HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂質抗原提示分子CD1dの構造機能解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	日下, 裕規
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13960号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77900
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_KUSAKA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏　名　　日下　裕規

学 位 論 文 題 名

脂質抗原提示分子 CD1d の構造機能解析

CD1d は非古典的 MHC クラスⅠ分子の仲間であり、内在性及び外来性の脂質抗原をナチュラルキラーT (NKT)細胞に提示する抗原提示分子である。NKT 細胞は様々なサイトカインを産生することができ、Th1 型及び Th2 型のどちらの免疫応答も誘導することができる。Th1 と Th2 のバランスの崩壊は癌や自己免疫疾患等の要因となるため、それらを調節することができる NKT 細胞は重要な創薬ターゲットとなっている。NKT 細胞によって産生されるサイトカインの種類は CD1d によって提示される抗原に依存するが、抗原と対応するサイトカインの詳細な関係については現在明らかになっていない。CD1d と抗原との複合体の精緻な構造情報を X 線結晶構造解析によって得ることで、CD1d による抗原認識の分子機構を明らかにすることを目指し研究を行った。

CD1d は重鎖とβ2 ミクログロブリン(β2m)である軽鎖からなるヘテロ二量体であり、N 型糖鎖修飾を受ける糖タンパク質である。大腸菌発現系では CD1d の調製は難しいため、本研究では蛋白質量を多く要求される結晶構造解析に向け、昆虫細胞発現系より調製期間が短く高収量が期待できるカイコ-バキュロウイルス発現系を用いて CD1d を調製した。組み換えバクミドをカイコに投与して 6 日間飼育した後、血リンパを回収して硫安分画、Ni アフィニティ精製、ゲルろ過クロマトグラフィーの三段階で精製を行い、高い精製度でヒト CD1d (hCD1d)およびマウス CD1d (mCD1d)を得ることに成功した。さらに hCD1d は、重鎖と軽鎖をリンカーで接続し、1 本のポリペプチド鎖として発現させる scCD1d として調製したところ、ヘテロ二量体の共発現系に比べて収量が 10 倍に増加し、熱安定性も向上した。一本鎖化によって収量が大きく増加した要因として、一本鎖化によって CD1d の安定化に必要なβ2m が先に翻訳され近傍に存在した状態で CD1d が翻訳されるため、別々に翻訳された分子が会合してヘテロ二量体を形成するよりも効率よく CD1d-β2m 複合体の構造をとることができるためであると考えられる。

CD1d は leukocyte immunoglobulin-like receptor B2 (LILRB2)に結合するが、極めて相同性の高い LILRB1 には結合しないことが報告されている。カイコ発現系で調製した CD1d が生理的機能を保持しているかを調べるため、表面プラズモン共鳴法を用いて LILRB と CD1d との相互作用解析を行った。センサーチップ上に CD1d を固定化し、LILRB1 および LILRB2 をアナライトとして結合実験を行った。カイコ発現系で調製した CD1d は LILRB1 には結合せず、LILRB2 とは弱い親和性で結合し、哺乳細胞発現 CD1d と同じ傾向を示した。このことから、カイコ発現 CD1d は哺乳細胞発現 CD1d と同等の機能を保持していることが明らかになった。

結晶化条件探索の結果、hCD1d は 0.18 M Tri-ammonium citrate, 20% PEG 3350 において、また mCD1d は 0.18 M Tri-ammonium citrate, 20% PEG 4000 において再現よく結晶が得られた。CD1d の結晶に対して X 線回折実験を行ったところ、内在性脂質とみられる抗原が結合した結晶構造が得られた。CD1d の構造はα-GalCer の結合したものとほぼ一致したが、ヒトおよびマウス CD1d 間

