

博士論文

HIV の変異と特異的 T 細胞受容体の  
分子間相互作用の研究

清水 晃尚

## 目次

略号.....	2 - 3
第 1 章 序論.....	4 - 8
図表 .....	9 - 14
第 2 章 T 細胞受容体と Nef138-10 エピトープの相互作用解析	
2.1 概要.....	15
2.2 材料と方法.....	15 - 23
2.3 結果.....	23 - 32
2.4 考察.....	32 - 34
図表 .....	35 - 60
第 3 章 Nef138-10(6L)変異によるエスケープ機構の解明	
3.1 概要.....	61
3.2 材料と方法.....	62
3.3 結果.....	62 - 65
3.4 考察.....	65 - 66
図表 .....	67 - 73
第 4 章 総括.....	74 - 76
図表 .....	77
参考文献.....	78 - 83
謝辞.....	84

## その他の略号

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (後天性免疫不全症候群)
$\beta$ -ME	2-mercaptoethanol
$\beta_2m$	$\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ -ミクログロブリン)
BSP	BirA substrate peptide
CBB	Coomassie brilliant blue
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (細胞傷害性 T 細胞)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1 (ヒト免疫不全ウイルス 1 型) ※ 本論文では、HIV-1 を HIV と記載する。
HLA	Human leukocyte antigen (ヒト白血球抗原)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate
MHC	Major histocompatibility complex (主要組織適合遺伝子複合体)
MPD	2-methyl-2,4-pentanediol
Nef	Negative Factor
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
SC	Shape complementarity
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIV	Simian immunodeficiency virus (サル免疫不全ウイルス)
TCR	T cell receptor (T 細胞受容体)
Tris	Tris hydroxymethyl aminomethane

## アミノ酸の略号

A	(Ala)	Alanine	アラニン
R	(Arg)	Arginine	アルギニン
N	(Asn)	Asparagine	アスパラギン
D	(Asp)	Aspartic acid	アスパラギン酸
C	(Cys)	Cysteine	システイン
Q	(Gln)	Glutamine	グルタミン
E	(Glu)	Glutamic acid	グルタミン酸
G	(Gly)	Glycine	グリシン
H	(His)	Histidine	ヒスチジン
I	(Ile)	Isoleucine	イソロイシン
L	(Leu)	Leucine	ロイシン
K	(Lys)	Lysine	リシン
M	(Met)	Methionine	メチオニン
F	(Phe)	Phenylalanine	フェニルアラニン
P	(Pro)	Proline	プロリン
S	(Ser)	Serine	セリン
T	(Thr)	Threonine	トレオニン
W	(Trp)	Tryptophan	トリプトファン
Y	(Tyr)	Tyrosine	チロシン
V	(Val)	Valine	バリン

## 第 1 章 序論

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (Human immunodeficiency virus type 1、HIV-1、本論文では HIV と表記する) は、後天性免疫不全症候群 (Acquired immunodeficiency syndrome、AIDS) の原因ウイルスである。HIV はレトロウイルス科レンチウイルス亜科 (Retroviridae Lentivirus) に属し、一本鎖 RNA をゲノムとして持つ。そしてレトロウイルスに共通な構造タンパク質をコードする 3 つの遺伝子 (gag、pol、env) に加えて、6 つのアクセサリ遺伝子 (*tat*、*rev*、*vif*、*vpr*、*vpu*、*nef*) を有する。HIV がゲノム複製に用いる逆転写酵素はエラー頻度が高く、1 回の複製で平均 1 箇所の変異が起こる (1)。さらに一日あたり約  $1 \times 10^{10}$  個のウイルス粒子が産生されるので、HIV は感染個体内で種々の変異をもつ多様なウイルス集団として準種を形成する (2)。

HIV が主に感染するのは免疫系において中心的な役割を担う CD4 陽性 T 細胞である。HIV は感染後、CD4 陽性 T 細胞を破壊し減少させ、やがて免疫系の破綻を引き起こす。HIV 感染は急性感染期、慢性感染期、AIDS 発症期からなる 3 つの過程に分けることができ (図 1-1)、急性感染期では HIV 感染者の個体内で HIV に特異的な細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T lymphocyte、CTL) が出現し、最大で全 CD8 陽性 T 細胞中の約 10% 以上まで増加することが報告されている (3)。それにより血中のウイルス量は急速に減少するが、体内から HIV が完全に排除されることはない。その後ウイルス量の減少に伴い HIV 特異的 CTL も減少し、HIV と免疫系が拮抗した状態である慢性感染期が長期に渡り続くが、やがて免疫系が破綻することで免疫不全状態である AIDS 発症期となる。

CTL は HIV 抑制のコントロールに重要な役割を果たしていると考えられており (4-8)、サル免疫不全ウイルス (Simian immunodeficiency virus、SIV) を用いた動

物モデル感染系においては、サルエイズモデルに抗 CD8 抗体を投与し、血中の CTL を枯渇状態にさせるとウイルス量が増加することが報告されている(9, 10)。

CTL は感染細胞から抗原を提示されることで細胞傷害作用が誘導される。ウイルスに感染した細胞内ではウイルス由来のタンパク質が発現し、細胞質にあるプロテアソームで 8~11 アミノ酸からなるペプチド断片に分解(プロセッシング)される。それらのペプチド断片の一部は小胞体(Endoplasmic reticulum、ER)膜に存在する抗原処理関連トランスポーター(Transporter associated with antigen processing、TAP)を介して、細胞質から ER 内腔に輸送される。ER 内腔でペプチド断片は MHC(Major histocompatibility complex、主要組織適合遺伝子複合体) class I のペプチド収容溝に結合し、ペプチド/MHC class I 複合体(pMHC)が形成される。pMHC はゴルジ体を経由してウイルス感染細胞表面へと輸送され、CTL に対して抗原提示をおこなう(図 1-2)(11, 12)。

CTLは細胞膜上に $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖から構成されるT細胞受容体(T cell receptor、TCR)を発現しており、TCRを介してpMHCを認識する(図1-3)。そして感染細胞に対して細胞傷害顆粒であるパーフォリンやグランザイムを細胞外に放出する。パーフォリンは細胞膜を貫通させ、グランザイムによりアポトーシスを誘導することで、感染細胞が破壊されウイルスは排除される。

TCRは抗体と同じく免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、抗原認識に重要な可変領域と多様性に乏しい定常領域から構成されている。可変領域はT細胞の分化過程で体細胞遺伝子組み換えにより多様性を獲得することでMHCによって提示されたウイルスや細菌由来の様々なペプチド断片を非自己として認識することが可能となる。TCRの $\alpha$ 鎖遺伝子はV $\alpha$ (Variable)遺伝子断片とJ $\alpha$ (Joining)遺伝子断片、 $\beta$ 鎖遺伝子はV $\alpha$ とD $\beta$ (Diversity)とJ $\beta$ 遺伝子断片によってコードされている。遺伝子再構成の際にそれぞれの遺伝子断片の結合部において塩基が不規則に付加あるいは

削除されることでTCRは $10^{15}$ 以上もの異なる多様性を獲得する(13, 14)。TCRの $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖の変領域には相補性決定領域(Complementarity Determining Region、CDR)と呼ばれるpMHCとの結合に重要なループ構造領域が存在する。CDRにはCDR1、CDR2、CDR3が存在し、生殖細胞系遺伝子由来のCDR1およびCDR2はMHCとの認識に、非生殖細胞系遺伝子由来のCDR3はペプチドとの認識に重要とされている(15-17)。またTCRはMHCのペプチド収容溝に対して斜めに配向し、 $V\alpha$ 鎖はMHCの $\alpha 2$ ドメインとエピトープのN末端寄りの半分を認識し、 $V\beta$ 鎖は $\alpha 1$ ドメインとエピトープのC末端側を認識することが多くのTCR-pMHC複合体構造解析で報告されている(図1-4)(18-21)。

一方ヒトのMHC class IIはHLA(human leukocyte antigen、ヒト白血球抗原) class Iと呼ばれ、多型性に富む。そのため提示されるエピトープのアミノ酸配列はMHCの種類により異なる(22-26)。HLA class IIにはA、B、C、3種類の対立遺伝子が存在するため、一人のヒトで最大6種類の異なるHLA class I分子が細胞表面に発現している。その中でHLA-A\*2402(本論文ではA24と表記する。)は、日本人の6割以上が発現する東アジアで最も頻度の高いHLA型であり(27)、HIV抗原に関して抗原提示されるエピトープが多数報告されている(<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>)。このうちHIVのNef遺伝子産物内のエピトープであるNef138-10(wt)(RYPLTFGWCF)は、多数の患者でCTL応答が惹起されるイムノドミナント(免疫優性)なエピトープである。

しかしHIVは非常に変異する頻度が高いウイルスであるため、エピトープ部位にアミノ酸変化が生じるとCTLによる細胞傷害性機構から逃れたエスケープ変異体が容易に出現することが知られている(28-30)。HLA-A24により提示されるNef138-10(wt)エピトープにおいてもエスケープ変異が生じることは報告されており、Nef138-10(wt)配列を持つウイルスはHLA-A24陽性者に感染すると、急速に血中か

ら排除され2番目のチロシン(2Y)がフェニルアラニン(2F)に置換したNef138-10(2F)(REPLTFGWCF)配列を持ったウイルスが優勢となる(図1-5)(31)。またNef138-10エピトープの2番目ではなく、6番目のフェニルアラニン(6F)がロイシン(6L)に置換したNef138-10(6L)(RYPLTLGWCF)配列を持つウイルスがHLA-A24陽性感染者において増殖する症例もわずかに存在する(図1-5)。このようにHLA-A24陽性HIV感染者の個体内では2Fのような優位に増殖しやすい変異体や、6Lのように2Fと比べ出現する頻度が少ない変異体が存在する一方で、感染者の血中にはこれら変異型Nef138-10エピトープに対して認識能を示すCTLが存在する。

当研究室では患者由来の末梢血単核球より3種類のNef138-10特異的CTLクローン、H27-14、T36-5、C1-28 CTLクローン(本論文ではそれぞれwt CTL、2f CTL、dual CTLと表記する。)が樹立され、それぞれNef138-10(wt)とNef138-10(2F)に対する結合能および認識能を検討するためにNef138-10を提示したHLA-A24テトラマーを用いた多重染色と細胞傷害活性試験がおこなわれた。これらのCTLクローンを異なる蛍光色素で標識したNef138-10(wt)またはNef138-10(2F)を提示したHLA-A24テトラマーで多重染色したところ、wt CTLクローンと2f CTLクローンはそれぞれNef138-10(wt)を提示したHLA-A24とNef138-10(2F)を提示したHLA-A24の一方とのみ結合するのに対して、dual CTLクローンは双方と結合していた(図1-6a)。細胞傷害活性試験においても、wt CTLはNef138-10(2F)よりもNef138-10(wt)をより強く認識し、2f CTLクローンは逆にNef138-10(2F)をより強く認識していた。そしてdual CTLクローンはNef138-10(wt)とNed138-10(2F)の双方を同程度認識することが明らかとなった(図1-6b)。またwt CTLクローンにおいてのみ6L変異を有するNef138-10(6L)に対して、Nef138-10(wt)と比べ弱いながらも認識能を示した。これらの結果はそれぞれのCTLクローンに由来するTCRと野生型または変異型Nef138-10エピトープを提示しているHLA-A24分子との特異性が異なることを示唆している。



そこで本研究では、HLA-A24陽性HIV感染者から分離された抗原認識特性の異なるCTLクローン由来のTCRと、野生型または変異型Nef138-10エピトープを提示したHLA-A24との結合を分子レベルで検討することにより、HIVのエスケープ機構を解明することを目的とした。第2章ではHLA-A24によって提示されたNef138-10(wt)、Nef138-10(2F)と、それらに対して特異性の異なる3種類のTCRとの分子間相互作用解析および結晶構造解析をおこない、続く第3章ではNef138-10(wt)とNef138-10(6L)に対するTCRの認識能について解析をおこなった。

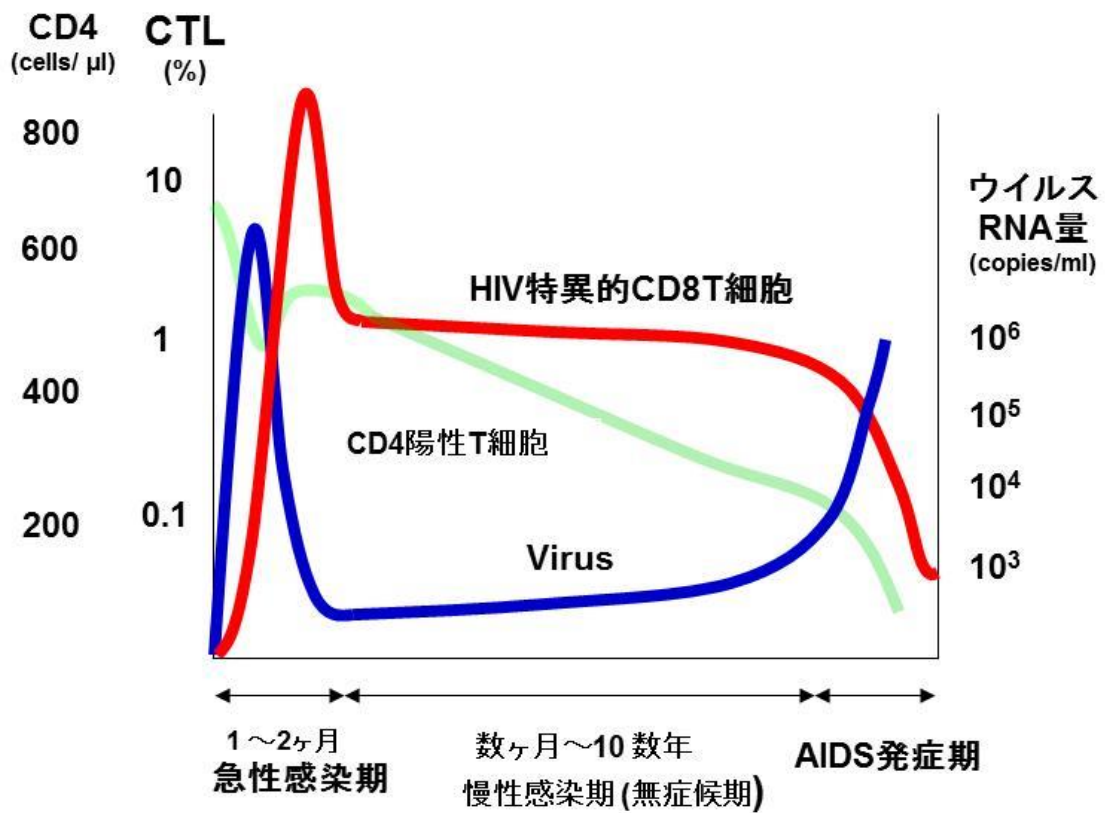


図 1-1. HIV 感染における時間経過と免疫応答

横軸に時間経過を示した。縦軸には血漿中のウイルス RNA 量 (copies/ml) (青線)、末梢血単核球中の CD4 陽性 T 細胞数 (cells/ $\mu$ l) (緑線)、および HIV 特異的な CD8 陽性 T 細胞の割合 (%) (赤線) を示した。

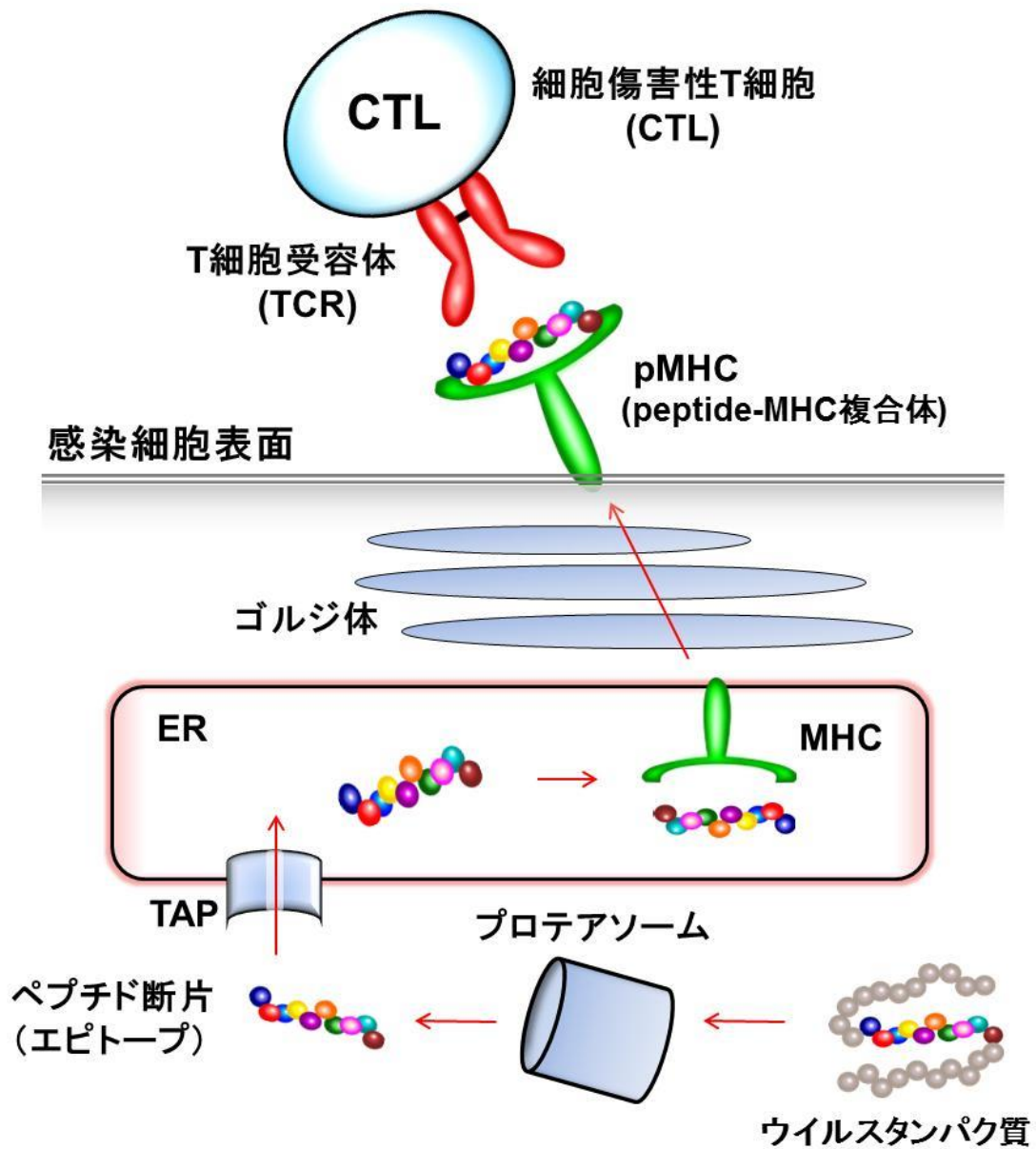
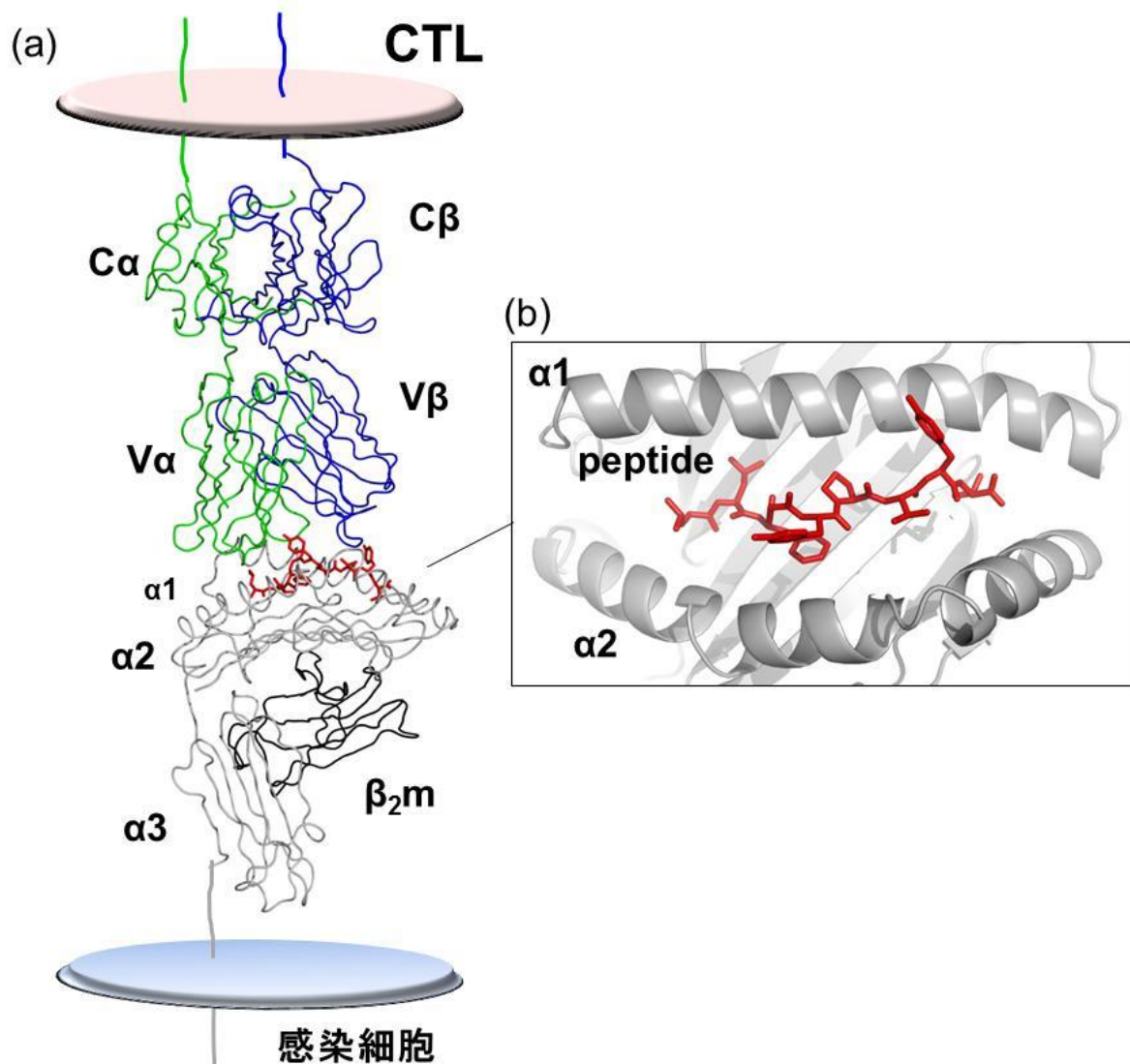


図 1-2. MHC class I による抗原提示過程

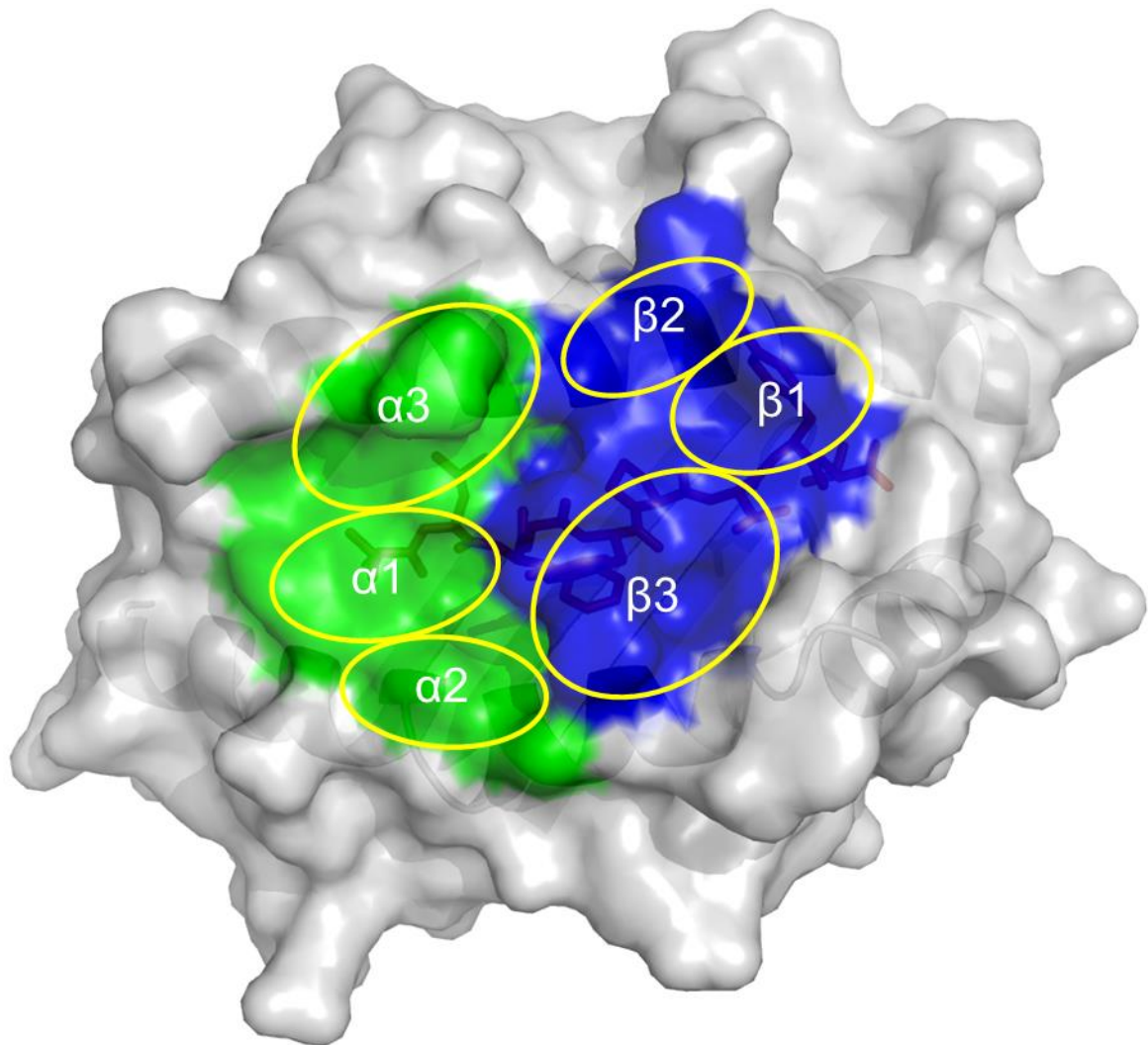
ウイルスタンパク質由来のペプチド断片は小胞体内で MHC と結合し、pMHC として感染細胞表面へ輸送され CTL に対して抗原提示をおこなう。



### 図 1-3. T 細胞受容体(TCR)による pMHC の認識

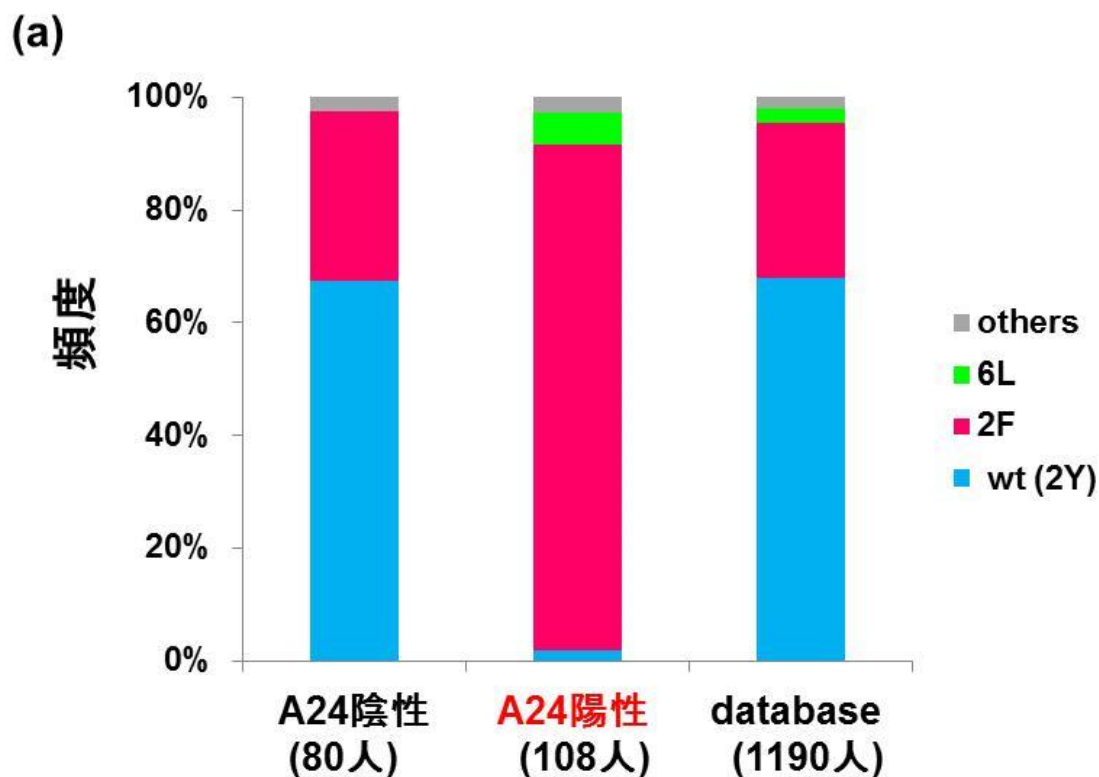
(a) HTLV-1 Tax ペプチド断片と MHC の複合体を TCR が認識している様子を示す (Protein Data Bank エントリー、1BD2 より作製) (32)。TCR は V 領域(可変領域)と C 領域(定常領域)からなる  $\alpha$  鎖(V $\alpha$ 、C $\alpha$ ) (グリーン)と  $\beta$  鎖(V $\beta$ 、C $\beta$ ) (ブルー)がヘテロダイマーを形成し、細胞傷害性 T 細胞(CTL)表面に発現している膜結合型タンパク質である。pMHC は  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ドメインを有する重鎖(グレー)と軽鎖( $\beta_2 m$ ) (ブラック)が非共有結合により会合し、非自己由来のペプチド断片(レッド、スティック表示)を感染細胞表面で CTL に提示している。ペプチド断片は  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$ ドメイン構造から形成される収容溝と結合している。

