

天然由来物質による claudin-1 を介した高分子送達の科学的基盤研究

筑波大学生命環境系

南 雲 陽 子

Tight junctions (TJ) are intercellular barriers between epithelial cells that separate the internal and external environments of cellular sheets, and control invasion of foreign substances and a diffusion of solutes and water across the epithelium. Macromolecules such as biologics with high molecular weight and hydrophilicity are unable to diffuse through the lipid bilayer of the cell membrane. Control of TJ opening by attenuating the barrier function of TJ has proved to be attractive because it could allow safe and controllable transdermal administration of macromolecules.

MA026, a cyclic depsipeptide with 14 amino acid residues, is a natural product isolated from *Pseudomonas* sp. RtIB026 as an antiviral compound. It was recently suggested that MA026 binds to claudin-1. Because claudin is the essential component of tight junction complex, we investigated the effects of MA026 on TJ and found that MA026 opens TJ of MDCK II cell monolayer, reversibly. This result suggests that MA026 is a candidate for TJ reversible opener.

Here, we report the binding specificities and activity of MA026 toward claudin-1 and other claudin family proteins revealed by several methods, and the 3-dimensional structure of MA026. Our results not only reveal the mode of action of TJ regulator MA026 with novel binding site but also are useful for transdermal administration of large hydrophilic biologics.

1. 緒 言

スキンケア用品の作用には、保湿から皮膚トラブルの予防や治療など様々なものがある。特に近年では美白や肌の新陳代謝促進など、より特異的な効果を狙うものも見受けられる。そのような特異的作用を狙う場合、各種有効成分を作用対象であるメラノサイトや基底細胞が存在する基底層付近まで届ける必要がある。しかしながら、元来皮膚の最も重要な機能は水分が外に逃げるのを防ぐと同時に雑菌などの外部刺激から守るバリア機能であり、LogP 値などにも依存するものの、500Da 以上の分子は皮膚透過性が乏しいことが知られている¹⁾。従って有効成分が500Da 以上の場合、作用部位に効率的に浸透させるための工夫が必要だと考えられる。

皮膚のバリア機能には、角質層による静的なバリアと、その下層の生細胞層(顆粒層)に存在するタイトジャンクション(TJ)による動的なバリアがあり、後者の重要性は近年ますます増加している。角質層への浸透はナノカプセル化など製剤を工夫するアプローチがとられているが、TJ へのアプローチは検討例が少ない^{2, 3)}。その理由の一つとして、TJ へのアプローチは角質より下層へのアクセスを可能にするため、細胞障害性や異物の侵入を抑えるなど、相反する目的を満たすための慎重な研究開発が必要となる

点が挙げられる。

これまで我々は、上皮細胞層 TJ を可逆的に開口させる薬剤(可逆的 TJ 開口剤)について研究を行ってきた⁴⁻⁷⁾。可逆的 TJ 開口剤は、有効成分投与時のみ短時間 TJ を開口させ、その後、速やかに閉口させることができるため、異物の侵入を抑えつつ、有効成分の浸透を促進することが可能になると考えられる。MA026(図1A)は *Pseudomonas* sp. から単離された環状デプシペプチドである⁸⁾。抗C型肝炎ウイルス(HCV)活性を有しており、HCV 感染に必要なタンパク質 claudin-1 の部分配列に結合する報告がなされていた⁹⁾。Claudin-1 は TJ の主要構成因子であり、皮膚バリア機能に不可欠なタンパク質である¹⁰⁾。そこで我々は本化合物による TJ への影響を検討したところ、大きな細胞障害性を示すことなく、処理後約1時間で強く TJ 開口を引き起こし(開口期)、その後徐々に閉口していく(閉口期)可逆的 TJ 開口作用を見出すことができた(図1B, C)¹¹⁾。その後、既報の MA026 の構造に誤りがあることが明らかになり、構造を訂正するとともに特許を取得した^{12, 13)}。本化合物の実用化のためには MA026 のターゲットの特定、標的分子への作用を介して TJ を開口するという proof of concept が必要である。そこで本研究では、1) MA026 の claudin-1 を介した作用メカニズム解析、2) MA026 と claudin-1 及び他の claudin family protein との結合解析、3) MA026 の X 線結晶構造解析を行い、MA026 の TJ 開口活性についての分子標的・作用機構解析を目的とした。

