

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

Claudin-1を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成21（2009）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

Claudin-1を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成21(2009)年 3月

平成20年度総括・分担研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告	
Claudin-1を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査	----- 1
磯田 勝広	
II. 分担研究報告	
C-CPE構造変異体ライブラリの作製	----- 7
角田 慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 13

# Claudin-1 を標的とした C 型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその 臨床応用に向けた疫学調査

研究代表者 磯田 勝広 大阪大学大学院薬学研究科 助教

## 研究要旨

本研究は、最近新規同定された C 型肝炎ウイルス (HCV) 受容体、claudin-1 (CL-1) に着目し、独自の CL binder [アンタゴニスト] 創出技術を用いて HCV 感染阻害薬を開発すると共に、疫学的に C 型肝炎の炎症・悪化と CL-1 の発現パターンの関連解析を行うことにより、近未来に臨床応用可能な C 型肝炎の画期的予防・治療薬の創製を試みるものであり、国民の健康増進、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保に大きく貢献できる。本年度は CL-1 アンタゴニスト探索系として 5 種類の CL 発現細胞、2 種類の CL 蛋白質発現系を構築し、阪大微研松浦善治教授、阪大医竹原徹郎准教授、感染研脇田隆字部長との共同研究体制を整備した。

研究分担者氏名: 角田 慎一  
所属研究機関: 独立行政法人 医薬基盤研  
究所 創薬プロテオミクスプロジェクト  
職名: サブリーダー

## A. 研究目的

現在、我が国では 200 万人が C 型肝炎ウイルスに感染しており、年間 3 万人が C 型肝炎により死亡している。C 型肝炎に対して有効な薬物治療法としては、インターフェロン（免疫賦活化作用）とリバビリン（ウイルス複製阻害作用）の併用療法しか無く、この併用療法ですら 50% の奏効率しかないのが現状である。つまり、患者の 2 人に 1 人は肝硬変から肝臓に至り、最終的には死を待つばかり。肝細胞上の C 型肝炎ウイルス受容体の同定研究は広く行われてきており、ヒト CD81、SR-BI (scavenger receptor class B type I) や claudin-1 が受容体の候補として同定されている。HCV E2 蛋白質が claudin-1 の細胞外領域に結合するとエンドサイトーシスによりウイルス粒子が細胞内に取り込まれることから、claudin-1 の細胞外領域に結合して claudin-1 と E2 蛋白質の結

合を阻害する分子を創製することができれば、吸着阻害作用を有する C 型肝炎治療薬の開発に繋がると考えられる。本吸着阻害薬の第一選択としては抗 claudin 抗体が挙げられるものの、既存の抗 claudin-1 抗体は細胞内領域を認識する抗体であり、細胞外領域を認識する抗 claudin-1 抗体の作製に成功したグループは未だ皆無である。

本研究は、肝細胞等における C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染受容体 (claudin-1; CL1) を創薬ターゲットとした初めての“C 型肝炎の画期的予防・治療薬”を、独自の基盤技術 (claudin binder [アンタゴニスト] 創出技術) にて創出しようとするものであり、我が国の国民の健康増進といった社会的側面のみならず、バイオ製薬メーカーの育成や我が国の知的財産の確保にも大きく貢献できるものである。また当該研究によって先駆けて開発された“新規抗 C 型肝炎薬”の有効性に関しては、動物レベルでの基礎研究に加え、疫学的に C 型肝炎の発症・悪化と CL1 の発現パターンの関連解析を実施することにより評価を行うものであり、近未来的な臨床応用を強く目指したものである。本年度、申請者らは、実施した研究にお



いて、CL1と同様の立体構造を有する類縁体(CL4)を標的とした機能阻害剤(claudin binder; アンタゴニスト)の創出技術を活用し、CL4 アンタゴニストの構造変異体ライブラリの構築および CL1 アンタゴニストスクリーニング系を構築した。これらのことについて報告書をまとめる。

## B. 研究方法

### 1. 各種キメラ claudin 発現細胞の作製

構築したベクター-pGTCL1、pSKCL3、pGTCL4、または pGTCL5、pGTCL7 を template にして mPCR 法によりキメラ cDNA を調製した。キメラ cDNA を各種制限酵素で処理後、pcDNA3.1(-) または pFastBac1 と ligation した。Ligation した plasmid を大腸菌 (DH-5・・・) に transformation した。12 hr 後にシングルコロニーをピックアップし、LB/Amp (100・g/mL) 液体培地で 12 hr 培養後、アルカリ-SDS 法にてプラスミドを回収した。回収したプラスミドを *Xho*I で処理し、insert の確認を行った。Insert の確認できたサンプルのシーケンス解析を行った。次にトランスフェクションする前日に L 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を 24 穴プレートに播種した。次の日に、トランスフェクション試薬に lipofectamine (4・L) と plus reagent (4・L) を用い、プラスミド (0.3・g、pcDNA3.1(-)、pcDNA-MsCL1/F、pcDNA-MsCL1/1<sup>st</sup>、pcDNA-MsCL3/F、pcDNA-MsCL3/1<sup>st</sup>、pcDNA-MsCL4/F、pcDNA-MsCL5/F、pcDNA-MsCL5/1<sup>st</sup>、pcDNA-MsCL7/F、および pcDNA-MsCL7/1<sup>st</sup>) をトランスフェクションした。48 時間培養後、細胞を回収し、cell lysates を調製した。調製した cell lysates を用いて western blot 法にて各種 claudin の発現を確認した。さらに Fig. 1 に従って安定株を樹立する。

