

タイトジャンクション動的平衡を制御する低分子化合物の探索

名古屋大学大学院創薬科学研究科構造分子薬理学分野

廣 明 秀 一

The cellular maintenance of tight junctions (TJs) is considered as dynamic remodeling processes of equilibrium between internalization / degradation and generation of claudin-based TJ strands. While the mechanism of biogenesis of TJs driven by ZO-1 and its paralogs were well understood, the molecular mechanism behind TJs' turnover remains unknown. Recently, the E3 ubiquitin ligase ligand of Numb-protein X1 (LNX1p80) was identified as a responsible factor that binds to claudin-1 and promotes its endocytosis. Since the first PDZ domain of ZO-1 is indispensable for claudin interaction in the TJ biogenesis, a competition between ZO-1 and LNX1p80 against claudin is assumed. We analyzed in vitro binding activity of the several claudin-derived peptides and the other peptides derived from the TJ-related proteins. We found that some of the claudin-derived peptide could bind LNX1-PDZ2, whereas none of claudins bind LNX1-PDZ3. Notably, all of these claudin-derived peptides bound ZO1-PDZ1. CAST and JAM-4 are the strong binders to LNX1-PDZ2 domain, which also did not bind ZO1-PDZ1. For further clarifying the molecular recognition mechanisms underlying the claudin competition among LNX1 and ZO-1 PDZ domains, we started the structural studies. We also succeeded in determining the NMR structure of mouse ZO1-PDZ1 domain, which was further subjected to a virtual screening study for identifying ZO1-PDZ1 inhibitors. We succeeded in crystallizing the LNX1-PDZ2 in a certain condition, and the structural determination at 1.5Å resolution was mostly completed. This high-resolution structure of LNX1-PDZ1 is also planned to be subjected to a virtual screening study. These structural informations of TJ-related PDZ domains will provide the molecular basis towards discovery and development of TJ-regulating (promoting and inhibiting) small molecular weight compounds.

1. 緒 言

細胞接着装置は、組織や臓器の形成に必須の構造体であり、その異常はがんや他の多くの疾患の原因になっている。細胞接着装置は、まず直接細胞間の接着に関与する膜タンパク質である接着分子の細胞質側に、その分子の機能を制御する足場タンパク質、それを安定化するための細胞骨格、ならびに接着分子によって制御されているシグナル伝達因子など、数多くのタンパク質から構成されている。これらの多数のタンパク質が巨大な分子複合体を形成して、生体膜に存在する膜ドメイン構造とともに、最終的に細胞間接着を完成させているのである。接着装置は、特に上皮細胞で発達しており、頭頂部のタイトジャンクション (TJ) と、それより内側に位置するアドヘレンスジャンクション (AJ) により構成されている。

このうち TJ は、4 回膜貫通構造をもつ接着分子クロロディン (CLD) およびオクルーディンと、CLD の裏打ちタンパク質 ZO-1/ZO-2 と呼ばれるマルチドメイン蛋白質からなる。具体的には、CLD の C 末端に存在する PDZ 結合モチーフと、ZO-1/ZO-2 が持つ PDZ ドメインが結合する。

TJ の形成には、この裏打ちタンパク質群の特定の PDZ ドメインと CLD の相互作用が、必須であることが知られている (図 1 a)。TJ は腸管や血液脳関門などの上皮細胞に存在し、細胞極性を維持すると同時に、水分子やイオンの透過を調節するバリア機能を持つ¹⁾。皮膚においては、水分子の透過を制御するバリアとして、保湿・保水などコスメトロジー研究の観点からも注目される。例えば、TJ の主成分の一つ claudin-1 を欠損したマウスが、全身の乾燥にともなう脱水症状により生後すぐに死んでしまうことから、TJ は皮膚バリア機能における保水・保湿に極めて重要な役割を果たすと考えられてきた¹⁾。

これまで、TJ の制御は、ZO-1 による形成促進のメカニズムのみが知られており^{2,3)}、一方、その分解経路ないしダウンレギュレーション過程についてはほとんど研究がなされていなかった。しかし 2008 年に、筆者らの共同研究者である神戸大学医学研究科の古瀬教授らのグループが、CLD のエンドサイトーシスを促進する因子としてマルチ PDZ ドメイン蛋白質である LNX1p80 を発見・同定した⁴⁾。LNX1 (Ligand of Numb X1) は、もともとは神経前駆細胞の維持と胎生期の神経発生に必須の因子 Numb の相互作用因子として同定されたユビキチン化酵素 E3 であり、Numb との結合モチーフ NPXY の下流に、4 つの PDZ ドメイン、N 末端に RING ドメインを持つ (図 1 b)。古瀬らは、この LNX1 の PDZ ドメインが CLD の C 末端に結合することで CLD をユビキチン化し、そのエンドサイトーシスの促進と細胞表面からの TJ 構造の消失を誘導することを見出した。興味深いことに、ZO-1/ZO-2 と LNX1 は、いず



A search for low-molecular weight ligands that regulate a dynamic equilibrium of tight-junction.

