

ペプチドとリポペプチドを結合する
HLA クラス I 分子の X 線結晶構造解析

麻 実乃莉

目次

要旨	1
略語表	2
第 1 章：序論	5
主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex, MHC)	
クラス I 分子の基本構造と機能	5
MHC クラス I 分子の細胞表面発現を制御する細胞内分子機構	8
リポペプチドを CTL に提示するアカゲザル MHC クラス I 分子の発見	10
MHC クラス I 分子によるペプチド結合の分子機構	13
アカゲザル LP1 分子のリポペプチド結合様式	15
ヒト LP1 分子は存在するのか	17
第 2 章：手法	18
CASTp によるポケット体積の計算	18
タンパク質の調製	18
モデルリガンドの合成	19
リフォールディング	20
リコンビナントタンパク質の精製	21
X 線結晶構造解析	22
第 3 章：結果	23
HLA クラス I 分子のポジション 9 のアミノ酸残基に着目した、 ヒト LP1 候補分子の絞り込み	23
HLA-A*24:02 はリポペプチド依存的に安定的な複合体を形成する	25
リポペプチドは HLA-A*24:02 の抗原結合溝に結合する	28
HLA-A*24:02 の Ser9 は、Mamu-B*098 の Ser9 と同様、 ミスチン酸結合に貢献する	30
HLA-A*24:02 の Ser9 を Tyr9 に置換すると、リポペプチド結合能が減弱する	30
HLA-A*24:02 は、B ポケットリモデリングにより、ペプチドだけでなく リポペプチドを結合することができる	34
HLA-C*14:02 は、Ser9 が直接関与した B ポケットリモデリングを介して、 dual binding ability を発揮する	39

第4章：考察	43
Dual binding ability を有するヒト LP1 分子の同定とそこから見える進化過程	43
ヒト LP1 と結合するウイルスリポペプチドレパトア	44
ウイルスリポペプチド特異的 T 細胞応答に起因する自己免疫疾患.....	45
総括	47
引用文献	51
謝辞	56

要旨

MHC クラス I 分子は、重鎖： $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) ヘテロ二量体に構築された抗原結合溝にペプチドリガンドが結合することにより安定的な三量体を形成し、抗原提示分子として機能する。多くの MHC クラス I：ペプチド複合体の結晶構造解析から、抗原結合溝には 6 つのポケット (A-F ポケット) が存在し、このうち N 末から 2 番目のアミノ酸 (P2) を結合する B ポケットと C 末アミノ酸を結合する F ポケットがペプチドリガンドレパトアの形成に重要であることが知られている。これに対して、N-ミリスチル化ウイルスタンパク質の N 末端リポペプチド断片を結合するアカゲザル MHC クラス I 分子 (以下 LP1 分子と総称する) が発見され、B ポケットには C14 直鎖脂肪酸 (ミリスチン酸) が結合することが明らかとなった。そこで申請者は、アカゲザル LP1 分子の B ポケット構造の特徴を切り口として、リポペプチド結合能を有するヒト MHC (HLA) クラス I 分子の同定を目指した研究を推進した。

まず P2 アミノ酸とミリスチン酸の分子形状の違いから、ミリスチン酸を収容する B ポケットは深く大きいことが予想された。実際、B ポケット底面を構成するポジション 9 において、LP1 分子ではコンセンサスアミノ酸 (Tyr9) ではなく小さなアミノ酸 (Ser9 あるいは Gly9) が配置されていた。そこで、Ser9 を有し日本人においてメジャーな HLA-A*24:02 と HLA-C*14:02 を絞り込み、リポペプチド結合能を検証した。それぞれの重鎖： $\beta 2m$ 二量体はリポペプチド存在下で安定三量体を形成した。この三量体を結晶化し、X 線結晶構造を決定したところ、Ser9 側鎖は水素結合により B ポケットとは反対側に配向し、深く広い B ポケットにミリスチン酸が収納されることが判明した。他方、これらの HLA クラス I 分子はペプチドも結合することが分かっている。そこでペプチド結合複合体とリポペプチド結合複合体の結晶構造を比較したところ、Ser9 を介した水素結合ネットワークがリガンドの種類に応じて再構築され、ミリスチン酸だけでなく P2 アミノ酸を結合できる B ポケット構造が生み出されていた。したがって、これらの HLA クラス I 分子は、B ポケットリモデリングの機構によりリガンドレパトアを拡大し、効果的な抗ウイルス免疫応答を誘導すると考えられた。

略語表

ABC : ATP-binding cassette

β 2m : Beta-2-microglobulin

CAR : Coxsackievirus and adenovirus receptor

CD : Cluster of Differentiation

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate

CTL : Cytotoxic T lymphocyte

CYB5R3 : Cytochrome b5 reductase 3

DIPEA : N,N-Diisopropylethylamine

DMF : N,N-Dimethylformamide

DNA : Deoxyribonucleic acid

DTT : Dithiothreitol

EBV : Epstein-Barr virus

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

Fmoc : 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl group

HATU : 1-((Dimethylamino)(dimethyliminio)methyl)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridine 3-oxide
hexafluorophosphate

HBV : Hepatitis B virus

HCMV : Human cytomegalovirus

HIV : Human immunodeficiency virus

HLA : Human leukocyte antigen

HOBT : 1-Hydroxybenzotriazole

HSV : Herpes simplex virus

HTLV : Human T-cell leukemia virus

ICP47 : Infected cell protein 47

IFN : Interferon

IPTG : Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

MAIT : Mucosal associated invariant T

MARCKS : Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate

MES : 2-Morpholinoethanesulfonic acid

MetAP2 : Methionine aminopeptidase 2

MHC : Major histocompatibility complex

NKT : Natural killer T

NMT : N-myristoyl transferase

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

PCR : Polymerase chain reaction

PDB : Protein data bank

PEG : Polyethylene glycol

PLC : Peptide-loading complex

SIV : Simian immunodeficiency virus

TAP : Transporter associated with antigen processing

TBS : Tris buffered saline

TCR : T-cell receptor

TFA : Trifluoroacetic acid

TIPS : Triisopropylsilane

TNF : Tumor necrosis factor

US3 : Unique short 3

アミノ酸（略字・構造式）一覧表

ChemDraw から構造式を作成、リガンドを簡略化する場合は1文字、それ以外の場合は3文字表記で表す。

和名	英名	3文字	1文字	構造式
アラニン	Alanine	Ala	A	—CH_3
バリン	Valine	Val	V	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
ロイシン	Leucine	Leu	L	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
イソロイシン	Isoleucine	Ile	I	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
メチオニン	Methionine	Met	M	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
フェニルアラニン	Phenylalanine	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
チロシン	Tyrosine	Tyr	Y	$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
トリプトファン	Tryptophan	Trp	W	$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
セリン	Serine	Ser	S	$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
スレオニン	Threonine	Thr	T	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
システイン	Cysteine	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
アスパラギン	Asparagine	Asn	N	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
グルタミン	Glutamine	Gln	Q	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
アスパラギン酸	Aspartic Acid	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
グルタミン酸	Glutamic Acid	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
アルギニン	Arginine	Arg	R	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
リジン	Lysine	Lys	K	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
ヒスチジン	Histidine	His	H	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$
グリシン	Glycine	Gly	G	—H
プロリン	Proline	Pro	P	

第 1 章：序論

主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex, MHC) クラス I 分子の基本構造と機能

MHC クラス I 分子は、脊椎動物のほぼ全ての有核細胞に発現する膜タンパク質で、重鎖と $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) が結合したヘテロ複合体にペプチドリガンドが結合した 3 量体として細胞表面に表出する (図 1)。重鎖の細胞外領域に存在する 3 つのドメイン構造 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$) は、 $\beta 2m$ やリガンドとの結合により適切に折り畳まれた安定的な三次構造を構築し、その機能を発揮する。膜近位に位置する $\alpha 3$ ドメインは immunoglobulin superfamily に属する構造を有し、同じく immunoglobulin superfamily に属する $\beta 2m$ と非共有的に結合することにより MHC クラス I 複合体形成に貢献するとともに、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) に発現した CD8 分子との直接的な相互作用を担う (図 1) [1]。他方、膜遠位に存在し、相対する $\alpha 1$ ドメインと $\alpha 2$ ドメインは、2 つの α ヘリックス構造と β シート構造からなる抗原結合溝の形成に寄与する。健常細胞において、MHC クラス I 分子は自己由来のペプチドを結合して細胞表面に表出するが、これを認識しうる自己反応性 CTL は胸腺での負の選択により排除されているので、T 細胞応答は生じない[2]。一方、ウイルス感染細胞においては、ウイルス由来のペプチドを結合した MHC クラス I 分子が細胞表面に発現し、ウイルスペプチド特異的 MHC クラス I 拘束性 $\alpha\beta$ T 細胞受容体 (TCR) と CD3 複合体を発現した CD8 陽性 CTL の活性化を誘導する (図 1) [3, 4]。活性化した特異的 CTL は、インターフェロン (IFN) $-\gamma$ 、腫瘍壊死因子 (TNF) $-\alpha$ などのサイトカインの放出やパーフォリン、グランザイムを含有した細胞傷害性顆粒を分泌することにより、感染細胞にアポトーシスを誘導し、感染細胞を排除する[5-7]。したがって、MHC クラス I 分子は、細胞表面に提示するペプチドリガンドレパートリーを変化させることにより、ウイルス感染細胞のような異常な自己細胞と健常細胞の免疫識別を成立させる鍵分子である。また、ウイルス感染や

がん化、あるいは様々な細胞機能低下の結果として MHC クラス I 分子の細胞表面発現が低下した場合には、CTL に代わってナチュラルキラー細胞がそれを検知し、異常細胞を排除する[8]。したがって、MHC クラス I 分子は生体の恒常性維持に重要な役割を担っており、その発現に際しては精緻な細胞内制御機構が存在する。

細胞傷害性 T 細胞

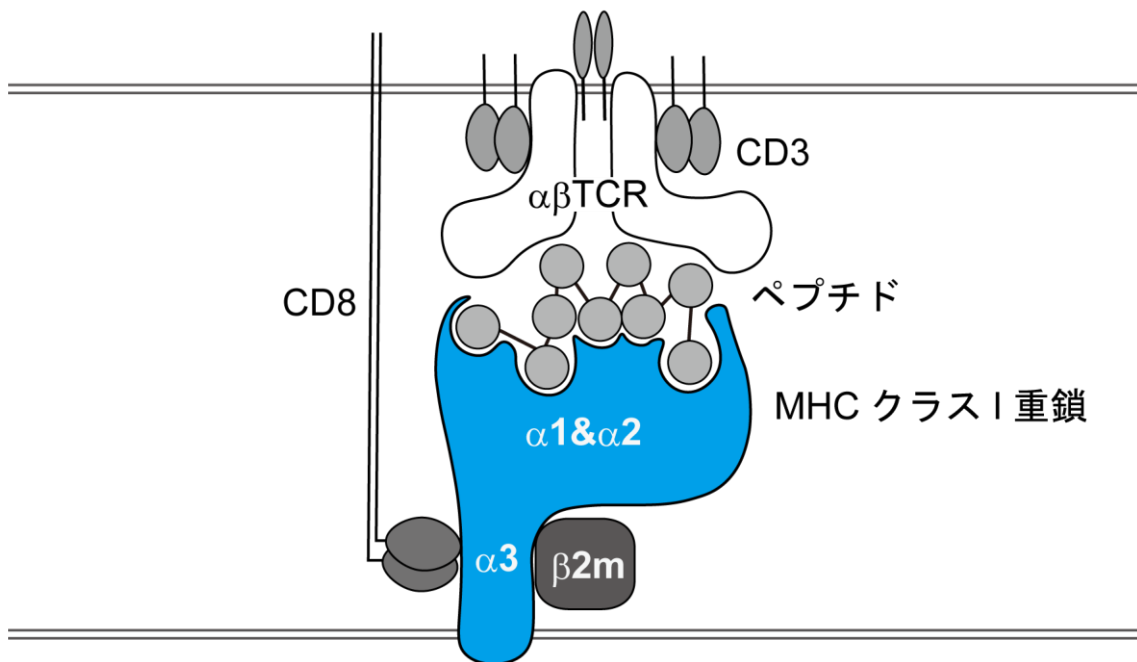


図 1 : MHC クラス I 分子の基本構造

MHC クラス I 分子は $\alpha 1$ から $\alpha 3$ ドメインからなる重鎖と $\beta 2m$ 、ペプチドからなる 3 量体であり、細胞表面に発現する。この 3 量体は、CD8 陽性かつ $\alpha \beta$ TCR・CD3 複合体を発現した CTL によって認識される。

MHC クラス I 分子の細胞表面発現を制御する細胞内分子機構

小胞体において新たに生合成された MHC クラス I 重鎖は、まず小胞体に局限して発現する膜貫通型シャペロン分子であるカルネキシンと結合する (図 2)。小胞体内腔において重鎖が $\beta 2m$ と結合すると、不安定な重鎖 : $\beta 2m$ ヘテロ二量体はカルネキシンから離れ[9]、小胞体内腔に存在する可溶性シャペロンタンパク質複合体 (カルレティキュリン・ERp57) と結合する[10, 11]。小胞体局在膜貫通型シャペロン分子であるタパシンは、不安定な重鎖 : $\beta 2m$ ヘテロ二量体とカルレティキュリン・ERp57 から構成される複合体と結合し、さらに抗原処理関連トランスポーター (TAP) と結合することにより、ペプチドローディング複合体 (PLC) を形成する[12]。TAP は ABC トランスポーターに属する TAP1 と TAP2 からなるヘテロ二量体であり、ATP 依存的に細胞質から小胞体内腔へとペプチドを輸送する機能を担う[13]。ペプチドリガンドのソースは、多くの場合、分解過程に入った細胞質タンパク質であり、細胞質プロテアソームにより生成されたペプチドは TAP を介して小胞体内腔に輸送され、PLC を構成する不安定な重鎖 : $\beta 2m$ ヘテロ二量体と結合する[14]。これによって安定化した重鎖 : $\beta 2m$: ペプチドリガンド三量体は小胞体シャペロン分子群から離れ、ゴルジ体を通って、細胞表面に発現する[12, 15]。したがって、MHC クラス I 分子の安定発現には TAP 機能が不可欠であり、TAP 欠損細胞においては大半の重鎖は小胞体内腔に留まったのち細胞質に輸送され分解 (小胞体関連分解) を受けるため、細胞表面発現は顕著に低下する[16, 17]。なお、TAP1, TAP2 遺伝子が MHC 領域に存在することからも[18]、TAP ペプチド輸送体が MHC 機能と高度に連動していることが理解できる。また、PLC 複合体はその機能的な重要性から病原性ウイルスの免疫逃避の格好の標的ともなりうる。たとえば、単純ヘルペスウイルス (HSV) の ICP47 は TAP の細胞質側の輸送孔を物理的に塞ぐことによって、ペプチド輸送を阻害する[19]。また、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の US3 はタパシンに直接結合し、タパシン依存性のペプチドローディングを阻害する[20]。

