

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06078

研究課題名(和文) B細胞抑制性因子CD72による自己抗原の特異的認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of specific recognition mechanism of self-antigen by B cell inhibitory co-receptor CD72

研究代表者

沼本 修孝 (Numoto, Nobutaka)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20378582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞抑制性因子CD72と自己抗原Sm/RNPとの間の特異的な分子認識機構の構造基盤は明らかになっていない。CD72のリガンド結合ドメインの高純度大量精製法を洗練させ、自己免疫疾患を自然発症するモデルマウスのアリルである、CD72cのリガンド結合ドメインについて結晶構造を決定した。これにより、正常型CD72とCD72cとで分子表面の静電ポテンシャルが大きく異なっており、Sm/RNPへの結合親和性の相違についての分子機構を解明した。また、CD72とSm/RNPとの複合体について、クライオ電子顕微鏡による構造解析を試み、予備的な試料観察から今後の立体構造解析が十分に期待される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD72が自己抗原であるSm/RNPを認識して結合し、自己抗体の産生を抑制する機構の解明は、疾患に関わる自己抗原への応答を特異的に阻害するしくみの存在をはじめて明らかにしたものである。CD72の機能を利用することで、自己免疫疾患に関わる核酸に対する免疫応答を選択的に制御するような、新しい概念に基づく治療法の確立につながる可能性が考えられる。CD72の機能を制御する分子の合理的な設計が可能となるよう、その構造生物学的基盤を提供する。

研究成果の概要(英文)：The structural basis of the specific molecular recognition mechanism between the B cell inhibitory co-receptor CD72 and the self-antigen Sm/RNP has not been clarified. The purification method of the ligand binding domain of CD72 was improved to obtain a large amount of high-purity sample sufficient for crystallization. The crystal structure of the ligand-binding domain of CD72c, which is an allele associated with an autoimmune disease in mice, has been determined. The structure reveals that the electrostatic potential on the molecular surface was significantly different between normal CD72 and CD72c, and the negative charge patch of CD72c will cause the weaker binding affinity to Sm/RNP than that of normal CD72. In addition, structural analysis of the complex of CD72 and Sm/RNP by cryoEM was attempted. The preliminary results indicated that the samples are suitable for further structural determination.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 自己免疫疾患 核酸 B細胞 クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、体内で抗体産生を担う B 細胞が過剰に応答し、自己抗体を産生することが原因のひとつである。代表的な自己免疫疾患の 1 つ全身性エリテマトーデス (SLE) の発症には核内自己抗原 Sm/RNP が重要な役割をはたしていることが知られており、B 細胞上に発現している抑制性の補助因子 CD72 が Sm/RNP を特異的に認識して結合することで免疫細胞の活性化および自己抗体産生を抑制し、SLE 発症を防止していることが明らかにされていた。また CD72 のリガンド結合ドメイン (CTL D : C-type lectin like domain) の結晶構造も決定されており、分子表面に存在する正電荷に富んだ領域が、Sm/RNP に含まれる核酸の負電荷と相補的であることからこの領域で結合することが強く示唆されていた。

しかしながら、CD72 と Sm/RNP との複合体の構造情報は報告されておらず、その分子認識機構の詳細は不明のままであった。上記のような静電的な相互作用のみからでは、CD72-CTL D が Sm/RNP に特異的に結合し、単体の ssDNA とはほとんど結合しないという知見を説明できない。すなわち、Sm/RNP に含まれるタンパク質部分の結合に対する寄与も重要であると考えられ、これらを解明するためには CD72-CTL D と Sm/RNP の複合体での構造決定が不可欠と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、CD72-CTL D と Sm/RNP との間の特異的な分子認識機構を、その複合体の立体構造解明することで明らかにすることを目的とした。これにより、自己免疫疾患に関わる核酸に対する免疫応答を選択的に制御するような、新しい概念に基づく治療法の確立にむけ、CD72 の機能を制御する分子の合理的な設計が可能となるよう、その構造生物学的基盤を提供することを目指した。

また、自己免疫を自然発症するモデルマウスより得られたアレルである、CD72c は Sm/RNP との結合親和性が低下している。その分子機構を明らかにするため、CD72c-CTL D の結晶構造を決定することも目的とした。

3. 研究の方法

1) CD72-CTL D の高純度試料調製方法の高効率化と Sm/RNP 試料調製

CD72-CTL D の試料調製方法については、われわれのこれまでの研究から確立されていたものの、結晶化に必要な大量の試料を、一度に効率よく調製することは難しかった。CD72-CTL D は大腸菌発現系を用いて不溶性画分に大量発現させた後、on column refolding 法により正しい立体構造に巻き戻してから精製する必要があり、この refolding の過程を効率化した。

Sm/RNP については、市販の試料の精製度をさらに向上させた。

2) CD72c-CTL D の X 線結晶構造解析

マウス由来 CD72c-CTL D を大量に調製し、結晶化を行った。得られた結晶から、SPring-8 の高輝度マイクロフォーカス X 線ビームが利用可能な BL32XU にて自動データ収集システム ZOO を用いて回折データを収集し、プログラム KAMO により多数の small wedge データから完全データを得た。構造決定は、既報のもの (CD72a-CTL D) を使用した分子置換法により行った。

3) クライオ電子顕微鏡による CD72-CTL D と Sm/RNP の複合体の構造解析

個別に精製した CD72-CTL D と Sm/RNP を用いて複合体を形成させ、負染色による電子顕微鏡観察および、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。

4. 研究成果

1) CD72-CTL D の高純度試料調製方法の高効率化と Sm/RNP 試料調製

CD72-CTL D は大腸菌発現系を用いて大量発現させた後、不溶性画分として回収し、Ni アフィニティークロマトグラフィー用レジンをを用いた on column refolding 法により正しい構造をもった試料として回収する。このために使用する Ni アフィニティークロマトグラフィー用レジンを数種類検討したところ、これまでに使用していたレジンよりも高効率に refold が可能なレジンを見いだした。これにより、従来よりも大量の精製試料をより簡便かつ高効率に調製することが可能になった。特にこれまで必要な収量が得られずに結晶化実験が困難であった CD72c-CTL D の大量精製が可能となり、X 線結晶構造解析を行うことができた。

市販のウシ由来 Sm/RNP 試料の純度、均一性などを SDS-PAGE、ゲル濾過クロマトグラフィー、および動的光散乱などで検討した結果、ゲル濾過精製後の試料は構造解析に十分使用可能な水準であった。

2) CD72c-CTLD の X 線結晶構造解析

改良した精製法により結晶化に十分な量を得た CD72c-CTLD について、結晶化条件の初期スクリーニングを行ったところ、非常に多数の微小な結晶からなる大型のクラスター状結晶が得られた。結晶化条件の最適化を行ったがクラスター化を抑えて完全な単結晶を得ることはできなかった。しかしながら、大型放射光施設 SPring-8 の最新のマイクロビーム X 線（ビームサイズ $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ）を用いることで、クラスター結晶の微小な領域からの X 線回折は、単結晶由来の回折点として分離して解析することが可能であることがわかった。近年整備された自動測定技術とあわせ、14 個のクラスター結晶から 1,400 の small wedge（微小領域）回折データを収集し、これをプログラム KAMO による格子定数による階層的クラスタリングによって取捨選択して merge することで、2.5 Å 分解能のデータを得ることができた（図 1）。この回折データから、分子置換法により構造決定することに成功した（論文準備中）。

