

「CLIP 置換型インバリアント鎖遺伝子ライブラリーを用いた自己反応性 CD4<sup>+</sup>T 細胞が認識する抗原ペプチドの多様性の解析」  
植村 靖史、西村 泰治、「臨床免疫」  
(科学評論社) 37: 156-164, 2002

### はじめに

インバリアント鎖 (Ii 鎖) は、抗原提示細胞の小胞体内で HLA クラス II (HLA-II) 分子と会合し、主に細胞外の抗原に由来するペプチドを HLA-II を介して効率よく CD4<sup>+</sup>T 細胞に提示する為に必須の機能を担っている。近年、この Ii 鎖遺伝子に変異を導入した遺伝子の発現により、任意の抗原ペプチドや抗原蛋白質をクラス II 経路に輸送し、HLA-II を介して CD4<sup>+</sup>T 細胞に提示させる方法が報告されている<sup>1),2)</sup>。著者らは CLIP 置換型 Ii 鎖遺伝子を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞が特異的に認識する抗原ペプチドを同定する発現クローニング法を開発したので紹介する。

### ペプチド-HLA クラス II 分子複合体の構造

HLA-II 分子 (図 1) は抗原提示細胞、(APC ; B 細胞、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、単球、マクロファージなど)、活性化 T 細胞などに発現し、鎖と鎖が非共有結合により結合して形質膜表面に発現する膜結合型糖タンパク質である。HLA-II 分子の細胞外部分は および のそれぞれ 2 つのドメインにより構成されており、形質膜より遠い側の 1 および 1 ドメインが組み合わさって溝状の構造を作っている。この溝は、2 つの相対するヘリックスが側壁を、また、シート構造が底を形成することによりできている。溝の幅と深さは約 10 Å で長さは約 20 Å である。この溝状の構造部分 (ペプチド収容溝) への結合を介して 9~20 数個のアミノ酸からなるペプチド (図 1A) が結合する。

ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、HLA クラス I (HLA-I) 分子の場合と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で HLA-II 分子に向かうアミノ酸残基の側鎖がアンカーとなり、これが HLA-II 分子上のペプチド収容溝に存在する 3~5 個のポケットにうまく収容され、両分子の結合を可能にしている<sup>3)</sup>。HLA-II 分子の多型はペプチド収容溝を構成するアミノ酸残基に集中してい

るため (図 1B) 個々の HLA-II 分子は、それぞれ特有の形状と性質 (極性や電荷) を示すポケットをペプチド収容溝にもっている。このため HLA-II 分子に結合するペプチドの構造も HLA-II 分子ごとに異なっている。従って HLA-II 遺伝子の個体差は、特定の抗原ペプチドに対する T 細胞応答が疾患の発症に關与する場合、疾患の感受性を決定する重要な遺伝要因となる<sup>4)</sup>。

### HLA-II 分子による抗原提示における Ii 鎖の役割

CD4<sup>+</sup>T 細胞に提示されるペプチドは、抗原提示細胞が主に細胞外液中あるいは自己形質膜上に存在する自己ならびに非自己蛋白を取り込み、これをエンドソームの中で蛋白分解酵素により分解した産物である。インバリアント (Ii) 鎖は、小胞体内で HLA-II 分子と会合してこれをエンドソームに輸送するとともに、CLIP (class II-associated Ii chain peptide) 部分が HLA-II 分子のペプチド収容溝を覆うことにより細胞質から取り込まれたペプチドあるいは I 型膜蛋白のシグナル配列に由来するペプチド断片等が小胞体内で HLA-II 分子に結合するのを阻止している<sup>5)</sup>。

### CD4<sup>+</sup> T 細胞抗原受容体 (TCR) によるペプチド-HLA-II 分子複合体の認識

型 T 細胞抗原受容体複合体 (図 2) は V-(D)-J 再構成により多様性を有する TCR 鎖と TCR 鎖と、多様性を有しない CD3、 、 および 鎖により構成されており、適切なペプチド-HLA 複合体を認識した T 細胞は TCR 鎖や ZAP70 などのリン酸化を介して活性化シグナルを下流に伝達し、種々の転写因子を活性化してサイトカインの分泌や増殖応答を誘導する。

最近、Wiley らの立体構造解析により、CD4<sup>+</sup>TCR-抗原ペプチド/HLA-II 分子の 3 分子複合体の立体構造が解明され、TCR の抗原認識の構造基盤が明らかとなった<sup>6)</sup>。TCR-抗原ペプチド/HLA-II 分子複合体は比較的平面に近い状態で会合しており、TCR は V、V 鎖の CDR1 (相補性決定領域: complementarity determining region: CDR) 領域と V-(D)-J の結合領域が形成し、最も多様性に富む CDR3 領域によって主にペプチドを認識し、CDR2 領域は HLA クラス II 分子の -ヘリックスと接触している。さらにペプチドの主鎖の方向と、V、V 鎖それぞれのドメインの中央部を結んだ

