

ペプチドでTリンパ球の特異性をさぐる

「場と反応」領域 宇高 恵子

1. 背景

Tリンパ球による抗原認識の分子機構

免疫系は多様な抗原のそれぞれに対し特異的な抗原受容体を用意して対応する。抗体分子とTリンパ球の抗原レセプター（TCR）は、どちらもランダムな遺伝子組み換えにより、個々に異なる特異性をもつ抗原受容体のレパートリーを獲得するが、前者が抗原そのものに結合するのに対し、後者はもっぱらウイルス感染細胞やガン細胞など、変調を来した自己の細胞に反応する。これは、TCRが認識できる抗原の範囲が自己の細胞上の主要組織適合性抗原

(MHC : Major Histocompatibility Complex) 分子とそれに結合した抗原ペプチドに限られているからである (図1)。MHCクラスI分子 (MHC-I) は、細胞内で分解されたタンパク質の断片であるペプチド (8~9個のアミノ酸が連なったもの) を結合し、細胞障害性Tリンパ球 (CTL) に提示する。MHC-Iには人ごとに異なる型があり、提示できる抗原の種類が異なるため、病気に対する抵抗性に大きく影響する。MHC-I自身には自己由来のペプチドと抗原由来のそれとを見分ける能力がなく、また、MHC-Iの構造はペプチドの会合なしでは不安定であるので、細胞表面のMHC-Iは通常、自己の正常なタンパク質由来の多様なペプチドを結合している。ウイルス感染細胞やガン細胞では、ウイルスやガン性変化に由来するペプチドが提示されるが、その場合でも抗原ペプチドをのせたMHC-Iは全MHC-Iの1%にも満たない。

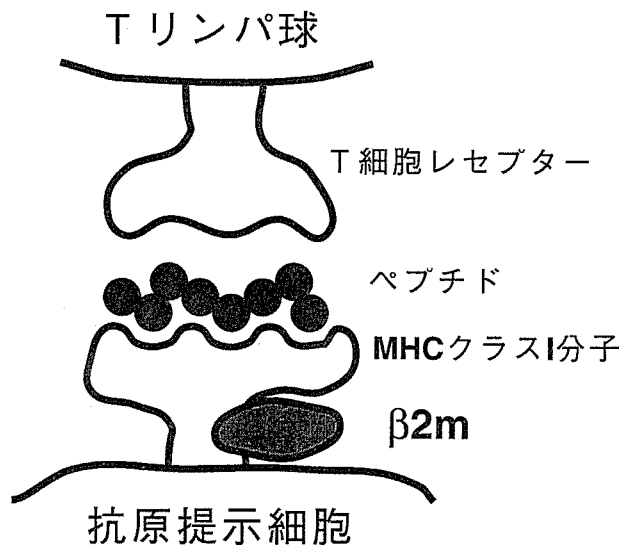


図1 Tリンパ球による抗原認識

2. 研究のねらい／目的

(1) 1分子レベルでの見分けの研究

a. MHC-Iとペプチドの会合の特異性をさぐる

MHC-Iの型ごとに異なる結合ペプチドをより正確に予想して、ウイルスやガンに対するワクチンの開発に貢献する。

b. TCRとMHC-ペプチド複合体の会合の特異性をさぐる

任意のTCRについて抗原ペプチドを同定する方法を開発し、ガン抗原や自己免疫疾患の抗原の同定に貢献する。また、TCRが同じMHC-Iを共通に抗原提示分子として使いながら、その中にわずかに顔を覗かせたペプチド抗原を、いかにして自己由来の多様なペプチドから見分けるのか、TCRにとっての自己、非自己の違いについて質的、量的な理解を深める。

(2) 1細胞レベルでの見分けの研究

Tリンパ球が数百のMHC-ペプチド複合体に1個程度の頻度でしか存在しないMHC-抗原ペプチド複合体を大多数の正常な自己由来のMHC-ペプチドの中から鋭敏に見分けるしくみをさぐる。また、Tリンパ球が正常の自己に弱く反応しながらも、過って攻撃することがない理由をさぐる。

[補足説明]

