

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19151

研究課題名(和文) リポペプチドを提示する、新しいヒトMHCクラス1分子群の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a novel class of human MHC class I molecules presenting lipopeptide antigens

研究代表者

森田 大輔 (Morita, Daisuke)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：40706173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド抗原提示を専門に担う古典的なMHCクラス1分子とは対照的に、N末端ミリスチン酸(C14飽和脂肪酸)修飾を受けたペプチド抗原、すなわち「リポペプチド」の抗原提示を担う新しいタイプのMHCクラス1分子群(LP1分子)が存在する(Morita et al. Nature Communications 7:10356,2016)。サルエイズモデルより同定したサルLP1分子の詳細な構造解析情報をベースにした in silico スクリーニング、及び、変異体解析によって、高いリポペプチド結合能を有すると考えられるヒトLP1分子候補群の選抜を完了した。

研究成果の概要(英文)：In contrast to peptide Ag-presentation mediated by conventional MHC class I, a new pathway for host defense has been discovered in the monkey AIDS model, in which N-myristoylated viral lipopeptide-specific T cell responses develop to combat against infection. We have identified novel rhesus MHC class I (LP1) molecules as lipopeptide-presenting molecules and determined the X-ray crystal structures of rhesus LP1 complexed with lipopeptide at high resolution (Morita et al. Nature Communications 7:10356,2016). In the basis of the detailed structural information, we have completed to select human LP1 candidate molecules by in silico database searching and the mutant analysis, which was likely to be capable of binding lipopeptide Ags.

研究分野：免疫学

キーワード：MHCクラス1 リポペプチド Nef ミリスチン酸修飾

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの免疫パラダイム

免疫系とは自己と非自己を識別する反応系である。獲得免疫系において、この識別には蛋白断片である「ペプチド」を特異的に認識する MHC 拘束性 T 細胞群が主要な役割を果たしていると考えられてきた (図 1 左)。これに対して、CD1 分子によって提示される「脂質」を特異的に認識する T 細胞群が存在し、感染細胞を直接制御するエフェクター細胞として生体防御の一翼を担っていることが特に結核菌などの抗酸菌感染症において明らかにされてきた (図 1 中央)。

(2) リポペプチド免疫応答の発見とリポペプチドを提示する新しい MHC クラス 1 分子の同定

一方、ウイルスはゲノムサイズが小さく、固有の脂質を合成することが出来ないため、上記の CD1 分子を介した脂質特異的免疫応答の標的とはならないと考えられている。しかしながら、ヒト/サル免疫不全ウイルス (HIV/SIV) が産生する Nef 蛋白質は、その N 末端に脂質修飾の一つであるミリスチン酸修飾を受けることにより、リポ蛋白質として CD4 分子など様々な免疫蛋白質の機能や発現を抑制し、感染の成立に大きく寄与する。研究代表者は、サルエイズモデルの研究から、この Nef リポ蛋白質の N 末端断片に由来するミリスチン酸付加 Nef ペプチド、すなわち「リポペプチド」がキラー T 細胞の特異的標的抗原となることを発見し、リポペプチドと言う新しい抗原レパートリーの存在を実証してきた (Morita D, et al. J. Immunol. 187(2):608-612, 2011 及び Morita D, et al. J. Virol. 87(1):482-488, 2013)。

意外なことに、このリポペプチド免疫応答を担う抗原提示分子 (LP1 分子) の実体は、これまでペプチド抗原提示を専門に担うと考えられてきた古典的 MHC クラス 1 分子である。LP1: リポペプチド複合体の X 線結晶構造解析からこの LP1 分子の抗原結合溝はペプチドではなく、リポペプチドの結合に最適化された構造を有していた。このことから、少なくとも一部の MHC クラス 1 分子群はリポペプチドを結合し、T 細胞への抗原提示を担うために存在していると考えられた (図 1 右) (Morita D, et al. Nat. Commun. 7:10356, 2016)。

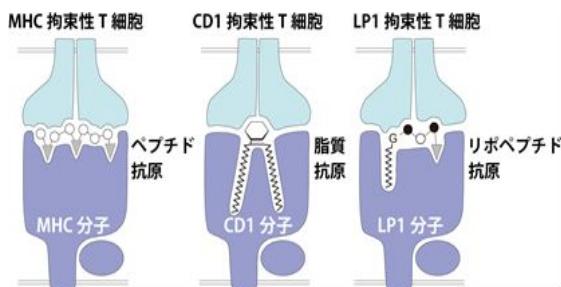


図 1. 免疫系は従来のペプチドや脂質抗原だけではなく、「リポペプチド」についても特異的な獲得免疫応答を誘起することが出来る。

2. 研究の目的

リポペプチド免疫応答のヒトにおける存在の有無とその病態的意義については未だ不明である。本研究課題では、サル免疫解析から得られた基礎的知見をもとにヒトへの展開と応用を目指した。そして、リポペプチド抗原特異的 T 細胞応答の全容解明に向け、「リポペプチドを提示する、新しいヒト MHC クラス 1 分子群の同定とその機能解析」を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in silico スクリーニング

