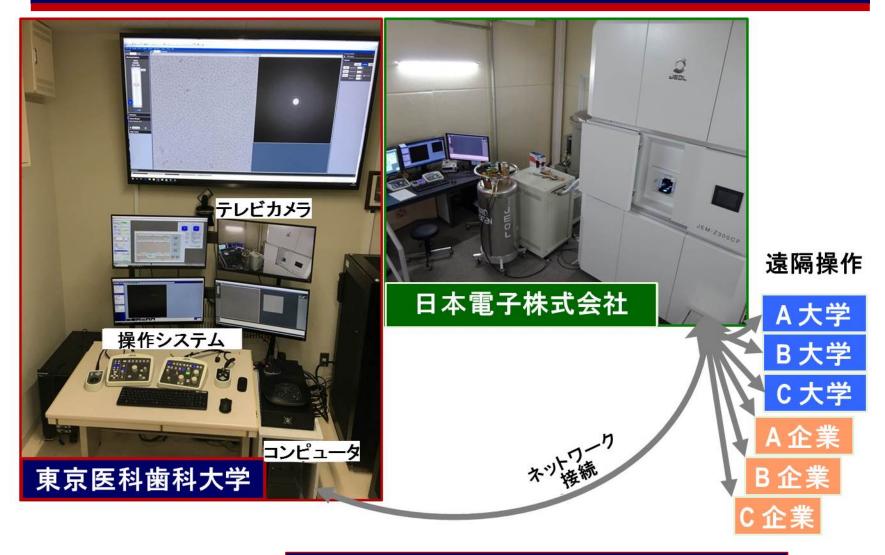
クライオ電顕法の目覚ましい発展と創薬への可能性



グラクソ・ウエルカム社とスミスクライン・ビーチャム社の 合併時にEvidence-based Drug Development

B Agnew, Science, 287, 1952-3 (2000)

success rate <1/31,000

SGDD が注目される

低い成功確率

SGDD: <u>Structure-Guided Drug Development</u> 一般にはGuidedでなくBasedが使われる

効率の良い創薬開発

救う方法はないか?

ew strategy

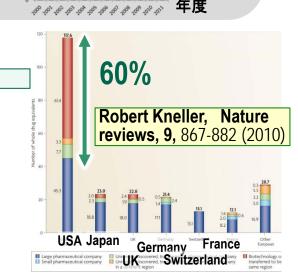
製薬企業のゴミ箱

候補化合物や 標的タンパク質

候補化合物

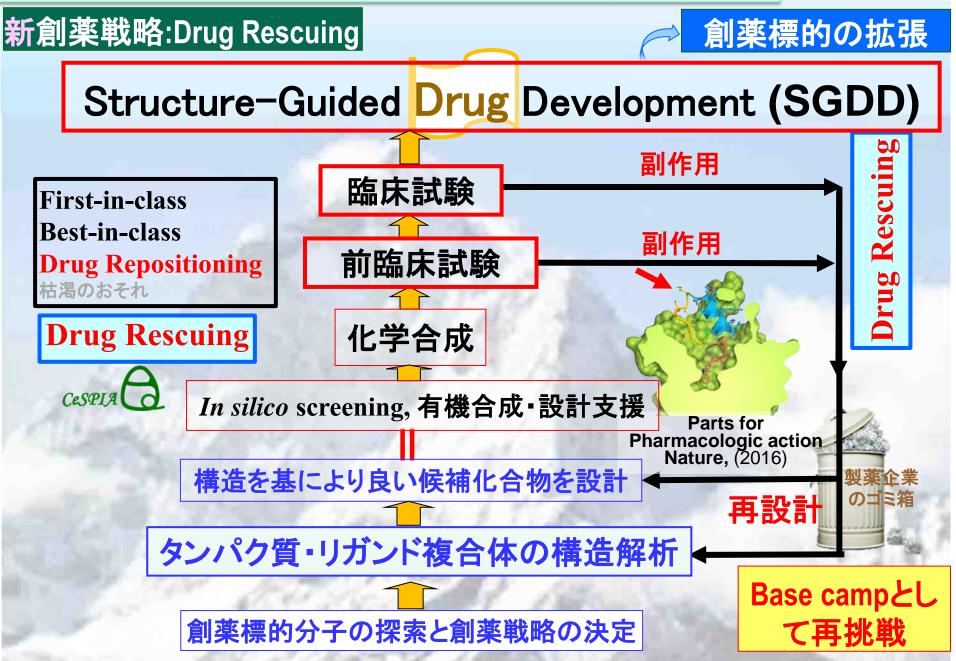
米国では新薬の6割程度が、アカデミアやベンチャー 企業との共同研究で創られている

