

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670483

研究課題名(和文) 新たなエイズウイルス免疫標的分子「リポペプチド」の研究～アカゲザルからヒトへ～

研究課題名(英文) Study of lipopeptide-specific immunity against AIDS: from monkeys to humans

研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA, Masahiko)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80333532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスがつくる「ペプチド」を標的にした免疫応答のしくみは古くからよく知られており、ワクチンの開発など、その免疫応答を利用した医学応用が進められています。本研究では、「リポペプチド」という新しい標的に対する免疫応答の存在を発見し、それがどのようなしくみで起きるのかを、アカゲザルの解析をもとに明らかにしました。本研究により、今後ヒトにおけるしくみを解明するうえで重要な学術的基盤が確立されました。

研究成果の概要(英文)：Immune responses directed against viral "peptides" have been studied extensively, which have medical implications, including the development of peptide vaccines. This study focussed on immune responses directed against viral "lipopeptides", and it was elucidated how this new immune pathway was activated. This study has provided an important basis for the near-future identification of such an immune pathway in humans.

研究分野：感染免疫学

キーワード：細胞・組織 ウイルス 免疫学 脂質 エイズ リポペプチド

1. 研究開始当初の背景

ヒトあるいはサル免疫不全ウイルスが産生する Nef タンパク質は、その N 末端にミリスチン酸の付加を受けたリポタンパク質としてその機能を発揮し、ウイルスの病原性に寄与する。一方、研究代表者の最新の研究から、このミリスチン酸付加 Nef タンパク質に由来するリポペプチドが細胞傷害性 T 細胞の新しい標的抗原となることが明らかとなった。さらに重要なことには、アカゲザルエイズモデルにおいてサル免疫不全ウイルスの感染に伴い Nef リポペプチドに対する末梢血 T 細胞応答が惹起され、この応答のマグニチュードは、血漿ウイルス価と逆相関を示した。これらの事実は、ウイルスの病原性に深く関与した Nef タンパク質のミリスチン酸修飾反応を鋭敏に検知し、感染防御を担う免疫系の存在を示唆する。しかしながら、この新しい免疫応答の分子機構やヒトでの免疫病態は不明であった。

研究代表者は、アカゲザルリポペプチド抗原提示分子の同定と分子構造の決定がリポペプチド免疫応答の全容解明に向けて重要な突破口になると考え、その準備を進めてきた。まず、サル免疫不全ウイルス Nef タンパク質由来のリポペプチドを合成し、それを特異的に認識するアカゲザル細胞傷害性 T 細胞株の樹立を試みた。樹立された 2 つのアカゲザル CD8 陽性 T 細胞株 (2N5.1, SN45) のうち、2N5.1 はミリスチン酸修飾を受けた Nef N 末端 5-mer ペプチド (ミリスチン酸 - Gly - Gly - Ala - Ile - Ser; C14nef5) を、また SN45 はミリスチン酸修飾を受けた Nef N 末端 4-mer ペプチド (ミリスチン酸 - Gly - Gly - Ala - Ile; C14nef4) を認識して活性化することがわかった。またこの抗原特異的 T 細胞活性化には適切な個体由来の末梢血単核球の共存が必要であったことから、それらの個体の末梢血単核球にはリポペプチドを T 細胞に抗原提示する「リポペプチド提示分子」が発現していると推定された。

そこで末梢血単核球を免疫原としてマウスあるいはラットを免疫し、抗原特異的な 2N5.1 T 細胞活性化を阻害するモノクローナル抗体の単離を進めた。その結果、阻害活性を有する複数のモノクローナル抗体が得られ、これらは MHC クラス 1 分子を認識することが明らかになった。そこで 2N5.1 に対して C14nef5 を抗原提示できる個体から cDNA ライブラリーを作製し、MHC クラス 1 あるいはその類縁分子をコードする遺伝子群を調製した。それらをクローン化したのち、一つ一つをアカゲザル上皮細胞に発現させ抗原提示機能が賦与できるかどうかの検証を行った。その結果、Mamu-B*098 アリルをコードする cDNA をトランスフェクトしたアカゲザル上皮細胞は C14nef5 を 2N5.1 T 細胞株に抗原提示できることが判明した。