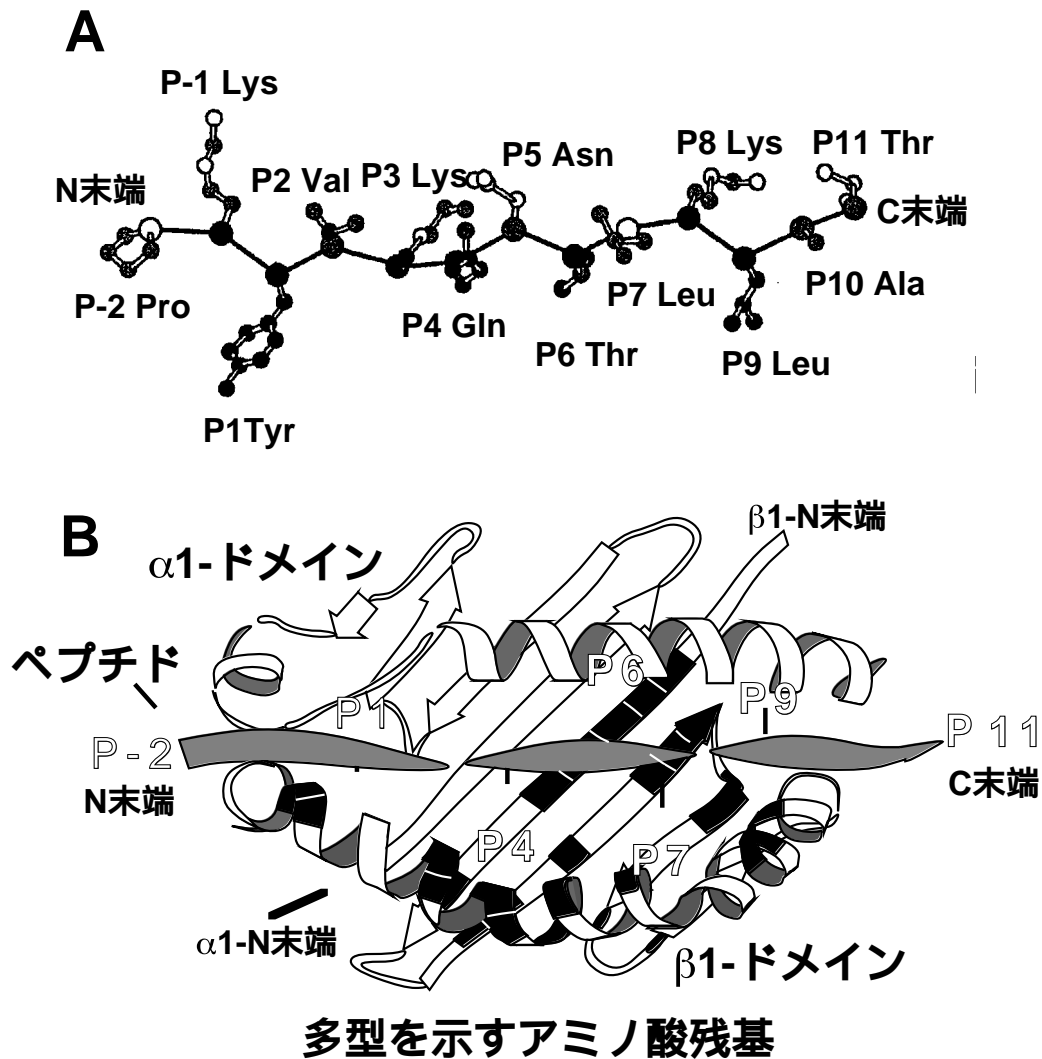


図 1. HLA-DR1 分子と結合ペプチドの構造<sup>3)</sup>

A: HLA-DR1 により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド(HA306-318)の構造を示す。DR1 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最も N 末端側の Tyr の位置を position1(P1)として C 末端方向に番号をつけた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。また、アミノ酸の側鎖が、DR1 分子のペプチド収容溝の 5 個のポケットに結合するアミノ酸残基を四角で囲んで示した。Wiley らの立体構造解析ではペプチドの 5 つの側鎖 (P-1,P3,と P8 の 3 つのリジン、P5 のアスパラギン酸と P2 のバリン) が上方を向いて TCR と接触している。

B: HA306-318 を結合した DR1 分子を真上 (TCR 側) より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上で DR1 分子との結合に重要な 5 個のアミノ酸残基 (P1, P4, P6, P7 および P9) の側鎖を収容するポケットの位置を示す。黒い部分は HLA-DR 分子で多型を示すアミノ酸残基を示す。

