

学位申請論文

ウェルシュ菌エンテロトキシンとクローデイン-19 との複合体の構造学的研究

名古屋大学大学院 創薬科学研究科 基盤創薬学専攻
創薬分子構造学講座 構造生理学分野（藤吉研究室）

齊藤 恭紀

要旨

嫌気性桿菌のウェルシュ菌, *Clostridium perfringens* には、ヒトや家畜に食中毒をひき起こす性質のものがいる。この細菌による食中毒の原因物質は *Clostridium perfringens* が産生するエンテロトキシン (CPE) である。CPE は細胞傷害ドメインと受容体結合ドメイン (C-CPE) からなっており、腸管上皮細胞の受容体に結合した後に細胞毒性を発揮する。C-CPE の受容体は密着結合 (TJ) の主要膜タンパク質であるクローディン (Cldn) である。Cldn は多重遺伝子ファミリーを形成しており、TJ の形態や透過特性を左右する主たるタンパク質として機能している。C-CPE は細胞毒性を起こすことなく特定の Cldn サブタイプに結合して、その Cldn を TJ から取り除き、TJ の透過特性を可逆的に変化させる機能を持つ。これまでに、病態生理学的・薬理学的重要性から、C-CPE と Cldn との相互作用について研究が為されてきた。しかし、C-CPE と Cldn との複合体の構造に関する研究はほとんど進んでおらず、詳細な相互作用の理解には情報が不足していた。本研究では、C-CPE と Cldn との複合体について構造生理学的に解析を行った。

第一章では、結晶化に適した Cldn サブタイプを選別し、C-CPE と Cldn との複合体の構造解析を行ったことを示す。まず、蛍光ゲル濾過クロマトグラフィー法を用い、29 種類のマウスの Cldn について、発現量・単分散性・C-CPE 結合能を評価した。これにより、結晶化に適した Cldn サブタイプとして Cldn-19 を選別した。さらに、腸管における CPE の主たる受容体である Cldn-3, Cldn-4 と同様に、Cldn-19 からなる TJ が C-CPE によって壊されることを蛍光顕微鏡観察および電子顕微鏡観察によって確認した。C-CPE と Cldn-19 との複合体の構造解析を行ったところ、3.7 Å 分解能で C-CPE/Cldn-19 複合体の結晶構造が明らかになった。結晶構造において、C-CPE は結合に重要な領域と考えられてきた Cldn の細胞外第 2 領域 (ECS2) と相互作用して結合していた。さらに、C-CPE は結合に関与しないと考えられてきた Cldn の細胞外第 1 領域 (ECS1) ととも相互作用して結合していた。C-CPE/Cldn-19 複合体の結晶構造と C-CPE が結合していない Cldn-15 の結晶構造を比較し、構造の同異点を見出した。

第二章では、C-CPE と Cldn-19 との相互作用について示す。複合体の結晶構造中にて、C-CPE と相互作用していた Cldn-19 のアミノ酸残基について変異体を作製し、各変異体について C-CPE とのアフィニティーを調べた。変異導入によるアフィニティー変化の結果を C-CPE の構造にマッピングしたところ、C-CPE と Cldn-19 との結合に重要な領域が明らかとなった。さらに、この領域のアミノ酸残基は C-CPE 感受性の Cldn サブタイプ間で保存されていることが分かった。これらの解析によって、溶液中においても C-CPE は Cldn-19 の ECS1 および ECS2 と相互作用して結合していることが明らかとなり、その結合様式は C-CPE 感受性 Cldn の間で共通していることが示唆された。

第三章では、C-CPE の結合による Cldn の構造変化について示す。C-CPE が結合していない Cldn-15 の結晶構造と、C-CPE/Cldn-19 複合体の結晶構造を比較したところ、Cldn の重合

に重要だと考えられている細胞外ヘリックスおよび ECS2 に違いが見られた。Cldn-15 の構造を基に作製した Cldn-19 ホモロジーモデルと C-CPE/Cldn-19 複合体の構造を比較したところ、Cldn-19 ホモロジーモデルは同一膜平面内で線状重合が可能である構造をしていたが、C-CPE が結合した Cldn-19 は同一膜平面内において線状重合ができないと考えられる構造をしていた。また、C-CPE の結合による立体障害によって、隣接する細胞間での Cldn 同士の相互作用が阻害されることが示唆された。これらの結果を基に、C-CPE による TJ の崩壊機構を考察した。

目次

要旨.....	2
目次.....	4
略語表.....	5
序論.....	7
本論.....	18
第一章 C-CPE と Cldn との複合体の結晶構造の解明	
1-1 実験背景	18
1-2 結果	18
1-2-1 結晶化に適した Cldn サブタイプのスクリーニング	18
1-2-2 C-CPE/mCldn-19 の結晶構造解析.....	31
1-3 考察	46
第二章 C-CPE と mCldn-19 間の相互作用解析	
2-1 実験背景	51
2-2 結果	51
2-3 考察	61
第三章 C-CPE による TJ の崩壊機構	
3-1 実験背景	64
3-2 結果	64
3-3 考察	69
総合討論.....	71
実験方法.....	73
謝辞.....	80
参考文献.....	81

略語表

AP	Alkaline phosphatase
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
C-CPE	Carboxy-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
Cldn	Claudin
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
CPE-R	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin receptor
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltoside
E 面	Extracytoplasmic face
ECH	Extracellular helix
ECS1	First extracellular segment
ECS2	Second extracellular segment
EDTA	Ethylen diamine tetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FSEC	Fluorescence-detection size-exclusion chromatography
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathione S-transferase
HA	Hemagglutinin
HPLC	High performance liquid chromatography
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
mCldn	Mouse Cldn
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N.C.	Negative Control
OD	Optical density
P 面	Protoplasmic face
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PDB ID	Protein Data Bank identification code
PEG	Polyethylene glycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RMSD	Root mean square deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris Buffered Saline

TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20
TEV	Tabacco etch virus
TJ	Tight junction
TM	Transmembrane
ZO-1	Zonula occludens-1

序論

本研究では、ウェルシュ菌, *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) が産生する毒素の C 末端側受容体結合ドメイン (C-CPE) とクローディン (Cldn) との複合体の結晶構造を解明することで、C-CPE と Cldn との詳細な結合様式および密着結合 (TJ) から Cldn が除かれる仕組みを理解することを目的とした。以下、<ウェルシュ菌による食中毒>、<TJ>、<Cldn>、<Cldn と CPE>のそれぞれの項目について概説する。

<ウェルシュ菌による食中毒>

ウェルシュ菌, *C. perfringens* は、1892 年に分離培養された芽胞を形成するグラム陽性の嫌気性桿菌であり、土壌、ヒトおよび家畜の腸管など、至る所に生息している [1, 2, 3, 4]。この *C. perfringens* は複数種類の毒素産生能を持っており、ヒトや家畜に害を与え得る [2, 3, 4, 5, 6]。 *C. perfringens* は個体ごとに毒素産生能が異なっており、4 つの致死性の毒素である、アルファ毒素、ベータ毒素、イプシロン毒素、イオタ毒素の毒素産生能の違いによって A~E の 5 タイプに分類されている [2, 7, 8, 9, 10] (表 1)。この内 *C. perfringens* タイプ A は、ヒトと家畜に対して下痢と腹痛の症状を特徴とする食中毒をひき起こす [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]。アメリカ合衆国において、*C. perfringens* タイプ A による食中毒の被害者数は年間約 100 万人に上り、その経済的損失は年間約 3 億ドルと見積もられている [18, 19]。

この *C. perfringens* タイプ A による食中毒は、*C. perfringens* が産生する腸毒素、*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) によりひき起こされることが分かっている [9, 10, 15, 17, 20]。CPE は芽胞形成時に産生される分子量 35.3 kDa の可溶性タンパク質であり、受容体結合ドメインと細胞傷害ドメインの 2 つのドメインからなる [21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29] (図 1)。CPE は受容体結合ドメインを介して宿主細胞の受容体に結合した後、細胞傷害ドメインによって膜内にイオン透過孔を作り出し、Ca²⁺の流入による細胞死をひき起こす [30, 31] (図 2)。その結果、下痢や腹痛といった症状が現れる [15, 20, 32]。CPE の受容体は 4 回膜貫通型と推測される膜タンパク質、CPE-R として同定され [33]、後に密着結合 (TJ) の主要膜タンパク質であるクローディンの一種であることが分かった [34, 35]。

	産生される毒素			
タイプ	アルファ毒素	ベータ毒素	イプシロン毒素	イオタ毒素
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

表1 4つの致死性毒素の産生能による *C. perfringens* のタイプ分類

+, 産生される; -, 産生されない。

文献 [2] より引用。

A



B

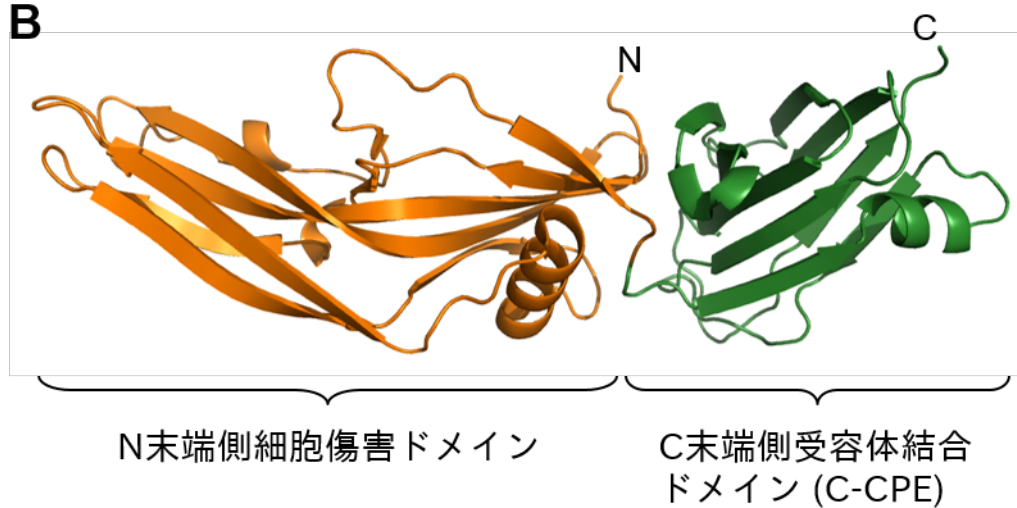


図1 *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) の結晶構造

(A) CPE のドメイン構成。アミノ酸の残基番号を付した。

(B) CPE の結晶構造 (PDB ID: 3AM2 [28]) をリボンモデルで表示した。N 末端側ドメインと C 末端側ドメインをそれぞれオレンジ色と緑色で示した。N 末端の 1~35 残基はディスオーダーしている。

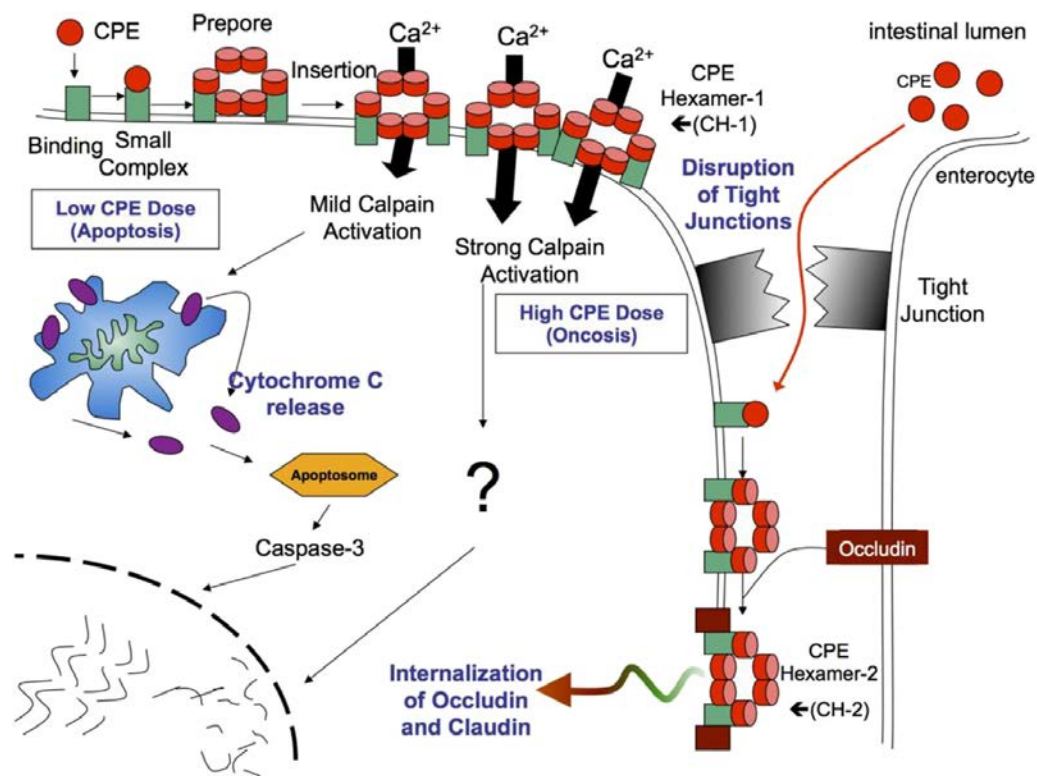


図2 CPEの作用機序

CPEは細胞膜上の受容体に結合して複合体となり、さらにその複合体が多量体化する（プレポア構造）。多量体化した受容体/CPE複合体は構造変化を起こして細胞膜内にイオン透過孔を形成する。イオン透過孔を介した Ca^{2+} の流入により、細胞死が引き起こされる。CPEはそれ以外にも密着結合を崩壊させる機能も持っている。文献 [4]より転載。

<TJ>

TJ は脊椎動物と尾索動物の上皮細胞間および内皮細胞間に存在する細胞間接着複合体であり、細胞間隙を介した物質移動のバリアとして機能している [36, 37, 38, 39, 40]。この TJ のバリア機能は、体内と外環境を隔て、体内に様々な溶液組成を持つ器官を形成するために必須である [41, 42, 43]。TJ を超薄切片像で観察すると、隣り合う上皮細胞間の細胞膜同士がところどころ密着したように見える [36] (図 3A)。また、TJ を凍結切断レプリカ法により観察すると、TJ スtrand と呼ばれる膜内粒子からなるスtrand が網目状になっている様子がわかる [44, 45, 46, 47] (図 3B)。これらの観察結果から TJ の構造は、隣り合う細胞同士の TJ スtrand が対になって細胞間を密着し、その対になった TJ スtrand が細胞の周りをベルト状に取り囲んだものであると考えられている [45, 46, 47, 48] (図 3C)。これまでに、TJ を構成する膜内在性タンパク質および膜表在性タンパク質が多数報告されている [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59]。その中で唯一クローディン (Cldn) という膜タンパク質が、TJ を持たない L 繊維芽細胞に遺伝子導入した際に、組織中に見られるものと同様の TJ スtrand を形成することが分かっている [60, 61, 62, 63, 64, 65, 66]。さらに、Cldn 遺伝子をノックアウトしたマウスのセルトリ細胞、オリゴデンドロサイト、内耳の辺縁細胞では、TJ スtrand が消失することが報告された [67, 68, 69]。また、Cldn ノックアウトマウスの表現型解析や培養細胞を用いた Cldn の機能解析研究等から、Cldn が TJ のバリア機能も担っていることが示されてきた [43, 63, 70, 71, 72, 73, 74, 75]。そのため、Cldn は TJ の構造および機能を担う主要構成タンパク質であると考えられている。

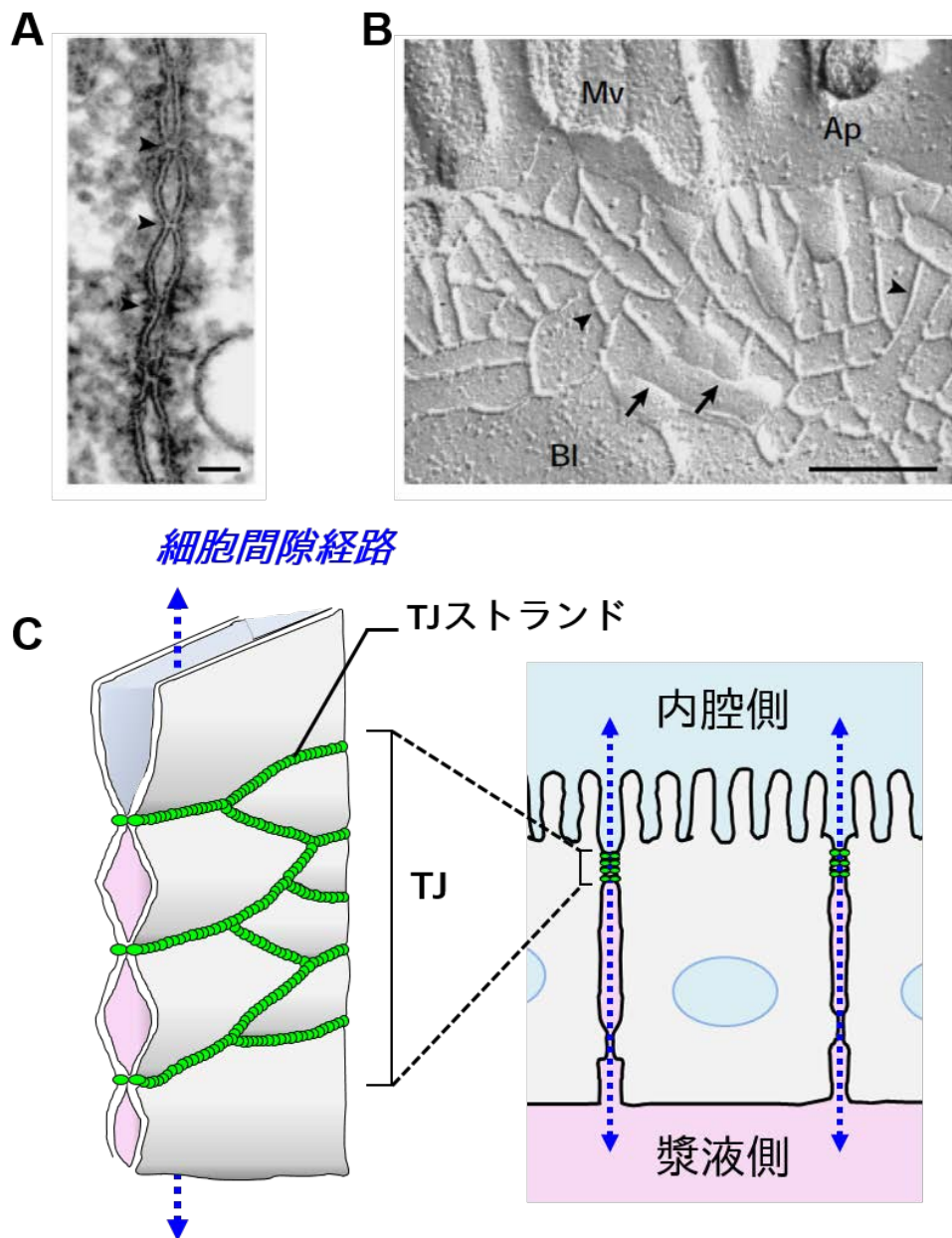


図3 TJの構造

(A) TJの超薄切片像。隣り合う細胞同士の膜がところどころ密着している (矢頭)。スケールバー, 50 nm。

(B) TJの凍結切断レプリカ像。Mv, 微絨毛; Ap, 頂端膜; Bl, 側底膜。矢頭, P面に見られる膜内粒子からなる TJ ストランド; 矢印, E面に見られる TJ ストランドに相補的なくぼみ。スケールバー, 200 nm。

(C) TJの模式図。緑色の丸印で表した膜タンパク質が細胞膜内で重合して、数珠状の TJ ストランドを形成している。TJ ストランドは隣り合う細胞の TJ ストランドと対になることで細胞同士を密着させている。青色の破線矢印, 細胞間隙経路。細胞膜が密着した領域は細胞間隙輸送の障壁として機能している。A および B は文献 [46]より引用。

<Cldn>

Cldn は、N 末端と C 末端を細胞質側に向けた分子量約 22~32 kDa の 4 回膜貫通型の膜タンパク質で、細胞外に 2 つの細胞外領域を持つ [46, 51, 76, 77, 78] (図 4)。この Cldn は、マウスでは 27 種類、ヒトでは 26 種類のサブタイプを持つファミリーを形成しており、各サブタイプは組織特異的な発現パターンを示す [35, 40, 77, 79, 80]。Cldn 分子同士は、細胞膜面に対して平行な方向 (シス) と垂直な方向 (トランス) の両方向で相互作用することができる [81]。この相互作用により対になった TJ スtrand が形成されて、細胞同士が密着され则认为られている [78, 81, 82, 83, 84] (図 5)。TJ に局在している Cldn サブタイプの違いによって TJ の透過特性が異なることが分かっており、各器官・組織の生理機能に適するように Cldn サブタイプの組み合わせとその発現量が決まっていると认为られている [73, 74, 75, 81]。

<Cldn と CPE>

C. perfringens タイプ A 食中毒の原因毒素である CPE は、その C 末端側のドメインである C-CPE を介して、特定の Cldn サブタイプの細胞外第 2 領域 (ECS2) に結合すると认为されてきた [85, 86, 87]。加えて、C-CPE 単体は細胞傷害を起こすことなく可逆的に Cldn に結合し、結合した Cldn を TJ スtrand から除いて TJ の透過特性を変化させる機能を持っていることも示された [63] (図 6)。その後、C-CPE と Cldn との相互作用に関する多くの研究によって、C-CPE の Cldn 結合に重要な残基および Cldn の C-CPE 結合に重要な残基が特定されてきた [27, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92]。しかし、C-CPE と Cldn との詳細な結合様式や、C-CPE が TJ スtrand から Cldn を取り除く仕組みについてははっきりと分かっていなかった。

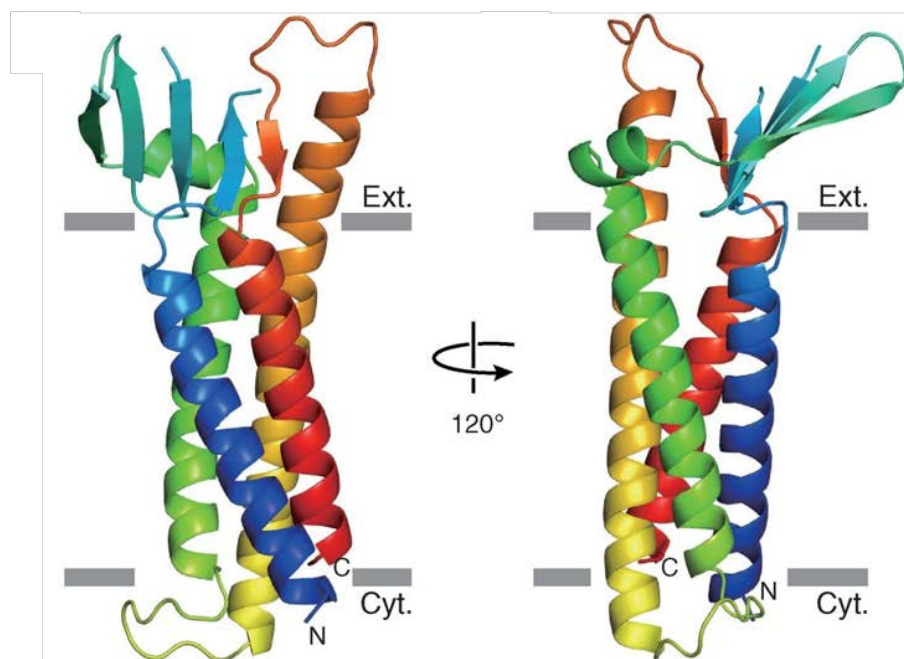
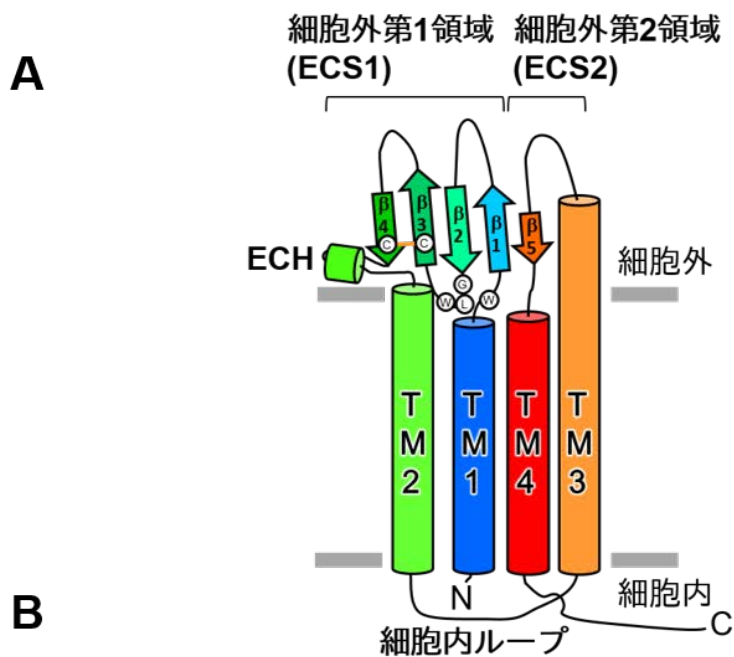


図4 Cldn の構造

(A) Cldn の二次構造の模式図。Cldn は4本の膜貫通ヘリックスと2つの細胞外領域 (ECS1 および ECS2) を持つ。Cldn に保存されたモチーフ、W-GLW-C-C モチーフは ECS1 および ECS2 からなるβシート構造を安定化させている。β1~5, β1~5 ストランド; TM 1~4, 膜貫通ヘリックス 1~4; ECH, 細胞外ヘリックス; 黄色の線, ジスルフィド結合; グレーの長方形, 細胞膜表面。

(B) mCldn-15 の構造をリボンモデルで示した。N 末端から C 末端にかけて青から赤に変わる虹色で表示 (PDB ID: 4P79)。Ext., 細胞膜外葉; Cyt, 細胞膜内葉。文献 [78] より転載。

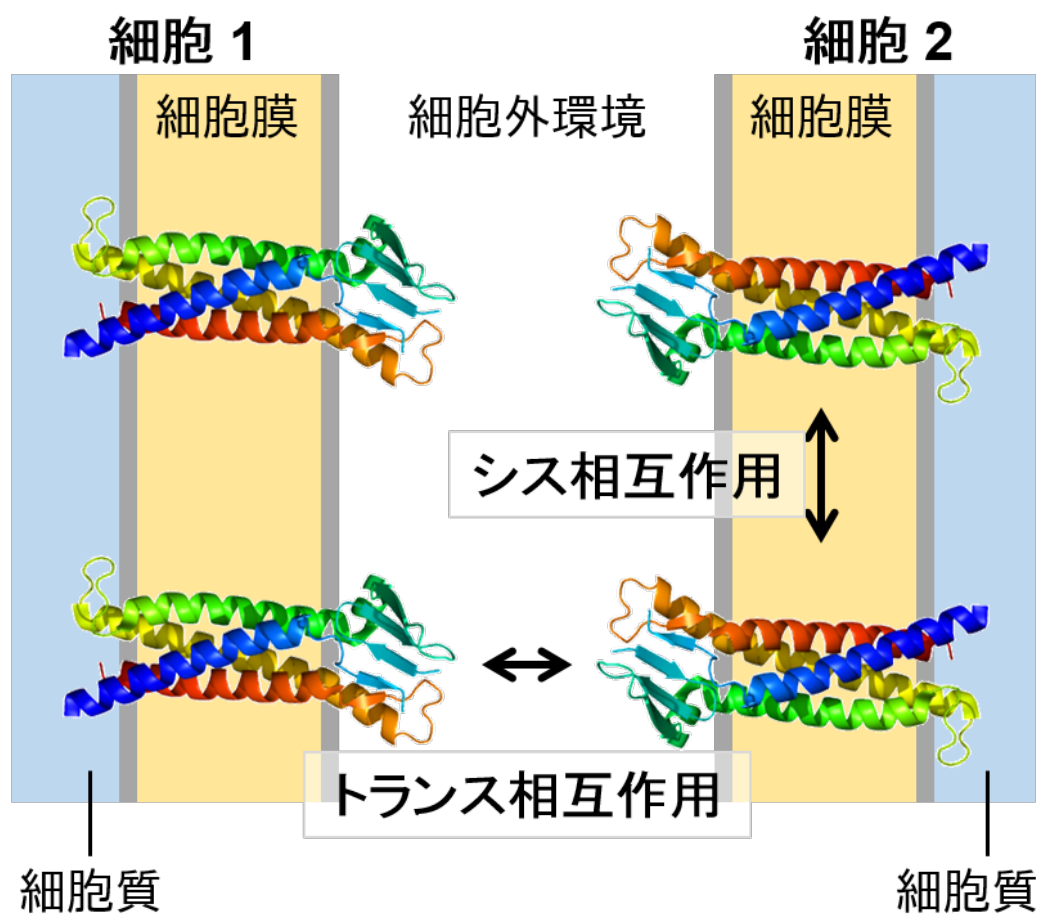


図 5 Cldn プロトマー間の相互作用

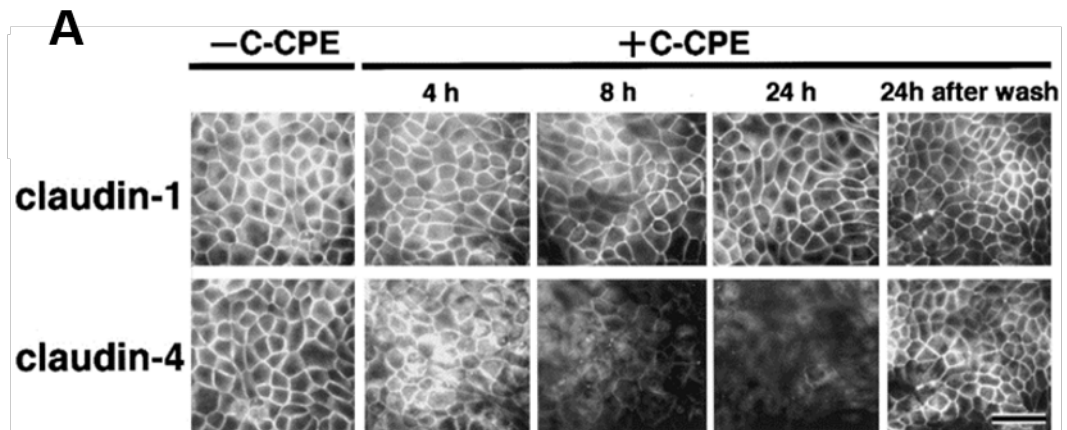
同一膜平面内における Cldn プロトマー間の相互作用 (シス相互作用) および隣り合う細胞間における Cldn プロトマー間の相互作用 (トランス相互作用) を矢印で示した。Cldn 分子はマウス Cldn-15 のリボン図を用いた (PDB ID: 4P79 [78])。色付けは図 4 と同じ。

本論では、3章に分けてそれぞれ論じるが、概要は以下の様である。

第一章では、C-CPE 結合能を持つ構造解析に適したマウス Cldn (mCldn) サブタイプを選別し、C-CPE と mCldn との複合体の構造解析を行ったことを示す。まず、蛍光ゲル濾過クロマトグラフィー法 (FSEC) [93] を用いて、C-CPE と結合する発現量の高い安定な mCldn サブタイプを選別した。その結果、発現量・単分散性が共に高く、これまでに C-CPE と結合することが報告されていなかった mCldn-19 を見出した。この mCldn-19 を、TJ を持たない上皮様細胞の SF7 細胞にて発現させたところ、良好な TJ ストランドを形成した。この SF7 細胞に C-CPE を加えたところ、mCldn-19 からなる TJ ストランドは消失した。これより、mCldn-19 が C-CPE の受容体として機能することが確かめられた。結晶化に適するように改変した mCldn-19 と C-CPE を大量発現・精製し、共結晶化を行ったところ、良好な結晶ができ、3.7 Å 分解能で C-CPE と mCldn-19 との複合体の結晶構造を明らかにした。この結晶構造では、mCldn-19 の細胞外第 1 領域 (ECS1) および ECS2 が C-CPE と相互作用して結合していた。C-CPE/mCldn-19 複合体の構造を、Cldn 非結合状態の C-CPE の構造および C-CPE 非結合状態の mCldn-15 の構造と比較し、同異点を見出した。

