

平成 30 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：2016～2017

課題番号：16K15517

研究課題名(和文) ヒトリポペプチド抗原提示分子の同定～新たなウイルス制御パラダイムの確立を目指して

研究課題名(英文) Identification of human lipopeptide-presenting molecules: a new host defense mechanism against viral infections

研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA, Masahiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80333532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はサルエイズモデルを活用し、ウイルスが産生する「脂質修飾ペプチド(リポペプチド)」を標的とした免疫応答の存在を見出し、その免疫応答を担う鍵分子を発見した。本研究においては、サルにおける第二の鍵分子を発見し、この構造を明らかにした。さらにこれら2つのサル分子の解析結果をもとに、同様の働きをもつヒト分子候補を絞り込むことに成功した。さらにヒト分子の解析に適したトランスジェニックマウス作製の研究基盤を確立した。これらの研究は新たなウイルス制御の理解に道を開くものである。

研究成果の概要(英文)：The principal investigator has discovered an immune pathway directed against viral lipopeptides by the use of the monkey AIDS model, resulting in the identification of one of the key molecules involved in this new host defense mechanism. In this study, the another key molecule in monkeys was identified, and its fine structure as well as its biological properties were determined. Based on these monkey studies, human molecules are beginning to be identified that may function critically in the immune recognition of viral lipopeptides. Furthermore, a transgenic mouse technology has been established that will facilitate the analysis of the human molecules.

研究分野：感染免疫

キーワード：ウイルス 生体防御

1. 研究開始当初の背景

高次免疫系の最大の特徴である「抗原特異性」の理解は、近代免疫学における中心的課題のひとつである。1987年、MHCクラス1分子：ペプチド複合体のX線結晶構造の解明 (Nature 329: 506, 1987) 以来、MHC分子によるタンパク質 (ペプチド) 抗原提示機構とそれを認識するT細胞サブセットの機能解析が精力的に行われ、ほぼその全容が解明された。獲得免疫の多くの免疫局面が、この抗原提示パラダイムに基づいて理解され、さらにはタンパク質/ペプチドワクチンの開発によって、多くの感染症やがんの制御へと結実した。一方、研究代表者は、アカゲザルエイズモデルを活用した末梢血T細胞の *ex vivo* 解析ならびに長期培養T細胞株の樹立を通して、ウイルスが創出する「リポペプチド」に対するT細胞応答の存在を明らかにした (J Immunol (Cutting Edge) 187:608, 2011; J Virol 87:482, 2013)。この新しい免疫機構の構築基盤を解明し、さらにはアカゲザルからヒトへの展開を通して、新しい免疫パラダイムを確立することは、学術的にもまた社会的にも重要な意義を含んでいる。

研究代表者は、リポペプチド抗原提示を阻害するモノクローナル抗体を樹立し、その認識抗原の生化学的特徴からMHCクラス1様分子 (LP1) がリポペプチド抗原提示分子として機能する可能性を考えた。そこで、SIV Nefタンパク質のミリスチン酸修飾に由来する5-mer リポペプチド (C14-Gly Gly Ala Ile Ser; C14-nef5) とそれを特異的に認識するT細胞株 (2N5.1) を活用した遺伝子スクリーニングを行った。まずMHC関連遺伝子群を濃縮したcDNAライブラリーを作製し、それらを上皮細胞株にトランスフェクトしてリポペプチド抗原提示能が付与されるかどうかを指標にLP1の同定を進めた。その結果、アカゲザル古典的MHCクラス1アリル (Mamu-B*098) がリポペプチド提示分子として機能することが実証された (Nature Commun 7:10356, 2016)。

一方、SIV感染アカゲザル末梢血より樹立したT細胞株 (SN45) はC14-Gly Gly Ala Ile (C14-nef4) に応答すること、また2N5.1を活性化する個体とは別個の個体由来する抗原提示細胞がSN45に抗原提示できることから第二のリポペプチド提示分子 (LP2 と名付けた) の存在が推定された。