Hidekazu Hiroaki

Division of Structural Molecular Pharmacology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya University

れもそのPDZドメインによってTJを構成する鍵分子であるクローデインのC末端を認識して結合するため、お互いに競合関係にある。言い換えれば、CLDとの相互作用において両タンパク質のPDZドメインが拮抗し、TJの形成と消失の動的平衡を達成していると考えられる(図1c)。

筆者らは、皮膚バリア機能を強化する低分子化合物を、構造生物学に基づいた創薬手法を援用して探索することを目的として、研究を開始した。その際に、特にCLDとLNX1の相互作用を特異的に阻害する低分子化合物を開発することができれば、前述の動的平衡がTJ形成側に偏り、結果的にTJが担う皮膚のバリア機能を強化できるのではないかと考えた。すでに皮膚バリア機能を強化することを目的とした化粧品成分として、タイトジャンクション形成促進剤の報告がある一方で、TJの形成過程における細胞質内タンパク質を標的とした、タイトジャンクション形成促進剤の報告はまだない。しかし、通常、タンパク質-タンパク質相互作用 (protein-protein interaction, PPI) を創薬標的とする場合には、低分子化合物によりその相互作用を強化することは原理的に難しい一方で、PDZドメインのような相互作用ポケットの形状が明らかなドメインに対しては、PPI阻害剤の開発は不可能ではない。ここで問題になるのは、LNX1に4つあるPDZドメインのどのドメインがCLDとの結合に寄与しているか不明であるということである。そこで、筆者らは、構造生物学的手法と分子間相互作用解析により各PDZドメインの特徴付けを行うことを目指した。まず、LNX1のPDZドメインの結晶解析を行った。分子間相互作用解析では、LNX1のPDZ2ドメインとCLDの一部に相互作用を検出し、一方PDZ3はいずれとも相互作用しなかった。更に、JAM-4/CASTがLNX1-PDZ2にCLDよりも強く結合することが明らかになった。それと並行して、CLD結合においてそれと拮抗するZO-1

の1番目のPDZドメイン (ZO1-PDZ1) の立体構造決定を行った。一連の研究結果から得られる知見、とくに原子レベルでの立体構造情報は、インシリコ創薬の手法などと組み合わせることで、LNX1に特異的な薬剤を設計・探索することを可能にするであろう。

2. 実験

2.1 GST融合LNX1のドメイン発現系構築と精製

本研究の最終的なゴールの一つはLNX1のPDZドメインの立体構造決定であるが、構造解析には大量の精製したタンパク質試料が必要である。従って、研究に先立ち、効率のよい大腸菌組換えタンパク質発現系の構築と精製法の確立は必須である。

ヒト (h)・マウス (m) LNX1のドメイン領域 (表1) の遺伝子をpGEX-6P3-PRESATベクターに挿入した発現用プラスミドを作製した⁵⁾。このプラスミドを大腸菌BL21 (DE3) に導入した。その大腸菌をLB培地で培養し、IPTGによって発現誘導することで目的タンパク質を大量

表1

LNX1	domain領域	アミノ酸残基数	
mouse	PDZ1	258 – 367	110
	PDZ2	381 – 467	87
	PDZ3	505 – 591	87
	PDZ4	621 – 726	106
human	RING	16 – 140	125
	PDZ1	254 – 363	110
	PDZ2	377 – 463	87
	PDZ3	504 – 590	87
	PDZ4	621 – 726	106

