

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06100

研究課題名(和文) ヒトクローディン-11の立体構造解析に基づいた血液精巣関門の構造基盤研究

研究課題名(英文) Structural basis of the blood-testis barrier based on structural analysis of human claudin-11.

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・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：10597868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液精巣関門のバリア機能に関わる密着結合膜タンパク質ヒトクローディン-11について、大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用した高品質試料調製手法を確立した。この無細胞合成ヒトクローディン-11をラットへの免疫原とスクリーニング用の抗原として用いることで、立体構造解析に有用である立体構造認識性の抗ヒトクローディン-11抗体産生ハイブリドーマのモノクローナル化を達成し、さらに、ヒトクローディン-11の立体構造解析では、この抗体断片との複合体のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって、二次元の粒子像と低分解能の三次元マップを取得し、クローディンと抗体が結合する様子を捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトクローディン-11の高品質精製試料の生産手法の確立は本研究課題が初となる。これにより、ヒトクローディン-11を標的とした新規薬剤の探索や効果測定においても分子レベルでの実験と評価が可能となる。また、同じく本研究課題内で作成した立体構造認識性の抗ヒトクローディン-11モノクローナル抗体についても抗体医薬品としての利用の可能性を秘めていることから、本研究成果は、男性型不妊症、特にクローディン-11の発現異常を原因とする先天性男性型不妊症の研究および治療手法の創出に大いに貢献できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have established a method for the preparation of high-quality samples of human claudin-11, a tight junction membrane protein involved in the function of the blood-testis barrier, using an E. coli cell-free protein synthesis technology. By using this cell-free synthesized human claudin-11 as an immunogen and as an antigen for screening, we have obtained a monoclonal hybridoma that produces a structure-recognizing anti-human claudin-11 antibody, which is useful for structural analysis. In addition, single-particle analysis of the complex with the antibody fragment using cryo-electron microscopy has allowed to capture the binding of claudin to the antibody from a two-dimensional particle image and a low-resolution three-dimensional map.

研究分野：構造生物学

キーワード：膜タンパク質 大腸菌無細胞タンパク質合成技術 密着結合 モノクローナル抗体 クライオ電子顕微鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

密着結合ストランドとクローディン 密着結合 (以下 TJ) ストランドは、TJ の帯状構造物を指し、傍細胞経路を介した選択的イオン透過能により、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いる。4 回膜貫通型膜タンパク質クローディンはこの選択的イオン透過能を担う機能本体として古瀬、月田らによって発見され (Furuse et al, J. Cell Biol., 1998) 現在では約 30 種のファミリー分子が見出されており、膜タンパク質オクルーディン、足場タンパク質 ZO-1 らと共に TJ ストランドを形成している。

TJ ストランド上に整列したクローディン分子は、細胞膜平面方向のクローディン分子間相互作用 (シス相互作用) と隣接細胞上のクローディン分子との相互作用 (トランス相互作用) によって強固な選択的イオン透過バリアを形成する。2014 年、マウスクローディン-15 の X 線結晶構造から、クローディン分子間のシス相互作用は細胞外ヘリックス (ECH) 上の疎水性アミノ酸と第 2 細胞外領域上の芳香族アミノ酸間の疎水性相互作用であることが解明され (Suzuki et al, Science, 2014, PDB: 4P79) マウスクローディン-19・ウェルシュ菌毒素 C-CPE 変異体複合体構造 (Saitoh et al, Science, 2015, PDB: 3X29) と、ヒトクローディン-4・C-CPE 複合体構造 (Shinoda et al, Sci. Rep., 2016b, PDB: 5B2G) によって、C-CPE 結合により惹起される TJ ストランド破壊メカニズムが解明された (図 1a, b)。

