

Title	The four-transmembrane protein IP39 of Euglena forms strands by a trimeric unit repeat
Author(s)	Ito, Yasuyuki
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/26308">http://hdl.handle.net/11094/26308</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 論文内容の要旨

〔論文題名〕 The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strands by a trimeric unit repeat. (*Euglena gracilis*の4回膜貫通タンパク質-IP39は非対称的な三量体を形成し、膜平面内で直列に重合する。)

専攻名：病態制御医学専攻

氏名： \_\_\_\_\_ 伊藤 泰行 \_\_\_\_\_

## 〔目的〕

Tight junctions (TJs) の主要な構成分子であるclaudinは現在27種類のメンバーが確認されており、細胞間接着部位において膜平面内で重合して (strand形成) 上皮細胞間バリアを構築する。従って、細胞間バリアの理解のためには claudinの立体構造情報に基づいたその重合原理の議論が重要であるが、その情報は皆無である。近年、*Euglena gracilis*にclaudin類似の膜タンパク質IP39の発現が報告された。IP39も線状に重合し、さらに天然性に結晶性を持つことから、IP39の構造解析がclaudinの重合様式を分子レベルで説明できる可能性がある。そこで我々は2次元結晶構造解析法を用いてIP39の立体構造解析に取り組み、claudinの重合原理の解明を試みた。

## 〔方法ならびに成績〕

*Euglena*-IP39はPMP-22/EMP/MP20/Claudin superfamilyと膜貫通領域、および第一細胞外ループ内のsuperfamily内に高く保存されたmotif (W-LW-C-C) において高い相同性が見られた。

*Euglena gracilis*より精製した4回膜貫通タンパク質IP39を人口脂質と混合し、透析法にて界面活性剤を除去することで脂質平面内にIP39を再構成する2次元結晶化を行った。タンパク質の精製条件、可溶化条件等、結晶化条件検討にて得られた2次元結晶を酢酸ウランを用いて負染色を行い、電子顕微鏡観察により結晶性を評価することで、IP39がより均一に脂質平面内に配向する良質な結晶を作製する条件を決定した。条件設定後の結晶は氷包埋し、極低温電子顕微鏡にて立体構造情報を収集した。3次元再構成した結果から、IP39は最小単位に3量体を形成していることが判明した。またIP39は4通りの分子間相互作用を持つことが分かり、これにより3量体が長軸方向に繰り返し重合して分子鎖を構築し、さらに2列の分子鎖の重合方向が逆平行に隣り合う逆平行2本鎖で1つのstrandを形成することが判明した。3量体内において、1分子と他の2分子は配向が異なっており、1分子が脂質膜に対して垂直方向の軸を回転軸に180°向きを変えて、他の2分子に配向していることが分かった。また1つのstrand内で、逆平行2本鎖はその2列間をIP39のリン酸化C末鎖を介して結合していることが判明した。

## 〔総括〕

膜タンパク質が脂質膜の様な2次元平面内で相互作用することで重合鎖を作る際、その結合による歪みから、重合は直線状ではなく湾曲することで、次第にはリング状の分子鎖が構成される。しかし、IP39は4つの分子間相互作用を持つことで湾曲することを抑制し、直線状の重合鎖形成を可能としていると考えられる。2次元結晶化されたIP39の構造は、細胞骨格タンパク質の存在無しにIP39単独で直線状に重合出来ることを意味しており、分子量29kDaの小さな4回膜貫通タンパク質がこの様な平面内配向を見せる例は過去に例が無く、構造学的にも非常に興味深い点である。IP39-strandに見られる分子の並び方は、claudinが構築するTJs-strandの重合様式を示唆している可能性があり、今後のclaudinの機能および構造解析において重要な知見、テンプレートとなると思われる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		伊藤 泰行	
論文審査担当者	(職)	氏名	
	主査	大阪大学教授	月田 早智子
	副査	大阪大学教授	原田 彰宏
	副査	大阪大学教授	金井 好克
論文審査の結果の要旨			
<p>Tight junctions (TJs) の主要な構成分子であるclaudinは現在27種類のsubtypeでclaudin familyを構成し、TJにおいて膜平面内で線状に重合 (strand形成) して細胞間バリアーを構築する。細胞間バリアーの機能の理解のためには claudinの立体構造情報に基づいたstrand形成原理の解明が必須であるが、その情報は皆無である。近年、Euglena gracilisにclaudin類似の膜タンパク質IP39の発現が報告された。Claudinが構造解析に於いて結晶化が困難な高難度タンパク質であるのに対し、哺乳動物に比べて進化的に古い生物であるEuglenaのIP39は細胞膜内で天然性に結晶性を持つ。そこで膜タンパク質の構造解析に有効な脂質二重層内に結晶を作製する2次元結晶構造解析法をIP39に適用することにより、分解能約10 ÅのIP39の構造解析データを得た。2次元結晶内でIP39は4通りの分子間相互作用様式を示す分子であり、このmulti-interactionにより脂質平面内でTJ-strand様に線状重合をすることが明らかになった。本研究結果は細胞間バリアー形成に必須であるclaudinの線状の重合様式を示唆するはじめての知見であり、学位に値するものと認める。</p>			