

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25330349

研究課題名(和文) TCR-pMHC結合エネルギーの精密計算に基づく胸腺内T細胞選択の原理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of selection mechanism in thymus based on precise estimation of TCR-pMHC binding energy

研究代表者

鶴井 博理 (Tsurui, Hiromichi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40217386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：共通のpMHCに対し特異性の高低の差のあるTCRとの共結晶構造(3C5Z, 3C60)を用いて、MM/PB(GB)SAの計算条件を検討した。MM/PBSA, MM/GBSAいずれにおいても、計算値の変動は30kCal/mol前後におよんだ。残基間相互作用の精密解析により、TCR-pMHCの認識の特異・非特異性を理解するよう方針変更した。共通のpMHCを含むTCRとの共結晶5つについて、被提示ペプチドのP2, P3, P5, P8の部位に7, 8, 2, 3種の変異を入れた構造を生成、構造を最適化の後FMO計算を行った。PIEDAにより残基間の相互作用の精密な解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：MM/PB(GB)SA calculation conditions were searched using co-crystal structures including common pMHC, and TCRs having different binding spectra, 3C5Z (narrow) and 3C60 (broad). Calculated binding free-energy fluctuated within about 30 kcal/mol, too large to the purpose. I exchanged the strategy to understand binding specificity based on precise residue-residue interaction, which are provide by fragment molecular orbital (FMO) method. Five co-crystal structures, 3C5Z, 3C60, 3C6L, 4P5T and 3RDT, having common pMHC and TCRs of different binding spectra were selected. Mutations in the sequence of presented peptide at position 2, 3, 5, 8 with 7, 8, 2 and 3 kinds, respectively, were generated and optimized. FMO calculations were performed for the structures and Pair Interaction Energy Decomposition Analysis (PIEDA) were done. Detailed analyses of interaction energies between residues of TCR and pMHC were enabled.

研究分野：情報学

 キーワード：T細胞受容体 分子動力学 TCR-pMHC 結合エネルギー MM/PB(GB)SA フラグメント分子軌道法 GPGPU
PIEDA

1. 研究開始当初の背景

T 細胞受容体と、被提示ペプチド + MHC (以下 TCR-pMHC) の相互作用は T 細胞の細胞運命を決定するにも拘わらず、その結合に関する知見はかなり限られている。一般的に TCR-pMHC 相互作用は被提示ペプチドに特異的と思われるが、結合スペクトラム、あるいは結合プロファイルとも言うべき結合特性を実験的に決定する場合は膨大な手間がかかり実質不可能である。In silico で結合の自由エネルギーを算出する試みは、Michielin & Karplus, Flower らにより熱力学的積分法や自由エネルギー摂動法により試みられているが、比較的弱い相互作用に限られ、また、精密に求めるには膨大な計算量を必要とするため、結合プロファイルを求めることは非現実的であるように思われた。また、Kosmrlj, Chakraborty らのグループは TCR-pMHC を string model と Miyazawa-Jernigan 行列により評価する方法を提案し、それなりに注目を集めたが、モデルが単純化されすぎており、実際の計算に耐えるものかは疑問である。一方、水分子を連続体近似し、非静電的相互作用を accessible surface area で評価、分子動力学により結合状態と乖離状態の多数の構造を分子動力学(MD)によりサンプリングし、各構造での乖離 - 結合状態のエネルギー差をもとめ平均化することにより結合自由エネルギーを求める手法 (MM/PB(GB)SA) は現実的な計算量 (数 10 nSec) で実験値と比較的良好な相関を示す計算手法、という認識が受け入れられていた。計算精度の妥当性は対象とする系にも依存するため、MM/PB(GB)SA による計算について多くの報告がなされていたが、あまり明瞭な結論は出ていなかったというのが実情である。一方、多くのコアを持つ画像ボードを汎用の計算に用いて効率的に数値計算を進める手法が、ハード(GPGPU と称される)、ソフトの両面で急速に進展しつつあった。分子動力学、量子力学等においても代表的なプログラムが、GPGPU への対応を進めており、計算の効率化が図られていた。研究代表者は、長年にわたり TCR-pMHC 相互作用の計算に従事していたため、GPGPU を用いて MD 計算を効率的に行い、MM/PB(GB)SA により現実的な計算時間で TCR-pMHC の結合プロファイルを計算し得る、と予想し、また、予備的な計算でも良好な結果を示していたので、遺伝子配列と homology modeling に基づく TCR を大量に生成し、それぞれの TCR に関して結合プロファイルを計算し、固体内での TCR-repertoire の稠密性を評価することを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GPGPU を実装した高速計算機を用い、MM-PB(GB)SA により TCR-pMHC 間の結合自由エネルギーを求

