

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440029

研究課題名(和文)細胞間隙ルートの分子機構の解明

研究課題名(英文)Studies on molecular mechanism of paracellular pathway

研究代表者

青山 浩(Aoyama, Hiroshi)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：60291910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間でバリア機能を担うclaudin(CL)と細胞間で物質輸送を担うconnexin(Cx)について以下の研究を行った。CLの機能阻害タンパク質として知られているウエルシュ菌エンテロトキシンのC末端ドメインの変異体変異体スクリーニングから親和性の高いCL binderを2つ創製した。これらのX線結晶構造からCLとの複合体形成の安定性に寄与する構造変化を明らかにした。Cxについては、電気生理学的実験とホモロジーモデリングを組み合わせて、組織特異的に発現するCxについて構造活性相関を解析した。

研究成果の概要(英文)：We performed the following studies on claudin, which plays a barrier function between cells, and connexin, which is responsible for substrate transport between cells. Two CL binders with high affinity for CL were created from mutant variant screening of the C-terminal domain of Clostridium perfringens enterotoxin, which is known as an inhibitory protein in the paracellular route. These X-ray structures revealed structural changes contributing to the stability of complex formation with CL. For structural activity correlation was analyzed for tissue-specifically expressed Cx by the combination of dual patch clamp and homology structure modelling.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年の上皮細胞生物学を初めとする多くの研究の進展により、細胞間での反応が生命活動に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。例えば、細胞間では物質の漏えいを防ぎ必要に応じて物質を生体内外に輸送する機能が必要であるが、このバリア機能は4回膜貫通タンパク質 claudin (CL) が担うことがわかっている。一方、隣接する細胞の細胞質をつなぐ 2nm の孔を形成する円筒状の粒子の集まりが形成され (ギャップ結合)、この孔をイオンや情報伝達物質が通過して細胞間の情報伝達を可能にすることも明らかとなり、こちらも4回膜貫通タンパク質 connexin (Cx) が孔を形成することがわかっている。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、細胞間隙でバリア機能を担う CL と細胞間物質輸送を担う Cx の機能を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

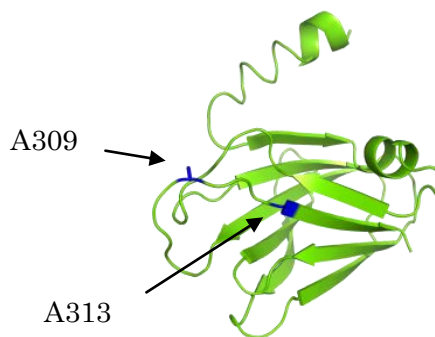
3. 研究の方法

- (1) CL はヒトでは 27 種類以上の分子 (CL1 ~CL27) が発見され組織特異的に発現して生命の恒常性に寄与するが、癌組織で高発現し、C 型肝炎ウイルスの受容体でもあるため創薬ターゲットとして注目を集めている。粘膜に存在する CL4 に結合できる唯一の分子としてウェルシュ菌エンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPE) の C 末端ドメイン (C-CPE; 194~319 残基) が知られており、この C-CPE を鋳型とした C-CPE 変異体ライブラリーによるスクリーニング系を構築し、新たな CL binder の創製と X 線結晶構造解析を行った。
- (2) Cx もヒトでは 21 種類以上の分子が発見されており、本研究では以下の 4 点に着目し、パッチクランプ実験とホモロジーモデリングを融合してギャップ結合における各アミノ酸の役割を検討した。
- ① 水晶体線維に発現する Cx50 のギャップ結合中央に位置する G46 の役割
  - ② Cx50 は高いチャネルコンダクタンス ( $\gamma_j = \sim 200\text{pS}$ ) を示すが、神経細胞の Cx36 は低い。アミノ酸配列を精査したところ、この原因は Cx の 2 つの細胞外ループ (E1 と E2) のうち E1 にあると考えられたので、Cx50Cx36E1 キメラタンパク質を作成し E1 ループの役割を調べた。
  - ③ 心房筋細胞に局在する Cx40 と Cx43 は、それぞれホモ結合 (Cx40/Cx40、Cx43/Cx43) では機能するがヘテロ結合 (Cx40/Cx43) では機能するの議論がわかれている。そこでヘテロ結合における細胞外ループ (E1 と E2) のアミノ酸の役割を調べた。
  - ④ Cx のアミノ酸配列を比較したところ、ヘテロ結合は 2 つのグループに分けることができ、同じグループ内では異なる Cx