> 東京医科歯科大学CeSPL Business Venture CESPLA 藤吉·日本電子共同出資



創薬標的分子の探索と創薬戦略の決定

2000年から構造創薬(SGDD) 基盤技術開発を進めてきた



mitochondria

神経細胞

イオンチャネル

13 water channels

Nasal cavity: AQP-3, 4

Spinal cord: AQP-4

Drug Rescuing の例として、 水チャネル阻害剤開発

AOPO:白内障、細胞接着

AQP1:腎臓はじめ多くの場所に発現

AQP2:ダイナミックな機構、心臓疾患 等多くの病気治療対象

AOP3:水だけでなくグリセロール透過、 美容、怪我などに関係:結晶化に成功

AQP4:細胞接着、躁鬱病や多発性硬化 症等にも関連し高次の脳機能と関連

AQP5:ドライアイ、唾液分泌

AQP6:水チャネルのファミリーながら、 陰イオンチャネル、脳での機能等

AQP7:グリセロール透過、脂肪細胞、肥満 AQP8:消化管、膵臓、腺房、肝臓

AQP9:グリセロール、肝細胞

H ← AQP10:グリセロール、消化管

Domino toppliAQP11:NPAがNPC腎性嚢胞症

AQP12:NPAがNPT、オルガネラに発現

physiological processes

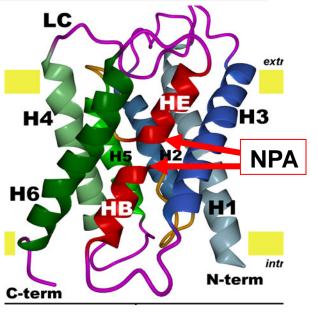
—— Brain: AQP-1, 3, 4, 6, 9 00 Eye: AQP-0, 1, 3, 4, 5 Salivary gland: AQP-1, 4, 5, 8 Trachea: AQP-1, 3, 4, 5 Lung: AQP-1, 4, 5 Heart: AQP-1, 7 Liver: AQP-1, 4, 8, 9 Pancreas: AQP-1, 8 Kidney: AQP-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 Gall bladder: AQP-1 Spleen: AQP-1 Stomach: AQP-4 Colon: AQP-1, 3, 4, 7, 8 Urinary bladder: AQP-1, 3 Reproductive system: AQP-1 Testis: AQP-1, 2, 7, 8, 9 Red Blood cells: AQP-1, 3 White Blood cells: AQP-9 Skin: AQP-1, 3, 4 Skeletal muscle: AQP-4, 7 high-speed water flow of **3 billion water molecules/sec** Aquaporins in Human Body

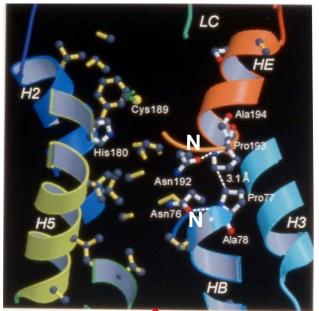
Involved in numerous

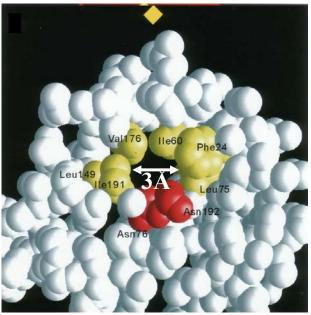
1秒間に30億もの水分子を透過しな がらプロトンをも透過しない機構は?

