

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21615

研究課題名(和文) リポペプチド提示HLAクラスI分子の同定～感染防御と自己免疫の新機序解明へ～

研究課題名(英文) Identification of HLA class I molecules with the capacity of mediating lipopeptide presentation

研究代表者

杉田 昌彦 (Sugita, Masahiko)

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：80333532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答の主要な標的はペプチドであると考えられている。一方研究代表者は、アカゲザルエイズモデルの詳細な解析をもとに、脂質修飾を受けたウイルスタンパク質の断片すなわちリポペプチドが細胞傷害性T細胞の標的となることを見出し、この免疫応答の起点となるアカゲザルリポペプチド提示分子を同定した。しかし、ヒトにおけるリポペプチド免疫応答の存在や分子機構は不明であった。本研究課題において、リポペプチドを結合するHLAクラスI分子HLA-A\*24:02を同定し、そのX線結晶構造の解明した。さらに個体レベルでの免疫解析を目途として、HLA-A\*24:02を発現した遺伝子改変マウスを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人が持つHLAタイプのうち、保有率が高いHLA-A\*24:02がペプチドだけでなくリポペプチドを結合することを明らかにし、その分子構造基盤を解明した。さらにHLA-A\*24:02を発現した遺伝子改変マウスの樹立に成功し、今後のリポペプチド特異的T細胞応答や新たなリポペプチドワクチン開発に有用な小動物モデルを確立した。ウイルスタンパク質の脂質修飾は病原性と深く関わっており、この化学反応を検知する「リポペプチド免疫」の理解がさらに進めば、ウイルス感染制御に向けた新たな戦略が構築できる。また「リポペプチド免疫」を切り口としたヒト自己免疫病の理解と制御にも貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is generally accepted that peptides comprise a major antigen repertoire targeted by the immune system. By taking advantage of a rhesus model of human AIDS, this principal investigator previously identified immune responses directed against lipopeptides that were derived from lipid-modified viral proteins. However, it remained unknown whether such immune responses may exist in humans. In this research project, the principal investigator demonstrated that HLA-A\*24:02 exhibited a previously unrecognized ability to bind lipopeptide ligands and determined a molecular principle for lipopeptide binding by the use of X-ray crystallography. Furthermore, HLA-A\*24:02-expressing transgenic mice were established, which would be valuable for in vivo analysis of HLA-A\*24:02-dependent, lipopeptide-specific immune responses.

研究分野：感染免疫学

キーワード：HLA リポペプチド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

MHCクラスI分子は、重鎖とベータ2ミクログロブリンが非共有的に結合したヘテロ二量体に8-merから11-merのペプチドリガンドが結合して安定複合体(三量体)を形成する。健常細胞においては、自己タンパク質由来のペプチドが小胞体膜に存在するABCトランスポーター(TAP1/2複合体)を介して細胞質から小胞体内腔に輸送され、小胞体内腔で安定三量体を形成したのち細胞表面に出す。MHCクラスI分子の発現レベルは細胞の健常性の指標となり、発現レベルの低下した異常細胞はNK細胞により検知され、排除される。一方ウイルス感染細胞においては、多くの場合、ウイルスタンパク質分解に起因する非自己ペプチドがTAP依存的に小胞体内腔に到達し、ウイルスペプチドを結合したMHCクラスI分子が形成され、細胞表面に出す。非自己ペプチドの出はMHCクラスI拘束性にウイルスペプチドを特異的に認識するclonotypicなアルファベータT細胞受容体(TCR)を発現したCD8陽性細胞傷害性T細胞によって検知され、感染細胞は排除される。したがって、MHCクラスI分子の発現レベルの維持やそれが結合するリガンドレパトアの構築は生体のホメオスタシスの観点から重要な生物学的意義を有する。

