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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　　氏　名　　日　下　裕　規

審査担当者	主　査	教　授	前　仲　勝　実
	副　査	教　授	木　原　章　雄
	副　査	准教授	佐　々　貴　之
	副　査	准教授	黒　木　喜　美　子

学 位 論 文 題 名

脂質抗原提示分子 CD1d の構造機能解析

博士学位論文審査等の結果について（報告）

CD1d は血球系の細胞に広く発現する MHC クラス I の仲間であり、脂質や糖脂質を提示する。CD1d の抗原の１つである α-ガラクトシルセラミド(α-GC)は CD1d に提示されることにより NKT 細胞を活性化し、Th1 型サイトカイン IFN-γ と、Th2 型サイトカイン IL-4 の両方を誘導する。著者は CD1d タンパク質の立体構造解析や物理化学解析を通じて、CD1d による α-GC 認識機構、ヒトとマウス CD1d の種差、NKT 細胞の活性化における Th1/ Th2 バランスの制御機構解明、CD1d に提示される昆虫由来脂質成分の探索などを目的として研究を遂行した。

本論文の構成は、第一章序論、第二章実験方法、第三章結果、第四章考察、第五章総括となっている。著者はまず第一章で研究背景について述べた後、第二章でヒト、及びマウス CD1d の調製系を構築するところから具体的な研究の話を展開している。CD1d は N 型糖鎖を有するタンパク質なので、先行研究では昆虫細胞を用いた発現系が用いられていた。昆虫細胞は非常に有用な系であるが、ウイルス増幅に時間がかかるという問題点もある。そこで著者は培養細胞ではなく、カイコ個体を用いる発現系に着手し、ヒト CD1d の調製に成功した。また、CD1d の安定性を向上させるため、CD1d とヘテロ二量体を形成する β2m を１本のポリペプチド鎖として発現させるコンストラクト scCD1d を作製したところ、scCD1d の収量は、共発現した場合に較べて約 10 倍に向上した。また DSC によって熱安定性を比較したところ、共発現したものに較べてわずかに熱安定性も向上していることが示された。著者は、カイコ発現系の有用性を示すとともに、マルチコンポーネントの複合体を調製する際の１つの解決策を提示することに成功した。

次に著者は CD1d と抗原複合体の X 線結晶構造解析に着手した。X 線結晶構造解析では、大きく分けて、カイコ内在性抗原との複合体構造解析、α-ガラクトシルセラミド(α-GC)誘導体との複合体構造解析に成功している。カイコ内在性抗原との複合体構造解析では、カイコより精製したヒト CD1d の脂質抗原ポケットに、リン脂質様の電子密度を認めた。構築したリン脂質ホスファチジルエタノールアミン(PE)のモデルは、二つの脂質抗原ポケット A’ポケットと F’ポケットにまたがるように配置していた。既報のヒト CD1d と α-GC との複合体構造と比較したところ、A’ポケットの３残基（Trp58、Val65、Phe88）の配向に大きな違いが見られた。後述するように、カイコの内在性脂質は短いアシル鎖を有するものが CD1d に結合していることが判明し、A’ポケットの３残基はアシル鎖の長さによって配向が異なることが示唆された。他方、マウス CD1d の脂質抗原ポケットには、A’ポケット深部に小さな電子密度が認められ、脂肪酸のモデルを構築した。先行研究において、マウス CD1d の A’ポケットにはスペーサー脂質と呼ばれる脂肪酸が結合することが知られており、本研究は先行研究を支持する内容となっていた。

α-GC 誘導体との複合体構造解析では、アシル鎖に Se 原子が導入された抗原 α-GC-12’Se とアシル鎖にアミド基を導入した抗原アミド型 α-GC の X 線結晶構造解析に成功した。α-GC-12’Se との複合体構造では、異常散乱差フーリエマップから、先行研究では場所の特定が難しかった 12 位の原子の位置を高い信頼度で決定することに成功した。アミド型 α-GC との複合体構造解析では、hCD1d-α-GC-C20amide、hCD1d-αGC-C26amide、mCD1d-αGC-C20amide、mCD1d-αGC-C26amide をそれぞれ 1.9 Å、2.3 Å、1.8 Å、2.5 Å 分解能で決定した。アミド型 α-GC との複合体は、先行研究と比較しても高い分解能で構造を決定しており、電子密度も非常に明瞭であり、信頼性の高い

モデルを構築することに成功した。ヒトとマウス CD1d の構造を比較すると、抗原のアミド基の位置が異なっており、マウスにおいては抗原のアミド基が A'ポケットの Ser46 と水素結合ネットワークを形成している一方で、ヒト CD1d では該当残基が Gly46 であるため水素結合は形成していなかった。著者は、ヒト/マウスにおける Gly46/ Ser46 の違いは、ヒトとマウス CD1d の種差を説明する上で非常に重要な残基であることを見出しており、抗原による NKT 細胞の活性化における種差の理解が深まることが期待される。

最後に著者は、カイコを用いて調製したヒト、及びマウス CD1d タンパク質から脂質を抽出し、成分を詳細に調べた。精製 CD1d から抽出した脂質を TLC で分析した結果、ヒト CD1d とマウス CD1d に共通して脂質関連分子群のバンドが観測された。さらに抽出した脂質を LC-MS で解析したところ、主にアシル鎖長が 16〜18 のカイコ由来脂質が CD1d に結合していることが判明した。昆虫由来の脂質は、CD1 に提示されることでアレルギーの原因となっている可能性もあり、今後引き続き解析を進めていく必要がある。著者が、カイコの内在性脂質を CD1d から抽出して LC-MS で解析する方法を確立した意義は大きい。

以上より、本論文は、CD1d による α-GC 認識機構、ヒトとマウス CD1d の種差、CD1d に提示される昆虫由来脂質成分についての新知見を得たものであり、将来、脂質抗原をアジュバントとして利用し、NKT 細胞の活性化制御を軸にした創薬に貢献するところは非常に大きい.

よって著者は，北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める.