本研究において構築されたLNX1p80の各領域の発現系。数字は、発現系を構築した領域のN末端とC末端の残基番号を示す。右欄は、各発現系のアミノ酸残基数である。

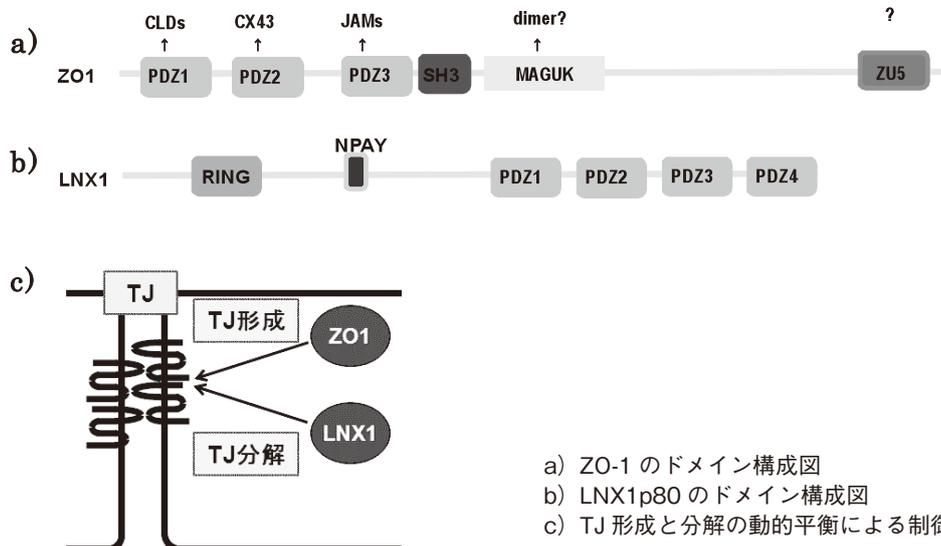


図1

- a) ZO-1のドメイン構成図
- b) LNX1p80のドメイン構成図
- c) TJ形成と分解の動的平衡による制御機構の模式図

発現させた。集菌後、超音波により大腸菌を破碎し、DEAE-sepharose カラム、Glutathione-sepharose カラムを順に用いて融合タンパク質を精製した。さらに PreScission Protease によりカラム上で GST 部分を切断し、ゲル濾過カラムに通した。精製後、限外濾過によるタンパク質の濃縮を行った。これを透析し結晶化用サンプルとした。相互作用解析には GST 融合タンパク質を用いた。条件を精査したがヒト・マウスいずれの由来の LNX1 においても 1 番目の PDZ ドメインと 4 番目の PDZ ドメインについては、溶解度の高い、かつアグリゲーションしにくい良質なタンパク質試料を得ることができなかった。従って、今後の研究は 2 番目と 3 番目の PDZ ドメインに限って続行することとした。

2・2 LNX1-PDZ2 と相互作用するペプチドの作成

本研究では LNX1-PDZ2 に相互作用するパートナーに注目し、その C 末端 10 アミノ酸をチオレドキシシン (Trx) 融合ペプチドとして発現系を構築ののち、発現・精製した⁶⁾。精製には DEAE-sepharose カラム、Ni キレート sepharose カラムを順に用い、imidazol を含むバッファーで溶出した。溶出したタンパク質を透析し、以降の実験に用いた。用意したペプチドの配列を表 2 に示す。

2・3 X 線結晶解析

24 mg/mL まで濃縮したマウス LNX1-PDZ2 の試料を、リガンドフリー状態で、結晶化を試みた。大規模スクリーニングには大阪大学蛋白質研究所 Phoenix を使用し、約 870 条件の探索を行った。結晶化は、4℃ で蒸気拡散法 (sitting drop 法) で行った。晶出した結晶がタンパク質の結晶であることを確認する為に、神戸大学研究基盤センターにおいて X 線照射実験を行った。更に有望な結晶については、flash cooling 法により凍結し、大阪大学鈴木准教授に共同研究を依頼して、つくばの高輝度放射高施設 (Photon Factory, PF) で構造決定用のデータセットを取得した (表 3)。

マウス LNX1-PDZ2 の結晶構造決定には分子置換法を用

表 2

mCLD1	-PTPSSGKDYV	hCAR	-PAQSKDGSIV
mCLD3	-GTAYDRKDYV	hJAM4	-PEKVSNTTVV
mCLD4	-ARSVPASNYV	mJAM4	-PQKVRNVTLV
mCLD7	-PKSNSKEYV	h(m)CAST	-DQDDEEGIWA
mCLD15	-FGKYGKNAYV		

本研究において構築された claudin ならびにタイトジャンクション関連蛋白質の C 末端ペプチドの配列。添え字の m/h はそれぞれマウス・ヒト由来であることを示す。CAST ではヒトとマウスでこの領域のアミノ酸が完全一致している。すべてのペプチドはチオレドキシシン融合タンパク質発現系として構築された。