MHCクラスI分子を介したペプチド抗原提示機構は近代免疫学が確立した中心的パラダイムの一つであり、感染免疫、がん免疫、自己免疫の病態の理解とともにワクチン開発を促進させてきた。しかしながら近年、アカゲザルエイズモデルにおいてリポペプチドを標的としたMHCクラスI拘束性細胞傷害性T細胞応答の存在が実証されたことから、この免疫パラダイムには修正が必要な可能性が生じてきた。サル免疫不全ウイルス(SIV) Nefタンパク質は、そのN末端グリシン残基にC14直鎖脂肪酸(ミリスチン酸)が結合することにより膜にアンカーし、その免疫抑制機能を発揮する。他方、アカゲザル免疫系は、このSIV病原性に関与する脂質修飾反応を検知し、リポペプチド特異的T細胞応答を誘起する。アカゲザル末梢血より樹立されたT細胞株の解析から、アカゲザルMHC(Mamu)クラスI分子群のうち、Mamu-B\*098アロモルフはミリストイル化Nef 5-merリポペプチド(Myrr-GGAIS)を結合し、これを特異的に認識するTCRを発現したCD8陽性T細胞株(2N5.1)を活性化することが示された。また、Mamu-B\*05104アロモルフはミリストイル化Nef 4-merリポペプチド(Myrr-GGAI)を結合し、これを特異的に認識するTCRを発現したCD8陽性T細胞株(SN45)を活性化した。これらの事例は、進化の過程で高度な多型性を獲得したアカゲザルMHCに限定された事象なのか、あるいはヒトを含む他の哺乳動物にも同等の免疫応答が存在することを暗示しているのか、答えが出されていない。

Mamu-B\*098 : Myrr-GGAIS 複合体および Mamu-B\*05104 : Myrr-GGAI 複合体のX線結晶構造解析から、リポペプチドを結合するMHCクラスI分子群の構造学的特徴を垣間見ることができる。従来のペプチド結合MHCクラスI分子においては、抗原結合溝に構築された6つのポケット構造(A-Fポケット)のうち、AポケットにはN末端アミノ酸残基(P1)、Bポケットには2番目のアミノ酸残基(P2)、FポケットにはC末端アミノ酸残基(P $\Omega$ )が収納される。他方、リポペプチド結合Mamu分子は、ともにAポケットは空であり、Bポケットにはミリスチン酸が、またFポケットにはP $\Omega$ が収納される。したがって、リポペプチドを結合するMHCクラスI分子は、P2アミノ酸よりサイズが大きく疎水性の高いミリスチン酸を結合するBポケットを保有することが必要条件となる。本研究課題においては、これらの学術的背景に鑑み、Bポケットの構造に着眼して、リポペプチドを結合するヒトMHC(HLA)クラスI分子の同定を目指した研究を推進した。

### 2. 研究の目的

本研究のSpecific aimsは以下の3点に集約される。

- (1) 既知のアカゲザルリポペプチド提示MHCクラスI分子の構造情報をもとに、ヒトリポペプチド結合HLAクラスI分子を同定する。
- (2) (1)で同定したヒトリポペプチド結合HLAクラスI分子のリポペプチド抗原提示能力を検証するため、ヒトリポペプチド結合HLAクラスI分子を発現した遺伝子改変マウスを樹立する。
- (3) リポペプチド抗原のT細胞エピトープを検討し、自己リポペプチドと非自己リポペプチドの免疫識別の成立基盤を解析する。

### 3. 研究の方法

- (1) HLA-A\*24:02重鎖およびベータ2ミクログロブリンリコンビナントタンパク質の調製

N末にアラニンを加したHLA-A\*24:02重鎖エクストドメインおよびベータ2ミクログロブリンについて、大腸菌レアカドンに配慮して遺伝子配列をデザインし、発現ベクター(pET-21c(+))に組み込んだ。また、部位特異的変異導入により、9番目のアミノ酸がセリンからチロシンに置換されたHLA-A\*24:02重鎖(すなわちHLA-A\*24:50)をコードする遺伝子配列を得た。大腸菌

Rosetta2 (DE3) pLysS 株に各プラスミド遺伝子を導入し、アンピシリン含有 LB 培地において形質転換株を得た。IPTG 存在下でタンパク質発現誘導を行なったのち菌を回収し、常法にしたがってリゾチーム処理と界面活性剤 (CHAPS, デオキシコール酸) による溶解、DNaseI 処理を行なった。遠心により回収した inclusion body 粗画分に対して、界面活性剤を含む洗浄液による洗浄操作を行い、6 M グアニジン塩酸含有溶液で溶解した。さらに遠心により不溶画分を除去し、DTT による還元操作を行なったのち、実験使用直前まで凍結保管した。