2. 方 法

2. 1. FITC 4 kDa dextran 透過促進活性測定(図2)

イヌ腎臓上皮細胞 MDCK II を transwell insert (Corning) に播種し、7日間培養し単層形成させた。Insert の apical



Scientific research on claudin-1-mediated macromolecular delivery by naturally derived compound

Yoko Nagumo

Institute of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

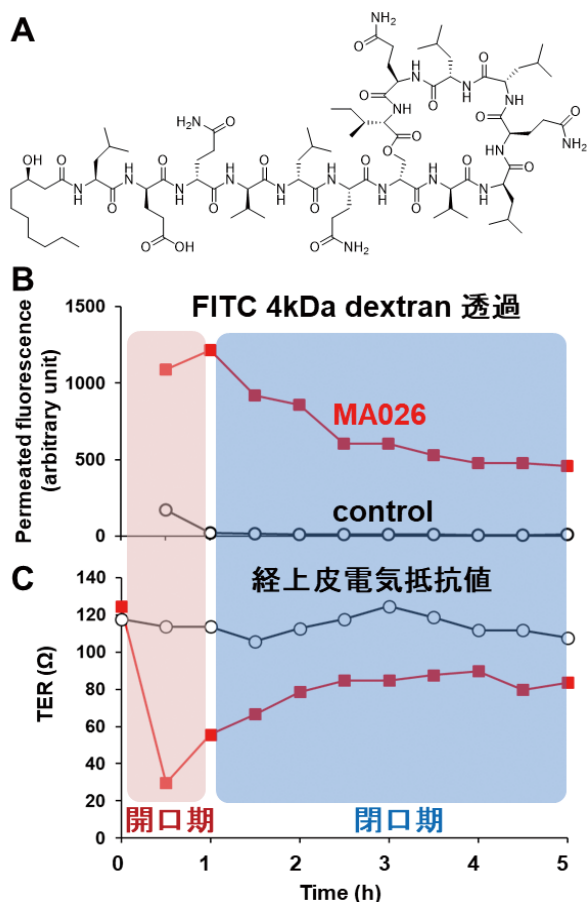


図1 MA026の構造とTJ透過促進能

(A) MA026化学構造、(B) FITC 4kDa dextran透過、(C) 経上皮電気抵抗値(TER) に対するMA026の作用。TJ開口の後、MA026を取り除かなくとも自然に閉口してくることがわかる。

側にのみFITC 4kDa dextran (FD-4, Sigma) 溶液を加えたのち、MA026 やその類縁体 (3 μ M) を処理した。Insert の basal 側の溶液を経時的に回収し、その蛍光を Wallac 1420 ARVO Multilabel Counter (Perkin Elmer, Ex/Em=485/528nm) で測定することで、insert を透過した FD-4 を検出した。

ペプチド競合阻害実験の場合には、予め MA026 (3 μ M) とペプチド (150 μ M) を混ぜておき、その混合物を細胞に処理した。

2. 2. 蛍光染色

単層状に培養した MDCK II 細胞にビオチン化 MA026 を処理し、ホルマリン固定した。Fluorescein avidin (A2011, Vector Laboratories) により染色し、観察は Leica AF 6000 fluorescence microscope (Leica Microsystems) により行った。

2. 3. SPR分子間相互作用解析

CM5 センサーチップ (Cytiva) に claudin-1 の部分配列

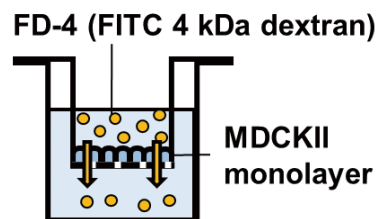


図2 Transwell を用いた FITC 4kDa dextran (FD-4) 透過促進活性測定模式図

ペプチド QCK-VFDSL-LNLSS を、lysine のアミノ基を介してアミノカップリング法により固定化した。74.5RU の固定化量を得、種々濃度の MA026 をアナライトとして流し Biacore X100 (Cytiva) で解析した。