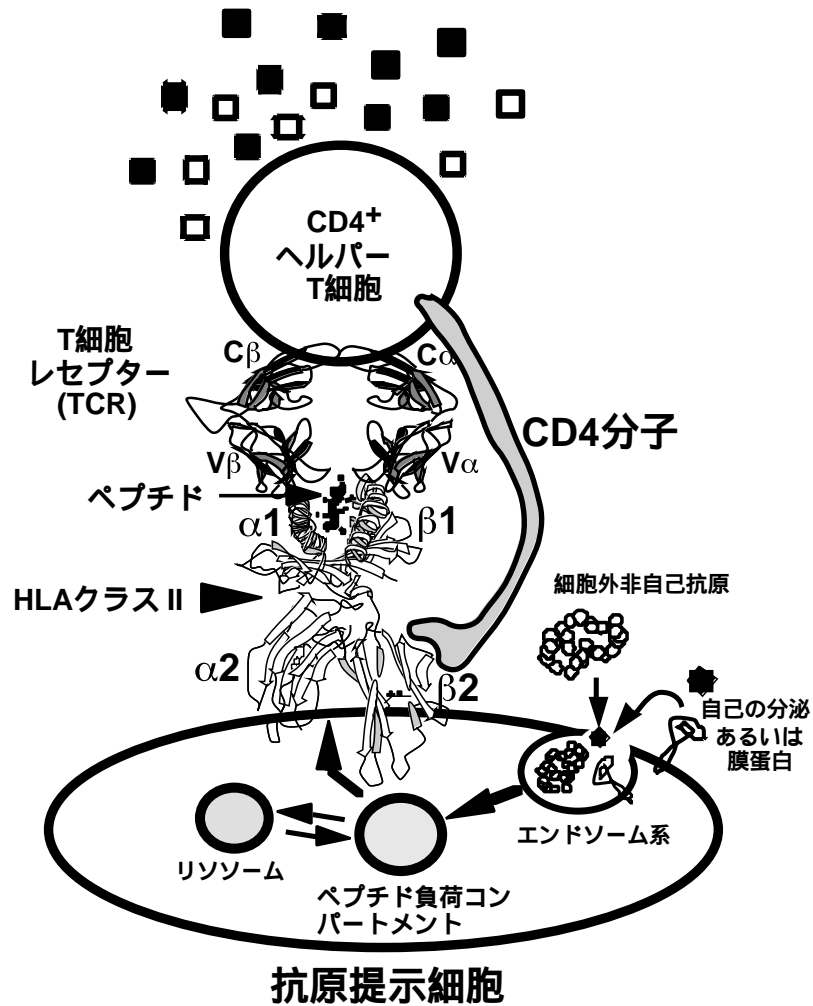


図 2. CD4<sup>+</sup>T 細胞による抗原ペプチドの認識 <sup>3),6)</sup>

外来抗原が抗原提示細胞によりプロセスされ、HLA-II 分子により提示された抗原ペプチドが CD4<sup>+</sup>T 細胞の TCR により認識される様子を示す。TCR 部分の V<sub>β</sub>, V<sub>α</sub> は TCR の 鎖と 鎖を、また C と V は定常領域と可変領域をそれぞれ示す。TCRV<sub>β</sub> は HLA クラス II 分子の 1 ドメインの ヘリックス部分と抗原ペプチドの N 末端側を、TCRV<sub>α</sub> は HLA クラス II 分子の 1 ドメインの ヘリックス部分と抗原ペプチドの C 末端側を認識している。

線とのなす角度が CD4<sup>+</sup>TCR は斜め(45 ~ 70°)になっているのに対して、CD4<sup>+</sup> TCR はより直角に近い(約 70 ~ 80°)状態で結合して認識していることが明らかになった<sup>7)</sup>。さらに、Wiley らの構造解析においてはペプチドの主鎖と TCR とが接触をもつことも示されている。

抗原ペプチドにアミノ酸置換を導入したアナログペプチド(altered peptide ligand: APL)に対する T 細胞応答の解析において、TCR は抗原ペプチド中の TCR に接触するアミノ酸残基の違いを識別するだけでなく、クラス II 分子と結合するアンカー残基を結合親和性の等しい別のアミノ酸残基に置換した APL をも識別する例が報告されている<sup>8)</sup>。さらに、ある TCR の認識は抗原の TCR 接触アミノ酸残基の隣接アミノ酸残基あるいは非隣接アミノ酸残基の影響を受けるという報告もある<sup>9),10)</sup>。これらの現象は抗原ペプチド中の特定のあるアミノ酸残基の置換によってペプチドの立体構造に変化をきたし、置換した部分から離れた TCR 接触残基と TCR の相互作用に影響を与えることを示唆している。従って CD4<sup>+</sup>T 細胞が認識可能なペプチドの構造を予測するのは容易ではない。

