

## 13. 抗ベーチェット病医薬化学基盤開発

野口 博司

\*静岡県立大学 薬学部 生薬学教室

Key words : ベーチェット病, HLA, 分子認識, 分子動力学シミュレーション, 構造生物学

### 緒言

ベーチェット病 (BD) は、口腔内のアフタ性潰瘍、眼症状、皮膚症状、外陰部潰瘍など、全身の臓器に急性の炎症を起こす原因不明の難治性炎症疾患であり、現在でも失明率が高い。BD は 1972 年に難病指定され、病因・病態が研究されてきたが、未だ原因は明らかとされておらず、新たな治療法の開発にむけた病因・病態研究の新展開が求められている。これまでの研究から、発症には遺伝因子と環境的因子があると考えられており、遺伝因子としてヒト白血病抗原 HLA (human leukocyte antigen) のハプロタイプ HLA-B\*51:01 や HLA-A\*26:01 等と高い相関を示すことが認められている。SNP (single nucleotide polymorphism) 解析の進歩によって抗原ペプチドの結合部位近傍にアミノ酸残基の変異が見いだされたが、BD 発症の分子メカニズムの解明には至っていない。BD はシルクロード病とも称され中東から日本、韓国にわたる地域に高頻度にみられる。従って、本病に関する研究は東アジア、特に日本が先導的に取り組むべき課題である。本研究では、BD 発症の最初の免疫応答に関わり、第一の疾患感受性遺伝子である HLA-B\*51:01 と HLA-A\*26:01 に着目した。HLA は 2 つのポリペプチド鎖、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖から構成されるタンパク質であり (図 1A)、 $\alpha$  鎖に存在するペプチド結合溝を介して抗原ペプチドと結合し (図 1B)、T 細胞表面の受容体 TCR (T cell receptor) に抗原を提示する。HLA の多様なエピトープ認識機構に関して、これまで幾つかのエピトープペプチドとの複合体 X 線結晶構造解析が報告され、相互作用メカニズムが明らかになっている。しかし、BD 発症に関わる原子レベルの構造基盤はほとんど得られていない。また、2012 年に McCluskey, Rossjohn, Purcell らによって抗 HIV 薬アバカビルと HLA-B\*57:01 との複合体構造が報告され、アバカビル過敏症のメカニズムが原子レベルで明らかとなった<sup>1)</sup>。そこで本研究では、BD 発症に関与する HLA のエピトープ選択性を分子動力学 (MD) シミュレーションによって明らかにすると共に、実験的手法によるエピトープ選択性の解明と HLA のエピトープ選択性を制御する低分子化合物の探索基盤の構築を目指し、組換え HLA タンパク質の調製を行った。

### 方法、結果および考察

#### 1. MD シミュレーションによる HLA のエピトープ選択性の解析

BD 発症に関わる HLA のエピトープ選択性を明らかにするため、BD 発症に関わる HLA-B\*51:01 と HLA-A\*26:01、BD 発症に関与しない HLA-B\*35:10 と HLA-A\*11:01 を対象に、BD 発症に関わると考えられている 9 アミノ酸残基 (AAAAAIFVI) からなる MICA-TM (major histocompatibility complex class I chain related gene A transmembrane) ペプチドとの複合体構造について、プログラム *AMBER10* を用いた MD シミュレーションを行った<sup>2)</sup>。初期構造はプログラム *TIP3P* で発生させた約 65,000 原子の水分子を含む  $86 \times 90 \times 88 \text{ \AA}^3$  の区画に入れた。系には周期境界条件を課し、エネルギー最小化と平衡化の後、時間ステップを 2 fs とし、等圧・等温アンサンブル (NTP) で 50 ns の計算を行った。一般に、HLA クラス I のペプチド結合溝には少なくとも 5 つのサブサイト (S1-S2, S3, S4-S6, S7, S8-S9) があることが知られている (図 1)。