Tリンパ球は胸腺内で分化する際に、自己のMHC-ペプチド複合体に強く反応するものは除去され、弱く反応するものが選択的に分化を促されて末梢のリンパ組織に出る。これに対し、自己のMHC-ペプチド複合体に全く反応できないものは分化できず胸腺内で自滅する。このことは、末梢で実際に機能しているTリンパ球は、自己の細胞上の正常なMHC-自己ペプチド複合体に弱い結合親和性を有することを示している。そもそも、TCRのMHC-抗原ペプチド複合体に対する結合親和性は、非特異的にタンパク質間で偶然に起こる会合の度合いの高々、数十から数百倍程度の、シグナル対ノイズ比が極めて低い見分けのシステムである。この狭いウインドウの中に、“弱く”反応する自己のMHC-ペプチド複合体に対する結合親和性を位置させると、Tリンパ球による自己、非自己の見分けの差はさらに狭いものとなる。私には、Tリンパ球がなぜ、このような狭い親和性の中で“綱わたり”をしながらも、正常の自己には反応せず、ごくわずかな非自己抗原に対しては鋭敏に反応できるのかが、不思議でたまらない。

3. 研究方法と成果

(1) 1分子レベルでの見分けの研究

a. MHCクラスI分子とペプチドの会合

MHC分子のように限られてはいるが、広い範囲の多様なリガンドを結合する分子の特異性を客観的に把握する方法はまだ開拓期にある。従来の、MHCから回収したペプチドに共通なアンカーアミノ酸を決定し、それらをもとに未知のペプチドに対して結合能の予想をする方法では的中率が低く、また、実際にアンカーを欠くが高い結合能を示すペプチドもあるが、それらの予想はむずかしい。

我々は、図2に示すような合成ペプチドライブラリーを用い、数種のMHC分子についてペプチドの結合の特異性を調べた。ライブラリーの命名は図書館に多様な本が並ぶように、多様なペプチド種が含まれる混合物であることに由来する。合成は共同研究者であるK.-H. Wiesmüller, S.Kienle (Univ. Tübingen)の両氏による。ライブラリーのデザインはMHC-I分子に一般的な9アミノ酸長のペプチドについて、それぞれのアミノ酸をうけるMHC-I分子上の構造を位置ごとにさぐることを目的として行った。図2のXの位置のカップリングにはCysを除く(分子間、分子内でのジスルフィド結合を防ぐため)19のアミノ酸の混合液を用いた。注目する位置についてはA,D,E...のようにそれぞれ一つのアミノ酸を結合させたサブライブラリーを19種類合成した。なお、カップリング効率はアミノ酸ごとに異なるので、この合成では定量的な解析に耐えるよう、最終的に得られたライブラリー中のXの位置にそれぞれのアミノ酸が等モルに代表されるように合成を最適化した。一般にタンパク質の構造には、それを構成するすべてのアミノ酸が大なり小なり影響を与えるので、ひとつのアミノ酸の結合に対する貢献度を単離することは難しい。しかし、近傍のアミノ酸の影響をライブラリー