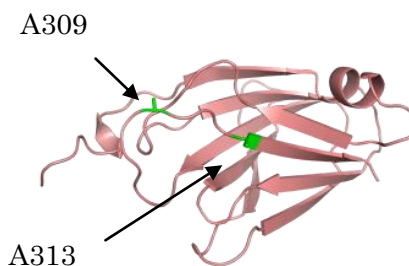
でも結合できるが、異なるグループでは結合できないとの仮説を立てた。それぞれのグループから Cx26 と Cx43 を選び、変異により結合能が回復するかを調べた。

4. 研究成果

- (1) CL 提示発芽型バキュロウイルスを用いた CL binder screening 系を構築し、様々な変異体と CL 分子種の結合を調べた結果、309 位の Asn と 313 位の Ser をアラニンに置換した C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> では、CL4 の結合親和性が約 10 倍 ( $K_D = 46\text{ pM}$ ) になることを見出した。さらに N 末端を 11 残基切断することで  $K_D = 19\text{ pM}$  というきわめて強い結合能をもつ C-CPE201<sub>N309A/S313A</sub> の作製にも成功した。大腸菌で上記の高親和性 CL binder を発現させて精製後にマロン酸を沈殿剤とすることで結晶を得た。X 線回折データは大型放射光施設 SPring-8 BL44XU ビームラインで収集し、分子置換法により構造を決定した。さらに研究期間中に報告された CL4 と C-CPE の複合体構造 (PDB ID : 5B2G) を鋳型として CL4 と 2 つの高親和性 CL4 binder の複合体モデル構造を作製し、CL4 binder の 313 位で形成されるくぼみ構造や N 末端領域の構造変化が CL4 との結合安定性に寄与していることを明らかにした。



C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> の X 線結晶構造

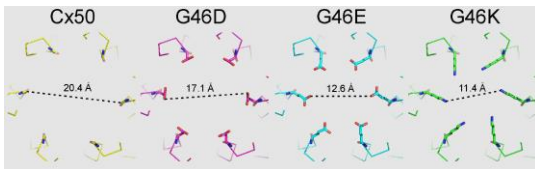


C-CPE205<sub>N309A/S313A</sub> の X 線結晶構造

(2)

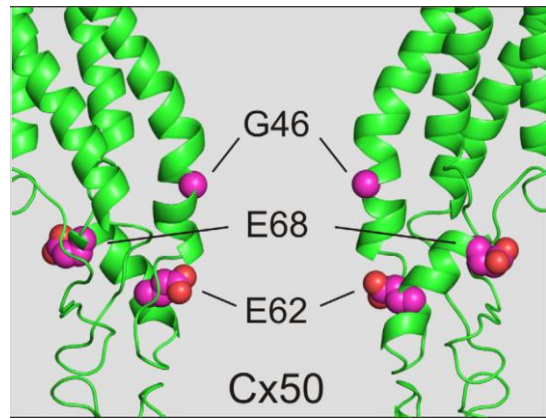
① ギャップ結合のCx50の46位Glyはチャネル孔中央に位置するとともに第1膜貫通ヘリックスと細胞外第1ループ(E1)との境界領域にある。このG46をアスパラギン酸とグルタミン酸に置換するとチャネルコンダクタンスは野生型に比して1.3~1.5倍に上昇したが、リジンに置換すると10分の1に低下した。G46から長い側鎖と電荷を持つアミノ酸に置換した結果(G46D、G46E、G46K)から以下の3点が明らかとなった。

- 変異によりギャップ結合のチャネル半径は小さくなっているがイオン透過を抑制しない。
- 陽イオンを輸送する傾向のあるCx50では、負電荷の集積がイオン透過性を高めたが、正電荷の集積は逆の結果となった。
- 野生型Cx50のイオン透過は最適解ではなく、Cx変異による種々の疾患の治療に役立つ可能性がある(雑誌論文①)。



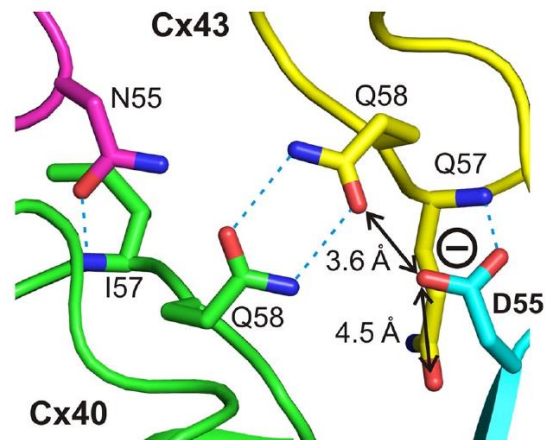
野生型 Cx50 と変異体(G46D, G46E, G46K)のホモロジーモデル