2. 研究の目的

アカゲザルリポペプチド応答性T細胞株 (SN45) の拘束分子LP2を同定し、LP1とLP2の免疫生物学的また構造学的共通性からヒトリポペプチド提示分子を推定し、それを実証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) T細胞アッセイ

SN45 T細胞株より単離したT細胞抗原受容

体アルファ鎖およびベータ鎖 cDNA をそれぞれ pREP7, pREP9 発現ベクターに挿入し、T細胞抗原受容体欠損株 (J.RT3) にエレクトロポレーションにより遺伝子導入した。G418 とハイグロマイシンによる選択ののち、T細胞アッセイのレスポンスとして使用した (J.RT3/SN45)。T細胞の活性化は、メディアウム中に放出されるインターロイキン 2 を ELISA で測定することにより評価した。

一方、SN45 T細胞抗原受容体アルファ鎖およびベータ鎖の細胞外ドメインをコードする cDNA を単離し、それらが大腸菌に発現させることによりそれぞれのリコンビナントタンパク質を単離したのち、定法にしたがってT細胞抗原受容体テトラマーを作製した。テトラマーの反応性は、リポペプチドをパルスしたLP2発現細胞を用いたフローサイトメトリーにより検証を行った。

(2) リコンビナントLP2タンパク質の調整、結晶化およびX線結晶構造解析

LP2の細胞外領域をコードするcDNAをpLM1プラスミドベクターに挿入し、大腸菌Rosetta2 (DE3) pLysS株を用いてリコンビナントタンパク質の生合成を行った。IPTG存在下培養によりタンパク質発現を誘導したのち大腸菌 inclusion body を回収し、6M グアニジン塩酸を用いて溶解した。さらにリポペプチド存在下でリコンビナントLP2とベータ2ミクログロブリンを急速混和し、透析によりタンパク質の巻き戻しを行った。得られたタンパク質サンプルは、ゲルろ過および陰イオン交換樹脂を用いて精製した。

得られた巻き戻しタンパク質を結晶化母液 (MIB バッファー) と混和することにより結晶化を推進した。得られたタンパク質結晶は20%エチレングリコール存在下で凍結保護し、理化学研究所 SPring-8 大型放射光施設で解析を行った。得られたデータをもとにMamu-B*098の結晶構造をモデルとして分子置換を行い、LP2:リポペプチド複合体の結晶構造を決定した。

(3) トランスジェニックマウスの作出

関連した従来の方法にしたがい、マウス内因性プロモーター下流にMHCクラス1重鎖アルファ1, アルファ2ドメインをコードするcDNA配列をつなぎ、さらにその下流にはマウスMHCクラス1アルファ3ドメインからポリAシグナルに至るまでのゲノム配列をつないだトランスジーンコンストラクトを作製した。このトランスジーンをマウス受精卵前核に注入し仔を得た。トランスジーンゲノムへの挿入は、ゲノム遺伝子を鋳型とした特異的PCRにより確認した。またRT-PCR法により期待通りの配列を持つmRNAが転写されていることを確認した。

