

構造情報を利用したタイトジャンクション増強剤の 実用的な化合物への骨格転換

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

Tight junction (TJ) is an inter-cellular adhesion machinery that is maintained by epithelial cells in a dynamic equilibrium between biogenesis and degradation. Biogenesis of TJ is mainly proceeded by ZO-1 (and its paralogs ZO-2/3), whereas TJ degradation is promoted by LNX1. In detail, two PDZ domains in ZO-1 and LNX1 are competing each other among molecular interaction against claudins' C-termini. Inhibition of either ZO-1 or LNX1 interaction to claudin may result in TJ-opening or TJ-closure, respectively. In this study, we screened compounds from natural products that binds ZO1-PDZ1. We found glycyrrhizin binds ZO1-PDZ1 with a reasonable affinity, while baicalin, baicalein, hesperetin and naringenin exhibited weak affinity against ZO1-PDZ1. Among these four flavonoids, baicalin and baicalein showed significant reduction CLD-2 from the intercellular membrane between two adjacent cells. Naringenin exhibited a marked increase in CLD-2 density between two adjacent cells. Baicalin and baicalein are candidates for drug absorption enhancers, whereas naringenin is a promising candidate for TJ barrier enhancer.

1. 緒言

タイトジャンクション (TJ) は、上皮細胞の細胞間の頂端部に形成される強固な細胞間接着装置である。TJの機能は臓器の種類により異なる。例えば水やイオン分子以外の物質を透過させない強固なバリアとして機能する一方で、特定のイオンの再吸収のみを促す選択的細胞間チャネルとして機能するなど、多彩な機能を担う。その主要成分は生体内にヒトゲノム中に27種類あると考えられている4回膜貫通タンパク質クローディング (CLD) と、同じく4回膜貫通タンパク質であるものの機能が未知のオクルーディング、その裏打ちタンパク質で分子内にPDZドメインを3個有するZO-1/2/3などである (図1A)。TJは、皮膚においては表皮・顆粒細胞層において皮膚バリア機能を担っている。これまでTJは、その生化学的実験における難溶性と電子顕微鏡により観察された強固な構造から、TJは生理的に「安定」な構造体であると信じられてきた。2007年に生理研 (岡崎) の古瀬らは、CLDを特異的にユビキチン化してエンドサイトーシスするタンパク質LNX1を発見した (図1B)。これにより、TJは、エンドサイトーシス・分解経路による分解と、新規合成・重合促進による形成の、動的平衡によって保たれているという新しいモデルが示された¹⁾。この作業仮説で特徴的なのは、TJの形成促進と、TJの内在化・減弱が、ともにTJの制御タンパク質に含ま

れるPDZドメインとCLDのC末端の相互作用によりスイッチされているという点である (図1C)。

筆者らのグループでは、2009年より、コスメトロジー研究振興財団の支援のもと、TJ抑制因子であるLNX1のPDZドメインの構造決定に成功した (論文投稿準備中)。他方、TJ形成促進因子ZO-1のPDZドメインについてもNMR解析を進め²⁾、そのPDZドメインにホスファチジルイノシトールリン酸が結合し、CLD結合と拮抗する作用を持っていることを明らかにした³⁾。更に上記PDZドメインの構造情報をインシリコ創薬手法に活用し、新規の非ペプチド性LNX1阻害薬、NPL-1010、NPL-1011、NPL-3009の化合物を同定した⁴⁾。これら阻害剤はモデル上皮細胞でTJ形成を増強した。また化合物探索の過程で、類似骨格を有する類縁化合物から、TJ形成促進因子であるZO1-PDZ1に結合し、TJを減弱させバリアを緩和する化合物も発見することができた⁵⁾。

しかし、筆者らが発見した「第一世代TJ制御低分子」はいずれも合成低分子であり、ヒト皮膚などに対する刺激性・安全性などは未確認であるため、化粧品原料として必ずしも望ましくはない。そこで本研究では、インシリコ手法の一つである化合物骨格転換 (スキュフォールドホッピング) の技術を用いて、TJを強化または減弱させる作用を持つ天然物由来あるいは食品由来の成分を新たに探索することとした。その際、下記の2つのアプローチによる研究を計画した。

【アプローチ1】

既知情報を活用した化合物探索：すでに筆者らは、天然物である真菌フジウム・コキネウム培養上清から単離された四環系トリテルペノイド抗生物質、フジジン酸 (FUS) が、複数のPDZドメインに結合することを発見



Scaffold conversion of tight junction enhancers into ready-to-use compounds based on 3D-structure of PDZ domains

Hidekazu Hiroaki

Laboratory of structural and molecular pharmacology, Graduate school of pharmaceutical sciences, Nagoya University

