

学位論文題名

マウスクラスII MHC分子のアレル特異的抗原結合部位の解析

学位論文内容の要旨

はじめに

抗原は抗原提示細胞(APC)の中に取り込まれ、分解処理されてペプチドになる。このペプチドが主要組織適合抗原(MHC)分子に結合し、MHC分子とともに細胞表面に輸送、発現されて、T細胞に認識される。従って、抗原特異的T細胞の活性化には、T細胞レセプター(TCR)、MHC分子、抗原性ペプチド間の三分子複合体形成が必要である。しかし、高度な多形性を示すMHC分子と結合し、T細胞反応を惹起できるペプチド抗原は、一定のアミノ酸配列を持つものに限られる。

MHCクラスII分子と結合するペプチドは、15から20個のアミノ酸より成っており、クラスII分子上の抗原結合溝内のポケットにアミノ酸側鎖を入れて結合を安定にしている。ただし、クラスIIの対立遺伝子(アレル)産物間でポケットを形成するアミノ酸に変異があるので、ポケット構造も異なり、結合するペプチドの種類も異なる。従って、ペプチド上のMHC結合部位(アグレトープ)に対応するMHC分子上のペプチド結合部位(デセトープ)を同定することは、重要である。今回は、これまで著者の教室の研究で明らかになっているハトチトクロームcの43番から58番残基由来のp43-58およびp43-58類似ペプチド上のアグレトープに対応する、I-A分子上のデセトープを決定した。

材料及び方法

- 1) ペプチド: ペプチドは、自動ペプチド合成機430A (Applied Biosystems)で合成し、HPLCにて95%以上に精製した。ペプチドのアミノ酸構成は、質量分析装置JMS-HX110 (JEOL)を用いて確認した。
- 2) T細胞ハイブリドーマ: T細胞ハイブリドーマKE17-1およびKE45-13はB10.A(4R)マウスを46D50E54R (20nmol)、またハイブリドーマBD5-8はB10マウスをp43-58 (20nmol)で免疫し、通常の方法で作成した。各種ペプチドに対する反応性は、ハイブリドーマ(1×10^5 /well)をペプチドおよびAPC (2×10^5 /well)と共に24時間培養し、培養上清中のIL-2産生量により表わした。IL-2の定量は、IL-2依存性細胞CTLL-2の $[^3\text{H}]$ -thymidine取り込みで行った。
- 3) L細胞トランスフェクタント: I-A^bとI-A^kの各領域(α 鎖シート、 α 鎖ヘリックス前半・後半、 β 鎖シート、 β 鎖ヘリックス)を組み合わせ合成したリコンビナントI-A遺伝子を導入

した細胞 (Braunstein博士、Columbia Universityより供与)と、I-A^k鎖の53,56,57,59番残基に点突然変異を加えた遺伝子(Mathis博士、Institut de Chimie Biologique Faculté de Médecineより供与)を導入したL細胞を使用した。

4) ペプチド結合の競合的抑制試験：I-Aトランスフェクタント(5×10^5)を、インヒビターの46D50E54Aまたは46F50E54A (300mM)と共に37°Cで30分培養後、インディケーターとして用いたビオチン化46D50E54Aまたはビオチン化46F50E54A (30mM)と共に37°C、3時間培養した。続いて、phycoerythrin-conjugated streptavidin (PE-SA, Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL)で4°C、30分間染色した。染色の強度を増強するため、ビオチン化抗streptavidin抗体 (Vector Lab., Buringame, CA)、そして再びPE-SAで染色した。

結果

当教室の以前の実験から以下のことが判明している。1) p43-58、およびその類似ペプチド上の46番と54番残基はアグレトープとして作用し、47番から53番残基は主としてエピトープ (TCRと結合する部位) として機能する。2) p43-58のエピトープである50番残基をグルタミン酸に置換したペプチド50Eも、A^bマウスにおいて免疫原性を示す。3) 50Eの46番残基にフェニルアラニン(F)を持ち、かつ54番残基にアラニン(A)を持つペプチド46F50E54Aが、50EよりもA^b分子に強く結合する。4) 一方、50EはA^kマウスにおいて免疫原性を示さないが、46番残基をアスパラギン酸(D)、54番残基をアラニンに置換したペプチド46D50E54Aは、A^kマウスに対して有意のT細胞反応を誘導する。今回は、p43-58類似ペプチド上のアグレトープに対応するI-A分子上のデセトープを決定するために、リコンビナントI-A分子およびミュータントI-A分子を使用した解析を行った。その結果以下のことが判明した。

1) I-A分子の抗原結合溝の一方の側壁を形成するα鎖のαヘリックス部分の前半が、ペプチド結合に重要であることが判明した。すなわち、この部分がA^k由来のリコンビナントI-A分子では他の部分の由来にかかわらず、A^kに結合するペプチド46D50E54Aが結合した。逆に、α鎖のαヘリックス部分の前半がA^b由来のリコンビナントI-A分子には、A^bに結合するペプチド46F50E54Aが結合した。

2) α鎖のαヘリックス部分の前半では、A^kとA^bの間では53、56、57、59番残基にアミノ酸の差異が認められた。そこで、これらの残基を置換した変異I-A分子に対するペプチドの結合性を検討した。その結果、A^kに結合するペプチド46D50E54Aは、I-A^k分子と同じアルギニン(arginine)をα鎖の56番残基に持つI-A分子に結合し、一方A^bに結合するペプチド46F50E54Aは、I-A^b分子と同じアラニン(alanine)をα鎖の56番残基に持つI-A分子に結合することが判明した。

3) 上記の結合試験の結果は、T細胞ハイブリドーマを使用した機能的解析の結果と一致した。特に、T細胞ハイブリドーマKE17-1は、α鎖56番残基がアルギニンであるI-A分子より提示された46D50E54Aに反応し、α鎖56番残基がアラニンであるI-A分子より提示された46F50E54Aに反応した。

考察

I-A^b, k分子 α 鎖の56番残基のアミノ酸が、p43-58類似ペプチド上のアグレトープである46番残基のアミノ酸と結合し、結合するペプチドの特異性を決定すると考えられた。I-A分子 α 鎖の56番残基は、ヒトMHCクラスII分子で示されたポケット1を形成する残基に相当し、ポケット1がペプチドとの結合に重要であるとのデータと一致した。これらの知見は、ペプチドに対する免疫反応を誘導したり、ペプチドワクチンを作成するための重要な基礎データになると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

マウスクラスⅡ MHC 分子のアレル特異的抗原結合部位の解析

蛋白抗原は、抗原提示細胞に取り込まれ、分解処理されてペプチド分子となる。このペプチド分子が、主要組織適合抗原(MHC)分子と結合した時始めて、T細胞に提示され、T細胞を刺激することができる。従って分解されたペプチド分子がMHCと結合するか否かは、元の蛋白が抗原性を示すか否かの決定因子となる。

本論文は、これまでMHC分子との結合様式が、詳細に解明されてきたハトチトクローム c 43-58(p43-58)アナログ分子を用い、ペプチド結合において働くMHCクラスⅡ分子のポケット部位のキーアミノ酸を同定することを目的とした。p43-58アナログのうち、MHCに結合するアグレトープの46番残基がフェニルアラニンの46F50E54A(46F)はA^b分子、46番残基がアスパラギン酸である46D50E54A(46D)は、A^k分子と強く結合する。A^kとA^b分子間のリコンビナントcDNAを作製して、L細胞にトランスフェクトし、A^b/A^kリコンビナント分子を発現させた。これらのトランスフェクタントと、46Fと46Dとの結合性を直接結合試験とT細胞ハイブリドーマを用いた機能試験を併用して解析した。

その結果、I-A分子の α 鎖 α ヘリックス前半が、p43-58アナログペプチドのアグレトープ46番残基と結合する部位であることが判明した。A^kとA^b分子間で、 α 鎖 α ヘリックス前半には、53, 56, 57, 59番の4つのアミノ酸置換がある。そこでA^k分子の4つのアミノ酸を1個ずつ置換して、46F, 46Dとの結合性の変化を調べた。A^k分子上の56番残基をA^bと同じアラニンに置換したA^k(56A)は、他のアミノ酸は全てA^k分子と同一にもかかわらず、46Fを結合し、A^bタイプの結合性に变化した。以上の結果は、T細胞ハイブリドーマを用いた機能試験の結果と完全に一致した。即ち、I-A分子の56番残基のアミノ酸は、アレル特異的にペプチド抗原を結合するポケットの、キーアミノ酸と結論された。

学位論文発表は、30名を越える聴衆の参加のもと行われた。上出教授より、p43-58以外の抗原系でもI-A分子の56番残基が重要と云えるのか、56番目のアミノ酸置換によりポケットの構造に変化はないのか、T細胞ハイブリドーマを用いてIL-2産生を計測するアッセイ系で問題はないか、柿沼教授よりMHC拘束に関わるMHC上の構造、リコンビナントやミュータントI-A分子をトランスフェクトする時のコンストラクトについて、トランスフェクタントと正常の抗原提示細胞上のI-A分子の発現量について、ヒトのMHCでもマウスと同様の

ことが通用するのか、生田教授より、ウィルスの免疫系からのエスケープ機構としてミューテーションがあるが、エピトープとアグレトープとどちらのミューテーションが実際働いているのか等の質問があった。これらに対して申請者は適切に回答し得た。

以上、本論文は抗原提示において最も重要な働きをする、MHC分子の抗原結合構造の詳細を明らかにした。これらの成果は将来種々のヒト免疫疾患の治療、ワクチン合成など、医学の分野で大いに活用されるもので、博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。