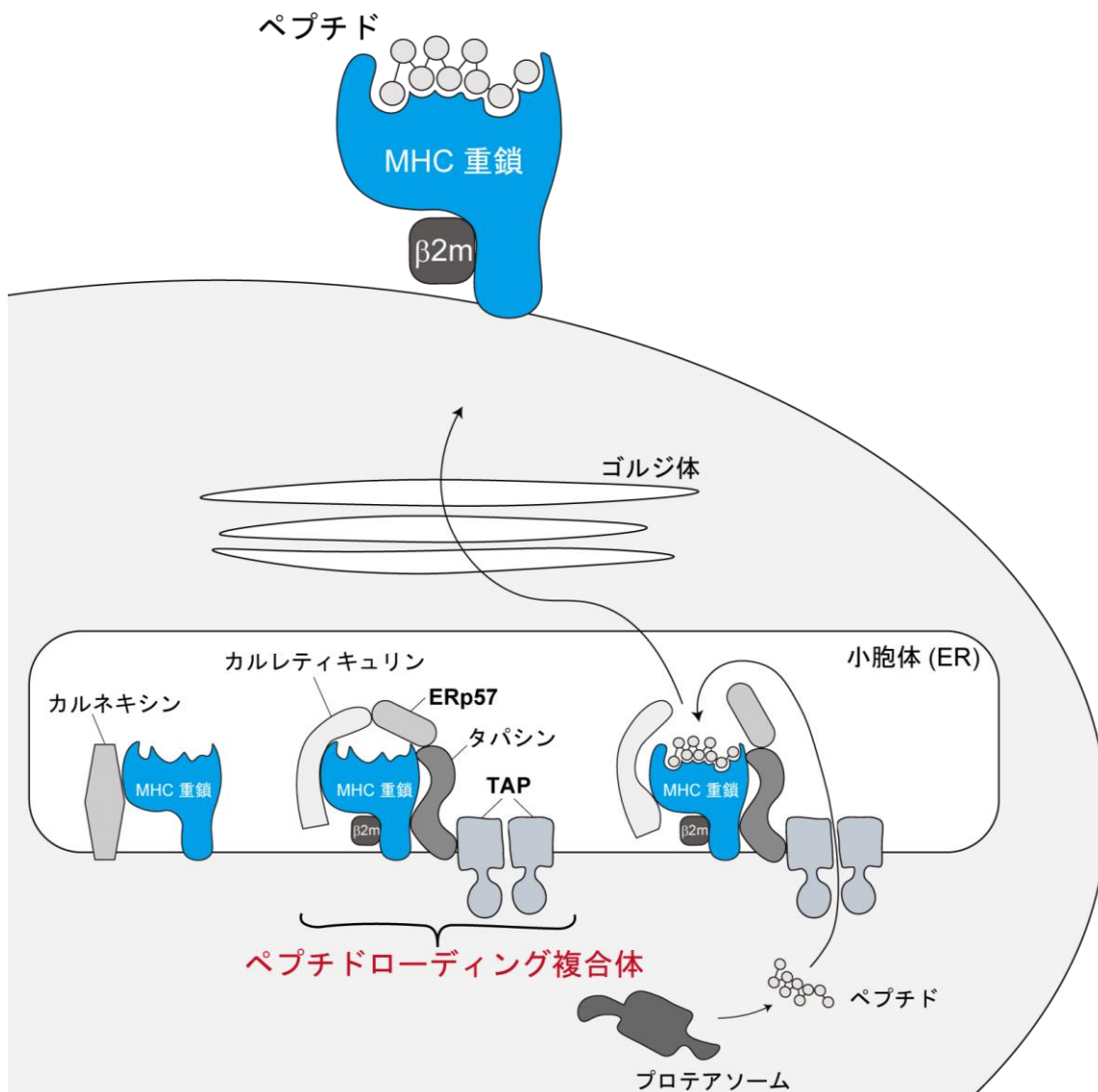


図2：MHCクラスI分子の発現に伴う細胞内分子機構

リガンドを結合する前のMHCクラスI分子は、小胞体内でシャペロン分子と複合体を形成し、ペプチドローディング複合体を形成する。TAPを介して小胞体内でリガンドが結合して初めてMHCクラスI分子は安定化し、細胞外へ輸送される。

リポペプチドを CTL に提示するアカゲザル MHC クラス I 分子の発見

PLC を標的にした前述の免疫逃避機構と異なり、ヒト/サル免疫不全ウイルス (HIV/SIV) は既に細胞表面発現した MHC クラス I 分子の機能を抑制する[21]。Nef タンパク質の N 末には N ミリスチル化配列 (Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr) が存在し、その翻訳過程において開始メチオニンがメチオニンアミノペプチダーゼ 2 (MetAP2) によって切断されたのち[22]、露出した N 末グリシン残基に対し N-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) の触媒により C14 直鎖脂肪酸 (ミリスチン酸) が付加される (図 3 下) [23]。この修飾は不可逆であり、ミリスチン酸修飾を受けた Nef タンパク質は膜にアンカーして MHC クラス I 分子を含む種々の免疫分子のクラスリン依存性エンドサイトーシスを促進することにより、宿主免疫の抑制に働く[24, 25]。実際、Nef の N ミリスチル化が起こらない変異ウイルスは病原性が顕著に低下することが知られている[25-27]。

所属研究室では、Nef のミリスチル化を標的にした CTL 応答は、効果的な感染防御に寄与するであろうとの着想から、アカゲザルエイズモデルを用いた検証を開始し、まず SIV 感染個体の末梢血にはミリスチル化 SIV Nef 5-mer (Myr-GGAIS) に反応して IFN- γ を産生する T 細胞が存在することを見出した[28]。さらに、ナイーブ個体から Myr-GGAIS 特異的な T 細胞株 (2N5.1)、また感染個体から Myr-GGAI 特異的な T 細胞株 (SN45) が樹立された (図 3 上) [28, 29]。これらの T 細胞株は clonotypic な TCR と CD8 $\alpha\beta$ を発現した典型的な CTL フェノタイプを示した。そして、阻害抗体の認識分子の同定や遺伝学的解析、さらに候補分子を発現したトランスフェクタントのリポペプチド抗原提示能の検証実験をもとに、アカゲザルの古典的 MHC クラス I アロモルフ (allomorph) である Mamu-B*098 と Mamu-B*05104 がそれぞれ 2N5.1 と SN45 の拘束分子として機能することが明らかになった[30, 31]。さらに、これらの MHC クラス I allomorph の細胞表面発現は TAP 機能に依存しないことが明らかとなり[32]、従来のペプチド結合 MHC クラス I 分子群とは異質の MHC クラス I サブセットの存在が示唆された。所属研究室では、リポペプチド抗原提示能を有する MHC

クラス I allomorph を Lipopeptide-Presenting MHC class I (LP1) と総称し、その解析を進めている。

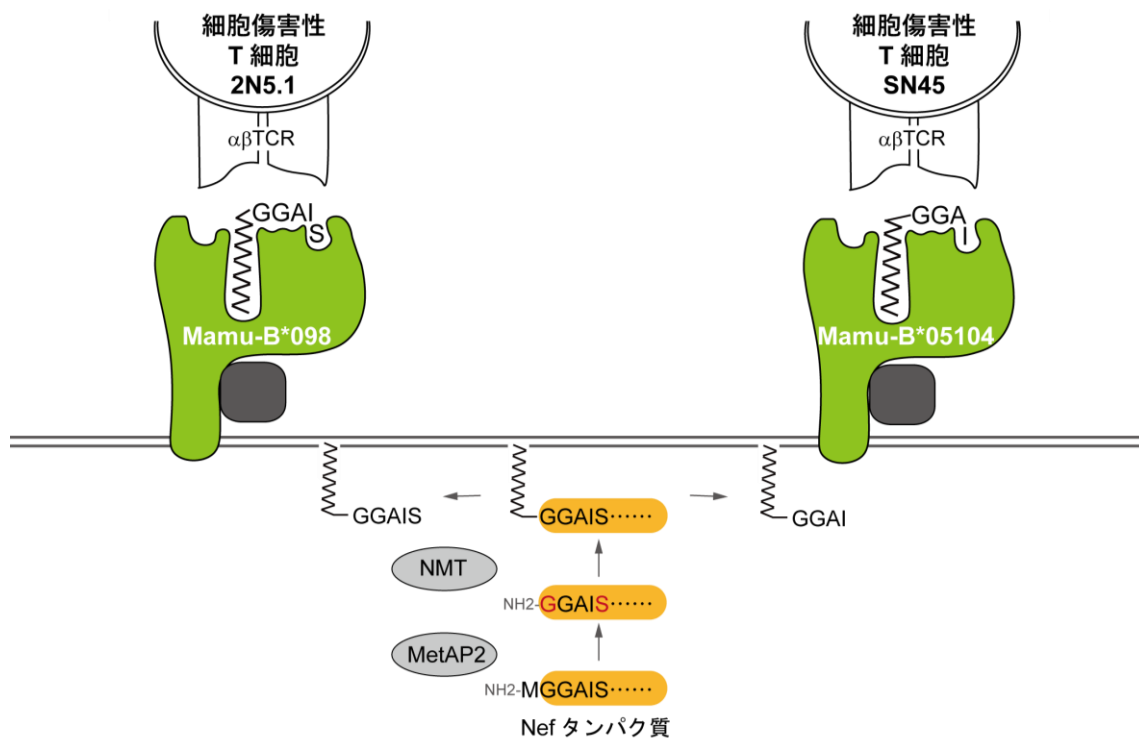


図3：ペプチド提示MHCクラスI分子とリポペプチド提示MHCクラスI分子

HIV/SIV ウイルスの Nef タンパク質は、MetAP2 による開始メチオニンの除去、NMT によるミリスチン酸修飾を経て、膜にアンカーすることで病原性を発揮する。所属研究室は、Nef 由来のリポペプチド (Myr-GGAIS, Myr-GGAI) に特異的な CTL クローン (2N5.1, SN45) を樹立し、その拘束性分子である MHC クラス I サブセット (Mamu-B*098, Mamu-B*05104) を同定した。

MHC クラス I 分子によるペプチド結合の分子機構

MHC クラス I 遺伝子群は polygenic であり、ヒトにおいては 3 つの遺伝子座 (HLA-A, -B, -C) が存在する。1987 年、HLA-A*02:01 の X 線結晶構造が解明されて以降、異なるペプチドを結合した多くの MHC クラス I allomorph の構造が解明され、抗原結合溝の共通構造が明らかとなってきた (図 4A) [33-35]。相対する 2 つの α ヘリックス構造を側面、 β シート構造を底面にして構成される抗原結合溝には、6 つのポケット構造 (A – F ポケット) が存在する (図 4B) [36, 37]。このうち、ペプチドリガンド結合に最も重要な役割を担うのは B ポケットと F ポケットであり、それぞれ 2 番目のアミノ酸残基 (P2) と C 末端アミノ酸残基 (P Ω) を結合する (図 4A, 4C)。抗原結合溝の両端は閉じているため、結合できるペプチド鎖長には制限があり、おおむね 8-mer から 11-mer のペプチドが収納される。多くの場合、A ポケットは N 末アミノ酸残基 (P1) を収納することにより安定的なペプチド結合に貢献する。A–F までのポケットのうち、とりわけ B ポケットは P2 アミノ酸の側鎖特異性を規定するアミノ酸群 (とくに 9, 45, 63, 66, 67, 70, 99 番目のアミノ酸残基) が polymorphic であることから allomorph 特異的な構造を有しており、結合ペプチドの P2 アミノ酸残基にバイアスが生じることが多い[38]。例えば、HLA-B*27:05 の B ポケットへの結合においては塩基性アミノ酸である Arg が選択されるのに対し、HLA-A*02:01 の B ポケットへの結合においては Leu や Met などの疎水性アミノ酸が好まれる (図 4C, 4D) [39, 40]。このことは、後述のミリスチン酸の B ポケットへの結合を理解する背景として重要である。

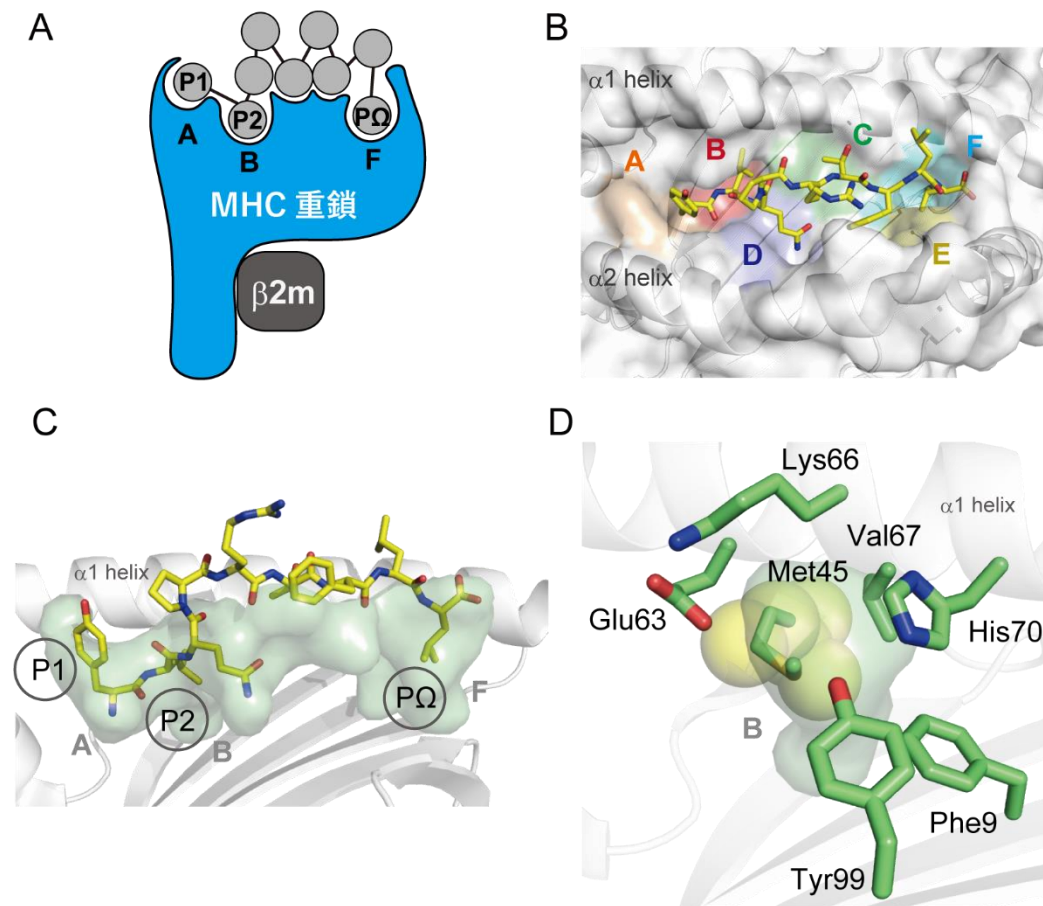


図4：MHCクラスI分子のペプチド結合様式

A：MHCクラスI分子のペプチド結合時の共通構造の模式図。P1はAポケットに、P2はBポケットに、PΩはFポケットに収容される。

B： $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ヘリックス、 β シートから構成される抗原結合溝。HLA-A*02:01を例にAからFまでのポケットを示す。PDB ID：7RTDより作成。

C：HLA-A*02:01の $\alpha 1$ ヘリックスを奥に見た抗原結合溝（半透明緑）とペプチド（黄色、スティックモデル）を示す。9-merペプチド（YLQPRTFLL）のうち、AポケットにP1アミノ酸のTyr、BポケットにP2アミノ酸のLeu、FポケットにPΩアミノ酸のLeuが収容されている。PDB ID：7RTDより作成。