いた。まず、構造解析ソフト CCP4 中のプログラム Molrep⁷⁾ を用い位相を決定した。モデルには Protein Data Bank に登録されている hLNX2-PDZ2 (PDB ID : 2VWR) を用いた。モデルとの兼ね合いで、mLNX1PDZ2 の 87 個のアミノ酸のうち N 末端側 2 残基はカットした。また Unit cell 内に 1 分子というシンプルな構造であった。この構造を CCP4 中のプログラム Refmac5⁸⁾ によって精密化した。構造の確認には、プログラム Coot を用いた。精密化を 20 サイクルかけた後、Coot による構造の確認・修正をした。Coot で出力された電子密度図は非常に精巧であり、マップのとおりに座標を合わせるようにした。この作業を 5 セット程度行った後、Coot の Find water を用い、水を assign した。ただし、非常に高分解能データであることを考慮し、1σ のレベルで電子密度が球状であるもの以外の場所に assign された水はすべて削除した。R factor、Free R の値が 20% 程度から落ちなくなったところで、構造解析ソフト Phenix 中にある Phenix.refine を用い、simulated annealing を行った。最後に multi conformer (alternative conformer) のアミノ酸、および対称軸上に存在する水を 0.5 の占有率で assign した。この構造を Refmac5 で 20 サイクル精密化したモデルを最終的なマウス LNX1-PDZ2 の構造とした。立体構造は、現在、PDB 登録準備中である。

2・4 LNX1-PDZ2 とペプチドの相互作用解析

Trx 融合ペプチドを Co²⁺ レジンに固定し、そこへ 5 nmol GST あるいは GST 融合 LNX1-PDZ2 を添加した。4℃ で 1 時間半攪拌しバッファーで 3 回 wash した後、500 mM imidazol を含むバッファーで溶出した。差を明瞭にするため銀染色を行った。表面プラズモン共鳴センサー (BIACORE[®] 3000) をもちいた相互作用解析においては、10 mM CH₃COONa 水溶液 (pH5.0) で希釈した 20 μg/mL Trx 融合ペプチドをセンサーチップ CM3 に固定した。そこへ HBS-EP バッファーに溶解した 0, 10, 25, 50, 100 μg/mL の濃度の LNX1-PDZ をアナライトとして測定した。CLD と相互作用することが明らかな mZO1-PDZ1 を、陽性の標準試料として測定し、結果を比較した。

表 3

施設名	神戸大学 研究基盤センター	高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設
装置名	RIGAKU R-AXIS IV ⁺⁺	PFAR-NW12A
波長	1.0 Å	1.0 Å
露光時間	10 分	2 秒
回転角度	0, 90°	+1°
撮影枚数	2 枚	360 枚
カメラ距離	150 mm	100 mm

In house 回折装置 (神戸大学) ならびにつくば高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 (PF) におけるマウス LNX1-PDZ2 の結晶回折実験の諸条件

2・5 ZO1-PDZ1 の NMR 立体構造解析

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で二重標識したマウス ZO-1 の一番目の PDZ ドメイン (mZO1-PDZ1) について、NMR を用いて立体構造決定を行った。0.7mM のタンパク質を 20mM MES 緩衝液 (pH 5.8) に溶解し、シゲミサンプル管に封入して、一連の 2D-NMR、3D-NMR の測定を行った。測定は、大阪大学蛋白質研究所 Bruker DRX-600 ならびに神戸大学医学研究科設置の Bruker Avance-III 測定装置を使用した。データ解析は NMRPipe⁹⁾、Sparky¹⁰⁾ をそれぞれ使い、構造計算には CYANA ver.2.1¹¹⁾ ならびに CNS1.2¹²⁾ を用いた。

3. 結果

3・1 mLNX1-PDZ2 の結晶構造解析

mLNX1-PDZ2 の結晶構造解析は、後述する結晶化キットを用いて、Sitting drop 法 (リザーバ 80 μL , drop1+1 μL) により行った。その際、マウス LNX1-PDZ2 は溶解度が極めて高い試料であったため、低い母液からは再現よく結晶が得られなかった。そこで、濃度を濃縮限界と考えられる 24mg/mL まであげ、さらに結晶化温度を 4 $^{\circ}\text{C}$ として条件の探索を行った。その結果、結晶化キット Structure Screen (Molecular Dimensions 社) 中の 3 条件 (A7, B6, D1)、および Index (Hampton research 社) F11、Crystal Screen Cryo (Hampton research 社) C4 で結晶の析出が認められた。

