

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K14395

研究課題名（和文）創薬を指向した補助刺激受容体CD28ファミリーとシグナル伝達分子の構造基盤解明

研究課題名（英文）Structural basis of the co-stimulation receptors, CD28 family, and signalling molecules for drug discovery

研究代表者

稲葉 理美（Inaba-Inoue, Satomi）

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：70785493

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、獲得免疫機構におけるT細胞の活性化に關与するシグナル伝達分子に着目し、受容体細胞内領域への分子認識機構を多角的に明らかにすることを目的に研究を行った。補助刺激受容体であるCD28やそのファミリー分子の細胞内領域とそれらに結合する複数のアダプタータンパク質のSH2ドメインとの複合体について、X線結晶構造解析、X線小角散乱法および放射光円二色性分散を用いて構造を評価することで、分子認識の基盤となる構造情報をより詳細に明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、獲得免疫におけるT細胞活性化初期シグナルに着目して、分子レベルでの知見を得ることができた。これらの詳細な分子間相互作用の情報は、今後創薬などの応用面において重要となると考えられる。また、複数の解析手法を組み合わせることで、特定の複合体を多面的な視点から明らかにし、その手法の有効性も示すことができた。今後、本研究対象のみならずタンパク質科学分野での幅広い利用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is to focus on the signalling molecules involved in the activation of T cells in the acquired immunity mechanism and to elucidate the molecular recognition mechanisms to the intracellular regions of the receptors from multiple techniques. Structural characterisation of the intracellular regions of the co-stimulatory receptor CD28 and its family molecules in complex with the SH2 domains of adaptor proteins that bind to them, using X-ray crystallography, small-angle X-ray scattering and synchrotron radiation circular dichroism. These results provide more detailed structural information underlying molecular recognition.

研究分野：生物物理学・タンパク質科学・構造生物学

キーワード：免疫系シグナル伝達 分子間相互作用 X線小角散乱 複合体構造

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体外から侵入した外来抗原が、抗原提示細胞により T 細胞に提示されると、2 つの独立した受容体間相互作用により免疫系シグナルが伝達される。1 つは主要組織適合複合体 (MHC) と T 細胞受容体 (TCR) を介した抗原特異的シグナルで、もう 1 つが B7 分子群と補助刺激受容体 CD28 を介した補助シグナルである。CD28 は T 細胞活性化初期に重要な役割を担う補助刺激受容体で、それ自身は酵素活性などを持たないが、細胞内領域に SH2 ドメインを持つタンパク質が結合しうるチロシンモチーフを有している。このチロシンが、キナーゼによりリン酸化されると、growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)、Grb2-related adaptor downstream of Shc (Gads)、phosphoinositide3-kinase 調節サブユニット (PI3K p85) の SH2 ドメインがこのリン酸化チロシン (pY) を認識し、結合する【図 1】。この CD28 細胞外領域を標的とした薬剤 (CTLA-4 Ig) は、既に関節リウマチなどの自己免疫疾患に対する治療薬として高い効果を上げており、これらの T 細胞補助シグナル伝達機構の詳細な解明は、その他にもがん免疫療法などに対する医薬品開発への応用にも繋がる。これまでに、pYMMN 配列を含む CD28 リン酸化ペプチドと 4 つの SH2 (Grb2 SH2、Gads SH2、p85 nSH2、p85 cSH2) との高分解能複合体立体構造解析に成功し、結合熱力学量と併せて高精細な相互作用様式を明らかにしてきた (Inaba et al., J. Biol. Chem., 2017)【図 2】。

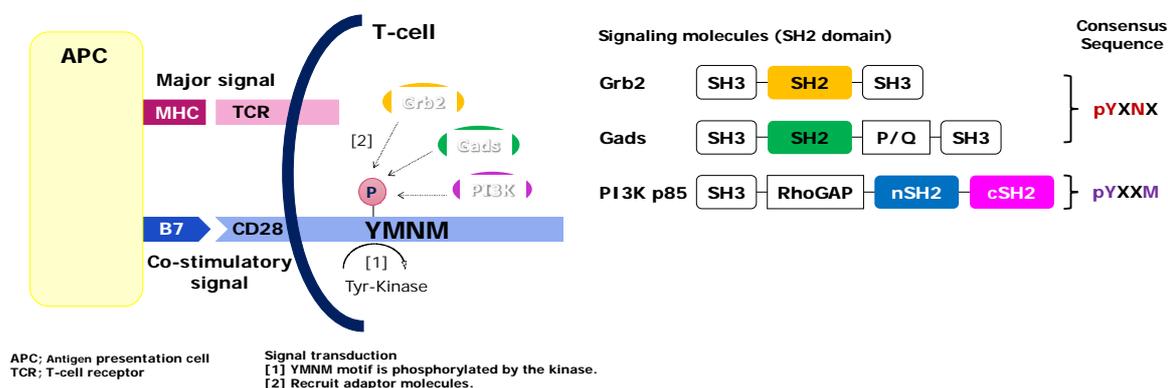


図 1. T 細胞活性化シグナルの概要と本研究で用いたアダプタータンパク質のドメイン構造

一方、活性化した T 細胞には、inducible costimulator (ICOS) や cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) が発現しており、それぞれ T 細胞の活性化を促進、もしくは抑制し、CD28 同様に細胞内領域にチロシンモチーフを有している。これらも、SH2 を有するタンパク質が認識し結合しうるが、認識モチーフ配列の違いにより Grb2 と Gads は結合せず、PI3K p85 の nSH2 および cSH2 は結合することが知られている。しかし、補助刺激受容体間での相互作用様式の比較や原子レベルでの構造情報は報告されておらず、受容体認識結合と下流シグナルへの影響は未解明である。また、先に決定した CD28 複合体構造では、CD28 リン酸化ペプチドのコンセンサス配列以外の残基は結合への関与が見られなかったが、分子間での活性化や結合力への違いも報告されていることから、溶液中での構造情報の取得が、受容体認識機構の詳細解明の鍵を握ると考えられていた。

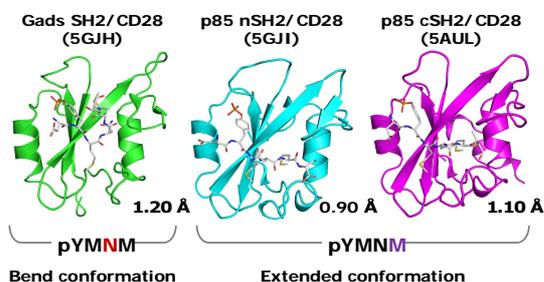


図 2 アダプタータンパク質 SH2 ドメインと CD28 ペプチドとの複合体結晶構造

2. 研究の目的

CD28 および CD28 ファミリー受容体 (ICOS と CTLA-4) とアダプタータンパク質 SH2 ドメイン (Grb2 SH2、Gads SH2、p85 nSH2、p85 cSH2) との分子間相互作用様式を詳細に明らかにすることで、将来的に創薬に繋がる構造基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

X線結晶構造およびX線小角散乱 (SAXS) を用いて、CD28 もしくは CD28 ファミリーペプチドとの結合に伴う構造の違いを比較した。また、放射光円二色性分散 (CD) スペクトルにより、溶液中での二次構造変化を追跡した。X線小角散乱測定は、大型放射光施設 SPring-8 (ビームライン BL45XU) および英国ダイヤモンド放射光施設 (ビームライン B21) にて実施した。

4. 研究成果

既に報告済みの CD28 ペプチドに加え、ICOS ペプチドと PI3K p85 nSH2 と cSH2 の複合体結晶構造を 1.2 および 1.1 Å 分解能で決定した。その結果、CD28 ペプチドの複合体と非常に類似した様式で結合していることが明らかとなった。

一方、溶液中での構造形態を明らかにするため、SAXS および放射光 CD スペクトルの測定を行った。複合体構造を精度良く測定するために、ゲルろ過クロマトグラフィーを連結した SEC-SAXS 法を適用した。初めに、各種測定条件の検討を行った。X線に対するダメージを軽減するために、キャピラリーセル内に試料を流しながら X線を照射する実験系で測定を行ったが、得られた結果からは顕著な X線ダメージに由来する散乱プロファイルが得られた。そこで、測定溶媒の組成を見直し、pH や塩濃度、Buffer の種類を検討した。その結果、X線ダメージが大幅に軽減できる溶液の条件を見出すことができた。これを使って、各 SH2 ドメインと CD28 複合体構造の SAXS 解析を行ったところ、4つの SH2 ドメインの散乱曲線、および慣性半径はよく類似していた【図 3】。これらの結果は、結晶構造の結果とも一致する。また、CD28 ペプチド複合体ではリガンドなしのときと比べて、SAXS 散乱プロファイルの変化が観測された。これは、SH2 ドメインがリガンド結合に伴って構造変化が起こることを示唆している。