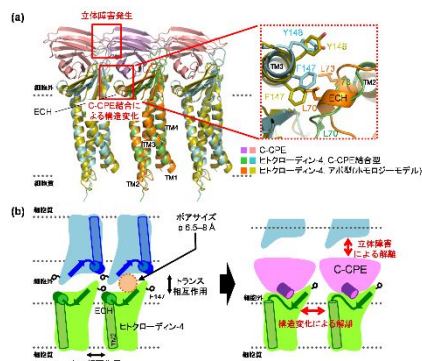


図1. C-CPE結合により惹起されるヒトクローディン-4間相互作用の破壊メカニズム (a) C-CPE結合により引き起こされるヒトクローディン-4の立体構造変化 (b) 密着結合領域の構造面 (いずれも、Shinoda et al, Sci. Rep., 2016 (研究業績1)の図を改変したものを引用)

血液精巣関門とクローディン-11 精巣内の精細管には、精子形成に至る諸段階の精細胞と、精細胞と接触して精細胞の成熟に必要な様々な物質を分泌するセルトリ細胞が存在する。セルトリ細胞は精細管内壁側 (基底膜側) に位置しており、隣接セルトリ細胞との間には血液精巣関門と呼ばれ、「クローディン-11」が主要構成分子となっている TJ が存在する。 (Morita et al, J. Cell Biol., 1999) (図 2)。

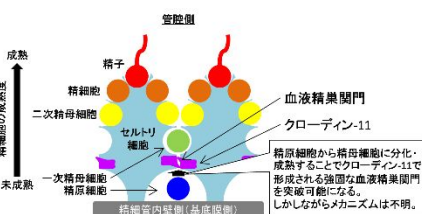


図2. 精細管での精細胞成熟過程の模式図

血液精巣関門は、基底膜側と管腔側との物質交換を制限することで管腔側の溶液環境を精細胞の成熟に適した環境の維持を担っている。その為、クローディン-11 の欠損は精細胞の成熟に適した環境の維持を困難とし、精母細胞はこれ以上分化・成熟することが不可能となる (Gow et al, Cell, 1999)。

基底膜側にある未分化の精細胞 (精原細胞) は分化・成熟に伴って血液精巣関門を突破して管腔側へ移動するが、クローディン-11 による強固な TJ を突破するメカニズムについては全く不明である (図 2)。

また、一部の無精子症患者ではセルトリ細胞でのクローディン-11 発現が亢進し、不必要な TJ の増加によって精細胞の管腔側へ移動が困難となることが報告されているが (Nah et al, Fertil. Steril., 2011) この発症メカニズムも不明である。このようなメカニズムを理解する上で、血液精巣関門に関するアミノ酸レベルでの構造情報は最も有力な知見となる。しかしながら、クローディン-11 はシス相互作用に関わるアミノ酸を含む領域を欠いており (図 3) クローディン-11 固有の分子間相互作用によって TJ ストランドを形成していることが予想されることから、血液精巣関門の TJ 構造と精細胞成熟過程での血液精巣関門の役割や突破メカニズムについて、既存の構造情報から適切な知見を得ることは困難となっている。

クローディン	135	VATAWYGNRI	VQEFY	DPMP	TPVN	ARYE	FGGAL	FTGW	AAASL	174
クローディン-1	135	VATAWYGNRI	VQEFY	DPMP	TPVN	ARYE	FGGAL	FTGW	AAASL	174
クローディン-2	134	IPVAMN	LHGL	LRDFY	SP	LPVDS	MKFE	IGCAL	YLG	173
クローディン-3	133	VPVSW	ASANT	IRDFY	N	PVVE	PAQK	REMG	AGLY	172
クローディン-4	134	VPVSW	TAHNI	IQDFY	N	PLVAS	GQKRE	MGAS	LYV	173
クローディン-5	134	VPLCW	FANIV	VREFY	D	PSV	PVSK	QYEL	GAAL	173
クローディン-6	134	IPVGT	WAHAI	IRDFY	N	PLVA	EAQK	RELG	ASLY	173
クローディン-7	135	VAGSW	YGHIV	TDYF	N	PLI	P	TNI	KYEF	174
クローディン-8	135	IPVSW	VAANA	IRDFY	N	S	IVN	VAQK	RELG	174
クローディン-9	134	IPVCW	TAHAI	IQDFY	N	PLVA	EAAL	KREL	GAAL	173
クローディン-10a	131	TGCSL	YANKIT	TEFF	D	PLF	-	VEQK	YELG	169
クローディン-10b	133	TGCSL	YANKIT	TEFF	D	PLF	-	VEQK	YELG	171
クローディン-11*	136	VAT	IWF	PVCA	HR	-	-	-	-	167
クローディン-15	133	VATIS	WYAF	NIT	TRD	FF	D	PLY	PGTK	171
クローディン-19	135	TAVSW	YATL	VTQE	FF	N	PST	PVN	ARYE	174