Mamu-B*098 はそのアミノ酸配列の特徴から古典的 MHC クラス 1 分子と考えられた。古

典的 MHC クラス 1 分子は 8-mer から 10-mer のペプチドを結合して T 細胞に抗原提示すると考えられてきた。MHC クラス 1 アリル (Mamu-B*098) がリポペプチドを結合することはこれまでの免疫パラダイムが想定していない事象であり、その検証には詳細な構造解析が必要と考えられた。またその情報が得られれば、ヒトリポペプチド提示分子の同定が可能になることが期待された。

2. 研究の目的

アカゲザルリポペプチド提示分子として MHC クラス 1 アリルが同定された。これは、これまでに確立されたペプチド提示分子としての MHC クラス 1 分子の構造論では説明がつかない事象である。そこでアカゲザルリポペプチド提示分子の構造を決定し、その特質を明らかにする。さらにその構造情報をもとに、ヒトリポペプチド提示分子の同定に向けた基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) Mamu-B*098 可溶性リコンビナントタンパク質の調製

Mamu-B*098 の細胞外領域 (ただし N 末端に Met - Ala 配列を付加、また 167 番目の Cys を Ser に置換) をコードする cDNA を大腸菌発現ベクター pLM1 に組み込んだ。またアカゲザルベータ 2 ミクログロブリン cDNA を単離し、同様に pLM1 に組み込んだ。これらの発現プラスミドを用いて、Rosetta 2 (DE3) pLysS 大腸菌をトランスフォームし、定法にしたがい IPTG による発現誘導を行った。大腸菌を回収し、1% Triton-X-100 および 1% deoxycolate を含む溶解液で溶解し、さらに DNase I 処理を行った。遠心と洗浄によりリコンビナントタンパク質を含有した inclusion body を精製したのち、6M Guanidine-HCl を用いて可溶化を行った。リコンビナントベータ 2 ミクログロブリンも同様の方法で調製した。

可溶性 Mamu-B*098, ベータ 2 ミクログロブリンおよび c14nef5 リポペプチドからなる三量体を得るために、3 者を酸化型・還元型グルタチオンを含む巻き戻しバッファーを用いて急速に希釈し、巻き戻しを促進させた。巻き戻された三量体タンパク質を size exclusion chromatography および monoQ anion exchange chromatography を用いて精製した。

(2) Mamu-B*098:C14nef5 複合体の結晶構造の決定

精製三量体の結晶化は、1 μ l の 100 mM Tris-HCl pH 7.2, 2 mM 塩化亜鉛、13% PEG 600 溶液と同量の三量体溶液 (1 mg/ml) を混和し 20°C でインキュベートすることにより行った。また凍結保護剤として 20% エチレングリコールを用いた。回折データは理化学研究所 SPring-8 施設で収集した。

(3) 可溶性 T 細胞抗原受容体の調整

2N5.1 T 細胞抗原受容体アルファ鎖（ただし 158 番目の Thr を Cys に置換）とベータ鎖（ただし 169 番目の ser を Cys に置換）の細胞外領域をコードする cDNA を構築し、pET-21c(+) に組み込んだ。これらの発現プラスミドを用いて、Rosetta 2 (DE3) pLysS 大腸菌をトランスフォームし、IPTG による発現誘導を行った。大腸菌を回収し、1% Triton-X-100 および 1% deoxycolate を含む溶解液で溶解し、さらに DNase I 処理を行ったのち、遠心と洗浄によりリコンビナントタンパク質を含有した inclusion body を精製した。リコンビナントアルファ鎖とベータ鎖を 5M urea 存在下で混和し、10 mM Tris-HCl pH 8.0 に対して透析を行うことにより、可溶性二量体を調整した。

(4) Biolayer interferometry および surface plasmon resonance アッセイ

種々の合成リガンドのリコンビナント MHC クラス 1 分子に対する結合親和性を、Octet RED96 システムを用いて評価した。リコンビナント MHC クラス 1 タンパク質をセンサーチップ表面に固着させ、リポペプチドリガンドと 30°C で結合させた。

リガンド結合 MHC クラス 1 分子と可溶性 T 細胞抗原受容体との相互作用の定量化は、Biacore 3000 を用いた surface plasmon resonance アッセイにより行った。リガンド結合 MHC クラス 1 分子をセンサーチップに固着させ、種々の濃度のリコンビナント T 細胞抗原受容体と 30°C でインキュベートすることにより association を評価した。さらにリコンビナント T 細胞抗原受容体の非存在下で dissociation の評価を行った。