(b) TCR 側から見たペプチド収容溝。  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメイン構造をヘリックス、ペプチド断片をスティックで表示した。



**図 1-4. TCR による pMHC の結合様式**

pMHC を TCR 側から見た図を示す (Protein Data Bank エントリー、1BD2 より作製) (32)。MHC は分子表面図 (灰色)、ペプチドはスティック表示 (赤色) で示す。TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖が結合する pMHC のアミノ酸分子表面をそれぞれ緑、青で示す。また TCR の  $\alpha$  鎖 CDR1-3 ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ) と  $\beta$  鎖 CDR1-3 ( $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ ) が結合する pMHC 領域のおおよその位置を黄色線で示す。



(b) Nef138-10エピトープ

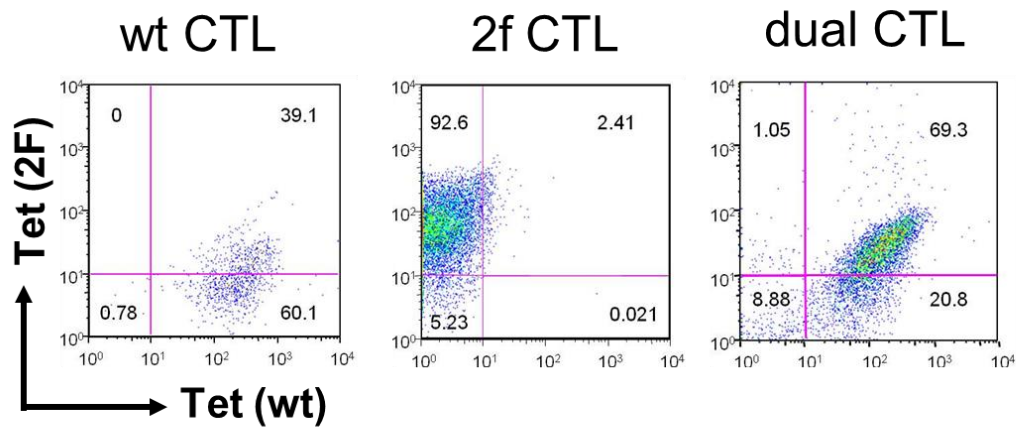
(wt)	R	<u>Y</u>	P	L	T	<u>F</u>	G	W	C	F
(2F)	-	<u>F</u>	-	-	-	-	-	-	-	-
(6L)	-	-	-	-	-	<u>L</u>	-	-	-	-

図 1-5. HLA-A24 陽性 HIV 感染者における変異体の頻度

(a) HLA-A24 陰性と陽性感染者における Nef138-10 エピトープのシーケンス解析データを示す。Nef138-10(wt)の配列を持ったウイルスを青、(2F)を赤、(6L)を緑、その他のアミノ酸配列を灰色で示す。

(b) Nef138-10(wt)、(2F)、(6L)のアミノ酸配列を示す。

(a)



(b)

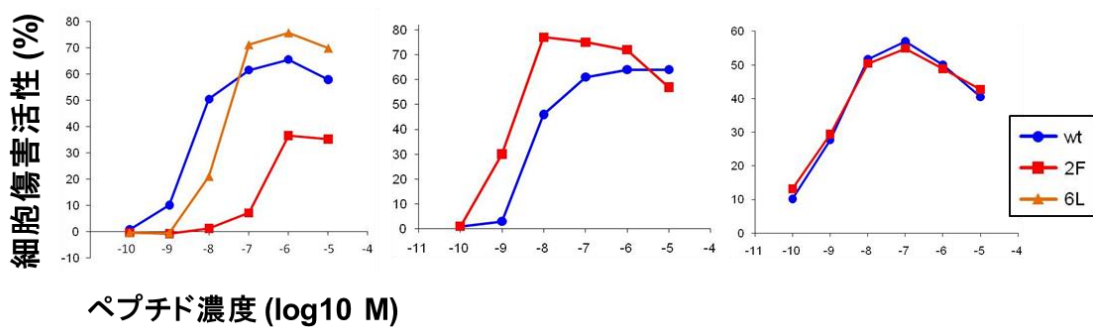


図 1-6. テトラマー多重染色と細胞傷害活性試験

(a) Nef138-10を提示したA24テトラマーを用いてwt、2f、dual CTLクローンを多重染色した。横軸はNef138-10(wt)、縦軸はNef138-10(2F)を提示したA24テトラマーで染色したことを示す。

(b) wt、2f、dual CTLクローンをを用いて細胞傷害活性試験を行った。縦軸は細胞傷害活性、横軸はHLA-A24陽性B-LCLに添加したNef138-10(wt)とNef138-10(2F)、Nef138-10(6L)ペプチド濃度で、それぞれ青線、赤線、橙線で示す。

## 第2章 T細胞受容体とNef138-10エピトープの相互作用解析

### 2.1 概要

本章ではNef138-10エピトープに対して異なる認識能を示す3種類のCTLクローン (wt、2f、dual CTLクローン) (第1章 図1-6) からwt TCR、2f TCR、dual TCRを作製し、HLA-A24によって提示されたNef138-10(wt)またはNef138-10(2F) (A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(2F)と表記する)との分子間相互作用解析および結晶構造解析をおこなうことで、Nef138-10(2F)変異によるpHLAとTCRとの相互作用における影響を検討した。

### 2.2 材料と方法

#### 2.2.1 発現系の構築

TCRの $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の遺伝子は当研究室でpGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてTAクローニングされたwt CTLクローン、2f CTLクローン、dual CTLクローン由来のTCR- $\alpha$ 鎖遺伝子(TRA)とTCR- $\beta$ 鎖遺伝子(TRB)のcDNAをそれぞれ用いた。TRAとTRBは構造解析のために細胞外領域のみをPCR法により増幅した。forward primerは大腸菌発現用にコドン使用頻度が最適化され、かつ開始コドンと共に制限酵素サイトが付加されたプライマーを用いた。reverse primerはTRAとTRBの定常領



域にあたるのでそれぞれ共通のプライマー(TRA、TRB)を使用した。用いたプライマーを表2-1に示す。

TRAとTRBは本来の位置とは異なる部位に分子間ジスルフィド結合を導入することで機能を損なわずにヘテロダイマーであるTCRタンパク質としての安定性を高めることが知られており(33)、多くのTCRの機能及び構造解析に用いられている(34-38)。α鎖は定常領域に存在する48番目のアミノ酸であるスレオニン、β鎖は定常領域の57番目のセリンがそれぞれシステイン(コドン)(T48C、S57C)となるように塩基置換されており、β鎖はさらにジスルフィド結合の形成に関与しないシステイン(コドン)がアラニン(コドン)(C75A)となるように塩基置換されている(図2-1)。それらの変異を含むTCRのα鎖とβ鎖が挿入されたベクターをそれぞれ中国科学院病原微生物与免疫学研究室の施一博士から供与していただいた。これらのベクター及びPCR増幅した目的のTRAとTRBを用いて制限酵素処理を行い、大腸菌発現用ベクターであるpET-21aベクターとpET-21dベクターのNdeI-XhoI、NcoI-XhoIサイトにTRAまたはTRBをそれぞれ挿入することで3種類のCTLクローンから目的の発現ベクターを6種類構築した。以下に構築した発現ベクターを示す。

wt TRA/pET21a

wt TRB/pET21d

2F TRA/pET21a

2F TRB/pET21a

dual TRA/pET21a

dual TRB/pET21d

構築した発現ベクターは挿入DNA断片の塩基配列が正しいことをシーケンス解析により確認した。そしてタンパク質発現用のコンピテントセルBL21(DE3)株を形質転換し、100 µg/mlのカルベニシリンを含むLBプレート上で培養することにより、目的タンパク質の発現ベクター保持株を選定した。そして100 µg/mlのカルベニシリンを含むLB培地で振盪培養し、さらにLBプレート上で培養した。培養した菌は10%グリセロールを含むLBで回収し-80°Cで保存した。このグリセロールストックから大量培養を行った。

## 2.2 大腸菌封入体からのTRA、TRBの精製

100 µg/mlのカルベニシリンを含む2LのLB培地で大腸菌グリセロールストックを37°Cで培養し、OD<sub>600</sub>の値が0.5-0.7に達した時点で終濃度が1 mMになるようにIPTGを添加した。さらに4-5時間培養した後に集菌した。菌体を破碎バッファーA(表2-2)で懸濁して超音波処理を行い、遠心操作(20,000 xg、10min、4°C)により目的タンパク質の封入体を含む不溶性画分を得た。不溶性画分はさらに洗浄バッファーBで3回、洗浄バッファーCで2回懸濁し遠心操作により封入体を精製した。封入体はグアニジン塩酸塩を含む可溶化バッファーDで変性、可溶化し20-50 mg/mlになるように調製したのちタンパク質リフォールディングのストック溶液として-80°Cで保存した。用いたバッファーを表2-2に示す。

## 2.3 リフォールディングによるTCRの作製

3種類のTCRについてリフォールディングをおこなった。それぞれの系を下記に示す。以下、実験操作はすべて4°Cでおこなった。

(1) wt TCR

30 mgのwt TRAと25 mgのwt TRBリフォールディングストック溶液を希釈バッファー(6 M guanidine HCl, 10 mM EDTA, 10 mM )を用いて15 mlになるように希釈した後、1 Lのリフォールディングバッファー(0.1 M Tris-HCl, 0.4 M L-arginine, 5 M urea, 3.7 mM cystamine, 6.6 mM  $\beta$ -mercaptoethylamine, 0.2 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, pH 8.5)に添加し、24時間インキュベートした。その後、MWCO 6,000-8,000の透析膜を用いて10倍量のmilli-Qに対して24時間透析し、さらに10 mM Tris-HCl, pH 8.5に対して24時間透析操作を行った。透析後のタンパク質溶液は0.2  $\mu$ mフィルターを用いて濾過し、10 mM Tris-HCl, pH 8.5で平衡化した陰イオン交換カラム Resource Q(GE Healthcare)に通して、0 - 0.5 Mの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出した。目的タンパク質の溶出画分は非還元条件下と還元条件下でSDS-PAGEを行い、CBB染色により確認し回収した。最後にゲル濾過カラム HiLoad 16/60 Superdex 75 pg(GE Healthcare)を用いて精製した。精製後のサンプルをBiacore解析に用いる場合には、10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、pH 7.4の溶出バッファーで、結晶化実験に用いる場合には、20 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、pH 8.0の溶出バッファーで、それぞれゲル濾過精製を行った。溶出画分はCBB染色により確認し、MWCO 10,000の限外濾過膜を用いて10 mg/mlまで濃縮し、-80°Cで保存した。

(2) 2f TCR

1 Lのリフォールディングバッファーに対し、50 mgの2F TRAと40 mgの2F TRBリフォールディングストック溶液を用いてwt TCRと同様にリフォールディング操作を行い精製後、-80°Cで保存した。

### (3) dual TCR

2 Lのリフォールディングバッファー(0.1 M Tris-HCl、0.4 M L-arginine、5 M urea、5 mM 還元型グルタチオン、0.5 mM 酸化型グルタチオン、2 mM EDTA、0.2 mM phenyl methylsulfonyl fluoride、pH 8.5)に対し、希釈バッファーで5 mlになるように20 mgのdual TRAと35 mgのdual TRBリフォールディングストック溶液を希釈し、添加後一晩インキュベートした。さらに同量のリフォールディングストック溶液を添加し、24時間インキュベートした後、タンパク質濃縮・脱塩用システム QuixStand System(GE Healthcare)とMWCO 10,000の限外濾過カセットを用いて200-400 mlまで濃縮した。その後10倍量の5 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、pH 8.5に対して24時間透析し、さらに10 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、pH 8.0に対して24 - 36時間透析を行った。透析後のタンパク質溶液は陰イオン交換カラム Resource Q(GE Healthcare)とMono Q 5/50 GL(GE Healthcare)とゲル濾過カラム Superdex 75 10/300GL(GE Healthcare)を用いて精製し、4-10 mg/mlまで濃縮し、-80°Cで保存した。

## 2.4 リフォールディングによるpHLAの作製

HLA-A24発現ベクター、 $\beta_2m$  (beta 2-microglobulin) 発現ベクター及びHLA-A24の3'末端にビオチン付加配列(Bir A substrate peptide:BSP)が導入されたHLA-A24-BSP発現ベクターは布矢純一博士により供与していただいた。HLA-A24と $\beta_2m$ 及びHLA-A24-BSPはTCRと同様に封入体として発現させ、複数のバッファー(表2-2)を用いて精製した。まず破碎バッファーaで懸濁し超音波処理を行い、懸濁バッファーbで3回、1%Triton X100を含まない洗浄バッファーbで1回洗い、封入体を精

製した。そして尿素を含んだ可溶化バッファーcで可溶化し、タンパク質リフォールディングのストック溶液として-80°Cで保存した。

1 Lのリフォールディングバッファー(0.1 M Tris-HCl、0.4 M L-arginine、5 mM 還元型グルタチオン、0.5 mM 酸化型グルタチオン、2 mM EDTA、0.2 mM phenyl methylsulfonyl fluoride、pH 8.0)に対して45 mgのHLA-A\*2402と15 mgのβ<sub>2</sub>mを3 M グアニジン塩酸塩を含む10 mM EDTA(pH 8.0)と10 mM 酢酸ナトリウム(pH 4.2)でそれぞれ5 mlになるように希釈し、目的のペプチド(10 mg)存在下でリフォールディングバッファーに添加した。24-36時間後、リフォールディング溶液を1-2 mlに濃縮し20 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、pH 8.0で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 75 pg(GE Healthcare)を用いてゲル濾過精製を行い、目的タンパク質の溶出画分を回収し、引き続き同じバッファーで平衡化されたMono Q 5/50 GL(GE Healthcare)を用いて0 - 0.5 Mの塩化ナトリウムの濃度勾配により精製し、10 mg/mlにまで濃縮し-80°Cで保存した。

表面プラズモン共鳴を用いた分子間相互作用解析にはHLA-A24の代わりにHLA-A24-BSPを用いてリフォールディングを行い、HLA-A24の場合と同様に精製した後にビオチン化した。

ビオチン化は40 μMのpHLA-A24-BSPに対して3 μgのBirA、0.05 M Bicine、pH 8.3、10 mM ATP、10 mM 酢酸マグネシウム、50 uM ビオチンを加え25°C、16時間反応を行った。ビオチン化したpHLA-A24-BSPは溶出バッファー(10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、pH 7.4)で平衡化したSuperdex 200 10/300 GLを用いてバッファー交換を行った。

## 2.5 表面プラズモン共鳴分光法による分子間相互作用解析

分子間相互作用測定装置Biacore 2000を用いて、TCRとpHLA間における平衡値解析を25°Cの条件下で行った。まずstreptavidinが固相化されたSensor Chip SA(GE healthcare)にbiotin化したpHLAを400-800 RU(resonance unit) 固定化し、非特異的結合を抑えるために20 µg/mlのbiotin化したBSAを10 µl/minの流速で10分間送液してから測定をおこなった。系を図2-8に示す。

wt TCRと2f TCRを用いたpHLAとの平衡値解析では、ランニングバッファーとして10 mM HEPES、3 mM EDTA、150 mM NaCl、pH 7.4を使用し、流速20 µl/minで60秒間送液を行った。

dual TCRの解析には流速30 µl/minでランニングバッファーとして10mM HEPES、3 mM EDTA、150 mM NaCl、0.005% Surfactant P20、pH 7.4を行った。

得られたセンサーグラムの結果からBIAevaluation software (version 4.1; GE healthcare)を用いて解析を行った。

## 2.6 タンパク質の結晶化

結晶化の初期スクリーニングは、自動結晶化装置 Mosquito (TTP Lab Tech) と96 穴タンパク質結晶化プレート MRC-2 (As One)を用いた。

タンパク質試料とリザーバー溶液(結晶化溶液)を0.1-0.2 µL ずつ混ぜ合わせ、シッピングドロップ蒸気拡散法により、20°C の条件下で行った。リザーバー溶液は市販のスクリーニングキット溶液であるCrystal Screen、Crystal Screen 2、Natrix、MembFac、PEG/ION Screen、Index (Hampton Research)、Ozma PEG 48 Salt Screen with PEG 8K and 10K (Emerald BioSystems)、The Protein Complex Suite (QIAGEN)の計8種類を用いた。

初期スクリーニングで得られた結果に基づき、Additive Screen (Hampton Research) を用いた添加剤によるスクリーニングや、24 穴プレート Cryschem™ Plate (Hampton Research) を用いて沈殿剤濃度、塩濃度、pH などを変化させることで結晶化条件の最適化を行った。24 穴プレートを用いた結晶化は手動でタンパク質試料とリザーバー溶液を 1  $\mu$ l ずつ混合し、初期スクリーニング同様シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。

## 2.7 X 線回折測定と回折データの処理

X 線回折測定と回折データの処理は共同研究者である東京大学放射光連携研究機構生命科学部門構造生物学研究室の山形敦史博士におこなっていただいた。

まず X 線回折測定は X 線による結晶の損傷を最小限に抑えるため凍結保護剤として 20%エチレングリコールを使用し、100 K の窒素ガスのクライオストリーム中で測定をおこなった。そして回折データの処理には HKL2000 (39) と CCP4 program suite (40) によりブラベ格子と格子定数を決定後、回折データの各反射スポットに対して指数付けと強度測定後、スケーリングとデータリダクションを行って空間群の決定および各指数に対する回折強度と構造因子を算出した。

## 2.8 構造決定と精密化

初期構造モデルは MOLREP (41) を用いて分子置換法により決定した。

分子置換法とは目的のタンパク質とアミノ酸配列の相同性が高い構造既知の類似タンパク質を鋳型とし、X 線結晶構造解析に必要な位相を決定する方法である。その際にサーチモデルとして用いた pHLA と TCR はモデルバイアスを減少させるために

ペプチドの構造と CDR 領域の構造を、それぞれ除いてから分子置換を行った。用いたサーチモデルを表 2-4 に示す。

そしてプログラム Crystallography & NMR System (CNS) (42) または CCP4 パッケージに導入されている Refmac 5 を用いて構造モデルを精密化し、プログラム COOT (43) を用いて構造モデルを修正するというサイクルを数回繰り返した。途中で分子置換法の際に除いた構造を加え、精密化を行った。

最終的な構造モデルは Rampage (44) を用いて Ramachandran プロットの計算を行い、立体化学的評価をおこなった。構造モデルの描画は PyMOL (DeLano Scientific; <http://www.pymol.org>) を用いて作成した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 封入体の単離と可溶化

3 種類の TCR の  $\alpha$  鎖 (wt TRA、2f TRA、dual TRA)、 $\beta$  鎖 (wt TRB、2f TRB、dual TRB)、と HLA-A24、HLA-A24-BSP、 $\beta_2m$  遺伝子が挿入された発現ベクターを用いて大腸菌を形質転換した。形質転換後の大腸菌を大量培養し、目的タンパク質を封入体として発現させ、精製した。精製後の封入体は変性剤を用いて可溶化し、SDS-PAGE により精製度を確認した。可溶化したそれぞれのタンパク質の SDS-PAGE の結果をそれぞれ図 2-2 に示す。

### 2.3.2 TCR のリフォールディングと精製



可溶化後の変性したタンパク質を用いて *in vitro* リフォールディングをおこない、イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィー精製をおこなった(図 2-3, 4)。その結果、分子間相互作用解析やタンパク質の結晶化に必要な精製度で TCR タンパク質を得ることが出来た(図 2-7a)。wt TCR と 2f TCR は共にリフォールディング効率が良く、1 L のリフォールディング操作に対してそれぞれ 20-30 mg、10-20 mg 得ることが出来た。一方 dual TCR はリフォールディング効率が非常に悪く、さらに純度を高めるためには、イオン交換クロマトグラフィー精製を 2 回行わなければならない、最終的な収量は 1L あたり 50-150 µg と非常に少なかった。

### 2.3.3 pHLA のリフォールディングと精製

次に結晶構造解析のために 2 種類の pHLA 分子(A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(2F))をリフォールディングにより作製し、ゲル濾過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィー精製をおこなった(図 2-5)。分子間相互作用解析には pHLA をビオチン化する必要があるため、HLA-A24 の C 末端に BSP 配列が付加された A24/N138-10(wt)-BSP と A24/N138-10(2F)-BSP、さらにネガティブコントロールとして同じく A24 拘束性エピートプである HIV タンパク質由来の Env584 (RYLRDQQLLGI) ペプチドを用いて A24/Env584-BSP を作製し(図 2-6)、3 種類ともビオチン化した。最終的な精製結果を図 2-7b に示した。1 L リフォールディングあたりの pHLA の収量は 5-15 mg であった。

### 2.3.4 分子間相互作用解析

作製した wt TCR、2f TCR、dual TCR と A24 によって提示された Nef138-10(wt) または N138-10(2F)との結合能を明らかにするために、ビアコアを用いた表面プラズモン共鳴分光法による分子間相互作用解析をおこなった(図 2-9, 10)。平行値解析から算出した解離定数を表 2-3 にまとめた。

wt TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(2F)との解離定数はそれぞれ 9.7  $\mu\text{M}$  と 300  $\mu\text{M}$  であり、A24/N138-10(2F)よりも A24/N138-10(wt)とのほうがおよそ 30 倍結合が強かった。2f TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(2F)との解離定数はそれぞれ 48.7  $\mu\text{M}$ 、1.6 $\mu\text{M}$  であり A24/N138-10(2F)のほうがおよそ 30 倍結合が強いことが判明した。一方 dual TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(2F)との解離定数はそれぞれ 37.5  $\mu\text{M}$ 、21.1  $\mu\text{M}$  であり、同程度の親和性を有していたが A24/N138-10(2F)とのほうがわずかに結合が強いことが分かった。

TCR と pMHC の結合は抗原抗体反応(1-1000 nM)と比べ弱く(45-47)、一般的な解離定数の値は 1-100  $\mu\text{M}$  と報告されている(20)。作製した 3 種類の TCR と pHLA との解離定数の値は、wt TCR-A24/N138-10(2F)を除き、全てその範囲内に収まっていた。またすべての TCR はネガティブコントロールである A24/Env584 に対して高い濃度の TCR(66  $\mu\text{M}$  または 80  $\mu\text{M}$ ) を添加してもほとんど結合が確認されなかった(図 2-9)。

つまり wt TCR は N138-10(wt)特異的であり、2f TCR は A24/N138-10(2F)特異的であるのに対して、dual TCR は A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(2F)の双方に対して同程度の結合能を有しているということが分子レベルで判明した。作成した TCR と pHLA は細胞傷害性試験やテトラマー多重染色の結果(第 1 章 図 1-6)を反映していた。

### 2.3.5 結晶化と構造決定

分子間相互作用解析から得られた結果をより詳細に検討するため、X線結晶構造解析をおこなった。まず調製した TCR 単体、pHLA 単体、TCR-pHLA 複合体の結晶化を試みた。その結果、dual TCR 単体、dual TCR-A24/N138-10(wt)を除く、全てのタンパク質結晶を得ることに成功し、それぞれ X線回折データを収集した(図 2-11)。

得られた X線回折データを用いて分子置換法により構造を決定し、精密化をおこなった(図 2-12)。2f TCR-A24/N138-10(wt)と 2f TCR-A24/N138-10(2F)は twin 結晶だったため、twin を考慮した精密化をおこなった。分子置換法に用いたサーチモデルとデータ収集および精密化の統計値をそれぞれ表 2-4、2-5 に示す。

### 2.3.6 Nef138-10(wt)と Nef138-10(2F)のペプチド構造の違い

A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(2F)における 1 アミノ酸の違いによる影響を明らかにするために構造を決定した。この 2 つの構造を比較するために C $\alpha$  原子に対して構造の重ね合わせをおこなったところ(図 2-13a)、重ね合わせの程度を示す RMSD (root mean square deviation)は HLA-A24、 $\beta_2m$ 、ペプチド構造においてそれぞれ 0.361 Å、0.260 Å、0.196 Å であり、非常に類似していた。Nef138-10 ペプチドは M 字型の構造を形成し、その中央に位置する 4 番目のロイシン(L4<sub>pep</sub>)と 6 番目のフェニルアラニン(F6<sub>pep</sub>)の側鎖は上(TCR との相互作用面)を向いているのに対して、2 番目のチロシン/フェニルアラニン(Y2<sub>pep</sub>/ F2<sub>pep</sub>)と 5 番目のスレオニン(T5<sub>pep</sub>)、8 番目のトリプトファン(W8<sub>pep</sub>)、10 番目のフェニルアラニン(F10<sub>pep</sub>)の側鎖は下

(HLA-A24 の收容溝)を向いていた(図 2-12、2-13a)。HLA-A24 において提示されるペプチドの 2 番目と C 末端のアミノ酸は HLA-A24 の收容溝と結合するアンカー残基として知られており、アンカーモチーフが存在する(48, 49)。Nef138-10 の場合、エピトープの 2 番目のアミノ酸はチロシンまたはフェニルアラニンであることが多く、チロシンの場合には HLA-A24 の 70 番目のヒスチジン(H70<sub>a24</sub>)と水素結合を形成することが知られている(50)。A24/N138-10(wt)においても Y2<sub>pep</sub> と H70<sub>a24</sub> による水素結合の形成を確認した(図 2-13b)。しかし A24/N138-10(2F)では F2<sub>pep</sub> に水酸基がないため、H70<sub>a24</sub> と水素結合は形成されないが、T5<sub>pep</sub> の水酸基が H70<sub>a24</sub> と水素結合を形成する距離(2.5 - 3.5 Å)に存在しており、Y2<sub>pep</sub> との代わりに H70<sub>a24</sub> と水素結合を形成しているのではないかと考えられる(図 2-13c)。H70<sub>a24</sub> に対する Nef138-10(wt) と Nef138-10(2F)の相互作用を模式図に示した(図 2-13d,e)。

### 2.3.7 wt TCR による A24/N138-10(wt)の認識

Nef138-10(wt)に特異的な wt TCR と A24/N138-10(wt)との複合体について解析をおこなった(図 2-14a)。wt TCR-A24/Nef138-10(wt)は互いの接触領域における形状の相補性を示す Sc(shape complementarity)の値(0-1.0 で示す)が 0.75 であり、TCR と pMHC における sc の値(sc=0.41-0.75) (20)の中で最も高い値を示した。また wt TCR は Nef138-10(wt)ペプチドの F6<sub>pep</sub> を囲むように水分子を介して A24/N138-10(wt)と密に相互作用していたことから、Nef138-10(wt)ペプチドに対して非常に特異性が高いと考えられる。

次に wt TCR-A24/N138-10(wt)の結合前と結合後における wt TCR と Nef138-10(wt)ペプチド構造の変化について比較をおこなった(図 2-14b)。wt TCR は  $\alpha$  鎖の 93 番目のアルギニン(R93 $\alpha$ )の側鎖の向きが変化して F6<sub>pep</sub> と  $\pi$ -カチオン