D：HLA-A*02:01の $\alpha 1$ ヘリックスを奥に見たBポケット（半透明緑）とP2アミノ酸（Leu、黄色、空間充填モデル）、周辺アミノ酸（Phe9, Met45, Glu63, Lys66, Val67, His70, Tyr99、緑色、スティックモデル）を示す。PDB ID：7RTDより作成。

アカゲザル LP1 分子のリポペプチド結合様式

Myr-GGAIS を結合した Mamu-B*098 および Myr-GGAI を結合した Mamu-B*05104 の X 線結晶構造解析により、これらの MHC クラス I 分子によるリポペプチド結合の基本様式が明らかとなった[30, 31]。ともに抗原結合溝には MHC クラス I 分子に特徴的な 6 つのポケット構造が確認され、ミリスチン酸が B ポケットに、またペプチド部分の C 末端アミノ酸残基 (Myr-GGAIS の場合は Ser、Myr-GGAI の場合は Ile) は F ポケットに収納された (図 5A)。また A ポケットにはリガンドは存在しなかった。ミリスチン酸の鎖長はどの必須アミノ酸側鎖 (アミノ酸一覧表参照) より長いため、リポペプチド結合には深い B ポケット構造が必要であると考えられる。前述した B ポケットのアンカー特性を規定するアミノ酸群 (9, 45, 63, 66, 67, 70, 99 番目のアミノ酸残基) のうち、9 番目のアミノ酸は B ポケット底部中央の β シート上に存在し、その側鎖はポケット内腔に突き出す形でポケットの深さを制御する。ペプチド提示 MHC クラス I 分子においては 9 番目のコンセンサスアミノ酸残基が Tyr であり、その嵩高い側鎖は B ポケットのサイズ縮小に寄与している (図 5B, 右パネル)。対照的に、Mamu-B*098 や Mamu-B*05104 では、9 番目にそれぞれ Ser、Gly のような小さいアミノ酸が配置され、深い B ポケットが構築されている (図 5B, 左・中央パネル)。

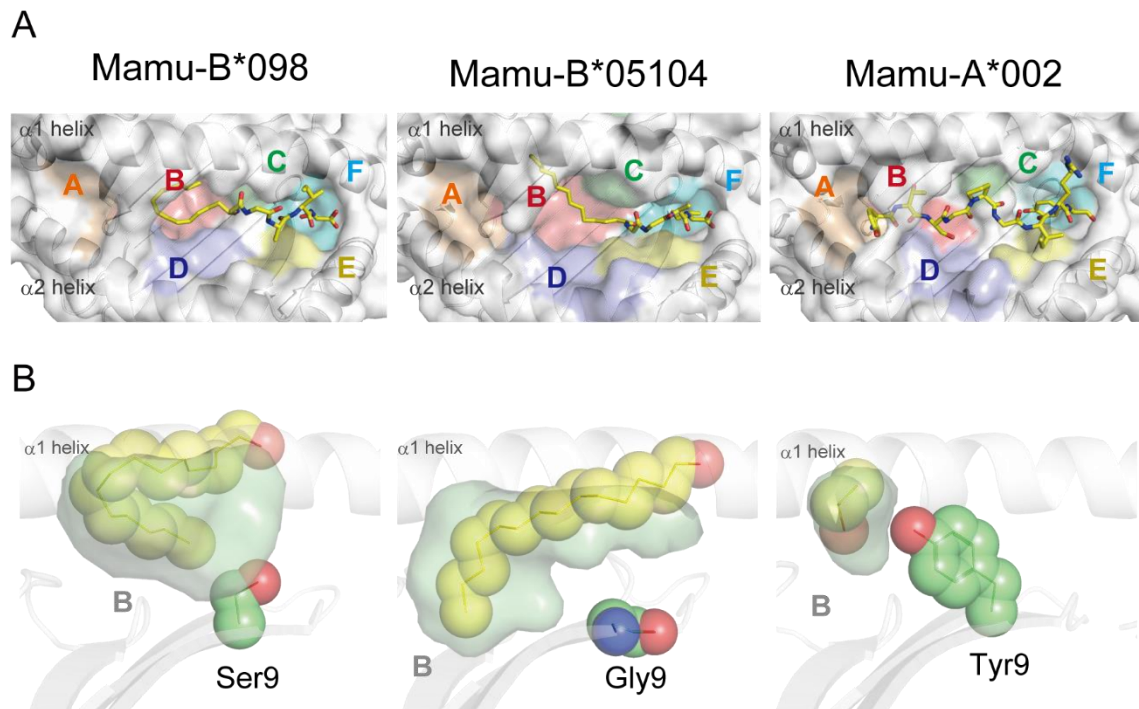


図5：ペプチド提示MHCクラスI分子とLP1分子の結晶構造

A：抗原結合溝のAからFポケットと各リガンド（黄色、スティックモデル）を示す。

B：それぞれのBポケット（半透明緑）と結合しているリガンド（黄色、空間充填モデル）、底部に位置する9番目のアミノ酸（緑色、空間充填モデル）を示す。PDB ID:4ZFZ (Mamu-B*098)、6IWG (Mamu-B*05104)、3JTT (Mamu-A*002) から作成。

ヒト LP1 分子は存在するのか

ヒトの MHC クラス I 分子、つまり HLA クラス I 分子においても、LP1 に相当する allomorph は存在するのだろうか。HLA 領域は、ヒトゲノムにおいて最も多型性が認められており [41]、報告されているアレル数は HLA クラス I だけでも 24,000 種類を超える (IPD-IMGT/HLA の登録総数)。ヒトにおいてもアカゲザルと同様の進化を遂げ、LP1 が生み出されている可能性は十分に考えられる。他方、Mamu-B*098 や Mamu-B*05104 のように TAP 機能に全く依存せずに細胞表面に発現する HLA クラス I 分子は確認されていない。本研究では、B ポケットの深さを規定する 9 番目のアミノ酸を切り口として、ヒト LP1 の同定を目標としたアプローチを進めた。

第 2 章：手法

CASTp によるポケット体積の計算

PDB (<https://www.rcsb.org/>) に登録されている HLA クラス I 結晶構造 (表 2) について、ポジション 7, 9, 22, 24, 34, 35, 36, 45, 63, 66, 67, 70, 74, 97, 99, 159, 163 のアミノ酸を選択し、CASTp ウェブサーバー (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?1bxw>) で Radius probe を 1.4 Å を設定した上で、B ポケットの体積を計算した[42]。

タンパク質の調製

HLA-A*24:02 重鎖 α 1 ドメイン (Gly1 より Ser93 まで)、HLA-C*14:02 重鎖全長 (Gly1 より Pro276 まで、C1G 変異を導入)、およびヒト β 2m (Ile1 より Met99) は N 末端に Ala を付加したうえで大腸菌レアコドン修正し人工合成 (IDT) を委託した。HLA-A*24:02 の重鎖 α 2, α 3 ドメインは、ヒト PBMC からクローニングした cDNA 配列をテンプレートとして PCR にて増幅した。人工合成品と PCR 産物は制限酵素処理した後に、pET-21c (+) プラスミドに組み込んだ。また、HLA-A*24:50、HLA-C*14:02 (S9Y) は部位特異的変異導入によって作製した。各コンストラクトを用いて大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS 株 (Novagen) を形質転換し、100 ug/mL Ampicillin 含有 LB プレートで 37°C、13 時間培養した。生じたコロニーを pick up し 37°C、200 rpm、LB 培地で 7 時間振とう培養(前培養)した後に、得られた菌液を 2 L バッフル付三角フラスコに移し、37°C、200 rpm、LB 培地で振とう培養(本培養)した。OD600 が 0.5 に達した際に IPTG (終濃度 0.5 mM) を添加し、37°C、200 rpm で さらに 5 時間振とう培養した。培養液を回収し、5000 rpm、4°C で 20 分間遠心 (himac CR20GIII (HITACHI)) した。以降の操作は液量 (L) \times OD600 の値が 5 程度の場合の操作であり、この値を参考に実測値に従って液量を変更した。集菌後、60 mL の Resuspension buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、25%w/v スクロース、1 mM EDTA \cdot 2Na (pH8.0)、0.1%w/v NaN₃、10 mM

DTT) で懸濁し、ビーカーへと移した。そこへ 1 mL の 50 mg/mL Lysozyme を添加し、室温で 1 時間穏やかに攪拌した後、250 mL の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、1%w/v CHAPS、1%w/v sodium deoxycholate、100 mM NaCl、1 mM EDTA · 2Na (pH8.0)、0.1%w/v NaN₃、10 mM DTT) を添加し、さらに 1 時間攪拌した。その後、0.5 mL の 2 mg/mL DNase I、2.1 mL の 1 M MgCl₂ を添加し、室温で 5 時間穏やかに攪拌した。攪拌後、7000 rpm、4°C で 25 分間遠心した。ペレットに 40 mL の Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5%w/v CHAPS、100 mM NaCl、1 mM EDTA · 2Na (pH8.0)、0.1%w/v NaN₃、1 mM DTT) を添加し、氷上で 30 秒間超音波破碎した後に 30 秒間静置を 3 回繰り返して懸濁させ、7000 rpm、4°C で 25 分間遠心した。この洗浄操作を再度繰り返し、ペレットに 40 mL の Rinse buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA · 2Na (pH8.0)、0.1%w/v NaN₃、1 mM DTT) を添加し、氷上で 30 秒間超音波破碎した後に 30 秒間静置を 5 回繰り返した。その後 7000 rpm、4°C で 25 分間遠心した。ペレットを 20 mL の Solubilization buffer (6 M グアニジン塩酸塩、25 mM MES (pH6.0)、10 mM EDTA · 2Na、1 mM DTT を含む) にて溶解した後、2 mL チューブ (Eppendorf) に分注して 17400 g、20°C、2 時間遠心 (MX-100 遠心機を使用) し、上清を回収した。回収した上清に DTT (終濃度 50 mM) を添加した上で、37°C の恒温槽で 2~3 時間加温し、実験使用前まで -80°C のディープフリーザーで保存した。

モデルリガンドの合成

以下のリガンドは Fmoc 固相合成法によって作製した。4-mer リポペプチドの Myr-GANF, Myr-GAAL と 8-mer ペプチドの LANTVATL, LYNTVATL (LL8) [43] は C 末端アミノ酸 (Leu もしくは Phe) が preload された Fmoc C 末端アミノ酸-Wang Resin (渡辺化学) を反応容器に加え、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 5 mL で室温、30 分間攪拌した。DMF を除去し、20%v/v ピペリジン/DMF による脱保護反応を 3 分間、3 分間、10 分間と 3 回繰り返した。脱保護完了後、DMF 5 mL での洗浄操作を 5 回繰り返した。合成量に対して F-moc アミ

ノ酸 (3 等量)、HATU (3 等量) を測り、DIPEA (6 等量)、DMF 5 mL と共に転倒混和した後に、反応容器に加えて 1 時間以上攪拌した。縮合完了後、同様に DMF での洗浄操作を 5 回繰り返した。脱保護と縮合は各ステップ後に、ニンヒドリン反応を利用してアミノ基を検出する Kaiser テストを行って評価した。ミリスチン酸の縮合では、まず、ナスフラスコに合成量に対してミリスチン酸 (6 等量)、HOBT・H₂O (6 等量) を加えた。次に、窒素噴霧下で 5 mL の脱水ジクロロメタン、脱水 DMF を加えた後塩化カルシウム管を用いて、室温、1 時間攪拌しミリスチン酸無水物を得た。N 末 Gly の脱保護後、ミリスチン酸無水物を 3 時間、一晩と 2 回の縮合反応を行った。合成産物は一晩の減圧乾燥を行った後、95%v/v TFA、2.5%v/v 超純水、2.5% v/v TIPS を加えて氷上 5 分、その後、室温 3 時間反応させ樹脂から切り出した。最後に 20% v/v 酢酸/ジエチルエーテル溶液を加えて、数回エバポレートすることで酢酸塩に置換した。置換後のサンプルは超純水に溶解あるいは懸濁させ、凍結乾燥させた。8-mer ペプチドの RAGFVANF, RYGFVANF (RF8) [44]は合成品を委託購入した (Genscript)。

リフォールディング

HLA クラス I 重鎖とヒトβ2m のリコンビナントタンパク質各 1 μmol を含む Solubilization buffer (6 M グアニジン塩酸塩、10 mM EDTA・2Na (pH8.0)) 30 mL をシリンジに充填した。5 μmol 分のリガンドを添加した 1 L の 4°C Refolding buffer (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・2Na (pH8.0)) を調製した。23G 針 (テルモ) を用いてシリンジに充填した変性タンパク質溶液を Refolding buffer に一気に注入し、250 rpm、2 日間 cold room 内で攪拌した。測定の場合のみは、75 mL の Refolding buffer を用い、重鎖 (1 μM)、ヒトβ2m (1 μM)、リガンド (10 μM) の条件を採用した。2 日後に溶液を回収し、透析チューブ (Thermo Fisher Scientific) を用いてリフォールディングスケールに対し 5 倍量の 100 mM Urea、5 倍量の 10 mM Tris-HCl

(pH8.0)、5 倍量の 10 mM Tris-HCl (pH8.0) の順にそれぞれ 12 時間、透析した。透析後のサンプル溶液に陰イオン交換樹脂 (TOYOPEARL DEAE-650M、Tosoh Bioscience, LLC) を添加して 170 rpm、1 時間 cold room 内で攪拌した。上清を除き、樹脂を 10 mL の 10 mM Tris-HCl (pH8.0) で洗浄した。その後、1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.0) でタンパク質を溶出し、次項の精製操作を行った。

リコンビナントタンパク質の精製

AKTA pure 25M (GE Healthcare) にゲル濾過カラム Superdex200 Increase 10/300GL(GE Healthcare)を装着し、TBS (100 mM NaCl,10 mM Tris-HCl pH 8.0) に置換し、タンパク溶出液をアプライした。吸光度 280 nm で認められるピークをタンパク質の溶出とみなし、データを測定、分取した。結晶化させる場合は、ゲル濾過精製サンプルを透析カセット (Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes 10K MWCO 3-12 mL Capacity, Thermo Fisher Scientific) に充填し、サンプル量に対して 100 倍量の 10 mM Tris-HCl pH 8.0 の外液を使用し、3 時間、6 時間、12 時間 4℃で透析を行った。脱塩後、AKTA pure 25M (GE Healthcare) に 10 mM Tris-HCl pH 8.0 にて平衡化させた陰イオン交換カラム MonoQ (GE Healthcare) でイオン交換クロマトグラフィーを行った。脱塩後のサンプルをカラムに吸着させた後、1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 を使って徐々に NaCl 濃度を上げることでサンプルを溶出させ、分取した。回収したサンプルを透析カセット (Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes 10K MWCO 0.5-3 mL Capacity) (Thermo Fisher Scientific) に充填し、100 倍量の 10 mM Tris-HCl pH 8.0 の外液を使用し、3 時間、6 時間、12 時間 4℃で透析を行った。タンパク質濃度は、TaKaRa BCA Protein Assay Kit (TAKARA T9300A-1)を用いて定量した。

