

平成28年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	レトロウイルス感染阻止に関わる T 細胞の分子認識機構の解明	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部 免疫学教室 助教 本園千尋 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

レトロウイルス感染阻止に関わる CD4 陽性 T 細胞から同定した TCR をモデルとして、1) TCR-ペプチド・MHC クラス II 複合体 (pMHCII) 相互作用の動力的・熱力学的解析、ならびに、2) TCR-pMHCII の結晶構造解析により、レトロウイルス感染制御に関わる TCR-pMHCII 相互作用の特性について、物理パラメーターならびに結晶構造の両面から分子機序の解明を目指す。

2. 研究経過及び成果

我々は免疫系が完成した成体マウスに致死性の赤白血病を誘発するフレンド白血病ウイルスをモデルとして、レトロウイルス感染制御に関わる CD4 陽性 T 細胞応答について解析を進めてきた。その成果として、発症感受性の (BALB/c × C57BL/6)F1 マウスに強い感染防御能を誘導する抗原エピトープとして、i18 ペプチド (FV env462-479: HPPSYVYSQFEKSYRHKR) を同定し、唯一回の免疫操作でレトロウイルス感染に対し強い抵抗性が誘導出来ることを示した (Miyazawa, M. et al. J. Immunol. 148: 748-758, 1995)。さらに、我々は抗原特異的な CD4 陽性 T 細胞応答の解析ツールとして、ペプチド・MHC Class II 四量複合体 (MHC II テトラマー) を独自に調製することに成功し、i18 特異的 CD4 陽性 T 細胞の TCR のレパトリーについて詳細な解析を行った。その結果、i18 特異的 CD4 陽性 T 細胞から同定した TCR の種類はマウス個体間 (N=5) で全く異なっていた。さらに興味深いことに、各個体内の TCR のレパトリーは非常に限定されており、約 70% 以上が同一の TCR で構成されていた (未発表データ)。これらの結果は、弱い感染防御能しか与えない fn ペプチド (FV env121-141: DEPLTSLTPRCNTAWNRLKL) に特異的な TCR レパトリーが、個体間ならびに個体内において多様性に富んでいる結果と相反している。以上より、強い感染防御能を有する i18 ペプチドで誘導した CD4 陽性 T 細胞は、各個体間によって異なり、且つ、個体内で極めて限定された TCR を有することが明らかになった。このことは、i18 ペプチドは複数の異なる TCR に認識されやすい構造的な性質を有していることが示唆している。

そこで複数の結合能が異なる i18 特異的 TCR に着目し、レトロウイルスベクターを用いてマウス T 細胞に遺伝子導入し、T 細胞上に TCR が再構成できるか MHC II テトラマーに対する結合能を指標として調べた。その結果、i4-TCR は T 細胞表面に再構成されることが明らかになった。また実際に i4-TCR を再構成した T 細胞は i18 ペプチドをパルスした細胞に対して IFN-g の産生を認めた。このことから、i18 特異的 TCR は機能的にマウス T 細胞の表面に再構成されることが明らかになった。さらに i18 特異的 TCR の交差反応性を明らかにするため、アラニン置換した i18 ペプチドに対する応答性を調べた。その結果、i18 ペプチドの N 末端ならびに C 末端側のアラニン置換に対して認識能を維持していたが、中央部分のアラニン置換に対して認識が低下していた。このことから、i18 特異的 TCR の認識には i18 ペプチドの中央部分のアミノ酸が重要であることが示唆された。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

1. 可溶性 TCR ならびに pMHCII 蛋白質の調製

可溶性 i18 特異的 TCR 蛋白質を大腸菌の発現系を用いて調製を行う。

2. TCR-pMHCII 相互作用の動力的解析

調製した TCR ならびに pMHCII 蛋白質を用いて、Biacore で TCR-pMHCII 相互作用の動力的解析を行う。結合速度定数(K_{on})ならびに解離速度定数(K_{off})のパラメーターを算出し、解離定数($K_d = K_{off}/K_{on}$)を指標として、結合の強さを評価する。

3. TCR-pMHCII 相互作用の熱動的解析および結晶構造解析 (Cardiff 大学での実験)

等温滴定型熱量測定を用いて、TCR-pMHCII 相互作用について熱動的解析を行う。解離定数 K_d に加えて、エンタルピー変化 (ΔH) ならびにエントロピー変化 (ΔS) を算出し、それらを指標として TCR-pMHCII 相互作用の熱動的安定性について評価する。また TCR-pMHCII の結晶構造解析により、i18 ペプチドのどのアミノ酸部位が各 TCR に認識されているのか、その全体像を原子レベルで明らかにする。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第16回国際免疫学会 (豪州)	口頭発表	2016年8月25日