

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07078

研究課題名（和文）「リポペプチド免疫」に着目した自己免疫の新機軸

研究課題名（英文）Lipopeptide Immunity: A novel approach to autoimmunity

研究代表者

森田 大輔 (Morita, Daisuke)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：40706173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者はウイルス由来のリポペプチドをT細胞へと提示する新しいタイプのMHCクラスI分子LP1を同定し、その構造と機能を明らかにしてきた。一方、リポペプチド免疫は抗原特異性が曖昧であり自己と非自己の識別が理論上困難であるため、ウイルス感染に伴うヒト自己免疫の増悪に關与する可能性を想起した。そこで、既存のLP1分子の情報をもとにヒトLP1候補として日本人集団における最頻度アリルであるHLA-A\*2402とHLA-C\*1402を同定し、そのX線結晶構造解明した。さらに、リポペプチド免疫を再構築した独自のマウスラインの樹立を完了し、現在、ウイルス感染と自己免疫との關連性について検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原体抗原と自己抗原の間に構造類似性がある時、両者の間に免疫学的な交差反応が起こり、自己反応性が生じ得る。従来、この概念は蛋白やペプチド抗原に対する免疫の枠組みの中で理解されてきたが、リポペプチド抗原を特異的に認識するT細胞は、自己と非自己の識別が本質的に困難であることから、自己免疫病態の発露に關与している可能性が高い。本研究が成就すれば、自己免疫の新概念が生み出され（学術的意義）、リポペプチドを標的とした新しい治療法・予防法・診断法の開発に繋がる（社会的意義）。

研究成果の概要（英文）：We have identified a novel subset of MHC class I molecule, LP1 that presents virus-derived lipopeptides to T cells and have elucidated their structures and functions. On the other hand, lipopeptide immunity is theoretically difficult to distinguish between self and non-self due to its ambiguous antigen specificity, suggesting its potential involvement in the exacerbation of human autoimmunity associated with viral infection. Therefore, based on the structural information from the known LP1 molecules, we identified HLA-A\*2402 and HLA-C\*1402, which are the most frequent alleles in the Japanese population, as LP1 candidates, and determined their X-ray crystal structures at a high resolution. Furthermore, we have established mouse lines that recapitulate lipopeptide immunity. Utilizing these unique animal models, we are investigating the relationship between viral infection and autoimmunity.

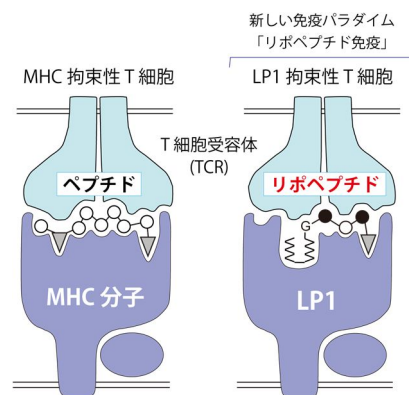
研究分野：免疫学

キーワード：MHCクラスI HLA リポペプチド ミリスチン酸修飾 エイズ 自己免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルスが産生する蛋白質の一部は、宿主由来の C14 飽和脂肪酸 (ミリスチン酸) あるいは C16 飽和脂肪酸 (パルミチン酸) による修飾を受けることにより、脂質化蛋白質としてその機能を発揮する。これらの多くはウイルスの生存戦略を担う分子であり、病原性と深く関連する。研究代表者はアカゲザルエイズモデルの解析から、この脂質化ウイルス蛋白質に由来する 4-mer あるいは 5-mer リポペプチドを標的とした新しい T 細胞応答の存在を発見した。そして、リポペプチド抗原提示を担う責任分子として新しい MHC クラス 1 サブセットである「LP1」の同定に成功した (図 1)。



(2) 研究代表者を中心とした研究成果によって、リポペプチド特異的 T 細胞受容体 (TCR) とリポペプチドを結合したサル LP1 との共結晶構造が明らかになった (引用文献)。その結果、T 細胞は主にリポペプチドのミリスチン酸とペプチドとの境界領域 (アミド基と N 末端グリシン残基) を認識していることを見出した。この極めて限られた認識様式は多数のアミノ酸残基が T 細胞エピートプを形成する典型的なペプチド抗原とは対照的である。さらに、この境界領域は自己リポペプチドにおいても共通する構造であることから、リポペプチド免疫は自己と非自己の識別が理論上困難であり、ウイルス免疫と自己免疫の境界領域で機能する可能性を想起した。