2. 4. 各種 claudin 安定発現細胞株作成

複数の蛍光タンパク質を融合させたヒト claudin-1 や他のヒト claudin ファミリーの遺伝子配列を pEF1 vector (Thermo Fischer Scientific) に入れたコンストラクトを作成した。MDCK II 細胞に発現している claudin-1, -2, -3, -4, -7 を欠損させた quin KO MDCK II 細胞 (quinKO 細胞、生理学研究所周瀬教授よりご供与) に対し、Fugene (Promega) を用いてトランスフェクションした。2 日後より G418 (Nacalai Tesque) による薬剤選択を 10 日程度行い、遺伝子導入しなかったコントロール細胞が死滅したところで、遺伝子導入細胞群を限界希釈法により 96 穴プレート (Iwaki) に播種した。蛍光顕微鏡観察により蛍光タンパクの発現、局在などを確認した。さらに細胞抽出液を回収し、WB 法で抗 claudin-1 抗体 (Proteintech) を用いて検出することにより、蛍光タンパク質と融合した claudin-1 を検出した。

3. 結果と考察

3. 1. MA026 の claudin-1 を介した作用メカニズム解析

MA026 は claudin-1 の部分配列 VFDSL-L と結合することが示唆されている¹⁾。Claudin は、TJ 形成に必須な膜タンパク質であり、隣接する細胞の細胞膜上で claudin 同士が集積して形成される TJ ストランドと呼ばれる紐状の細胞密着構造を形成することでバリアを形成している (図3)。VFDSL-L 相同領域を含むドメインは TJ ストランドを形成する claudin 同士の cis 結合に関与する部位と考えられているため、MA026 が VFDSL-L 領域に結合し、cis 結合を乱すことで TJ 開口させている可能性が考えられる。そこで VFDSL-L ペプチドを合成し、ペプチドにより MA026 の TJ 開口活性が競合阻害されるか検討した。MA026 とペプチドの混合物を細胞に処理した結果、VFDSL-L 配列を逆

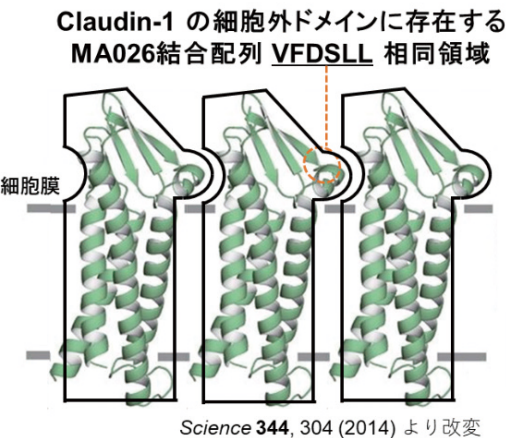


図3 Claudinストランド模式図

向きにしたLLSDFVペプチドはMA026のTJ開口活性に影響を示さなかったのに対し、VFDSLペプチドは1/20以下まで顕著に減少させることがわかった(学術論文作成中)。この結果はMA026がclaudin-1細胞外ドメインとの相互作用を介してTJ開口活性を示していることを示唆している。

MA026はClaudin-1のVFDSL配列と結合し、TJストランドを形成するclaudin-1のcis結合を阻害している可能性が考えられたことから、MA026とVFDSLペプチドとの直接の相互作用をSPRにより検討した。VFDSLとその前後を含む13残基ペプチドQCK-VFDSL-NLSSを合成し、アミノカップリング法によりCM5センサーチップに固定化した。アナライトとして種々濃度のMA026を用いて検討を行ったものの、MA026が高濃度の条件においても弱い結合しか見られず、ペプチド-低分子間の弱い相互作用であることが示唆された。MA026は可逆的にTJ開口を誘導すること、また強い相互作用で長時間結合するTJ結合物質の場合、TJを長時間開口させてしまう可能性が考えられることから、MA026とVFDSL部位との相互作用が弱いことがTJ開口の可逆性に重要である可能性が考えられる。今後はclaudin-1を固定化しMA026をアナライトとして流し特異的結合を確認した後、VFDSLペプチドでの結合阻害を見る定性的な解析を考えている。

ところで、ヒトclaudinには20種類以上のファミリーが存在し、1個の細胞に複数種のclaudinが発現、細胞や臓器の特異性に関与していると考えられている。今回我々がMA026のTJ開口活性に重要であることを見出したVFDSL配列部分は、ヒトclaudinファミリー内で保存性がさほど高くない(図4)。そこでMA026のclaudinファミリーに対する特異性を検討することにした。

各ヒトclaudinのVFDSL相同領域ペプチドを合成し、MA026のTJ開口活性に影響を与えるか競合阻害実験に

Claudin	Protein sequence	重要機能果たす細胞・組織例
1	QCKV FDSL LNLS-SS	皮膚
2	QCDIYST LL GL-PA	
3, 4, 6, 9	QCKV YDSL LAL-PQ	4: 尿路上皮
5	QCKV YDSV LAL-ST	血液脳関門
7	SCKM YDSV LAL-SA	
8	QCKI YDSL LAL-SP	
10	NCKD FP SM L AL-DG	
11	HCKPLVDI L IL-PG	血液精巣関門
12	DCLMY D TTWYS-SV	
14	QCQIVR SLL AL-PQ	有毛細胞
15	NCWE FP SM L AL-SG	
16	TCDEY DSI LAEHPL	腎臓
17	QCKFY SLL AL-PP	
18.1	ECRPYFTI L GL-PA	肺
18.2	ECRGYFT LL GL-PA	胃・がん化細胞
19	QCKLY DSL LAL-DG	シュワン細胞

図4 ヒトclaudinファミリータンパク質のVFDSL相同領域アラインメントと機能

より検討した。その結果、claudin-1のVFDSLペプチドが最も強くMA026のTJ開口活性を阻害すること、また各claudinのペプチド配列によって阻害活性が異なることがわかった(学術論文作成中)。中にはVFDSL配列がごく一部異なるだけで阻害活性がほぼ完全に失われるものもあれば、VFDSL配列のほとんどが異なっている程度阻害活性があるものもあり、配列特異性の高さを示す興味深い結果となった。解析の詳細は現在作成中の学術論文にて記載するが、以上の結果はMA026がclaudin-1に対して高い特異性を示すこと、またclaudin-1以外のclaudinファミリータンパク質に対しても、VFDSL相同領域を介してある程度相互作用し、TJ開口を誘導できる可能性を示唆している。今後、MA026とVFDSL相同配列との詳細な相互作用解析を行うことにより、claudin発現部位ごとに組織選択的な透過促進剤の開発が期待できる。

3. 2. MA026 とclaudin-1の結合解析

我々はこれまでにMA026の構造活性相関研究を行い、MA026を構成する14アミノ酸のうち、TJ開口活性に必要なアミノ酸残基や置換しても大きな影響がないアミノ酸残基について明らかにしている(論文査読中)。これら情報に基づき、TJ開口活性に影響が少ないと考えられるアミノ酸残基1か所をリジン残基に変換し、ビオチンを結合させた化合物を合成した。このビオチン化MA026のTJ開

口活性を測定したところ、十分な TJ 開口活性を確認できたことから (図 5)、このビオチン化体を MDCK II 細胞に処理し fluorescein avidin を用いた蛍光染色を試みた。しかしながら非特異的な細胞内シグナルが強く、ビオチン化 MA026 特異的なシグナルの検出が難しかった。そこで新たに TJ 開口活性に影響が少ないと考えられるアミノ酸残基 3 か所を選び、それぞれをリジン残基に変換した上にポリエチレングリコールリンカーを介してビオチンを導入した。これらビオチン化 MA026 の TJ 開口活性を同様に測定したところ活性を確認できたため、そのうちの一つを用いて同様に蛍光染色を試みたところ、ビオチン化 MA026 由来と考えられるシグナルが検出された (学術論文発表予

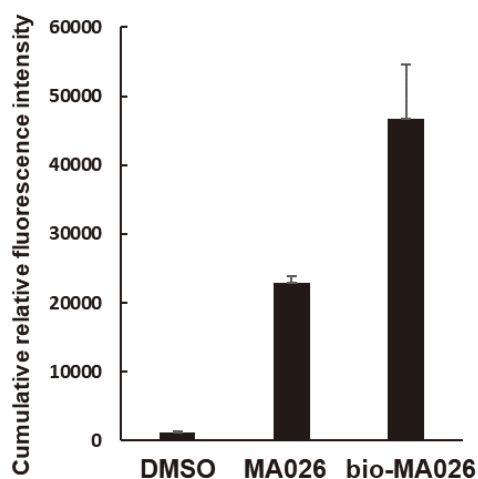


図 5 ビオチン化 MA026 の TJ 開口活性
DMSO コントロール、MA026、ビオチン化 MA026 (bio-MA026) の FD-4 累積透過量 (5 時間処理)。ビオチン化 MA026 は TJ 開口活性を示した。