める手法を確立し、結晶構造の得られているいくつかの TCR-pMHC complex の提示ペプチドに系統的なミューテーションを入れた多くの complex 構造を生成・計算することによりその TCR の結合プロファイルを求め、更にある程度ランダムに TCR, ペプチドの適切な組み合わせの構造を生成し、その complex に関して計算することにより、胸腺における T 細胞選択と自己寛容、外部エペトープへの応答の関係を明らかにすることである。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、

(1) TCR-pMHC complex の MD を行い、MM-PB(GB)SA により結合自由エネルギーを計算するために必要な諸パラメーターを決定する、

(2) 結合特性に関してある程度知見の得られている TCR-pMHC の組み合わせ、例えば特異性の高い認識をする TCR と pMHC との組み合わせと、比較的広い認識をする TCR-pMHC の組み合わせそれぞれに関して、系統的に配列に変異を加えたペプチドとの結合エネルギーを計算し、結合プロファイルを求める、

(3) マウスゲノムから TCR 遺伝子を構成される機序に基づき TCR 遺伝子を構成し、その配列に基づき、ホモロジーモデリングにより 3 次元構造を決定する。この手法の確立により、遺伝子情報に基づき、結晶構造解析の有無に拘わらずかなり広範な TCR-pMHC に対して MD、MM-PB(GB)SA を行うことが出来るようになる、

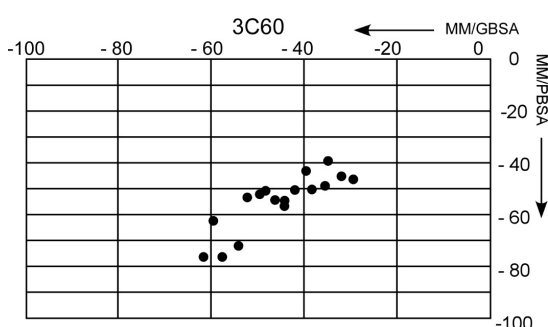
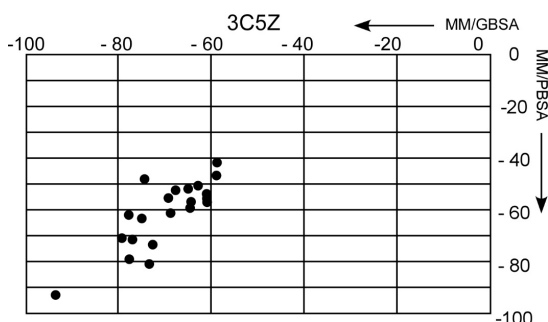
(4) (3) により構成された種々の TCR-pMHC complex に対し、MD、MM-PB(GB)SA を行い、胸腺に於いて選択されるクローンの結合特性、特に自己ペプチド及び外来 microbe のエペトープに関して比較・検討を行う、というアプローチをとる。

4. 研究成果

(1) MM/PB(GB)SA 計算について

(i) 計算条件の設定 既設の数台の Workstation に加え、新たに Supermicro 社製 dual CPU の Workstation を購入、nVidia 製の GPGPU, Tesla c2075, K20 等を装着、Amber V.12 もしくは V.14 を用い主として定温、定圧、Langevin 過程を用いて計算を行った。計算対象として、TCR-pMHC の結合プロファイルを調べる目的で、共通の pMHC を認識する、特異的な TCR を含む PDBID 3C5Z 及び高度に交差反応性の認識をする TCR を含む 3C60 を、TCR の定常ドメインを除いたもの、及び複合体全体を含むものに (溶媒を含み、原子数それぞれ約 140000、180000) を用いた。計算時間は、数 10 ~ 200 nSec を行った。140000 原子の場合、Tesla C2075 1 枚を併用する計算で 10 nSec/day の計算効率であった。これらの TCR-pMHC に関しては、Huseby らにより構造、被提示ペプチド上の変位の影響がかなり

詳細に調べられている。下に、MD により MM/PB(GB)SA により結合自由エネルギーを計算した結果をしめす。各ポイントは 10 nSec の MD によるものである。横軸に MM/GBSA, 縦軸に MM/PBSA の結果をしめしてある。