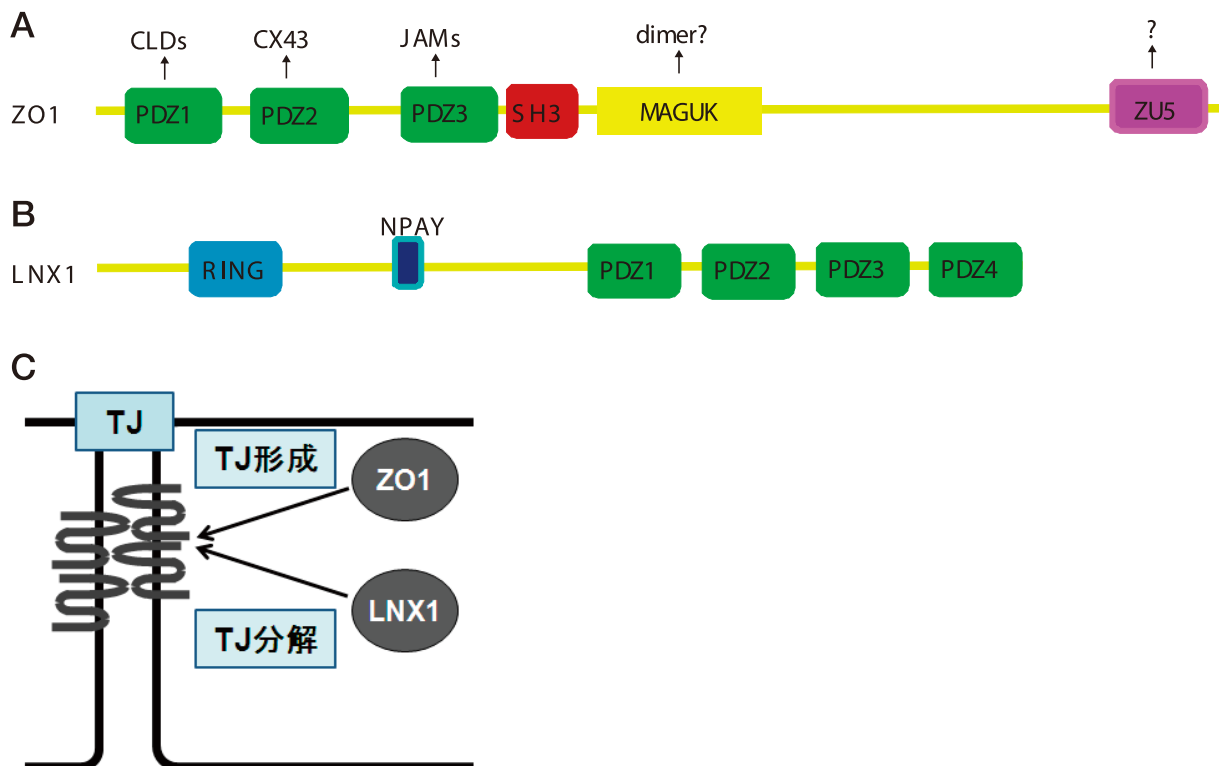


図1 TJ形成促進因子ZO1ならびにTJの抑制分解因子LNX1のドメイン構成(A, B)と、CLDのC末端相互作用の拮抗によるTJ動的制御仮説(C)

し報告している⁶⁾。そこで、米NCBIが公開している化合物DBであるPubChemを利用して、トリテルペノイド化合物のリストを作成し、FUSと似た負電荷を持つグリチルレチック酸(GA)ならびにグリチリチン(GRZ)に着目し、ZO1-PDZ1ドメインとの相互作用解析、ならびにイヌ腎臓尿細管上皮細胞MDCK II細胞に対する薬理作用を観察した。

【アプローチ2】

既報の相互作用の文献情報を活用した化合物探索：筆者らはアミノベンジルまたはアミノベンゾイル構造を分子内に有するジクロフェナクならびにフルフェナミン酸が、ZO1-PDZ1のみならず複数のPDZドメインに弱く結合することを見だしている。そこで、ZO1-PDZ1と配列が類似した他のPDZドメインに結合する天然物を文献情報より探索し、その天然物ならびに類縁化合物とZO1-PDZ1・LNX1-PDZ2の相互作用を実験により検証する、という手法で、新規相互作用の探索を行った。具体的には、PSD-95のPDZドメインと、生薬オウゴンに含有されているフラボノイドの直接相互作用が報告されていた⁷⁾。そこで、主要なオウゴン含有フラボノイドならびに、類似のフラボノイド計13種を購入し(図2)、NMRによる相互作用解析、ならびにMDCK II細胞に対する薬理作用を観察した。

2. 方法

2.1. NMR試料の調製

mZO1-PDZ1の発現は、当研究室で作成したpGEX-6P3-PRESAT/mZO1-PDZ1プラスミドを使用した。このプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)に形質転換した。LB寒天培地に生えたコロニーを数個拾い、LB培地(50 μg/mL ampicillin) 10 mLに添加し、37℃で約5時間培養した。その後、¹⁵NH₄Cl (0.5 g/L) を唯一の窒素源とするM9培地1 Lに培養液を加え、O.D.₆₀₀=0.4になるまで培養した。その後、温度を20℃に下げ再び培養した。O.D.₆₀₀=0.45の時に終濃度が0.5 mMになるようにIPTGを加えて発現誘導し、20℃で一晩培養した。

回収した菌体1 gに対して20 mLの破碎バッファー(50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.3% Triton X-100, pH7.2)を加え、懸濁し、Bioruptor (Cosmo Bio)で超音波破碎した(on time 30 sec/off time 30 sec, total 10 min × 4回)。破碎後、遠心分離し(20000 rpm, 20 min, 4℃, KUBOTA 3700)、上清を回収した。回収した上清をDEAE Sepharose Fast Flow カラム(GE Healthcare)とGST-accept カラム(nacalaitesque)に流し、GST融合ZO1-PDZ1をレジンに結合させた。カラムに150 μLのPreScission Proteaseを添加して4℃で静置し、GSTタグを切断した。切断後、バッファーで目的タンパク質を溶出した。