### 2. claudin-1 または claudin-4 組み換えバキ

### ュロウィルスの構築

claudin-1 または claudin-4 のバキュロウィルスを構築するために各 claudin 発現プラスミドを構築した。方法は pGTCL1 または pGTCL4 を PCR 法にて mouse claudin-1 または claudin-4 の full length または 1<sup>st</sup> loop 部位を増幅し、それぞれ *Not*I/*Xho*I、*Pst*I/*Sma*I または *Kpn*I で処理後、pFastBac1 または pFastBac1-gp64 に組み込んだ。組み込んだ plasmid を *E. coli* (DH-5・・・) に transformation した。12hr 後にシングルコロニーをピックアップし、LB/Amp (100・g/mL) 液体培地で 12hr 培養後、アルカリ-SDS 法にて plasmid を回収した。回収した plasmid を *Xba*I または *Kpn*I 処理をし、insert の確認を行った。Insert (claudin-1) が入っていると思われる 4 サンプルを Mini prep し、シーケンスの解析を行った。次に構築したバキュロウィルス組換え claudin-1 または claudin-4 (BV-CL1 と BV-CL4) をそれぞれ MOI 5.0、2.5 で Sf9 細胞 (250 mL) に感染させ、3 日間培養した。培養上清から高速遠心 (4,000 ×g) により budded baculovirus (BV) を回収した。回収した BV の蛋白定量をした後に、0.1・g/lane で SDS-PAGE に供し、転写後 anti-claudin-4 mAb にて claudin-4 の発現を確認した。なお、ポジティブコントロールとして CL4/L の lysate (2・g/lane) を用いた。

### 3. claudin-4 binder を利用したスクリーニング系の構築

CL4 提示ファージを用いて、BV-CL4 と CL4 発現細胞による提示ファージ濃縮系の構築を試みた。CL4 発現細胞によるファージライブラリー濃縮系の作製方法は、作製した Library 1 および library 2 より定法により phage を作製した。作製した phage を 2% BSA (in serum-free MEM) を用い、4・°C で 1 時間ブロッキングした。その後、予めブロッキングしておいた L 細胞に添加し、37・°C で 2 時間インキュベーションした。さらに、その上清を予めブロッキングしておいた CL4/L 細胞に添加し、37・°C で 2 時間インキュベーションし

た。インキュベーション後、細胞を回収し、50 mM HCl に懸濁し、4 °C で 10 分間インキュベーションすることにより phage を乖離させた。回収した phage を大腸菌 TG1 (O.D. = 0.3–0.6) に感染させ、グリセロールストックの作製と titer check を行った。次に BV-CL4 によるファージライブラリー濃縮系の作製方法は、BV-CL4 (0.5, または 1.0 · g/ /well or tube) を 4 °C で一晩インキュベーションすることで ELISA プレートまたはイムノチューブに固相化した。翌日、40% BlockAce (0.4 g/10 mL を 100%とする) で室温で 2 時間ブロッキング後、あらかじめ 8% BlockAce でブロッキングした aTac phage と C-CPE phage の混合溶液を添加した。室温で 2 時間反応後、100 mM HCl で phage を乖離させ、phage を回収した。回収した phage を大腸菌 TG1 (O.D. = 0.3–0.6) に感染させ、クローンディスクに播種し、titer check を行った。さらにクローンディスク上の任意のクローンをピックアップし、ダイレクト PCR により C-CPE phage の濃縮の有無を検討した。

## C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

## D. 考 察

### 1. 各種キメラ claudin 発現細胞の作製

Fig. 2 と Fig. 3 に claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-5、claudin-7 の Full Length および 1st ループをトランスフェクションし、発現をウエスタンブロットで観察した結果を示した。各種キメラ claudin 発現細胞の Full Length のバンドが確認できた。claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-5、claudin-7 を細胞膜に発現する L 細胞の作製ができたと考えられる。さらに、さらに Fig. 1 に従って安定株を樹立をおこなっている。

### 2. claudin-1 または claudin-4 組み換えバキュロウィルスの構築

claudin-1、claudin-4 発現バキュロウィルスを作製するために claudin-1 full length と、claudin-1 1<sup>st</sup> loop を組み換えたプラスミドを Fig. 4 (A) に示した。次にこれらの claudin-1 の発現チェックを行った。

Mouse claudin-1 full length を組み込んだ pFastBac1 は 7 サンプル、claudin-1 1<sup>st</sup> loop (*Pst*I/*Sma*I version) を組み込んだ pFastBac1-gp64 は 8 サンプル、insert の確認ができた (Fig. 4(B)、(C))。なお、claudin-1 1<sup>st</sup> loop (*Kpn*I version) は 3 回行ったが insert は確認できなかった。これらのうち、4 サンプルについてシーケンスの解析を行ったところ、claudin-1 full length を組み込んだ pFastBac1 は 4 サンプル、claudin-1 1<sup>st</sup> loop (*Pst*I/*Sma*I) を組み込んだ pFastBac1-gp64 は 2 サンプルシーケンスの配列が正しかった。

次に claudin-4 バキュロウィルスの発現を確認した。250 mL の培養液から BV-WT は 6.1 mg/mL、BV-CL4 は 5.6 mg/mL のものが 250 · L ずつ回収できた。さらに western blot 法により claudin-4 の発現を確認したところ BV-CL4 にのみ claudin-4 の発現が確認できた (Fig. 5)。

### 3. claudin-4 binder を利用したスクリーニング系の構築

Library 1 および library 2 を用いたファージ表面提示法による Claudin-4 発現 L 細胞を用いたパンニング結果を Fig. 6 に示した。Library 1 は 2nd で大幅な ratio の上昇が認められたのに対して、library 2 では 4th round で ratio の上昇が認められた。これらのことより、Claudin-4 発現 L 細胞はファージ濃縮スクリーニング系に有効であると考えられる。

次に Library 1 および library 2 を用いたファージ表面提示法による BV-CL4 を用いたパンニング結果を Fig. 7 に示した。Library 1 および 2 において CL4 指向性クローンが濃縮された。これら



のことより、BV-CL4 はファージ濃縮スクリーニング系に有効であると考えられる。

#### 4. 疫学調査体制の構築

阪大微研松浦善治教授、阪大医竹原徹郎准教授、感染研脇田隆字部長との共同研究体制を整備した。

#### E. 結論

1. claudin-1, claudin-3, claudin-4, claudin-5, claudin-7 を発現する L 細胞の作製ができた

2. claudin-1 または claudin-4 組み換えバキュロウィルスが作製できた。

3. Claudin-4 発現 L 細胞と BV-CL4 を用いたスクリーニング系の構築ができた。

4. 阪大微研松浦善治教授、阪大医竹原徹郎准教授、感染研脇田隆字部長との共同研究体制を整備した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### G-1 論文発表

1. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.