(単位は kCal/mol)

GBSA と PBSA とはかなり良く相関していることは明らかである。しかし、いずれも値の変動は大きく、20 回の run で 30 kCal 以上変動している。同一の構造に対して軌跡ごとにこれだけ変動しては、被提示ペプチドの配列依存性を調べることは困難である。

(ii) MMPBSA の問題点 用いられている相互作用の近似がかなり粗い。分子内ポテンシャルはまだしも、受容体 (蛋白質) - リガンド (以下 R-L) 間静電相互作用、ファン デアールズ 相互作用、溶媒の影響 (極性及び非極性の) エントロピーの評価法に問題がある。我々の計算結果は、軌跡ごとの変動を示しているが、これは、サンプリングされた構造の差がエネルギー評価の変動を生んだと見なしえる。MM/PB(GB)SA は元来、R-L の結合エネルギーを評価する目的で開発された手法であり、対象によってはかなり良い成績が報告されている。これらの系では、リガンドが小分子であり、リガンドと相互作用する受容体の部分もかなり限局されるため、構造の変動の影響が大きく現れないと思われる。我々の対象としている系は、被提示ペプチドのみならず、MHC 分子の、2つのヘリックスを TCR の CDR 1, CDR 2, CDR 1, CDR 2 分子が覆い、さらに、TCR の定常ドメイン、MHC 分子 2, 2 ドメインは MD 時かなり大きく動くことが VMD などのビューアで見取れる。これらの動きも遠距離ポテンシ

ヤルを介して当然結合エネルギーに影響を与える。通常、R-L 結合部位に存在する水分子は、水素結合、疎水性相互作用を介して結合エネルギーに大きな影響を与えることが予想される。MM/PB(GB)SA では、これらの水分子の影響を単純に一樣な誘電体 + 表面積の効果として扱うことになるが、この近似は大きな誤差を生むことが予想される。特に、TCR-pMHC の系では、結合面にかなりの水分子を含み、その水分子には、バルクの水の様にほぼ拘束がなく動き回るものがある一方、特定の部位にほとんど固定された状態のものもある。これらの水分子をどの様に扱うかにより、計算値に大きな差が生じると思われる。対象とした系は 140000 原子から 180000 原子で MD における相空間は膨大な次元となり、その中で 10 nSec から 100 nSec という軌跡 (この手法では短い方では無い) はおそらく全く不十分なのであろう。では、妥当なサンプリングとは何か、という問いは、MD から統計力学的量を求める場合に最も本質的でありながら尤もらしい答えは全く得られていない。マルチカノニカル サンプリング、レプリカ交換法といった、より広域の状態までサンプリングする手法は提案されても、これで十分条件は示されていない。

上記理由により TCR-pMHC の結合自由エネルギーを求め、結合プロファイルを描くことが差し当たって困難となったため、研究の strategy を変更することとした。すなわち、分子認識に關与する相互作用を精密に解析することにより、TCR-pMHC の認識の特異・非特異性を理解しようという方針である。

(2) FMO 計算

(i) Fragment molecular orbital (FMO) 分子を適当な断片に分け (タンパクなら 1 残基 ~ 2 残基、核酸なら 1 塩基、というように) 各残基内で、他の残基は時間平均した固定された外場として扱い、自己無同着になるまでその断片の分子軌道を計算、全ての断片について計算後、再び新たな断片ごとの電子軌道に関して (外場としての効果を更新して) 自己無同着となるまで計算する。これを収束するまで繰り返すことにより分子全体に関しての電子軌道を得る。リガンドとの結合の精密な評価に用いられ、創薬においても重要な手法となってきた。巨大タンパク質間の相互作用に適用するにはいくつかの問題があるが、前述の理由による方針変更の選択枝の一つとして適用を試みた。京に移植された ABINIT-MP で、MP-2, 631-Gd のレベルで計算を行い、各残基間の相互作用エネルギーを求めた。さらに、PIEDA 計算 (相互作用を静電項、交換反発項、電荷移動項、分散項に分離) を行い、各残基間の相互作用を計算した。

(ii) 計算対象 共通の pMHC を認識する、結合特性のことなる TCR との共結晶 PDBID: 3C5Z, 3C6L, 3C60, 3RDT, 4P5T の TCR バリアブル ドメイン、MHC の 1, 1 各ド

メイン,被提示ペプチドの計約 400 残基に、被提示ペプチドにそれぞれの TCR で応答に差の以下の変位を入れた構造

P2: E, F, G, I, L, Y, W, Q(WT)

