

平成30年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の個別分子構造解析手法の確立と
薄膜サンプル調製プロセスの開発」

研究開発成果等報告書

令和元年9月

内閣府 沖縄総合事務局

学校法人沖縄科学技術大学院大学学園

沖縄プロテイントモグラフィ株式会社

目 次

第1章 研究開発の概要

- 1－1 研究開発の背景・研究目的及び目標
- 1－2 研究体制
- 1－3 成果概要
- 1－4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

- 2－1 2次元構造解析ソフト（COMET 2D）の開発
- 2－2 薄膜のサンプル調製手法の開発
- 2－3 低分子ドラッグと標的タンパク質の複合体の構造解析手法の確立
- 2－4 膜タンパク質（GPCR 等）の構造解析手法の確立
- 2－5 市場調査

最終章 全体総括

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

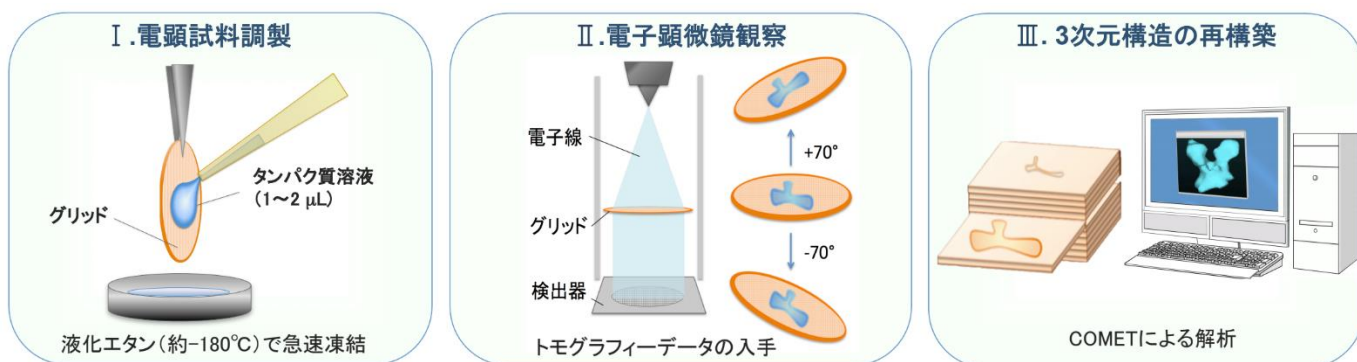
創薬分野では数年前から従来の低分子化合物ではなく、バイオ創薬(タンパク質を利用した薬)の比重が大きくなってきている。創薬には膨大な時間とコストがかかり、薬となる候補を絞り込む(スクリーニング)プロセスにおいて、その分子構造の可視化は重要な技術であり、創薬全体の生産性に大きく影響する。

従来より、タンパク質の構造解析技術では、X線結晶構造解析技術を用いるのが一般的であるが、それには標的タンパク質の結晶化が前提であった。一部のタンパク質は結晶化が難しいことから従来の手法は利用できず、バイオ創薬の現場では可視化できないまま開発が進んでいる例も多い。タンパク質分子は溶液の条件や添加物、水との相互作用によって容易に形状が変化する柔らかい分子であることから、単純な可視化ニーズに加えて、多様な形態を見たいというニーズも強くなり、新しい構造解析技術が望まれている。

弊社では、沖縄科学技術大学院大学(OIST)で開発された、クライオ技術とトモグラフィー法を用いて、結晶化不要で、3次元のタンパク質分子の構造解析ができる手法(Protein Tomography法)をすでに事業化している。これは、個別のタンパク質分子の構造解析ができる産業界で唯一のサービスである。本研究開発では、この技術を革新的に進展させ、個別タンパク質分子の構造解析で扱えるサンプルの種類を増やし、高分解能な解析結果を、短納期・低コストで実現できる手法を確立することを目的とした。

クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の構造解析は世界的にも高い注目を集めている。特に、高分解能を得られる単粒子解析手法が話題であるが、従来と同じく平均化技術であり、分子の形態変化を伴うダイナミクス観察には適さない。それに対し、弊社の技術では個別分子の様々な形態を観察でき、創薬プロセスにおける新薬候補の低分子化合物と標的タンパク質が結合した際の構造変化や抗体薬候補と抗原の結合による複合体の構造などが可視化可能となり、創薬プロセス全体の効率化に大きく寄与できると考え、新規技術開発を進める。

3D プロテイントモグラフィー法(COMET3D)による解析の流れ



主なタンパク質の立体構造解析法の比較

手法	X-ray Crystallography	NMR	クライオ電子顕微鏡 単粒子解析	クライオ電子顕微鏡 Protein Tomography
比較要素				
技術	平均化技術	平均化技術	平均化技術	個別分子毎
ダイナミクス対応	×	×	×	○
高分子	△	×	△	○
対象タンパク質の数	×	×	×	○
解像度	○	○	○	△

従来の平均化技術に比べ、本技術(クライオ電子顕微鏡+トモグラフィー技術)の大きな特徴は下記の通りである。

- ・ サンプルの結晶化が不要である
- ・ 個々の分子の姿を可視化できる唯一の技術である
- ・ 構造解析にかかる期間、コストが安い

本研究の初期段階においては、新技術を実現するために解決すべき研究課題は、高度化・高品質化と低コスト化と考えた。また、ユーザからのニーズの主たるものは、下記の3点であると考え、これらのニーズに応えるべくサブテーマを設定した。