定)。今後は抗 claudin-1 抗体染色との共局在検討、pull down assay などを試みる予定である。

次に、claudin を発現していない上皮細胞に蛍光タンパク質融合ヒト claudin-1 や他のヒト claudin ファミリータンパクを導入した細胞を作成し、MA026 処理時の変動を検出することで作用メカニズムを解析することとした。MDCK II 細胞で発現している claudin-1, -2, -3, -4, -7 を欠損することにより TJ バリアが失われた quin KO MDCK II 細胞 (quinKO 細胞) を生理学研究所古瀬教授よりご供与いただき¹⁴⁾、蛍光ヒト claudin-1 のみを発現する細胞を構築した。これらの細胞では claudin-1 の細胞膜領域での局在が観察されており、部分的なバリア機能が確認できた (図 6)。今後、TJ バリア機能に対する MA026 の作用や、共培養における共局在、MA026 処理時の局在変動観察を検討する。並行して claudin ファミリーを個別に導入した細胞の TJ バリア機能検討を進めており、今後は他の claudin ファミリータンパク質導入細胞単独、または claudin-1 導入細胞との共培養における検討、及びその MA026 による TJ 開口活性などを検討することで claudin 特異性などの検討を行う予定である。

3. 3. MA026 の X 線結晶構造解析

生理活性物質とその標的タンパク質との相互作用を分子レベルで解析するには、双方の立体構造が明らかになっていることが重要である。そこで我々は MA026 の結晶化を行い、その X 線結晶構造を得ることに成功した (論文査読中)。MA026 は全体的な構造としては左巻き α ヘリックス構造をとっていた。その結果、図 7 に示すように N 末に存在するアシル鎖と疎水性アミノ酸残基が化合物の片側に集

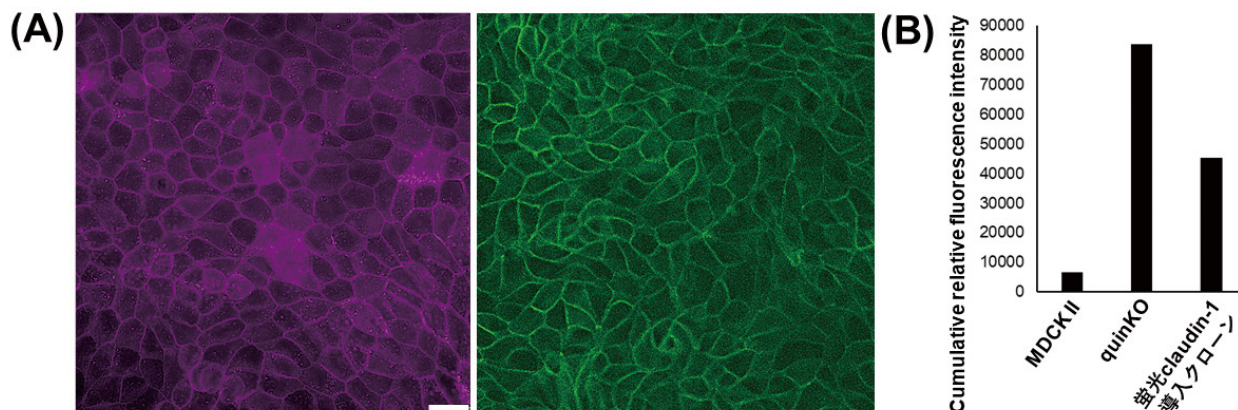


図 6 蛍光タンパク質融合ヒト claudin-1 発現 quinKO 細胞
(A) mCherry-claudin-1 発現 quinKO 細胞 (左)、YFP-claudin-1 発現 quinKO 細胞 (右) における蛍光タンパク発現局在。TJ が作られる細胞間隙に主に発現が見られる。Bar, 20 μ m。 (B) MDCK II 細胞、quinKO 細胞、蛍光タンパク質融合 claudin-1 を発現した quinKO 細胞クローンの FD-4 累積透過量 (2 時間処理)。複数の claudin ファミリータンパク質を発現し正常なバリア機能を有する MDCK II では FD-4 透過量が少ないのに対し、MDCK II から 5 種類の claudin ファミリータンパク質を欠損させた quinKO 細胞ではバリア機能が失われ、FD-4 透過量が上昇する。蛍光 claudin-1 導入 quinKO クローンでは部分的ではあるが FD-4 透過量の減少が観察される。

