでに得られた技術を基盤にさらなる研究開発を進め、新しい応用分野の開拓も視野に入れて取り組んでいく。

将来的には、解析技術の更なる拡張を行い、より高精度な方法の開発にも取り組む計画である。特に、核酸構造体の設計とその利用方法の最適化を進めることで、より効率的で高精度な解析を可能とし、医薬品開発のス

ピードアップとコスト削減につなげたいと考えている。また、低温電子顕微鏡法の活用をさらに進め、複雑なタンパク質複合体の解析を可能とすることで、新薬の発見と開発に寄与することを目指す。

今後の発展としては、技術導出を最優先し、得られた知見を基に新たなプロジェクトや研究開発を推進する予定である。これにより、創薬基盤技術としてのさらなる応用が期待され、社会における医療や健康維持に貢献することを目指す。

結論

本研究開発課題は、分子ケージの内部空間を利用して、弱いタンパク質間相互作用の安定化および評価技術の確立に成功するという目標に対して大きな成果を上げた。これにより、基礎科学としての大きな進展を遂げるとともに、創薬業界への貢献も期待される。特に、弱いタンパク質間相互作用の評価技術の確立は、新しい創薬ターゲットの発見や評価において非常に有利であり、創薬プロセス全体の効率性と精度を向上させる可能性がある。研究チームは今後もこの技術を基盤にさらなる研究を進め、社会への貢献を目指して邁進する所存である。以上が、本課題における主要な成果と今後の展望である。

Overview of the Research and Development:

The research project "Extended Crystalline Sponge Method for Advanced Protein Structural Analysis" aimed to extend the existing crystalline sponge (CS) method to the analysis of protein complexes. Led by Kyoto University in collaboration with the University of Tokyo and Kansai Medical University, the project spanned from October 1, 2019, to March 31, 2024. The main objective was to establish techniques for stabilizing and evaluating weak protein-protein interactions within molecular cages.

Protein complex analysis has become a critical issue in the pharmaceutical industry. The original CS method revolutionized the structural analysis of small molecules, and there was significant anticipation that extending this method to macromolecules like proteins could lead to substantial progress.

Achievements and Their Significance:

One of the primary outcomes of this research was the successful stabilization of weak protein complexes using the internal space of molecular cages. Notably, protein pairs with sub-millimolar dissociation constants (K_d) were stabilized, significantly improving the signal-to-background (S/B) ratio for weak interactions and enhancing the method's applicability in drug discovery. Furthermore, the research established a new physicochemical theory allowing for the targeted stabilization of interactions with predictable strengths. A simple simulation program was also developed to effectively match experimental results.

The project made substantial progress in improving the platform for evaluating and collecting data on protein complexes. Various nucleic acid structures were designed and assessed for their ability to form assemblies, enabling the quantitative analysis of low-affinity protein interactions that were previously difficult to measure. This advancement increased the versatility of the technique.

A computer-aided design program for nucleic acid structures was also developed and prototyped. This program enables the quick and cost-effective design, ordering, and synthesis of structures with specified shapes and sizes, enhancing the precision and affordability of protein interaction analysis. Additionally, significant stabilization and refolding effects of encapsulated proteins were observed when using chemical

cages. The project also involved demonstrating drug candidate molecule screening using nucleic acid structures, obtaining examples that favorably facilitate technology transfer and future applications. The development and validation of evaluation methods using cryo-electron microscopy (cryo-EM) were another crucial aspect of this research. Using newly designed ellipsoidal structures, data were obtained for protein complexes, demonstrating the method's capability to quantitatively evaluate weak protein interactions previously undetectable by traditional techniques like surface plasmon resonance (SPR). Overall, the project achieved significant progress in stabilizing and evaluating weak protein interactions. The data collected during the project period provided a foundation for quantifying weak interactions, offering substantial impacts on both the scientific community and the pharmaceutical industry.

Future Prospects:

The achievements of this project are expected to contribute significantly to both basic science and the pharmaceutical industry. The technique's ability to evaluate weak protein-protein interactions is particularly advantageous for discovering and assessing novel drug targets. The platform enables seamless evaluation and screening of interactions, which could enhance the efficiency and accuracy of the drug discovery process.

Future efforts will focus on deepening industry collaboration to bring the developed technology into practical use and expand its application on a larger scale. Feedback from industry partners will be used to refine and optimize the techniques, aiming for highly accurate interaction analysis. Continued research will also explore new application fields based on the established technology.

Long-term goals include further expanding the analysis techniques to achieve even higher accuracy. Optimizing the design and utilization of nucleic acid structures will allow for more efficient and precise analysis, accelerating drug development and reducing costs. Advancing the use of cryo-EM will enable the analysis of complex protein assemblies, contributing to the discovery and development of new drugs. Efforts will prioritize technology transfer, leveraging the knowledge gained to drive new projects and research developments. This will further the technology's application as a fundamental tool in drug discovery and contribute to societal health and medical advancements.

Conclusion:

This research project successfully achieved its goal of stabilizing and evaluating weak protein-protein interactions within molecular cages, representing significant progress in both basic science and the pharmaceutical industry. The established techniques for evaluating weak interactions will greatly aid in the discovery and assessment of new drug targets, improving the overall efficiency and accuracy of the drug discovery process. The research team remains committed to advancing this technology and contributing to societal health and scientific progress.