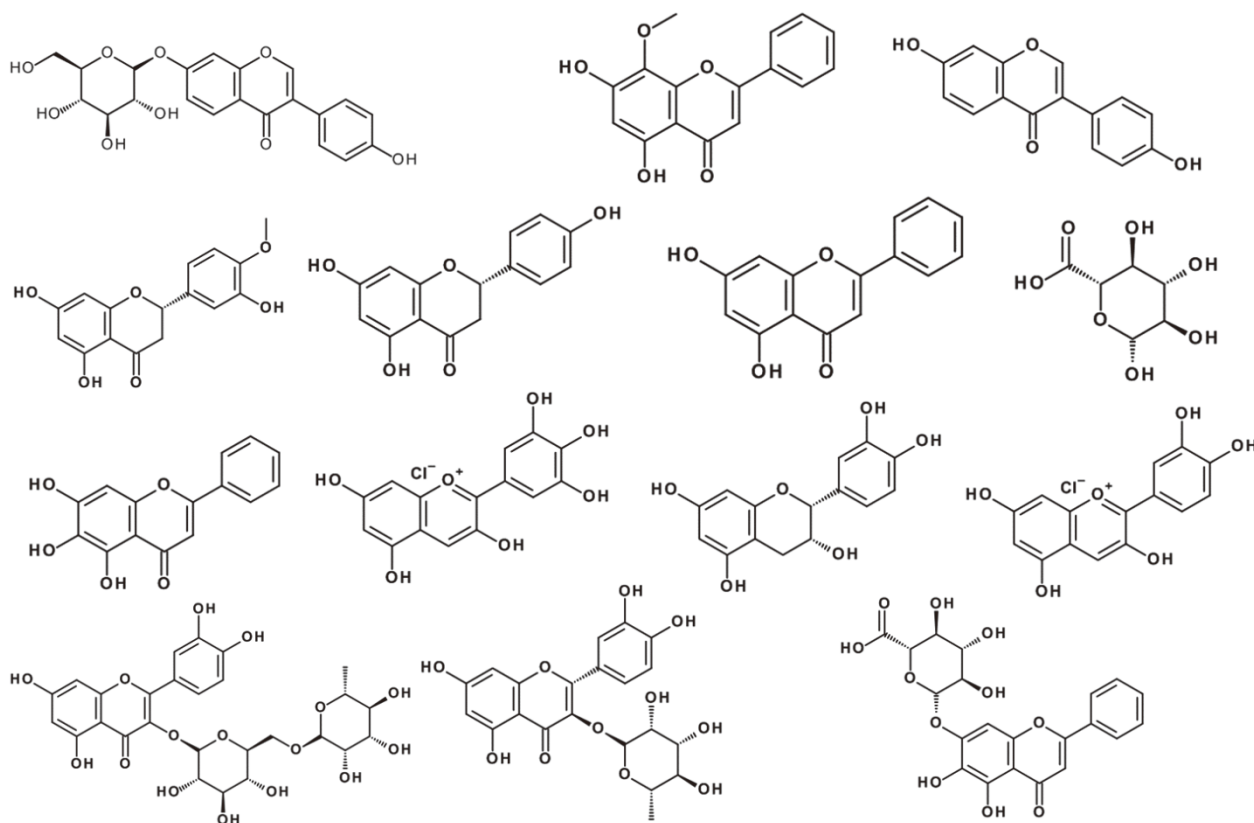


図2 探索に用いた13種のフラボノイドとグルクロン酸(コントロール)

mZO1-PDZ1は限外ろ過器により濃縮後、AKTAprime plus (GE Healthcare) を用いてゲルろ過クロマトグラフィー (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.2) により精製し、更に濃縮後、NMRバッファー (20mM MES, pH5.9) に透析し、 ^{15}N mZO1-PDZ1 サンプルとした。

2.2. NMR 滴定実験によるタンパク質・低分子化合物相互作用の観察と評価

^{15}N 標識したPDZドメイン (0.1mM) に2当量、または10当量のフラボノイド (5% d_6 -DMSO, 10% D_2O) を添加し、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、下記の計算式でシグナル移動度 $\Delta\delta$ [ppm] を算出した。各化合物ごとに閾値を決定し、閾値以上のシグナル移動度を示す残基をZO1-PDZ1 (PDB: 2RRM) の立体構造にマッピングし、PyMOLで作図した。マッピングの結果、CLD結合ポケット部位にマッピングが集中し、さらにHSQCスペクトルでシグナルの移動が見られた化合物に関して、相互作用があったと定義した。測定はBruker社AvanceIII 600 MHzデジタルNMR装置を用いた。

$$\Delta\delta = \sqrt{(\delta\text{H}_{\text{com}} - \delta\text{H}_{\text{free}})^2 + \left(\frac{\delta\text{N}_{\text{com}} - \delta\text{N}_{\text{free}}}{6}\right)^2}$$

ここで、 $\delta\text{H}_{\text{com}}$, $\delta\text{H}_{\text{free}}$, $\delta\text{N}_{\text{com}}$, $\delta\text{N}_{\text{free}}$ はそれぞれ化合物混合時 (com) または d_6 -DMSO 添加時、つまり化合物なし (free) の水素軸 (H) または窒素軸 (N) の化学シフト値を示している。

