

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06500

研究課題名(和文)ネオ・セルフの立体構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of neo-self

研究代表者

横山 茂之(YOKOYAMA, Shigeyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・科技ハブ産連本部・特別招聘研究員

研究者番号：00159229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 159,800,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉抗原Cry j 1由来の、N末端側隣接領域(NF)4残基を含む13残基のペプチド(NF-pCj1)と、HLA-DP5との複合体構造に基づいて、T細胞活性化に重要なHLA-DP5の6量体構造を解明し、このクラスタリングがTCR活性化を著しく増強していることを明らかにした。さらに、HLA-DP5の6量体構造に結合するTCR側の多量体構造を明らかにした。このTCR多量体構造の形成は、T細胞活性化に至るHLA-II・TCR複合体に普遍的であり、ネオ・セルフを基礎付ける構造的実体であると結論された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来は、T細胞活性化において、HLAおよびTCRのそれぞれが多量体化することの重要性は示唆されていたが、その直接的な検証と、立体構造的な実体は不明であった。本研究の成果として、「ネオ・セルフ」とは、TCRを強く活性化できる状態であり、その実体は「HLAとTCRの相互作用が、HLAの多量体とTCRの多量体との相互作用が可能になるペプチド提示様式」であると結論された。これにより、獲得免疫の中核である抗原提示の実体が解明されたことになり(学術的意義)、自己免疫疾患における抗原提示機構の理解に基づく治療、有効な感染症ワクチンやがんワクチンの設計・開発等に役立つと期待される(社会的意義)。

研究成果の概要(英文)：Based on the crystal structure of HLA-DP5 complexed with a 13-residue peptide (NF-pCj1) containing a 4-residue N-terminal flanking region (NF) derived from a cedar pollen antigen Cry j 1, the functionally-important hexameric structure of HLA-DP5 was elucidated, and it was clarified that this clustering significantly enhances TCR activation. Furthermore, the multimeric structure on the TCR side that binds to the hexameric structure of HLA-DP5 was clarified. Thus, it was concluded that the formation of this TCR multimeric structure is universal to the HLA-II・TCR complex leading to T cell activation, and is the structural entity on which “neo-self” is based.

研究分野：構造生物学

キーワード：免疫学 タンパク質 アレルギー・ぜんそく 立体構造 MHC TCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

横山と笹月は、HLA-II の一種 HLA-DP5 と、スギ花粉抗原 Cry j 1 由来の 9 残基の最小エペトープペプチド (pCj1) との複合体の結晶構造を決定し、その全体構造とペプチド収容溝内のペプチド認識機構を明らかにしていた。さらに、平成 26 年度終了の新学術領域研究 (HLA 進化と疾病) において、HLA-DP5 と、4 残基の隣接領域 (NF) を含む 13 残基のペプチド (NF-pCj1) との複合体構造を決定した。決勝のパッキングにおいて、ペプチドの隣接領域が収容溝から突出して分子間の「留め金」のように作用して、HLA-DP5・NF-pCj1 複合体の分子が直線上に会合していた。さらにこの 1 次元の会合状態が横にも整列して 2 次元に会合し、平面上に整列するという新規のパッキング様式を示していた。会合の相互作用面には HLA-DP5 に特異的な残基が存在し、同種の HLA 同士の「ホモ会合」と考えられた。このホモ会合構造を、強い T 細胞活性化を引き起こす HLA-II・非自己ペプチド・TCR 複合体の既知構造に重ね合わせたところ、TCR は互いに立体障害を起こすことなく多量体化できることが推定された。したがって、この新規の構造モデル (HLA-II・ペプチドのホモ会合と TCR 側のクラスター化) は、結晶化のアーティファクトではなく、免疫シナプス形成と T 細胞活性化の観点から検証する価値があるものと考えられた。

2. 研究の目的

TCR の活性化には TCR の多量体化が関わること、また、抗原ペプチドを提示する HLA-II もクラスターを形成することに注目して、HLA-DP5 と、スギ花粉抗原 Cry j 1 由来の 13 残基のペプチド (NF-pCj1) との複合体構造の解析から得られた新規の構造モデル (HLA-II・ペプチドのホモ会合と TCR 側のクラスター化) に基づき、免疫シナプス形成と T 細胞活性化の観点から、この構造モデルが、ネオ・セルフの構造的実体を示すという仮説の検証に取り組む。これにより、「ネオ・セルフとは、HLA 分子による抗原ペプチド提示の様式が T 細胞受容体分子 (TCR) を強く活性化できる状態である」という概念の成立を目指す。

3. 研究の方法

HLA-DP5 とスギ花粉抗原 Cry j 1 のペプチドとの複合体の立体構造解析に基づく研究を展開する。まず始めに、HLA-II・ペプチドの会合に関与する Cry j 1 ペプチドの N 末側隣接領域 (NF) 残基の「留め金」としての重要性を確認するため、HLA-DP5 によって提示されることが知られている他のアレルゲン・ペプチドの NF 配列の保存性を解析する。特に重要と考えられる NF 残基の変異体ペプチドを作製する。T 細胞活性化能を評価するため、NF-pCj1 によって活性化される TCR をクローン化し、T 細胞のモデルを作成し、他方、一定量の HLA-DP5 を細胞表面に発現する抗原提示細胞 (APC) のモデルを作成する。これにより、NF 変異体ペプチドを用いて、HLA-II・ペプチドの会合における NF 保存残基の寄与を明らかにする。