図3. 第2細胞外領域におけるヒトクローディンサブタイプ間の一次構造の違い
本研究課題の研究対象であるヒトクローディン-11を★印で示した。
また、シス相互作用に関わるアミノ酸を黒字で示した。

2. 研究の目的

本研究課題では、X 線結晶構造解析と低温電子顕微鏡法による単粒子解析を用いて、シス/トランス相互作用を含んだ最小単位と予想されるヒトクローディン-11 ホモ 4 量体の立体構造を原子分解能で決定し、固有の分子間相互作用と選択的イオン透過バリア能を解明することを目的とする。この詳細な立体構造情報により、血液精巣関門における基底膜側と管腔

側との物質交換制限による精細胞の成熟に適した環境維持のメカニズムと精細胞成熟過程における血液精巢関門突破のメカニズムについて、これまでにない詳細な知見が得られるだけでなく、現在有効な治療法が見つからない血液精巢関門の異常が原因とされる無精子症についても、立体構造情報に基づいた発症メカニズム解明と創薬が可能になると考えている。

3. 研究の方法

ヒトクローディン-11の調製

ヒトクローディン-11の調製は、大腸菌無細胞タンパク質合成技術 soluble-membrane fragment (S-MF)法 (Shinoda et al, Sci. Rep., 2016a)を用いたヒトクローディンの生産手法に準じた。N末端側に modified natural poly-histidine (N11) タグと TEV protease 切断サイトを導入した全長ヒトクローディン-11の合成後の反応液から、超遠心によって可溶性画分を回収したのち、これをアフィニティレジン (Ni-sepharose Fast Flow, GE) に吸着させて、Reverse-IMAC法で精製し、これをゲルろ過カラム (Superdex 200 increase 10/300 GL) で分画した。単分散性のピーク画分を集めて各種実験に用いた。なお、ゲルろ過カラムクロマトグラフィで使用したランニングバッファーには、0.05% β -dodecyl-D-maltoside (DDM), 0.002% cholesteryl hemisuccinate (CHS), 400 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)を用いた。

立体構造解析用抗ヒトクローディン-11モノクローナル抗体作成

ラットへの免疫と、ハイブリドーマ作成および培養については、ユニテック株式会社 (<https://www.uniqtech.co.jp>) に委託して実施した。また、免疫原として用いるプロテオリポソームの作成方法、並びに立体構造解析用モノクローナル抗体のスクリーニング手法については日野らの手法に準じた (Hino et al, Curr. Opin. Str. Biol., 2013)。精製ヒトクローディン-11を脂質膜 (卵黄ホスファチジルコリン : lipid A = 9:1) に再構成させたプロテオリポソームを免疫原としてラット3匹に接種し、抗体価の高い上昇が認められた2匹について脾臓を摘出してハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマのスクリーニングではヒトクローディン-11の立体構造解析に適した、構造認識性と高親和性を合わせ持つクローンを選択することを目的として、リポソーム ELISA、変性 ELISA、蛍光ゲルろ過カラムクロマトグラフィ (FSEC) および表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を実施して有望なクローンを選定したのち、限界基釈法を用いてクローニングし、Rapid Monoclonal Antibody Isotyping Kit (コスモバイオ) を用いて isotype を決定した。

