



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 β 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4.2Å、3.6Å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わせて比較した結果、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ストランド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ストランドを、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を示した。また、グリシン変異体やアラニン変異体ではストランド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ストランドの柔軟性は、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ストランドの柔軟性を決定する一因であると考えられる。そしてTJストランドの柔軟性がストランド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なっており、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。