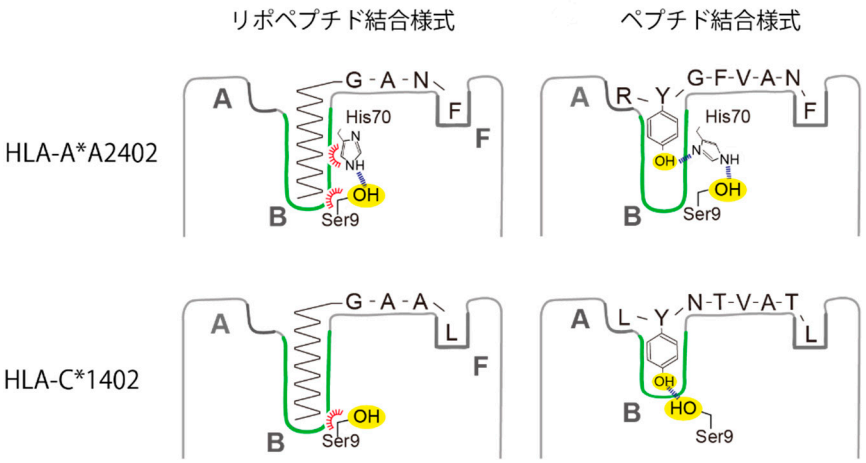
165　リポペプチドを標的とした感染防御と自己免疫の新機序	森田　大輔

【目的】本研究は、研究代表者がアカゲザルエイズモデルの解析をもとに世界に先駆けて発見した「MHC クラス 1 分子によるリポペプチド抗原提示」を土台として、サルからヒトへの展開と新たなヒト免疫病態の解明を目指すものである。リポペプチド免疫応答の視点から、ウイルス感染に伴って誘起される自己免疫疾患の成立機構を個体レベルで解明することを目的として、ヒトのリポペプチド提示 MHC クラス 1（以下、LP1 と記載する）アリル群の同定と構造解析、ならびに LP1 トランスジェニック（Tg）マウスの作出と機能解析を行った。

【方法】リポペプチド結合試験については、HLA（ヒト MHC）重鎖の大腸菌リコンビナント蛋白質をリポペプチドあるいはペプチドリガンド存在下に緩衝液中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て評価した。また、高度に精製した各 HLA 複合体を用いて X 線結晶構造解析を実施した。Tg マウスについては、HLA 遺伝子をマウス MHC クラス 1 遺伝子（H2Kb）プロモーター下流につないだトランスジーンを作製し、これをマウス受精卵前核にインジェクションすることにより作出した。イミキモド乾癬モデルについては、イミキモドクリームをマウス右耳に 7 日間、連続塗布した後、組織解析に供した。

【結果】サル LP1 分子のアミノ酸配列情報ならびに構造学的特徴をもとに、ヒト LP1 分子のスクリーニングを実施し、HLA-A*2402 および HLA-C*1402 において高いリポペプチド結合能があることを見出した。これらの HLA 分子はともにペプチド抗原提示分子でもあることから、リポペプチド複合体ならびにペプチド複合体の X 線結晶構造解析を実施し、リポペプチドとペプチドという 2 種類のリガンドをともに結合できる dual function について、その構造基盤を解明した。リガンドを収納するポケット構成アミノ酸の一部が、その側鎖の配向をダイナミックに変化させることでポケット構造や水素結合ネットワークが再構築され、ポケットの大きさや疎水性環境がリガンドの種類に応じて最適化されることを見出した（図）。また、HLA-A*2402 については Tg マウスの作出を完了し、個体レベルでの解析準備が整った。さらに、先行していたアカゲザル LP1（Mamu-B*098）Tg マウスを活用し、代表的な自己免疫モデルのひとつであるイミキモド乾癬モデルにおいて、non-Tg マウスと比較して、B*098 Tg マウスには顕著な炎症反応が惹起されることを見出した。

HLA-A*2402 と HLA-C*1402 によるリポペプチドならびにペプチド結合様式の分子モデル



165. リポペプチドを標的とした感染防御と自己免疫の新機序

森田　大輔

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 細胞制御分野

Key words：リポペプチド，MHC クラス 1，ミリスチン酸修飾，HIV

緒　言

ウイルスが産生する蛋白質の一部は、宿主由来の C14 飽和脂肪酸（ミリスチン酸）あるいは C16 飽和脂肪酸（パルミチン酸）が結合することにより、脂質化蛋白質としてその機能を発揮する［1］。研究代表者はサルエイズモデルの詳細な免疫解析から、脂質化を受けたウイルス蛋白断片に由来する「リポペプチド」（図 1a）を標的とした新しい T 細胞応答を発見した［2，3］。そして、リポペプチド抗原提示を担う拘束因子としてアカゲザル由来 MHC クラス 1 アリル群（以下、LP1 と記載する）を同定し、その高解像度 X 線結晶構造解析に成功した［4，5］。アカゲザル LP1 分子は内因性リガンドとしてリゾリン脂質を結合し、小胞体膜に局在するペプチド輸送体 TAP 非依存的に細胞表面へと発現する［6］。これらの特質は従来のペプチド提示 MHC クラス 1 分子には認められないことから、LP1 は MHC クラス 1 の新しいサブグループである（図 1b）。また、リポペプチドは従来のペプチド抗原（9〜11 残基）と比べ、ペプチド長が 4〜5 残基と著しく短いため、自己と非自己の識別が理論上困難である。そのため、リポペプチド免疫は感染防御と自己免疫の境界領域で機能している可能性が高い。特に、リポペプチド免疫応答のヒト疾患における役割については不明であり、その解明は今後の最重要課題である。

本研究では、リポペプチド免疫応答の視点から、ウイルス感染に伴って誘起される自己免疫疾患の成立機構を個体レベルで解明することを目的として、ヒト LP1 アリル群の同定と構造解析、ならびに LP1 トランスジェニック（Tg）マウスの作出と機能解析を行った。

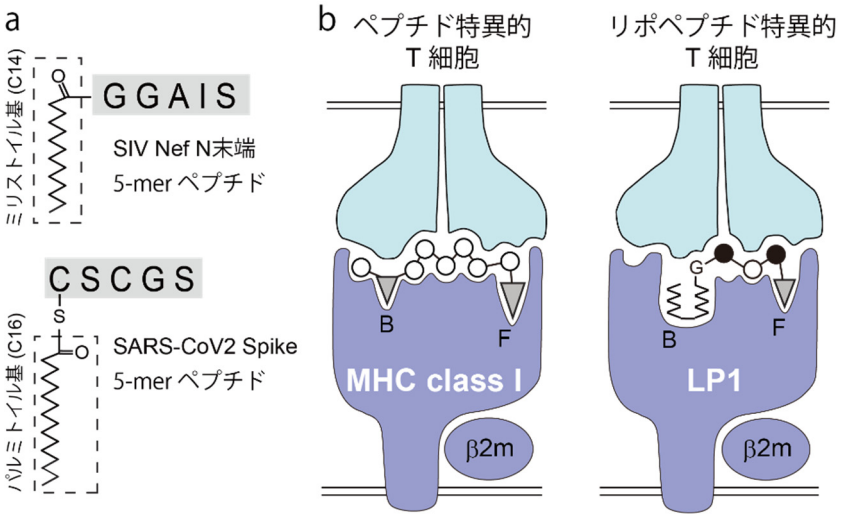


図 1. リポペプチド抗原提示

a）ウイルス蛋白質への脂質修飾反応により生み出されるリポペプチド抗原の一例。

b）MHC クラス 1 分子の中には従来のペプチド提示 MHC クラス 1（左）のみならず、リポペプチド抗原提示を担う新しいサブグループ（右）が存在する。

方　法

1. リポペプチド結合試験と結晶化

各 HLA 遺伝子の細胞外領域を pET21c ベクターへと組込み、大腸菌 Rosetta2 株にインクルージョンボディーとして発現させた。精製インクルージョンボディーを緩衝液中でヒト beta2-microglobulin 及びリポペプチドあるいはペプチド存在下にリフォールディングさせ、10 mM Tris、pH8.0 に対して透析した。陰イオン交換樹脂による濃縮後、superdex200 Increase ゲル濾過カラムに供した。結晶化については、ゲル濾過カラムによる精製後、さらに monoQ 陰イオン交換カラムによって高純度に精製を行い、結晶化サンプルとした。最適化した条件で結晶化させ、凍結保護剤としてエチレングリコールを加え、凍結させた。測定は理化学研究所 Spring-8 にて行った。得られたデータは HKL-2000 によってプロセスし、分子置換によって位相を決定した。モデルの精密化には PHENIX および Coot を用いた。図は Pymol ソフトウェアを用いて描出した。

2. LP1 トランスジェニックマウスの作出とイミキモド乾癬モデル

alpha3 ドメイン以降をマウス MHC クラス 1（H2Kb）に置換した HLA-A*2402 遺伝子を、H2Kb プロモーター下流につないだトランスジーンを作製し、これをマウス受精卵前核にインジェクションすることで作出した。トランスジーンの蛋白質レベルでの発現検証にはフローサイトメトリーを用いた。イミキモド乾癬モデルにおいてはマウスの右耳にイミキモドを含むベルセナクリーム 25 mg を 7 日間、連続塗布した。7 日後の右耳を回収し、ホルムアルデヒドによる固定後にパラフィンブロックを作製し、HE 染色を行った。

結果および考察

1. リポペプチド結合 HLA 分子の同定と X 線結晶構造解析

アカゲザル LP1 分子群の高解像度 X 線結晶構造解析から、ペプチドを提示する 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、また容積が顕著に大きいという特質を備えていた[4, 5]。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 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た。そして、MHC クラス 1 分子がリガンド依存的に安定的な構造を保持できることを利用して、緩衝液中で各候補 HLA とリポペプチドとの結合試験（リフォールディング実験）を行い、高いリポペプチド結合能を持つ HLA 分子群を同定することに成功した。興味深いことに、これらの HLA 分子はいずれもペプチド抗原提示分子としても広く知られていた。日本人集団において特に頻度が高い代表的な 2 分子（HLA-A*A2402 と HLA-C*1402）に着目し、そのリポペプチド複合体ならびにペプチド複合体の X 線結晶構造を決定した [7]。全ての結晶構造において、その抗原結合溝の中にはリガンドの構造に合致した電子マップが観察されたことから、両 HLA のリポペプチドとペプチドを共に結合できる dual function が構造学的にも実証された。MHC クラス 1 の抗原結合溝の中には A から F までの 6 つのポケットが存在しているが、アンカーとなるリポペプチドのアシル鎖は B ポケットに、C 末端アミノ酸は F ポケットにそれぞれ収納されていた。また、A ポケットは空となっていた。これらの結合パターンはサル LP1 分子と同等であり、種を超えて共通する様式であると考えられた（図 2）。次に、リポペプチド複合体とペプチド複合体との構造を比較してみると、HLA-A*2402 については B ポケット側壁に位置する His70 の側鎖がリガンドの種類に応じて水素結合ネットワークを切り替えるようにして回転し、結果として、ポケットの大きさと表面の疎水性環境を変化させていることが分かった（図 3）。一方、HLA-C*1402 については、B ポケット底部に位置する Ser9 側鎖が同様にリガンドの種類に応じて、空間的配向を変化させ、ペプチドリガンドに対してはポケット内部を向き、収納されるチロシン残基側鎖と水素結合を形成するのに対して、リポペプチドリガンドに対してはポケット外側を向き、その Cbeta 炭素を介してファンデルワールス相互作用を働かせることで結合に寄与していた。このように、リポペプチド結合 HLA は、リガンドを収納する B ポケット構成アミノ酸の一部について、その側鎖配向をダイナミックに変化させることで、リガンドの種類に応じてポケット構造を再構築し、ポケットの大きさや疎水性環境を最適化していることが分かった（要旨の図参照）。

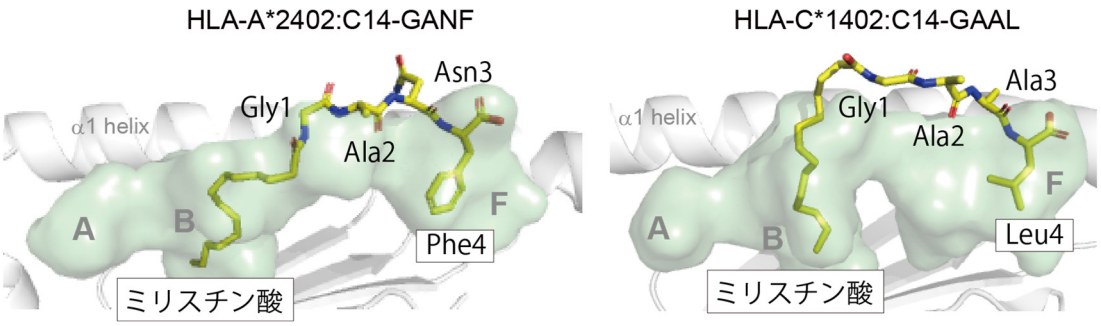


図 2. HLA-A*2402 及び HLA-C*1402 のリポペプチド結合様式

HLA-A*2402（左）と HLA-C*1402（右）の各リポペプチド複合体共結晶について、抗原結合溝を半透明の緑色で、リポペプチドリガンドを黄色のスティックモデルで示した。また、アンカーとなっているミリスチン酸と C 末端残基を強調して示した。

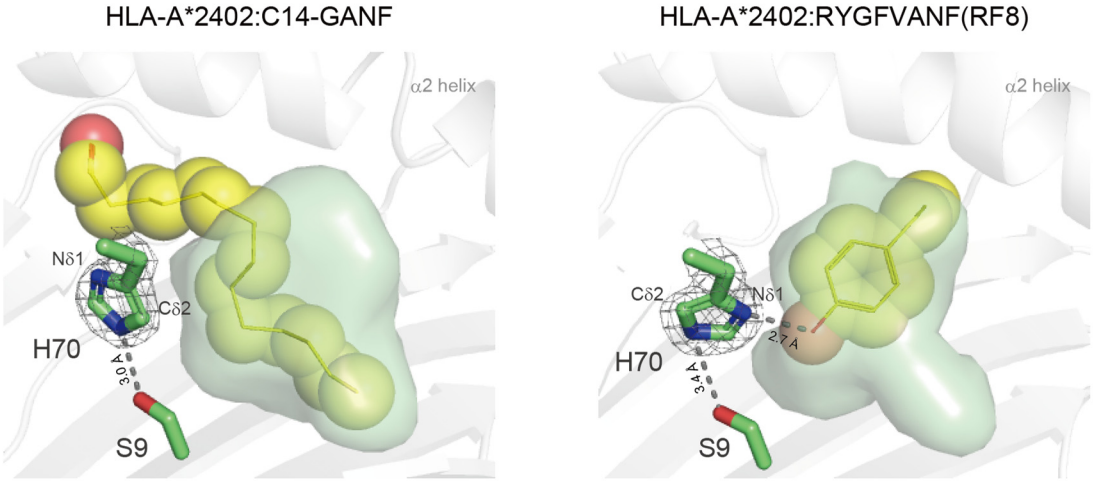


図 3. HLA-A*2402 における 70 番目のヒスチジン残基の回転

HLA-A*2402 のリポペプチド複合体（左）とペプチド複合体（右）について、各 B ポケットを半透明の緑で、アンカーとなるリポペプチドのミリスチン酸とペプチドのチロシン残基を黄色のスフィアモデルで示した。His70 側鎖については、2Fo-Fc マップ（2.0 σ）を表記した。また、水素結合を破線で示した。

2. LP1 トランスジェニックマウスの作出とイミキモド乾癬モデルの適応

リポペプチド提示能力を証明し、リポペプチド免疫を標的としたワクチン開発や自己免疫疾患の検証を行うため、HLA-A*2402 Tg マウスを作出した。得られたマウス由来脾臓細胞において、すべての細胞画分でトランスジーンの発現を蛋白質レベルで確認できたことから、用いたトランスジーンコンストラクトは適切に機能していると判断した。