で抗原結合部位に存在する電子密度に大きな差異がみられた。hCD1d は脂質結合ポケットから突き出た大きな頭部とポケット深部まで続く棒状の部分を持つ、リン脂質のような形状の電子密度が観測された一方で、mCD1d は脂質結合ポケット深部に短い脂肪酸のような電子密度が観測された。結晶化に用いた CD1d に結合した脂質の組成がヒトとマウスで異なるのかについて、CD1d から脂質を抽出して TLC を用いて解析したところ、両者に PE, PC, SM, DG, FA が結合しており、大きな差異はみられなかった。CD1d の提示する内在性抗原は未だ明らかにされていないため、内在性脂質と CD1d についての相互作用についてさらなる解析が必要である。

CD1d に結合して様々な活性を示す抗原について、CD1d との複合体構造解析をすることでそのメカニズムを明らかにすること試みた。α-GalCer は CD1d の強力な抗原であり、NKT 細胞の Th1 及び Th2 サイトカイン産生を強く誘導する 8。しかし、NKT 細胞の TCR と結合するのはα-GalCer の頭部のみであるにもかかわらず、アシル鎖の長さが Th1/Th2 の比率や NKT 細胞の活性に影響を及ぼす 9。CD1d に対するα-GalCer のアシル鎖との結合を評価するため、異常散乱によって正確な位置を決定できるα-GalCer-12’ Se を用いてアシル鎖の配座を評価することを試みた。hCD1d および mCD1d との複合体の解析を行ったところ、Se 誘導体はα-GalCer と同様の配座で CD1d に結合していた。また、Se 原子の異常散乱からα-GalCer の配座決定が難しかった領域の構造の決定に成功した。また、Th2 選択的 CD1d 抗原として設計されたアミド導入α-GalCer 誘導体との複合体の解析を行った。α-GalCer 誘導体はアシル鎖が短くなるにつれて Th2 選択性が増す一方で活性自体も低下するが、アミド導入によって高い活性を維持できることが報告されている。α-GalCer-amide が高い活性を示す機構を明らかにするため、α-GalCer-amide と CD1d との相互作用について立体構造から考察した(図 6)。α-GalCer-amid は hCD1d 内部との極性相互作用は見られず、α-GalCer と類似した配座で結合した。一方、mCD1d はα-GalCer-amid は Ser28 と直接水素結合を形成し、さらに Gln14 および Arg74 と水分子を介した水素結合ネットワークを形成していた。α-GalCer-amide の活性は mCD1d 発現細胞を用いて試験されているため、ヒトにおけるα-GalCer-amide の活性についてはさらなる検討が必要であることが示唆された。

本研究では、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて、結晶構造解析に向けたヒトおよびマウス CD1d の調製系を確立し、活性の異なる抗原との相互作用解析によって CD1d による NKT 細胞の免疫応答の調節機構の解明を目指した。カイコ-バキュロウイルス発現系により効率的にヒト及びマウス CD1d の調製に成功し、さらにヒト CD1d の重鎖と軽鎖を一本鎖化することによって収量の大幅な改善に成功した。また、SPR 解析及び立体構造解析からカイコ発現系で調製された CD1d は生理活性と正しい立体構造を保持していることを実証した。CD1d はカイコ内在性脂質を抗原として結合して調製された。ヒト及びマウス CD1d では結晶構造中に見られる電子密度の形状が大きく異なっており、CD1d に結合する内在性脂質には種差があることが示唆された。構造決定の難しい領域に Se 原子を導入したα-GalCer を用いて立体構造解析を行い、ヒト及びマウス CD1d におけるα-GalCer の詳細な構造を明らかにした。さらに、高い活性を持つα-GalCer-amide との共結晶構造から、アミド基導入によって新たに形成された水素結合ネットワークが活性に影響を与えていることが示唆された。CD1d 抗原による Th1/Th2 選択性及び活性の機構の解明には至らなかったものの、カイコによる効率的な CD1d の調製法を活用することにより、多様な抗原との立体構造解析の効率化が可能になり、NKT 細胞を介した免疫機構への理解が深まるものと期待される。