AQP1の構造解析

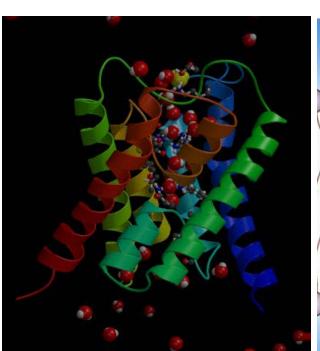
Nature, 387, 624-7 (1997) **Nature, 407**, 599-605 (2000)

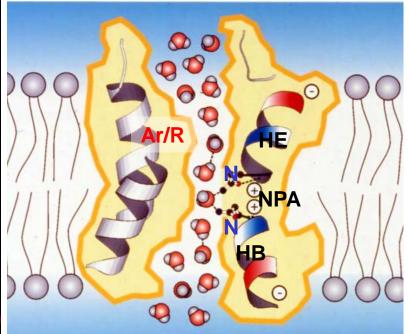


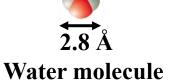


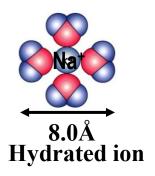


at 3.8 Å resolution





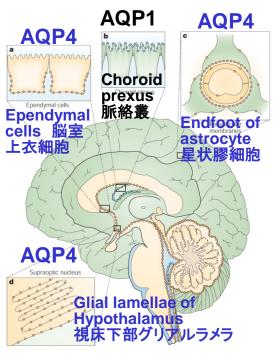




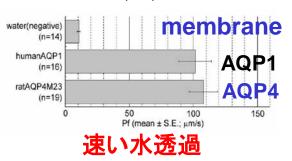
H-bond isolation mechanism

脳の水チャネル 電子線結晶学の優位性

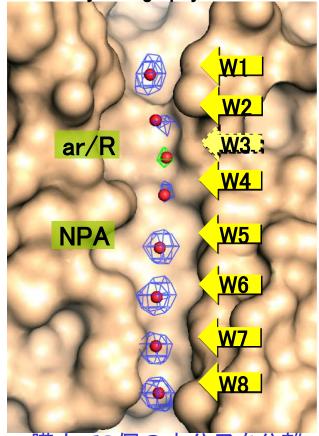
脳は85%が水を含む



M.A. Moghaddam, O.P. Ottersen, Nature Rev. Neurosci., 4, 991-1001(2003)

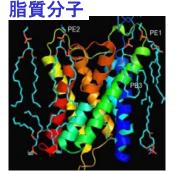


Electron crystallography at 2.8 Å

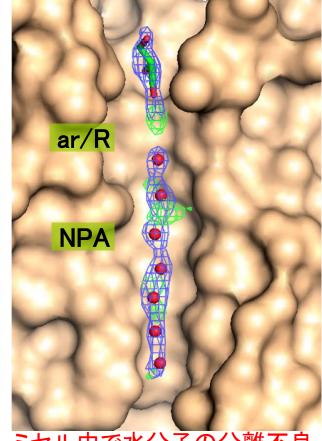


膜内で8個の水分子を分離

J. Mol. Biol., **389**, 694–706 (2009)

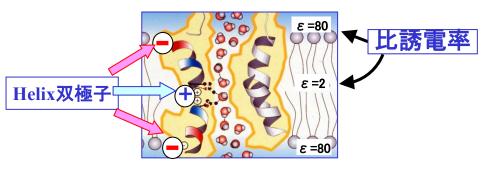


X-ray crystallography at 1.8 Å

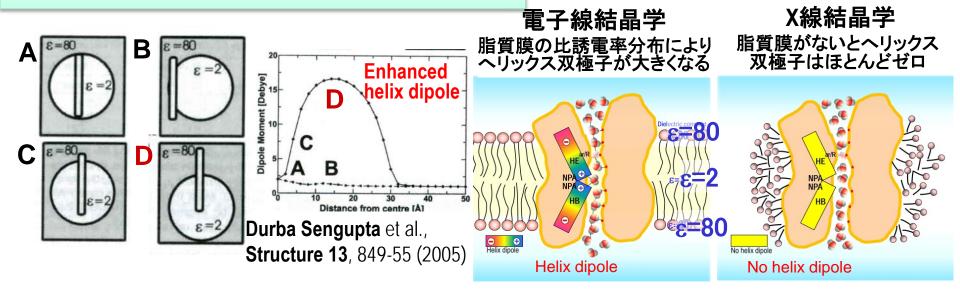


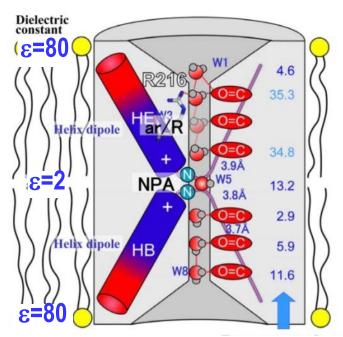
ミセル中で水分子の分離不良

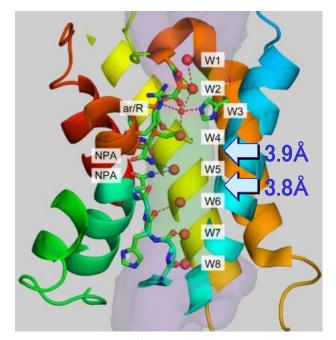
JD Ho et al., *PNAS* 106, 7437-42 (2009)



膜内では短いヘリックスの双極子が大







脂質膜内での大きいヘリックス双極子とカルボニル基の配置が重要

Drug Rescuingの例

脳浮腫のための薬

お酒を飲むと脳でのAQP4 の発現量 が増加する

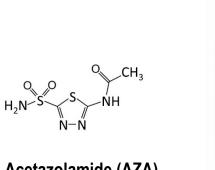
脳は頭蓋骨でおおわれている

もし酔っぱらって脳を強打すると、脳 浮腫で亡くなる可能性あり

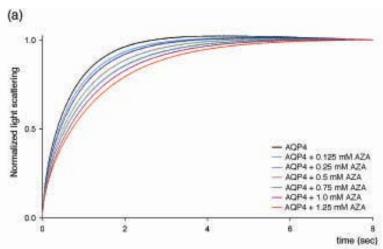


AQP4の阻害剤としてアセタゾーラミドを発見 **J. Struct. Biol., 166,** 16-21 (2009).

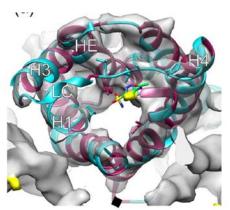
AZA Concentration depending inhibition



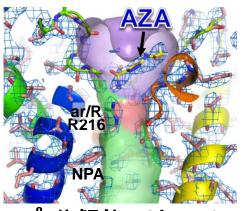
Acetazolamide (AZA)



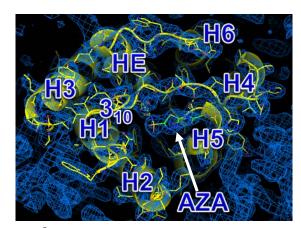
ストップトフロ一光散乱法で、AZA が水チャネル AQP4の阻害剤であることを確認



5Å分解能では、大まかな 結合位置がわかるだけ Microscopy 65, 177-84 (2016)



