

|      |   |   |   |
|------|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 第 | 号 |
|------|---|---|---|

## 主論文の要旨

論文題目 ウェルシュ菌エンテロトキシンとクローディン-19との複合体の構造学的研究

氏名 齊藤 恭紀

## 論文内容の要旨

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。