図 1.  
T 細胞はペプチド抗原 (MHC 分子依存的) のみならず、リポペプチド抗原 (LP1 分子依存的) にも特異的に応答する。

### 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者がアカゲザルエイズモデルの解析をもとに世界に先駆けて発見し、2016 年に発表した「MHC クラス 1 分子によるリポペプチド抗原提示 (引用文献)」を土台として、サルからヒトへの展開と新たなヒト自己免疫病態の解明を目指したものである。第一の課題として、「リポペプチド提示ヒト HLA クラス 1 (LP1) アリル群の同定」を設定した。第二の課題として、ヒト LP1 を発現させることによりリポペプチド免疫を再構築したヒト LP1 トランスジェニック (Tg) マウスを作出し、個体レベルでの解析基盤を確立することを目指した。最終的な課題として、上記着想をベースにウイルス感染に伴って誘起される自己免疫疾患の成立機構を個体レベルで解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) HLA 遺伝子の細胞外ドメインを人工合成したものをベクター (pET21) にクローニングし、レアコドン を補正した大腸菌株に発現させた。リコンビナント蛋白質をインクルージョンボディとして精製後、リポペプチドあるいはペプチド、及びベータ 2 ミクログロブリン存在下に緩衝液中でリフォールディングさせた。各サンプルは 10mM Tris 緩衝液 (pH8.0) に透析後に DEAE 陰イオン樹脂によって濃縮したものをゲル濾過クロマトグラフィーに供し、A280nm の吸光度をモニターした。

(2) リフォールディングさせた各 HLA 分子をゲル濾過クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーによって SDS-PAGE 上 90%以上の純度で精製し、各種の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件を探索した。結晶が認められた条件について、緩衝液 pH と沈殿剤の濃度を最適化させた後、得られた結晶について理化学研究所 SPring-8 のビームライン (BL26B1) において回折点を測定し、分子置換によって結晶構造を解いた。次いで Coot 及び Phenix ソフトウェアを用いて、リファインメントを進め、構造を決定した。構造図の描出においては Pymol ソフトウェアを用いた。

(3) マウス H2Kb 遺伝子のアルファ 1-2 ドメインを HLA-A\*2402 及び Mamu-B\*098 遺伝子と置き換えることでトランスジーンを作製した。これをマウス受精卵前核にインジェクションすることにより、各トランスジェニックマウスを作出した。トランスジーン のタンパク発現には市販の抗 HLA 抗体を用いて、フローサイトメトリーにて評価した。

### 4. 研究成果

(1) 研究代表者は複数のサル LP1 分子群の詳細な構造解析と細胞生物学的アプローチから LP1 分子に共通するユニークな特徴として、以下の点に着目した。

- ・ペプチド抗原提示を担う MHC クラス 1 分子とは対照的に、リポペプチドのアシル鎖を収納す

る抗原結合ポケットは顕著に大きく、また疎水性アミノ酸が集中している。

・LP1 分子の 9 番目のアミノ酸が抗原結合ポケットの大きさを規定している。

そこで、欧州バイオインフォマティクス研究所データベースに登録されている全ヒト HLA クラス 1 アリルの中から上記の情報を基にして絞り込み、ヒト LP1 アリル候補を選抜した。そして、コンビナント蛋白質のリフォールディング実験から各 HLA 分子のリポペプチド結合能を定量した。その結果、HLA-A\*2402 と HLA-C\*1402 において高いリポペプチド結合能があることを見出した。興味深いことに、これらの HLA アリル群は日本人集団において最も頻度の高い HLA 遺伝子のひとつである。

続いて、4-mer リポペプチドを結合させた各 HLA 分子について X 線結晶構造解析を行い、高解像度でそれらの構造を解いた。その結果、サル LP1 分子と同様に、ヒト MHC クラス 1 においてもリポペプチドは両末端をアンカーとして結合することが示された。また、中央のアミノ酸は溶媒中に露出されることから、T 細胞エピトープとして機能するものと考えられた (図 2A)。

一方、HLA-A\*2402 と HLA-C\*1402 はともに通常のペプチド抗原を結合し、T 細胞へと提示できることが既に分かっていた。そこで、9-mer ペプチドを結合させた各分子の結晶構造を解き、その構造をリポペプチド結合分子と比較した。その結果、各 HLA 分子はそのポケット構造をダイナミックに変化させることによって、リポペプチドとペプチドという二つの異なるリガンドの収納を可能とする「dual function」を有していることを見出した (図 2B)。

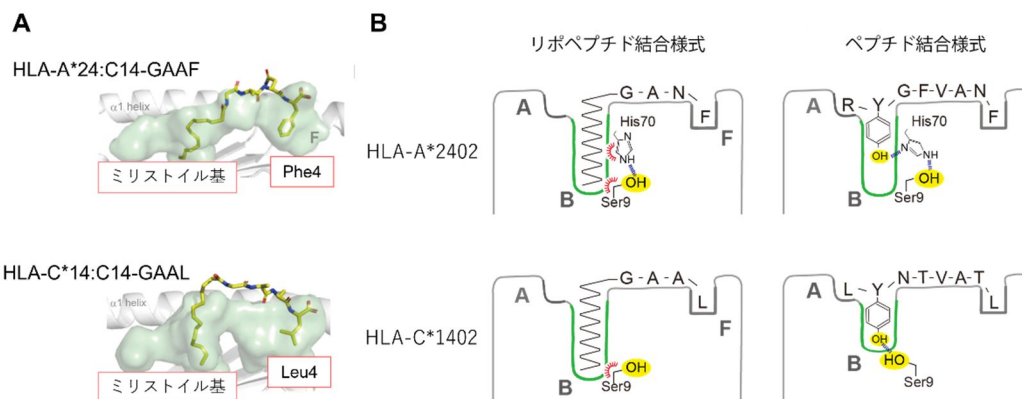


図 2.

