

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 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：2010～2014

課題番号：22133004

研究課題名（和文）HLAクラスI / II分子の高次構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of HLA class I/II molecules

研究代表者

横山 茂之（YOKOYAMA, Shigeyuki）

独立行政法人理化学研究所・横山構造生物学研究室・上席研究員

研究者番号：00159229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 123,900,000円

研究成果の概要（和文）：本申請課題において、HLA分子（HLA-DP5, HLA-DR53, HLA-DR4）に結合する抗原ペプチドとの複合体について、タンパク質の試料調製、結晶化を実施した。HLA-DP5に関しては、スギ花粉由来の抗原ペプチド（pCry j 1）との複合体の結晶構造の決定に成功した。この立体構造情報に基づいて、pCry j 1結合部位に対する阻害剤を設計した。最終的に、10個の化合物を結合親和性に対する評価試験の候補とした。さらに、HLA-DP5が隣接領域を含むpCry j 1を認識した結晶構造の決定にも成功した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we performed the protein expression, purification, and crystallization of HLA molecules, HLA-DP5, HLA-DR53, and HLA-DR4, bound to their antigenic peptide. Thereby, we successfully determined the crystal structure of HLA-DP5 in complex with *Cryptomeria japonica* 1 peptide (pCry j 1), derived from Japanese cedar pollen. Based on this structural information, we designed ten compounds to inhibit pCry j 1 binding to HLA-DP5, as evaluation test candidates for the peptide-binding affinity. Furthermore, we determined the crystal structure of HLA-DP5 in complex with pCry j 1, including the flanking region.

研究分野：構造生物化学

キーワード：HLA ペプチド 立体構造 タンパク質 免疫学 医薬品設計 X線結晶構造解析 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

ヒトの MHC (Major Histocompatibility Complex, 主要組織適合遺伝子複合体) である HLA は、生体防御の最前線で多様な病原体由来のペプチドを結合し、抗原特異的免疫応答を制御している。これまでに、数百例の HLA 分子の結晶構造が報告されているが、ほとんどが細菌やウイルス由来の抗原との複合体構造であった。また、HLA 分子と「自己タンパク質由来ペプチド」との結合が自己免疫疾患を発症させる可能性が示唆されているが、HLA が結合しているペプチドの解明には至っていない。実際、米国 NIH の HLA 結合ペプチドデータベース (IEDB) では、日本人に発症する自己免疫性甲状腺炎やスギ花粉症に関連する HLA-DP5 と相関する 4 種類の抗原ペプチドが知られるのみで、日本人 HLA と疾患と関係するデータが不足している。HLA と病態との関係を明らかにし、HLA を標的とした免疫制御分子の同定を行うためには、HLA および自己/非自己タンパク質由来ペプチドとの複合体の立体構造の決定は欠かせない。得られた構造情報に基づき、標的分子の機能を制御する低分子化合物を *in silico screening* により推定し、分子創薬へ向けた情報基盤の構築に資する必要がある。

2. 研究の目的

(1) HLA の細胞生物学的機能を解明する上で、立体構造の決定ならびに結合ペプチドの同定と結合モチーフの決定が基盤として最重要である。日本人集団に高頻度で存在し、また疾患と相関する、HLA-DR53, DP5, DR4, B52, B54 に結合したペプチドとの複合体構造を明らかにする。

(2) HLA 分子と結合ペプチドとの立体構造情報に基づいて、ペプチド結合部位に結合する阻害剤を設計する。設計する阻害剤の種類としては、分子量 500 以下程度の低分子化合物の他、10 残基程度のペプチドを対象とする。

