

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860323

研究課題名(和文) MHCクラス1-リポペプチド複合体の構造解析及びリポペプチド抗原提示経路の解明

研究課題名(英文) Crystallographic analysis of the MHC class I:lipopeptide complex and identification of the lipopeptide-antigen presentation pathway

研究代表者

森田 大輔 (Morita, Daisuke)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：40706173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サルエイズモデルにおいて、サル免疫不全ウイルスが産生するリポペプチドを標的とした抗原特異的T細胞応答が惹起される。しかしながら、リポペプチド抗原提示の分子機序の詳細は不明であった。本研究では、リポペプチドを提示する新しいタイプのアカゲザル由来MHCクラス1分子Mamu-B*098を同定し、リポペプチドとの高解像度共結晶構造解析により、その詳細な結合様式を明らかにした(Morita et al. Nature Communications 2016, doi:10.1038/ncomms10356)。

研究成果の概要(英文)：A new pathway for host defense has recently been discovered in the monkey AIDS model, in which lipopeptide-specific T cell responses develop to combat against infection. However, the molecular mechanisms underlying lipopeptide antigen (Ag) presentation remain elusive. In this study, we identified a lipopeptide-Ag presenting rhesus MHC class I molecule, Mamu-B*098. A high-resolution X-ray crystallographic analysis of the Mamu-B*098:lipopeptide complex reveals the detailed binding manner (Morita et al. Nature Communications 2016, doi:10.1038/ncomms10356).

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 HIV 抗原提示

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの免疫パラダイム

免疫系とは自己と非自己を識別する反応系である。獲得免疫系において、この識別には「ペプチド」を特異的に認識する MHC 拘束性 T 細胞群が主要な役割を果たすと考えられている。一方、近年、同定された「脂質」を特異的に認識する CD1 拘束性 T 細胞群が感染細胞を直接制御するエフェクター細胞として生体防御の一翼を担うことが実証されつつあり、注目を集めている。

(2) リポペプチド免疫応答の発見

一方、ウイルスには固有の脂質がないため、上記の脂質特異的免疫応答の標的とはならないと考えられる。しかしながら、ヒト/サル免疫不全ウイルス(HIV/SIV)が産生する Nef 蛋白質は、その N 末端に脂質修飾の一つであるミリスチン酸修飾を受けることにより、リポ蛋白質として様々な免疫蛋白質の機能を抑制し、感染の成立に大きく寄与する。研究代表者は、サルエイズモデルの研究から、この Nef リポ蛋白質に由来するミリスチン酸付加 Nef ペプチド (C14-nef5、図 1) がキラー T 細胞の特異的標的抗原となること発見し、リポペプチドと言う新しい抗原レパートリーの存在を実証した (Morita D, et al. J. Immunol. 187(2):608-612, 2011 及び Morita D, et al. J. Virol. 87(1):482-488, 2013)。



図 1. 新しい T 細胞抗原、リポペプチドの構造

2. 研究の目的

研究代表者は新しい抗原レパートリー「リポペプチド」特異的な T 細胞応答を発見した。しかしながら、その免疫応答の詳細な分子機序は不明であった。そこで、本研究においてはリポペプチドを T 細胞へと提示する抗原提示分子を同定し、その結合様式を X 線結晶構造解析によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リポペプチド抗原提示を阻害する抗体の作製

アカゲザル末梢血単核球を免疫原として Balb/c マウスへと頻回に免疫し、脾臓細胞を

回収した。これをミエローム細胞と細胞融合することによってサル末梢血単核球を認識する数百種類以上のハイブリドーマを作製した。その中から、リポペプチド抗原依存的な T 細胞応答を阻害することが出来るモノクローナル抗体をスクリーニングした。

(2) リコンビナント Mamu-B*098 の調製

Mamu-B*098 の細胞外ドメインのみを人工合成によってクローニングし、これを大腸菌へと導入した。IPTG による蛋白質の発現誘導を行い、インクルージョンボディとして蛋白質を大量に調製した。これをリポペプチド (C14nef5) 存在下に適切な溶媒条件においてリフォールディングさせた。得られた蛋白質をゲル濾過クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにて高度に精製した。純度については、SDS-PAGE と Native-PAGE および CD スペクトルを測定することによって評価した。

(3) Mamu-B*098 とリポペプチドとの結合試験

上記の方法に従って、Mamu-B*098 リコンビナント蛋白質を調製し、その C 末端にビオチンを付加した。これをストレプトアビジンが高密度に固相化されているセンサーへとロードし、Bio-Layer Interferometry 法を用いて、リポペプチド存在下のみ認められるシグナルの強度を測定し、リポペプチド結合能を評価した。比較対象として、古典的な MHC クラス 1 分子である Mamu-A*02 を選択し、同様にしてリコンビナント蛋白質を調製した。

(4) 結晶化と分子モデルの構築

初期の結晶化では複数の市販スクリーニングキットを用いた。各キットについて、蛋白濃度と温度条件を検討した。ヒットが得られた結晶化条件について、pH、塩濃度、PEG 濃度について条件を細かく検討し、最適な結晶が得られる条件をスクリーニングした。最終的に得られた最適な結晶について、その回折データを理化学研究所 SPring8 にて採取した。分子モデルの構築に際しては、Mamu-B*017 分子をモデルとして分子置換を実施した。次いで、CCP4 および PHENIX ソフトウェアによってリファインメントを繰り返し、最終的な分子モデルを構築した。

4. 研究成果

(1) リポペプチド抗原提示分子の同定

リポペプチド抗原提示分子を同定する目的で、リポペプチド抗原提示を阻害する抗体をスクリーニングした。その結果、抗サル MHC クラス 1 分子抗体および抗サルβ2 ミクログロブリン抗体を同定した。この結果から、リポペプチド提示分子は MHC クラス 1 分子であると考えられた。そこで、サル MHC ク

ラス 1 分子を網羅的にクローニングし、これをサル腎上皮細胞株へと導入した。各細胞の中からリポペプチド抗原存在下のみ特異的 T 細胞 (2N5.1) を活性化できる遺伝子を探索したところ、Mamu-B*098 を同定した。次いで、大腸菌リコンビナント Mamu-B*098 分子を調製した。このリコンビナント分子には、コントロール MHC 分子には認められないリポペプチド結合能があること (図 2) ならびに抗原依存的に 2N5.1 T 細胞を活性化できること、この 2 点を確認、Mamu-B*098 をリポペプチド抗原提示分子として確定した。

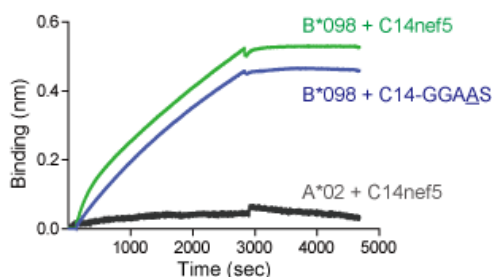


図 2. Mamu-B*098 は古典的な MHC 分子 (Mamu-A*02) とは異なり、リポペプチドを結合する。

(2) Mamu-B*098: リポペプチドの X 線結晶構造解析

リポペプチド抗原の詳細な結合様式を明らかにするため、リコンビナント Mamu-B*098: C14nef5 リポペプチド複合体を大量に調製し、SDS-PAGE 上、ほぼ単一なバンドとなるまで高度に精製した。このリコンビナント蛋白質を用いて結晶を作成し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、1.76 オングストロームと言う高解像度でその構造を解き明かすことに成功した。Mamu-B*098 分子は、典型的な MHC クラス 1 分子と同様、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ ドメインと $\beta 2$ ミクログロブリンから成り、リポペプチドは、1 と 2 ドメインに挟まれた抗原結合溝内に収納されていた。

リポペプチドと Mamu-B*098 の抗原結合溝とを重ね合わせてみると、リポペプチドの両末端、ミリスチン酸と C 末端アミノ酸 (セリン) 残基が溝内に深く収納されており、これらの部位が結合に関与していることが分かった。また、MHC クラス 1 分子が持つポケット構造のうち、ミリスチン酸は大きく疎水性の高い B ポケット、C 末端アミノ酸は親水性の小さな F ポケットへそれぞれ収納されていた。一方、ペプチド中央の 3 アミノ酸は溶媒面に露出しており、この領域が T 細胞の認識に関わるものと考えられた。得られた結果から、リポペプチドの抗原提示モデルを構築した (図 3)。

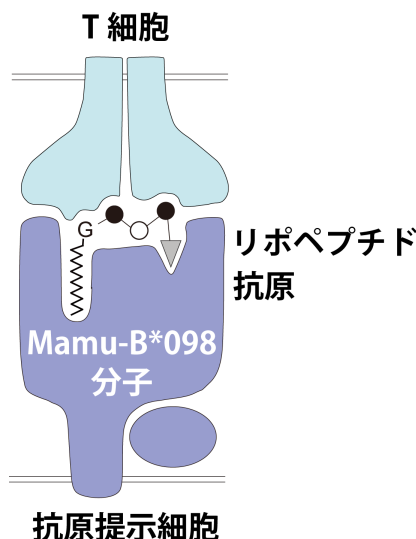


図 3. リポペプチドの抗原提示モデル

(3) 考察とまとめ

興味深いことに、Mamu-B*098 の抗原結合溝はリポペプチドとの結合に最適化された構造を有していた。これまで MHC クラス 1 分子は長鎖ペプチドの抗原提示を専門に担うと考えられてきたが、Mamu-B*098 の構造は典型的な長鎖ペプチドを結合しないことを強く示唆した。この事実は、「MHC クラス 1 分子は長鎖ペプチド抗原を提示する」と言う広く受け入れられた既成概念を新たに塗り替えるものであり、一部の MHC クラス 1 分子はリポペプチド抗原提示を担うように進化してきた可能性が考えられた。

ウイルスはその複製過程で自身の蛋白質にアミノ酸の変異を導入し、免疫系からの攻撃を回避する仕組みを備えている。これに対して、リポペプチド抗原には変異の導入が困難であることが知られ、ウイルスの急所を突く画期的なリポペプチドワクチンの開発が期待される。本研究は、免疫学的新発見をもたらすだけでなく、グローバルな感染症であるエイズの制圧に向けた新たな一歩となる可能性を秘めている。

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)

Morita D, Yamamoto Y, Mizutani T, Ishikawa T, Suzuki J, Igarashi T, Mori N, Shiina T, Inoko H, Tanaka Y, Mikami B, Sugita M. Crystal structure of the lipopeptide-bound MHC class I complex. *Nature Communications* 7:10356, 2016. 査読有

doi: 10.1038/ncomms10356.

〔学会発表〕(計 2 件)

Morita D and Sugita M.

“Discovery of lipopeptide Ag-presenting molecules: its molecular identity and X-ray crystallographic structure”

第 44 回日本免疫学会学術集会 (札幌) 2015 年 11 月 18-20 日

Morita D and Sugita M.

"Discovery of a lipopeptide Ag-presenting molecule: its molecular identity and X-ray crystallographic structure"

The 10th International Symposium of the Institute Network, Sapporo, 23-24 July, 2015.

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森田 大輔 (MORITA DAISUKE)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号 : 40706173

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし