

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08358

研究課題名(和文) DIHS治療薬の合理的開発を志向したHLAの構造学的研究

研究課題名(英文) Structural studies of HLA to develop of rational medicines for DIHS treatment

研究代表者

日下部 吉男 (Kusakabe, Yoshio)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：30338537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-B*13:01のX線結晶構造解析を行うにあたり、HLA-B*13:01は 2-Microglobulinと複合体を形成しているため、結晶構造解析を行うためには両者の複合体を得ることが必要である。各々のタンパク質について、Hisタグ有とタグ無の発現系を構築し、精製したタンパク質を得ることに成功した。その後、ゲル濾過クロマトグラフィーにて複合体の形成を確認したところ、複合体を得ることが出来なかった。そこでHLA-B*13:01と 2-Microglobulinの複合体をin silicoで予測した結果、形成するためにはジペプチド以上のペプチドが必要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA-B*13:01のX線結晶構造解析を目指したが、2-Microglobulinとの複合体を得ることが出来なかった。そこで、HLA-B*13:01と 2-Microglobulinの複合体をin silicoで明らかにし、DIHSを引き起こすアロプリノールとフェノバルビタールをドッキングの手法で結合様式を予測した結果、共通の結合が見つかることが出来た。このことからHLA-B*13:01を持つ人に対して薬疹を引き起こす医薬品の共通構造を予測することが出来、この結果を応用することでHLA-B*13:01を持つ人が薬疹を引き起こす医薬品をあらかじめ予測することが出来ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the three-dimensional structure of HLA-B*13:01 by X-ray crystal structure analysis. Since HLA-B*13:01 forms a complex with 2-Microglobulin, it is necessary to obtain a complex of the two in order to perform crystal structure analysis. For each protein, expression systems with and without His tags were constructed, and expression and purification were performed, and we succeeded in obtaining proteins free of impurities. After that, we confirmed the formation of the complex by gel filtration chromatography, but we were unable to obtain a complex with or without a tag. Therefore, we predicted the complex between HLA-B*13:01 and 2-Microglobulin in silico, and found that a peptide of dipeptide or more is required for the complex to form.

研究分野：皮膚科

キーワード：アレルギー 重症型薬疹 DIHS 立体構造 インシリコ

1. 研究開始当初の背景

重症型薬疹で特に予後の悪い重症の合併症を生じるものに「薬剤性過敏症症候群 (DIHS)」があり、特定の HLA がこの薬疹発症に関与していることが知られている。DIHS の原因薬物はある程度同定されており、アロプリノールやフェノバルピタール、レクチゾールなど身近な薬が DIHS に関与している。本研究協力者の昭和大学医学部皮膚科学教室渡辺教授は、これらの薬物による DIHS の発症に HLA-B*13:01 が関与していることを明らかにした。つまり、HLA-B*13:01 を持った人が、アロプリノール、フェノバルピタールやレクチゾールなどの薬物を服用することによって重篤なアレルギー反応が起ってしまう。

HLA は、生体において排除しなければならない微生物に感染した細胞や癌細胞と正常な細胞を識別するのに関わっている。感染細胞やがん細胞などの異常な細胞に含まれる外来の生体高分子は①ペプチドに分解され、②小胞体に運ばれ HLA と結合すると、③ペプチドが結合した HLA が細胞外に移動する。④T 細胞は細胞外に提示された HLA-外来ペプチド複合体を認識することで、この細胞を破壊する(図 1)。

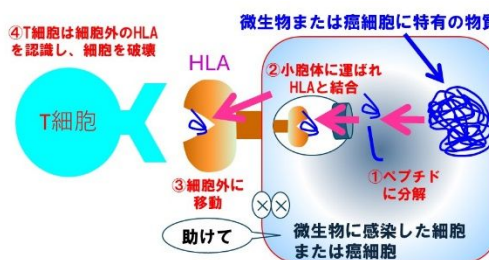


図1 生体内でのHLAの働き

これらの背景から、(i)DIHS を発症する人が有する HLA-B*13:01 がアロプリノール、フェノバルピタールなどの薬物と結合することで、HLA-B*13:01 の抗原ペプチド結合部位の構造変化が誘起される。(ii)HLA-B*13:01 の抗原ペプチド結合部位の構造が変化することで HLA-B*13:01-薬物複合体が自己ペプチドと結合してしまい、HLA-B*13:01-薬物-自己ペプチド三者複合体が細胞外に移動する。その結果、(iii)T 細胞は HLA-B*13:01-薬物-自己ペプチド複合体を認識し、正常細胞を攻撃することによってアレルギー反応を起こすという仮説が提唱されている。