3.4Å 分解能ではAZAに 相当する密度が観える



3.0Å分解能で正しい構造が 解析できたと思ったが

正しくない結合構造だった



2.8Å分解能で正しい結合構造が 解析できたので、これを基に設計

Drug Rescuing



創薬には高分解能 の構造情報が必要

結晶学による膜タンパク質の構造解析 劇的変化

単粒子解析法

構造解析には長い期 間が必要であった

ET_BR-ET1 57 citations

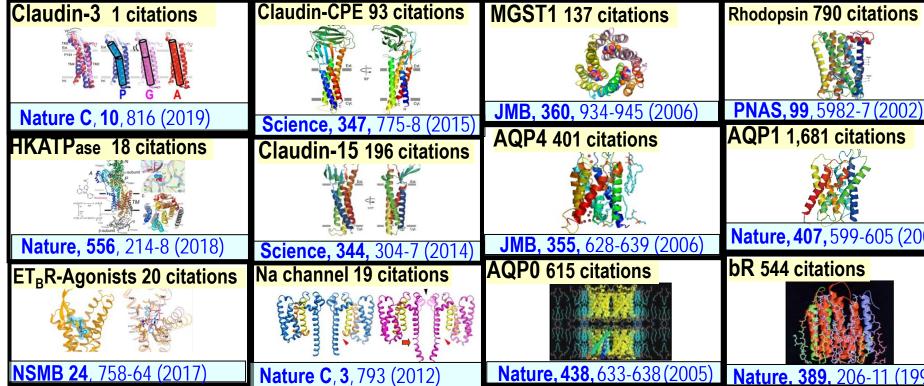
Nature, 537, 363-8 (2016)

Booth & Mooney M&M, 348, 13-21 (2013)

K2 Summit camera

AChR 1,429 citations

Nature, 423, 949-55 (2003)

