

創薬の未来を拓く クライオ電子顕微鏡

たんぱく質など生体分子の3次元構造は、生命科学や創薬の研究に欠かせない基盤情報である。ここ数年で飛躍的に増加しているのが、クライオ電子顕微鏡によるたんぱく質の構造解析数だ。「クライオ(低温)」という名の通り、生体分子を低温に急冷することで生のままの観察を実現した。東京医科歯科大学の藤吉好則特別荣誉教授と日本電子は、日本で最初にクライオ電子顕微鏡を開発し、30年以上にわたって改良を重ねてきた。最新の装置には、従来は困難だった脂質膜中のたんぱく質の構造解析を可能にする新たな技術を搭載している。たんぱく質や薬剤の3次元構造を世界最高レベルの分解能で解析できると注目が高まっている。

ふじよし よしのり
藤吉 好則

東京医科歯科大学 高等研究院
特別荣誉教授

2015～19年 NexTEP新技術の
代表研究者

生体分子の3次元構造 損傷を低減して観察

2017年のノーベル化学賞は、クライオ電子顕微鏡の基礎技術を生み出した欧米の3人の研究者に授与された。実は日本でも独自に開発が進んでおり、クライオ電子顕微鏡の黎明期である1970年代後半から、東京医科歯科大学の藤吉好則特別荣誉教授と日本電子(東京都昭島市)は二人三脚で研究開発を続けてきた(図1)。

藤吉さんがクライオ電子顕微鏡の開発に挑んだのは、「分子レベルから人間を理解したい」という大学生の時の夢を叶えるためだった。人間の個性や能力が形成される過程での脳の動きを突き止めようと、細胞間の情報伝達に欠かせない膜たんぱく質の

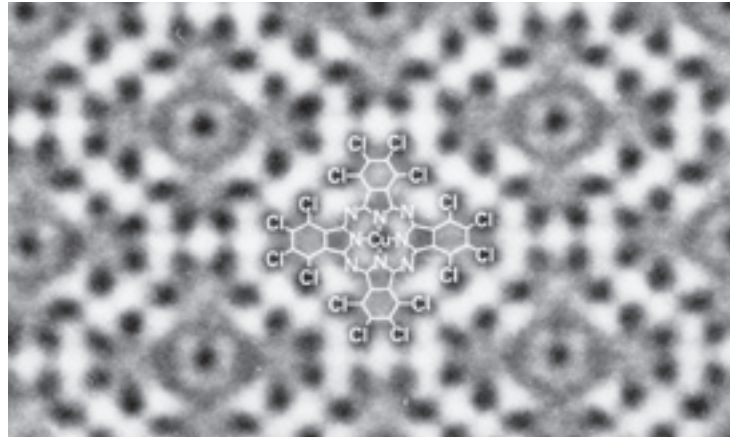
後ろの写真はIBSA法に対応したクライオ電子顕微鏡。藤吉さんと日本電子が共同開発に成功した。

構造解析に注目したことが「研究者人生の出発点でした」と振り返る。

1970年代半ば当時、X線の回折から構造を決定するX線結晶構造解析は、生体分子の3次元構造の解析法として最も確立されていた。「しかし大きな3次元結晶を作製しなければならないのが難点でした。そこで電子線結晶学と呼ばれる電子顕微鏡による結晶解析を志しました。数ナノメートルと非常に薄い膜構造を原子や分子レベルで見するには、対象物を直接観察できる電子線が適しているのではないかと考えました」。そして1978年、塩化フタロシアン銅の中の銅原子や塩素原子の1つ1つを電子顕微鏡で観察することに成功した(図2)。電子線で原子そのものが見えるかという論争が起きている最中での世界初の快挙だった。

電子顕微鏡は感度が高い一方で、照射する電子線が試料を損傷させることに藤吉さんは悩んでいた。塩化フタロシアン銅は丈夫な有機物だが、たんぱく質など損傷を受けやすい生体分子を見ることは難しい。加えて、電子顕微鏡内部は電子が気体分子に妨げられないよう真空環境にしているため、生体分子の水分が蒸発して構造が壊れてしまう。

これらの問題を解決しようと世界的にも研究開発が始まっていたのが、クライオ電子顕微鏡だ。生体分子を低温に急冷することで電子線による損傷を低減できたという報告を知り、藤吉さんは日本電子を訪ね、共同開発に