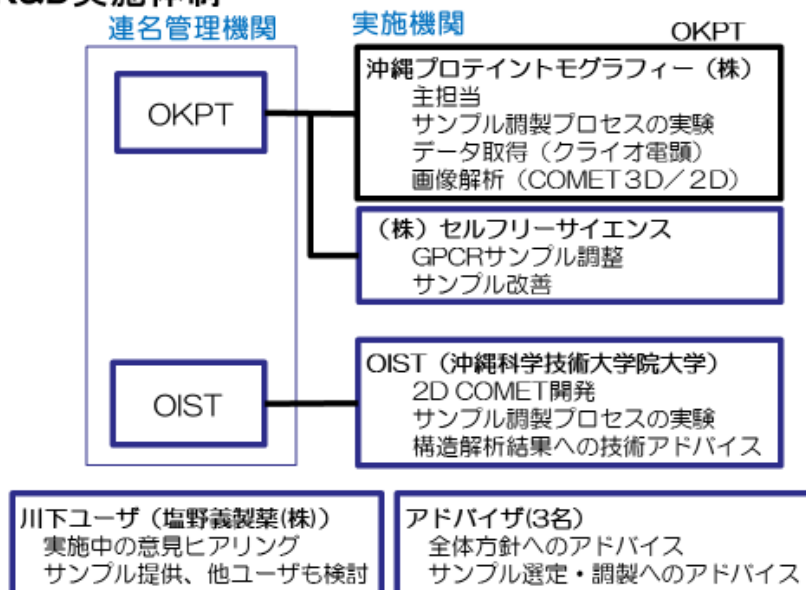
- ・ さらに簡便で低価格、短納期である構造解析手法(サービス)
- ・ 膜タンパク(特に GPCR)の解析
- ・ バイオ創薬ではなく、従来の低分子化合物の薬をメインに開発している製薬企業からは、低分子化合物とタンパクとの結合部位の可視化

4つの研究開発の具体的内容を下記のように設定した。

- 1 2次元構造解析ソフト(COMET 2D)の開発
- 2 薄膜のサンプル調製手法の開発
- 3 低分子ドラッグと標的タンパク質の複合体の構造解析手法の確立
- 4 膜タンパク質(GPCR 等)の構造解析手法の確立

1-2 研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

R&D実施体制



研究者（OKPT）Dr. 三瀬武史、前川あゆ美、亀井朗、福永響、Dr. 長谷川聡、Ruby May Andales

（OIST）Ulf Skoglund 教授、Dr. Lars-Go`ran O`fverstedt

アドバイザー：塩野義製薬株式会社：シニアフェロー 医学博士 坂田恒昭

愛媛大学 教授 澤崎達也、准教授 竹田浩之

1-3 成果概要

- 1 2次元構造解析ソフト（COMET 2D）の開発
- 2 薄膜のサンプル調製手法の開発
- 3 低分子ドラッグと標的タンパク質の複合体の構造解析手法の確立
- 4 膜タンパク質（GPCR 等）の構造解析手法の確立

（1）具体的な取組内容

タンパク質分子の構造解析作業の精度と効率を改善するために、4つのサブテーマ毎に解析サイクルを繰り返し実施した。3年間の研究開発期間を経て当初の目的はほぼ達成されたと考えられる。

① 2次元構造解析ソフトCOMET2D開発：

開発は完了、テスト利用を通じてソフトウェアの改善も行った。多くの事例に適用し、コントラストが改善することを確認した。

OISTクライオ電子顕微鏡の新しいカメラの導入とOSのアップグレードにより可能となった高速撮影による動画撮影法を利用して、撮影画像そのものの解像度を向上させた。

② 薄膜のサンプル調製手法の開発：

サンプルグリッド評価方法を検証し、当社の標準的な調製プロセスに組み込んだ。改良された調製プロセスに従って多くのサンプルを調製した。「グリセロール添加濃度（溶液の粘性の変化）による膜厚

の変化」・「界面活性剤の種類と濃度の違いによる金コロイド粒子の分散の度合い」に着目した実験も行なった。

- ③ 低分子ドラッグと標的タンパク質の複合体の構造解析手法の確立：
サンプルとなるタンパク質を選定し、また、外部への技術紹介時にケーススタディとしておいて大いに活用し、Bio International(Boston)、BioJapanなどのイベントでポスター展示を実施した。実際の案件に適用することを目指した。
- ④ 膜タンパク質(GPCR等)の構造解析手法の確立：
セルフリーサイエンス社より膜タンパク質の提供を受け、リポソームやナノディスクに埋め込んだGPCR(8サンプル)の構造解析を行った。

(2) 研究補助事業の効果・成果

- ① COMET2Dのソフト開発は完了し、複数サンプルでの実施結果からCOMET2Dの利点が明確になった。COMET2Dの機能を発揮させるには十分薄いグリッドを作製する必要があること、また大きな分子には向かないことが分かった。弊社のサービスメニューとして追加し、実際の顧客データにも適用した。クライオ電子顕微鏡での撮影のみを必要とするユーザも存在した。
- ② グリッド選定に関して実験結果を定量的に示し、グリッド評価方法を得た。この評価方法の適用により、標準的なサンプルのグリッド作製では特に問題は発生しなくなった。また、グリセロールや界面活性剤の影響、グリッドの選定方法についての知見を得て、実際の案件に活用している。
- ③ 市販のタンパク質を2種類使ってそれぞれケーススタディを得た。価値ある成果が得られたので学会などでの露出を増やし、複数の問い合わせを得た。国内製薬企業からの受注案件に適用し、本事業の研究成果と似た結果を得ることができた。また、未知サンプルの場合には、解析分子数を増やす必要があるとの知見を得た。
- ④ GPCRの構造解析については、いくつかの解析作業を行ったが、リポソームに発現させる場合、リポソーム自体のサイズ制御が難しいことがわかった。その後、Nanodiscの採用を試み、Nanodiscサンプルの3次元構造解析に成功した。膜タンパク質を含まないリポソームの解析結果についてケーススタディとして利用しているが、サービスメニューとしての採用までには至っていない。膜タンパク質の構造解析手法はやはり難しいテーマであることを再認識した。
しかし、このケーススタディにより、リポソーム単体の解析の受注につながった。また、東京医科大学医学総合研究所分子細胞治療研究部門(落谷教授、吉岡講師)との共同研究に結びつき、細胞小胞であるエクソソームの解析に成功、結果は学会などで紹介された。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

