

---

# プロジェクト研究成果報告会

## プログラム・要旨集

---

2021年2月19日（金）

オンライン開催

[https://www.jbic.or.jp/news\\_event/2020/report-meeting](https://www.jbic.or.jp/news_event/2020/report-meeting)

<主 催>

一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム

次世代天然物化学技術研究組合

## 【プログラム】

13:30～13:35 **開会挨拶 (5分)**

一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 会長 赤羽 浩一

13:35～14:05 プロジェクト成果発表 (1)

福島医薬品関連産業支援拠点化事業に係る研究開発業務

**福島医薬品関連産業支援拠点化事業の進捗と今後 (30分)**

福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター 高木 基樹

14:05～15:10 プロジェクト成果発表 (2)

患者層別化マーカー探索技術の開発／免疫応答モニタリングによるがん免疫の全容理解に基づく新規層別化マーカーの開発

**研究代表者挨拶 (5分)**

愛知医科大学医学部 腫瘍免疫寄付講座 上田 龍三

**末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞クラスターによる免疫チェックポイント阻害薬効果予測 (20分)**

埼玉医科大学 国際医療センター 各務 博

**ロングリードシーケンサーを用いたがん組織の HLA クラス I 変異解析 (20分)**

国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野 河津 正人

**統合データサイエンスサイト「がん免疫ビブリオテカ」の構築 (20分)**

産業技術総合研究所 人工知能研究センター 堀本 勝久

15:10～15:40 プロジェクト成果発表 (3)

革新的中分子創薬技術の開発／中分子製造技術の開発

**「中分子製造技術の開発」の成果 (30分)**

産業技術総合研究所 生命工学領域 細胞分子工学研究部門 新家 一男

15 : 40～16 : 40 プロジェクト成果発表 (4)

革新的中分子創薬技術の開発／中分子シミュレーション技術の開発

**「NMRによる動的立体構造情報に基づく中分子シミュレーション技術の開発」の成果 (20分)**

理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム 嶋田 一夫

**「インシリコ技術による構造的実証に基づく中分子シミュレーション技術の開発」の成果 (20分)**

産業技術総合研究所 生命工学領域 細胞分子工学研究部門 動的創薬モダリティ研究グループ

福西 快文

**「クライオ電子顕微鏡法による中分子シミュレーション技術の開発」の成果 (20分)**

東京医科歯科大学 高等研究院 卓越研究部門 藤吉 好則

## 【目次】

1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業に係る研究開発業務.....	1
1-1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業の進捗と今後	
2. 患者層別化マーカー探索技術の開発／免疫応答モニタリングによるがん免疫の全容理解に基づく新規層別化マーカーの開発.....	2
2-1. 末梢血 CD4 <sup>+</sup> T細胞クラスターによる免疫チェックポイント阻害薬効果予測	
2-2. ロングリードシーケンサーを用いたがん組織のHLAクラスⅠ変異解析	
2-3. 統合データサイエンスサイト「がん免疫ビブリオテカ」の構築	
3. 革新的中分子創薬技術の開発／中分子製造技術の開発.....	5
3-1. 「中分子製造技術の開発」の成果	
4. 革新的中分子創薬技術の開発／中分子シミュレーション技術の開発.....	6
4-1. 「NMRによる動的立体情報に基づく中分子シミュレーション技術の開発」の成果	
4-2. 「インシリコ技術による構造的実証に基づく中分子シミュレーション技術の開発」の成果	
4-3. 「クライオ電子顕微鏡法による中分子シミュレーション技術の開発」の成果	

## 1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業に係る研究開発業務

### 1-1. 福島医薬品関連産業支援拠点化事業の進捗と今後

福島県立医科大学 医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター 高木 基樹

福島医薬品関連産業支援拠点化事業は東日本大震災からの福島復興事業の一環として、経済産業省の平成23年度第三次補正予算を原資とする福島県の復興基金を基に、県からの補助金による福島県立医科大学の事業として平成24年度から令和2年度までの予定で実施されているプロジェクトであり、JBICへは研究開発業務および成果活用・創薬等支援に関する業務の一部を委託している。本事業は平成19-23年度に実施されたNEDO「遺伝子発現解析技術を活用した個別がん医療の実現と抗がん剤開発の加速」の後継プロジェクトであると共に、実質的には過去の複数の経済産業省バイオ関連国家プロジェクトの集大成事業にあたる。また、本事業は、それらのプロジェクトで蓄積した成果やノウハウ（技術）をもとに新たに取得した成果を活用し、製薬企業等における医薬品等の開発の支援、新規産業の創出、既存企業の誘致及びこれらに伴う雇用の創出等により福島復興に貢献することを目的としている。

