

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25840028

研究課題名(和文) Claudinの担う密着結合メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of claudin on the tight junction mechanism

研究代表者

篠田 雄大 (Shinoda, Takehiro)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：10597868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、腸粘膜上皮間密着結合ストランドの構成分子であるヒトクローデイン-4とウェルシュ菌毒素Clostridium perfringens enterotoxinのC末端ドメイン(C-CPE)との複合体の立体構造を、X線結晶構造解析により3.5 オングストローム分解能で決定した。本複合体構造からヒトクローデイン-4とC-CPE間の詳細な相互作用様式を解明し、さらに、C-CPE結合により惹起されるヒトクローデイン-4の立体構造変化と、この構造変化に伴った密着結合ストランド崩壊の詳細なメカニズムを、既知であるマウスクローデイン-15単体の立体構造との比較から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined the crystal structure of the complex of human claudin-4 which is a main component of tight junction strand of the intestinal epithelial barriers with the C-terminal domain of the Clostridium perfringens enterotoxin (C-CPE) at 3.5-angstrom resolution.

The complex structure of claudin-4 and C-CPE revealed the details about the interaction between them and the differences with the off-target claudin. Moreover, a comparison of the present C-CPE-bound structure of claudin-4 with the enterotoxin-free claudin-15 structure revealed sophisticated C-CPE-induced conformation changes of the extracellular segments, induced upon the foundation of the rigid four-transmembrane-helix bundle structure. These conformation changes provide a mechanistic model for the disruption of the lateral assembly of claudin molecules.

研究分野：分子生物学

キーワード：密着結合 大腸菌無細胞タンパク質合成技術 膜タンパク質 X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

密着結合の帯状構造物である密着結合ストランドは、上皮シートのバリア能や傍細胞経路での選択的イオン透過能を担っている。例えば表皮における保湿、腎ネフロンにおける水やイオンの再吸収、血液脳関門での血液と脳髄液との間の物質交換の制限など、生命活動と直結する組織内外の溶液環境整備に関わっており、密着結合ストランドの機能の研究は、多細胞生物の生命現象や疾病に対する本質的理解、さらには密着結合ストランドを標的とした新規治療手法の創出において必要不可欠となっている。

クローディンは、密着結合ストランドを構成する分子として古瀬、月田らによって発見された4回膜貫通型膜タンパク質であり (Furuse et al, *J. Cell. Biol.*, 1998)、密着結合は、細胞膜上のクローディン間との相互作用 (*cis* 相互作用) により形成される密着結合ストランドと、隣接細胞の密着結合ストランド上のクローディン間の相互作用 (*trans* 相互作用) により形成されると考えられている。クローディンの欠損や変異は、密着結合ストランドの消失、あるいはバリア能や選択的イオン透過能を破綻・変化させることから、密着結合ストランドの構造と機能にクローディンが深く関与することが知られている。現在、ヒトでは27種報告されているクローディンサブタイプは、組織固有の発現パターンを示し、発現パターンの違いによって発揮する機能が異なることが分かっている。さらに、クローディン分子間の相互作用には、ホモやヘテロといった多様なサブタイプの組み合わせが存在し、隣接・対合するクローディンサブタイプの組み合わせによってイオン透過機能が変化することが知られている (Furuse et al, *J. Cell. Biol.*, 1999)。つまり、密着結合ストランドの構造と機能を本質的に理解する為には、クローディンサブタイプの性質を個々に研究するのみならず、ホモフィリックあるいはヘテロフィリックなクローディンサブタイプ同士の相互作用と、それにより発揮される選択的イオン透過能のメカニズムを、分子レベルあるいは原子レベルで解明する必要がある。

タンパク質機能の詳細な理解において、原子分解能での立体構造情報を得ることが出来る線結晶構造解析は最も有力な手段である。構造生物学的見地からクローディン分子間相互作用の理解が可能となるだけでなく、他のサブタイプについても、取得したあるひとつのクローディン分子の立体構造情報とサブタイプ間の一次構造の比較から有力な構造情報を取得することが出来る。また、このような原子分解能での立体構造情報はクローディン分子を標的とした新規薬剤の創出にもつながるはずである。一方で、クローディンは界面活性剤抵抗性の膜ドメインに集積する傾向が強く、生細胞を用いた発現システムでは生体膜から抽出することが困