代表取締役社長 亀井 朗

TEL: 098-982-3359 FAX: 098-982-3361

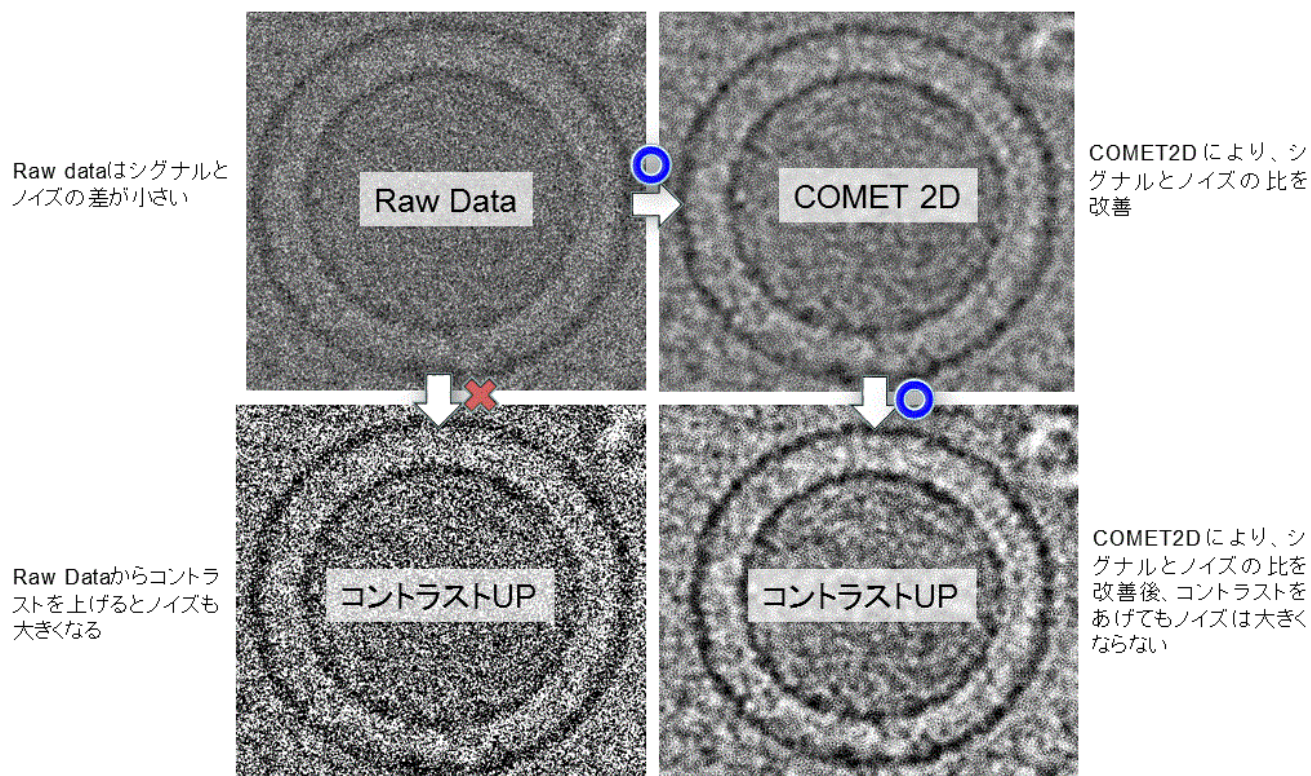
Email: info@okinawa-pt.com

第2章 本論

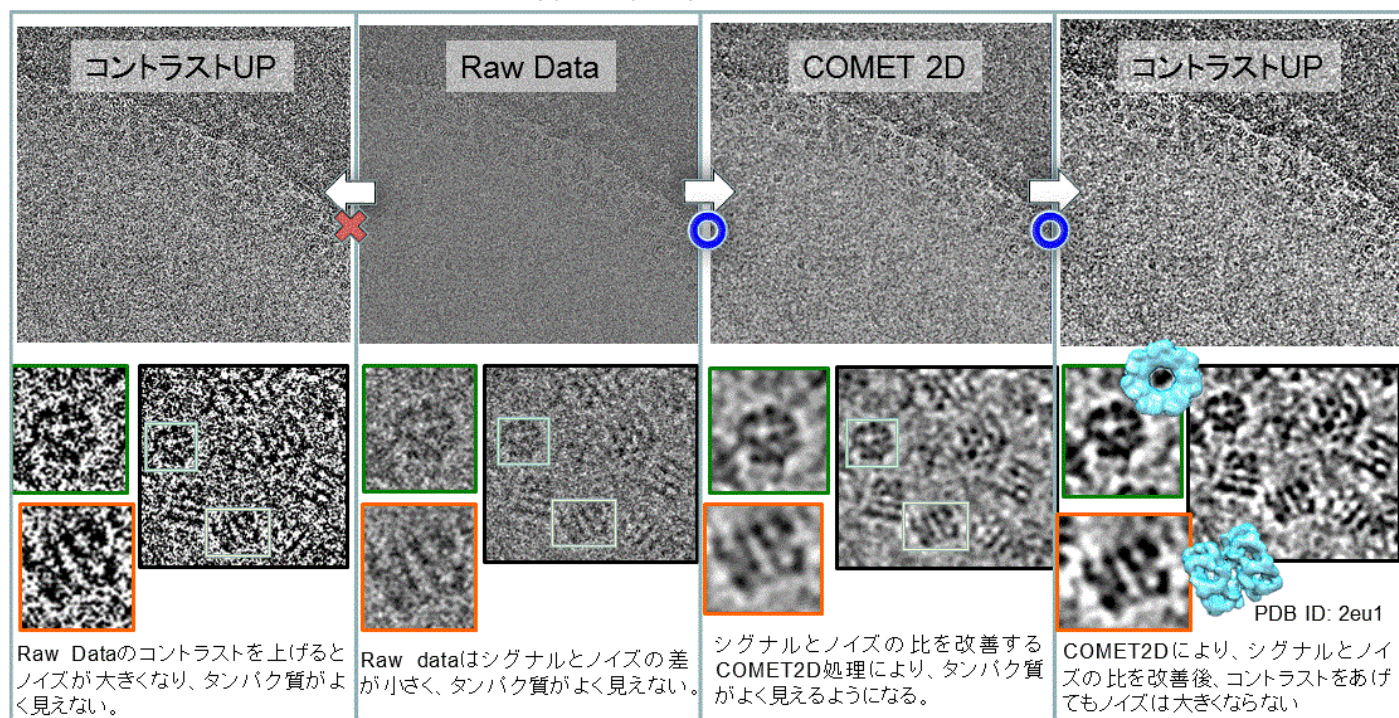
具体的な研究の成果・内容について、テーマごとにまとめる。

2-1 2次元構造解析ソフト（COMET2D）の開発：

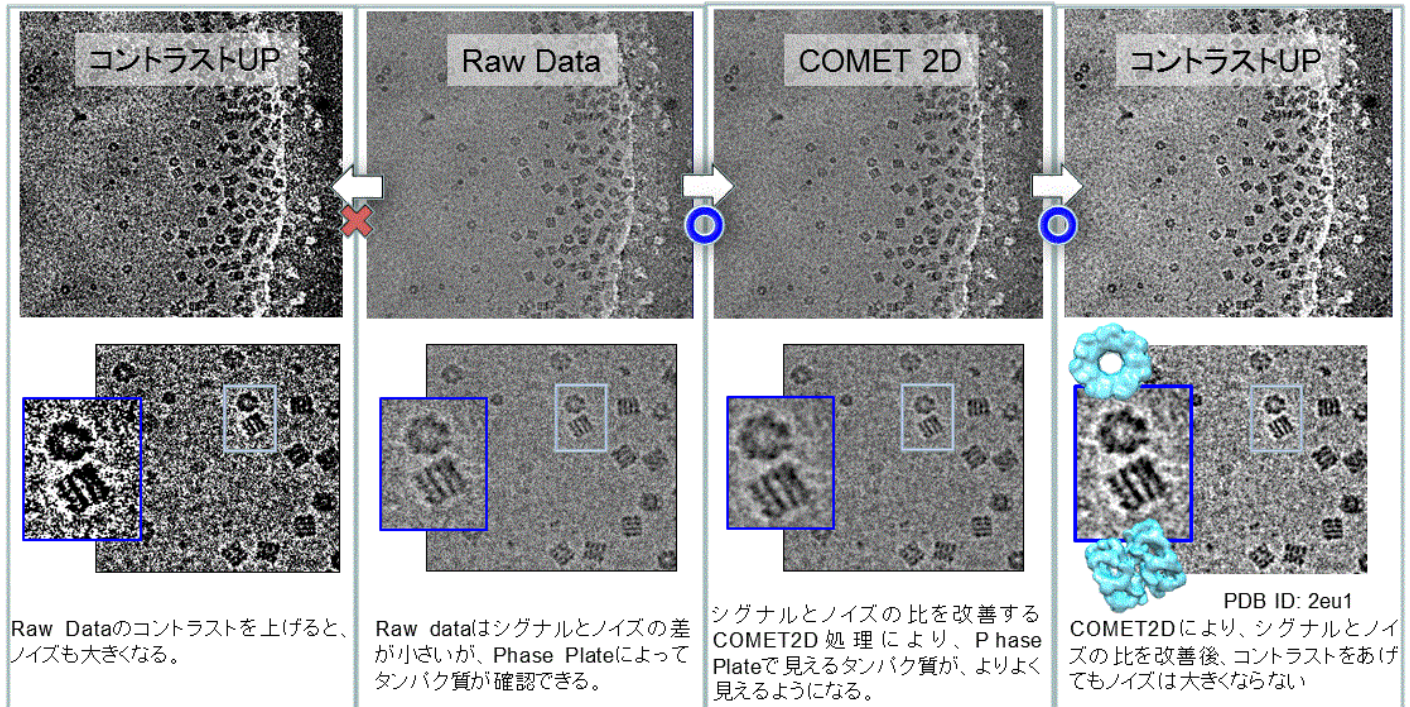
材料：ProteoLiposome (提供:セルフリーサイエンス), グリッド: Quantifoil 1.2/1.3,
撮影: Talos Arctica (+phase plate) 倍率: x150000, 解析: COMET2D



材料: GroEL、グリッド: Quantifoil 1.2/1.3、
撮影: Titan Krios (-phase plate)、倍率: x75000、解析: COMET2D



材料: GroEL、グリッド: Quantifoil 1.2/1.3
 撮影: Titan Krios (+phase plate)、倍率: x75000、解析: COMET2D



まとめ

- ・ COMET2D はシグナルとノイズの差を改善させ、コントラストや分解能を改善させる。
- ・ その機能を発揮させるためには、十分薄いグリッドを作成して撮影しなければならないことが明らかとなった。
- ・ 大きいリポソームよりも、サイズが小さいリポソームに COMET2D の使用は適していた。
- ・ GroEL などサイズの大きいタンパク質に COMET2D を適用できることが示された。

2-2 薄膜のサンプル調製手法の開発：

必要機器の購入検討・機種選別・導入（Vitrobot、親水化処理装置など）



グローブボックス

Vitrobot

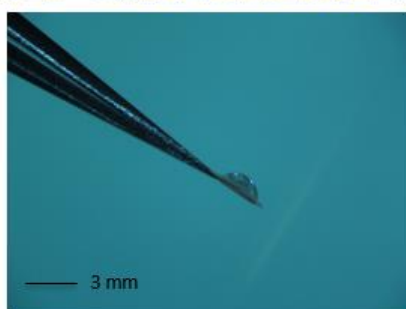


エタンガスボンベ

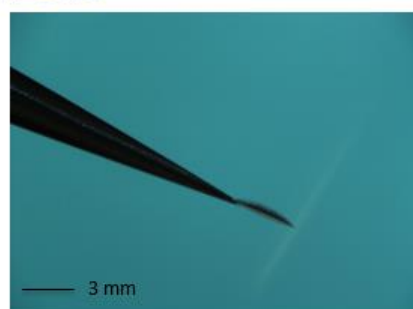


親水化処理装置

上記の一例として、親水化処理装置の効果を検証した



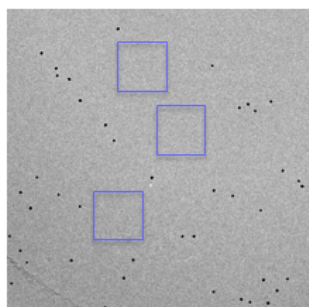
親水化処理前



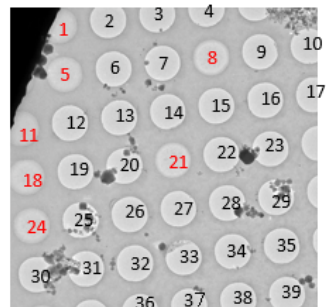
親水化処理後

従来、経験則のみで評価・選択されてきたグリッドの違いを数値化する評価手法の確立

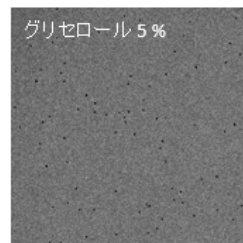
- 【評価のポイント】
- ・最も薄いホールの厚みはどうか
 - ・均一なサンプルの薄膜が形成できるかどうか
 - ・サンプルの性質によって安定性が変化するかどうか



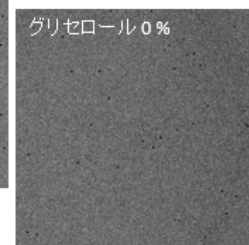
高倍率で任意の範囲における
グレースケールの平均値を測定



視野中のホールのうち、観察に
適した薄膜の数を平均化



グリセロールを5%添加すると、
グレースケールが89 - 98に変化。



サンプルに応じたグリッドの種類の使い分けの指針を作成した

Quantifoil R1.2/1.3

- ・溶液の性質が分からない場合
- ・サンプル濃度が薄い場合
- ・多くのデータセットを取得したい場合
- ・溶液の粘性が高い場合

C-flat (2.0/1.0)

- ・最良のデータセットを1つ欲しい時
- ・サンプル濃度がある程度濃い場合
- ・溶液の表面張力が強い
- ・粘性が低い場合

一般的な水溶性タンパク質溶液の場合、組成やタンパク質濃度が変わっても、
グリッド作成に大きな問題は生じなくなった

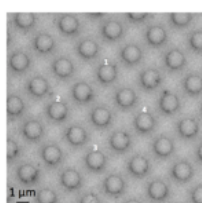
緩衝溶液中に含まれる界面活性剤の影響についての調査

- 実施前の認識
- ・界面活性剤の濃度を下げる、もしくは種類を変更すること
 - ・アライメント用の金コロイドの濃度を上げること

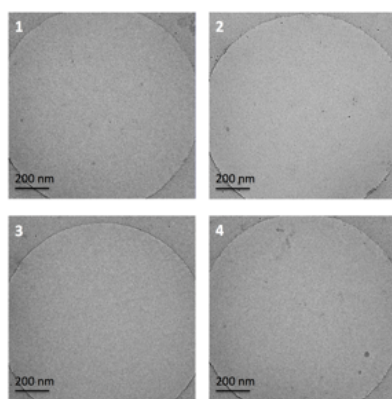
界面活性剤の種類や濃度と金コロイドの個数に関して、相関を調べた

検討した界面活性剤の種類

- A) CHAPS
- B) *n*-Decyl- β -D-maltoside
- C) *n*-Octyl- β -D-glucoside
- D) Sodium cholate
- E) MEGA-8

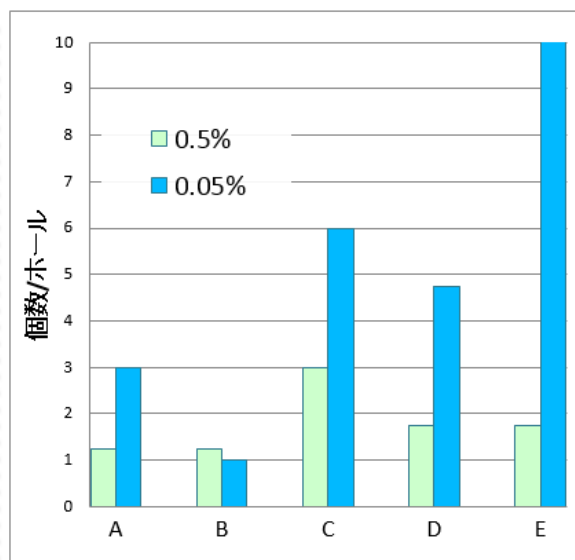


1700倍



37000倍

ホールあたりの平均粒子数をカウントした



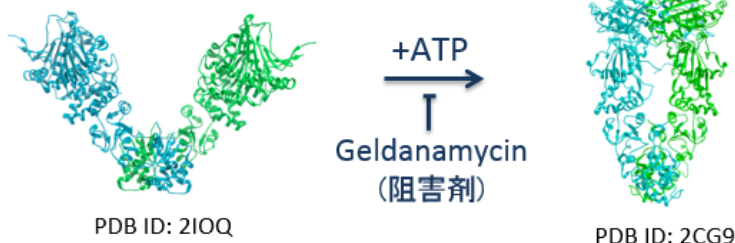
A・C・Dは界面活性剤を10倍希釈することにより、
残存金コロイド数が2倍以上になった。Bは濃度
依存性が低く、Eは0.05%含有していても0%の
ときとほぼ変わらない印象。

2-3 低分子ドラッグと標的タンパク質の複合体の構造解析手法の確立：

テスト用サンプルの選出

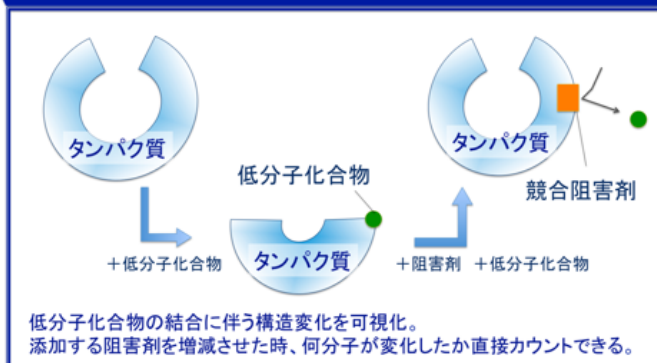
HSP90 (Heat Shock Protein 90)