2. Isoda, K., Kagaya, N., Akamatsu, S.,

Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Bio. Pharm. Bull.*, 31, 309-311, 2008.

##### G-2 学会発表

1. 佐伯理恵, 角谷秀樹, 吉田孟史, 深坂昌弘, 磯田勝広, 鈴木亮, 近藤昌夫, 渡邊善照, 丸山一雄, 八木清仁: ウエルシュ菌エンテロトキシン断片を利用した claudin-4 ターゲティング法の開発., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### H-1 特許取得

なし

##### H-2 実用新案登録

なし

##### H-3 その他

なし

#### I. 研究協力者

近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科 准教授

角谷秀樹 大阪大学大学院薬学研究科 博士  
後期課程 2 年

佐伯理恵 大阪大学大学院薬学研究科 博士  
前期課程 1 年

松久幸司 大阪大学大学院薬学研究科 博士  
前期課程 1 年

山浦利章 大阪大学大学院薬学研究科 博士  
前期課程 1 年

Table.1 Amino Acid Sequence for Random C-CPE

	306	310	312	315	317
Wild type	Y	Y	Y	L	Q
1	A	R	N	Q	P
2	V	R	T	M	R
3	P	S	S	F	R
4	G	G	F	N	L
5	F	A	W	R	N
6	S	C	E	T	R
7	S	V	R	W	T
8	K	Q	Q	Q	Q
9	P	T	Y	H	S
10	L	Q	Q	Q	N
11	D	L	M	L	W
12	R	E	T	T	V



Table.2 Amino Acid Sequence for Random C-CPE

	304	305	307	39	313	318
Wild type	S	S	S	N	S	K
1	V	T	C	V	N	K
2	C	P	A	H	L	T
3	A	G	G	V	P	P
4	R	G	H	L	E	H
5	A	A	P	S	R	Q
6	P	A	P	D	P	A
7	C	T	T	T	N	K
8	H	P	S	P	G	H
9	R	G	G	R	N	R

## C-CPE 構造変異体ライブラリの作製

分担研究者 角田 慎一 （独）医薬基盤研究所 サブプロジェクトリーダー

## 研究要旨

Claudin は細胞間隙の tight junction を構成する分子量 23 kDa の 4 回膜貫通蛋白質であり、claudin-1~24 の 24 種類の亜分子から成る claudin family を形成している。近年、claudin はバリア機能の本体としての役割のみならず、HCV の co-receptor として働くこと、または、多くの癌細胞でその発現がアップレギュレートされていることが報告されている。Claudin の細胞外領域に結合する分子は、ウェルシュ菌エンテロトキシン *Clostridium perfringens* enterotoxin の C 末断片 (C-CPE) が claudin-4 に結合する唯一の分子である。本研究は、C-CPE を prototype として用いた CL-1 アンタゴニスト創出に資する C-CPE 構造変異体ライブラリの作製を試み、C-CPE を Claudin-4 の結合性に関与するアミノ酸をランダムに置換した、ライブラリを 2 種類作製することに成功した。

## A. 研究目的

Claudin は細胞間隙の tight junction を構成する分子量 23 kDa の 4 回膜貫通蛋白質であり、claudin-1~24 の 24 種類の亜分子から成る claudin family を形成している。この claudin family の発現には組織特異性が認められており、各組織によってバリア機能の本体を担う claudin の分子種がそれぞれ異なっている。近年、claudin はバリア機能の本体としての役割のみならず、HCV の co-receptor として働くこと、または、多くの癌細胞でその発現がアップレギュレートされていることが報告されている。Claudin の細胞外領域に結合する分子は、ウェルシュ菌エンテロトキシン *Clostridium perfringens* enterotoxin の C 末断片 (C-CPE) が claudin-4 に結合する分子として知られている。すなわち、claudin の細胞外領域を認識する抗体、または、claudin-4 以外の claudin に結合する分子の存在は皆無に等しい。本研究は、独自の CL-4 アンタゴニスト、C-CPE を用いた CL binder 技術と人工機能性蛋白質迅速創製技術を有効活用し、世界初の『CL-1 を介した HCV 感染阻害法』を開発することを目的としている。そこで本年度は、C-CPE を prototype として用いた CL-1 アンタゴニスト創出

に資する C-CPE 構造変異体ライブラリの作製を試みた。

## B. 研究方法

## 1. C-CPE 構造変異体ライブラリの作製

既に、アラニンスキャン解析により、アラニン置換に伴い C-CPE の CL-4 結合性が低下する 5 アミノ酸を同定していた。そこでまず、Tyr306、Tyr310、Tyr312、Leu315 など 5 アミノ酸をランダムに 20 種類のアミノ酸に置換し、ライブラリの作製を試みた。方法は上記のアミノ酸をコードする配列を全てのアミノ酸をコードし得るランダムな配列、NNS 配列 (N: A, T, G, C, S: G, C) に変換したプライマーを用いて PCR を行った。これによって、C-CPE の 5 カ所または 7 カ所のアミノ酸をコードする配列を NNS に置換した。得られた PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製した後、Not I および Nco I でそれぞれ一晩ずつ 37 °C で反応させた。制限酵素処理を行った PCR 産物をあらかじめ Not I および Nco I で処理した pCANTAB ベースの phagemid vector である pY03 と 16 °C で一晩ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を Sac I および Sph I で 37 °C で 2 時間処理後、PCR purification kit を

用いて精製した。あらかじめ 2YT 培地で 0. D. =0.3-0.6 まで培養し、ミリ Q 水で洗浄後、10%グリセロール溶液で 50 mL に懸濁した大腸菌 TG1 に対して、精製したライゲーション産物 2 mL を添加し、Gene-purser II を用い、2.5 KV、0.25 mF、200  $\Omega$  でエレクトロポレーションを行った。その後、2% グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、一部を 50 mg/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クロロディスクに播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することでライブラリサイズを算出、およびシーケンスの確認を行った。また、残りのサンプルは 50 mg/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT プレートに播種し、一晚培養してグリセロールストックを作製した。さらにアラニン置換により C-CPE の CL-4 結合性が上昇した Ser304、Ser305、Ser307、Asn309、Ser313、Lys318 などランダムなアミノ酸に置換したライブラリを上記と同様に作製した。

