

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370043

研究課題名（和文） HIV 変異ペプチドによる免疫逃避機構の構造基盤

研究課題名（英文） Structural basis for immune evasion mechanism of HIV peptide mutations.

研究代表者

前仲 勝実 (MAENAKA KATSUMI)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10322752

研究成果の概要（和文）：

ウイルス感染を制御する受容体は、主要組織適合性抗原(MHC)を認識するNK細胞受容体KIR群やLILR群である。本研究ではHIV変異ペプチドを提示したMHCとLILR群との複合体の低分解能結晶構造解析の結果、ペプチドの変異によるLILR結合活性への影響は低いように思われ、結合実験の結果はこれを支持した。他方、KIRについて、異なるペプチドの結合が変化する構造基盤が明らかとなってきた。

研究成果の概要（英文）：

MHC recognizing receptors expressed on natural killer cells and cytotoxic T cells, KIRs and LILRs, have a pivotal role on regulation of virus infection. The mutation of a HIV-derived peptide on MHC molecule disrupt T cell function and also inhibit NK function by increasing the binding activity of an inhibitory KIR. Here we successfully determined the structure of a LILR-MHC complex at low resolution, revealing that this complex structure is similar to the previously reported LILR-MHC complexes, LILR recognize the site far from the peptide-binding region and thus the HIV peptide mutations do not likely affect the LILR binding, supported by our binding study. On the other hand, we also determined the crystal structure of the MHC class I molecule displaying the HIV mutant peptide, which increased the KIR binding, revealing the molecular mechanism for the change of KIR binding activity.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 5,900,000 | 1,770,000 | 7,670,000 |
| 2011年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2012年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：蛋白質科学・分子免疫学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：(1)HIV (2)細胞表面受容体 (3)蛋白質 (4)蛋白質間相互作用 (5)表面プラズモン共鳴 (6)NMR解析 (7)X線結晶構造解析 (8)免疫制御

1. 研究開始当初の背景

主要組織適合性抗原(MHC)は細胞内の多様なペプチドを細胞表面に提示することにより、細胞内の異常を知らせる能力を有する。このMHCを色々な側面から認識できる免疫系細胞受容体群が存在する。申請者は、MHC認識ヒト免疫細胞表面受容体群(Killer cell Ig-like receptor (KIR)群、Leukocyte Ig-like receptor (LILR/CD85)群など)の蛋白質解析を構造と機能の両面から進めてきた。これらのレセプター群は細胞外領域が似ているにもかかわらず、細胞内ドメインの違いから活性化シグナルを伝達するものと抑制性シグナルを伝達するものが存在する。KIR受容体は約10個程度のメンバーから構成され、細胞外領域にimmunoglobulin(Ig) foldを2つあるいは3つ有する(それぞれKIR2DおよびKIR3Dと呼ぶ)。KIRメンバーにより結合するMHCの種類(アリアル)が異なることが知られ、KIR2DはHLA-Cを、KIR3DはHLA-AやHLA-Bを認識する。さらにリガンド結合部位のアミノ酸の若干の違いに起因して、活性型(KIR2DS/KIR3DS)が抑制型(KIR2DL/KIR3DL)に比べて少し親和性が低い傾向にある。他方、申請者らの研究などから、KIR群はMHCに提示されるペプチドに依存した認識を示すことがわかった(JBC 1999, JI 2007など)。しかし、多くの研究者がKIR群はアリアル特異的にMHCを認識することにしか関心を示さず、これらのペプチド依存認識とKIR群の活性型と抑制型の調節との関連は十分に解析されてこなかった。

本研究代表者はペプチドを利用した免疫細胞の制御を考えていたが、最近Oxford大学Rowland-Jones教授との共同研究から、ヒトMHCの一つであるHLA-Cに提示されるHIVペプチドの変異がT細胞受容体(TCR)と反応できなくなることによりCTLからの逃避を誘導するだけでなく、KIR2D群の認識を強め、NK細胞からの逃避に貢献することを見出し、“2重逃避機構 Dual escape model”を提唱した(AIDS 2009)。そこで、その構造基盤を理解するために、KIR2DL1とHLA-Cw4-SL9(HIVペプチド)との複合体の結晶化に成功し、精密化を進めている(未発表)。現時点ではペプチドのC末端アミノ酸のわずかな変化がKIR群との相互作用を強めていることがわかった。しかし、他のHIV由来ペプチドの変異等がKIR3DやLILR群にも同様に当てはめることができるかどうかは不明である。特にエイズ発症との遺伝的な相関が指摘され(Science 2004など)、HIV研究コンソーシアムで大変注目されているKIR3Dの立体構造解析に成功した例はない。他方、KIRと同じくMHCを認識するLILR群はペプチド結合領域を認識しないことから、ペプチド依存性はないと考えられてきた。しかし、最近米

グループが抑制型LILRB2が提示されたHIV由来ペプチド依存的にHLA-B27を認識し、申請者らの報告と同様のTCR以外の逃避機構を示唆する報告を行った(JEM 2009)。

2. 研究の目的

ウイルス感染の主たる防御は細胞傷害性T細胞(CTL)やナチュラルキラー(NK)細胞であり、これらを制御する代表的な受容体は、主要組織適合性抗原(MHC)を認識するヒトNK細胞受容体 Killer cell immunoglobulin (Ig)-like receptor (KIR)群や Leukocyte Ig-like receptor (LILR)群である。上述のように、研究代表者らはMHCに提示されるHIVペプチドの変異がCTLだけでなく、KIR群の認識に影響を与えることを見出し、“2重逃避機構 Dual escape model”を提唱した。さらに、米グループからLILR群も同様のペプチドによる影響を受けることが報告された。そこで、本研究ではHIV変異ペプチドを提示したMHCとKIR群あるいはLILR群との複合体の結晶構造解析を行い、その分子基盤を明らかにする。そこで、本研究ではKIR2DL1-HLA-Cw4の組み合わせの解析を進展させ、未だ不明であるKIR3DおよびLILR受容体のHIV由来ペプチドの機能制御の構造基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究代表者は、これまでにKIR2D群およびLILR群は大腸菌での発現系を確立済みであり、リガンドMHC分子群も大腸菌で発現、巻き戻しにより組換え蛋白質を調製できる。KIR3DL1については、同様の方法では調製できず、ヒト293細胞あるいは蚕个体を用いた発現系を用いる。本研究は以下の項目よりなる。

(1) HIV感染者から同定されたLILR群の認識に影響を与えるHLA-B27提示変異ペプチドを用いたLILRB2/HLA-B27相互作用解析と複合体の立体構造解析

(2) KIR3DL1/KIR3DS1単独およびHLA-Bとの複合体のX線結晶構造解析

(3) 他のHIVペプチドと自然変異ペプチドについてKIR/LILRに対する機能評価、立体構造解析から有効なペプチドワクチンの同定・設計の構造基盤の確立

LILR群(LILRB1, LILRB2)は大腸菌での発現系を確立済みであり、リガンドMHC分子群も大腸菌で発現、巻き戻しにより組換え蛋白質を調製できる。LILRB2の認識に影響を与えるHIV感染者から同定されたHLA-B27提示変異ペプチドを合成済みであり、相互作用解析と立体構造解析に直ちに取り組み始める状態にある。これまでにLILRB2-HLA-G複合体の結晶構造解析に成功した実績を有するので、これを踏まえて研究遂行する。

他方、KIR2D 群は LILR 群と同様に巻き戻し法で作成できるが、抑制型 KIR3DL1 と活性型 KIR3DS1 については、巻き戻しでの作成が困難であり、申請者らが実績を持つヒト 293 細胞 (PNAS 2007, JVM 2008 など) あるいは蚕個体を用いた発現系 (BBRC 2009 など) を利用する。一部のコンストラクトではすでに発現を確認している。これまでに KIR3DL1 に結合する HLA-B57 が提示するペプチドを同定し、細胞レベルでの機能評価を済ませている (JI 2007) ので、こちらの系も利用する。また、HIV 由来の HLA-Cw4 結合モチーフを有するものを HIV ゲノム配列から約 100 種類のペプチドを同定・合成し、HLA-Cw4 に優位に結合するものを簡易巻き戻し系と微量ゲルろ過解析法を組み合わせることにより HLA-Cw4 結合ペプチドを同定した。各ペプチドと KIR 受容体との結合の有無は表面プラズモン共鳴法などにより、解析を進めている。機能的な特徴のあるペプチドについては、HLA-Cw4-ペプチド複合体と KIR2DL1/KIR2DS1 レセプター群との複合体の立体構造解析を進めることが可能であるので、これも進める。