\*現所属：日本薬科大学 薬学教育推進センター

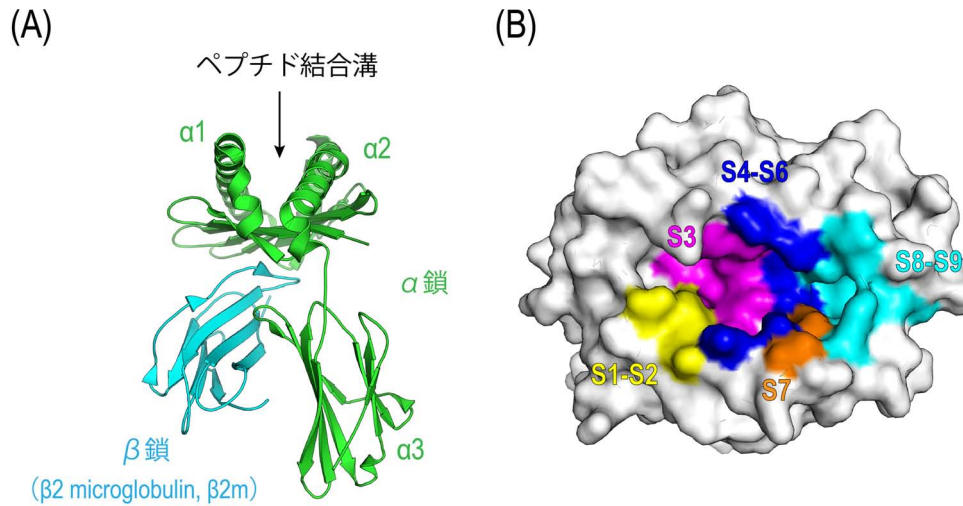


図1. HLA クラス I の構造

(A) リボンモデルで示した HLA クラス I の基本構造。HLA は 2 つのポリペプチド鎖、 $\alpha$  鎖 (緑) と  $\beta$  鎖 (シアン) から構成される。 $\alpha$  鎖は 3 つのドメイン、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  に分けられる。 $\alpha 1$  ドメインと  $\alpha 2$  ドメインの間にはエピトープが結合する溝 (ペプチド結合溝) がある。

(B) 分子表面モデルで示した  $\alpha$  鎖のペプチド結合溝。5 つのエピトープペプチドが結合する部位 (サブサイト) (S1-S2、S3、S4-S6、S7、S8-S9) を、それぞれ黄、マゼンタ、青、オレンジ、シアンで示した。