第二章では、C-CPE と mCldn-19 との相互作用解析を行った結果を示す。結晶構造中において、C-CPE は mCldn-19 の細胞外領域と、水素結合、イオン結合および疎水性相互作用をして結合していることを明らかにした。これらの相互作用箇所について、mCldn-19 変異体を作製し、FSEC を用いて変異導入によるアフィニティーの変化を調べた。その結果、C-CPE と mCldn-19 との結合には、ECS1 および ECS2 の両方が重要であることが明らかになった。この結果を C-CPE の構造にマッピングし、C-CPE 感受性 mCldn 間におけるアミノ酸配列の保存性と比較したところ、C-CPE との結合に重要な mCldn-19 のアミノ酸残基は、C-CPE 感受性 mCldn サブタイプ間で良く保存されていることが分かった。これより、C-CPE と mCldn-19 の結合様式は、C-CPE 感受性 Cldn サブタイプ間で共通していることが示唆された。さらに、C-CPE と相互作用しているアミノ酸残基の中で、ECS1 中の連続する 3 残基は C-CPE の感受性に関わらず保存性が高かったが、ECS2 のアミノ酸残基は C-CPE 感受性の mCldn において保存性が高かった。したがって、mCldn サブタイプ間における C-CPE 結合能の違いは、ECS1 の違いというより ECS2 の違いに起因することが示唆された。

第三章では、mCldn-15 の構造を基に作製した C-CPE フリーの mCldn-19 ホモロジーモデルと C-CPE/mCldn-19 複合体の構造を比較することで、C-CPE の Cldn への結合過程を推測し、TJ ストランドの崩壊機構を考察した。



B

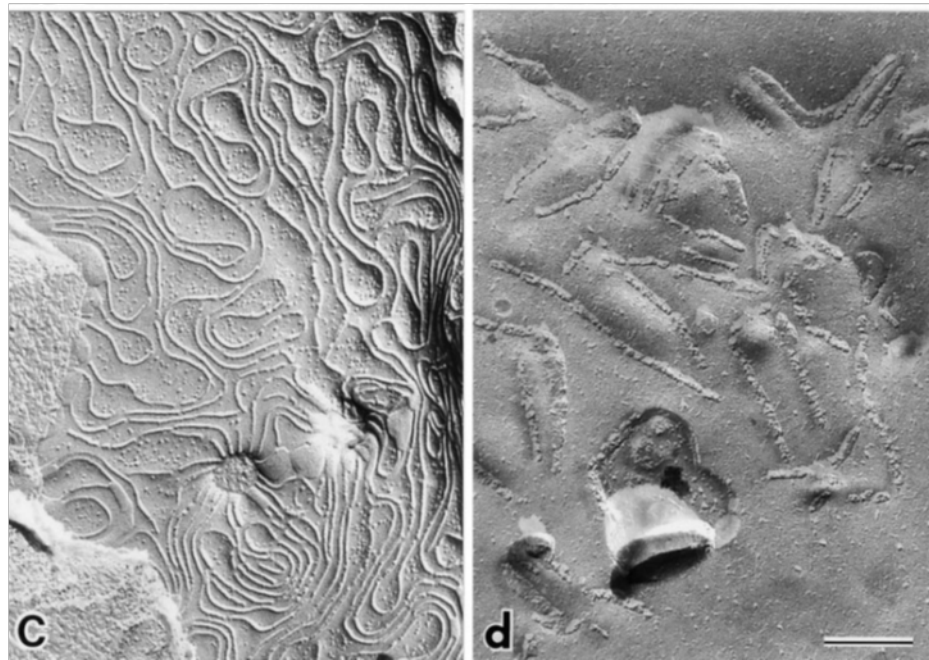


図6 C-CPE による TJ への影響

(A) TJ からの Cldn-4 の選択的な減少。培養上皮細胞の免疫蛍光顕微鏡観察。C-CPE の添加によって、C-CPE 結合能のない Cldn-1 に変化は見られないが、C-CPE 結合能を持つ Cldn-4 は発現量が減少し、TJ から消失する。C-CPE を洗い流すと、Cldn-4 の発現量・局在は元通りになる。スケールバー, 40 μ m。

(B) mCldn-3 からなる TJ ストランドへの C-CPE の影響。mCldn-3 を発現させた L 線維芽細胞の凍結切断レプリカ像。細胞膜上に網目状に発達した TJ ストランドが見られる (左側のパネル)。C-CPE を加えて 4 時間後に観察すると、TJ ストランドは断片化した膜内粒子の凝集体になっていた。スケールバー, 200 nm。文献 [63] より転載。

本論

第一章 C-CPE と Cldn との複合体の結晶構造の解明

1-1. 実験背景

X 線結晶構造解析により高分解能の C-CPE/Cldn 複合体の結晶構造を解明するためには、C-CPE/Cldn 複合体を高い結晶性で結晶化させる必要がある。結晶性の高いタンパク質結晶の作製には、単分散性の高い試料を高純度かつ高濃度に用意することが望ましい。しかし、Cldn サブタイプ間の発現量および単分散性について網羅的に調べた報告はない。さらに、Cldn の C-CPE 結合能を調べた報告は限定的な Cldn サブタイプに限られており、網羅的に行った報告はない [33, 34, 63, 85, 86, 94]。

そこで、単分散性・発現量がともに高く、C-CPE 結合能を有する Cldn サブタイプを mCldn 全 27 サブタイプ (29 種類) から選別し、それら mCldn サブタイプと C-CPE との複合体の複合体形成能についての探索実験を行った。

1-2. 結果

1-2-1. 結晶化に適した Cldn サブタイプのスクリーニング

Sf9 昆虫細胞発現系において、N 末端に EGFP (A207K) を融合させた 29 種類の mCldn (EGFP-mCldn) を発現させた (表 2)。各 EGFP-mCldn を発現させた Sf9 細胞の可溶化上清を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットで検出したところ、EGFP-mCldn の種類ごとにバンドの本数や濃さに差が見られたが、発現を試みた全ての EGFP-mCldn の発現が確認された (図 7)。この可溶化上清を FSEC で分析したところ、発現を試みた全種類の EGFP-mCldn のピークが検出された (図 9)。FSEC のクロマトグラムを基に、比較的発現量の高い mCldn として mCldn-3, -9, -15, -18st, -19 を見出した。発現量が高い mCldn サブタイプの中では、mCldn-18st, -19 の単分散性が高かった。

精製した GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を用い、FSEC によって EGFP-mCldn 全種類の C-CPE 結合能を評価した (図 8, 図 9) (用いた C-CPE の長さについては、アミノ酸配列の範囲を下付きで示した。)。その結果、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の添加により、mCldn-3, -4, -6, -7, -8, -9, -14, -19 の 8 種類において EGFP-mCldn のピークが高分子量側に明確にシフトし、それ以外の mCldn サブタイプでは明確にシフトしなかった。これは、Cldn-3, -4, -6, -7, -8, -9, -14 が CPE 結合能を持ち、Cldn-1, -2, -5, -10, -11, -12, -13, -15, -16, -17, -18, -20, -22 が結合能を持たない、あるいは

比較的弱い結合能を持つという、これまでの報告と一致する [34, 63, 85, 86, 87, 92, 95]。したがって、本解析系において見られた GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 添加による高分子量側への EGFP-mCldn のピークシフトは、その mCldn の C-CPE 結合能を反映していると考えられた。本解析系において、mCldn-19 は C-CPE 結合能を持つと考えられる結果が得られたが、これまでに mCldn-19 全長について C-CPE 結合能を調べた報告はなかった。mCldn-19 の ECS2 ペプチドは C-CPE 結合能を持たないという報告があるが [86]、これは mCldn-19 全長での解析と ECS2 ペプチドのみの解析の違いに起因するのではないかと考えられた。そこで、内因性の TJ を欠く上皮様培養細胞株である SF7 細胞を用いて、mCldn-19 の C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 結合能の有無を確認した (図 10, 図 11)。Venus-mCldn-19 を安定的に発現する SF7 細胞 [96] を用いて、C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 添加群と C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 無添加群を用意し、24 時間後に免疫蛍光顕微鏡観察を行った (図 11A)。C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 無添加群では、Venus-mCldn-19 は TJ のマーカータンパク質である ZO-1 と共に細胞間接着部に局在していた。一方、C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 添加群では、ZO-1 は細胞間接着部に局在していたが、Venus-mCldn-19 は細胞間接着部から消失していた。これより、C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の添加によって、Venus-mCldn-19 からなる TJ スtrandが消失していることが示唆された。凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡観察 [97] によって TJ スtrandの有無を確かめたところ、P 面に見られる Venus-mCldn-19 からなる TJ スtrandは、C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の添加によって観察されなくなった (図 11B)。

精製した EGFP-mCldn-1, -3, -19 溶液に 100 $\mu\text{g/ml}$ (7.01 μM) になるように GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を加えて FSEC によって分析したところ、EGFP-mCldn-3, -19 のピークは図 9 と同様に高分子量側に明確にシフトしたが、EGFP-mCldn-1 のピークは高分子量側へ明確にシフトしなかった (図 12)。さらに、EGFP-mCldn-19 の高分子量側へのピークシフトは GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の濃度依存的に起こることが分かった (図 13A)。そこで、FSEC を用いて EGFP-mCldn-1, -3, -19 と GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ との見かけの親和性を定量した (図 13B)。ポジティブコントロールとして用いた EGFP-mCldn-3 の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ との見かけの解離定数である $K_{0.5}$ 値は $7.9 \pm 0.2 \text{ nM}$ と算出され、以前報告されていた K_d 値 (11.9 nM, 10.0 nM) [63, 85] と同様の値であった。一方、ネガティブコントロールとして用いた EGFP-mCldn-1 では、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の添加によって高分子量側へのわずかなピークシフトが認められたが、有意な $K_{0.5}$ 値を算出できなかった [63, 85, 86, 87]。これらの結果から、FSEC を応用した本解析系は Cldn の C-CPE 結合能を正しく定量できていると考えられる。この解析系で mCldn-19 を分析したところ、 $K_{0.5}$ 値を $240 \pm 18 \text{ nM}$ と算出することができた。したがって、C-CPE は mCldn-19 と nM オーダーで結合し、mCldn-19 からなる TJ スtrandの形成を阻害することが明らかになった。以上の結果より、発現量および単分散性が高く C-CPE 結合能を有する mCldn-19 を、C-CPE/Cldn 複合体の構造解析に適する mCldn サブタイプとして選別した。

mCldn サブタイプおよびアイソフォーム	受入番号
mCldn-1	NP_057883.1
mCldn-2	NP_057884.1
mCldn-3	NP_034032.1
mCldn-4	NP_034033.1
mCldn-5	NP_038833.2
mCldn-6	NP_061247.1
mCldn-7	NP_001180548.1
mCldn-8	NP_061248.1
mCldn-9	NP_064689.2
mCldn-10 isoform a	NP_076367.2
mCldn-10 isoform b	NP_067361.2
mCldn-11	NP_032796.1
mCldn-12	NP_075028.1
mCldn-13	NP_065250.1
mCldn-14	NP_001159397.1
mCldn-15	NP_068365.1
mCldn-16	NP_444471.1
mCldn-17	NP_852467.1
mCldn-18 (isoform A1.1)	NP_062789.1
mCldn-18st (isoform A2.1)	NP_001181850
mCldn-19 isoform 2	NP_694745.1
mCldn-20	NP_001095030.1
mCldn-21	XM_001478811
mCldn-22	NP_083659
mCldn-23	NP_082274
mCldn-24	NP_001104788
mCldn-25 (claudin domain-containing protein 1 isoform 1)	NP_741968
mCldn-26 (transmembrane protein 114)	NP_083346
mCldn-27 (transmembrane protein 235)	NP_001079004.1.

表2 本研究で用いた mCldn サブタイプおよびアイソフォーム

各 mCldn について、米国立生物工学情報センター (NCBI) における受入番号を示した。

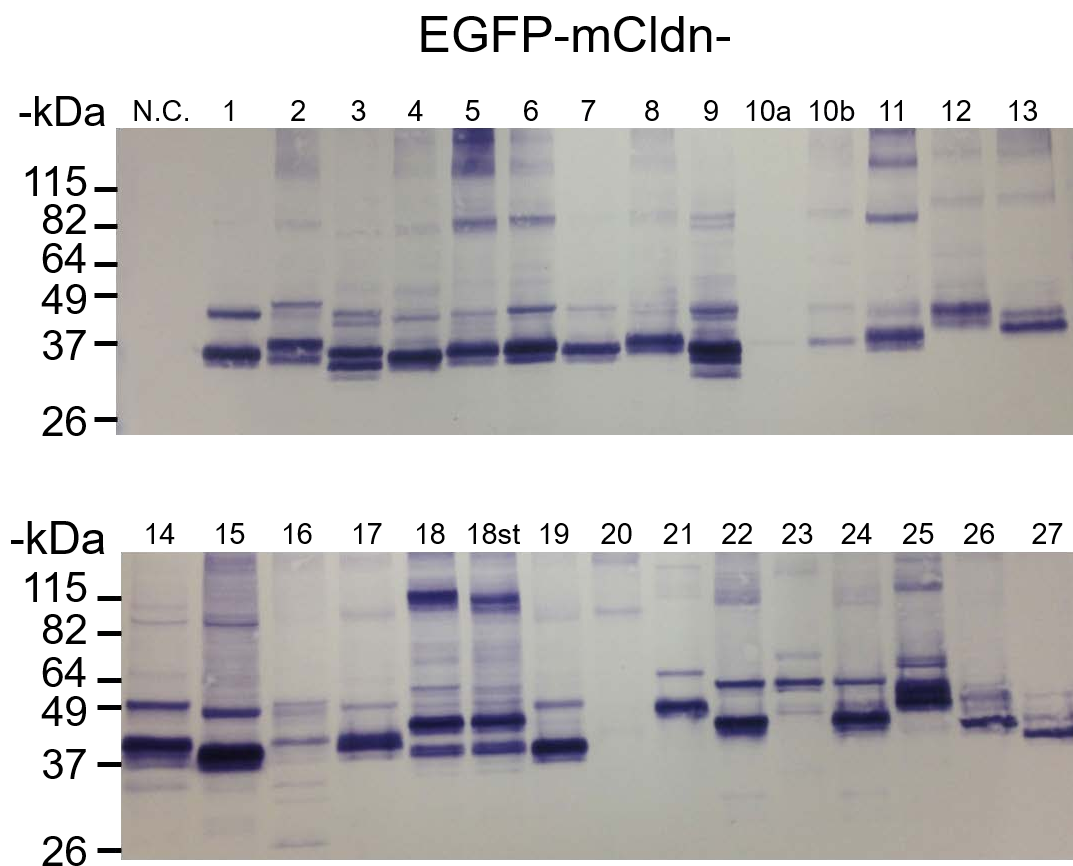


図7 Sf9 昆虫細胞発現系における EGFP-mCldn の発現

EGFP を N 末端に融合させた mCldn 全 27 サブタイプ (29 種類) を Sf9 昆虫細胞発現系で発現させ、その可溶化上清を分析試料として用いた。抗 GFP モノクローナル抗体を一次抗体に用いて、ウェスタンブロッティング法によりバンドを検出した。各レーン上部に mCldn サブタイプの種類を示した。N.C., ネガティブコントロール。

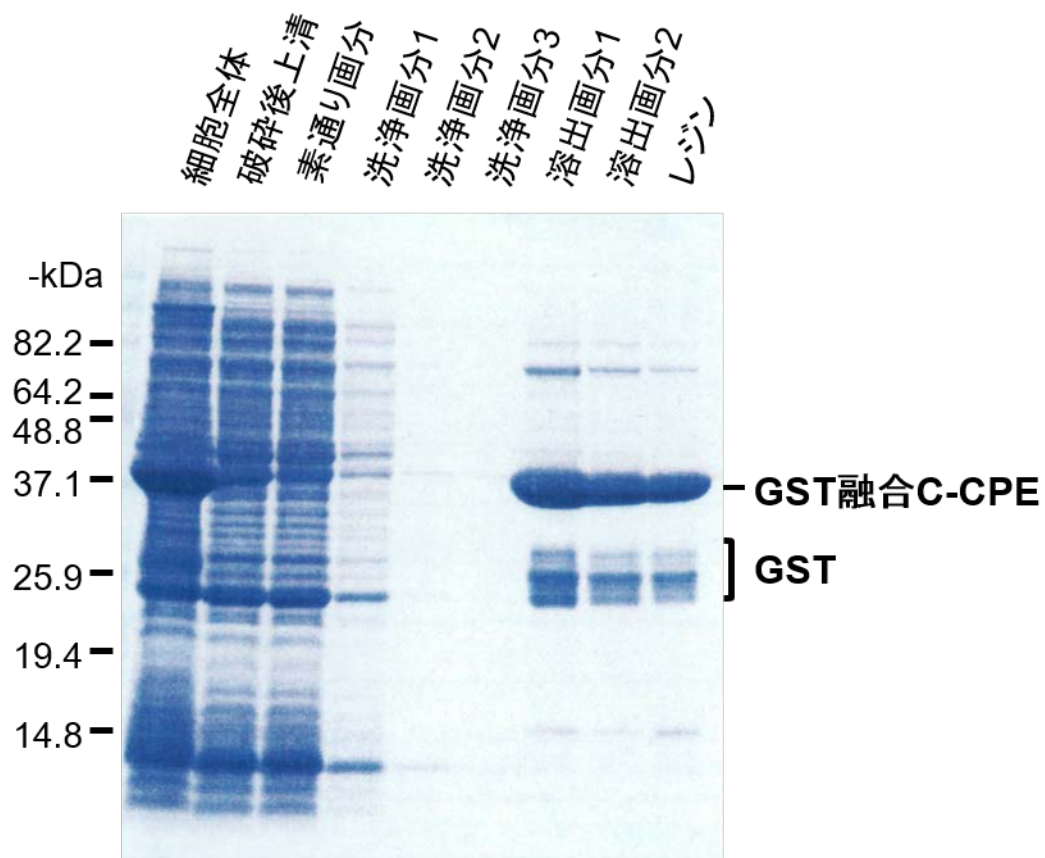


図8 GST タグアフィニティー精製による GST 融合 C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の精製

精製過程の各画分について SDS-PAGE を行い、CBB 染色で検出した。精製 GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ は、FSEC の実験に用いた。

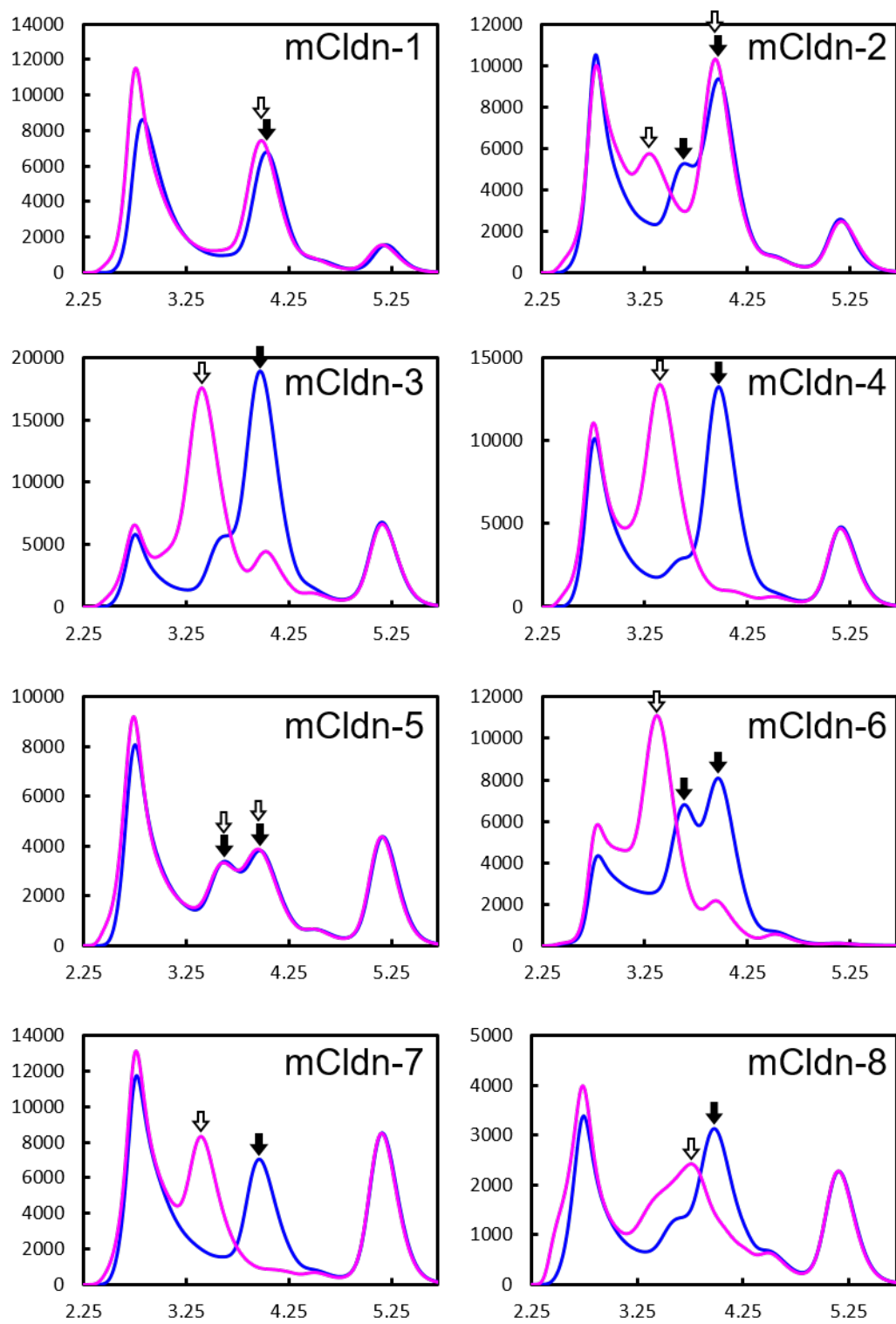


図9 結晶化に適した mCldn のスクリーニング

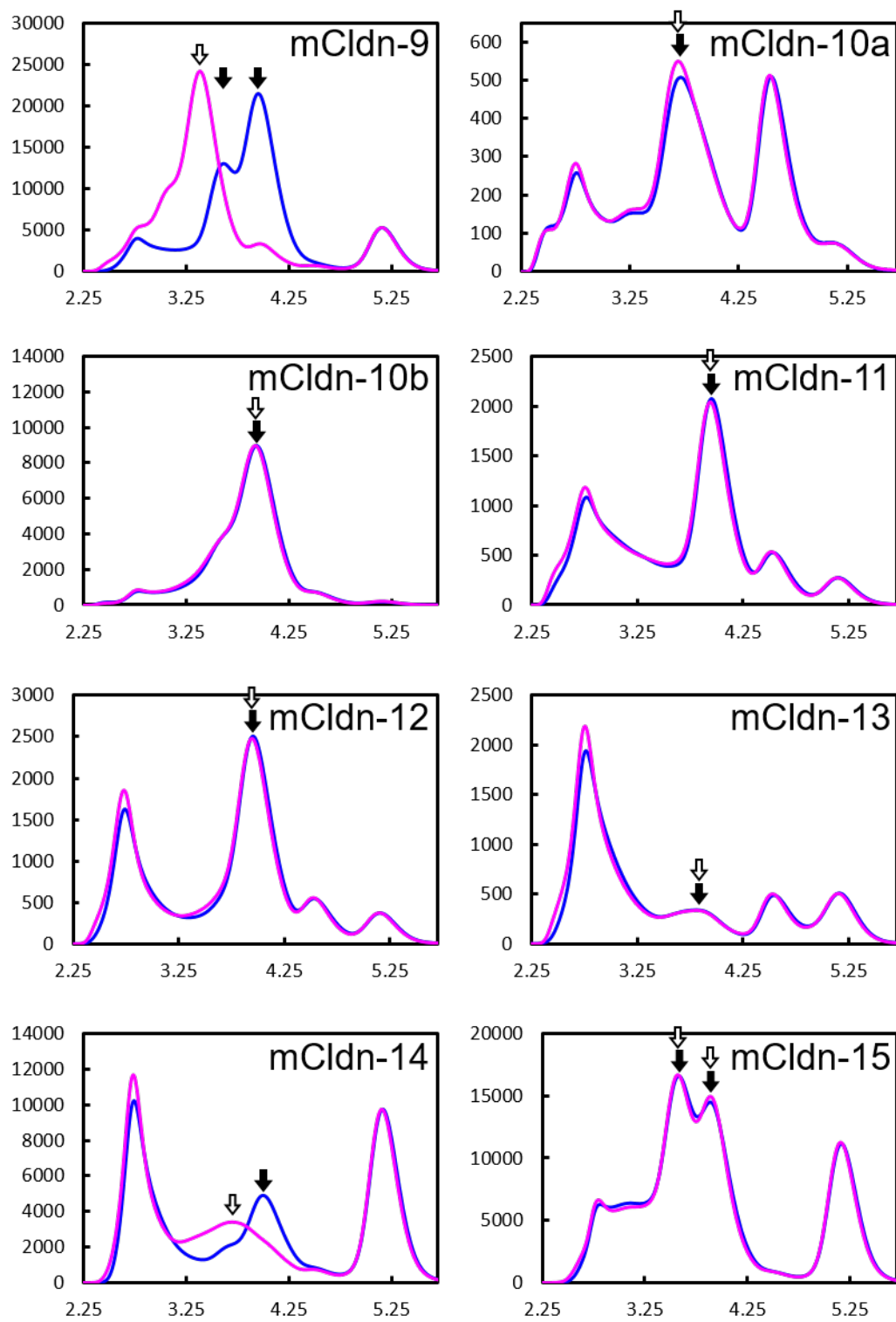


図9 結晶化に適した mCldn のスクリーニング (続き)

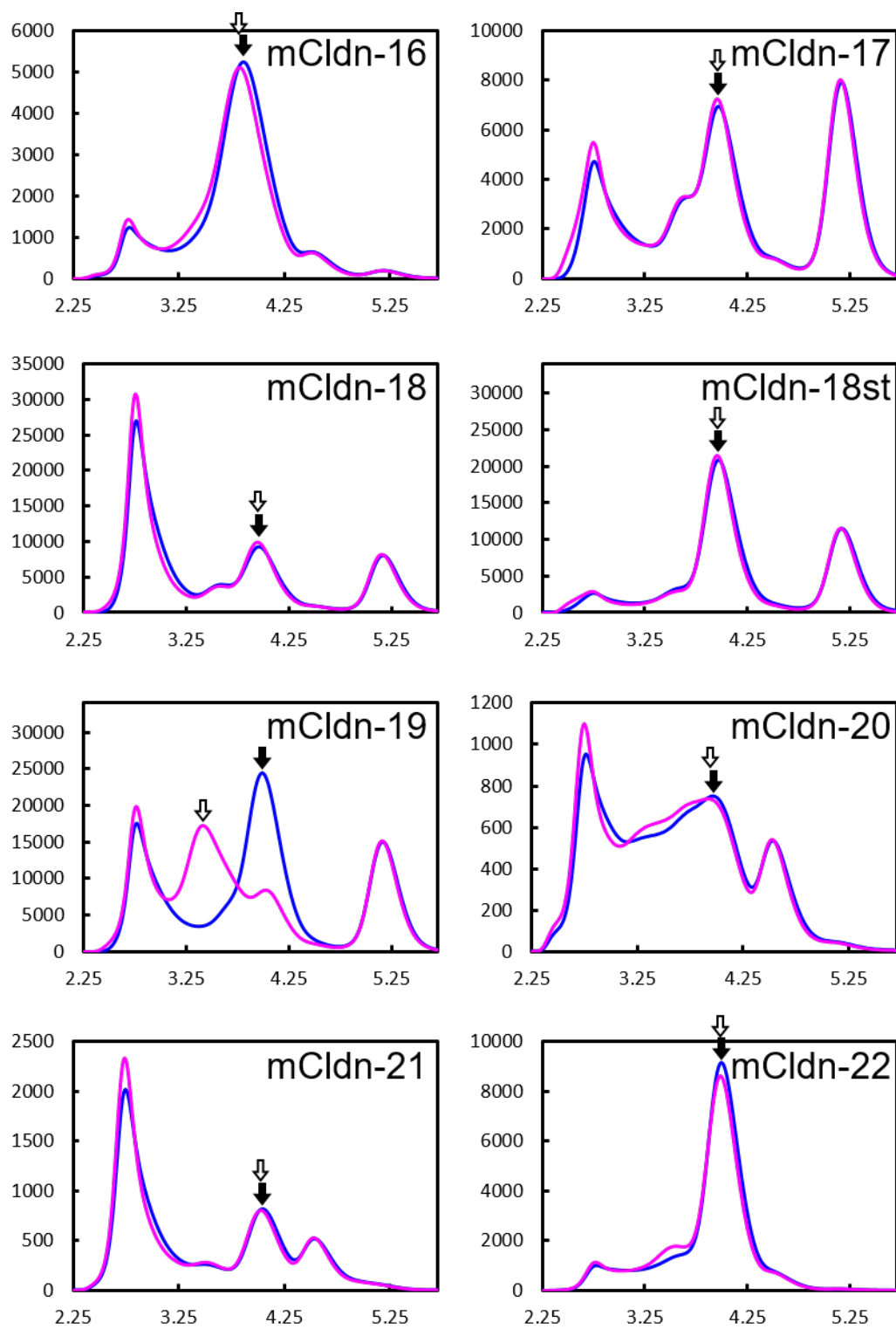


図9 結晶化に適した mCldn のスクリーニング (続き)

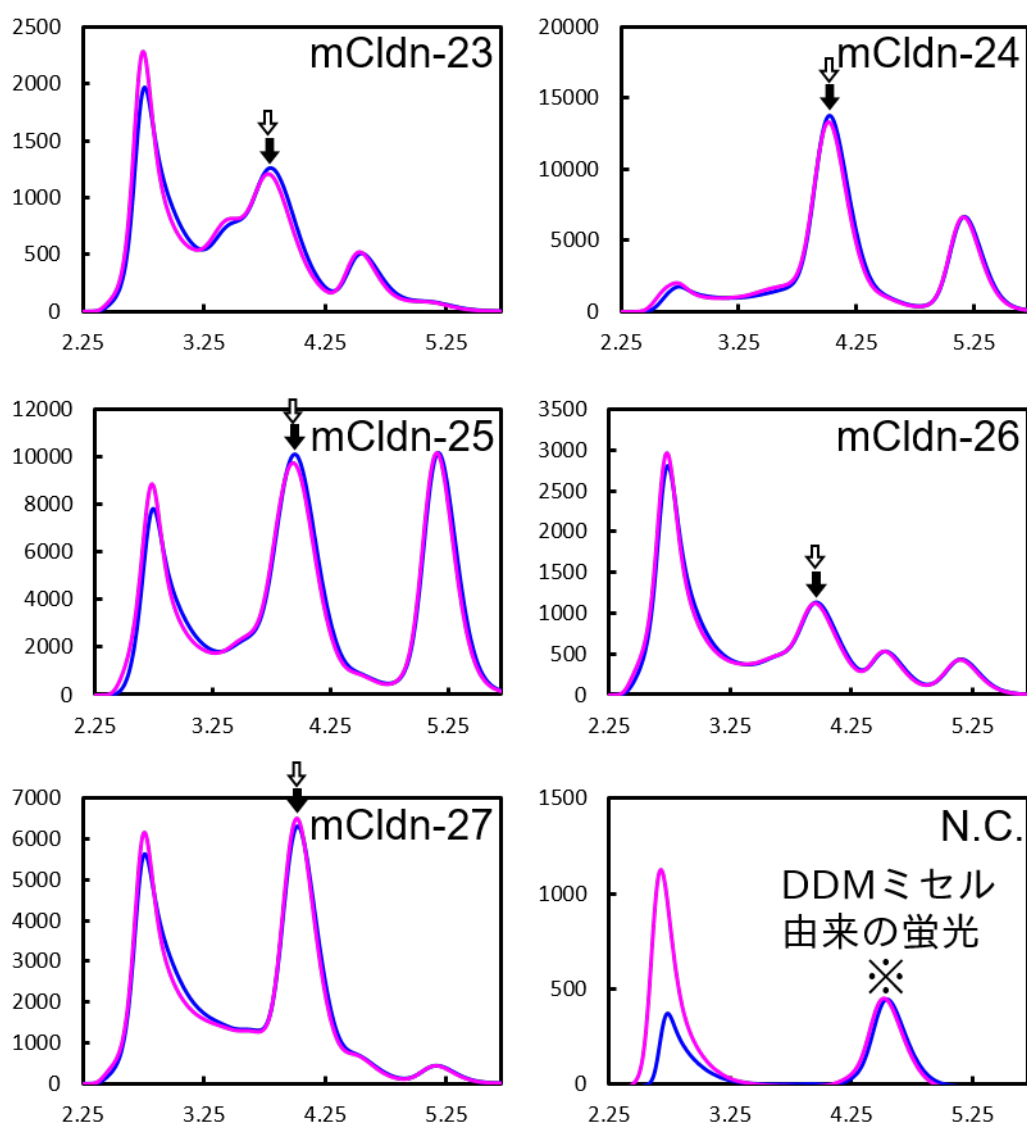


図9 結晶化に適した mCldn のスクリーニング (続き)