特定の蛋白質の成熟過程において、シャペロンとして機能する蛋白質。
モノマーの分子量は90 kDaで、二量体として存在する。

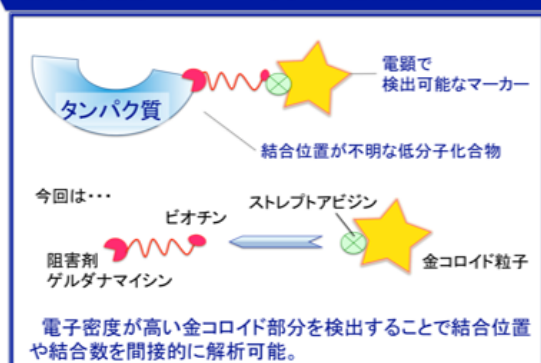


検討手法

低分子薬剤の結合による蛋白質の構造変化を捉える

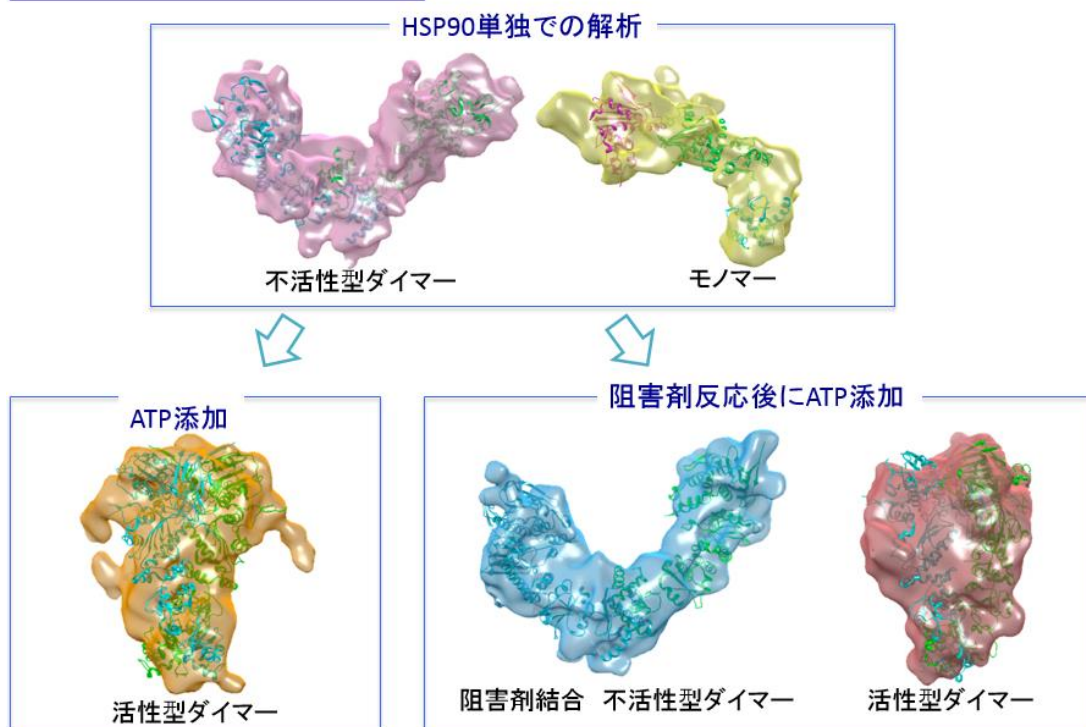


低分子薬剤とタンパク質の結合位置を解析する



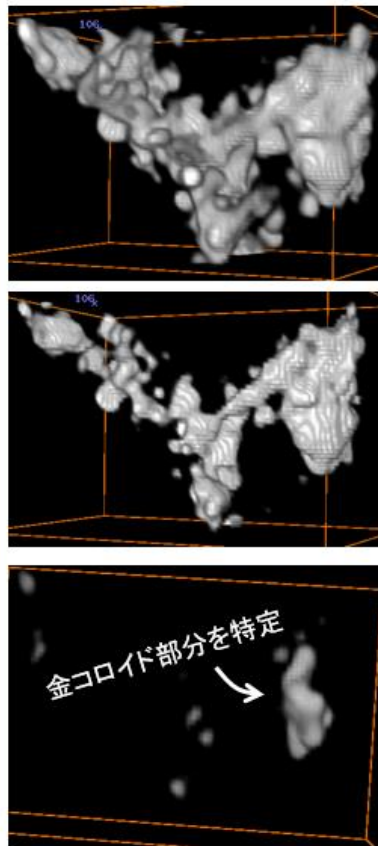
トモグラフィー法による解析結果

低分子化合物結合による構造変化

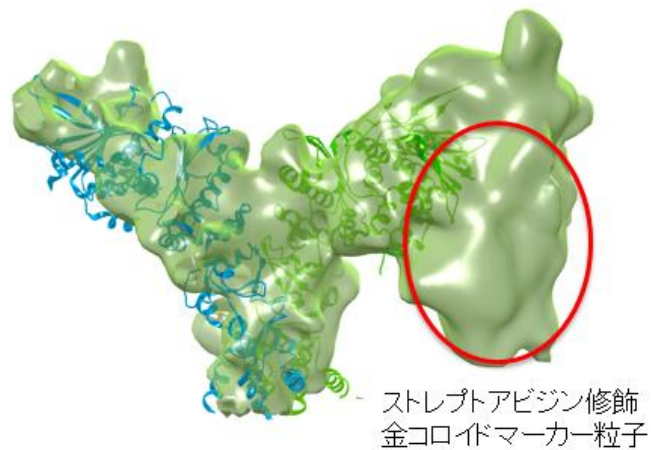


トモグラフィー法による解析結果

表示レベルの変更



低分子化合物の結合場所の特定



製薬企業A社からサンプルの提供を受け、
HSP 90同様、3段階の解析を実施

蛋白質Xの単体

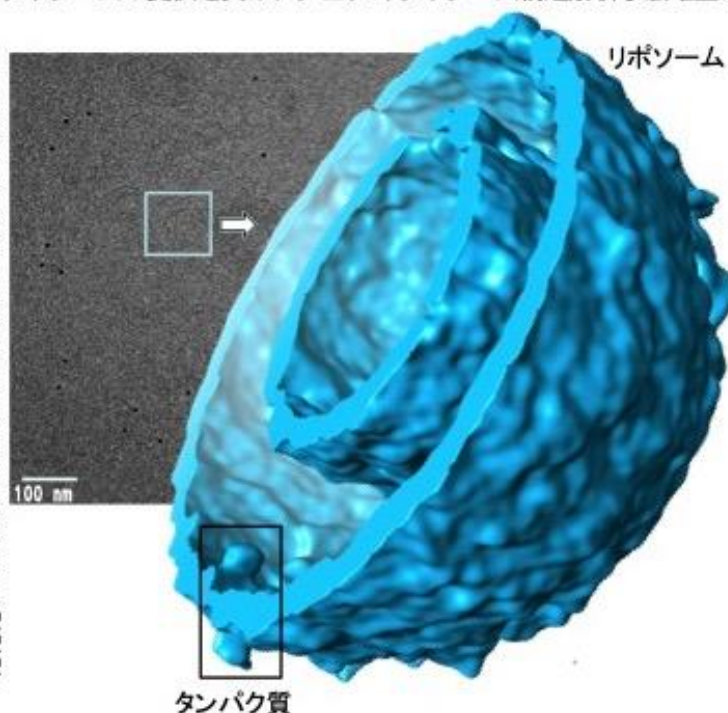
蛋白質X+低分子化合物Y

蛋白質X+低分子化合物Yにbiotin修飾したもの
+ストレプトアビジン結合金コロイド

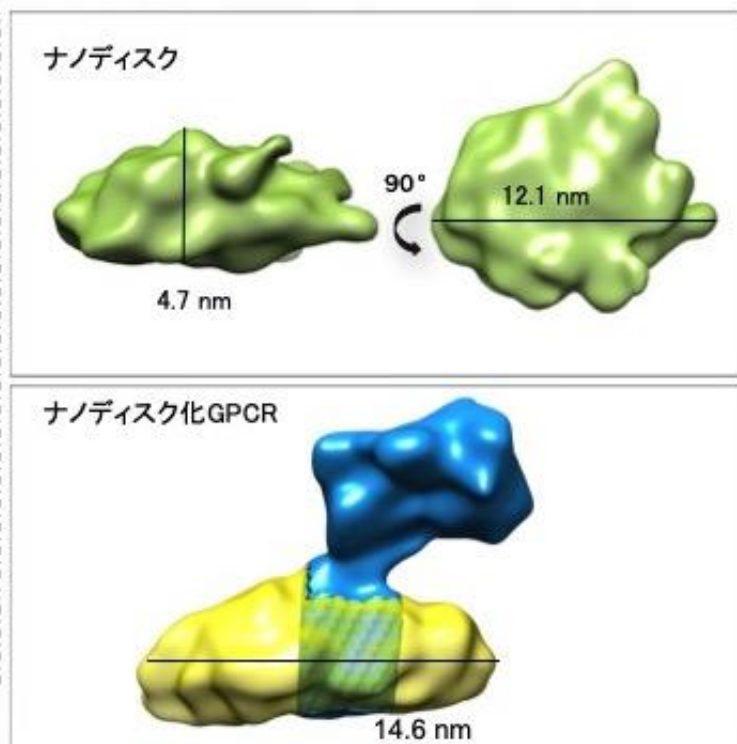
