

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07172

研究課題名(和文)「リポペプチド」を標的とした、ウイルス感染制御の新戦略

研究課題名(英文) Novel strategy of host defense targeted for "viral lipopeptides"

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はウイルスのリポタンパク質に由来する脂質修飾ペプチド(リポペプチド)を感知し、ウイルス感染細胞を排除する新しい免疫応答を発見し、リポペプチド提示分子として、新しいタイプのMHCクラス1分子群(LP1分子)を同定した(Morita et al. Nature Communications 7:10356,2016)。本研究では、ワクチン開発を目標として、リポペプチド免疫におけるT細胞認識の分子論を解明するとともに、ヒトLP1分子の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LP1分子がウイルス感染に伴い、どのようにしてウイルスリポペプチド抗原をT細胞へと提示しているのか、その分子論の詳細は不明であった。本研究によって、学術的意義として、リポペプチド免疫認識における構造学的な基盤が確立された。また、社会的意義として、リポペプチド免疫と言う新しい視点からのワクチン開発の可能性が拓かれた。同時に、ウイルス感染に伴う自己免疫疾患について、リポペプチド免疫の関連が示唆され、将来的には新しい治療法の開発へと繋がる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We have discovered the novel immune responses directly against lipopeptide antigens derived from N-myristoylated viral proteins, and identified a novel subset of MHC class I molecules as lipopeptide-presenting molecules (Morita et al. Nature Communications 7:10356,2016). In this study, we determined the molecular mechanism of lipopeptide-immune recognition by T cells and searched for human lipopeptide-presenting molecules for lipopeptide-vaccine development.

研究分野：免疫学

キーワード：MHCクラス1 リポペプチド ミリスチン酸修飾 エイズ

1. 研究開始当初の背景

免疫系は自己と非自己を識別する反応系であり、ウイルス、細菌あるいは寄生虫などの外敵から生体を守るために必須の役割を果たす。この識別に中心的役割を果たす T 細胞は MHC 分子によって提示される蛋白質断片「ペプチド」抗原を認識すると考えられてきた。このパラダイムは多くの感染症、自己免疫疾患あるいは癌免疫において、長い間、免疫研究の主流をなしてきた(図 1 左)。

これに対して、脂質化されたウイルスペプチド「リポペプチド」を特異的に認識し、応答する T 細胞群が存在する(図 1 右)。例えばヒト/サル免疫不全ウイルス (HIV/SIV) Nef 蛋白質は宿主細胞の反応系を利用して、脂質による修飾(ミリスチン酸修飾)を受けることで、その免疫抑制蛋白質としての機能を発揮する。研究代表者はサルエイズモデルを用いた独自の免疫解析から、このようなリポ蛋白質に由来するリポペプチドを結合し、細胞傷害性 T 細胞へと提示する抗原提示分子として、新しいタイプの MHC クラス 1 分子「LP1」を同定した。しかしながら、ヒトにおけるリポペプチド免疫応答の役割と臨床的意義については不明であった。

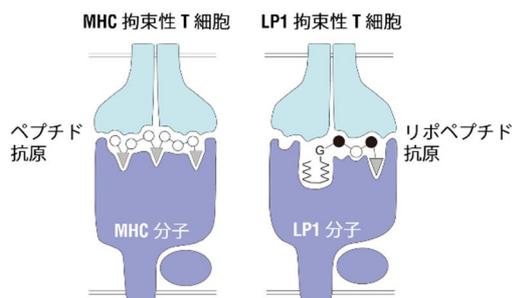


図 1

2. 研究の目的

本研究では、新しい抗原レパートリーであるリポペプチドについて、ワクチン開発を目標とした学術基盤の構築を行うことを目的とした。具体的には、1) リポペプチド免疫における T 細胞認識の分子論を明らかにすること、2) リポペプチドを提示するヒト MHC クラス 1 分子群(ヒト LP1)を同定し、その構造を解き明かすこと、この 2 点を目標とした。

3. 研究の方法

1) X 線結晶構造解析

MHC クラス 1 あるいは T 細胞受容体の細胞外領域を 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。各インクルージョンボディーをバッファーシステムの中で適切なリガンド存在下にリフォールディングさせ、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た。次いで、Superdex200 Increase カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィー及び monoQ カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供することで、高純度に精製した。それぞれの蛋白質について、スクリーニングキットを使って、結晶化条件を決定した。測定は理化学研究所 SPring-8 にて行い、分子置換によって位相を決定し、分子モデルを構築した。

2) LP1 内在性リガンドの決定

代表的なアカゲザル LP1 である Mamu-B*098 の細胞外ドメインにヒト IgG Fc 領域を融合させることで分泌蛋白質の形で発現するコンストラクトを構築した。これを Expi293F 細胞に発現させ、protein G カラムを用いて Mamu-B*098-Fc リコンビナント蛋白質を培養上清から精製した。結合リガンドを酸性メタノールにて抽出し、逆相カラムでの LC-MS/MS 解析に供した。

4. 研究成果

1) リポペプチド免疫における T 細胞認識の分子論

リポペプチド特異的 T 細胞の代表例として SIV nef 4-mer リポペプチドを認識する SN45 T 細胞に着目した。まず、その抗原提示分子を同定するため、SN45 T 細胞を活性化できる個体から MHC クラス 1 分子を網羅的にクローニングした。その中から SN45 T 細胞を活性化できるクローンとして、Mamu-B*05104 を同定し、その X 線結晶構造を決定した(Yamamoto et al. J. Immunol. 2019)。

次に、SN45 T 細胞受容体と nef リポペプチド結合 Mamu-B*05104 との複合体の X 線結晶構造解析を行った。SN45 T 細胞はリポペプチドのアシル鎖とペプチドとの境界領域を主に認識していた。一方で、ペプチド部分と T 細胞受容体との直接的な相互作用は間接されなかった(Morita et al. Int. Immunol. 2020, 図 2)。

さらに、健常細胞における LP1 分子の内在性リガンドを決定するため、可溶性 LP1 分子を細胞から調製し、結合リガンドを質量分析に供した。得られた特異的シグナルから、自己リゾリン脂質が候補として選抜された。標品との比較検討から、それらのシグナルが確かにリゾリン脂質であることを確かめた。さらに、LP1:リゾリン脂質複合体の結晶構造を解き明かし、真にリガンドであることを実証した(Shima et al. JBC 2020)。

以上から、健常細胞においてリポペプチド提示分子 LP1 は自己リゾリン脂質を結合する一方で、ウイルス感染細胞においてはウイルスリポペプチドを結合して発現し、これが目印となって細胞傷害性 T 細胞が活性化すると考えられた。また、リポペプチド特異的 T 細胞による自己と非自己の識別は理論上、困難であることから、リポペプチド免疫をトリガーとする自己免疫疾患の存在が示唆された。

3) ヒト LP1 の同定と構造解析

アカゲザル LP1 分子群の高解像度 X 線結晶構造解析から、古典的 MHC クラス 1 分子とは対照的に、LP1 分子が有するアシル鎖を収納する抗原結合ポケットは、多数の疎水性アミノ酸が集中し、また空間的容積が顕著に大きいという特質を備えていた。そこで、MHC 分子のアミノ酸配列データベース (European Bioinformatics Institute) に登録されている 1 万種類に及ぶヒト MHC (HLA) クラス 1 分子の中から、上記の性質に合致すると考えられたアリル群を抽出し、リポペプチド存在下にリフォールディングさせ、ゲル濾過クロマトグラフィーによって検証した。最終的に、2 種類のヒト LP1 候補を選抜した。これらのアリルについて、リポペプチドとの複合体の高解像度 X 線結晶構造を解明し、高い結合能があることを実証した。ヒト LP1 の Tg マウス樹立を進めており、リポペプチドワクチン開発に向けた動物モデルの確立が期待される。

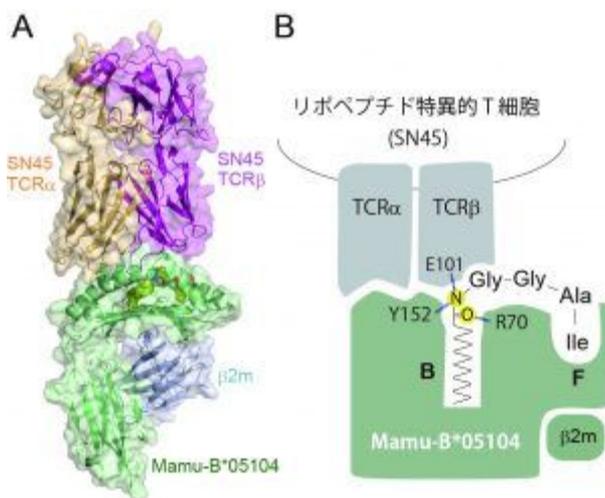


図 2

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 0件）

1. 著者名 Yamamoto Yukie, Morita Daisuke, Shima Yoko, Midorikawa Akihiro, Mizutani Tatsuaki, Suzuki Juri, Mori Naoki, Shiina Takashi, Inoko Hidetoshi, Tanaka Yoshimasa, Mikami Bunzo, Sugita Masahiko	4. 巻 202
2. 論文標題 Identification and Structure of an MHC Class I?Encoded Protein with the Potential to Present N-Myristoylated 4-mer Peptides to T Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3349 ~ 3358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900087	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 Shima Yoko, Morita Daisuke, Mizutani Tatsuaki, Mori Naoki, Mikami Bunzo, Sugita Masahiko	4. 巻 in press
2. 論文標題 Crystal structures of lysophospholipid-bound MHC class I molecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011932	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 Morita Daisuke, Iwashita Chieri, Mizutani Tatsuaki, Mori Naoki, Mikami Bunzo, Sugita Masahiko	4. 巻 32
2. 論文標題 Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 805 ~ 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa050	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田大輔、嶋 耀子、杉田 昌彦
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第29回 日本生体防御学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋 燿子、森田大輔、杉田 昌彦
2. 発表標題 リポペプチドを提示する MHC class I 分子の内因性リガンドの同定
3. 学会等名 第29回 日本生体防御学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Morita, Chieri Iwashita, and Masahiko Sugita
2. 発表標題 T-cell recognition of the lipopeptide-bound MHC class I complex; evidence from the crystal structure
3. 学会等名 The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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