本事業は、生体試料を収集・保存し、それらをそのまま研究機関等に提供する、いわゆる「バイオバンク事業」とは異なり、希少かつ微量な生体試料を、①「情報（遺伝子発現プロファイル、ゲノム解析情報、血中・体液中の抗体プロファイル、網羅的抗体（試薬・医薬・バイオシミラー等）評価情報、病理組織学的解析情報、薬効評価情報、臨床情報等）に変換する」②「加工（がん組織由来培養細胞（F-PDO<sup>®</sup>）、担がんマウスモデル（F-PDX<sup>®</sup>）、遺伝子強制発現細胞株等）して増やす」③「極微量試料の解析技術（DNAマイクロアレイシステム、タンパク質マイクロアレイシステム）を開発する」ことにより最大限に活用することを目指している。

われわれは本事業で創出または取得したこれらの生体由来加工試料、解析情報等の多種多様な成果物を「福島コレクション<sup>®</sup>」と命名し、製薬企業や検査・診断薬企業、研究機関等との間で、これらの福島コレクション<sup>®</sup>を活用した受託・共同研究や成果物の提供（MTA）が次々に進んでいる。

本事業で創出されたこれらの「福島コレクション<sup>®</sup>」の意義と有用性が理解され、国内はもとより世界中の製薬企業や研究機関等で広く活用されることが、日本の医薬品関連産業、ひいては健康医療産業を活性化し、国民の健康な暮らしと福島復興に貢献するものと信じ、この目標達成に向けて邁進している。

本発表では、本事業および福島コレクション<sup>®</sup>の概要を説明した上で、本事業の様々な成果の中から、本事業で開発した患者由来がんモデルである「がんオルガノイド（F-PDO<sup>®</sup>）」と「患者腫瘍移植マウスモデル（F-PDX<sup>®</sup>）」を用いた免疫応答による細胞傷害性を検出する *in vitro* アッセイ系の構築を中心に紹介する。

## 2. 患者層別化マーカー探索技術の開発／免疫応答モニタリングによるがん免疫の全容理解に基づく新規層別化マーカーの開発

### 2-1. 末梢血 CD4<sup>+</sup> T細胞クラスターによる免疫チェックポイント阻害薬効果予測

埼玉医科大学医学部 国際医療センター 各務 博

#### 目的

本研究の目的は、末梢血という軽微侵襲で経時的に解析可能な検体に由来する免疫担当細胞を解析することにより、がん細胞に対する免疫状態を数学的に記述し数理解理解し、適切な治療介入を可能とする患者層別マーカーを開発することにある。

#### 背景

抗腫瘍免疫現象には、エフェクターCD8 T細胞とエフェクターCD4 T細胞両者が必須である。

PD-1 阻害薬は主にエフェクターCD8 T細胞の数的、質的増強を誘導するが、CD4 T細胞に対する効果がほとんどみられない。したがって、その抗腫瘍効果は予め存在するCD4 T細胞免疫に依存する。また、抗CTLA-4 抗体によるCD4 T細胞数増加効果の必要性は、既存CD4 T細胞免疫評価から推定可能である。このようにCD4 T細胞免疫評価は、バイオマーカーとしての意義を有している。

我々は、末梢血 CD62L<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> T細胞の存在割合と免疫チェックポイント阻害薬治療後 PFS, OS が有意に相関することを見出している。

#### 成果

##### 1. unsupervised clustering から解明された抗腫瘍 CD4<sup>+</sup> T細胞クラスター

CyTOF™を用いて肺癌患者の治療前末梢血 CD4<sup>+</sup> T細胞の unsupervised clustering を行った。この結果、CD62L<sup>low</sup> subpopulation は、ケモカインレセプター発現パターンから主に4種、naïve 細胞、Treg を除いた CD62L<sup>high</sup> subpopulation は7種の T細胞クラスターにより構成されていた。抗PD-1 抗体治療後の PFS、OS と正の相関関係を有するのは、2つのクラスターのみであり、この2クラスターはバイオマーカー性能を有していた。

