

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 中 村 駿

論 文 題 目 タイトジャンクション構成

要素クロードイン3の構造生物学的研究

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	大 嶋	篤 典
委 員	名古屋大学教授	廣 明	秀 一
委 員	名古屋大学准教授	阿 部	一 啓

論文審査の結果の要旨

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着装置であり、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trand 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trand 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 モジュレーター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trand の形成機構についてはマウス由来 Cldn15 (mCldn15) の結晶構造から、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示唆されている。また、その構造を基にして、TJ スtrand 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、サブタイプによって異なる接着性及び透過特性や TJ スtrand 形状が生じる機構、C-CPE 親和性を決定する機構については未解明である。

申請者はこれらの問題を解決するために、新たな Cldn 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 の 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り分解能が改善し、構造解析に十分な分解能のデータ収集を可能にした。この結果を第一著者として論文にまとめ、発表した (Nakamura et al. *Acta Crystallographica F*, 2018, *in press*)。その後 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 β シートを形成していることを明らかにした。

また立体構造から明らかになった C-CPE との相互作用に関与する mCldn3 の残基について、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、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を明らかにした。

mCldn3 と構造既知のサブタイプの構造比較によって、Cldn の新たな構造的特徴として TM3 の屈曲構造を明らかにした。mCldn3 の TM3 の屈曲の起点は Pro134 残基であり、Cldn ファミリーにおけるこの位置の残基はプロリン、グリシンまたはアラニンがよく保存されていることから、mCldn3 の P134A 及び P134G 変異体の構造解析を行い、この位置の残基の種類によって、TM3 の屈曲の有無が決定することを示した。さらに、機能解析実験により TM3 の屈曲が引き起こす細胞外領域の構造変化は、シス相互作用ポケットの大きさを規定し TJ ストランドの形状を変え、TJ の接着強度の変化といった生理機能への影響を解明した。この結果から細胞外領域から離れた TM3 の一つの残基が、Cldn 分子間の相互作用や TJ の機能に影響を及ぼすことを明らかにした。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 ストランドを、フリーズフラクチャー法を用いて電子顕微鏡にて観察し、野生型では柔軟性の低い直線的なストランド形状、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ストランド形状が形成されることを示した。また 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持つことを示した。これらの結果から、TM3 の屈曲を決定する残基によって 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を示した。

上述のように本論文においては、熱安定性が高まる C-CPE 変異体と mCldn3 を共結晶化することで三次元結晶の分解能を向上させるとともに、得られた mCldn3 の X 線結晶構造を基にした、C-CPE 親和性を決定する機構及び TM3 の屈曲の重要性を明らかにした。これらの知見は、特定の Cldn サブタイプを標的とした C-CPE 改変体の開発や、サブタイプ特異的な TM3 の形状を考慮した相互作用解析及び TJ の機能解析に寄与するものである。したがって、当審査委員会は、論文が博士(創薬科学)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。