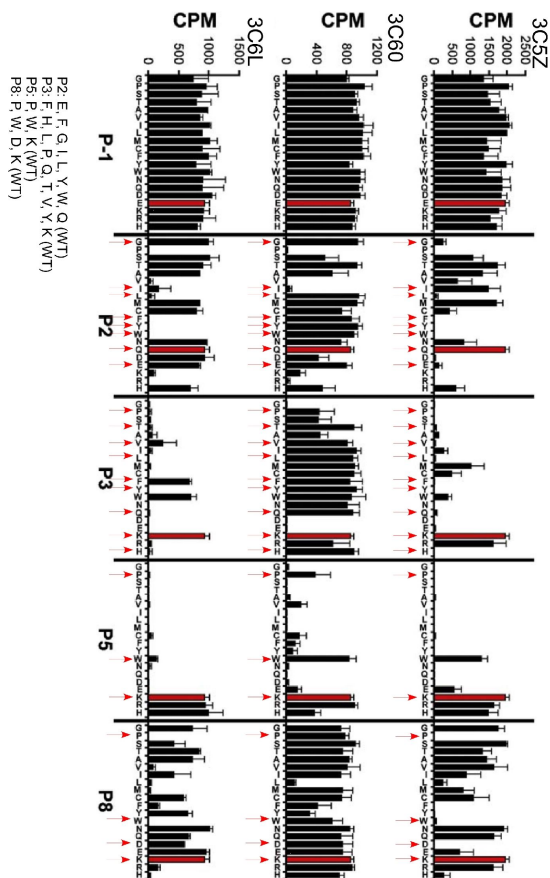
P3: F, H, L, P, Q, T, V, Y, K(WT)

P5: P, W, K(WT)

P8: P, W, D, K(WT)

(P2, P3, P5, P8 は被提示ペプチド上、TCR に向かって突き出た残基である)

の、計 105 (21 X 5) 構造



(From Huseby et al. Cell 112:247 (2008)) 被提示ペプチド上の変異が T 細胞応答に与える影響を示した図。赤矢印の変位を入れた構造を生成した。

(ii) 構造の標準化の必要性 変位を導入しているためそのままでは構造に大きな歪みを生じており、不自然な構造をとっている。FMO 計算は極めて構造に鋭敏であり、それぞれの構造間で、変位の比較を行うためにも構造の標準化が必要であり、ポテンシャルエネルギーが最低の状態が尤も自然であるが、ポテンシャル空間も極めて高次元であるため、最安定構造を決定することは必ずしも簡単では無い。比較容易に計算しえる最安定構造の決定法として、レプリカ交換法 -> 擬似焼き鈍し法 (simulated annealing) で得られた構造をいくつか比較し一致すれば妥当と見なす、という方針が考えられ、報告者が利用できる計算環境では現実的と思われた。これだけ大きな系でレプリカ交換法を行うのはかなりの計算時間を要することが予

想され、また、各レプリカ間の温度差のとり方も検討を要する事項である。実際に予備的計算を行った結果、16レプリカを温度差 1 ~ 1.5 で並走させることが、変性を来さない温度範囲 (1.5 ~ 2.2.5) で十分な交換効率を得られ、それなりにポテンシャル障壁を越えて広範な相空間を探索しているのでは、と考えている。しかし、蛋白質のポテンシャルのエネルギーのような超高次元空間のエネルギー ランドスケープに関しての知見はほとんど無く、合理的根拠を持ったレプリカ交換法の探索条件の設定は一般的にはまだほとんど手つかずの状態である。今回は、計算構造の数の膨大なこと (105 構造) レプリカ交換法による MD の計算コストがかなり大きいことから、通常用いられているポテンシャルエネルギーの最小化 (最急降下法 + 共役勾配法) により構造を決定した。

