

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目      タイトジャンクション構成要素クローディン3の  
                         構造生物学的研究

氏名      中村 駿

## 論文内容の要旨

タイトジャンクション (TJ) は上皮細胞で形成される細胞接装置であり、細胞間隙における物質の透過を制御することによって、生体内環境を維持している。その主要構成要素は、クローディン (Cldn) と呼ばれる4回膜貫通型タンパク質であり、TJの接着及び透過特性を担っている。Cldnは細胞膜上でTJストランドと呼ばれる網目状の構造体を形成し、隣接する細胞同士を密着させて、物理的な隔壁または細胞間隙経路として働く。哺乳類では27種のサブタイプが同定されており、各サブタイプが特異的な接着及び透過特性やTJストランド形状を示し、さらには器官特異的な発現パターンを示すことによって、各器官に最適な内部環境が形成されている。一方で、TJによる物質透過の制限は薬物治療において目的薬物の標的部位への輸送を妨げる障壁となるため、新薬開発の課題となっている。食中毒原因菌である *Clostridium perfringens* が産生する毒素 (CPE) は、特定のCldnサブタイプに結合することでTJを崩壊させる。そのC末端領域 (C-CPE) は、細胞毒性がなく、TJを一時的に緩めることができるため、特定のサブタイプへの親和性を高めたC-CPE改変体はTJモジュレータとしての利用が期待されている。CldnサブタイプによってCPEへの親和性が異なっており、親和性を決定する機構の解明はC-CPEの利用のために必須である。

TJストランドの形成機構やC-CPEとの相互作用については、これまでに行われたCldnの構造解析によって理解が進んできた。マウス由来Cldn15 (mCldn15) の結晶構造より、Cldnの全体構造や同一細胞膜上でCldnが重合する際に形成するシス相互作用の結合機構が明らかになった。また、その構造を基にして、TJストランドは同一細胞膜上においてはCldn重合体の逆平行二重鎖によって形成されると推定され、隣接細胞間のCldn同士で形成するトランス相互作用によって細胞間隙ポアを形成すると考えられている。また、マウス由来Cldn19 (mCldn19) やヒト由来Cldn4 (hCldn4) とC-CPEの複合体の結晶構造より、C-CPEによるTJ崩壊モデルが提唱された。しか

し、現在までに得られた構造情報のみでは、サブタイプによって異なる接着及び透過特性や TJ ストランド形状が生じる機構や、**C-CPE** 親和性を決定する機構について明らかになっていない。

本研究ではこれらの問題を解決するために、新たなサブタイプの構造解析を目指した。構造解析されていないサブタイプのうち、様々な器官に広範囲に発現し、**CPE** に高親和性なサブタイプであるマウス由来 **Cldn3** (**mCldn3**) を構造解析の第一候補として選定した。

**mCldn3** について X 線結晶構造解析を行うために、大量発現系及び精製方法を構築し、結晶化条件の検討を行った。**mCldn3** 単独については蒸気拡散法または脂質キュービックフェーズ法を用いた結晶化条件のスクリーニングにおいて結晶が得られなかったが、**C-CPE** と複合体を形成させることによって熱安定性が向上し、蒸気拡散法にて結晶を得ることに成功した。その後、結晶化条件を最適化して得られた結晶について X 線回折実験を行ったところ、**8Å** の分解能が得られた。高分解能データを収集するために、さらに熱安定性が高まる **C-CPE** 変異体を用いて結晶化することによって分解能が改善され、構造解析に十分な分解能のデータを収集できた。**mCldn19** の立体構造を元に作製した **mCldn3** のホモロジーモデルを用いた分子置換法によって初期位相を決定して初期構造を得た。さらに構造の精密化を行い、最終的に **mCldn3** と **C-CPE** の複合体構造を **3.4Å** 分解能にて決定した。**mCldn3** の全体構造は、既に構造決定された他のサブタイプと同様に、**4** つの膜貫通ヘリックスが左巻きのヘリックスバンドルを形成し、**2** か所の細胞外セグメントが逆平行  $\beta$  シートを形成していた。

**C-CPE** を特定のサブタイプへの特異性を高めた TJ モジュレーターとして利用するためには、**C-CPE** 親和性を決定する機構を理解する必要がある。**C-CPE** 低親和性である **mCldn19** については立体構造を基にした **C-CPE** 結合に関する網羅的な解析が行われており、**C-CPE** 高親和性である **mCldn3** の構造を基にした網羅的な解析を行うことによって、親和性を決定する結合機構の詳細な理解を目指した。立体構造から明らかになった相互作用に関与する **mCldn3** の残基について、それぞれ一残基のアラニン置換体を作製し、蛍光ゲル濾過法を利用した結合実験によって評価した結果、**C-CPE** 結合に重要な **5** か所の残基を同定した。さらに、これらの残基をサブタイプ間でのバリエーションのある残基へ置換して評価した結果、**C-CPE** との結合可否や親和性を決定する残基の特徴が明らかとなった。**mCldn3** と **mCldn19** で異なる **C-CPE** 親和性は、**C-CPE** の疎水性ポケットと相互作用する細胞外領域の **1** か所の残基の側鎖の大きさによって決まることが示された。