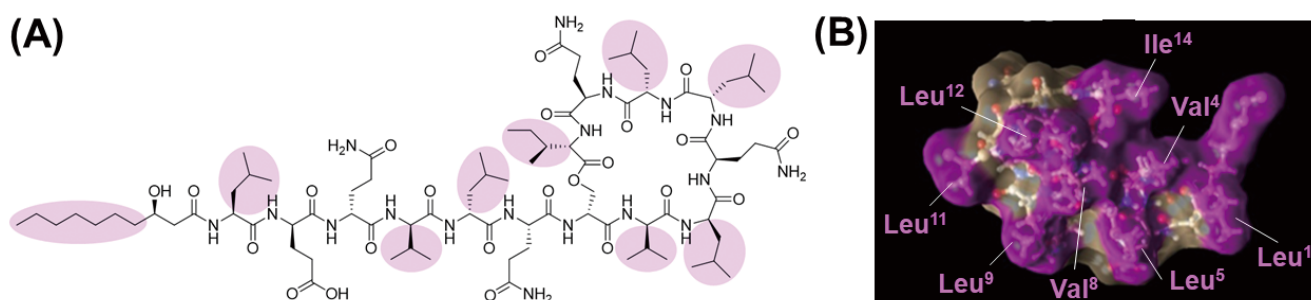


図7 MA026 X線結晶構造解析結果

(A) MA026の化学構造のうち、N末アシル鎖と疎水性残基をマゼンタで示した。(B) MA026の結晶構造。(A)で示した疎水性部分であるN末アシル鎖と疎水性残基が片側に集積し疎水性クラスターを形成していることがわかった。

積しており、疎水性クラスターを形成していることが明らかとなった。これまでの構造活性相関解析から、MA026のTJ開口活性には疎水性アミノ酸が重要であることが示されていることから（論文査読中）、MA026の疎水性クラスター領域がclaudin-1のVFDSL配列と相互作用していると考えられる。今後、MA026の結晶構造と、現在得られているclaudinファミリーのX線構造解析結果を用いて結合モデル作成・相同配列領域比較などを行い、相互作用や特異性に重要な部分構造について検討を進める予定である。

4. 総括

本研究では主にMA026のclaudin-1を介した作用メカニズム解析、特にclaudin-1の部分配列であり、MA026が結合すると示唆されていたVFDSL配列ペプチドとの相互作用解析を行った。VFDSL配列ペプチドにより、MA026のTJ開口活性が失われたことは、MA026がclaudin-1を介してTJ開口していることを強く示唆するものであった。さらにclaudinファミリーのVFDSL相同領域ペプチド競合阻害実験ではVFDSL配列がごく一部異なるだけで阻害活性がほぼ完全に失われるものや、VFDSL配列のほとんどが異なっている程度阻害活性があるものもあるなど興味深い結果が得られた。これらの結果により、MA026のclaudin-1特異性の高さとともに、他のclaudin特異的な阻害活性を示すMA026類縁体が合成できる可能性が見出され、組織選択的透過促進剤という新たなコンセプトを得ることができた。各種claudinを導入したquinKO細胞も取得できており、claudinを介した作用のメカニズム解析を進めている。

今回、MA026プローブを用いたclaudin-1の結合解析では、結合の証明までには至らなかったが、結合解析に有用なプローブ化に成功したことは今後の研究に大きく寄与すると考えられる。さらにSPRを用いた相互作用解析からMA026とVFDSLペプチドとの結合が弱い相互作用

であることが示唆された。このことから今後は定性的な解析となるが弱い相互作用でも検出できる手法の検討にシフトする。今回のペプチド競合阻害実験から明らかとなったように、選択性は高いがペプチド-中分子間の弱い相互作用であることがTJ開口の可逆性に寄与している可能性も考えられるため、詳細に検討していく必要があると考えている。

最後にMA026のX線結晶構造が得られたことで、構造活性相関検討の結果を統一的に理解するための基盤が得られた。今後、VFDSLペプチドや相同領域配列との相互作用を明らかにすることで、MA026を用いた非侵襲的薬剤送達の科学的基盤を確立する重要な知見となることが期待できる。

皮膚研究の進展に伴い、皮膚トラブルの原因や老化に伴う皮膚変性メカニズムが明らかになってきている。また、高齢社会における美しさ・若々しさに対するニーズから美容皮膚研究が進展し、老化に伴うしみ・しわなどの生成メカニズムについても明らかになっている。その結果、これらのトラブルやニーズに対応する成分などが研究開発され新たに上市されている。この流れは今後も加速していくと考えられる。さらに科学技術の進歩により複雑な生体高分子の生産が容易になってきており、医療分野以外でも利用されるようになってきた。近年耳にすることが多くなった「医薬部外品」では、医薬品のように治療には至らないまでも、高い効果・効能が期待されるような成分が配合され、皮膚を介してさらに奥の作用部位に有効成分を届けることが必要になってきている。上記のような有効成分には親水性の中・高分子化合物も多く存在するため、MA026をはじめとする透過補助剤により、有効成分をその作用部位まで浸透させる技術も同時に進展していく必要があると考えられる。本助成の成果をMA026を用いた非侵襲的経皮投与による有効成分送達に繋げ、皮膚の健康促進に貢献する予定である。

(引用文献)

- 1) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* **9**, 165 (2000).
- 2) Singh N., Kalluri H., Herwadkar A., Badkar A., Banga A.K., Transcending the skin barrier to deliver peptides and proteins using active technologies. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **29**, 265 (2012).
- 3) Wallis L., Kleynhans E., Du Toit T., Gouws C., Steyn D., Steenekamp J., Viljoen J., Hamman J., Novel non-invasive protein and peptide drug delivery approaches. *Protein Pept. Lett.* **21**, 1087 (2014).
- 4) Mukaiyama M., Usui T., Nagumo Y., Non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol, clotrimazole, open tight junctions via TRPA1 activation. *J. Biochem.* **168**, 407 (2020).
- 5) Mukaiyama M., Yamasaki Y., Usui T., Nagumo Y., Transient receptor potential V4 channel stimulation induces reversible epithelial cell permeability in MDCK cell monolayers. *FEBS Lett.*, 593, 2250 (2019).
- 6) Kanda Y., Yamasaki Y., Sasaki-Yamaguchi Y., Ida-Koga N., Kamisuki S., Sugawara F., Nagumo Y., Usui T., TRPA1-dependent reversible opening of tight junction by natural compounds with α , β - unsaturated moiety and capsaicin. *Sci. Rep.*, **8**, 2251 (2018).
- 7) Shiobara T., Usui T., Han J., Isoda H., Nagumo Y., The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin. *PLoS One*, **8**, e79954 (2013).
- 8) PCT WO 02/062831 (2002).
- 9) Shimura S., Ishima M., Nakajima S., Fujii T., Himeno N., Ikeda K., Izaguirre-Carbonell J., Murata H., Takeuchi T., Kamisuki A., Suzuki T., Kuramochi K., Watashi K., Kobayashi A., Sugawara F., Total Synthesis and Anti-Hepatitis C Virus Activity of MA026. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18949 (2013).
- 10) Kubota K., Furuse M., Sasaki H., Sonoda N., Fujita K., Nagafuchi A., and Tsukita S., Ca^{2+} -independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr. Biol.* **9**, 1035 (1999).
- 11) Kanda Y., Yamasaki Y., Shimura S., Kamisuki S., Sugawara S., Nagumo Y., Usui T., MA026, an anti-hepatitis C virus compound, opens tight junctions of the epithelial cell membrane. *J. Antibiot.* **70**, 691 (2017).
- 12) Uchiyama C., Fukuda A., Mukaiyama M., Nakazawa Y., Kuramochi Y., Muguruma K., Arimoto M., Ninomiya A., Kako K., Katsuyama Y., Konno S., Taguchi A., Takayama K., Taniguchi A., Nagumo Y., Usui T., Structural revision of natural cyclic depsipeptide MA026 established by total synthesis and biosynthetic gene cluster analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 8792 (2021).
- 13) 特許第 6975437 号 PCT/JP2020/012446「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」
- 14) Otani T., Nguyen T.P., Tokuda S., Sugihara K., Sugawara T., Furuse K., Miura T., Ebnet K., Furuse M., Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *J. Cell Biol.* **218**, No. 10 3372 (2019).