(芳香環と塩基性アミノ酸との間に働く非共有結合)相互作用を形成すると同時に  $\beta$  鎖の 100 番目のグリシン(G100 $\beta$ )と水素結合を形成し、TCR とペプチドの相互作用面における安定化に寄与していた。また  $\alpha$  鎖の 98 番目のチロシン(Y98 $\alpha$ )と  $\beta$  鎖の 31 番目のアルギニン(R31 $\beta$ )は、ともに Nef138-10(wt)の T5<sub>pep</sub> の側鎖と水素結合を形成しており、ペプチドの構造を大きく変化させていた(図 2-14c)。

wt TCR は Nef138-10(wt)ペプチドと結合するために適切な TCR の構造をとると同時に F6<sub>pep</sub> を囲むように相互作用することで Nef138-10(wt)ペプチドの構造を大きく変化させることが明らかとなった。

### 2.3.8 wt TCR-A24/N138-10(wt)と wt TCR-A24/N138-10(2F)複合体の違い

次に wt TCR による A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(2F)との認識能の違いを明らかにするために構造の比較をおこなった(図 2-15a)。しかし両者の TCR や HLA-A24、Nef138-10 ペプチド構造における RMSD はそれぞれ 0.488 Å、0.375 Å、0.215 Å であり、大きな構造の違いはなかった。wt TCR は A24/Nef138-10(wt)と結合する場合に Y98 $\alpha$  と R31 $\beta$  が T5<sub>pep</sub> の側鎖と水素結合を形成していたが(図 2-14c)、wt TCR-A24/N138-10(2F)においても同様に T5<sub>pep</sub> と水素結合を形成していた(図 2-15b,c)。

一方、A24/N138-10(2F)単体では Nef138-10(2F)の T5<sub>pep</sub> と HLA-A24 の H70<sub>a24</sub> が水素結合を形成していたが(図 2-13c)、wt TCR-A24/N138-10(2F)複合体構造では、ペプチドの構造変化により T5<sub>pep</sub> と H70<sub>a24</sub> の距離が離れてしまい(6.3 Å)、水素結合は形成されていなかった(図 2-15e)。

### 2.3.9 2f TCR による A24/N138-10(2F)の認識

Nef138-10(2F)に特異的な 2f TCR と A24/N138-10(2F)との複合体について解析をおこなった。Nef138-10(2F)ペプチドについて 2f TCR との結合前と結合後と比較をすると、Nef138-10(2F)の 8 番目のトリプトファン(W8<sub>pep</sub>)が約 3.6 Å TCR 側に移動していた(図 2-16a)。

次に 2f TCR について A24/N138-10-(2F)との結合前と結合後と比較したところ(図 2-16b)、2f TCR は A24/N138-10(2F)と結合すると、β 鎖の 96 番目のアラニン(A96β)が W8<sub>pep</sub> の側鎖と水素結合を形成することで W8<sub>pep</sub> を TCR 側に引き寄せていたことが分かった(図 2-16c)。また、β 鎖の 98 番目のヒスチジン(H98β)は L4<sub>pep</sub>、F6<sub>pep</sub>、W8<sub>pep</sub> の側鎖によって形成された浅いポケットの中央に配置し、L4<sub>pep</sub>と水素結合を形成していた。

また 2f TCR と結合する前の Nef138-10(2F)ペプチド構造では T5<sub>pep</sub> と F6<sub>pep</sub> が W8<sub>pep</sub> とペプチド内で水素結合を形成していたのに対して(図 2-16d)、2f TCR が結合するとペプチドの構造が大きく変化して、F6<sub>pep</sub> は W8<sub>pep</sub> の側鎖と新たに水素結合を形成し、T5<sub>pep</sub> と W8<sub>pep</sub> との水素結合は形成されなかった(図 2-16e)。さらに 2f TCR-A24/N138-10(2F)では T5<sub>pep</sub> と H70<sub>a24</sub> の距離が最短でも 4.1 Å であり、水素結合は形成されていなかった(図 2-16e)。

### 2.3.10 2f TCR-A24/N138-10(wt)と 2f TCR-A24/N138-10(2F)複合体の違い

2f TCR は A24/N138-10(wt)よりも A24/N138-10(2F)との親和性がおよそ 30 倍高く(表 2-3)、その差を明らかにするために 2f TCR-A24/N138-10(wt)と 2f TCR-A24/N138-10(2F)との構造を比較した(図 2-17a)。両者において大きな構造の違いは見られなかったが、TCR と Nef138-10 ペプチドの相互作用に違いが見られた。

2f TCR は Nef138-10(2F)と 7 つの水素結合を形成していたのに対して、Nef138-10(wt)との水素結合は 2 つであった(図 2-17b)。

### 2.3.11 dual TCR による A24/N138-10(2F)の認識

dual TCR のリフォールディング効率は悪く、結晶化に十分な量の試料を得ることが困難であったため、TCR 単体と dual TCR-A24/N138-10(wt)については結晶が得られず、構造を決定することが出来なかった。

そこで dual TCR と A24/N138-10(2F)との相互作用についてのみ解析をおこなった(図 2-18a)。Nef138-10(2F)ペプチドに対する dual TCR の  $\alpha$  鎖の接触面積は  $216 \text{ \AA}^2$  であるのに対して  $\beta$  鎖では  $113 \text{ \AA}^2$  であり、およそ 2 倍の差があった。HLA-A24 に関しては、その差がさらに大きく、HLA-A24 に対する  $\alpha$  鎖の接触面積は  $544 \text{ \AA}^2$  であるのに対して  $\beta$  鎖はわずか  $95 \text{ \AA}^2$  であった。また dual TCR と Nef138-10(2F)ペプチドにおける水素結合の数は 2 つであり、wt TCR-A24/N138-10(wt)や 2f TCR/N138-10(2F)と比べて少なかった。

次に dual TCR-A24/N138-10(2F)複合体と A24/N138-10(2F)単体におけるペプチド構造の比較をおこなった(図 2-18b)。両者のペプチド構造における RMSD は  $0.635 \text{ \AA}$  であり、主鎖に対する大きな構造変化はなかったが、TCR が結合する前と比べ  $P3_{\text{pep}}$  は TCR 側に移動していた。しかし Nef138-10(2F)の  $T5_{\text{pep}}$  は、A24/N138-10(2F)単体構造と同様に(図 2-13c)、HLA-A24 の  $H70_{a24}$  と水素結合を形成したままであった(図 2-18c)。

### 2.3.12 wt TCR、2f TCR、dual TCR による A24/N138-10 に対する相互作用様式の違い

wt TCR は Nef138-10(wt)の T5<sub>pep</sub> と水素結合を形成し、F6<sub>pep</sub> を囲むように相互作用することでペプチド構造を大きく変化させていた。また 2f TCR は Nef138-10(2F)の W8<sub>pep</sub> を HLA-A24 から TCR 側に引き寄せることでペプチド構造を大きく変化させていた。一方 dual TCR は主に  $\alpha$  鎖を用いて A24/N138-10(2F)と相互作用しており、ペプチドの構造変化が小さかった。wt TCR、2f TCR、dual TCR の Nef138-10 ペプチドに対する相互作用様式の違いを模式図で示した(図 2-19)。

このように wt TCR、2f TCR、dual TCR は Nef138-10 ペプチドに対する相互作用様式が著しく異なる。そこでそれぞれの TCR における可変領域のアミノ酸配列を比べると相同性はおよそ 30%であった(図 2-20a)。そして wt TCR に対して 2f TCR、dual TCR の構造を重ね合わせると RMSD は、それぞれ 5.443 Å、5.915 Å であり、かなり異なる。各複合体構造を HLA-A24 に対して重ね合わせた結果を図 2-20b に示した。また wt TCR と 2f TCR の CDR3 $\alpha$  と CDR3 $\beta$  は Nef138-10 ペプチドの中央に配置していたが、dual TCR では CDR1 $\alpha$  と CDR3 $\beta$  が配置していた(図 2-21a)。さらに wt TCR と 2f TCR は A24/N138-10 との接触面積に關与する  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の割合がほぼ等しいのに対して、dual TCR では  $\alpha$  鎖が 80%を占有していた。一方 2f TCR は 3 種類の TCR 間では一番 A24/N138-10 との接触領域が広く、BSA の値は 2300 Å<sup>2</sup> であった(図 2-21b)。

次に wt TCR、2f TCR、dual TCR において、TCR が結合する前と後のペプチド主鎖の移動距離を比較した。wt TCR-A24/N138-10(wt)は A24/N138-10(wt)の、2f TCR-A24/N138-10(2F)、dual TCR-A24/N138-10(2F)は A24/N138-10(2F)の HLA-A24 の  $\alpha$ 1 $\alpha$ 2 ドメインに対して構造の重ね合わせをおこなった(図 2-22a)。その



結果、wt TCR-A24/N138-10(wt)では F6<sub>pep</sub> の移動距離が最も長く 2.72 Å であり、2f TCR-A24/N138-10(2F)では G7<sub>pep</sub> と W8<sub>pep</sub> の移動距離がそれぞれ 2.72 Å、1.71 Å であった。しかし dual TCR-A24/N138-10(2F)では wt TCR-A24/N138-10(wt)や 2f TCR-A24/N138-10(2F)と異なり、TCR と結合後のペプチド主鎖の移動距離は短く、P3<sub>pep</sub> が最長で 1.68 Å であった(図 2-22b)。

## 2.4 考察

本章では HLA-A24 によって提示された Nef138-10(wt)または Nef138-10(2F)に対して、抗原特異性の異なる 3 種類の CTL による認識能の違いを検討することで HIV のエスケープ機構を解明すべく、TCR 分子と pHLA 分子との分子間相互作用解析および結晶構造解析をおこなった。まず分子間相互作用解析において、作製した TCR が A24/N138-10(wt)または A24/N138-10(2F)と特異的に結合し、細胞レベルでの実験結果を反映していることを確認した。そして X 線結晶構造解析をおこない、wt TCR、2f TCR、dual TCR による A24/N138-10 との相互作用を詳細に検討した。

まず抗原側となる A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(2F)について構造の比較をおこなったところ、ペプチドと HLA-A24 との間で形成される水素結合の位置に違いがみられた。A24/N138-10(wt)ではペプチドの 2 番目のアンカー残基である Y2<sub>pep</sub> が HLA-A24 の H70<sub>a24</sub> と水素結合を形成していたのに対して(図 2-13b)、A24/N138-10(2F)では 5 番目の T5<sub>pep</sub> がセカンダリーアンカー残基として H70<sub>a24</sub> と水素結合を形成していた(図 2-13c)。HLA-A24 に対する Nef138-10(wt)ペプチドと Nef138-10(2F)ペプチドの結合能は、ほぼ同程度であることが報告されており(31, 51)、Nef138-10(2F)では Nef138-10(wt)の Y2<sub>pep</sub> の代わりに T5<sub>pep</sub> が H70<sub>a24</sub> と水素

結合を形成することで、HLA-A24 との安定性を補っているのではないかと考えられた。

次に Nef138-10(wt)に特異的な wt TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(2F)との複合体構造について解析をおこなった。wt TCR は Nef138-10 ペプチドの F6<sub>pep</sub> を囲むように A24/N138-10(wt)と相互作用しており、TCR と pHLA との相補性が非常に高い ( $S_c=0.75$ ) TCR であることが分かった。

また wt TCR-A24/N138-10(wt)と wt TCR-A24/N138-10(2F)の構造に大きな違いがみられなかったことから、wt TCR と A24/N138-10(2F)が結合して安定な状態、すなわちタンパク質結晶中の wt TCR-A24/N138-10(2F)分子では、wt TCR-A24/N138-10(wt)とほとんど差がないと考えられる。つまり wt TCR が A24/N138-10(2F)と結合するには wt TCR-A24/N138-10(wt)と同様にペプチドの T5<sub>pep</sub>、F6<sub>pep</sub> と強く相互作用することでペプチド構造を大きく変化させなければならない。しかし A24/N138-10(2F)単体において Nef138-10(2F)の T5<sub>pep</sub> は、HLA-A24 の H70<sub>a24</sub> と水素結合を形成しているため安定である。その結果 wt TCR は Nef138-10(2F)の T5<sub>pep</sub> と水素結合を形成しにくく、ペプチドの構造変化が生じにくい、ため、A24/N138-10(2F)との親和性が低いと考えられる。

2f TCR は Nef138-10(2F)に対して特異的な TCR であり、W8<sub>pep</sub> を HLA-A24 から TCR 側に持ち上げることで、TCR と pHLA との接触面積が広いという特徴を有していた。また W8<sub>pep</sub> の側鎖はペプチド収容溝に位置し、T5<sub>pep</sub> や F6<sub>pep</sub> と相互作用していたが、TCR と相互作用することで W8<sub>pep</sub> が TCR 側に移動し、ペプチド構造が大きく変化していた。その結果 T5<sub>pep</sub> は H70<sub>a24</sub> と水素結合を形成する距離から遠ざかっていた。つまり 2f TCR は Y2<sub>pep</sub> と H70<sub>a24</sub> が水素結合を形成している Nef138-10(wt)よりも不安定な Nef138-10(2F)ペプチドを TCR 側に近接させやすく、それにより多くの相互作用

用を獲得することで 2f TCR は A24/N138-10(wt)よりも A24/N138-10(2F)との親和性が高いと考えられる。

dual TCR は A24/N138-10(2F)のペプチド N 末端側を主に認識し、wt TCR や 2f TCR のように C 末端側の F6<sub>pep</sub> や W8<sub>pep</sub> と強く相互作用していなかった。F6<sub>pep</sub> は Nef138-10 のアンカー残基から離れており、HLA-A24 収容溝から突出している(補足図)。また W8<sub>pep</sub> は HLA-A24 の収容溝に位置し、さらにペプチド内で相互作用を形成している(図 2-16d)。これらのことから Nef138-10 における F6<sub>pep</sub> と W8<sub>pep</sub> は TCR と相互作用するとペプチド構造に大きな影響を与えうる重要なアミノ酸であることが A24/N138-10 単体構造からも予想される。しかし dual TCR は F6<sub>pep</sub>、W8<sub>pep</sub> と強く相互作用していなかったことから、A24/N138-10(2F)において HLA-A24 の H70<sub>a24</sub> と水素結合を形成している T5<sub>pep</sub> の構造に及ぼす影響が少なかったと考えられる。つまり dual TCR は A24/N138-10 ペプチドの構造変化が生じにくい部分を主に認識することで、A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(2F)の双方を認識することができるのだろうと考えられる。

本研究では 3 種類の TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(2F)との相互作用を解析することで、HIV の Nef138-10(2F)変異による TCR との相互作用に対する影響を検討した。その結果、Nef138-10(2F)の 2 番目のフェニルアラニンは Nef138-10(wt)のチロシンから変異すると、ペプチドと HLA-A24 との相互作用を変化させ、TCR と結合する際に影響を及ぼす変異であることが示唆された。

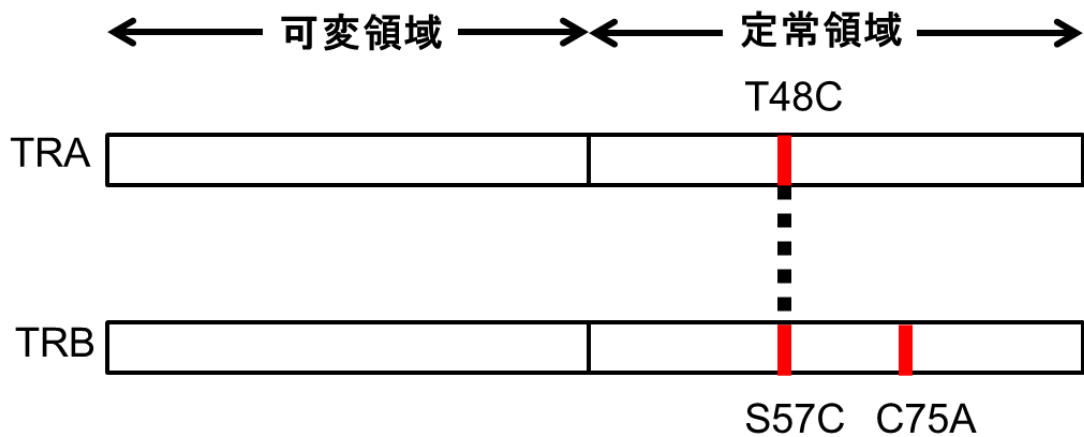


図 2-1. ジスルフィド結合を導入した TRA、TRB の構造.

TRA(TCR- $\alpha$  鎖)定常領域 48 番目のスレオニンと TRB(TCR- $\beta$  鎖)定常領域 57 番目のセリンをシステインとなるように置換してある(T48C, S57C)。また TRB 定常領域 75 番目のシステインをアラニンとなるように置換してある(C75A)。

それぞれの位置を赤線で示し、分子間ジスルフィド結合の位置を点線で示す。

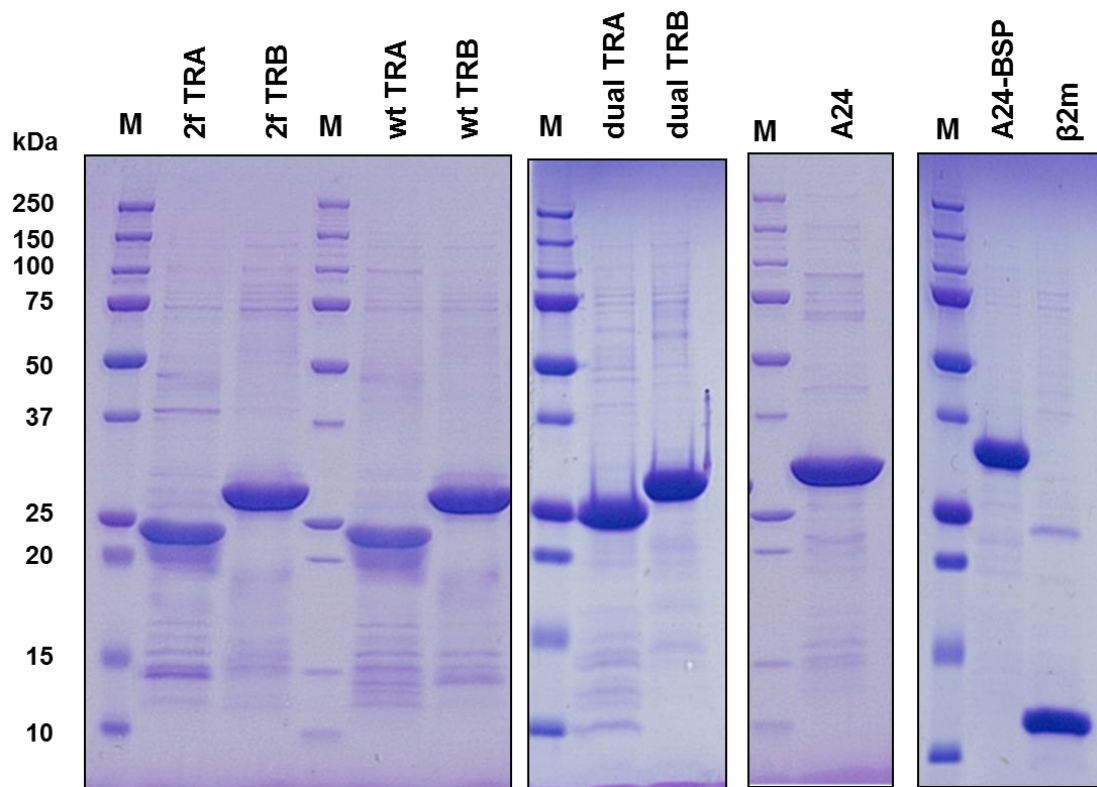


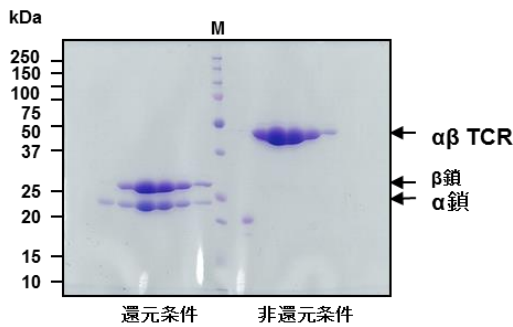
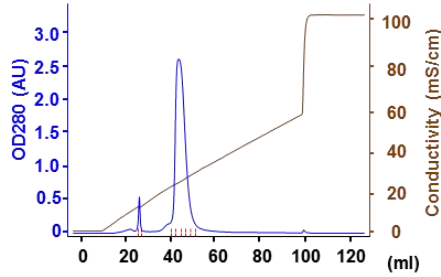
図 2-2. 可溶化した封入体タンパク質

SDS-PAGE (15%)を還元条件下でおこない、CBB 染色した(5μg/レーン)。

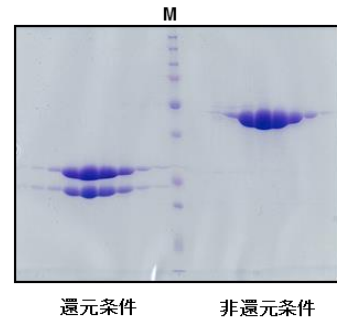
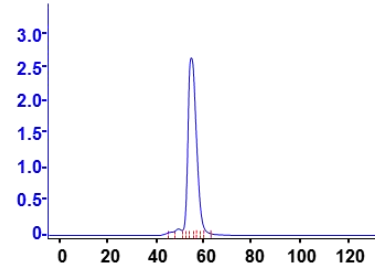
分子量は TRA:23kDa、TRB:29kDa、A24:32 kDa、A24-BSP:33kDa、β2m:12 kDa。M はマーカーを示す。

## wt TCR

### (a) イオン交換クロマトグラフィー

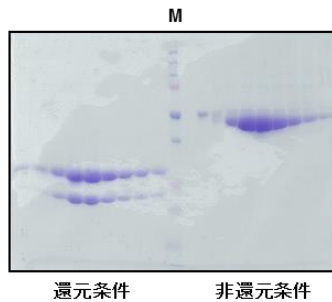
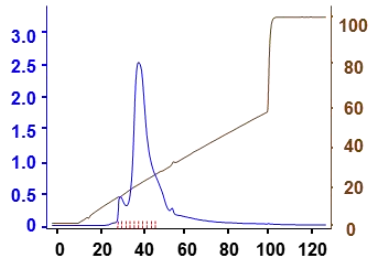


### (b) ゲル濾過クロマトグラフィー

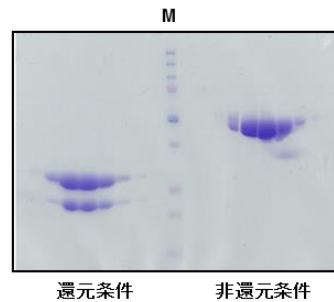
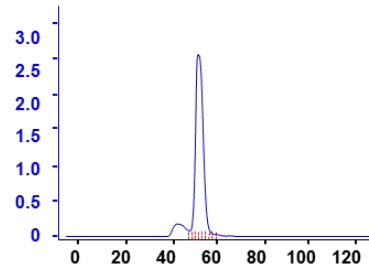


## 2f TCR

### (c) イオン交換クロマトグラフィー



### (d) ゲル濾過クロマトグラフィー



## 図 2-3. wt TCR と 2f TCR の精製

リフォールディングした wt TCR と 2f TCR のイオン交換クロマトグラフィー(a, c)とゲル濾過クロマトグラフィー(b, d)の精製結果を示す。それぞれ SDS-PAGE (12%) を還元、非還元条件下でおこない、TCR がヘテロダイマーであることを確認した。M はマーカを示す。

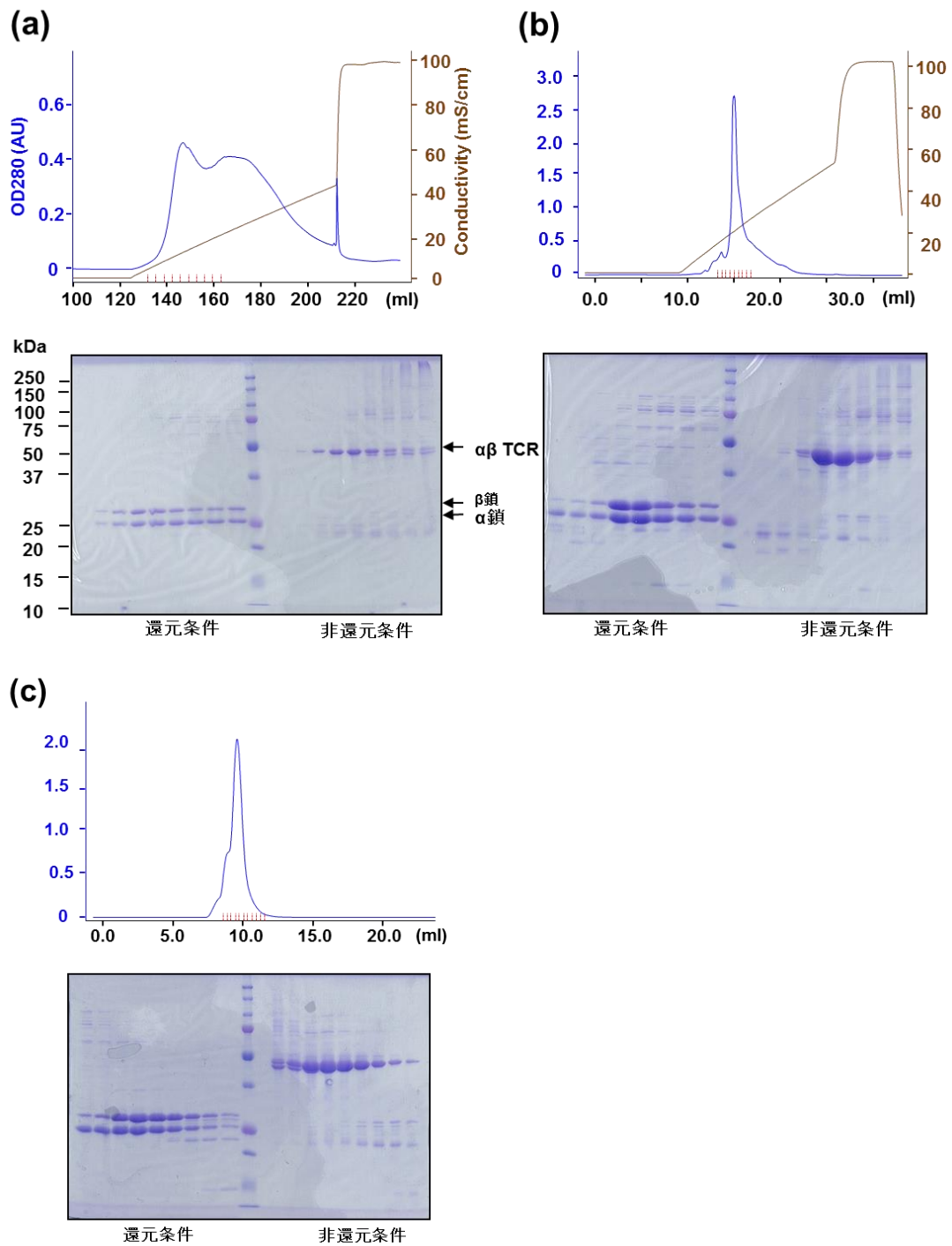


図 2-4. dual TCR の精製

リフォールディングした dual TCR の Resource Q カラム (a) と Mono Q カラム (b) を用いたイオン交換クロマトグラフィーの精製結果とゲル濾過クロマトグラフィー (c) の精製結果を示す。それぞれ SDS-PAGE (12%) を還元、非還元条件下でおこなった。M はマーカを示す。