■図2 原子レベルの分解能で塩化フタロシアン銅の分子像観察に成功した。中心の銅原子や16個の塩素原子が完全に分離して観察される。

着手した。1986年、藤吉さんと日本電子は、電子線照射による損傷を極限まで抑えた第1号機の開発に成功し、世界に先駆けて販売を開始した。

水分子の通り道 電子線結晶学で解明

藤吉さんが日本電子と共同開発したクライオ電子顕微鏡は、水チャンネルと呼ばれる膜たんぱく質の電子線結晶学を用いた構造解析に大いに威力を発揮した。人間の身体の70パーセント近くは水でできており、個体の生命や脳機能などを健全に保つには、水分子しか通過させない水チャンネルが重要な役割を果たす。アクアポリン0からアクアポリン12まで、人間の身体には13種類もの水チャンネルが存在している。「多くの組織で見られるアクアポリン1は、1秒間に30億個もの水分子を通しながら、いかなるイオンもプロトン

も決して通しません。実現不可能ではないかと思われるほど不思議な仕組みでした」。

X線結晶構造解析では試料の3次元結晶を作製する必要があるが、生体分子の中には結晶を作りにくいものもあり、構造解析が困難な標的がいくつも存在した。とりわけ細胞表面に存在する膜たんぱく質は、脂質膜に埋まった状態であるため、本来の構造を維持したままの3次元結晶化が困難で、他の生体分子に比べて構造解析が遅れていた。しかし電子顕微鏡の場合、膜の中に膜たんぱく質が埋まった状態の2次元結晶を用いるので、元のままに近い構造を解析できる。

このような電子線結晶学の長所を生かし、藤吉さんはヒト由来の膜たんぱく質として世界で初めて、アクアポリン1の3次元構造の解析に成功した(図3)。さらに構造解析の結果を基に、水分子の水素の向きによって、速い水透

過と高い水選択性がもたらされていると、水チャンネルの仕組みを解明した。

アクアポリン1の構造解析は、藤吉さんの共同研究者で、アクアポリンの発見者であるピーター・アグレ博士の2003年のノーベル化学賞受賞にもつながった。クライオ電子顕微鏡の実力が注目されたのは、藤吉さんの功績が大きい。

結晶化不要の新技术 脂質膜中で解析を実現

電子線結晶学は、脂質膜の中で膜たんぱく質を構造解析する有効な手法であるが、問題もあった。生体分子の2次元結晶を用いて構造解析するには、2次元結晶を張り付けた電子顕微鏡用グリッドをさまざまな角度に傾斜させて、電子顕微鏡像と回折像を撮影しなければならない。高度な装置や技術が必要で、誰でも簡単に扱えるものではなく、生体分子を結晶化させずに3次元構造を調べる技術が求められていた。

この状況を一変させたのが、ノーベル化学賞を受賞した単粒子解析法によるクライオ電子顕微鏡の技術だった。多数の単一粒子を観察して画像処理によって詳細な構造を得る単粒子解析法は、2次元結晶の作製が不要である。それだけでなく、生体分子を取り出して分散させた水溶液を、マイナス約180度に冷やした液体エタンを使って急速に凍結することで、生体分子の構造を破壊せずに解析できる。氷の中

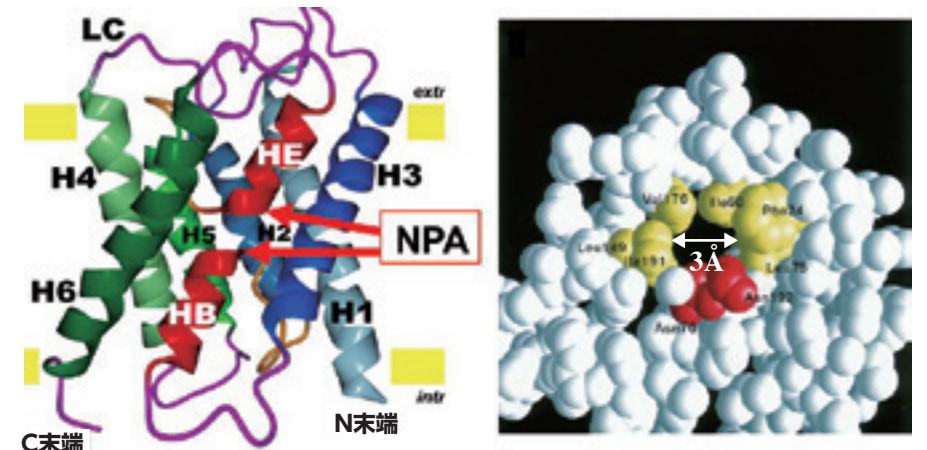
に閉じ込めた状態(氷包埋)であれば、真空中でも乾燥することはない。

単粒子解析法は、これまで結晶化が難しかった生体分子を構造解析する道を拓いたが、藤吉さんにとって重要な課題がまだ残されていた。それは、膜たんぱく質を構造解析するために、界面活性剤を使って周囲にある脂質膜を取り除くことだった。生体分子は動的な機能を発揮するために、脂質膜で形を大きく変える。水チャンネルの解析を通じて藤吉さんは、「膜たんぱく質は脂質膜の中であって初めて、その機能を発揮できる」と痛感したという。「膜たんぱく質を脂質膜から分離して解析しても、脂質膜の中にある状態で構造解析しない限り、その機能を正しく理解することはできません」。

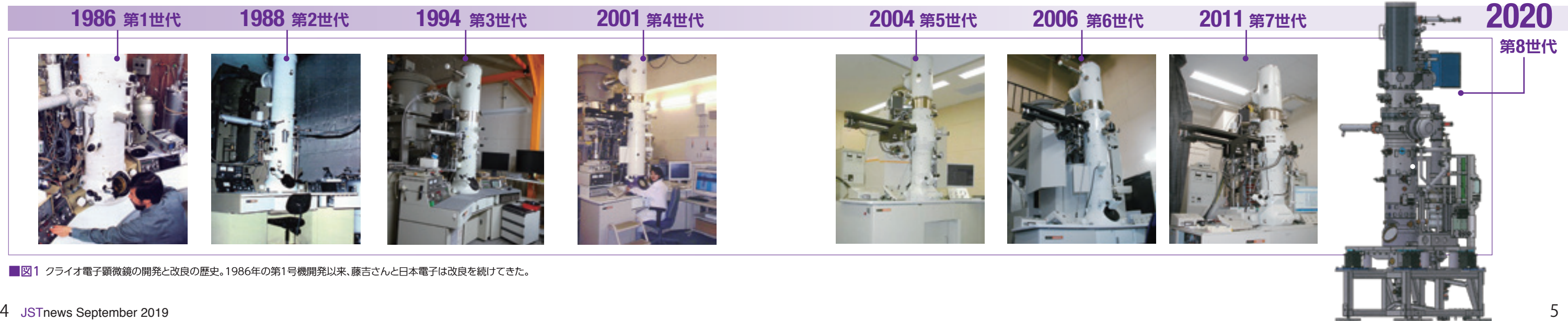
脂質膜の中に膜たんぱく質が埋まった状態で3次元構造を解析する

ため、藤吉さんが考案した構造解析法が「IBSA(イブサ)法」だ。IBSAはImage Based Structure Analysis(画像に基づく構造解析)の頭文字を取っている。1つの生体分子の画像を傾斜した条件で高分解能像を撮影した後に、同一視野を非傾斜の条件で撮影し、その非傾斜の画像を参照することで、最初に撮影した像から3次元構造を構築する方法だ。

単粒子解析法は非傾斜の像内にさまざまな方向を向いた氷包埋粒子が存在するので、3次元構造を容易に解析できる。しかし、IBSA法では脂質膜に入った標的粒子は脂質膜に垂直に入っているため、3次元構造を解析するには傾斜した像を撮影しなければならない。傾斜した条件では、氷が厚くなるのでシグナルとノイズの比率(S/N)が悪くなってしまう。



■図3 左:アクアポリン1の構造解析。右:中央の3オングストローム(0.3ナノメートル)の穴は0.28ナノメートルの水分子が通過できる絶妙な大きさだ。



■図1 クライオ電子顕微鏡の開発と改良の歴史。1986年の第1号機開発以来、藤吉さんと日本電子は改良を続けてきた。

さらに、脂質膜と膜たんぱく質とのコントラストの差が少ないことも問題だった。たんぱく質を見ることができるのは、氷の比重1に対して膜たんぱく質が1.3であるからだ。脂質膜は1.1と、たんぱく質と比重があまり変わらない。そのため、それぞれを区別して、高いコントラストで画像を撮影することが困難である。

これらの問題を解決して構造解析するのがIBSA法だ。脂質膜を除去しないため、界面活性剤によるノイズが発生しない上、脂質膜から取り出すことで破壊されてしまうようなもろい膜たんぱく質であっても構造解析できる可能性がある。

IBSA法では、脂質膜に入った状態で、しかも傾斜した試料の像を撮影して立体構造を解析するので、どうしてもS/Nが悪い像から立体構造を解析しなければならない。解析する膜たんぱく質の2次元平均像を正確に計算するために、コントラストを高くできる焦点条件で撮影した非傾斜の画像を参照することで、傾斜した状態の画像を解析する。これにより、解析が困難な問題を克服して3次元構造解析を実現できる(図4)。

膜たんぱく質を精製しないで構造解析しようとすると、構造解析の対象

となる膜たんぱく質以外にも、数多くの分子が膜内に含まれてしまう。そこで、あらかじめ標的膜たんぱく質に抗体などの目印を付けて、対象となる膜たんぱく質を識別可能にすることで3次元構造解析ができると期待される。

安定な傾斜ステージと高性能電子銃を搭載

IBSA法を実現する技術を搭載したクライオ電子顕微鏡を開発するため、日本電子と共同で応募したのがNexTEPだった。大学などの研究成果を元にした企業の実用化開発を後押しするため、必要な開発費を支援する制度である。開発が成功した場合、企業は開発費の全額を返済するが、不成功の場合は10パーセントに留め、開発リスクをJSTが負担する。

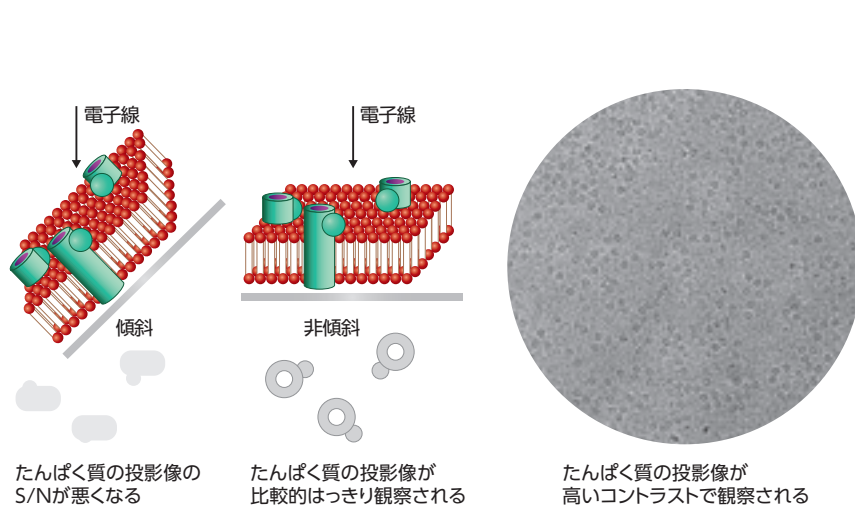
藤吉さんがIBSA法のデータ収集ソフトウェアと解析ソフトウェアを開発し、日本電子がクライオ電子顕微鏡の開発を担当した。開発のポイントは2点ある。まず、さまざまな角度から試料の画像を撮影できるように、試料を載せて安定に傾斜するステージを作った。単粒子解析法ではステージを傾斜させず、非傾斜の像でさまざまな方向からの粒子像を撮影できるため、傾斜機

構の性能や安定性はそれほど求められていなかった。しかし、IBSA法では、傾斜像と非傾斜の像をペアで撮影する必要があるため、傾斜機構の安定性は極めて重要となる。

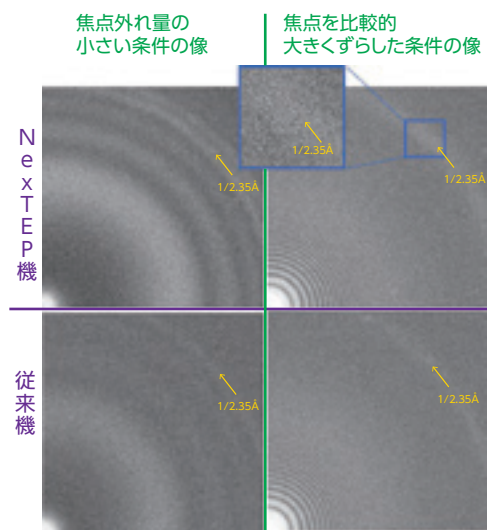
加えて、電子線の光源として冷陰極電界放出型電子銃を用いた。元々は日本電子が材料系の試料の観察に使う電子顕微鏡向けに開発した電子銃で、従来の電子銃に比べて分解能が高いのが特長だ。その電子銃をクライオ電子顕微鏡向けに調整し、初めて搭載した。

これらの工夫により、同一分子を違う角度から撮影した画像を安定にペアで得ることが可能になり、脂質膜から分離せずとも高分解能の3次元構造解析を実現できるようにした。今回開発したクライオ電子顕微鏡は、2種類のたんぱく質の3次元構造解析で0.3ナノメートル以上の分解能を達成し、世界最高水準の性能を示した。

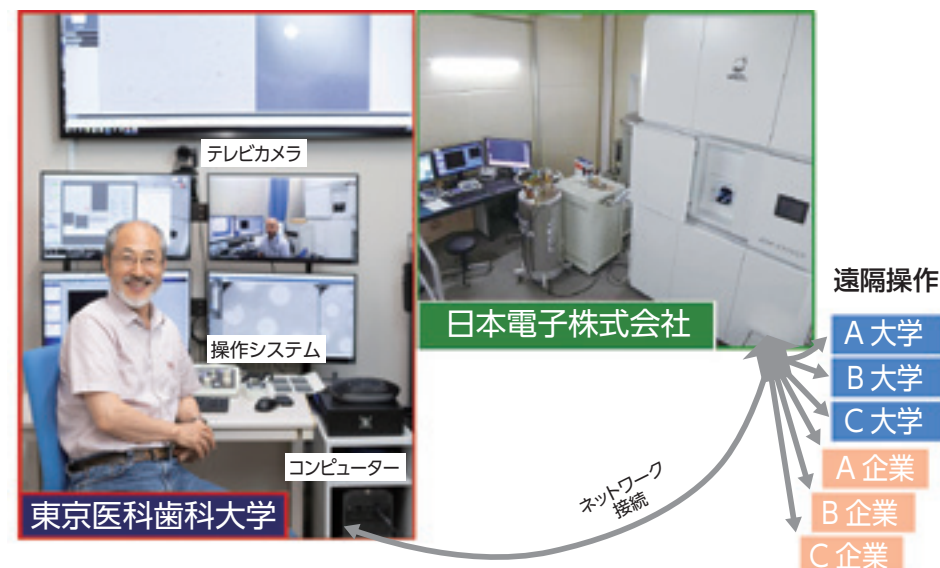
「2019年5月、NexTEPの成功認定を受けるに至りました。装置の開発には巨額の資金が必要ですが、NexTEPのおかげで、非常にタイミング良く、世界に伍していける高性能なクライオ電子顕微鏡システムを開発することができました」と藤吉さんは振り返る。



■図4 左: IBSA法を示す模式図。傾斜すると厚さが増してS/Nが悪くなるため、粒子像の正確な平均化は容易ではないが、傾斜していない状態の画像も撮影することで補う。すなわち、非傾斜の像では脂質膜に垂直に存在するたんぱく質の投影像が高いコントラストで観察されるので、それぞれの粒子像の位置や回転条件を決められる。この情報を傾斜像にフィードバックすることで最初の像を正確に解析できる。
右: 脂質膜に存在するイネキシンの非傾斜条件のクライオ電子顕微鏡像



■図5 NexTEPで開発したクライオ電子顕微鏡と従来機で撮影した非晶質の膜(カーボン膜)の像に、電子顕微鏡画像の分解能推定法の1つであるフーリエ変換を行った。左下の原点から遠いほど分解能は高くなる。1/2.35オングストローム(1/0.235ナノメートル)は、分解能の基準とするために蒸着した金の粒子の(1, 1, 1)の回折点の位置を示す。従来機と比較して各段に高い分解能の情報を得られた。



■図6 遠隔操作による高性能なクライオ電子顕微鏡の共同利用イメージ。クライオ電子顕微鏡を設置したハブセンターと、各拠点の操作システムを光回線でつなぎ、ストレスなく高分解能データ収集が可能になる。

ごみから宝を生み出す新しい創薬戦略の確立へ

クライオ電子顕微鏡の目覚ましい発展は、従来の方法では解析が困難であった生体分子の構造情報を獲得可能にした。細胞への物質と情報の出入りを制御している膜たんぱく質が正常に働かないと、病気を発症する危険性が高まる。世界中で膜たんぱく質を対象とした薬が盛んに開発されている。

膜たんぱく質の3次元構造を知り、狙った場所に結合する薬剤を探索する戦略が、2000年代に欧米を中心として盛んになった。これを「構造に指南された創薬戦略(Structure-guided drug development:SGDD)」という。例えば胃腸薬として、膜たんぱく質の一種であるヒスタミン受容体に結合することで、胃酸の分泌を抑える働きをするものが開発されている。

しかし、この戦略で発見できる薬剤は3万個に1個という低い確率だ。そこで製薬会社は、すでに認可されている薬を別の病気の治療薬として使える可能性を検証するドラッグ・リポジショニング(Drug Repositioning)戦略に移行した。現在、新薬の約50パーセントが、この戦略により見いだされている。元々高血圧の改善のため、血管拡張剤として開発されたミノキシジルという

化合物に発毛効果があることがわかり、発毛剤に転用されたのは典型例といえる。副作用もわかっているので開発の効率は良いが、「釣り堀で魚を釣っているようなもので、すぐに枯渇してしまいます」と藤吉さんは懸念する。

新しい創薬戦略として藤吉さんが提唱するのが、ドラッグ・レスキューイング(Drug Rescuing)だ。重要な薬候補になったものの動物実験で効かなかったり、副作用があったりしたため、お蔵入りになっていた化合物を見直して再設計する。藤吉さんの言葉を借りれば「ごみの山を宝の山にする」取り組みである。開発中止となった化合物と創薬標的分子との結合状態の構造情報が、クライオ電子顕微鏡によって短期間に得られるようになり、標的分子に最適の薬理作用を実現すると期待されている。さらに、薬理作用に影響を与えない部分も明らかになるので、この部分に改変を加えて副作用を低減させる試みもできる。

このような構造創薬の成功確率を高めるには、膜たんぱく質のみならず、薬剤となる化合物の3次元構造解析も不可欠だ。従来のクライオ電子顕微鏡の分解能が0.3ナノメートルであったのに対し、藤吉さんは世界最高レベルの0.24ナノメートルまで引き上げた(図5)。「高分解能の解析では、日本の

貢献が大きいのです。日本電子製のクライオ電子顕微鏡で大阪大学の加藤貴之さんが撮影した像を用いて、英国のMRC分子生物学研究所に留学している中根崇智さんが解析法を改良することによって、0.15ナノメートルという分解能が達成されました。生体分子だけでなく薬剤の詳細を見ることができるよう3次元構造解析も確実に視野に入ってきています」。世界をはるかに超えた分解能達成で、「日本電子のクライオ電子顕微鏡が注目され始めました」と語る。

遠隔操作で共同利用ベンチャーで創業支援

最新のクライオ電子顕微鏡は日本電子社内に設置され、東京医科歯科大学の研究室からでもモニター画面を見ながら遠隔操作できる。クライオ電子顕微鏡は1台数億円と高額で維持管理も大変だ。購入が難しい企業や研究機関に遠隔操作システムを導入してもらい、クライオ電子顕微鏡を共同利用できるようにする計画だ(図6)。

2017年4月、藤吉さんと日本電子は共同出資でCeSPIA(セスピア、東京都千代田区)を設立した。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析には熟練した技術やノウハウが必要なことから、同社は創業のための3次元構造解析の受託とコンサルティングを主な事業内容としている。生体分子や化合物などの試料をCeSPIAに送れば、クライオ電子顕微鏡や遠隔操作システムを持たなくても、手頃な価格で高分解能の構造解析結果が得られる。

「地上100メートルまでジャンプするような目標を掲げてきました」と話す藤吉さん。これまでの道程は、厚さ10センチメートルのレンガを1つずつ積み上げてきたようなもので、どれがブレイクスルーだったとは言えないという。「誰か1人が100メートル一気にジャンプするよりも、多くの人が上っていけるようにレンガの階段を作ることが重要です。もっと高くレンガを積み上げることもできるでしょう。地道な経験の積み重ねこそが、成功の理由です」。