

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22623

研究課題名（和文）タイトジャンクション形成と透過制御の構造基盤解明

研究課題名（英文）Structural basis of tight junction formation and permeation control

研究代表者

中村 駿（Nakamura, Shun）

東京医科歯科大学・高等研究院・プロジェクト助教

研究者番号：80882779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：タイトジャンクションの構造基盤解明とその透過を制御するモジュレータの創製を目指し、CldnのX線結晶構造解析に向けた実験及びCldnとC-CPEの相互作用解析を行った。構造解析については、Cldnファミリーの中から選定したサブタイプについて結晶を作製し、5 Å分解能の回折データを取得できた。CldnとC-CPEの相互作用解析については、これまでに決定したCldn3/C-CPE複合体構造を基に変異体解析を行い、結合親和性を決定するCldnの2か所の残基を同定した。そのうちの1か所について、C-CPEの結合ポケットの改変によって、特定のCldnサブタイプへの親和性を高めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新たなCldnサブタイプの構造決定に向けて大きく進めることができた。特性が異なる27種のCldnサブタイプは器官特異的に発現して多様なバリアを形成するため、その詳細な立体構造を明らかにすることはサブタイプ特異的なバリア形成機構の解明及びC-CPE改変体の設計に重要である。また、C-CPEのCldnとの結合に重要なポケットを改変することによって、特定のCldnサブタイプへの親和性を高めることができた。そのようなC-CPE改変体は、特定器官のタイトジャンクションの薬物透過性を高めるモジュレータの創製に繋がり、薬物動態の障壁を除くことによる新薬開発の促進が期待される。

研究成果の概要（英文）：With aiming for elucidating the structural basis of tight junctions and creating a modulator that controls tight junction permeation, I proceeded experiments for X-ray crystallography of Cldn and analysis of the interaction between Cldn and C-CPE. For structural analysis, crystals were prepared for the subtype selected among the Cldn family, and diffraction data of 5 Å resolution was obtained. For the analysis of the interaction between Cldn and C-CPE, mutant analysis based on the structural information of the Cldn3 / C-CPE complex showed that two critical residues on Cldn determine the binding affinity. By modifying the binding pocket of C-CPE related to one of the critical residues, I succeeded in increasing the affinity for a specific Cldn subtype.

研究分野：構造生物学

キーワード：タイトジャンクション クローディン 構造生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タイトジャンクション (TJ) は、細胞同士を接着して生体内環境を維持するバリアを形成する。一方で、薬物治療においては、薬の体内動態を制限して標的部位への到達を妨げる障壁となる。特に、創薬ターゲットとして重要な中枢神経疾患においては血液脳関門の TJ の通過は大きな課題となっている。TJ のバリア機能は細胞接着分子であるクローニン (Cldn) が担い、27 種の Cldn サブタイプが器官特異的に発現して多様なバリアを形成する。ウェルシュ菌産生毒素の C 末端領域 (C-CPE) は、Cldn に結合して毒性なく TJ を緩めることができるため、薬物透過性を高めるモジュレーターとして期待されている。しかし、Cldn サブタイプによって C-CPE に対する感受性が異なっており、血液脳関門の TJ を形成する Cldn5 には C-CPE が結合できない。したがって、C-CPE を用いて血液脳関門の TJ の透過制御するためには、Cldn5 への親和性を高めた C-CPE へ改変する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血液脳関門 TJ の透過を制御する C-CPE 改変体の創製である。そのために、Cldn5 及び他のサブタイプの立体構造を決定し、サブタイプ特異的な TJ の構造基盤の解明を目指す。サブタイプ間の構造を比較することによってサブタイプ特異的な特徴及び精緻な構造の違いを明らかにすることを目指す。Cldn の立体構造情報を基にして C-CPE を Cldn5 に結合できるように改変することを目指す。Cldn と C-CPE の相互作用に重要となる部位を同定し、C-CPE が Cldn5 に結合できない原因を究明する。これらの情報を基にして、C-CPE の改変を進める。

3. 研究の方法

(1) Cldn の X 線結晶構造解析

Cldn の大量発現は、組み換えバキュロウイルスを利用した哺乳類細胞発現系を用いた。Cldn の精製は、細胞を破砕して膜画分を回収し、界面活性剤によって可溶化した溶液を用いて行った。アフィニティータグ精製を行った後、プロテアーゼによってタグを切断し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。結晶化は、濃縮した精製タンパク質を用い、蒸気拡散法及び LCP 法によって行った。X 線回折実験は、SPring-8 のビームラインを用いた (SPring-8 利用研究課題名「タイトジャンクションに関わる膜タンパク質の X 線結晶構造解析」、課題番号 2020A2721 及び 2021A2751)。