自己免疫疾患の発症機序の 1 つに、感染に際し微生物由来の抗原により活性化された CD4<sup>+</sup>T 細胞が、分子相同性により自己抗原に対して交差反応を示し、自己免疫現象が発生するという分子擬態(molecular mimicry)仮説が提唱されている<sup>11)</sup>。従来、自己反応性 CD4<sup>+</sup> TCR に対して分子擬態を示す微生物由来の抗原ペプチドは、単に自己抗原とのアミノ酸の一次配列の相同性、あるいは同一性により検索されてきたが、CD4<sup>+</sup>TCR は抗原特異性を有しているにもかかわらず、数多くのエピトープを認識しうることが証明されてきた。

さらに最近では、多発性硬化症の自己抗原であるミエリン塩基性蛋白に対する自己反応性 T 細胞クローンが、わずかに相同性を有するか、あるいは全く相同性を示さないアミノ酸配列をもつ抗原ペプチドにより活性化を受けるなどの報告がある<sup>12),13)</sup>。従って、CD4<sup>+</sup> TCR による認識は従来考えられていた以上に多様であり、単なるアミノ酸の一次配列の類似性の検索だけでは疾患発症に重要な役割を果たす可能性がある分子擬態ペプチドを同定するための本質的な手掛かりとはならない。

## li 鎖遺伝子を利用した CD4<sup>+</sup> T 細胞抗原受容体のエピトープの多様性の解析

### 1. li 鎖遺伝子を利用した多様なペプチド・HLA-II 複合体を発現する抗原提示細胞ライブラリーの構築

これまで CD4<sup>+</sup>T 細胞が認識するペプチドの構造の多様性に関する解析は、1 アミノ酸残基を置換したアナログペプチド、あるいは 1 アミノ酸残基のみを固定し、他の部分はランダムなアミノ酸からなるコンビナトリアルペプチドライブラリーに対する T 細胞の増殖応答を観察することにより予測されてきた<sup>14),15)</sup>。これらのアプローチは抗原ペプチド中の各々のポジションに位置するアミノ酸に対して置換が許容されるアミノ酸の組み合わせから適切なエピトープを同定しようとするものであるが、上記のように TCR の抗原認識は抗原ペプチド中の各々のアミノ酸残基同士の相互作用により影響を受けることがあるため、各ポジションに対して最適なアミノ酸残基同士を組み合わせで合成したペプチドが、T 細胞の増殖応答を誘導できないことが多い<sup>16)</sup>。

著者らはこの問題を克服して、CD4<sup>+</sup> T 細胞の TCR が認識する多様なリガンドを特異的に同定するために、以下のような li 鎖を用いた発現クローニング法を開発した<sup>17)</sup>。図 3 に示すように、li 鎖遺伝子の p89-102 に相当する 13 アミノ酸からなる CLIP 部分を、全くランダムな 13 アミノ酸からなるペプチド(約 20<sup>13</sup> 種類の多様性を有する)をコードする合成オリゴヌクレオチド・ライブラリーと置換する。これを T 細胞クローンが認識する拘束分子をコードする HLA-II 遺伝子と共に、96 穴プレート中で COS-7 細胞に遺伝子導入することにより、一過性に発現したエピトープ発現細胞のライブラリーを構築する。翌日、これに T 細胞クローンを添加し、48 時間培養して培養上清中の IFN- $\gamma$  を定量して T 細胞の反応を検出する。T 細胞応答が陽性のウェルが見つければ遺伝子導入したサブライブラリーをさらにサブクローニングして、目的とする抗原ペプチドをコードする CLIP 置換 li 鎖遺伝子を特定する。そして CLIP インサート部分の塩基配列を決定することにより T 細胞クローンを活性化するペプチドリガンドを同定する。最終的に当該ペプチドを合成して T 細胞刺激活性を確認する。

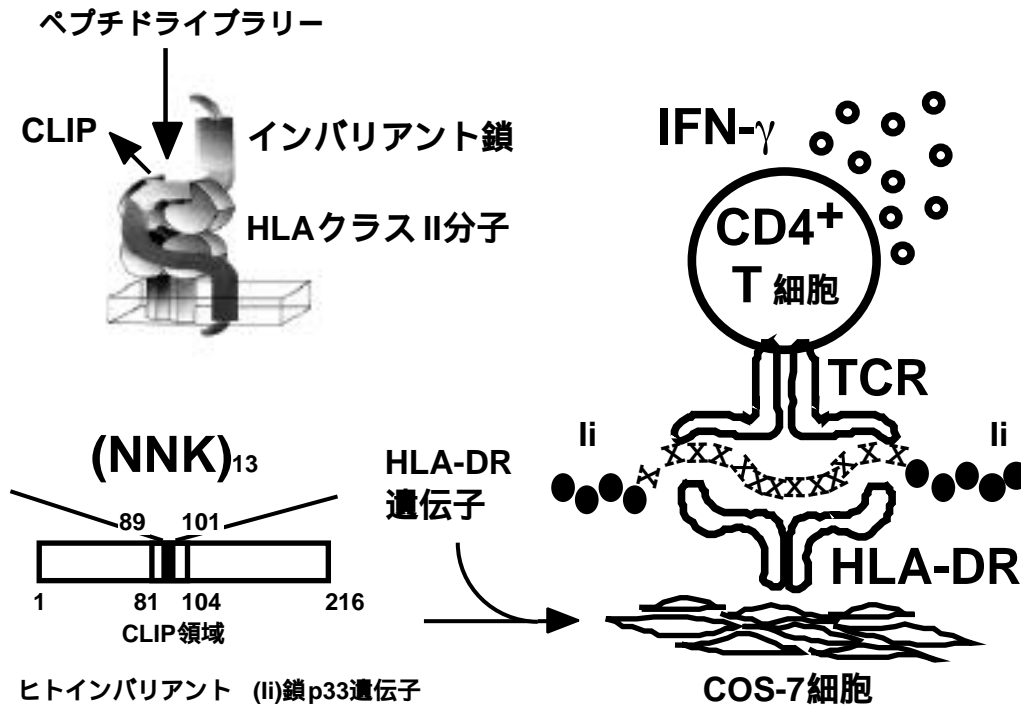


図 3. ペプチドライブラリー / CLIP 置換型 li 鎖遺伝子と HLA-DR 遺伝子を共に一過性に発現する COS-7 細胞を用いた T 細胞クローンの TCR リガンドの同定方法<sup>17)</sup>  
 li 鎖遺伝子の CLIP 部分に導入されたコドン NNK を 13 回くり返した合成オリゴヌクレオチドの、N は塩基 A,T,G,C の K は塩基 G,T の混合物であることを示す。コドンの第 3 ポジションを K とすることにより終止コドンの出現頻度を減らした。方法の詳細については本文参照。

## 2. 発現クローニングによる CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンが認識する TCR リガンドの同定

著者らはこのシステムを用いて、分子擬態による発症機序が提唱されている I 型糖尿病の患者から樹立された、有力な自己抗原の 1 つである GAD65 (65-kDa glutamic acid decarboxylase) に反応性を示す T 細胞クローンの未知のリガンドの同定と TCR 認識の多様性を解析している。用いた T 細胞クローンは日本人で I 型糖尿病に疾患感受性を示す HLA-DR53 により提示された、GAD65 p115-127 に反応する自己反応性 Th1 様 T 細胞クローン、SA32.5 と MK20.2 である<sup>18)</sup>。システムの検出感度は、II 鎖の CLIP 部分を T 細胞クローン SA32.5 を活性化する GAD65 ペプチドに置換したベクター-pClG を、野生型の CLIP をコードするベクター-pCl により希釈して検出限界を検討した(図 4)。その結果、96 穴プレート 1 ウェル中に導入したエピトープライブラリーの中に 1/1000 の割合で T 細胞クローンを刺激できるペプチドをコードする CLIP 置換型 II 鎖遺伝子が COS 細胞に導入されれば、T 細胞応答を IFN- $\gamma$  の ELISA にて検出が可能であることがわかった。

このシステムを用いて合計  $2.0 \times 10^5$  個の CLIP 置換型 II 鎖遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、T 細胞クローンを活性化する GAD65 とは全く異なるシーケンスをもつペプチドを同定した<sup>17)</sup>(図 5)。このシーケンスに基づき、CLIP 領域との接合部を含むオーバーラッピングペプチドを合成し、T 細胞クローンを活性化できるか増殖反応にて検討したところ、ペプチドによる増殖活性を認めた。T 細胞クローンが認識した部位は、ランダム 13mer を設定した部位とその前方の CLIP との接合部を含んでいて、オーバーラッピングペプチドから得られた情報によるフレームの比較においてロイシンの 1 アミノ酸残基が一致するのみであった。以上の結果から、この方法を用いて、T 細胞クローンが交差反応を示すペプチドリガンドを同定できることが明らかとなった。

## 3. TCR による抗原ペプチドの認識パターンの解析

さらに T 細胞を活性化するリガンドを予測する為のより詳細な情報を得るため、おのおの連続した 3 残基を 1 ブロックとして、これを全くランダムなアミノ酸の組み合わせにしたエピトープライ

ブラリーを構築し、同様のスクリーニングにより、交差反応を示すペプチドのシーケンスの多様性を検討した<sup>19)</sup>(図 6)。このスクリーニングには SA32.5 および別の I 型糖尿病患者より樹立し、HLA-DR53 拘束性と GAD65 p116-127 ペプチド (NILQYVVKSFDF) への特異性を共有するが、TCR が異なる MK20.2 を用いた。その結果、それぞれの T 細胞クローンは、エピトープを共有していたにも関わらず、交差反応を示したペプチドのシーケンスは全く異なっており、さらに GAD65 と同等あるいはより強いアゴニスト活性を有するものを多く含んでいた。例えば、MK20.2 T 細胞クローンにおいては GAD65 p124 のポジションにはリジンしか許容されないが SA32.5 T 細胞クローンにおいては、プロリン、アルギニン、アスパラギンが許容された。特に注目したい点は、SA32.5 T 細胞クローンの p123 にメチオニン、p124 にアスパラギン、p125 にスレオニンが許容されているのに対し、1 残基置換合成アナログペプチドに対する増殖応答と比較すると、SA32.5 T 細胞クローンにおいて、それぞれのポジションにメチオニン、アスパラギン、スレオニンのアミノ酸残基はほとんど許容されないことである(図 7)。