### (2) リガンド依存的 HLA-A\*24:02 三量体形成の誘導ならびにその精製と結晶化

上記により調整した HLA-A\*24:02 重鎖およびベータ 2 ミクログロブリンリコンビナントタンパク質各 1  $\mu\text{mol}$  (30 mL) シリンジに充填し、5  $\mu\text{mol}$  のリガンドを含む 1L のリフォルディングバッファー (0.5 M L-アルギニン塩酸塩、100 mM Tris-HCl (pH8.3)、5 mM 還元型グルタチオン、0.5 mM 酸化型グルタチオン、2 mM EDTA  $\cdot$  2Na (pH8.0)) に対して一気に注入し、攪拌した。2 日後リフォルディング溶液を回収し、段階的に透析を行なってグアニジンを除去した。陰イオン交換樹脂 (TOYOPEARL DEAE-650M) を添加し、洗浄を行なったのち、1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.0) に対してタンパク質溶出操作を行なった。ゲルろ過カラム Superdex200 Increase 10/300GL (GE Healthcare) を用い、紫外波長 280 nm で吸光度を測定して三量体溶出フラクションを同定、分取し、透析および脱塩操作を行なった。さらに陰イオン交換カラム MonoQ (GE Healthcare) に吸着させ、溶出液の NaCl 濃度を連続的に上げることにより、イオン交換クロマトグラフィーを実施した。回収した三量体溶出フラクションに対し透析を行い、バッファーを 10 mM Tris-HCl pH 8.0 に置換した。三量体の結晶化は、蒸気拡散法のうちシッティングドロップ法を採用し、4°C あるいは 20°C で行なった。最適の条件で得られた結晶に対して SPring-8 ビームライン I (BL26B1) の X 線照射を行い、X 線回折データを収集した。データバンクに登録されたペプチド結合 HLA-A\*24:02 複合体の結晶構造 (PDB ID: 3VXN) を基に分子置換法により位相を決定し、さらに WinCoot CCP4 ソフトウェアと Phenix ソフトウェアを用いたモデル構築と構造精密化を行なった。

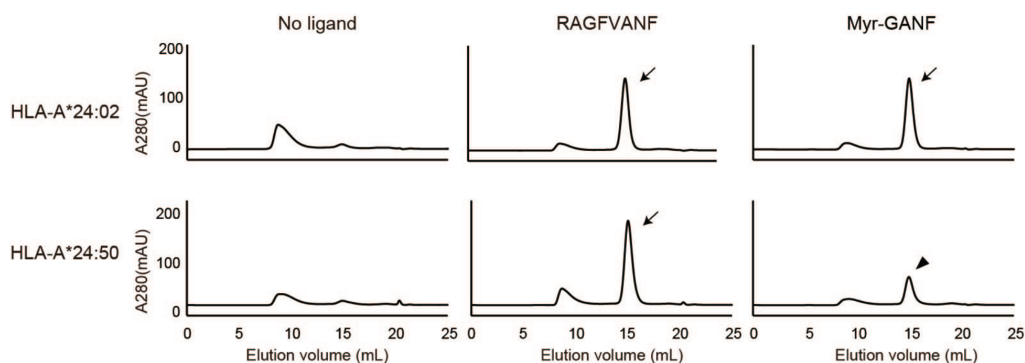
### (3) HLA-A\*24:02 トランスジェニックマウス (Tg) の樹立

マウス内因性 H-2Kb プロモーター下流に HLA-A\*24:02 重鎖のアルファ 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 H-2Kb 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。トランスジーン断片を精製し、マウス受精卵前核に注入して仔を得た。トランスジーンのゲノムへの挿入は、ゲノム A\*2402 トランスジェニック遺伝子を鋳型とした特異的 PCR により確認した。さらに TAP1 欠損マウスとの交配を進め、HLA-A\*24:02 Tg/TAP KO マウスを樹立した。遺伝子改変マウスの樹立と解析は、関連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なった。