4. 研究成果

(1) Mamu-B*098 がリポペプチド抗原提示分子としての要件を満たすことを実証した。

可溶性 Mamu-B*098 リコンビナントタンパク質あるいはペプチド提示 MHC クラス 1 分子である Mamu-A*02 の可溶性リコンビナントタンパク質をセンサーチップに固着させ、C14nef5 との結合を biolayer interferometry を用いて検証した。その結果、C14nef5 リポペプチドは Mamu-A*02 にはまったく結合しないのに対し、Mamu-B*098 には優位な結合力を有することが明らかとなった。

プレートに固着させた可溶性 Mamu-B*098 リコンビナントタンパク質に C14nef5 を作用させたのち、2N5.1 T 細胞株を加えて培養すると、T 細胞の活性化が生じ、インターフェロンガンマ産生が観察された。この T 細胞応答は可溶性 Mamu-A*02 リコンビナントタンパク質を固着させたプレートでは観察されなかった。また C14nef5 の 4 番目のアミノ酸を Ile から Ala に置換した変異抗原 (C14-GGAAS) は、C14nef5 と競合的に働く non-antigenic

アナログである。実際、biolayer interferometry を用いた解析において、C14-GGAAS の可溶性 Mamu-B*098 リコンビナントタンパク質への結合は観察されたが、可溶性 Mamu-B*098 リコンビナントタンパク質固着プレートを用いた T 細胞アッセイにおいて抗原活性を認めなかった。

さらに surface plasmon resonance を用いて、T 細胞抗原受容体との相互作用を検証した。2N5.1 可溶性 T 細胞抗原受容体は C14-GGAAS をロードした可溶性 Mamu-B*098 リコンビナントタンパク質には結合しないが、C14nef5 をロードした Mamu-B*098 には結合することが示された。その結合親和性は、旧来知られている古典的 MHC クラス 1: ペプチド間の結合親和性とほぼ同等であった。

以上の semi-cell free アッセイあるいは cell free アッセイから、Mamu-B*098 分子は C14nef5 を物理的に結合し、T 細胞を活性化できること、その認識には T 細胞抗原受容体が使われていることが明らかとなり、Mamu-B*098 分子がリポペプチド提示分子として機能することが確定された。

(2) Mamu-B*098 : C14nef5 複合体の X 線結晶構造を解明した。

古典的 MHC クラス 1 アリルの一つである Mamu-B*098 分子がどのようにして C14nef5 リポペプチドを結合することができるのか、これまで得られた情報からはほとんど説明ができなかった。そこで Mamu-B*098 : C14nef5 複合体の X 線結晶構造の解明が必須と考え、これを推進した。

Mamu-B*098 : C14nef5 複合体の結晶構造は 1.76 オングストロームの高い解像度で解かれた (図 1)。

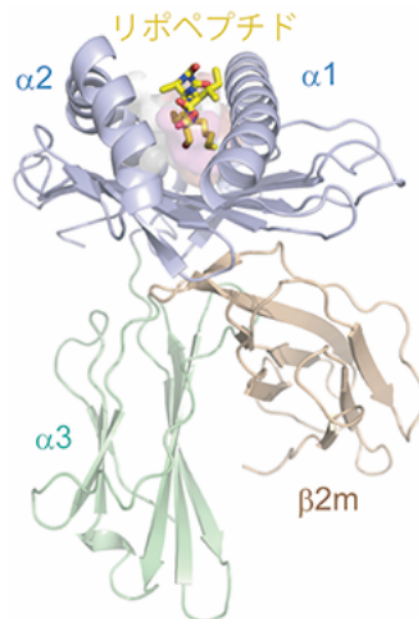


図 1 Mamu-B*098 : C14nef5 複合体の結晶構造

Mamu-B*098 の全体的な基本構造は、これまでに解かれた古典的 MHC クラス 1 分子と同等であり、とりわけアルファ 1 ヘリックスとアルファ 2 ヘリックスの形状や空間配置に差異はみられなかった。重要なことに、両ヘリックス間には C14nef5 にマッチした連続性のある電子密度が観察された。したがって Mamu-B*098 分子が従来しられている古典的 MHC クラス 1 分子の基本構造を踏襲しながらもリポペプチドを結合する能力を有することが視覚的に実証された。