リコンビナント抗ヒトクローディン-11モノクローナル抗体断片の作成

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから抗体遺伝子を抽出し、Fv領域の遺伝子配列を決定した。リコンビナント抗体断片の作成では、はじめに、N末端側に改変 Natural ポリ His タグ、C末端側に GFP タグを付加した各クローンの一本鎖 Fv を作成して、大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用して生産し、GFPの蛍光を指標に生産性とヒトクローディン-11への結合性を確認し、良好なクローンについて、Fv-clasp (Arimori et al, Structure, 2017) と Fab断片を作成した。

リコンビナント抗ヒトクローディン-11モノクローナル抗体断片の生産

本研究課題で使用した抗体断片の生産ではすべて大腸菌無細胞タンパク質合成技術を用いた (Matsuda et al, PLoS One, 2018)。合成後の反応液の可溶性画分をアフィニティ精製 (Ni-sepharose Fast Flow, GE) した後、これをゲルろ過カラム (Superdex 200 increase 10/300 GL) で分画し、単分散性のピーク画分を集めて各種実験に用いた。なお、ゲルろ過カラムクロマトグラフィで使用したランニングバッファーには、400 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)を用いた。

リコンビナント抗ヒトクローディン-11モノクローナル抗体断片のX線結晶構造解析

結晶化に用いた抗体断片試料には、150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)に置換後、約 20 mg protein/ml に濃縮したものをを用いた。結晶化では、まず、市販の結晶化条件スクリーニングキット (Wizard I/II (Rigaku), NeXtal PEGs Suite (NeXtal), NeXtal PACT Suite (NeXtal)) を利用し、sitting drop 法で約 300 条件を検索し、見出された結晶化条件を基に、hanging drop 法で条件の最適化を進めた。X線回折データ測定では、得られた結晶を結晶化条件に 30% w/v Sucrose を加えた抗凍結液に約 1 時間浸漬させたものを、液体窒素で瞬間凍結し、これを大型放射光施設 SPring-8 BL26B2 および Swiss Light Source X06SA にて X線回折データを収集した。測定データの index とスケーリングには XDS (ref.) を利用し、既知構造 (PDB: 6X8P) を用いた分子置換法で初期位相を決定し、タンパク質構造解析プログラムスイート phenix と coot を利用して立体構造のモデリングを行った。

ヒトクロードイン-11 と抗ヒトクロードイン-11 モノクローナル抗体断片との複合体調製

上述の精製ヒトクロードイン-11 と精製抗体断片を混合した後、抗体断片側の精製用アフィニティタグを利用して精製した。さらに、抗体断片上のタグを削除して reverse-IMAC 法で精製したものをゲルろ過カラム (Superdex 200 increase 10/300 GL) で分画して、クロードイン-11 と抗体断片を含んだ単分散性のピーク画分を回収した。クライオ電子顕微鏡用の試料調製では、この複合体に saposin A (Briggs et al, Nat Methods, 2016) と豚脳由来 polar lipid extract を、重量比 1:1:2 の割合で混合したのち、saposin A の精製用アフィニティタグを用いてカラム担体へ吸着させて、400 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) で洗浄後、500 mM imidazole を含んだ緩衝液で溶出した。これをランニングバッファーに 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) を用いて、ゲルろ過カラム (Superdex 200 increase 10/300 GL) で分画し、クロードイン-11、抗体断片、および saposin A を含んだ単分散性のピーク画分を精製標品として回収した。

クライオ電子顕微鏡を用いたデータ収集および単粒子解析法による立体構造解析

電顕用グリッド (Quantifoil Cu, R0.6/1, 300 mesh) に上述の精製試料 3 μ l を滴下し、vitrobot (ThermoFisher) を用いて余分な試料液を濾紙で除去した後、液体エタンで凍結した。測定では、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios G4 (ThermoFisher) と検出器 K3 direct electron detector (Gatan) を使用し、ピクセルサイズは 0.8285 オングストローム/pix、加速電圧は 300 KeV にて 5,842 枚の micrograph を取得した。単粒子解析では、解析プログラム relion-3 (Zivanov et al, Elife, 2018) を用いて Motion correction し、CTF estimation 以降の解析処理には cryosparc (Punjani et al, Nat Methods, 2017) を用いた。

4. 研究成果

ヒトクロードイン-11 のリコンビナント生産および精製手法の確立

膜タンパク質の精製では、界面活性剤を用いて脂質膜から可溶化させる工程が必須であるが、クロードインは界面活性剤抵抗性の膜ドメインに集積する傾向がある為、細胞を用いた発現系での生産は困難である。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ドイン生産系を確立し、ヒトクロードイン-1 ~ -5 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., 2016a)。そこで、本研究課題のヒトクロードイン-11 の生産においてもこの無細胞合成クロードイン生産系を利用し、アフィニティ精製 (Reverse-IMAC 法) とゲルろ過カラム精製という比較的簡単な精製によって高純度のヒトクロードイン-11 精製試料をミリグラム単位で生産可能とした (図 4)。これにより、大量の精製試料を繰り返し必要とするモノクローナル抗体作成における免疫原やスクリーニング用抗原の生産や立体構造解析が可能となった。抗ヒトクロードイン-11 モノクローナル抗体作成

タンパク質の立体構造解析では、X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法が主流である。立体構造解析におけるモノクローナル抗体の利用の主な利点は、標的タンパク質との複合体となることでサイズを拡大し、かつ構造的特徴を付加し、加えて、標的タンパク質を特定の構造に安定化させることである為、特に膜タンパク質の立体構造解析において多くの実績が報告されている。本研究課題の標的であるクロードインは約 20 kDa

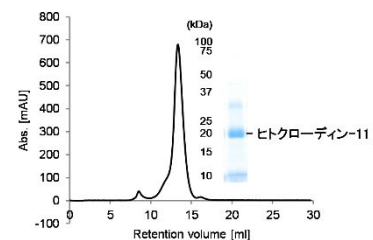


図4. 大腸菌無細胞タンパク質合成技術を利用したヒトクロードイン-11 大腸菌無細胞タンパク質合成技術で合成したヒトクロードイン-11を、Native-Hisタグによるアフィニティ精製とゲルろ過カラムsuperdex 200 10/300により精製した。SDS-PAGE像はCBBで染色。

と小さく、X線結晶構造解析では crystal contact に関わる領域が不足し、単粒子解析では粒子サイズが小さすぎる上に外観的特徴も乏しいことから、本研究課題の達成においてモノクローナル抗体の利用は不可欠である。本研究課題では、無細胞タンパク質合成技術を利用して作成したヒトクローニン-11 の精製

標品を免疫原として接種後に高い抗体価の上昇が認められたラット2匹から脾臓を摘出してハイブリドーマを作成し、リボソーム ELISA 法による 1st スクリーニングから蛍光ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる結合性の評価や変性 ELISA 法による立体構造認識性の評価を経て、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを6クローン選定した(図 5a)。さらに、選抜した6クローンから産生した抗ヒトクローニン-11 抗体について、クローニン分子への結合における競合の有無を調査したところ、クローニン分子上に共存して結合し得る、競合しない抗体クローンの組み合わせの存在が判明した(図 5b)。

ヒトクローニン-11/モノクローナル抗体複合体の作成および立体構造解析

先述の通り、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析では、より大きな粒子サイズと特徴的な粒子形状を持つ試料のほうが解析に有利であることから、本研究課題では、抗体2クローンをクローニンに結合させた精製試料を作成し、クライオ電顕測定に用いることにした。

個々に精製したヒトクローニン-11、クローン 542 のリコンビナント Fab 断片、クローン 113 の Fv-clasp、および saposin A の4者を混合し、各タンパク質に付加した精製タグで精製した後、ゲルろ過カラムで分画することで、したものである。4者は強固に結合した4者複合体をピーク画分として単離することに成功した(図 6a)。

この精製試料について、300 keV の透過型クライオ電子顕微鏡 Krios G4 にて粒子の電顕画像を取得し、単粒子解析用画像解析プログラム relion および cryosparc を用いて解析したところ、クローン 542 の Fab 断片はクローニン-11 との結合が保持されているが、クローン 113 の Fv-clasp は乖離していることが 2D classification の結果から判明した(図 6b)。また、3D reconstruction と refinement 処理を経て、低分解能の3次元マップを得るまでに至っているが、クローニン分子に相当するマップが不鮮明である為、原子モデル作成には至っていない(データ非公開)。このクローン 113 Fv-clasp の乖離やクローニン分子のマップの不鮮明さの原因は、第一にクローニン分子自体の構造安定性の不足、第二に抗体クローン 113 の親和性が~200 nM 程度と不十分であったことと考慮しており、本研究の構造解析の達成にはクロスリンカー等を用いた複合体構造の安定化が必須であると考えている。

なお、クローン 542 の Fab 断片については、X線結晶構造解析によって、2.8 オングストローム分解能の回折データを取得したことで初期位相の決定に至っている(現在は精密化中である為、データ非公開)。

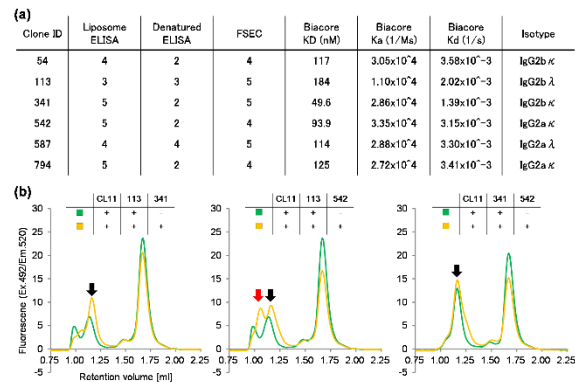


図5. 抗ヒトクローニン-11モノクローナル抗体作成 (a) 本研究課題内で作成・選抜した抗ヒトクローニン-11モノクローナル抗体一覧。Liposome ELISA、Denatured ELISAおよびFSECのカラムに配載した数値は各アッセイでのスコア(5段階。数値が高いものほど高い結合性を示した)。(b) FSECを利用した、ヒトクローニン-11上での各抗体クローン間の競合有無の確認(抜粋)。クローン113と542の組み合わせについては、複数の抗体がクローニン上に結合したことを示す高分子量側のピークが示された(赤色ブロック矢印)。

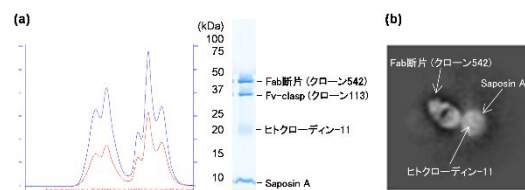


図6. ヒトクローニン-11/モノクローナル抗体断片複合体の精製とクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析 (a) ヒトクローニン-11/Fab断片(クローン542)/Fv-clasp(クローン113)/Saposin A複合体のゲルろ過カラム溶出プロファイル。ブロック矢印で示したピーク画分をクライオ電子顕微鏡測定に用いた。SDS-PAGE像はこのピーク画分を非還元条件で泳動し、CBBで染色したもの。(b) 上記複合体の単粒子解析。解析プログラムCryosparcでの2D classification像の一部を抜粋して示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 篠田 雄大、染谷 友美	4. 巻 90
2. 論文標題 立体構造解析のための大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いた哺乳類由来膜タンパク質調製手法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 539 ~ 539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900539	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠田雄大、新屋直子、染谷友美、白水美香子
2. 発表標題 ヒトクローディン-11の立体構造解析に向けたモノクローナル抗体作製
3. 学会等名 第92回生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松波 秀行 (Matsunami Hideyuki) (80444511)	沖縄科学技術大学院大学・生体分子電子顕微鏡解析ユニット・スタッフサイエンティスト (38005)	
研究分担者	染谷 友美 (Someya Tomomi) (80450401)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------