## 4. 研究成果

### (1) リポペプチド結合分子 HLA-A\*24:02 の同定と構造決定

MHC クラス I 分子の抗原結合溝を構成する 6 つのポケット構造のうち、B ポケットは最も多様性に富み、アロモルフ特異的なリガンドレパトアの構築に深く関与する。前述のように、もし B ポケットがミリスチン酸を収納できるとすれば、典型的な MHC クラス I 分子の B ポケットとは異なる深い構造が必要となることから、本研究において B ポケット底部に存在し B ポケットの深さを規定する 9 番目のアミノ酸残基に着目したアプローチを採用した。実際、この部位のコンセンサスアミノ酸はチロシン (Tyr9) であるのに対し、アカゲザルリポペプチド提示分子は側鎖の小さなアミノ酸 (Mamu-B\*098 においては Ser9、Mamu-B\*05104 においては Gly9) が配置されていた。HLA データベースの探索から、ヒト HLA クラス I アロモルフにおいて Gly9 を有するものは存在しないが、日本人における保有率が高い HLA-A\*24:02 を含め Ser9 を有するものは少数存在することがわかった。そこで 3-(2) で記した方法により HLA-A\*24:02 のリガンド依存的な安定複合体形成能を検証した (下図、詳細は引用文献①を参照)。

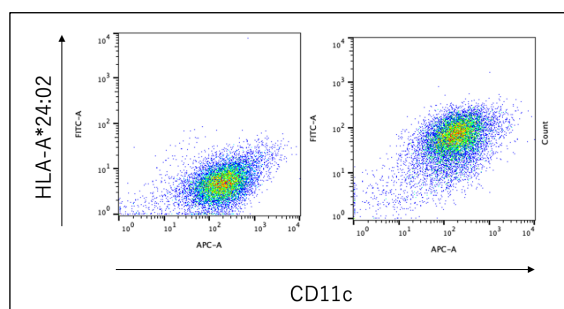


HLA-A\*24:02 は、リガンド非存在下では安定的複合体を形成しないが、ペプチドリガンド (RAGFVANF) 存在下で安定的複合体を形成し、溶出量 15 mL において相当するシグナルピークを形成した (上段中央パネル、矢印)。同様にリポペプチド (Myr-GANF) 存在下においても同等のシグナルピークを検出したことから、リポペプチドが機能的リガンドとして機能することが示唆された。他方、HLA-A\*24:02 の Ser9Tyr 変異体に相当する HLA-A\*24:50 においては、ペプチドに比してリポペプチドによる複合体形成誘導能が顕著に低下していた (下段右パネル、矢じり)。したがって、HLA-A\*24:02 はペプチドだけでなくリポペプチド結合能を有し、その能力は Ser9 により制御されていると推察した。このことを実証するため、Myr-GANF 結合 HLA-A\*24:02 複合体の X 線結晶構造を解析し、抗原結合溝においてリポペプチドリガンドを検出した。また Ser9 は B ポケット底部に存在し、構築された深い B ポケットにおいてミリスチン酸が収納されることを確認した。

リポペプチドのみを結合しペプチドを結合しないと考えられているアカゲザルリポペプチド提示分子 (Mamu-B\*098, Mamu-B\*05104) と異なり、HLA-A\*24:02 はペプチドとリポペプチドをともに結合することができる。このことは、HLA-A\*24:02 の B ポケットが物性の異なる 2 つのアンカー残基、すなわち P2 アミノ酸とミリスチン酸を結合する構造を有することを示唆した。この基盤となるメカニズムを解明するため、ペプチド結合 HLA-A\*24:02 とリポペプチド結合 HLA-A\*24:02 の構造を詳細に解析した。その結果、アンカー残基の種類に応じて、B ポケットを構成する一部のアミノ酸残基 (Ser9, His70) を介した水素結合ネットワークが再編され、B ポケット構造がそれぞれのリガンド結合に適した形へとリモデリングされることが明らかとなった。この機構は、免疫系が抗原提示分子のアミノ酸変異を介することなくリガンドレパトアを拡大する有効な手段と考えられた。

## (2) HLA-A\*24:02 を発現する Tg マウスの樹立と解析

HLA-A\*24:02 のリポペプチド提示能を個体レベルで検証するためには、HLA-A\*24:02 Tg マウスが有用である。リポペプチド特異的 T 細胞集団の検証やリポペプチドワクチンの開発を含めた今後の研究展開を考慮して、その作出に着手した。3-(2) に示した通り、Tg マウスの作出に成功し、脾臓細胞や骨髄由来樹状細胞 (右図、左パネル non-Tg、右パネル Tg) を用いたフローサイトメトリー解析において、期待したレベルの HLA-A\*24:02 分子の発現を検出した。



また TAP KO マウスとの交配も順調に進み、その細胞表面発現において TAP 機能を必要としないアカゲザルリポペプチド提示分子 (Mamu-B\*098, Mamu-B\*05104) とは異なり、HLA-A\*24:02 の細胞表面発現は TAP 機能に深く依存することを明らかにした。

## (3) 自己・非自己リポペプチド識別の分子機構に関する考察

上述の Myr-GGAI リポペプチド特異的 Mamu-B\*05104 拘束性 SN45 T 細胞株の解析から、clonotypic なアルファベータ TCR によるリポペプチド認識の標的エピトープはペプチドと脂肪酸をつなぐ Myr-Gly1 アミド結合であることが明らかになっている。この要素は自己・非自己由来のリポペプチドに共通の構造でありことから、自己・非自己リポペプチド識別の機構を説明できていない。その手がかりを得るためにリポペプチドアナログの抗原活性を検証したところ、Myr-GGSI は Myr-GGAI に比して 10 倍高い抗原活性を有することを見出した。そこで SN45 TCR と Myr-GGSI 結合 Mamu-B\*05104 の共結晶構造を解析したところ、Myr-Gly1 アミド結合に加えて 3 番目のセリン残基の側鎖にある水酸基が TCR ベータ鎖と水素結合を形成することが判明した (未発表)。すなわちペプチド部分のアミノ酸配列がリポペプチドの特異的認識における combinatorial なエピトープを形成し、自己・非自己識別の確度を高めている可能性が考えられた。一方、分子論的考察から 2 番目のアミノ酸残基は直接的な T 細胞エピトープとはならないものの、Myr-Gly1 アミド結合の空間配置を制御し、ここに自由度の高い二面角ファイを有するグリシンを配置できるか否かがリポペプチド認識に重要であるが明らかとなった。このように直接的な T 細胞エピトープとはならないものの抗原リガンドの可塑性と抗原性を制御するような残基を non-epitopic residues affecting ligand plasticity and antigenicity (NR-PA) と呼称することを提唱した (詳細は引用文献②を参照)。

### <引用文献>

① Asa M, Morita D, Kuroha J, Mizutani T, Mori N, Mikami B, Sugita M. Crystal structures of N-myristoylated lipopeptide-bound HLA class I complexes indicate reorganization of B-pocket architecture upon ligand binding. J Biol Chem. 2022;298(7):102100. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102100.

© Morita D, Asa M, Sugita M. Engagement with the TCR induces plasticity in antigenic ligands bound to MHC class I and CD1 molecules. *Int Immunol.* 2023;35(1):7-17. doi: 10.1093/intimm/dxac046.

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 2件）

1. 著者名 Asa Minori, Morita Daisuke, Kuroha Jin, Mizutani Tatsuaki, Mori Naoki, Mikami Bunzo, Sugita Masahiko	4. 巻 298
2. 論文標題 Crystal structures of N-myristoylated lipopeptide-bound HLA class I complexes indicate reorganization of B-pocket architecture upon ligand binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102100 ~ 102100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morita Daisuke, Asa Minori, Sugita Masahiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Engagement with the TCR induces plasticity in antigenic ligands bound to MHC class I and CD1 molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 7 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Morita D, and Sugita M.
2. 発表標題 Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 麻実乃莉、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クラスI分子の構造と機能
3. 学会等名 第33回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Morita, Masahiko Sugita
2. 発表標題 A molecular basis for specific recognition of lipopeptides by TCRs
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minori Asa, Daisuke Morita, Masahiko Sugita
2. 発表標題 Dynamic B-pocket remodeling is a basis for HLA class I molecules to bind peptides and lipopeptides
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

医生物学研究所・細胞制御分野 <a href="https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/laboratory/lab06/">https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/laboratory/lab06/</a>
---

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