X線結晶構造解析

結晶化はシッティングドロップ法を用いた蒸気拡散法にて行った。結晶化のスクリーニングには PACT premier、JCSG-Plus、BCS screen(Molecular Dimension)を用い、結晶化プレート(HAMPTON Research HR3-299)の母液用のウェルに 100 μ L の各母液を分注し、4 $^{\circ}$ Cまたは 20 $^{\circ}$ Cで結晶化を行った(表 1)。結晶は 25% エチレングリコール存在下に、-196 $^{\circ}$ Cで凍結した後、SPring-8 ビームライン I (BL26B1) の X 線を照射し、X 線回折パターンを測定した。HKL2000[45]、もしくは XDS を用いて[46]、得られた X 線回折パターンを mtz ファイルに変換し、HLA-A*24:02 ペプチド共結晶 (PDB ID : 3VXN)、HLA-C*06:02 ペプチド共結晶 (PDB ID : 5W6A) を用いて、CCP4i ソフトウェアから分子置換法により位相を決定した[47, 48]。WinCoot CCP4 ソフトウェアを用いて電子マップから構造を修正し[49]、Phenix ソフトウェアで精密化した[50]。構造の描画には Pymol ソフトウェア (<http://www.pymol.org>) を使用した。

第3章：結果

HLA クラス I 分子のポジション 9 のアミノ酸残基に着目した、ヒト LP1 候補分子の絞り込み

ペプチドを結合するサル MHC クラス I 分子[51]と異なり、2 種類のサル LP1 分子 (Mamu-B*098, Mamu-B*05104) においては B ポケットの底部に位置するポジション 9 に比較的小さなアミノ酸 (それぞれ Ser, Gly) が配置され、ミリスチン酸の収納が可能な深く大きい B ポケットが構築されている (表 2)。そこで、まず HLA クラス I 分子群について、データベース (EMBL-EBI) の情報をもとに、ポジション 9 のアミノ酸の種類とその頻度を検討した。その結果、ヒトにおいてもポジション 9 に最も高い頻度で配置されるアミノ酸は Tyr であり (Tyr9)、次いで His、Phe など比較的高い側鎖を持つアミノ酸が過半数を占めた (図 6A)。一方、側鎖の小さいアミノ酸に関しては、Mamu-B*05104 のようにポジション 9 に Gly を持つ allomorph は存在しなかったが、Mamu-B*098 のようにポジション 9 に Ser (Ser9) を持つ allomorph が HLA-A グループと HLA-C グループに少数ながら存在することが分かった。さらに、既に PDB に登録されている HLA クラス I 結晶 (表 2) に対して B ポケットの体積を計算した結果、Ser9 を有する HLA クラス I 分子の B ポケットは、Tyr9 を有する HLA クラス I 分子の B ポケットと比較して体積が大きい傾向にあることが分かった (図 6B)。そこで、Ser9 を持つ HLA クラス I 分子のうち HLA-A、HLA-C のそれぞれから、日本人集団における高頻度アレルである HLA-A*24:02 と HLA-C*14:02 をヒト LP1 候補として絞り込み、そのリポペプチド結合能を検証した。

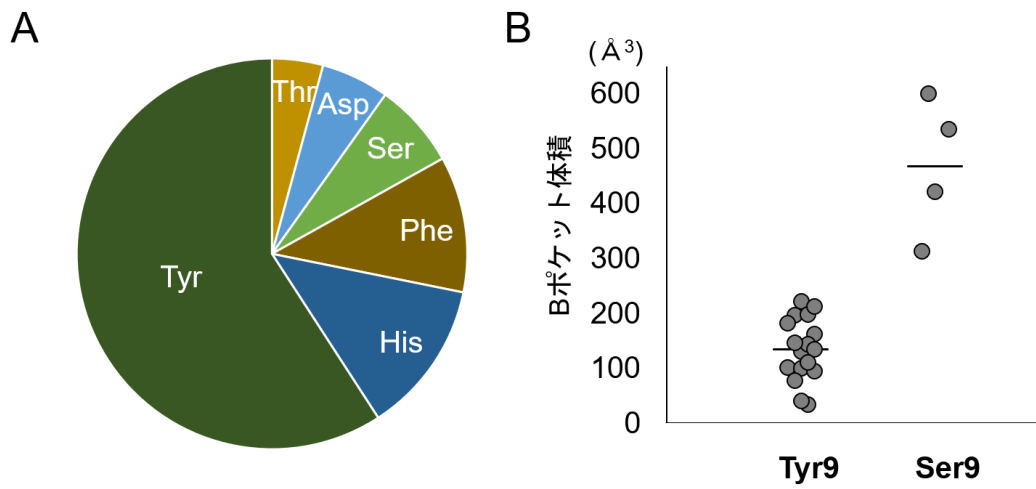


図 6 : HLA クラス I 分子における 9 番目のアミノ酸

A : HLA クラス I 分子を第一区域別に 1 アリル選択し、9 番目のアミノ酸の頻度を円グラフとして示した。(アリル総数 : 71)

B : 既出の結晶構造から Tyr9 を持つ HLA クラス I 分子 (17 種) と Ser9 を持つ HLA クラス I 分子 (4 種) について B ポケットの体積計算値を示す。バーは体積の平均値。

HLA-A*24:02 はリポペプチド依存的に安定的な複合体を形成する

前述のように、MHC クラス I 重鎖と $\beta 2m$ は、小胞体内で適切なリガンドを結合することにより初めて安定的な複合体を形成する。この特性は *in vitro* の実験系においても検証することが可能である。6M グアニジン塩酸塩溶液で変性させたリコンビナント HLA クラス I 重鎖と $\beta 2m$ をリガンドと混和したのち、Refolding buffer に添加して急速にグアニジン塩酸塩濃度を下げると、ゲル濾過クロマトグラフィーで検出可能な 45 kDa の安定的な複合体の形成（リフォールディング）が誘導できる（図 7A）。実際、変性 HLA-A*24:02 重鎖と $\beta 2m$ を HLA-A*24:02 に結合することが分かっている 8-mer ペプチド（RAGFVANF）と混和したのち Refolding buffer に加えてリフォールディングを誘導すると、分子量 45 kDa に相当する溶出体積 15mL のピークが検出される（図 7B, 中央パネル, 矢印）。他方、リガンド非添加の条件で同様の操作を行うと、溶出体積 15mL のシグナルがほとんど消失することから（図 7B, 左パネル）、8-mer ペプチド（RAGFVANF）は HLA-A*24:02 分子のリガンドとして機能し、重鎖、 $\beta 2m$ 、リガンドからなる安定的な三量体が形成されたと判断できる。次に、HLA-A*24:02 がリポペプチドを結合して安定的な三量体を形成する可能性を検討するために、まずモデルリポペプチドをデザインした。アカゲザル LP1：リポペプチド複合体と種々 MHC クラス I：ペプチド複合体の結晶構造の比較解析から、両者において C 末端 3 アミノ酸残基の空間配置や結合様式には有意な差異が認められないこと[30]、および N ミリスチル化配列（Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr）との整合性の観点から Myr-GANF 4-mer リポペプチドを選択し、その存在下における HLA-A*24:02 複合体形成を検証した。その結果、8-mer ペプチド（RAGFVANF）添加時と同様に、溶出体積 15mL のピークが認められた（図 7B, 右パネル, 矢印）。また、認められた溶出体積 15 mL のピークを分取し、SDS-PAGE により構成タンパク質の解析を行ったところ、MHC 重鎖（32 kDa）とヒト $\beta 2m$ （12 kDa）に相当するバンドが検出された（図 7C）。

以上の結果は、HLA-A*24:02 がペプチドリガンドだけでなく、リポペプチドリガンドを結合できることを強く示唆した。しかしながら、アカゲザル LP1 の細胞表面発現は TAP 機能にまったく依存しないことや内因性リガンドとしてペプチドを検出しないことから、アカゲザル LP1 分子はリポペプチドのみを結合し、ペプチド結合能力はないと考えられている[32]。一方、HLA-A*24:02 はペプチドを結合し特異的 CTL を活性化することはよく知られた事実である[52, 53]。リポペプチドが本当に HLA-A*24:02 のリガンドとして機能するのか（すなわち抗原結合溝に結合するのか）、またそうだとすれば、どのような分子機序で物性の異なるペプチドとリポペプチドをともに結合できるのか検証する必要があると考え、X 線結晶構造解析に進んだ。

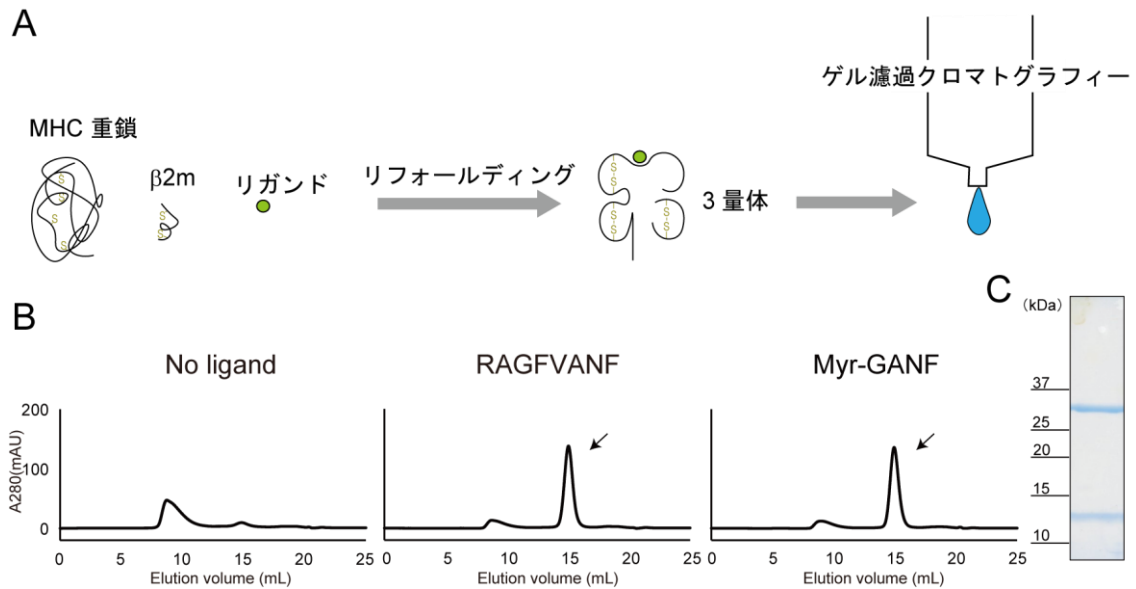


図 7 : HLA-A*24:02 のリガンド依存的複合体形成とその検出

- A : リフォールディングと検出法の概略図を示した。バッファー内では結合可能なリガンドが存在した時のみ、正しい S-S 結合が形成され、MHC クラス I 重鎖 : $\beta 2m$: リガンドの 3 量体が形成される。この 3 量体の分子量は約 45 kDa であり、本実験ではゲル濾過クロマトグラフィーで溶出体積 15 mL に相当する。
- B : HLA-A*24:02 をリガンドなし (左)、モデルペプチド (RAGFVANF、中央) あるいはモデルリポペプチド (Myr-GANF、右) と共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で評価した。どちらのリガンドも溶出体積 15 mL (矢印) でピークが認められた。
- C : Myr-GANF 添加時において 15mL のピークを分取し、SDS-PAGE にかけると HLA-A*2402 重鎖 (32kDa) と $\beta 2m$ (12 kDa) に相当する分子量のバンドを認めた。

リポペプチドは HLA-A*24:02 の抗原結合溝に結合する

まず、HLA-A*24:02 : Myr-GANF 複合体の結晶を得るため、ラージスケールでのリフォーリングを行い、ゲル濾過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーによって複合体を精製した。このサンプルを用いて結晶化スクリーニングを行った結果、1 条件で棒状の結晶が認められた (図 8A)。この結晶に X 線を照射し、最終的に 1.89 Å の解像度で分子モデルを構築した (表 3)。HLA-A*24:02 : Myr-GANF 複合体の全体構造は他の MHC クラス I 複合体の場合と変わらず、 $\alpha 1$ ヘリックス、 $\alpha 2$ ヘリックスと β シートで構成される抗原結合溝が構築されていた (図 8B)。そして、抗原結合溝には、Myr-GANF に相当する連続した電子マップ (polder omit map 3.5σ) が明瞭に確認されたことから、Myr-GANF リポペプチドが HLA-A*24:02 のリガンドとして機能すると結論づけた (図 8C)。また、抗原結合溝には A から F までの 6 つのポケット構造が確認できたが、A ポケットにはリガンドが存在せず、B ポケットにミリスチン酸、F ポケットに C 末端アミノ酸 (PQ) の Phe が収容されていた。したがって、このリポペプチド結合様式は、アカゲザル LP1 分子 (Mamu-B*098, Mamu-B*05104) のリポペプチド結合の基本様式を踏襲したものであった。

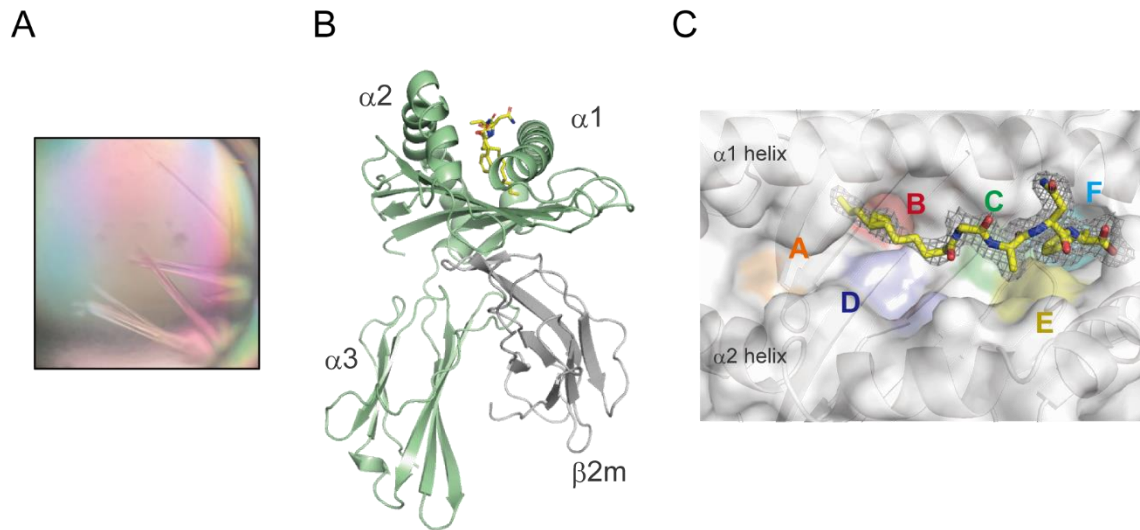


図 8 : HLA-A*24:02 : Myr-GANF 複合体の結晶構造解析

A : サンプル液組成 (7 ug, 0.01 M Tris-HCl (pH8.0), 0.05 M NaCl)、母液組成 (0.002 M ZnCl₂, 0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 20 %(w/v) PEG8000) の条件で棒状単結晶が認められた。

B : HLA-A*24:02 は、 $\alpha 1$ から $\alpha 3$ ドメインで構成される重鎖 (緑色) と $\beta 2m$ (灰色)、Myr-GANF (黄色) の 3 量体を形成していた (1.89 Å)