3. 研究の方法

(1) 結晶化に供するタンパク質試料の調製には、大腸菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の生細胞合成系、ならびに、大腸菌、小麦胚芽、昆虫細胞、ヒト細胞等に由来する無細胞タンパク質合成系から、対象となる HLA 分子に最適な系を選択し、大量合成・精製を行った。DLS, MALDI, 熱プロファイリング、分析超遠心などによりタンパク質の性状分析を行い、結晶化へと進めた。プロテアーゼ添加、微小重力環境、レーザー照射をはじめとする結晶化促進手法の利用や、結晶化原理の異なる 4 種類の自動化ロボットを駆使し、数千の条件において結晶化を行った。得られた結晶を SPring-8 等の大型放射光施設等において X 線照射を行い、構造解析を行った。得られた結晶が微小なものである場合にも、マイクロフォーカスビーム等を用いて反射

を得て、解析を行った。

(2) インシリコスクリーニングについては、ドッキングと分子動力学計算を組み合わせる手法で実施した。まず、HLA-DP5 側の構造の自由度を考慮するために、分子動力学計算を行い、構造のアンサンブルを作成した。得られたアンサンブルを用いて、ドッキングの条件検討を行った。最も良好な条件を用いて、東京大学の化合物ライブラリーをドッキングさせ、ドッキングスコアの上位を選定した。ペプチドの設計に関しては、Cry j 1 由来の 13 アミノ酸残基からなるペプチドについて、1-4 個の変異を任意の位置にかけた仮想ペプチドライブラリーを作成した。これらのペプチドについて、pCry j 1 の位置に基づいて初期構造を作成し、分子動力学計算を行った。得られたトラジェクトリー (構造の時系列データ) の結合エネルギーを MM-PBSA 法によってスコアリングし、スコア上位のペプチドを選定した。低分子化合物等の最適化のためには、(1)HLA との複合体の構造解析、(2)低分子化合物等の設計のステップを繰り返し、進めた。

4. 研究成果

(1) スギ花粉症と相関する HLA-DP5 とスギ花粉抗原ペプチド (pCry j 1) および HLA-DR53 と pCry j 2、また、グレーブス病と相関する HLA-DP5 と甲状腺刺激ホルモン受容体ペプチド (pTSHR)、さらに、橋本病と相関する HLA-DR53 と pTSHR に関して、結晶化スクリーニングに供することが可能な量の精製試料を得ることに成功した。得られた調製試料を用いて、種々の条件で結晶化を進めたところ、HLA-DP5・pCry j 1 複合体では単結晶が、HLA-DR53・pCry j 2 複合体と HLA-DP5・pTSHR 複合体では微小結晶が、得られた。

(2) HLA-DP5 と非自己である Cry j 1 由来の 9 残基の抗原ペプチドとの複合体結晶に関して、大型放射光施設にて X 線回折実験を行い、2.4 Å 分解能の回折データを取得した。HLA-DP2 (PDB:3LQZ) を探索構造として分子置換法による位相決定後、分子モデルの精密化を経て、最終構造を得ることに成功した (図 1 左)。

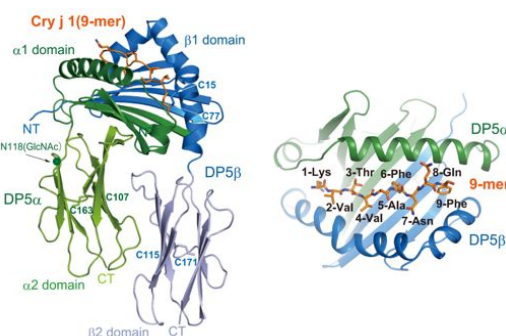


図 1. HLA-DP5・pCry j 1 複合体の結晶構造

pCry j 1 (9-mer) は、HLA-DP5 のα鎖とβ鎖から構成される抗原結合ポケットに收容され (図 1 右)、10 組の水素結合と疎水的な相互作用により認識されていた (図 2 上)。一方、自己抗原を結合した HLA-DP2 では抗原ペプチドとの間に水素結合を 1 組しか形成せず、殆どが疎水的な相互作用によるものであり、認識機序の違いが明白であった (図 2 下)。