事業化および実証まで実施することができた

2-4 膜タンパク質 (GPCR 等) の構造解析手法の確立：

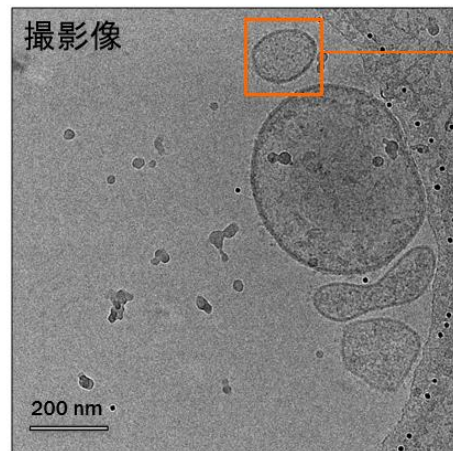
医薬品の多くがGタンパク質共役受容体(GPCR)を標的とする。その構造解析技術の発達には医薬産業の創業に多大な貢献をしよう。セルフリースサイエンス社からGPCRプロテオリポソームの提供を受け、プロテオリポソーム構造解析手法確立に取り組んだ。



医薬品の多くがGタンパク質共役受容体(GPCR)を標的とする。その構造解析技術の発達には医薬産業の創業に多大な貢献をしよう。セルフリースサイエンス社からナノディスクに埋め込んだGPCRサンプルの提供を受け構造解析を行った。

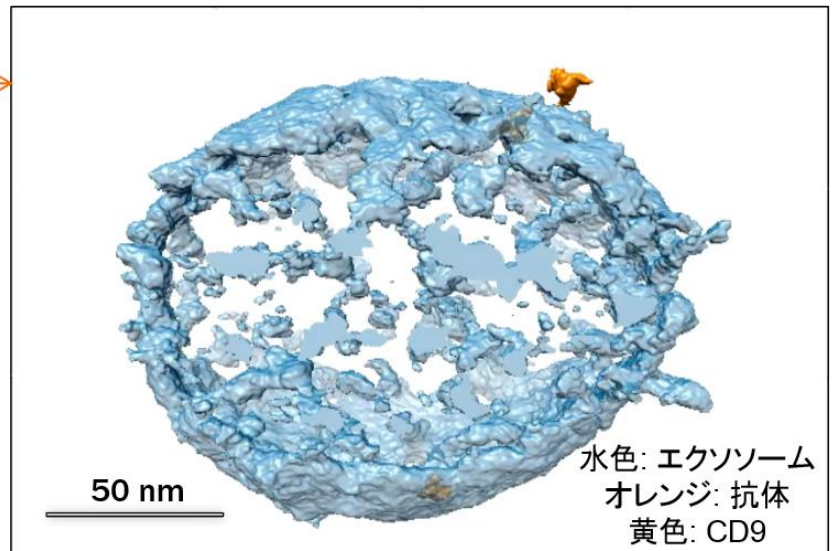


エクソソーム



東京医科大学医学総合研究所
分子細胞治療研究部門
落谷孝広教授、吉岡祐亮講師との共同研究

エクソソーム + 抗体 + CD9 複合体の構造



まとめ

- ・ プロテオリポソームの3次元構築に成功した。大きいサイズのリポソームが混入すると、グリッドの膜厚が厚くなり分解能が得られないことが分かった。
[$R = D \pi N$ R:分解能、D:厚さ、N:撮影枚数]