2.3. MDCK II 細胞を用いた TJ 増強(緩和) 効果の観察

6穴プレートにカバーガラスを入れ、そこに 30×10^4 個のMDCK II細胞を播種し、 37°C 、5% CO_2 環境下で24時間静置培養した。その後、D-MEM培地に100 μM 、 d_6 -DMSO濃度0.1%になるように化合物を混合し、細胞に添加した後、 37°C 、5% CO_2 環境下で48時間、また96時間インキュベートした。96時間インキュベートの場合、48時間後に化合物を同濃度になるよう混合し直し細胞に添加した。血清、抗生物質を含有していないD-MEM培地で1回洗浄後、4%-パラホルムアルデヒド溶液-リン酸緩衝液 (nacalai tesque) を添加し、室温で10分間静置した。PBSで1回洗浄後、透過溶液 (0.5% Triton X-100 in PBS) を添加し、室温で5分間静置した。その後、PBS-t (0.1% Tween20 in PBS) で3回洗浄後、ブロッキング溶液 (2% BSA in PBS-t) を加え、1時間インキュベートした。ブロッキング溶液で希釈した100 μL の一次抗体の上に固定した細胞面を下にしてカバーガラスをかぶせ、 4°C で一晩インキュベートした。翌日、カバーガラスを回収し、TBS-tで3回洗浄した。その後、ブロッキング溶液で希釈した100 μL の二次抗体の上に固定した細胞面が下になるようにカバーガラスをかぶせ、室温、遮光条件で1時間インキュベートした。TBS-tで3回洗浄後、封入剤40 μL を

スライドガラスの上に滴下し、その上にカバーガラスをかぶせ、封入した。これらのサンプルは倒立顕微鏡IX71 (OLYMPUS社) を用いて顕微鏡観察した。なお、露光時間は1/100秒で固定した。

一次抗体

- ・ Rabbit anti-Claudin-2 antibody (Sigma-Aldrich) 1/200 希釈

二次抗体

- ・ Anti-Rabbit IgG, F (ab')₂ fragment-Cy3 antibody (Sigma-Aldrich) 1/1000 希釈

3. 結果

3.1. グリシルリチンはZO1-PDZ1と強く特異的に相互作用する

NMR滴定実験を行った結果、グリシルリチン (GRZ) の添加によりZO1-PDZ1のCLD結合ポケット周辺の残基に大きな化学シフト変化を観測した (図3B)。GRZとの相互作用の着想の発端となったFUS (図3A) と化学シフト移動の度合いを、残基あたりで標準化した平均化学シフト変化と比較したところ0.026 ppm (GRZ) に対して0.004 ppmとほぼ6倍の移動度の変化であった。またこの値は、我々のグループで既に発見している合成のZO1-PDZ1阻害剤であるNPL-3013の平均化学シフト変化 (0.013 ppm) に較べても大きかった (data not shown)。別の実験によりNPL-3013とZO1-PDZ1の解離定数 (*K_d*) はおよそ60 μM程度であることがわかっている。ここから概算するとGRZとZO1-PDZ1の*K_d*は、30 μMかそれよりも小さいであろうと予想された。

GRZとZO1-PDZ1の分子認識機構をより詳細に検討するために、GRZ分子内に含まれる2つのカルボキシルグループに着目した。これはPDZドメインがもともとタンパク質のC末端カルボキシルグループを認識するドメインであり、また、ZO1-PDZ1に既に結合することがわかっているすべての分子 (ジクロフェナク・フルフェナミン酸・フシジン酸およびNPL-3013) がカルボキシル基を有しているからである。そこでGRZのアグリコンであるグリチルレチック酸 (GA) とZO1-PDZ1の相互作用を調べたところ、顕著な結合が見られなかった (図3C)。このことから、GRZとZO1-PDZ1の相互作用には、GRZ糖部グルクロン酸のカルボキシル基が重要な役割を担っている可能性が示唆された。参考までに、ドッキングソフトGOLDにより予測された、FUSとGRZのZO1-PDZ1複合体の立体構造モデルを示す (図3D, E)。GRZのテルペノイド部分がPDZドメインの溝を覆い隠すように結合しているモデルが得られた。今後、更に詳細に検証する予定である。