C : Myr-GANF リガンド (黄色、スティックモデル) と、A-F ポケットで定義される抗原結合溝を示す。Myr-GANF の電子マップ (灰色、メッシュ) は Phenix polder omit map $\sigma = 3.5$ 。

HLA-A*24:02 の Ser9 は、Mamu-B*098 の Ser9 と同様、ミリスチン酸結合に貢献する

前述のように、HLA-A*24:02 と Mamu-B*098 は共に Ser9 を有し、B ポケットにミリスチン酸を収納する。そこで、リポペプチド結合における両者の B ポケット構築および Ser9 の空間配置を比較検討した。まず、Mamu-B*098 : Myr-GGAIS 結晶では、ミリスチン酸が B ポケットに U 字状に收容されるのに対し、HLA-A*24:02 : Myr-GANF 結晶においては、S 字状に收容されていた (図 9A, B)。このようなミリスチン酸のコンフォメーションの違いはあるものの、脂肪酸の先端部分は B ポケット底部に達しており、ポジション 9 のアミノ酸が小さいことがミリスチン酸の收容に重要であることがうかがえた。さらに、Ser9 側鎖のヒドロキシル基は、HLA-A*24:02 の場合は His70 や水分子を介して Asp74 と水素結合を形成し、また Mamu-B*098 の場合は Thr97 と水素結合を形成することにより、B ポケットとは反対側に配向していた。その結果、どちらの場合も Ser9 の C β 炭素とミリスチン酸炭素との間にファンデルワールス相互作用がもたらされ、ミリスチン酸結合に貢献していた。

HLA-A*24:02 の Ser9 を Tyr9 に置換すると、リポペプチド結合能が減弱する

HLA-A*24 ファミリーに属する HLA-A*24:50 は、HLA クラス I 分子のポジション 9 のコンセンサスアミノ酸である Tyr を持つが、それ以外のアミノ酸配列は HLA-A*24:02 と完全に一致している。したがって、HLA-A*24:02 と HLA-A*24:50 のリポペプチド依存的複合体形成の効率を比較することにより、リポペプチド結合におけるポジション 9 のアミノ酸の重要性を直接的に検証することができると考え、HLA-A*24:50 のリフォールディング試験を行った。ペプチド (RAGFVANF) 添加の場合、溶出体積 15mL にリガンド依存的な複合体のピークを認め (図 10A, 中央パネル, 矢印)、リガンド非添加の場合にはピークを認めないことから (図 10A, 左パネル)、HLA-A*24:50 がペプチド結合能を有し、ペプチドリガンド依存的な複合体形成が起きることを確認した。一方、Myr-GANF リポペプチド添加の条件においては、HLA-A*24:02 の場合と比較して (図 7B)、溶出体積 15mL に検出されるリガンド

依存的な複合体のシグナルが減弱していた (図 10A, 右パネル, 矢じり)。このことについて構造学的な洞察を得るために、HLA-A*24:50 : RAGFVANF ペプチド複合体の結晶構造を決定したところ、B ポケットには P2 アミノ酸 (Ala) が収容され (図 10B)、HLA-A*24:50 では Tyr9 側鎖が B ポケット側に突き出す形になっていた (図 10C)。その結果、HLA-A*24:50 では著しく B ポケット体積が縮小しており、ミリスチン酸の安定的な収納に適した B ポケット構造を構築することが困難であると考えられた。

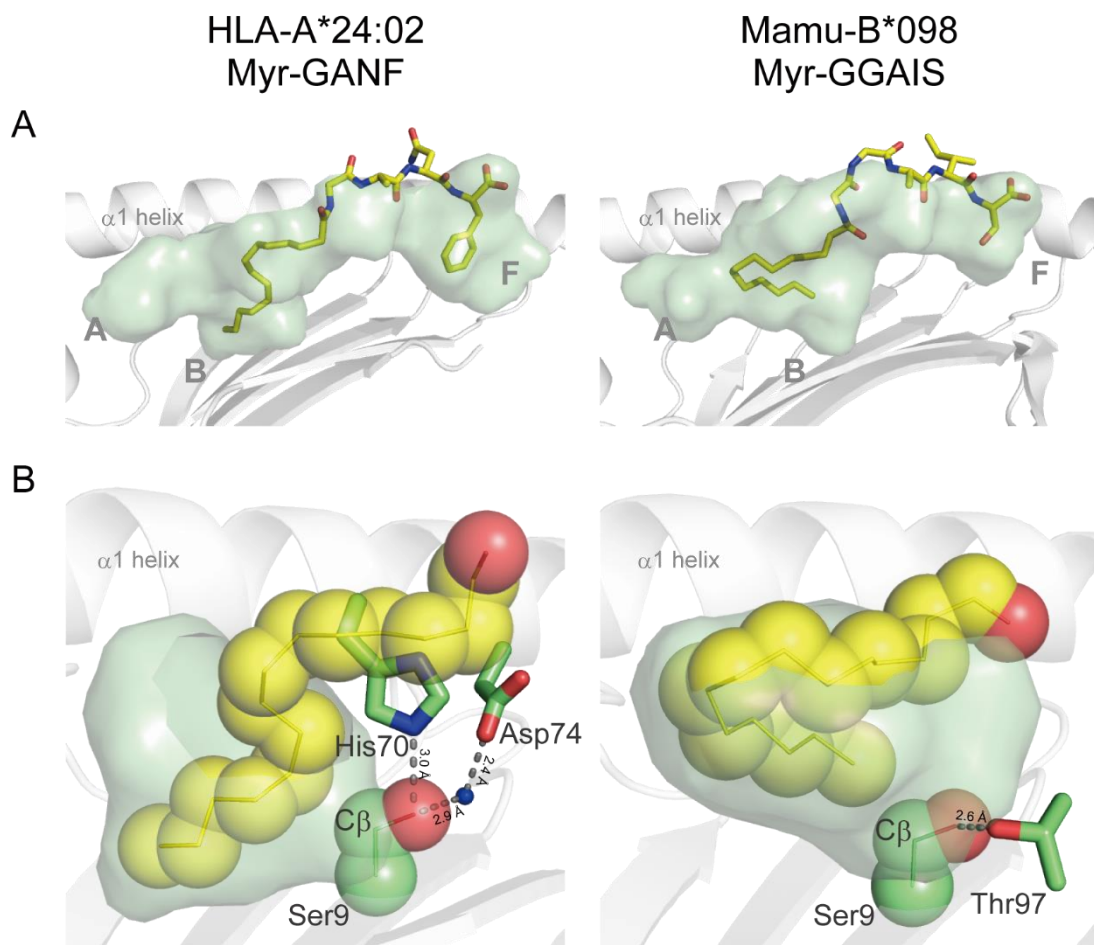


図9：HLA-A*24:02 と Mamu-B*098 のリポペプチド収容様式

A： $\alpha 1$ ヘリックスを奥に見た抗原結合溝（半透明緑）とリポペプチド（黄色、スティックモデル）を示す。

B：ミスチン酸（黄色、空間充填モデル）のBポケット（半透明緑）への結合様式の詳細。Bポケット底部におけるSer9（緑色、空間充填モデル）とその周辺アミノ酸（緑色、スティックモデル）側鎖の水素結合（灰色、点線）を示す。

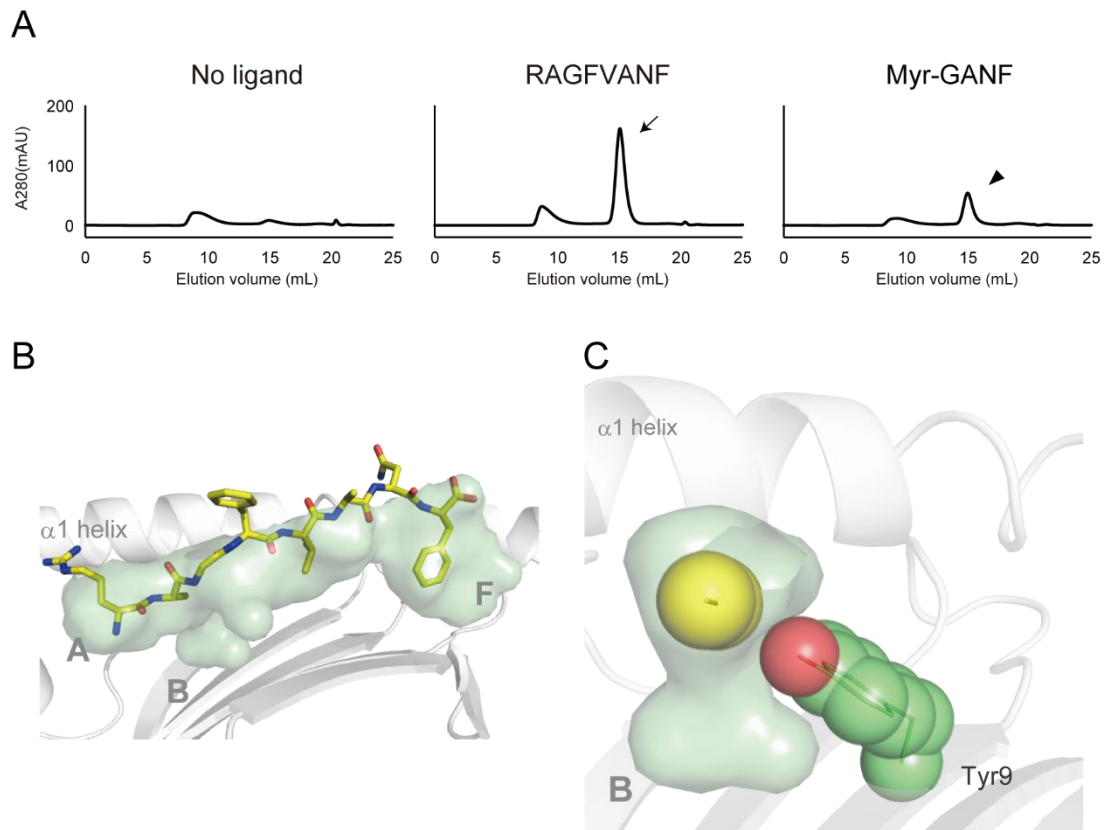


図 10 : HLA-A*24:50 のリポペプチド結合能の検証と結晶構造解析

A : HLA-A*24:50 のリガンド依存的な複合体形成を検出するゲル濾過クロマトグラフィー。抗原なし (左)、モデルペプチド (中央、矢印)、モデルリポペプチド (右、矢じり) を示す。

B : $\alpha 1$ ヘリックスを奥に見た抗原結合溝 (半透明緑) と RAGFVANF ペプチド (黄色、スティックモデル) を示す。

C : P2 アミノ酸の Ala (黄色、空間充填モデル) の B ポケット (半透明緑) への結合様式と B ポケット底部における Tyr9 (緑色、空間充填モデル) を示す。

HLA-A*24:02 は、B ポケットリモデリングにより、ペプチドだけでなくリポペプチドを結合することができる

これまで解析が進められてきたアカゲザル LP1 分子 (Mamu-B*098、Mamu-B*05104) とは異なり、HLA-A*24:02 はペプチドだけでなくリポペプチドを結合する能力 (dual binding ability) を有することが明らかとなった。このことは、HLA-A*24:02 の B ポケットがペプチドリガンドの P2 アミノ酸のみならず、リポペプチドリガンドの脂肪酸 (ミリスチン酸) という異質の化学物性を有する分子を収納できることを示唆している。HLA-A*24:02 の dual binding ability の分子基盤を解明するために、ペプチド (RYGFVANF; RF8) 結合 HLA-A*24:02 とリポペプチド (Myr-GANF) 結合 HLA-A*24:02 の結晶構造を比較検討した (図 11A)。

まず、F ポケットに収納された C 末端アミノ酸 (Phe) の空間配置には差異が認められず、周辺アミノ酸 (Asn77、Tyr84、Thr143、Lys146、Trp147) との水素結合ネットワークの構築パターンもまた同一であった (図 11B)。一方、A ポケットにおいては、Myr-GANF リポペプチドが結合した場合にはリガンドが存在しないが、RF8 ペプチドが結合した場合は P1 アミノ酸 (Arg) が結合していた。しかし、A ポケットにリガンドが存在するかないかに関わらず、A ポケットのリガンド結合を担う Tyr クラスタ (Tyr7、Tyr59、Tyr159、Tyr171) の空間配置は、両者でほとんど変わらなかった (図 12)。ペプチド結合の場合は、Arg の主鎖アミノ (NH₂) 基の N 原子、カルボニル (CO) 基の O 原子と Tyr クラスタのヒドロキシル基の間に水素結合が形成されていた (図 12, 右パネル)。一方、リポペプチド結合の場合は、ペプチド結合時の主鎖 N 原子、O 原子と同じ位置に、水分子が配置されることにより、水分子と Tyr クラスタのヒドロキシル基の間にペプチド結合時と同様の水素結合ネットワークが形成されていた (図 12, 左パネル)。したがって、ペプチド結合の場合でもリポペプチド結合の場合でも、A ポケットと F ポケットの基本構造は不変であると結論づけた。

一方、B ポケットにおいては、Myr-GANF 結合の場合はミリスチン酸、ペプチド結合の場合は P2 アミノ酸 (Tyr) が結合した (図 13)。どちらの場合においても、Ser9 側鎖のヒドロ

キシル基は His70 のイミダゾール環と水素結合を形成することにより、B ポケットの反対側に向く形で深い B ポケットが維持されていた。対照的に、His70 のイミダゾール環において、結合リガンドの違いに適応した空間配置の変化が認められた。ミリスチン酸結合の場合、Ser9 の C β 炭素原子に加えて His70 のイミダゾール環の C δ 2 炭素原子がミリスチン酸炭素原子とファンデルワールス相互作用を形成し、安定的な脂肪酸結合に寄与する (図 13, 左パネル)。これに対して、P2 Tyr 結合の場合は、イミダゾール環の時計回りの回転 (二面角において χ 2 約 130 度に相当) を認め、その結果として C δ 2 炭素原子の代わりに N δ 1 原子が B ポケット面に表出し、P2 Tyr のヒドロキシル基との間で水素結合を形成することにより安定的な P2 アミノ酸結合に貢献した (図 13, 右パネル)。したがって、HLA-A*24:02 分子は、リガンドの種類に応じた適切な B ポケットリモデリングを介して、その dual binding ability を発揮すると結論づけた。