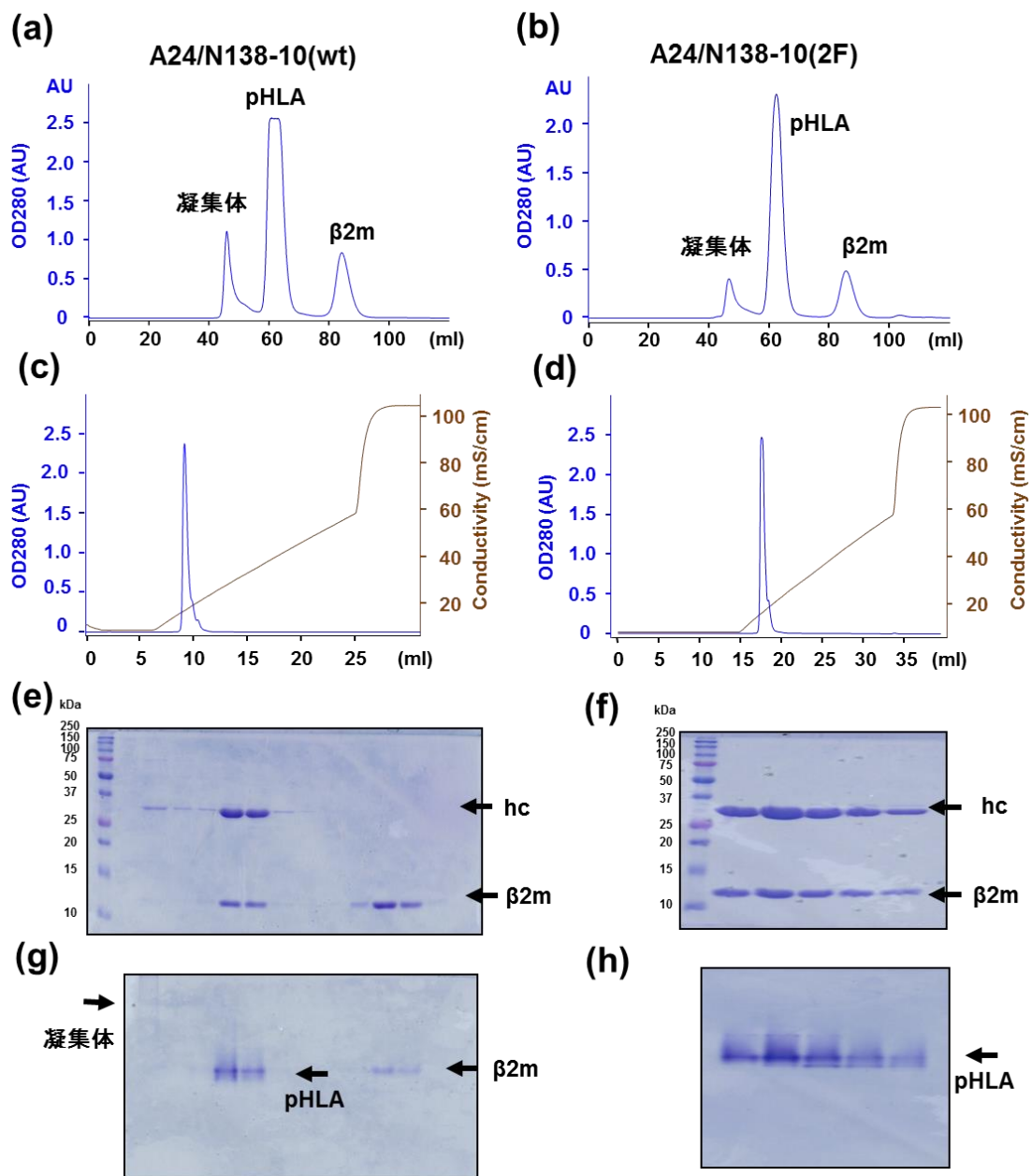


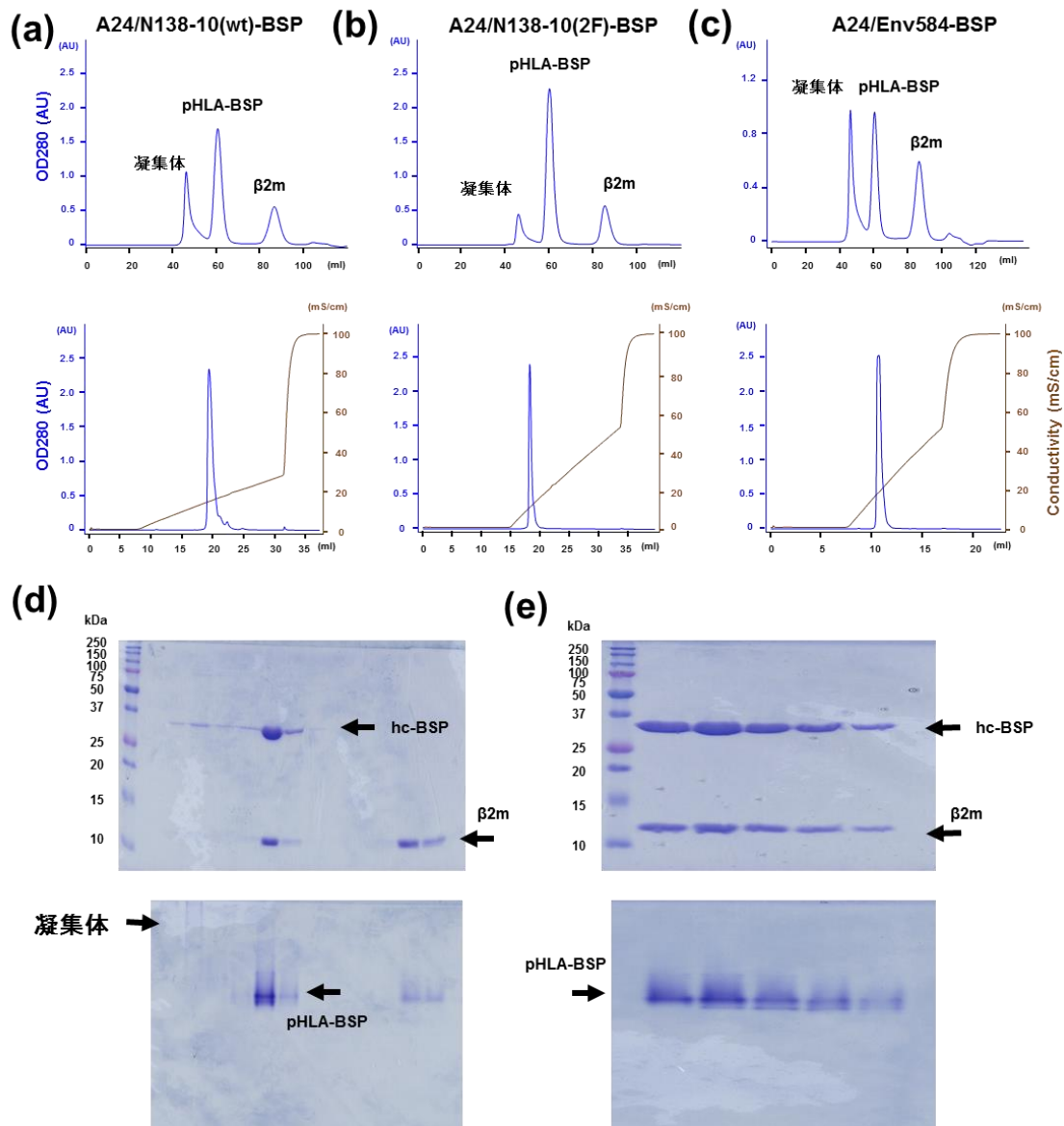
図 2-5. A24/N138-10 の精製

(a、c) A24/N138-10(wt)のゲル濾過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーの精製結果。

(b、d) A24/N138-10(2F)のゲル濾過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーの精製結果。

(e、g) は(b)の SDS-PAGE (15%)と Native PAGE (10%)。 (f、h) は(d)の SDS-PAGE (15%)と Native PAGE (10%)。 図中の hc と  $\beta$ 2m は、それぞれ HLA-A24 と  $\beta$ 2 ミクログロブリンを示す。また pHLA は HLA-A24 と  $\beta$ 2m の複合体であることを示す。





## 図 2-6. A24/N138-10-BSP の精製

(a-c) A24/N138-10(wt)-BSP と A24/N138-10(2F)-BSP、A24/Env584-BSP のゲル濾過クロマトグラフィー(上)とイオン交換クロマトグラフィー(下)の精製結果。

(d) (b)のゲル濾過クロマトグラフィー精製後に 15% SDS-PAGE(上)と 10% Native-PAGE(下)を行い、CBB 染色した。

(e) (b)のイオン交換クロマトグラフィー精製後に 15% SDS-PAGE(上)と 10% Native-PAGE(下)を行い、CBB 染色した。

図中の hc-BSP と  $\beta 2m$ 、M はそれぞれ HLA-A24-BSP と  $\beta 2$  ミクログロブリン、マーカーを示す。

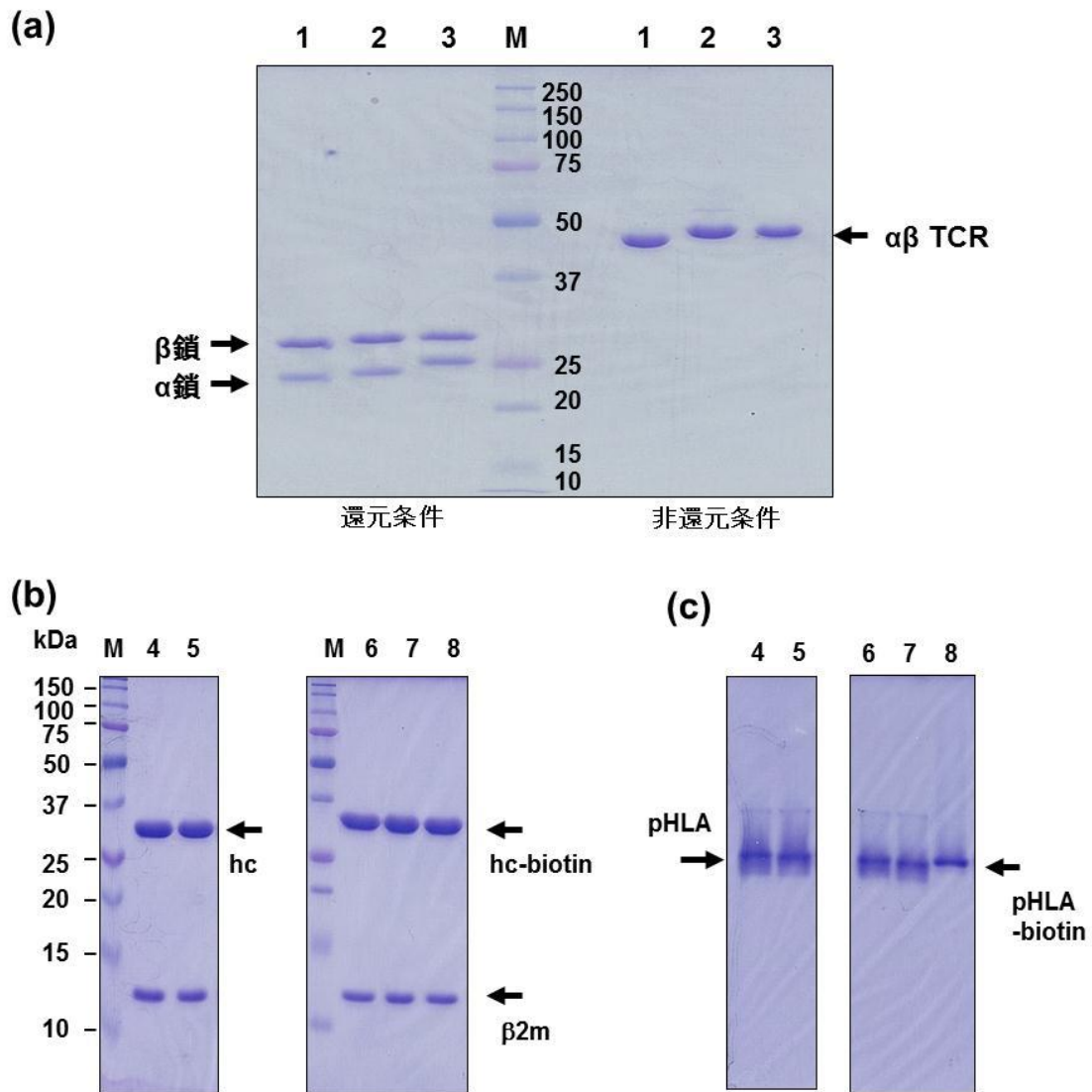


図 2-7. 精製後の TCR と pHLA、pHLA-biotin

(a) SDS-PAGE (12%) (2  $\mu$ g/レーン).

1: wt TCR

2: 2f TCR

3: dual TCR

(b) SDS-PAGE (15%)、(c) Native-PAGE (10%) (5  $\mu$ g/レーン).

4: A24/N138-10(wt)

5: A24/N138-10(2F)

6: A24/N138-10(wt)-biotin

7: A24/N138-10(2F)-biotin

8: A24/Env584-biotin

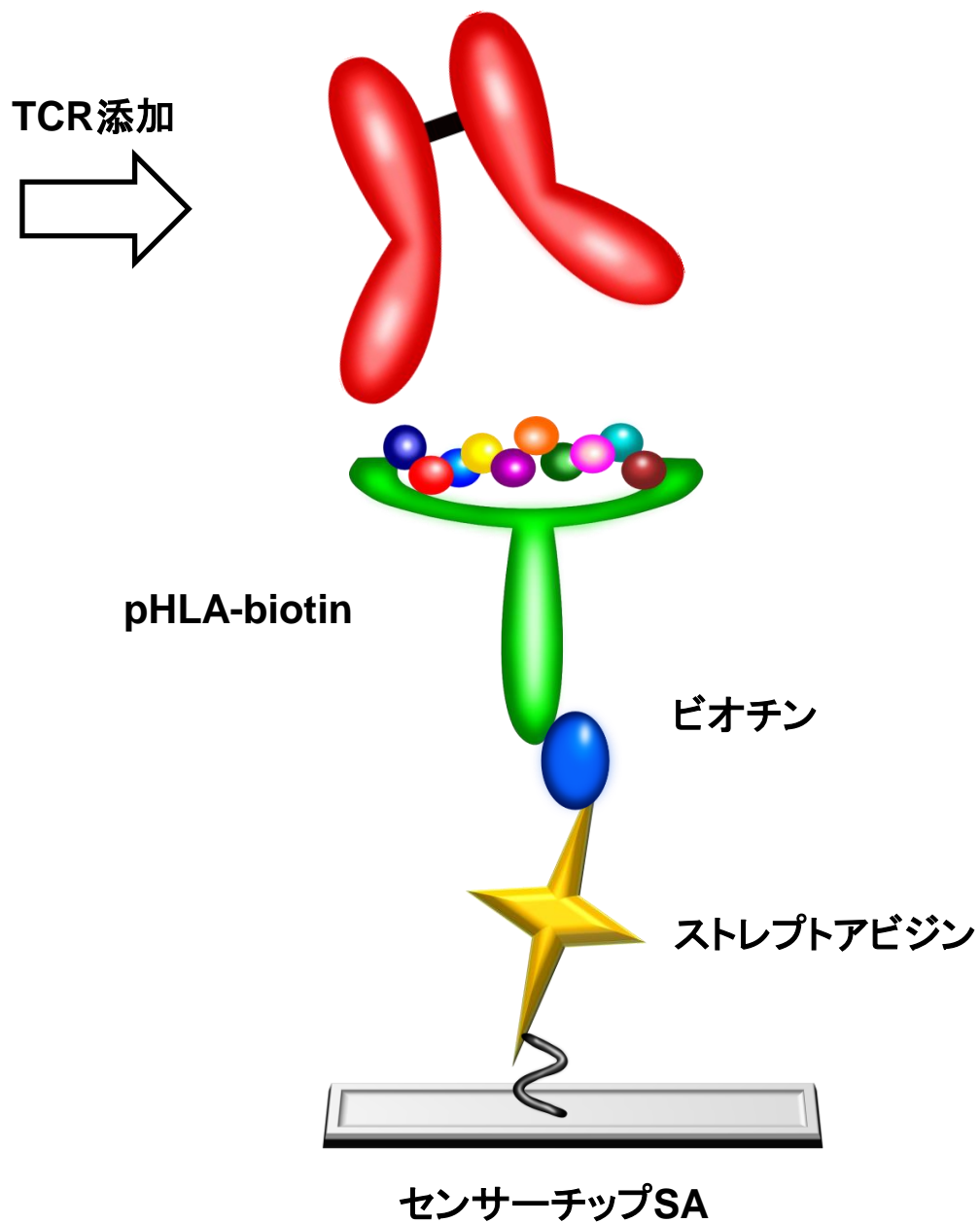
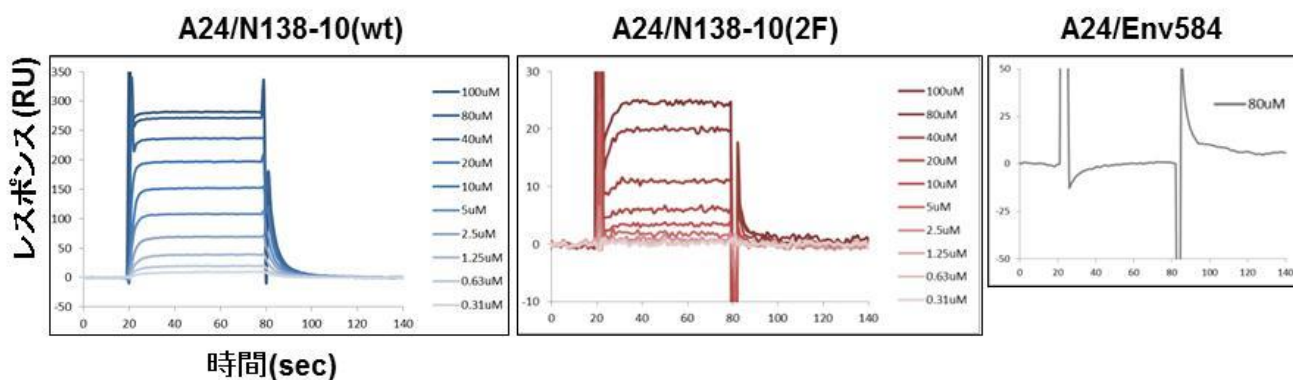


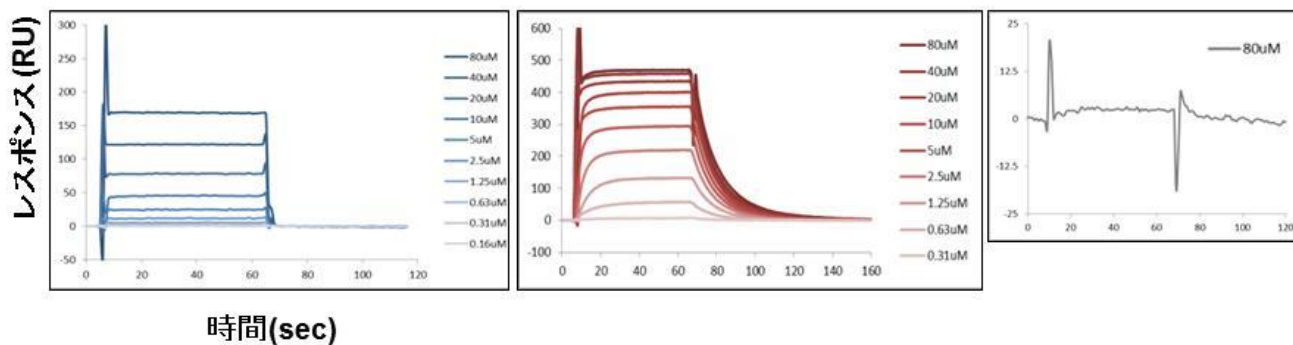
図 2-8. ビアコアを用いた分子間相互作用解析

リンカーを介してストレプトアビジンが固相化されたチップ(センサーチップ SA) にビオチン化した pHLA(pHLA-biotin)を固定化した。  
そこへ TCR の希釈系列を調製し、添加した。

(a) wt TCR



(b) 2f TCR



(c) dual TCR

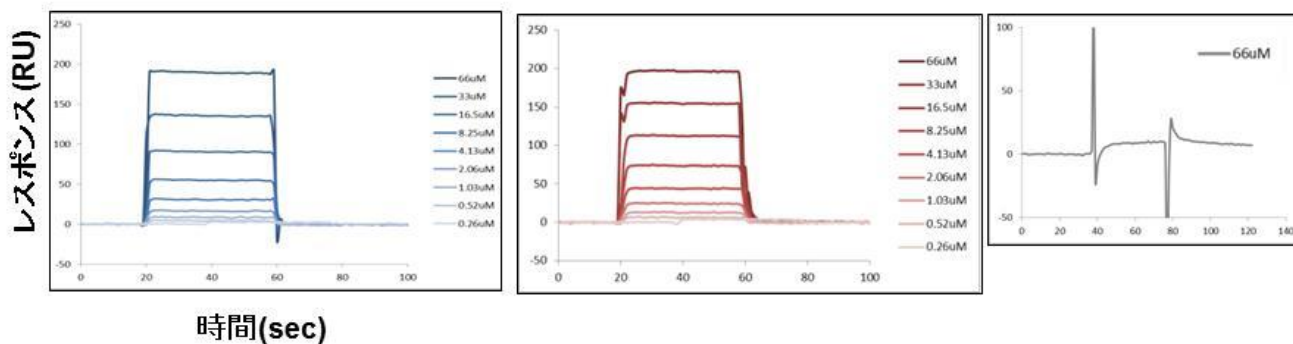
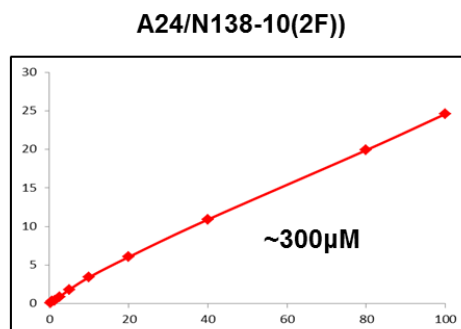
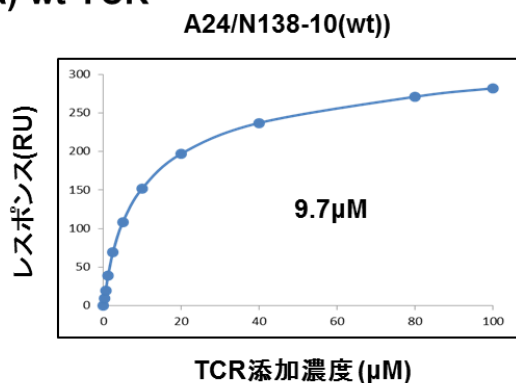


図 2-9. センサーグラム

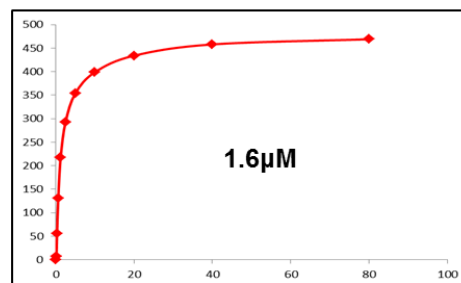
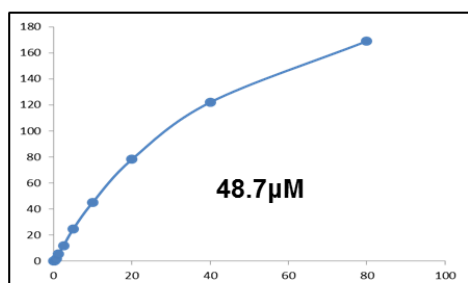
(a) wt TCR (0.31-100  $\mu$ M)、(b) 2f TCR (0.31-80  $\mu$ M)、(c) dual TCR (0.26-66  $\mu$ M) の (左) A24/N138-10(wt)、(中央) A24/N138-10(2F)、(右) A24/Env584 (ネガティブコントロール) に対するセンサーグラムを示した。

縦軸はレスポンス (Resonance Unit)、横軸は時間 (sec) を示す。

(a) wt TCR



(b) 2f TCR



(c) dual TCR

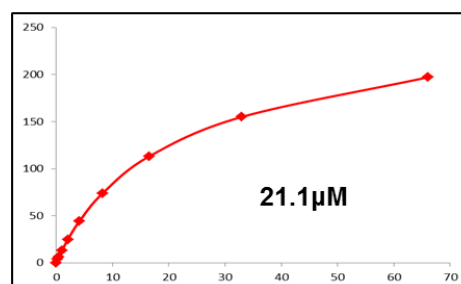
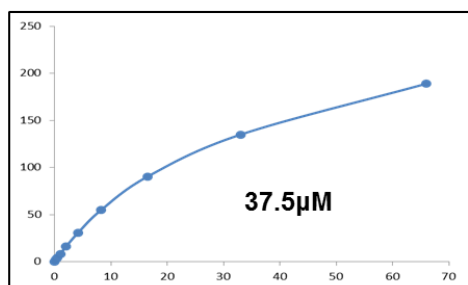


