

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02893

研究課題名(和文)環状デブシペプチドMA026によるタイトジャンクション開口機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the opening mechanism of tight junction by MA026

研究代表者

臼井 健郎 (Usui, Takeo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60281648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：MA026は上皮のバリア構造であるタイトジャンクション(TJ)を可逆的に開口する天然物である。本研究では生産菌の生合成遺伝子解析、及び全合成から天然型MA026の平面構造を確定するとともに構造活性相関検討を行った。さらに結晶構造から立体構造を明らかにし、親水性と疎水性の両親媒性の表面を有すること、TJ開口には疎水面のアミノ酸クラスターが重要であることを見出した。また、本物質がclaudin-1のVFDSL配列と結合特異性が高い一方で、claudin-3,4といった腸管で発現するclaudinのVFDSL相同配列とも結合することが示され、経口の物質透過促進剤になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MA026の可逆的TJ開口活性を利用することで、これまで注射などの侵襲的投与法を余儀なくされている難吸収性薬剤を、貼り薬や吸入剤といった経皮、経粘膜による非侵襲的手法で投与することが可能になると考えられる。今回の研究で明らかになった構造と活性の関係性や標的特異性は、高活性類縁体の合成へと展開でき、注射剤の経皮・経口薬への転換を可能にすることで、患者の薬剤投与への負担を軽減できるようになると期待される。

研究成果の概要(英文)：MA026 is a natural product that reversibly opens tight junctions (TJs) in the epithelial barrier structure. In this study, the planar structure of natural MA026 was determined from biosynthesis gene analysis of the producing bacteria and total organic synthesis, and structure-activity relationships were investigated. The crystal structure revealed that MA026 has hydrophilic and hydrophobic amphiphilic surfaces, and that the amino acid cluster on the hydrophobic surface is important for the TJ opening. In addition, it was shown that this substance has high specificity for binding to the VFDSL sequence of claudin-1, but also binds to the VFDSL homologous sequence of claudin-3,4, which is expressed in the intestinal tract, suggesting the possibility that MA026 would be an oral substance permeation enhancer.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タイトジャンクション Claudin 環状デブシペプチド 構造活性相関

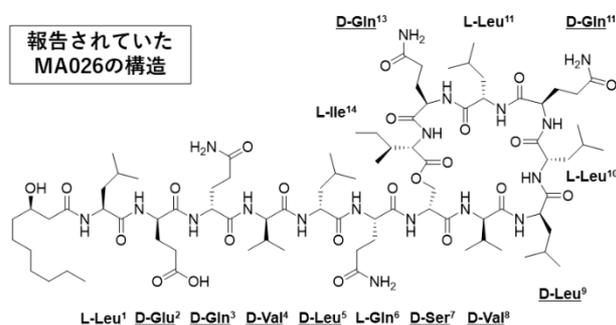
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚、腸管などの上皮組織バリア構造は大きく二つ、静的なバリア構造である角質や粘液層、及び動的なバリア構造であるタイトジャンクション(TJ)に大別される。このうち TJ は上皮細胞層の最もアピカル側に存在する細胞間接着構造であり、4 回膜貫通型タンパク質の claudin や occludin、tricellulin、JAMs と、細胞質内の膜裏打ちタンパク質である Zo タンパク質や cingulin などから形成されている。これらのうち、最も重要な TJ 結合の本体が、ヒトでは 27 種のファミリーから形成されている claudin である。

近年、オプジーボを代表とする抗体などのバイオ医薬品が広く使われるようになってきた。バイオ医薬品は、その特異性と有効性の高さから急速に市場規模を拡大している一方、生体膜透過性が悪いため注射や点滴などの投与に頼らざるを得ない。このような投与法は通院が必要で、痛みも伴う侵襲的投与方法であるため、患者の生活の質(QOL)低下を招いている。患者の QOL 向上のための有効な手段として、貼り薬や吸入剤といった経皮、経粘膜(経鼻、経肺)による非侵襲的投与が考えられており、その一つに TJ 開口剤の利用が提案されている。しかしながら TJ は生体に有害な物質の防御にも重要なため、TJ を長い時間開口させることは危険だと考えられる。そこで我々は、バイオ医薬品をはじめとする難吸収性物質の非侵襲的薬剤投与に、短時間 TJ を開口させ、その後 TJ 閉口を誘導する化合物「可逆的 TJ 開口物質」を利用することを提案している。