このようにGRZはZO1-PDZ1に結合するため、もし、細胞内でZO1-PDZ1の機能を阻害するなら、例えば

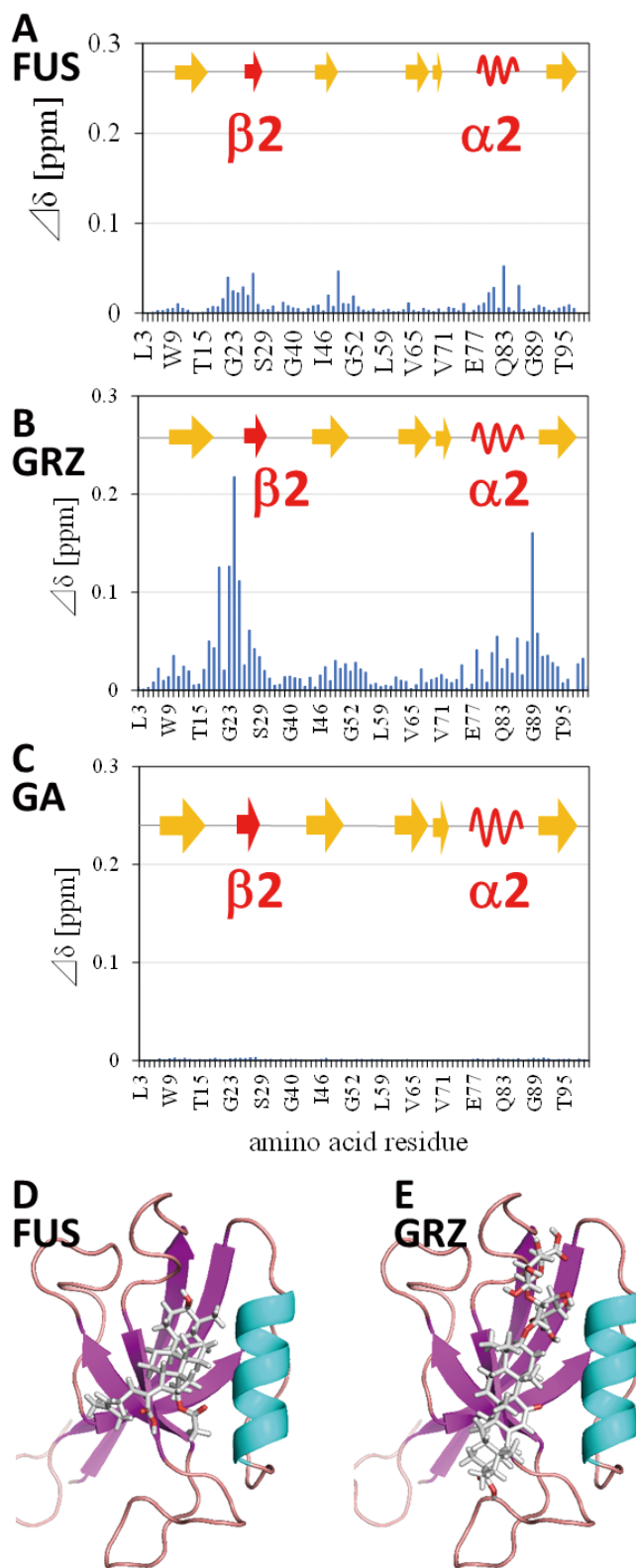


図3 テルペン類化合物とZO1-PDZ1の相互作用。A～C, NMR滴定実験、A, FUS; B, GRZ; C, GA。D, EはドッキングソフトGOLDにより予測された複合体のモデル図

MDCK II細胞を処理した際に、TJの減弱効果が見られるはずである。他方、GRZやGRZを多く含む植物であるカンゾウには、粘膜細胞の保護機能が知られており、これは

TJの機能強化を介している可能性がある。今回、MDCK II細胞のTJに対するGRZの効果を調べたところ、当初はわずかながらTJの強化が観察されたが、実験の再現性は得られなかった。他方、MDCK II細胞をGAに曝露したところ、細胞毒性が観察された。

3.2. フラボノイドからのZO1-PDZ1に相互作用する化合物の探索

NMR滴定実験により、化合物のZO1-PDZ1への相互作用能を評価した。化合物はバイカリン、バイカレインの構造に似たフラボノイドを全13種類選定した。ZO1-PDZ1溶液に対し、2当量の化合物を添加して¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定した。その結果、バイカリン、バイカレイン、ヘスペレチンを添加したときにシグナルの化学シフトが変化した。また、ヲゴニン、クリシン、(-)-エピカテキンはタンパク質溶液を添加した際に沈殿が生じた。シグナルは観測できたが、シグナルの化学シフトの変化は観測できなかった (data not shown)。D-グルクロン酸、ナリンゲニン、シアニジンクロライド、デルフィニジンクロライドでは2当量の添加でわずかなシグナル変化が観測された。そのため、化合物の濃度を10当量に変更し、¹H-¹⁵N HSQCを測定し直したところ、10当量ではシグナルの化学シフトが変化した(表1)。その他の化合物ではシグナルの化学シフト変化は観測できなかった。

ZO1-PDZ1における化合物の結合部位を決定するために、化合物を添加した際に化学シフトが変化した残基(閾値以上のシグナル移動度を示した残基)を同定し、ZO1-PDZ1の結晶構造にマッピングした。その結果、D-グル

クロン酸以外の、化学シフトが変化した化合物(バイカリン、バイカレイン、ヘスペレチン、ナリンゲニン、シアニジンクロライド、デルフィニジンクロライド、グリシルリチン)に関して、ZO1-PDZ1の $\alpha 2$ ヘリックスと $\beta 2$ シートの間にあるCLD結合ポケットに特異的に結合することが示された。以上の結果を表1にまとめる。また、後述するように、TJに影響を与えた3つのフラボノイド、バイカリン、バイカレイン、ナリンゲニンについて、NMR化学シフト変化をZO1-PDZ1ドメインの残基ごとに図示したグラフならびに立体構造に結合部位をマッピングした図を示す(図4A~4C)。

3.3. オウゴン由来フラボノイドによるTJ緩和効果

前述のNMR実験で顕著な化学シフト変化をもたらしたフラボノイドのうち、オウゴン由来フラボノイドであるバイカリン、バイカレイン、ヲゴニンについて、MDCK II細胞に曝露し、TJへの影響を調べた。具体的には、化合物(100 μ M)で48時間曝露後に細胞を固定し、CLD-2抗体を用いた免疫染色実験により、TJの変化を観察した。Controlでは細胞膜にCLD-2が局在する様子が観察されたが、バイカリン、バイカレイン曝露ではCLD-2の消失が観察された(図5A~C)。ヲゴニン曝露でもCLD-2の消失が観察されたが、同時に細胞毒性も観察され、細胞の培養ディッシュへの接着も不十分であったため、純粋なTJによる影響ではないと考えた(data not shown)。

前述のNMR滴定実験をさらに精密に行ったところ、ZO1-PDZ1とバイカリンの解離定数はおよそ1.8mMと試算された。細胞内への化合物の吸収を考えると、

表1 フラボノイドによるZO1-PDZ1/LNX1-PDZ2のNMR滴定実験のまとめ

化合物	ZO1-PDZ1			LNX1-PDZ2
	相互作用	$\Delta\delta_{ave}$ (2eq) [ppm]	$\Delta\delta_{ave}$ (10eq) [ppm]	相互作用
Baicalin	○	0.0067	n.d.	×
Baicalein	○	0.0058	n.d.	×
D-glucuronic acid	×	0.0027	0.0082	n.d.
Wogonin	*	0.0013	n.d.	n.d.
Chrysin	*	0.001	n.d.	n.d.
Rutin	×	0.0019	n.d.	n.d.
Astilbin	×	0.0016	n.d.	n.d.
Daidzin	×	0.0017	n.d.	n.d.
Daidzein	×	0.0016	n.d.	n.d.
Hesperetin	○	0.0052	n.d.	×
Naringenin	○	0.0022	0.0043	×
(-)-Epicatechin	*	0.001	n.d.	n.d.
Cyanidin chloride	○	0.0026	0.0075	×
Delphinidin chloride	○	0.0031	0.0083	×
Glycyrrhizin	○	0.026	n.d.	×
Glycyrrhetic acid	*	0.001	n.d.	n.d.

○:相互作用あり、×:相互作用なし、*:沈殿が生じた、n.d.:no data

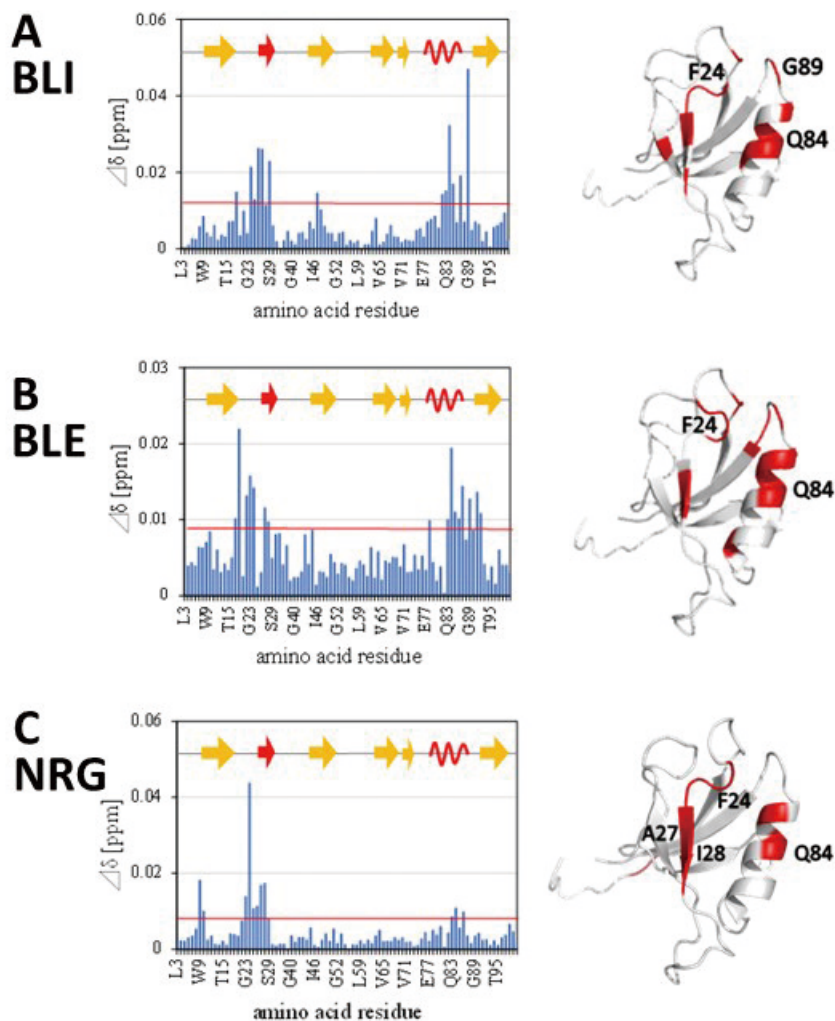


図4 フラボノイドとZO1-PDZ1の相互作用のNMR滴定実験による確認(左)と立体構造へのマッピング(右)。A, Baicalin, 2 eq., B, Baicalein, 2 eq., C, Naringenin, 10 eq.

100 μM濃度でのTJ緩和活性は、ZO1-PDZ1阻害のメカニズムでは説明しづらい。先行研究によると、岐阜薬科大学の五十里らが、MEK/ERK経路の活性化によってMDCK II細胞でCLD-2が減少したことを報告していた⁸⁾。そこで、MEK1阻害剤であるU0126を用いて、バイカリン、バイカレインによるTJ減弱化がMEK/ERK経路の活性化によるものかどうかについて検討した。その結果、U0126を用いてもCLD-2の減少は回復しなかった(図5D~I)。この結果は、バイカリン、バイカレインによるTJ緩和機構を解明する上で、重要な足掛かりとなるものと考えられる。