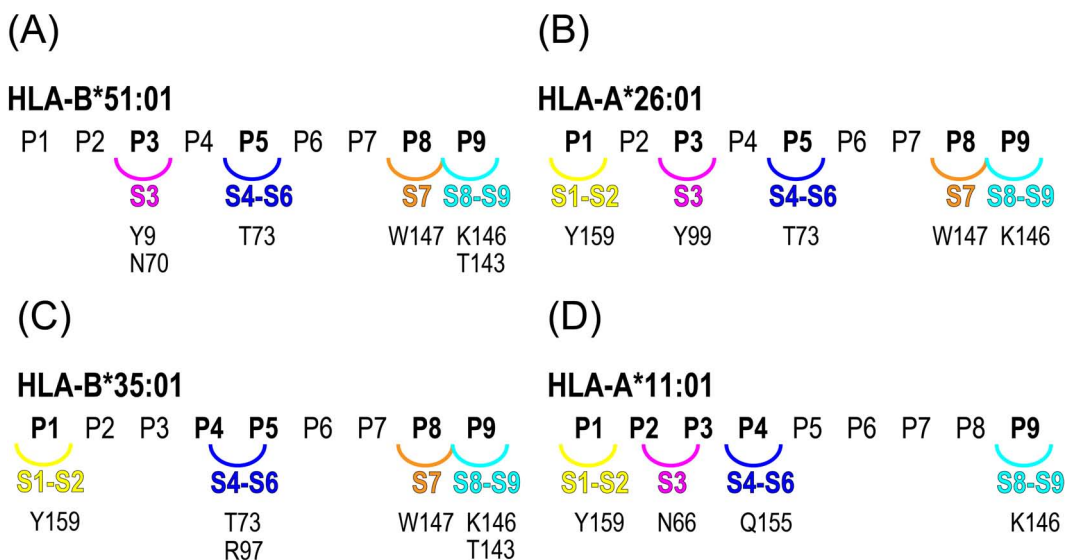


図2. HLA と MICA-TM ペプチドとの相互作用

(A) BD 発症に関与する HLA-B\*51:01、(B) BD 発症に関与する HLA-A\*26:01、(C) BD 発症に関与しない HLA-B\*35:01、(D) BD 発症に関与しない HLA-A\*11:01。サブサイトの色は図 1 に対応する。それぞれのサブサイトにおいて MICA-TM ペプチドとの相互作用に関与するアミノ酸残基を示した。

MD シミュレーションの結果、4 つの HLA において MICA-TM ペプチドの認識に違いが見られた (図 2)。

後述する結合自由エネルギーとアミノ酸変異の解析から、BD 発症に関与する HLA-B\*51:01 と HLA-A\*26:01 において、特に N70、T73、Y99、K146、Y159 は MICA-TM ペプチドとの相互作用に重要なアミノ酸であった。また、MM/PBSA (molecular mechanics / Poisson-Boltzmann surface area) 法によって結合に伴うギブズの自由エネルギー  $\Delta G_{\text{bind}}$  を算出した (表 1)。

表 1. 結合に伴うギブズの自由エネルギー  $\Delta G_{\text{bind}}$

	HLA-B*51:01	HLA-B*35:01	HLA-A*26:01	HLA-A*11:01
$\Delta E_{\text{MM}}$ (kcal/mol)	- 243.1	- 277.6	- 207.3	- 271.7
$\Delta G_{\text{sol}}$ (kcal/mol)	187.0	228.7	164.3	240.6
$- T\Delta S$ (kcal/mol)	9.7	12.7	21.5	15.4
$\Delta G_{\text{bind}}$ (kcal/mol)	- 46.4	- 36.2	-21.5	-15.7

$\Delta G_{\text{bind}}$  は分子力学エネルギー  $\Delta E_{\text{MM}}$ 、溶媒和の自由エネルギー  $\Delta G_{\text{sol}}$ 、エントロピー項  $T\Delta S$  の総和であり、 $\Delta G_{\text{bind}}$  が小さい方が強く相互作用する。

$\Delta G_{\text{bind}}$  は分子力学エネルギー  $\Delta E_{\text{MM}}$ 、溶媒和の自由エネルギー  $\Delta G_{\text{sol}}$ 、エントロピー項  $T\Delta S$  の総和であり、 $\Delta G_{\text{bind}}$  が小さい方が強く相互作用することを意味する。算出された  $\Delta G_{\text{bind}}$  から、それぞれの遺伝子座 (HLA-B と HLA-A) における MICA-TM ペプチドとの相互作用を比較した。HLA-B では、BD に関与する HLA-B\*51:01 (-46.4 kcal/mol) は BD 発症に関与しない HLA-B\*35:01 (-36.2 kcal/mol) よりも強く相互作用、同様に HLA-A においても、BD 発症に関与する HLA-A\*26:01 (-21.5 kcal/mol) は BD 発症に関与しない HLA-A\*11:01 (-15.7 kcal/mol) よりも強く相互作用することが示された。本研究によって、BD 発症に関与する相互作用の構造基盤を得ることが出来た。今後は HLA が関与する他の疾患におけるエピトープ選択性の解明や低分子化合物による選択性の変化メカニズムの解明が期待できる。

## 2. HLA 組換えタンパク質の調製

相互作用スクリーニングや X 線結晶構造解析を行うには、十分な量の HLA タンパク質が必要である。そこで、BD 発症に関与する HLA-B\*51:01 と HLA-A\*26:01 を対象に、大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製を行った。大腸菌での生産効率を上げるため、目的遺伝子を全て大腸菌のコドンに変更した cDNA を利用し、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を同時に大腸菌内で発現させる共発現系も検討した。既報を参考に、HLA-B\*51:01 ( $\alpha$  鎖) と HLA-A\*26:01 ( $\alpha$  鎖) の細胞外領域、あるいは  $\beta$  鎖をアンピシリン耐性の発現ベクターに組み込んだ。宿主大腸菌として BL21 (DE3) を用い、IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) の添加によって発現を誘導した。誘導後、温度を 20 °C または 37 °C で培養を行った。培養後、遠心分離によって得られた菌体を SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) に供し、泳動ゲルを CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色することで、目的タンパク質の発現の有無を確認した (図 3)。