EGFP を N 末端に融合させた mCldn 全 27 サブタイプ (29 種類) を Sf9 昆虫細胞発現系で発現させ、その可溶化上清を分析試料として用いた。EGFP 蛍光を基に FSEC によって分析した。縦軸および横軸は、それぞれ、蛍光強度 (arb. unit)、保持時間 (min)。青色およびマゼンタのクロマトグラムは、それぞれ GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 無添加のもの、添加したもの。N.C., ネガティブコントロール。GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 添加前の mCldn のピーク, 黒矢印。; GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 添加後の mCldn のピーク, 白抜き矢印。

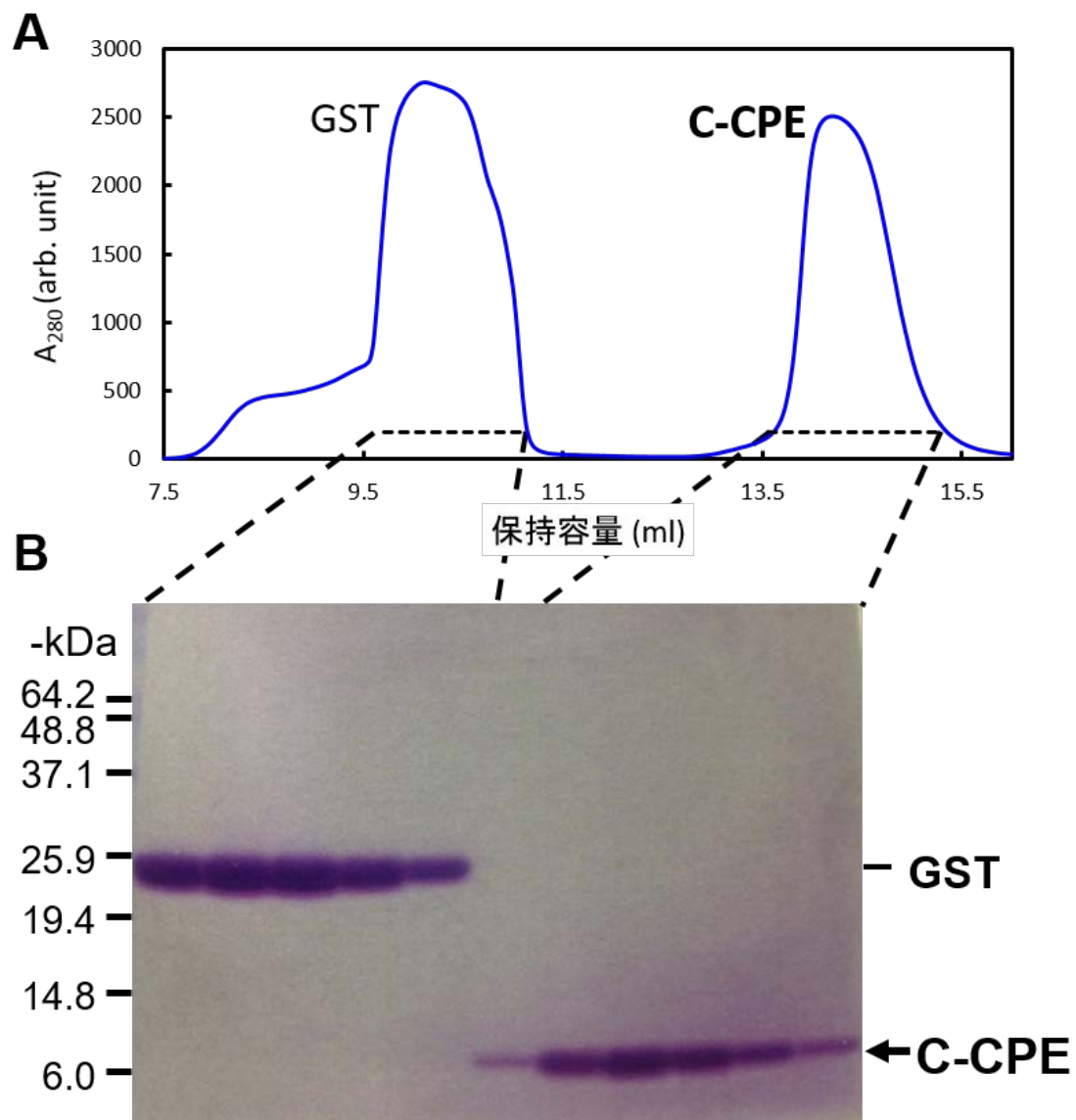


図 10 C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の精製

(A) ゲル濾過クロマトグラフィーによる C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の精製。GST 融合 C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を Thrombin で処理した後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を精製した。
 (B) (A) で分画した画分を SDS-PAGE で分析し、CBB 染色によってバンドを検出した。C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の画分は濃縮し、図 11 の実験に使用した。

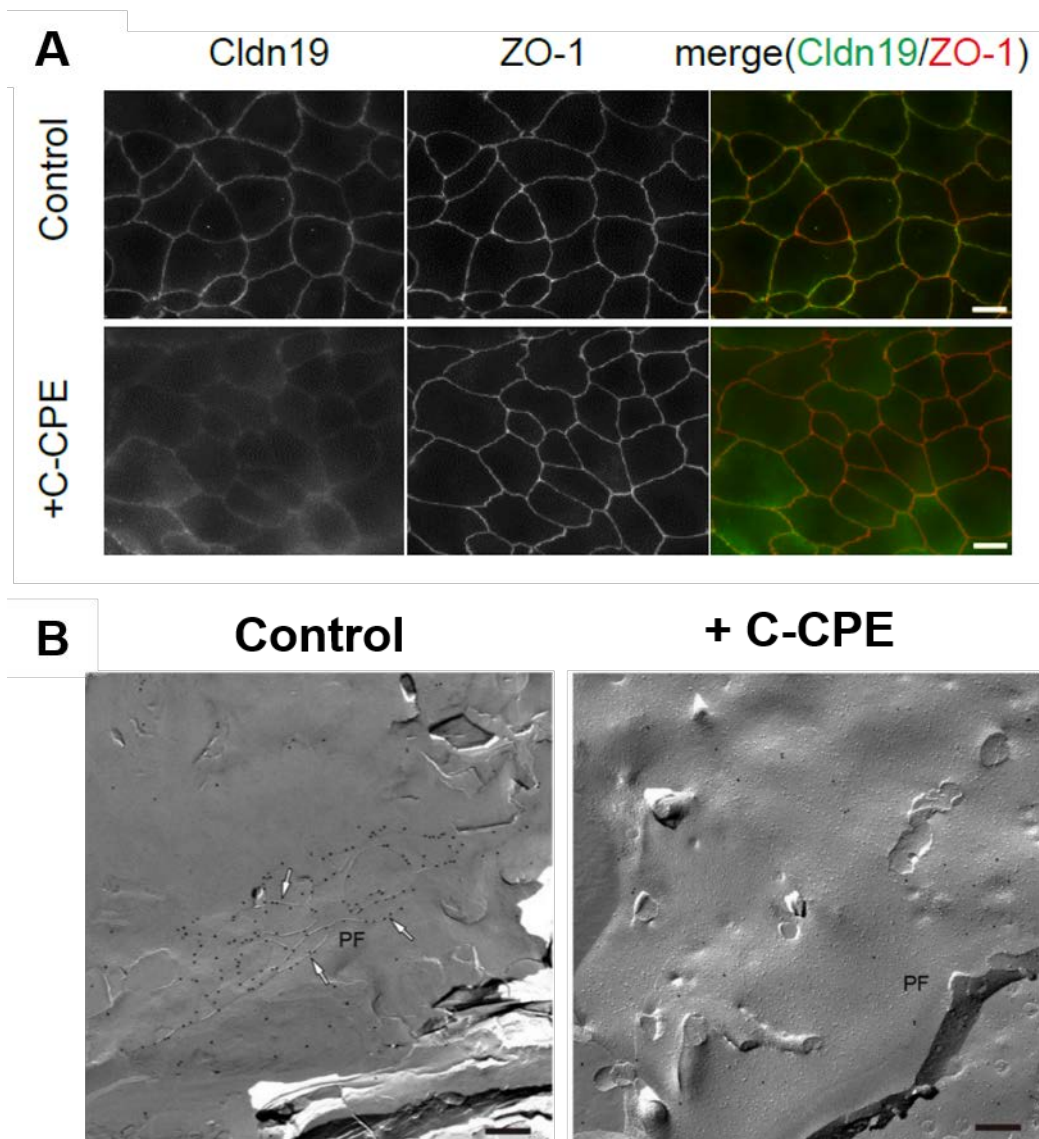


図 11 Venus-mCldn-19 からなる TJ への C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の影響

(A) 安定的に Venus-mCldn-19 を発現する SF7 細胞の免疫蛍光顕微鏡観察。フィルター上で集密的になった SF7 細胞を、100 $\mu\text{g/ml}$ の C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ に暴露したもの (+ C-CPE) と暴露していないもの (Control) の 24 時間後の様子。抗 Cldn-19 抗体と抗 ZO-1 抗体を一次抗体に用いて、Venus-mCldn-19、ZO-1 をそれぞれ検出した。スケールバー, 10 μm 。

(B) (A)の細胞を凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡観察法によって観察した。抗 GFP ポリクローナル抗体で Venus-mCldn-19 を標識した (15 nm 金粒子)。スケールバー, 300 nm。

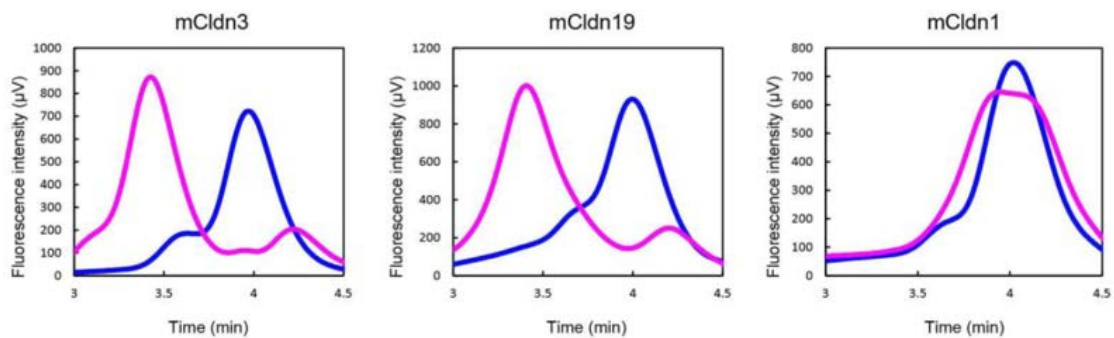


図 12 mCldn サブタイプの違いによる GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 感受性の差

GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の添加による EGFP-mCldn-1, -3, -19 のピークの変化。精製した EGFP-mCldn-1, -3, -19 を分析試料として用い、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 添加の影響を FSEC で分析した。GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の終濃度は 100 $\mu\text{g/ml}$ (7.01 μM)。青色のクロマトグラム, GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 非存在下。マゼンタのクロマトグラム, 7.01 μM の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 存在下。縦軸の蛍光強度は任意単位。

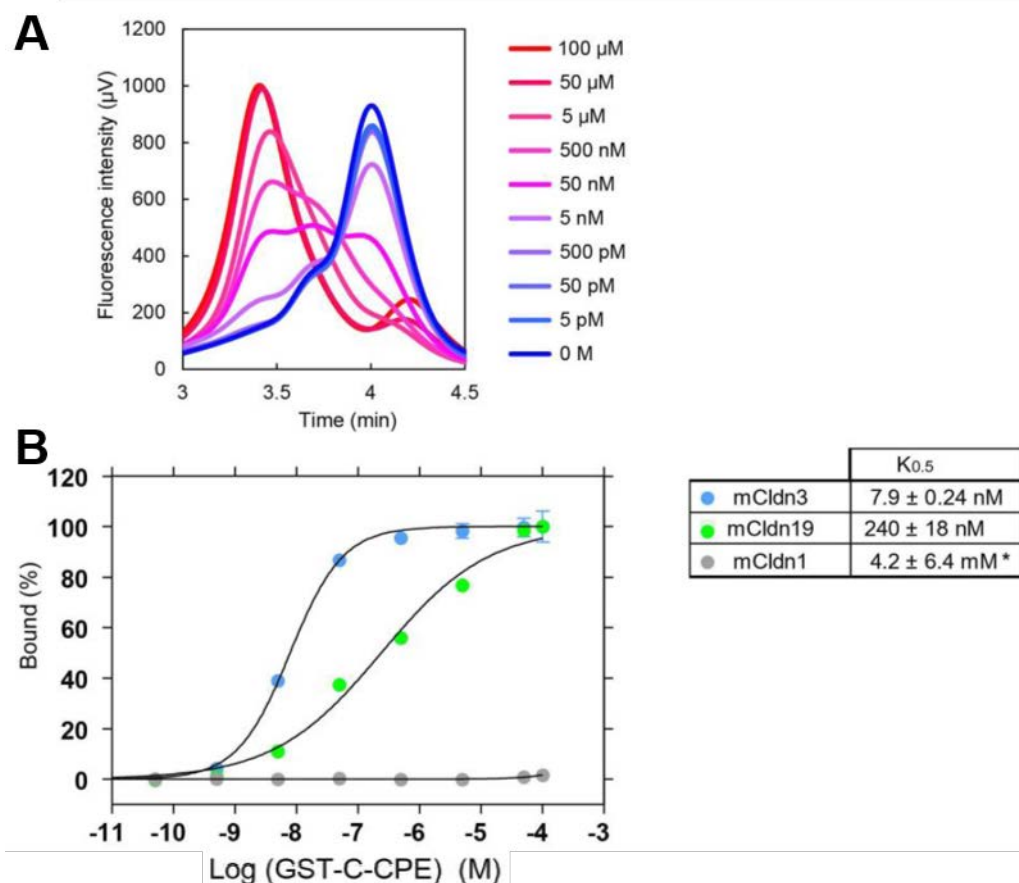


図 13 FSEC を用いた EGFP-mCldn-19 と GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 間のアフィニティー解析

(A) GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の濃度依存的な EGFP-mCldn-19 のクロマトグラム変化。GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度の薄い方から濃い方にかけて、青色から赤色のグラジエントで示してある。縦軸の蛍光強度は任意単位。

(B) GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉/EGFP-mCldn-19 複合体に相当するピークの保持時間における蛍光強度変化を、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の濃度に対しプロットした。ポジティブコントロールとして EGFP-mCldn-3 を用い、ネガティブコントロールとして EGFP-mCldn-1 を用いた。カーブフィッティングにより見かけの解離定数 ($K_{0.5}$) を算出した。*, 有意でない値。

1-2-2. C-CPE/mCldn-19 の結晶構造解析

1-2-1 にて、結晶化に適した mCldn として mCldn-19 を選別したので、C-CPE と mCldn-19 との複合体の X 線結晶構造解析を試みた。まず、結晶化のために mCldn-19 および C-CPE について結晶化コンストラクトの至適化を行った。Cldn の TM2 および TM4 直後の膜近傍に位置するシステイン残基は、細胞内にてパルミトイル化されるという報告がされている [98]。このパルミトイル化は Cldn の TJ への局在を促進させるが、Cldn の安定性およびストランド形成には影響しないと考えられている。全ての Cldn 分子が均一にパルミトイル化の修飾を受けないおそれがあるので、均一性を高めるためにパルミトイル化されることが推測される膜近傍の 3 つのシステイン残基をアラニン残基に置換した (C104A, C183A, C184A)。さらに、DISOPRED [99] による特定の構造をとっていない領域の予測結果を基に、特定の構造をとっていない可能性が高い mCldn-19 の C 末端尾部を 26 残基 (C186-V211) 除いた。以降、この結晶化コンストラクトを mCldn-19_{cryst} と表記する (図 14A)。

次に、C-CPE の結晶化コンストラクトの至適化を行った。報告されている C-CPE の結晶構造 (PDB ID: 2QUO [27]) では、Cldn 結合ドメイン以外の余分な領域 (D194~L202 の領域) が見られた。この領域を削除し、CPE のアミノ酸配列のうち 203-319 の領域を用いることにした。さらに、C-CPE への S313A の変異導入は C-CPE の受容体である Cldn-4 へのアフィニティーを上昇させるという報告 [100] があることから、mCldn-19 へのアフィニティーも大きくなることを期待し、S313A 変異体を用いることにした。以降、この結晶化コンストラクトを C-CPE_{cryst} と表記する (図 14B)。

C-CPE_{cryst} および mCldn-19_{cryst} をそれぞれ、大腸菌発現系および Sf9 昆虫細胞発現系を用いて大量発現・精製した (図 15, 図 16)。精製した C-CPE_{cryst} と mCldn-19_{cryst} を混合し、C-CPE/mCldn-19 複合体を形成させ、精製した (図 17)。精製した C-CPE/mCldn-19 複合体を用い、蒸気拡散法によって様々な条件での結晶化を試みたところ、「実験方法 -結晶化-」に記載した条件で約 250 μm の結晶が作製できた (図 18A)。大型放射光施設, SPring-8 のビームライン, BL32XU にて、この結晶に X 線マイクロビームを照射し 3.7 Å 分解能で回折データを収集した (図 18B)。この回折データセットを基に、分子置換法によって C-CPE と mCldn-19 との複合体の結晶構造を 3.7 Å 分解能で決定した (表 3, 図 19, 図 20, PDB ID: 3X29)。

結晶中の非対称単位中には、C-CPE_{cryst} と mCldn-19_{cryst} が 1:1 で結合した複合体が 2 つ含まれており、それらは上下逆さまに並んでいた (図 19A, B)。この非対称単位に含まれる 2 つの C-CPE/mCldn-19 複合体は、それぞれ異なる結晶化コンタクトをしているにも関わらず、C α 原子間の平均二乗偏差 (RMSD) が 0.39 Å であり、ほぼ同じコンフォメーションであった (図 19C, 図 21B)。C-CPE/mCldn-19 複合体中における C-CPE_{cryst} の構造を、Cldn が結合していない C-CPE の構造 (PDB ID: 2QUO [27]) と比較したところ、 $\alpha 3$ ヘリックスと $\beta 9$ ストランド間の領域にわずかな違いが見られたものの、C α 原子間の RMSD は 0.88 Å であり、

互いに同様のコンフォメーションをとっていた (図 21C)。mCldn-19 に結合した C-CPE_{cryst} の構造を Cldn が結合していない CPE 全長の構造 (PDB ID: 3AM2 [28]) と比較したところ、 $\alpha 3$ ヘリックスと $\beta 9$ ストランド間の領域には違いは見られず、ほぼ同一のコンフォメーションをしていた (RMSD: 0.47 Å) (図 21D)。そのため、C-CPE_{cryst} の構造と Cldn が結合していない C-CPE の構造 (PDB ID: 2QUO [27]) の間に見られたわずかな違いは、異なる結晶パッキング相互作用によるものと考えられた。したがって、C-CPE の構造は mCldn-19_{cryst} への結合の有無に関わらずほとんど変化しないと考えられた。

mCldn-19_{cryst} の全体構造は CPE 結合能を持たない mCldn-15 の結晶構造と似ていた (図 22A)。特に膜貫通領域については、mCldn-19_{cryst} も 4 本の TM ヘリックスが左巻きのヘリックスバンドルを形成しており、mCldn-15 の構造と同様であった (図 22A)。一方、mCldn-19_{cryst} の ECS1 および ECS2 については、mCldn-15 の結晶構造と異なる点が見られた (図 22, 図 23)。mCldn-15 の構造では $\beta 1$ ストランドと $\beta 2$ ストランド間のループ (アミノ酸残基 35-42) はディスオーダーしていたが、mCldn-19_{cryst} の構造では明瞭に見えており、C-CPE と相互作用していた (図 23, 図 24A, 図 26A および B)。mCldn-19_{cryst} の ECS2 は mCldn-15 の ECS2 と比べ C-CPE 側に傾いており、C-CPE の疎水性のポケットにはまり込んでいた (図 22, 図 24, 図 26, 図 27)。mCldn-19_{cryst} の TM3, TM4 間のループにある $\beta 5$ ストランドは、mCldn-15 のものよりも長く、隣の $\beta 1$ ストランドとより多くの水素結合を形成していた (図 22)。また、 $\beta 3$ ストランドおよび $\beta 4$ ストランドに存在する高度に保存されたシステイン残基 (C54 と C64) 間のジスルフィド結合は、mCldn-15 の構造と同様に mCldn-19_{cryst} の構造でも明瞭に見られた (図 24A, 図 26A および B)。C-CPE と相互作用している mCldn-19_{cryst} の $\beta 3$ ストランドと $\beta 4$ ストランドは、mCldn-15 と比べると外側に反っており、mCldn-15 で見えていたその先端のループは、mCldn-19_{cryst} の構造ではディスオーダーしていた (図 22, 図 23, 図 24A)。最後に、 $\beta 4$ ストランドと TM2 をつなぐ ECS1 中の領域 (残基 69-74) は、mCldn-15 の構造では膜表面にほぼ平行な短い細胞外ヘリックス (ECH) になっていたが (図 22, 図 23)、mCldn-19_{cryst} の結晶構造ではディスオーダーしていた (図 22, 図 23, 図 24)。

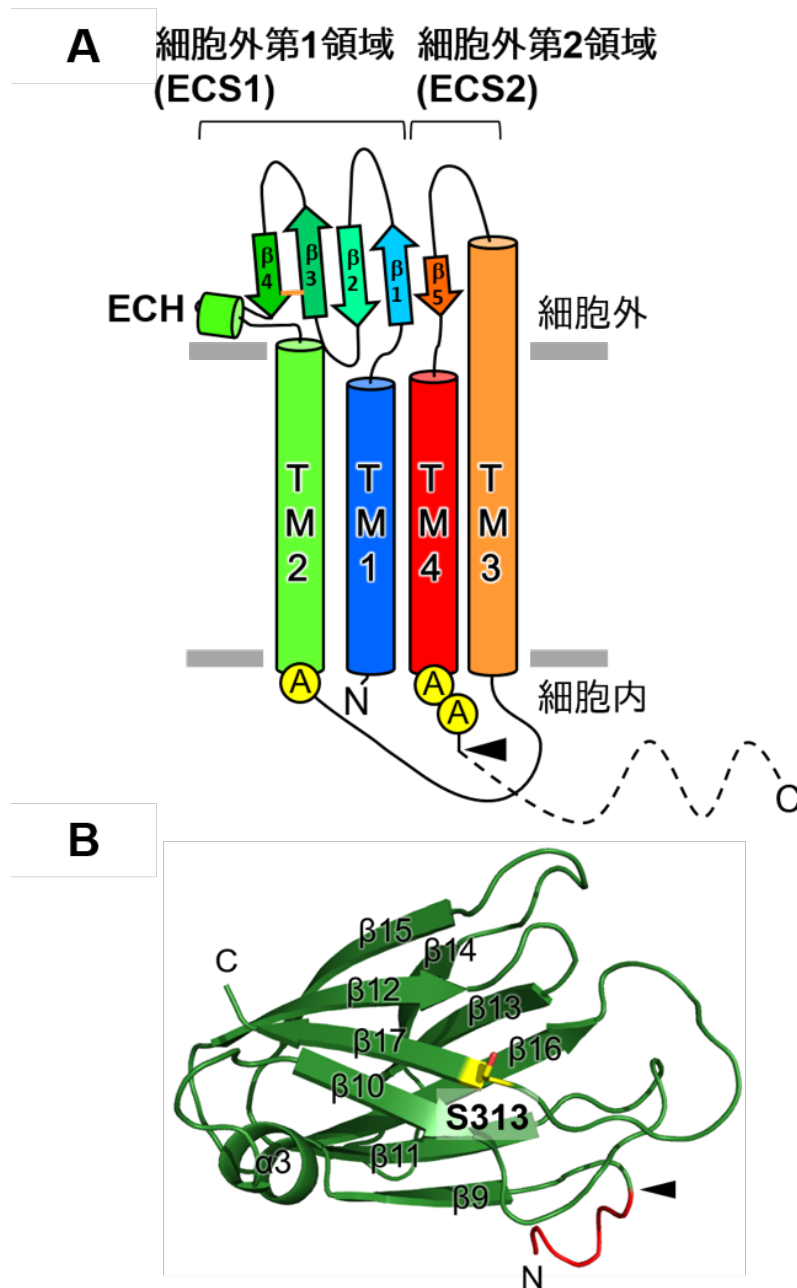


図 14 mCldn-19 および C-CPE の結晶化コンストラクト

(A) mCldn-19 の結晶化コンストラクト (mCldn-19_{cryst})。 パルミトイル化を受けることが推測される 3 ヶ所のシステイン残基をアラニン残基に置換し (TM2 の直下, C104A; TM4 の直下, C183A, C184A)、ディスオーダー領域と推測される C 末端を 26 残基除いた (破線で表した C186-V211 を除去。除いた後の C 末端の位置を矢頭で示した。)。

(B) C-CPE の結晶化コンストラクト (C-CPE_{cryst})。 C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の結晶構造 (PDB ID: 2QUO [27]) をリボンモデルで示した。赤色で余分な領域を示した。矢頭の位置 (L202) まで N 末端を除き、S313 (黄色のスティックモデル) をアラニン残基に置換した。βストランド、αヘリックスの番号付けは、文献 [28] に従った。

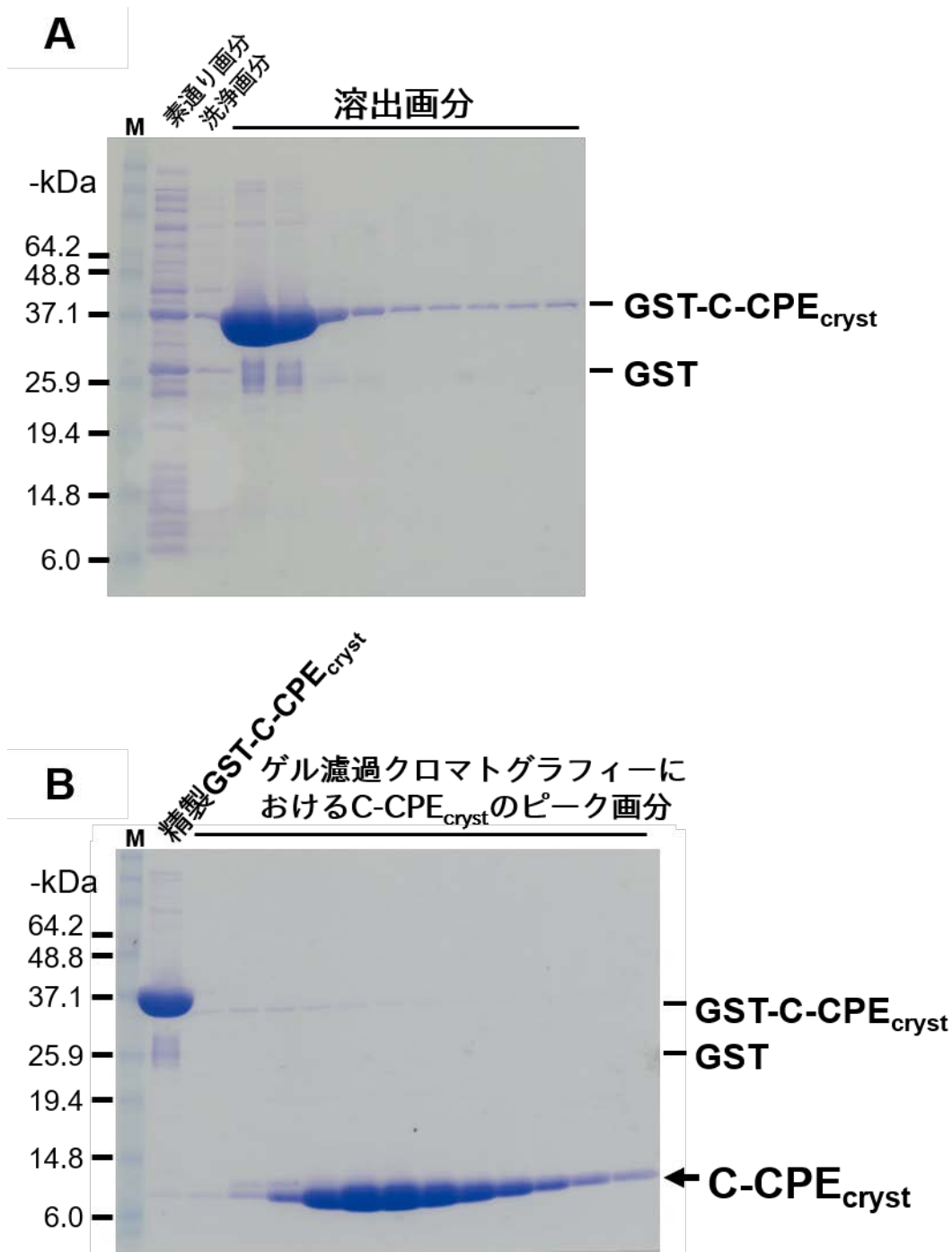


図 15 C-CPE_{cryst} の精製

(A) GST タグアフィニティー精製による GST-C-CPE_{cryst} の精製。精製時の各画分を SDS-PAGE で分析し、CBB 染色をした。GST-C-CPE_{cryst}, 39.4 kDa; GST, 26 kDa。M, マーカー。

(B) ゲル濾過クロマトグラフィーによる C-CPE_{cryst} の精製。C-CPE_{cryst} のピークの画分を SDS-PAGE で分析し、CBB 染色をした。C-CPE_{cryst}, 13.3 kDa。

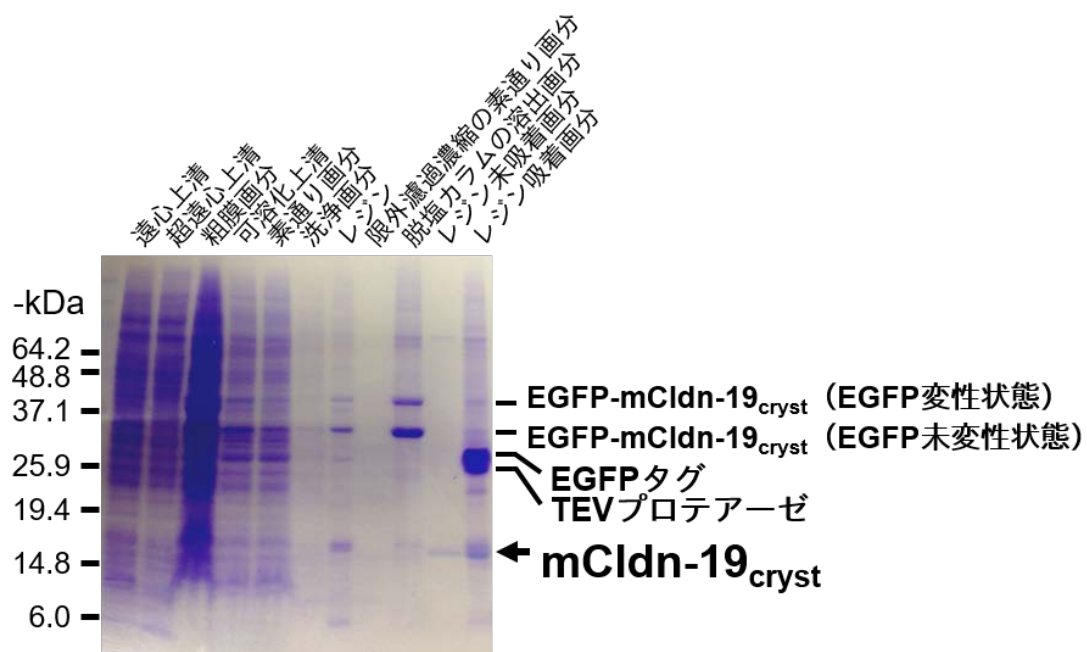


図 16 mCldn-19_{cryst} の精製

His タグアフィニティー精製後に、脱塩カラムを用いて溶出画分からイミダゾールを除去した。脱塩カラムの溶出画分に TEV プロテアーゼを加えて EGFP タグを切断した。TEV プロテアーゼおよび EGFP タグはレジンに吸着させた。レジン未吸着画分を精製 mCldn-19_{cryst} として回収した。EGFP-mCldn-19_{cryst}, 49.3 kDa; EGFP タグ, 29.4 kDa; TEV プロテアーゼ, 27.5 kDa; mCldn-19_{cryst}, 19.8 kDa。

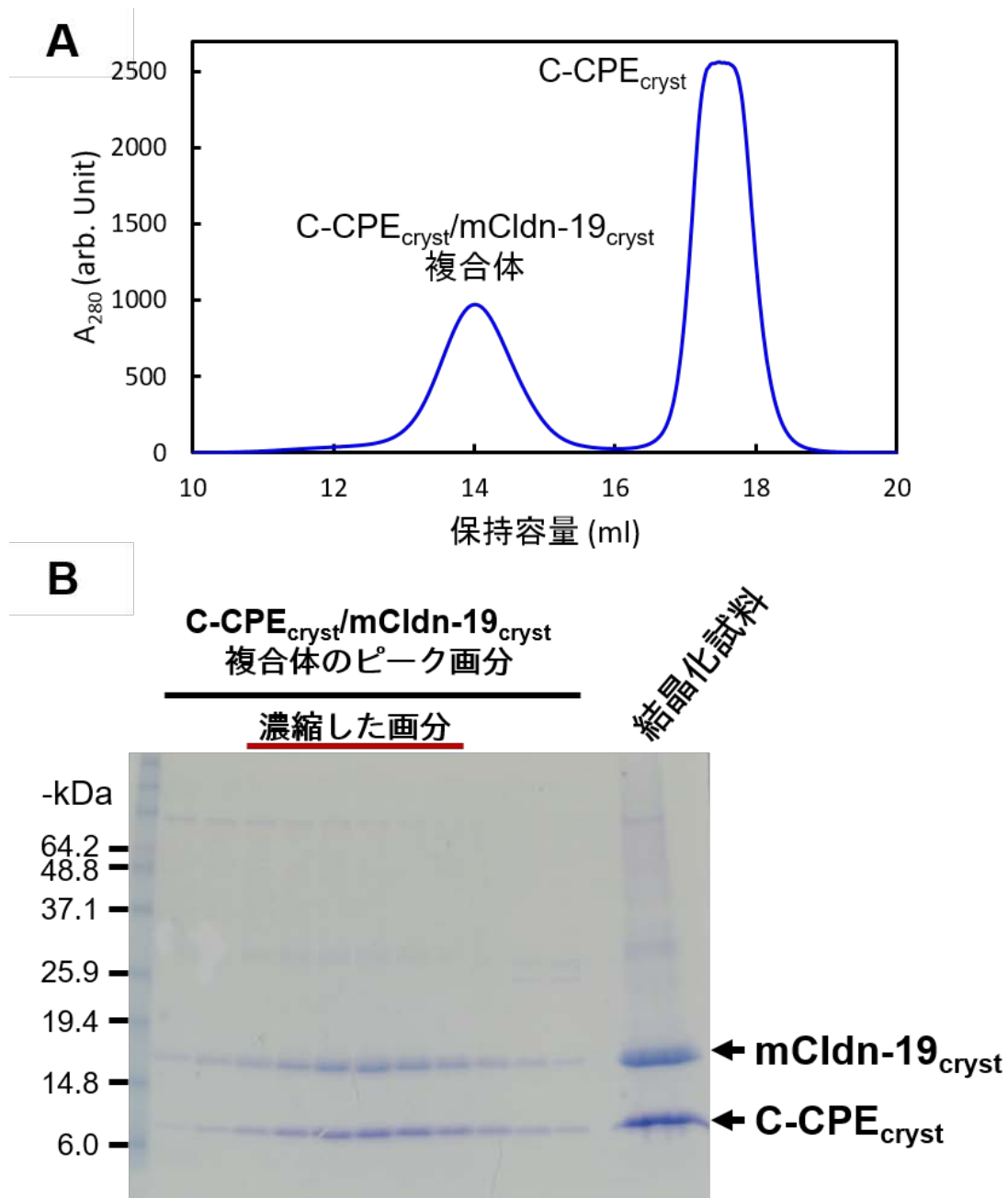


図 17 C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体の精製

(A) ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製。精製 C-CPE_{cryst} と精製 mCldn-19_{cryst} を混合して C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体を形成させたものを分析試料とした。ゲル濾過クロマトグラフィーによって、C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体のピーク領域を分画した。

(B) C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体の精製純度の確認。ゲル濾過クロマトグラフィーによって分画した試料および結晶化試料を SDS-PAGE によって分析し、CBB 染色をした。黒線で示したレーン，分画した C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体の画分；赤線で示したレーン，濃縮に用いた画分。mCldn-19_{cryst}, 19.8 kDa; C-CPE_{cryst}, 13.3 kDa。

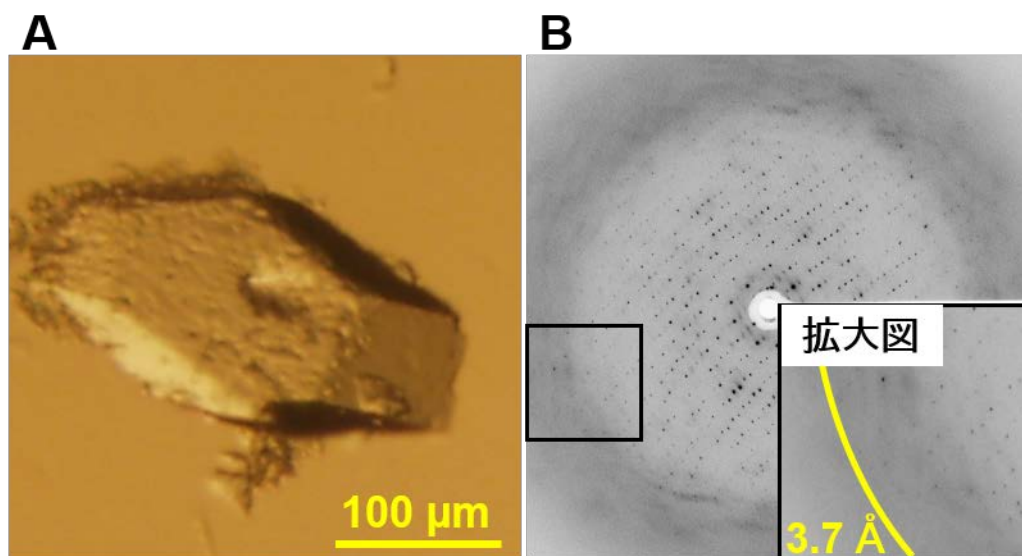


図 18 C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体の結晶とその X 線回折能

(A) 蒸気拡散法によって作製した C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体の結晶。スケールバー, 100 μm。

(B) C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体の結晶の X 線回折能。大型放射光施設 SPring-8 の BL32XU にて、結晶に X 線を照射した際に見られた回折点。四角で囲んだ領域の拡大図を示した。

	天然体
データ収集	BL32XU
空間群	$P2_12_12_1$
格子定数	
a, b, c (Å)	79.86, 122.36, 132.59
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0
波長 (Å)	1.0000
R_{merge}	0.057 (0.399)
$I/\sigma I$	23.6 (2.1)
コンプリーteness (%)	97.3 (92.5)
多重度	5.4 (3.6)
分解能 (Å)	34.7-3.70 (3.83-3.70)
独立した反射点の個数	
観測した反射点	14027
精密化に使用した反射点 [テストセット]	14006 [1407]
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}^{\dagger}$	0.251 (0.323) / 0.293 (0.353)
原子の数	
mCldn-19 _{cryst}	2319
C-CPE _{cryst}	1864
B因子	
mCldn-19 _{cryst} (Å ²)	126
C-CPE _{cryst} (Å ²)	135
R.m.s偏差	
結合長 (Å)	0.002
結合角 (°)	0.645
ラムチャンドラプロット	
最優先許容 (%)	98.3
許容可能 (%)	1.7
不可 (%)	0

表3 結晶学的データ収集と構造精密化計算に関する統計量

括弧内は最外殻の分解能に対する値。 $^{\dagger}R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = \sum ||\text{Fobs}| - |\text{Fcalc}|| / \sum |\text{Fobs}|$

Fobs, 観測された構造因子; Fcalc, 計算された構造因子。 R_{free} は全ての反射点の 10%を用いて計算し、全体の精密化過程には使用しなかった。

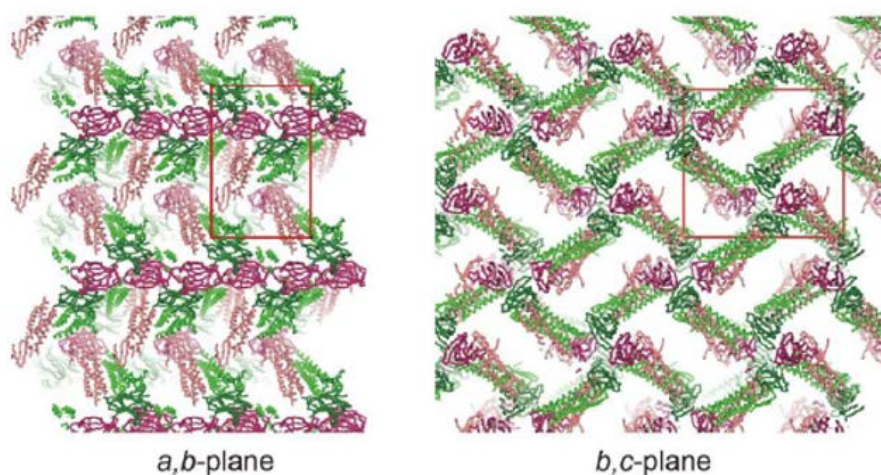
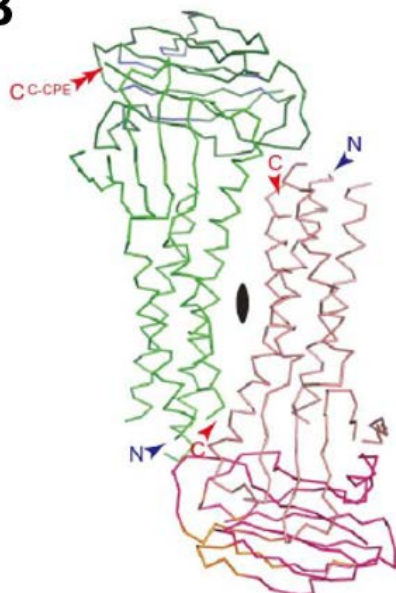
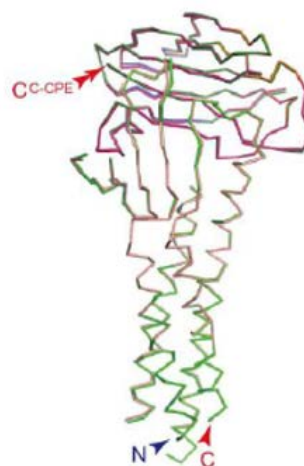
A**B****C**

図 19 C-CPE/mCldn-19 複合体の結晶パッキング

(A) $P2_12_12_1$ 空間群における C-CPE/mCldn-19 複合体の結晶パッキングを a, b 面に垂直な方向から見た図 (左) と b, c 面に垂直な方向から見た図 (右)。赤色の四角, 単位胞。

(B) 非対称単位中に見られる 2 つの C-CPE/mCldn-19 複合体は、緑とサーモンピンク (mCldn-19_{cryst})、フォレストグリーンとマゼンタ (C-CPE_{cryst}) でそれぞれ示した。結晶コンタクトは C-CPE 間でのみ見られ、グレーと黄色でその箇所を示した。青色と赤色の矢頭で mCldn-19_{cryst} の N 末端と C 末端をそれぞれ示した。C-CPE の C 末端は二重矢頭で示した。黒色の楕円, 非結晶学的な 2 回回転軸。

(C) 非対称単位中の 2 つの複合体の重ね合わせ。2 つの複合体の Cα 間の RMSD: 0.39 Å。

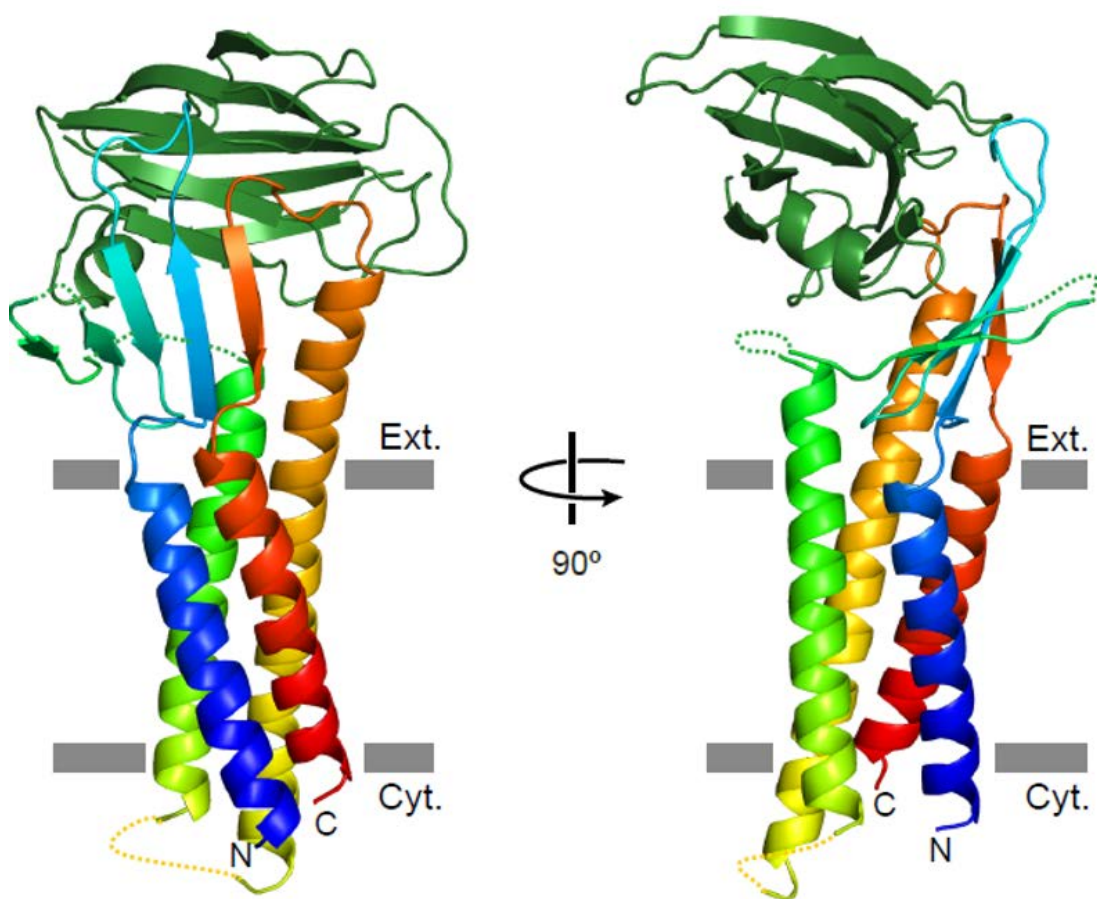


図 20 C-CPE/mCldn-19 複合体の全体構造

リボンモデルで示した C-CPE/mCldn-19 複合体を、膜面と平行な方向から見た図。mCldn-19_{cryst} は N 末端から C 末端にかけて、青色から赤色に変化する虹色で示した。C-CPE_{cryst} はフォレストグリーンで示した。ディスオーダー領域は破線で示した。グレーの長方形は推測される膜の境界を示している。Ext., 外葉; Cyt., 内葉。PDB ID: 3X29。

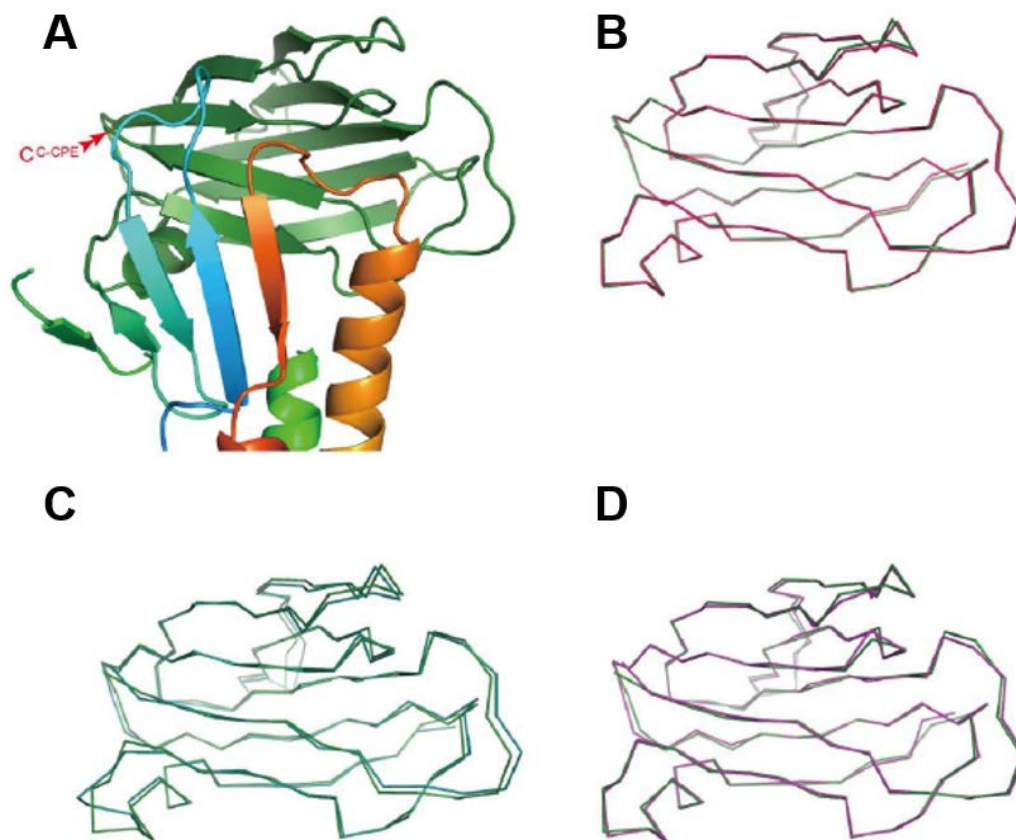


図 21 mCldn-19 の結合による C-CPE の構造への影響

(A) リボンモデルで示した mCldn-19 結合状態の C-CPE_{cryst} の構造を膜面に平行な方向から見た図。Cldn が結合していない他の C-CPE の構造の C α トレースを、複合体中の C-CPE の構造に重ね合わせた (C および D)。二重矢頭、C-CPE の C 末端。

(B) C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体結晶の非対称単位における 2 つの独立した C-CPE の重ね合わせ。色分けは図 19 と同じ (RMSD: 0.30 Å)。

(C) C-CPE (PDB ID: 2QUO [27]) 単体の構造と mCldn-19 に結合した C-CPE_{cryst} の構造の重ね合わせ (RMSD: 0.88 Å)。

(D) 全長 CPE の C-CPE 領域 (PDB ID: 3AM2 [28]) と、mCldn-19 に結合した C-CPE の構造の重ね合わせ (RMSD: 0.47 Å)。

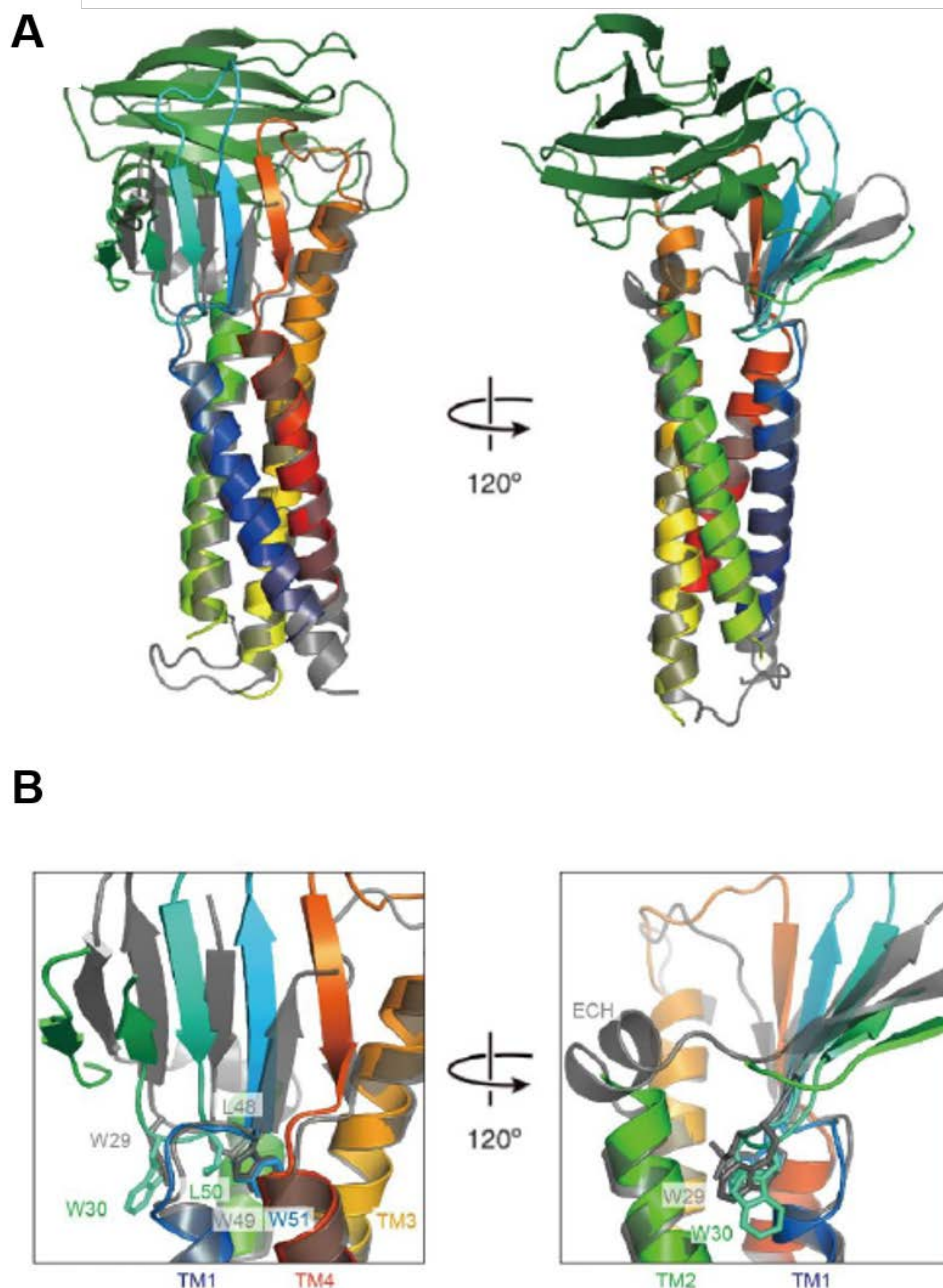


図 22 C-CPE が結合した mCldn-19 と C-CPE が結合していない mCldn-15 の比較

(A) C-CPE_{cryst}/mCldn-19_{cryst} 複合体と mCldn-15 の全体構造を重ね合わせて、膜面に平行な方向から見た図。両構造はリボンモデルで示した。複合体構造の色は図 20 と同じ。mCldn-15 は透明なグレーで示した。

(B) mCldn-19_{cryst} と mCldn-15 の細胞外ドメインの拡大図。C-CPE は明瞭にするために省いた。W-LW コンセンサスモチーフ (スティックモデルで表示) は、mCldn-19_{cryst} および mCldn-15 の構造において、どちらも 4 本のヘリックスバンドルによって作られる凹部に位置していた。

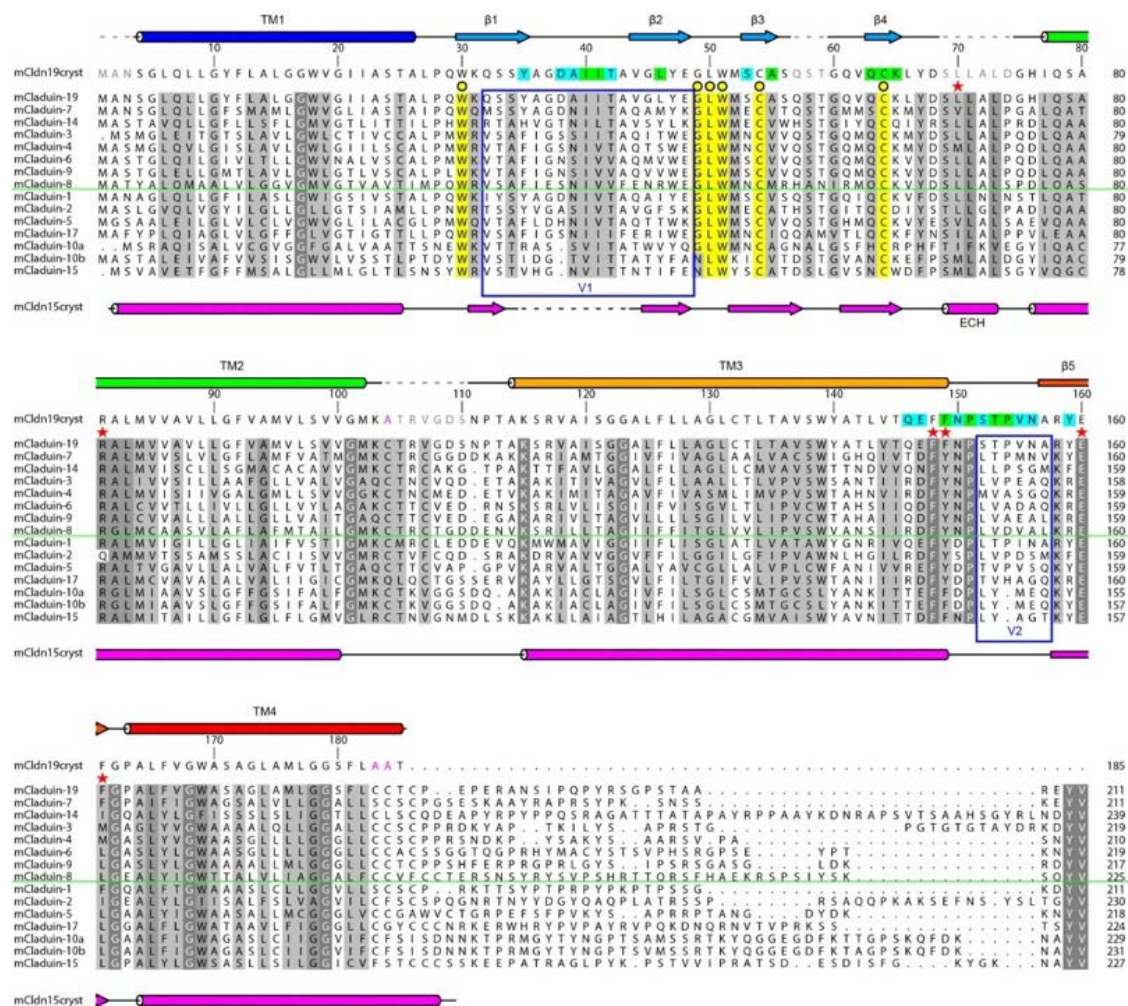


図 23 クラシック Cldn の多重整列

クラシック Cldn [77] に分類される次の mCldn のアミノ酸配列を整列させた: 結晶化に使用した mCldn-19 コンストラクト (mCldn-19_{cryst}), mCldn-19, mCldn-7, mCldn-14, mCldn-3, mCldn-4, mCldn-6, mCldn-9, mCldn-8, mCldn-1, mCldn-2, mCldn-5, mCldn-17, mCldn-10a, mCldn-10b, mCldn-15 (各 mCldn のアミノ酸配列は表 2 に示したものをを用いた)。mCldn-19_{cryst} と mCldn-15 の二次構造要素は配列の上下にそれぞれ示した。αヘリックスは円柱で示し、βストランドは矢印で示した (mCldn-19_{cryst} の色付けは図 20 と同じ)。破線は、mCldn-19_{cryst} と mCldn-15 の構造においてディスオーダーしていた領域。CPE 感受性の Cldn サブタイプは緑色の線の上に並べ、CPE 非感受性の Cldn サブタイプは線の下に並べた。アミノ酸配列の番号付けは全長の mCldn-19 に基づいて行った。mCldn-19_{cryst} の配列において、グレーの文字はディスオーダーした残基を示し、マゼンタの文字はパルミトイル化を受ける可能性があるためにアラニン残基に置換した部位を示した。C-CPE との水素結合および疎水性相互作用に関わる残基は、それぞれシアンと緑色で示した。赤色の星印は、mCldn-15 の結晶構造にお

るモノマーの線状配列から推測される、mCldn-19_{cryst} モノマー間の側方相互作用 (シス相互作用) に関わる可能性のある残基を示した。Cldn コンセンサス配列 (W-GLW-C-C) は黄色で示した。高度に保存された残基はグレーの背景によって示し、保存性の度合いはグレーの暗さによって示した。

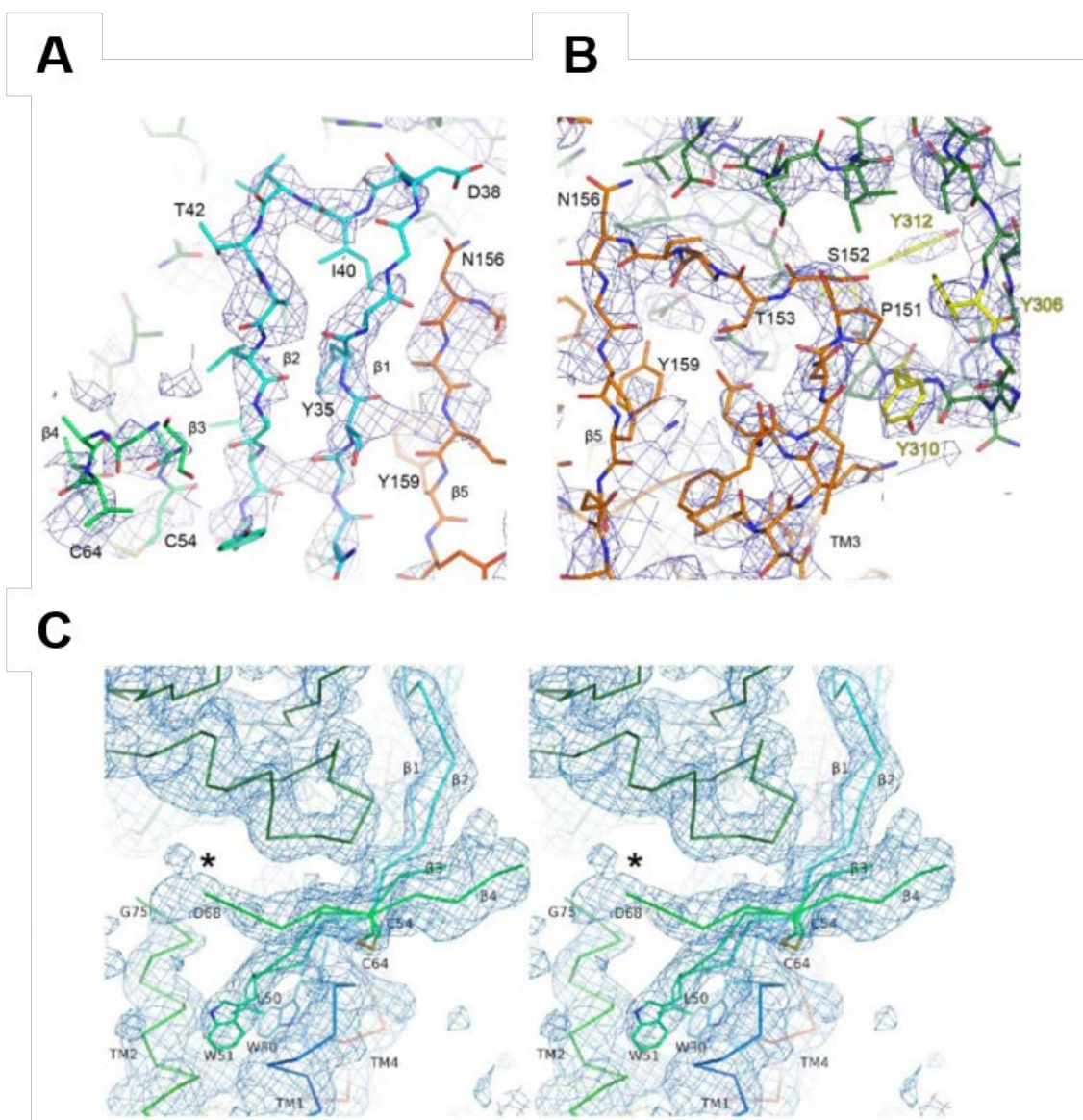


図 24 C-CPE と相互作用している mCldn-19_{cryst} の ECS1 および ECS2 周辺の電子密度マップ

(A, B) 3.7 Å 分解能でのコンポジットオミットマップ。mCldn-19_{cryst} の ECS1 (A) と ECS2 (B) の周辺を 1.2 σ でそれぞれ輪郭づけた (青色のメッシュ)。

(C) 1.0 σ で輪郭づけた 2Fo-Fc マップ (シアンのメッシュ) のステレオ図。 ディスオーダーしていた mCldn-19_{cryst} の ECH 領域 (S69-D74) をアスタリスクで示した。mCldn-19_{cryst} の最終的なモデル (図 20 と同じ配色) と CPE (フォレストグリーン) はラインモデルで示した。W-LW-C-C コンセンサスモチーフはスティックモデルで示した。

1-3. 考察

<結晶化に適した C-CPE 結合能を持つ Cldn サブタイプのスクリーニング>

本章では、FSEC を応用して 29 種類の mCldn の発現量・単分散性・C-CPE 結合能を網羅的に調べた。網羅的検討の結果、Sf9 昆虫細胞発現系において、mCldn は種類ごとに発現量・単分散性が異なっていることが分かった。Sf9 昆虫細胞発現系を用いて Cldn の発現を行った報告は、ヒト Cldn-4 や mCldn-15 等の数種類の Cldn に限られている [78, 101, 102]。脊椎動物の上皮細胞における内在性の Cldn の存在量は他のタンパク質に比べて少ないことが知られているので [101]、今回の知見は精製 Cldn を大量に必要とする様々な実験に有益な情報になると考えられる。

C-CPE 結合能については、mCldn-3, -4, -6, -7, -8, -9, -14, -19 の 8 種類の mCldn が GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 結合能を持つことが分かった。このうち、全長の mCldn について C-CPE 結合能が確かめられた報告は、mCldn-3, -4, -6, -7, -8, -14 の 6 種類である [34, 63, 85, 87]。mCldn-9 については、ECS2 領域が C-CPE 結合能をもつという報告があるのみである [86]。全長の Cldn-9 が CPE 結合能を持たないという報告 [103] もあるが、どの生物種の Cldn-9 なのか記載されていない点や、TRITON-X100 で可溶化している点などがあり、mCldn-9 が C-CPE 結合能を持たないと結論づけるには不十分である。今回用いた FSEC による C-CPE 結合能解析は全長 Cldn を用いており、mCldn の細胞膜上での C-CPE 結合能を調べたこれまでの結果と合致している。したがって、mCldn-9 は C-CPE 結合能を有することが示唆されるが、今後より厳密な解析系によって明らかにしていく必要があると考えられる。mCldn-19 は、ECS2 領域のペプチドを用いた実験から C-CPE 結合能を持たないと考えられていた [86]。しかし、本研究によって全長の mCldn-19 は nM オーダーで C-CPE 結合能を持つことが明らかになった。C-CPE の受容体として機能する Cldn サブタイプとして mCldn-9 も含めると新たに 2 つを明らかにできたので、さらなる研究によって CPE と Cldn との相互作用について理解が深まると考えられる。Cldn サブタイプは、アミノ酸配列の相同性によって、クラシック Cldn (Cldn-1~10, -14, -15, -17, -19) と非クラシック Cldn (Cldn-11~13, 16, -18, -20~27) の 2 種類に大別することができる [79] (図 25)。興味深いことに、CPE 感受性の Cldn は全てクラシック Cldn に属している。クラシック Cldn は、細胞外領域のアミノ酸配列の保存性が非クラシック Cldn に比べて高いという特徴がある。したがって、クラシック Cldn の中には C-CPE の結合に重要なモチーフが存在していることが示唆される。C-CPE と Cldn との相互作用については第二章で詳述する。

C-CPE の結合により C-CPE 感受性 Cldn からなる TJ ストランドが崩壊するという観察結果は、mCldn-3 と Cldn-4 について報告されているのみである [63]。本研究によって、mCldn-19 においても mCldn-3 や Cldn-4 と同様に、C-CPE の添加によって mCldn-19 からなる TJ ストランドが消失することが確認された。mCldn-3 と mCldn-4 間のアミノ酸配列の相同性は比較的高い (70%) が、mCldn-19 と mCldn-3, -4 間のアミノ酸配列の相同性は比較的

低い (それぞれ 46%)。それにも関わらず、mCldn-3, Cldn-4 と同様に mCldn-19 でも C-CPE の結合によって TJ ストランドの崩壊が観察されたので、C-CPE の結合による TJ ストランドの崩壊は C-CPE 感受性 Cldn の中で普遍的であることが示唆された。

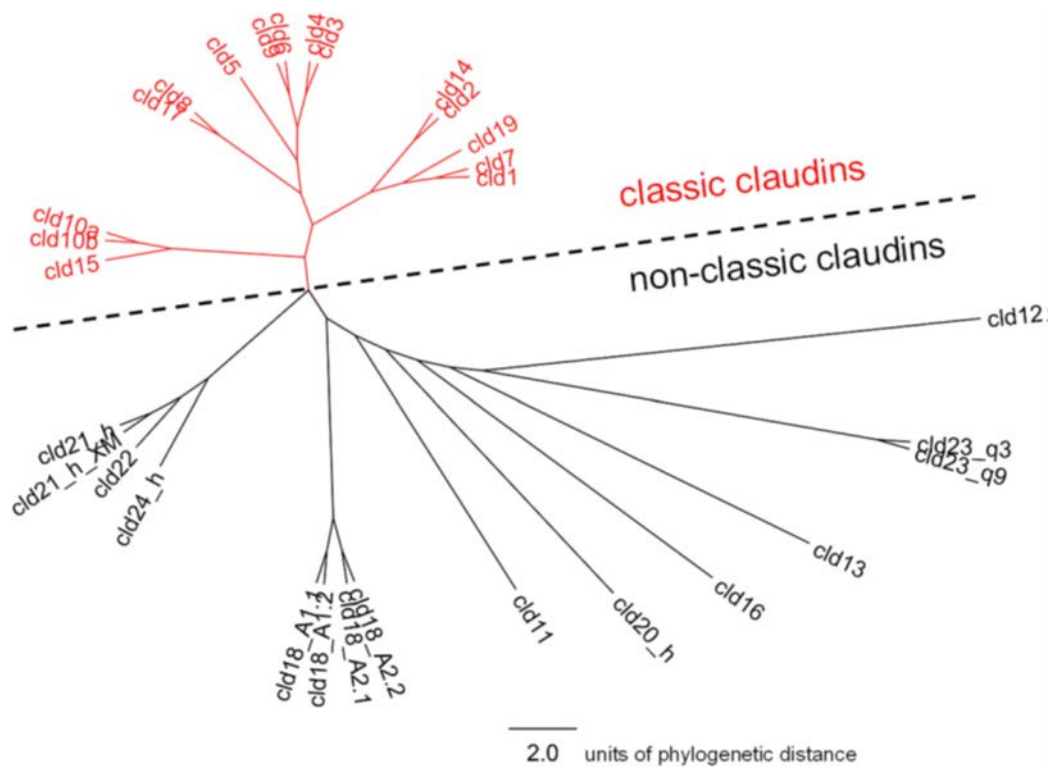


図 25 Cldn の系統樹

高い配列相同性を持ちクラスターを形成しているクラシック Cldn (1~10, 14, 15, 17, 19) は赤色で示した。それ以外の非クラシック Cldn (11~13, 16, 18, 20~24) は黒色で示した。文献 [79] より転載。

< C-CPE/mCldn-19 複合体の結晶構造 >

本研究によって 3.7 Å 分解能で C-CPE/mCldn-19 複合体の構造が明らかになった。非対称単位中に 2 つの C-CPE/mCldn-19 複合体が上下逆さまに並んでいたが、生体中において同一膜平面内で Cldn の細胞外領域が膜の両面に向くことはないので、上下逆さまに並んだ状態は基本的に結晶化の人為的相互作用によるものと考えられる。非対称単位中に含まれる 2 つの C-CPE/mCldn-19 複合体は、C-CPE を介してそれぞれ異なる結晶化コンタクトをしていた。それにも関わらず、非対称単位中の 2 つの C-CPE/mCldn-19 複合体は同様のコンフォメーションであったので、結晶化コンタクトによる構造への影響はほとんどないと考えられる。C-CPE と mCldn-19 とのストイキオメトリについては、これまで C-CPE と Cldn-4 について生化学的に示されてきた報告と同じく、C-CPE と mCldn-19 は 1:1 の量比で結合していた [27, 104]。さらに、C-CPE は mCldn-19 の細胞外領域に結合しており、C-CPE 側の Cldn 結合に重要と考えられている 3 つの Tyr 残基 (Y306, Y310, Y312) からなる窪みと、Cldn 側の C-CPE 結合に重要と考えられている ECS2 が相互作用していた。そのため、結晶構造における C-CPE と mCldn-19 間の相互作用は、C-CPE 感受性である他の Cldn サブタイプと同様であり、かつ生理的な結合状態を反映していることが示唆される [91, 105]。C-CPE と mCldn-19 との詳細な相互作用に関しては第二章に詳述した。

Cldn と結合していない C-CPE および CPE の構造 (PDB ID: 2QUO, 3AM2 [27, 28]) と C-CPE/mCldn-19 複合体中の C-CPE_{cryst} の構造をそれぞれ比較したところ、C-CPE の構造は mCldn-19_{cryst} への結合の有無に関わらずほとんど変化しないことが分かった。したがって、C-CPE は構造変化を起こさずに剛体として Cldn に結合すると考えられる。C-CPE が結合した mCldn-19_{cryst} と mCldn-15 の構造を比較したところ、Cldn 間の全体構造は似ており、4 本の TM ヘリックスからなる膜貫通領域についてはほぼ同じであったが、細胞外領域のコンフォメーションには違いが見られた。Suzuki らの報告のように、mCldn-15 の構造を基にして作製した mCldn-19 のホモロジーモデルは、C-CPE が結合していない mCldn-15 の構造と比べて ECS1, 2 の遠位側の末端にわずかな違いが見られたものの、同様の構造であった (RMSD: 0.68 Å, [78]) (図 33)。そのため、mCldn-19_{cryst} と mCldn-15 の構造間に見られた細胞外のコンフォメーションの違いは、C-CPE の結合によるものであることが示唆される。すなわち、mCldn-15 の構造においてディスオーダーしていた β 1, 2 ストランド間のループ領域 (アミノ酸残基 35-42) が、mCldn-19_{cryst} では C-CPE と相互作用しており、明確な電子密度が観測されるようになっていたこと、mCldn-19_{cryst} の β 5 ストランドが mCldn-15 のものよりも長く、隣の β 1 ストランドとより多くの水素結合を形成していたこと、C-CPE と相互作用していた mCldn-19_{cryst} の β 3 ストランドと β 4 ストランドが mCldn-15 と比べて外側に反っており、それらのストランド間におけるループの先端が mCldn-15 と異なりディスオーダーしていたこと、mCldn-15 の ECH に相当する領域 (残基 69-74) が mCldn-19_{cryst} の構造ではディスオーダーしていたことは、C-CPE の結合によるものであることが示唆された。C-CPE の結合による mCldn-19_{cryst} の構造変化については、第三章で詳細に示した。

C-CPE が結合した mCldn-19_{cryst} の構造におけるコンセンサス残基 (W-LW) は、mCldn-15 と細胞外領域のコンフォメーションが異なるにも関わらず、mCldn-15 と同様に細胞外側の膜表面に位置していた。したがって、W-LW コンセンサス残基は、どちらの構造でも β シートドメインの疎水性アンカーとして機能し、細胞外領域のコンフォメーションを安定化させていると考えられる。加えて、C-C コンセンサス残基である $\beta 3$ ストランドと $\beta 4$ ストランドに存在する高度に保存されたシステイン残基 (C54 と C64) も、mCldn-15 の構造と同様に mCldn-19_{cryst} の構造中でジスルフィド結合を形成しており、細胞外領域のコンフォメーションを安定化させていると考えられる。

第二章 C-CPE と mCldn-19 間の相互作用解析

2.1. 実験背景

CPE は病態生理学的、創薬科学的にも重要な分子であり、その受容体の特定が試みられてきた [33, 34]。後に、CPE の受容体が Cldn であることが明らかになり、CPE と Cldn 間の相互作用研究が行われてきた [27, 35, 63, 85, 86, 87, 91, 92, 95]。CPE に関しては、C 末端側に Cldn 結合ドメイン (C-CPE) があることがわかり、C-CPE についての広範な変異体解析によって、Cldn との結合に重要なアミノ酸残基が特定されてきた [21, 22, 26, 88, 89, 90, 106]。さらに、C-CPE の構造が解明されたことによって、Cldn への結合に重要なアミノ酸残基は疎水性の窪みを作っていることが明らかになった [27]。一方 Cldn に関しては、C-CPE への結合に重要な領域は ECS2 のみであると考えられてきた [85, 87]。そして、ECS2 ペプチドを用いた CPE 結合能解析によって、ECS2 中の結合モチーフ (毒素結合モチーフ: NP(V/L)(V/L)(P/A)) が CPE 結合に重要なことが示されてきた [86, 107]。その後、Cldn の ECS2 周辺のホモロジーモデルが作製され、どのように C-CPE の窪みと Cldn の ECS2 が相互作用して結合しているのかという問いに対するモデルが提案された [91, 105]。しかし、C-CPE と Cldn が実際に結合した高分解能の構造情報はなく、詳細な結合様式は明らかになっていなかった。

第一章にて、C-CPE/mCldn-19 複合体の結晶構造を 3.7 Å 分解能で解明したことを示した。本章では、C-CPE が mCldn-19 とどのような相互作用をして結合しているのかということを明らかにするために、mCldn-19 の変異体を用いた実験を行い、C-CPE と mCldn-19 間の相互作用を詳しく解析した結果を示す。

2.2. 結果

C-CPE/mCldn-19 複合体の結晶構造において、C-CPE は mCldn-19 の ECS1 および ECS2 の両方と相互作用して結合していた (図 26)。この相互作用は主に疎水性相互作用からなり、ところどころ水素結合やイオン結合をしているものであった (図 26, 図 27)。水素結合やイオン結合をしているアミノ酸残基は ECS2 の辺りに比較的多くみられた (図 26, 図 27)。ECS2 における保存されたモチーフ残基の側鎖 (150N-P-S-T-P154) は C-CPE の方へ伸びており、C-CPE の 3 つのチロシン残基 (Y306, Y310, Y312) からなる疎水性ポケットおよび D225, L254, L315 の近くのポケットの中にぴったりとはまり込んでいた (図 26, 図 27)。C-CPE 感受性の Cldn サブタイプ間で保存されているアスパラギン残基, N150 は、C-CPE の P311 の主鎖のカルボニル基と水素結合をし、C-CPE の正に帯電した R227 の側鎖と相互作用している E147 と分子内水素結合をして、複合体を安定化させていた (図 26, 図 27)。最

近、改変した Cldn-2 の ECS2 ペプチド (141HGILRDFYNPLVPDAMKFEI160) が結合した CPE の構造が報告された [108]。この ECS2 ペプチド/CPE 間の結合様式と、C-CPE/mCldn-19 複合体における ECS2/C-CPE 間の結合様式を比較したところ、ECS2 ペプチドは mCldn-19 のものとは異なる配列であるにもかかわらず、同様の構造をとって C-CPE の疎水性ポケットに位置している様子が見られた (図 28)。

これまで、C-CPE との結合には Cldn の ECS2 のみが関与すると考えられてきたが、C-CPE/mCldn-19 複合体の結晶構造では、ECS2 だけでなく ECS1 も C-CPE と相互作用していた (図 26A および B)。ECS1 における、 β 1 ストランドと β 2 ストランド間のアミノ酸配列 (残基 32-48) は Cldn サブタイプ間で異なっているが、この部位の中間の領域 (残基 39-42) は、比較的保存されている (図 23)。mCldn-19 の構造におけるこのモチーフ (A/N/S)-I-(I/L/V)-(T/V) は、C-CPE の表面と明確に相互作用していた (図 26A および B)。一方、mCldn-15 におけるこの領域はディスオーダーしていた (図 22, 図 23)。

結晶構造中で見られた相互作用が溶液中でも存在していることを検証するため、C-CPE と相互作用している mCldn-19 の ECS1 および ECS2 のアミノ酸残基に変異を導入した。作製した mCldn-19 変異体の C-CPE へのアフィニティーを、界面活性剤溶液中で FSEC を用いて評価した (図 29, 図 30, 表 4)。C-CPE へのアフィニティーは、ECS2 における推定上の結合モチーフに変異導入した際と、ECS1 の保存されたモチーフ残基 (A39-I41) に変異導入した際に、比較的大きく影響を受けた (表 4)。これらの変異導入によるアフィニティーの減少結果を C-CPE の表面にマッピングした結果は、CPE 感受性 Cldn 間におけるアミノ酸配列の保存性を C-CPE 表面にマッピングした結果とほぼ完全に一致していた (図 31B および C)。

mCldn-19 の ECS2 における S152 を疎水性残基に置換した mCldn-19 変異体は C-CPE に高いアフィニティーを示し、酸性残基のアスパラギン酸残基に置換した mCldn-19 変異体は C-CPE への低いアフィニティーを示した (表 4)。mCldn-19 の ECS2 における N150 の位置にあるアミノ酸残基がアスパラギン残基であるかどうか、Cldn の CPE 感受性を決める上で重要であることが示されている。例えば、CPE 感受性 Cldn の N150 をアスパラギン酸残基に置換すると C-CPE とのアフィニティーが減少し、CPE 非感受性の mCldn-1 の D150 をアスパラギンに置換すると C-CPE 結合能を持つようになるという報告がある [87]。N150 の残基が、なぜ C-CPE との結合に重要なのかを明らかにするために、N150 をアラニン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン、リシン、ロイシンにそれぞれ変異させた mCldn-19 変異体を作製し、C-CPE とのアフィニティーへの影響を解析した。その結果、N150 はアスパラギン酸、リシン、グルタミン、アラニンに置換した時に C-CPE とのアフィニティーが比較的大きく減少し、ロイシン、セリンに置換した時には比較的小さな減少であった (表 4)。ECS2 領域の pI が C-CPE のアフィニティーに重要であるという報告 [87] があるので、ECS2 の pI と、E147 および N150 の側鎖の大きさを変えることなく、N150 部位を負に帯電させる E147Q/N150D 二重変異体を作製して、ECS2 における pI の C-CPE 結合への重要性を検証した。すると、E147Q/N150D 二重変異体では、C-CPE へのアフィニティーが野生型よりも著

しく減少した (表 4)。加えて、E147Q 変異体、E147A 変異体、E147R 変異体では、C-CPE へのアフィニティーが野生型と変わらなかった (表 4)。したがって、ECS2 の pI が C-CPE との結合に必ずしも重要なわけではないことが分かった。一方、クラシック Cldn の ECS1 において保存されているモチーフ残基 (mCldn-19 では 39A-I-I41) についても、変異体を作製し、C-CPE へのアフィニティーの変化を調べた (表 4)。A39 をアルギニン残基、セリン残基に置換した変異体は、どちらも C-CPE へのアフィニティーが減少していた (表 4)。I40, I41 残基については、アラニン、セリン、バリン、ロイシンに置換した変異体を作製して分析した。その結果、I41L 変異体以外の変異体は全て、C-CPE へのアフィニティーが減少していた。これらの結果を総合すると、クラシック Cldn の ECS1 において保存されているモチーフ残基は Cldn の C-CPE 感受性に関わっており、このモチーフ残基の側鎖の大きさが CPE 感受性に重要であることが分かった。

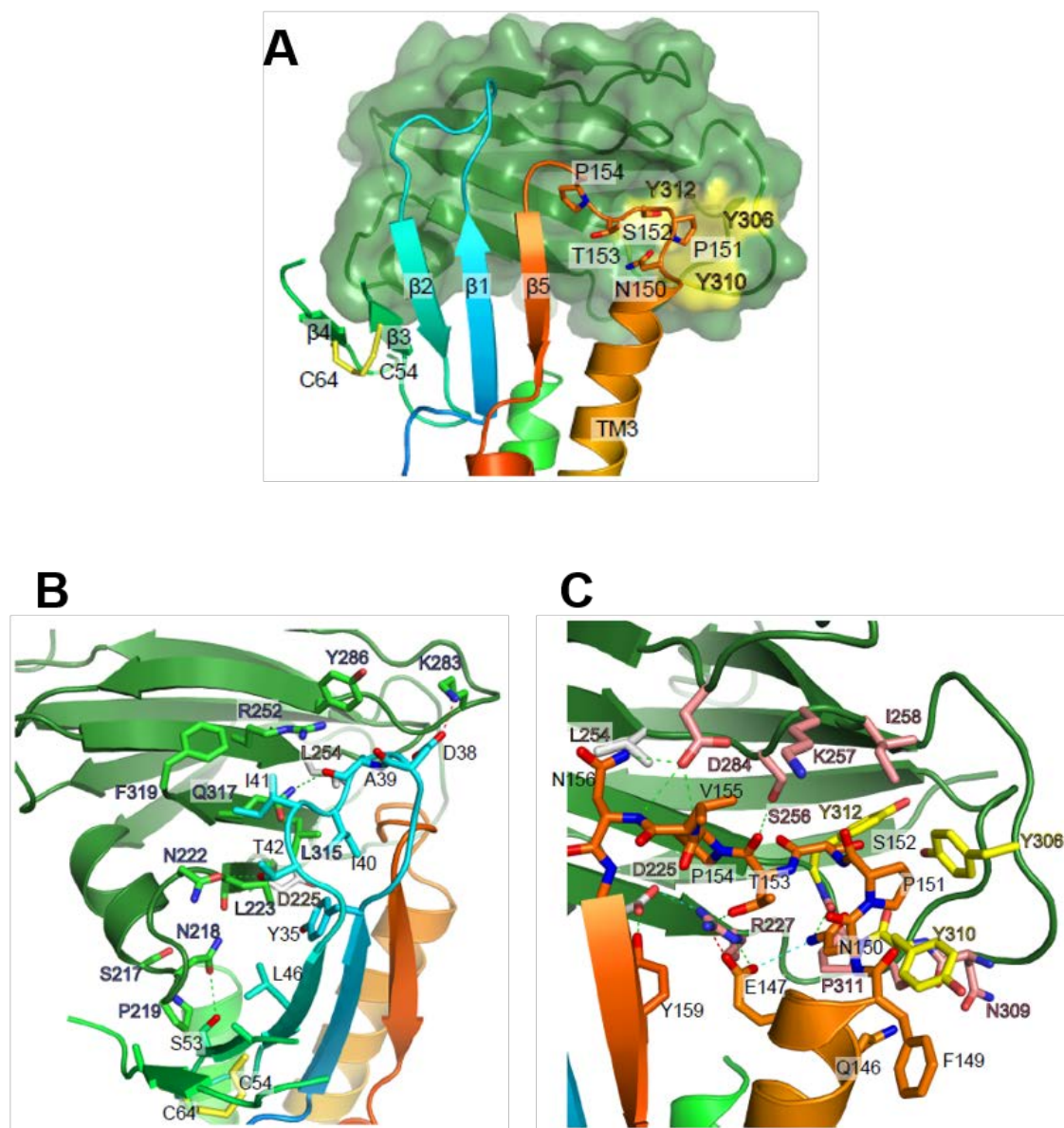


図 26 C-CPE と mCldn-19 との相互作用

(A) C-CPE_{cryst} (表面モデル) と mCldn-19_{cryst} (リボンモデル) の細胞外ドメインの拡大図。色付けは図 20 と同じ。C-CPE 結合に関わる Cldn の ECS2 における保存配列については、残基の側鎖をスティックモデルで示し、ラベルした。Cldn との結合に重要な C-CPE の 3 つの Tyr 残基は黄色で表示し、ラベルした。

(B) ECS1 と C-CPE の相互作用箇所の拡大図。ループ領域の側鎖はスティックモデルで示した。分子間、分子内の水素結合およびイオン結合は、それぞれ緑色、シアン、赤色の破線で示した。ECS1、ECS2、もしくは両方と相互作用する C-CPE の残基は、それぞれライトグリーン、サーモンピンク、グレーで示した。

(C) ECS2 と C-CPE_{cryst} の相互作用箇所の拡大図。C-CPE との相互作用に関わる主鎖のカルボニル基と ECS2 の側鎖はスティックモデルで示した。

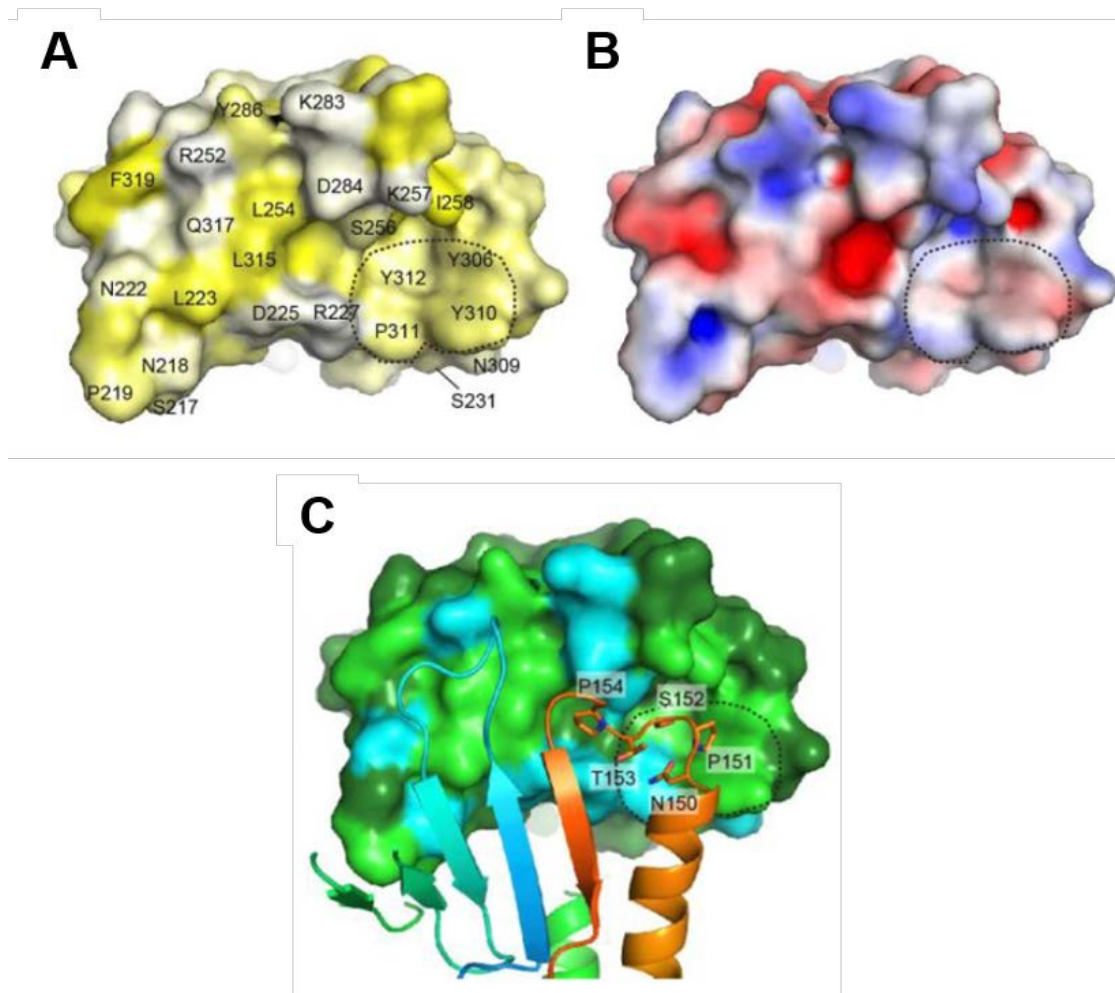


図 27 mCldn-19 と相互作用する C-CPE 表面の性質

(A) 図 26A と同じ方向から見た C-CPE 表面の疎水性。残基は黄色 (疎水性が高い) から白色 (荷電している) の範囲で色付けした。mCldn-19_{cryst} の ECS と相互作用している C-CPE の残基はラベルした。

(B) C-CPE 表面の静電ポテンシャルを (A) と同じ向きから見た図。-3 kT/e (赤色) から +3 kT/e (青色) の範囲で表示した。

(C) C-CPE と mCldn-19_{cryst} との複合体を (A) と同じ方向から見た図。mCldn-19_{cryst} と疎水性相互作用を形成している C-CPE の残基をライトグリーンで示し、水素結合を形成している残基をシアンで示した。相互作用していない残基はフォレストグリーンで示した。主に 3 つ組のチロシン残基と Pro311 によって作られている疎水性の窪みは破線で囲った。

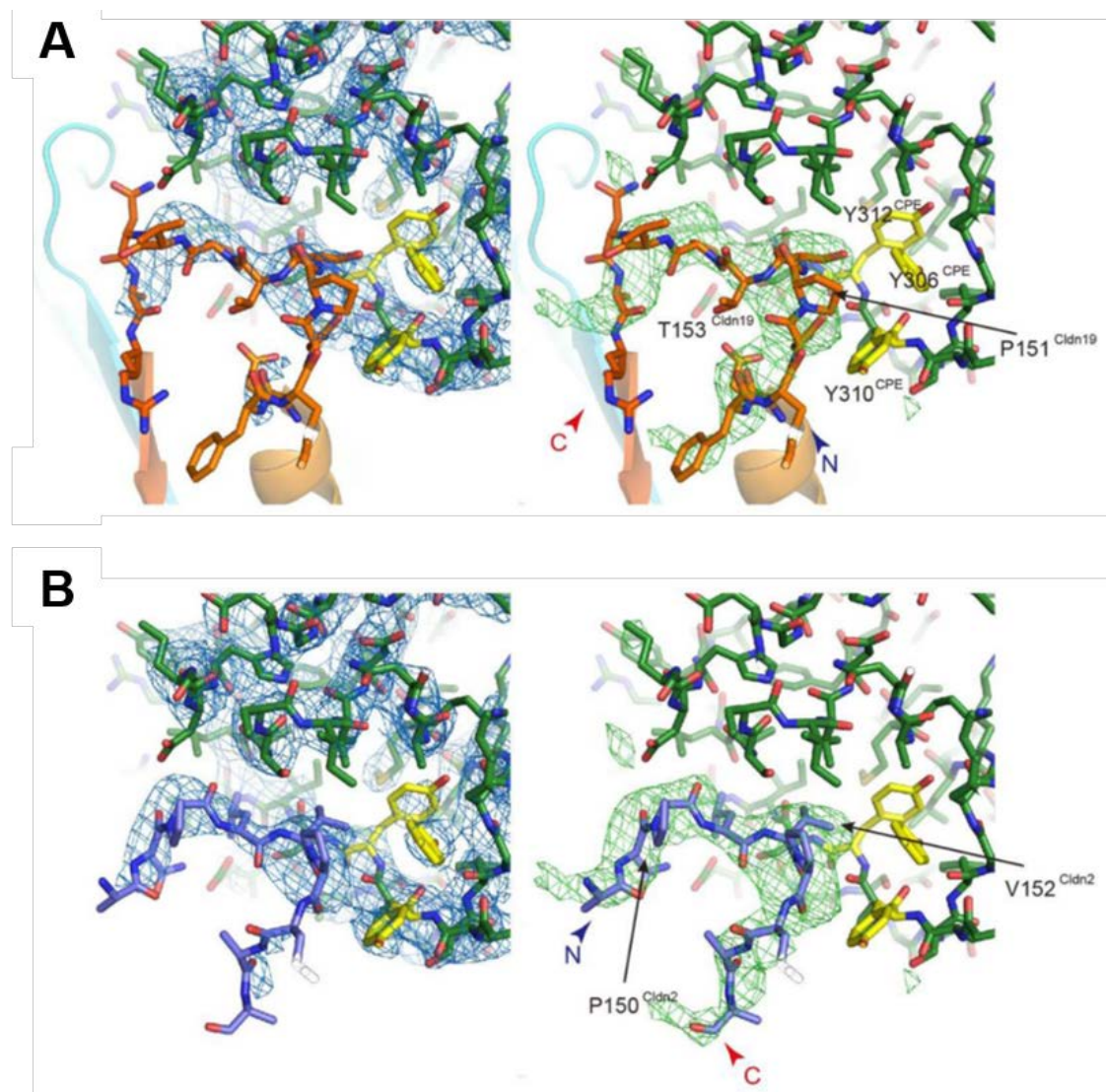


図 28 mCldn-19_{cryst} の ECS2/C-CPE 間の結合領域と、改変した mCldn-2 の ECS2 ペプチド /CPE 間の結合領域との比較

(A および B) 1.5 σ で輪郭を付けた 2Fo-Fc マップ (左、青色のメッシュ) と 3.0 σ で輪郭を付けた Fo-Fc マップ (右、緑色のメッシュ) を示した。このマップは、改変した mCldn-2 の ECS2 ペプチドが結合した全長 CPE (PDB ID: 4P5H [108]) の実験的な構造因子を Fo、全長 CPE の座標を Fc として計算した。したがって、Fo-Fc の電子密度 (緑色メッシュ) は、改変した mCldn-2 の ECS2 ペプチドに相当する。

(A) C-CPE/mCldn-19 複合体構造に見られる ECS2 ループはオレンジ色で示した。

(B) CPE/ペプチド複合体の構造の報告 [108] においてモデル化された改変 mCldn-2 の ECS2 ペプチドは青色のスティックモデルで示した。全てのパネルにおいて、CPE をフォレストグリーンで示した。Cldn との結合に重要な C-CPE における 3 つのチロシン残基は黄色で示した。青色と赤色の矢頭は、それぞれペプチドの N 末端と C 末端を示した。マップ

プの低い分解能と ECS2 ペプチドの高い B 因子のために、モデル化されたペプチドの構造は信頼性が無くなっている (ペプチドの N 末端と C 末端が逆になっている可能性がある) が、このマップは、Cldn-2 と mCldn-19 間で ECS2 配列が異なるにも関わらず、ECS2 が同様のコンフォメーションをとり C-CPE の同じ結合部位に結合することを示している。

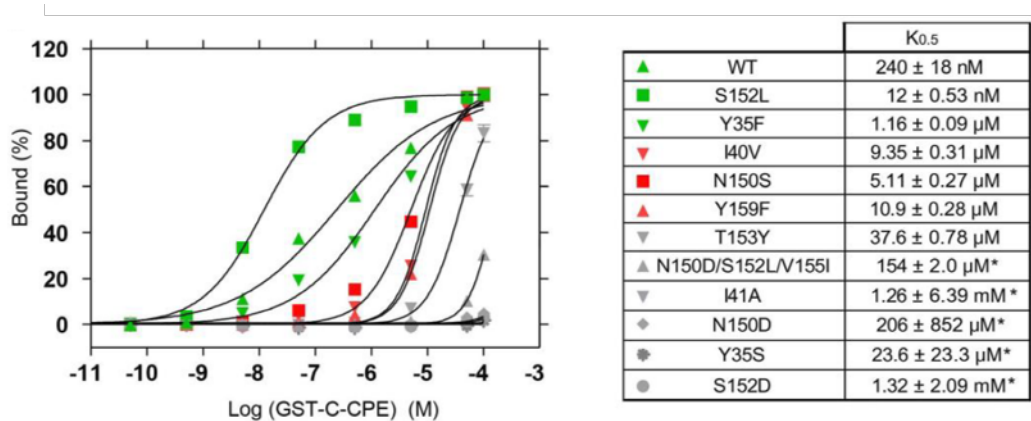


図 29 FSEC による C-CPE への mCldn-19 変異体のアフィニティーの定量

C-CPE に対する mCldn-19 変異体の用量反応曲線の比較。C-CPE に対するそれぞれの mCldn-19 変異体の見かけのアフィニティー (K_{0.5} 値) は右側の表に示した。実験は各測定濃度において 3 回行った (K_{0.5} = 平均値 ± S.D.)。アスタリスクを付した K_{0.5} 値は有意でない。

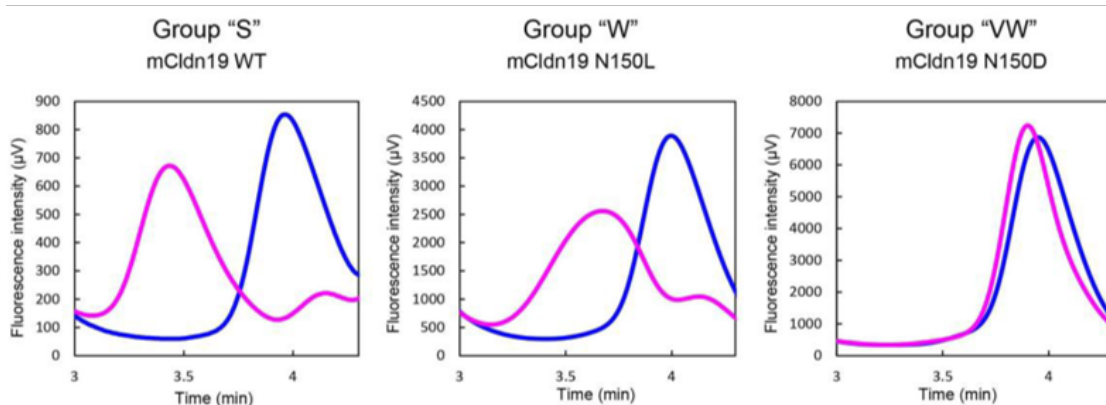
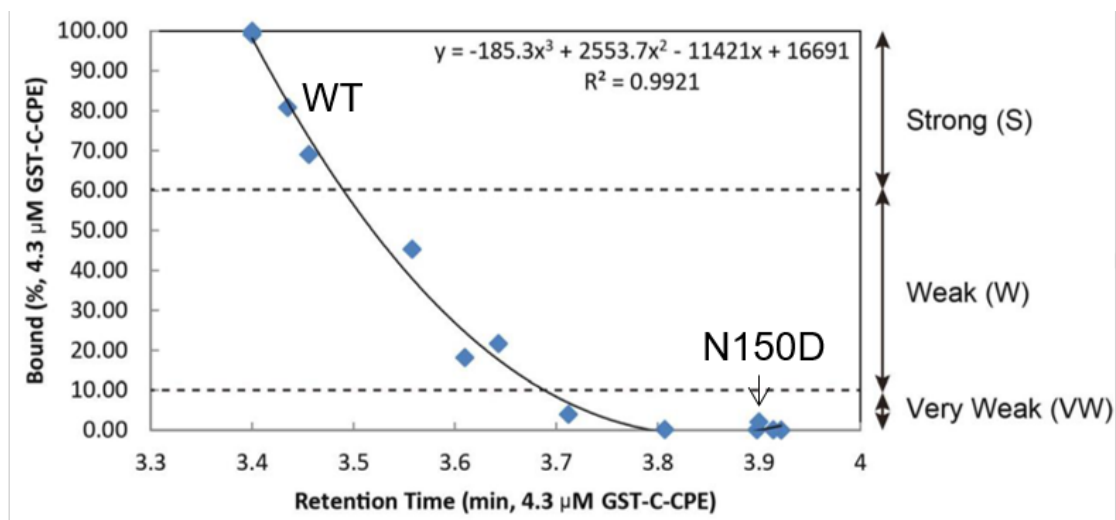


図 30 異なる mCldn-19 変異体ごとの、C-CPE と結合している mCldn-19 の割合と C-CPE/mCldn-19 複合体のピークの保持時間との関係性

FSEC の解析結果に基づき、一定濃度の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 存在下において、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ と結合している mCldn-19 変異体の割合と、 GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉/mCldn-19 変異体のピークの保持時間との関係を表した。FSEC 解析に用いた試料は 4.3 μM の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を含んでいる。GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ と結合している mCldn-19 変異体の割合に基づいて、mCldn-19 変異体を 3 つのグループに分類した。各 mCldn-19 変異体の C-CPE へのアフィニティーについて、各 mCldn-19 変異体の 60% より多くが C-CPE と結合しているものは、その結合を強い結合 (S)、 10% から 60% が C-CPE と結合しているものは、弱い結合 (W)、10% 以下が C-CPE と結合しているものは、とても弱い結合 (VW) とそれぞれみなした。EGFP-mCldn-19 変異体単独のクロマトグラム (青色) と 4.3 μM GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 存在下でのクロマトグラム (マゼンタ) を示した。左側のパネルは (S) に分類される野生型 mCldn-19 のプロファイル。中央のパネルは (W) に分類される N150L 変異体のプロファイル。右側のパネルは (VW) に分類される N150D 変異体のプロファイル。

	residue number	original type	mutated type	retention time (min)	binding capacity
ECS1	35	Y	S	3.922	VW
			F	3.456	S
	38	D	A	3.450	S
	39	A	R	3.817	VW
			S	3.515	W
	40	I	A	3.814	VW
			S	3.859	VW
			V	3.643	W
			L	3.847	VW
	41	I	A	3.898	VW
			S	3.909	VW
			V	3.699	VW
			L	3.444	S
	42	T	A	3.468	S
			V	3.427	S
	53	S	A	3.425	S

	residue number	original type	mutated type	retention time (min)	binding capacity
ECS2	146	Q	A	3.486	S
	147	E	A	3.450	S
			Q	3.420	S
			R	3.423	S
			Q/N150D	3.883	VW
	150	N	A	3.725	VW
			S	3.558	W
			D	3.900	VW
			Q	3.825	VW
			K	3.835	VW
			L	3.675	W
	151	P	A	3.859	VW
			G	3.888	VW
	152	S	L	3.400	S
			M	3.400	S
			D	3.914	VW
			F	3.416	S
	153	T	V	3.429	S
			L	3.463	S
			Y	3.712	VW
	154	P	A	3.644	W
			D	3.976	VW
	155	V	I	3.434	S
	156	N	A	3.426	S
			G	3.550	W
			S	3.421	S
	159	Y	S	3.550	W
			F	3.610	W

表4 C-CPE 結合への影響に基づいた mCldn-19 への変異の分類

図 30 に示した基準によって、各 mCldn-19 変異体の C-CPE へのアフィニティーの強度を分類した。4.3 μ M GST-C-CPE の存在下で分析した時の結果を示した。野生型の mCldn-19 と GST-C-CPE からなる複合体の保持時間は 3.435 分であった。E147Q/N150D は二重変異体。

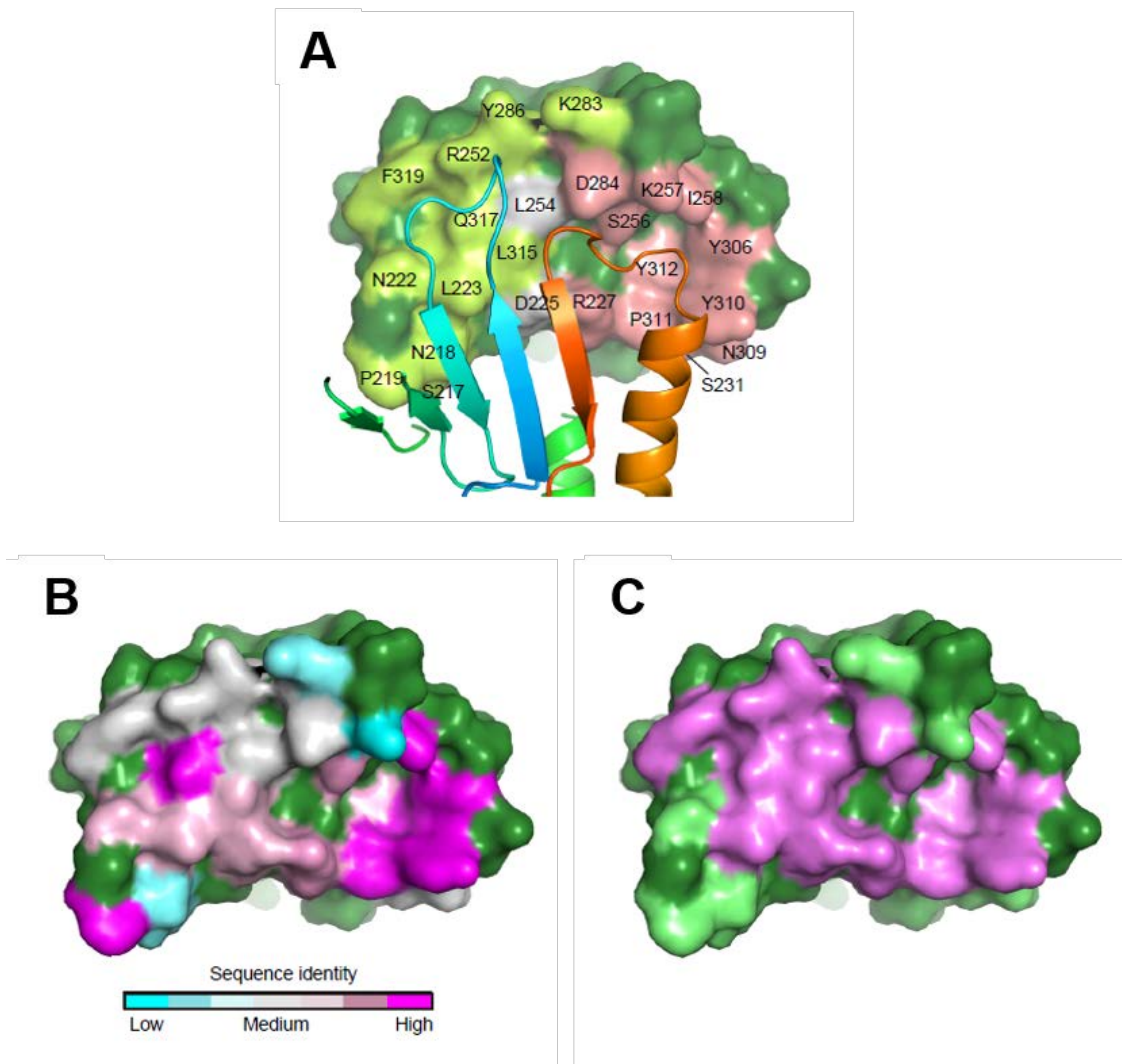


図 31 C-CPE と mCldn-19_{cryst} 間の相互作用界面

(A) リボンモデルで示した mCldn-19_{cryst} に結合している C-CPE の表面モデル。ECS1, ECS2 もしくはその両方と相互作用している C-CPE の残基は、それぞれライトグリーン、サーモンピンク、グレーで示した。

(B) および (C) は (A) と同様に、mCldn-19_{cryst} と相互作用している C-CPE の表面を示した。

(B) mCldn-19_{cryst} との相互作用に関わる C-CPE の残基を、全ての CPE 感受性 Cldn の保存性に基づいて色分けした。シアン、保存性が低い；マゼンタ、保存性が高い。

(C) C-CPE との結合アフィニティーに対する mCldn-19 への変異の影響を、相互作用している C-CPE の残基にマッピングした図。紫色は有意に結合アフィニティーの減少が見られた変異 (VW に分類されるもの) を示し、ライム色は小さな減少が見られた変異 (W に分類されるもの) を示した。

2.3. 考察

CPE と Cldn サブタイプの相互作用解析から、Cldn サブタイプの中には CPE 感受性 Cldn と非感受性 Cldn が存在することが示された [63]。その後、CPE 感受性 Cldn である mCldn-3 と CPE 非感受性 Cldn である mCldn-1 とのキメラ Cldn を用いた解析が行われ、C-CPE との結合に重要な Cldn の領域が調べられた [85]。Fujita らが、Cldn の N 末端側半分と C 末端側半분을境に、mCldn-1 と mCldn-3 を互いに置換したキメラ (C1/3 キメラ, N 末端側半分が mCldn-1 で C 末端側半分が mCldn-3; C3/1 キメラ, N 末端側半分が mCldn-3 で C 末端側半分が mCldn-1) を作製して CPE の細胞毒性を調べたところ、C1/3 キメラを発現する細胞では CPE による細胞毒性が見られ、C3/1 キメラを発現する細胞では CPE による細胞毒性が見られなかった。さらに、GST 融合 mCldn-3 ECS1、GST 融合 mCldn-3 ECS2、GST 融合 mCldn-1 ECS2 の CPE 結合能を調べたところ、GST 融合 mCldn-3 ECS2 のみに CPE の結合が見られた。加えて、GST 融合 mCldn-3 ECS2 への C-CPE のアフィニティーは、全長の mCldn-3 を発現させた細胞への CPE のアフィニティーとほぼ同じであった。これにより、ECS2 のみが C-CPE との結合に重要であると考えられてきた [85]。ECS2 が C-CPE との結合に重要であることは、その後の研究によって支持されてきたが、全長 Cldn において ECS1 が C-CPE との結合に関わっていないかどうかは明確に示されていなかった。そのような中、ECS1 に HA タグを融合させた Cldn-4 を用いた解析により、C-CPE 結合における ECS1 の重要性が検証された [87]。Kimura らは、ECS1 に HA タグを融合した Cldn-4 に抗 HA 抗体を反応させた後、CPE が結合するかどうかを調べた。その結果、抗 HA 抗体の結合は C-CPE の結合を阻害しないことが分かった。これより、C-CPE 結合に ECS1 は関与しないことが示唆された。しかしながら、HA タグを導入した箇所が C-CPE との結合界面であるかどうかは明らかにされていなかった。Kimura らが HA タグを導入した箇所は Cldn-4 の Ala72 と Leu73 の間であり、mCldn-19 におけるこの領域 (Ala72 と Leu73) は、C-CPE/mCldn-19 複合体中の β 4 ストランドと TM2 間のディスオーダーしている領域に相当する。この領域は C-CPE と Cldn 間の相互作用界面ではないので、抗 HA 抗体をこの箇所に結合させたとしても、C-CPE が ECS1 と相互作用することを阻害しない可能性がある。したがって、これまでの研究から ECS1 が C-CPE 結合に関与しないと結論づけるには根拠が不十分であったと考えられる。

本研究により明らかになった C-CPE/mCldn-19 複合体の結晶構造において、C-CPE は mCldn-19 の ECS1 および ECS2 の両方と相互作用して結合していた。mCldn-19 変異体を用いた解析によって、ECS1 および ECS2 の両方が mCldn-19 と C-CPE との結合に重要であることが示された。さらに、mCldn-19 の変異体解析から明らかになった C-CPE 結合に重要な mCldn-19 の残基を C-CPE 表面にマッピングした図は、CPE 感受性 Cldn における残基の保存性をマッピングした図とほぼ完全に一致することが分かった。そのため、C-CPE と mCldn-19 間の結合様式は C-CPE 感受性 Cldn サブタイプ間で

共通していることが示唆された。mCldn-19 は、末梢神経・腎臓に発現しており、小腸・大腸では発現がみられない [66, 109, 110, 111, 112, 113]。そのため、小腸・大腸において mCldn-19 は CPE の受容体として機能していないと考えられる。しかし、本研究により、mCldn-19 と C-CPE との結合様式は、小腸において CPE の受容体として機能する Cldn-4 および Cldn-3 と同様であることが示された。このことは、最近報告されたヒト Cldn-4 と C-CPE との複合体の結晶構造が C-CPE/mCldn-19 複合体の構造と同様であったことから確認された [114]。

CPE による毒性は、場合によっては下痢や食中毒だけで済まないこともある。例えば、アメリカ合衆国の精神病院において、*C.perfringens* タイプ A による食中毒が起き、比較的若くて健康な患者が死亡するというケースが報告されている [115, 116]。これは、便秘を起こす副作用を持った向精神薬を投与され、CPE が腸管に長時間存在し続けてしまったことによるものと推測されている。CPE が腸管に長時間存在し続けるとどうなるのかを調べるために、空腸を外科的に閉じたマウスを用いた実験が行われた [117]。このマウスの閉じた空腸に CPE を注射したところ、2 時間後にマウスは死亡した。死亡したマウスを調べてみると、血清、肝臓、腎臓にて CPE が検出された。これにより、CPE が腸管に長時間存在し続けると、CPE は腸管上皮を破壊し、内臓に到達することが示された。mCldn-19 は腎臓に発現が見られるため、mCldn-19 が CPE の標的となる場合もあることが示唆される。

本研究により、mCldn-19 における ECS2 の結合モチーフ (150N-P-S-T-P154) は、これまで予想されていたように [91] C-CPE の 3 つのチロシン残基 (Y306, Y310, Y312) からなる疎水性ポケットおよび S256, D284, L223, L254, L315, A313, D225 に囲まれる比較的弱い疎水性のポケットにはまっていた (図 26, 図 27)。この ECS2 の結合モチーフは、CPE に結合した改変 Cldn-2 の ECS2 ペプチド [108] とアミノ酸配列が異なるにも関わらず、同様の構造をして CPE の疎水性ポケットにはまり込んでいた (図 28)。これより、ECS2 の結合モチーフはペプチドであっても、全長の Cldn における ECS2 と同様の構造をとって C-CPE と結合できると考えられる。ECS2 と相互作用する C-CPE 側の疎水性ポケットを構成している Y306, Y310, Y312 をアラニン残基に変異させると、C-CPE の mCldn-4 へのアフィニティーは減少する [89, 90, 91]。C-CPE/mCldn-19 複合体構造において、この疎水性ポケットに位置している mCldn-19 の S152 を、ロイシン残基やメチオニン残基、フェニルアラニン残基といった疎水性残基に置換すると、C-CPE とのアフィニティーは上昇し、酸性残基のアスパラギン酸残基に置換するとアフィニティーは減少した (表 4)。この mCldn-19 の S152 に相当する mCldn-3 およびヒト Cldn-4 の L150 をフェニルアラニン残基に置換すると、C-CPE の Y306A 変異によるアフィニティーの減少が回復するという報告もされている [91]。このように、C-CPE の疎水性ポケットにはまり込める疎水性残基が ECS2 に存在しているかどうかは、その Cldn サブタイプが C-CPE 感受性かどうかを左右する重要な要因の一つであることが示唆される。C-CPE 感受性の Cldn サブタイプ間で保存されている ECS2 のアスパラギン残基, N150 が C-CPE との結合に重要であることは、これまでの研究から示されていたが、な

ぜ N150 が C-CPE との結合に重要なのかということはよく分かっていなかった [86, 87]。C-CPE/mCldn-19 複合体の構造中において、N150 は C-CPE の P311 の主鎖のカルボニル基と水素結合をし、C-CPE において正に帯電した R227 の側鎖と相互作用している E147 と分子内水素結合をして、複合体を安定化させていた (図 26)。mCldn-19 への E147A、E147Q、E147R の変異導入では C-CPE 結合に影響が見られなかった (表 4)。したがって、mCldn-19 の N150 と E147 間の分子内水素結合は C-CPE 結合に大きく影響しないと考えられる。さらに、ECS2 領域の pI の重要性を E147Q/N150D 二重変異体により検証したところ、ECS2 の pI は必ずしも重要でないことが明らかとなった。mCldn-19 は、N150Q、N150D、N150L、N150K の変異によって C-CPE へのアフィニティーが減少したので、N150 の側鎖の大きさと性質が C-CPE 結合に重要であると考えられる (表 4)。C-CPE へのアフィニティーに関して、mCldn-19 の N150 への変異による影響の大きさは、Asp, 147Gln/150Asp >> Lys > Gln >> Ala > Leu >> Ser > Asn の順であった (表 4)。これらの結果は、C-CPE の 3 つの Tyr 残基からなる疎水性ポケットの周辺では主に疎水性残基と非荷電性残基が Cldn と C-CPE との相互作用界面を形成しているという、結晶構造中で見られた知見と合致した (図 27)。本研究結果より、C-CPE 結合における N150 残基の重要性は、C-CPE の P311 の主鎖のカルボニル基と水素結合を形成することであると考えられるが、この位置の側鎖のわずかな違いが C-CPE 結合に大きく影響する理由は不明である。

C-CPE に結合している mCldn-19 の ECS1 には、クラシック Cldn 間で保存されたモチーフ残基 ((A/N/S)-I-(I/L/V)-(T/V): mCldn-19 では 39A-I-I41) があつた (図 23)。このモチーフ残基は、mCldn-19 変異体を用いた解析によって C-CPE の結合に重要であることが分かった。側鎖の静電的な性質を変えない I40A、I40V、I40L、I41A、I41V の変異導入によって C-CPE とのアフィニティーが減少した (表 4)。そのため、このモチーフ残基における側鎖の大きさが C-CPE へのアフィニティーに影響すると考えられる。

以上の結果を総合すると、ECS2 が主に Cldn サブタイプの CPE 感受性を決めており、ECS1 は単に疎水性の相互作用領域を拡大させることで、CPE との結合を安定化させていることが示唆される。

第三章 C-CPE による TJ の崩壊機構

3.1. 実験背景

C-CPE は特定の Cldn サブタイプに結合するだけでなく、結合した Cldn を TJ から取り除き、TJ の透過特性を変化させる機能を持つことが示されてきた [63]。第一章で、mCldn-19 においても、C-CPE が結合することで mCldn-19 からなる TJ ストランドが消失することを示した。これまでに、C-CPE 添加によって TJ から C-CPE 感受性 Cldn が除かれる機構として 2 つのモデルが提唱されている [63, 86]。一つ目のモデルは、C-CPE が TJ ストランド中に組み込まれている C-CPE 感受性 Cldn に直接結合し、その Cldn を TJ ストランドから取り除くというものである。二つ目のモデルは、C-CPE が TJ ストランドに組み込まれる前の C-CPE 感受性 Cldn プロトマーを捕捉し、その捕捉された Cldn が TJ ストランドに取り込まれなくなることで、TJ ストランドにその Cldn が存在しなくなるというものである。現在、TJ が動的な接着複合体であり、TJ ストランドを構成する Cldn 分子が入れ代わり立ち代わりしているということ [96, 118, 119]、Cldn-3 を発現させた HEK293 細胞に TJ を形成させた後に C-CPE を添加すると、C-CPE が TJ を形成していない箇所に多く存在していたこと [86]、C-CPE と Cldn の解離定数が約 nM オーダーと高いにも関わらず、TJ の透過特性が変化するのは数日後であるということ [63, 85, 86] から、C-CPE は TJ を形成する前の Cldn 分子を捕捉して TJ の形成を阻害することで、TJ の崩壊を誘導するという捕捉モデルが有力であると考えられている [86]。しかし、C-CPE が直接 TJ ストランドを形成している Cldn 分子に作用していないという証拠はない。いずれのモデルであったにしても、どのようにして C-CPE が Cldn 分子の TJ ストランド形成を阻害しているのかについて構造学的には分かっていなかった。

本章では、C-CPE/mCldn-19 複合体の構造と、C-CPE が結合していない mCldn-15 の構造および C-CPE 未結合の mCldn-19 ホモロジーモデルを比較し、C-CPE 結合による mCldn-19 の構造変化および TJ の崩壊機構を考察した結果を示す

3.2. 結果

第一章で、C-CPE/mCldn-19 複合体の構造を C-CPE が結合していない mCldn-15 の結晶構造と比較した (図 22, 図 32)。その結果、mCldn-15 よりも C-CPE が結合した mCldn-19 の方が、①ECS2 が C-CPE 側に動いてはまっていること、② $\beta 5$ ストランドが長いこと、③C-CPE と相互作用している $\beta 3$ ストランドおよび $\beta 4$ ストランドが外側に反っていて、そのストランド間のループ領域がディスオーダーしていること、④ディスオーダーしていた $\beta 1$ ストランドと $\beta 2$ ストランド間のループが C-CPE に結合してはっきりと見えていること、⑤ $\beta 4$ スト

ランドと TM2 間に存在する ECH の領域がディスオーダーしていること、などの顕著な違いが見られた。そして、mCldn-15 の結晶構造を基に作製した C-CPE が結合していない mCldn-19 のホモロジーモデルは、mCldn-15 の構造と同様であったので [78] ($C\alpha$ の RMSD: 0.68 Å; 図 33)、この違いが C-CPE の結合による構造変化の結果であることが示唆された。そのため、本章では C-CPE/mCldn-19 複合体の構造と mCldn-19 ホモロジーモデルを比較して、C-CPE の結合による mCldn-19 の構造変化を考察することとした (図 34)。mCldn-19 ホモロジーモデルは、mCldn-15 と同様の構造であったので、C-CPE/mCldn-19 複合体の構造と比べると、 $\beta 1$ ストランド、 $\beta 5$ ストランドが短かった (図 34B)。mCldn-19 ホモロジーモデルを C-CPE/mCldn-19 複合体と重ね合わせた時、mCldn-19 ホモロジーモデルの ECH、 $\beta 3$ ストランド、 $\beta 4$ ストランドは、C-CPE と立体障害を起こしていた (図 34A)。mCldn-19 ホモロジーモデルでは mCldn-15 と同様に ECH が見られたのに対し、C-CPE/mCldn-19 では ECH がディスオーダーしていた (図 24, 図 34A)。また、C-CPE/mCldn-19 の TM3 は、mCldn-19 ホモロジーモデルと比べると、右に少し回転して C-CPE 側へ傾いていた (図 34B)。この TM3 の動きに伴って、mCldn-19 の 3 つのフェニルアラニン残基 (F148, F149, F161) の位置が変わっていた。この 3 つのフェニルアラニン残基は、膜平面内で mCldn-15 が線状重合するためのシス相互作用に関わっている疎水性残基 (F146, F147, L158) に相当する [78] (図 23)。

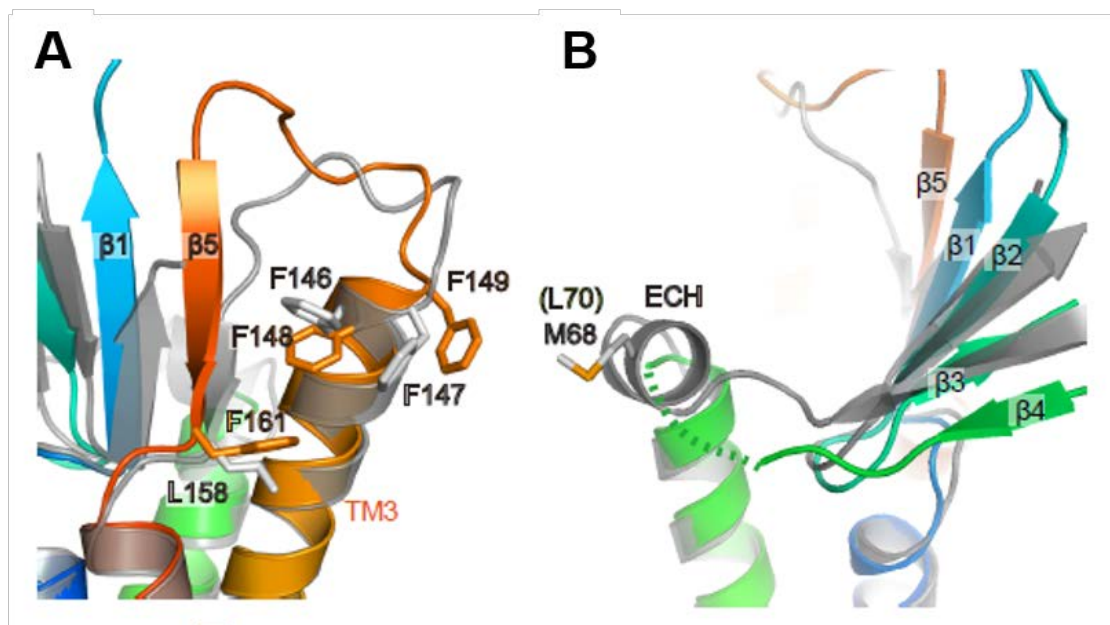


図 32 mCldn-19_{cryst} と mCldn-15 の細胞外ドメインの比較

(A) および (B) mCldn-19_{cryst} と mCldn-15 は、それぞれソリッドカラーと透明なグレーのリボンモデルで示した。膜平面内で Cldn が線状に重合するためのシス相互作用に関わると考えられている疎水性残基はスティックモデルで示し、ラベルした。 mCldn-19_{cryst} の構造において、ディスオーダーしていた ECH 領域は破線で示した。

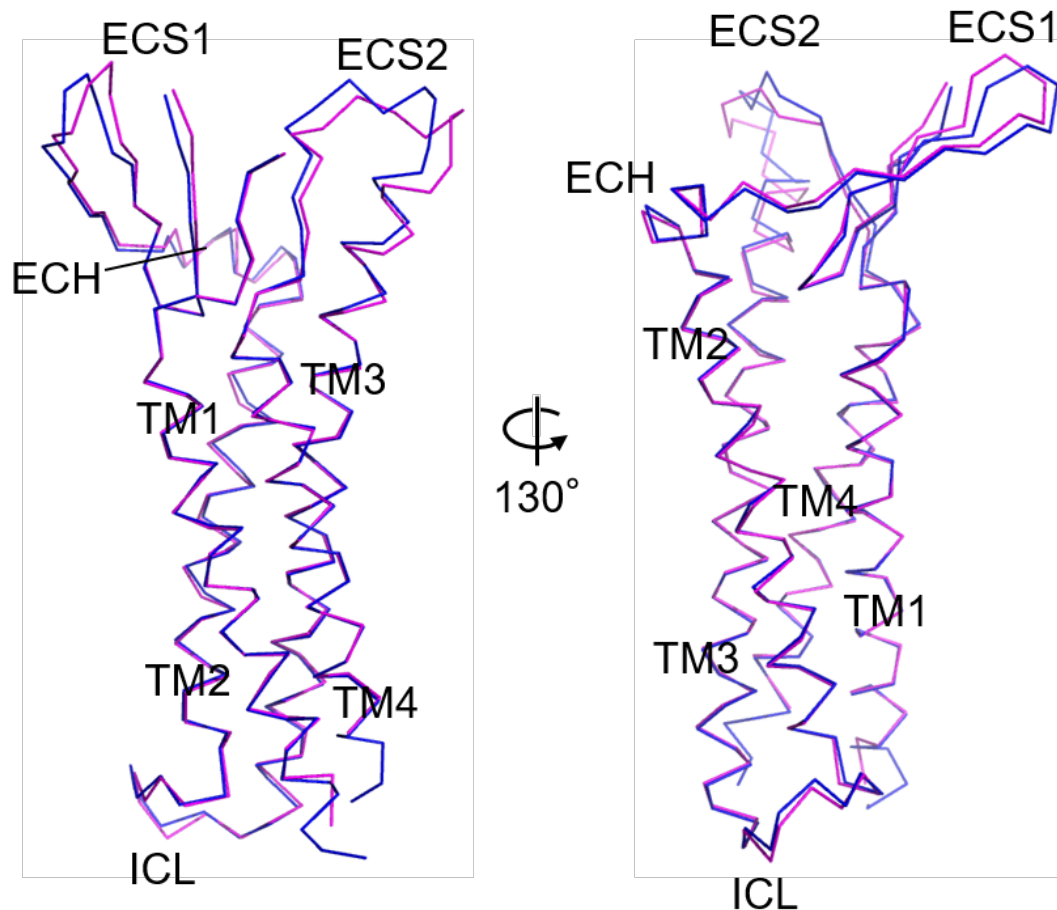


図 33 mCldn-15 と mCldn-19 ホモロジーモデルの重ね合わせ

mCldn-15 の構造 (PDB ID: 4P79 [78]) と、mCldn-15 の構造を基に作製した mCldn-19 ホモロジーモデルの重ね合わせ。どちらの構造もラインモデルで示した。青色, mCldn-15; マゼンタ, mCldn-19 ホモロジーモデル。2 つの構造を重ね合わせた時の C α 間の RMSD は 0.68 Å であった。

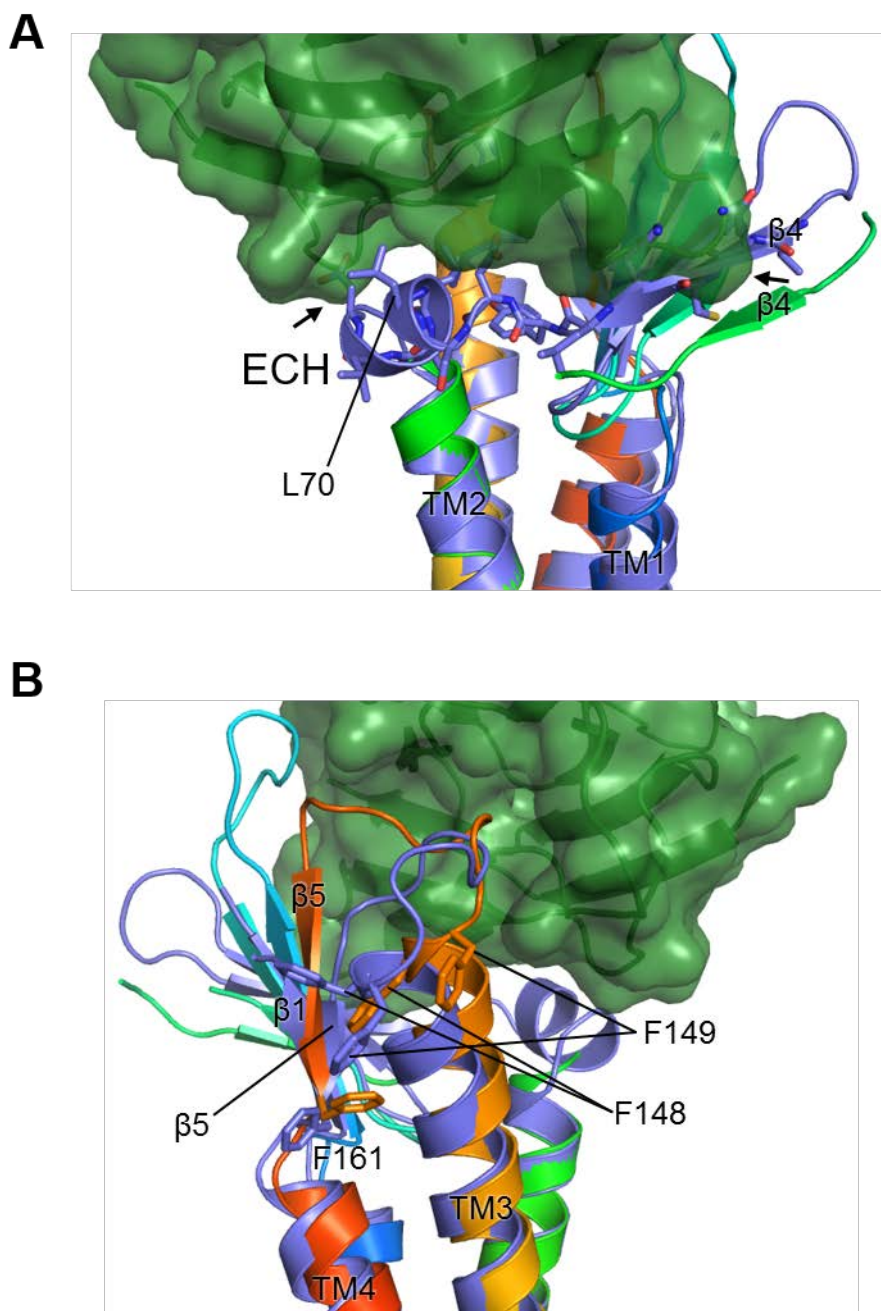


図 34 C-CPE/mCldn-19 複合体と C-CPE 非結合の mCldn-19 ホモロジーモデルとの比較
 (A) ECH の周辺領域。mCldn-19 はリボンモデルで表示し、C-CPE は表面モデルで表示した。C-CPE/mCldn-19 は図 20 と同様に色付けし、mCldn-19 ホモロジーモデルは薄紫色で色付けした。2つの構造は TM2 (アミノ酸残基 78-97) を基に重ね合わせた。黒矢印は、mCldn-19 ホモロジーモデルが C-CPE と立体障害を起こしている箇所を示した。mCldn-19 の L70 は、mCldn-15 が線状に重合するのに重要な M68 に相当する疎水性の残基。
 (B) ECS2 の周辺領域。 mCldn-19 の F148, F149, F161 は、mCldn-15 が線状に重合するのに重要な F146, F147, L158 にそれぞれ相当する疎水性の残基。

3.3. 考察

C-CPE/mCldn-19 複合体の構造と C-CPE が結合していない mCldn-19 ホモロジーモデルの構造を比較した結果、いくつかの違いが見られた。上記の様に、mCldn-15 と mCldn-19 ホモロジーモデル間の構造の差異は小さかったので、C-CPE/mCldn-19 複合体と mCldn-19 ホモロジーモデルの構造の違いに基づいて C-CPE 結合によって起こり得る mCldn-19 の構造変化を推測した (図 35)。Cldn の ECS2 ペプチドが単独で C-CPE に結合できること [86, 108] (図 28) を考慮すると、ECS2 における保存された C-CPE 結合モチーフの構造変化は、Cldn が CPE フリー状態から CPE 結合状態に構造変化する際の最初の段階である可能性がある。この ECS2 における C-CPE 結合モチーフが C-CPE の疎水性ポケットにはまり込むことが最初に起こると仮定して、引き続き起こる構造変化を推察した。以下に推察された構造変化の過程を述べる。まず、ECS2 における C-CPE 結合モチーフが C-CPE の疎水性ポケットにはまり込む。これに伴って、TM3 が右に回転しながら C-CPE 側に傾き、 $\beta 5$ ストランドが伸びる (図 35 左)。 $\beta 5$ ストランドの伸長に伴って $\beta 1$ ストランドが伸び、ディスオーダーしていた $\beta 1$ と $\beta 2$ ストランド間のループが C-CPE と相互作用できるようになる (図 35 中央)。ECS1 の相互作用によって C-CPE と Cldn 間の相互作用の強度が大きくなり、C-CPE は ECH・ $\beta 3$ ストランド・ $\beta 4$ ストランドを押す (図 35 中央)。その結果として、ECH がディスオーダーすると推察される (図 35 右)。

mCldn-15 プロトマーは、ECH の疎水性残基と ECS2 の疎水性残基が相互作用することによって線状に重合すると考えられている [78]。この線状重合に重要な疎水性残基は、mCldn-19 では ECH に存在する L70、ECS2 に存在する F148, F149, F161 に相当する。mCldn-15 の線状構造 [78] を基に、mCldn-19 ホモロジーモデルの線状配列をモデル化した (図 36 左)。その結果、ECH に存在する L70 と ECS2 に存在する F148, F149, F161 が、疎水性相互作用ができるような配置になった (図 36 左)。この mCldn-19 の線状配列における mCldn-19 プロトマーの 1 つを C-CPE/mCldn-19 複合体に置き換えると、ECH のディスオーダーおよび ECS2 の動きによって、線状配列に重要な疎水性相互作用が乱されることが示唆された (図 36 右)。したがって、Cldn への C-CPE の結合は、Cldn プロトマー間の線状配列を崩壊させ、Cldn の ECS1 および ECS2 を遮蔽することによって、Cldn の同一膜平面内での重合 (シス相互作用) および隣り合う細胞間での Cldn の相互作用 (トランス相互作用) を阻害すると推測される。いくつかの研究がこの推測を支持している [86, 89]。このような機構により、C-CPE が結合した Cldn は TJ ストランドの形成ができなくなるのかもしれないが、どのようにして C-CPE が TJ ストランドを崩壊させるのかについて完全に理解するためには、mCldn-19 単体の構造解析などのさらなる研究が必要である。

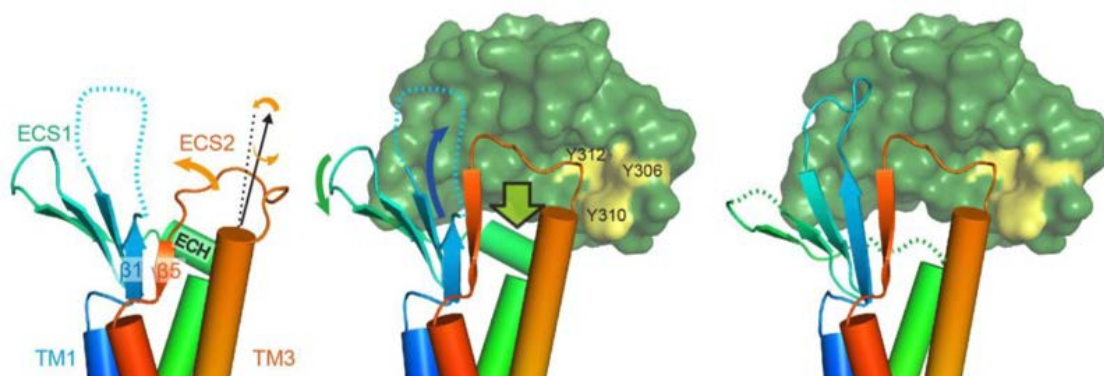


図 35 推測される C-CPE 結合に伴う mCldn-19 の構造変化

推測される C-CPE 結合によって引き起こされる mCldn-19 の連続的な構造変化の 2 段階モデル。mCldn-19 は Cartoon モデルで示した。C-CPE が結合していない mCldn-19 ホモロジーモデルの構造と C-CPE/mCldn-19 複合体間における構造の違いに基づいて推測された Cldn の細胞外領域の動きを矢印で示した。透明な緑色矢印は C-CPE が Cldn に結合する方向を示した。C-CPE が結合していない mCldn-19 ホモロジーモデルは、mCldn-15 の構造を基に作製したもの。青色もしくは青緑色の破線はディスオーダーしている箇所。TM3 から伸びている黒色の矢印と破線は、TM3 ヘリックスの軸を示している。

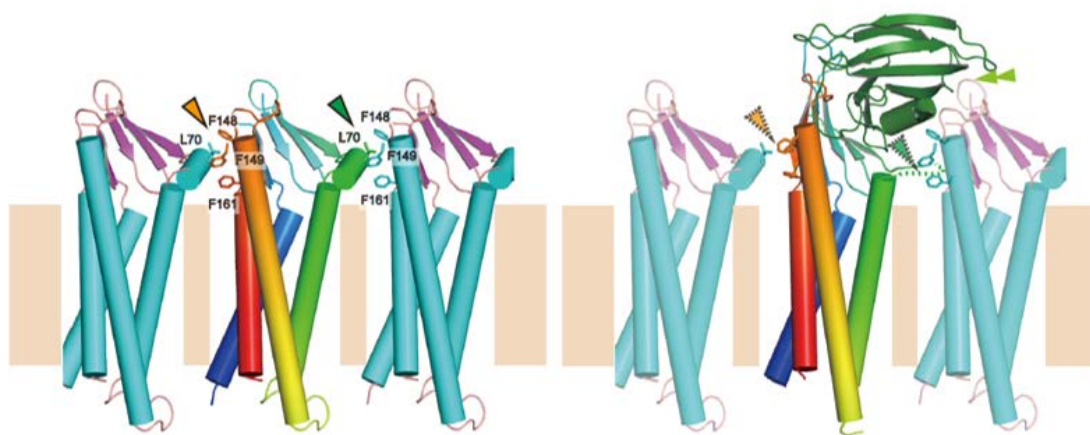


図 36 構造的知見に基づいた C-CPE 結合による TJ ストランドの崩壊モデル

TJ ストランドにおける mCldn-19 の線状配列は、mCldn-15 の結晶構造に基づいてモデル化した。線状配列の相互作用に関わる疎水性残基はスティックモデルで表示し、矢頭で示した (左側のパネル)。C-CPE の結合は、隣接する Cldn プロトマー間の疎水性相互作用を乱し (破線で縁取った矢頭)、立体障害を生み出す (二重矢頭)。これによって、膜平面内で隣接する Cldn プロトマー間の相互作用 (シス相互作用) と、隣接する細胞同士の Cldn プロトマー間の相互作用 (トランス相互作用) が阻害されることが示唆された。

総合討論

<C-CPE と Cldn との相互作用研究>

日本とアメリカ合衆国において、CPE を原因物質とする *C.perfringens* タイプ A による食中毒は患者数が細菌性の食中毒の中で第 2 位に順位づけられており、我々の健康にとって重要な病気である ([18]; 日本における順位は厚生労働省の 2011~2015 の統計データを基に計算した 5 年平均値)。また、CPE は抗生物質関連下痢症のケースを含む *C.perfringens* タイプ A による非食中毒性の胃腸疾患にも関わっている [3, 17]。この *C.perfringens* タイプ A による非食中毒性の胃腸疾患は、*C.perfringens* タイプ A による食中毒よりも慢性的でしばしば重篤化することが知られている [3]。その他にも、CPE は *C. perfringens* タイプ C による壊孔性腸炎の病理発生に寄与しているとの報告もされてきている [120, 121]。このように、CPE は人々の健康を損なう疾患に関わっている。一方で、CPE の Cldn 結合ドメインである C-CPE は、Cldn を高発現しているがん細胞に対する治療薬や診断薬、TJ の透過特性を変化させる薬物吸収促進剤として役立てられようとしている [111, 122, 123, 124]。そのため、C-CPE と Cldn との相互作用機構および C-CPE による TJ の崩壊機構を理解することは CPE による疾患の克服や C-CPE を基にした薬剤等の開発にとって重要である。

本研究で、初めて C-CPE と全長 Cldn との複合体の構造が明らかになり、構造を基にした変異体解析によって、C-CPE と Cldn との詳細な相互作用機構を理解できるようになった。さらに、C-CPE の結合によって Cldn はどのようにして TJ ストランド形成ができなくなるのかについて、初めて構造を基にしたモデルを提唱した。本研究で得られた知見は、上記の CPE による疾患の治療や予防、C-CPE を応用した薬剤開発等に役立てられることが期待される。

また、今回提唱した C-CPE による TJ の崩壊モデルは、mCldn-15 の結晶構造から得られた Cldn プロトマーの同一膜平面内における重合機構 [78] を支持している。しかし、mCldn-19 も mCldn-15 と同様に TJ ストランドの形成に ECH と ECS2 の疎水性残基が重要なかどうかは、そのアミノ酸残基が保存されてはいるものの実験的に明らかにはなっていない。本研究で提唱した C-CPE による TJ の崩壊モデルを検証していくことで、長年良く分かっていなかった TJ の構築機構への理解が進むことが期待される。

<Cldn サブタイプの違いによる TJ の透過特性の違い>

TJ のバリア機能に及ぼす効果から Cldn サブタイプを分類すると、イオン等の透過を制限するバリア型 Cldn と、特定のイオンなどを漏えいさせる漏えい型 Cldn に分類することができる。これまで、カチオンを透過させる漏えい型 Cldn である mCldn-15 の構造のみが明らかになっていた [78, 125, 126]。本研究により、カチオンおよびアニオンの透過を制限するバリア型 Cldn である mCldn-19 の構造が明らかになったので [127, 128]、このバリア

型 Cldn である mCldn-19 と漏えい型 Cldn である mCldn-15 の構造情報を基にしたさらなる研究によって、TJ の透過特性の違いを生み出す仕組みの理解が進むことが期待される。

<Cldn-19 と先天性の腎臓病>

Cldn-19 は、末梢神経・網膜色素上皮・腎臓で発現が認められる [66, 109, 110, 111, 129]。腎臓において、Cldn-19 は Cldn-16 と共にヘンレ係蹄の太い上行脚に発現しており、二価カチオンの再吸収を担っている [128, 130]。ヒトにおいて、Cldn-19 への変異は、眼の異常、高カルシウム尿症と腎石灰化症を伴う家族性低マグネシウム血症 (FHHNC) の原因となることが知られている [111]。FHHNC は腎臓における進行性の Mg^{2+} と Ca^{2+} の損失による慢性的な腎不全を特徴としている。FHHNC を起こす Cldn-19 の変異は、G20D、Q57E、L90P、G123R が報告されており [111, 128]、それぞれ TM1、ECS1 の $\beta 3, 4$ 間のループ、TM2、TM3 に位置している。これらの変異がなぜ Cldn-19 の正常な機能を損なうのかについても、mCldn-19 の構造が明らかになったことで、今後理解が進むことが期待される。

実験方法

FSEC に用いる GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ の発現・精製

CPE 遺伝子の C 末端領域 (194-319) は、pGEX-6P-1 ベクター (GE Healthcare) にサブクローニングした。このプラスミドを *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene) に導入し、N 末端に GST を融合した C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を発現させた。本菌を 100 µg/ml アンピシリン, 25 µg/ml クロラムフェニコールを含む 10 ml の LB 培地に植菌し、一晩 37°C で振盪培養した。一晩培養した 10 ml 培養液を、100 µg/ml アンピシリン, 25 µg/ml クロラムフェニコールを含む 1 L の LB 培地に移し、37°C で振盪培養した。OD₆₀₀ の値が 0.5 に達した時に 0.5 mM になるように IPTG を加え、30°C, 5 時間振盪培養した。培養液を 4°C, 5,000×g, 15 分で遠心分離を行い、細胞を回収した。回収した細胞は PBS で洗った後、液体窒素で急速凍結して -80°C で保存した。保存していた細胞は、10 µg/ml ロイペプチン, 10 µg/ml アプロチニン, 10 µg/ml トリプシン阻害剤, 10 µg/ml DNaseI, 1 mM Phenylmethylsulfonyl (PMSF), 0.5 µg/ml リゾチームを含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS; 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl) で再懸濁し、室温で 10 分間振盪した。この細胞懸濁液は氷上でソニケーションを行って破碎した。細胞の破片を 4°C, 40,000×g, 25 分の遠心分離によって取り除き、その上清を回収した。破碎上清は Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) と混ぜ、4°C で 2 時間転倒混和した。反応させたレジンを開カラムに充填して TBS で洗った。レジンを 10 mM の還元型グルタチオンを含んだ TBS を加えて、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を溶出した。この精製 GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) に充填し、緩衝液を 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) (Anatrace) に交換した。

29 種類のマウス Cldn サブタイプの発現・可溶化

マルチクローニング部位の上流に 8×His タグ-EGFP (A207K) の塩基配列を導入した pFastBac1 ベクター (Life Technologies) に、29 種類のマウス Cldn 遺伝子をそれぞれサブクローニングした。この 29 種類のプラスミドを用い、製造業者の説明書にしたがってバキュロウイルスを作製した。6 穴プレート (Corning) に 2.0×10⁶ 細胞/2 ml/ウェルで接着させた Sf9 昆虫細胞に、作製したバキュロウイルスを 800 µl ずつ加えて感染させ、27°C、湿潤箱の中で 48 時間接地培養を行った。バキュロウイルス感染後の Sf9 細胞は、ピペッティングによって剥離した後エッペンチューブに回収し、4°C, 10,000×g, 5 分遠心分離をして上清を除いた。回収した細胞ペレットは 1 ml の TBS によって洗浄した。細胞ペレットを 1 ml の可溶化緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% DDM) に懸濁し、4°C, 30 分、転倒混濁して可溶化させた後、4°C, 28,600×g, 30 分遠心分離を行い、その上清を可溶化上清として回収した。この可溶化上清はウェスタンブロッティングおよび FSEC による解析に用いた。

ウェスタンブロッティングによる 8×His-EGFP (A207K) -Cldns の発現確認

25 μ l の可溶化上清を 25 μ l の 2×SDS サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) と混合し、60°C, 10 分熱処理した後に、ウェスタンブロッティングにより EGFP 融合 mCldn の発現を確認した (図 7)。一次抗体反応は、ラット抗 GFP モノクローナル抗体 (nacalai tesque) を Blocking One (Nacalai tesque) で 1,000 倍に希釈したものを用いて、4°C, 一晩行った。二次抗体反応は、AP 標識ヤギ抗ラット抗体 (Promega) を TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で 7,500 倍に希釈したものを用いて、室温で 1 時間行った。その後、AP 発色によってバンドを検出した。ネガティブコントロールとして、プラスミドを導入していない Sf9 細胞を用いた。

FSEC による 8×His-EGFP (A207K) -Cldns の分析

上述の可溶化上清を可溶化緩衝液で 1.2 倍希釈して容量を増やし、2 等分した後、その可溶化上清を用いて FSEC を行った (図 9)。FSEC には島津 HPLC のシステムを使用し、カラムは Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare) を用いた。使用前に溶離液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% DDM) でカラムを平衡化し、オートサンプラーによって可溶化上清を 10 μ l ずつカラムに注入して、流速 0.4 ml/min にて分析した。この際、励起波長は 488 nm に設定し、509 nm の蛍光波長を検出した。マウス Cldns の C-CPE 結合能を評価するため、2 等分した片方の可溶化上清 (55 μ l) に、終濃度が 4.3 μ M になるように 5 mg/ml の濃度の精製 GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を 2 μ l 加え、FSEC で分析した。ネガティブコントロールとして、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ のみ及び遺伝子導入を行っていない Sf9 細胞の可溶化上清を用いた。

C-CPE の精製

上述のとおりにして精製した GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を濃縮し、1 mg の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ あたり 10 U の thrombin を加えて、4°C, 2 時間反応させた。GST タグを切断した C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ はゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。AKTA の HPLC システムを使用し、カラムは Superdex 75 10/300 GL カラム (GE ヘルスケア) を用いた。カラムは使用前に溶離液 (10 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 120 mM NaCl) で平衡化した。精製した C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ は Amicon Ultra-15 で 5 mg/ml まで濃縮した後、液体窒素で急速凍結して使用時まで -80°C で保存した。

培養 SF7 細胞への C-CPE 処理

mCldn-19 を恒常的に発現するように作製された SF7 細胞 [96] は、Transwell チャンバー (Corning) にて培養した。フィルター上の細胞がコンフルエントになった時、上記の精製 C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を終濃度 100 μ g/ml になるようにバソラテラル膜側のチャンバーに加え、24 時間

培養した。C-CPE 処理をした細胞は、免疫蛍光顕微鏡観察および凍結切断免疫電子顕微鏡観察に用いた。コントロールには C-CPE 処理をしていない SF7 細胞を用いた。

免疫蛍光顕微鏡観察

フィルター上に接着している上記の mCldn-19 を恒常的に発現している SF7 細胞は、メタノールで -20℃, 10 分間処理し、固定した。固定後、この細胞は PBS で洗い、1% BSA を含む PBS でブロッキングした。次に、この細胞に一次抗体としてウサギ抗 Cldn-19 ポリクローナル抗体 [66] とマウス抗 ZO-1 モノクローナル抗体 [131] を加え、湿潤箱中で 1 時間反応させた。この細胞は、PBS で 3 回洗った後、二次抗体として Alexa488 をコンジュゲートした抗ウサギ IgG および Alexa647 をコンジュゲートした抗マウス IgG (Invitrogen) と反応させた。二次抗体を結合させた細胞は PBS で 3 回洗った後、Milli-Q 水で 1 回洗った。この細胞は蛍光染色用封入剤 (Dako) を用いて封入し、その観察試料を Olympus BX51 蛍光顕微鏡によって観察した。

SDS 処理凍結切断レプリカ標識法

上記の C-CPE 処理を施した mCldn-19 を恒常的に発現している SF7 細胞と、C-CPE 処理を施していない細胞の 2 種は、室温にて、0.1 M Hepes-NaOH, pH 7.2, 4% ホルムアルデヒドで 1 時間固定化した。固定化した細胞は 4℃ で 3 回 0.1 M リン酸緩衝液を用いて洗い、一晩 30% グリセロール, 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4 中におき、凍結保護を行った。細胞試料は液体窒素に浸漬して凍らせ、-150℃ に安定化させた JFD-II 凍結エッチングシステム (JEOL) 中にて、冷やした金属ナイフで切断した。切断後にすぐさま 60° の角度でプラチナ-カーボンで切断面に蒸着させ、影を付けた。その後、試料を回転させながら上からカーボン蒸着を行い、レプリカ試料を作製した。作製したレプリカ試料は、15 mM Tris-HCl, pH 8.3, 2.5% SDS, 20% スクロースに移し、120℃, 20 分間オートクレーブして、レプリカ膜に残った細胞成分を溶かした。このレプリカ膜は 300 倍希釈した抗 GFP ポリクローナル抗体と最初に反応させ、200 倍希釈した抗ウサギ抗体をコンジュゲートさせた 15 nm の金コロイド (BBInternational) を反応させた [97, 132]。レプリカ膜は 4k×4k CMOS カメラ (TVIPS) を搭載した JEM-1010 電子顕微鏡 (JEOL) を用いて 15,000 倍の倍率で観察した。

タンパク質発現と精製

C-CPE

S313A の変異を導入した CPE の C 末端側の残基 203-319 (C-CPE₂₀₃₋₃₁₉S313A) は、pGEX-6P-1 ベクター (GE Healthcare) にサブクローニングし、上述の方法で大量発現・精製した。ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した C-CPE₂₀₃₋₃₁₉S313A は 5 mg/ml の濃度まで濃縮して、液体窒素で急速凍結して -80℃ で保存した。

mCldn-19

マルチクローニング部位の上流に 8×His タグ-EGFP (A207K) の配列を導入した pFastBac1 ベクターに、mCldn-19 をサブクローニングした。不均一なパルミトイル化による Cldn 分子の不均一性を防ぐために、mCldn-19 の Cys104, Cys183, Cys184 をアラニン残基に置換した。さらに、DISOPRED [99] によって、ディスオーダー領域と推測された mCldn-19 の C 末端尾部 26 残基を除去した。最終的な mCldn-19 コンストラクト (mCldn-19_{cryst}) は、N 末端にタバコエッチウイルス (TEV) プロテアーゼで切断可能な 8×His タグおよび EGFP (A207K) が融合した状態 (EGFP-mCldn-19_{cryst}) で発現させた。製造業者の説明書にしたがってバキュロウイルスを作製し、ウイルスのタイターを増幅させた。Sf900III 培地 (Life Technologies) で振盪培養していた Sf9 細胞にバキュロウイルスを感染させ、27°C で 48 時間振盪培養した。Sf9 細胞は遠心分離によって回収し、PBS で洗った。Sf9 細胞はプロテアーゼ阻害剤 (1 mM PMSF, 10 µg/ml ロイペプチン, 10 µg/ml アプロチニン, 10 µg/ml トリプシン阻害剤) を含んだ TBS で再懸濁し、EmulsiFlex-C5 (Avestin) を用いて 15,000 psi で破碎した。細胞の破片は 4°C, 2,000×g, 20 分の遠心分離によって除いた。さらに、この上清を 4°C, 100,000×g, 1 時間で超遠心し、そのペレットを TBS で懸濁し粗膜画分として回収した。粗膜画分の懸濁は Dounce ホモジナイザーを用いて行った。粗膜画分は 1% DDM と 0.2% cholesteryl hemisuccinate (Sigma Aldrich) を含んだ TBS 中で、4°C, 1 時間可溶化させた。不溶性の物質は 4°C, 100,000×g, 45 分の超遠心によって除き、上清を回収した。回収した上清に Talon コバルトアフィニティーレジン (Clontech) を加え、4°C, 3 時間転倒混和した。このレジンを 0.1% DDM, 10 mM イミダゾールを含む TBS で洗った後、EGFP-mCldn-19_{cryst} を 0.1% DDM, 200 mM イミダゾールを含む TBS で溶出した。溶出液の緩衝液を、PD-10 脱塩カラムを用いて 0.025% DDM を含む TBS に交換した。PD-10 カラムの溶出液に TEV プロテアーゼを加え、4°C, 一晩反応させた。反応後の液に、Talon コバルトアフィニティーレジンを加えて、4°C, 2 時間インキュベートし、切断した 8×His-EGFP タグおよび未反応の EGFP-mCldn-19_{cryst} をレジんに吸着させた。このレジンをオープンカラムに充填し、その素通り画分を精製 mCldn-19_{cryst} として回収した。

C-CPE/mCldn-19 複合体

精製した mCldn-19_{cryst} を C-CPE₂₀₃₋₃₁₉S313A と 1:2 (w/w) の比率で混合し、4°C, 2 時間転倒混和した。この溶液を、移動相 (10 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.025% DDM) で平衡化した Superdex 200 10/300 GL ゲル濾過カラムに注入した。C-CPE₂₀₃₋₃₁₉S313A /mCldn-19_{cryst} 複合体のピークを分画し、その画分を ~5 mg/ml に濃縮した。