3.4. ナリンゲニンによるTJ強化効果の発見

グレープフルーツなどの柑橘類に含まれるナリンゲニン、ヘスペレチンがZO1-PDZ1に弱いながら結合したため、TJに対する薬理作用をより詳細に調べることにした。CLD-2抗体を用いた免疫染色実験により、TJへの影響をさらに評価した。ヘスペレチンではTJの変化は観察され

なかった一方で、ナリンゲニン曝露後48時間でCLD-2が細胞膜に集積し、細胞境界線がはっきりした様子が観察された(図5J~K)。このナリンゲニンによるTJ強化はヒト小腸細胞であるCaco-2細胞でも報告されているがMDCK II細胞での観察は今回が初めてである⁹⁾。ナリンゲニンによるTJ強化は、異なる由来の上皮細胞でも普遍的である可能性がある。今後、より化粧品への応用に近い、皮膚TJに対するバリア機能強化の可能性について調べていきたい。

4. 考察

グリチルリチンおよびいくつかのフラボノイドには、腸管などの粘膜の保護機能や、小腸バリアの強化機能などが知られている。筆者らは既に、LNx1-PDZ2の特異的阻害剤であるNPL-1011と、ZO1-PDZ1の阻害剤であるNPL-3004, NPL-3013を発見しており、これらの化合物によりMDCK II細胞のTJの強化と減弱をそれぞれ観察し

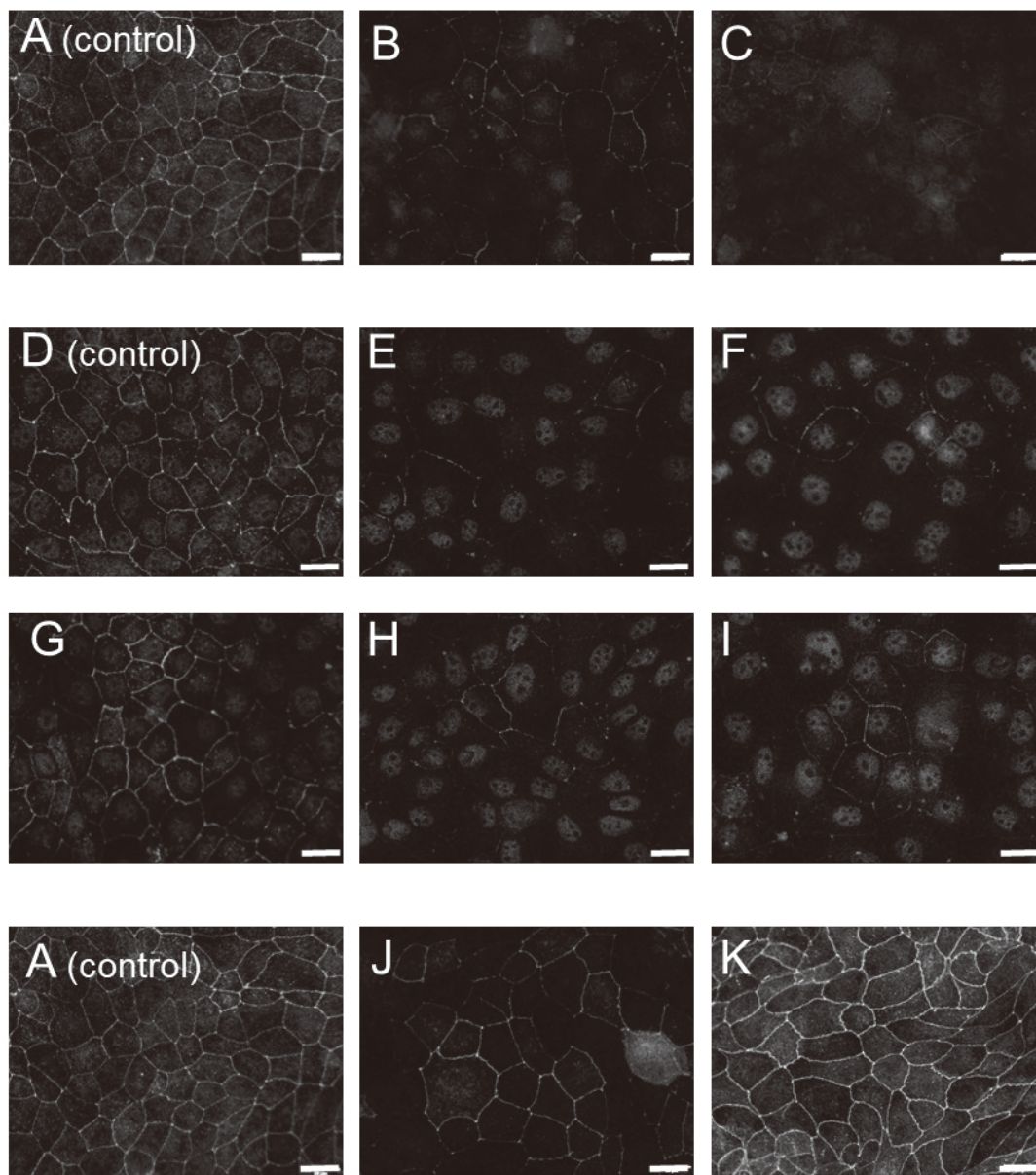


図5 フラボノイドおよび MEK/ERK 阻害剤 U0126 の MDCK II 細胞の CLD2 局在への影響。A, DMSO のみ (control); B, Baicalin (100 μ M); C, Baicalein (100 μ M); D, DMSO のみ (control); E, Baicalin (100 μ M); F, Baicalin (100 μ M) + U0126 (5 μ M); G, U0126 (5 μ M); H, Baicalein (50 μ M); I, Baicalein (50 μ M) + U0126 (5 μ M); A, DMSO のみ (control), 再掲; J, Hesperetin (100 μ M); K, Naringenin (100 μ M), scale bar = 20 μ m。