本研究協力者の理化学研究所統合生命医科学研究センターファーマコゲノミクス研究グループ 荻田奏誠博士は、アロプリノールやフェノバルピタールやレクチゾールが HLA-B*13:01 のアレルギー型を持つ人に DIHS を発症させ、362 アミノ酸残基中 3 残基しか違いのない (アミノ酸相同性 99% 以上) HLA-B*13:02 を持つ人には発症させない事を明らかにした【未公表情報】。

2. 研究の目的

本研究では、①HLA-B*13:01 単独構造、HLA-B*13:01-アロプリノール複合体構造、HLA-B*13:01-フェノバルピタール複合体構造を X 線結晶構造解析の手法で明らかにし、②得られた複合体構造を用いて、ペプチド結合部位に強く結合しそうなペプチド誘導体をデザインし、③デザインしたペプチドに対して、HLA-B*13:01-アロプリノール複合体、HLA-B*13:01-フェノバルピタール複合体との結合強度を実験的に明らかにすることで、HLA-B*13:01 を持つ人に対して、DIHS を起こさない治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)発現系の構築

HLA-B*13:01 の X 線結晶構造解析を行うためには、不純物を含まない HLA-B*13:01 が大量に

必要なため、大腸菌を用いた HLA-B*13:01 の発現系を構築した。HLA-B*13:01 遺伝子を GenScript 社 人工遺伝子合成受託サービスにて合成した。合成した HLA-B*13:01 遺伝子を PCR で増幅した。増幅した遺伝子と発現ベクターに対して、2 種類の制限酵素で切断後、電気泳動を行い、各々のバンドを切り抜き、QIAGEN 社の QIAquick Gel Extraction Kit で DNA を抽出後、Promega 社の LigaFast™ Rapid DNA Ligation System を用いて Ligation を行った。Ligation を行ったプラスミドを用いて DH5 α を形質転換し、アンピシリンを含む LB 培地に播種し、24 時間培養した。得られたコロニーに対して、QIAGEN MiniPrep を用いてプラスミドを抽出し、制限酵素で切断後、電気泳動にて確認した。

(2)大量発現

クローニングにて作成した発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、固体培地に播種後、37°Cで一晩培養する。その後、シングルコロニーを 20mL の LB 培地に移し、37°Cで一晩培養する(前培養)。1L の LB 培地に前培養液を加え、37°Cで培養する。OD₆₀₀ が 0.7 付近になったら、0.5mM IPTG とするように加え、15°Cで一晩誘導を行う。

(3)大量精製

一晩誘導を行った培養液を 8,000×g で 15 分間遠心分離後、沈殿物に対して 6M 硫酸グアニジンで懸濁し、1 時間攪拌する。攪拌後、8,000×g、15 分遠心分離を行い、上清を 5mL TALON カラムに通す。カラム内を 40mL PBS で洗浄し、その後 10mM イミダゾール液でカラム内をさらに洗浄する。その後 1M イミダゾール液を 30mL カラムに通し、タンパク質を溶出した。

4 . 研究成果

pCold-ProS2 を用いた HLA-B*13:01 発現系の構築および大量培養・精製

発現ベクターとして pCold-ProS2 を用いて発現系の構築を行った。インサートチェックの結果、pCold-ProS2 と HLA-B*13:01 遺伝子の 2 本のバンドを確認できたことから、発現系の構築に成功した。クラス I の HLA は β_2 -Microglobulin が必要なことから、 β_2 -Microglobulin に対しても pCold-ProS2 を用いた発現系の構築を行った。インサートチェックの結果、pCold-ProS2 と β_2 -Microglobulin 遺伝子の 2 本のバンドを確認できたことから、発現系の構築に成功した。