A. リポペプチドを結合した HLA-A\*2402 (上) および HLA-C\*1402 (下) の結晶構造。抗原結合ポケットを半透明緑色、リポペプチドを黄色スティックモデルで示した。

B. HLA-A\*2402 (上) および HLA-C\*1402 (下) のリポペプチド及びペプチドの各結合様式を比較したモデル図。ポケット内部のアミノ酸 (9 番と 70 番) がリガンドの種類に応じてその構造を変化させている。

(2) C57BL/6 など免疫実験に用いられるマウス系統に LP1 遺伝子に相当する MHC クラス 1 は認められない。そこで、最初に同定された LP1 であるアカゲザル Mamu-B\*098 およびヒト LP1 有力候補である HLA-A\*2402 を導入することでリポペプチド免疫応答を再構築したマウスラインの作出を進めた。得られた両マウスラインにおいて、トランスジーンは RNA レベルで正しくスプライシングを受けて全長が発現していること、タンパクレベルで各種細胞表面上に発現していることを確認した。先行して樹立を完了した Mamu-B\*098 トランスジェニック (Tg) マウスにおいては、リポペプチド免疫感作によってリポペプチド抗原特異的な T 細胞応答を認めたとことから、この Tg マウスにおいてリポペプチド免疫応答は機能的に再構築されたと判断した。現在、LP1 Tg マウスに対して各種の自己免疫モデルを適応することで、リポペプチド免疫における自己反応性を詳細に検討している。

ヒトにおいて、ウイルス感染に伴い、自己免疫疾患の増悪が観察されるケースがある。これまでの研究成果を踏まえ、この自己免疫誘導において、自己リポペプチド認識が関与している可能性が高い。本研究のさらなる発展によって未知のヒト免疫病態の解明と治療法の確立へと繋がるのが期待される。

#### < 引用文献 >

Morita D, Iwashita C, Mizutani T, Mori N, Mikami B, Sugita M.

“Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides.”  
Int Immunol. 2020 Nov 23;32(12):805-810.

Morita D, Yamamoto Y, Mizutani T, Ishikawa T, Suzuki J, Igarashi T, Mori N, Shiina T, Inoko H, Fujita H, Iwai K, Tanaka Y, Mikami B, Sugita M.

“Crystal structure of the N-myristoylated lipopeptide-bound MHC class I complex.”  
Nat Commun. 2016 Jan 13;7:10356.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daisuke Morita, Minoru Asa, Masahiko Sugita	4. 巻 35
2. 論文標題 Engagement with the TCR induces plasticity in antigenic ligands bound to MHC class I and CD1 molecules	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 7-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac046.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minoru Asa, Daisuke Morita, Jin Kuroha, Tatsuaki Mizutani, Naoki Mori, Bunzo Mikami, Masahiko Sugita	4. 巻 298
2. 論文標題 Crystal structures of N-myristoylated lipopeptide-bound HLA class I complexes indicate reorganization of B-pocket architecture upon ligand binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102100.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mizutani Tatsuaki, Ano Toshiaki, Yoshioka Yuya, Mizuta Satoshi, Takemoto Keiko, Ouchi Yuki, Morita Daisuke, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Tsuruyama Tatsuaki, Fujiwara Nagatoshi, Sugita Masahiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Neutrophil S100A9 supports M2 macrophage niche formation in granulomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106081 ~ 106081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 麻実乃莉、森田大輔、杉田昌彦
2. 発表標題 リボペプチドを提示するMHCクラスI分子の構造と機能
3. 学会等名 第33回日本生体防御学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Morita, Masahiko Sugita
2. 発表標題 A molecular basis for specific recognition of lipopeptides by TCRs
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minori Asa, Daisuke Morita, Masahiko Sugita
2. 発表標題 Dynamic B-pocket remodeling is a basis for HLA class I molecules to bind peptides and lipopeptides.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田大輔、杉田昌彦
2. 発表標題 Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromu Suzuki, Daisuke Morita
2. 発表標題 N-myristoylated lipopeptide-specific T cell development independently of TAP transporters
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Minori Asa, Daisuke Morita, Masahiko Sugita
2. 発表標題 Lipo peptide antigen presentation mediated by classical MHC class I molecules
3. 学会等名 The 13th International CD1-MR1 Conference (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関