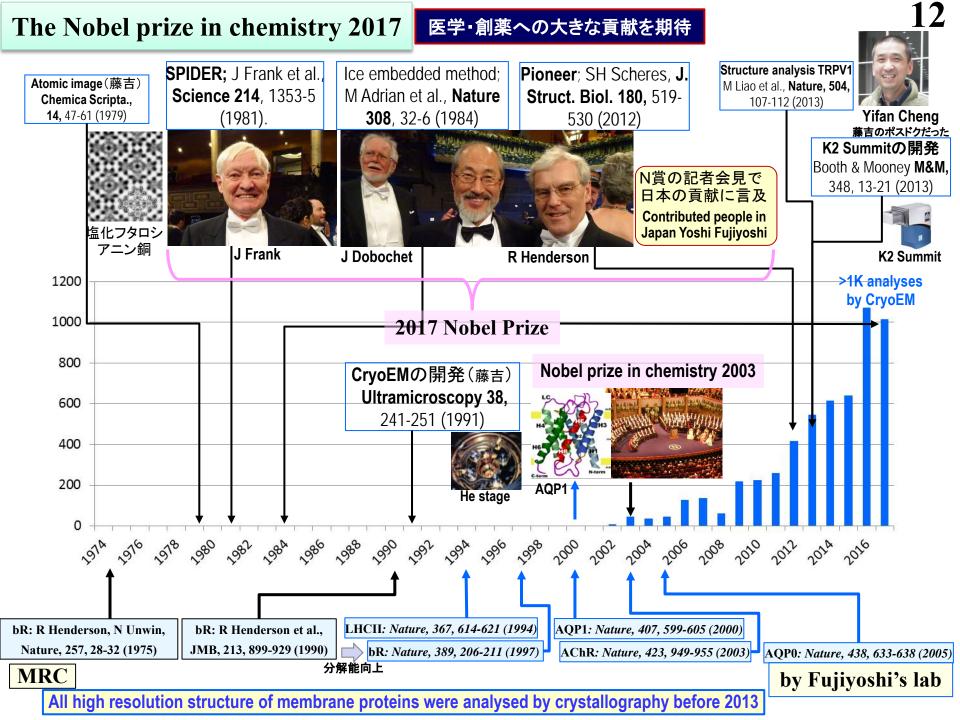


Cx26 547 citations

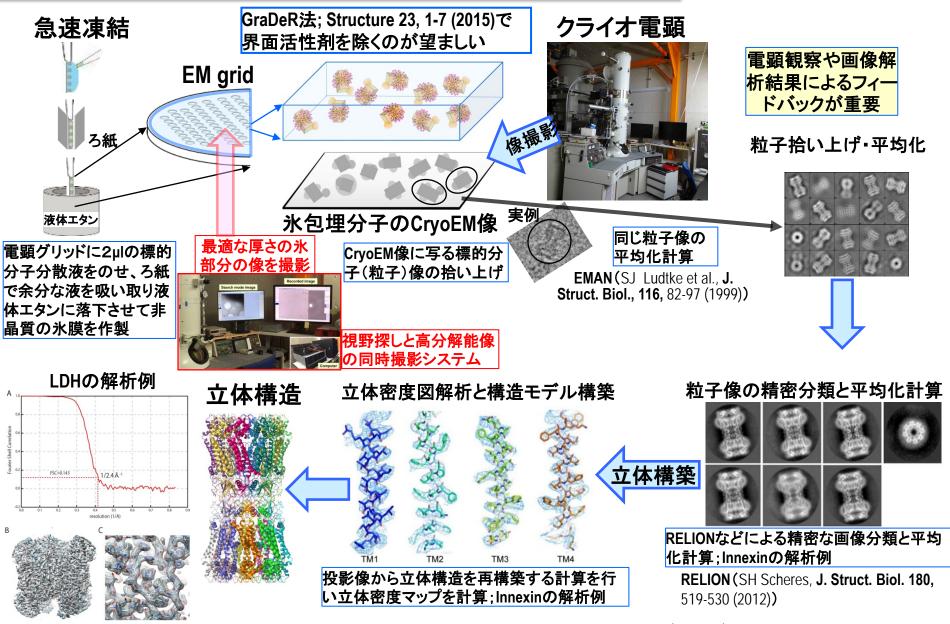
Nature, 458, 597-602 (2009)

Nature, 407, 599-605 (2000) **bR** 544 citations

Nature, **438**, 633-638 (2005) **Nature**, **389**, 206-11 (1997) LHC 2,118 citations **Nature**, **367**, 614-21 (1994)



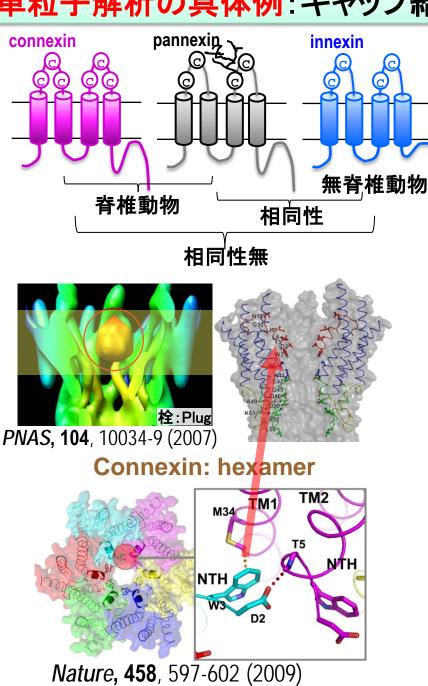
膜蛋白質等の構造解析:クライオ電顕による単粒子解析法



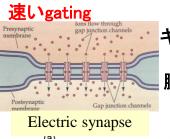
JSB, **205**, 11-21 (2019)

Nature Commun, 7, 13681 (2016)

単粒子解析の具体例:ギャップ結合チャネル



発生制御、炎症、細胞死、免疫応答、筋収縮などに関わる



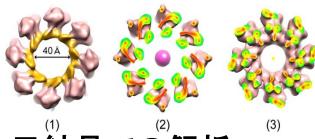
ギャップ結合チャネルは 複雑なgating機構, 膜電位, Ca²⁺, リン酸化, pHなどでgating制御