## C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

## D. 考 察

### 1. C-CPE 構造変異体ライブラリの作製

作製したライブラリ 1 のシーケンス解析結果を Table. 1 に示した。任意のクローンのアミノ酸配列を解析したところ、ほぼ全てのクローンで置換部位がランダムな配列へと変換されていた。

得られたライブラリ 1 のサイズは  $3.2 \times 10^8$  CFU であり、理論値 ( $20^5 = 3.2 \times 10^6$  CFU) よりも大きかった。このことより、理論値を十分に網羅したライブラリの構築に成功した。次にライブラリ 2 のシーケンス解析結果を Table. 2 に示した。ライブラリ 2 もライブラリ 1 と同様、任意のクローンのアミノ酸配列を解析したところ、ほぼ全てのクローンで置換部位がランダムな配列

へと変換されていた。得られたライブラリ 2 のサイズは  $1.6 \times 10^7$  CFU であった。以上より、2 種類の C-CPE 構造変異体ライブラリの作製に成功した。

## E. 結論

1. C-CPE の CL-4 結合性が低下する Tyr306、Tyr310、Tyr312、Leu315 など 5 アミノ酸をランダムに 20 種類のアミノ酸に置換し、ライブラリ 1 の作製に成功した。
2. C-CPE の CL-4 結合性が上昇した Ser304、Ser305、Ser307、Asn309、Ser313、Lys318 などアミノ酸をランダムなアミノ酸に置換したライブラリ 2 の作製に成功した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M., Horiguchi, Y., Mizuguchi H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
2. Shibata, H., Yoshioka, Y., Ohkawa, A., Minowa, K., Mukai, Y., Abe, Y., Taniai, M., Nomura, T., Kayamuro, H., Nabeshi, H., Sugita, T., Imai, S., Nagano, K., Yoshikawa, T., Fujita, T., Nakagawa, S., Yamamoto, A., Ohta, T., Hayakawa, T., Mayumi, T., Vandeenabeele, P., Aggarwal, BB., Nakamura, T., Yamagata, Y., Tsunoda S., Kamada, H., Tsutsumi, Y. Creation and X-ray structure



analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist. *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.

3. Sugita, T., Yoshikawa, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Shibata, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi Y. Comparative study of the protein transduction domains-mediated molecular transduction. *Br. J. Pharmacol.*, 153, 1143-1152, 2008.
4. Yoshikawa, T., Sugita, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Nagano, K., Nabeshi, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Abe, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus. *J. Mol. Biol.*, 380, 777-782, 2008.
5. Mukai, Y., Shibata, H., Nakamura, T., Yoshioka, Y., Abe, Y., Nomura, T., Taniai, M., Ohta, T., Ikemizu, S., Nakagawa, S., Tsunoda, S., Kamada, H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J. Mol. Biol.*, in press.

## G-2 学会発表

1. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 菱輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価: 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討., 第 24 回 DDS 学会, 東京 2008 年 6 月.
2. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向 洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作: ファージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン・の創製とその特性評価., 第 8 回 日本蛋白質科学会年会, 東京,

2008 年 6 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

なし

### H-2 実用新案登録

なし

### H-3 その他

なし

## I. 研究協力者

なし

Table.1 Amino Acid Sequence for Random C-CPE

	306	310	312	315	317
Wild type	Y	Y	Y	L	Q
1	A	R	N	Q	P
2	V	R	T	M	R
3	P	S	S	F	R
4	G	G	F	N	L
5	F	A	W	R	N
6	S	C	E	T	R
7	S	V	R	W	T
8	K	Q	Q	Q	Q
9	P	T	Y	H	S
10	L	Q	Q	Q	N
11	D	L	M	L	W
12	R	E	T	T	V

Table.2 Amino Acid Sequence for Random C-CPE

	304	305	307	39	313	318
Wild type	S	S	S	N	S	K
1	V	T	C	V	N	K
2	C	P	A	H	L	T
3	A	G	G	V	P	P
4	R	G	H	L	E	H
5	A	A	P	S	R	Q
6	P	A	P	D	P	A
7	C	T	T	T	N	K
8	H	P	S	P	G	H
9	R	G	G	R	N	R



# 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M	Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis	Biochem. Pharmacol.	75	1639-1648	2008年
Isoda, K., Kagaya, N., Akamatsu, S., Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K	Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury	Bio. Pharm. Bull.	31	309-311	2008年
Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M	Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis	Biochem. Pharmacol.	75	1639-1648	2008年
Shibata, H., Yoshioka, Y., Ohkawa, A., Minowa, K., Mukai, Y., Abe, Y., Tanai, M., Nomura, T., Kayamuro, H., Nabeshi, H., Sugita, T., Imai, S., Nagano, K., Yoshikawa, T., Fujita, T., Nakagawa, S., Yamamoto, A., Ohta, T., Hayakawa, T., Mayumi, T., Vandeenabeele, P., Aggarwal, BB, Nakamura, T., Yamagata, Y., Tsunoda S., Kamada, H., Tsutsumi, Y	Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor- $\alpha$ antagonist	J. Biol. Chem.	283	998-1007	2008年
Sugita, T., Yoshikawa, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Shibata, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kamada, H., Tsunoda S., Tsutsumi Y	Comparative study of the protein transduction domains-mediated molecular transduction	Br. J. Pharmacol.	153	1143-1152	2008年
Yoshikawa, T., Sugita, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Nagano, K., Nabeshi, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Abe, Y., Kamada, H., <u>Tsunoda, S.</u> , Tsutsumi, Y	Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus	J. Mol. Biol.	380	777-782	2008年
Mukai, Y., Shibata, H., Nakamura, T., Yoshioka, Y., Abe, Y., Nomura, T., Tanai, M., Ohta, T., Ikemizu, S., Nakagawa, S., Tsunoda, S., Kamada, H., Yamagata Y., Tsutsumi Y	Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant	J. Mol. Biol.	385	1221-1229	2008年

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochempharm](http://www.elsevier.com/locate/biochempharm)

## Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis

Azusa Takahashi<sup>a</sup>, Eriko Komiya<sup>a</sup>, Hideki Kakutani<sup>b</sup>, Takeshi Yoshida<sup>b</sup>, Makiko Fujii<sup>a</sup>, Yasuhiko Horiguchi<sup>c</sup>, Hiroyuki Mizuguchi<sup>d,e</sup>, Yasuo Tsutsumi<sup>d,f</sup>, Shin-ichi Tsunoda<sup>f</sup>, Naoya Koizumi<sup>a</sup>, Katsuhiko Isoda<sup>b</sup>, Kiyohito Yagi<sup>b</sup>, Yoshiteru Watanabe<sup>a</sup>, Masuo Kondoh<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Showa Pharmaceutical University, Tokyo 194-8543, Japan

<sup>b</sup> Laboratory of Bio-Functional Molecular Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

<sup>c</sup> Department of Molecular Bacteriology, Division of Infectious Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

<sup>d</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

<sup>e</sup> Laboratory of Gene Transfer and Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

<sup>f</sup> Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 November 2007

Accepted 21 December 2007

#### Keywords:

*Clostridium perfringens* enterotoxin

Tight junction

Claudin

Site-directed mutagenesis

### ABSTRACT

A C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) is a modulator of claudin-4. We previously found that upon deletion of the C-terminal 16 amino acids, C-CPE lost its ability to modulate claudin-4. Tyrosine residues in the 16 amino acids were involved in the modulation of claudin-4. In the present study, we performed functional domain mapping of the 16-amino acid region of C-CPE by replacing individual amino acids with alanine. To evaluate the ability of the alanine-substituted mutants to interact with claudin-4, we carried out a competition analysis using claudin-4-targeting protein synthesis inhibitory factor. We found that Tyr306Ala, Tyr310Ala, Tyr312Ala, and Leu315Ala mutants had reduced binding to claudin-4 compared to C-CPE. Next, we investigated effects of each alanine-substituted mutant on the TJ-barrier function in Caco-2 monolayer cells. The TJ-disrupting activity of C-CPE was reduced by the Tyr306Ala and Leu315Ala substitutions. Enhancement of rat jejunal absorption was also decreased by each of these mutations. The double mutant Tyr306Ala/Leu315Ala lost the ability to interact with claudin-4, modulate TJ-barrier function, and enhance jejunal absorption. These data indicate that Tyr306 and Leu315 are key residues in the modulation of claudin-4 by C-CPE. This information should be useful for the development of a novel claudin modulator based on C-CPE.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 8196; fax: +81 6 6879 8199.

E-mail address: [masuo@phs.osaka-u.ac.jp](mailto:masuo@phs.osaka-u.ac.jp) (M. Kondoh).

Abbreviations: TJ, tight junction; C-CPE, C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin; CPE, *Clostridium perfringens* enterotoxin; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; C-CPE-PSIF, C-CPE-fused protein synthesis inhibitory factor; LDH, lactate dehydrogenase; TEER, transepithelial electric resistance; FD-4, fluorescein isothiocyanate-dextran with a molecular weight of 4000.

0006-2952/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2007.12.016



## 1. Introduction

Sequencing of the human genome has provided useful information about molecular targets for drug development and has enabled target molecule-based drug discovery. Many drug candidates, however, are eliminated during clinical development due to severe side effects caused by inadequate pharmacokinetic properties and biodistribution [1,2]. The ability of a drug to pass through epithelial and/or endothelial cell sheets is a critical aspect of its pharmacokinetics and biodistribution.

There are two routes by which drugs cross epithelial and endothelial cell sheets: transcellular and paracellular. In the transcellular route, drugs are delivered by simple diffusion into the cell membranes and active transport via a receptor or transporter on cell membranes [3,4]. Transcellular delivery via transporters has been widely investigated, and the transporters involved in the influx and efflux of peptides and organic anions and cations have been identified [4–8]. The expression profiles of the transporters differ among tissues, and therefore methods for delivering drugs to a target tissue using a specific transporter may be promising; however, it may be necessary to modify the drug to target it to the appropriate transporter. Such modifications should not affect the pharmaceutical activity of the drug. Thus, the transcellular route is not always suitable for drugs created by genome-based high-throughput production.

In the paracellular route, a drug is delivered to cells by loosening the tight junctions (TJs), which normally restrict the movement of substances through the intercellular space in epithelial and endothelial cell sheets [9,10]. Therefore, to deliver drugs through the paracellular route, it is necessary to modulate the TJ-barrier function. TJ modulators have been developed as enhancers of absorption since the 1960s [11–13]. These absorption enhancers include chelators and surfactants, and they enhance absorption by dilating TJs, allowing drugs to enter the intercellular spaces of epithelial cell sheets [14]. Because opening of TJs is suitable for delivering a variety of molecules, absorption enhancers can be used for drug candidates created by genome-based high-throughput production; however their use is limited because they cause severe side effects, including exfoliation of the intestinal epithelium, irreversibly compromising its barrier functions, and because they have low tissue specificity [14–16].

As mentioned above, TJs form an intercellular seal and control solute movement through the paracellular route across epithelium and endothelium, thus maintaining the composition of the tissue interior [17,18]. There are some differences in the permeability of the TJ barrier in different types of epithelium and endothelium due to their specific physiological requirements [9]. This implies that a molecule regulating the tissue-specific barrier function of TJs should be useful for the delivery of drugs via the paracellular route.

Studies by Tsukita and co-workers have revealed that claudin plays a pivotal role in regulation of the TJ barrier [18]. Claudins are four-transmembrane proteins with molecular masses of ~23 kDa and form a large family with at least 24 members [19]. The expression of each claudin family member

varies by cell type and tissue [17,20]. For instance, claudin-1 is ubiquitously expressed, whereas claudin-16 and claudin-6 are expressed in specific cell types and during specific periods of development, respectively [21,22]. Interestingly, the barrier functions of claudin are also tissue-specific. Deletion of claudin-1 and claudin-5 results in disruption of the epidermal and blood-brain barrier, respectively [23,24]. Moreover, claudins form homo/hetero-paired strands in the membrane between adjacent cells [25,26]. Because there are at least 24 claudin family members, many different strand pairs could be formed, which could give TJs a high degree of tissue specificity. The ability to modulate the barrier-function of claudin in a member-specific manner would allow tissue-specific delivery of drugs through the paracellular pathway.

*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) causes food poisoning in humans. It consists of two functional domains, an N-terminal cytotoxic region and a C-terminal receptor-binding region (C-CPE) [27–29]. A receptor for CPE was identified in 1997 [30], and it was found to be identical to claudin-4 in 1999 [20]. Treatment of cells with C-CPE causes a decrease in intracellular claudin-4 levels and disruption of the TJ barrier in epithelial cell sheets [31]. Using C-CPE as a claudin modulator, we previously showed that it is possible to enhance drug absorption by 400-fold compared to sodium caprate, the only absorption enhancer used in the clinic [32]. Thus, claudin is a novel target molecule for drug delivery through the paracellular pathway.

Currently, C-CPE is the only known modulator of claudin. Functional domain mapping of C-CPE is useful for development of a claudin modulator using C-CPE as a prototype. Indeed, we previously found that upon deletion of the C-terminal 16 amino acids, C-CPE loses its ability to modulate claudin-4. Tyr306 is a key residue for claudin-4 modulation by C-CPE [32,33]. In the present study, we performed systemic analyses of each of the C-terminal 16 amino acids. We found that Leu315 in addition to Tyr306 is important for the ability of C-CPE to modulate the TJ barrier.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Anti-His-tag and anti-claudin-4 antibodies were obtained from Novagen (Madison, WI) and Zymed Laboratories (South San Francisco, CA), respectively. Ni-NTA agarose and PD-10 columns were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA) and GE Healthcare Bio-Sciences Co. (Piscataway, NJ), respectively. The reagents used in this study were of research grade.

### 2.2. Cell cultures

Human intestinal Caco-2 cells at passages 68–80 were used for transepithelial electrical resistance (TEER) assays. Claudin-4-expressing mouse fibroblast cells (CL4/L cells) were kindly provided by Drs. S. Tsukita and M. Furuse (Kyoto University, Japan). Caco-2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. CL4/L cells were maintained in modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum at 37 °C.



### 2.3. Preparation of C-CPE mutants

Each of the C-terminal 16 amino acids of C-CPE were individually mutated to Ala by polymerase chain reaction (PCR) using the primers listed in Tables 1 and 2 for single and double mutants, respectively, and pET-H<sub>10</sub>PER as a template as follows [30]. The resulting PCR fragments encoding the Ala-substituted mutants were ligated into the pET-16b vector (Novagen) via the NdeI/BamHI site, and the DNA sequence was confirmed. Each plasmid was transduced into *Escherichia coli* BL21 (DE3), and production of mutant C-CPEs was induced by addition of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside. The harvested cells were lysed in buffer A (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 400 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 0.1 mM p-aminophenyl methanesulfonyl fluoride hydrochloride, and 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol), supplemented with 8 M urea when necessary. The lysates were applied to a HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare), and mutant C-CPEs were eluted with buffer A containing 100–1000 mM imidazole. The buffer was exchanged with phosphate-buffered saline by gel filtration using a PD-10 column. The concentrations of mutant C-CPEs were estimated using a protein assay kit with bovine serum albumin as a standard (Bio-Rad, Hercules, CA). The purification of mutant C-CPEs was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by staining of the gels with Coomassie Brilliant Blue (data not shown).

### 2.4. Competition assay

We previously prepared C-CPE-fused protein synthesis inhibitory factor (C-CPE-PSIF), which is a claudin-4-targeting molecule, and we showed that it is cytotoxic to CL4/L cells

[34]. To assess the interaction between mutant C-CPEs and claudin-4, we evaluated the competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced cytotoxicity by mutant C-CPEs as follows. CL4/L cells were pretreated with C-CPE or mutant C-CPE at the indicated concentrations for 1 h, after which C-CPE-PSIF was added to the cells. After an additional 36 h of culture, the cytotoxicity of C-CPE-PSIF was assayed by the release of lactate dehydrogenase (LDH) using a CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit according to the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI). The cytotoxicity was expressed according to the following equation: % maximum LDH release =  $100 \times (\text{LDH released from the mutant-treated CL4/L cells} / \text{the total LDH content in the cells})$ .

### 2.5. Pull-down assay

Confluent Caco-2 cells, which develop TJs, were harvested and lysed in lysis buffer (phosphate-buffered saline containing 1% Triton X-100 and 1% protease inhibitor cocktail [Sigma, St. Louis, MO]). The resultant Caco-2 lysates were used for pull-down assay. Epithelial cell layers in rat jejunum were recovered and lysed in lysis buffer (25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 1% protease inhibitor cocktail). The buffer of the rat lysates was changed into phosphate-buffered saline by gel filtration using a PD-10 column. The resultant lysates of rat jejunum were used for pull-down assay. C-CPE or mutant C-CPEs were incubated with the lysates for 30 min at 37 °C and then mixed with Ni-NTA agarose (Invitrogen). After an additional 3 h at 4 °C, the beads were washed, and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-claudin-4 and anti-His-tag antibodies. The bound primary antibody

**Table 1 – Primers used for alanine scan**

Primers	Sequences (5'–3')
Common forward primer	ggaaatc <u>catatg</u> gaa aga tgt gtt tta aca gtt cca tct aca
Reverse primer for Ser304Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att tcc act ata tat gca att agc ttt cat tac aag aac
Ser305Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att tcc act ata tgc tga att agc ttt cat tac aag
Tyr306Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att tcc act agc tga tga att agc ttt cat tac
Ser307Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att tcc agc ata tga tga att agc ttt c
Gly308Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att tgc act ata tga tga att agc ttt
Asn309Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta tgc tcc act ata tga tga att agc
Tyr310Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg tgc att tcc act ata tga tga
Pro311Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata tgc gta att tcc act ata tga tga
Tyr312Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga agc agg gta att tcc act ata tga
Ser313Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tat tgc ata agg gta att tcc act ata
Ile314Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa taa tgc tga ata agg gta att tcc act
Leu315Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt ttg aaa tgc tat tga ata agg gta att tcc
Gln317Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa ttt tgc aaa taa tat tga ata agg gta att
Lys318Ala	cg <u>ggatcc</u> tta aaa tgc ttg aaa taa tat tga ata agg gta att
Phe319Ala	cg <u>ggatcc</u> tta agc ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att

The underlined sequence in the common forward primer indicates the NdeI site. The underlined sequence in the reverse primers and the italicized codon indicate the BamHI site and the alanine-substituted residue, respectively.

**Table 2 – Primers and templates used for preparation of double-alanine mutants**

Primers or templates	Sequence (5'–3')/template
Common forward primer	ggaattc <u>catatg</u> gaa aga tgt gtt tta aca gtt cca tct aca
Tyr306Ala/Leu315Ala	
Reverse primer	cg <u>ggaacc</u> tta aaa ttt ttg aaa tgc tat tga ata agg gta att tcc
Template	Tyr306Ala
Tyr310Ala/Leu315Ala	
Reverse primer	cg <u>ggaacc</u> tta aaa ttt ttg aaa tgc tat tga ata agg ggc att tcc
Template	Tyr310Ala
Tyr312Ala/Leu315Ala	
Reverse primer	cg <u>ggaacc</u> tta aaa ttt ttg aaa tgc tat tga agc agg gta att tcc
Template	Tyr312Ala

The underlined sequence in the forward and reverse primer indicate NdeI and BamHI sites, respectively. The italicized sequences in the reverse primers indicate the sites of mutation. The templates was pET-16b vector containing the indicated mutant C-CPE.

was detected with a peroxidase-labeled secondary antibody followed by visualization with chemiluminescence reagents (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

## 2.6. TEER assay

Caco-2 cells were seeded in Transwell™ chambers (Corning, NY) at a subconfluent density. TEER of the Caco-2 monolayer cell sheets on the chamber, a sign of TJ integrity, was measured using a Millicell-ERS epithelial volt-ohmmeter (Millipore, Bedford, MA). When the TEER values reached a plateau and the TJs were well developed, the Caco-2 monolayers were treated with C-CPE or mutant C-CPEs on the apical side of the chamber, and the TEER values were measured. The TEER values were normalized by the area of the Caco-2 monolayer. The TEER value of a blank Transwell™ chamber (background) was subtracted.

## 2.7. In situ loop assay

The experimental protocol for the in situ loop assay was approved by the Ethics Committee of Showa Pharmaceutical University. Wistar male rats (250–280 g; Animal and Material Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) were allowed at least a week to adapt in an environmentally controlled room. Fluorescein isothiocyanate-dextran with a molecular weight of 4000 (FD-4) was used as a model drug that passes across the intestinal epithelium mainly through the paracellular route [35–37]. Rats were anesthetized with thiamethyl sodium (Mitsubishi Pharma Co. Ltd., Osaka, Japan). A midline abdominal incision was made, and the lumen of the jejunum was washed with phosphate-buffered saline. A jejunal loop (5 cm in length) was prepared by closing both ends with sutures. A mixture of FD-4 and C-CPEs was administered into the jejunal loop. Blood was collected from the jugular vein at the indicated time points. The plasma concentration of FD-4 was determined with a

fluorescence spectrophotometer (Fluoroskan Ascent FL; Thermo Electron Corp., Waltham, MA). The area under the plasma concentration-time curve from 0 to 4 h (AUC<sub>0–4</sub>) was calculated by the trapezoidal method.

## 2.8. Statistical analysis

Significant difference is evaluated by ANOVA followed by student t-test, and the significant difference is set at  $p < 0.05$ .

# 3. Results

## 3.1. Alanine scan of the C-terminal 16 amino acids in C-CPE

We previously found that upon deletion of the 16 C-terminal amino acids, C-CPE loses its ability to disrupt the TJ barrier and to interact with claudin-4, and tyrosine residues in the 16 amino acids are involved in its modulation of claudin-4 [38]. However, systematic analysis of the 16 amino acids has never been performed. To examine the function of each of the 16 amino acids, we generated mutants in which the individual amino acids were replaced with alanine. Of the 16 mutants, all except for Phe316Ala, could be expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Thus, we were not able to examine the role of Phe316.

We previously prepared the claudin-4-targeting cytotoxic recombinant protein C-CPE-PSIF [34]. To screen the interaction of the mutants with claudin-4, we examined their ability to reduce C-CPE-PSIF-induced cytotoxicity in claudin-4-expressing CL4/L cells. Treatment of the cells with C-CPE-PSIF induced the release of approximately 55–65% of the total LDH (data not shown). The inhibition of C-CPE-PSIF-induced LDH release by each mutant C-CPE is summarized in Table 3. These results suggest that substitution of Tyr306, Tyr310, Tyr312, or Leu315 with alanine resulted in a decrease in the binding of the mutant C-CPEs to claudin-4, whereas replacement of Ser304, Ser305, Ser307, Asn309, Ser313, or Lys318 by alanine slightly increased the binding to claudin-4.

Next, we examined the effects of each mutant on the TEER value, an indicator of the tightness of the TJs. The experiments were performed using monolayers of human intestinal Caco-2 cells grown on a membrane, a method commonly used for evaluating the TJ-barrier function. Treatment of the cells with C-CPE at 20  $\mu$ g/ml for 18 h lowered the TEER value from 498 to 22  $\Omega$  cm<sup>2</sup> (data not shown). TJ-modulating activities were calculated as the ratio of the reduction in TEER for the mutant compared to C-CPE and are presented in Table 4. Only the Tyr306Ala and Leu315Ala mutants had weaker TJ-modulating activity than C-CPE (64.1 and 45.1% of C-CPE, respectively).

## 3.2. Effect of Leu315Ala substitution on the ability of C-CPE to interact with claudin-4

Because of these findings, we performed further studies of the Tyr306 and Leu315 mutants. We confirmed the interaction of Tyr306Ala and Leu315Ala with claudin-4 by a pull-down assay using lysate from Caco-2 cells. Claudin-4 was precipitated by C-CPE at 1  $\mu$ g/ml, whereas claudin-4 was not precipitated by Tyr306Ala or Leu315Ala at the same concentration (Fig. 1A). An



**Table 3 – Competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced LDH release by mutant C-CPEs**

Wild-type or mutant C-CPE	Inhibitory ratio (% of C-CPE)
C-CPE	100
Ser304Ala	125.6 ± 0.7
Ser305Ala	126.8 ± 0.2
Tyr306Ala	63.8 ± 0.4
Ser307Ala	123.6 ± 2.2
Gly308Ala	99.1 ± 2.7
Asn309Ala	125.6 ± 1.8
Tyr310Ala	72.2 ± 2.3
Phe311Ala	114.9 ± 0.5
Tyr312Ala	73.1 ± 2.4
Ser313Ala	132.9 ± 0.8
Ile314Ala	94.3 ± 3.1
Leu315Ala	69.1 ± 2.7
Gln317Ala	96.8 ± 1.6
Lys318Ala	126.2 ± 2.1
Phe319Ala	111.5 ± 3.9

After a 1 h of treatment with C-CPE or mutant C-CPEs at 5 µg/ml, claudin-4-expressing L cells were treated with C-CPE-PSIF (0.2 µg/ml) for 36 h, and the release of LDH was determined. The results are shown as the percent of C-CPE-induced LDH release, and the values are the means ± S.D. (n = 4).

additional band was observed below claudin-4 in the pull-down assay using C-CPE and mutants. This was due to nonspecific binding of the anti-claudin-4 antibody by His-tagged protein (data not shown).

To confirm the interaction between mutated C-CPEs and claudin-4, we also investigated the dose-dependence of Tyr306Ala and Leu315Ala in a competitive assay using C-CPE-PSIF. As shown in Fig. 1B, pretreatment of the cells with C-CPE at 10 µg/ml reduced LDH release by C-CPE-PSIF from 56.5 to 8.3% of the total LDH, whereas the Tyr306Ala and Leu315Ala mutants had much weaker inhibitory effect (50.0 and 40.5%

**Table 4 – Effects of mutant C-CPEs on TJ barrier in Caco-2 cells**

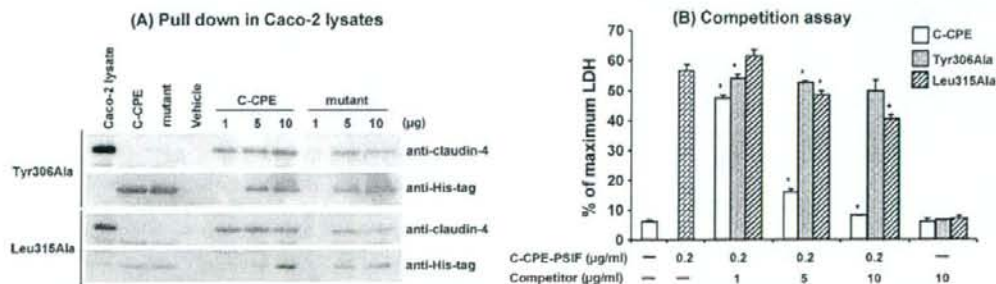
Wild-type or mutant C-CPE	Decreased ratio of TEER (% of C-CPE)
C-CPE	100
Ser304Ala	100.3 ± 0.5
Ser305Ala	100.1 ± 2.3
Tyr306Ala	64.1 ± 4.3*
Ser307Ala	100.4 ± 1.8
Gly308Ala	98.1 ± 0.2
Asn309Ala	104.4 ± 1.3
Tyr310Ala	93.8 ± 1.2
Pro311Ala	101.4 ± 2.3
Tyr312Ala	100.1 ± 1.5
Ser313Ala	104.6 ± 0.8
Ile314Ala	98.3 ± 1.4
Leu315Ala	45.1 ± 5.3*
Gln317Ala	98.8 ± 1.3
Lys318Ala	99.3 ± 0.8
Phe319Ala	103.5 ± 0.9

Caco-2 cells were seeded on a Transwell™. After development of the TJ barrier in Caco-2 cells, C-CPE or mutant C-CPEs was added at 20 µg/ml, and TEER was measured. The decrease in the ratio of TEER vs. C-CPE was calculated from the following equation:  $100 \times (\text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment of the cells with each mutant C-CPE}) / (\text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment with C-CPE})$ . The values are means ± S.D. (n = 4).

\* Significant difference from C-CPE ( $p < 0.05$ ).

release, respectively). Thus, the interaction of C-CPE with claudin-4 was weakened by substitution of Tyr306 or Leu315 with alanine. These results suggest that Leu315 in addition to Tyr306 is important in the interaction of C-CPE with claudin-4.

We previously found that rat jejunal absorption of FD-4, a model compound used for evaluation of paracellular absorption, is enhanced by C-CPE via an interaction with claudin-4



**Fig. 1 – Role of Leu315 in the interaction between C-CPE and claudin-4.** (A) Pull-down assay using Caco-2 lysates. TJ-developing Caco-2 cells were harvested and lysed in the lysis buffer. The lysate was incubated with vehicle, C-CPE, or mutated C-CPEs for 30 min at 37 °C. Ni-NTA agarose was added, and the mixture was incubated for 3 h at 4 °C. The Ni-NTA agarose was then precipitated, and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-claudin-4 or anti-His-tag antibodies. The lanes containing Caco-2 lysate, C-CPE, and mutated C-CPE (mutant) served as positive controls for claudin-4, C-CPE, and mutant C-CPEs, respectively. The results are representative of three independent experiments. (B) Competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced cytotoxicity by mutant C-CPEs. Claudin-4-expressing CL4/L mouse fibroblasts were pretreated with C-CPE or mutant C-CPEs at the indicated concentrations for 1 h. The cells were then incubated with C-CPE-PSIF (0.2 µg/ml). After 36 h, LDH release was determined using a commercially available kit. The results are representative of three independent experiments. Values are means ± S.D. (n = 3). \* Significant difference from C-CPE-PSIF-treated group ( $p < 0.05$ ).