European Bioinformatics Institute のデータベースに登録されている約 1 万種類のヒト MHC クラス 1 の配列より、リポペプチドのアシル鎖を収納する B ポケットの構成アミノ酸 (45 番目など) を抽出した。そして、個々のアミノ酸側鎖の疎水性度については Kd score (Kyte J, et al. J. Mol. Biol. 157(1):105-132, 1982) を用いて、また、その高さについては全原子数の和を用いて数値化し、それぞれ積算した。サル LP1 分子において得られる数値をベースとして一定の基準を設定し、2 つの数値についてこの基準を通過する分子群をヒト LP1 分子候補として選抜した。

(2) LP1 変異体解析

サル LP1 分子と HLA-B27 のアミノ酸配列を比較し、結晶構造において、その側鎖が抗原結合溝の中を向き、かつ両者で異なるアミノ酸を選び出した。次いで、標的アミノ酸に対して PFU ポリメラーゼを用いた PCR 法によって site directed mutagenesis を実施し、LP1 の配列を HLA-B27 へと近づけた。このとき、変異標的箇所が 3 アミノ酸以上の場合、遺伝子人工合成の受託サービスを活用して、種々の変異体を構築した。それぞれの変異体を CHO 細胞へと lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションし、その細胞表面での発現量を抗 pan-MHC クラス 1 抗体である w6/32 を用いたフローサイトメトリーによって評価した。また、それぞれの変異 LP1 の細胞外領域を pET21 ベクターへと組み込み、大腸菌にインクルージョンボディーの形でそれぞれのリコンビナント蛋白質を発現させた。これをグアニジン塩酸塩にて溶解し、リポペプチド存在下に in vitro での 2 日間のリフォールディングを行った。10mM Tris 緩衝液への透析後、陰イオン交換樹脂を用いて蛋白質を濃縮し、Superdex200 Increase カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。約 45kD に相当する溶出時間に認められるピークサイズを定量し、リポペプチド結合活性

を評価した。

4. 研究成果

(1) In silico スクリーニング

MHC クラス 1 分子の抗原結合溝には A から F までの 6 つのポケットが存在している。サル LP1 分子：リポペプチド複合体の詳細な構造情報（図 2）より、この中で、アシル鎖の収納を担うのは B ポケットであることが分かっている。LP1 分子の B ポケットは疎水性が高く、容積が顕著に大きいという特徴を備えており、これは通常のペプチド抗原提示を担う MHC クラス 1 分子には認められない特徴である。そこで、ヒト MHC クラス 1 配列データベースに対して、B ポケットを構成するアミノ酸側鎖情報を抜き出し、推定される B ポケットの疎水性度と容積に着目して、これを数値化した。得られた値に基づいて、insilico でのスクリーニングを行い、ヒト MHC クラス 1 分子の順位付けを行った。そして、上位にランキングされる MHC クラス 1 をヒト LP1 分子の有力候補として選抜した。

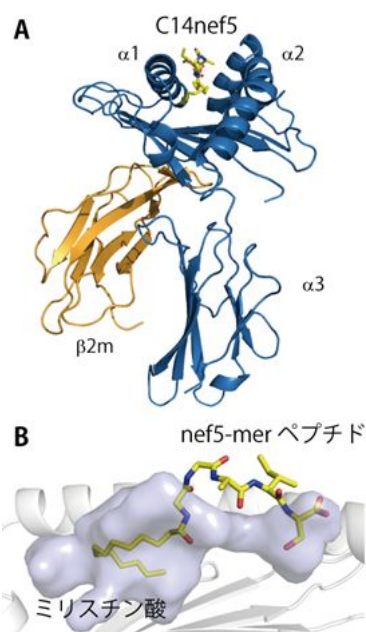


図 2. LP1:SIV nef リポペプチド複合体の X 線結晶構造解析 (PDB code: 4ZFZ) LP1 分子の全体像 (A) とリポペプチド結合様式 (B)

(2) LP1 変異体解析

サル LP1 分子とリポペプチドとの相互作用に必須となるアミノ酸を同定するため、サルの代表的なペプチド抗原提示 MHC クラス 1 である Mamu-B*008 と LP1 とのアミノ酸配列を比較した。まず、両者で異なるアミノ酸のうち、抗原結合溝内部を構成する全てのアミノ酸を入れ替えたところ、両者のペプチドあるいはリポペプチド結合能は完全にスイッチできることが分かった(図 3)。このペプチド

結合とリポペプチド結合の差異を決定する重要なアミノ酸を明らかにするため、次にサル LP1 分子の抗原結合溝内部を構成する特徴的なアミノ酸群について、個々に Mamu-B*008 が持つアミノ酸へと置換することによって、種々の変異体を作製した。得られた変異体について、上述した方法に従って、ペプチド結合性とリポペプチド結合能をそれぞれ評価した。この実験を通じて、LP1 分子にリポペプチド抗原提示能を付与する極めて重要なアミノ酸部位の同定に成功した(国際学術誌への投稿準備中)。この場所に LP1 分子と同じ特徴を有するアミノ酸を持っている場合、ヒト LP1 分子である可能性が高い。(1)と同様にデータベースの探索から、最終的に 8 種類のヒト MHC クラス 1 を候補分子として選び出した。