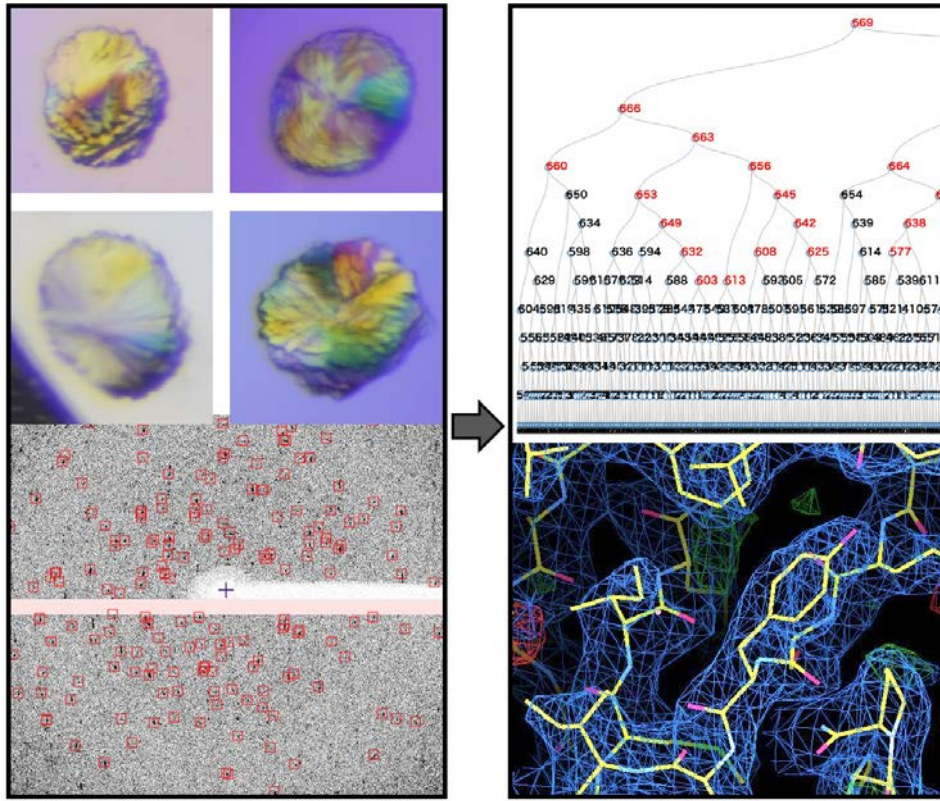


図 1 CD72c-CTLD のクラスター結晶（左上）と回折像（左下）。微小領域からの回折データを大量に収集して階層的クラスタリングにより分類し（右上）、構造決定に成功した（右下）。

正常型の CD72-CTLD では、リガンド結合部位と考えられる部位において、核酸の負電荷に相補的になるように分子表面に正電荷の領域が存在する。これに対し、得られた CD72c-CTLD の結晶構造から、対応する部位がアミノ酸残基の変異により負電荷を示すことがわかった（図 2）。これにより、CD72c-CTLD の Sm/RNP との結合親和性が低下していることについて、Sm/RNP の核酸の負電荷と静電的な反発が生じているためであることが強く示唆された。

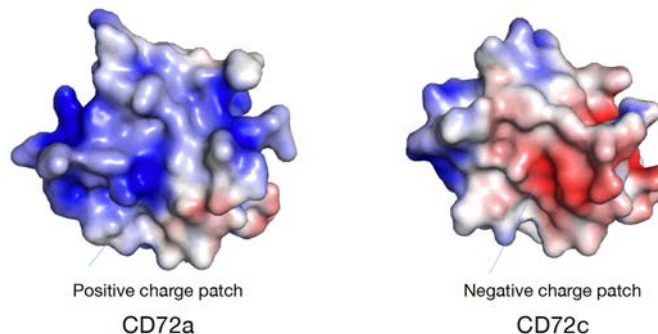


図 2 正常型 CD72 (CD72a) と CD72c のリガンド結合ドメインの分子表面静電ポテンシャル図。

3) クライオ電子顕微鏡による CD72-CTLD と Sm/RNP の複合体の構造解析

CD72-CTLD の分子量は約 15 kDa と小さいが、Sm/RNP は約 220 kDa と比較的大きな分子量である。X 線結晶構造解析においては数百 kDa 程度の複合体の結晶化は容易な部類ではないが、近年急速に発展しているクライオ電子顕微鏡による単粒子解析法では結晶化の必要がなく、また 200 kDa を超える分子量は解析に十分な大きさである。まず得られた Sm/RNP 試料が構造解析可能な純度であるかどうかを確認するため、Sm/RNP 単独で負染色での電子顕微鏡観察および、クライオ電子顕微鏡による観察を行った。その結果、良好な二次元平均像 (図 3) が得られ、CD72-CTLD との複合体での構造解析が十分可能であることが強く示唆された。

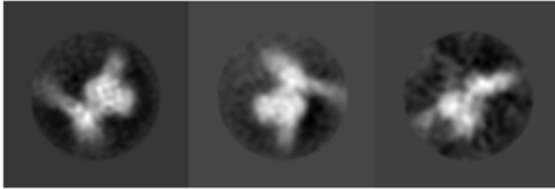


図 3 Sm/RNP の cryoEM での二次元平均像

CD72-CTLD と Sm/RNP とを混合し、複合体を形成させた試料の予備的な観察では、一部の試料で凝集が生じていることが疑われたため、複合体形成の条件を検討し、負染色での電子顕微鏡観察で均一な粒子像を確認した。今後のクライオ電子顕微鏡による複合体構造解析が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沼本修孝, 赤津ちづる, 品川健朗, 鏑田武志, 伊藤暢聡
2. 発表標題 B細胞抑制性因子CD72とSm/RNPの複合体形成様式の推測
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼本修孝, 鏑田武志, 伊藤暢聡
2. 発表標題 B細胞抑制性因子の自己免疫疾患感受性アリルCD72cの結晶構造解析
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沼本修孝, 平田邦生, 鏑田武志, 伊藤暢聡
2. 発表標題 B細胞抑制因子CD72のクラスター結晶からの構造決定
3. 学会等名 日本結晶学会令和2年度年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子構造情報学分野研究概要
<http://www.tmd.ac.jp/mri/SBS/sb/research.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	伊藤 暢聡 (Ito Nobutoshi) (40361703)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	
連携研究者	鏑田 武志 (Tsubata Takeshi) (80197756)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------