HLA-DP5 と NF-pCj1 との複合体の結晶構造においては、この複合体は、ユニット・セルにおいて 6 量体を形成し、さらに 1 次元の直線状会合、2 次元の平面上会合をしていた。この会合様式の中から、T 細胞活性化に大きく寄与するものが在るか否かを明らかにするために、HLA-DP5 が分子間で直接に相互作用する部位に変異を導入し、その影響を、上記の APC と T 細胞のモデルを用いて解析する。解明された重要会合様式の HLA-DP5 多量体構造モデルに対して、様々な強度の T 細胞活性化能を有する HLA-II・ペプチド・TCR 複合体を重ね合わせ、強い T 細胞活性化能を基礎付ける多量体化様式を明らかにする。さらに、膜貫通量域を含む TCR・CD3 ヘテロ 8

量体 ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2$) を調製し、ネオ・セルフの立体構造的実体を検証する。

4. 研究成果

第一に、HLA-DP5 の 6 量体構造を解明し、このクラスタリングが TCR 活性化を著しく増強していることを明らかにした。第二に、HLA-DP5 の 6 量体構造に結合する TCR 側の多量体構造を明らかにした。このような TCR 多量体構造の形成は、T 細胞活性化に至る HLA-II・TCR 複合体に普遍的で、ネオ・セルフを基礎付ける構造的実体であると結論された。

HLA-DP5 とスギ花粉抗原 Cry j 1 のペプチドとの複合体の立体構造解析に基づく研究を推進した。始めに、HLA-DP5 のペプチド収容溝には 9 アミノ酸残基 KVTVAFNQF (pCj1) が結合していたことに基づいて、HLA-DP5 によって提示される他のペプチド [スギ花粉アレルゲン (Cry j 1, 2)、ヒノキ花粉アレルゲン (Chao 1, 2) のペプチド] のアミノ酸配列に、pCj1 の N 末側隣接領域 (NF) の -2 位と -3 位の Ser、Lys がよく保存されていた。抗原提示細胞 (APC) と T 細胞のモデルを作成し、これらの NF 残基が、ペプチドと HLA-DP5 の親和性、提示細胞表面のペプチド量および T 細胞活性化能を、約 2 倍に増大していることを明らかにした。

NF を持つペプチド (NF-pCj1) と HLA-DP5 との複合体の結晶構造においては、HLA-DP5 が 6 量体を形成していた。1 分子のペプチドの pCj1 領域と、NF の Ser(-2)-Lys(-3)とは、互いに異なる HLA-DP5 分子と結合しており、NF による親和性増強は、6 量体形成に起因することがわかった。さらに、6 量体中の HLA-DP5 分子間相互作用部位への変異導入によって T 細胞活性化がほぼ消失したことから、HLA-II 6 量体形成の TCR 活性化における重要性が明らかになった。この発見により、HLA-II のクラスタリングの構造基盤が解明された。

HLA-DP5 の 6 量体と結合する TCR 側の立体構造を検討したところ、2 種類の会合様式の組み合わせで 4 量体を形成することが分かり、HLA-DP5 の 6 量体化によって TCR が 4 量体化し、強く活性化すると考えられる。このような HLA-II の 6 量体と TCR の 4 量体の相互作用は、比較的強い免疫応答 (病原体、アレルゲン等) の HLA-II・TCR 複合体構造に共通することが判明した。これにより、TCR を活性化に導く多量体構造の実体が初めて明らかになった。さらに、比較的弱い免疫応答 (自己免疫等) の HLA-II・TCR 複合体構造では、HLA-II の 6 量体化と TCR の 4 量体化は弱いと考えられた。他方、Treg の TCR は、HLA 多量体との強い結合が困難であることが示唆された。したがって、TCR を強く活性化できる状態 (ネオ・セルフ) は、「HLA と TCR の相互作用が、HLA の 6 量体と TCR の多量体との相互作用が可能になるペプチド提示様式である」と結論した。さらに、独自の無細胞タンパク質合成法を適用して、膜貫通量域を含む TCR・CD3 ヘテロ 8 量体 ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2$) を調製することに成功し、ネオ・セルフの立体構造的実体を検証した。