難であり、このことが大量の高純度精製標品を使用する結晶化条件スクリーニングにおいて克服しがたい障害となっている。

この問題の解決法として、我々は任意の脂質条件下で目的膜タンパク質を発現できる大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用したクローディン発現系を確立し、これまでに複数のヒトクローディンサブタイプについて高品質標品の大量調製に成功している (Shinoda et al, *Sci. Rep.*, 2016, 6:30442。本研究課題開始当時は未発表)。我々の大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用したクローディン調製技術は密着結合の研究において革新的と言って過言ではない。

なお、本研究課題開始当時において、我々は大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用して調製したヒトクローディン-4と食中毒を引き起こすウェルシュ菌のタンパク質性毒素 *Clostridium perfringens* enterotoxin の C 末端ドメイン (C-CPE) との複合体の作成と結晶化に成功し、大型放射光施設 SPring-8 において X 線回折データを取得するまでに至っていた。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、「線結晶構造解析を用いた、クローディンの担う密着結合メカニズムの解明」である。

本研究課題を遂行するにあたり、我々はヒトクローディンのサブタイプのうち、腸管粘膜上皮などに高発現し、傍細胞経路での Cl<sup>-</sup> イオン透過に関わるとされるヒトクローディン-4に着目した。ヒトクローディン-4はホモフィリックな相互作用のみでも密着結合ストランドを形成し、ヒトクローディン-4に対して nM オーダーの親和性を示す C-CPE は、密着ストランド上のクローディン-4と結合し、密着結合ストランド崩壊を引き起こす (Sonoda et al, *J. Cell. Biol.*, 1999)。つまり、クローディン-4には、クローディン間相互作用を保持した「多量体状態」と、C-CPE 結合によりクローディン間相互作用が解除された「単量体状態」の少なくとも2状態が存在すると考えられる。さらに、ヒトクローディン-4を用いた我々の予備実験結果や Van Itallie らの報告 (Van Itallie et al, *J. Biol. Chem.*, 2011) などを踏まえることで、下記に挙げた2点を本研究により立証すべき課題とした。

(1) 大腸菌無細胞合成系で調製したヒトクローディン-4は、*cis*相互作用と*trans*相互作用により多量体(おそらく4量体)を形成している。

(2) C-CPEは、クローディン-4細胞外領域へ結合し、クローディン-4の構造変化を引き起こすことで、*trans*相互作用や*cis*相互作用を破綻させて、クローディン-4を単量体化させる。

(1) について、本研究課題では *cis/trans* 相互作用を保持し、機能単位とされる4量体

構造に焦点を絞り、ヒトクロードイン-4 ホモ 4 量体の X 線結晶構造解析を行う。これにより得た立体構造情報からクロードイン分子間相互作用の仕組みを理解し、クロードインサブタイプ分子間の一次構造比較と合わせて、『クロードインサブタイプの組み合わせと、それにより発揮される機能との相関』を解明する。また、(2) については、獲得したヒトクロードイン-4 ホモ 4 量体構造とヒトクロードイン-4・C-CPE 複合体構造を比較し、C-CPE 結合によるクロードイン-4 の構造変化の仕組みと、そのクロードイン間相互作用への影響を理解することで、『クロードイン-4 と C-CPE の結合により引き起こされる密着結合ストランド崩壊メカニズム』を解明する。

