

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 齊藤 恭紀

論文題目 ウェルシュ菌エンテロトキ
シンとクロードイン - 19 との複合体の構造
学的研究

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	藤吉	好則
委員	名古屋大学教授	廣明	秀一
委員	名古屋大学准教授	大嶋	篤典

論文審査の結果の要旨

上皮細胞のシートは、生体内外および組織内外を隔てるバリアとしての機能を中心としつつ、細胞間を通すチャネルとしても機能している。この上皮細胞におけるバリア機能は、タイトジャンクション (TJ) と呼ばれる構造体により形成されており、多細胞生物における恒常性維持の根幹をなしている。このTJは、あたかもジップロックのような筋状の構造体を形成し、細胞間を密に接着して細胞間隙を通る物質の移動を制限している。このTJの基本骨格をなす最も重要と考えられている分子は、1998年に発見され、クローディンと名付けられた4回膜貫通型の膜タンパク質である。クローディン分子同士は、隣接する細胞をつなぐことに加え、同一膜平面内で線状に重合し、TJストランドという構造体を形成する。このクローディンは、ヒト、マウスなどにおいて27種類のサブタイプが報告されている。それぞれのクローディンは、組織特異的な発現パターンを示し、その発現量とサブタイプの組み合わせによって、各組織・器官に適した透過特性を示していると考えられている。発見されて15年以上の間、その立体構造は不明であったが、2014年にクローディン-15の構造が申請者の研究室で解析されて、4本の膜貫通ヘリックスが密な左巻きのヘリカルバンドルを形成し、細胞外の領域が β シートを形成し、高度に保存されているWLWというアミノ酸配列がヘリカルバンドルに挿入されて、この β シートの角度が一定になるようにつながり止められている構造が明らかになった。このクローディン分子は互いに疎水的な相互作用によって、TJストランドを形成している（シス相互作用）。このストランド2本が、反平行に配置して1つの細胞内でのTJストランドが形成される。この細胞に向かい合う位置にある細胞でも同様のTJストランドが形成され、クローディン分子が接着（トランス相互作用）して細胞のバリアを形成しているというモデルが提案された。

一方、食中毒の原因菌であるウェルシュ菌が作り出す毒素(CPE)は、クローディンのいくつかのサブタイプに特異的に結合する。この毒素のC末端側のクローディン結合ドメイン単体(C-CPE)は、細胞傷害を起こすことなくクローディンに結合し、結合したクローディンをTJストランドから取り除き、TJの透過特性を可逆的に変化させることが知られている。これを活用し、TJの透過特性を調節することで、細胞間隙を制御した薬物の送達に利用することが期待される。それゆえ、申請者は、C-CPEとクローディンの詳細な結合様式や、C-CPEがTJストランドを崩壊させる機構の解明を目指して、C-CPEとクローディン複合体の構造解析を行った。

申請者は、27種類のマウス由来のクローディンのそれぞれのN末端側に緑色蛍光タンパク質GFPを融合させ、昆虫細胞発現系を用いて発現させた。これらのGFP融合クローディンについて、蛍光ゲル濾過クロマトグラフィー法を用いてC-CPEとの結合能の有無、発現量、単分散性を網羅的に評価した。この様な独自に開発したアッセイ系を用いた実験の結果、それまでに知られていたクローディン-3やクローディン-4などと共に、新たにクローディン-19が複合体を形成することを発見し、C-CPEとの複合体の

構造解析の候補としては、クロードイン-19が良いことを見出した。それゆえ、クロードイン-19とC-CPEを、それぞれ、昆虫細胞発現系、大腸菌発現系を用いて大量発現・精製した。そして、このC-CPEとクロードイン-19との複合体について、様々な結晶化条件を検討することで、良い結晶の作製に成功した。この複合体の結晶からX線回折データを取得することによって、3.7 Å分解能での構造解析に成功した。その結果、これまでは、クロードインの第2番目の細胞外セグメントだけがC-CPEの結合に関わっていると予測されていたが、このクロードイン-19では、第1と第2の2つの細胞外セグメントでC-CPEを認識していることを構造的に明らかにした。さらに、この立体構造から明らかになった相互作用が生理的に意味のある結合に寄与していることを確認するために、1残基づつの変異を導入することで確かめた。しかも、クロードイン-15の構造からクロードイン-19単独の構造モデルを作製し、その構造モデルとC-CPE/クロードイン-19複合体との構造を比較することで、C-CPEがTJストランドを崩壊させる機構を提案した。これらの構造解析の結果を第1著者としてScience誌に発表した (Saitoh et al., **Science**, **347**, 775-778 (2015))。

ウェルシュ菌の毒素CPEの受容体がクロードインであること、C-CPEがクロードインをTJストランドから取り除きTJのバリア機能を阻害させることが報告されてから、その構造情報が長年望まれていたが、申請者は、C-CPEとクロードインとの複合体構造を初めて原子レベルで解析して、ついにこれに答えた。これにより、C-CPEとクロードインの相互作用機構を詳細に理解できるようになるとともに、C-CPEの結合によるTJストランドの崩壊モデルを提案することができた。しかも、C-CPEとの結合には、クロードインの細胞外第2セグメントのみが必要であることが長い間定説になっていたが、構造を基にした詳細な解析により、細胞外第2セグメントだけでなく細胞外第1セグメントもC-CPEとの結合に重要であることを初めて疑問の余地なく明らかにした。この発見は、より特異的でアフィニティーの高いTJモジュレーターの開発に貢献することが期待される。現状では、脳疾患に対する小分子医薬品候補の約98%が血液脳関門を通過できないために薬にならない状況が存在する。この血液脳関門における物理的障壁であるTJを制御する上で、重要な構造解析に成功した。

上述のように本論文においては、薬物動態の問題を解決するための重要な構造基盤を与え、細胞間隙経路の物質透過性を制御するドラッグデリバリー法の開発に大きく貢献することが期待される。そして、ウェルシュ菌による食中毒の予防薬の設計やクロードインを過剰発現している癌細胞を標的とした治療薬の開発等、幅広い分野に貢献することが期待される。従って、当審査委員会は、論文が博士（創薬学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。