ている(論文投稿準備中)。今回、グリチルリチンおよび4種のフラボノイドとZO1-PDZ1の直接相互作用をNMRにより観察した。そのうち、細胞内でZO1-PDZ1を阻害することと矛盾しないTJ制御効果を示したのはバイカリン、バイカレインであった。

グリチルリチンによるMDCK II細胞の効果は、当初はTJ強化機能であると考えられたがその変化は小さく、実験の再現性がなかった。グリチルリチンの分子量ならびに極性官能基の数を考えると、いわゆるリピンスキー則から外れるため、細胞膜と透過して細胞内へ移行する効率は極

めて低いと考えられる。そのため、細胞外部からの投与でTJが変化しなかったと考察した。他方、グリチルレチン酸はZO1-PDZ1には相互作用しなかったため、少なくとも3位のグルクロン酸はZO1-PDZ1結合に必須と考えられる。例えばグリチルレチン酸3-O-グルコニドは、グリチルリチンよりも糖が一残基分小さいので、何らかのTJ活性を示すかもしれないと予想している。

今回TJ緩和効果を示した2種のフラボノイド・バイカリン、バイカレインについて、その薬理作用について文献検索を行ったところ、すべてがTJないし臓器のバリア

機能を強化または保護する機能であり、TJ緩和効果を記した文献はなかった。文献¹⁰⁾にはバイカリンのバリア保護機能の報告の一例をあげる。他方、ratに対する高濃度のBaicalin投与がTGFβ経路を介して、腎臓の線維化を促進するという副作用の報告があり(文献)、これはEMTを示唆するため、変性の途中でTJの減弱・分解を含んでいる可能性がある。ZO1-PDZ1との結合の弱さから考えて、バイカリン、バイカレインのTJ減弱効果はZO1-PDZ1阻害以外の何らかのシグナル伝達系を介していることは間違いなく、その候補としてTGFβ経路の活性化があげられる。

他方、今回TJ強化を示したNaringeninについては、TJバリア機能を強化するシグナル伝達系であるAMPKを活性化することを示唆する報告があり、MDCK II細胞のTJ強化においても同様の機構であると考えられる。その場合、フラボノイド分子の作用点がどこか、については、更なる研究が必要である。今後、柑橘系に含まれる他のフラボノイドとの比較や、AMPK経路の活性化の確認などを行いつつ、皮膚バリア機能強化のための有望な成分として研究を続ける予定である。筆者らが既に見だしているLNX1を阻害することによるTJ強化と、相乗効果が期待できるかどうかなど、精査したい。

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) 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.
- 2) Umetsu Y, Goda N, Taniguchi R, Satomura K, 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.
- 3) Hiroaki H*, Satomura K, Goda N, Nakakura Y, Hiranuma M, Tenno T, Hamada D, Ikegami T: Spatial Overlap of Claudin- and Phosphatidylinositol Phosphate-Binding Sites on the First PDZ Domain of Zonula Occludens 1 Studied by NMR., *Molecules*. **23**, E2465, 2018.
- 4) 特願 2016-535943 「タイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物」、発明者：廣明秀一、天野剛志、中倉由香子、野田翔太、出願日：2015/7/22 (再表)
- 5) 特願 2017-520717 「タイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物」、発明者：廣明秀一、天野剛志、野田翔太、出願日：2016/5/24 (再表)
- 6) Tenno, T., Goda, N., Umetsu, Y., Furuse, M., Ota, M., Kinoshita, K., and Hiroaki, H*. Accidental interaction between PDZ domains and diclofenac revealed by NMR-guided virtual screening. *Molecules*. **18**, 9567-9581, 2013.
- 7) Tang W, Sun X, Fang JS, Zhang M, Sucher NJ: Flavonoids from Radix Scutellariae as potential stroke therapeutic agents by targeting the second postsynaptic density 95 (PSD-95) /disc large/zonula occludens-1 (PDZ) domain of PSD-95., *Phytomedicine*. **11**, 277-284, 2004.
- 8) Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, Sugatani J*: Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *J Cell Physiol*., **226**, 2448-2456, 2011.
- 9) Noda S, Tanabe S, Suzuki T*: Naringenin enhances intestinal barrier function through the expression and cytoskeletal association of tight junction protein in Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res*. **57**, 2019-2028, 2013.
- 10) Chen J, Zhang R, Wang J, Yu P, Liu Q, Zeng D, Song H, Kuang Z: Protective effects of baicalin on LPS-induced injury in intestinal epithelial cells and intercellular tight junctions. *Can J Physiol Pharmacol*., **93**, 233-237, 2015.
- 11) Cai Y, Ma W, Xiao Y, Wu B, Li X, Liu F, Qiu J, Zhang G: High doses of baicalin induces kidney injury and fibrosis through regulating TGF-β/Smad signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. **333**, 1-9, 2017.
- 12) Liu X, Wang N, Fan S, Zheng X, Yang Y, Zhu Y, Lu Y, Chen Q, Zhou H, Zheng J: The citrus flavonoid naringenin confers protection in a murine endotoxaemia model through AMPK-ATF3-dependent negative regulation of the TLR4 signalling pathway. *Sci Rep*., **6**, 39735, 2016.