結晶化

精製した C-CPE₂₀₃₋₃₁₉S313A /mCldn-19_{cryst} 複合体はシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化させた。リザーバー溶液には、17.5% ポリエチレングリコール (PEG) 1500, 100

mM 酢酸ナトリウム, pH 5.8, 100 mM Mg(NO₃)₂ を用いた。タンパク質溶液とリザーバー溶液を 1:1 (v/v) で混合した液滴を 20°C で 4 日間静置したところ、結晶が現れた。結晶は同じ母液の組成に加え、PEG 1500 の濃度 (17.5% から 18%) および PEG400 の濃度 (0% から 15%) を徐々に上げた液に段階的に浸漬していった後、液体窒素で急速凍結した。

mCldn-19 のホモロジーモデリング

ホモロジーモデリングのために、mCldn-19 と mCldn-15 の多重配列アライメントを ClustalW [133] を用いて行った。手作業でアライメントを修正した後、初期テンプレートとしてジスルフィド結合の制限をつけた mCldn-15 の原子モデルを用い、MODELLER [134] v9.12 によって CPE が結合していない mCldn-19 のホモロジーモデルを作製した。mCldn-15 のディスオーダーしている ECS1 領域は、COOT [135] にて手作業で除去した。最終的なモデルは、さらに CNS [136] v1.3 で実験データを加えずに精密化した。以前の報告 [78] のように、ホモロジーモデリングの結果からは、Cldn サブタイプ間において 4 本の TM ヘリックスの束と ECH 領域はよく保存されている一方、細胞外ドメインの遠位の末端部において構造的な特徴がみられることが示された (図 33)。

構造決定

X 線回折データは SPring-8 の BL32XU マイクロフォーカスビームライン [137] で収集し、HKL2000 を用いて処理した [138]。立体構造は分子置換法によって決定した。初期位相は、mCldn-15 の構造に基づいて作製した mCldn-19 の TM ドメインのホモロジーモデルと C-CPE の結晶構造 [27] をサーチモデルとして用い、Phaser [139] によって算出した。そして、非対称単位中に C-CPE と mCldn-19 が 1:1 で結合した複合体が 2 分子含まれていることが分かった。原子モデルは 2 倍の非結晶学的対称性を用いて、COOT による手作業のモデル構築と PHENIX [140] による精密化の反復サイクルによって再構築した。精密化を行った最終的なモデルは、 $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ が 0.251/0.293 で分解能が 3.7 Å となった。データ処理と精密化の統計値は表 3 に示した。2 分子の C-CPE と 2 分子の mCldn-19 からなるモデルのラマチャンドランプロットは MolProbity [141] で計算した (表 3)。図は PyMOL (<http://www.pymol.org/>) と UCSF Chimera [142] を用いて作図した。静電ポテンシャルの表面分布は Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) [143] を用いて算出した。

FSEC によるみかけのアフィニティー($K_{0.5}$)の見積もり

上述したように GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を精製し、PD-10 脱塩カラムで 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% DDM に緩衝液を交換した。N 末端に 8×His タグと EGFP (A207K) を融合したマウス Cldn-1, -3, -19 を pFastBac1 ベクターにサブクローニングした (EGFP-mCldns)。全ての mCldn-19 変異体は、このコンストラクトを基にして、QuickChangeII 部位特異的変異導入キット (Stratagene) を用いて作製した。EGFP-mCldn コンストラクトは

上述のように発現させ、精製した。

それぞれの精製した EGFP-mCldn タンパク質は 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% DDM で希釈し、60 μ l の一定分量で 6 nM の EGFP-mCldn を用意した。この分注した溶液は、それぞれ 5 pM から 100 μ M の濃度になるように精製 GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ を加えて 4°C で一晩おいた。それぞれの試料について、連続的な希釈実験は 3 回行った。一晩インキュベーションを行った後、10 μ l の試料を、20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% DDM で平衡化させた Superdex 200 Increase 5/150 GL カラム (GE Healthcare) に注入した。島津 HPLC のシステムを使用して流速 0.4 ml/min で送液した。タンパク質の溶出は 488 nm の励起波長と 509 nm の蛍光波長を用いて測定した [93]。C-CPE へのマウス Cldn のアフィニティーを見積もるため、異なる GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度 (0 M, 5 pM, 50 pM, 500 pM, 5 nM, 50 nM, 500 nM, 5 μ M, 50 μ M, 100 μ M) についてクロマトグラムを記録した (図 13A)。100 μ M の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度では、完全に mCldn-19 は飽和しているため、GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉/EGFP-mCldn-19 複合体に相当するピーク (保持時間は 3.416 分) の蛍光強度は最大値をとり、その保持時間は最小値をとると考えられる。そのため、異なる GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度条件下で得られた複合体の保持時間における蛍光強度を、100 μ M の濃度時での複合体の蛍光強度を用いて標準化し、mCldn へ結合した GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 量を推測した。異なる GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度条件下で mCldn と結合したタンパク質の量をプロットし、異なる mCldn の結合アフィニティーを決定するために使った。そして、mCldn 分子の半分が GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ と結合している GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度を、 $K_{0.5}$ 値として示した。カーブフィッティングとみかけの $K_{0.5}$ 値の算出は GraphPad PRISM4 ver. 4.04 (GraphPad Software) で行った (図 13B)。

mCldn-1 のような、いくつかの mCldn コンストラクトについては、100 μ M の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度でも結合を飽和させるのに十分な濃度ではなかった。このような場合には、完全に結合した GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉/EGFP-mCldn 複合体のピーク強度を平均化して、標準化した蛍光強度を算出するために使用した。そのようにして算出した mCldn の $K_{0.5}$ 値は信頼できないものとしてアスタリスクで示した (図 13B)。

C-CPE への結合アフィニティーに基づいた mCldn-19 変異体の分類

C-CPE への結合アフィニティーに基づいて mCldn-19 変異体を分類するために、4.3 μ M の GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ 濃度で溶出してくる GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉/EGFP-mCldn 複合体の保持時間と、C-CPE の結合量の関係をプロットした (図 30)。多項式最小二乗フィットでカーブフィッティングを行った。C-CPE の結合量に基づき、mCldn-19 変異体を強いアフィニティーを持つもの (60%以上の C-CPE 結合を示した mCldn 変異体を”S”)、弱いアフィニティーを持つもの (10%から 60%の間の C-CPE 結合を示した mCldn を”W”)、とても弱いアフィニティーを持つもの (10%より小さい C-CPE 結合を示した mCldn を”VW”) の 3 種類に分類した。この 3 種類の分類は、C-CPE への結合アフィニティーを調べた全ての mCldn-19 変異体の分類に用

いた。

単発の FSEC 解析による mCldn-19 変異体の GST-C-CPE へのアフィニティー測定

EGFP-mCldn-19 の野生型と変異体のコンストラクトは、pBiEx-1 ベクター (Novagen) にサブクローニングした。6 穴プレート (Corning) に、 0.8×10^6 細胞/well の細胞密度で Sf9 細胞を静置培養し、Cellfectin-II 試薬 (Life Technology) を用いて一過的に発現プラスミドを導入した ($4 \mu\text{g/well}$)。27°C で 60 時間培養した後、ピペッティングにより細胞を剥離し、回収した。回収した細胞は PBS で洗い、150 μl の可溶化緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% DDM, プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque)) で再懸濁した。その細胞懸濁液は、4°C で 30 分転倒混和をし、4°C, $120,000 \times g$, 30 分、遠心分離を行った。この上清の一部 (55 μl) は、4.3 μM GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉ と 4°C, 2 時間インキュベートさせた。インキュベートした試料は、20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% DDM で平衡化させた Superdex 200 Increase 5/150 GL カラムに注入した。島津 HPLC のシステムを使用して流速 0.4 ml/min で送液し、488 nm の励起波長と 509 nm の蛍光波長を用いてタンパク質の溶出を測定した。mCldn-19 変異体の C-CPE 結合容量は、溶出した GST-C-CPE₁₉₄₋₃₁₉/EGFP-mCldn-19 複合体の保持時間から推測し、上記で定義した 3 種の分類基準に基づいて分類した。

謝辞

本論文は筆者が名古屋大学大学院創薬科学研究科・名古屋大学細胞生理学研究センターに在籍中・所属中の研究成果をまとめたものである。同研究科および同センターの藤吉好則特任教授は、私を快く研究室に受け入れてくださり、自由に研究する環境を提供してくださいました。また、研究面や生活面等様々な面で力強く支えてくださり、研究者としての在り方もご教示くださいました。深謝いたします。同センターの谷一寿特任教授は、研究を力強く支えてくださり、研究者として働いていくためのご助言等をご教示くださいました。深謝いたします。ロックフェラー大学の鈴木博視博士は、未熟であった私に丁寧に諸々の実験技術や研究の進め方をご教示くださり、様々な面で常に力強く支えてくださいました。深謝いたします。同研究科・同センターの入江克雅助教は、X線結晶構造解析を力強く支えてくださり、実験デザインの議論もしてくださいました。深謝いたします。同センターの西川幸希研究員は、凍結切断免疫電子顕微鏡観察を力強く支えてくださいました。深謝いたします。大阪大学生命機能研究科・医学系研究科の月田早智子教授には、報文の執筆や実験デザインの議論等でお世話になりました。深謝いたします。大阪大学同研究科の田村淳准教授には、クロードイン遺伝子のスクリーニングおよび蛍光顕微鏡観察でお世話になりました。深謝いたします。大阪大学同研究科の小倉祐輝氏は、蛍光顕微鏡観察を行ってくださるとともに、最適な実験条件の議論をしてくださいました。深謝いたします。技術的に支えてくださった大阪大学同研究科のメンバーに深謝いたします。アフィニティー値の計算を行ってくださった名古屋大学同センターの阿部一啓准教授に深謝いたします。X線回折データの取得を支えてくださった大型放射光施設 (SPring-8) の BL32XU、BL38B1、BL41XU のビームラインスタッフのメンバーに深謝いたします。報文執筆時に力強く支えてくださったロックフェラー大学の Thomas Waltz 教授に深謝いたします。

研究生生活を共に過ごした名古屋大学同センターの皆様には、研究に対する熱い情熱を持って有意義な議論をしていただき、困難な時、落ち込んだ時等には助けていただきました。皆様と過ごせたお陰で大いに成長できたと思います。深謝いたします。同センターの秘書、堀田智美氏は、出張や書類提出などの事務手続き等を力強く支えてくださいました。深謝いたします。

最後に、研究者として働きたいという私の想いに対し、理解し応援し続けてくださった両親、祖父母、妻に深謝いたします。

参考文献

1. Welch W. H. and Nuttall G. H. F. (1892). A gas-producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov. Spec.) capable of rapid development in the blood-vessels after death. Bull. Johns Hopkins Hosp. 3, 81-91.
2. Li J., Adams V., Bannam T. L., Miyamoto K., Garcia J. P., Uzal F. A., Rood J. I., and McClane B. A. (2013). Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 208–233.
3. Freedman J. C., Shrestha A., and McClane B. A. (2016). *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. Toxins (Basel) 8.
4. Shrestha A., Uzal F. A., and McClane B. A. (2016). The interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with receptor claudins. Anaerobe 41, 18–26.
5. McClane B. A., Uzal F. A., Miyakawa M. F., Lysterly D. and Wilkins T. D. (2006). The enterotoxigenic clostridia, in: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer H., Stackebrandt E. (Eds.), The Prokaryotes, third ed., Springer NY press., New York. 688-752.
6. Petit L., Gibert M., and Popoff M. R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 7, 104–110.
7. Brooks M. E., Sterne M., and Warrack G. H. (1957). A re-assessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. J. Pathol. 74, 185–195.
8. Sterne M., and Warrack G. H. (1964). THE TYPES OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS. J. Pathol. Bacteriol. 88, 279–283.
9. Niilo L. (1980). *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. Can. Vet. J. 21, 141–148.
10. McDonel J. L. (1980). *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). Pharmacol. Ther. 10, 617–655.
11. Hobbs B. C., Smith M. E., Oakley C. L., Warrack G. H., and Cruickshank J. C. (1953). *Clostridium welchii* food poisoning. J. Hyg. (Lond.) 51, 75–101.
12. Hauschild A. H., Niilo L., and Dorward W. J. (1967). Experimental enteritis with food poisoning and classical strains of *Clostridium perfringens* type A in lambs. J. Infect. Dis. 117, 379–386.
13. Niilo L. (1971). Mechanism of Action of the Enteropathogenic Factor of *Clostridium perfringens* Type A. Infect. Immun. 3, 100–106.
14. Strong D. H., Duncan C. L., and Perna G. (1971). *Clostridium perfringens* Type A Food Poisoning II. Response of the Rabbit Ileum as an Indication of Enteropathogenicity of Strains of *Clostridium perfringens* in Human Beings. Infect. Immun. 3, 171–178.

15. Niilo L. (1973). Fluid secretory response of bovine Thiry jejunal fistula to enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 7, 1–4.
16. Niilo L. (1974). Response of ligated intestinal loops in chickens to the enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 28, 889–891.
17. Sarker M. R., Carman R. J., and McClane B. A. (1999). Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol. Microbiol.* 33, 946–958.
18. Scallan E., Hoekstra R. M., Angulo F. J., Tauxe R. V., Widdowson M.-A., Roy S. L., Jones J. L., and Griffin P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15.
19. Hoffmann S., Batz M. B., and Morris J. G. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 75, 1292–1302.
20. Skjelkvåle R., and Uemura T. (1977). Experimental Diarrhoea in human volunteers following oral administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* 43, 281–286.
21. Horiguchi Y., Akai T., and Sakaguchi G. (1987). Isolation and function of a *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment. *Infect. Immun.* 55, 2912–2915.
22. Hanna P. C., Wnek A. P., and McClane B. A. (1989). Molecular cloning of the 3' half of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene and demonstration that this region encodes receptor-binding activity. *J. Bacteriol.* 171, 6815–6820.
23. Hanna P. C., and McClane B. A. (1991). A recombinant C-terminal toxin fragment provides evidence that membrane insertion is important for *Clostridium perfringens* enterotoxin cytotoxicity. *Mol. Microbiol.* 5, 225–230.
24. Hanna P. C., Mietzner T. A., Schoolnik G. K., and McClane B. A. (1991). Localization of the receptor-binding region of *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region. *J. Biol. Chem.* 266, 11037–11043.
25. Hanna P. C., Wieckowski E. U., Mietzner T. A., and McClane B. A. (1992). Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* 60, 2110–2114.
26. Kokai-Kun J. F., and McClane B. A. (1997). Deletion analysis of the *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* 65, 1014–1022.
27. Van Itallie C. M., Betts L., Smedley J. G., McClane B. A., and Anderson J. M. (2008). Structure of the claudin-binding domain of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 283, 268–274.

28. Kitadokoro K., Nishimura K., Kamitani S., Fukui-Miyazaki A., Toshima H., Abe H., Kamata Y., Sugita-Konishi Y., Yamamoto S., Karatani H., et al. (2011). Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* 286, 19549–19555.
29. Briggs D. C., Naylor C. E., Smedley J. G., Lukyanova N., Robertson S., Moss D. S., McClane B. A., and Basak A. K. (2011). Structure of the food-poisoning *Clostridium perfringens* enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins. *J. Mol. Biol.* 413, 138–149.
30. Wieckowski E. U., Wnek A. P., and McClane B. A. (1994). Evidence that an approximately 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 269, 10838–10848.
31. Chakrabarti G., and McClane B. A. (2005). The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell. Microbiol.* 7, 129–146.
32. McClane B. A. (2000). *Clostridium perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol.* 8, 145–146.
33. Katahira J., Inoue N., Horiguchi Y., Matsuda M., and Sugimoto N. (1997). Molecular Cloning and Functional Characterization of the Receptor for *Clostridium perfringens* Enterotoxin. *J. Cell Biol.* 136, 1239–1247.
34. Katahira J., Sugiyama H., Inoue N., Horiguchi Y., Matsuda M., and Sugimoto N. (1997). *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 26652–26658.
35. Morita K., Furuse M., Fujimoto K., and Tsukita S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 511–516.
36. Farquhar M. G., and Palade G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17, 375–412.
37. Diamond J. M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* 20, 10–18.
38. Green C. R., and Bergquist P. R. (1982). Phylogenetic Relationships within The invertebrata in Relation to The structure of Septate Junctions and the development of “Occluding” Junctional Types. *J. Cell Sci.* 53, 279–305.
39. Lane N. J., Dallai R., Burighel P., and Martinucci G. B. (1986). Tight and gap junctions in the intestinal tract of tunicates (Urochordata): a freeze-fracture study. *J. Cell. Sci.* 84, 1–17.

40. Günzel D., and Yu A. S. L. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* 93, 525–569.
41. Frömter E., and Diamond J. (1972). Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature New Biol.* 235, 9–13.
42. Powell D. W. (1981). Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 241, G275–288.
43. Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2009). *Physiology and Function of the Tight Junction. Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1
44. Staehelin L. A., Mukherjee T. M., and Williams A. W. (1969). Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* 67, 165–184.
45. Staehelin L. A. (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell. Sci.* 13, 763–786.
46. Tsukita S., Furuse M., and Itoh M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285–293.
47. Furuse M. (2010). *Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
48. Zihni C., Mills C., Matter K., and Balda M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 564–580.
49. Stevenson B. R., Siliciano J. D., Mooseker M. S., and Goodenough D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103, 755–766.
50. Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., and Tsukita S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
51. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., and Tsukita S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539–1550.
52. Martìn-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., et al. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142, 117–127.
53. Cohen C. J., Shieh J. T., Pickles R. J., Okegawa T., Hsieh J. T., and Bergelson J. M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 15191–15196.
54. Makarova O., Roh M. H., Liu C.-J., Laurinec S., and Margolis B. (2003). Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* 302, 21–29.

55. Osler M. E., Chang M. S., and Bader D. M. (2005). Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J. Cell. Sci.* *118*, 4667–4678.
56. Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., and Tsukita S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* *171*, 939–945.
57. Steed E., Rodrigues N. T. L., Balda M. S., and Matter K. (2009). Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol.* *10*, 95.
58. Higashi T., Tokuda S., Kitajiri S., Masuda S., Nakamura H., Oda Y., and Furuse M. (2013). Analysis of the “angulin” proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J. Cell. Sci.* *126*, 966–977.
59. Günzel D., and Fromm M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Compr. Physiol.* *2*, 1819–1852.
60. Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K., and Tsukita S. (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* *143*, 391–401.
61. Morita K., Sasaki H., Fujimoto K., Furuse M., and Tsukita S. (1999). Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J. Cell Biol.* *145*, 579–588.
62. Morita K., Sasaki H., Furuse M., and Tsukita S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* *147*, 185–194.
63. Sonoda N., Furuse M., Sasaki H., Yonemura S., Katahira J., Horiguchi Y., and Tsukita S. (1999). Clostridium perfringens Enterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands. *J. Cell Biol.* *147*, 195–204.
64. Tsukita S., and Furuse M. (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.* *9*, 268–273.
65. Itoh M., Sasaki H., Furuse M., Ozaki H., Kita T., and Tsukita S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3. *J. Cell Biol.* *154*, 491–498.
66. Miyamoto T., Morita K., Takemoto D., Takeuchi K., Kitano Y., Miyakawa T., Nakayama K., Okamura Y., Sasaki H., Miyachi Y., et al. (2005). Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J. Cell Biol.* *169*, 527–538.
67. Gow A., Southwood C. M., Li J. S., Pariali M., Riordan G. P., Brodie S. E., Danias J., Bronstein J. M., Kachar B., and Lazzarini R. A. (1999). CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell* *99*, 649–659.
68. Gow A., Davies C., Southwood C. M., Frolenkov G., Chrastowski M., Ng L., Yamauchi D., Marcus D. C., and Kachar B. (2004). Deafness in Claudin 11-Null Mice Reveals the Critical

- Contribution of Basal Cell Tight Junctions to Stria Vascularis Function. *J. Neurosci.* *24*, 7051–7062.
69. Kitajiri S., Miyamoto T., Mineharu A., Sonoda N., Furuse K., Hata M., Sasaki H., Mori Y., Kubota T., Ito J., et al. (2004). Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J. Cell Sci.* *117*, 5087–5096.
 70. Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., and Tsukita S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* *156*, 1099–1111.
 71. Muto S., Hata M., Taniguchi J., Tsuruoka S., Moriwaki K., Saitou M., Furuse K., Sasaki H., Fujimura A., Imai M., et al. (2010). Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8011–8016.
 72. Meng J., Holdcraft R. W., Shima J. E., Griswold M. D., and Braun R. E. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16696–16700.
 73. Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., and Tsukita S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.
 74. Van Itallie C. M., and Anderson J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.* *68*, 403–429.
 75. Tamura A., and Tsukita S. (2014). Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barriology revealed in knockout mice. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 177–185.
 76. Tsukita S., Yamazaki Y., Katsuno T., Tamura A., and Tsukita S. (2008). Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* *27*, 6930–6938.
 77. Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., Tada Y., Saito K., Tamura A., Igarashi M., Endo T., Takeuchi K., et al. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* *585*, 606–612.
 78. Suzuki H., Nishizawa T., Tani K., Yamazaki Y., Tamura A., Ishitani R., Dohmae N., Tsukita S., Nureki O., and Fujiyoshi Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* *344*, 304–307.
 79. Krause G., Winkler L., Mueller S. L., Haseloff R. F., Piontek J., and Blasig I. E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 631–645.

80. Thompson P. D., Tipney H., Brass A., Noyes H., Kemp S., Naessens J., and Tassabehji M. (2010). Claudin 13, a Member of the Claudin Family Regulated in Mouse Stress Induced Erythropoiesis. *PLoS One* 5.
81. Furuse M., Sasaki H., and Tsukita S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* 147, 891–903.
82. Piontek J., Winkler L., Wolburg H., Müller S. L., Zuleger N., Piehl C., Wiesner B., Krause G., and Blasig I. E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22, 146–158.
83. Piontek J., Fritzsche S., Cording J., Richter S., Hartwig J., Walter M., Yu D., Turner J. R., Gehring C., Rahn H.-P., et al. (2011). Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3903–3918.
84. Suzuki H., Tani K., Tamura A., Tsukita S., and Fujiyoshi Y. (2015). Model for the Architecture of Claudin-Based Paracellular Ion Channels through Tight Junctions. *J. Mol. Biol.* 427, 291–297.
85. Fujita K., Katahira J., Horiguchi Y., Sonoda N., Furuse M., and Tsukita S. (2000). Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett.* 476, 258–261.
86. Winkler L., Gehring C., Wenzel A., Müller S. L., Piehl C., Krause G., Blasig I. E., and Piontek J. (2009). Molecular determinants of the interaction between Clostridium perfringens enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem.* 284, 18863–18872.
87. Kimura J., Abe H., Kamitani S., Toshima H., Fukui A., Miyake M., Kamata Y., Sugita-Konishi Y., Yamamoto S., and Horiguchi Y. (2010). Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J. Biol. Chem.* 285, 401–408.
88. Ebihara C., Kondoh M., Harada M., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S.-I., Horiguchi Y., Yagi K., and Watanabe Y. (2007). Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem. Pharmacol.* 73, 824–830.
89. Harada M., Kondoh M., Ebihara C., Takahashi A., Komiya E., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S.-I., Horiguchi Y., Yagi K., et al. (2007). Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 73, 206–214.
90. Takahashi A., Komiya E., Kakutani H., Yoshida T., Fujii M., Horiguchi Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Koizumi N., et al. (2008). Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1639–1648.

91. Veshnyakova A., Piontek J., Protze J., Waziri N., Heise I., and Krause G. (2012). Mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J. Biol. Chem.* 287, 1698–1708.
92. Robertson S. L., Smedley J. G., and McClane B. A. (2010). Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* 78, 505–517.
93. Kawate T., and Gouaux E. (2006). Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure* 14, 673–681.
94. Shrestha A., and McClane B. A. (2013). Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *MBio* 4.
95. Ling J., Liao H., Clark R., Wong M. S. M., and Lo D. D. (2008). Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance. *J. Biol. Chem.* 283, 30585–30595.
96. Yamazaki Y., Tokumasu R., Kimura H., and Tsukita S. (2011). Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. *Mol. Biol. Cell* 22, 1495–1504.
97. Fujimoto K. (1995). Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell Sci.* 108, 3443–3449.
98. Van Itallie C. M., Gambling T. M., Carson J. L., and Anderson J. M. (2005). Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J. Cell. Sci.* 118, 1427–1436.
99. Ward J. J., McGuffin L. J., Bryson K., Buxton B. F., and Jones D. T. (2004). The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* 20, 2138–2139.
100. Takahashi A., Kondoh M., Uchida H., Kakamu Y., Hamakubo T., and Yagi K. (2011). Mutated C-terminal fragments of *Clostridium perfringens* enterotoxin have increased affinity to claudin-4 and reversibly modulate tight junctions in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 466–470.
101. Mitic L. L., Unger V. M., and Anderson J. M. (2003). Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. *Protein Sci.* 12, 218–227.
102. Mogk S., Meiwes A., Shtopel S., Schraermeyer U., Lazarus M., Kubata B., Wolburg H., and Duszenko M. (2014). Cyclical Appearance of African Trypanosomes in the Cerebrospinal Fluid: New Insights in How Trypanosomes Enter the CNS. *PLoS One* 9.
103. Lal-Nag M., Battis M., Santin A. D., and Morin P. J. (2012). Claudin-6: a novel receptor for CPE-mediated cytotoxicity in ovarian cancer. *Oncogenesis* 1, e33.

104. Robertson S. L., Smedley J. G., Singh U., Chakrabarti G., Van Itallie C. M., Anderson J. M., and McClane B. A. (2007). Compositional and stoichiometric analysis of *Clostridium perfringens* enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. *Cell. Microbiol.* 9, 2734–2755.
105. Veshnyakova A., Protze J., Rossa J., Blasig I. E., Krause G., and Piontek J. (2010). On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. *Toxins (Basel)* 2, 1336–1356.
106. Takahashi A., Kondoh M., Masuyama A., Fujii M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., and Watanabe Y. (2005). Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J. Control. Release* 108, 56–62.
107. Mitchell L. A., and Koval M. (2010). Specificity of Interaction between *Clostridium perfringens* Enterotoxin and Claudin-Family Tight Junction Proteins. *Toxins (Basel)* 2, 1595–1611.
108. Yelland T. S., Naylor C. E., Bagoban T., Savva C. G., Moss D. S., McClane B. A., Blasig I. E., Popoff M., and Basak A. K. (2014). Structure of a *C. perfringens* enterotoxin mutant in complex with a modified Claudin-2 extracellular loop 2. *J. Mol. Biol.* 426, 3134–3147.
109. Luk J. M., Tong M.-K., Mok B. W., Tam P.-C., Yeung W. S. B., and Lee K.-F. (2004). Sp1 site is crucial for the mouse claudin-19 gene expression in the kidney cells. *FEBS Lett.* 578, 251–256.
110. Lee N. P. Y., Tong M. K., Leung P. P., Chan V. W., Leung S., Tam P.-C., Chan K.-W., Lee K.-F., Yeung W. S. B., and Luk J. M. (2006). Kidney claudin-19: localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease. *FEBS Lett.* 580, 923–931.
111. Konrad M., Schaller A., Seelow D., Pandey A. V., Waldegger S., Lesslauer A., Vitzthum H., Suzuki Y., Luk J. M., Becker C., et al. (2006). Mutations in the Tight-Junction Gene Claudin 19 (CLDN19) Are Associated with Renal Magnesium Wasting, Renal Failure, and Severe Ocular Involvement. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 949–957.
112. Holmes J. L., Van Itallie C. M., Rasmussen J. E., and Anderson J. M. (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr. Patterns* 6, 581–588.
113. Lu Z., Ding L., Lu Q., and Chen Y.-H. (2013). Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers* 1, e24978.
114. Shinoda T., Shinya N., Ito K., Ohsawa N., Terada T., Hirata K., Kawano Y., Yamamoto M., Kimura-Someya T., Yokoyama S., et al. (2016). Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. *Sci. Rep.* 6, 33632.
115. Bos J., Smithee L., McClane B., Distefano R. F., Uzal F., Songer J. G., Mallonee S., and Crutcher J. M. (2005). Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clin. Infect. Dis.* 40, e78-83.

116. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). Fatal foodborne *Clostridium perfringens* illness at a state psychiatric hospital--Louisiana, 2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 61, 605–608.
117. Caserta J. A., Robertson S. L., Saputo J., Shrestha A., McClane B. A., and Uzal F. A. (2011). Development and application of a mouse intestinal loop model to study the in vivo action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* 79, 3020–3027.
118. Shen L., Weber C. R., and Turner J. R. (2008). The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J. Cell Biol.* 181, 683–695.
119. Dukes J. D., Fish L., Richardson J. D., Blaikley E., Burns S., Caunt C. J., Chalmers A. D., and Whitley P. (2011). Functional ESCRT machinery is required for constitutive recycling of claudin-1 and maintenance of polarity in vertebrate epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 22, 3192–3205.
120. Ma M., Li J., and McClane B. A. (2012). Genotypic and Phenotypic Characterization of *Clostridium perfringens* Isolates from Darmbrand Cases in Post-World War II Germany. *Infect. Immun.* 80, 4354–4363.
121. Ma M., Gurjar A., Theoret J. R., Garcia J. P., Beingesser J., Freedman J. C., Fisher D. J., McClane B. A., and Uzal F. A. (2014). Synergistic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin and beta toxin in rabbit small intestinal loops. *Infect. Immun.* 82, 2958–2970.
122. Morin P. J. (2005). Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 65, 9603–9606.
123. English D. P., and Santin A. D. (2013). Claudins overexpression in ovarian cancer: potential targets for *Clostridium Perfringens* Enterotoxin (CPE) based diagnosis and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10412–10437.
124. Kondoh M., Masuyama A., Takahashi A., Asano N., Mizuguchi H., Koizumi N., Fujii M., Hayakawa T., Horiguchi Y., and Watanbe Y. (2005). A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharmacol.* 67, 749–756.
125. Colegio O. R., Van Itallie C. M., McCrea H. J., Rahner C., and Anderson J. M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 283, C142–147.
126. Tamura A., Hayashi H., Imasato M., Yamazaki Y., Hagiwara A., Wada M., Noda T., Watanabe M., Suzuki Y., and Tsukita S. (2011). Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology* 140, 913–923.
127. Angelow S., El-Husseini R., Kanzawa S. A., and Yu A. S. L. (2007). Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F166–177.

128. Hou J., Renigunta A., Konrad M., Gomes A. S., Schneeberger E. E., Paul D. L., Waldegger S., and Goodenough D. A. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J. Clin. Invest.* *118*, 619–628.
129. Peng S., Adelman R. A., and Rizzolo L. J. (2010). Minimal effects of VEGF and anti-VEGF drugs on the permeability or selectivity of RPE tight junctions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 3216–3225.
130. Hou J., Renigunta A., Gomes A. S., Hou M., Paul D. L., Waldegger S., and Goodenough D. A. (2009). Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 15350–15355.
131. Itoh M., Yonemura S., Nagafuchi A., Tsukita S., and Tsukita S. (1991). A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J. Cell Biol.* *115*, 1449–1462.
132. Suzuki H., Nishikawa K., Hiroaki Y., and Fujiyoshi Y. (2008). Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 1181–1189.
133. Thompson J. D., Higgins D. G., and Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673–4680.
134. Šali A., and Blundell T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* *234*, 779–815.
135. Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., and Cowtan K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 486–501.
136. Brünger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *54*, 905–921.
137. Hirata K., Ueno G., Nisawa A., Kawano Y., Hikima T., Shimizu N., Kumasaka T., Yumoto H., Tanaka T., Takahashi S., et al. (2010). New micro-beam beamline at SPring-8, targeting at protein micro-crystallography. *AIP Conference Proceedings* *1234*, 901–904.
138. Otwinowski Z., and Minor W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.* *276*, 307–326.
139. McCoy A. J. (2007). Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *63*, 32–41.
140. Adams P. D., Afonine P. V., Bunkóczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L.-W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive

- Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 213–221.
141. Chen V. B., Arendall W. B., Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S., and Richardson D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 12–21.
142. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., and Ferrin T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* *25*, 1605–1612.
143. Baker N. A., Sept D., Joseph S., Holst M. J., and McCammon J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 10037–10041.