HLA-B*13:01 発現ベクターを用いて BL21(DE3)を形質転換し、大量培養・誘導後、アフィニティークロマトグラフィーを行った。電気泳動を行った結果、1M イミダゾール溶出液にて HLA-B*13:01 を得ることに成功した(図 2)。

- ①溶菌後
- ②遠心上清
- ③カラム素通り
- ④緩衝液洗浄
- ⑤20mMイミダゾール
- ⑥1Mイミダゾール

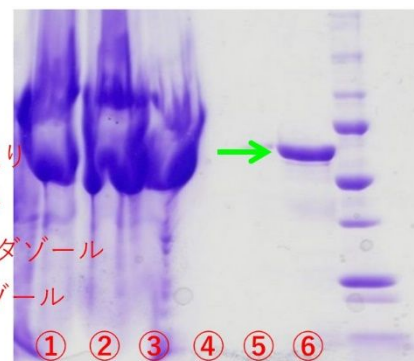


図2 HLA-B*13:01単独の精製結果

次に β_2 -Microglobulin に対しても同様に発現系を構築し、発現ベクターを用いて BL21(DE3) を形質転換し、大量培養・誘導後、アフィニティークロマトグラフィーを行った結果、1M イミダゾール溶出液に β_2 -Microglobulin を得ることに成功した(図3)。

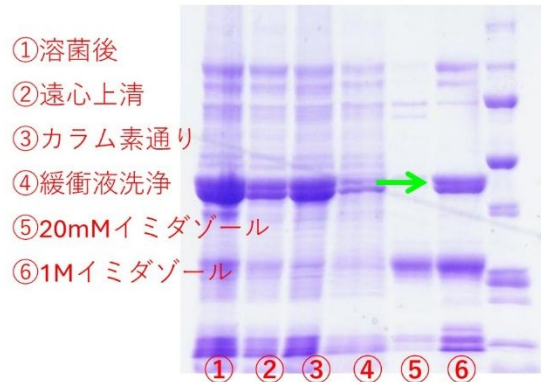


図3 β_2 -Microglobulin単独の精製結果

精製した HLA-B*13:01 および β_2 -Microglobulin を混合し、ProS2 タグを切断するために Turbo 3C Protease を加え、4°Cで 15 時間反応させた。反応液を濃縮し、Superdex 75pg カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、ピークが一つしか確認できず、電気泳動で確認した結果、ProS2 タグであったことが分かった(図4) このことから、HLA-B*13:01 と β_2 -Microglobulin は複合体を形成していないことが分かった。タグが複合体の形成を阻害していることが考えられるので、次にタグがついていない発現系で実験を行った。

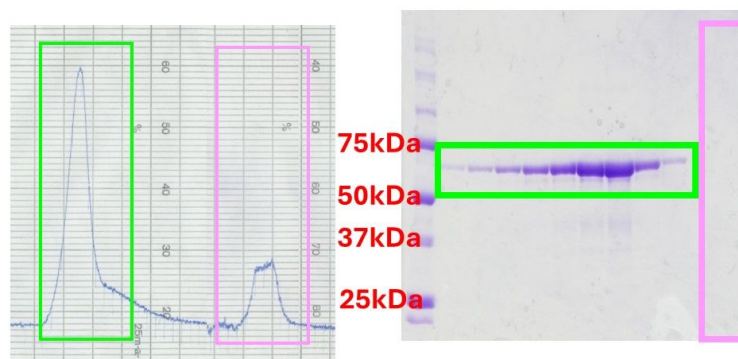


図4 ゲルろ過クロマトグラフィーの複合体形成実験結果

pGMT7 を用いたタグ無 HLA-B*13:01 の大量培養・精製

北海道大学薬学研究院生体分子機能学研究室田所高志博士に作成いただいた pGMT7 に組み込まれた HLA-B*13:01 発現ベクターを用いて HLA-B*13:01 の大量発現を行った。HLA-B*13:01 発現ベクターを用いて BL21(DE3)pLysS を形質転換し、37°Cで培養し、OD₆₀₀ が 0.7 付近になったら 0.5mM IPTG となるように加え、5 時間 37°Cで誘導を行った。培養液を 8,000×g で遠心し、超音波破碎後、電気泳動で確認した。その結果、IPTG 誘導を行った条件で、不溶性画分に HLA-B*13:01 を