アルファ 1 ヘリックスとアルファ 2 ヘリックスの間には、6 つの典型的なポケット構造 (A, B, C, D, E, F) が容易に同定でき、これもまた従来しられている古典的 MHC クラス 1 分子と同様であった。しかしその形状や機能は大きく異なることがわかった。

まず、C14nef5 と Mamu-B*098 分子との結合に際して、C14nef5 のミリスチン酸と C 末端セリン残基がアンカーとして機能することが明らかとなった (図 2)。

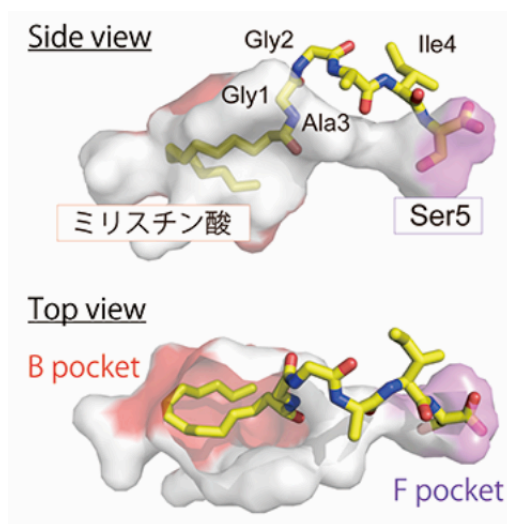


図 2 C14nef5 の結合様式

ミリスチン酸は U 字の形状で B ポケットに収納されていた。これと呼応して、B ポケットはそのサイズが大きく、内面は疎水性アミノ酸や非極性アミノ酸で被われていた。

一方、これまで知られていた古典的 MHC クラス 1 分子と異なり、Mamu-B*098 分子の F ポケットは小さいことが判明した。そして C14nef5 の C 末端に存在する小さなアミノ酸であるセリンと水素結合ネットワークを形成していた。

両末端がアンカーとして機能した結果、中央に存在する 3 つのアミノ酸残基とりわけ Gly2 と Ile4 は上方に位置し、その側鎖は水相に露出していた。これまでの変異抗原を用いた T 細胞アッセイの結果と合致して、この

部分が主要な T 細胞エピトープを構築する可能性が示唆された。

B ポケット、F ポケットとともに、従来しられていた古典的 MHC クラス 1 分子と大きく異なる点が A ポケットにおいて見出された。本来 A ポケットはペプチドリガンド N 末端と相互作用することによりリガンド結合の安定化に貢献する。しかし、Mamu-B*098 分子においては、A ポケットと B ポケットの間の通路が空間的にほとんど塞がれており、実際 A ポケットにはリガンドが結合していなかった。

以上の結果から、Mamu-B*098 分子はリポペプチドを結合するのに最適の構造を有しており、逆にこれまでしられているペプチドリガンドを結合しない可能性が高い。おそらく Mamu-B*098 はリポペプチドを特異的に結合するために進化してきた分子と考えられた。

(3) 第二のアカゲザルリポペプチド提示分子の同定、結晶構造の解明、そしてヒトリポペプチド提示分子の同定へ。

SN45 にリポペプチドを提示する抗原提示分子を最近同定し、その結晶構造を決定した。これまでに得られた Mamu-B*098 の構造情報と新しい構造情報から共通の特質を抽出することにより、リポペプチド提示分子の構造学的要件が明らかになってきた。そしてその要件を有するヒト分子の絞り込みを進めることができた。

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)

① 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. *Nature Communications* (2016). 7:10356. DOI: 10.1038/ncomms10356

[学会発表] (計 1 件)

① 杉田昌彦、脂質免疫：結核菌やエイズウイルスに対抗する新しい獲得免疫システム、第 89 回日本感染症学会学術講演会、京都、2015 年 4 月 16 日-17 日

[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〕

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/SugitaLab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA, Masahiko)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：80333532

(2) 研究分担者

高折 晃史 (TAKAORI, Akifumi)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番頭：20324626

(3) 連携研究者

なし