結晶が得られた条件のうち、Structure Screen A7 は、以前に 2.8 \AA 分解能の結晶が得られたものの、これまで再現が取れていなかった条件と全く同じ組成であった。そのため、再度得られた結晶は、以前に得られた結晶の再現であると考えられる。一方、結晶が得られた条件である Structure Screen B6 と Crystal Screen Cryo C4 は、供給元が異なるもののバッファー組成が同じであった。従って、母液濃度を濃くコントロールすることで、いくつかの結晶

化条件で再現性のよい結晶が得られたことになる。

それを踏まえて、更に高分解能の反射を与える結晶を得るために、前述の条件の組成を出発点に、1% もしくは 0.1M 刻みに沈殿剤および塩濃度を変化させて、最適条件を探索した。ただし条件 B6 に用いるカコジル酸は毒物であり、試薬の入手ならびにハンドリングが煩雑であったため、pH が同じ条件として 0.1M Bis-Tris (pH 6.5) で代用した。緩衝液成分を替えたにも拘わらず、結晶は 4 $^{\circ}\text{C}$ 、over night の静置で再現よく析出した (図 2A)。一方、結晶の大きさは PEG の量に大きく依存することがわかった。すなわち、PEG が最適結晶化領域よりも 1% でも多いと結晶の大きさは半分以下になる。これらの観察により、pH 6.5 の近傍が最適 pH なのかもしれないと考えられる。

次にこれらの結晶がタンパク質の結晶であることを確認する為に、神戸大学研究基盤センターにおいて X 線照射実験を行った。Structure Screen で析出した 3 条件では、中心に程近い点で回折点が得られ、タンパク質の結晶であることが確認できた。図 2B は B6 の回折像を示している。この B6 条件の回折像はそれぞれの回折点が独立して存在しており、極めて良好であった。そこで、これらの結晶を flash cooling 法により凍結し、PF でシンクロトロン光により回折実験を行い、立体構造決定と精密化に用いた。

図 3A にはマウス LNX1-PDZ2 の精密化途中での電子密度図に側鎖モデルを当てはめている途中経過の図を、図 3B には得られた PDZ ドメインの立体構造のリボン図を示している。図中の右側のヘリックスのすぐ左側が、ペプチド結合部位のポケットである。この PDZ ドメインは、CLD1 など一部の (後述のように全てではない) クローニン C 末端ペプチドに結合することができる。ここで、CLD1 を含む、ほぼすべてのクローニンの C 末端は、ZO1-PDZ1 と優先的に結合可能であることから、同じ PDZ ドメインであって

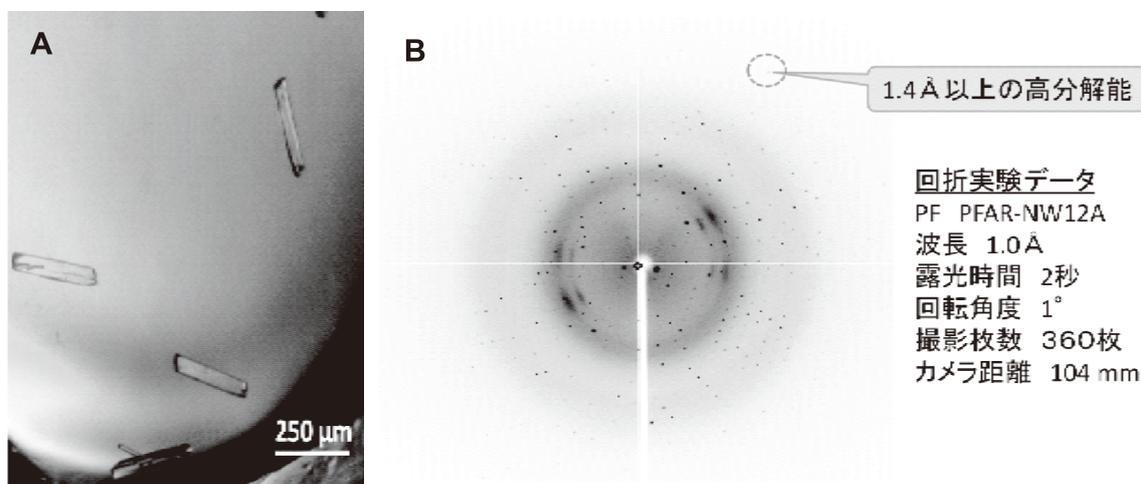


図 2

(A) mLNX1-PDZ2 の結晶の写真、(B) 結晶回折像の拡大図。数字は分解能を示す。

も、基質ペプチドの分子認識の様式はかなり異なることが予想される。この予想は、リガンドフリー状態でのポケット形状の差異からも、ある程度裏付けられた。

3・2 試験管内タンパク質相互作用実験による LNX1 の CLD 結合ドメインの決定

試験管内タンパク質結合実験 (pull-down 実験, data not shown) ならびに BIACORE を用いた相互作用実験から、PDZ2 と PDZ3 の二つの PDZ ドメインのうち、どちらが CLD に結合するかの判定を行った。表 4 には、種々のペプチドと PDZ ドメインとの解離定数 K_D の結果を示した。

その結果、mLNX1-PDZ2 は一部の CLD と相互作用するが一方全く相互作用をしない CLD もあることが明らかになった。通常、PDZ ドメインの多くはペプチドの C 末端 4 アミノ酸を必要十分条件として認識するが、CLD ではこの 4 残基はどれも配列がよく似ている。従って、mLNX1-PDZ2 には通常の PDZ ドメインとは異なる分子認識機構が内在している可能性が示唆された。これに対し mLNX1-PDZ3 は実験したどの CLD とも相互作用せず、同じ LNX1 内の PDZ 間でも結合に差が見られた。

3・3 LNX1 に優先的に結合する CLD 以外の基質の決定

更に、TJ に存在するタンパク質には、CLD のほかにも、その C 末端が LNX1 の PDZ ドメインと相互作用すると報告されているタンパク質が多数存在する。これらの中から、CLD よりも強く LNX1 と結合し、CLD と拮抗することのできるタンパク質を探索することができれば、そのペプチドの構造をもとに、CLD と LNX1 の相互作用を特異的に阻害する低分子化合物を設計することにつながる。そこで、CLD を含む 9 種の LNX1 結合タンパク質由来ペプチドと LNX1 の PDZ ドメインとの溶液中での会合を精査した。その結果、JAM ファミリーのひとつである JAM4 の C 末端ペプチドが、mLNX1-PDZ2 と強く相互作用することがわかった。また mLNX1-PDZ2 は hCAST とも相互作用するとわかった。これは前述の pull down assay の結果と一致した。

3・4 mZO1-PDZ1 のリガンドフリー体の溶液構造決定

NMR を用いて、mZO1-PDZ1 (95 アミノ酸残基) 由来の主鎖ならびに側鎖のほぼすべての水素、窒素、炭素の NMR シグナルを帰属することができた。帰属した結果は、

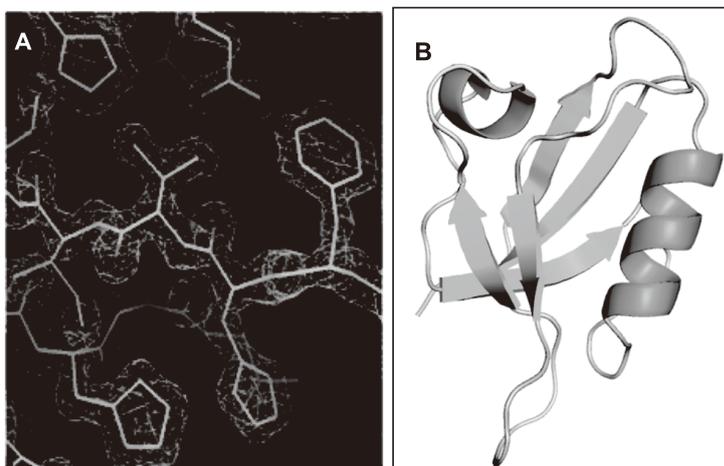


図 3

(A) マウス LNX1-PDZ2 の精密化途中の電子密度図。
(B) マウス LNX1-PDZ2 の立体構造のリボン表示。

表 4

K_D /M	hCAR	hJAM4	mJAM4	hCAST
hLNX1PDZ2	n.d.	1.4×10^{-7}	8.0×10^{-8}	9.9×10^{-8}
mLNX1PDZ2	n.d.	n.d.	3.3×10^{-8}	2.3×10^{-8}
mLNX1PDZ3	n.d.	7.2×10^{-9}	n.d.	n.d.
mZO1PDZ1	6.3×10^{-8}	3.9×10^{-7}	1.1×10^{-8}	n.d.