(iv) 計算結果

P2 変位に関して

CDR1 : 3C6O 3つの近い残基 (Gly, Tyr, Pro) との相互作用は絶対値が小さく (最も大きい Tyr と Glu 変異でさえ 3kCal 以下。他の相互作用は 1 kCal 以下) ほとんど変化なし。3C5Z, 3C6L, 4P5T: 変異により大きく変動する。3C5Z においては変異間で差がみられ Tyr と Glu 変異は -20kCal 程度、Trp, Tyr 変異も 2kCal 程度である。3C6L においては Asp(26), Asp(30) の変異に対する変動が大きく、特に Glu 変異に対して 30kCal 以上の静電的エネルギーを示す。Thr(28), Phe(29) は、多くの変異に対し電荷移動、分散、交換反発による相互作用を 1 ~ 2 kcal の程度示す。4P5T の相互作用もかなり 3C6L と近いが、Asp(30) に関して、Phe 変異に対して電荷移動のエネルギーを示さず、Tyr 変異に対して 3C6L が反発のエネルギーを示したのに対し、引力 (負) のエネルギーを示している。このような差は第一原理 (ab-initio) 計算で初めて明らかとなることである。

CDR3 : 3C6O 3つの近い残基 (Ser(94), Gly(95), Thr(96)) との相互作用は絶対値が小さく (最も大きい Thr と Glu 変異でさえ 3kCal 以下。他の相互作用は 1 kCal 以下) ほとんど変化なし。3C5Z, 3C6L, 4P5T: CDR 上のある残基は、変異により大きく変動する。3C5Z においては Asn(96) において変異間で差がみられ多くの変異に対して電荷移動と分散相互作用による負のエネルギーが -6kCal ~ -8kCal である。興味深いことは、Glu 変異に対し、静電相互作用よりも分散によるエネルギー寄与の方が大きいことである。3C6L においては Asp(94) の挙動であるが、Phe, Tyr 変異に対し電荷移動、分散相互作用による負エネルギーを示すが、全ての変異に対して 5kcal 以上の反発の静電エネルギーをしめし

ていることであり、特に Glu 変異に対して 40kcal 以上のエネルギーを示す。一方 Arg(96)の変異に対する変動は全てが静電エネルギーであるが、Glu 変異(約 26kcal)以外は WT より小さく 1kcal ほどである。4P5T の Arg(94)の相互作用はかなり 3C6L の Arg(96)と近いが、-6kcal 程度とより強い静電相互作用を示す。Asp(95)に関しては、Phe, Tyr 変異に対して電荷移動、分散のエネルギーを示すが、静電エネルギーは Tyr 変異で-1.6kcal をとる以外は中性残基では 3~5kcal をとり、Glu 変位では 38kcal ほどである。に対して 3C6L が反発のエネルギーを示したのに対し、引力(負)のエネルギーを示している。このような差は第一原理(ab-initio)計算で初めて明らかとなることである。

P3 変位に関して

CDR1 は、P3 変位に関してあまり差を示さず、ただ、3C6L Asp(26), Asp(30), 4P5T asp(30)は-2~-6kcal ほどの静電エネルギーを示す。しかし、WT の Lys が-30kcal 程の値を示すこと考慮すると、3C6L, 4P5T はかなりエネルギー的に不安定化するといつてよい。CDR3 は、3C60 では Arg(99)以外は中性残基ばかりで殆ど変異に関して差を示さない一方、3C5Z はやはり Lys(99)以外は中性残基であるが、Asn(96)においては、多くの変異い大して負の静電相互作用(-2~-4kcal)のみならず、-1kcal 程度の電荷移動および-2 kcal 程度の分散エネルギーを示す。が、WT との間に示すエネルギー 26kcal と比べると不安定化するといえる。Thr(97)の変動は変異の種類により変化に富む。陽性電荷を持つ His の変異および WT では、負の静電エネルギーが大きい、電荷移動、分散エネルギーも-1~-2kcal のエネルギーを示す。

3C6L においては、Asp(94), Asn(95), Arg(96)と並び、Asp は WT で-32kcal の大きな静電エネルギーを示し、他の変位では、-3 から -11kcal の静電エネルギーを示す。また、Tyr 変位に対して、-1 -2kcal の電荷移動、分散エネルギーを示す。他の変位に対してはこの両エネルギーは殆ど無い。Asn は中性であるが、WT、His に対して各々 -25kcal、-2.3kcal という静電エネルギーを示す。Tyr 変位に対して 6kcal という正の静電エネルギーを示す。他の変位に対しては概ね 1kcal 程度の変動である。Arg に関しては WT に対し、33kcal の静電エネルギーを示し、他の変異に関しては 1.5~2kcal 程度の静電エネルギーを示す。4P5T においては、Arg(94), Asp(95)は概ね 3C6L の同じ残基と近い振り舞いを示す。

P5 変異に関して

CDR1 は、3C5Z においては Asp(28), Tyr(29)