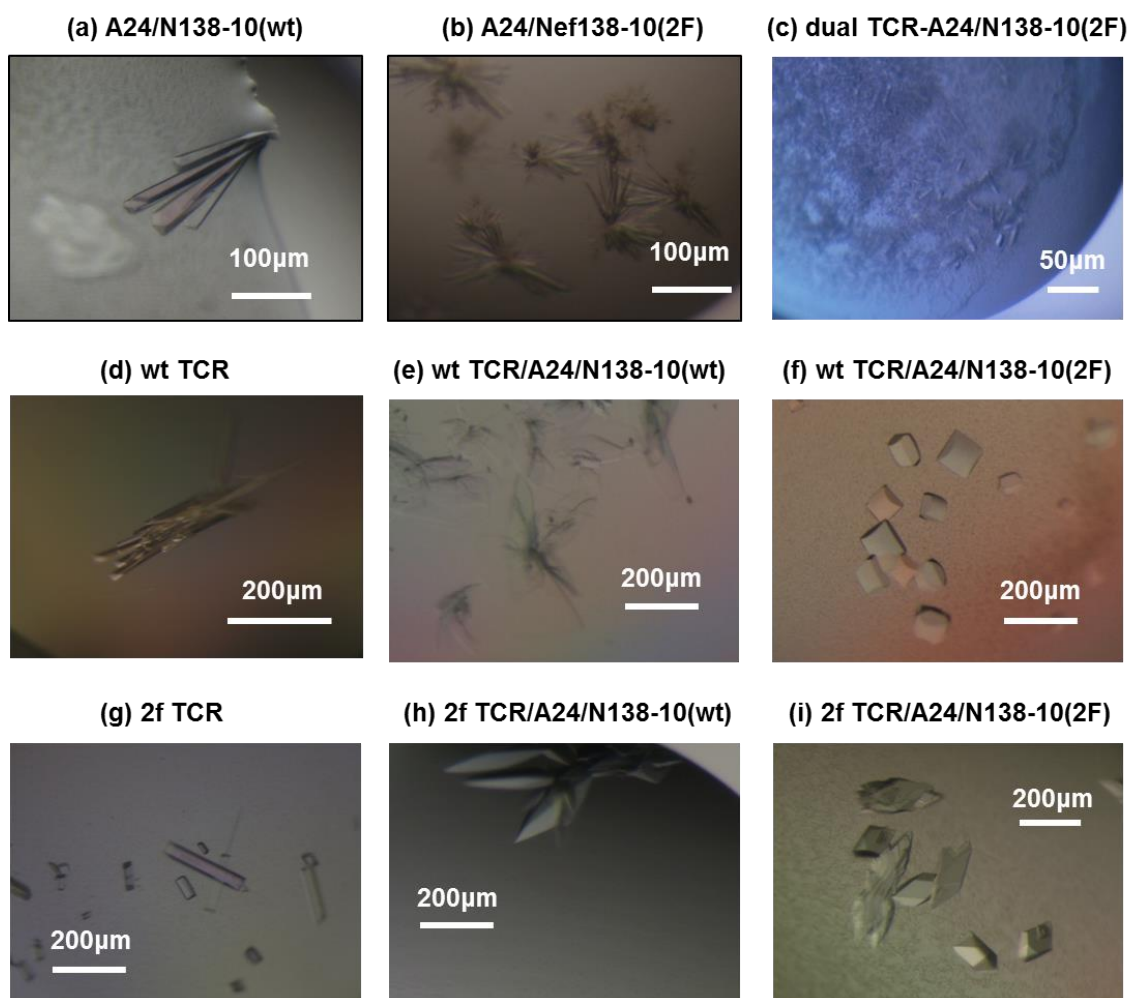
図 2-10. スキャッチャードプロット

図 2-9 から作製したスキャッチャードプロット。

(a) wt TCR、(b) 2f TCR、(c) dual TCR

縦軸をレスポンス(Resonance Unit)、横軸を添加した TCR の濃度を示す。

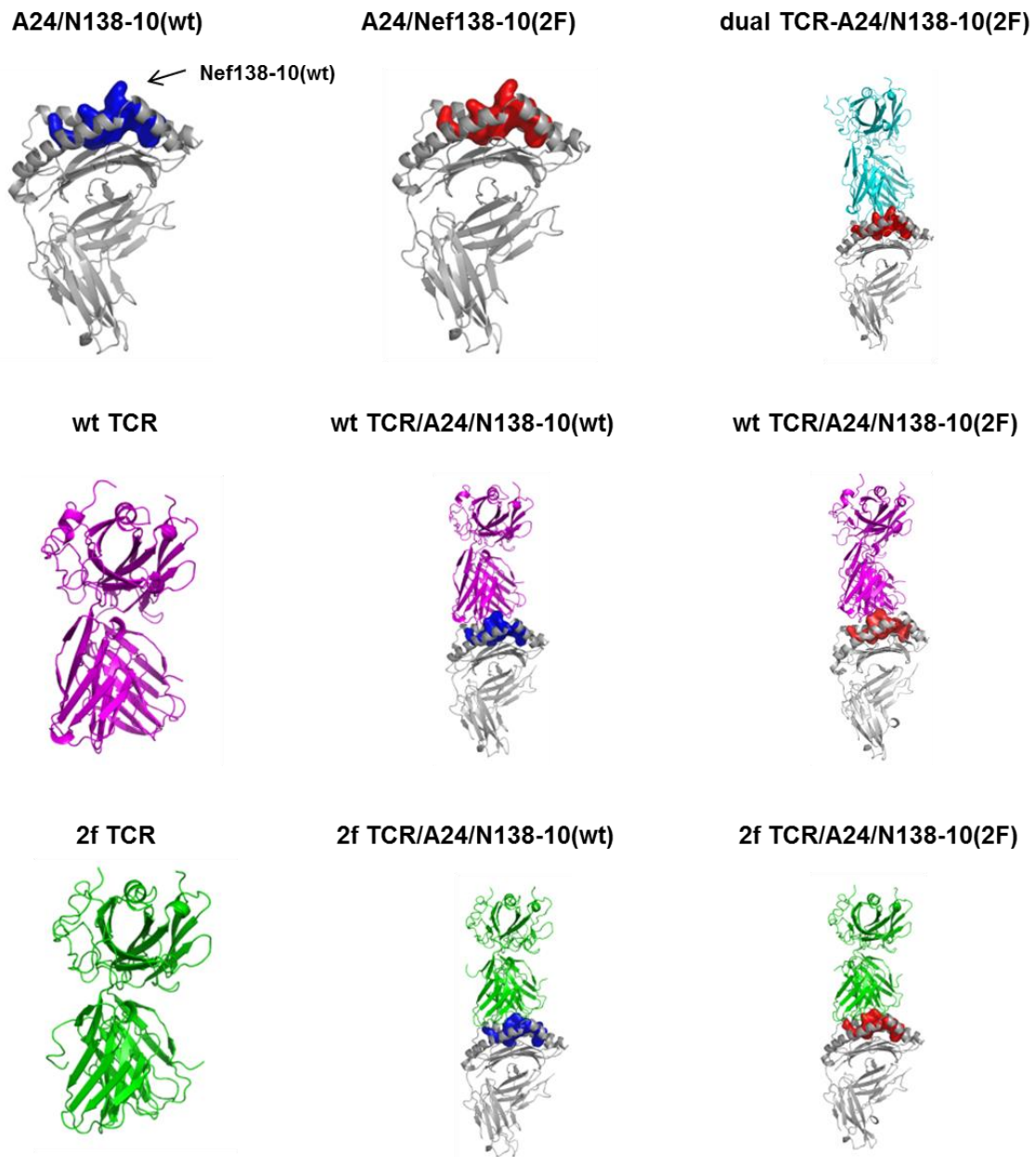
図中の数値は平衡値解析により算出した解離定数を示す。



**図 2-11. 結晶化**

pHLA 単体、TCR、TCR-pHLA 複合体の結晶を示した。それぞれの結晶化条件を以下に示す。

- (a) 5% PEG 8000, 50 mM ammonium formate.
- (b) 20% PEG 8000, 200 mM ammonium acetate.
- (c) 80 mM HEPES, pH 7.5, 8 mM Cobalt(II) chloride hexahydrate, 8% PEG, 6000, 4% 2-Methyl-2, 4-pentanediol (MPD), 8 mM betaine hydrochloride.
- (d) 0.1 M Bis-Tris, pH 6.5, 20% PEG 8000, 0.5 M magnesium chloride.
- (e) 20% PEG 3350, 0.1 M ammonium phosphate dibasic, 10 mM barium chloride dihydrate.
- (f) 9% PEG 3350, 9 mM iron(III) chloride hexahydrate, 90 mM sodium fluoride.
- (g) 0.2 M potassium sulfate, 0.1 M MES, pH 6.0, 15% PEG 8000.
- (h) 10% PEG8000, 0.1 M sodium formate, 0.1 M MES, pH 6.0.
- (i) 10% PEG3350, 0.1 M sodium nitrate, 0.1 M MES, pH 6.5.



**図 2-12. 全体構造**

TCR 単体、pHLA 単体、TCR-pHLA 複合体の全体構造を示した。

wt TCR をマゼンタ、2f TCR をグリーン、dual TCR をシアン、HLA-A24 と  $\beta$ 2m をグレーのカートゥーン表示で示した。

Nef138-10(wt)、Nef138-10(2F)ペプチドはそれぞれブルーとレッドの分子表面図で示した。

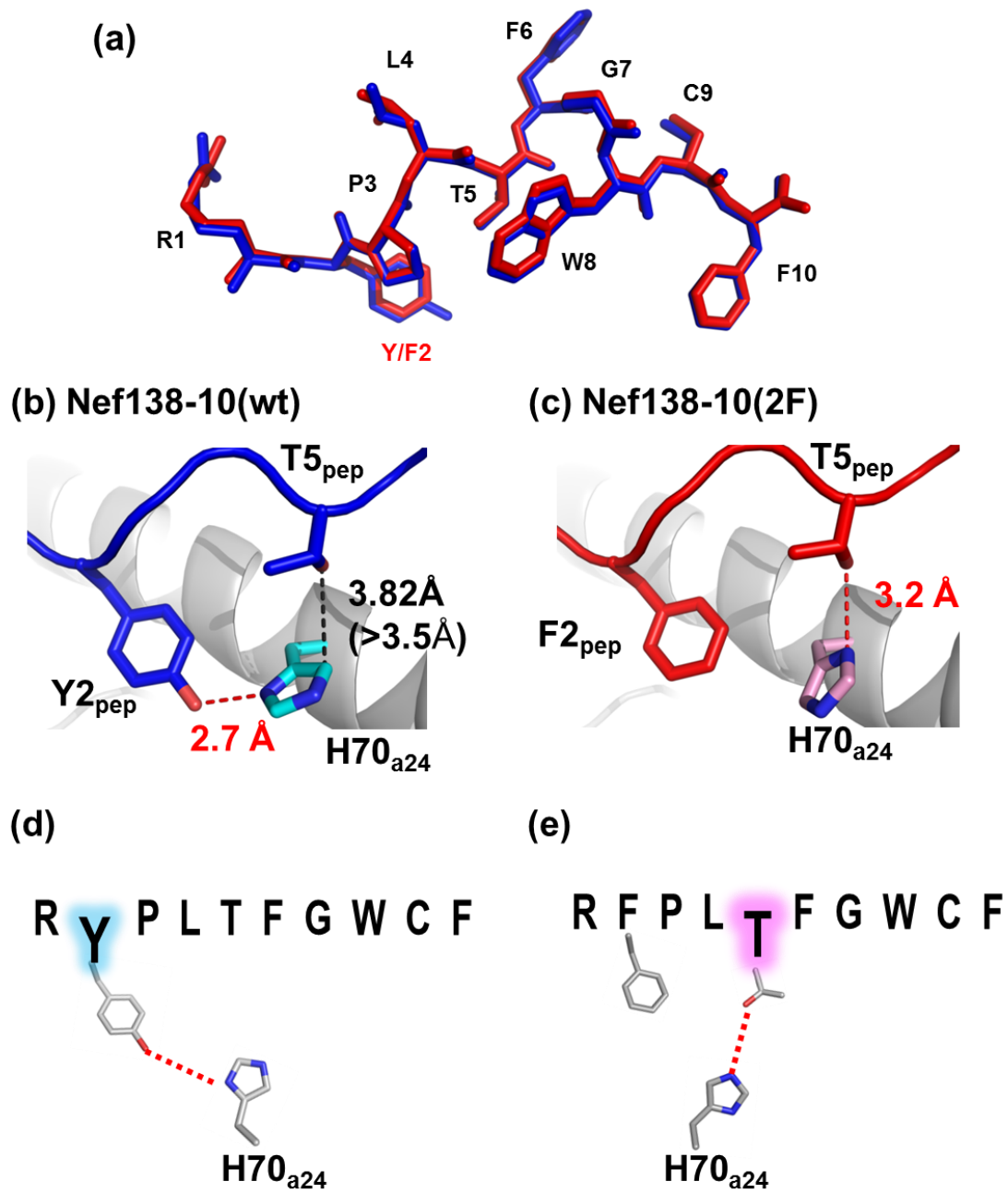
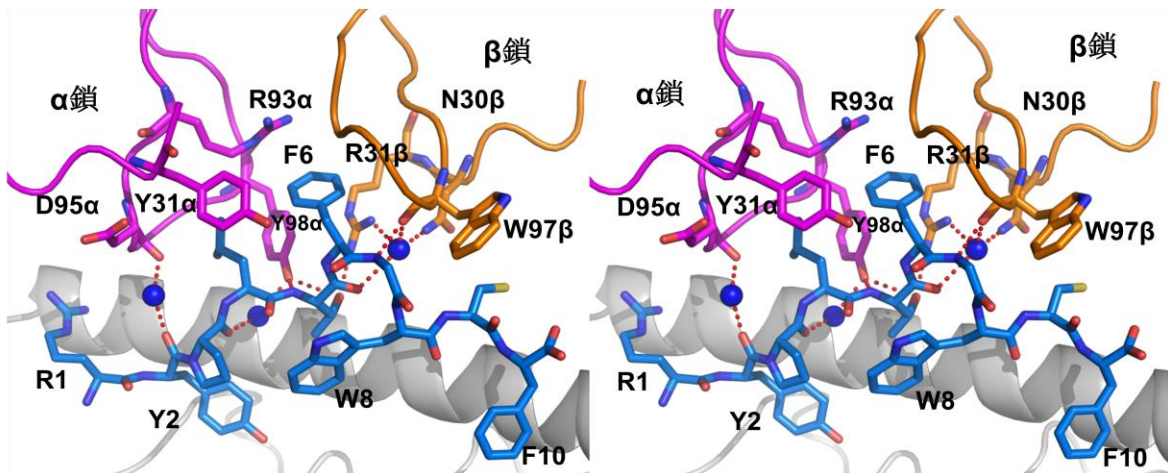


図 2-13. A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(2F)構造の比較

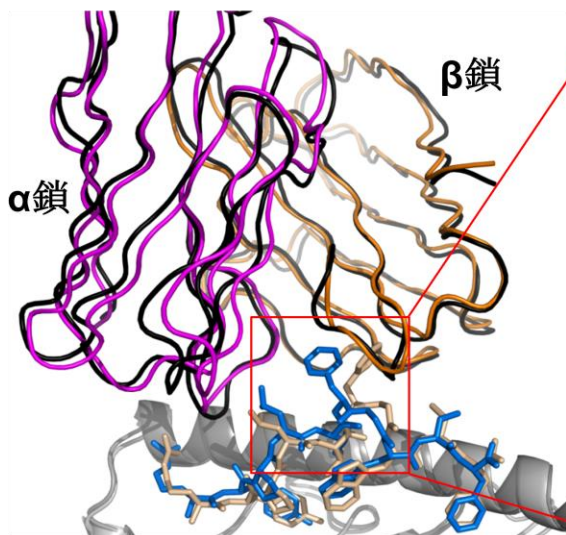
(a) Nef138-10(wt)(ブルー)と Nef138-10(2F)(レッド)ペプチド構造(スティック表示)の重ね合わせ。(b、c) HLA-A24 の 70 番目のヒスチジン(H70<sub>a24</sub>)と (b) Nef138-10(wt)ペプチド、(c) Nef138-10(2F)ペプチドとの相互作用を示した。(d)と(e)はそれぞれ(b)と(c)の模式図を示す。図中の赤い点線は水素結合(2.5-3.5 Å)を示す。



(a) <ステレオ図>



(b)



(c)

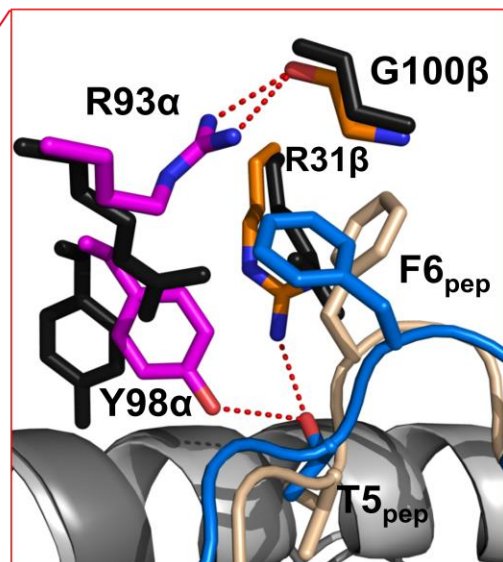
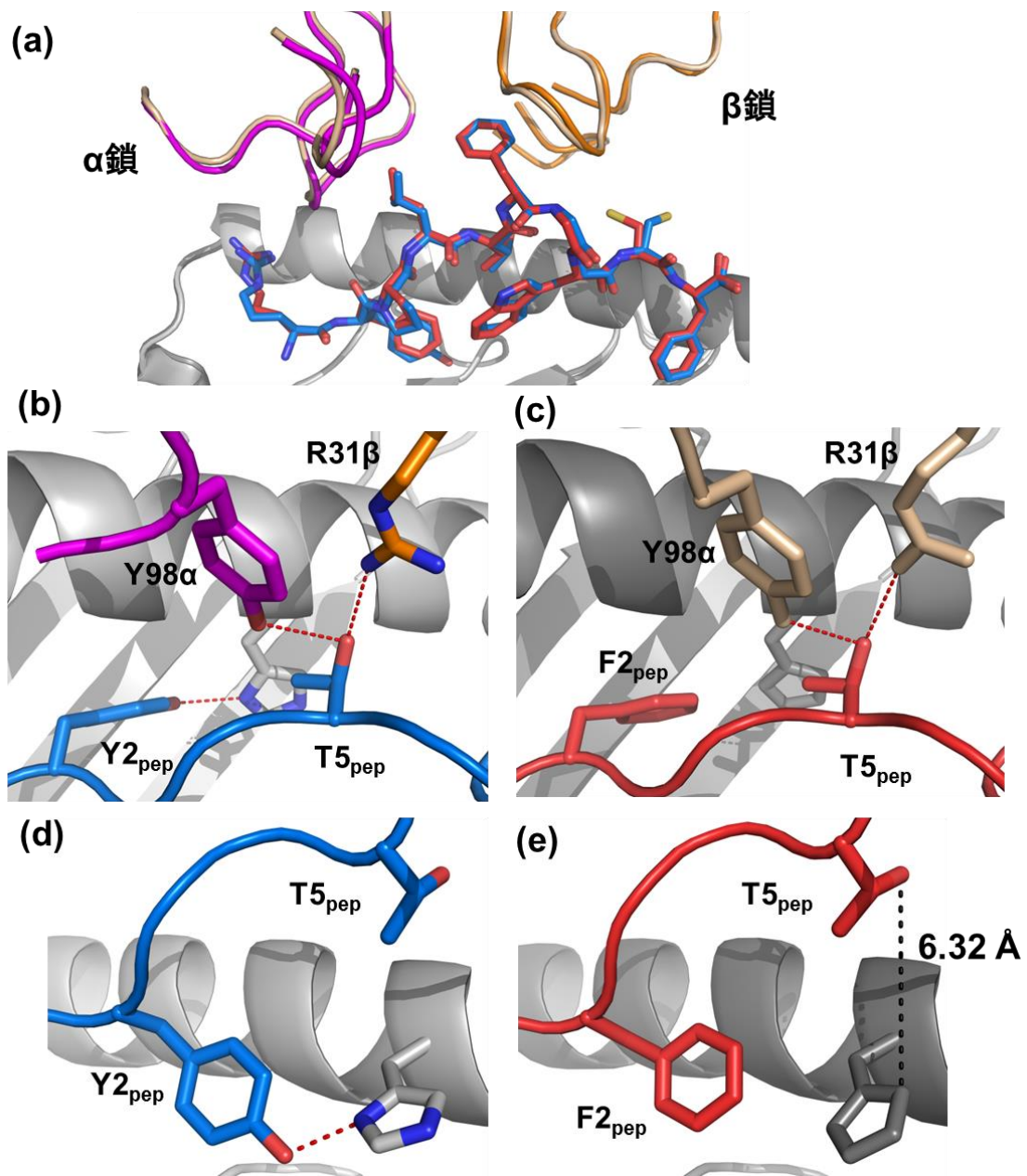


図 2-14. wt TCR と A24/N138-10(wt)との相互作用

(a) wt TCR-A24/N138-10(wt)複合体における wt TCR(α:マゼンタ、β:オレンジ)と Nef138-10(wt)ペプチド(ブルー)との相互作用(ステレオ図)。HLA-A24のα1ドメインはグレーのカートゥーンで表示したが、α2ドメインは視認性を考慮し除いた。Nef138-10(wt)ペプチドを青のスティック表示で示す。また水分子を青い球で示し、水素結合は赤い点線で示した。

(b、c) wt TCR 単体(ブラック)と A24/N138-10(wt)単体(ライトブラウン)を wt TCR-A24/N138-10(wt)複合体の構造に対して重ね合わせた。(c) F6<sub>pep</sub>と T5<sub>pep</sub>に対する wt TCR との相互作用。



**図 2-15. wt TCR-A24/N138-10(wt)と wt TCR-A24/N138-10(2F)の比較**

wt TCR-A24/N138-10(wt)と wt TCR-A24/N138-10(2F)複合体構造の重ね合わせを HLA-A24  $\alpha$ 1 $\alpha$ 2ドメインに対して行った。

(a) ペプチドの全体像。(b) wt TCR と Nef138-10(wt)ペプチドとの相互作用。(c) wt TCR と Nef138-10(2F)ペプチドとの相互作用。(d) Nef138-10(wt)ペプチドと HLA-A24 との相互作用。(e) Nef138-10(2F)と HLA-A24 との相互作用。wt TCR-A24/N138-10(wt)については図 2-14と同じ色付けをした。wt TCR-A24/N138-10(2F)についてはTCRをライトブラウン、Nef138-10(2F)ペプチドをレッドで示した。また水素結合は赤い点線で示した。

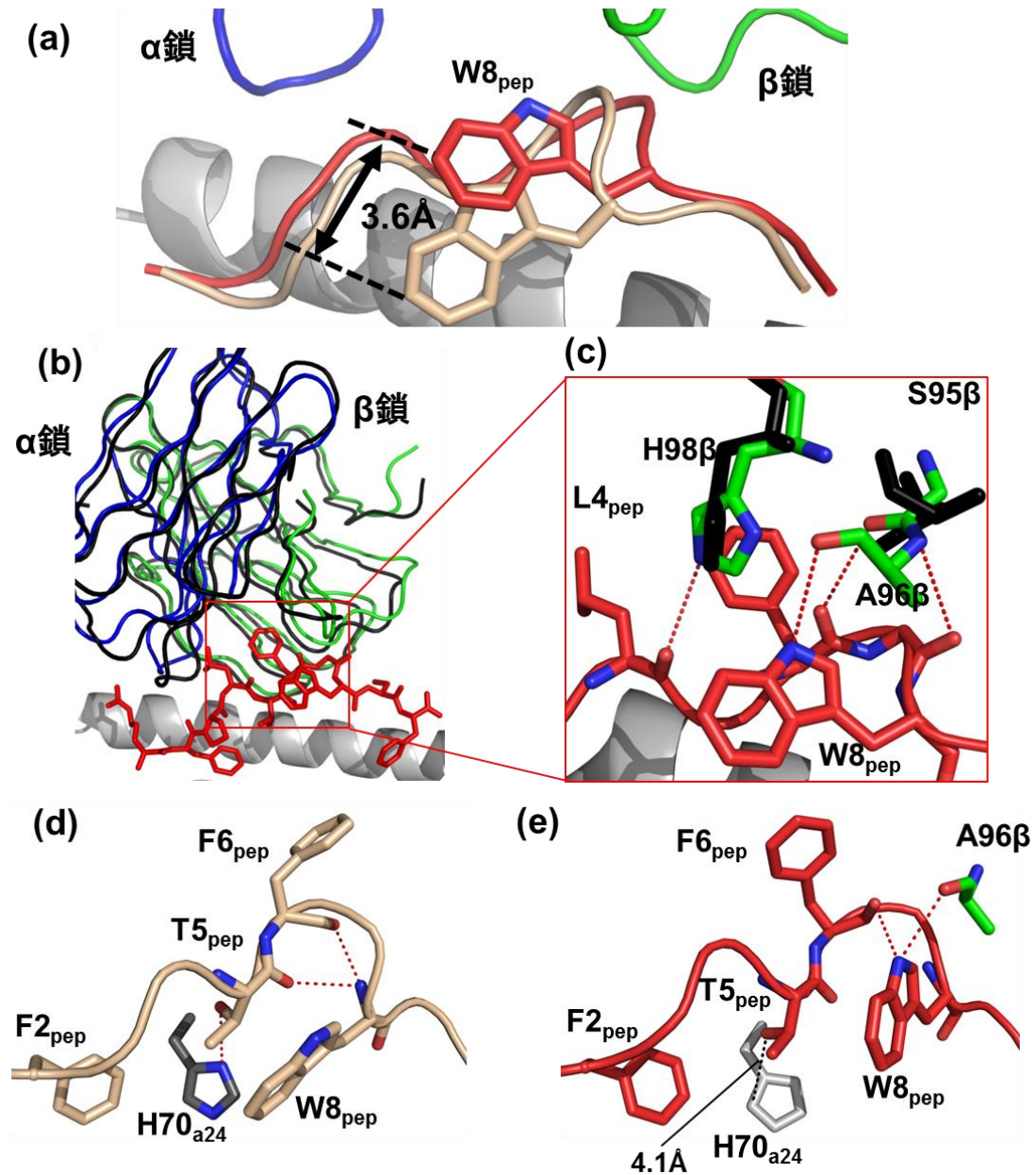
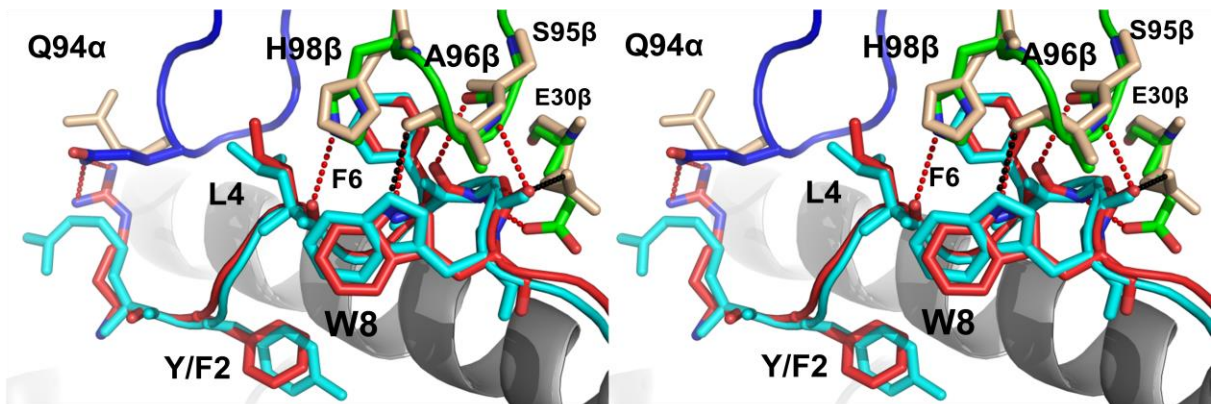


図 2-16. 2f TCR と Nef138-10(2F) の相互作用

(a) 2f TCR-A24/N138-10(2F) 複合体と A24/N138-10(2F) 単体の Nef138-10(2F) ペプチド構造を比較した。2f TCR-A24/N138-10(2F) における TCR $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖をそれぞれ青と緑で、Nef138-10(2F) ペプチド構造をレッドで示す。A24/N138-10(2F) 単体のペプチド構造はライトブラウンで示した。(b) 2f TCR 単体(ブラック)と 2f TCR-A24/N138-10(2F) 複合体の構造を重ね合わせた。(c) 2f TCR と Nef138-10(2F) ペプチドとの相互作用。(d) A24/N138-10(2F) 単体における Nef138-10(2F) ペプチド構造(ライトブラウン)。(e) 2f TCR-A24/N138-10(2F) 複合体における Nef138-10(2F) ペプチド構造。水素結合を赤い点線で示した。

(a) <ステレオ図>



(b)

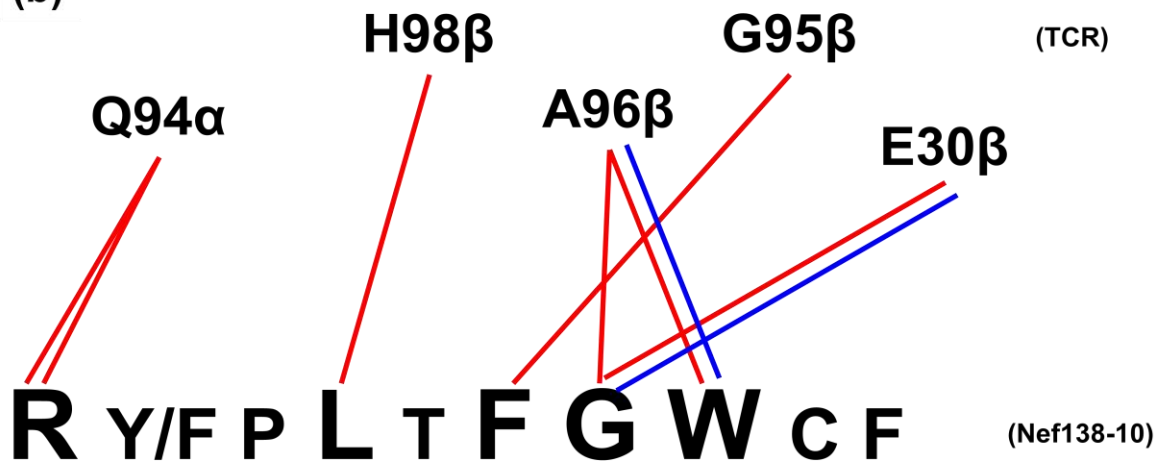


図 2-17. 2f TCR-A24/N138-10(wt)と 2f TCR-A24/N138-10(2F)の相互作用の比較  
(a) 2f TCR による A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(2F)との相互作用を比較した (ステレオ図)。  
(b) (a) の模式図。TCR と Nef138-10(wt)との水素結合を青線で、Nef138-10(2F)との水素結合を赤線で示した。

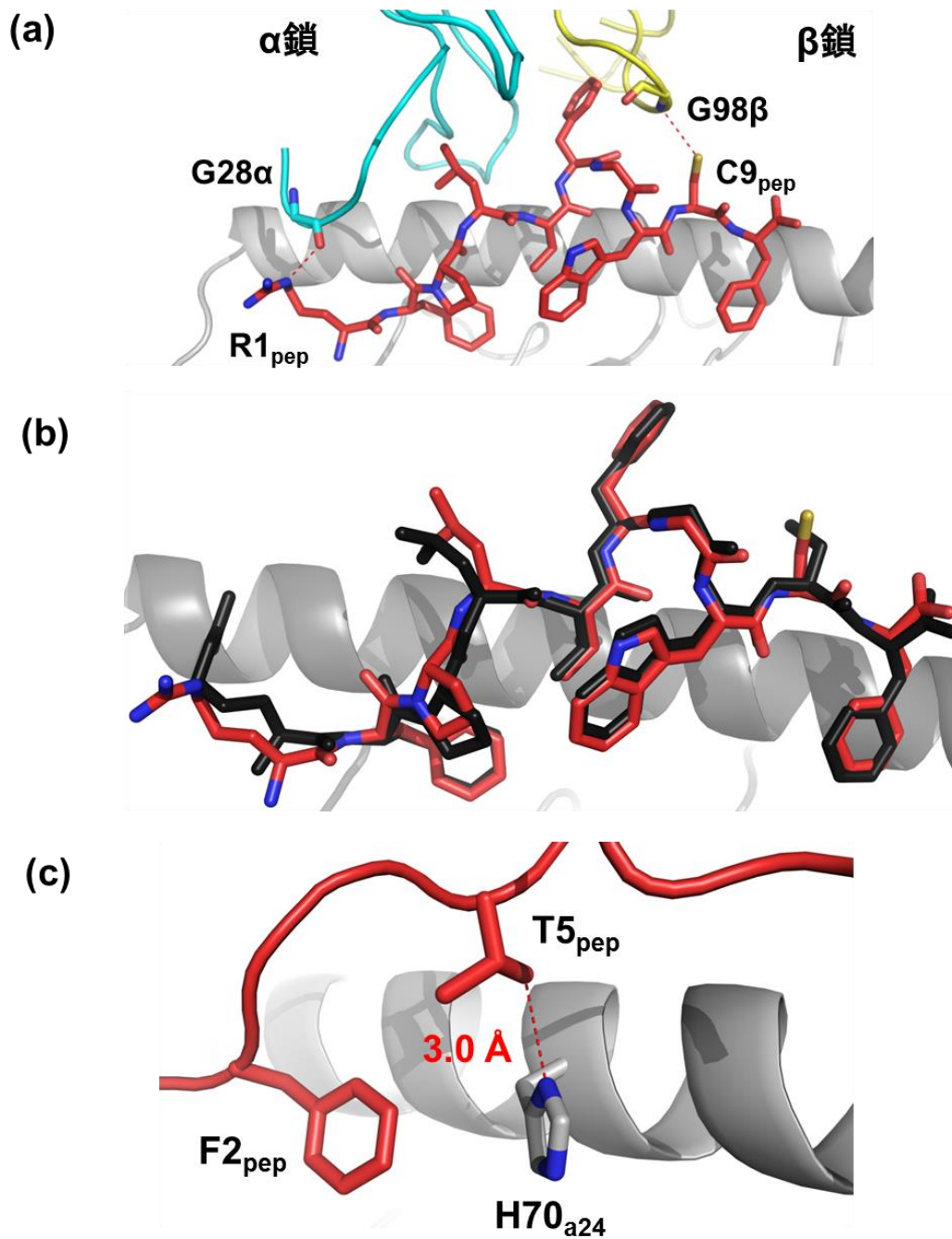


図 2-18. dual TCR と A24/N138-10(2F)の相互作用

(a) dual TCR と A24/N138-10(2F)の相互作用面。dual TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖をそれぞれシアンとイエロー、Nef138-10(2F)ペプチドを赤のスティック表示で示した。また水素結合は赤い点線で示した。(b) dual TCR-A24/N138-10(2F)複合体と A24/N138-10(2F)単体の Nef138-10(2F)ペプチド構造を比較した。(c) dual TCR-A24/N138-10(2F)複合体における Nef138-10(2F)ペプチドと HLA-A24 との相互作用。HLA-A24 $\alpha$ 1ドメインをグレーで示した。また水素結合は赤い点線で示した。

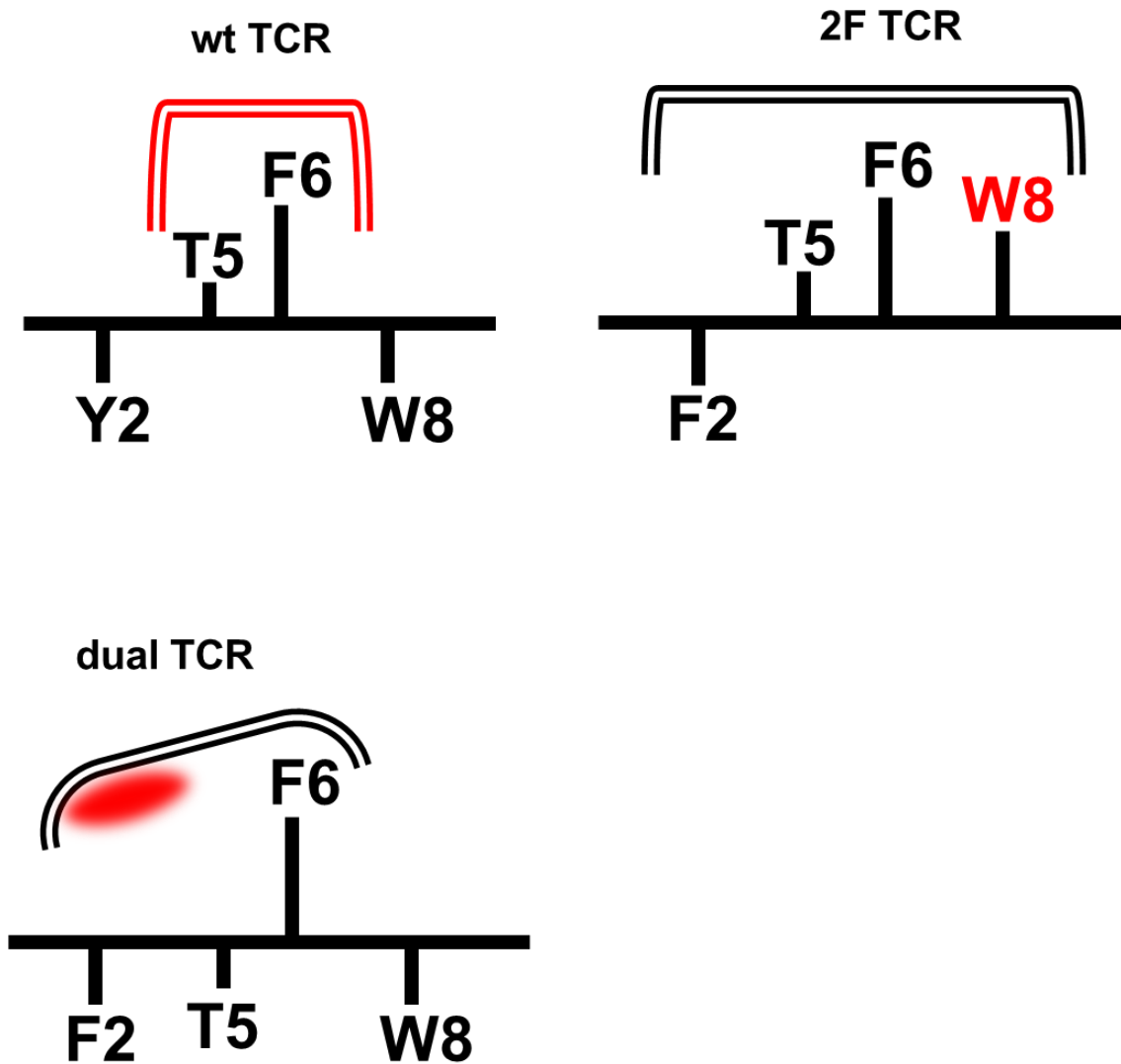


図 2-19. Nef138-10 ペプチドに対する各 TCR との相互作用様式の模式図  
 wt TCR-A24/N138-10(wt)、2f TCR-A24/N138-10(2F)、dual  
 TCR-A24/N138-10(2F)における TCR と Nef138-10 ペプチドとの相互作用様式を示  
 した。



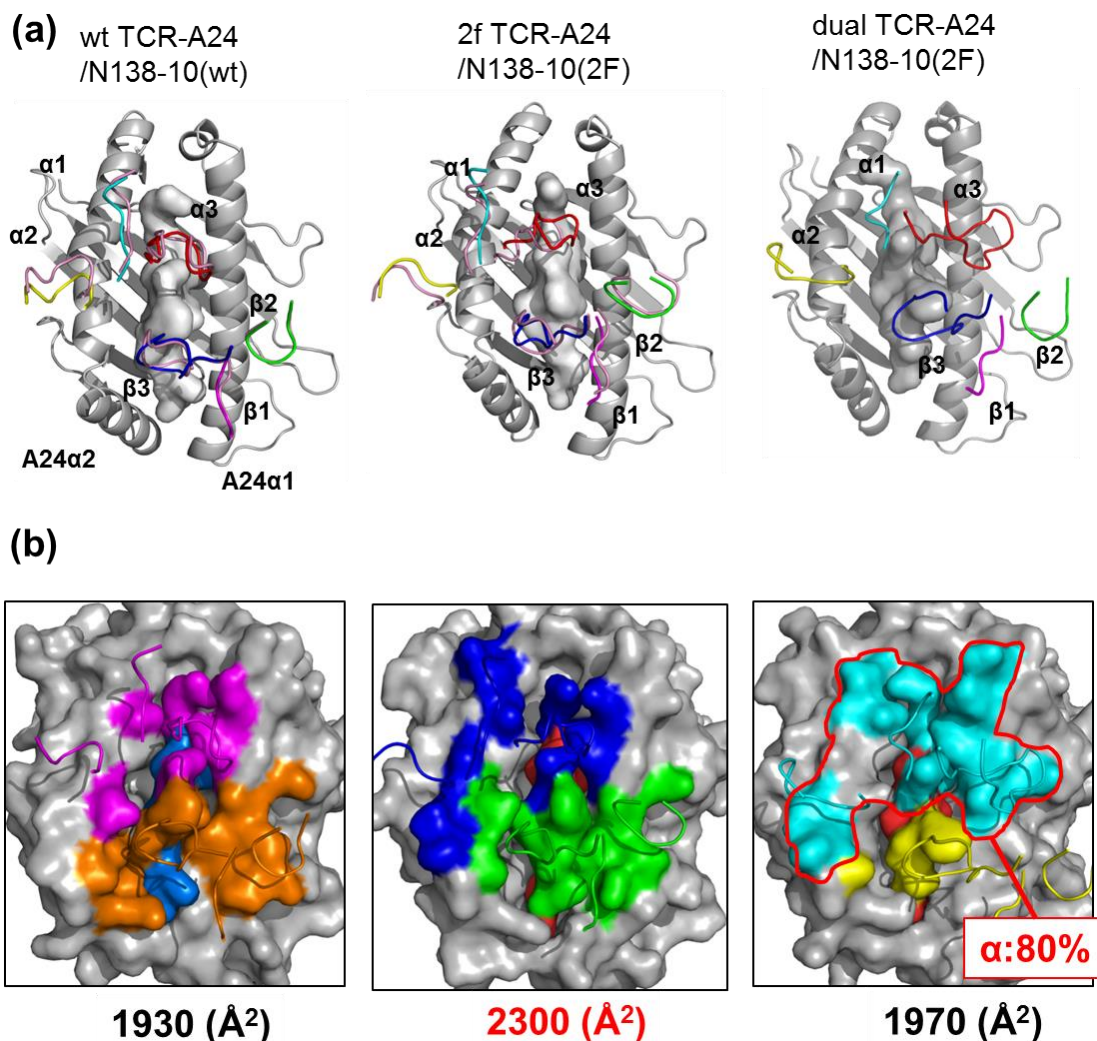


図 2-21. TCR-pHLA 複合体のフットプリント

(a) pHLA に対する TCR の CDR の位置を示した。HLA-A24 $\alpha$ 1 $\alpha$ 2 ドメインをグレーのカーブ表示、ペプチドをグレーの分子表面図で示した。TCR の CDR $\alpha$ 1 (シアン)、CDR $\alpha$ 2 (イエロー)、CDR $\alpha$ 3 (レッド)、CDR $\beta$ 1 (マゼンタ)、CDR $\beta$ 2 (グリーン)、CDR $\beta$ 3 (ブルー) はループ表示で示した。wt TCR と 2f TCR は TCR 単体 (ピンク) も示した。

(b) pHLA (分子表面図) における TCR (ループ表示) との接触表面を色付けした。wt TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖は、それぞれマゼンタ、オレンジ、2f TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖は、それぞれブルー、グリーン、dual TCR の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖は、それぞれシアン、イエローで示した。Nef138-10(wt) と Nef138-10(2F) ペプチドは、それぞれブルーとレッドの分子表面図で示した。



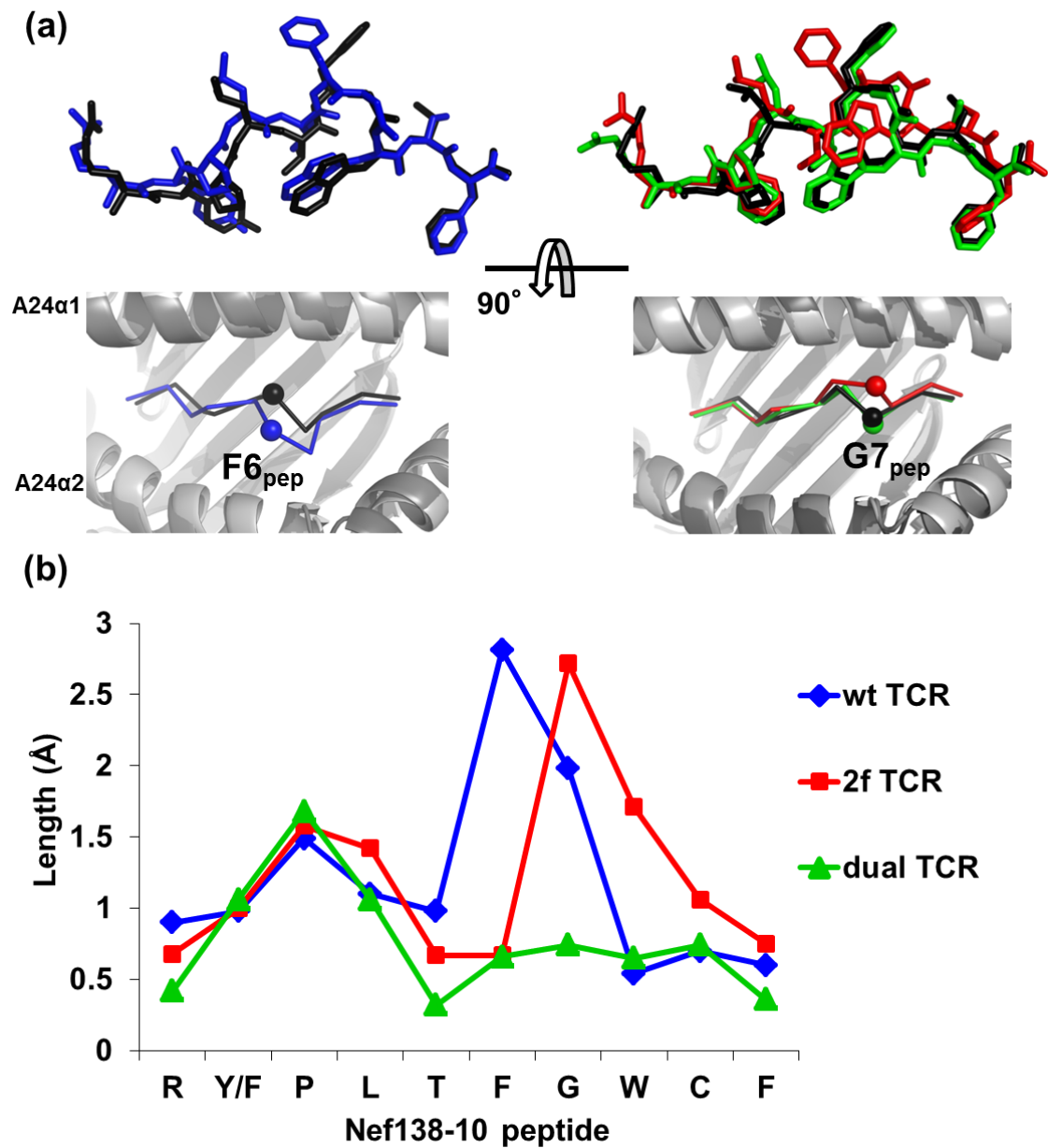
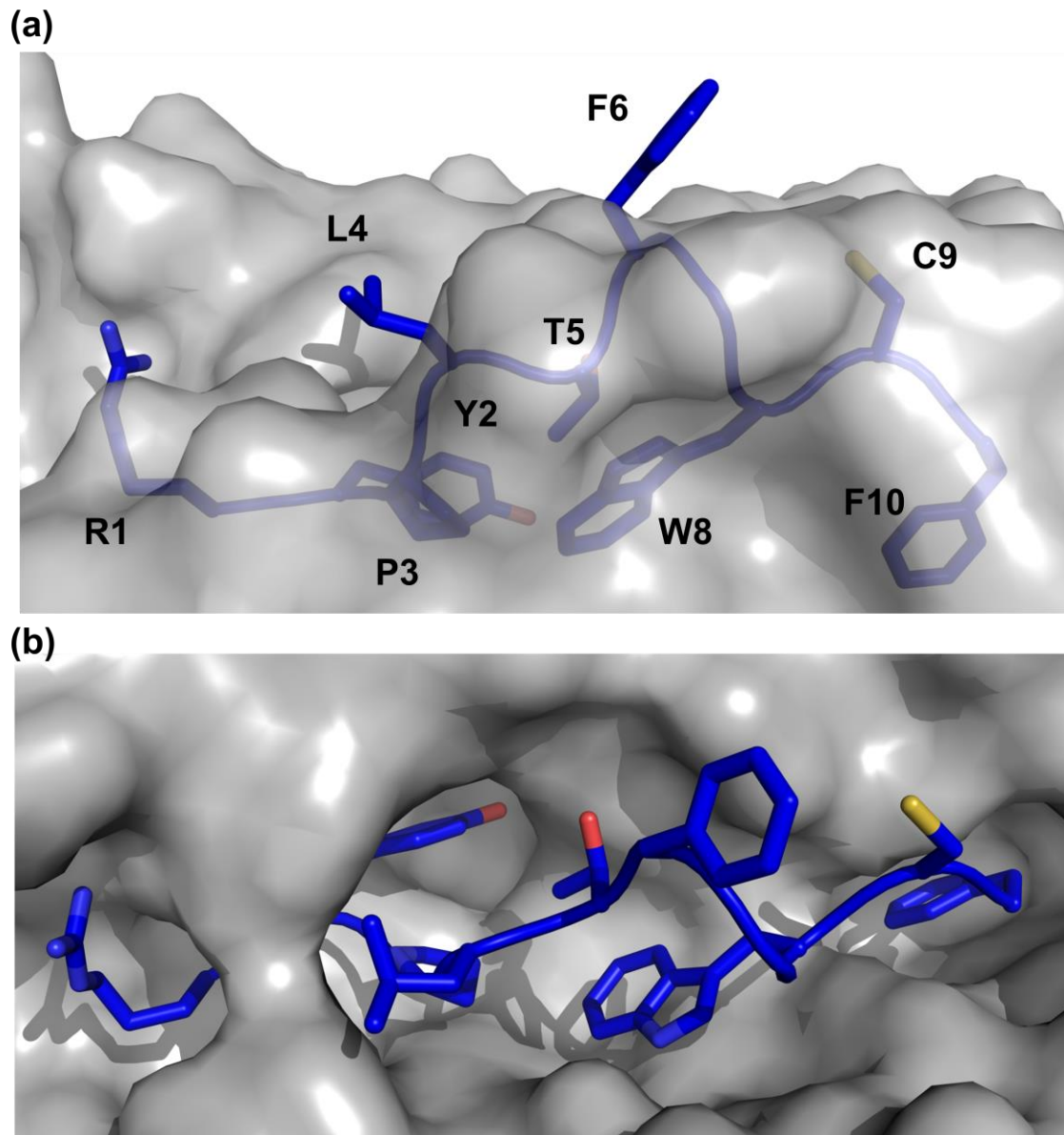


図 2-22. TCR-pHLA における Nef138-10 ペプチド構造の比較

(a) wt TCR-A24/N138-10(wt)(ブルー)と A24/N138-10(wt)(ブラック)のペプチド構造の比較(左)。2f TCR-A24/N138-10(2F)(レッド)と dual TCR-A24/N138-10(2F)(グリーン)、A24/N138-10(2F)(ブラック)のペプチド構造の比較(右)。

(b) TCR と結合後の Nef138-10 ペプチド主鎖の移動距離。縦軸は移動距離、横軸は Nef138-10 ペプチドのアミノ酸を示す。



**補足図. HLA-A24収容溝におけるNef138-10ペプチド構造**

(a) Nef138-10(wt)ペプチド構造をHLA-A24の側面から見た図。HLA-A24は半透明の分子表面図(グレー)で表した。Nef138-10(wt)ペプチドは側鎖をスティック表示(ブルー)で表した。

(b) (a)を上(TCR側)から見た図。

**表 2-1. プライマー**

---

**Forward primer**

**wt TCR**  
TRA:5' -CCAACATATGAAACAGGAGGTGACCCAGATTCCGGCAGCTCTGAGCGTCCCGGAA-3' (55 mer)  
TRB:5' -CCAACCATGGATACCGGAGTCTCGCAGAACCCGCGCCATAAAATCACCAAACGCGGA-3' (57 mer)

**2F TCR**  
TRA:5'-CCAACATATGCAGAAAGAGGTGGAGCAGAATAGCGGCCCGCTCAGCGTTCCGGAGGGCGCC-3' (61 mer)  
TRB:5'-CCAACATATGGAAGCCCAAGTGACCCAGAACCCGCGCTACCTATCACCGTG-3' (52 mer)

**dual TCR**  
TRA:5'-AACATATGGCGCAGAGCGTGACCCAGCCGGATATTCATATCACCG-3 (45 mer)  
TRB:5' -CCAACCATGGACACCGAAGTTACCCAGACCCCGAAAC-3' (37 mer)

**Reverse primer**  
TRAC:5'-GGCAGACAGACTTGCTCACTGGATTTAGAG-3' (29 mer)  
TRBC:5'-TGACCCCACTGTGCACCTC-3' (19 mer)

---

**表 2-2. 封入体精製に使用したバッファー**

---

**TCR**  
破砕バッファーA: 20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8  
洗浄バッファーB: 20 mM Tris HCl, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 % Triton X100, pH 8  
洗浄バッファーC: 20 mM Tris, 2 M Urea, 1 mM DTT, pH 8  
可溶化バッファーD: 50 mM Tris HCl, 6 M Guanidine hydrochloride, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10 % Glycerol, 10 mM DTT, pH 8

---

**HLA**  
破砕バッファーa: 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton-X100, 25 % Sucrose, 0.1 % Azide, pH 8.0  
洗浄バッファーb: 50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton-X100, 0.1 M NaCl, 0.1 % Azide, pH 8  
可溶化バッファーc: 50 mM Tris HCl, 8 M Urea, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

---

表 2-3. 平衡値解析

Analyte (TCR)	Ligand (A24/N138-10)	K <sub>D</sub> (μM)
dual	wt	37.5 ± 0.7 (n = 2)
	2F	21.1 ± 0.6 (n = 2)
wt	wt	9.7 ± 0.7 (n = 4)
	2F	291.5 ± 63.8 (n = 4)
2f	wt	48.7 ± 4.9 (n = 4)
	2F	1.6 ± 0.3 (n = 4)

表 2-4. 分子置換法に用いたサーチモデル

	サーチモデル	構造決定したタンパク質
pHLA	3I6L <sup>a</sup>	A24/N138-10(wt)
	A24/N138-10(wt)	A24/N138-10(2F)
	A24/N138-10(wt)	A24/N138-10(6L)
TCR	2BNU <sup>b</sup>	wt TCR
	3KXF <sup>c</sup>	2F TCR
TCR-pHLA	wt TCR + 3I6L <sup>a</sup>	wt TCR-A24/N138-10(wt)
	wt TCR-A24/N138-10(wt)	wt TCR-A24/N138-10(6L)
	wt TCR-A24/N138-10(6L)	wt TCR-A24/N138-10(2F)
	2F TCR + A24/N138-10(wt)	2F TCR-A24/N138-10(wt)
	2F TCR + A24/N138-10(wt)	2F TCR-A24/N138-10(2F)
	A24/N138-10(wt) + 3TPU <sup>d</sup>	dual TCR-A24/N138-10(2F)

<sup>a-d</sup>PDB (Protein Data Bank) code

表 2-5 データ収集と精密化の統計値

	A24N133-10(wt)	A24N133-10(2F)	H27-14 TCR	T36-5 TCR	wt TCR-424 N133-10(wt)	wt TCR-424 N133-10(2F)	2F TCR-424 N133-10(wt)	2F TCR-424 N133-10(2F)	duibi TCR-424 N133-10(2F)
Data collection									
Space group	C2	P1	P2 <sub>1</sub>	P1	C2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Cell dimensions a, b, c (Å)	163.07, 65.03, 50.06	51.12, 66.38, 87.32	42.42, 159.17, 68.35	45.77, 65.04, 92.28	221.447, 47.74, 113.99, 66.91, 98.63, 163.42	73.13, 73.13, 415.68	73.16, 73.16, 415.68	50.12, 86.49, 234.53	50.12, 86.49, 234.53
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 90.67, 90	112.30, 89.38, 90.01	90, 93.56, 90	91.30, 94.19, 105.93	90, 119.9, 90	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50-1.95	50-2.6	50-2.00	50-2.5	50-2.40	50-1.85	50-2.7	50-2.5	50-2.5
R <sub>int</sub>	0.053 (0.199)	0.15 (0.358)	0.066 (0.233)	0.040 (0.231)	0.097 (0.254)	0.075 (0.261)	0.078 (0.344)	0.063 (0.219)	0.063 (0.219)
I/ $\sigma$	30.43 (3.26)	14.30 (4.12)	26.30 (5.66)	33.68 (3.65)	19.4 (3.90)	35.30 (4.70)	13.18 (2.11)	32.8 (6.26)	32.8 (6.26)
Completeness (%)	93.8 (84.4)	96.4 (93.4)	98.1 (97.0)	92.0 (81.8)	91.9 (82.5)	99.4 (98.7)	92.2 (80.5)	99.2 (98.4)	99.2 (98.4)
Redundancy	2.9	2.9	3	3	4.0	5.9	5.2	5.8	5.8
No. of molecules in the asymmetric unit	1	2	2	2	1	1	2	1	1
Refinement									
Resolution (Å)	50-1.95	50-2.6	50-2.0	50-2.5	50-2.40	50-1.85	50-2.7	50-2.5	50-2.5
No. reflections	33,915	29,681	56,780	32,246	35,742	87,424	59,780	33,556	33,556
R <sub>int</sub> /R <sub>free</sub> (%)	17.3/24.6	18.7/24.1	21.0/26.2	23.0/27.1	19.9/24.2	21.2/23.2	25.8/29.6	20.0/23.7	20.0/23.7
atoms									
Protein	3,143	6,284	7,058	6,972	6,397	6,669	13,092	6,623	6,623
Water	204	230	626	112	276	582	0	280	280
B-factors (Å <sup>2</sup> )									
Protein	36.8	18.3	26.0	70.2	27.3	29.2	85.8	92.4	26.7
Water	45.3	18.1	33.2	49.0	29.5	36.4	0.0	0.0	34.6 (62.9 <sup>a</sup> )
R.m.s. deviations									
Bond lengths (Å)	0.0059	0.0063	0.0067	0.0067	0.0067	0.0074	0.0140	0.0052	0.0069
Bond angles (°)	1.233	1.328	1.345	1.515	1.145	1.216	1.817	1.657	1.093
Ramachandran plot									
Favoured (%)	98.1	95.5	96.9	94.5	96.9	96.3	94.5	93.1	96.2
Allowed (%)	1.9	4.5	3.1	5.5	3.1	1.7	5.5	6.9	3.8
Values in parentheses are for highest-resolution shell.									
<sup>a</sup> No. of ion									
<sup>b</sup> B-factors of ion									

### 第 3 章 Nef138-10(6L)変異によるエスケープ機構の解明

#### 3.1 概要

第 1 章で示したように多くの HLA-A24 陽性 HIV 感染者では Nef138-10(wt) (RYPLTFGWCF) の 2 番目のチロシンがフェニルアラニンに置換した Nef138-10(2F) (REPLTFGWCF) の配列を持つウイルスがエスケープ変異体として優位に増殖する。一方、6 番目のフェニルアラニンがロイシンに置換した Nef138-10(6L) (RYPLTLGWCF) の配列を持ったウイルス (6L 変異体) も一部の感染者で検出される (第 1 章 図 1-5)。この 6L 変異は HLA-A24 陽性と陰性 HIV 感染者群で比較すると HLA-A24 に関連した変異であることが認められた (Fisher's exact test,  $p=0.0391$ )。さらに一名の感染者において、ウイルス RNA の継時的なシーケンス解析をおこなったところ、実際に Nef138-10(wt) から Nef138-10(6L) に変異した症例が確認された (図 3-1)。フェニルアラニンからロイシンへの変異は 1 塩基置換により生じ (TTC-to-CTC)、それ以外のエピトープ内における変異は塩基レベルでも生じていなかったことから、免疫選択圧により 6L 変異体のみが優位に増殖したと考えられる。

一方 wt CTL クローンを用いた細胞傷害活性試験では、Nef138-10(wt) と比較して Nef138-10(6L) に対する wt CTL クローンの認識能は低かった (第 1 章 図 1-6)。そこで、本章では HLA-A24 によって提示された Nef138-10(6L) (A24/N138-10(6L)) と wt CTL クローン由来の wt TCR との分子間相互作用解析および結晶構造解析をおこない、6L 変異体が Nef138-10(wt) 特異的 CTL からのエスケープ変異体である可能性を示唆した。

## 3.2 材料と方法

A24/N138-10(6L)およびA24/N138-10(6L)-BSPはNef138-10(6L)ペプチド存在下で第2章と同様リフォールディングにより作製し、wt TCRとのビアコアを用いた分子間相互作用解析ならびに結晶構造解析をおこなった。

wt TCRも第2章で記述した方法で作製し、分子間相互作用解析と結晶化に用いた。

## 3.3 結果

### 3.3.1 A24/N138-10(6L)とA24/N138-10(6L)-BSPの調製

A24/N138-10(6L)とA24/N138-10(6L)-BSPのリフォールディングをおこない精製した(図3-2)。精製したA24/N138-10(6L)-BSPはビオチン化をおこない、分子間相互作用解析に用いた。精製したA24/N138-10(6L)とA24/N138-10(6L)-biotin(ビオチン化したA24/N138-10(6L)-BSP)の精製結果を示す。

### 3.3.2 分子間相互作用解析

wt TCRとA24/N138-10(6L)-biotinを用いて表面プラズモン共鳴分光法による分子間相互作用解析をおこなった(図3-3)。その結果A24/N138-10(6L)に対するwt TCRの解離定数は64.8  $\mu\text{M}$ であった。第2章で算出したA24/N138-10(wt)に対する解離定数は9.7  $\mu\text{M}$ であったことから(第2章表2-3)、およそ6.7倍の差があった。つま

り wt TCR は A24/N138-10(wt)と比較して、A24/N138-10(6L)との親和性が低いということが明らかとなった。

### 3.3.3 結晶化と構造決定

すでに構造が決定している A24/N138-10(wt)、wt TCR-A24/N138-10(wt)と構造を比較するために、作製した A24/N138-10(6L)を用いて pHLA 単体と wt TCR-pHLA 複合体の結晶化をおこなった。A24/N138-10(6L)は 20% PEG 3350、200 mM NaCl の条件で回折測定に十分な結晶が得られた(図 3-4a)。wt TCR-A24/N138-10(6L) 複合体は 9% PEG 3350、10 mM iron(III) chloride hexahydrate、100 mM sodium fluoride の条件で良質な結晶が得られた(図 3-4b)。これらの結晶を用いて回折測定をおこなったところ A24/N138-10(6L)は 2.5 Å 分解能、wt TCR-A24/N138-10(6L)は 1.8 Å 分解能で構造決定に十分なデータを収集することが出来た。

A24/N138-10(6L)は、第 2 章で構造を決定した A24/N138-10(wt)をサーチモデルとして分子置換法により構造を決定し、精密化をおこなった。wt TCR-A24/N138-10(6L)は、第 2 章で構造を決定した A24/N138-10(wt)単体と wt TCR 単体を組み合わせた分子置換法により構造を決定し、精密化をおこなった。データ収集と精密化の統計値を表 3-1 に示す。

### 3.3.4 A24/N138-10(6L)と A24/N138-10(wt)の構造比較

A24/N138-10(6L)の全体構造を図 3-5a に示した。また A24/N138-10(6L)のペプチド構造は明瞭な電子密度を示した(図 3-5b)。



次に A24/N138-10(6L)と第 2 章で構造を決定した A24/Nef138-10(wt)との構造を比較した(図 3-5c)。A24/N138-10(6L)と Nef138-10(wt)ペプチドの構造を重ね合わせると RMSD 値は 0.264 Å であり、両者のペプチド構造は類似していた。

Nef138-10(wt)と Nef138-10(6L)の違いは 6 番目のアミノ酸がフェニルアラニンかロイシンかだけであるが、両者の構造を比較すると側鎖の向きが若干異なっていた。また Nef138-10 エピトープにおいて 6 番目のフェニルアラニンまたはロイシンの側鎖は HLA-A24 によって形成されるペプチド収容溝から突出しており、溶媒露出表面積はそれぞれ 188.2 Å<sup>2</sup>(F<sub>pep</sub>)、151.2 Å<sup>2</sup>(L<sub>pep</sub>)であった(図 3-5d)。つまりフェニルアラニンのほうが TCR との相互作用面において 37 Å<sup>2</sup> 表面積が大きいということになる。これらの結果から 6 番目のアミノ酸の違いというのは TCR との結合において影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。

### 3.3.5 wt TCR による Nef138-10(wt)、Nef138-10(6L)に対する認識能の違い

wt TCR による A24/N138-10(wt)と A24/N138-10(6L)との認識能の違いを明らかにするために、wt TCR と A24/N138-10(6L)との複合体構造を決定した。そして wt TCR-A24/N138-10(6L)と第 2 章で構造決定した wt TCR-A24/N138-10(wt)の構造を比較した(図 3-6a)。両者の複合体において TCR、HLA-A24、Nef138-10 ペプチド構造を重ね合わせたところ RMSD はそれぞれ 0.485 Å、0.109 Å、0.123 Å であり、大きな変化はみられなかった。wt TCR-A24/N138-10(wt)と wt TCR-A24/N138-10(6L)複合体では Nef138-10 ペプチドの 6 番目のアミノ酸配列が異なる。前者ではフェニルアラニンであるのに対し、後者はロイシンである。そこで 6 番目のアミノ酸に対する TCR との結合について注目した。wt TCR-A24/N138-10(wt)複合体構造では、第 2 章で示したように、wt TCRα 鎖の 31 番目のチロシン、93 番目のアルギニン、98 番目

のチロシン(Y31 $\alpha$ 、R93 $\alpha$ 、Y98 $\alpha$ )と $\beta$ 鎖の31番目のアルギニン(R31 $\beta$ )により形成されたポケットが Nef138-10(wt)の6番目のフェニルアラニン(F6)を密に囲んでいた(図 3-6b)。しかし wt TCR-A24/N138-10(6L)において6番目のアミノ酸はロイシンであり、フェニルアラニンと比較すると、結合面積が小さいため TCR により形成されたポケットに隙間が生じていた(図 3-6c)。そのため両者の複合体では6番目のフェニルアラニンとロイシンに対するファンデルワールス相互作用の数も異なっていた。

これらの結果より Nef138-10 エピトープの6番目のアミノ酸がフェニルアラニンの場合と比較して、ロイシンでは wt TCR との相互作用が減少することが明らかとなった。

### 3.4 考察

本章では Nef138-10 エピトープの6番目のアミノ酸の違いについて注目し、wt TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(6L)との分子間相互作用解析および結晶構造解析をおこなった。その結果、分子間相互作用解析において wt TCR-A24/N138-10(6L)の親和性は wt TCR-A24/N138-10(wt)よりもおよそ 6.7 倍低いことが明らかとなった。wt TCR-A24/N138-10(wt)と wtTCR-A24/N138-10(6L)の構造を比較すると大きな差はみられなかったが、wt TCR によって形成されたポケットと Nef138-10 の6番目のアミノ酸(F6/L6)との相互作用面における隙間に違いがみられた(図 3-6b、c)。

wt TCR は A24/N138-10(wt)との結合において6番目のフェニルアラニンの側鎖に適合した相互作用をしているのに対して、A24/N138-10(6L)との結合では、6番目のロイシンはフェニルアラニンよりも小さな側鎖であるため結合面積が小さく、wt TCR との

接触領域面において、隙間が生じていた。そのため wt TCR は A24/N138-10(wt)よりも A24/N138-10(6L)との親和性が低いと考えられる。

多くの TCR-pMHC 分子間における解離速度定数と T 細胞の活性化には相関性があると報告されており(52-54)、解離定数もまた解離速度定数に次いで T 細胞活性化と相関性があると報告されている(21,55-59)。

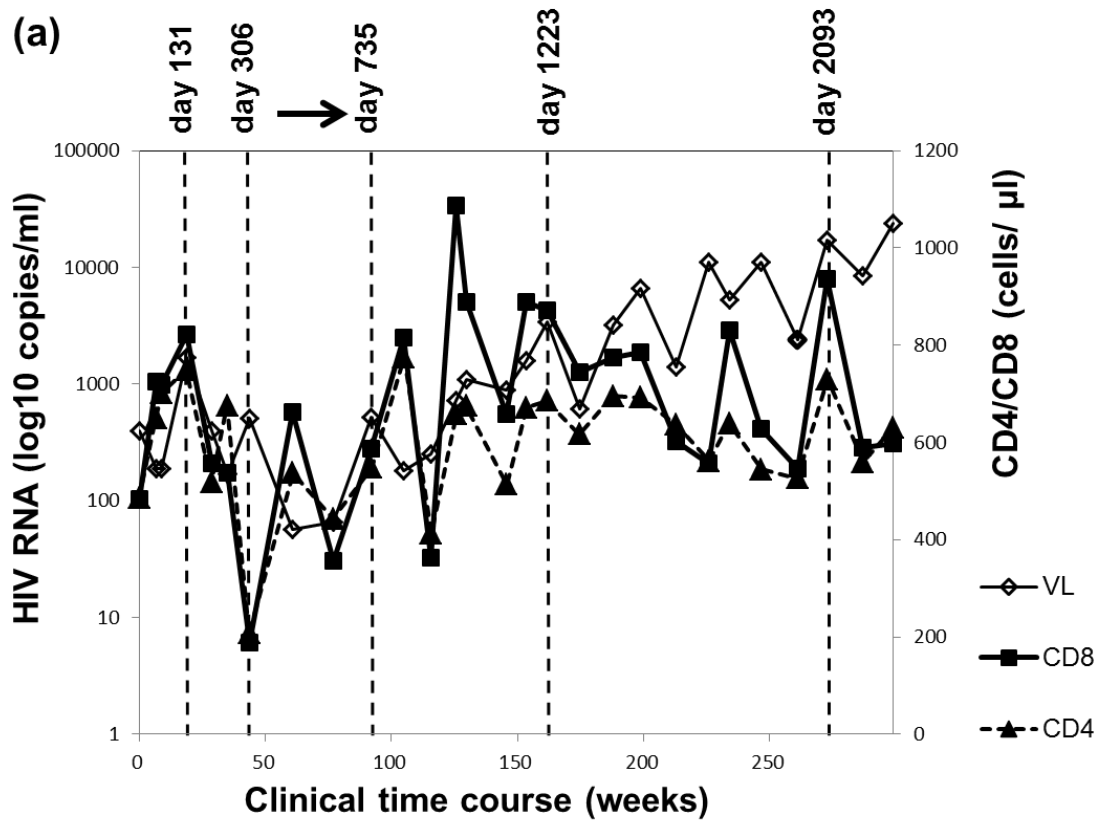
しかし T 細胞の機能解析は細胞傷害活性試験のほか、IL-2 や IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の産生を検出する ELISA など様々な系が用いられていることに加え、各研究室において T 細胞を刺激する時間なども異なる(21,52-59)。

そのため解離速度定数や解離定数が T 細胞の活性化に必ずしも相関性を示すわけではないが、本研究における wt TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(6L)との結合能の差は、明らかに CTL クローンを用いた細胞傷害活性試験の結果(第 1 章 図 1-6)を反映していると考えられる。

wt TCR と A24/N138-10(wt)、A24/N138-10(6L)との解離定数は、それぞれ 9.7  $\mu$ M、64.8  $\mu$ M であり(図 3-3)、一般的な TCR-pMHC 間の解離定数の値である 1-100  $\mu$ M の範囲内であった(20)。

しかし Nef138-10 エピトープのようにウイルス由来の抗原ペプチドを提示した pMHC と特異的に結合する TCR の解離定数は、0.1-21  $\mu$ M と報告されており(54,60,61)、非常に親和性が高い。wt TCR と A24/N138-10(6L)の解離定数は、この範囲から外れており親和性が低いため、wt TCR を発現した CTL では A24/N138-10(6L)を提示した感染細胞に対して十分な細胞傷害作用を発揮することが出来ないのではないかと考えられる。

以上のことから Nef138-10(6L)エピトープの 6 番目のロイシンは明らかに TCR との結合に影響を及ぼす変異であり、6L 変異体は wt CTL による選択圧から逃れたウイルスである可能性が高いことが示唆された。



(b)

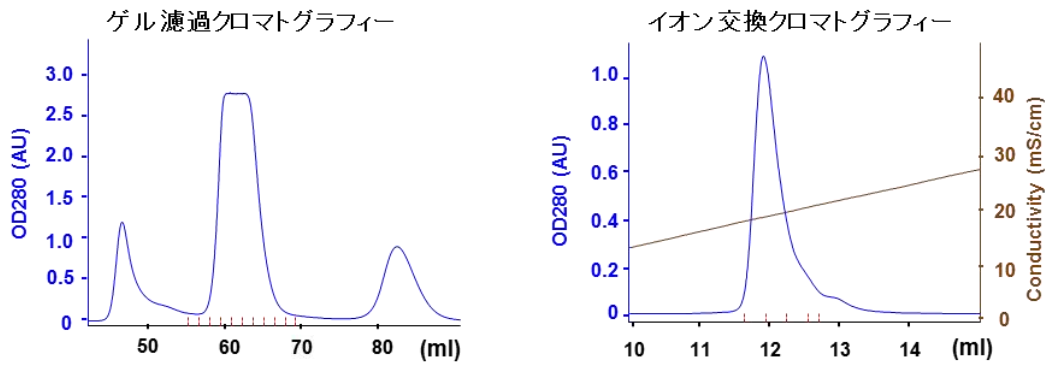
RYPLTFGWCF	
-----	(day 131)
-----	(day 306)
-----L-----	(day 735)
-----L-----	(day 1223)
-----L-----	(day 2093)

図 3-1. Nef138-10 エピトープにおける継時的シーケンス解析

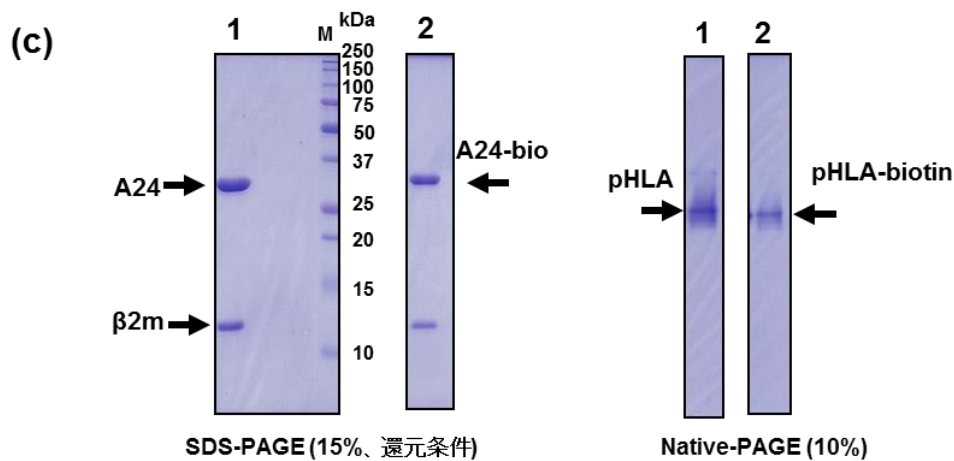
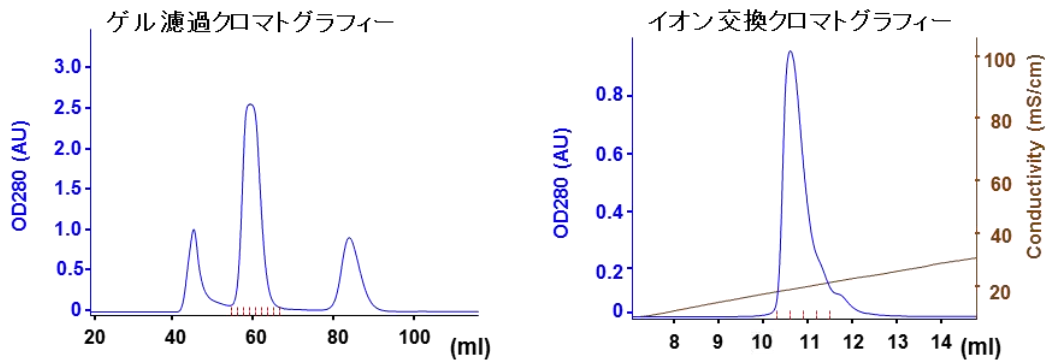
(a) 1名のHIV感染者におけるウイルス量(VL:◇)、CD4陽性T細胞数(CD4:▲)、CD8陽性T細胞数(CD8:■)を表す。

(b) (a)におけるシーケンスデータを示す。初診から735日目にはNef138-10エピトープで6番目のアミノ酸がフェニルアラニン(F)からロイシン(L)に置換したことが確認された。

**(a) A24/N138-10(6L)**



**(b) A24/N138-10(6L)-BSP**



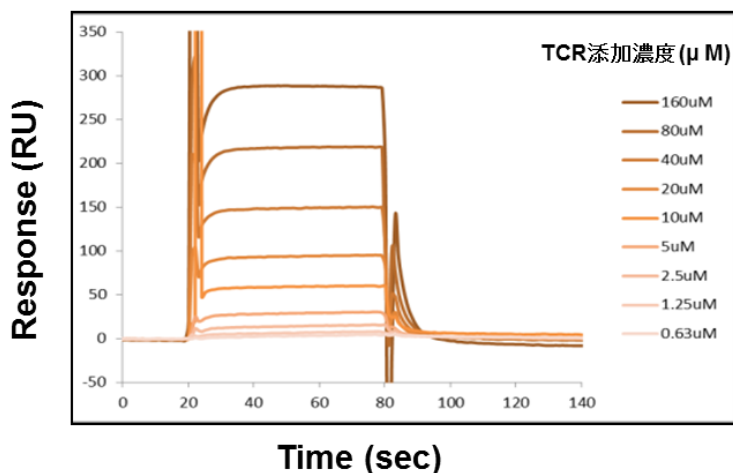
**図 3-2. A24/N138-10(6L)の精製**

(a) A24/N138-10(6L)と(b) A24/N138-10(6L)-BSP のクロマトグラム。

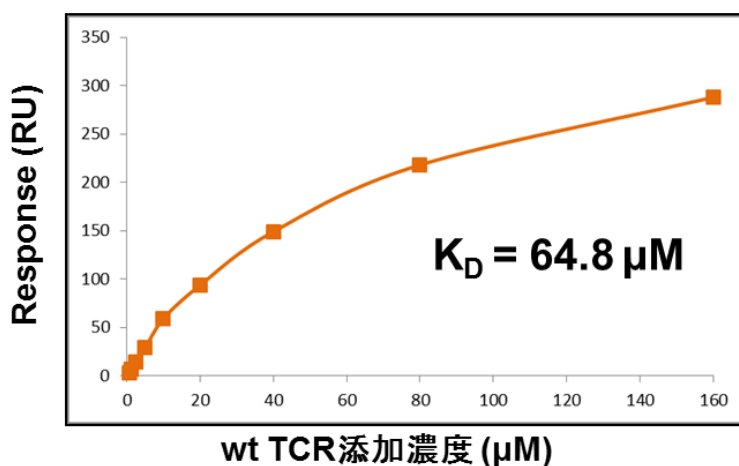
(c) 精製後の A24/N138-10(6L)とビオチン化後の A24/N138-10(6L)-BSP (A24/N138-10(6L)-biotin)。

1: A24/N138-10(6L)、2: A24/N138-10(6L)-biotin.(5μg/レーン)

(a)



(b)



(c)

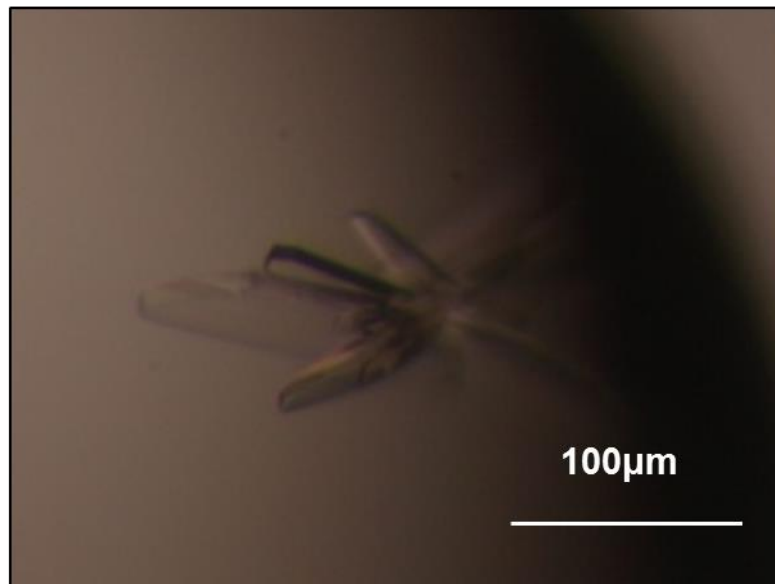
Analyte (TCR)	Ligand (A24/N138-10)	K <sub>D</sub> (μM)
wt TCR	wt	9.7 ± 0.7 (n = 4)
	6L	64.8 ± 3.4 (n = 2)

### 図 3-3. wt TCR と A24/N138-10(6L)の分子間相互作用解析

ストレプトアビジンが固相化されたセンサーチップにリガンドとして A24/N138-10(6L)-bio を固相化し、アナライトとして wt TCR を添加した。wt TCR は 2 倍希釈系列 を 10 点 (0, 0.63 μM-160 μM) 調製した。(a) はセンサーグラムの結果を示す。縦軸はシグナル強度 (RU)、横軸は時間 (秒) を示す。(b) は (a) の結果から得られたスキャッチャードプロットを示す。縦軸と横軸はシグナル強度 (RU) と添加した wt TCR の濃度 (μM) をそれぞれ示す。(c) wt TCR と A24/N138-10(6L) 解離定数を示す。また比較のために第 1 章で算出した A24/N138-10(wt) との解離定数 (K<sub>D</sub>) も示した。

(a)

A24/N138-10(6L)



(b)

H27-14TCR/A24-N138-10(6L)

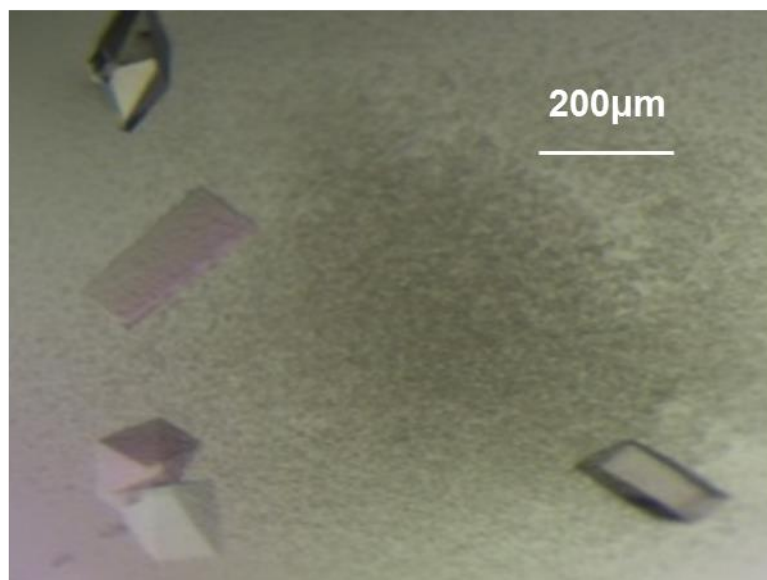
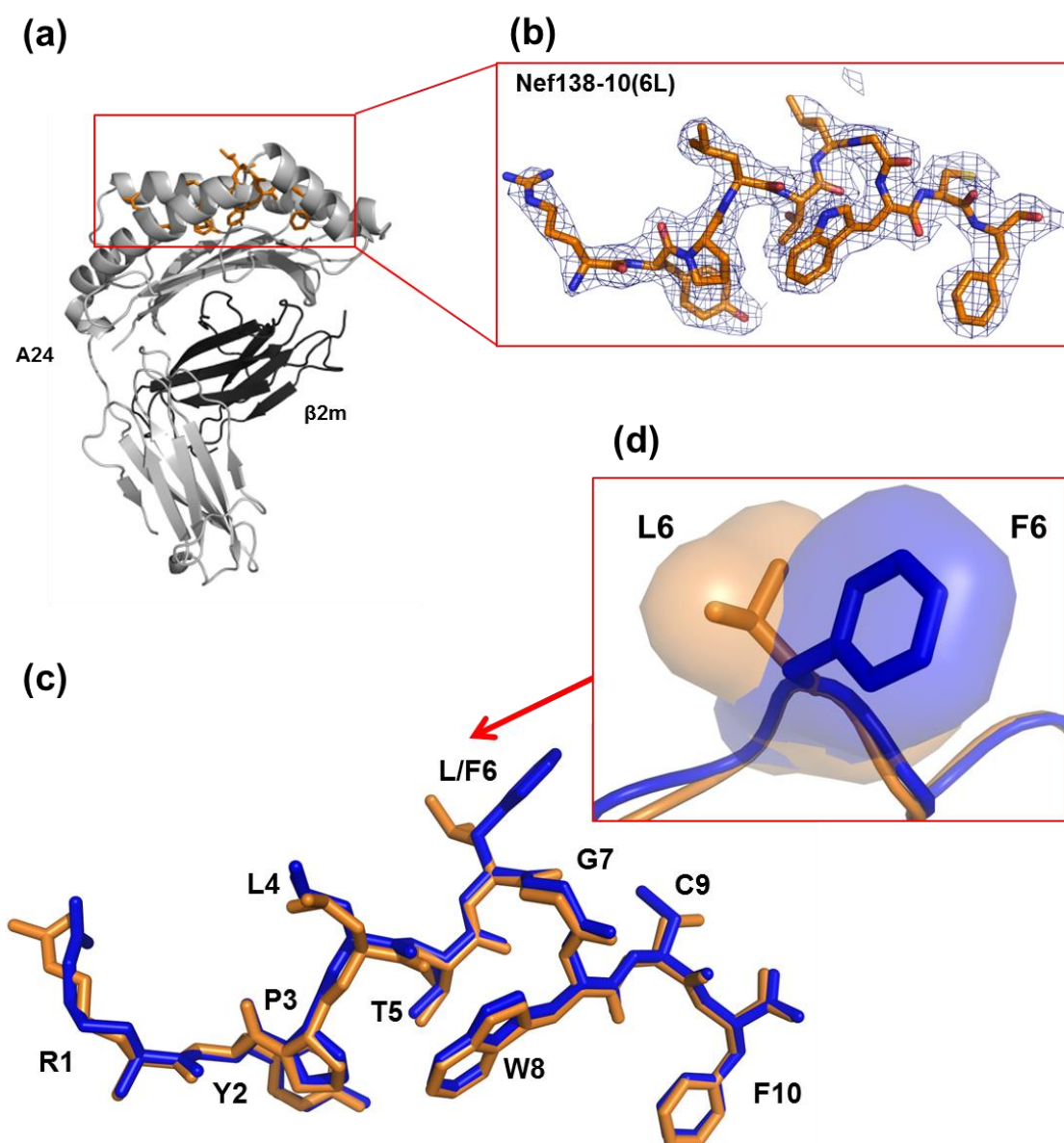