ニジマスの養殖に甚大な被害をもたらすサケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス IHNV に対して、同じ養殖池のニジマス個体の中に、耐性を示す個体と示さない個体があることが知られていた。この耐性を示す個体の腸管から、ウイルス耐性に関わると考えられる細菌 *Pseudomonas* sp. RtIB026 が見出され、この菌が抗ウイルス活性環状デプシペプチド MA026 を産生することが報告された。その後の研究により MA026 が



claudin-1 の VFDSL 配列と結合すること、さらに claudin-1 を感染受容体として用いている C 型肝炎ウイルス(HCV)の肝細胞への侵入を防ぐことが報告された(*J Am Chem Soc*, **135**, 18949 (2013))。我々は claudin-1 が TJ バリア機能に最も重要なタンパク質であることから、本物質が TJ 開口活性を有すると予想し、TJ 開口活性を検討した。その結果 MA026 処理後 30 分で TJ が開口し、その後ゆっくりと閉口することを見出した(*J Antibiot*, **70**, 691 (2017))。そこで MA026 による TJ 開口機構、及び標的特異性を明らかにするため全合成を行ったものの、合成した化合物は液体クロマトグラフィーでの保持時間、及び ¹H-NMR チャートが天然物と一致せず、また TJ 開口活性も見られなかった。そこで改めて MS/MS 解析によりアミノ酸配列を決定することで、報告されていた構造に一部誤りがあることを見出すとともに、全合成により活性を示す構造の決定に成功した。しかし天然 MA026 の正しい構造が同一の構造であるかは確定出来ておらず、またその TJ 開口機構、及び標的特異性は不明であった。

2. 研究の目的

これまで claudin を標的分子とした既存の TJ 開口物質として、claudin の一部配列を用いたペプチドや抗 claudin 抗体、及び下痢性病原菌 *Clostridium perfringens* が産生し、claudin-3, 4 と結合する菌体外毒素の C 末側断片(C-CPE)などが報告されているが、これらは可逆性が乏しく TJ を長時間開口させる。一方、MA026 は TJ 開口可逆性が高く、また D 型アミノ酸を多く含む環状デプシペプチドであるため、生体内のタンパク質分解酵素に対し耐性を示すことが期待できる新しいタイプの TJ 開口物質である。さらにペプチド系であることから、固相法による合成により多種多様な類縁体の作製が可能だと考えられる。例えばより高活性な類縁体や、蛍光・ビオチンプローブ、各 claudin タンパク質それぞれに対する特異的な類縁体への合成展開が挙げられる。Claudin ファミリータンパク質は、臓器・組織によってそれぞれ発現が異なっており、各臓器・組織で特有の機能を果たしていると考えられている。これらファミリータンパク質の機能分化についても、各 claudin タンパク質特異的のプローブが創製できれば、研究の発展が見込める。そこで本研究では MA026 を基盤に、

- (1) 天然型 MA026 構造の決定・構造活性相関検討
- (2) 特異的のプローブライブラリー開発
- (3) 開発したプローブを用いた TJ 開口機構の解析

を行い、TJ 開口機構や標的特異性を明らかにするとともに、既存の TJ 開口剤よりも可逆性が高く、安全性に優れた薬物透過促進物質の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 天然型 MA026 構造の決定・構造活性相関検討

MA026 生産菌 *Pseudomonas* sp. RtIB026 株の全ゲノム解析を行い、MA026 生合成遺伝子クラスター配列を明らかにする。コンセンサス配列から MA026 構造を推定するとともに、これまでに全合成から推定していた天然型 MA026 の構造を確定する。次に確定した MA026 の構造を元に、アラニンスキャン体や D/L 変換体などの合成類縁体を合成し、構造活性相関検討を行うことで、TJ 開口活性に重要な部位を明らかにする。

また、天然型 MA026 を大量培養・精製して結晶化を進め、X 線結晶構造解析を行うことで、立体構造を明らかにする。得られた立体構造、及び構造活性相関情報を元に、より高活性の MA026 類縁体の創製を試みる。

(2) 特異的プローブライブラリー開発

(1) のアラニンスキャン体で明らかになった構造活性相関検討から、TJ 開口活性に重要でないアミノ酸残基が明らかになる。このアミノ酸残基を利用して蛍光標識した MA026 類縁体、あるいはビオチン化 MA026 を合成する。合成したプローブ化 MA026 が TJ 開口活性を維持していることを確認する。