② Cx50Cx36E1 キメラタンパク質を作製したところ、接合部電圧(V<sub>j</sub>)に変化は認められなかったが、チャネルコンダクタンス( $\gamma_j$ )が201 pSから168 pSに減少することが明らかとなった。さらにE1ドメインのアミノ酸配列を詳細に比較して変異体を作製したところ、電荷の変化を生じる変異体では、G46D( $\gamma_j=256$  pS), E62N( $\gamma_j=228$  pS), E68R( $\gamma_j=231$  pS)となり野生型Cx50に比べて上昇していた。そこで、既に結晶構造が報告されているCx26をモデルにCx36(相同性67%)とCx50(相同性79%)のホモロジーモデルを作製した。Cx50のG46とE62はともにチャネル孔の内側に位置するのに対し、E68はチャネル孔の外側に位置していた。さらに、G46はチャネル孔の最も狭い領域に位置するのに対し、E62は比較的広い位置にあった。このことから、変異によるチャネル孔の直径の変化ではなく静電的相互作用の変化がE1ドメインのチャネル能に重要であることが明らかとなった(雑誌論文②)。



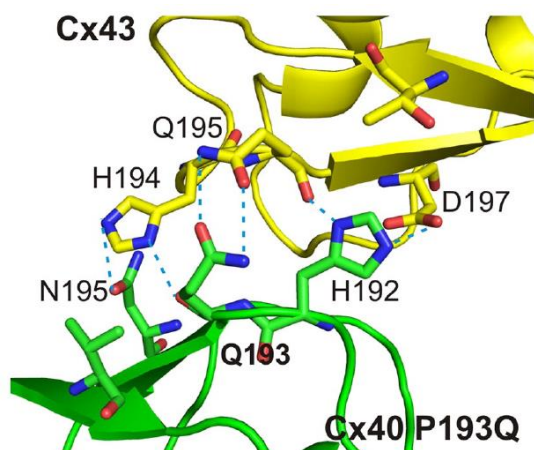
Cx50/Cx36E1 キメラタンパク質のホモロジーモデル

③ 心房筋細胞に局在するCx40とCx43はヘテロ結合を形成できるか不明であったが、蛍光タンパク質と融合させた顕微鏡での観察やパッチクランプ実験でもCx40/Cx43の結合は確認できなかった。一方、Cx40D55N/Cx43とCx40P193Q/Cx43ではヘテロ結合と十分なチャネルコンダクタンス( $\gamma_j$ )を確認できた。ホモロジーモデルを作製したところ、Cx40のD55はCx43の2つのグルタミンと静電的反発を生じて結合を妨げることが明らかとなった。Cx40は193位のProの構造の特殊性から野生型Cx40のホモロジーモデルは作製できなかったが、Cx40P193Q/Cx43のホモロジーモデルは作製できた。その結果、変異を導入したCx43のP193QとCx40のQ195が水素結合を形成できることが明らかとなった。これらの結果から心房筋組織のギャップ結合能を改善する余地があることがわかった(雑誌論文③)。



Cx40/Cx43のホモロジーモデル

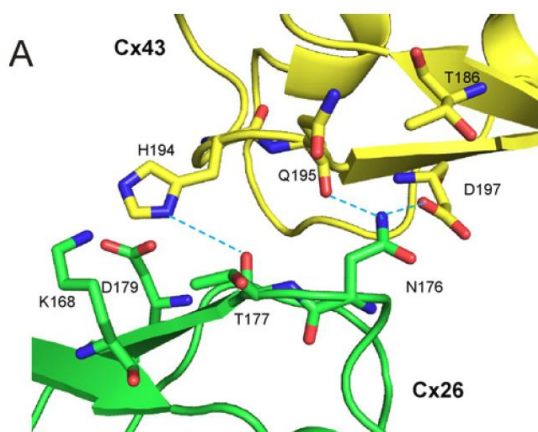
Cx40のD55がCx43のQ57及びQ58と静電的反発を生じて結合できない。



Cx40P193Q/Cx43 のホモロジーモデル

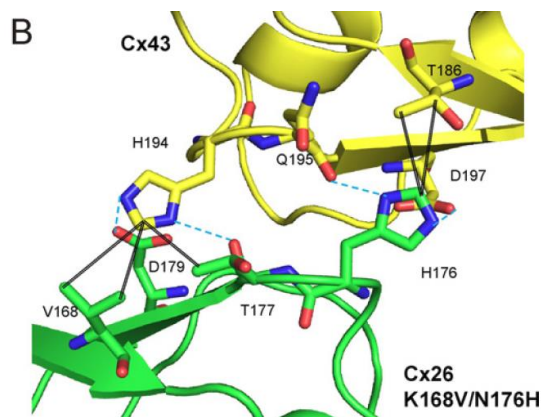
Cx40 の P193 を Q に変異することで、Cx43 の Q195 と水素結合が可能となった。