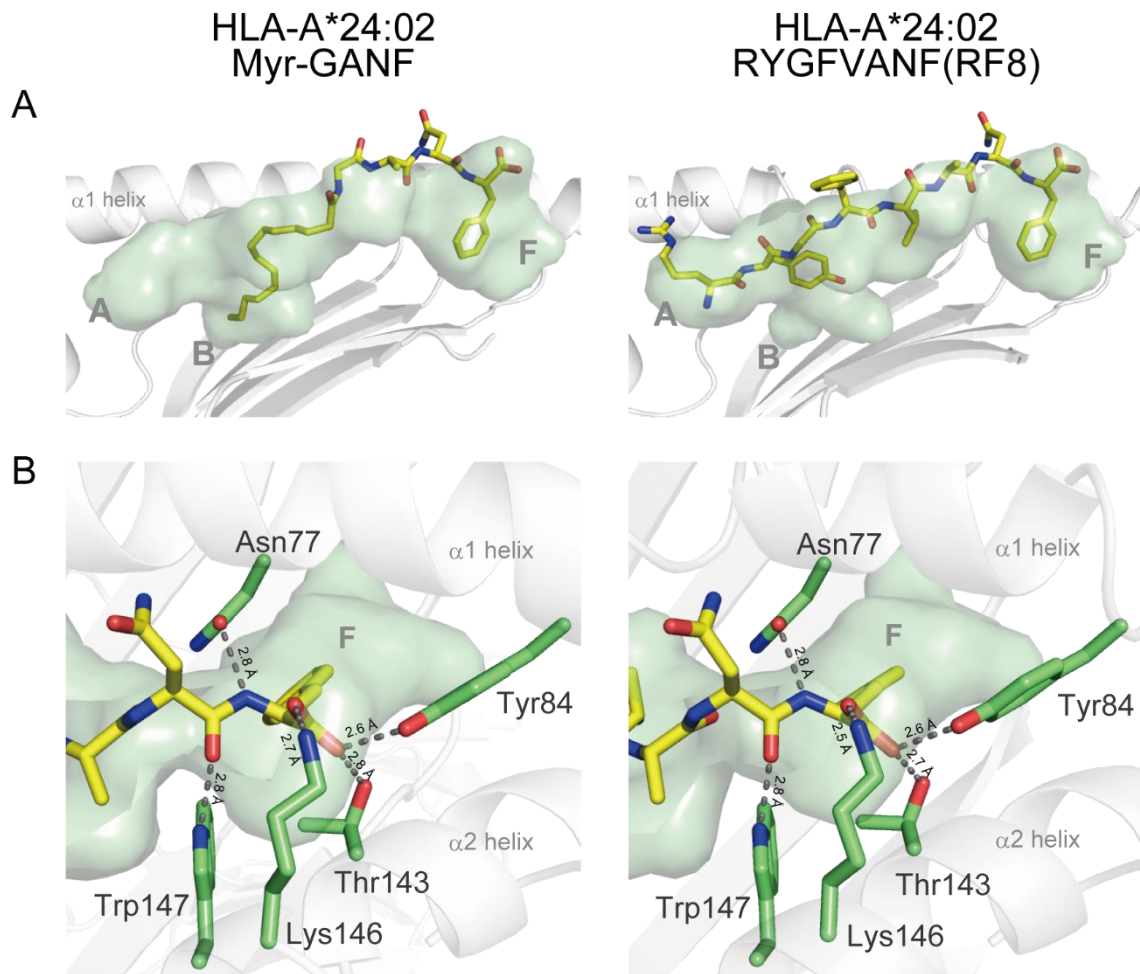


図 11 : Myr-GANF と RYGFVANF (RF8) の結合様式の比較

- A : $\alpha 1$ ヘリックスを奥に見た抗原結合溝 (半透明緑) と Myr-GANF リポペプチド (黄色、スティックモデル、左) と RF8 ペプチド (黄色、スティックモデル、右) を示す。
- B : リポペプチド(左)とペプチド(右)の F ポケット (半透明緑) 結合様式の比較図。F ポケットを構成するアミノ酸 (緑色、スティックモデル) 側鎖は、その配向やリガンドとの水素結合 (灰色、点線) の箇所が両者で同一であった。

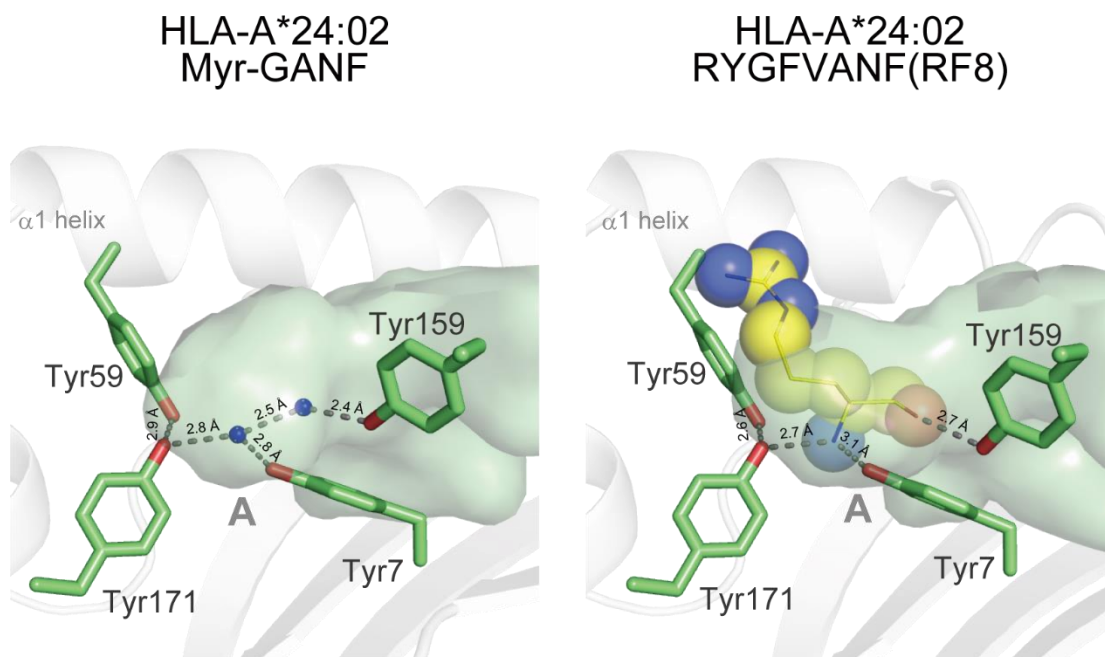
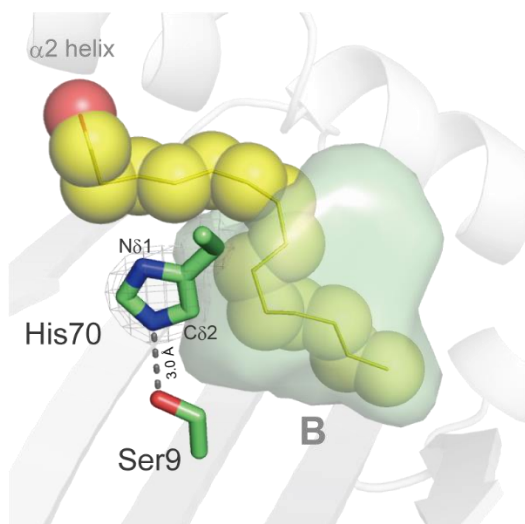


図 12 : A ポケットの結合様式の比較

Myr-GANF リポペプチド (左) と RF8 ペプチド (右) の A ポケット結合様式の比較図。リポペプチド結合時、A ポケット周辺の Tyr クラスター (緑色、スティックモデル) と水分子 2 つが形成する水素結合 (左) は、ペプチド結合時の同 Tyr クラスターと P1 アミノ酸 Arg 主鎖 (黄色、空間充填モデル、右) の水素結合 (灰色、点線) と同等であった。

HLA-A*24:02
Myr-GANF



HLA-A*24:02
RYGFVANF(RF8)

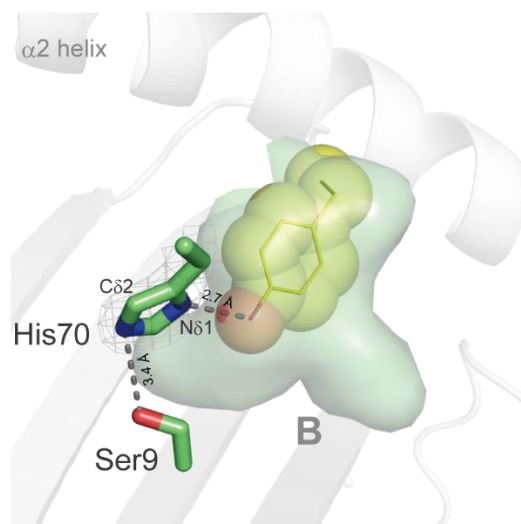


図 13 : B ポケットにおける His70 イミダゾール環の回転

Myr-GANF のミリスチン酸（黄色、空間充填モデル、左）と RF8 の P2 アミノ酸 Tyr（黄色、空間充填モデル、右）の B ポケット（半透明緑）結合様式を示す。どちらの場合も His70 側鎖（緑色、スティックモデル）は Ser9 側鎖（緑色、スティックモデル）と水素結合（灰色、点線）を形成していた。His70 側鎖の電子マップは 2Fo-Fc マップ 2.0 σ （灰色、メッシュ）によって表しており、His70 側鎖が確かにモデルの通りに配位していることを示している。

HLA-C*14:02 は、Ser9 が直接関与した B ポケットリモデリングを介して、dual binding ability を発揮する

Ser9 を有するもう一つのヒト LP1 候補分子 HLA-C*14:02 についても、リポペプチド結合能の検証を行った。まずリガンド結合依存的三量体形成実験において、HLA-C*14:02 は、ペプチド (LANTVATL) 添加の条件だけでなく、リポペプチド (Myr-GAAL) 添加の条件においても、リガンド非添加においては検出されない溶出体積 15 mL のピークを認めたことから dual binding ability を有することが確認された (図 14A)。対照的に、HLA-C*14:02 の Ser9 を Tyr に置換した S9Y ミュータントにおいては、ペプチド結合依存的な複合体形成と比べてリポペプチド結合依存的な複合体形成が著しく減弱した (図 14B)。したがって、HLA-C*14:02 においてもポジション 9 のアミノ酸がリポペプチド結合を制御していることが示唆された。

HLA-C*14:02 の dual binding ability の構造学的基盤を解明するために、HLA-C*14:02 : Myr-GAAL 複合体および HLA-C*14:02 : LYNTVATL (LL8) 複合体の X 線結晶構造解析を行った (表 3)。まずリポペプチド結合 HLA-C*14:02 において、ミリスチン酸は B ポケットに、また C 末アミノ酸 (Leu) は F ポケットに収容され、A ポケットにはリガンドが存在しない点において、HLA-C*14:02 のリポペプチド結合の基本様式は HLA-A*24:02 と同等であった (図 15A)。次に、HLA-C*14:02 の B ポケットにおけるミリスチン酸の結合様式と P2 アミノ酸 (Tyr) の結合様式の比較を行ったところ、ミリスチン酸結合の場合、Ser9 側鎖は B ポケットの反対側に配向し、側鎖のヒドロキシル基は水分子を介して Asp74 と水素結合を形成した (図 15B, 左パネル)。その結果、深い B ポケットが形成されると同時に、Ser9 の C β 原子がポケット面に表出し、ミリスチン酸炭素原子とファンデルワールス相互作用を形成することにより、安定的なミリスチン酸結合に寄与した。これとは対照的に、P2 Tyr 結合の場合、Ser9 側鎖は Asp74 との水素結合を失って B ポケット内腔を向き、P2 Tyr のヒドロキシル基

の間に新たな水素結合が形成されていた (図 15B, 右パネル)。したがって、HLA-C*14:02 の dual binding ability においては、Ser9 自体の水素結合パターンの変化を介した B ポケットリモデリングが重要な役割を果たしていると結論づけた。

以上より、HLA-A*24:02 と HLA-C*14:02 はヒト LP1 分子として機能する可能性が示された。そして、ポジション 9 のアミノ酸選択と B ポケットの可塑性が dual binding ability の要件となることが明らかとなった。

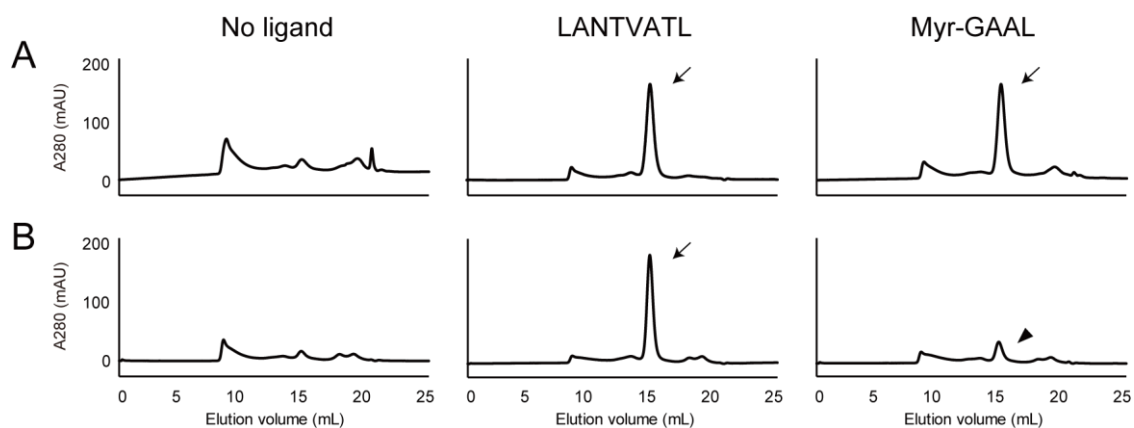


図 14 : HLA-C*14:02 と HLA-C*14:02 (S9Y) のリガンド依存的複合体形成

A : HLA-C*14:02 をリガンドなし (左)、モデルペプチド (LANTVATL、中央) あるいはモデルリポペプチド (Myr-GAAL、右) と共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で評価した。どちらのリガンドも溶出体積 15 mL (矢印) でピークが認められた。

B : HLA-C*14:02 (S9Y) を、同様にリガンドなし (左)、モデルペプチド (中央)、モデルリポペプチド (右) と共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で評価した。モデルペプチド存在下においては、HLA-C*14:02 と同等のピーク (矢印) が認められたものの、モデルリポペプチド存在下においては、ピーク強度が減弱した (矢じり)。