Innexin と Connexinは アミノ酸配列の相同性無

心筋の同期



Innexin: Octamer



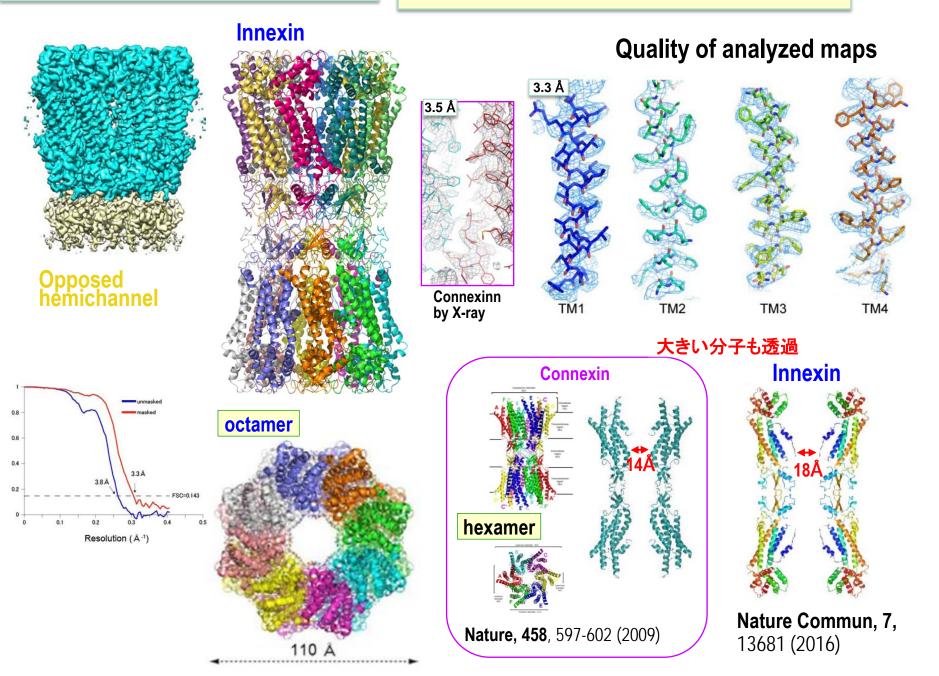
2次元結晶での解析

N-terminal deleted mutant; 10 Å resolution JMB, 428, 1227-36(2016)

変異を入れていない構造解析できず

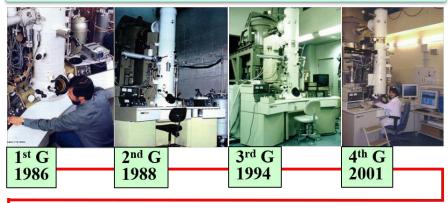
ギャップ結合の構造解析

結晶学で解けなかった構造を2か月で解析



複雑な話を我慢して聞いていただきありがとうございます

Development of Cyo-electron microscopes





G8のクライオ電顕は今年度末に完成

Collaborators:

Cryo-EM; Y. Aoki, I Ishikawa; JEOL

AQP1; K Murata, K Mitsuoka, T Hirai, T Walz, A Engel, P Agre,

AQP4; A Kamegawa, Y Hiroaki, K Tani, Y Tanimura, K Nishikawa, H Suzuki,

Cx26; A Oshima, K Tani, Y Hiroaki, S Maeda, T Tsukihara

Inx6; A Oshima, Oshima's group members

LDH; H Yamaguchi, A Kamegawa, K Nakata, T Kashiwagi, T Mizukoshi, K Tani, Ajinomoto, CeSPIA



Structure determination serviceBusiness Venture CeSPIA inc





Yoshi Fujiyoshi