④ Cx26 と Cx43 が結合できないことを蛍光タンパク質との融合実験ならびにパッチクランプにより確認した。Cx26N176H/Cx43、Cx26K168C/Cx43 といった single mutation では同様に結合が確認できなかったのに対し、double mutation Cx26K168V-N176H/Cx43 ではヘテロ結合とイオンの移動によるコンダクタンス変化が観測できた。ホモロジーモデルから野生型の Cx26 と Cx43 では3つしか分子間水素結合が形成できないのに対して、Cx26K168V-N176H/Cx43 では3つの水素結合に加えて5つの疎水性相互作用を獲得することで結合の安定に寄与していることが明らかとなった(雑誌論文④)。



Cx26/Cx43 のホモロジーモデル

Cx26 と Cx43 は 3 つの水素結合しか形成できない。



Cx26K168V-N176H/Cx43 のホモロジーモデル

Cx26K168V-N176H と Cx43 では 3 つの水素結合に加えて 4 つの疎水性相互作用が可能である。

#### 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 4 件)

- ① Xiaoling Tong, Hiroshi Aoyama, Tomitake Tsukihara and Donglin Bai  
Charge at the 46th residue of connexin 50 is crucial for the gap junctional unitary conductance and transjunctional voltage-dependent gating  
*J. Physiol.* (2014), 592(23), 5187-5202, 査読有  
DOI: 10.1113/jphysiol.2014.280636
- ② Xiaoling Tong, Hiroshi Aoyama, Swathy Sudhakar, Honghong Chen, Brian H. Shilton and Donglin Bai  
The first extracellular domain plays an important role in unitary channel conductance of Cx50 gap junction channels  
*PLOS ONE* (2015) 10(12) e014876, 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0143876
- ③ Arjewan Jassim, Hiroshi Aoyama, Willy G. Ye, Honghong Chen and Donglin Bai  
Engineered Cx40 variants increased docking and function of heterotypic Cx40/Cx43 gap junction channels  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* (2016) 90, 11-20 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.11.026>
- ④ Levent B. Karademir, Hiroshi Aoyama, Benny Yue, Honghong Chen and Donglin Bai  
Engineered Cx26 variants established

functional heterotypic Cx26/Cx43 and Cx26/Cx40 gap junction channels  
Biochem J. (2016) 473(10) 1391-1403,  
査読有  
doi:10.1042/BCJ20160200

[学会発表] (計 4 件)

- ① Xiaoling Tong, Hiroshi Aoyama, Tomitake Tsukihara and Donglin Bai  
Charge at the 46th residue of connexin 50 is crucial for the gap junctional unitary conductance and transjunctional voltage-dependent gating  
2014 International Biophysics Congress, 2014年8月3日, Australia
- ② Xiaoling Tong, Hiroshi Aoyama, Swathy Sudhakar, Honghong Chen and Donglin Bai  
The residue in the first extracellular domain play an important role in transjunctional-voltage dependent gating and unitary channel conductance of Cx50 gap junctional channels  
Biophysical Society 59<sup>th</sup> Annual Meeting, 2015年2月7日, USA
- ③ Xiaoling Tong, Hiroshi Aoyama, Swathy Sudhakar, Honghong Chen and Donglin Bai  
The first extracellular domain plays an important role in unitary channel conductance of Cx50 gap junction channels  
International Gap Junction Conference, 2015年4月1日, Chile
- ④ Arjewan Jassim, Hiroshi Aoyama, Willy G. Ye, Honghong Chen and Donglin Bai  
Engineered Cx40 variants showed heterotypic colocalization and increases gap junctional coupling with Cx43  
Biophysical Society 60<sup>th</sup> Annual Meeting, 2016年2月27日, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青山 浩 (AOYAMA, Hiroshi)  
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：60291910

### (2) 研究連携者

近藤 昌夫 (KONDOH, Masuo)  
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：50309697