研究分担者の笹月は、HLA が寄与する免疫関連疾患 (1)スギ花粉症、(2)グレーブス病(バセドウ病)・橋本病、(3)慢性 B 型肝炎および急性 GvH 病(アロ移植反応)について HLA・ペプチド相互作用、さらに HLA・ペプチド・TCR 相互作用の解明を進めている。慢性 B 型肝炎は SNP 解析で HLA-DP locus との相関が報告されていたが、DQB1*06:01 との相関が genotype based analysis で最も強いことを明らかにした。また、非血縁者間骨髄移植において HLA-C*14:02 および HLA-B*51:01 のミスマッチが急性 GvH 病発症と死亡に深く関わっていることを明らかにした。同じく非血縁者間骨髄移植における GvH 病において HLA-DP5 グループと DP2 グループの進化的分化の意味を考察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morishima Satoko, Shiina Takashi, Suzuki Shingo, Ogawa Seishi, Sato-Otsubo Aiko, Kashiwase Koichi, Azuma Fumihiro, Yabe Toshio, Satake Masahiro, Kato Shunichi, Kodera Yoshihisa, Sasazuki Takehiko, Morishima Yasuo	4. 巻 131
2. 論文標題 Evolutionary basis of HLA-DPB1 alleles affects acute GVHD in unrelated donor stem cell transplantation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 808 ~ 817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-08-801449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 横山茂之	4. 巻 25 (2)
2. 論文標題 「ネオ・セルフ抗原」の立体構造解析による免疫認識機構の研究	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本免疫学会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 6-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura-Someya, T., Hosaka, T., Shinoda, T., Shimono, K., Shirouzu, M. and Yokoyama, S	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell-Free Synthesis of Membrane Proteins.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Advanced Methods in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 123-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-4-431-56030-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terada, T., Kusano, S., Matsuda, T., Shirouzu, M. and Yokoyama, S	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell-Free Protein Production for Structural Biology	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Advanced Methods in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 83-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-4-431-56030-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Nao, Sasazuki Takehiko, Mizokami Masashi, et. al	4. 巻 6
2. 論文標題 Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep24767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasazuki Takehiko, Inoko Hidetoshi, Morishima Satoko, Morishima Yasuo	4. 巻 129
2. 論文標題 Gene Map of the HLA Region, Graves' Disease and Hashimoto Thyroiditis, and Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Advances in Immunology	6. 最初と最後の頁 175 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ai.2015.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morishima Satoko, Kashiwase Koichi, Matsuo Keitaro, Azuma Fumihito, Yabe Toshio, Sato-Otsubo Aiko, Ogawa Seishi, Shiina Takashi, Satake Masahiro, Saji Hiroh, Kato Shunichi, Kodera Yoshihisa, Sasazuki Takehiko, Morishima Yasuo	4. 巻 101
2. 論文標題 High-risk HLA alleles for severe acute graft-versus-host disease and mortality in unrelated donor bone marrow transplantation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 491 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2015.136903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yokoyama Shigeyuki
2. 発表標題 Structure and function of an HLA-DP5 peptide complex
3. 学会等名 The 1st International Symposium on NEO-SELF (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山茂之
2. 発表標題 ネオ・セルフの立体構造解析
3. 学会等名 新学術領域研究「ネオ・セルフの生成・機能・構造」第1回領域全体班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kusano, S., Ueda, S., Hamana, H., Kishi, H., Muraguchi, A., Ohsawa, N., Wakiyama, M., Yoshikai, Y., Yamada, H., Yamamoto, K., Kukimoto-niino, M., Nishimura, Y., Shirouzu, M., Sasazuki, T. and Yokoyama, S.
2. 発表標題 The flanking region of cedar pollen peptide in complex with HLA-DP5 facilitates T-cell activation.
3. 学会等名 16th International Congress of Immunology (ICI2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kishi, H., Jin, A., Hamana, H., Shitaoka, K., Tajiri, K., Kobayashi, E., Kusano, S., Yokoyama, S., Ozawa, T., Nagai, T., Obata, T., Hatakeyama, S., Horii, M., Hu, Y., Zhang, F. and Muraguchi, A.
2. 発表標題 ClS-Interaction of TCRs and antigen/MHC class 1 Complexes on CD8+ T cells causes their activation.
3. 学会等名 16th International Congress of Immunology (ICI2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yokoyama Shigeyuki
2. 発表標題 Cell-free protein synthesis methods to produce mammalian multiple transmembrane domain proteins
3. 学会等名 Cell-free protein synthesis methods to produce mammalian multiple transmembrane domain proteins (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ネオ・セルフの生成・機能・構造
<http://www.tokyo-med.ac.jp/neoself/index.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
研究分担者	笹月 健彦 (SASAZUKI Takehiko) (50014121)	九州大学・高等研究院・特別主幹教授 (17102)	

	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
研究協力者	村松 知成 (MURAMATSU Tomonari)		
研究協力者	草野 清輔 (KUSANO Seisuke)		
研究協力者	陳 鑿行 (CHEN Jianxing)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	田辺 弘明 (TANABE Hiroaki)		
研究協力者	齋藤 真悟 (SAITO Shingo)		
研究協力者	石原 大輔 (ISHIHARA Daisuke)		
研究協力者	TUN Xin (TUN Xin)		
研究協力者	豊海 彩 (TOYOUMI Aya)		

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		
オーストラリア	Monash University		