K_D /M	mCLD1	mCLD3	mCLD4	mCLD7	mCLD15
hLNX1PDZ2	n.d.	-	n.d.	-	-
mLNX1PDZ2	n.d.	2.8×10^{-7}	2.0×10^{-7}	n.d.	1.2×10^{-7}
mLNX1PDZ3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
mZO1PDZ1	7.0×10^{-9}	1.7×10^{-7}	3.2×10^{-8}	1.9×10^{-7}	5.8×10^{-8}

表面プラズモンセンサー解析による解離定数 K_D の比較。
n.d.) 実験を行ったが結合が弱く検出できなかったもの。
ハイフン) 実験を行っていないもの。

国際データベースであるBioMagResBankに登録した (deposition code 11424)。この結果は、Biomolecular NMR Assignment誌に報告した¹³⁾。

得られた化学シフト情報をもとに、更にNOE情報によるプロトン間距離を解析して、立体構造の決定に成功した。決定した立体構造座標は、国際データベースProtein Data Bankに登録した (PDB code ; 2RRM)。収束した20個の立体構造の重ね合わせ構造を図4Aに、既に報告されているZO1-PDZ1の結晶構造 (PDB : 2H3M) との比較を図4Bに、示す。既知の結晶構造との最大の構造の差異は、ペプチドリガンド (=CLD) 結合ポケットの入口付近に存在する $\beta 2/\beta 3$ loopの向きである。なお、結晶中では、このループ部分に硫酸イオンが結合していることが知られている。我々が決定した立体構造では、このループ部分に比較的大きな構造揺らぎがあることが明らかになった。

4. 考察

本研究の最終目的は、TJを分解する因子であるLNX1について、それを分子標的とみなして、それに特異的な阻害剤を開発し、コスメトロジー分野研究に展開することである。今回得られた結果からは、LNX1の二番目のPDZドメインが、CLDとの相互作用の一端を担うことが示され、LNX1-PDZ2を標的とした「立体構造に基づいた」創薬アプローチの妥当性は検証できた。しかし、LNX1のPDZ1ドメイン、PDZ4ドメインが、CLDとの相互作用の責任ドメインではないという確証を得るまでにはいたっていない (preliminaryにはCLDとは結合しないという結果を得ている)。これは、タンパク質試料としての性質が悪く、大腸菌発現系で大量の可溶性のタンパク質試料を調製することが困難だったからである。そこで、この問題点を解決

するために、現在、哺乳動物での培養細胞系で発現するLNX1全長のプラスミドをもとに、それぞれのPDZドメインをドメインごと欠失した変異体を作成した。この変異体プラスミドを培養細胞に導入して、4つあるPDZドメインのうちのPDZ2を破壊した場合にのみTJのエンドサイトーシスと分解が起きないことを確認する、という細胞生物学的実験を、神戸大学医学研究科古瀬教授と共同で進めている。また、CLD1のC末端ペプチドと¹⁵N標識したmLNX1-PDZ2を用いて、滴定実験を行った結果、LNX1はかなり広いインタフェースを用いてCLD1を認識しているという予備実験結果も既に得ている。そこで、これらの結果がまとも次第、マウスLNX1-PDZ2の立体構造ならびにペプチドとの相互作用の結果を査読付き専門誌に発表する予定である。

それらを踏まえた上で、mLNX1-PDZ2のフリーの立体構造を利用したインシリコスクリーニングと、それにより探索された低分子化合物がmLNX1-PDZ2に結合するかどうかの検証実験が、次に解決すべき課題である。筆者が2011年に神戸大から名古屋大に異動した関係で、特にインシリコスクリーニング関連の研究環境の再始動に手間取ってしまい、現時点でmLNX1-PDZ2のバーチャルスクリーニングは開始していない。また、インシリコスクリーニングの結果を実験的に検証するためには、NMRを利用した滴定実験を予定しているが、その結果を解釈するためにも、mLNX1-PDZ2のNMR解析を進め、シグナルの全帰属を行う予定である。これまでにZO1-PDZ1に関してインシリコスクリーニング実験を行った結果では、20個程度の化合物からでも数個の結合化合物が得られている。従って、インシリコスクリーニングの精度そのものについては、既存の技術 (市販ドッキングソフトの精度など) が十分実

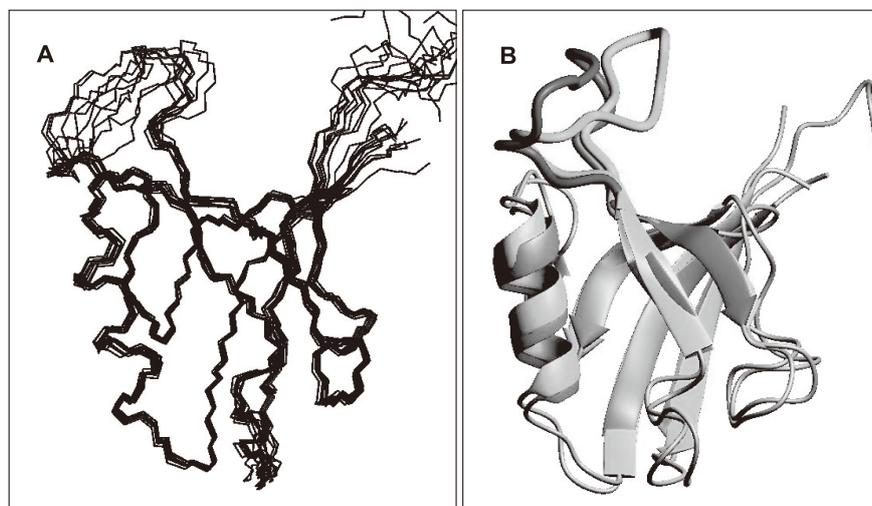


図4

(A)mZO1-PDZ1のNMR溶液構造、10個の解の重ね合せ図。(B)今回著者らが決定したNMR構造 (濃色) と既知の結晶構造 (淡色, PDB:2H3M) の比較。太く表示されたloop部分の構造が大きく変化している。

用可能なレベルに達していると考えられる。今後の研究の進展が期待できる。

一方、本研究で得られた結果であるところの、JAM4のC末端ペプチドが、mLNX1-PDZ2に対して、CLDのいずれのペプチドよりも強く結合するという発見の持つ意義は大きい。すなわち、例えば細胞膜透過ペプチド(CPP)のような方法論を援用して、JAM4ペプチドを細胞内に送り込むことによって、LNX1のTJ分解機能が阻害できる可能性が示された。これは、今後、検証するに値する有力な仮説である。その一方で、細胞接着分子であるJAM4については、これまで、TJ近傍に共局在することは知られていたが、TJ形成においてどのような役割を果たしているかなどの報告はほとんどなかった。また、生理的に、JAM4がLNX1によってエンドサイトーシスされるのかどうかについては、未だ明らかではない。今回の筆者らの知見は、JAM4がTJ近傍においてTJ抑制因子であるLNX1と優先的に結合することによって、間接的にCLDのユビキチン化を抑え、TJの安定化に寄与しているのではないか、という新しいモデルを示唆している。更に、LNX1にはスプライシングバリエーションとしてRINGドメインのないE3活性を欠失したLNX1p70というイソフォームが存在しているが、その分子は、細胞接着装置の足場タンパク質として機能する可能性が高い。本助成金によって行われた研究が端緒となり、コスメトロジー研究における新規作用メカニズムにおける皮膚保湿助剤が開発できるとともに、細胞接着装置研究に新たな光をあてる一助となれば幸いである。

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご支援いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S: Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice., *J Cell Biol*, **156**, 1099-111, 2002.
- 2) Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S: Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins., *J Cell Biol*, **147**, 1351-1363, 1999.
- 3) Ikenouchi J, Umeda K, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S: Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization., *J Cell Biol*, **176**, 779-786, 2007.
- 4) Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M: The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells., *J Cell Sci*, **122**, 985-994, 2009.
- 5) Goda N, Tenno T, Takasu H, Hiroaki H, Shirakawa M: The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics., *Protein Sci.*, **13**, 652-658, 2004.
- 6) Tenno T, Goda N, Tateishi Y, Tochio H, Mishima M, Hayashi H, Shirakawa M, Hiroaki H: High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling., *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 305-314, 2004.
- 7) Vagin AA, Teplyakov A: MOLREP: an automated program for molecular replacement., *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022-1025, 1997.
- 8) Vagin, AA, Steiner, RS, Lebedev, AA, Potterton, L, McNicholas, S, Long, F and Murshudov, GN: REFMAC5 dictionary: organisation of prior chemical knowledge and guidelines for its use., *Acta Cryst. D*, **60**, 2284-2295, 2004.
- 9) Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A: NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes., *J. Biomol. NMR*, **6**, 277-293, 1995.
- 10) Goddard TD, Kneller DG: Sparky 3, University of California, San Francisco.
- 11) Guntert P: Automated NMR protein structure calculation, *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect.*, **43**, 105-125, 2003.
- 12) Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse RWK, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL: Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 905-921, 1998.
- 13) Umetsu Y, Taniguchi R, Satomura R, Goda N, Ikegami T, Furuse M, Hiroaki H*: ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1, *Biomol. NMR Assign*, **5**, 207-210, 2011.