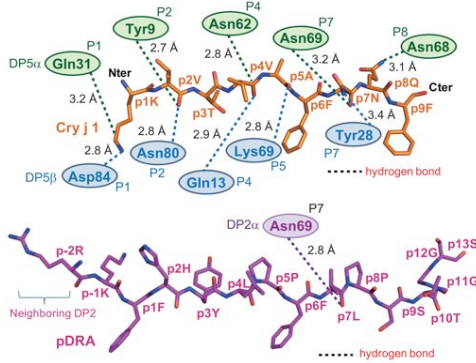


図 2. HLA-DP5 と HLA-DP2 の抗原認識機序

この様な pCry j 1 (9-mer) 認識の構造的特徴を踏まえ、変異解析実験を行った。HLA-DP5 β鎖の N 末端に pCry j 1 (9-mer) を融合し、HLA-DP5 α鎖と共に無細胞タンパク質合成系で共発現させ、pCry j 1 (9-mer) への変異導入体と野生型について発現量の差異をプルダウン法にて比較した (図 3)。変異の種類に関しては、得られた実構造の相互作用情報に基づいて、相互作用に影響を与える変異 (Kp1E, Np7Q, Fp9A)、相互作用に影響を与えない変異 (Tp3Y, Qp8E) をそれぞれ決定した (図 3)。解析の結果、全ての変異体で予測と結果が一致していたため、決定した複合体構造は溶液中での立体構造を反映していると結論付けた。

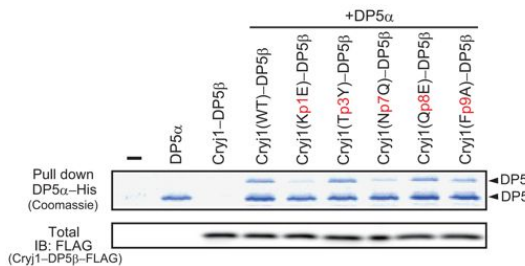


図 3. pCry j 1 に対する変異体解析

さらに、構造学のおよび進化学的手法を組み合わせて考察した結果、HLA-DP5 は酸性の P1 ポケット (acidic pocket) を進化の過程において獲得し、HLA-DP5 と相関するスギ花粉抗原ペプチドに含まれる塩基性の側鎖 (Lys/Arg) が、高頻度でこのポケットに係留される点を見出した (図 4)。また、DP5 の相関体である DP2 にも酸性の P4 ポケット (acidic pocket) が存在し、相関する抗原ペプチドの塩基性側鎖を高頻度で係留できる点を見出した (図 4)。さらに、HLA-DP は進化の過程で DP5 と DP2 の形質をそれぞれ保有

する 2 つのグループに分岐した為、酸性ポケットと塩基性側鎖の間に見られる多様化は、多種多様な抗原ペプチドを受容するために酸性ポケットと塩基性側鎖に関する多様性を獲得したことを結論付けた。この特徴的な構造基盤に基づき、より確度の高い HLA-DP5 に対するスギ花粉症抗原の結合阻害剤を探索し、スギ花粉症の効果的な予防・制御のための薬剤が設計されることが期待される。

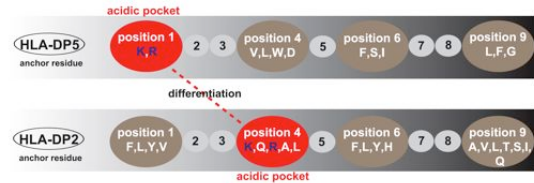


図 4. HLA-DP における酸性ポケットの役割

(3) 東大化合物ライブラリーからドッキングスコアとクラスタリングによって、低分子化合物 41 個を選び、結合親和性評価試験の候補として提案した。また、Cry j 1 由来の仮想ペプチドライブラリーからは、トラジェクトリー中で主要かつエネルギー的に安定な構造群の MM-PBSA スコアに基づいて 10 個を合成・評価候補として提案した。

(4) また、HLA-DP5 と N 末端側の隣接領域を含む Cry j 1 由来の 13 残基の抗原ペプチドとの複合体結晶に関して、大型放射光施設にて X 線回折実験を行い、3.4 Å 分解能の回折データを取得した。HLA-DP5•pCry j 1 (9-mer) 複合体を探索構造として分子置換法による位相決定後、分子モデルの精密化を経て、最終構造を得ることに成功した。收容溝内における pCry j 1 (13-mer) の認識機構は、上述 (2) の隣接領域を含まない pCry j 1 (9-mer) との結晶構造と同じであった。一方、pCry j 1 (13-mer) では、結晶中における 2 次元的な分子会合体が、隣接領域を含む pCry j 1 による「留め金」作用により形成されるという驚くべき違いを見出した。この会合体の生理的な意義を検証するため、HLA-DP5 陽性のスギ花粉症患者末梢血から隣接領域を含む pCry j 1 (13-mer) を拘束する T 細胞クローンを樹立し、T 細胞活性化実験を実施した。隣接領域が含まれる場合には T 細胞活性が著しく増強し、含まれない場合は減弱した。また、会合体中において、HLA-DP5 との相互作用に直接関与する隣接領域に対して反発変異を導入したところ、著しく減弱した。以上より、隣接領域を利用して構成される会合体形成は、全く新規の概念であり、かつ、機能的にも極めて重要であることが示された。

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 1 件)

- ① Kusano, S., Kukimoto-Niino, M., Satta, Y., Ohsawa, N., Uchikubo-Kamo, T., Wakiyama, M., Ikeda, M., Terada, T., Yamamoto, K., Nishimura, Y., Shirouzu, M., Sasazuki, T., Yokoyama, S., Structural basis for the specific recognition of the major antigenic peptide from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5, *Journal of Molecular Biology*, 426, 2014, 3016-3027, 10.1016/j.jmb.2014.06.020, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 横山 茂之 他、Cedar pollen peptide・HLA-DP5 complex forms a homophilic assembly for T cell activation、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ② 横山 茂之 他、HLA-DP5 によるスギ花粉抗原 Cry j 1 の特異的認識に対する構造的基盤、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ③ 横山 茂之 他、Structural basis of the specific recognition of the major epitope from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5、12th Conference of the Asian Crystallographic Association、2013 年 12 月 7 日~10 日、Hong Kong (China)
- ④ 横山 茂之 他、Structural analysis of the class II HLA molecule, DP5, in complex with the Cry j 1 antigen of Japanese cedar pollen、15th International Congress of Immunology、2013 年 8 月 22 日~27 日、Milano (Italy)
- ⑤ 横山 茂之 他、Structural basis of the specific recognition of the major epitope from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5、7th International Conference on Structural Genomics、2013 年 7 月 29 日~8 月 1 日、京王プラザホテル札幌 (北海道札幌市)
- ⑥ 横山 茂之 他、Structural basis for antigen presentation of Japanese cedar pollen Cry j 1 by HLA class II molecule, DP5、第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑦ 横山 茂之 他、Structural basis for the recognition of the peptide from CryJ1, the major allergen of Japanese cedar pollen, by the human class II MHC protein HLA-DP5、Centennial of Hashimoto Disease、2012 年 12 月 1 日、アクロス福岡 (福岡県福岡市)

[図書] (計 1 件)

- ① 草野 清輔、横山 茂之、医薬ジャーナル

社、血液フロンティア 2013 年 8 月号
「HLA 分子の立体構造から見えるもの」、
2013、1051-1058

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 茂之 (YOKOYAMA, Shigeyuki)
独立行政法人理化学研究所・横山構造生物学研究室・上席研究員
研究者番号：159229

(2) 研究分担者

白水 美香子 (SHIROUZU, Mikako)
独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・副センター長
研究者番号：70280732
(平成 22~24 年度は連携研究者)

本間 光貴 (HONMA, Teruki)
独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・チームリーダー
研究者番号：10466039
(平成 25 年度より)