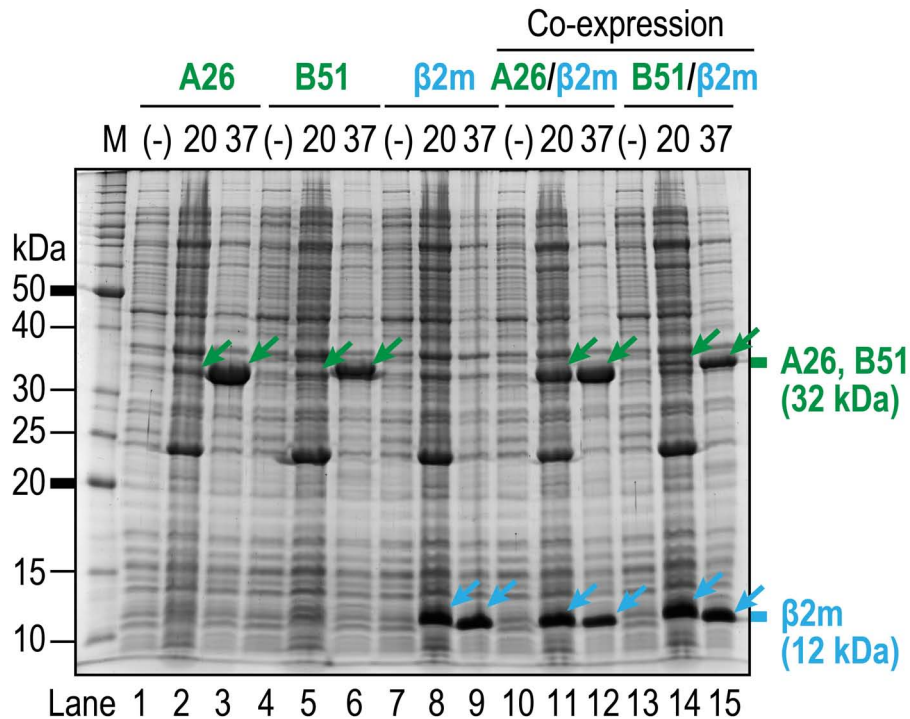


図3. HLA 組換えタンパク質の発現の確認

Mはサイズマーカー、(-)はIPTG誘導前、20と37はIPTG誘導後にそれぞれ20℃と37℃での培養。A26、B51、 $\beta$ 2mはそれぞれHLA-A\*26:01、HLA-B\*51:01、 $\beta$ 2m単独での発現。A26/ $\beta$ 2mとB51/ $\beta$ 2mは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の共発現。ゲルにおいて、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のバンドをそれぞれ緑とシアン色の矢印で示した。

その結果、HLA-B\*51:01に関して、37℃での培養では良好な発現を示したが(図3、Lane 6)、20℃での低温培養では発現量が著しく少なかった(図3、Lane 5)。 $\beta$ 鎖との共発現系においても、同様な傾向を示した(図3、Lane 14とLane 15)。一方、HLA-A\*26:01に関して、20℃と比較して、37℃での培養では良好な発現を示した(図3、Lane 2とLane 3)。興味深いことに、HLA-B\*51:01とは異なり、 $\beta$ 鎖との共発現系においては20℃の低温培養においてもHLA-A\*26:01は良好な発現を示し、 $\beta$ 鎖との共発現の効果が見られた(図3、Lane 11)。すなわち、HLA-A\*26:01( $\alpha$ 鎖)と $\beta$ 鎖との共発現系では $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が相互作用しており、それによって $\alpha$ 鎖の発現が向上したと考えられる。また、 $\beta$ 鎖については何れの場合でも良好な発現を示した。次に、発現タンパク質の可溶性を確認するために、菌体を超音波破碎し、その遠心上清をSDS-PAGEに供した(図4)。