一方、アカゲザルの代表的な LP1 分子である Mamu-B*098 Tg マウスの作出が先行して完了していた。このマウスに対して、リポペプチドを免疫感作することで、脾臓 CD8 陽性 T 細胞中にリポペプチド特異的 T 細胞が高頻度に出現することから、確かにリポペプチド免疫応答が再構築されていることが分かっている（未発表）。そこで、リポペプチド免疫と自己免疫との関わりについての知見を得るため、Mamu-B*098 Tg マウスに対して TLR7 リガンドであるイミキモドを用いた乾癬モデルを適応した。7 日間の耳への連続塗布の後、耳切片の HE 染色を行い、厚さや組織像を比較した。まず、non-Tg マウスにおいて、過去の文献と同じく、ナイーブマウスと比較して腫脹が認められた。そして、

Mamu-B*098 Tg マウスにおいては、non-Tg マウスのものと比べて、さらに顕著な腫脹が認められた。このことは、自己リポペプチドに対する免疫応答が自己免疫の開始あるいは増悪に関連するという可能性を強く示唆している。

健常細胞においては、ごく一部の細胞内蛋白質のみがミリストイル化を受けている［1］。従って、定常状態における内在性リポペプチド量は少なく、HLA-A*2402 や HLA-C*1402 の場合には、ペプチドが主要な内因性リガンドであると考えられる。しかしながら、ウイルス感染細胞においては、N ミリストイル化ウイルス蛋白質が過剰に産生される。そのような生理的条件下では、細胞内のリポペプチドリガンドプールが一時的に増大するため、LP1 分子によるリポペプチド抗原のサンプリングが可能となり、リポペプチド抗原特異的な T 細胞応答へと繋がるのであろう。この免疫経路が本当に存在しているのか、また、それが感染制御にどのように関わっているのかは今後の重要な課題である。さらに、ヒトにおいてウイルス感染に伴い自己免疫疾患の増悪が観察されるケースがあるが、その分子機序は殆ど不明である。リポペプチド免疫研究の切り口から、これらの問題に対する「答え」が見出されることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学医生物学研究所細胞制御分野の杉田昌彦先生、麻美乃莉さん、京都大学農学研究科応用構造生物学分野の三上文三先生、京都大学農学研究科化学生態学分野の森直樹先生である。

文　献

1） J A Boutin. Myristoylation. Cell Signal. 1997 Jan;9(1):15-35. PMID: 9067626 DOI: 10.1016/s0898-6568(96)00100-3

2） Morita D, Igarashi T, Horiike M, Mori N, Sugita M. Cutting edge: T cells monitor N-myristoylation of the Nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. J Immunol. 2011 Jul 15;187(2):608-12. PMID: 21653836 DOI: 10.4049/jimmunol.1101216

3） Morita D, Yamamoto Y, Suzuki J, Mori N, Igarashi T, Sugita M. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. J Virol. 2013 Jan;87(1):482-8. PMID: 23097434 DOI: 10.1128/JVI.02142-12

4） Morita D, Yamamoto Y, Mizutani T, Ishikawa T, Suzuki J, Igarashi T, Mori N, Shiina T, Inoko H, Fujita H, Iwai K, Tanaka Y, Mikami B, Sugita M. Crystal structure of the N-myristoylated lipopeptide-bound MHC class I complex. Nat Commun. 2016 Jan 13;7:10356. PMID: 26758274　DOI: 10.1038/ncomms10356

5） Yamamoto Y, Morita D, Shima Y, Midorikawa A, Mizutani T, Suzuki J, Mori N, Shiina T, Inoko H, Tanaka Y, Mikami B, Sugita M. Identification and Structure of an MHC Class I-Encoded Protein with the Potential to Present N-Myristoylated 4-mer Peptides to T Cells. J Immunol. 2019 Jun 15;202(12):3349-3358. PMID: 31043477 DOI: 10.4049/jimmunol.1900087

6） Shima Y, Morita D, Mizutani T, Mori N, Mikami B, Sugita M. Crystal structures of lysophospholipid-bound MHC class I molecules. J Biol Chem. 2020 May 15;295(20):6983-6991. PMID: 32269076 DOI: 10.1074/jbc.RA119.011932

7） 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. 2020 Jul;298(7):102100. PMID: 35667438 DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102100.