##### 2. 抗腫瘍 CD4<sup>+</sup> T細胞クラスターの single cell RNAseq 解析

末梢血 CD4<sup>+</sup> T細胞クラスターの遺伝子発現、clonotype 解析を行った。2つの抗腫瘍 CD62L<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T細胞クラスター遺伝子発現は近似していた。遺伝子発現クラスタリングの結果、Th17 とユークリッド距離が比較的近く、Th1 とは遠い関係にあることが示された。

また、clonotype 解析の結果、CD62L<sup>low</sup> subpopulation のみにサイズの大きなクローンが存在していること、CD62L<sup>low</sup> subpopulation 内4クラスターにおける clonotype overlap はほとんどないことが明らかとなった。

##### 3. 腫瘍微小環境内 T細胞との相関

生検肺癌組織検体を用いて、多重免疫組織化学解析を行った。がん胞巣近傍間質内 T細胞数と、抗腫瘍 CD62L<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T細胞クラスターに正の相関関係があることを見出した。

## 2-2. ロングリードシーケンサーを用いたがん組織のHLAクラスⅠ変異解析

国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野 河津 正人

がん細胞はHLAクラスⅠ分子の発現を低下させて腫瘍免疫から逃避することが30年ほど前から知られてきたが、HLAクラスⅠ分子発現低下の頻度、機能的意義、発現低下の原因などについては不明な点も多く残されている。免疫チェックポイント阻害剤が、悪性黒色腫、腎がん、大腸がん等様々ながん種で臨床効果を示し、予後の改善をもたらしているが、効果が得られない症例も多く、その一部ではHLAクラスⅠ分子発現低下による免疫回避が関与している。「がん局所免疫評価による腫瘍微小環境解析に基づくがん免疫応答調節機構の解明」の一環として、様々ながん種においてHLAクラスⅠ分子の遺伝子変異解析を行なったので、大腸がんを中心に解析結果を報告する。

大腸がんの約5%を占めるマイクロサテライト高度不安定性(MSI-H)がんでは、DNAミスマッチ修復機能異常により遺伝子変異が高度に蓄積する。変異ペプチド(ネオ抗原)が非自己として認識されるため、30-40%の症例で免疫チェックポイント阻害剤が奏功する。本邦においても2018年12月MSI-H固形がんを対象に臓器横断的に抗PD-1抗体ペンブロリズマブが承認された。MSI-H大腸がんの腫瘍免疫の状態を詳細に理解するために、ロングリードシーケンサーを用いて、112症例のMSI-H大腸がんのHLAクラスⅠの変異解析を行なった。全エクソンシーケンスの変異情報と、HLAのタイピング情報からネオ抗原の予測を行い、各症例の予測されるネオ抗原の数およびHLAとの親和性を算出した。また免疫組織染色による腫瘍組織に浸潤するCD8リンパ球数の測定を行なった。

HLA変異解析の結果、112症例中57症例に、80のフレームシフト変異、15のノンセンス変異、6例のスプライス変異が検出された。また32症例に、42のアミノ酸置換が検出された。53症例においては、複数のHLAクラスⅠ変異が検出された。これらの頻度は、ショートリードシーケンサーを用いた既報よりも頻度が高く、ロングリードシーケンサーを用いた解析により、高精度の変異解析が可能となったと考えられる。HLAアレルタイプ別の解析においては、HLAのタイプによって変異頻度が異なっており、ネオ抗原と高い親和性で結合するHLAタイプにおいて、変異頻度が高い傾向がみられ、HLA変異に関して免疫編集が生じていることが示唆された。

その他に、胃がん、肺がん、腎がん、MSI-H以外の大腸がん、免疫チェックポイント阻害剤使用症例などについても、HLAクラスⅠ変異やその他の腫瘍免疫反応に影響を与えるゲノム異常についての解析を行なったので、その結果を報告する。