いずれも変異が 30kcal, 15kcal 程度の不安定化を招くのに比し、3C60, 3C6L, 4P5T においては 1kcal 程度の安定化をもたらす。

CDR3 は、Asp(93)はいずれの TCR にも共通であり、WT からの変異に対し、30kcal 程度の不安定化をもたらす。3C60, 4P5T の Phe(94)、3C6L の Ala(94)は WT、変異体いずれに対しても 1kcal 以下の弱い相互作用しか示さない。3C5Z の Ser(94)は-8kcal ほどの値を示す。Trp(95)も 3C60, 3C6L, 4P5T に共通であるが、変異に対し、各々、13kcal、6kcal、10kcal、(Pro)程、の不安定化、3C6L, 5P5T の Trp 変異に対して各々、0kcal, 9kcal の不安定化をもたらす。

P8 変異に関して

CDR1 は、3C60 においては、His(27), Asn(28), Tyr(29)において、変異に対する変動が比較的小いのに比し(9kcal から -4kcal)、3C5Z の His(27), Asp(28)は変異が 30kcal, 15kcal 程度の不安定化を招く。Tyr(29)に関しては 10kcal の安定化をもたらす。3C6L においては、Asp 変異は His(27), Asn(28), において 25kcal、5kcal 程の安定化をもたらすが、他の変異に関しては変動は小さい。4P5T においては、His(27)において、Asp 変異は何故か 16kcal の不安定化をもたらす。また、Asn(28)においても、Asp 変異は 12kcal 程度の不安定化をもたらす。3C6L において見られた、電荷移動、分散エネルギーによる安定化は、4P5T では殆ど見られない。

CDR3 は Asp(93)は 3C60, 3C5Z, 3C6L, 4P5T に関して共通であり、変異に対する変動も殆ど同じである。また、3C60, 4P5T に共通な Asp(97)においても殆ど同じである。3C60, 3C5Z, 3C6L, 4P5T いずれにおいても、94 番残基、95 番残基において、変異は安定化をもたらすが、そその範囲は 3C60 においては -27kcal, -11kcal であるのに対し、3C5Z においては -12kcal, -5.7kcal, 3C6L においては -12kcal, -4kcal, 4P5T においては -19kcal, -4kcal ほどであり、3C60 においての安定化が大きい。

以上より取りあえず TCR-pMHC のような比較的大きなタンパク間の相互作用が FMO, PIEDA により残基レベルでその性質(静電、交換反発、電荷移動、分散)を含む定量的議論が可能となったと言えよう。更なる解析を現在進めており、論文発表は準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- (1) Tsurui H, Takahashi T, Matsuda Y, Lin Q, Sato-Hayashizaki A, Hirose S. Exhaustive Characterization of TCR-pMHC Binding Energy Estimated by the String Model and Miyazawa-Jernigan Matrix. General Med (2013), 2:1 査読あり
- (2) Kobayashi T, Sundaram D, Nakata K, Tsurui H: Gray-level co-occurrence matrix analysis of several cell types in mouse brain using resolution-enhanced photothermal microscopy. J Biome. Opt. 22(3), 036011 (2017) 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) TSURUI Hiromichi, HIROSE Sachiko. Thorough characterization of TCR-pMHC binding free energy estimated by string model and Miyazawa-Jernigan matrix (III). 第 42 回 日本免疫学会総会・学術集会記録 42 巻 91 頁 2013 年 12 月 11 日-13 日 幕張
- (2) Hiromichi Tsurui, Lin QINGSHUN, Sachiko Hirose, Characterization of TCR-pMHC interaction based on string model and Miyazawa-Jernigan matrix (IV). 第 4 3 回日本免疫学会学術集会 京都 2014 年 12 月 10 ~ 12 日
- (3) Tsurui H. and Hirose S. Trial to evaluate TCR-pMHC binding free energy using MM/PB(GB)SA and molecular dynamics. 第 4 4 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015 年 11 月 18 日 ~ 20 日
- (4) 上屋裕子、波内良樹、輪湖 博、鶴井博理、第 5 4 回日本生物物理学会総会年会 T 細胞受容体による特異的および交差反応的な抗原認識機構の解明、つくば国際会議場 2016 年 11 月 25 日 ~ 2016 年 11 月 27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鶴井 博理 (TSURUI Hiromichi)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：40217386

(2) 研究分担者
()
研究者番号：

(3) 連携研究者
()
研究者番号：

(4) 研究協力者
()