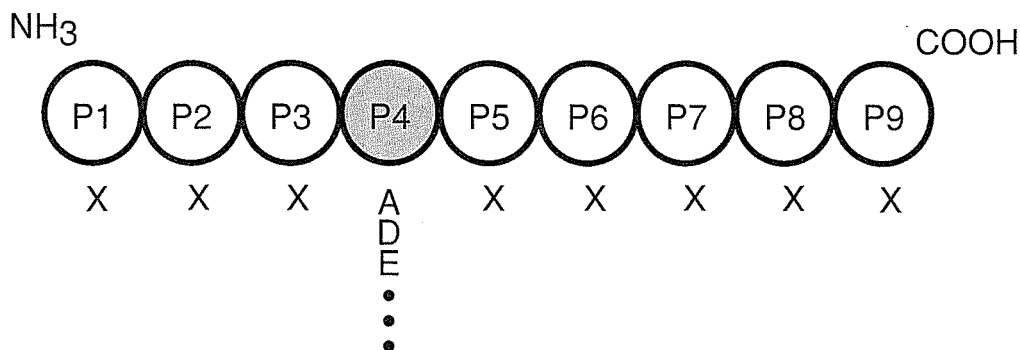


図2 9アミノ酸長ペプチドライブラリー

X : 19のアミノ酸が等モルに(同じ数ずつ)存在する位置
A, D... : あるアミノ酸に固定された位置

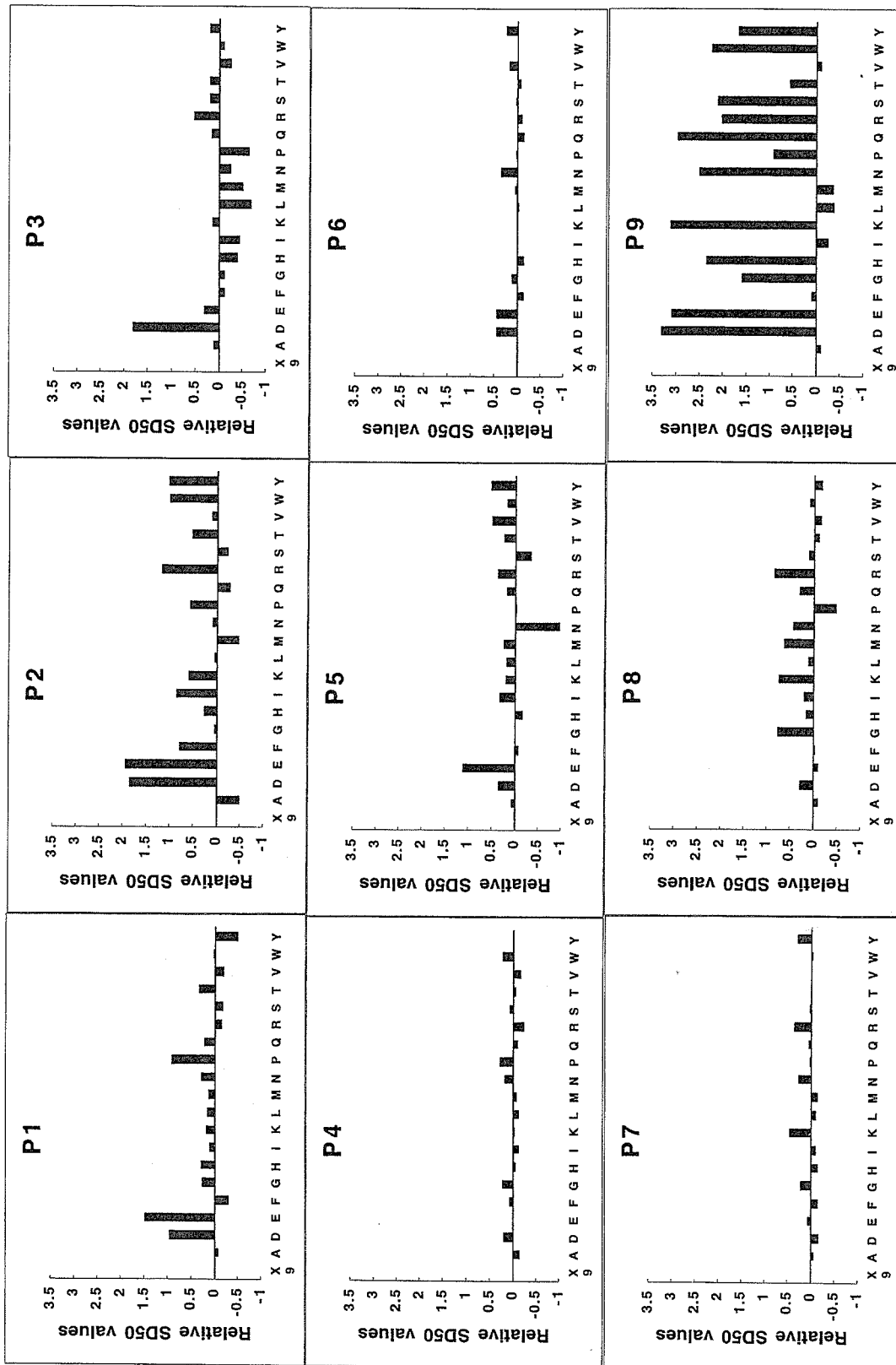


図3 OX8ライブラリーを用いて解析したMHCクラスI分子、D^bのペプチド結合の特異性

を用いることでランダム化し個々の効果を平均化してしまおう、というのがこのライブラリーの特徴である。MHC-Iへのライブラリーの結合能は空のMHC-Iへライブラリーペプチドを結合させ、ペプチドを会合したMHC-Iは熱安定性が増すことを利用して測定した。高結合能のペプチドは低濃度のペプチドでMHC-Iを安定化させることができる。図.3は50%のMHC-Iを安定化させるのに必要なペプチドのX9に対する比較濃度の対数(SD50)を示したものである。ペプチドの位置ごとに適合するアミノ酸の種類や結合に対する貢献の度合いが異なることがわかる。また、これらの結合パターンはMHC-Iの型ごとにユニークであった。

ペプチドの結合のGibb's Free Energy (DG) は、 $DG = RT + \ln(Kd)$, Kd は解離定数と表され、図3の縦軸はほぼKdの対数に相当する。もし、各々のアミノ酸がMHC-Iの対応する場所にそれぞれ比較的独立にドッキングするならば、各々のアミノ酸が供給する結合のエネルギーは加算的に扱えると予想される。そこで、縦軸の値を加算することにより任意のアミノ酸配列をもつペプチドについてMHC-Iへの結合能を予測するスコアリングの方法を考案した。この方法を用いて既知の抗原タンパク質中に存在するすべての9アミノ酸長のペプチドについてMHC-I結合スコアを与えたところ、MHC-I分子により差はあるが、自然の状態で優れた抗原となるようなペプチドは上位5位以内に予想された。また、実際に抗原となるペプチドの他にも高結合が予測されるペプチドがいくつかあげられることがわかった。これらのペ

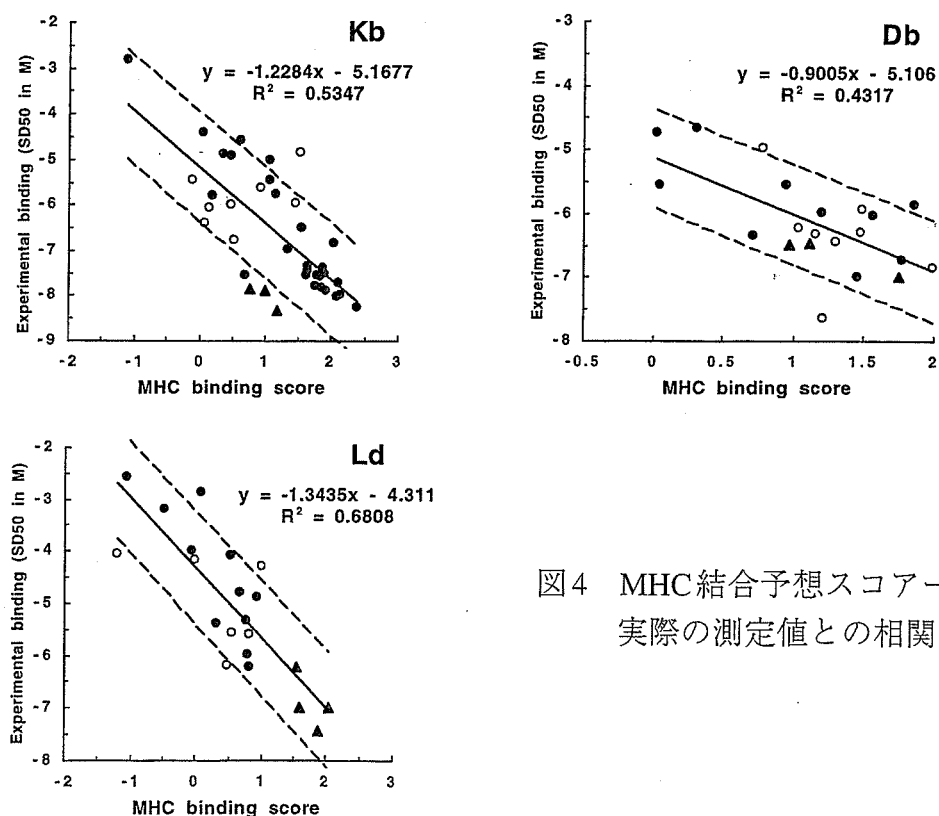


図4 MHC結合予想スコアと実際の測定値との相関

ペプチドが実際に高い結合能を示すが、細胞内でのタンパク分解によっては産生されにくいペプチドであるのか、それともスコアと実際の結合能の間には相関が低く、実際には低結合性を示すのかを調べるため、次に我々は、任意のアミノ酸配列のペプチドを数十合成し、予想結合スコアと実際の結合能の間の相関を調べた。図4に示すように、両者の間にはかなりばらつきはあるものの、直線的な相関関係があることが明らかとなった。このことから、MHC-ペプチドの会合について、統計的に有意な集団を対象にすると、個々のアミノ酸からの結合エネルギーに対する貢献はおおよそ独立、加算的に扱えることがわかった。しかし、個々のペプチドについては、おそらく近傍のアミノ酸との相互作用のために相関直線からのずれがみられることがわかった。この結果から、統計的に有意な範囲内で、予想スコアから、実際の結合値を相関直線の両側約一桁以内に予想することが80%程度の任意のペプチドについて可能となった(図4)。これを利用して異なる2種のMHC-I分子がそれぞれ提示できるペプチドのレパートリーを比較したものが図5である。各々のMHCが相重ならないユニークなレパートリーのペプチドを結合することがわかる。このような2種のMHC遺伝子を父方と母方からひとつずつ受け継いだ子どもは、たまたま両親から受け継いだMHCの型が同じであった子どもに比べてより多くの抗原に対応できることが明らかである。この生存への有利性が、MHCが長い分子進化の過程で常に遺伝的多型性(個人ごとに型が異なること)を保ち続けてきた理由のひとつであると考えられる。

次に、このスコアリングの方法を用いて、ガン特異的なTリンパ球を誘導するペプチドを探すことを試みた(大阪大第3内科の杉山、岡両氏との共同研究)。人の骨髄性白血病細胞に高い発現のみられる転写因子について

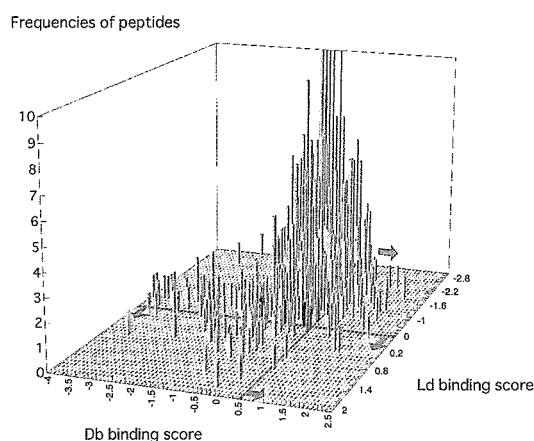


図5 異なるMHCクラスI分子が提示できるペプチドのレパートリーには重なりが少ない。MHC分子、D^b、L^dに結合できるペプチドの頻度を垂直方向の棒で表した。←が優位な抗原となりうるペプチドのD^b、L^dに対する結合能に相当する領域を示す。

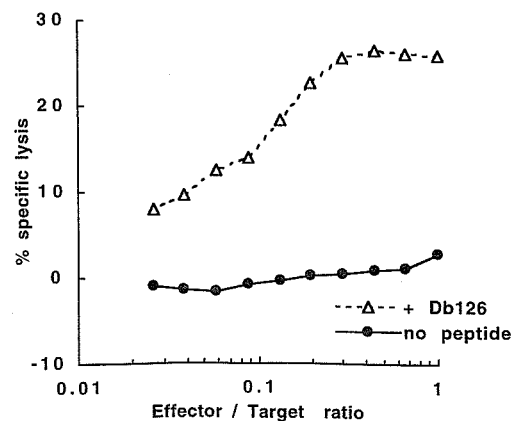


図6 D^b126ペプチド特異的CTLの誘導

MHC-Iに結合すると予想された上位5種のペプチドにつきTリンパ球の誘導を試みたところ、うち1つが効率よくTリンパ球を誘導できることがわかった(図6)。現在、誘導されたTリンパ球に実際にガン細胞を殺す能力があるかどうかを確かめている。

b. T細胞レセプター (TCR) と MHC-ペプチド複合体の会合の特異性

次に、ライブラリーを用いてペプチドの位置ごとにアミノ酸のMHC-Iへの適合度を調べる方法を、TCRの抗原特異性をさぐることに応用した。試した数個のTリンパ球について、すべて認識できるペプチドを予想することができた。また、抗原ペプチドの他に、自己のMHCに結合して弱く認識される自己ペプチドを推定するのにも役立った。現在、これらの自己ペプチドが、胸腺内でT細胞の選択的な分化誘導に貢献している可能性について検討を進めている。

(2) 1細胞レベルでの見分けの研究

抗原認識の場においては、抗原提示細胞上に1つのTCRに強く認識されるMHC-抗原ペプチド複合体と、弱く認識される自己ペプチドとの複合体が共存する場合が一般的である。この場合にはTリンパ球の活性化が起こり、後者のみが存在する正常の細胞上では活性化は起こらない(正常な自己は攻撃しない)。ライブラリーを用いてデザインしたペプチドの変異体を使ってこの分子メカニズムを探ったところ、弱く結合するMHC複合体はCD8というTCRによる認識を助ける分子を動員できず、細胞内にかえって活性化を抑えるようなシグナルを送るが、抗原ペプチドにTCRが強く結合し、近傍にある弱く結合するMHCとの会合も強められるような状況下では、弱い結合性のMHCもCD8を動員することができるようになり、抗原認識を促進することが示唆された。これは、Tリンパ球が非特異的な弱い結合では容易に活性化されないが、強い結合がわずかに起こると効率よく活性化されるしくみをうまく説明しているように思われる。

4. 今後の展望

1. いろいろな型のMHC分子についてライブラリーの結合結果のデータベースを作成し、ガンやウイルス、マラリヤ等に対する有効なワクチンの開発を助けたい。ライブラリーによる解析でカバーしきれない多様なMHC分子の特異性については、コンピューターモデリングを利用してペプチド結合能を予測する方法について研究を進めたい。

2. Tリンパ球の抗原レセプターは単なる on / off のスイッチではなく、結合の強さを見分けて異なる対応をする。このようなレセプターは生物のしくみのなかでもユニークなもののひとつであり、その分子機構はまだ明らかにされていない。ライブラリーを用いて結合の強さの異なるペプチドを自由にデザインできる有利性を活かして、また、酵母で作成した可溶性MHC分子を用いてTCRに認識される構造の解析と、結合親和性の測定と対応させながら、TCRへのシグナルの入り方について研究を進めたい。これは、自己、非自己の見分けに障害のある自己免疫疾患について理解を深めることにも通じる。

5. 発表リスト

論文

1. Decrypting the structure of cytotoxic T lymphocyte epitopes with complex peptide libraries. K.Udaka, K.-H. Wiesmüller, S.Kienle, G.Jung and P. Walden. in Current Topics of Molecular Evolution, P.189-197. 1996
2. Impaired induction of cytotoxic T lymphocytes by antagonism of a weak agonist borne by a variant hepatitis C virus epitope. T. Kaneko, T. Moriyama, K. Udaka, K. Hiroishi, H. Kita, H. Okamoto, H. Yagita, K. Okumura and M. Imawari. Eur. J.Immunol. 27, 1782-1787. 1997.
3. Transplanted and transfected Dystrophin protein stimulates the proliferation of lymphocytes of mdx mice and induces cytotoxic activities against Dystrophin -positive muscle. Y.Ohtsuka, K.Udaka, Y.Yamashita, H.Yagista, K.Yabuta and K.Okumura. submitted,
4. Repertoire overlap of peptide ligands is small between different MHC class I molecules. K.Udaka, S.Kienle, K.-H. Wiesmüller, H.Tamamura, H.Yamagishi, K.Okumura , T.Kawasaki. manuscript in preparation,
5. Dominant negative effect of CD8 non-binding MHC class I molecules in antigen recognition by cytotoxic T lymphocytes. K.Udaka, M.Endo, S.Kienle, K.-H. Wiesmüller, N.Aoki, H.Tamamura, H.Yamagishi, K.Okumura. manuscript in preparation,
6. A novel male specific peptide recognized by a transgenic cytotoxic T lymphocyte. K.Udaka, N.Aoki, K.Kakugawa, S.Kienle, K.-H. Wiesmüller, H.Tamamura, H.Yamagishi. manuscript in preparation,

総論、解説

1. Decrypting class I MHC-bound peptides with peptide libraries. K. Udaka, TiBS(Trends in Biochemical Sciences) 21, 7-11. 1996.

その他 4 件