## 2-3. 統合データサイエンスサイト「がん免疫ビブリオテカ」の構築

産業技術総合研究所 人工知能研究センター 堀本 勝久

本プロジェクトにおける産総研の役割は、

- 1 本プロジェクトで得られた臨床及び分子データの解析によるマーカー探索の支援
- 2 上記データ及び関連データの収納とその解析ツールを搭載した「がん免疫ビブリオテカ」の構築と公開
- 3 機器開発及び機器市販のための支援

である。1でのがん免疫関連データの探索支援の知見を生かして、また、3でのがん免疫関連データ計測のための新規機器開発の支援のために、2において、データの体系的な収納及び解析とその解釈のためのAIツールを装備したデータウェアハウス「がん免疫ビブリオテカ」を開発している。データベース構築は産総研分子細胞の福井、データ解析支援・ツール開発は産総研人工知能センターの堀本、AIツール開発は、文献情報に基づくツールを産総研人工知能センターの辻井、画像情報に基づくツールを東京大学生産研の佐藤がそれぞれ担当し、相互に連携して構築を進めている。

データベース構築に関しては、埼玉医科大学及び他の連携研究機関により計測されたデータを専用回線により産総研に集め、さらに外部の情報を取り込んだ上で体系的な収納を行っている。プロジェクト開始2年度である現在では収納データ数はまだ少ないが、基本的な収納フォーマットに準拠した臨床情報と分子・細胞計測データ（フローサイトメータ解析、CyTOF解析、レパトア解析、シングルセル解析、DNAマイクロアレイ、プロテオームDNAメチル化）の異なる階層のデータの統合的な収納が着実に進んでいる。

データ解析ツール開発については、1における探索研究に即して且つ他との差別化に必要なツールの選別を進めている。がん免疫研究に必要とされる既存の数理解析手法を選定した上で、特にシングルセル解析による免疫細胞性状の可視化、ネットワーク解析による細胞間の関連解析、マーカーに基づく動的免疫状態予測モデル等の解析ツールを搭載候補とした。AIツールに関しては、基本的な解析の枠組み構築が終了し、学習データの拡充による精度向上を図る段階になった。さらに、ツール作成の専門家とがん免疫の専門家との連携を図るためにウェブサイト構築し、継続的にがん免疫の専門家の知識を十分に反映したツールの作成を可能にした。

機器開発については、キヤノングループが開発するリン酸化自動計測機器の開発支援を行っている。産総研が網羅的リン酸化解析の有用性を示す論文の公表等で認知度の向上に努めると共に、キヤノングループは、個々機能要素の精度検証の後、本年度に機能要素のモジュール開発を進め、当初計画通り来年度末にプロト機を完成する見込みである。



### 3. 革新的中分子創薬技術の開発／中分子製造技術の開発

#### 3-1. 「中分子製造技術の開発」の成果

産業技術総合研究所 生命工学領域 細胞分子工学研究部門 新家 一男

##### 1. 天然化合物の母核改変技術の開発

中分子天然化合物は、現在考えられる最も理想的な中分子化合物ライブラリー構築のリソースであるが、有機合成による全合成は不可能ではないものの極めて困難な場合が多々あり、さらに誘導体展開に関しては出発物質から全合成し直す必要があるため現実的には不可能であった。そこで生合成遺伝子改変により母核を改変し、誘導体展開を行うことが長きに亘り考えられてきた。しかしながら、中分子天然化合物の代表であり臨床薬として多く利用されているマクロライド系化合物や環状ペプチド系化合物に関しては、それらの生合成遺伝子が 100 kb を超えるような巨大な遺伝子クラスターからなること、また極めて高い相同性と繰り返し配列から構成されているため、相同組換えや制限酵素を用いるような既存の遺伝子操作技術では、合目的な遺伝子改変が不可能であった。またこれらの中分子天然化合物は、対象とする化合物の生産菌でしか生産させることが出来なかったため、目的生合成遺伝子以外にも多数の生合成遺伝子が存在する中で、正確な遺伝子操作はさらに高いハードルであった。

我々はこれまでの技術開発で、中分子天然化合物の 100 kb を超える生合成遺伝子および配列情報を多数取得しており、これらの遺伝子を利用した異種発現技術を確立している。本技術と精密な遺伝子改変技術とを融合することで、これまでにない革新的な中分子天然化合物の生合成遺伝子改変技術（モジュール編集技術）を開発し、合目的に中分子天然化合物の母核改変を行える技術開発を行っている。