### 3. 研究の方法

ヒトクロードイン-4・C-CPE 複合体の調製 結晶パッキング改善の為に T4 リゾチーム(T4L)を N 末端側に付加、また、断片化しやすい 184 番目のアスパラギンから C 末端まで除去したヒトクロードイン-4(T4L-クロードイン-4)を作成した。大腸菌無細胞タンパク質合成技術に基づいて本研究課題期間中に新規開発した soluble-membrane fragment (S-MF) 法 (Shinoda et al, *Sci. Rep.*, 2016, 6:30442) を利用して T4L-クロードイン-4 を合成し、N 末端側の modified natural poly-histidine (N11) タグを利用したアフィニティ精製を行った。C-CPE も同様に大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用して合成・精製した。N11 タグを切除した精製 T4L-クロードイン-4 と C-CPE を混合し、C-CPE に付加された N11 タグでアフィニティ精製した後、ゲルろ過カラムクロマトグラフィで分画された溶出ピーク画分を結晶化に使用した。本複合体のセレノメチオン誘導体の調製では、反応液中のメチオンをセレノメチオンに置き換えて無細胞合成し、同様に調製した試料を用いた。T4L-クロードイン-4・C-CPE 複合体の X 線結晶構造解析 蒸気拡散法により T4L-クロードイン-4・C-CPE 複合体結晶を調製し、大型放射光施設 SPring-8 のタンパク質構造解析用ビームライン BL41XU 及び BL32XU にて X 線回折データを収集した。初期位相は、セレノメチオン誘導体の結晶から取得した 4.2 オングストローム分解能の単波長異常分散データセットと T4L 及び C-CPE の既知構造データを利用した Molecular replacement - Single-wavelength anomalous dispersion 法により決定し、セレン原子の位置に基づいて各アミノ酸の位置を決定した。最終的なリファインメントでは、3.5 オングストローム分解能のデータセットを利用した。このモデルの Ramachandran statistics は、

92.65% (favored)、7.30% (allowed)、0.06% (outliers)、clash score は 7.78、 $R_{work}$  値/ $R_{free}$  値は 0.29/0.31 となった。

ヒトクロードイン-1 抗ヒトクロードイン-1 抗体フラグメント複合体の調製と多量体形成確認 抗ヒトクロードイン-1 抗体フラグメントについては、深澤ら (Fukasawa et al, *J. Virol.*, 2015) によって報告された抗体クローンを基に遺伝子工学的に Fab フラグメント発現系を作成し、動物細胞を用いた発現システムにより大量調製した。この Fab フラグメントと大腸菌無細胞タンパク質合成技術 (S-MF 法) を利用して調製したクロードイン-1 を混合し、Fab フラグメントに付加された 6xHis タグでアフィニティ精製した後、ゲルろ過カラムクロマトグラフィで分画した。

### 4. 研究成果

ヒトクロードイン-4・C-CPE 複合体の立体構造解明 X 線結晶構造解析により、3.5 オングストローム分解能で決定されたヒトクロードイン-4・C-CPE 複合体の立体構造から、4 本の膜貫通領域とヒトの手指のような形状である細胞外領域から成るヒトクロードイン-4 (図 1) が、細胞外領域全体で、12 箇所の相互作用によって C-CPE と接触している様子を明らかとした。

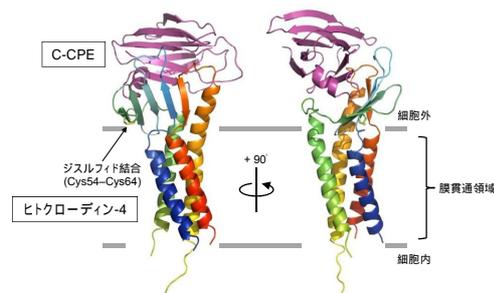
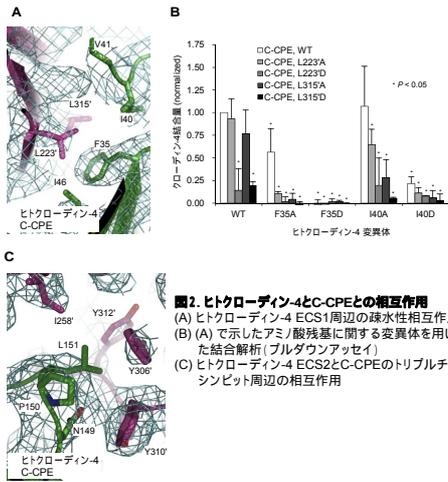


図1. ヒトクロードイン-4・C-CPE複合体のX線結晶構造

さらに、変異体を使用した詳細な解析の結果、本研究以前より良く知られている細胞外第二セグメント (Extracellular segment 1: ECS2) の結合サイト、特にロイシン 151 番と C-CPE 上のトリプルチロシンピット (チロシン 306 番、チロシン 310 番、およびチロシン 312 番) 間の疎水性相互作用だけでなく、細胞外第一セグメント (ECS1) 上のフェニルアラニン 35 番と C-CPE 上のロイシン 223 番及びロイシン 315 番間の疎水性相互作用がヒトクロードイン-4/C-CPE 間結合の要であることを明らかとした (図 2A-C)。一方、本課題のヒトクロードイン-4・C-CPE 複合体より先に報告された、C-CPE の本来の標的でないマウスクロードイン-19 と C-CPE 変異体 (S313A) との複合体の立体構造 (Saitoh et al, *Science*, 2015) との比較から、ヒトク

ローディン-4 との複合体には見られるがマウスローディン-19 には見られない5箇所の相互作用点と、逆にマウスローディン-19 には見られるがヒトローディン-4 には見られない6箇所の相互作用点を見出した(Shinoda et al, *Sci. Rep.*, 2016, 6:33632)。



C-CPE の結合により引き起こされる密着結合ストランド崩壊メカニズムの解明  
 鈴木らから報告されたマウスローディン-15 単体の X 線結晶構造 (Suzuki et al, *Science*, 2014) は、結晶中のクロロディン分子の配列が密着結合ストランドの *cis*相互作用を反映したものであった。そこで、マウスローディン-15 の立体構造を基に作成したヒトクロロディン-4 単体のホモロジーモデルとヒトクロロディン-4・C-CPE 複合体構造との比較により、C-CPE 結合による構造変化の有無を調べたところ、ECS1 において、クロロディン-4 に結合した C-CPE は、ストランド 4 を外側へ押しやることから引き起こされる一連の構造変化によって、ストランド 4 と第二膜貫通ヘリックス間にある extra cellular helix (ECH) が解かれ(図 3 A)。ECS2 では、C-CPE の結合によりフェニルアラニン 147 番を含む第三膜貫通ヘリックス上部が約 20° 回転することが判明した(図 3 B)。さらに、ヒトクロロディン-4 単体ホモロジーモデルとヒトクロロディン-4・C-CPE 複合体構造を、*cis* 相互作用を反映したマウスローディン-15 単体の結晶中の配列に当てはめると、C-CPE 結合により引き起こされる 2 つの構造変化は、*cis* 相互作用に関わる箇所と一致することが判明した。また、C-CPE は、*trans* 相互作用のモデルから推定されるポアサイズ(直径 = < 8 オングストローム)よりもはるかに巨大であることから、C-CPE により引き起こされる密着結合ストランド崩壊メカニズムとは、C-CPE 結合により引き起こされる構造変化に伴

う *cis* 相互作用の破綻と C-CPE の大きさによる *trans* 相互作用の空間的障害によるものであることを明らかにした(図 3 C)(Shinoda et al, *Sci. Rep.*, 2016, 6:33632)。

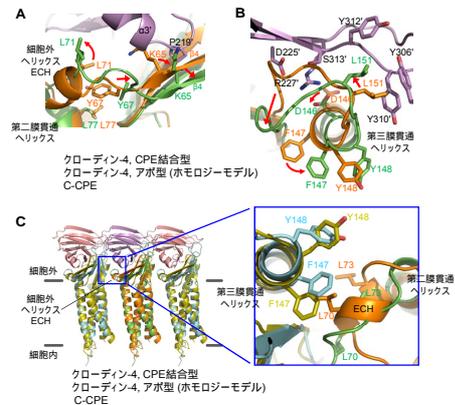


図3. C-CPE結合により引き起こされるクロロディン-4の構造変化と密着結合ストランドの破壊メカニズム  
 (A) ストランドP4-第二膜貫通ヘリックス間に生じる構造変化  
 (B) 第三膜貫通ヘリックス細胞外領域に生じる構造変化  
 (C) C-CPE結合により引き起こされる一連の構造変化の動きを示した。  
 (C) C-CPE結合により引き起こされる密着結合ストランド破壊メカニズム