さらに、放射光 CD スペクトルにより CD28 ペプチド結合に伴う二次構造の変化を追跡した。非常に興味深いことに、リガンドあり・なしいずれの条件下でも、すべての SH2 ドメインで異なるスペクトルを示し、二次構造含有量も各々異なっていた。以上の結果から、溶液中での構造形態として、全体構造としては結晶構造で得られたように非常に類似しているものの、局所的な構造はそれぞれの SH2 ドメインで異なっていることを明らかにした。

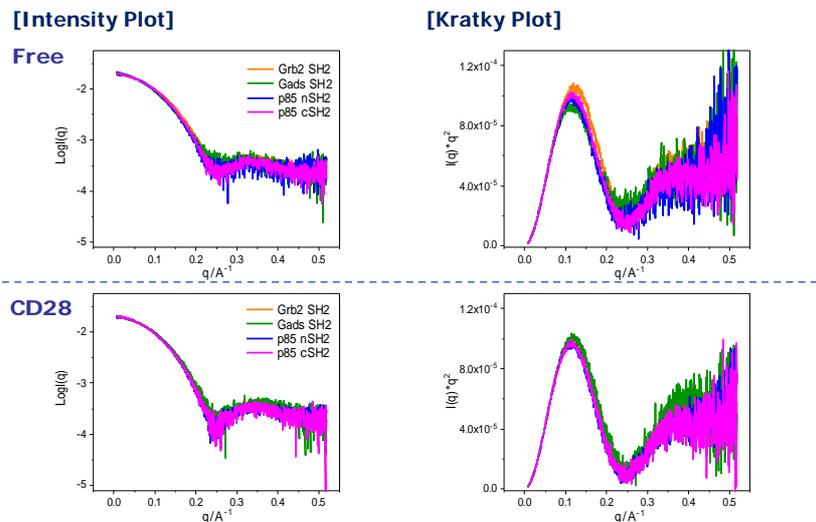


図 3 アダプタータンパク質 SH2 ドメインと CD28 ペプチドとの複合体 SAXS 解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inaba-Inoue Satomi、Inoue Katsuaki、Hikima Takaaki、Sekiguchi Hiroshi、Rambo Robert	4. 巻 75
2. 論文標題 Crystal and solution structures of SH2 domain of signaling molecule in complex with the co-stimulatory receptor CD28	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances	6. 最初と最後の頁 e69 ~ e69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2053273319094877	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 Hosoe Yuhi、Numoto Nobutaka、Inaba Satomi、Ogawa Shuhei、Morii Hisayuki、Abe Ryo、Ito Nobutoshi、Oda Masayuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural and functional properties of Grb2 SH2 dimer in CD28 binding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 80 ~ 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.16.0_80	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 稲葉 理美、関口 博史	4. 巻 11
2. 論文標題 小角X線散乱法による DNA 結合タンパク質の機能構造解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA利用研究成果集	6. 最初と最後の頁 292 ~ 295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18957/rr.11.5.292	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satomi INABA-INOUE, Katsuaki INOUE, Takaaki HIKIMA, Hiroshi SEKIGUCHI, Robert RAMBO
2. 発表標題 Crystal and solution structures of SH2 domain of signaling molecule in complex with the co-stimulatory receptor CD28
3. 学会等名 32nd European Crystallographic Meeting (ECM32) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉理美, 井上勝晶, 引間孝明, Rohanah Hussain, Giuliano Siligardi, 森井尚之, 織田昌幸, 八木直人, 関口博史, Robert P. Rambo
2. 発表標題 放射光X線による免疫系シグナル伝達タンパク質SH2と補助刺激受容体CD28との複合体溶液構造解析
3. 学会等名 第32回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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		
英国	Diamond Light Source		