##### 2. 微生物酵素を用いた中分子変換技術の開発

一方で、メバロチンやイベルメクチンの臨床開発例に見られるように、たった一つの水酸基あるいは二重結合の還元のみで劇的に薬効や代謝等が改善されることがある。有機合成では、足場の無い位置からの合成展開、あるいは位置特異的な反応は困難である。そこで、有機合成では不可能な反応を触媒し、かつマクロライド系化合物のような大きな分子量を持つ化合物の修飾が可能な酵素ライブラリーを構築し、実際に化合物修飾を行うと共に、足場を利用した有機合成による誘導体展開を行う技術開発を行っている。これまでの修飾酵素は工業原料のような低分子化合物を修飾するものが大半であったが、我々は幾つかの中分子天然化合物の修飾が可能な酵素を見出しており、それらの酵素－化合物のドッキング情報等を用いて、酵素の特異性改変などのシミュレーション技術開発も行っている。

今回の発表では、研究プロジェクトの概要および最近の成果について紹介する。中分子天然化合物を狙ったとおりに母核改変できる技術の確立（特許出願中）とその実例について紹介する。また、放線菌の P450 などの修飾酵素を用いた中分子化合物の変換事例とその応用の可能性について紹介する。

## 4. 革新的中分子創薬技術の開発／中分子シミュレーション技術の開発

### 4-1. 「NMRによる動的立体情報に基づく中分子シミュレーション技術の開発」の成果

理化学研究所 生命機能科学研究センター 生体分子動的構造研究チーム 嶋田 一夫

中分子創薬は次世代創薬において有効な創薬戦略の一つである。中分子創薬を実現するためには、中分子を膜透過させる戦略の確立や、中分子が得意とする細胞内作用点であるタンパク質・タンパク質相互作用 (PPI) の効率的な創薬標的化が必要となる。

一般に、分子量 500 を超える中分子化合物の膜透過予測は、中分子の LogP (脂溶性) など、膜透過に関する物性値でさえ正しく予測できていないため困難である。この主な原因は、中分子の構造的自由度が大きく、網羅的かつ定量的にその動的立体構造を再現できないことにある。また、細胞内タンパク質の多くは、複数のタンパク質と PPI をもつハブタンパク質として重要な生理機能を発揮する。1 種のタンパク質が複数のタンパク質と相互作用する機構は、結合部位が動的多形構造をとることで説明されている。

そこで、本課題では、1. 中分子化合物の取りうる構造多形、ならびに多形間の交換速度や存在割合を評価する手法を確立し、中分子化合物の膜透過シミュレーションに資すること、2. 細胞内タンパク質の PPI 界面の構造多形の検出、制御、安定化する技術を確立すること、を目標とする。

本年度の成果に関しては、その一部を、下記のように AMED 成果情報として公表している。

1. 環状ペプチドは立体構造を変えて細胞に入る—中分子ペプチド医薬のデザイン・発展に貢献する新発見— (Takeuchi K., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* (2021))
2. 隠れた薬剤結合部位を発見し、安定化する技術の確立に成功—PPI 阻害剤の効率的な創出により創薬の可能性を拡大— (Mizukoshi Y., et al., *Sci Adv.* (2020))
3. K<sup>+</sup>チャネルの病理性変異による機能変調機構を解明—溶液 NMR 法を活用した動的構造の解析により明らかに— (Iwahashi Y., et al., *Nat Commun.* (2020))
4. 発がん性タンパク質 RAS の活性を制御する新たな仕組みを発見—RAS の活性型割合が細胞内環境下で低下していることを in-cell NMR 法により観測— (Zhao Q. et al., *Cell Rep.* (2020))

本発表ではこれらの成果に関して概説する。

## 4-2. 「インシリコ技術による構造的実証に基づく中分子シミュレーション技術の開発」の成果

産業技術総合研究所 生命工学領域 細胞分子工学研究部門 動的創薬モダリティ研究グループ  
福西 快文

「革新的中分子創薬のための技術開発」の中分子用シミュレーション技術の開発として、1)膜透過を有する構造的特徴を予測する、実証に基づくシミュレーション技術の開発、2)実証に基づくPPIなどの細胞内創薬作用点に対する中分子の探索および構造最適化技術の開発を、下記5項目に分類し実施した。

### 1) 天然物・中分子を含む化合物データベース(DB)の構築

ナミキ商事とキシダ化学より合計 1000 万種以上の市販化合物の供給を受け、ドッキング・MD 計算に即使える化合物 DB を開発した。分子量 1000 Da~2000 Da の大きな天然物も計算処理できた。データは両社から配給されているが、阪大・川端猛准教授からソフトの譲渡を受け、LigandBox (<http://www.mypresto5.com/>)として公開し、また産総研・福井一彦総括研究主幹の協力を得て、多様なデータを統合する大規模なAI学習へ用いるためにInChI キーを付与、ゲノムや副作用等のデータとの紐づけを可能としNBDC より生命科学系データベースアーカイブからダウンロードできる。将来、疾患ゲノム解析などと連結して用いられることを期待している。

### 2) 膜透過性などの物性値を予測する機械学習(AI等)を含むシミュレーション技術の開発

環状ペプチドの配座探索も定量的に行えるMD計算(cNH法:(*J. Math. Phys.*, (2019); *J. Phys. A: Math. Theor.*, (2020))を開発し、NMR チームのデータと照合することで膜透過機構を解明し、この機構に対応する膜透過速度の計算理論を開発した。多数の配座を迅速に生成する手法と、理論式が実験データを再現するようにAI技術を用いてパラメータを決定した(*Mol. Inf.*, (2020))。AIでの代表的な課題は、回帰式のパラメータが多くなりすぎる過学習と、学習に使ったデータと応用でのデータの品質の差に起因する Under specification である。我々は、NMR実験で予測式の形が解明されたため、パラメータの数を自動的に最小化する機構を開発し、分子構造はユーザーが学習・予測とも同じ品質の構造データを得られるようにした。これらにより、膜透過に適した分子の特徴を複数個、見出すことができた。

### 3) 輸送タンパク質や膜接合タンパク質と薬物の分子の相互作用をシミュレーションする手法の開発

NMR チームが膜蛋白質の機能が膜組成に応じて機能が変化することを見出したため、任意の膜組成の系を自動生成する手法を開発した。また電顕チームが解明した膜蛋白質エンドセリン受容体とエンドセリンや市販中分子薬の複合体構造に対して、AIを利用して効率的に構造探索する分子動力学シミュレーション(MD)計算を開発・適用(GA-based mD-VcMD 等: *Biophysics and Physicobiology* (2021), *J. Chem. Inf. Model.*, (2020), *PEDS* (2019))、アポ体構造から天然・人工中分子の複合体予測に成功した。

### 4) 薬物が結合可能なタンパク質構造を効率的に探索する手法の開発 および

### 5) タンパク質の動的構造変化を考慮した薬物結合部位の推定・薬物分子設計シミュレーション技術の開発

蛋白質—蛋白質間相互作用(PPI)での代表的な創薬標的部位は、通常は隠れているが必要に応じて露出する薬物結合部位(クリプトサイト)である。我々は、アポ体蛋白質の MD 計算からアミノ酸側鎖の運動状態を解析し、蛋白質表面の芳香族性残基のうち、蛋白質に埋没状態・露出状態の自由エネルギー差が約 1kcal/mol になるアミノ酸残基が、クリプトサイトになることを見出し、各残基について「クリプトサイトらしさ(Cryptic-site index: *J. Phys. Chem. B* (2020))」を考案した。この指標では、64%のサイトが正しく予測できた。

PPI で中心的役割を果たすハブ蛋白質は複数の蛋白質を認識・結合する。クリプトサイトをもつハブ蛋白質 Bcl-xL には、複数のクリプトサイトの開き方や既存薬物の結合サイトがある。そこで複数の拡張アンサンブル法を改良し(MDドッキング)、アポ体の Bcl-xL に対して、2種類の異なる中分子を蛋白質から遠く離れた場所に置いてシミュレーション計算したところ、2つの薬剤が、自らそれぞれ正しい部位にクリプトサイトを開き、正しい Bcl-xL 薬物分子複合体を形成した。また、その結合自由エネルギーも実測と合致した(*Sci. Rep.* (2021))。