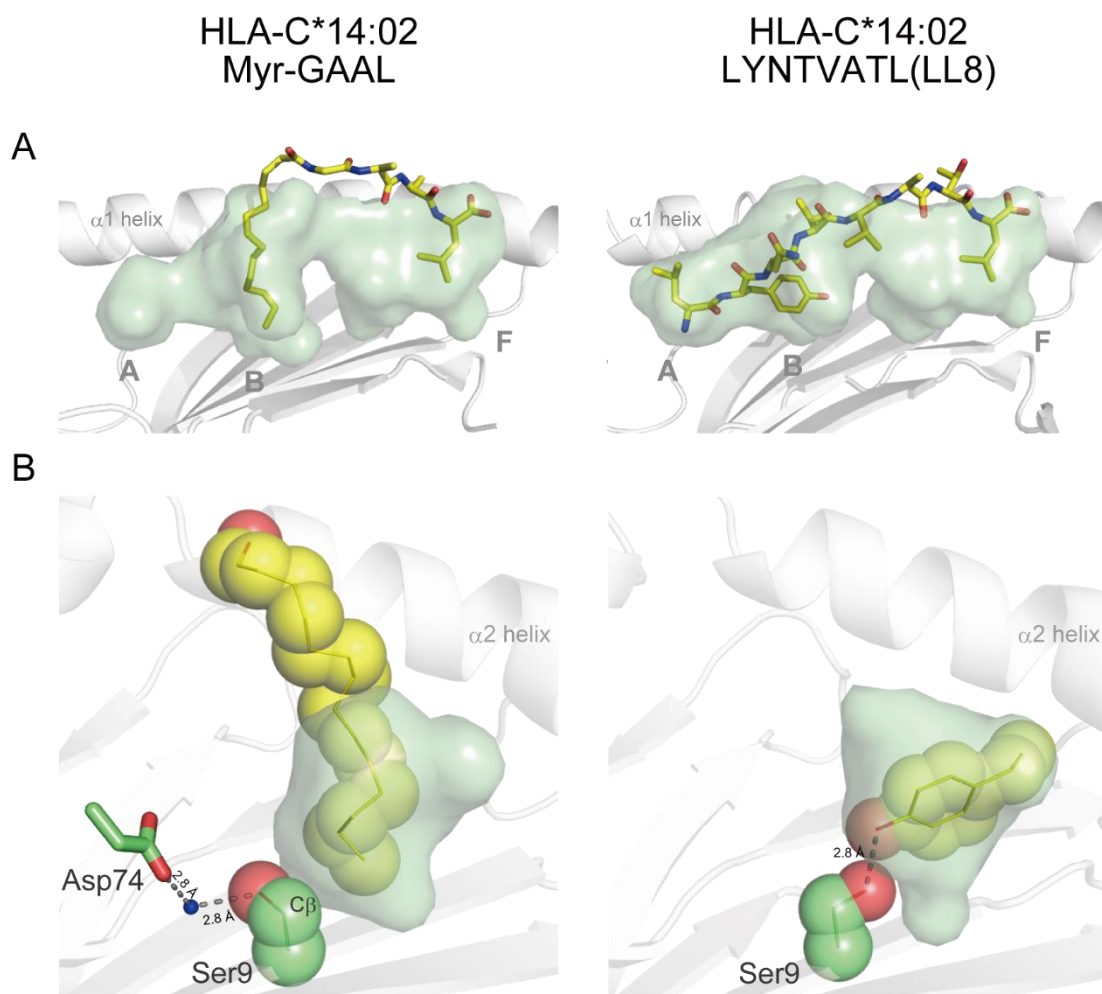


図 15 : HLA-C*14:02 における B ポケット構造の変化

A : $\alpha 1$ ヘリックスを奥に見た抗原結合溝 (半透明緑) と Myr-GAAL リポペプチド (黄色、スティックモデル、左) と LL8 ペプチド (黄色、スティックモデル、右) を示す。

B : Myr-GAAL のミリスチン酸 (黄色、空間充填モデル、左) と LL8 の P2 アミノ酸 Tyr (黄色、空間充填モデル、右) の B ポケット (半透明緑) 結合様式を示す。ミリスチン酸の場合、Ser9 側鎖 (緑色、スティックモデル) は Asp74 側鎖 (緑色、スティックモデル) と水分子を介した水素結合を形成する一方で、P2 アミノ酸 Tyr の場合は Ser9 側鎖が回転し、P2 アミノ酸 Tyr 側鎖と水素結合を形成していた。

第4章：考察

Dual binding ability を有するヒト LP1 分子の同定とそこから見えてくる進化過程

本研究によって、リポペプチド結合能を有する HLA クラス I 分子が初めて同定された。研究の起点は、アカゲザル LP1 分子がポジション 9 に頻度の低い小さなアミノ酸残基を有する点であり、その着眼は間違いではなかったと考えられる。その一方で、アカゲザル LP1 分子がリポペプチドのみを結合することとは対照的に、ヒト LP1 分子 (HLA-A*24:02, HLA-C*14:02) がペプチドとリポペプチドをともに結合できる dual binding ability を有する点は私の当初の想定を超えた発見であった。現時点でその分子基盤を一元的に説明することはできないが、ポジション 9 のアミノ酸だけでなく、B ポケットを構成する他のアミノ酸群の組み合わせの総和として作り出される B ポケットの基本骨格や可塑性 (リモデリング機構) ならびに静電ポテンシャルが深く関与しているものと思われる。この点は、これらのアミノ酸群をシステミックに置換した変異分子のリガンド結合能を一つ一つ評価していくことにより、一定の答えが見出せると考えている。

他方、アカゲザルはヒトとは異質の MHC クラス I 進化を辿ってきた点は考慮に値する。アカゲザルが属するオナガザル上科 (旧世界ザル) とヒトが属するヒト上科 (ヒト・類人猿) は約 2500 万年以上前に分岐し、その後アカゲザルに固有の MHC クラス I 進化が認められている[54]。アカゲザルにおいては、ダイナミックな遺伝子重複や脱落、活発な突然変異と組み換えの結果として、Mamu-A 遺伝子領域内と Mamu-B 遺伝子領域内に多数の遺伝子座が構築されてきた (Mamu-C 遺伝子領域は欠失している) [55]。しかも、遺伝子座の数は一定ではなく、ゲノム毎に異なることが知られている[56]。さらに Mamu 遺伝子領域内には、偽遺伝子の存在が顕著である。このような一見乱暴とも思える MHC クラス I 進化の過程で、リポペプチド結合に特化した MHC クラス I 分子が創生されてきたと考えられる。一方ヒトにおいては、ゲノム上に 3 つの MHC クラス I 遺伝子座 (HLA-A, -B, -C) が安定的に維持され、それぞれの遺伝子座において突然変異を基盤とした対立遺伝子が生み出されては進化

的な淘汰を受けてきた。したがって、dual binding ability を有するヒト LP1 分子は、ペプチド結合に特化した MHC クラス I 分子群を出発点としてリポペプチド結合に特化した MHC クラス I 分子群が生み出される長い進化の過程において、いわば中間産物と位置付けることができよう。

ヒト LP1 と結合するウイルスリポペプチドレパトア

HLA-A*24:02 と HLA-C*14:02 が実際にどのようなウイルスリポペプチドを結合し、提示し得るか考察する。この2つの HLA クラス I 分子に結合するペプチドリガンドの網羅的解析（レパトア解析）から、F ポケットに収納される C 末端のアンカー配列は共通であり、疎水性の高い Phe、Leu、Val、Ala が選好される[39, 40]。そこで、ミリスチル化配列を考慮しつつ 4-mer リポペプチドを想定し、Myr-GXXZ（X は任意のアミノ酸、Z = F, L, V, A）に該当する配列を探索し、下表にまとめた[57, 58]。これらのウイルスリポペプチドはいずれも HLA-A*24:02 や HLA-C*14:02 に結合可能と考えられ、これを特異的に認識する T 細胞群はウイルス感染防御の一翼を担っている可能性がある。

ウイルス名 (和名)	ウイルス名 (英名)	タンパク質	N末端から4-mer分の配列
ヒト免疫不全ウイルス	HIV	Gag	Myr-GARA...
ヒトT細胞白血病ウイルス1型	HTLV-1	Gag	Myr-GQIF...
B型肝炎ウイルス	HBV	pre-S1	Myr-GQNL...
単純ヘルペスウイルス1型	HSV-1	UL11	Myr-GLSF...
ヒトサイトメガロウイルス	HCMV	UL99	Myr-GAEL...

上記のタンパク質は、ミリスチン酸修飾を受けることにより、免疫分子の機能抑制やウイルス膜融合、あるいは出芽の促進などの機構を介して、ウイルスの生存や感染、増殖など病原性と深く関わっている[59-61]。逆にこれらのウイルスタンパク質のミリスチル化を検

出する CTL 応答は、感染防御の観点から極めて有効である。同時にそれは、リポペプチドという新しい抗ウイルスワクチンの開発にもつながることが期待される。

HLA-A*24:02 や HLA-C*14:02 は、世界的に頻度が高いアリルであるが、特に日本において顕著であり、日本人における HLA-A*24:02 保有率は 58%、HLA-C*14:02 保有率は 15%である[62]。ある地域の HLA アリル頻度と土着の感染症との間には相関があると考えられており[63, 64]、HLA-A*24:02 や HLA-C*14:02 が、日本で流行した感染症の影響で進化的に濃縮した可能性は十分に考えられる。例えば、成人 T 細胞白血病リンパ腫は、T リンパ球に発症する癌であり、原因ウイルスは、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) である。流行には地域性があることが認められており、日本の沖縄・九州地方などにキャリア感染者が多い[65]。HLA-A*24:02 や HLA-C*14:02 はリポペプチド抗原提示能力により、他のアリルより HTLV-1 感染に対する制御能が高く、日本人においてこれらのアリルを保有する選択圧が働いたのかもしれない。今後、ウイルス流行地域と HLA クラス I 頻度との相関性を調べる際には、HLA クラス I 分子のリポペプチド提示能の観点も加味して、検討する必要がある。

ウイルスリポペプチド特異的 T 細胞応答に起因する自己免疫疾患

ウイルス感染に伴い、しばしば自己免疫疾患の発症や増悪が起きることが知られている [66, 67]。ウイルス抗原を認識する T 細胞が自己抗原に対して交差反応性を示すことが主要な要因と考えられている [68]。Mamu-B*05104 : Myr-GGAI 複合体を特異的に認識する TCR (SN45) の結晶構造解析の結果から、TCR が認識する主たる T 細胞エピトープはミリスチン酸とペプチドの間にあるアミド結合とペプチド部分のごく限られたアミノ酸残基であると考えられており [69, 70]、ウイルスリポペプチドと自己リポペプチドの明確な免疫識別は理論上困難である。したがって、リポペプチド特異的 T 細胞が自己免疫疾患の発症に関わっている可能性は十分に考えられる。

1 型糖尿病は何らかの免疫機序で膵β細胞が破壊され、インスリンが産生されない自己免疫疾患である。先行研究によると、1 型糖尿病急性患者のうち HLA-A*24:02 保有者で膵β細胞の破壊が認められ[71, 72]、また 10 代以下の若い世代の患者に HLA-A*24:02 の保有率の高さが指摘されている[73, 74]。さらに、エンテロウイルスはコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体 (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor : CAR) を介してβ細胞に感染し、感染を契機に 1 型糖尿病が発症もしくは病状が悪化するという報告がある[75, 76]。この 2 点を併せて、エンテロウイルス感染により、HLA-A*24:02 保有者の若い世代に 1 型糖尿病発症率が上昇する可能性を考察したい。

手足口病やコクサッキーウイルスヘルパンギーナはエンテロウイルス属のコクサッキーウイルス、エンテロウイルスが原因ウイルスであり、5 歳以下の小児が罹患しやすい[77, 78]。エンテロウイルスのカプシドを構成する VP4 タンパク質はミリストイル化修飾を受け、Myr-GAQVST…の配列を持つ。VP4 タンパク質はエンテロウイルス属のライノウイルスやポリオウイルスも保有しており、ミリストイル化配列とオーバーラップした N 末端から 5 つのアミノ酸の配列は保存されている[79, 80]。一方、ヒトにはユビキタスに組織発現する内在性ミリストイル化タンパク質として、CYB5R3 や MARCKS タンパク質等が存在し、どちらも膵島に発現し機能することが分かっている[81, 82]。ミリストイル化 CYB5R3 の N 末配列は Myr-GAQLSL…、ミリストイル化 MARCKS の N 末配列は Myr-GAQFSK…であり、4-mer のリポペプチドを想定すれば、ウイルス由来の VP4 リポペプチドとは C 末端のアミノ酸 (PQ) が異なるのみである。PQ アミノ酸は通常 F ポケット内部に深く収容され、TCR の認識に直接的には影響しない。したがって、ウイルス由来の配列 (Myr-GAQV) と内在性タンパク質配列 (Myr-GAQ (F/L)) を T 細胞が識別することはできないと考えられる。

以上より、HLA-A*24:02 保有小児がエンテロウイルス属のウイルスに感染すると、HLA-A*24:02 はウイルス由来の VP4 リポペプチド (Myr-GAQV) を提示し特異的な CTL 応答を誘導すると推測できる。しかしながら、内在性リポペプチド (Myr-GAQ (F/L)) の配列と類

似しているために、ウイルス感染後に残ったメモリー/エフェクターT 細胞が正常細胞までも攻撃してしまうことで、徐々に膵β細胞の破壊が進行し、1 型糖尿病の発症につながる可能性がある。リポペプチド特異的 CTL 応答を切り口とした新しい自己免疫病態の解明は、今後の臨床的課題である。

総括

本研究は、サル LP1 分子の結晶構造から、リポペプチド結合に重要な 9 番目のアミノ酸に着目し、有力なヒト LP1 分子候補として HLA-A*24:02 と HLA-C*14:02 を同定した。両者はペプチドのみならず、リポペプチドの結合能力を有しており、HLA 分子群がリポペプチドのような脂溶性抗原を安定的に結合できることを示した初めての例である。さらに、高解像度の X 線結晶構造解析により、リポペプチドの抗原結合溝への結合様式を解明した。また、ペプチド結合様式とリポペプチド結合様式を比較することにより、Ser9 もしくは His70 を含む最小限かつ効果的な B ポケットリモデリングを検出し、化学極性の異なる 2 種類のリガンドの両方を結合できる分子構造学的基盤を解明した。HLA-A*24:02、HLA-C*14:02 は高頻度 HLA クラス I アリルであることから、本研究により得られた知見は、リポペプチドを標的とした新たなヒト感染防御機序の理解に貢献するだけでなく、リポペプチドワクチンの開発に向けた学術基盤を確立するものである。

表 1 : 結晶化条件

結晶		温度	サンプル条件				母液条件			
			タンパク量	緩衝液	添加剤①	添加剤②	塩	緩衝液	沈殿剤①	沈殿剤②
A*24:02	Myr-GANF	4°C	7 µg	Tris-HCl (10 mM, pH8.0)	NaCl (50 mM)		ZnCl ₂ (2 mM)	Tris-HCl (100 mM, pH8.0)	20%(w/v) PEG6000	
A*24:02	RYGF VANF	20°C	10 µg			ZnCl ₂ (0.1 mM)		Tris-HCl (100 mM, pH7.8)	20%(w/v) PEG6000	
A*24:50	RAGF VANF	4°C	10 µg				Tris-HCl (100 mM, pH7.8)	20%(w/v) PEG8000		
C*14:02	Myr-GAAL	4°C	10 µg				Ammonium Acetate (200 mM)	Sodium Acetate (100 mM, pH4.7)	25%(w/v) PEG Smear Low	5%(w/v) Ethylene glycol
C*14:02	LYNT VATL	20°C	10 µg					Sodium Acetate (100 mM, pH4.5)	20%(w/v) PEG Smear Low	

*灰色は該当試薬がないことを示す。

*PEG Smear Low は Molecular Dimensions 社製を使用。

表 2: HLA クラス I 分子とサル MHC クラス I 分子の B ポケット体積

MHC class I	B pocket size (Å ³)	PDB ID	MHC class I	B pocket size (Å ³)	PDB ID
HLA			HLA		
<i>Tyr at position 9</i>			<i>Ser at position 9</i>		
HLA-A*11	130.809	5GRD	HLA-A*24	535.194	7WT4
HLA-A*68	162.926	4HX1	HLA-C*04	313.752	1IM9
HLA-B*07	144.799	4U1K	HLA-C*14	601.134	7WJ2
HLA-B*14	197.578	3BXN	HLA-A*30	422.569	6J1V
HLA-B*15	222.176	1XR9			
HLA-B*35	34.422	3BWA	Mamu		
HLA-B*39	182.234	4O2E	<i>Tyr at position 9</i>		
HLA-B*44	198.233	3L3I	Mamu-A*002	141.763	3JTT
HLA-B*46	134.628	4LCY	<i>Ser at position 9</i>		
HLA-B*51	102.455	1E27	Mamu-B*098	238.406	4ZFZ
HLA-B*53	41.212	1A1M	<i>Gly at position 9</i>		
HLA-B*57	100.920	3X12	Mamu-B*051	287.002	6IWG
HLA-B*58	212.718	5IM7			
HLA-B*81	146.593	4U1L			
HLA-C*05	77.746	5VGD			
HLA-C*03	95.425	1EFX			
HLA-C*08	112.006	6JTP			

表 3 : データコレクションとリファインメント

	HLA-A*24:02 Myr-GANF complex	HLA-A*24:02 RF8 complex	HLA-A*24:50 RAGFVANF complex	HLA-C*14:02 Myr-GAAL complex	HLA-C*14:02 LL8 complex
PDB ID	7WT3	7WT4	7WT5	7WJ3	7WJ2
<i>Data collection</i>					
Detector at BL26B1	Eiger4M	Eiger4M	Eiger4M	MX225HE	MX225HE
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$C2$	$C2$
Cell dimensions a, b, c (Å) β (°)	87.6, 46.7, 143.6 104.9	86.4, 46.6, 141.9 104.0	86.4, 46.6, 141.9 104.0	91.1, 77.5, 60.6 120.9	92.7, 76.9, 62.1 119.5
Trimer in asym. unit	2	2	2	1	1
Resolution (Å)	50-1.89 (2.00-1.89)*	50-1.89 (2.01-1.89)	50-2.10 (2.22-2.10)	50-1.56 (1.59-1.56)	50-1.28 (1.30-1.28)
R_{merge}	0.057 (0.448)	0.078 (0.472)	0.086 (0.463)	0.044 (0.390)	0.056 (0.384)
$I/\sigma(I)$	14.4(2.83)	11.6(2.25)	12.6(2.98)	49.5 (4.80)	36.6 (3.08)
Completeness (%)	99.6(99.5)	97.6 (97.3)	99.5 (99.1)	99.2 (84.9)	99.0 (97.3)
Redundancy	3.7 (3.9)	2.9 (2.8)	3.8 (3.9)	7.4 (6.2)	4.3 (3.9)
CC(1/2) (%)	99.9 (87.0)	99.7 (79.5)	99.7 (85.7)	99.8 (93.3)	99.6 (91.8)
Wilson B (Å ²)	27.1	21.1	25.8	16.9	13.6
<i>Refinement</i>					
Resolution (Å)	1.89(1.91-1.89)	1.89(1.92-1.89)	2.10(2.13-2.10)	1.56 (1.59-1.56)	1.28 (1.29-1.28)
No. of reflections	89123(2904)	85071(2706)	64481(2715)	50956 (2725)	96238 (3046)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	20.0(31.3)/ 23.5(33.0)	20.0(31.1)/ 23.2(34.1)	18.6(23.2)/ 22.8(28.4)	17.0 (18.3) / 18.8 (21.4)	15.6 (22.9) / 17.8 (27.4)
Coordinate error (Å)	0.22	0.22	0.25	0.13	0.13
No. of residues					
Protein	677	715	733	379	384
MYR/EDO/ACT/ TRIS/ZN/NA	2/37/3/1/3/0	0/46/1/2/3/0	0/47/0/1/3/0	1/18/0/0/0/0	0/7/1/0/0/1
Water	403	423	334	227	334
<i>B-factors (Å²)</i>					
Protein	36.8	32.1	37.2	21.3	19.6
Ligand and ion	42.7	36.5	41.6	31.6	26.0
Water	37.5	30.2	32.3	27.8	27.4
<i>RMSDs</i>					
Bond lengths (Å)	0.008	0.008	0.009	0.009	0.008
Bond angles (°)	1.243	1.020	1.094	0.917	1.06
<i>Ramachandran plot</i>					
Favored (%)	98.4	98.6	98.0	98.2	98.4
Outliers (%)	0	0	0	0	0
Crash score	4.41	4.19	5.10	1.41	4.37
Rotamer outliers (%)	1.00	0.95	1.54	0.59	1.40

*最高解像度の区画は()に表記

引用文献

1. Garcia, K.C., et al., CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature*, 1996. 384(6609): p. 577-581.
2. Klein, L., et al., Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*, 2014. 14(6): p. 377-91.
3. Rotzschke, O., et al., Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*, 1990. 348(6298): p. 252-4.
4. Gotch, F., et al., Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. *Nature*, 1987. 326(6116): p. 881-2.
5. Grayson, J.M., et al., Gene expression in antigen-specific CD8+ T cells during viral infection. *J Immunol*, 2001. 166(2): p. 795-9.
6. Pipkin, M.E. and J. Lieberman, Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol*, 2007. 19(3): p. 301-8.
7. Lechner, F., et al., Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *The Journal of experimental medicine*, 2000. 191(9): p. 1499-1512.
8. Ljunggren, H.G. and K. Karre, In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 1990. 11(7): p. 237-44.
9. Sugita, M. and M.B. Brenner, An unstable beta 2-microglobulin: major histocompatibility complex class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and then is stabilized by binding peptide. *The Journal of experimental medicine*, 1994. 180(6): p. 2163-2171.
10. Sadasivan, B., et al., Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, 1996. 5(2): p. 103-14.
11. Morrice, N.A. and S.J. Powis, A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr Biol*, 1998. 8(12): p. 713-6.
12. Peaper, D.R. and P. Cresswell, Regulation of MHC class I assembly and peptide binding. *Annual review of cell and developmental biology*, 2008. 24: p. 343-368.
13. Neefjes, J.J., F. Momburg, and G.J. Hammerling, Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, 1993. 261(5122): p. 769-71.
14. Yewdell, J.W., DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends in immunology*, 2011. 32(11): p. 548-558.
15. Townsend, A., et al., Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*, 1989. 340(6233): p. 443-8.
16. Hughes, E.A., C. Hammond, and P. Cresswell, Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(5): p. 1896-901.

17. Van Kaer, L., et al., TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell*, 1992. 71(7): p. 1205-14.
18. Trowsdale, J., et al., Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature*, 1990. 348(6303): p. 741-4.
19. Hill, A., et al., Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*, 1995. 375(6530): p. 411-5.
20. Park, B., et al., Human Cytomegalovirus Inhibits Tapasin-Dependent Peptide Loading and Optimization of the MHC Class I Peptide Cargo for Immune Evasion. *Immunity*, 2004. 20(1): p. 71-85.
21. Schwartz, O., et al., Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine*, 1996. 2(3): p. 338-342.
22. Arfin, S.M., et al., Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(17): p. 7714-8.
23. Towler, D.A., et al., Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. 262(3): p. 1030-1036.
24. Le Gall, S., et al., Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity*, 1998. 8(4): p. 483-95.
25. Chaudhuri, R., et al., Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol*, 2007. 81(8): p. 3877-90.
26. Aldrovandi, G.M., et al., Regions of human immunodeficiency virus type 1 nef required for function in vivo. *Journal of Virology*, 1998. 72(9): p. 7032-7039.
27. Peng, B. and M. Robert-Guroff, Deletion of N-terminal myristoylation site of HIV Nef abrogates both MHC-1 and CD4 down-regulation. *Immunology Letters*, 2001. 78(3): p. 195-200.
28. Morita, D., et al., Cutting edge: T cells monitor N-myristoylation of the Nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. *J Immunol*, 2011. 187(2): p. 608-12.
29. Morita, D., et al., Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J Virol*, 2013. 87(1): p. 482-8.
30. Morita, D., et al., Crystal structure of the N-myristoylated lipopeptide-bound MHC class I complex. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 10356.
31. Yamamoto, Y., et al., 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. 202(12): p. 3349-3358.
32. Shima, Y., et al., Crystal structures of lysophospholipid-bound MHC class I molecules. *J Biol Chem*, 2020. 295(20): p. 6983-6991.
33. Bjorkman, P.J., et al., Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 1987. 329(6139): p. 506-512.

34. Madden, D.R., et al., The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*, 1992. 70(6): p. 1035-48.
35. Smith, K.J., et al., An altered position of the alpha 2 helix of MHC class I is revealed by the crystal structure of HLA-B*3501. *Immunity*, 1996. 4(3): p. 203-13.
36. Saper, M., P. Bjorkman, and D. Wiley, Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 1991. 219(2): p. 277-319.
37. Matsumura, M., et al., Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*, 1992. 257(5072): p. 927-34.
38. Sidney, J., et al., HLA class I supertypes: a revised and updated classification. *BMC Immunol*, 2008. 9: p. 1.
39. Sarkizova, S., et al., A large peptidome dataset improves HLA class I epitope prediction across most of the human population. *Nature Biotechnology*, 2020. 38(2): p. 199-209.
40. Abelin, J.G., et al., Mass Spectrometry Profiling of HLA-Associated Peptidomes in Mono-allelic Cells Enables More Accurate Epitope Prediction. *Immunity*, 2017. 46(2): p. 315-326.
41. Borghans, J.A., J.B. Beltman, and R.J. De Boer, MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics*, 2004. 55(11): p. 732-9.
42. Tian, W., et al., CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res*, 2018. 46(W1): p. W363-W367.
43. Horton, H., et al., Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses in HIV vaccine trial participants who subsequently acquire HIV-1 infection. *Journal of virology*, 2006. 80(19): p. 9779-9788.
44. Liu, J., et al., Cross-allele cytotoxic T lymphocyte responses against 2009 pandemic H1N1 influenza A virus among HLA-A24 and HLA-A3 supertype-positive individuals. *Journal of virology*, 2012. 86(24): p. 13281-13294.
45. Otwinowski, Z. and W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997. 276: p. 307-26.
46. Kabsch, W., Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. 66(Pt 2): p. 125-32.
47. Vagin, A. and A. Teplyakov, Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. 66(Pt 1): p. 22-5.
48. Vagin, A.A., et al., REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004. 60(Pt 12 Pt 1): p. 2184-95.
49. Emsley, P., et al., Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. 66(Pt 4): p. 486-501.
50. Liebschner, D., et al., Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2019. 75(Pt 10): p. 861-877.

51. Liu, J., et al., Diverse peptide presentation of rhesus macaque major histocompatibility complex class I Mamu-A 02 revealed by two peptide complex structures and insights into immune escape of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 2011. 85(14): p. 7372-83.
52. Ikeda-Moore, Y., et al., Identification and characterization of multiple HLA-A24-restricted HIV-1 CTL epitopes: strong epitopes are derived from V regions of HIV-1. *J Immunol*, 1997. 159(12): p. 6242-52.
53. Arai, J., et al., Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 2001. 97(9): p. 2903-7.
54. Fukami-Kobayashi, K., et al., Genomic evolution of MHC class I region in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. 102(26): p. 9230-9234.
55. Shiina, T., et al., Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex. *Immunology*, 2017. 150(2): p. 127-138.
56. Naruse, T.K., et al., Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics*, 2010. 62(9): p. 601-11.
57. Boutin, J.A., Myristoylation. *Cell Signal*, 1997. 9(1): p. 15-35.
58. Sanchez, V., E. Sztul, and W.J. Britt, Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-Golgi-intermediate compartment. *Journal of Virology*, 2000. 74(8): p. 3842-3851.
59. Bryant, M. and L. Ratner, Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. 87(2): p. 523-527.
60. Baines, J.D. and B. Roizman, The UL11 Gene of Herpes-Simplex Virus-1 Encodes a Function That Facilitates Nucleocapsid Envelopment and Egress from Cells. *Journal of Virology*, 1992. 66(8): p. 5168-5174.
61. Silva, M.C., et al., Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J Virol*, 2003. 77(19): p. 10594-605.
62. Gragert, L., et al., Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. *Hum Immunol*, 2013. 74(10): p. 1313-20.
63. Cooke, G.S. and A.V. Hill, Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*, 2001. 2(12): p. 967-77.
64. Hill, A.V., et al., Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 1991. 352(6336): p. 595-600.
65. Watanabe, T., Current status of HTLV-1 infection. *Int J Hematol*, 2011. 94(5): p. 430-4.
66. Bjornevik, K., et al., Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 2022. 375(6578): p. 296-301.
67. Watanabe, R., H. Wege, and V. ter Meulen, Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature*, 1983. 305(5930): p. 150-3.
68. Rojas, M., et al., Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun*, 2018. 95: p. 100-123.

69. Morita, D., et al., Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides. *Int Immunol*, 2020. 32(12): p. 805-810.
70. Morita, D., M. Asa, and M. Sugita, Engagement with the TCR induces plasticity in antigenic ligands bound to MHC class I and CD1 molecules. *Int Immunol*, 2022.
71. Nakanishi, K., et al., Association of HLA-A24 with complete β -cell destruction in IDDM. *Diabetes*, 1993. 42(7): p. 1086-1093.
72. Nakanishi, K., et al., Human leukocyte antigen-A24 and -DQA1*0301 in Japanese insulin-dependent diabetes mellitus: independent contributions to susceptibility to the disease and additive contributions to acceleration of beta-cell destruction. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(10): p. 3721-5.
73. Uchigata, Y. and T. Awata, Age-dependent association of HLA-A24 in Japanese IDDM patients. *Diabetologia*, 1996. 39(3): p. 371-3.
74. Nejentsev, S., et al., Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature*, 2007. 450(7171): p. 887-92.
75. Yeung, W.C., W.D. Rawlinson, and M.E. Craig, Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*, 2011. 342: p. d35.
76. Hober, D. and P. Sauter, Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol*, 2010. 6(5): p. 279-89.
77. Xing, W., et al., Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2014. 14(4): p. 308-318.
78. Li, W., et al., Large outbreak of herpangina in children caused by enterovirus in summer of 2015 in Hangzhou, China. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 35388.
79. Paul, A.V., et al., Capsid Protein Vp4 of Poliovirus Is N-Myristoylated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987. 84(22): p. 7827-7831.
80. Chow, M., et al., Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 1987. 327(6122): p. 482-6.
81. Fiorillo, M.T., et al., Allele-dependent similarity between viral and self-peptide presentation by HLA-B27 subtypes. *J Biol Chem*, 2005. 280(4): p. 2962-71.
82. Fan, J., et al., Cyb5r3 links FoxO1-dependent mitochondrial dysfunction with beta-cell failure. *Mol Metab*, 2020. 34: p. 97-111.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、細部にわたり丁寧に御指導、御助言を賜りました京都大学 生命科学研究科 高次細胞制御学分野 杉田 昌彦教授に深謝の意を表します。研究の立案から結果の解釈、考察まで日々議論する中に見えた、洗練された科学的思考力をもつ先生の姿は、今後の私の研究生生活における目標です。

また、大変多くの熱心な御指導、御助言を賜りました森田 大輔助教、水谷 龍明助教に深く感謝いたします。先生方より日々多大なサポートを頂いたおかげで、本研究を結実させることができました。

さらに、本研究を行う上で、X線結晶構造解析について大変多くの御指導を頂きました三上 文三先生に厚く御礼申し上げます。構造解析の初学者だった私に、基礎的な原理から専門的な技法までご教授いただき、それは本研究に欠かせないものとなりました。

加えて、高次細胞制御学分野研究室の皆様には、ご指導・ご支援を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。

最後に、研究活動に理解を示し、物心両面に渡り常に支援してくれた両親に感謝します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

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.

Journal of Biological Chemistry, 298(7), 102100, 2022.