T 細胞クローン MK20.2 に関しては、1 残基置換アナログペプチドに対する増殖応答に矛盾する結果は得られなかった。この結果より、SA32.5 TCR の抗原認識は GADp123-125 部分に関して、隣接アミノ酸残基の影響を受けやすく、抗原ペプチド中のアミノ酸残基同士の相互作用が重要であると考えられた。このような場合、1 アミノ酸残基を置換したアナログペプチド、あるいはコンビナトリアルペプチドライブラリーに対する T 細胞の増殖応答の解析では増殖活性を得るリガンドに到達できない場合があると考えられる。

以上まとめると、CLIP 領域をランダムな 13 アミノ酸からなるペプチドをコードするように置換した変異インバリエント鎖遺伝子と HLA-II 遺伝子を一過性に発現するエピトープ発現細胞のスクリーニングにより、T 細胞クローンを活性化する多様なペプチドリガンドを同定することができた。さらに 2 つの GAD65 自己反応性 T 細胞クローンを用いた、3 残基ランダムのエピトープ発現細胞ライブラリーのスクリーニングにより、2 つの TCR の認識パターンに違いを見いだすことができた。また、GAD65 ペプチドよりも強いアゴニスト活性を有するペプチドのシーケンスを同定するこ

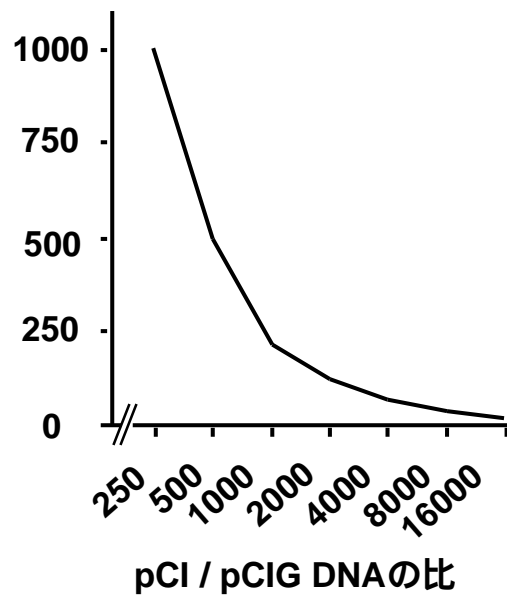
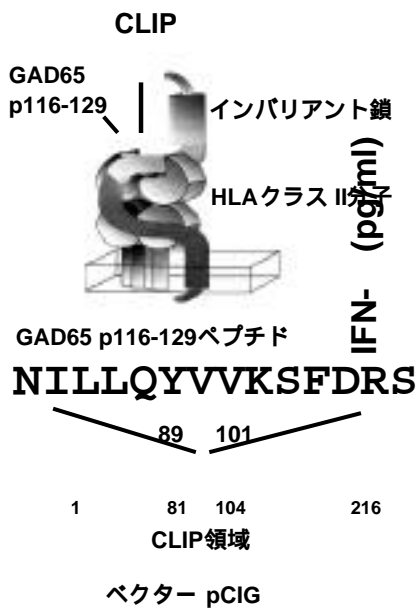
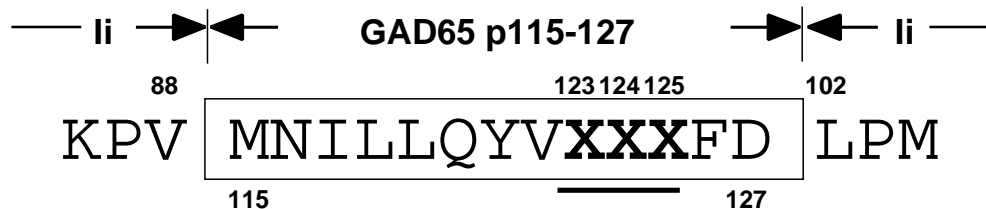


図 4. T細胞クローンによる IFN- の産生を指標とした、GAD65 / CLIP 置換型 li 鎖遺伝子を一過性に発現する細胞の検出限界の決定<sup>17)</sup>

GAD65 p116-129 を組み込んだ GAD/CLIP 置換型 li 鎖 (pCIG) と野生型の li 鎖 (pCI) を種々の割合で混合し HLA-DR53 遺伝子とともに、COS-7 細胞に 96 穴プレート中でトランスフェクションを行った。24 時間後、T 細胞クローンを添加して 48 時間培養し、T 細胞が培養上清中に分泌した IFN- を定量することにより T 細胞応答を検出した。







T細胞クローン	交差反応を示したペプチド	% GAD65 増殖応答
<b>SA32.5</b>	MNILLQYV <b>R</b> PSFD	<b>116</b>
	MNILLQYV <b>R</b> PTFD	<b>107</b>
	MNILLQYV <b>R</b> PVFD	<b>101</b>
	MNILLQYV <b>R</b> PKFD	<b>94</b>
	MNILLQYV <b>R</b> NGFD	<b>89</b>
	MNILLQYV <b>M</b> PGFD	<b>83</b>
	MNILLQYV <b>M</b> RVFD	<b>71</b>
<b>MK20.2</b>	MNILLQYV <b>S</b> KDFD	<b>134</b>
	MNILLQYV <b>A</b> KGFD	<b>134</b>
	MNILLQYV <b>N</b> KDFD	<b>125</b>
	MNILLQYV <b>S</b> KAFD	<b>119</b>
	MNILLQYV <b>A</b> KPFD	<b>115</b>
	MNILLQYV <b>N</b> KCFD	<b>113</b>
	MNILLQYV <b>S</b> KKFD	<b>107</b>

図 6. 2 種類の GAD65 自己反応性 TCR による抗原ペプチドの認識パターンの多様性の解析<sup>19)</sup>  
 HLA-DR53 拘束性と GAD65 p116-127 ペプチド(NILLQYVVKSFDF)への特異性を共有するが、TCR の異なる2つのT細胞クローンSA32.5とMK20.2を用いて抗原ペプチドの認識パターンを解析した。GAD65 p123-125 部分をランダムとしたエピトープライブラリーのスクリーニングで同定したシーケンスと GAD65 p116-127 の増殖応答を 100 としたときの増殖応答の程度を示す。

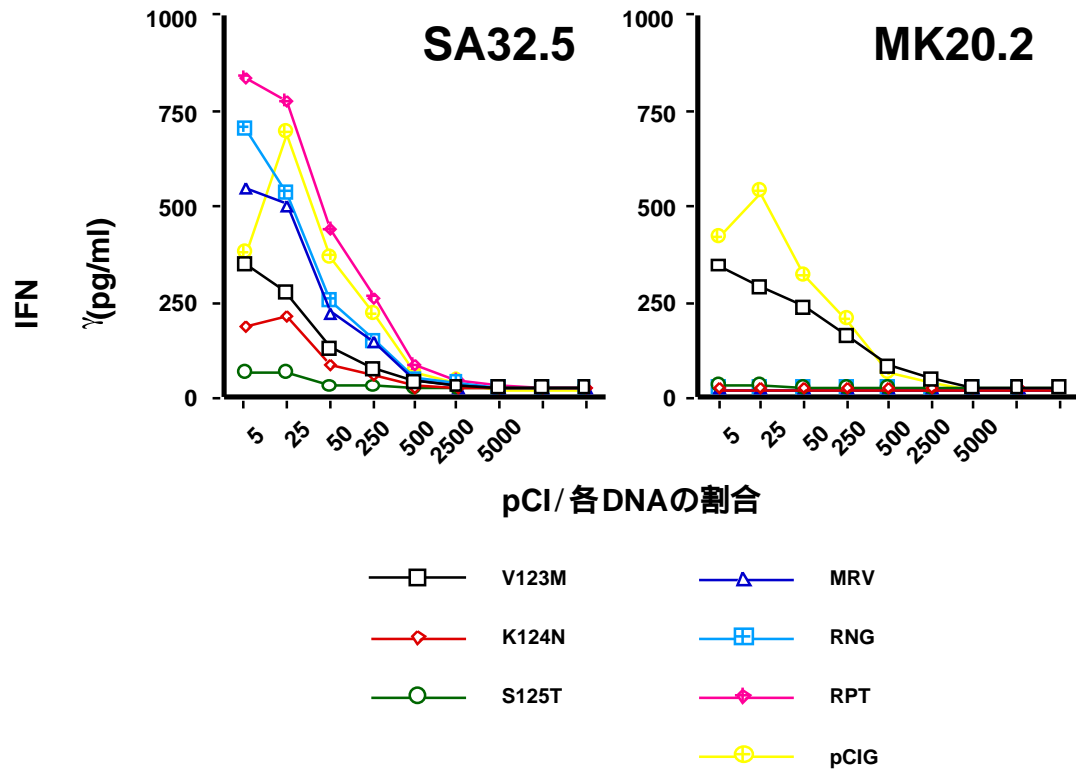


図 7. 抗原ペプチド上のアミノ酸残基の相互作用が TCR 認識に及ぼす影響<sup>19)</sup>

T細胞クローン SA32.5 は、GAD65 p115-127 で p123 V M, p124 K N, p125 S T に置換した 3 種のアナログ (V123M, K124N, S125T) をほとんど許容しないが、3 残基をランダムとしたライブラリーから同定されたものにはそれぞれのポジションに対して 1 残基置換では許容されないアミノ酸残基を含むものが同定された (MRV, RNG, RPT)。さらにアミノ酸残基の組み合わせによって GAD65 p115-127 より強いアゴニスト活性を示したペプチド (MNILLQYVRPTFD) も同定された。