当日、まとめて以上の成果を発表する。

#### 4-3. 「クライオ電子顕微鏡法による中分子シミュレーション技術の開発」の成果

東京医科歯科大学 高等研究院 卓越研究部門 藤吉 好則

「革新的中分子創薬のための技術開発」を目指す研究開発項目として、クライオ電子顕微鏡による中分子シミュレーション技術の開発を実施している。1) 膜透過を有する構造的特徴を予測する、実証に基づくシミュレーション技術の開発、2) 実証に基づく PPI などの細胞内創薬作用点に対する中分子の探索および構造最適化技術の開発、という 2 つの技術開発を実施したので、これらの成果を報告する。

1) の課題において、パラセラーとトランスセラーの輸送機構を理解し、その制御を行う技術開発を目指している。脳にはクロードインの 1, 5, 12 が発現しているとされており、脳内へのドラッグデリバリーシステム (DDS) 開発を行うには、クロードインの構造情報が必要である。血液脳関門で重要なクロードイン - 5 と 70% のホモロジーを有するクロードイン - 3 と G-CPE との複合体の構造を解析した結果、3 番目のヘリックス上の 134 番のアミノ酸は 27 種類のクロードインの全てにおいて P, G, A の 3 種類のみのものであり、これらのアミノ酸で制御される 3 番目のヘリックスの曲りがタイト結合の性質に大きく影響を与えることを見出した (*Nature Comms.* 10, 816 (2019))。このタイト結合を崩壊させる技術に加えて、形成を促進する中分子を探索して、発見することができた。これを用いると、タイト結合の崩壊制御と共に結合形成促進という両方向の制御が可能となり、潰瘍性大腸炎などの修復も可能である。次に、トランスセラーチャネルとして、ギャップ結合チャネルの研究を進めた。ギャップ結合チャネルは、発生制御、炎症、細胞死、免疫嘔吐、筋収縮などの重要な生理機能に関わっており、重要な創薬標的でもある。3 種類の状態でイネキシン - 6 の構造解析に成功した結果、脂質分子が関わる gating モデルを提案した (*Sci. Adv.* eaax3157 (2020))。さらに、ヒト由来の Pannexin の構造も複数の状態で解析し、脂質分子が関わる gating モデルを支持する結果を得た。

2) の課題において、胃内腔側を pH1 にできるほどのプロトン濃度勾配に抗してポンピングできる H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase と胃薬との複合体の構造を解析し、胃薬 vonoprazan はクリプトサイトへ結合と、100 万倍の H<sup>+</sup> の濃度勾配に逆らってポンピングできる驚異のプロトンポンプの機能を立体構造から詳細に理解できるようになった (*Nature*, 556, 214-218 (2018), *eLIFE*, 8 47701 (2019)) が、さらに研究を進めて、フリッパーゼである ATP11C のほとんどすべての中間体の構造を解析した (*JBC*, 295, 10180-94 (2020), *Cell Reports*, 32, 108208 (2020))。イオンチャネルは重要な創薬標的であるが、構造と機能を研究する対象として重要なバクテリア由来の電位感受性 Ca<sup>2+</sup>チャネルは発見されていなかった。それで、電位感受性 Ca<sup>2+</sup>チャネルを探索することによって、発見することが出来た (*eLIFE*, 9 52828 (2020))。革新的中分子創薬をさらに高効率で進めるために、高分解能の構造解析に適したクライオ電子顕微鏡として、第 8 世代のクライオ電子顕微鏡を開発し、高速のネットワークを活用した遠隔操作システムを完成させた。実際に、遠方 (日本電子株式会社) に設置されたクライオ電子顕微鏡を東京医科歯科大学から遠隔操作する実証実験を行い、この遠隔操作システムが有効であることを証明した。これら、ハードウェアの開発と合わせて、クライオ電子顕微鏡のための各種試料作製技術開発も進めた。実際に、味の素株式会社と株式会社 GeSPIA との共同研究で、LDH の 2 つの構造を単粒子解析法で解析して、論文を発表している (*JSB*, 205, 11-21 (2019)) が、氷包埋法では、粒子が気液界面で部分的に変形する問題があった。この問題を解決する新しい方法を開発し、特許申請と論文投稿を行った。さらに、実証に基づく PPI を中分子で制御する技術開発の応用例として、社会に役立つ可能性のある創薬例を示しつつある。以上をまとめて、革新的中分子創薬技術の開発の成果を報告する。