→ 均一なサイズ、かつ小さい 100 μm 以下のリポソームを用いて薄いグリッドを作成することで、分解能が向上し、リポソームとタンパク質部分の詳細な構造解析結果が可能になることが考えられた。

- ・ ナノディスク化 GPCR を用いた解析も進め、Titan Krios にてデータを取得して解析を行った。ナノディスクとナノディスクに埋め込まれた GPCR が観察された。
- ・ エクソソームなどの巨大な構造体の構造解析にもトモグラフィー法が有効であることが分かった。

2-5 市場調査

研究サブテーマとは別に市場調査を継続した。多くの技術情報とともにユーザニーズを効率的に入手でき非常に有益であった。参加した主たる展示会・商談会は、第 17 回日本蛋白質科学会年会に参加(ポスターセッション、展示、ランチョンセミナー主催)、Bio International (Boston) 展示会・商談会に JETRO ブースで出展、BioJapan 出展(沖縄ブースと OIST ブースでポスター展示)、関西バイオビジネスマッチングなどであった。

また、競合関係となるプロジェクトや企業も登場した。本分野の動きは激しいといえる。

AMED Binds

クライオ電子顕微鏡の有効利用を目指して活発な動きを展開している。

企業へのサービス提供も視野にいれている。

株式会社 CeSPIA(名古屋大学藤吉教授のベンチャー、2017.4 月設立)

日本電子(JEOL)の出資で単粒子解析サービスを開始。大学研究者も兼務している。

単価は概算で入手するも詳細は不明。記事情報では順調に共同研究を進めていると。

海外

クライオ電子顕微鏡を保有する大学や研究所が、アカデミアでの外部利用を開始した。

民間企業へのサービスは HP 情報からは 2, 3社が行っている。

最終章 全体総括

クライオ電子顕微鏡を用いたトモグラフィー手法による分子構造解析サイクルの生産性向上とケーススタディを増やすことを本研究の目的として、3年間にわたり、各種の実験、解析サイクルの繰り返しを行い、当初の目的を達成したと考える。

一方、クライオ電子顕微鏡を取り巻くアカデミア、ビジネス界の状況は急速に変化し、顕微鏡設備の進歩、クライオ電子顕微鏡の撮影サービスのしくみ確立 (AMED の BINDS プロジェクト)、商用サービスの登場など、弊社のビジネス環境も変化し、まだ変化が続いている。

また、解析プロセスの繰り返しにより習得した、サンプル調製、クライオ電子顕微鏡の操作ノウハウ、解析ソフト COMET、COMET2D の詳細部分の理解など、各プロセスの知見は、ドキュメント化できない部分も含め、全体の解析プロセス効率化には大いに有効である。本研究期間を通じて、研究に従事したすべての研究員のスキルは大いに向上したといえる。

1. 2次元構造解析ソフト (COMET2D) の開発:

COMET2D は開発が完了しており、簡便に二次元画像のコントラスト比が改善できるが、その効果はサンプル調製に依存する事が分かっており、選択的な適用が必要である。COMET2D が有効となる新しい分野を探してゆく必要がある。

2. 薄膜のサンプル調製手法の開発:

サンプル調製手法は定量的な評価方法が確立できたので、単粒子解析法などクライオ電子顕微鏡による他の解析手法においても応用可能である。

サンプル調製方法は現在のクライオ電子顕微鏡プロセスで大きな課題となっており、多くの研究グループで様々な新しい試みも行われている。これら最新技術の調査は今後も続けることが必要である。

3. 低分子ドラッグと標的タンパク質の複合体の構造解析手法の確立:

この研究成果は既に大きな効果がでている。ケーススタディとして顧客に提示でき、同様の事例の受注にもつながった。低分子を扱う製薬企業はまだ多く、同様のニーズはある。本事例は弊社の標準サービスメニューとなっている。

4. 膜タンパク質 (GPCR等) の構造解析手法の確立:

技術的に難しいテーマであったが、副次的な効果として、リポソーム、ナノディスク、エクソソームという巨大な構造体がトモグラフィーで解析できる事を示すケーススタディが得られた。この成果は顧客の範囲を単にバイオ創薬企業だけではなく試薬メーカー・化粧品メーカーなどにも拡大できると期待できる。

本研究を完了しての課題

・サブテーマの継続

各サブテーマはさらに実際の解析業務を通じてプロセスの効率改善が続けられる。

・単粒子解析法 (SPA)

国内では2年前からクライオ電子顕微鏡の注目度が高くなっており、本プロジェクト開始時とは市場環境が大きく変化した。解析手法として単粒子解析法が注目され、技術的には主に大学・研究機関の研究者がリードしている状況がある。国内のSPA商用サービス提供はCeSPIA社のみである。

・サービスメニューの拡充

我々はサービスメニューを拡大するためにCOMET2Dを計画したが、現在では単粒子解析サービス、クライオ電顕撮影等もサービスメニュー化すべきと考える。単粒子解析サービスを始めるための設備投資は、現在の弊社保有設備からすると、解析用コンピュータのみで済む状況である。

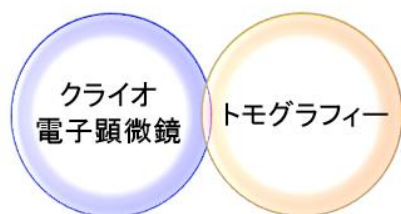
・トモグラフィー法とSPA

これまでの調査では、単粒子解析法はトモグラフィー法に比べて、撮影時間で数倍、処理時間で20倍以上必要であるため、トモグラフィー法は簡便な手法であるといえる。

本研究ではトモグラフィー法の確立が目的だったが、SPAもカバーできればクライオ電顕の技術をほぼカバーでき、顧客ニーズに応じた提案が可能であり、両手法の解析結果の比較なども提案できる。ただし、SPAは高価格になると考えられ、ビジネスとして成立するかはまだ不明であり、検討を続けることが必要である。

タンパク質分子構造解析サービス

現在



今後