とが可能であることがわかった。このシステムは TCR が認識するペプチドのシーケンスを短時間に多数同定でき、TCR 認識パターンを評価する上で優れた方法である。

今後、3 残基置換 GAD65 ペプチドによる情報を蓄積して、これらの T 細胞クローンに増殖誘導活性を示す自然界に存在する非自己ペプチドを同定することにより、日本人 1 型糖尿病における微生物感染を誘因とした発症機序の解明に貢献できると期待している。(その後の研究成果については文献 19 参照)

### おわりに

CLIP 置換 II 鎖を用いた多様な HLA-II・ペプチド複合体を発現する抗原提示細胞のライブラリーを利用して、抗原特異性は未知の T 細胞クローンが認識する TCR リガンドおよびその多様性を解析することが可能となった。本方法は CD4<sup>+</sup>T 細胞の免疫応答が一因となって発症する自己免疫疾患をはじめとする免疫疾患の病因、病態の解明に貢献するものと期待される。

### 文献

1. Fujii, S., Senju, S., Chen, Y.Z., et al. :The CLIP-substituted invariant chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cells. **Human Immunology**, 59:607, 1998.
2. Koch, N., van Driel, I.R. and Gleeson, P.A. :Hijacking a chaperone: manipulation of the MHC class II presentation pathway. **Immunology Today**, 21:546, 2000.
3. Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., et al. :Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. **Nature**, 368:215, 1994.
4. Matsushita, S., Takahashi, K., Motoki, M., et al. :Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1\*0405 and -DRB1\*0406 complexes: implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. **Journal of Experimental Medicine**, 180:873, 1994.
5. Cresswell, P. :Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. **Annual Review of Immunology**, 12:259, 1994.
6. Hennecke, J., Carfi, A. and Wiley, D.C. :Structure of a covalently stabilized complex of a human alpha beta T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. **EMBO Journal**, 19:5611, 2000.
7. Hennecke, J. and Wiley, D.C. :T cell receptor-MHC interactions up close. **Cell**, 104:1, 2001.
8. Kersh, G.J., Miley, M.J., Nelson, C.A., et al. :Structural and functional consequences of altering a peptide MHC anchor residue. **Journal of Immunology**, 166:3345, 2001.
9. Ausubel, L.J., Kwan, C.K., Sette, A., et al. :Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93:15317, 1996.
10. Leggatt, G.R., Hosmalin, A., Pendleton, C.D., et al. :The importance of pairwise interactions between peptide residues in the delineation of TCR specificity. **Journal of Immunology**, 161:4728, 1998.
11. Oldstone, M.B. :Molecular mimicry and immune-mediated diseases. **FASEB Journal**, 12:1255, 1998.
12. Hemmer, B., Vergelli, M., Gran, B., et al. :Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology. **Journal of Immunology**, 160:3631, 1998.
13. Hausmann, S., Martin, M., Gauthier, L., et al. :Structural features of autoreactive TCR that determine the degree of degeneracy in peptide recognition. **Journal of Immunology**, 162:338, 1999.
14. Shigematsu, H., Shimoda, S., Nakamura, M., et al. :Fine specificity of T cells reactive to human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant autoantigen in primary biliary cirrhosis: implications for molecular mimicry and cross-recognition among mitochondrial autoantigens. **Hepatology**, 32:901, 2000.
15. Hemmer, B., Vergelli, M., Pinilla, C., et al. :Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. **Immunology Today**,

- 19:163, 1998.
16. Tanaka, Y., Ohyama, H., Ogawa, M., et al. :Identification of peptide superagonists for a self-K-ras-reactive CD4<sup>+</sup> T cell clone using combinatorial peptide libraries and mass spectrometry. **Journal of Immunology**, 162:7155, 1999.
  17. Fujii, S., Uemura, Y., Iwai, L.K., et al. :Establishment of an expression cloning system for CD4<sup>+</sup> T cell epitopes. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, 284:1140, 2001.
  18. Tabata, H., Kanai, T., Yoshizumi, H., et al. :Characterization of self-glutamic acid decarboxylase 65-reactive CD4<sup>+</sup> T-cell clones established from Japanese patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Human Immunology**, 59:549, 1998.
  19. Uemura, Y., Senju, S., Maenaka, K., Iwai, L.K., Fujii, S., Tabata, H., Tsukamoto, H., Hirata, S., Chen, Y-Z, and Nishimura, Y. Systematic analysis of the combinatorial nature of epitopes recognized by TCR leads to identification of mimicry epitopes for GAD65 specific TCRs **Journal of Immunology**. in press