次に、**mCldn3** の構造を他の構造既知のサブタイプと比較した結果、**mCldn3** では **3** 番目の膜貫通ヘリックス (**TM3**) が他の構造既知のサブタイプに比べて大きく屈曲していた。**TM3** の屈曲はプロリン残基が起点となっており、**mCldn15** 及び **mCldn19** ではこの位置の残基はアラニンであり **TM3** は屈曲していない。**hCldn4** は **mCldn3** と同様にプロリンであり **TM3** は **mCldn3** 程ではないが少し屈曲したモデルが提案されている。この位置の残基は **Cldn** ファミリーにおいて、プロリン、グリシン、アラニンのバ

リエーションがあり、残基の種類によって **TM3** の屈曲が決まると示唆された。これを検証するために、**mCldn3** においてこのプロリンをグリシンやアラニンに置換した変異体について、**C-CPE** との複合体の結晶構造をそれぞれ  $4.2\text{\AA}$ 、 $3.6\text{\AA}$  分解能にて決定した。グリシン変異体及びアラニン変異体では **TM3** は屈曲しておらず、**mCldn15** や **mCldn19** の **TM3** の形状とよく似ていた。よって、**TM3** はプロリンが存在する場合は屈曲し、グリシン及びアラニンの場合は屈曲しないことが示された。**TM3** の屈曲によって生じる全体構造への影響を詳細に評価するために、**mCldn3** の野生型とアラニン変異体の構造を重ね合せて比較した結果、屈曲の起点から細胞外側へ離れるに従って、屈曲による残基の位置のずれが大きくなっていった。**TM3** は細胞外領域に繋がっており、細胞外領域全体は **TM3** の屈曲に伴って移動していた。**TM3** の細胞外側末端にはシス相互作用に関わる残基が、また細胞外領域にはトランス相互作用に関わる残基が存在するため、**TM3** の屈曲構造は **Cldn** 分子同士の相互作用に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

**TM3** の屈曲の有無による **TJ** スtrand形成への影響を調べるために、**mCldn3** の野生型、グリシン変異体またはアラニン変異体によって形成された **TJ** スtrandを、凍結切断法を用いて電子顕微鏡にて観察した。その結果、野生型では柔軟性の低い直線的なstrand形状、グリシン変異体やアラニン変異体では柔軟性の高い曲線的なstrand形状を示した。また、グリシン変異体やアラニン変異体ではstrand密度が高い領域を認めた。次に、**TJ** の接着能への影響を調べるために **Dissociation assay** によって評価した結果、野生型よりもグリシン変異体やアラニン変異体の方が強い接着力を示した。**mCldn15** の結晶構造によって、シス相互作用は、シス相互作用ポケットと細胞外ヘリックスの残基間での疎水性相互作用によって形成されることが示されている。**mCldn3** の野生型とアラニン変異体の構造比較の結果、シス相互作用ポケットを形成すると予測される残基は **TM3** の屈曲の有無によって位置が変わり、野生型では狭いポケット、アラニン変異体では広いポケットが形成されていた。すなわち、**TJ** スtrandの柔軟性は、狭いポケットの野生型の場合は低くなり、広いポケットのアラニン変異体の場合は高くなっている。よって、**TM3** の屈曲によって決まるポケットの大きさが **TJ** スtrandの柔軟性を決定する一因であると考えられる。そして **TJ** スtrandの柔軟性がstrand密度に影響することによって、**TJ** の接着力に違いが生じると考えられた。**TM3** の屈曲を決定する残基の種類はサブタイプによって異っており、この一つの残基の違いによって **Cldn** 分子の立体構造が異なり、**Cldn** 分子間の相互作用や **TJ** の機能に影響を及ぼすことが示唆された。

本研究によって得られた **mCldn3** の構造を基にして、**C-CPE** 親和性を決定する機構及び新たな構造的特徴として **TM3** の屈曲の重要性が明らかとなった。これらの知見によって、特定の **Cldn** サブタイプを標的とした **C-CPE** 改変体の開発や、サブタイプごとに異なる **TM3** の形状を考慮した相互作用解析及び **TJ** の機能解析が進むことが期待される。