ヒトクロロディン-4のホモ多量体調製手法の確立と分析  
 大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用して精製したクロロディン-1には多量体と単量体が平衡状態で存在する為、多量体からの単離が非常に困難である。一般的に、構造認識性の高いモノクローナル抗体には標的タンパク質の立体構造への安定化効果を示すものがある。そこで、本研究課題期間中に報告された深澤ら (Fukasawa et al, *J. Virol.*, 2015) の抗ヒトクロロディン-1モノクローナル抗体を用いて、クロロディン-1ホモ多量体への安定化効果を調べたところ、抗ヒトクロロディン-1モノクローナル抗体から1クローンのみ多量体への安定化効果を示す抗体(クローン4)を検出した(図4)。

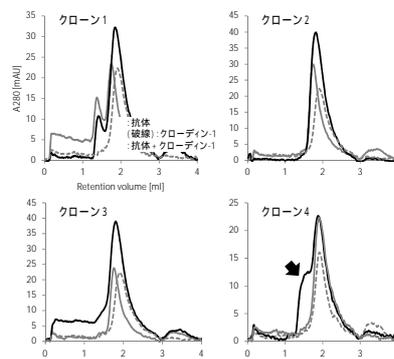


図4. ゲルろ過カラムSuperdex200 5/150上の精出ピークシフトを指標とした抗ヒトクロロディン-1モノクローナル抗体IgGの結合解析  
 クローン4のみ、抗体との混合により高分子量側への精出ピークシフト(矢印)を検出した。

次に、安定化効果を示す抗体、クローン4について、立体構造解析向けにFabフラグメントを作成し、抗原となるクロロディン-1と共精製を行ったところ(図5 A)、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出プロファイルにおいて抗体フラグ

メントとの複合体はクロードイン-1 単体と比較して大きく高分子量側へシフトすることを確認し(図5B)、Blue Native-PAGE による解析においても、クロードイン-1 ホモ4量体・抗体フラグメント複合体に相当する分子量のバンドを確認した(図5C)。現在は、このヒトクロードイン-1・Fab フラグメント複合体について電子顕微鏡による観察を実施し、ネガティブ染色像とクライオ電子顕微鏡像共に3つの粒子からなるY字型の像を得るまでに至っており、単粒子解析及びX線結晶構造解析での立体構造解析に向けた準備を進めている。

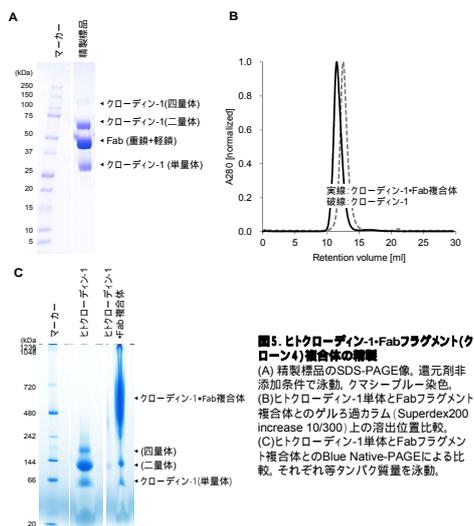


図5. ヒトクロードイン-1・Fabフラグメント(クローン4)複合体の精製  
(A) 精製標品のSDS-PAGE像。還元剤非添加条件で泳動。クマシーブルー染色。  
(B) ヒトクロードイン-1単体とFabフラグメント複合体とのゲルろ過カラム(Superdex200 increase 10/300)上の溶出位置比較。  
(C) ヒトクロードイン-1単体とFabフラグメント複合体とのBlue Native-PAGEによる比較。それぞれ等タンパク質量を泳動。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by enterotoxin.

Shinoda, T., Shinya, N., Ito, K., Ohsawa, N., Terada, T., Hirata, K., Kawano, Y., Yamamoto, M., Kimura-Someya, T., Yokoyama, S., Shirouzu, M.

*Scientific Reports*. 2016, 6:33632. doi: 10.1038/srep33632. 査読あり

Cell-free methods to produce structurally intact mammalian membrane protein.

Shinoda, T., Shinya, N., Ito, K., Ishizuka-Katsura, Y., Ohsawa, N., Terada, T., Hirata, K., Kawano, Y., Yamamoto, M., Tomita, T., Ishibashi, Y., Hirabayashi, Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S.

*Scientific Reports*. 2016, 6:30442. doi: 10.1038/srep30442. 査読あり

Allosteric regulation of -secretase

activity by a phenylimidazole-type -secretase modulator.

Takeo, K., Tanimura, S., Shinoda, T., Osawa, S., Zahariev, I. K., Takegami, N., Ishizuka-Katsura, Y., Shinya, N., Takagi-Niidome, S., Tominaga, A., Ohsawa, N., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Yokoshima, S., Yokoyama, S., Fukuyama, T., \*Tomita, T., Iwatsubo, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, 111, 10544-10549. doi: 10.1073/pnas.1402141111. 査読あり

[学会発表](計 4件)

“密着結合タンパク質ヒトクロードイン-4とウェルシュ菌毒素との結合様式の構造基盤およびヒトクロードイン-5結合型C-CPE変異体の開発”

篠田雄大, 新屋直子, 伊東夏織, 大沢登, 寺田貴帆, 木村(染谷)友美, 横山茂之, 白水美香子

第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015) 2015年12月1日 神戸ポートアイランド(神戸市・兵庫県)

“無細胞タンパク質合成技術を利用した結晶構造解析用ヒト膜タンパク質生産の体系的手法”

篠田雄大, 新屋直子, 伊東夏織, 桂(石塚)芳子, 大沢登, 寺田貴帆, 平田邦生, 河野能顕, 山本雅貴, 富田泰輔, 石橋洋平, 平林義雄, 染谷友美, 白水美香子, 横山茂之

日本結晶学会平成26年度年会

2014年11月1日 東京大学弥生講堂(文京区・東京都)

“ウェルシュ菌内毒素 *Clostridium perfringens* enterotoxin による、密着結合内クロードインアッセンブリーの破壊機構”

篠田雄大, 新屋直子, 伊東夏織, 大沢登, 寺田貴帆, 平田邦生, 河野能顕, 山本雅貴, 木村(染谷)友美, 横山茂之, 白水美香子

第87回日本生化学会大会

2014年10月17日 国立京都国際会館(京都市・京都府)

“Cell-free expression and purification of presenilin and signal peptide peptidase”

Shinoda, T., Ishizuka-Katsura, Y., Shinya, N., Takeo, K., Ohsawa, N., Terada, T., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tomita, T., Yokoyama, S. *Structural Life Science 7<sup>th</sup> International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS)*, 2013年7月29日 京王プラザホテル札幌(札幌市・北海道)

〔図書〕(計 2件)

Cell-free synthesis of membrane proteins.

Kimura-Someya, T., Hosaka, T., Shinoda, T., Shinomo, K., Shirouzu, M., Yokoyama, S.

*Advanced Methods in Structural Biology.*  
2016, 123-135

界面活性剤、脂質等の選択

篠田雄大、染谷友美、白水美香子

*膜タンパク質構造研究* 2013, 111-119

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：膜タンパク質の製造方法およびその利用

発明者：横山茂之、篠田雄大、伊東夏織、白水美香子、染谷友美、新屋直子、石塚芳子、堀哲哉、中村祥浩、田辺弘明

権利者：国立研究開発法人理化学研究所

種類：産業財産権

番号：PCT/JP2016/72444

出願年月日：2016年7月29日

国内外の別：国外

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

ウェルシュ菌毒素により引き起こされる密着結合破壊メカニズムの解明

<http://www.clst.riken.jp/ja/topics/research/161006news/>

細胞を使わない膜タンパク質の合成技術

- ヒトの膜タンパク質などを標的とした新薬の創出が加速 -

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160801\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160801_1/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠田 雄大 (Shinoda Takehiro)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：10597868