(研究計画)

本研究は以下の項目からなる。

- (1) HIV 感染者から同定された LIIR 群の認識に影響を与える HLA-B27 提示変異ペプチドを用いた LILRB2/HLA-B27 相互作用解析と複合体の立体構造解析
- (2) KIR3DL1/KIR3DS1 単独および HLA-B との複合体の X 線結晶構造解析
- (3) 他の HIV ペプチドと自然変異ペプチドについて KIR/LILR に対する機能評価、立体構造解析から有効なペプチドワクチンの同定・設計の構造基盤の確立

(1) HIV 感染者から同定された LIIR 群の認識に影響を与える HLA-B27 提示変異ペプチドを用いた LILRB2/HLA-B27 相互作用解析と複合体の立体構造解析

LILRB2 は発現及び巻き戻しの系が確立済みである。他方、リガンド HLA-B27 分子も同様に発現系と巻き戻し系を確立済みで、すぐに用いることができる。申請者は他の MHC である HLA-G と LILRB2 の複合体の結晶構造解析に成功している。現在、上述の変異 HIV ペプチドを提示させた LILRB2-HLA-B27 複合体について、針状微結晶を得て結晶化の最適化を進めつつある。結晶化条件の最適化に成功した後は、Spring8 や PF にて X 線回折データの収集を行い、分子置換法で構造決定を行う。これらの実験のうち、蛋白質の調製や結晶化には繰り返しの多いルーティーンな作業を多く含む。これには研究支援者を雇用する。また、もし結晶構造解析に成功しない場合には、NMR を用いた相互作用解析を進めることを想定している。順調に進めば、LILRB2 の HSQC スペクトルの測定を行い、HLA-B27 を混

合したときのピークシグナルの変化を測定する。

(2) 他の HIV ペプチドと自然変異ペプチドについて KIR/LILR に対する機能評価、立体構造解析から有効なペプチドワクチンの同定・設計の構造基盤の確立
HIV ゲノム配列から設計した HLA-Cw4 結合モチーフを持つ 9 アミノ酸ペプチドライブラリーから簡易巻き戻し系と微量ゲルろ過解析法を組み合わせることにより実際に HLA-Cw4 に結合するものを同定したので、各ペプチドを提示する HLA-Cw4 分子を作製し、これと KIR2DL1 (抑制型) と KIR2DS1 (活性型) との表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析法により、結合活性を解析し、結合のランク付けを決定したのに対して、このペプチドと HLA-Cw4 単体や複合体を作製し、KIR2DS1 (あるいは KIR2DL1) との複合体の構造解析に取り組み、このペプチドが活性型 KIR/抑制型 KIR の結合活性との機能-構造相関を明らかにする。上記の KIR3D 群および LILR 群の立体構造情報を加えて、分子認識データを整理統合することで、HIV 由来ペプチドワクチン候補の合理的な検索・設計方法を検討する。

4. 研究成果

変異 HIV ペプチドを提示させた LILRB2-HLA-B27 複合体について、混合比などを工夫することにより、針状微結晶を再現性よく得ることができるようになった。これを踏まえ、X 線回折データ測定を行い、条件検討を進めた。その結果、蛋白質結晶である事を確認したが、回折データを取るまでには至らなかった。今のところ、構造解析可能な結晶を得られる最適条件を見出すことができていない。複合体を遺伝子工学的に一本鎖化することや変異導入等の検討を行い、より安定な複合体を形成させる必要があることがわかった。他方、LILRB2 受容体を巻き戻し系で調製後、NMR 解析で良好な HSQC スペクトルを得るために様々な条件検討を行った結果、一部の変異導入と溶媒の組成などを工夫する事で大幅に改善する事がわかってきた。ある程度よいスペクトルデータが得られているものの、HLA-B27 を混合したときのピークシグナルの変化を測定できる条件の検討がさらに必要である。

LILR と MHC 複合体については、一つの組み合わせで低分解能ではあるが、解析に成功した。その構造はこれまで報告されている LILR-MHC 複合体と同じ様式であり、ペプチドの変異による LILR 結合活性への影響は低いように思われた。実際に結合実験の検証を行ったが、ペプチド変異による影響は見られず、構造データと合うものであった。他方、KIR と MHC については、異なるペプチドでの構造解析に成功した。C 末端

側のペプチド領域に変化が見られ、これが KIR に対する結合活性に影響を与えているように見えた。これにより結合が変化する構造基盤がある程度明らかとなってきた。

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 5 件)

1. Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson J.M, Chikata T, Brumme Z.L., Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by CTLs with Identical Epitope Specificity. *J Virol*. 2013 Feb;87(4):2253-63. (査読有)

2. Giles J, Shaw J, Piper C, Wong-Baeza I, McHugh K, Ridley A, Li D, Lenart I, Antoniou AN, Digleria K, Kuroki K, Maenaka K, Bowness P, Kollnberger S. (2012). HLA-B27 Homodimers and Free H Chains Are Stronger Ligands for Leukocyte Ig-like Receptor B2 than Classical HLA Class I. *J Immunol*. 188(12): 6184-93. (査読有)

3. Yoshida S, Mohamed RH, Kajikawa M, Koizumi J, Tanaka M, Fugo K, Otsuka N, Maenaka K, Yagita H, Chiba H, Kasahara M. (2012) Involvement of an NKG2D Ligand H60c in Epidermal Dendritic T Cell-Mediated Wound Repair. *J Immunol*. 188(8):3972-9. (査読有)

4. Kuroki K, Maenaka K. Analysis of receptor-ligand interactions by surface plasmon resonance. *Methods Mol. Biol*. 748, 83-106 (2011). (査読有)

5. Kawashima Y, Kuse N, Gatanaga H, Naruto T, Fujiwara M, Dohki S, Akahoshi T, Maenaka K, Goulder P, Oka S, Takiguchi M (2010). Long-term control of HIV-1 in hemophiliacs carrying slow-progressing allele HLA-B*5101. *J Virol*. 84, 7151-60. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. Kimiko Kuroki, Haruki Matsubara, Yoichi Watanabe, Yuko Fukunaga, Ryo Kanda, Jun Kamishikiryo, Hathairat Thananchai, Tariro Makadzange, Tao Dong, Sarah

Rowland-Jones, Toyoyuki Ose, and Katsumi Maenaka. Structural basis for immune regulation of cell surface receptors in HIV infection.

The 13th Kumamoto AIDS Seminar. Aso Resort Grandvrio Hotel (Kumamoto), October 25th, 2012.

2. 前仲 勝実、ヒト Killer cell Ig-like receptor 群の NK 細胞アロ反応性の構造基盤、第 7 1 回日本癌学会学術総会、さっぽろ芸文館 (札幌)、2012 年 9 月 20 日

3. 福原 秀雄、橋口 隆生、黒木 喜美子、尾瀬農之、前仲 勝実、機能および構造解析に向けた細胞表面蛋白質の調製法、日本蛋白質科学会・ワークショップ、名古屋国際会議場 (愛知)、2012 年 6 月 20 日

4. 前仲 勝実、表面タンパク質の不安定な複合体の分子解析、日本蛋白質科学会・ワークショップ、招待講演、ホテル阪急エキスポパーク (大阪)、2011 年 6 月 9 日

[その他]

ホームページ等

<http://convallaria.pharm.hokudai.ac.jp/bunshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前仲 勝実 (MAENAKA KATSUMI)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10322752

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし