

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19563

研究課題名（和文）ヒトリポペプチド提示分子の同定～ウイルス感染と自己免疫の新機序解明を目指して～

研究課題名（英文）Novel functions of human lipopeptide immunity in viral infection and autoimmunity

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルスタンパク質の一部は脂質修飾（N-ミリスチル化）を受けることによりその病原的機能を発揮する。一方宿主は、このN-ミリスチル化タンパク質に起因するリポペプチドを標的とした細胞傷害性T細胞応答を惹起することが明らかとなりつつある。本研究において、アカゲザルリポペプチド提示分子を同定し、その結晶構造を明らかにした。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を同定しつつある。これらの知見は、ウイルス感染制御や自己免疫の新しい理解に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、アカゲザルならびにヒトにおけるリポペプチド提示分子の存在と機能が解明され、ウイルスリポペプチドに対する新しい細胞傷害性T細胞応答の分子機構が明らかとなりつつある。さらに、この免疫応答を再構築した小動物モデルが確立されようとしている。これらの研究成果は、今後リポペプチドワクチンという新しいタイプのワクチン開発に向けた学術的基盤の構築に寄与するとともに、社会への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Some viral proteins undergo lipid modification termed N-myristoylation to dictate their pathological function. On the other hand, host cytotoxic T-lymphocytes recognize lipopeptides derived from N-myristoylated viral proteins, thereby detecting virus-infected cells and eliminating them. In this study, we identified lipopeptide-presenting molecules in rhesus macaques and determined their fine structure. Based on these structural information, we further identified human lipopeptide-presenting molecules. These findings will advance our understanding of how virus infections are controlled and how autoimmune disorders may be elicited.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ウイルス 免疫 ワクチン 細胞傷害性T細胞 リポペプチド MHC

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスタンパク質の一部はそのN末端にミリスチル化シグナル (Gly-X-X-Ser/Thr) を有し、宿主のN-ミリスチルトランスフェラーゼの作用によりN末端グリシン残基のミリスチル化を受ける。ウイルスタンパク質のミリスチル化は、その機能発現に重要な役割を担い、多くの場合ウイルスの病原性と深く関連する。一方、アカゲザルエイズモデルを用いた研究代表者の研究から、N-ミリスチル化を受けたSIV Nef タンパク質のN末端リポペプチド断片を標的とした細胞傷害性T細胞応答の存在が明らかになった。アカゲザル末梢血より樹立されたCD8陽性T細胞株2N5.1は、N-ミリスチル化を受けたNef タンパク質のN末端5-mer リポペプチド (C14nef5) を認識した。このリポペプチド特異的T細胞応答を阻害するモノクローナル抗体を樹立し、その抗体が認識する抗原がアカゲザルMHCクラス1分子であることがわかった。すなわち、MHCクラス1分子がリポペプチド提示分子として機能する可能性が示唆された。そこで2N5.1 T細胞株に対してC14nef5 リポペプチドを抗原提示できる複数の個体と抗原提示ができない複数の個体を同定し、それぞれの個体が有するMHCクラス1アリルを決定した。その結果、Mamu-B\*098 アリルが前者のグループにのみ共通に存在し、後者のグループには存在しないことがわかった。Mamu-B\*098 をサル上皮細胞株に強制発現させることにより、C14nef5 リポペプチドの2N5.1 T細胞株への抗原提示能を賦与できることが証明され、Mamu-B\*098 がリポペプチド抗原提示分子として機能することが明らかとなった。C14nef5 リポペプチドを結合したMamu-B\*098 複合体のX線結晶構造の解析から、リポペプチドのミリスチン酸部分は抗原結合溝に構築された深く疎水性のBポケットに収納されることがわかった。このBポケット構造は、ペプチドを結合する従来のMHCクラス1分子にはほとんど見られない特徴であった。

第二のリポペプチド認識CD8陽性T細胞株SN45はすでに2013年に報告されていた。研究開始時点において、SN45はN-ミリスチル化を受けたNef タンパク質のN末端4-mer リポペプチド (C14nef4) を認識し、その拘束因子としてMamu-B\*05104 が絞り込まれていた。そこでC14nef4 リポペプチドを結合したMamu-B\*05104 複合体のX線結晶構造を解明することにより、Mamu-B\*098 と共通したリポペプチド提示分子に固有の構造学的特徴が明らかとなり、その構造情報を起点としてヒトリポペプチド提示分子を同定できる可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) 第二のアカゲザルリポペプチド提示MHCクラス1アリルMamu-B\*05104に着目し、Mamu-B\*05104 / C14nef4 リポペプチド複合体のX線結晶構造を明らかにする。さらに、すでに得られているMamu-B\*098 / C14nef5 複合体の結晶構造と合わせ、リポペプチド提示分子に固有の構造学的特徴を見出す。

(2) (1)で得られたアカゲザルリポペプチド提示分子の構造情報をもとに、ヒトリポペプチド提示分子を同定し、その構造と機能を明らかにする。

### 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薬剤選択ののち、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 (IL-2) をELISAで測定することにより評価した。

#### (2) リコンビナントMamu-B\*05104タンパク質の調製、結晶化およびX線結晶構造解析

Mamu-B\*05104のエクトドメインをコードする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存在下での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C14nef4 リポペプチド存在下でリコンビナントMamu-B\*05104重鎖とベータ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、ゲル濾過 (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) および陰イオン交換樹脂 (monoQ) 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促進した。生成し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。収集したデータをもとにMamu-B\*098 / C14nef5 リポペプチド複合体の結晶構造をモデルとして分子置換を行い、Mamu-B\*05104 / C14nef4 リポペプチド複合体の結晶構造を決定した。

#### (3) リポペプチドを結合するHLAクラス1アリルの同定

リポペプチド結合分子候補として選択したヒトHLA-Cアリル (LP1cと表記する) およびHLA-B27アリル (陽性コントロール) について、Mamu-B\*05104の場合と同様、エクトドメインをコードするcDNAを単離し、発現ベクターに組み込んだのち、大腸菌を用いてリコンビナントタンパ

ク質の大量発現を行った。大腸菌 inclusion body より調製したリコンビナントタンパク質を 6M グアニジン塩酸を用いて溶解し、モデルリポペプチド (C14-GAAL) あるいは既知の HLA-B27 結合ペプチドの存在下また非存在下において、リコンビナント MHC クラス 1 重鎖とベータ 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。三量体の形成は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより検出した。さらに Mamu-B\*05104 と同様の方法で結晶化を行い、X 線結晶構造の解析を進めた。

#### (4) 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 LP1c 重鎖アルファ 1, アルファ 2 ドメインをコードする cDNA 配列を挿入し、さらにその下流にはマウス MHC クラス 1 (H2-Kb) 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連結した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。トランスジーンのゲノムへの挿入は、ゲノム遺伝子を鋳型とした特異的 PCR により確認した。

#### (5) 動物実験

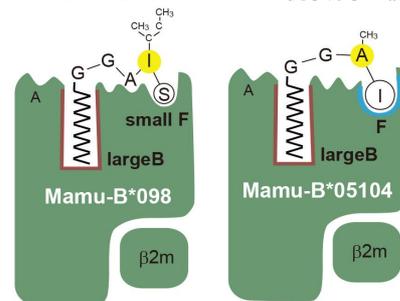
遺伝子改変マウスの樹立と解析ならびにアカゲザル検体を用いた実験は、法令ならびに学内規則に則り、当該委員会の承認を得て行った。

### 4. 研究成果

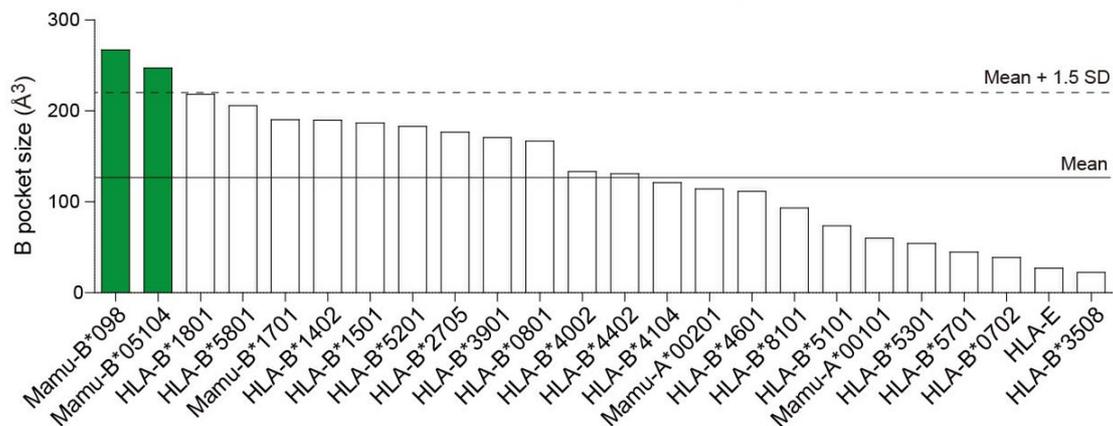
#### (1) Mamu-B\*05104 / C14nef4 複合体の X 線結晶構造

遺伝学的解析から、SN45 T 細胞に C14nef4 を提示するリポペプチド提示分子候補として Mamu-B\*05104, Mamu-B\*06004, Mamu-B11L\*01 の 3 アリルが絞り込まれた。そこでこれらを一過性に発現した HeLa 細胞と J.RT3/SN45 T 細胞を C14nef4 リポペプチド存在下あるいは非存在下で培養し、T 細胞の活性化を IL-2 産生を指標にモニターしたところ、Mamu-B\*05104 発現細胞と C14nef4 リポペプチドが共存する場合のみ、T 細胞の活性化が確認された。また T 細胞受容体を再構築していない J.RT3 は同様の条件でも IL-2 産生を認めなかったことから、この応答は T 細胞受容体を介したものであることが示された。これらの結果から、Mamu-B\*05104 が C14nef4 リポペプチドを結合し、SN45 T 細胞に提示するリポペプチド抗原提示分子として機能する可能性がさらに強まった。これまで 4-mer リポペプチドと MHC クラス 1 分子の結合様式は解明されていない。そこで C14nef4 リポペプチドを結合した Mamu-B\*05104 エクトドメイン/ベータ 2 ミクログロブリン複合体の結晶を調製し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、1.8 Å の解像度で構造を解くことができた。Mamu-B\*05104 の全体構造は他の MHC クラス 1 分子の構造とほとんど相違はなく、アルファ 1 ヘリックスとアルファ 2 ヘリックスの間隙には A から F までの 6 つのポケット構造を有する抗原結合溝が存在し、そこには C14nef4 に相当する電子マップを明瞭に確認できた。C14nef4 リポペプチドの両末端構造がアンカーとして機能し、ミリストイル基は抗原結合溝の B ポケットに、また C 末端イソロイシン残基が F ポケットに収納されていた (右図)。ミリストイル基を収納する B ポケットは、Mamu-B\*098 の B ポケットと同様、その内面が疎水性あるいは電荷を持たないアミノ酸残基で覆われており、ミリストイル基と多数のファンデルワールス力を形成することにより安定的にミリストイル基を収納していた。また、Mamu-B\*05104 は Mamu-B\*098 とともに、MHC クラス 1 分子としては例外的に大きなサイズの B ポケットを有することが明らかとなった (下図)。

明らかになった2つのリポペプチド提示分子の構造



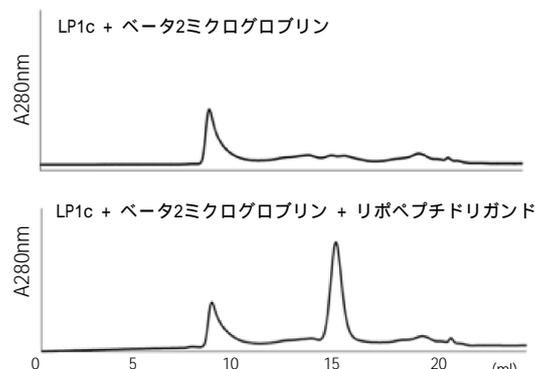
各MHC class 1 アリルにおけるBポケットの大きさ



## (2) ヒトリポペプチド結合分子ヒト LP1c の同定

上述のように、アカゲザルにおいて複数のリポペプチド提示分子が同定されその構造が解明されたことにより、リポペプチド提示能力を有する MHC クラス 1 分子に固有の特徴が明らかとなってきた。基本的に N 末端から 2 番目のアミノ酸残基を B ポケットに収納する従来のペプチド提示 MHC クラス 1 分子と異なり、ミリスチル基の収納には比較的大きな B ポケット構造が必要である。そこでまず、B ポケットのサイズを規定する B ポケット内面のアミノ酸群に着目し、比較的側鎖の小さいアミノ酸を有する HLA クラス 1 分子を抽出した。それぞれの重鎖エクドメインのリコンビナントタンパク質を調整し、リコンビナントベータ 2 ミクログロブリンとリガンドの存在下で巻き戻しを行った。HLA-B27 と特異的ペプチドリガンドを用いた事前のゲル濾過解析から、重鎖、ベータ 2 ミクログロブリン、リガンドの三量体は約 15 分の溶出時間で溶出されることがわかっていたので、その出現を指標に三量体形成をモニターした。その結果、LP1c 重鎖とベータ 2 ミクログロブリンはリポペプチドリガンド (C14-GAAL) の存在下で三量体を形成する可能性が強く示唆された。

現在、この三量体の X 線結晶構造の解明に成功し、抗原結合溝に結合したリポペプチドリガンドを確認している。したがって LP1c がリポペプチド結合分子として機能することがわかった。さらに LP1c が実際に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、LP1c を発現するトランスジェニックマウスの作製に着手し、産仔マウスのゲノムへのトランスジーン挿入を確認した。今後、このマウスにおける LP1c タンパク質の発現を確認するとともに、リポペプチド特異的 LP1c 拘束性 T 細胞の存在を実証することにより、LP1c のリポペプチド提示機能を検証する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Y, Morita D, Shima Y, Midorikawa A, Mizutani T, Suzuki J, Mori N, Shiina T, Inoko H, Tanaka Y, Mikami B, Sugita M.	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 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 Y, Morita D, Mizutani T, Mori N, Mikami B, Sugita M.	4. 巻 295
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 6983-6991
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0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総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 嶋耀子、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 class 1 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～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 杉田研究室  
[https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex\\_ivr/Lab/SugitaLab.html](https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex_ivr/Lab/SugitaLab.html)

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
--	---------------------------	-----------------------	----