また、MA026 は claudin-1 の細胞外ループに存在する VFDSL 配列と相互作用することが報告されている。この領域は claudin ファミリー間で保存性があまり高くないことから、MA026 の標的特異性を決めている可能性が高い。そこで STD-NMR 法やカロリメトリー、あるいは他の claudin タンパク質や VFDSL 配列を他の claudin の相同配列に置き換えた claudin-1 を発現させた上皮細胞を用い、MA026 と VFDSL ペプチドとの相互作用を検討する。結合が見られた場合、MA026 のアラニンスキャン体と各 claudin タンパク質の VFDSL 相同領域との相互作用を検討して、結合に関与するアミノ酸と、その結合を明らかにするとともに、結合モデルを作成する。

(3) 開発したプローブを用いた TJ 開口機構の解析

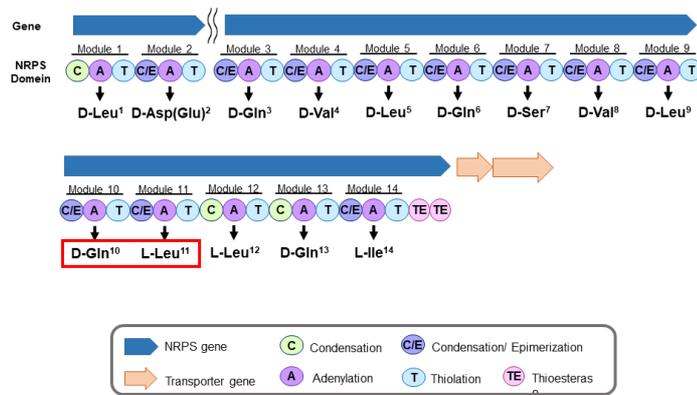
(2) で合成したプローブ化 MA026 が TJ 開口活性を維持していた場合、このプローブ化 MA026 を用いて TJ 開口時、claudin-1 がどのような挙動を示すか検討する。

4. 研究成果

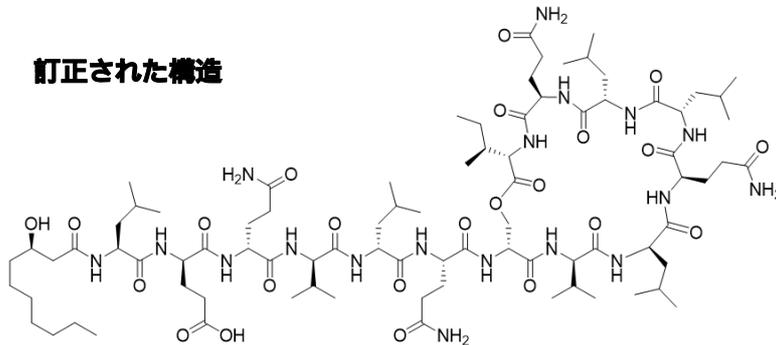
(1) 天然型 MA026 構造の決定・構造活性相関検討

Pseudomonas sp. RtIB026 の MA026 生合成遺伝子クラスター配列を明らかにした。

その結果、MS/MS 解析及び全合成で明らかにした構造とアミノ酸配列が一致したが、NRPS のコンセンサス配列からは 1 番目と 6 番目のアミノ酸 D/L 立体が異なる可能性が示唆された。そこで Leu1, Gln6 の立体をそれぞれ、または両方を変えた化合物を合成し、retention time を比較したところ、当初予想した構造が天然型であることが明らかになった。

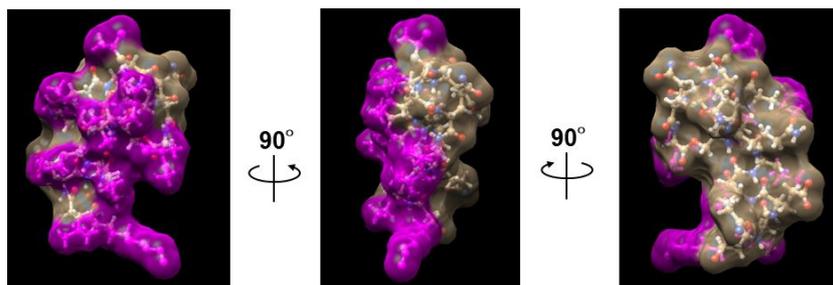
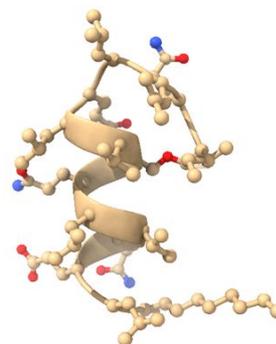


訂正された構造



次にアラニンスキャン体を作成し、TJ 開口活性を検討した。その結果、L-Gln6, D-Gln11, D-Gln13 の変異体が活性を維持したのに対し、疎水性アミノ酸残基のアラニン置換体ではほぼ完全に活性を失っていた。このことから MA026 は疎水性部分で claudin-1 の VFDSL 領域と結合している可能性が示唆された。

続いて *Pseudomonas* sp. RtIB026 の大量培養を行い、MA026 の精製を行った。40 L 培養から約 140 mg の MA026 を精製するとともに、4 類縁体の単離に成功した。このうち一つには MA026 とほぼ同等の TJ 開口活性が見られたことから、他の類縁体と共に構造決定を進めている。また、MA026 が充分量得られたことから結晶化を試みた。その結果白色結晶が得られ、X 線構造解析により左巻き α -helix 構造であることが明らかになった。さらにこの立体構造上で、片側が親水性、もう片側が疎水性の両親媒性の構造であることが明らかになり、構造活性相関検討で得られた TJ 開口に重要な疎水性アミノ酸がクラスターを形成しており、この領域が VFDSL 配列と相互作用することが示唆された。

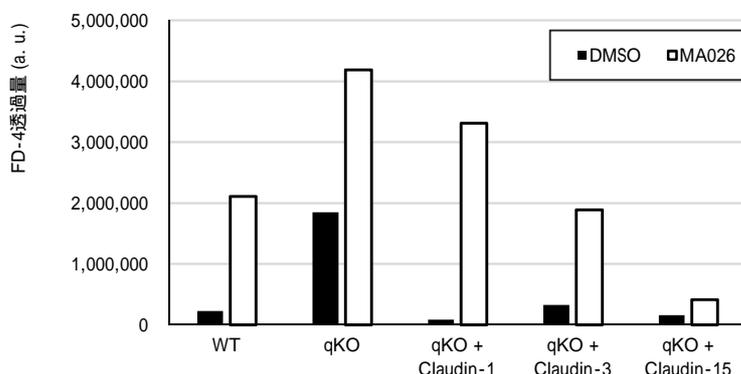


(2) 特異的プロプライブラリー開発

構造活性相関検討から L-Gln6, D-Gln11, D-Gln13 が TJ 開口活性に重要でないアミノ酸残基であることが明らかになった。そこでこれらの残基を Lys に置換した上でリンカーを伸ばし、ビオチン化標識した MA026 類縁体を作成して TJ 開口活性を検討した。その結果、天然型 MA026 と比較していずれの類縁体も 50%以上の TJ 開口活性を維持していることが示された。

MA026 の他の claudin ファミリータンパク質群との相互作用を検討するため、STD-NMR 法やカロリメトリーを検討した。しかしながら MA026 は水溶性が悪く、それぞれの手法に十分な濃度でアッセイすることが困難であることが明らかになった。そこで各 claudin タンパク質の VFDSL 相同領域ペプチドを用いて TJ 開口活性への competition assay を行った。その結果、3 μ M MA026 の TJ 開口活性を VFDSL ペプチドは強く抑え、その IC₅₀ 値は約 1 μ M であった。このことから MA026 が VFDSL 配列と結合することが示唆された。さらに他の claudin 相同領域ペプチドでも VFDSL と比較して弱いものの、TJ 開口活性を抑えるものが見出された。特に claudin-3, 4, 6, 9 の相同領域ペプチド VyDFSLL や claudin-8 の相同領域ペプチド iyDSL もそれぞれ IC₅₀ 値 12.5 μ M、11.0 μ M で TJ 開口活性を阻害した。一方、claudin-15 の相同領域ペプチド efpsml は 150.0 μ M でも全く TJ 開口活性を阻害しなかった。以上のことから MA026 は claudin-1 特異性が高いこと、また claudin-3, 4 が主要な発現臓器である腸管の TJ を開口させ、経口投与の薬剤の吸収効率を上げる可能性があることが示唆された。

次にイヌ腎上皮細胞 MDCK II で発現しているすべての claudin、claudin-1, 2, 3, 4, 7 の遺伝子を破壊した 5 重遺伝子破壊 MDCK II 細胞 (qKO) を自然科学研究機構生理学研究所の古瀬教授からご供与いただき、claudin-1, 3, 15 のみをそれぞれ強制発現する細胞を構築した (qKO-Cld1, qKO-Cld3, qKO-Cld15)。これらの細胞を単層培養したところ、いずれも TJ を形成することが出来た。さらに MA026 による TJ 開口活性を検討したところ、qKO-Cld1, qKO-Cld3 の TJ は開口させたが、qKO-Cld15 の TJ は開口することが出来なかった。同様な手法で各 claudin タンパク質に対する特異性を調べることが可能であり、種々の MA026 合成類縁体の TJ 開口活性検証を行う予定である。



(3) 開発したプローブを用いた TJ 開口機構の解析

TJ 開口活性を示した L-Gln6 のビオチン化体を用いて TJ 開口に伴う claudin-1 と MA026 の挙動解析を試みた。MDCK II 細胞層に処理して抗ビオチン抗体で検出を試みたところ、TJ が存在する細胞間が染色されものの蛍光が弱く、また固定処理で観察できなくなった。この理由として細胞上の claudin-1 と MA026 の相互作用が弱いことが原因だと考えられるため、クロスリンカーによる固定化を試みている。今後、固定化条件が決まる、または共有結合性の官能基を導入した MA026 類縁体の合成により claudin-1 との共染色を行い、claudin-1 と MA026 の挙動を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Uchiyama Chihiro, Fukuda Akane, Mukaiyama Minagi, Nakazawa Yoshiki, Kuramochi Yuka, Muguruma Kyohei, Arimoto Mitsue, Ninomiya Akihiro, Kako Koichiro, Katsuyama Yohei, Konno Sho, Taguchi Akihiro, Takayama Kentaro, Taniguchi Atsuhiko, Nagumo Yoko, Usui Takeo, Hayashi Yoshio	4. 巻 60
2. 論文標題 Structural Revision of Natural Cyclic Depsipeptide MA026 Established by Total Synthesis and Biosynthetic Gene Cluster Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 8792 ~ 8797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202015193	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Mukaiyama M, Yamasaki Y, Usui T, and Nagumo Y.	4. 巻 593
2. 論文標題 Transient receptor potential V4 channel stimulation induces reversible epithelial cell permeability in MDCK cell monolayers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 2250-2260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13490.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 向山海風、南雲陽子、臼井健郎	4. 巻 72
2. 論文標題 注射・点滴不要のバイオ医薬品投与法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 796-800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南雲陽子、向山海風、内山千尋、福田茜、有本光江、山崎洋平、加香孝一郎、勝山陽平、谷口敦彦、林良雄、臼井健郎
2. 発表標題 MA026の構造訂正とTJ開口活性の作用機構解析
3. 学会等名 天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向山海凧、山崎洋平、内山千尋、福田茜、有本光江、加香孝一郎、谷口敦彦、林良雄、南雲陽子、臼井健郎
2. 発表標題 MA026の構造訂正とTJ開口活性に関する構造活性相関検討
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向山海凧、内山千尋、福田茜、中澤圭輝、倉持由佳、谷口敦彦、南雲陽子、林良雄、臼井健郎
2. 発表標題 Tight Junction開口剤MA026のClaudinに対する標的特異性
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mukaiyama M, Uchiyama C, Fukuda A, Yamasaki Y, Taniguchi A, Hayashi Y, Nagumo Y, and Usui T
2. 発表標題 Structure revision and SAR analysis of MA026
3. 学会等名 The 10th Korea-Japan Chemical Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向山海凧、内山千尋、福田茜、倉持由佳、松垣直宏、千田俊哉、谷口敦彦、今野翔、林良雄、南雲陽子、臼井健郎
2. 発表標題 環状ペプチドMA026のTJ開口活性の作用機構解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向山海風、内山千尋、福田茜、倉持由佳、今野翔、谷口敦彦、南雲陽子、林良雄、白井健郎
2. 発表標題 TJ開口剤MA026のClaudinファミリーに対する標的特異性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南雲陽子、向山海風、白井健郎
2. 発表標題 天然物を用いた非侵襲的薬剤投与法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 大会シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞層透過促進剤、薬剤吸収補助用組成物、及び医薬組成物	発明者 白井健郎、南雲陽子、向山海風、林良雄、谷口敦彦、内山	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/12446	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 細胞層透過促進剤、薬剤吸収補助用組成物、及び医薬組成物	発明者 白井健郎、南雲陽子、向山海風、林良雄、谷口敦彦、内山	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6975437	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

筑波大学生命環境科学研究科 白井研究室 https://sites.google.com/view/usui-lab/%E3%83%9B%E3%83%BC%E3%83%A0

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
研究協力者	林 良雄 (Hayashi Yoshio) (10322562)	東京薬科大学・薬学部・教授 (32659)	

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