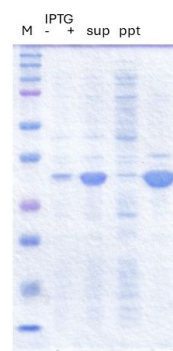


図5 pGMT7発現ベクターを用いたHLA-B*13:01単独の発現確認

確認することができた (図5)。

β_2 -Microglobulin についても同様に田所博士に作成いただいた発現ベクターを用いて BL21(DE3)を形質転換し、37°Cで培養・誘導を行った。培養液を 8,000×g で遠心後、超音波破碎を行い、遠心後、不溶性画分に対して 6M 硫酸グアニジンを用いて可溶化した。

6M 硫酸グアニジン溶液下に含まれる HLA-B*13:01 (0.2 μ mol, 6.5 mg)および β_2 -Microglobulin (0.4 μ mol, 5.4 mg)を 500mL の緩衝液(20 mM TrisHCl pH 8.0, 100 mM NaCl)中で透析し、Refolding を行った。Refolding 溶液を濃縮し、Superdex 75pg カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その結果、pClod-ProS2 タグでの発現系と同様に、HLA-B*13:01 と β_2 -Microglobulin の複合体を得ることが出来なかった (図6)。

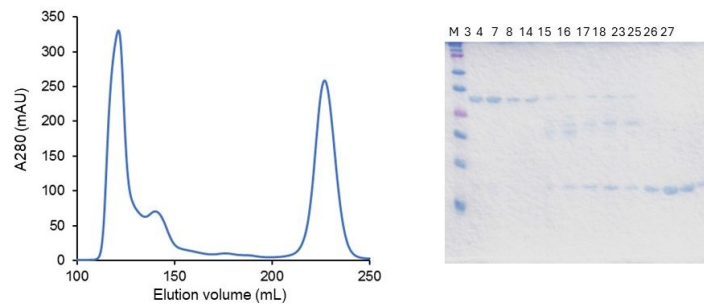


図6 ゲルろ過クロマトグラフィーの複合体形成実験結果

以上の結果より、HLA-B*13:01 および β_2 -Microglobulin を各々精製することに成功した。しかし、両者の複合体構造を得ることが出来なかった。今後、複合体構造を得るために、Refolding を行う際に、ペプチドを入れて行うなどの工夫が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kusakabe Yoshio, Moriya Shun-Suke, Sugiyama Toru, Miyata Yoshiki	4. 巻 90
2. 論文標題 Isolation and identification of the new baicalin target protein to develop flavonoid structure-based therapeutic agents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117362 ~ 117362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2023.117362	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshio Kusakabe, Akito Hasegawa, Hiroomi Hosaka, Takayoshi Sakurai, Chisato Sunaga, Buntaro Yamaguchi, Naohiro Sakai, Kae Kobayashi, Natsumi Hama, Riichiro Abe, Hideaki Watanabe
2. 発表標題 The effect of Baicalin on Annexin A1 in Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis
3. 学会等名 11th International Congress of Cutaneous Adverse Drug Reactions（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kae Kobayashi, Mikiko Tohyama, Chisato Sunaga, Hiroomi Hosaka, Yoshio Kusakabe, Hideaki Watanabe
2. 発表標題 Drug eruption caused by anti-androgen drugs and reports of Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japan.
3. 学会等名 25th World Congress of Dermatology Singapore 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshio Kusakabe, Akito Hasegawa, Hiroomi Hosaka, Takayoshi Sakurai, Chisato Sunaga, Buntaro Yamaguchi, Naohiro Sakai, Kae Kobayashi, Natsumi Hama, Riichiro Abe, Hideaki Watanabe
2. 発表標題 The role of Baicalin on Annexin A1 in Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis
3. 学会等名 SJS/TEN2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究テーマについて、第123回日本皮膚科学会総会にて口頭発表を行った結果、学会優秀演題賞を受賞した。

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
研究協力者	渡辺 秀晃 (Watanabe Hideaki)	昭和大学医学部横浜市北部病院・皮膚科学・教授	

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
---------	---------