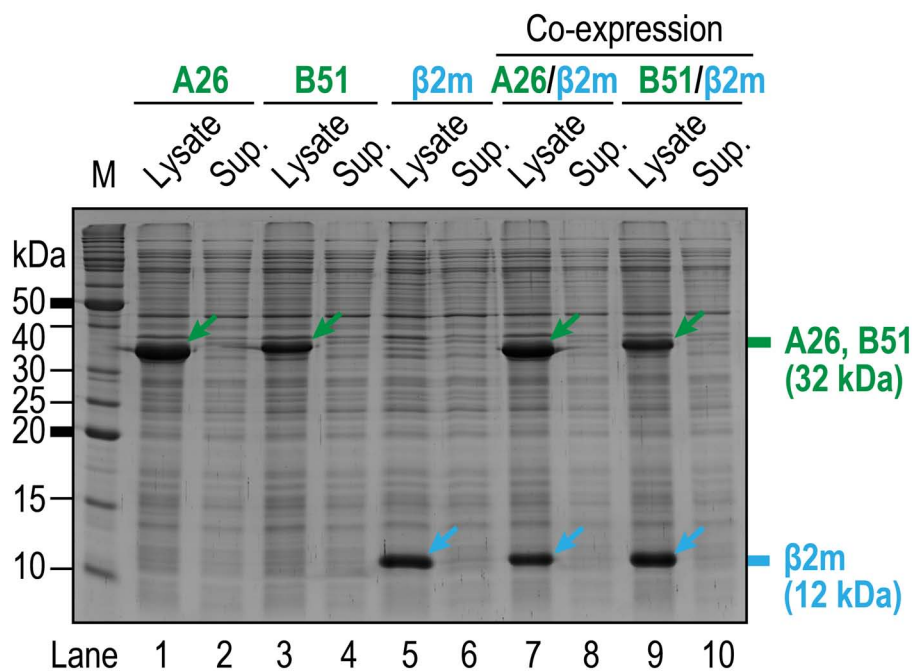


図4. HLA 組換えタンパク質の可溶化の確認 (37 °C 培養)

M はサイズマーカー、Lysate は超音波破碎後、Sup. は超音波破碎後の遠心上清を示す。可溶性に関しては 20 °C 培養でも同様な結果であったため、37 °C 培養の結果のみ示す。

その結果、何れの条件においても発現タンパク質のほとんどは不溶性であり、尿素を用いたリフォールディングによって可溶化する必要があると考えられた。以上の結果から、本研究によって BD 発症に関わる HLA タンパク質の X 線結晶構造解析や相互作用スクリーニングを行うのに十分な組換えタンパク質を得ることが出来ると見込まれた。今後は HLA 組換えタンパク質を大量に調製し、構造生物学的研究を進めていく。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科の竹内不二夫、蕪城俊克、タイ王国チュラロンコン大学理学部の Supot Hannongbua、静岡県立大学薬学部の橋本博である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Illing P T, Vivian J P, Dudek N L, Kostenko L, Chen Z, Bharadwaj M, Miles J J, Kjer-Nielsen L, Gras S, Williamson N A, Burrows S R, Purcell A W, Rossjohn J, McCluskey J. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 2012;486(7404):554-8. doi: 10.1038/nature11147. PubMed PMID: 22722860
- 2) Kongkaew S, Yotmanee P, Rungrotmongkol T, Kaiyawet N, Meeprasert A, Kaburaki T, Noguchi H, Takeuchi F, Kungwan N, Hannongbua S. Molecular Dynamics Simulation Reveals the Selective Binding of Human Leukocyte Antigen Alleles Associated with Behçet's Disease. *PLoS One* 2015;10(9):e0135575-88. doi: 10.1371/journal.pone.0135575. PubMed PMID: 26331842