図 3-4. A24/N138-10(6L)単体と wt TCR-A24/N138-10(6L)の結晶

(a) A24/N138-10(6L)の結晶。

(c) wt TCR-A24/N138-10(6L)複合体の結晶。



**図 3-5. A24/N138-10(6L)と A24/N138-10(wt)のペプチド構造の比較**

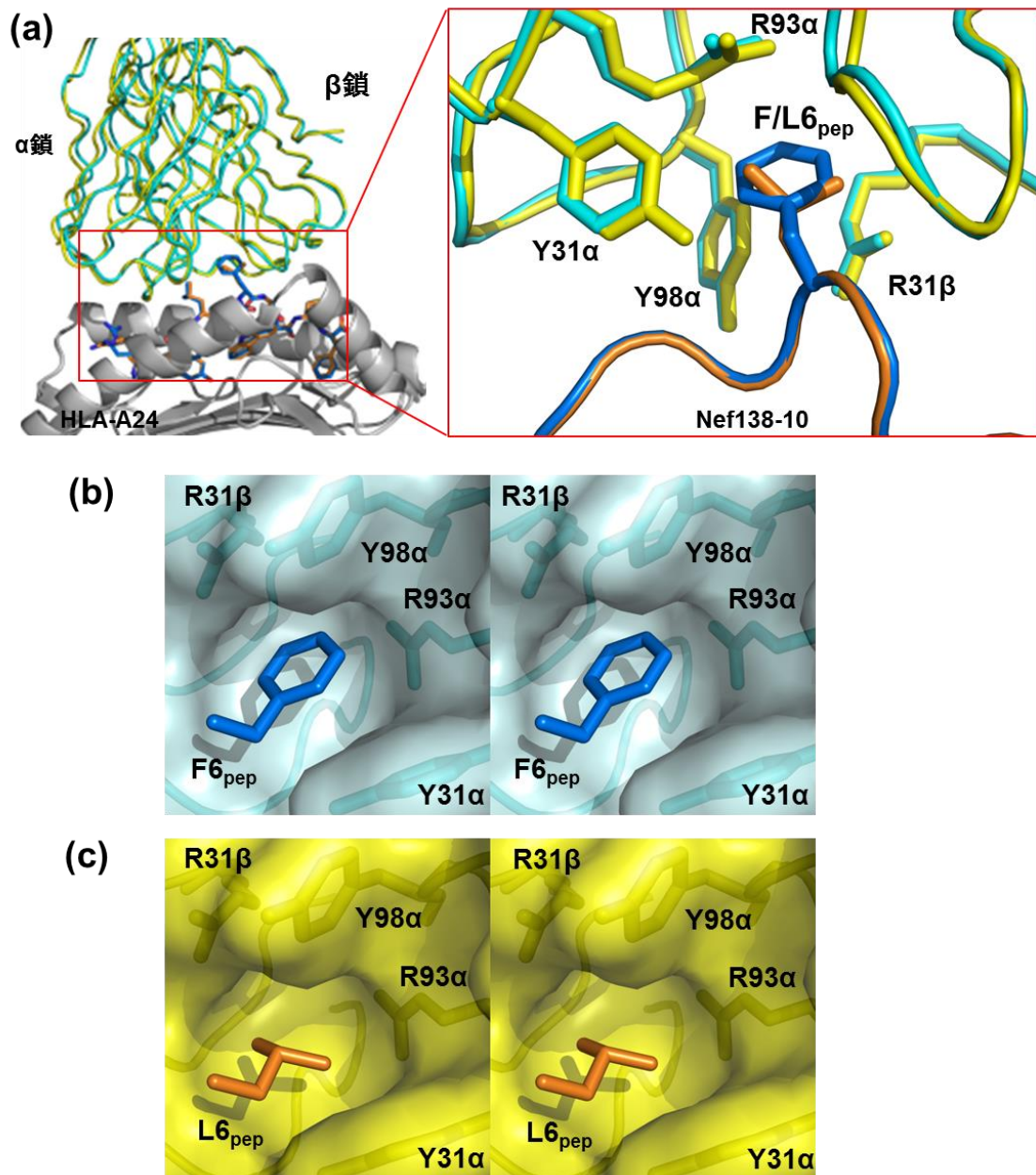
(a) A24/N138-10(6L)の全体構造をそれぞれ示す。HLA-A24 をグレー、β2m をブラックで表し、Nef138-10(6L)ペプチドをオレンジのスティック表示で示した。

(b)  $2F_{obs} - F_{calc}$  電子密度マップ (contour level=1.0  $\sigma$ ) を青色で示す。

(c) A24/N138-10(6L) (オレンジ) と A24/N138-10(wt) (ブルー) のペプチド構造 (スティック) の重ね合わせ。ペプチドの 6 番目の位置を赤矢印で示した。

(d) ロイシンとフェニルアラニンの側鎖を上から見た図 (スティック表示と分子表面図)。





**図 3-6. wt TCR-A24/N138-10(wt)と wt TCR-A24/N138-10(6L)複合体の比較**  
 (a) wt TCR-A24/N138-10(wt)と wt TCR-A24/N138-10(6L)を HLA-A24 の構造 (1-182 番) に基づいて重ね合わせをおこなった。それぞれの TCR をシアン (wt) とイエロー (6L) で示し、HLA-A24 は灰色で示す。また Nef138-10(wt)ペプチドをブルー、Nef138-10(6L)をオレンジで示す。  
 (b) wt TCR-A24/N138-10(wt)における TCR (シアン、分子表面図) と Nef138-10 の 6 番目のフェニルアラニン側鎖 (ブルー、スティックモデル) を示す (ステレオ図)。  
 (c) wt TCR-A24/N138-10(6L)における TCR (イエロー、分子表面図) と Nef138-10 の 6 番目のロイシン 側鎖 (オレンジ、スティックモデル) を示す (ステレオ図)。

表 3-1. データ収集と精密化の統計値

	N138-10(6L)	H27-A24-N138-10(6L)
<b>Data collection</b>		
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	71.73, 88.74, 155.83	67.40, 99.05, 162.97
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Wavelength		
Resolution (Å)	50-2.50	50-1.80
<i>R</i> <sub>sym</sub>	0.10 (0.335)	0.072 (0.284)
<i>I</i> /σ	26.3 (5.57)	43.7 (5.412)
Completeness (%)	99.1 (98.4)	98.7 (97.2)
Redundancy	5.5	5.9
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	50-2.50	50-1.80
No. reflections	33,023	95,049
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	20.8/26.6	20.1/23.0
No. atoms		
Protein	6,296	6,676
Water	248	730
<i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )		
Protein	24.62	26.38
Water	24.17	36.25
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.010
Bond angles (°)	1.156	1.445
Ramachandran plot		
Favoured (%)	94.3	98.3
Allowed (%)	5.7	1.7

Values in parentheses are for highest-resolution shell.

## 第4章 総括

本研究では抗原特異性の異なる3種類のCTLクローン由来のTCR分子と、野生型または変異型Nef138-10エピトープが提示されたHLA-A24との分子間相互作用解析および結晶構造解析によりHIVのエスケープ機構の解明を試みた。尚、これまでに報告されているHLAとTCRの複合体の中で、HLA-A24とTCRの複合体構造は初の報告例である。

まず第2章では、多くのHLA-A24陽性HIV感染者間で蔓延しているNef138-10(2F)配列を持つ2F変異体のエスケープ機構について研究をおこなった。野生型エピトープであるNef138-10(wt)(RYPLTFGWCF)においてペプチドの2番目のチロシン(Y<sub>2<sub>pep</sub></sub>)はHLA-A24の70番目のヒスチジン(H70<sub>a24</sub>)と水素結合を形成していた。それに対し変異型エピトープであるNef138-10(2F)(REPLTFGWCF)ではペプチドの5番目のアミノ酸であるスレオニン(T<sub>5<sub>pep</sub></sub>)がH70<sub>a24</sub>と水素結合を形成していることを示唆した。そしてTCRとA24/N138-10の構造解析から2F変異はエピトープとしてHLA-A24により提示されると、TCRが結合するときに影響を及ぼす変異であることを示唆した。

第3章ではHLA-A24陽性HIV感染者の一部で確認されるNef138-10(6L)(RYPLTLGWCF)配列を持った6L変異体について研究をおこなった。Nef138-10(6L)は6番目のアミノ酸がロイシン(L<sub>6<sub>pep</sub></sub>)であり、Nef138-10(wt)ではフェニルアラニン(F<sub>6<sub>pep</sub></sub>)である。この側鎖の結合面積の違いによりNef138-10(6L)はNef138-10(wt)に特異的なTCRとの結合能が低下することで生じるエスケープ変異であることを示唆した。

HIVのエスケープ機構には主に抗原ペプチドとHLAとの結合能に影響を及ぼす変異やTCRとの結合に影響を及ぼす変異、細胞内におけるプロセッシング過程に影響を

及ぼす変異が挙げられる(62-65)。Nef138-10(2F)はHLA-A24との結合能に影響を及ぼす変異ではないが(31,51)、Nef138-10(6L)についてはまだ報告されていない。しかしA24/N138-10(6L)のNef138-10(6L)ペプチド構造においてL6<sub>pep</sub>の側鎖はHLA-A24収容溝とは逆、つまりTCRとの相互作用面側に向いており、HLA-A24との結合能に影響を及ぼすとは考えにくい。またNef138-10(6L)のプロセシングの影響については不明であり、Nef138-10(6L)に特異的なCTLの存在は確認されていないが、本研究の結果からNef138-10(6L)のL6<sub>pep</sub>はTCRとの相互作用に影響を及ぼす変異である可能性が高いと考えられる。

一方 Nef138-10(2F)は本研究で示したようにエピトープと HLA との相互作用が変化することでTCRとの結合能に影響を及ぼす変異であること、プロセシングに影響を及ぼすエスケープ変異であることが報告されている(31,51)。Nef138-10(2F)配列を含む Nef タンパク質を細胞内で発現させた場合や CD4 陽性 T 細胞に 2F 変異体ウイルスを感染させた場合、細胞表面における Nef138-10(2F)の抗原提示量は Nef138-10(wt)の場合と比べ、低下する。しかし感染者の血中には、dual TCR のような Nef138-10(2F)を認識することの出来る CTL が多く存在しており(68)、さらに T 細胞の疲弊マーカーである PD-1 の発現量が HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞で上昇していることも報告されている(69)。本研究では分子間相互作用解析と結晶構造解析から、実際に Nef138-10(2F)エピトープが HLA-A24 によって提示され、TCR と分子レベルで相互作用することを証明した。また、HLA-A24 陽性 HIV 感染者の個体内では、2F 変異体が優位に増殖することから、Nef138-10(2F)を認識する CTL は Nef138-10(wt)ではなく、N138-10(2F)を提示している細胞により抗原提示を受けて誘導されるが、その抗原提示をおこなう細胞は、感染細胞ではなく、別に存在しているのではないかと推測される。おそらくアポトーシスやネクローシスに陥った感染細胞または HIV 粒子などを樹状細胞などの抗原提示細胞が取り込み、外来性抗原として

クロスプレゼンテーション経路(66,67)を経て、Nef138-10(2F)を細胞表面で抗原提示しているのではないかと考えられる。つまり感染細胞は Nef138-10(2F)を効率よく提示することが出来ないため、ほとんど排除されないが、CTL は非感染細胞により抗原提示され慢性的に刺激を受け続けていることが示唆される(図 4-1)。

HIVに対する細胞傷害作用は、感染細胞内でのウイルスタンパク質の発現、そのプロセッシング、HLAクラスI分子との結合と膜表面への輸送、TCRを介したCTLとの相互作用などが関与する複雑な生体反応である。そこで本研究では細胞内でのプロセスを介さない、TCRとpHLAの分子間相互作用をin vitroで再現した。その結果 Nef138-10における6L変異はTCRとの結合能が低下したことで生じるエスケープ変異であることを示唆した。そして2F変異はペプチドとHLA-A24との相互作用を変化させることでTCRとの相互作用に影響を及ぼす変異であることを示唆した他、現在提唱されているプロセッシングに影響を及ぼす変異であることと矛盾しない結果を得た。今後Nef138-10(2F)エピトープのプロセッシングによる影響の解明が期待される。

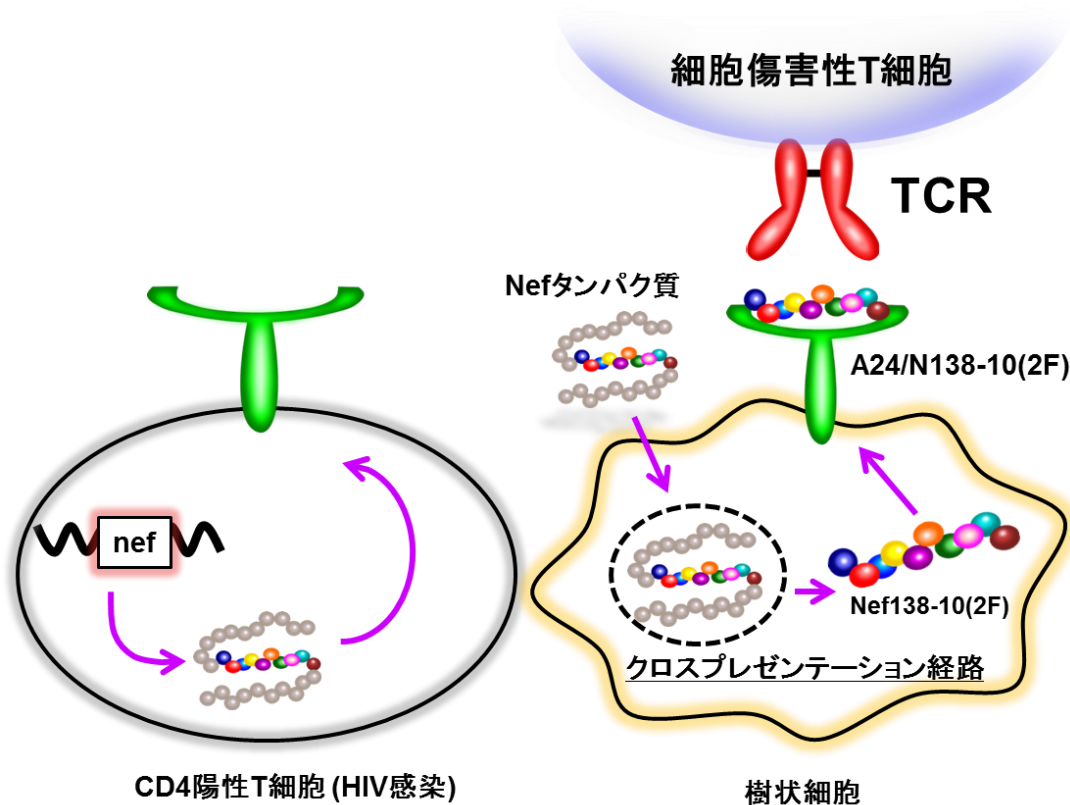


図 4-1. Nef138-10(2F)の抗原提示経路

ウイルスに感染した CD4 陽性 T 細胞内では、Nef138-10(2F)配列を含む Nef タンパク質は発現するがプロセッシングなどの影響により Nef138-10(2F)エピトープは細胞表面で抗原提示されない。

樹状細胞は Nef138-10(2F)配列を含む Nef タンパク質を外来抗原として取り込み、クロスプレゼンテーション経路などを経て、Nef138-10(2F)は HLA-A24 により細胞傷害性 T 細胞へ抗原提示されると考えられる。

## 参考文献

1. Preston, B. D., Poiesz, B. J., & Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Science*, 242(7), 1168.
2. Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, 267(5197), 483-9.
3. Wilson, J. D., Ogg, G. S., Allen, R. L., Davis, C., Shaunak, S., Downie, J., Dyer, W., et al. (2000). Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS*, 14(3), 225-33.
4. Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., et al. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology*, 68(7), 4650-4655.
5. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., & Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 68(9), 6103-10.
6. Huynen, M. A., & Neumann, A. U. (1996). Rate of killing of HIV-infected T cells and disease progression. *Science*, 272(5261), 537-542.
7. Rinaldo, C., Huang, X. L., Fan, Z. F., Ding, M., Beltz, L., Logar, A., Panicali, D., et al. (1995). High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *Journal of Virology*, 69(9), 5838-5842.
8. Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R. P., Elbeik, T., et al. (1996). Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasiespecies in a person with prolonged infection and low viral load. *The Journal of Immunology*, 156(7), 2616-2623.
9. Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H. C., & Martin, M. A. (1998). Administration of an Anti-CD8 Monoclonal Antibody Interferes with the Clearance of Chimeric Simian/Human Immunodeficiency Virus during Primary Infections of Rhesus Macaques. *Journal of Virology*, 72(1), 164-169.
10. Schmitz, J. E. (1999). Control of Viremia in Simian Immunodeficiency Virus Infection by CD8+ Lymphocytes. *Science*, 283(5403), 857-860.
11. Flutter, B., & Gao, B. (2004). MHC class I antigen presentation--recently trimmed and well presented. *Cellular & molecular immunology*, 1(1), 22-30.
12. Hansen, T. H., & Bouvier, M. (2009). MHC class I antigen presentation: learning from viral

- evasion strategies. *Nature reviews Immunology*, 9(7), 503-13.
13. Rowen, L., Koop, B. F., & Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*, 272(5269), 1755-62.
  14. Davis, M. M., & Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334(6181), 395-402.
  15. Danska, B. J. S., Livingstone, A. M., Paragas, V., Ishihara, T., & Fathman, C. G. (1990). The presumptive CDR3 regions of both T cell receptor alpha and beta chains determine T cell specificity for myoglobin peptides. *J Exp Med*, 172, 27-33.
  16. Rock, E. P., Sibbald, P. R., M M Davis, A., & Chien, Y. H. (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med*, 179(1), 323.
  17. Housset, D., Mazza, G., Grégoire, C., Piras, C., Malissen, B., & Fontecilla-Camps, J. C. (1997). The three-dimensional structure of a T-cell antigen receptor V alpha V beta heterodimer reveals a novel arrangement of the V beta domain. *The EMBO journal*, 16(14), 4205-16.
  18. Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., & Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, 384(6605), 134-141.
  19. Marrack, P., Scott-Browne, J. P., Dai, S., Gapin, L., & Kappler, J. W. (2008). Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annual Review of Immunology*, 26 (V), 171-203.
  20. Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. a. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology*, 24, 419-66.
  21. Bridgeman, J. S., Sewell, A. K., Miles, J. J., Price, D. a, & Cole, D. K. (2012). Structural and biophysical determinants of  $\alpha\beta$  T-cell antigen recognition. *Immunology*, 135(1), 9-18.
  22. Deres, K., Beck, W., Faath, S., Jung, G., & Rammensee, H. G. (1993). MHC/peptide binding studies indicate hierarchy of anchor residues. *Cellular Immunology*, 151(1), 158-167.
  23. Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., & Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 419(6906), 480-483.
  24. Narzi, D., Winkler, K., Saidowsky, J., Misselwitz, R., Ziegler, A., Böckmann, R. A., & Alexiev, U. (2008). Molecular determinants of major histocompatibility complex class I complex stability: shaping antigenic features through short and long range electrostatic interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23093-23103.
  25. Wu, L. C., Tuot, D. S., Lyons, D. S., Garcia, K. C., & Davis, M. M. (2002). Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature*, 418(6897), 552-556.
  26. Ibe, M., Moore, Y. I., Miwa, K., Kaneko, Y., Yokota, S., & Takiguchi, M. (1996). Role of strong



- anchor residues in the effective binding of 10-mer and 11-mer peptides to HLA-A\*2402 molecules. *Immunogenetics*, 44(4), 233-41.
27. Koga, M., Kawana-Tachikawa, A., Heckerman, D., Odawara, T., Nakamura, H., Koibuchi, T., Fujii, T., et al. (2010). Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiology and immunology*, 54(4), 196-205.
  28. Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., et al. (1991). Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature*, 354(6353), 453-459.
  29. Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., et al. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine*, 3(2), 205-211.
  30. Price, D. A., Goulder, P. J. R., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R. M., et al. (1997). Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1890-1895.
  31. Furutsuki, T., Hosoya, N., Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Odawara, T., Goto, M., Kitamura, Y., et al. (2004). Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *Journal of virology* 78, 8437-8445.
  32. Ding, Y. H., Smith, K. J., Garboczi, D. N., Utz, U., Biddison, W. E., & Wiley, D. C. (1998). Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity*, 8(4), 403-411.
  33. Boulter, J. M., Glick, M., Todorov, P. T., Baston, E., Sami, M., Rizkallah, P., & Jakobsen, B. K. (2003). Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. *Protein Engineering Design and Selection*, 16(9), 707-711.
  34. Van Boxel, G. I., Stewart-Jones, G., Holmes, S., Sainsbury, S., Shepherd, D., Gillespie, G. M. A., Harlos, K., et al. (2009). Some lessons from the systematic production and structural analysis of soluble (alpha) (beta) T-cell receptors. *Journal of Immunological Methods*, 350(1-2), 14-21.
  35. Kuball, J., Dossett, M. L., Wolf, M., Ho, W. Y., Voss, R.-H., Fowler, C., & Greenberg, P. D. (2007). Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood*, 109(6), 2331-2338.
  36. Yuan, F., Georgiou, T., Hillon, T., Gostick, E., Price, D. A., Sewell, A. K., Moysey, R., et al. (2007). Crystallization and preliminary X-ray structural studies of a Melan-A pMHC-TCR complex. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology And Crystallization*

- Communications, 63(Pt 9), 758-760. *International Union of Crystallography*.
37. Deng, L., Langley, R. J., Brown, P. H., Xu, G., Teng, L., Wang, Q., Gonzales, M. I., et al. (2007). Structural basis for the recognition of mutant self by a tumor-specific, MHC class II-restricted T cell receptor. *Nature Immunology*, 8(4), 398-408.
  38. Sethi, D. K., Schubert, D. A., Anders, A.-K., Heroux, A., Bonsor, D. A., Thomas, C. P., Sundberg, E. J., et al. (2011). A highly tilted binding mode by a self-reactive T cell receptor results in altered engagement of peptide and MHC. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(1), 91-102.
  39. Otwinowski, Z., and W. M. (1997). Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode Macromolecular Crystallography. In *Methods in Enzymology*, 276(January 1993), 306-315.
  40. Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 50(Pt 5), 760-763.
  41. Vagin, A., & Teplyakov, A. (1997). MOLREP : an Automated Program for Molecular Replacement. *Journal of Applied Crystallography*, 30(6), 1022-1025.
  42. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., et al. (1998). Crystallographic and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica*, D54, 905-921.
  43. Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(Pt 12 Pt 1), 2126-2132.
  44. Lovell, S. C., Davis, I. W., Ili, W. B. A., Bakker, P. I. W. D., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., et al. (2003). Structure validation by C $\alpha$  geometry: phi,psi and C $\beta$  deviation. *Struct. Funct. Genet.*, 450(August 2002), 437-450.
  45. Van Der Merwe, P. A., & Davis, S. J. (2003). Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annual Review of Immunology*, 21, 659-84.
  46. Davis, S. J., Ikemizu, S., Evans, E. J., Fugger, L., Bakker, T. R., & Van Der Merwe, P. A. (2003). The nature of molecular recognition by T cells. (C. Parent, K.-D. Schewe, V. Storey, & B. Thalheim, Eds.) *Nature Immunology*, 4(3), 217-224.
  47. Matsui, K., Boniface, J. J., Reay, P. A., Schild, H., Fazekas De St Groth, B., & Davis, M. M. (1991). Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science*, 254(5039), 1788-1791.
  48. Ibe, M., Moore, Y. I., Miwa, K., Kaneko, Y., Yokota, S., & Takiguchi, M. (1996). Role of strong anchor residues in the effective binding of 10-mer and 11-mer peptides to HLA-A\*2402 molecules. *Immunogenetics*, 44(4), 233-41.
  49. Sidney, J., Southwood, S., & Sette, A. (2005). Classification of A1- and A24-supertype

- molecules by analysis of their MHC-peptide binding repertoires. *Immunogenetics*, 57(6), 393-408.
50. Cole, D. K., Rizkallah, P. J., Gao, F., Watson, N. I., Boulter, J. M., Bell, J. I., Sami, M., et al. (2006). Crystal structure of HLA-A\*2402 complexed with a telomerase peptide. *European journal of immunology*, 36(1), 170-9.
  51. Fujiwara, M., Tanuma, J., Koizumi, H., Kawashima, Y., Honda, K., Mastuoka-Aizawa, S., Dohki, S., et al. (2008). Different abilities of escape mutant-specific cytotoxic T cells to suppress replication of escape mutant and wild-type human immunodeficiency virus type 1 in new hosts. *Journal of virology*, 82(1), 138-47.
  52. Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., & Chien, Y.-hsiu. (1998). LIGAND RECOGNITION BY  $\alpha\beta$  T CELL RECEPTORS. *Microbiology*, 16(1), 523-544.
  53. Cole, D. K., Pumphrey, N. J., Boulter, J. M., Sami, M., Bell, J. I., Gostick, E., Price, D. a, et al. (2007). Human TCR-binding affinity is governed by MHC class restriction. *Journal of immunology*(Baltimore, Md. : 1950), 178(9), 5727-34.
  54. Lyons, D. S., Lieberman, S. A., Hampl, J., Boniface, J. J., Chien, Y., Berg, L. J., & Davis, M. M.(1996). A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity*, 5(1), 53-61.
  55. Tian, S., Maile, R., Collins, E. J., & Frelinger, J. A. (2007). CD8+ T cell activation is governed by TCR-peptide/MHC affinity, not dissociation rate. *The Journal of Immunology*, 179(5), 2952-2960.
  56. Chervin, A. S., Stone, J. D., Holler, P. D., Bai, A., Chen, J., Eisen, H. N., & Kranz, D. M. (2009). The impact of TCR-binding properties and antigen presentation format on T cell responsiveness. *The Journal of Immunology*, 183(2), 1166-1178.
  57. Schmid, D. A., Irving, M. B., Posevitz, V., Hebeisen, M., Posevitz-Fejfar, A., Sarria, J.-C. F., Gomez-Eerland, R., et al. (2010). Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *The Journal of Immunology*, 184(9), 4936-4946.
  58. Stone, J. D., Chervin, A. S., & Kranz, D. M. (2009). T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology*, 126(2), 165-76.
  59. Aleksic, M., Dushek, O., Zhang, H., Shenderov, E., Chen, J.-L., Cerundolo, V., Coombs, D., et al. (2010). Dependence of T Cell Antigen Recognition on T Cell Receptor-Peptide MHC Confinement Time. *Immunity*, 32(2), 163-174.
  60. Miles, J. J., Bulek, A. M., Cole, D. K., Gostick, E., Schauenburg, A. J. A., Dolton, G., Venturi, V., et al. (2010). Genetic and Structural Basis for Selection of a Ubiquitous T Cell Receptor Deployed in Epstein-Barr Virus Infection. *PLoS Pathogens*, 6(11), 15.
  61. Varela-Rohena, A., Molloy, P. E., Dunn, S. M., Li, Y., Suhoski, M. M., Carroll, R. G., Milicic, A.,

- et al. (2008). Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. *Nature Medicine*, 14(12), 1390-1395.
62. Couillin, I., Culmann-Penciolelli, B., Gomard, E., Choppin, J., Levy, J. P., Guillet, J. G., & Saragosti, S. (1994). Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 NEF protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(3), 1129-1134.
63. Draenert, R., Le Gall, S., Pfafferott, K. J., Leslie, A. J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E. C., et al. (2004). Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(7), 905-915.
64. Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., et al. (2004). Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 78(3), 1324-1332.
65. Douek, D. C., Betts, M. R., Brenchley, J. M., Hill, B. J., Ambrozak, D. R., Ngai, K.-L., Karandikar, N. J., et al. (2002). A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *The Journal of Immunology*, 168(6), 3099-104.
66. Marañón, C., Desoutter, J.-F., Hoeffel, G., Cohen, W., Hanau, D., & Hosmalin, A. (2004). Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6092-6097.
67. Kreer, C., Rauen, J., Zehner, M., & Burgdorf, S. (2012). Cross-presentation : how to get there – or how to get the ER. *Frontiers in Immunology*, 2, 1-10.
68. Miyazaki, E., Kawana-Tachikawa, A., Tomizawa, M., Nunoya, J.-ichi, Odawara, T., Fujii, T., Shi, Y., et al. (2009). Highly restricted T-cell receptor repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution. *AIDS*, 23(6), 651-60.
69. Nakayama K., Nakamura H., Koga M., Koibuchi T., Fujii T., Miura T., Iwamoto A., Kawana-Tachikawa A. (2011). Imbalanced Production of Cytokines by T Cells Associates with the Activation/Exhaustion Status of Memory T Cells in Chronic HIV Type 1 Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press.

## 謝辞

本研究において懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野の岩本愛吉教授に心より感謝し、御礼申し上げます。また、日々の研究の遂行に対して、ご助言を賜りました立川(川名)愛准教授、細谷紀彰助教を始めとする感染症分野の皆様には感謝致します。

X線結晶構造解析では共同研究者である東京大学放射光連携研究機構生命科学部門構造生物学研究室の深井周也准教授、山形敦史助教には、実験技術をはじめとする研究全般にわたり丁寧にご指導、助言をしてくださいました。心から感謝いたします。

また回折測定では、SPring8やPhoton Factoryのスタッフの皆様には手厚いサポートをして頂きました。心から感謝いたします。

最後に、私の大学院生活を支えてくれた両親に深く感謝いたします。