(4) 動物実験

アカゲザル検体を用いた実験は、法令なら

びに学内規則に則り、当該委員会の承認を得て行った。

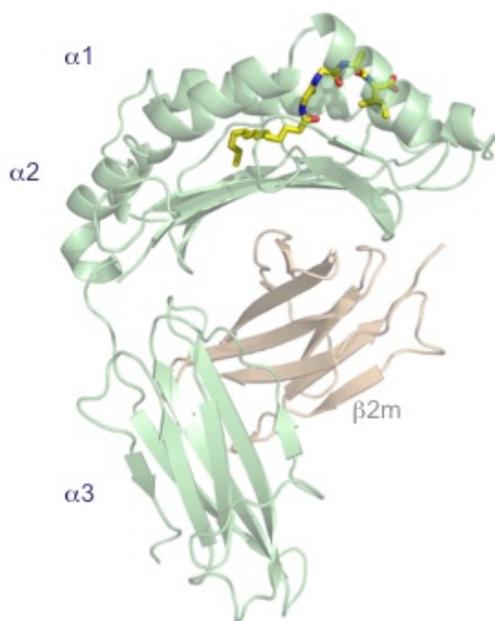
4. 研究成果

(1) LP2 分子の同定

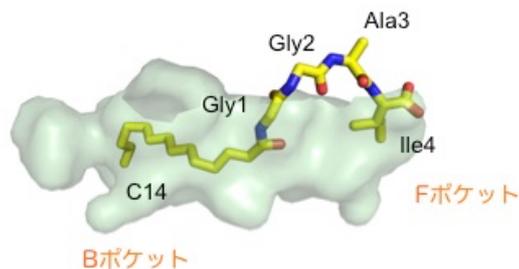
SN45 T 細胞株を活性化するアカゲザル個体 3 頭と活性化しないアカゲザル個体 3 頭の MHC ハプロタイプの比較から、前者には存在せず後者にもみ共通に存在するアレルを抽出し、それぞれをコードする cDNA 遺伝子を単離した。これらを遺伝子導入した HeLa 細胞を抗原提示細胞として用い、C14-nef4 リポペプチド特異的な J. RT3/SN45 活性化を評価する手法により LP2 を同定した。さらに LP2 発現細胞に c14-nef4 リポペプチドをパルスした細胞のみが SN45 T 細胞抗原受容体テトラマーにより標識されたことから、LP2 が SN45 の拘束分子であると結論付けた。

(2) LP2: リポペプチド複合体の構造決定

C14-nef4 リポペプチドとベータ 2 ミクログロブリン存在下で LP2 リコンビナントタンパク質の巻き戻しを行い、得られた複合体を結晶化して X 線結晶構造解析を行った。その結果 1.8 オングストロームの高解像度での結晶構造解明に成功した。LP2 分子は典型的な 3 つのドメイン構造を有し、ベータ 2 ミクログロブリンと非共有的に結合するとともに、アルファ 1 ヘリックスとアルファ 2 ヘリックス間に構築される抗原結合溝には C14-nef4 リポペプチドが結合した構造が観察された。



抗原結合溝には A ポケットから F ポケットまでの 6 つのポケット構造が確認され、このうち B ポケットには C14 ミリスチン酸がアンカーとして結合し、また F ポケットにはペプチド C 末端のイソロイシンがアンカーとして結合することがわかった。



(3) ヒトリポペプチド提示分子の同定に向けたアプローチ

Mamu-B*098 と LP2 に共有され、かつ旧来のペプチド提示分子にはみられない構造学的特徴として B ポケットのサイズが比較的大きいことが挙げられる。これらの分子群においては、9 番目のアミノ酸残基の側鎖が比較的小さいことがわかった。さらに本研究と平行して行ってきた Mamu-B*098 の内因性リガンドの探索からリン脂質群が内因性リガンドとして機能する可能性が示唆され、実際生化学的アプローチにより LP2 もリン脂質群を結合することがわかった。これと符合して、Mamu-B*098 と LP2 はともにペプチドトランスポーター (TAP) 欠損細胞においても野生型細胞と遜色のない細胞表面発現が保持されることを見出した。これら 3 つの免疫生物学的・構造学的特質はおそらくリポペプチド提示分子に深く関連したものであるとの推察を得、これをもとにしてヒトリポペプチド提示分子の同定に着手した。

当初、TAP 非依存的な細胞表面発現が得られる MHC クラス 1 アレルの探索を行い、その結果 HLA-Cw0602 を抽出した。しかしこのアレルは特異的に結合するペプチドが知られており、さらにこのペプチドを結合した HLA-Cw0602 複合体の結晶構造が得られたためリポペプチド提示分子候補ではないと判断して断念した。ついで、B ポケットのサイズの観点から HLA 分子の抽出を行い、8 つの HLA アレルについてリコンビナントタンパク質を調整した。これらを C14-nef4 リポペプチドとベータ 2 ミクログロブリンの存在下で巻き戻し実験を行ったところ、このうちの 1 アレルが C14-nef4 リポペプチド依存的に巻き戻しが起きることがわかった。

(4) Mamu-B*098 トランスジェニックマウスの作出と解析

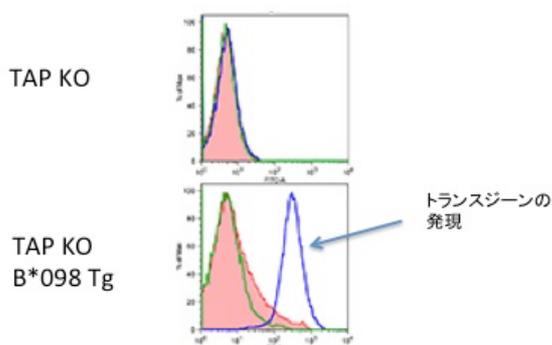
今後、ヒトリポペプチド結合分子が同定できた場合、それがリポペプチド提示分子として機能することを実証するためには、リポペプチド特異的 T 細胞応答を示す必要がある。しかし、ヒトの解析においてはさまざまな障壁があり極めて困難である。そこで代替案としてヒトリポペプチド提示分子を発現したトランスジェニックマウスを作出し、その個体においてリポペプチド特異的 T 細胞応答系

が新構築できたかどうかを検証する手法が現実的であると判断した。

そこでそのトライアルに備え、すでに同定済のアカゲザルリポペプチド提示分子 Mamu-B*098 についてトランスジェニックマウスの作出と解析を行った。過去の類似の研究を参考に、まずトランスジーン構築を行った。プロモーターはマウス内因性の MHC クラス I プロモーターを用い、それがマウス細胞で機能することを確認した。また CD8 アクセサリー分子との結合に重要なアルファ 3 ドメインについては、マウス由来のアルファ 3 ドメインに置換したキメラ分子を採用した。加えて全長に cDNA を用いるのではなく、トランスジーンの後半は内因性のエキソン・イントロン構造を保持する形にした。



このトランスジーンコンストラクトをマウス受精卵に注入しトランスジェニックマウスを作製したところ、メンデルの法則にしたがって仔が生まれることを確認した。脾臓細胞 (TAP 欠損バックグラウンド) におけるトランスジーンタンパク質発現を、フローサイトメトリーを用いて検討したところ、トランスジェニックマウスにおいて Mamu-B*098 分子の顕著な発現を認めた。



さらにこのマウスより骨髄樹状細胞を単離し抗原提示細胞として用いたところ、C14-nef5 リポペプチドを 2N5.1 T 細胞株に抗原提示できることを確認した。以上より、今後のヒトリポペプチド提示分子の解析に必須となるトランスジェニックマウス作出・解析テクノロジーが構築できた。

(5) 成果のまとめ

第二のアカゲザルリポペプチド提示分子 LP2 を同定し、その X 線結晶構造を解明した。また、先に同定されたアカゲザルリポペプチド提示分子 Mamu-B*098 との詳細な比較を行うことにより、両者に共有されかつ旧来のペプチド提示分子には見られない細胞生物学

的また構造学的特徴を明らかにした。これはヒトリポペプチド提示分子同定の重要な指標となる。加えて今後のヒトリポペプチド提示分子の機能解析に備え、トランスジェニックマウス作出の基盤構築を完了した。

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 Daisuke Morita, and Masahiko Sugita. Lipopeptides: a novel antigen repertoire presented by major histocompatibility complex class I molecules. Immunology 査読有、49 巻、2016、139-145
DOI: 10.1111/imm.12646

[学会発表] (計 2 件)

① 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、2017

② Yoko Shima, Daisuke Morita, and Masahiko Sugita. Lipopeptides and phospholipids comprise a novel antigen repertoire presented by classical MHC class I molecules. 12th International Symposium of the Institute Network、Tokyo、2017

[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]

ホームページ等

http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex_ivr/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・再生医科学研究所・
教授
研究者番号： 80333532

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし