



Title	Molecular basis of lipid presenting and loading mechanisms of CD1b [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	田, 聡; Tian, Cong
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15159号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/87177">https://hdl.handle.net/2115/87177</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Cong_Tian_review.pdf, 審査の要旨



# 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 田 聡

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

Molecular basis of lipid presenting and loading mechanisms of CD1b  
(CD1b の脂質抗原提示と脂質積込み機構の分子基盤)

博士學位論文審査等の結果について (報告)

CD1 タンパク質は MHC クラス I の仲間であり、MHC クラス I と類似した構造を持つが、ペプチド抗原ではなく脂質抗原を提示する。ヒト CD1 の遺伝子は 5 種類あるが、そのうち 4 種類 (CD1a, 1b, 1c, 1d) が抗原を提示することがわかっている。筆者はその中でも、結核菌の細胞壁構成成分を T 細胞に提示する役割を持つ CD1b に着目して研究を進めてきた。CD1b は主にリソソームに発現しており、結核菌由来のグルコースミコール酸、グリセロールミコール酸やリポアラビノマンナンなどを提示する。CD1b-抗原複合体が CD1 拘束性の T 細胞に認識されると、T 細胞によるインターフェロニン $\gamma$ などのサイトカイン産生が誘導され、感染細胞の排除へとつながる。筆者は CD1b に提示される脂質抗原が免疫細胞を活性化されるアジュバントとして応用可能であると考え、CD1b の抗原提示の分子機構解明に着手した。特に本論文では、これまで分子基盤が明らかとなっていない CD1b によるグリセロールミコール酸の認識機構について、構造生物学的側面から研究を推進した。また、CD1b への脂質輸送を担う分子として、saposin タンパク質に着目し、saposin と CD1b との相互作用解析や複合体形成の条件検討を行った。

著者はまず、CD1b の発現系確立に取り組んだ。所属研究室の先行研究で CD1 のアイソタイプのうち CD1d の調製をカイコーバキュロウイルス発現系によって行っていたため、CD1b の発現についても同様にカイコ発現系を用いて調製した。当初は、CD1b とヘテロダイマーを形成する  $\beta 2m$  microglobulin ( $\beta 2m$ ) との共発現に取り組んだが、CD1b と  $\beta 2m$  の複合体を得ることができなかった。そこで、CD1b と  $\beta 2m$  の遺伝子を連結し、1本のポリペプチド鎖として発現させたところ、発現量が増加し、高純度に精製することに成功した。調製した CD1b について市販のスクリーニングキットを用いて結晶化を行ったところ、良好な結晶が得られ、結晶化条件の検討をした後、2.4Å分解能で構造決定することに成功した。構造決定した CD1b の全体構造は既に報告されていた CD1b と  $\beta 2m$  複合体の構造と一致しており、カイコ発現系によって適正に折りたたまれたタンパク質を調製できたことが示された。結晶化の際に抗原の添加を行っていなかったが、抗原結合ポケットの A' ポケットと T' ポケットに連続した明瞭な電子密度が観察されたため、カイコ由来の脂質を結合している可能性が示唆された。そこで筆者は、精製した CD1b から脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて標準脂質標品と比較したところ、フォスファチジルコリン (PC)、フォスファチジルエタノールアミン (PE)、コレステロールが含まれていた。PC と PE は CD1b に結合することが報告されているが、コレステロールは報告例がなく、CD1b に結合する生理的意義や結合様式などが今後の課題となる。次に筆者は、有機合成したグリセロール脂質 (グリセロー

ルモノミコール酸) を CD1b に添加した後、結晶化を行い 2.9Å で構造決定に成功した。CD1b の抗原結合ポケットの電子密度は、カイコ内在性脂質の時とは異なり、A' ポケットの入り口付近に観察された。電子密度にグリセロールモノミコール酸のモデルをフィッティングさせたところ、グリセロール部分が CD1b の結合ポケットから外に突出したモデルが構築された。CD1b-グルコースモノミコール酸を認識する T 細胞受容体 (TCR) と構造を重ね合わせたところ、グリセロールモノミコール酸のグリセロール部分は TCR に認識される部位近傍に位置したものの、グルコースモノミコール酸とは抗原の位置は異なったため、TCR との結合様式は既存のものとは異なることが示唆された。最後に筆者は、saposin による CD1b への脂質輸送機構を解明するため、4 種類の saposin タンパク質 (saposin A, B, C, D) を大腸菌で発現させ、プルダウンアッセイによって結合試験を行った。結合試験の結果、CD1b と結合したのは、saposin C のみであり、低塩濃度や低 pH 条件下で CD1b-saposin C が結合することが判明した。Saposin C は酸性条件下で二量体化すること、脂質存在下で多量体を形成することなどが知られている。筆者は様々な状態の saposin C を作製し、電子顕微鏡や動的光散乱でサイズや形状の評価を行い、結合試験を行う準備を進めた。これまでの結合試験の結果では、脂質や界面活性剤を含まない条件でも CD1b と結合することを明らかにしており、多量体の形成と脂質輸送の関連性については、さらなる研究が必要である。

このように、著者は、脂質抗原を提示する CD1b 分子に着目し、新規抗原となるコレステロールの発見や CD1b によるグリセロールモノミコール酸の認識機構を明らかにした。さらに、saposin による CD1b への脂質輸送機構解明に向けて、基盤となる結合の条件や試験の方法を確立した。筆者は、将来 CD1b を介した脂質アジュバントの開発に向けて重要な知見を残し、今後も CD1b を初めとした脂質を認識するタンパク質の研究に貢献する人材である。

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。