(2) Cldn と C-CPE の相互作用解析

Cldn または C-CPE の変異体は、部位特異的な組み換えによって作製した。発現は、Cldn は哺乳類細胞、C-CPE は大腸菌を用いた。Cldn と C-CPE の結合評価は、蛍光ゲル濾過法を用いた。この手法において Cldn または C-CPE に GFP を融合して発現させることによって、精製せずに細胞破砕液の状態での複合体形成によるピークシフトを高感度で検出できるため、多検体を効率的にスクリーニングできた。

4. 研究成果

本研究課題において、TJ の構造基盤を解明し、その透過制御を可能とするモジュレータの創製を目指し、Cl_{dn} の構造解析に向けた実験および Cl_{dn} と C-CPE の変異体を用いた相互作用解析を進めた。

(1) Cl_{dn} の X 線結晶構造解析

全 Cl_{dn} サブタイプの中から蛍光ゲル濾過法を用いたスクリーニングによって発現状態の良好なサブタイプを選定し、Cl_{dn5} を含む複数の Cl_{dn} サブタイプについて大量発現及び精製に成功した。それらのサブタイプについて結晶化スクリーニングを行った結果、構造未解明である Cl_{dn} サブタイプについて、結晶が得られた。初期スクリーニングにて得られた結晶を用いた回折実験では、分解能 10 Å 程度の回折像が得られた。結晶性の改善による高分解能データの取得を目指し、発現コンストラクトの改善及び界面活性剤など精製条件の検討を行い、結晶化条件の最適化を進めることによって、分解能 5 Å 程度の回折データの取得に成功した (図 1)。

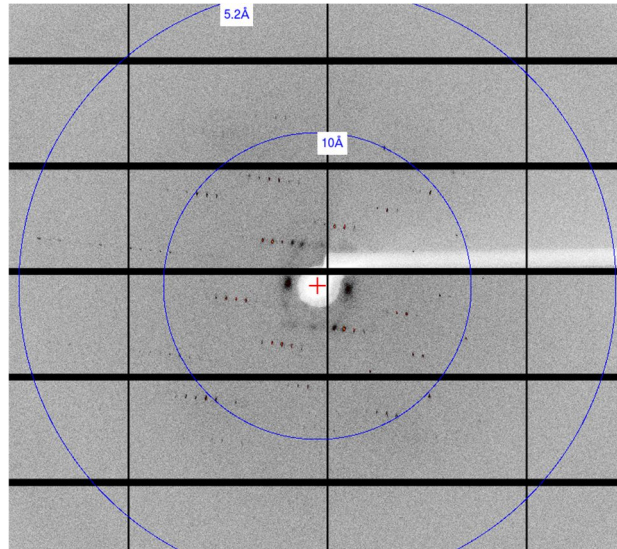


図 1. 本研究において作製した Cl_{dn} サブタイプの結晶から取得した X 線回折像

(2) Cl_{dn} と C-CPE の相互作用解析

Cl_{dn} と C-CPE の相互作用解析については、研究代表者が明らかにした Cl_{dn3} と C-CPE の複合体の構造情報を基に Cl_{dn} または C-CPE の変異体を作製し、蛍光ゲル濾過法を用いた結合実験によって結合親和性を決定するクローニン上の 2 箇所のアミノ酸残基を同定した。様々なアミノ酸残基に置換した変異体解析によって、この 2 箇所のアミノ酸残基の側鎖の大きさや電荷が C-CPE 親和性を決定することを明らかにした。さらに、Cl_{dn5} など C-CPE が結合できない Cl_{dn} サブタイプのこの 2 箇所のアミノ酸残基を、C-CPE が結合可能なサブタイプで見られるアミノ酸残基に置換することにより、C-CPE が結合できるよう変化することを確認した。したがって、Cl_{dn5} に C-CPE が結合できない原因はこの 2 箇所の残基にあり、サブタイプによって多様であるこの 2 箇所のアミノ酸残基が C-CPE への親和性に大きく影響していることが明らかとなった。したがって、この部位における Cl_{dn} と C-CPE の相互作用を改善することによって、Cl_{dn5} に結合できる C-CPE 改変体が設計できることが示唆された。

結合に重要な 2 箇所のアミノ酸残基のうちの 1 箇所について、対応する C-CPE 上の残基を様々なアミノ酸残基に置換して結合への影響を検討した結果、特定のクローニンサブタイプへの親和性を高めることができた。すなわち、クローニンサブタイプによってこの箇所の残基の側鎖の大きさが異なっており、この箇所の相互作用に関わる C-CPE の結合ポケットの大きさをアミノ酸残基の変異導入によって変えることにより、特定のクローニンサブタイプに対する親和性を高めるように C-CPE を改変できることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------