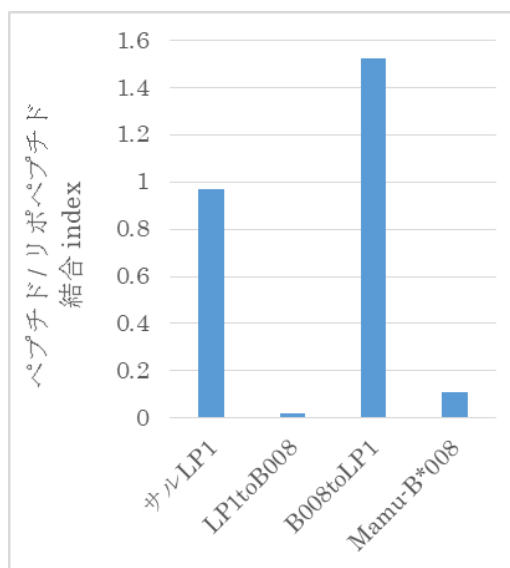


図 3. LP1 変異体の解析

サル LP1 分子の抗原結合溝を Mamu-B*008 のアミノ酸に置換した変異体 (LP1toB008) と逆に Mamu-B*008 の抗原結合溝をサル LP1 のアミノ酸に置換した変異体 (B008toLP1) の解析結果。アミノ酸置換によって、ペプチド/リポペプチド結合能も同様に置き換わっている。縦軸の数値は、低ければ (0 に近ければ) ペプチド結合性が高いことを、高ければ (1 に近ければ) リポペプチド結合性が高いことを意味している。

(3) ヒトリポペプチド提示分子の同定に向けた準備状況と今後の展開

幾つかのヒト MHC クラス 1 分子は (1) (2) どちらの方法でも選抜されることから、特に有力な候補と考えられた。全ての候補分子について、理化学研究所バイオリソースセンターあるいは遺伝子人工合成サービスによって、全長の遺伝子配列を入手した。これを、大腸菌発現用の pET21 ベクターへとクロ

ーニングし、ヒトリポペプチド提示分子同定に向けた最終準備を完了した。

今後の展開として、まずは速やかに個々の候補分子について、大腸菌リコンビナント蛋白質を調製し、リポペプチド結合試験（構築済み）によって、ヒトのリポペプチド結合性 MHC クラス 1 分子群を同定する。その後、特に結合活性が高い 2 種類の MHC クラス 1 分子については、ラージスケールでのリフォールディングから大量にリポペプチドとの複合体蛋白質を調整し、X 線共結晶構造解析を行う。これによって、リポペプチド結合能を直接的に実証するとともに、その結合様式を解き明かす。さらに、トランスジェニック (Tg) マウスの樹立へと進む。Tg マウス脾臓細胞における細胞表面での発現を確認した後、リポペプチド抗原を免疫する、あるいは invitro にて T 細胞をリポペプチド抗原で繰り返し刺激することによって、リポペプチド特異的な T 細胞応答の有無を評価する。この抗原提示能の評価を通して、当該 MHC クラス 1 分子が真に「LP1 分子」であることを機能レベルで実証する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yuya Yoshioka, Tatsuaki Mizutani, Satoshi Mizuta, Ayumi Miyamoto, Satoru Murata, Toshiaki Ano, Hiroshi Ichise, Daisuke Morita, Hiroyuki Yamada, Yoshihiko Hoshino, Tatsuaki Tsuruyama and Masahiko Sugita
Neutrophils and the S100A9 protein critically regulate granuloma formation
Blood Advances 2016 Dec;1:184-192. 査読有

[学会発表](計 4 件)

森田 大輔、嶋 耀子、杉田 昌彦
霊長類研究から見えてきた、非ペプチド抗原を標的とする新しい獲得免疫機構
第 29 回日本生体防御学会学術集会 (京都)
2018 年 6 月 28 日 (発表予定)

森田大輔

リポペプチド：エイズウイルス制御の新しい免疫標的分子
日本薬学会第 138 年会 (金沢)
2018 年 3 月 28 日

森田大輔、杉田昌彦

「リポペプチド免疫応答」の発見とその分子機構の解明
第 27 回日本生体防御学会学術集会 (福岡)
2016 年 7 月 8 日

Morita D

Discovery of N-myristoylated lipopeptide Ag-presenting MHC class I molecules.

The 23rd East Asia Joint Symposium (国際学会)

2016 年 10 月 19 日 (Taipei)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ

http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex_ivr/Lab/SugitaLab.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 大輔 (MORITA, Daisuke)

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
助教

研究者番号：40706173

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし