



Title	脂質抗原提示分子CD1dの構造機能解析
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13960
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94369
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_KUSAKA.pdf



博士論文

脂質抗原提示分子 CD1d の構造機能解析

日下 裕規

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
生体分子機能学研究室

2020 年 3 月

目次

目次.....	1
略語表.....	3
バッファー及び培地の組成.....	5
1 章 序論.....	6
1-1 CD1 ファミリー分子.....	6
1-2 CD1d.....	8
1-3 NKT 細胞.....	9
1-4 研究目的.....	10
2 章 実験方法.....	12
2-1 CD1d タンパク質の調製.....	12
2-2 CD1d-avi タンパク質の調製.....	13
2-3 LILRB2 の調製.....	15
2-4 scCD1d タンパク質の調製.....	17
2-5 mCD1d タンパク質の調製.....	18
2-6 SPR 法による相互作用解析.....	19
2-7 グリコシダーゼによる糖鎖除去と分析.....	19
2-8 タンパク質の結晶化.....	20
2-9 X 線回折実験及び結晶構造解析.....	22
2-10 scCD1d の物理化学的解析.....	23
2-11 CD1d 結合脂質の解析.....	24
3 章 結果.....	25
3-1 CD1d- β 2m 複合体の調製.....	25
3-2 CD1d- β 2m 複合体の結晶構造解析.....	30
3-3 CD1d-LILRB2 の相互作用解析.....	35

3-4	CD1d の受ける糖鎖修飾	42
3-5	scCD1d の調製	43
3-6	scCD1d の性状解析	47
3-7	mCD1d の調製	50
3-8	CD1d に結合したカイコ内在性脂質の解析	54
3-9	scCD1d の結晶構造解析	55
3-10	scCD1d- α -GC- 125 I の結晶構造解析	57
3-11	ヒトおよびマウス CD1d の内在性抗原結合構造	59
3-12	ヒトおよびマウス CD1d とアミド型 α -GC の複合体構造	62
4 章	考察	66
4-1	CD1d の調製	66
4-2	CD1d の結晶化条件の探索と構造解析	66
4-3	SPR による相互作用解析	67
4-4	CD1d の糖鎖修飾	69
4-5	scCD1d の調製	70
4-6	scCD1d の性状解析	70
4-7	scCD1d の結晶構造解析	71
4-8	ヒトおよびマウス CD1d による内在性抗原認識	75
4-9	アミド型 α -GC の認識機構	77
5 章	総括	81
	参考文献	82
	謝辞	88

略語表

6×His tag	Hexahistidine tag
Amp	Ampicillin
BSA	Bovine serum albumin
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus
CBB	Coomassie brilliant blue
CIEX	Cation exchange chromatography
DSC	Differential scanning calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Gen	Gentamycin
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamine
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	Horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
Ig	Immunoglobulin
iNKT	Invariant natural killer T
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LILR	Leukocyte immunoglobulin-like receptor
MALDI	Matrix assisted laser desorption / ionization
MHC	Major histocompatibility complex
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
Ni-AFC	Nickel affinity chromatography
TCR	T cell receptor
TLC	Thin layer chromatography
PBS	Phosphate buffered saline
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Tet	Tetracycline
WB	Western blotting
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

β2m

Beta-2 microglobulin

バッファー及び培地の組成

2xYT 培地	Tryptone 16 g/L, Extract Yeast Dried 10 g/L, NaCl 5 g/L
2xYT/Km/Gen 培地	2xYT 培地 + Kanamycin 50 µg/ml, Gentamycin 7 µg/ml
LB 寒天培地	Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 14 g/L
LB/Amp 寒天培地	LB 寒天培地 + Ampicillin 100 µg/ml
LB/Km/Gen/IPTG/X-Gal 寒天培地	LB 寒天培地 + Kanamycin 50 µg/ml, Gentamycin 7 µg/ml, 200 µM IPTG, X-Gal 40 µg/ml
PBS (-)	137 mM NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄

1章 序論

1-1 CD1 ファミリー分子

CD1 は beta-2 microglobulin ($\beta 2m$) とヘテロ二量体を形成する非古典的 MHC クラス I の仲間であり、広く血球系細胞に発現して抗原提示を行う糖タンパク質である^{1,2}。CD1 ファミリーには CD1a から CD1e までの 5 つのアイソフォームが存在し、うち CD1a から CD1d までの 4 つのアイソフォームが細胞表面で抗原提示を行う。MHC にはペプチドを結合する親水性のポケットが存在するが、CD1 には深い疎水性のポケットが存在し、アルキル鎖を埋め込むような形で自己ないし非自己由来の様々な脂質抗原が結合する³⁻⁸(図 1-1)。CD1 は小胞体シグナルペプチド配列を持ち、小胞体内で自己脂質を結合した後、細胞表面に運ばれて自己脂質を提示する⁹。その後エンドサイトーシスによって取り込まれ、エンドソームやリソソーム内において抗原が載せ替えられて再び細胞表面に発現し、取り込まれた外来性抗原などの抗原が提示される。各 CD1 アイソフォームは抗原結合部位の形状がそれぞれ異なり、結合する脂質もそれによって異なる。CD1 アイソフォームがエンドサイトーシスの各段階に局在して抗原分解プロセスに広く分布することにより、多様な性質を持つ抗原のサンプリングを可能にしている^{3,10}。CD1 は 2 つのグループに大別され、CD1a, b, c の 3 つはグループ I、CD1d はグループ II に分類される^{1,11}(表 1-1)。グループ I CD1 は主に抗原提示細胞に発現し $\alpha\beta$ T 細胞に抗原提示を行う^{4,7,8}。CD1a は主にリポペプチドなど比較的短い炭化水素鎖をもつ化合物を抗原として結合する(図 1-2A)。CD1b は深いキャビティーを持ち、非常に長い炭化水素鎖を持つ脂質抗原を結合する(図 1-2B)。このような脂質をサンプリングするため、細胞内ではリソソームに局在している。CD1c は CD1a と CD1b の中間的な大きさの抗原結合部位を持ち、細胞内においても CD1a と CD1b の中間的な分布をする(図 1-2C)。グループ II CD1 (CD1d) は広く血球系細胞に発現しナチュラルキラー T (NKT) 細胞に抗原提示を行う^{5,6}(図 1-2D)。CD1e は細胞表面での抗原提示を行わず、細胞内にのみ局在する。

表 1-1 CD1 ファミリータンパク質

アイソフォーム	CD1a	CD1b	CD1c	CD1d	CD1e
グループ	I			II	-
抗原提示	$\alpha\beta$ T 細胞			NKT 細胞	-
抗原結合部位体積($\text{\AA}^3$)	1350	2200	1780	1650	2000
細胞内分布	早期エンド ソーム	エンドリソ ソーム	後期エンド ソーム	後期エンド ソーム	

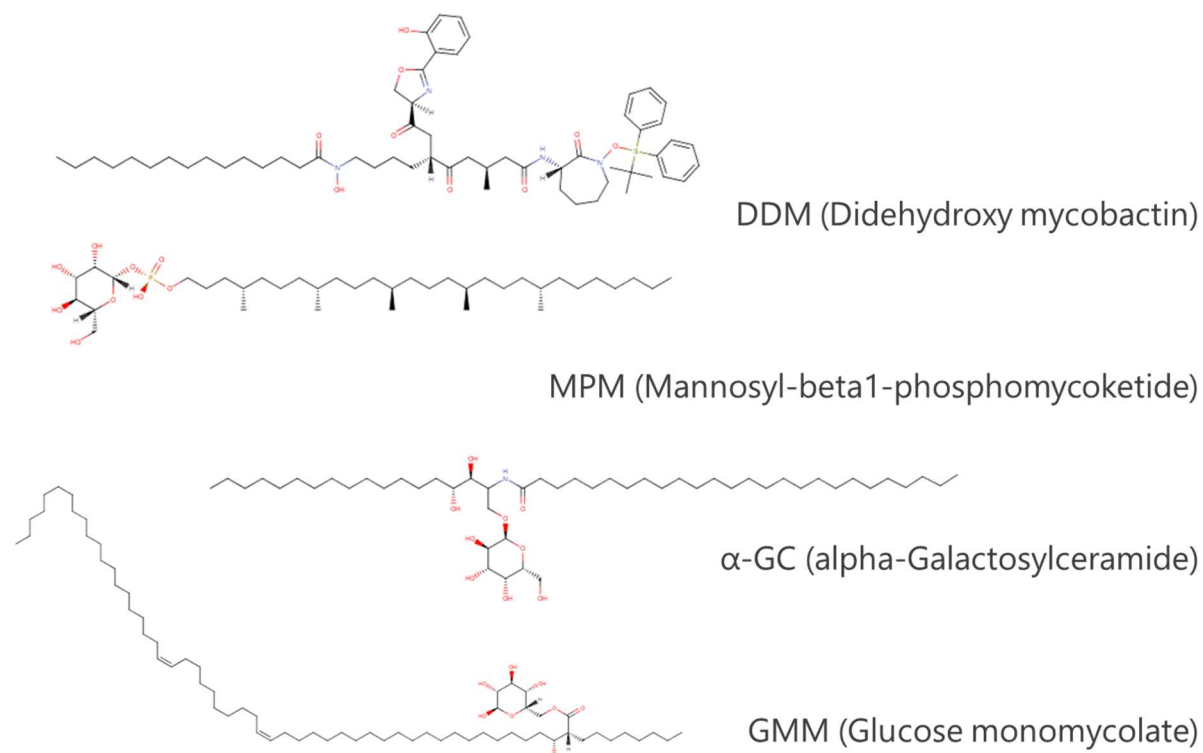


図 1-1 CD1 に結合する脂質 CD1 に結合する脂質のうち、共結晶構造が得られているものを例に挙げた。CD1a は DDM のようなリポペプチドと結合する。CD1c は結核菌の MPM のような長い炭化水素鎖をもつ糖脂質を結合することができる。CD1d は抗原の結合ポケットに分岐があるため、 α -GC のようなアルキル鎖を 2 本持つ糖脂質を結合することができる。CD1b は CD1 の中で最大の深さのポケットを持ち、GMM のような長大なアルキル鎖をもつ糖脂質を結合することができる。

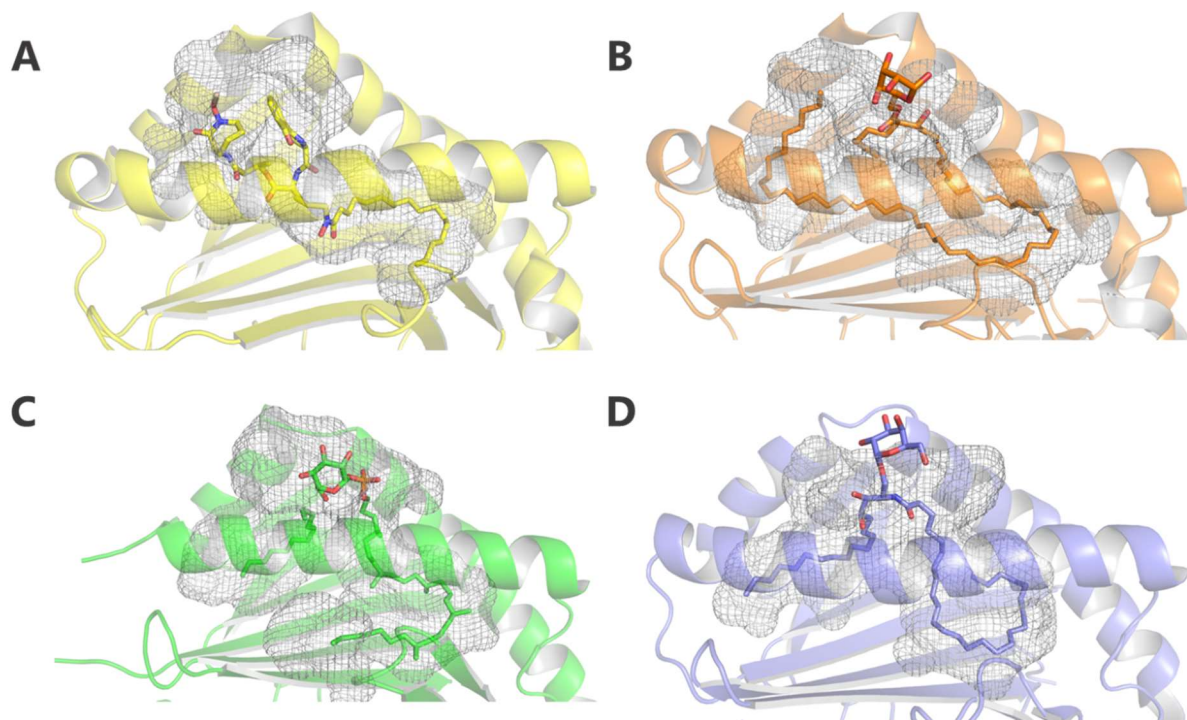


図 1-2 CD1 の抗原結合ポケット 各 CD1 アイソフォームの抗原結合部位。ポケットを mesh で示した。ポケットは Hollow¹² を用いて算出した。(A) CD1a-DDM (PDB ID: 1XZ0) (B) CD1b-GMM (PDB ID: 1UQS) (C) CD1c-MPM (PDB ID: 3OV6) (D) CD1d- α -GC (PDB ID: 1ZT4)

1-2 CD1d

CD1d は MHC クラス I 分子と極めて類似した構造をとり、 $\alpha 1$ -3 の 2 つのドメインから構成される重鎖と、軽鎖である $\beta 2m$ から構成されるヘテロ二量体である。しかし、 $\alpha 1$, 2 ドメインにおける、2 本の α ヘリックスと β シートから構成される抗原結合ポケットが疎水性であるため、MHC がペプチドを結合するのとは異なり脂質を抗原として結合する¹³。CD1d は血液細胞に発現し、特に樹状細胞、皮質胸腺細胞、脾臓 B 細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞に多く発現している²。グループ I の CD1 はヒトを含む哺乳動物に広く保存されているもののマウスやラットには見られないが、CD1d はげっ歯類を含むほぼ全ての哺乳動物に広く保存されている¹⁴。CD1d が小胞体内でフォールディングする際にはホスファチジルイノシトールやホスファチジルエタノールアミンを含む内因性脂質が結合し、これはシャペロンとしてフォールディングを促進するとともに CD1d を安定化させることが示唆されている¹⁵⁻¹⁸。小胞体タンパク質であるマイクロソームトリグリセリド転送タンパク質(MTP)の欠損は CD1d による抗原提示を欠落させ、さらに MTP がホスファチジルエタノールアミンを CD1d に転移することから、MTP が小胞体内における内在性脂質の結合に関与していると考えられている^{19,20}。また、発現した CD1d がエンドサイトーシスによ

って取り込まれて抗原の載せ替えが行われる際、エンドソームやリソソーム内において脂質が CD1d に結合するためには、おそらく脂質二重層中に埋め込まれた脂質が CD1d の抗原結合部位へと移動する必要がある。リソソームに存在するサポシンはスフィンゴ脂質の代謝に関与するタンパク質であるが、サポシンの欠損は CD1d による NKT 細胞への抗原提示の欠落を招くことから、CD1d への脂質輸送に関与すると考えられている。サポシン B の導入はサポシン欠損マウスにおける CD1d の α -GC 提示を回復し²¹、ガングリオシドやリン脂質を輸送することが報告されている^{22,23}。

1-3 NKT 細胞

Natural killer T (NKT)細胞は NK 細胞受容体と T 細胞受容体(TCR)の両方を発現する細胞であり²⁴、CD1d によって提示された抗原を認識する。NKT 細胞は通常の T 細胞とは異なりリンパ節や脾臓にはあまり存在せず、肝臓や骨髄に多く分布している。個人差はあるものの一般に NKT 細胞は血中のリンパ球の 1%以下と極めて少ない割合で存在しているが、NKT 細胞は哺乳類に高度に保存されており、免疫システムに大きな影響を与える^{25,26}。NKT 細胞は主にインバリエントな α 鎖と限られた種類の β 鎖からなる TCR を発現している²⁴。NKT 細胞は IFN- γ などの細胞傷害性 T 細胞を活性化させる Th1 型サイトカインと、IL-4 などの抗体産生を促進する Th2 型サイトカインのどちらも産生することができる(図 1-3)。互いに抑制し合う Th1 型と Th2 型の両方の免疫応答を誘起することができるため、NKT 細胞は免疫機能のバランスを調節する上で重要な役割を担っている^{27,28}。CD1d と脂質抗原の結合親和性が高いものは TCR との結合時間を延長しサイトカイン極性を Th1 に偏重させ、また疎水性の低い脂質と結合した CD1d は脂質ラフトへ集積せず、Th2 型サイトカインを多く産生させるという報告があるが、Th1/Th2 バランスを調製する機構の全容は未だ不明である²⁹。Th1/Th2 バランスの崩壊は癌や自己免疫疾患の要因となり、これらの疾患において NKT 細胞が減少していることも NKT 細胞の関与を示している^{30,31}。感染症やアレルギーなど様々な疾患において NKT 細胞の関与が報告されており³²⁻³⁵、免疫機能の調節に重要な役割を果たしていることから有望な創薬ターゲットとして期待されている。しかし、サイトカイン極性を決定づける要因や自然免疫および獲得免疫に対する NKT 細胞の役割の詳細については未だ明らかになっておらず、抗原と NKT 細胞刺激活性の構造活性相関研究が進められている。NKT 細胞活性化に関する内在性の抗原について詳細は明らかになっていないが、NKT 細胞の特性が注目されて開発された抗原として海綿由来のスフィンゴ糖脂質である α -ガラクトシルセラミド(α -GC)が知られており、強力な抗腫瘍活性を発現させる²⁸。 α -GC は抗原提示細胞から CD1d を介して NKT 細胞に提示され、サイトカイン産生を促すことで NK 細胞、T 細胞、B 細胞、およびマクロファージ

ジ等のエフェクター細胞を活性化させる³⁶⁻³⁸ほか、活性化された NKT 細胞は直接腫瘍細胞を障害する³⁹ことで抗腫瘍効果を示すと考えられている。

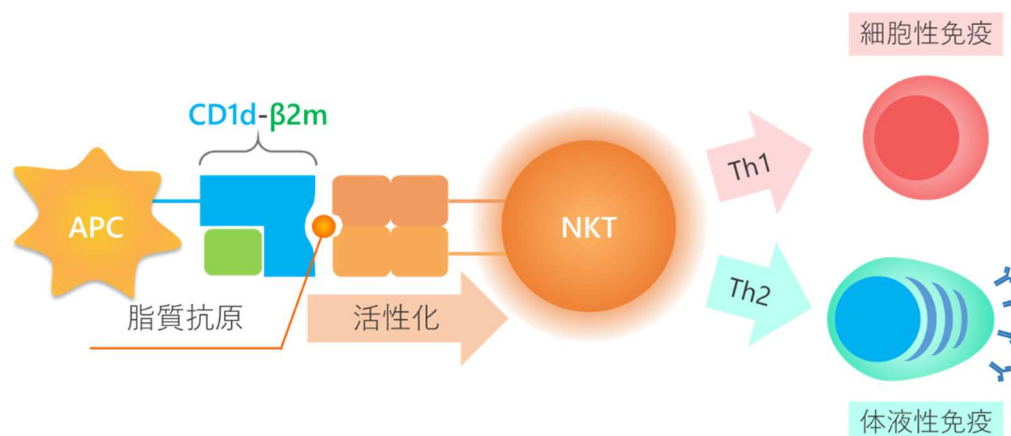


図 1-3 CD1d による NKT 細胞の活性化 APC: 抗原提示細胞 NKT: ナチュラルキラーT 細胞

1-4 研究目的

NKT 細胞は癌や自己免疫疾患といった難治療性のものを含む多種の病気の機構に関与しており、CD1d を介して NKT 細胞を刺激し、免疫調節機能を働かせることにより治療に有効な効果が得られることが期待されている。NKT 細胞は極めて多様なサイトカインを産生することができ、その種類は CD1d によって提示される抗原に依存するが²⁹、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。NKT 細胞の成熟に関与する内在性抗原や NKT 細胞を活性化する内在性の抗原は未解明であるが、外来性抗原としてはライム病の病原菌である *Borrelia burgdorferi* 由来のジアシルグリセロール⁴⁰や寄生虫 *Leishmania donovani* 由来のリポホスホグリカン⁴¹などが報告されている。マウスにおいて NKT 細胞の欠損がこれらの感染症への抵抗力を失わせることが報告されているが、疾患における NKT 細胞の役割についての理解は未だ限定的である。 α -GC は最も構造活性相関研究が精力的に取り組まれている抗原であり、 α -ガラクトースが重要であること⁴²⁻⁴⁵、直接 NKT 細胞には提示されない炭化水素鎖に芳香環を導入することで Th1 サイトカインが多く産生されること^{46,47}、アシル鎖長を短くすることで Th2 サイトカイン側に偏る傾向があること⁴⁸などが報告されている。NKT 細胞の活性を強くコントロールできる抗原は発見されていない。マウスモデルで α -GC が腫瘍を縮小させた⁴⁹⁻⁵¹ことからヒトでの臨床試験が始まったものの、現在まで続く取り組みの中でも有効な治療法は確立できていない⁵²。NKT 細胞活性化の詳細な機構の解明と NKT 細胞を協力的に刺激する抗原の開発には CD1d による脂質認識機構を詳細に解明する必要がある。しかし、脂質結合タンパク質とリガンドとの相互作用には脂質のアルキル鎖が特に重要であり⁵³、CD1d の結合ポケット内部でのリガンドのアルキル鎖の配向を

詳細に解析する必要があるが、明瞭な抗原の電子密度を得るためには超高分解能が必要である。これまで報告されているヒト CD1d 結晶構造の中で最も高い分解能は 2.48 Å であり⁵⁴、抗原の配座を決定し得る超高分解能を達成する結晶構造は未だ報告されていない(図 1-4)。種々の脂質抗原がもたらす NKT 細胞への作用を CD1d とリガンドの相互作用と関連付けるためには、さらなる精緻な構造情報に基づく CD1d-リガンド相互作用の解析が必要である。本研究は CD1d 内部における抗原の配座や CD1d との相互作用を立体構造解析によって明らかにし、抗原の CD1d との結合親和性が与える活性への影響を解明することで CD1d 免疫機構の理解を深めることを目的としている。本論文では結晶化に向けた CD1d の調製系の確立と結晶化条件の探索、および内在性抗原、重原子置換抗原、アミド型抗原の CD1d 複合体の X 線結晶構造解析について報告する。

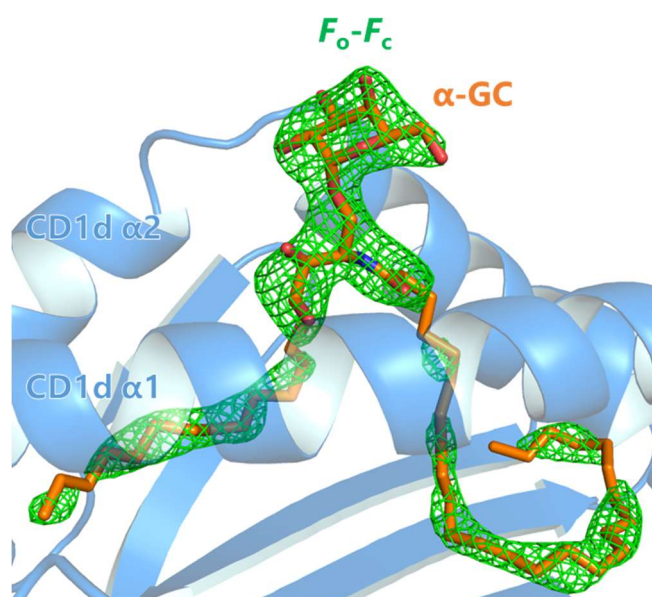


図 1-4 CD1d 抗原結合部位中の電子密度 CD1d を青色の cartoon で表示し、α-GC を橙色の stick で示した。また、 F_o-F_c マップ(3σ)を緑色の mesh で示した(PDB ID: 1ZT4)。

2章 実験方法

2-1 CD1d タンパク質の調製

CD1d- β 2m 複合体の調製には Bac-to-Bac[®] baculovirus expression system (Thermo Fisher Scientific) を用い、カイコ発現系で共発現させた。

2-1-1 CD1d プラスミド調製

Bac-to-Bac ドナーベクターとしてヒト CD1d 細胞外ドメイン(1-295 aa)及びヒト β 2m (1-119 aa)がサブクローニングされた pFastBac[™] Dual を用いた。CD1d 及び β 2m には N 末端に分泌シグナル配列があり、また CD1d には C 末端側に 6×His タグが付加されている。ドナーベクターを用いて大腸菌 DH5 α 株ケミカルコンピテントセルを形質転換し、LB/Amp 寒天培地で一晚培養した。得られたシングルコロニーを 2×YT/Amp 培地に植菌し一晚振盪培養した。培養液を 16100×g で 1 分間遠心して菌体を回収し、QIAprep[®] Spin Miniprep kit (QIAGEN)を用いてプラスミド DNA を精製した。

2-1-2 組換えバキュロウイルス DNA (バクミド)調製

ドナーベクターを大腸菌 DH10Bac BmNPV 株ケミカルコンピテントセルに添加し、2xYT 培地で 1 時間の回復培養の後にテトラサイクリン(10 μ g/ml)を添加し、一晚振盪培養した。その後菌液にゲンタマイシン(7 μ g/ml)を添加して 2 時間振盪培養し、LB/Km/Gen/IPTG/X-Gal 寒天培地に塗布して 24 時間培養した。得られた白コロニーに対して、バキュロウイルス DNA のトランスポゼース認識配列 mini-attTn7 の上流及び下流に結合するプライマー(表 2-1E)と DNA ポリメラーゼ(Go Taq[®] Master Mix and Polymerase, Promega)を用いて PCR 法により増幅し、1-2%アガロースを用いた電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後紫外線で検出して分析し、目的遺伝子の導入が確認されたものを選択した。2xYT/Km/Gen 培地で一晚振盪培養し、培養液を遠心して菌体を回収した。得られた菌体からプラスミド精製キット (NucleoBond[®] Xtra Midi, タカラバイオ) を用いてバクミド DNA を精製した。

2-1-3 カイコ発現系によるタンパク質発現

カイコ 1 頭あたり、20 ng/ μ l バクミド DNA 50 μ l に DMRIE-C (Thermo Fisher Scientific) 3 μ l を添加して 45 分間静置し、50 μ l を 5 齢カイコ幼虫(錦秋鐘和)に接種した。5 日間飼育した後、腹脚に注射針を刺して漏出した体液(血リンパ)を回収し、チオ硫酸ナトリウムを終濃度 0.5% (w/v)となる

よう添加した。回収体液を 5000 ×g, 4 °Cで 30 分間遠心して残渣を除き、上清をさらに 40000 ×g, 4 °Cで 30 分間遠心した。遠心分離上清をタンパク質画分として回収し、沈殿を P1 ウイルス画分として PBS (-)に溶解して液体窒素で凍結させ、-80 °Cで保存した。ウイルス回収以降はバクミド接種の代わりに微量の P1 ウイルス溶液を接種してタンパク質発現を行った。

2-1-4 CD1d-β2m 複合体の精製

• 硫酸分画

回収したカイコ体液に 50%飽和度となるよう飽和硫酸アンモニウム水溶液を滴下し、4 °Cで 1 時間攪拌した後 20000 ×g, 4 °Cで 30 分間遠心し、上清を破棄した。沈殿をバッファー(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazole)に溶解し、Omnipore membrane filter (0.2 μm 親水性 PTFE, Millipore)で濾過した。

• Ni-AFC

沈殿を溶解したバッファーを HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare)に添加し、HPLC システム AKTA explorer 10S (GE Healthcare)を用いて、HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare)で精製した。ランニングバッファーとして 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl と 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 400 mM Imidazole を用い、イミダゾール濃度のグラジエントで溶出した。15%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色及び HisProbe™-HRP Conjugate (Thermo Fisher Scientific)を用いたウェスタンブロット法で検出した。WB には蛍光基質として Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を用い、検出には ImageQuant Las 4000mini (GE Healthcare)を用いた。

• ゲル濾過クロマトグラフィー

Ni-AFC によって精製された scCD1d を含む画分を回収し、Amicon® Ultra-15 10K (Millipore)で濃縮した。AKTA explorer 10S / AKTA pure 25 / AKTA purifier 10 (GE Healthcare)を用いて、HiLoad Superdex200 16/60 (GE Healthcare)で精製した。ランニングバッファーには 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl を用いた。15%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色で検出して目的タンパク質の含まれる画分を調べて回収した。

2-2 CD1d-avi タンパク質の調製

CD1d-β2m 複合体の調製には Bac-to-Bac® baculovirus expression system (Thermo Fisher Scientific)を用い、カイコ発現系で共発現させた。

2-2-1 CD1d-avi プラスミド調製

CD1d-avi の調製を行うにあたり、CD1d の鋳型として pFastBac™ Dual にサブクローニングされたヒト CD1d 及びヒト β2m を用いた。CD1d には N 末端に分泌シグナル配列があり、C 末端に His タグが付加されている。また、Avi タグの鋳型として当研究室保有の pCA7 改変ベクターにコードされた Avi タグ付加タンパク質を用いた。各種プライマー(表 2-1C)と DNA ポリメラーゼ(KOD -plus-, タカラバイオ)を用いてから His タグを含まない[シグナル]-[CD1d]と[CD1d]-[タグ]を PCR 法により増幅した。

タグ: LEVLFQGPAAVDYKDDDDKGTKHHHHHHTGGLNDIFEAQKIEWHE

(3C プロテアーゼ切断サイト、FLAG タグ、6×His タグ、Avi タグ)

次に両 PCR 産物を鋳型として、プライマー(表 2-1C, D)と DNA ポリメラーゼ(KOD -plus-, タカラバイオ)を用いて CD1d-avi 全長を PCR 法により増幅した。PCR 産物と pFastBac™ 1 を Not I (タカラバイオ)と Hind III (タカラバイオ)で消化して 0.8-1%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線で検出した目的位置の DNA バンドを QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。各抽出物をエタノール沈殿によって濃縮し、Ligation high Ver.2 (東洋紡)を用いて 16 °Cで 2 時間のライゲーション反応を行った。ライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5α ケミカルコンピテントセルを形質転換し、LB/Amp 寒天培地で一晩培養した。得られたコロニー中のプラスミド DNA を鋳型とし、マルチクローニングサイトの上流及び下流に位置するプライマー(表 2-1A)と DNA ポリメラーゼ(Go Taq® Master Mix and Polymerase, Promega)を用いて PCR 法により増幅し、1%アガロースを用いた電気泳動を行った後エチジウムブロマイドで染色し、紫外線で検出して分析した。目的遺伝子の導入が確認されたものを鋳型とし、各プライマーと BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて PCR 法により増幅した。増幅産物をエタノール沈殿によって濃縮した後 Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems)に溶解して 95 °Cで 2 分間のインキュベーションの後急冷し、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で目的配列がベクターに挿入されていることを確認した。

表 2-1 プライマー配列

A. ポリヘドリンプロモーター-MCS	
pFastBac1 F	5'-CCTATAAATATTCCGGATTA-3'
pFastBac1 R	5'-CAAATGTGGTATGGCTGATT-3'
B. T7 プロモーター-MCS	
T7 promoter F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7 terminator R 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

C. CD1d-avi 調製

Not I _CD1d F 5'-GAAT**CGGGCCG**CATGGGGTGCCTGCTGTTT-3'

CD1d_Tag R 5'-GAACAGAACCTCGAGCCAGTAGAGGACGATGTCCT-3'

CD1d_Tag F 5'-ATCGTCCTCTACTGGCTCGAGGTTCTGTTCCAGGG-3'

Tag_Hind III R 5'-NNNNN**AAGCTT**TATCATTCGTGCCATTCGATTTTC-3'

D. scCD1d 調製

Not I _β2m F 5'-NNNNN**CGGCCG**CATGTCTCGTTCTGTTGCTTTAG-3'

β2m_Linkers R 5'-CCACCCGAGCCCGAGCCTCCACCGCCCAT**GTCTCGATCCCACTTA**ACTATCTTGGG-3'

Linkers_CD1d F 5'-**GCTCGGGCTCGGGTGGAGGTGGATCG**GAAGTCCCGCAAAGGCTTTCCCCC-3'

CD1d_Hind III R 5'-NNNNN**AAGCTT**TTACCAGTAGAGGACGATGTCCTG-3'

E. バクミドインサート確認

M13 (-40) F 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

M13 R 5'-CAGGAAACAGCTATGA-3'

2-2-2 組み換えバキュロウイルス DNA (バクミド)調製

2-1-2 と同様に、CD1d-avi がサブクローニングされた pFastBac™Dual を大腸菌 DH10Bac BmNPV 株に導入してバクミド DNA を調製した。

2-2-3 カイコ発現系によるタンパク質発現

2-1-3 と同様にバクミド DNA をカイコに接種し、体液をとウイルスを回収した。ウイルス回収後はバクミドの代わりにウイルスを接種した。

2-2-4 CD1d-avi の精製

2-1-4 と同様の方法で、60%飽和度硫酸でカイコ体液を硫酸分画し、沈殿を回収した。沈殿を再溶解して Ni-AFC を行い、さらに CD1d-avi 複合体を含む画分についてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

2-3 LILRB2 の調製

2-3-1 LILRB2 封入体の調製

発現ベクターとして pGMT7 ベクターに LILRB2 細胞外ドメイン(1-196 aa)がサブクローニングされたものを使用した。発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株ケミカルコンピテント

セル(Novagen)を形質転換し、LB/Amp 寒天培地で一晚培養した。得られたコロニーを釣菌して2×YT 培地で培養し、OD₆₀₀が0.4となった時点でIPTGを終濃度1 mMとなるよう添加してさらに4時間振盪培養した。培養液を5000×g, 4 °Cで10分間遠心し、菌体を回収した。菌体を懸濁バッファー(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl)で懸濁し、4 °Cで超音波破碎を行った。完全に破碎した菌体を8000 rpm, 4 °Cで5分間遠心して上清を破棄した。得られた沈殿の洗浄のため、洗浄バッファー(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100)で懸濁し、8000 rpm, 4 °Cで5分間遠心して上清を破棄する操作を3回行った。さらに懸濁バッファーで懸濁し、8000 rpm, 4 °Cで5分間遠心して上清を破棄する操作を3回行い、沈殿として封入体を得た。封入体に可溶化バッファー(6M Guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0)を添加して転倒混和し、可溶化した封入体を得た。

2-3-2 希釈法による LILRB2 の巻き戻し

可溶化した LILRB2 封入体を 9690×g, 4 °Cで10分間遠心して夾雑物を除き、可溶化バッファーで10 mg/mlに希釈した後、終濃度1 mMとなるよう DTT を添加し室温で30分インキュベートした。4 °Cに冷却したリフォールディングバッファー(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM L-Arginine-HCl, 2 mM EDTA, 3.73 mM Cystamine, 6.34 mM Cysteamine)を封入体溶液に攪拌しながら滴下し、グアニジン濃度が1.5 Mになるまで希釈した。希釈した封入体溶液を1 Lのリフォールディングバッファーに攪拌しながら滴下して希釈し、4 °Cで2日間攪拌した。

2-3-3 ゲル濾過クロマトグラフィー

リフォールディング溶液を Vivaflow 50 (10000 Da MWCO, Sartorius)及び Amicon® Ultra-15 10K (Millipore)で濃縮し、Millex-GV (0.22 µm, PVDF, Millipore)で濾過した。濃縮タンパク質溶液を AKTA explorer 10S (GE Healthcare)を用いて、HiLoad Superdex200 16/60 (GE Healthcare)で精製した。ランニングバッファーとして20 mM Tris-HCl, 100 mM NaClを用いた。15%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色で検出して目的タンパク質の含まれる画分を調べて回収した。

2-3-4 陽イオン交換クロマトグラフィー

ゲル濾過クロマトグラフィー精製後の LILRB2 の含まれる画分を Amicon® Ultra-15 10K (Millipore)で濃縮し、Spectra/Por® 7 Dialysis membrane Pre-Treated RC Tubing (MWCO: 10k, Spectrum Labs)を用いた透析によって10 mM MES pH6.0にバッファー置換した。透析後サンプルを Millex-GV (0.22 µm, PVDF, Millipore)で濾過し、AKTA explorer 10S (GE Healthcare)を用いて、RESOURCE

S 1 ml (GE Healthcare)で精製した。ランニングバッファーには 10 mM MES pH6.0 と 10 mM MES pH6.0, 1M NaCl を用い、塩濃度のグラジエントで溶出した。

2-4 scCD1d タンパク質の調製

タンパク質発現には Bac-to-Bac[®] baculovirus expression system (Thermo Fisher Scientific)を用いた。ヒト $\beta 2m$ を N 末側に、ヒト CD1d 細胞外ドメインを C 末側に持ち、それぞれをフレキシブルリンカー(GGGGSGSGGGGS)で連結した scCD1d をトランスファーベクターである pFastBac[™]1 にサブクローニングした。

2-4-1 scCD1d プラスミド調製

鋳型として pFastBac[™] Dual にサブクローニングされたヒト CD1d 及びヒト $\beta 2m$ を用いて scCD1d の調製を行った。CD1d 及び $\beta 2m$ には N 末端に分泌シグナル配列があり、また CD1d には C 末端側に His タグが付加されている。各種プライマー(表 2-1D)と DNA ポリメラーゼ(KOD -plus-, タカラバイオ)を用いて、[分泌シグナル]-[$\beta 2m$]-[リンカー]及び[リンカー]-[CD1d]-[His タグ]を PCR 法により増幅した。各増幅産物を 1-2% (w/v)アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線で検出した目的位置の DNA バンドを QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。抽出した 2 種の PCR 産物を鋳型とし、プライマーと DNA ポリメラーゼ(KOD -plus-, タカラバイオ)を用いて scCD1d 全長を増幅した。PCR 産物と pFastBac[™] 1 を Not I (タカラバイオ)と Hind III (タカラバイオ)で消化して 0.8-1%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線で検出した目的位置の DNA バンドを QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。各抽出物をエタノール沈殿によって濃縮し、Ligation high Ver.2 (東洋紡)を用いて 16 °Cで 2 時間のライゲーション反応を行った。ライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5 α ケミカルコンピテントセルを形質転換し、LB/Amp 寒天培地で一晚培養した。得られたコロニー中のプラスミド DNA を鋳型とし、マルチクローニングサイトの上流及び下流に位置するプライマー(表 2-1A)と DNA ポリメラーゼ(Go Taq[®] Master Mix and Polymerase, Promega)を用いて PCR 法により増幅し、1%アガロースを用いた電気泳動を行った後エチジウムブロマイドで染色し、紫外線で検出して分析した。目的遺伝子の導入が確認されたものを鋳型とし、各プライマーと BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて PCR 法により増幅した。増幅産物をエタノール沈殿によって濃縮した後 Hi-Di[™] formamide (Applied Biosystems)に溶解して 95 °Cで 2 分間のインキュベーションの後急冷し、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で目的配列がベクターに挿入されていることを確認した。

2-4-2 組み換えバキュロウイルス DNA (バクミド)調製

2-1-2 と同様に、scCD1d がサブクローニングされた pFastBac™ 1 を大腸菌 DH10Bac BmNPV 株に導入してバクミド DNA を調製した。

2-4-3 カイコ発現系によるタンパク質発現

2-1-3 と同様にバクミド DNA をカイコに接種し、体液とウイルスを回収した。ウイルス回収後はバクミドの代わりにウイルスを接種した。

2-4-4 scCD1d の精製

2-1-4 と同様の方法で、60%飽和度硫酸でカイコ体液を硫酸分画し、沈殿を回収した。沈殿を再溶解して Ni-AFC を行い、さらに scCD1d を含む画分についてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

2-5 mCD1d タンパク質の調製

Bac-to-Bac® baculovirus expression system (Thermo Fisher Scientific)を用いてマウス CD1d およびマウス $\beta 2m$ を共発現した。

2-5-1 mCD1d プラスミド調製

マウス CD1d1 細胞外ドメイン(1-297aa)およびマウス $\beta 2m$ (1-119aa)について、*Bombyx mori* におけるレアコドンに縮重した他のコドンに変更し、人工遺伝子合成(Eurofins Genomics)にて各 DNA 配列をもつ鋳型プラスミドを調製した。BamH I および Not I を用いて鋳型プラスミド中の CD1d 配列を消化し、Xho I および Nhe I を用いて鋳型プラスミド中の $\beta 2m$ 配列を消化した後、2-2-1 と同様にアガロースゲルを用いて精製した。同様に消化した pFastBac™ Dual に各断片を Ligation 反応によって組み込み、ドナーベクターを調製した。

2-5-2 組み換えバキュロウイルス DNA (バクミド)調製

2-1-2 と同様に、scCD1d がサブクローニングされた pFastBac™ 1 を大腸菌 DH10Bac BmNPV 株に導入してバクミド DNA を調製した。

2-5-3 カイコ発現系によるタンパク質発現

2-1-3 と同様にバクミド DNA をカイコに接種し、体液とウイルスを回収した。ウイルス回収以後はバクミドの代わりにウイルスを接種した。

2-5-4 scCD1d の精製

2-1-4 と同様の方法で、60%飽和度硫酸でカイコ体液を硫酸分画し、沈殿を回収した。沈殿を再溶解して Ni-AFC を行い、さらに scCD1d を含む画分についてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

2-6 SPR 法による相互作用解析

2-6-1 リガンドのビオチン化

CD1d-avi を 50 mM bicine pH 8.3, 10 mM ATP, 10 mM magnesium acetate, 100 μ M d-biotin の条件で、当研究室にて調製されたビオチンリガーゼ BirA と 30 °C で 2 時間反応させた。ビオチン化反応後、Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filter (10 kDa, Millipore) を用いて限外濾過を行い、HBS-EP バッファー (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20) へとバッファー置換した。Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific) を用いたウェスタンブロットティングにより、ビオチン化反応の進行を確認した。

2-6-2 SPR 解析

SPR 解析は Biacore2000 (GE Healthcare) を使用し、ランニングバッファーとして HBS-EP バッファーを用いて 20 °C の条件で測定を行った。センサーチップ CAP (GE Healthcare) にリガンドであるビオチン化 CD1d、ビオチン化 β 2m を固定化し、またネガティブコントロールとしてビオチン化 BSA を、ポジティブコントロールとしてビオチン化 HLA-G を固定化した。各リガンドを固定化したセンサーチップにアナライトとして LILRB1 及び LILRB2 を添加した。

2-7 グリコシダーゼによる糖鎖除去と分析

PNGase F (New England Biolabs) 及び Endo H_f (New England Biolabs) を用いてタンパク質に修飾された糖鎖の消化を行った。タンパク質溶液を 10 $\times$ Denature Buffer と混ぜて 95 °C で 10 分間反応させてから、糖鎖消化反応を行った。以下の表 2-2 に示したように反応溶液を調製し、糖鎖消化は 37 °C で 1 時間ないし一晩反応を行った。

表 2-2 グリコシダーゼ反応条件

溶液(μl)	PNGase F	Endo H _f
タンパク質溶液(1 mg/ml)	27	27
10 × Denature Buffer	3	3
10 × G5 Reaction Buffer	6	0
10 × G7 Reaction Buffer	0	6
10% NP40	6	0
酵素溶液	4	4
超純水	20	14
総液量	60	60

• MALDI-TOF MS

逆相クロマトカラム ZipTip u-C18 (Millipore)を用いて測定サンプルの脱塩濃縮を行った。ZipTip は 0.1 % (v/v) トリフルオロ酢酸/アセトニトリルで湿潤化し、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸/50 % (v/v) アセトニトリルで洗浄した後、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸で 3 回平衡化した。その後測定サンプル溶液中で吸引・吐出を 10 回行いタンパク質を ZipTip に吸着させ、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸で 3 回洗浄した。0.1%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリル/飽和シナピン酸でタンパク質を溶出し、サンプルターゲット MTP 384 target plate polished steel TF (Bruker Daltonics)に添加して風乾した。調製したサンプルは Ultraflex II TOF/TOF200 (Bruker Daltonics)で測定した。Protein Standard II (Bruker)を用いてキャリブレーションを行い、Linear Positive モードで測定を行った。

2-8 タンパク質の結晶化

2-8-1 結晶化の手法

• スクリーニング

タンパク質結晶化プレート MRC-2 (Hampton Research)を用いてシットティングドロップ蒸気拡散法により結晶化スクリーニングを行った。各ウェルにリザーバー溶液 80 μl を分注し、タンパク質溶液 200 nl とリザーバー溶液 200 nl をナノリッター分注システム mosquito (TTP Labtech)を用いて混合して結晶化ドロップを作製し、20 °Cでインキュベートした。

- **条件展開**

VDX Plate Greased (Hampton research)を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。プレートの各ウェルに結晶化リザーバー溶液 1 ml を添加し、プラスチックカバーガラス Fisherbrand Unbreakable Cover Slips (Thermo Fisher Scientific)にタンパク質溶液とリザーバー溶液とを 1 μ l ずつ混合した結晶化ドロップを作成した。密封状態となるようウェルの上にカバーガラスを固定し、20 °Cでインキュベートした。

2-8-2 CD1d の結晶化

スクリーニングキット PACT Suite (QIAGEN)と AmSO₄ Suite (QIAGEN) を用いてスクリーニングを行った。

2-8-3 CD1d- α -GC の結晶化

CD1d 溶液に対し、DMSO に 1 mg/ml で溶解した α -ガラクトシルセラミドを 3 モル当量かつ混合液の DMSO 濃度が 5%以下となるよう反応液を調製して 20 °Cないし 37 °Cで一晩静置した。混合液を Superdex200 10 300 GL (GE Healthcare)を用いてゲル濾過精製し、メインピークを回収して結晶化に用いた。

2-8-4 CD1d- α -GC-12'Se の結晶化

CD1d 溶液に対し、DMSO に 50 mg/ml で溶解した α -GC-12'Se(図 3-9)を 3 モル当量かつ混合液の DMSO 濃度が 1%以下となるよう反応液を調製して 20 °Cないし 37 °Cで一晩静置した。混合液を Superdex200 10 300 GL (GE Healthcare)を用いてゲル濾過精製し、メインピークを回収して結晶化に用いた。

2-8-5 scCD1d-LILRB2 の結晶化

2-8-3 と同様にして CD1d と α -ガラクトシルセラミドの複合体を調製し、さらに LILRB2 をモル比 1:1 となるよう CD1d と混合して 10 mg/ml 程度まで濃縮し、結晶化に用いた。

スクリーニングキット AmSO₄ Suite (QIAGEN), PEGs Suite (QIAGEN), PEGs II Suite (QIAGEN)を用いてスクリーニングを行った。

2-8-6 scCD1d-LILRB2- α -GC-12'Se の結晶化

10 mM Citrate pH 5.6, 100 mM NaCl にバッファーを置換し、2-8-4 と同様にして CD1d と α -GC-12'Se (図 3-9)複合体を調製した。次に 2-8-5 と同様にして CD1d と LILRB2 の複合体を調製した。

スクリーニングキット JCSG Core I -III (QIAGEN)を用いてスクリーニングを行い、結晶が得られた条件について条件展開を行った。

2-8-7 CD1d-内在性抗原の結晶化

精製した CD1d タンパク質溶液を用いて、2-8-6 で得られた条件をもとに条件展開を行った。

2-8-8 CD1d- α GC-amide の結晶化

10 mM Citrate pH 4.0, 100 mM NaCl にバッファーを置換し、2-8-4 と同様にして CD1d と α -GC-amide (図 3-9)複合体を調製した。2-8-6 で得られた条件をもとに条件展開を行った。

2-9 X 線回折実験及び結晶構造解析

各タンパク質結晶の X 線回折実験とデータ収集は表 2-3 のように行った。

表 2-3 X 線回折実験

サンプル	hCD1d	CD1d- α GC-12'Se	scCD1d	scCD1d- α GC-12'Se
ビームライン	Photon factory BL-5A	SPring-8 BL32XU	Photon factory BL-1A	Photon factory BL-1A
測定波長(Å)	1.0	1.0	1.1	1.1
測定角度(°)	0-180	0-180	0-180	0-360
角度変化量(°)	0.5	1.0	0.1	0.2
透過率(%)	100	23	50	10
サンプル	scCD1d- α GC- 20amide	scCD1d- α GC- 26amide	CD1d- α GC- 20amide	mCD1d- α GC- 26amide
ビームライン	Photon factory BL-17A	Photon factory BL-1A	Photon factory BL-1A	Photon factory BL-1A
測定波長(Å)	0.98	1.1	1.1	1.1
測定角度(°)	0-180	0-180	0-180	0-180
角度変化量(°)	0.05	0.1	0.1	0.1
透過率(%)	40	10	50	50

得られた回折データは XDS⁵⁵, DIALS⁵⁶ で処理して CCP4 suite⁵⁷ の aimless でスケーリングするか、HKL2000⁵⁸, iMosflm⁵⁹ を用いて積分及びスケーリングを行い、空間群と格子定数を決定した。得られた反射ファイルは Xtriage 及び Truncate にて分析した。得られた反射ファイルと CD1d モデル構造(PDB ID: 4EN3 改)から、Phaser MR⁶⁰ 及び Molrep⁶¹ を用いて分子置換法により位相を決定し、CD1d の構造モデルを得た。構造モデルを REFMAC5⁶², Phenix.refine⁶³, Coot⁶⁴ を用いて精密化し、立体構造を決定した。

2-10 scCD1d の物理化学的解析

• DSC

0.1-0.2 mg/ml まで測定サンプルを濃縮し、96 ウェルプレートにサンプルを 400 µl 添加した。測定範囲 20-90 °C, 温度変化速度 60 °C/hr で MicroCal VP-Capillary DSC (GE Healthcare)を用いて測定を行った。

• 遠紫外円偏光二色性 CD スペクトル測定

0.1-0.2 mg/ml まで測定サンプルを濃縮し、光路長 0.1 cm の石英製角型キュベット(日本分光)に 200 µl 添加した。表 2-4 に示した測定条件で、J-820 (日本分光)を用いてスペクトル測定を行った。

表 2-4 CD スペクトル測定条件

セル長(cm)	0.1
測定波長(nm)	200-260
バンド幅(nm)	1
レスポンス(sec)	4
示差速度(nm/min)	20
積算回数(回)	8
データ取り込み間隔(nm)	0.5

測定により得られた楕円率 θ を以下の式 1 により、平均モル残基楕円率 $[\theta]$ (deg · cm²/dmol)に換算した。

$$[\theta] = \theta \cdot 100 / (l \cdot c \cdot A)$$

式 1

l : セル長(cm)

c : 残基モル濃度(M)

A : 吸光度(nm)

2-11 CD1d 結合脂質の解析

精製した CD1d から脂質を抽出し、CD1d に結合したカイコ内在性脂質を分析した。

2-11-1 CD1d 結合脂質の抽出

精製済み CD1d 500 ~ 600 µg から Bligh-Dyer 法⁶⁵によって脂質を抽出した。

2-11-2 TLC

scCD1d および mCD1d から抽出した脂質を標準脂質(Phospholipid Kits, Olbracht Serdary Research Laboratories)とともに HPTLC シリカゲルプレート(Merk)にスポットし、展開溶媒 (1-Butanol : 酢酸 : 水 = 3:1:1) で展開した。分離後に銅リン酸を噴霧し、180°Cで加熱して呈色反応を行った。

2-11-3 UPLC-MS

scCD1d および mCD1d から抽出した脂質を UPLC/Xevo G2 Q-Tof (Waters Corporation)を用いて測定を行った。脂肪酸はネガティブイオン、他すべてはポジティブイオンモードで測定した。

3章 結果

3-1 CD1d- β 2m 複合体の調製

CD1d は糖タンパク質であり、大腸菌のような翻訳後修飾を受けない発現系では生理活性を保持したまま大量発現を行うことは難しい。大腸菌封入体のシャペロンを用いた特殊な巻き戻し系での CD1d 調製法が報告されているものの収率は低く^{66,67}、これまでの当研究室での試みでは大腸菌発現系を用いて効率的に CD1d を調製することはできなかった。そこで、本研究では哺乳細胞に近い翻訳後修飾が行われる昆虫細胞を用いた発現系にて CD1d の調製系を構築した。

3-1-1 カイコ-バキュロウイルス発現系によるタンパク質発現

バキュロウイルスを用いた昆虫細胞発現系は哺乳細胞に近い翻訳後修飾を行うことができ、また哺乳細胞の複製起点を持たないために安全にタンパク質を調製することができる。しかし、ウイルスの力価増幅のために継代を繰り返す必要があるため、時間や費用面のコストが大きい⁶⁸⁻⁷⁰。そこで本研究では、P1 ウイルスから高力価が得られ、安価かつ迅速にタンパク質を調整することのできるカイコ-バキュロウイルス発現系を用いて CD1d 調製系を確立した。

● 発現ベクターの構築

CD1d と β 2m がサブクローニングされたトランスファーベクター(図 3-1)を用いて、組み換えカイコバキュロウイルスゲノム DNA (バクミド)を作製した。作製したバクミドないしウイルス感染カイコ体液から得られるウイルス粒子を 5 齢カイコ幼虫に接種し、CD1d と β 2m を体液(血リンパ)中に分泌発現させた。

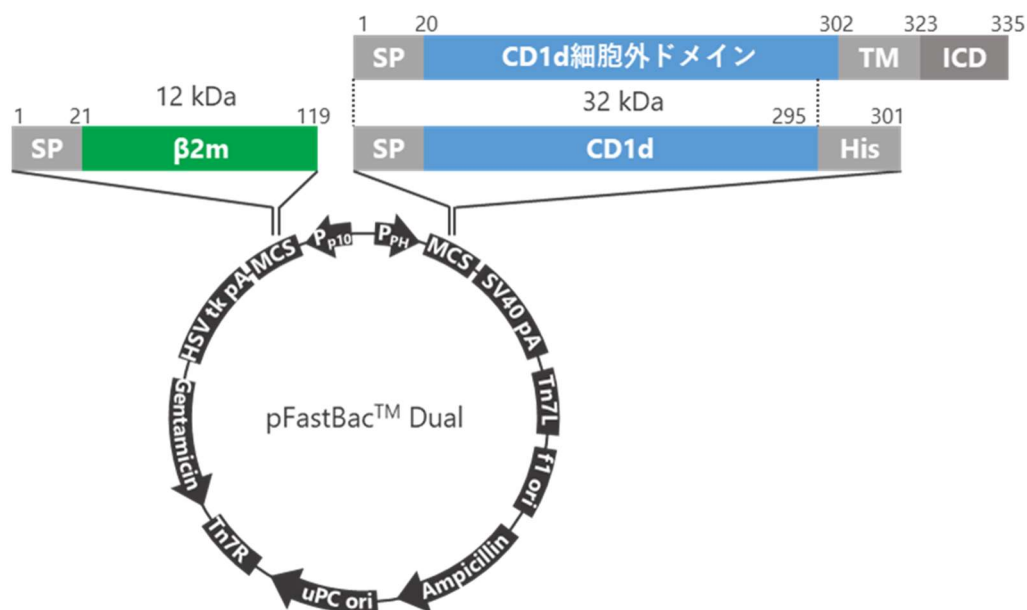


図 3-1 CD1d-β2m ドナーベクターマップ CD1d は pFastBacDual のポリヘドリンプロモーター下流に、β2m は p10 プロモーター下流にそれぞれサブクローニングされている。SP:シグナルペプチド TM: 膜貫通ドメイン ICD: 細胞内ドメイン HIS: 6xHis タグ

3-1-2 カイコ体液からのタンパク質精製

- 硫安分画

カイコ体液中には大量のヒスチジンが含まれており、カイコ体液をそのまま Ni アフィニティー精製することができない。そこでバッファー置換を兼ねて、粗精製として硫安分画を行った。各硫安飽和度での検討を行い、カイコ体液に対して 50%飽和度の硫酸アンモニウムを加えることで全ての CD1d を沈殿させた(図 3-2)。

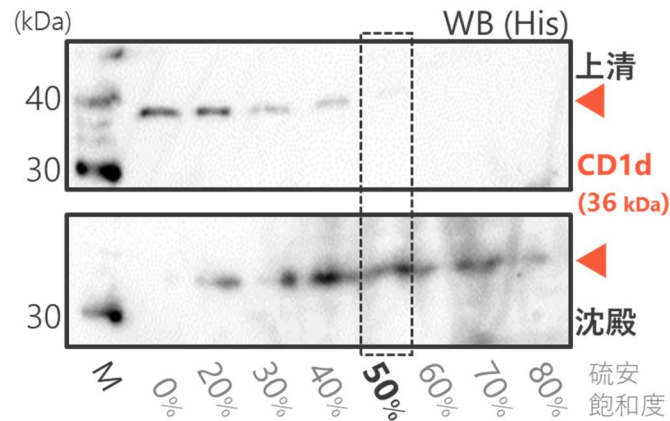


図 3-2 CD1d- β 2m 硫酸分画のウェスタンブロッティング カイコ体液に硫酸アンモニウムを各飽和度になるよう添加した際の、上清と沈殿に含まれる CD1d。CD1d のバンド位置を赤三角形で示した。50%飽和度における上清と沈殿中の CD1d を破線枠で囲った。

- **Ni-アフィニティー精製**

沈殿をバッファーに再溶解し、Ni アフィニティークロマトグラフィーを行った(図 3-3)。CD1d の分子量付近にはカイコ由来のタンパク質も存在したが、 β 2m の存在を指標として CD1d- β 2m 複合体が含まれる画分を回収した(図 3-3A)。CD1d はイミダゾール濃度 50 mM 付近で Ni カラムから溶出された(図 3-3B)。

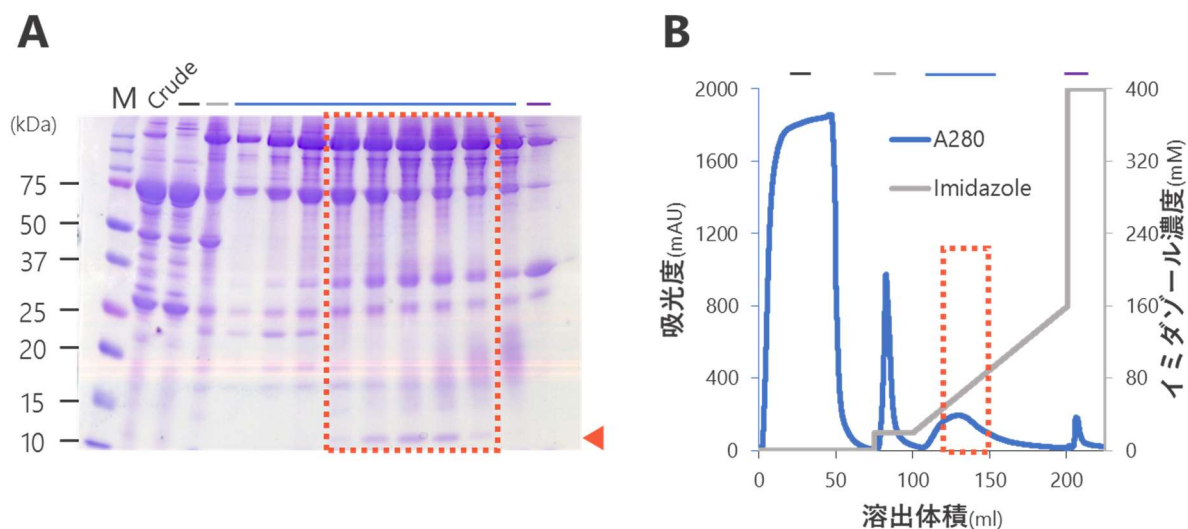


図 3-3 CD1d の Ni アフィニティー精製 (A) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件)による溶出画分の分析。クロマトグラム上部の棒線と対応している。CD1d が含まれる画分は β 2m (橙色三角形の位置)の存在により確認している。**(B)** Ni アフィニティー精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を以降の精製に用いた。

• ゲル濾過精製

結晶化を行う際にはさらに高純度の CD1d が必要となるため、CD1d を含む画分をゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに精製した(図 3-4)。SDS-PAGE で精製度を分析し、高純度の CD1d を得た(図 3-4A)。最終的な CD1d の収量はカイコ 1 頭あたり 2-8 μ g であった。

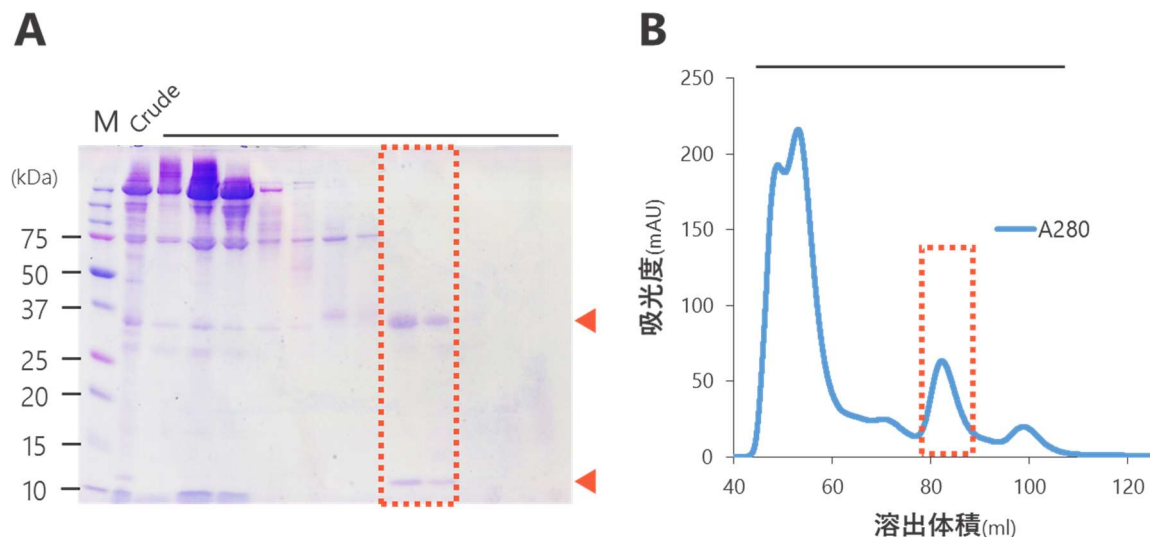


図 3-4 CD1d のゲル濾過精製 (A) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件)による溶出画分の分析。クロマトグラム上部の棒線と対応している。橙色三角形はそれぞれ CD1d と $\beta 2m$ の位置を指している。 **(B)** ゲル濾過精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を精製 CD1d として以降の実験に用いた。

また、得られた CD1d がヘテロ二量体を形成しているか調べるため、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分子量を推算した。標準タンパク質の溶出位置から検量線を作成し、得られた式に CD1d の溶出位置を代入して分子量を算出した結果、ヘテロ二量体の推算分子量より少し小さい 36 kDa となった(図 3-5)。

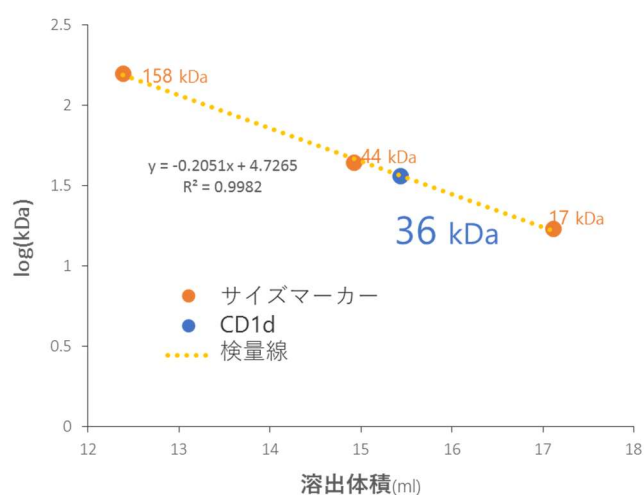


図 3-5 ゲル濾過を用いた分子量推算 ゲル濾過の溶出体積と分子量の対数プロット。ゲル濾過カラムには Superdex200 10/300 GL (GE Healthcare)を用いた。橙: 標準タンパク質 青: CD1d 黄: 検量線

3-2 CD1d-β2m 複合体の結晶構造解析

前任者の取り組みによって得られていた CD1d 結晶の回折データ(図 3-6)から、CD1d-β2m 複合体(PDB ID:4EN3)をサーチモデルとした分子置換法によって分解能 4.2 Å で CD1d の結晶構造を得た(図 3-7)。測定及び精密化のデータは表 3-1 のようになった。

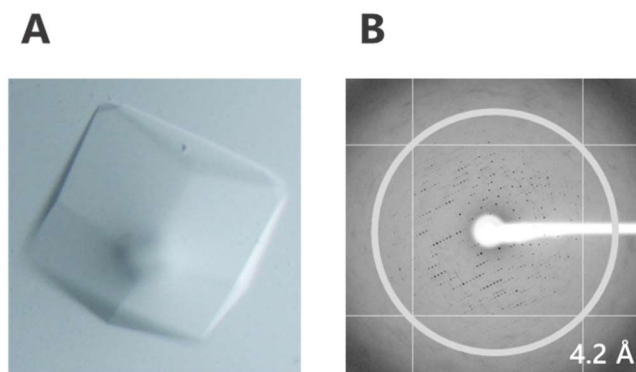


図 3-6 CD1d 結晶 (A) CD1d の単結晶。シッティングドロップ蒸気拡散法により 0.1 M MES pH 6.5, 1.6 M Ammonium sulfate, 10% (w/v) 1,4-Dioxane の条件で得られた結晶。**(B)** CD1d 結晶の X 線回折像。

表 3-1 CD1d の測定・精密化データ

Space group	$I\ 2_13$
Cell dimensions (Å)	$a = b = c = 240.34$
Resolution (Å)	50.00-4.20 (4.27-4.20)
$I / \sigma(I)$	34.125 (2.737)
Completeness (%)	99.9 (100.0)
Redundancy	21.9 (21.9)
R / R_{free}	25.3 / 28.2

得られた CD1d の全体構造を図 3-7A に示した。 $\alpha 1$ - $\alpha 3$ のドメインからなる重鎖と β がヘテロ二量体を形成する典型的な MHC の構造をとり、これまでに報告されているヒト CD1d の結晶構造ともよく一致した。また、 $\alpha 1$ ドメインと $\alpha 2$ ドメインの 2 本のヘリックスと底面の β シートによって形成される抗原結合部位にはタンパク質由来ではない電子密度が観測された(図 3-7B)。CD1d の *N* 型糖鎖修飾を受けると推測される N38, N60, N126, N163 残基のうち、N126 を除く 3 つの残基でタンパク質由来ではない電子密度がみられ、GlcNAc を 1 つないし 2 つ置くことができた(図 3-7C)。

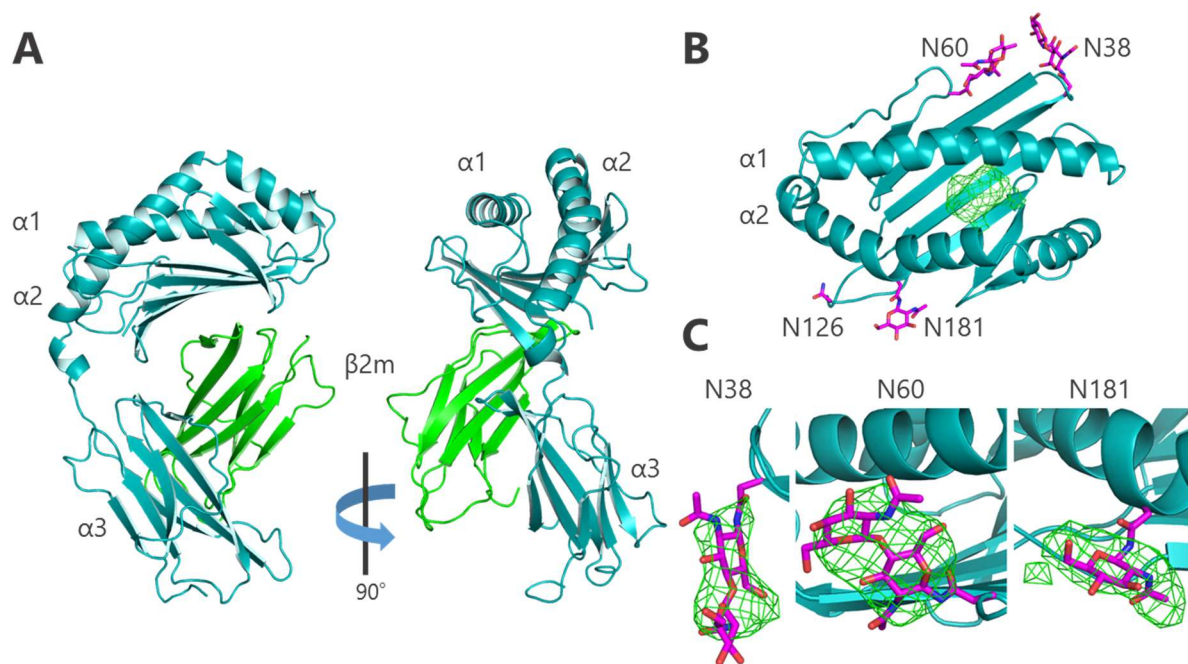


図 3-7 CD1d の X 線結晶構造 (A) 正面及び側面から見た CD1d の結晶構造。CD1d を青で、 $\beta 2m$ を緑で示した。**(B)** 上面からみた CD1d (21-201 aa)。CD1d は青で示し、糖鎖を紅紫色のスティックで示した。抗原結合部位近傍の F_o-F_c マップ(3 σ)を緑色で示した。**(C)** CD1d の各アスパラギン残基における糖鎖修飾。CD1d は青で示し、糖鎖を紅紫色のスティックで示した。アスパラギン残基近傍の F_o-F_c マップ(3 σ)を緑色で示した。

さらに高分解能のデータを得るため CD1d の結晶化を行ったところ、硫酸アンモニウムを含む条件において、幅広い pH 条件で同様の結晶が得られた(図 3-8)。

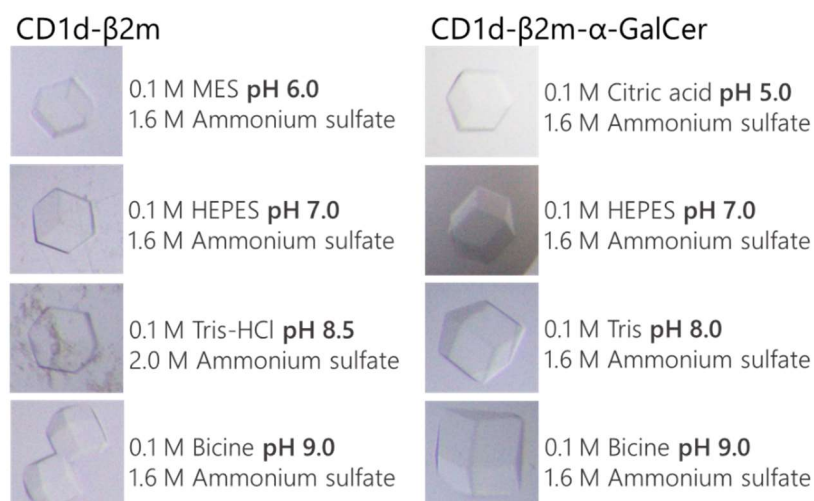


図 3-8 CD1d の結晶

得られたいくつかの結晶について X 線回折実験を行い同様の手法で解析を行ったが、4 Å 程度から大きく分解能が向上することはなく、空間群や格子定数といった結晶学的パラメータはどれも同様であった。

• CD1d-α-GC-12'Se の結晶構造解析

より高分解能なデータを得るため、これまでに結晶が得られた条件のうち、硫酸アンモニウムを含まないものを条件展開し、良質な結晶を得ることを試みた。これまでの研究で 0.1 M Citrate pH 5.6, 20% Isopropanol, 20% PEG4000 で微小な多結晶が得られていたため、単結晶を得るために pH 5.0-6.5, 16-24% Isopropanol, 15-22.5% PEG4000 の範囲で条件検討を行った。また CD1d と結合した抗原のアシル鎖の立体配座を決定するため、抗原として炭素原子をセレンに置換した α-GC-12'Se を用いた(図 3-9)。重原子は異常散乱によって立体構造中の座標が求められるため α-GC-12'Se との複合体結晶構造を得ることでこれまで電子密度が不明瞭だった部分の抗原の配座を明らかにすることが期待される。

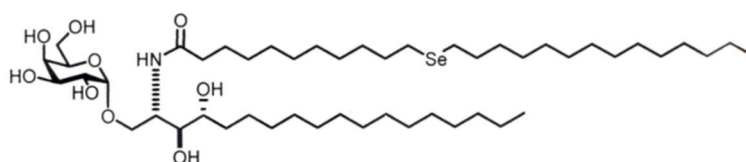


図 3-9 α-GC-12'Se

検討の結果 pH 5.6, 20% Isopropanol, 16-18% PEG4000 において板状の結晶が得られた(図 3-10A)。これを用いて X 線回折実験を行い、回折像を得た(図 3-10B)。

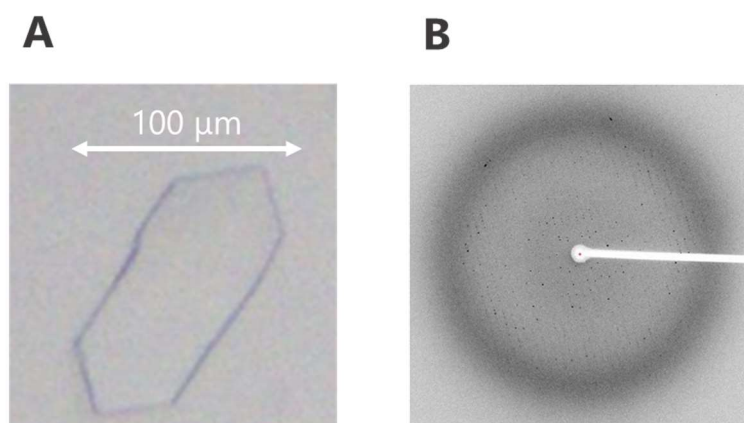


図 3-10 CD1d-α-GC-12'Se 結晶 (A) CD1d-α-GC-12'Se の結晶。ハンギングドロップ蒸気拡散法により 0.1 M Citrate pH 5.6, 20% Isopropanol, 16.5% PEG4000 の条件で得られた結晶。(B) CD1d-α-GC-12'Se 結晶の X 線回折像。

解析の結果を表 3-2 に示した。硫酸アンモニウム条件とは異なった空間群をもち、分解能はおおよそ 3.0 Å と向上した。CD1d-β2m 複合体(PDB ID:4EN3)をサーチモデルとした分子置換法によって図 3-11A に示した構造モデルを得た。非対称単位に 2 分子の CD1d が含まれ、結晶の溶媒含量は 50%であった。2 つの CD1d 分子の構造はほとんど等しく、これまで得られた CD1d 構造とも一致した。しかし、リガンドを添加したにも関わらず、CD1d の抗原提示部位にはリガンド由来の電子密度は観測されなかった(図 3-11B)。

表 3-2 CD1d-α-GC-12'Se の測定・精密化データ

Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = 104.9, <i>b</i> = 144.1, <i>c</i> = 62.64
Resolution (Å)	50.00-3.00 (3.18-3.00)
<i>I</i> / σ(<i>I</i>)	3.5 (1.0)
CC(1/2)	0.87 (0.52)
Completeness (%)	99.8 (99.7)
Redundancy	3.2 (3.3)
<i>R</i> / <i>R</i> _{free}	29.2 / 33.1

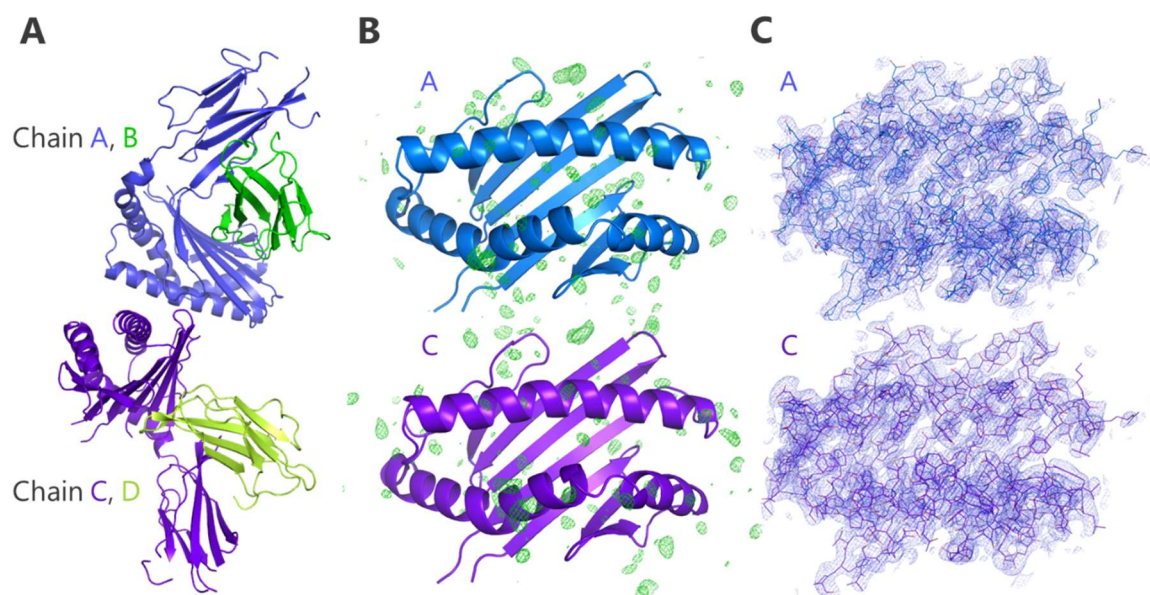


図 3-11 CD1d- α -GC-12'Se の X 線結晶構造 (A) 非対称単位中の CD1d の結晶構造。1 つ目の CD1d の重鎖(A 鎖)を青で、 β 2m(B 鎖)を緑で示し、2 つ目の CD1d の重鎖(C 鎖)を紫で、 β 2m(D 鎖)を黄緑で示した。(B) 上面からみた CD1d (21-201 aa)。CD1d A 鎖は青で示し、CD1d C 鎖は紫で示した。周囲の F_o-F_c マップ(3 σ)を緑色で示した。(C) 上面からみた CD1d (21-201 aa)。CD1d A 鎖は青で示し、CD1d C 鎖は紫で示した。2 F_o-F_c マップ(1.5 σ)を青及び紫のメッシュで示した。

3-3 CD1d-LILRB2 の相互作用解析

CD1d- β 2m 複合体結晶は分子間に大きな空隙があり、分子の自由度が大きくなっていると考えられる。そこで、CD1d に結合するタンパク質との共結晶化を行うことにより、結晶中の空隙を埋めて分子の接触面積を増大させることを試みた。

CD1d に相互作用するとの報告⁷¹があり、CD1d のパッキングを阻害しない位置で結合することが予想された LILRB2 が複合体分子として有用であるかを検証するため、結晶化に先立ち SPR による結合解析を行った。

3-3-1 CD1d-avi の調製

相互作用解析を行うにあたり、反応場における CD1d の配向を均一に保ち相互作用面を露出させるため、CD1d の C 末端に Avi タグを付加したコンストラクトを作製した(図 3-12)。

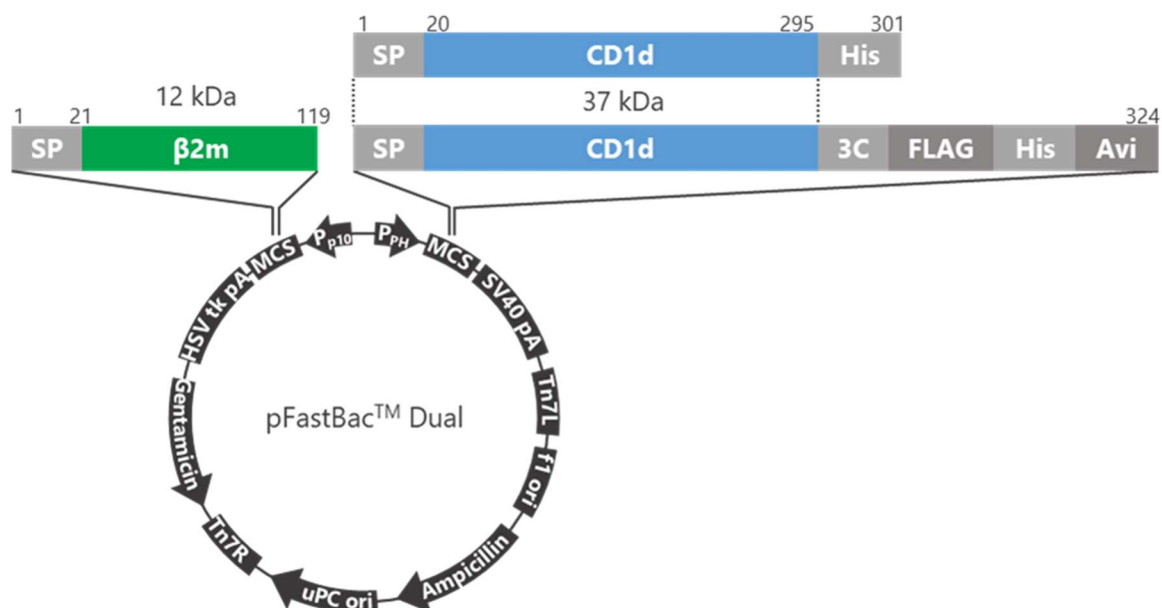


図 3-12 CD1d-avi ドナーベクターマップ SP:シグナルペプチド 3C: 3C プロテアーゼ切断サイト (LEVLFQGP) FLAG: FLAG タグ(AAAVDYKDDDDKGTK) His: 6 × His タグ(HHHHHH) Avi: Avi タグ (TGGLNDIFEAQKIEWHE)

3-1-1 と同様に CD1d-avi をカイコ血リンパ中に分泌発現させて回収し、3-1-2 と同様にして 50% 飽和度硫酸アンモニウムで沈殿させ、Ni アフィニティー精製(図 3-13)とゲル濾過精製(図 3-14)を行った。CD1d-avi の収率は CD1d と同程度で、カイコ 1 頭あたり 5 µg であった。

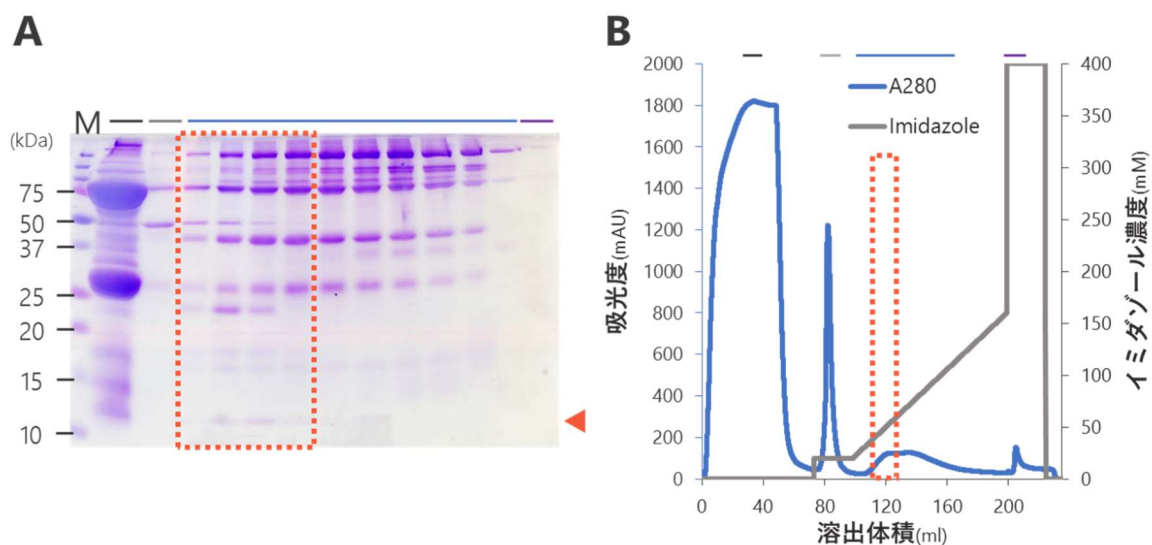


図 3-13 CD1d-avi の Ni アフィニティー精製 (A) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件) による溶出画分の分析。クロマトグラム上部の棒線と対応している。CD1d が含まれる画分は β 2m (橙色三角形の位置) の存在により確認している。**(B)** Ni アフィニティー精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を以降の精製に用いた。

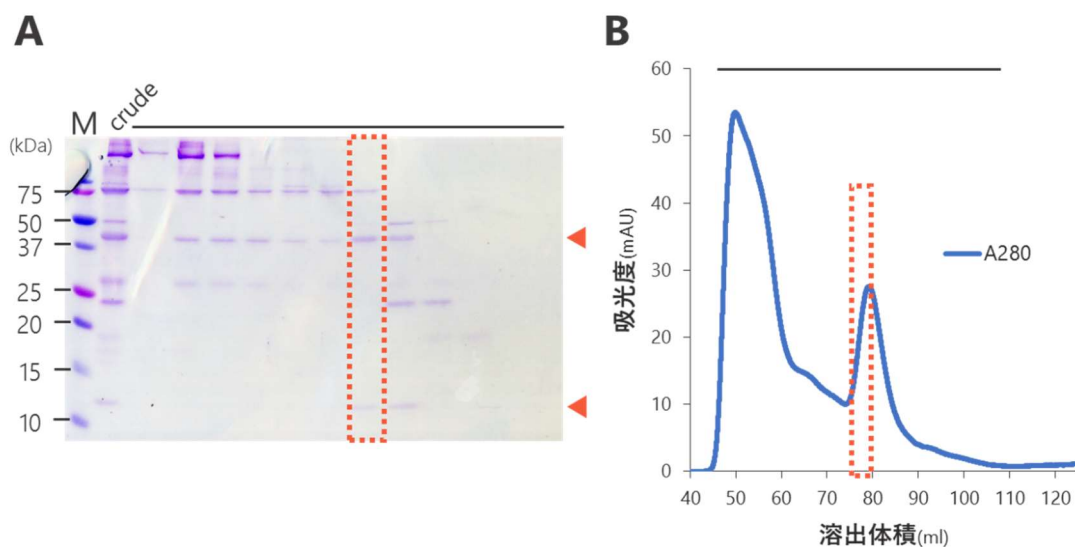


図 3-14 CD1d-avi のゲル濾過精製 (A) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件) による溶出画分の分析。クロマトグラム上部の棒線と対応している。橙色三角形はそれぞれ CD1d と β 2m の位置を指している。**(B)** ゲル濾過精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を精製 CD1d-avi として以降の実験に用いた。

精製した CD1d-avi をセンサーチップに固定化するため、ビオチン化反応を行った。コントロールとしてビオチン化された β 2m を用い、ウェスタンブロッティングで HLA-G と CD1d の反応前後を比較してビオチン化反応の進行を確認した(図 3-15)。

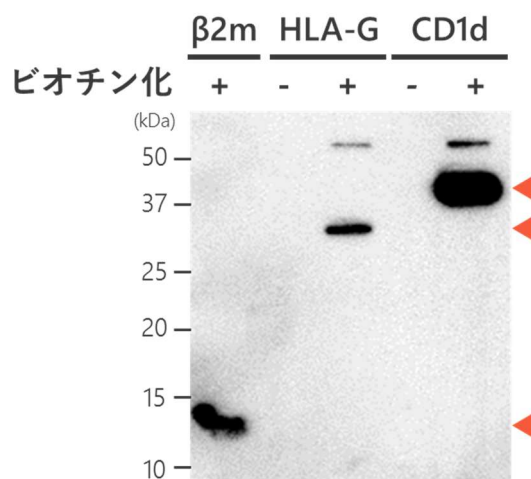


図 3-15 ウェスタンブロッティングによるビオチン化反応の検出 ストレプトアビジン-HRP コンジュゲートでビオチン化されたタンパク質を検出した。橙色三角形でビオチン化された各タンパク質のバンド位置を示した。

3-3-2 LILRB2 の調製

LILRB2 は当研究室の論文⁷²を参考に調製した。相互作用に関与する LILRB2 の N 末端側 Ig-like ドメイン 2 個をサブクローニングしたプラスミド(図 3-16)で大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を形質転換し、封入体として LILRB2 タンパク質を発現させた後、希釈法にて巻き戻し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した(図 3-17)。

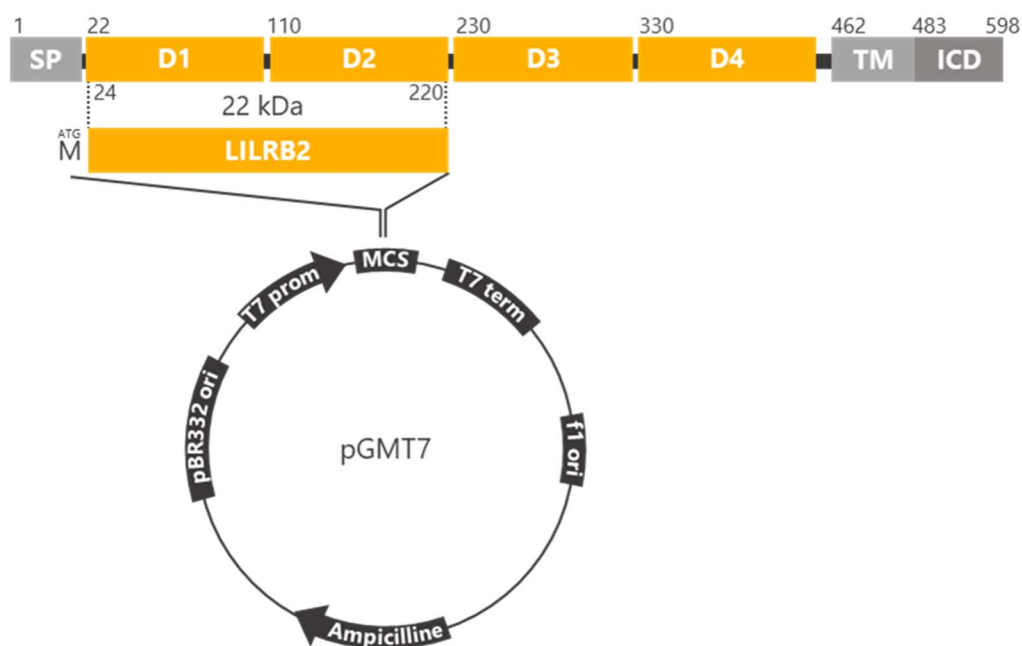


図 3-16 LILRB2 発現ベクターマップ SP:シグナルペプチド D1-4: Ig 様ドメイン TM: 膜貫通ドメイン ICD: 細胞内ドメイン

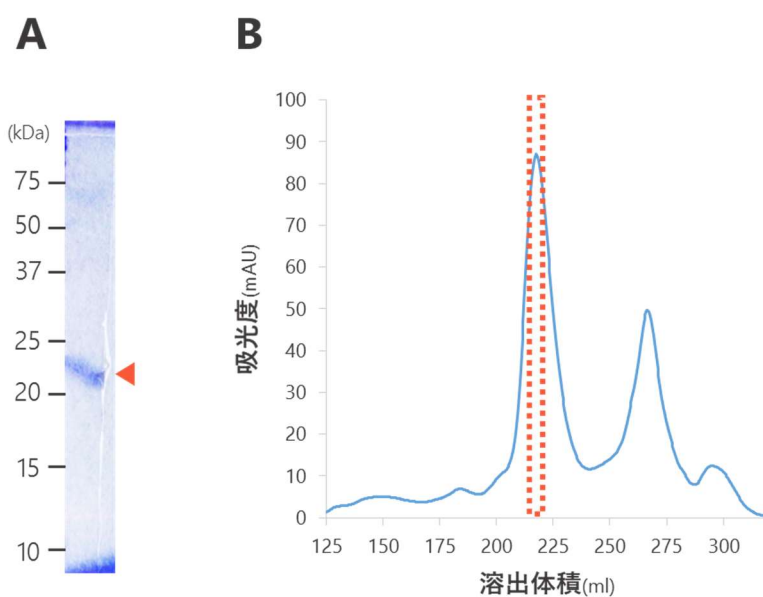


図 3-17 LILRB2 のゲル濾過精製 (A) SDS-PAEG による LILRB2 の分析。橙色点線枠の画分を分析した。橙色三角形で LILRB2 (22 kDa) のバンド位置を示した。(B) ゲル濾過精製時のクロマトグラム。橙色点線枠を精製 LILRB2 として以降の SPR 解析に使用した。

3-3-3 SPR 解析

CD1d と LILRB2 との特異的な相互作用について解析するため、以下に示すコントロールを置き SPR 法を用いて結合実験を行った。センサーチップに固定化するタンパク質として CD1d の他、コントロールとして LILRB と強く結合する HLA-G、LILRB2 にのみ結合する β 2m、LILRB には結合しない BSA を用いた。また液相に流すタンパク質として LILRB2 に加え、HLA-G にのみ結合する LILRB1 を用いた。

LILRB1 は HLA-G に既報⁷³とほぼ同じ結合定数で結合したが、CD1d と β 2m には結合しなかった(図 3-18A)。一方 LILRB2 は HLA-G に対して既報⁷³と同様強く結合し、また CD1d と β 2m への結合も示した(図 3-18A)。HLA-G への LILRB1 の結合量は濃度依存的に増加し、解離定数は 2.6 μ M であった。(図 3-18B)。LILRB2 は β 2m, CD1d, HLA-G に濃度依存的な結合量の増加を示した。LILRB2 と HLA-G との解離定数は 2.4 μ M であった(図 3-18C)。LILRB2 と β 2m の解離定数は 17 μ M であり、LILRB2 と CD1d の解離定数は 22 μ M で、どちらも LILRB2-HLA-G の解離定数の 10 倍程度となった(図 3-18C)。

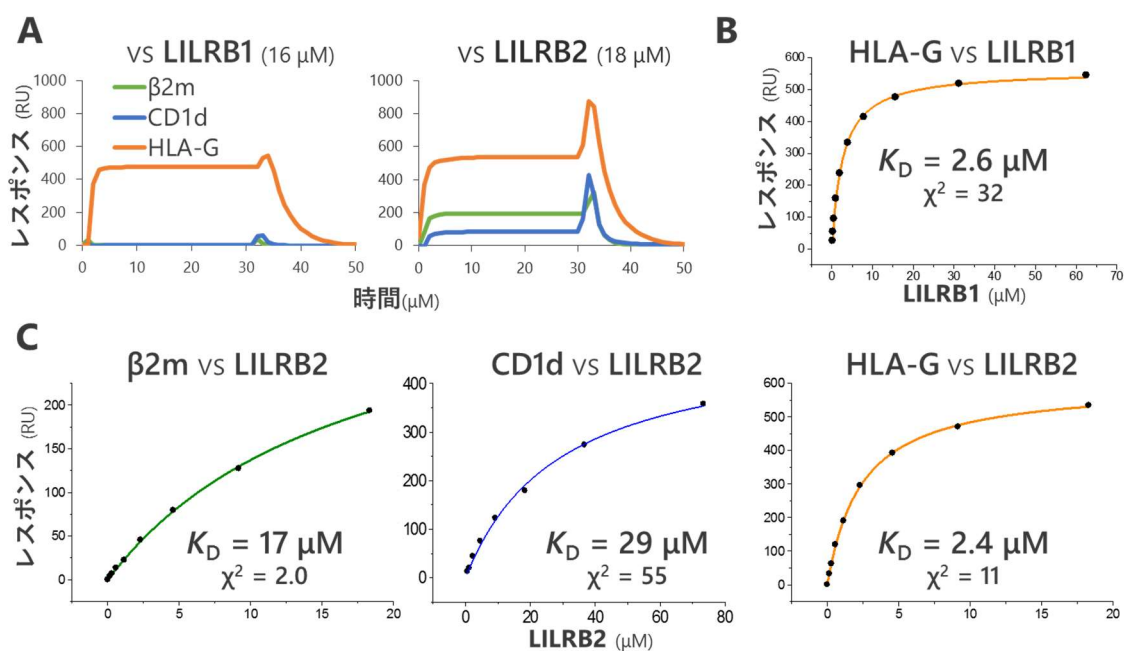


図 3-18 SPR 法による相互作用解析 流速: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, Ligand 固定化量; BSA: 630 RU; $\beta 2\text{m}$: 500 RU; CD1d: 700 RU; HLA-G: 1270 RU **(A)** LILRB1 及び LILRB2 と各タンパク質との結合を示すセンサグラム。LILRB1 は HLA-G のみに結合し、LILRB2 は HLA-G, CD1d, $\beta 2\text{m}$ の全てに結合する。 **(B)** LILRB1 と HLA-G の平衡値プロット。黒点が各 LILRB1 濃度における平衡状態のレスポンス、橙色線が 1:1 結合モデルによるフィッティング曲線を表す。 **(C)** 各タンパク質と LILRB2 との平衡値プロット。黒点が各 LILRB2 濃度における平衡状態のレスポンス、曲線が 1:1 結合モデルによるフィッティング曲線を表す。緑色が $\beta 2\text{m}$, 青色が CD1d, 橙色が HLA-G との結合を示している。

3-4 CD1d の受ける糖鎖修飾

CD1d は糖タンパク質であり、カイコ発現系で発現された CD1d は昆虫細胞で発現された場合と同様に *N* 型糖鎖修飾を受けることが予想される。安定な CD1d の発現には糖鎖修飾は有利に働くが、結晶構造解析を行う際には構造自由度の高い糖鎖はしばしば分解能低下の原因となる。カイコで発現させた CD1d の糖鎖修飾について解析を行った。

3-4-1 グリコシダーゼ処理

N 型糖鎖を切断する 2 つの酵素 Endo H_f 及び PNGase F (図 3-19A) を用いて糖鎖の消化を行った。Endo H_f はハイマンノース型ないしハイブリッド型 *N* 型糖鎖を、アスパラギン側鎖に結合した GlcNAc を 1 つ残して切断する酵素である。PNGase F は α 1-3 Fucose を持たない全ての *N* 型糖鎖を切断する酵素である。

Endo H_f で処理することで、未処理 CD1d より低い位置に CD1d 由来の 2 本のバンドが現れた(図 3-19B)。PNGase F 処理では、Endo H_f で処理した際より低い位置にバンドが現れ、PNGase F のバンドの下に CD1d の単一のバンドが現れた(図 3-19B)。PNGase F 消化産物のバンド位置は CD1d のポリペプチド鎖分子量である 33 kDa に一致したことからカイコ発現系にて調整した CD1d に *N* 型糖鎖が付加されていることが示唆された。

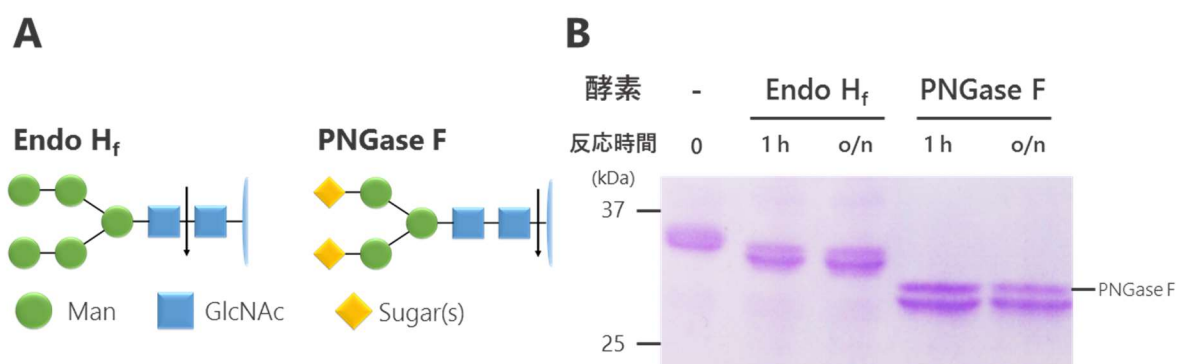


図 3-19 グリコシダーゼによる CD1d の *N* 型糖鎖消化 (A) グリコシダーゼの糖鎖切断部位。Man: マンノース GlcNAc: N-アセチルグルコサミン Sugar(s): 任意の糖 (B) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件) による糖鎖消化 CD1d の分析。Endo H_f で処理した際に現れた 2 本のバンドはどちらも CD1d 由来であり、PNGase F で処理した際に現れた 2 本のバンドのうち上のバンドは PNGase F である。

3-5 scCD1d の調製

結晶構造解析で高分解能のデータを得るためには結晶中の分子が均一であることが重要であり、修飾された糖鎖は分解能を下げる要因になりうる。しかし、CD1d-β2m 複合体は CD1d に修飾された糖鎖がなければ不安定になってしまう⁷⁴ため、糖鎖を除去することが難しい。そこで、CD1d と β2m をフレキシブルリンカー(GGGGSGSGGGGS)で接続することにより分子の解離を防ぎ、糖鎖がなくても安定化することを期待し、2 つの分子を一本鎖化した scCD1d を作製した(図 3-20)。CD1d C 末端と β2m N 末端は立体構造上遠くに位置し、CD1d N 末端と β2m C 末端間の距離のほうが短く接続した際の影響が小さいと予想されたため、β2m を N 末端に接続した scCD1d を設計した(図 3-20)。リンカー長は既報⁷⁵を参考にした。

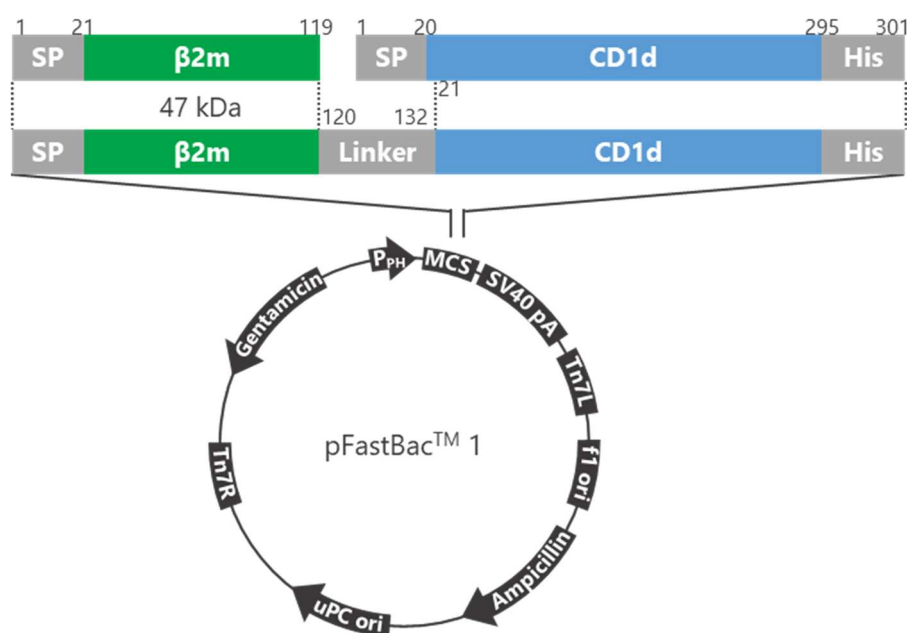


図 3-20 scCD1d のドナーベクターマップ SP:シグナルペプチド His: His タグ Linker:フレキシブルリンカー(GGGGSGSGGGGS)

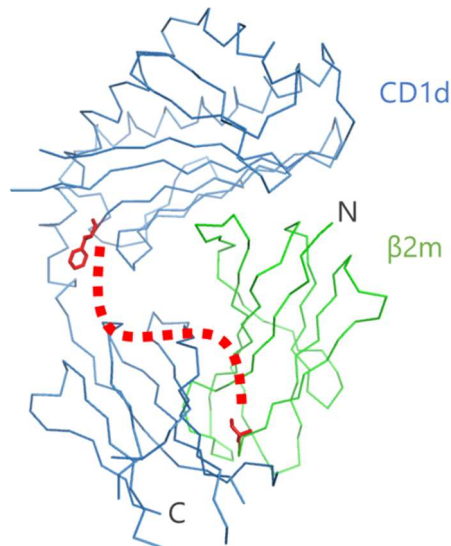


図 3-21 scCD1d の設計 CD1d 結晶構造をリボンモデルで示した。β2m N 末端及び CD1d C 末端を N, C と表記した。青線が CD1d を表し、緑線が β2m を表す。CD1d の N 末端と β2m の C 末端を赤のスティックで示し、フレキシブルリンカー(GGGGSGSGGGGS)の位置を赤破線で示した。

3-1-1 と同様にして scCD1d をカイコ血リンパ中に分泌発現させて回収した。各硫酸飽和度での検討を行い、60%飽和度の硫酸アンモニウムで scCD1d を全て沈殿させた(図 3-22)。

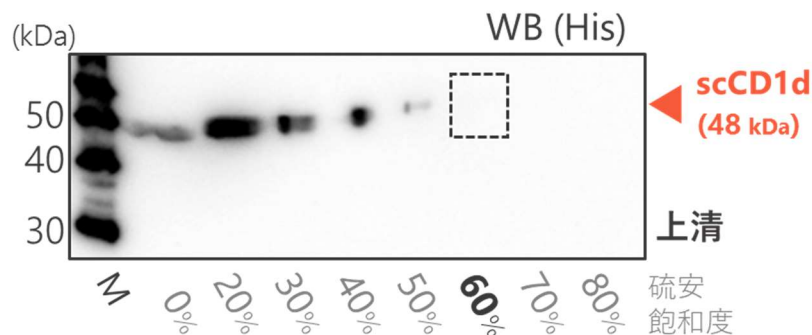


図 3-22 scCD1d 硫酸分画のウェスタンブロッティング カイコ体液に硫酸アンモニウムを各飽和度になるよう添加した際の上清に含まれる CD1d。CD1d のバンド位置を赤三角形で示した。60% 飽和度における上清中の CD1d を破線枠で囲った。

沈殿をバッファーに再溶解し、Ni アフィニティークロマトグラフィーを行った(図 3-23)。Ni アフィニティー精製時に scCD1d に近い分子量のカイコ由来タンパク質が scCD1d の溶出位置近傍

で溶出されるため、ウェスタンブロッティングにより scCD1d の含まれる画分を検出して回収した(図 3-23A)。scCD1d はイミダゾール濃度 50-100 mM で Ni カラムから溶出された(図 3-23B)。

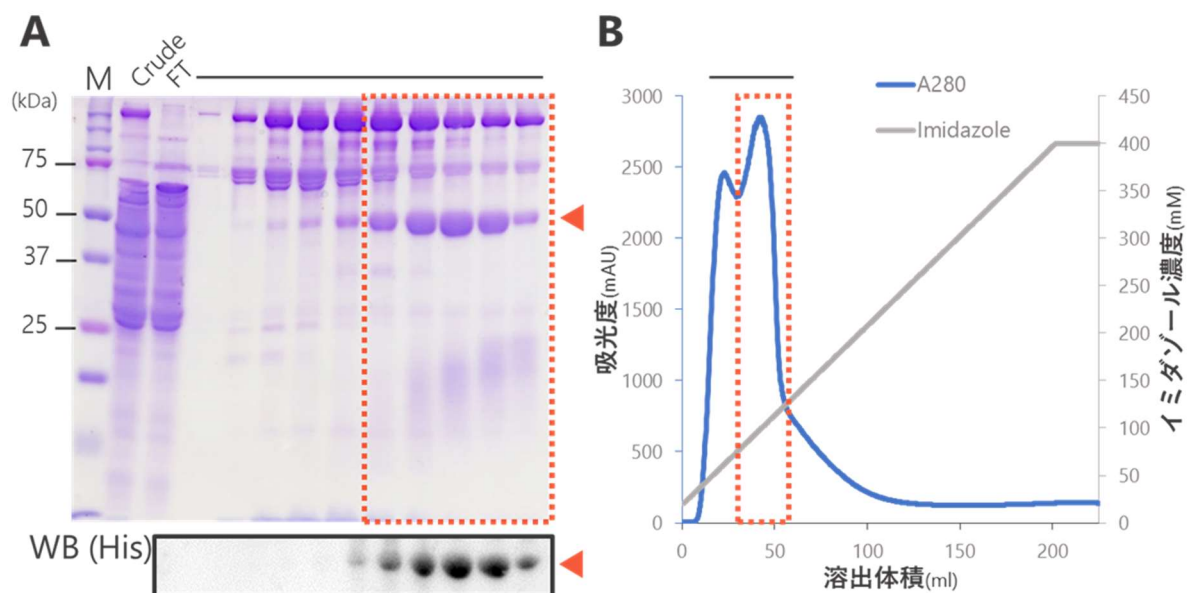


図 3-23 scCD1d の Ni アフィニティー精製 (A) SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、還元条件) による溶出画分の分析。上図は CBB 染色で検出した全体図。下図は His タグをウェスタンブロッティングで検出したときの scCD1d。クロマトグラム上部の棒線と対応している。**(B)** Ni アフィニティー精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を以降の精製に用いた。

さらに高純度のタンパク質を得るため、scCD1d を含む画分をゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した(図 3-24B)。SDS-PAGE で精製度を分析し、高純度の scCD1d を得た(図 3-24A)。最終的な CD1d の収量はカイコ 1 頭あたり 50-70 μg であった。

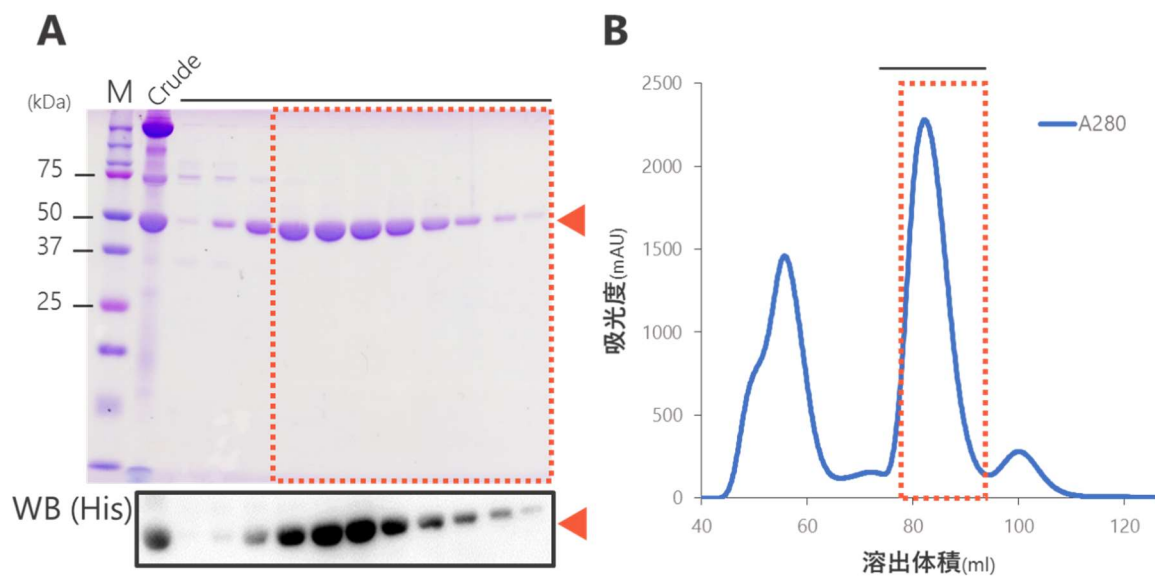


図 3-24 scCD1d のゲル濾過精製 (A) SDS-PAGE (12.5%アクリルアミドゲル、還元条件)による溶出画分の分析。上図は CBB 染色で検出した全体図。下図は His タグをウェスタンブロッティングで検出したときの scCD1d。クロマトグラム上部の棒線と対応している。**(B)** ゲル濾過精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を精製 scCD1d として以降の実験に用いた。

また、得られた scCD1d がモノマーであるかを調べるため、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分子量を推算した。標準タンパク質の溶出位置から検量線を作成し、得られた式に CD1d の溶出位置を代入して分子量を算出した結果、一本鎖化していない CD1d と同じであり、モノマー相当の 36 kDa となった(図 3-25)。

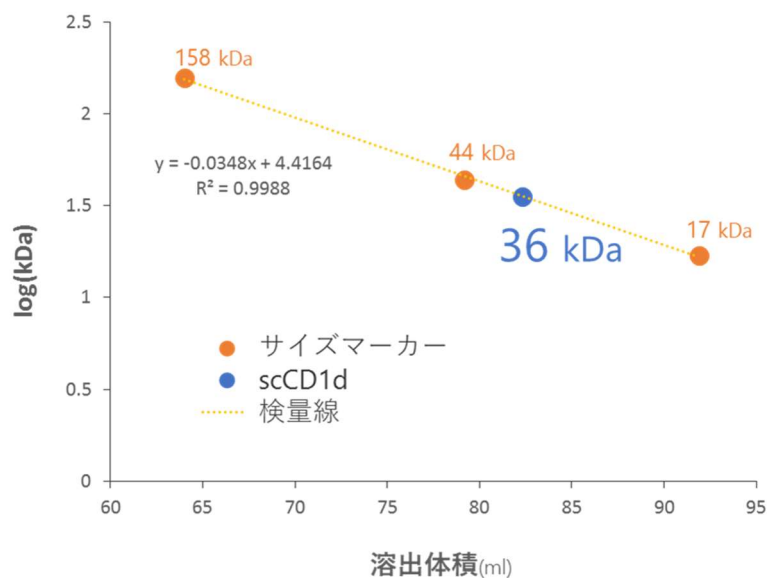


図 3-25 ゲル濾過の溶出体積と分子量の対数プロット ゲル濾過カラムには Superdex200 16/60 (GE Healthcare)を用いた。橙: 標準タンパク質 青: scCD1d 黄: 検量線

3-6 scCD1d の性状解析

一本鎖化による CD1d への影響を調べるため、種々の物理化学的手法を用いて CD1d の分析を行った。

3-6-1 MALDI-TOF MS

scCD1d の分子量を MALDI-TOF MS によって調べたところ、タンパク質の一次構造から推算される分子量より 4 kDa 程度大きい分子量であった(図 3-26)。CD1d の分子量も一次構造から推算される分子量より 4 kDa 程度大きく、scCD1d はカイク内で CD1d と同様の翻訳後修飾を受けていることが示唆された。

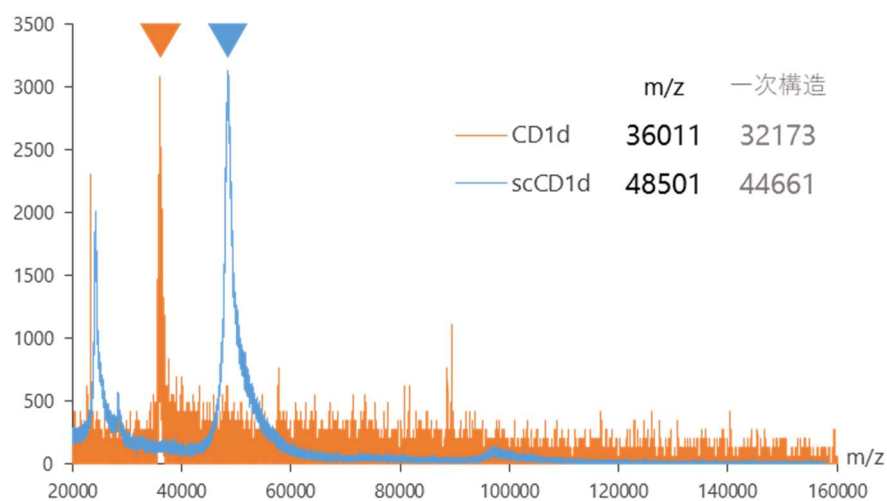


図 3-26 CD1d と scCD1d の MALDI-TOF MS 解析

3-6-2 示差走査熱量測定(DSC)

scCD1d の安定性を評価するため、示差走査熱量測定(DSC)を行った(図 3-27)。1 成分モデルにおいて、CD1d の変性温度は 61.5°C であり、 $\beta 2m$ の 61.0°C より高かった。また scCD1d の変性温度は CD1d よりもさらに高い 62.7°C であった(図 3-27A, B, 表 3-3)。2 成分モデルでは CD1d の T_{m2} (62.0°C) と scCD1d の T_{m1} (62.1°C) がほぼ等しい値をとった(図 3-27C, 表 3-3)。

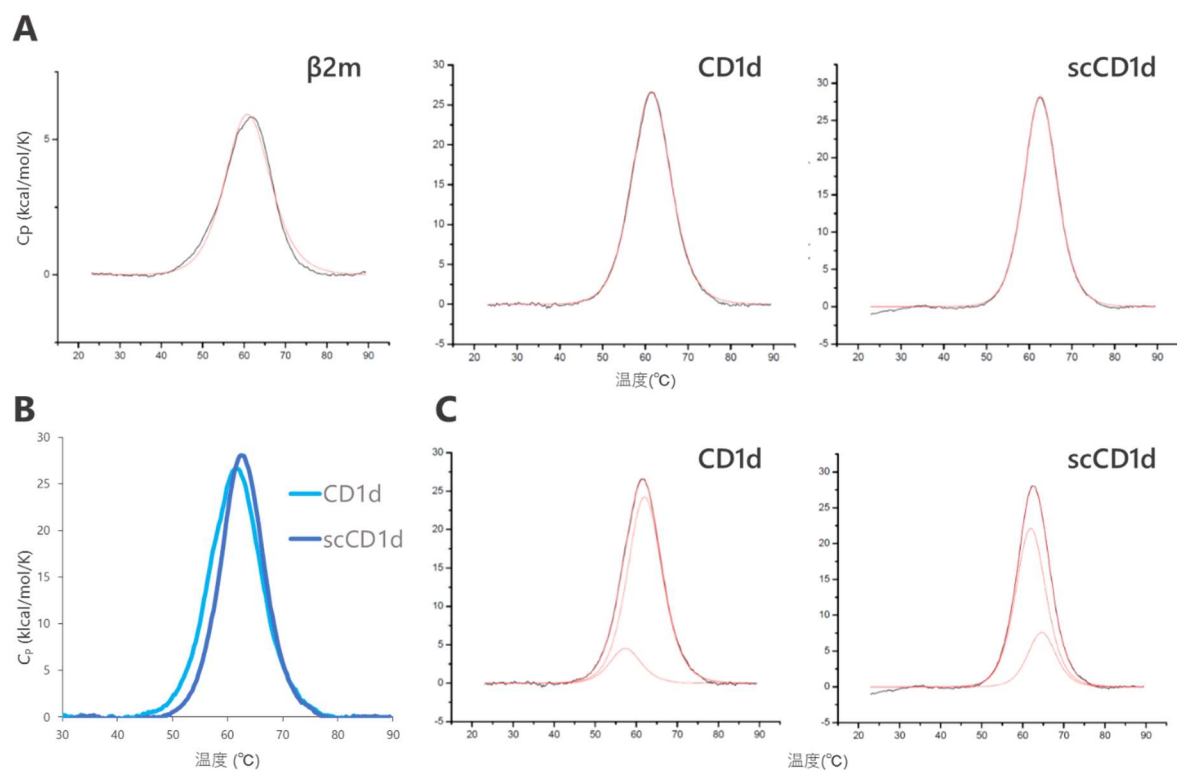


図 3-27 CD1d と scCD1d の熱容量曲線 (A) 1 成分モデルでのフィッティング。黒線が測定データ、赤線がフィッティング曲線を表す。(B) CD1d と scCD1d の熱容量曲線。水色: CD1d 青: scCD1d (C) 2 成分モデルでのフィッティング。黒線が測定データ、赤線がフィッティング曲線を表す。

表 3-3 非二状態転移モデルでの T_m 値

	1成分	2成分	
	T_m (°C)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
$\beta 2m$	61.0	-	-
CD1d	61.5	57.4	62.0
scCD1d	62.7	62.1	64.7

3-6-3 CD スペクトル解析

MHC 分子へのリガンドの積載はリソソームなどの低 pH 下で行われる。低 pH では MHC のリガンド結合部位がゆりみ、リガンドの交換が行われやすくなる⁷⁶。CD1d も同様に低 pH 下でリガンドの交換が促進されるが、低 pH にすることにより CD1d の立体構造が不可逆的に変化してし

もう可能性がある。CD1d の変性が起こらない pH の下限を調べるため、タンパク質の二次構造を測定することのできる CD スペクトル解析を scCD1d について各 pH 条件で行った(図 3-28)。

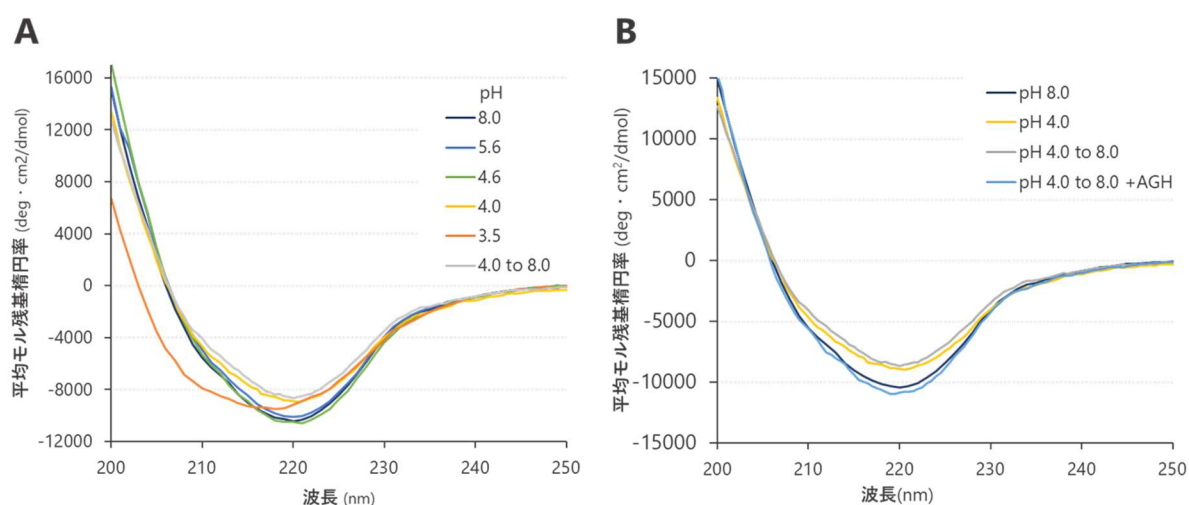


図 3-28 pH による scCD1d の CD スペクトル変化 (A) pH 3.5-8.0 までの範囲と、pH 4.0 にした後 pH 8.0 に戻した際の scCD1d の CD スペクトル。 **(B)** α-GC の添加の有無による pH 4.0 から pH 8.0 に変化させた際の scCD1d の CD スペクトルの比較。

pH を 4.6 まで変化させても波形は変化せず、scCD1d は構造を保持した(図 3-28A)。pH 4.0 で波形が浅くなり始め、pH 3.5 では元の波形と大きく異なる波形が得られた。また、pH 4.0 及び pH 3.5 に変化させた scCD1d を再び pH 8.0 条件下に戻して測定したが、元の pH 8.0 と同じ波形は得られなかった。しかし、pH 4.0 にした scCD1d に抗原である α-GC を添加して pH 8.0 に戻した際には、もとの pH 8.0 におけるスペクトルと一致した(図 3-28B)。

3-7 mCD1d の調製

マウス CD1d はヒト CD1d と高い配列相同性を持ち(図 3-29)、どちらも α-GC⁴⁴ やグラム陰性菌由来糖脂質^{6,77,78}などを認識して NKT 細胞を活性化させる。iNKT 細胞を効率的に刺激する α-GC 誘導体の研究が盛んに行われ、高いサイトカイン産生活性やサイトカイン選択性をマウス実験系で示した化合物が見出されたが^{29,79,80}、ヒト iNKT 細胞にはそれほど強い作用や選択性を示さなかった^{29,80}。ヒトとマウスにおける CD1d 免疫機構の詳細な理解のため、CD1d の抗原認識における差異の構造生物学的手法による解析に向けてマウス CD1d の調製系を構築した。

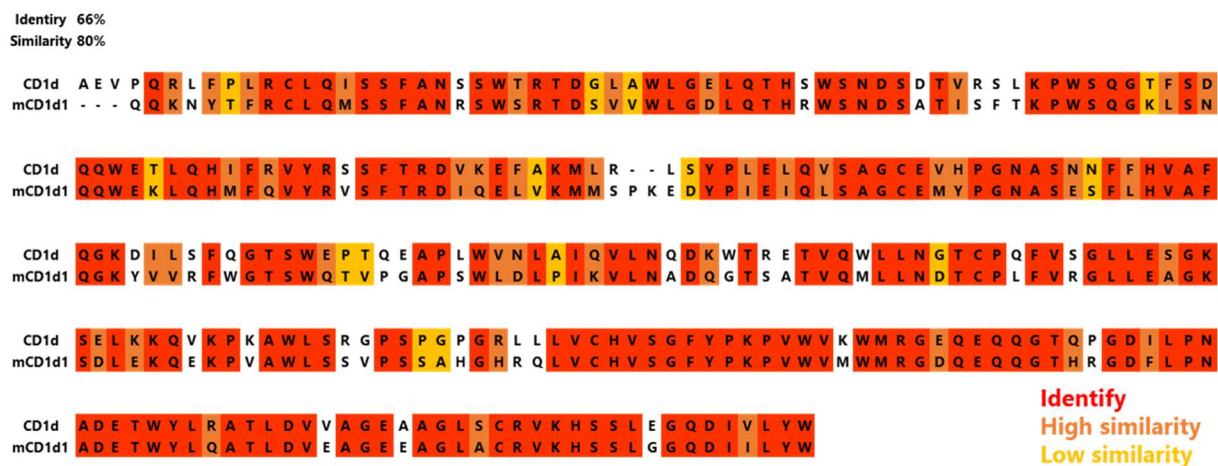


図 3-29 ヒト及びマウス CD1d の配列相同性 Clustal W⁸¹ による CD1d 重鎖の配列相同性の比較図。赤：Identify 橙：High similarity 黄：similarity

3-1-1 と同様にして mCD1d をカイコ血リンパ中に分泌発現させて回収した(図 3-30)。各硫酸飽和度での検討を行い、60%飽和度の硫酸アンモニウムで mCD1d を全て沈殿させた(図 3-31)。

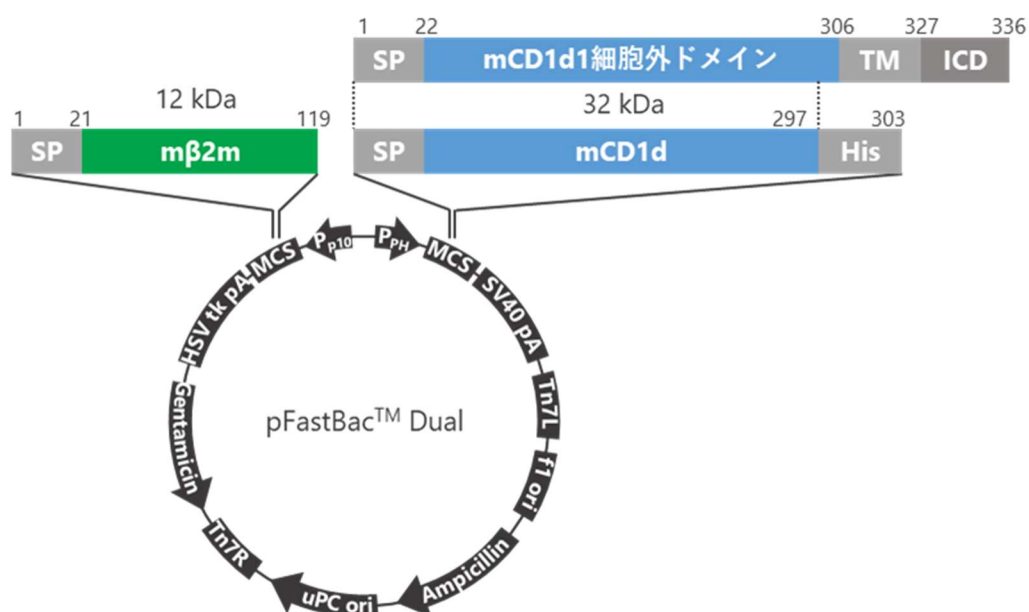


図 3-30 mCD1d ドナーベクターマップ SP:シグナルペプチド TM: 膜貫通ドメイン ICD: 細胞内ドメイン His: 6×His タグ(HHHHHH)

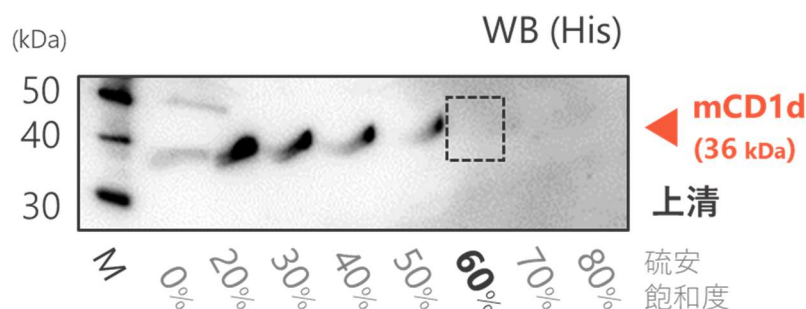


図 3-31 mCD1d 硫酸分画のウェスタンブロッティング カイコ体液に硫酸アンモニウムを各飽和度になるよう添加した際の上清に含まれる mCD1d。mCD1d のバンド位置を赤三角形で示した。60%飽和度における上清中の mCD1d を破線枠で囲った。

沈殿をバッファーに再溶解し、Ni アフィニティークロマトグラフィーを行った(図 3-32)。ウェスタンブロッティングによって mCD1d 重鎖は広範に渡って溶出していたが、ヘテロダイマーを形成しているもののみを回収するため、 β 2m が含まれる溶出画分のみを回収した(図 3-32A)。mCD1d はイミダゾール濃度 30-50 mM で Ni カラムから溶出された(図 3-32B)。

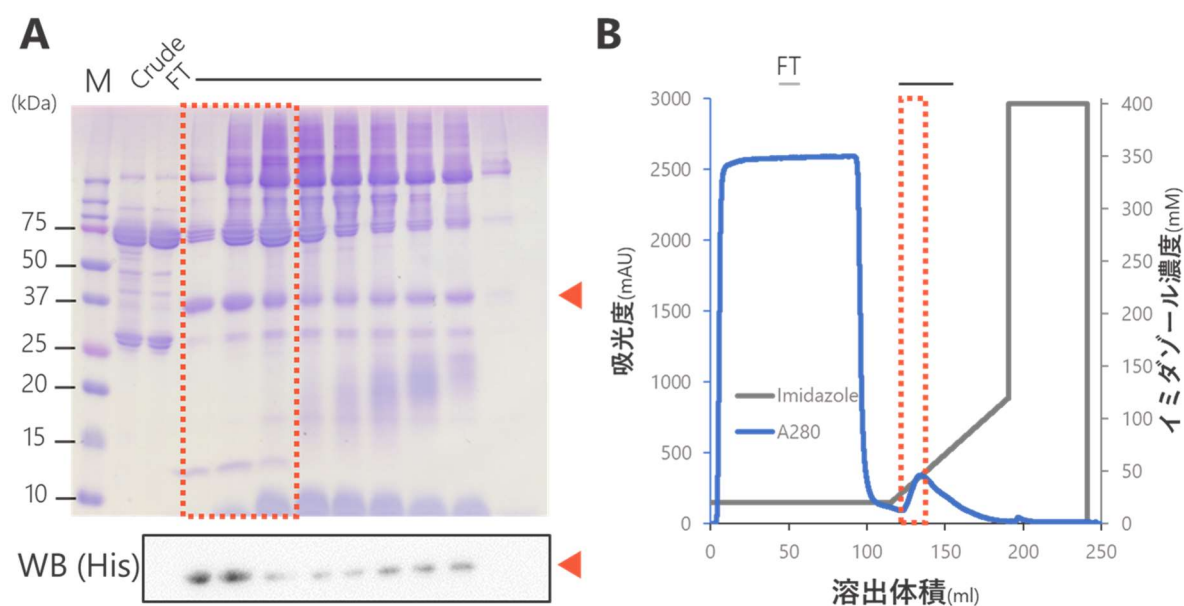


図 3-32 mCD1d の Ni アフィニティー精製 (A) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件) による溶出画分の分析。上図は CBB 染色で検出した全体図。下図は His タグをウェスタンブロッティングで検出したときの mCD1d。クロマトグラム上部の棒線と対応している。**(B)** Ni アフィニティー精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を以降の精製に用いた。

さらに高純度のタンパク質を得るため、mCD1dを含む画分をゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した(図 3-33B)。SDS-PAGE で精製度を分析し、高純度の mCD1d を得た(図 3-33A)。最終的な mCD1d の収量はカイコ 1 頭あたり 50 μ g であった。

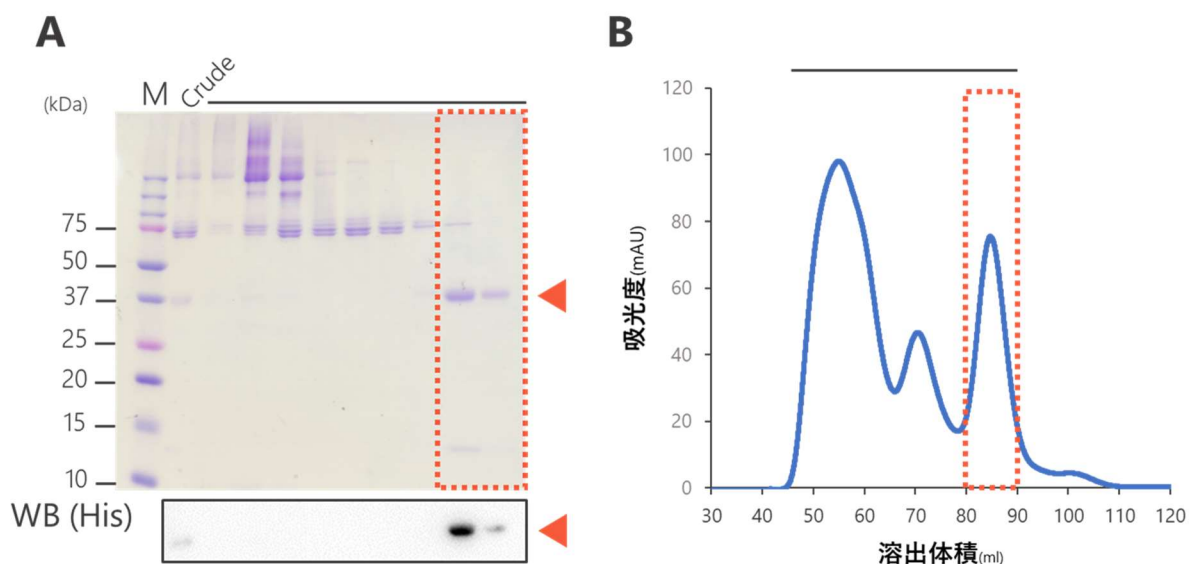


図 3-33 mCD1d のゲル濾過精製 (A) SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル、還元条件)による溶出画分の分析。上図は CBB 染色で検出した全体図。下図は His タグをウェスタンブロッティングで検出したときの mCD1d。クロマトグラム上部の棒線と対応している。**(B)** ゲル濾過精製時のクロマトグラム。橙色破線枠で囲った画分を精製 mCD1d として以降の実験に用いた。

3-7-1 mCD1d の DSC 解析

マウス CD1d はヘテロ二量体での共発現系でも scCD1d と同程度の発現量が得られたため、高発現量の要因を検討するために熱安定性の解析を DSC を用いて行った(図 3-34)。1 成分モデルにおいて、mCD1d の変性温度は 61.7°C と、ほぼ hCD1d (61.5°C) と同一であった。しかし、mCD1d の熱容量曲線はよりピークが鋭く、熱変性過程における分子集団のばらつきが小さいことがわかった。

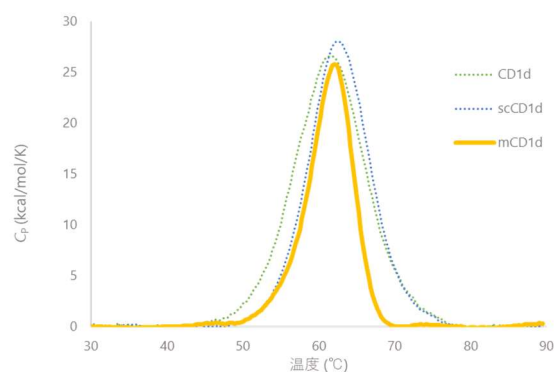


図 3-34 mCD1d の熱容量曲線 mCD1d と hCD1d および scCD1d の熱容量曲線。緑: hCD1d 青: scCD1d 黄色: mCD1d

3-8 CD1d に結合したカイコ内在性脂質の解析

CD1d は大きな疎水性ポケットを持つため、安定して存在するためには適切な脂質の結合を必要とする。カイコ発現系にて調製された CD1d が内在性抗原として結合する脂質を TLC 及び LC-MS によって解析した。

3-8-1 TLC

精製 CD1d から抽出した脂質を TLC で分析した結果、hCD1d と mCD1d に共通して FA, DG, PE, PC, SM のバンドが観測された(図 3-35)。

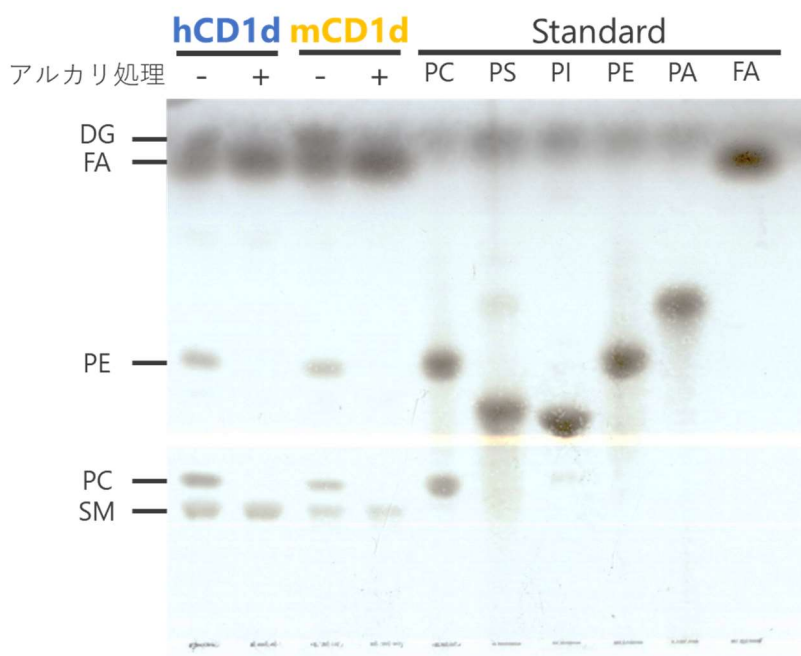


図 3-35 CD1d に結合したカイコ内在性脂質の TLC 解析

3-8-2 LC-MS

CD1d 結合脂質を詳細に解析するため、TLC で分離した各画分について LC-MS で解析した。CD1d には主にアシル鎖長が 16~18 の脂質が結合していた(表 3-4)。

表 3-4 ヒト・マウス CD1d 抽出脂質の LC-MS 解析 黒：ヒトとマウスで共通して見られたピーク 青：ヒト CD1d でのみ見られたピーク 黄：マウス CD1d でのみ見られたピーク

脂質	m/z (同定、未同定)	アシル鎖組成
FA	277, 279, 281	18:4, 18:3, 18:2
DG	632, 634, 647	20:2/18:1
PE	544 , 610, 758	20:5/18:4
PC	782, 758, 784, 760, 786	18:1/18:0, 18:1/16:0, 18:1/18:1, 18:2/16:0, 18:2/18:1
SM	703 , 610	18:1/16:0

3-9 scCD1d の結晶構造解析

scCD1d を用いて LILRB2 との共結晶化を行った。結晶化スクリーニングを行ったが、これまで CD1d の結晶が得られていた条件に類似した硫酸アンモニウムを含む条件で結晶が得られた(図 3-36A)。X 線回折実験を行い得た回折像(図 3-36B)を用いて強度データを得た(表 3-5)。CD1d-β2m 複合体(PDB ID: 4EN3)及び LILRB2 (PDB ID: 2DYP)をサーチモデルとした分子置換法を行ったが LILRB2 分子は見つけられず、これまでの硫酸アンモニウムを含む条件の CD1d 結晶と同様の空間群や格子定数をもった scCD1d 結晶構造が得られた。

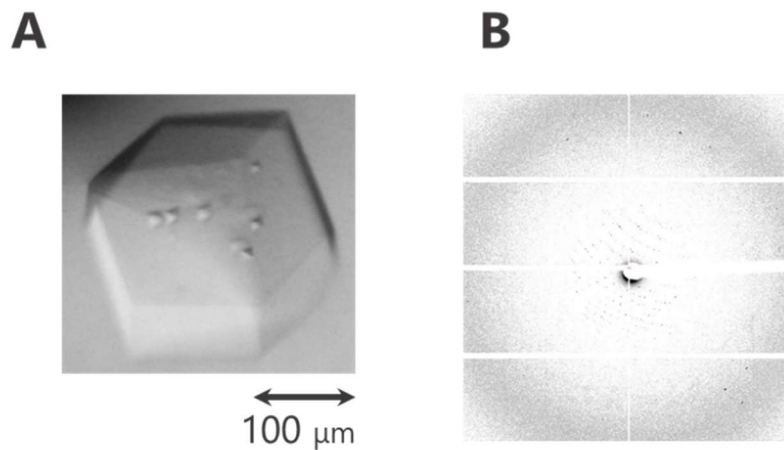


図 3-36 scCD1d 結晶 (A) scCD1d の単結晶。シッティングドロップ蒸気拡散法により 0.1 M Citrate pH 4.0, 1.6 M Ammonium sulfate の条件で得られた。**(B)** scCD1d 結晶の X 線回折像。結晶を 0.1 ° 回転させた際の回折像を 5 枚重ね合わせている。

表 3-5 scCD1d の測定データ

Space group	$I 2_13$
Cell dimensions (Å)	$a = b = c = 242.19$
Resolution (Å)	50.00-3.40 (4.27-3.40)
$I / \sigma(I)$	6.8 (3.7)
Completeness (%)	100.0 (100.0)
Redundancy	18.7 (16.7)

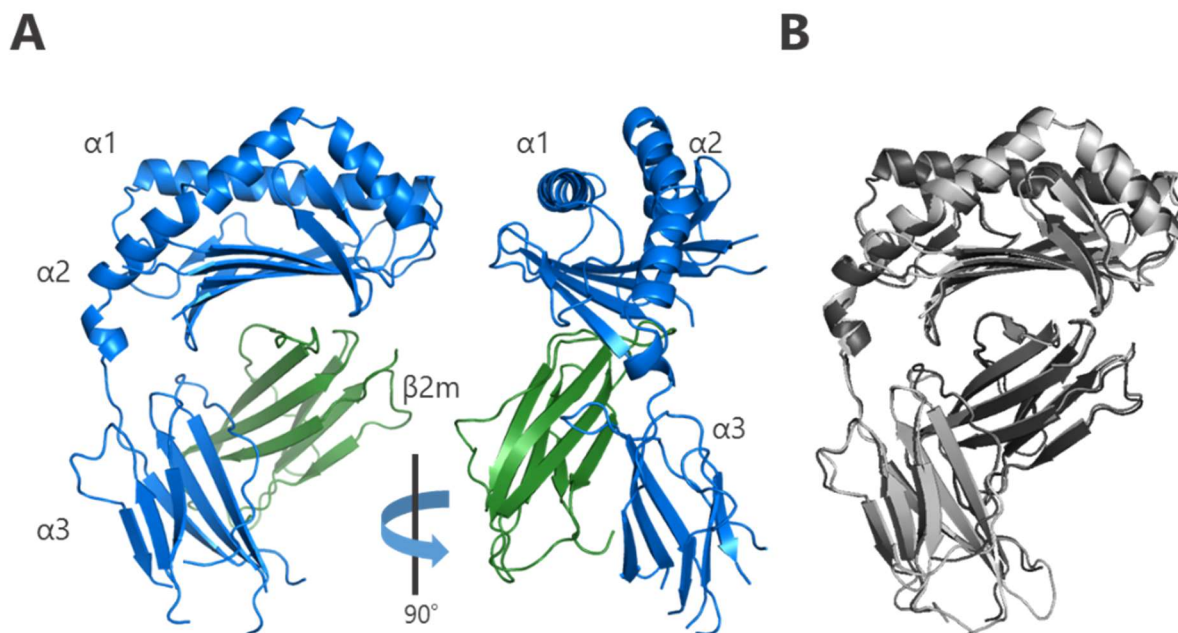


図 3-37 scCD1d の結晶構造 (A) 正面及び側面から見た scCD1d の結晶構造。CD1d を青で、β2m を緑で示した。**(B)** scCD1d と CD1d の重ね合わせ図。scCD1d を黒で、CD1d を灰色で示した。

3-10 scCD1d-α-GC-12'Se の結晶構造解析

scCD1d を用いた場合でも一本鎖化していない CD1d と同様に結晶が得られることが確認できたため、抗原の配座を決定し得る構造データを得るために α-GC-12'Se 及び LILRB2 との共結晶化を行った。結晶化スクリーニングにより微結晶が得られ、沈殿剤濃度を下げた条件で解析に十分な大きさの単結晶が得られた(図 3-38)。得られた結晶を用いて X 線回折実験を行い、分子置換法によって scCD1d の結晶構造を得た(図 3-39A)。測定・精密化データを表 3-6 に示した。サーチモデルとして CD1d-β2m 複合体(PDB ID: 4EN3)及び LILRB2 (PDB ID: 2DYP)を用いたが、結晶中に LILRB2 分子は見られなかった。

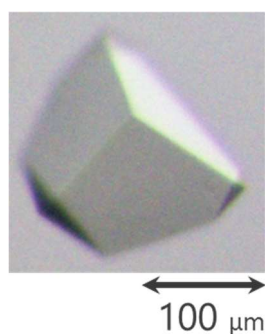


図 3-38 **scCD1d-αGC-12'Se の単結晶**。シッティングドロップ蒸気拡散法により 0.14 M tri-ammonium citrate, 16% PEG3350 の条件で得られた。

表 3-6 **scCD1d-αGC-12'Se の測定・精密化データ**

Data collection	
Space group	<i>P</i> 23
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> = 121.47
Resolution (Å)	42.94-2.40 (2.49-2.40)
<i>I</i> / σ(<i>I</i>)	11.4 (2.0)
Completeness (%)	100.0 (100.0)
Redundancy	21.8 (22.4)
Refinement	
<i>R</i> / <i>R</i> _{free}	0.20 / 0.23
RMSD bond (Å) / angle (°)	0.006 / 0.804

scCD1d の抗原結合部位に αGC-12'Se の電子密度が観測された(図 3-39B)。3-2 で示した分解能 4.2 Å の結晶構造ではと比較して明瞭な電子密度が観測された。また、αGC との複合体構造¹³と比較すると RMSD が 0.482 Å とほぼ一致し、抗原の形状にも大きな違いが見られなかったことから、αGC のセレン化による構造への影響は小さいものであると示唆された。また、赤破線で囲った領域に Se 原子由来の電子密度であると推察される大きな電子密度が観測された。Se 原子の位置を指標として精密化を行い、scCD1d 中の αGC-12'Se の配座を決定した(図 3-39C)。

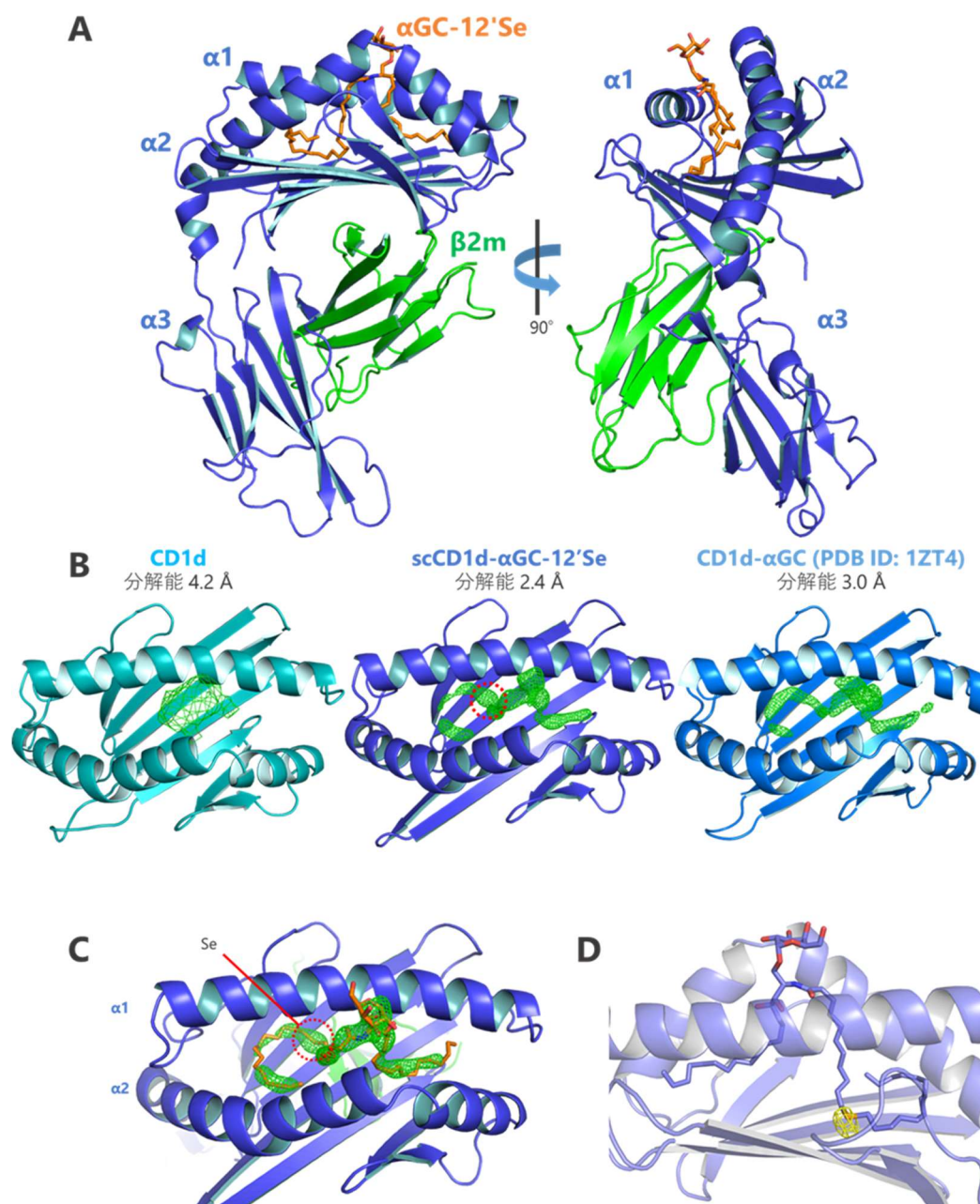


図 3-39 scCD1d-α-GC-12'Se の結晶構造 (A) 正面及び側面から見た scCD1d の結晶構造。CD1d を青で、β2m を緑で示し、α-GC-12'Se を橙色で示した。(B) 各結晶構造における抗原の電子密度の比較。緑で $F_o - F_c$ (3σ) を示した。(C) scCD1d 中の α-GC-12'Se とコンボジットオミットマップ。赤破線でセレン原子の位置を示した。(D) Se 原子の異常散乱差フーリエマップ。

3-11 ヒトおよびマウス CD1d の内在性抗原結合構造

ヒトおよびマウスにおける内在性抗原認識の違いについて理解を深めるため、内在性脂質が結合した際のそれぞれの CD1d の立体構造を解析した。

ヒトおよびマウス CD1d について結晶化スクリーニングを行い、再現よく結晶が得られる条件にて条件展開を行い、X 線回折実験によって得た回折像から立体構造を決定した。

表 3-7 内在性抗原結合 CD1d の測定・精密化データ

Data collection	scCD1d	mCD1d
Space group	<i>P</i> 23	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
		<i>a</i> = 42.09
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> = 121.23	<i>b</i> = 107.42
		<i>c</i> = 110.36
Resolution (Å)	47.49-2.65 (2.78-2.65)	48.29-2.30 (2.38-2.30)
<i>I</i> / $\sigma(I)$	11.4 (1.7)	7.9 (1.6)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	99.8 (99.3)
Redundancy	20.7 (21.5)	6.6 (6.9)
Refinement		
<i>R</i> / <i>R</i> _{free}	0.18/0.23	0.20/0.25
RMSD bond (Å) / angle (°)	0.008/0.94	0.007/0.91

ヒト CD1d では抗原結合ポケット入り口に大きな電子密度が見られた(図 3-40A)一方で、マウス CD1d では A'ポケット深部に小さな電子密度が観測された(図 3-40B)。ヒト CD1d の電子密度に対して PE を当てはめたところ、アシル鎖部分は α -GC と概ね一致した(図 3-40C)。また、マウス CD1d の電子密度に対して FA を当てはめたところ、短いアシル鎖を持つ α -GC 誘導体結合構造のスペーサー脂質部分と配向が一致した(図 3-40D)。

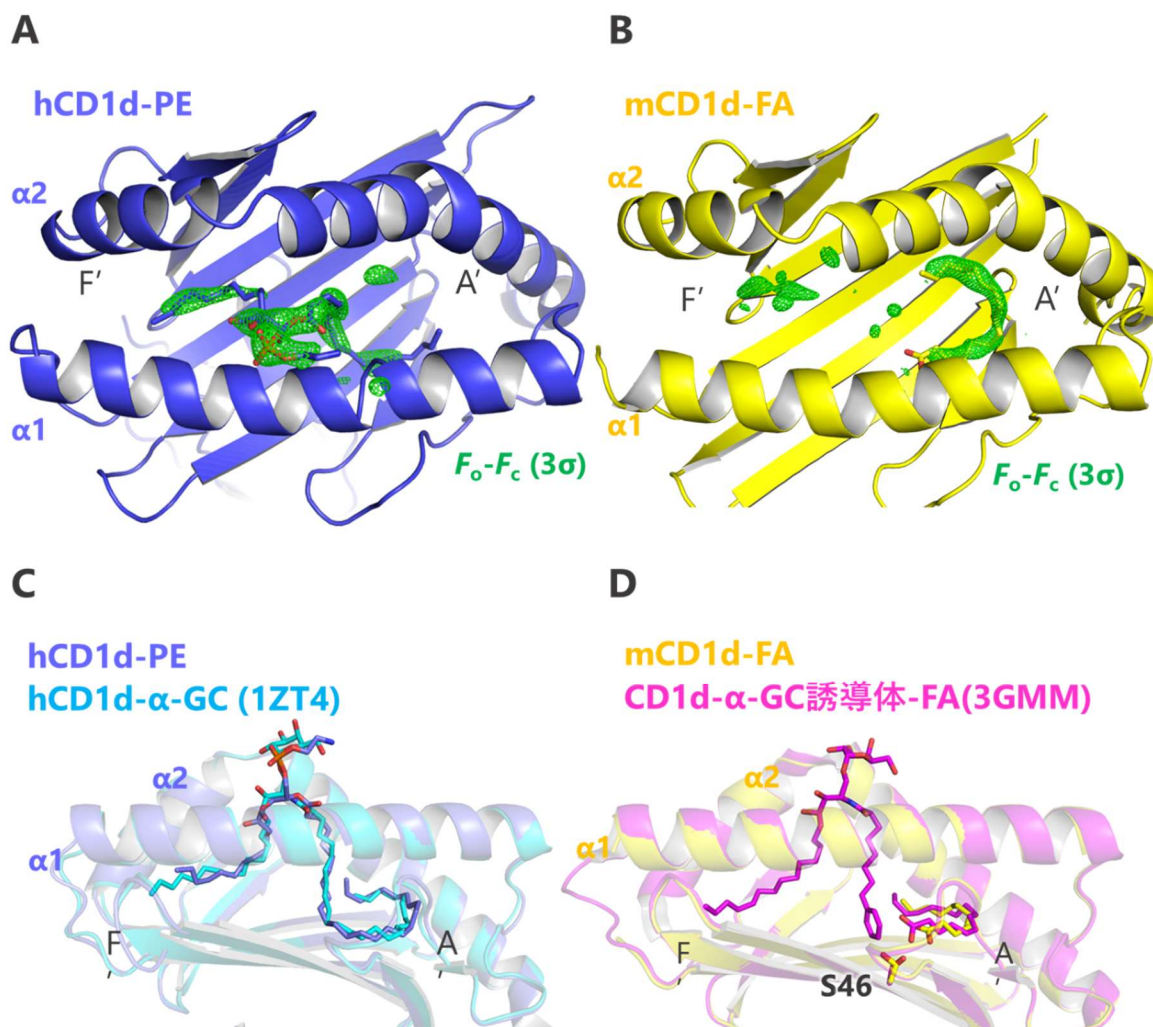


図 3-40 CD1d に結合したカイコ内在性脂質の電子密度 (A) 上面から見た scCD1d の抗原結合部位の電子密度図。緑のメッシュで F_0 - F_c マップを示した。(B) 上面から見た mCD1d の抗原結合部位の電子密度図。緑のメッシュで F_0 - F_c マップを示した。(C) 側面から見た scCD1d の抗原結合部位。PE (12:0/26:0) (D) 側面から見た mCD1d の抗原結合部位。FA (18:0)

内在性抗原を結合した CD1d の抗原結合部位の立体構造を α -GC 結合構造と比較したところ、ヒト CD1d において側鎖の配向が変化していた(図 3-41)。A'ポケット内部に位置する F88 の配向が不安定になっており(図 3-41A)、配向が変化した F88 との衝突を避けるように W58 および V65 の配向が変化した(図 3-41B)。一方、マウス CD1d では内在性抗原が結合した際も構造変化は起こさなかった(図 3-41C)。

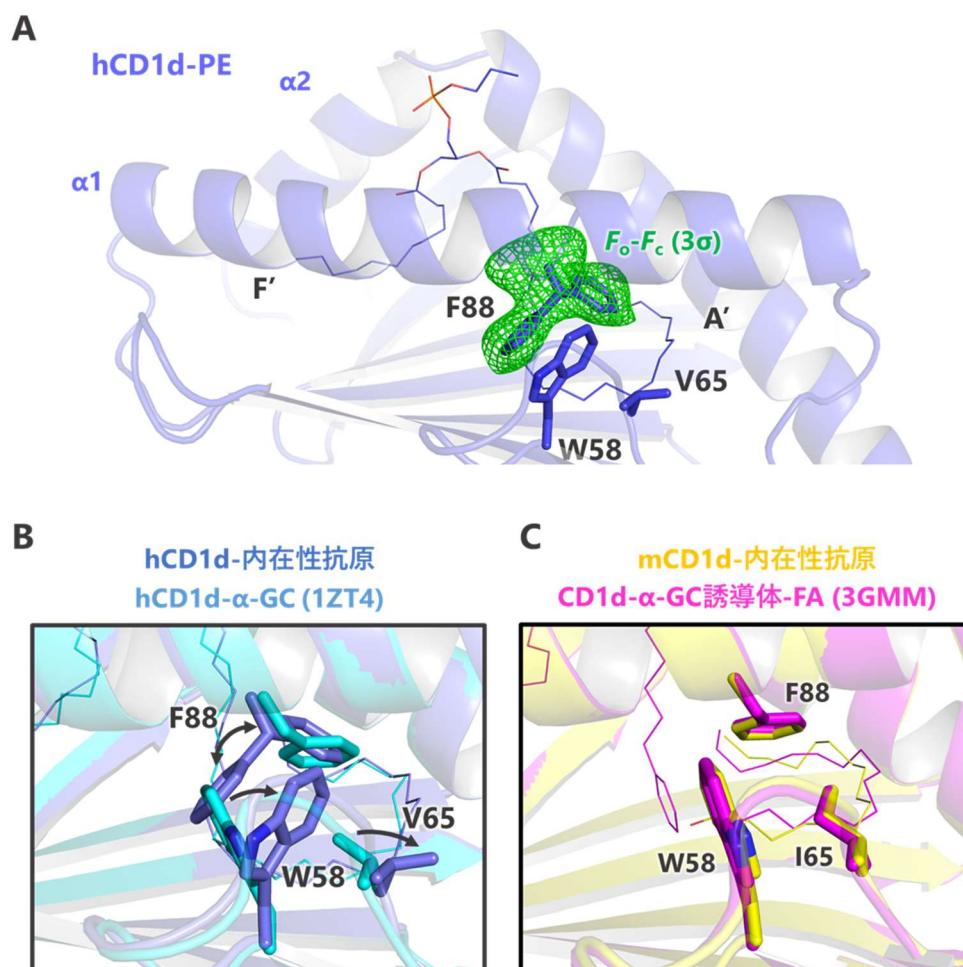


図 3-41 CD1d の A' ポケット内部の構造変化 (A) 側面から見た scCD1d の F88 の電子密度図。緑のメッシュで F_0-F_c マップを示した。 (B) ヒト CD1d A' ポケットの残基の構造比較図。 (C) マウス CD1d A' ポケットの残基の構造比較図。

3-12 ヒトおよびマウス CD1d とアミド型 α -GC の複合体構造

近年 α -GC にアミド基を導入した抗原(図 3-42)が高い活性を持ち⁸²、高いサイトカイン産生能を保持したまま Th2 選択性を上げることが報告された⁸³。これまでに見出された代表的な Th2 選択的抗原には OCH⁸⁴があり、多発性硬化症やクローン病などの治療薬として期待されているが、高い活性を持つ Th2 選択的抗原の少なく、CD1d 抗原の Th2 選択性に関する知見を深めることが求められている。そこで、活性と Th2 選択性を両立するアミド型 α -GC の CD1d 認識機構を解明するため、CD1d 抗原複合体の立体構造解析を行った。

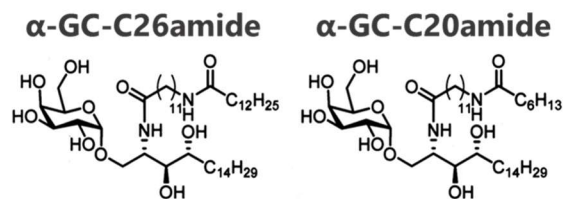


図 3-42 アミド型 α-GC

アミド型 α-GC と CD1d の結晶を調製した(図 3-43)。

ヒトおよびマウス CD1d とアミド型 α-GC の複合体結晶を調製し(図 3-43)、X 線回折実験によって得た回折像から立体構造を決定した(表 3-8)。

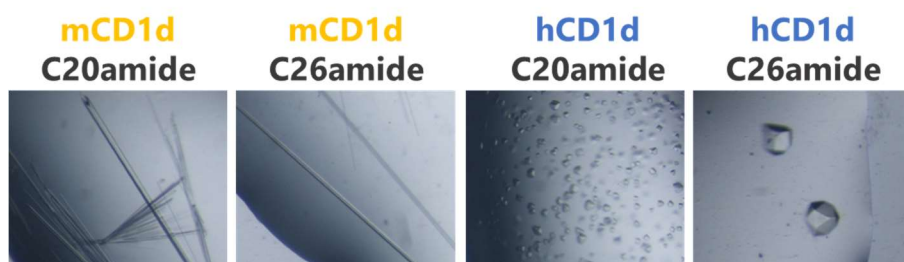


図 3-43 アミド型 α-GC と CD1d の複合体結晶

表 3-8 アミド型 α-GC と CD1d 複合体の測定・精密化データ

Data collection	mCD1d-α-GC-C20amide	mCD1d-α-GC-C26amide	scCD1d-α-GC-C20amide	scCD1d-α-GC-C26amide
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 23	<i>P</i> 23
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = 41.67	<i>a</i> = 41.74	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> = 120.97	<i>a</i> = <i>b</i> = <i>c</i> = 119.82
	<i>b</i> = 106.22	<i>b</i> = 106.11		
	<i>c</i> = 108.46	<i>c</i> = 108.43		
Resolution (Å)	47.70-1.90	48.28-2.30	49.36-1.80	42.36-2.50
	(1.94-1.90)	(2.38-2.30)	(1.84-1.80)	(2.60-2.50)
<i>I</i> / σ(<i>I</i>)	6.7 (1.8)	5.4 (2.1)	21.1 (2.1)	8.6 (1.5)
Completeness (%)	99.4 (100.0)	99.7 (98.8)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundancy	6.7 (7.0)	6.7 (7.0)	20.7 (21.2)	20.2 (20.3)
Refinement				
<i>R</i> / <i>R</i> _{free}	0.23/0.27	0.26/0.30	0.18/0.20	0.23/0.26
RMSD bond (Å) / angle (°)	0.008/1.01	0.003/0.58	0.018/1.52	0.004/0.71

C20amide および C26amide はそれぞれ同様の配座を示したが、ヒト CD1d とマウス CD1d とでは A'ポケットにおけるアシル鎖の配座が異なっていた(図 3-44A)。α-GC-C20amide 複合体は極めて高い分解能で構造を決定でき、非常に明瞭な抗原の電子密度が観測された(図 3-44B, C)。

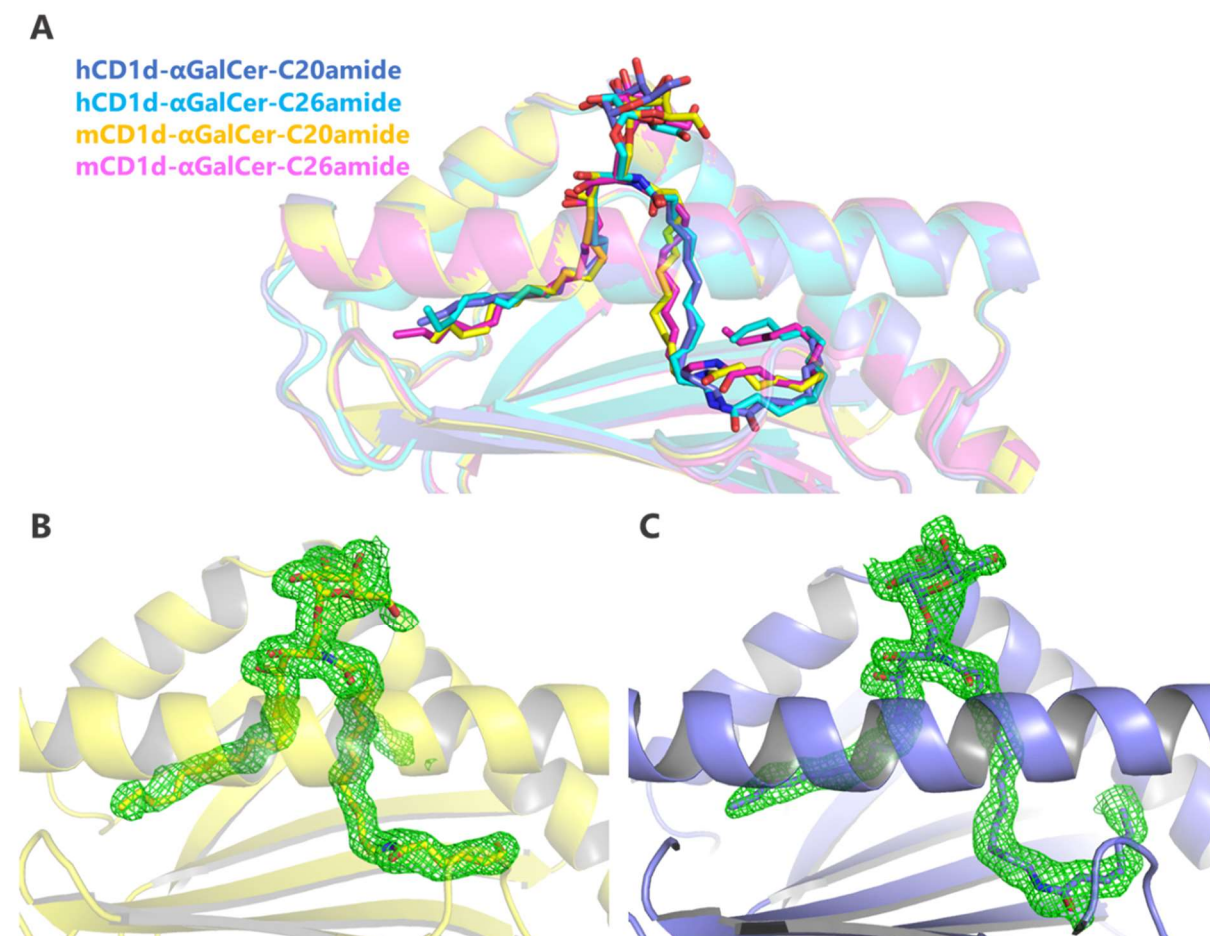


図 3-44 CD1d-α-GC-amide 結晶構造 (A) アミド型 α-GC の立体構造の重ね合わせ図。 青：hCD1d-α-GC-C20amide 水色：hCD1d-αGC-C26amide 黄：mCD1d-αGC-C20amide マゼンタ：mCD1d-αGC-C26amide (B) mCD1d-αGC-C20amide の抗原の電子密度図。緑のメッシュで F_o-F_c マップを示した。(C) hCD1d-αGC-C20amide の抗原の電子密度図。緑のメッシュで F_o-F_c マップを示した。

アミド型 α-GC アシル鎖と A'ポケットとの相互作用をみると、マウス CD1d では S46 と水分子を介した Q32, R92 との水素結合ネットワークが α-GC-amide のアミド基と形成されていた(図 3-45A)。しかし、ヒト CD1d においては α-GC-amide のアミド基は CD1d との極性相互作用を形成していなかった(図 3-45B)。

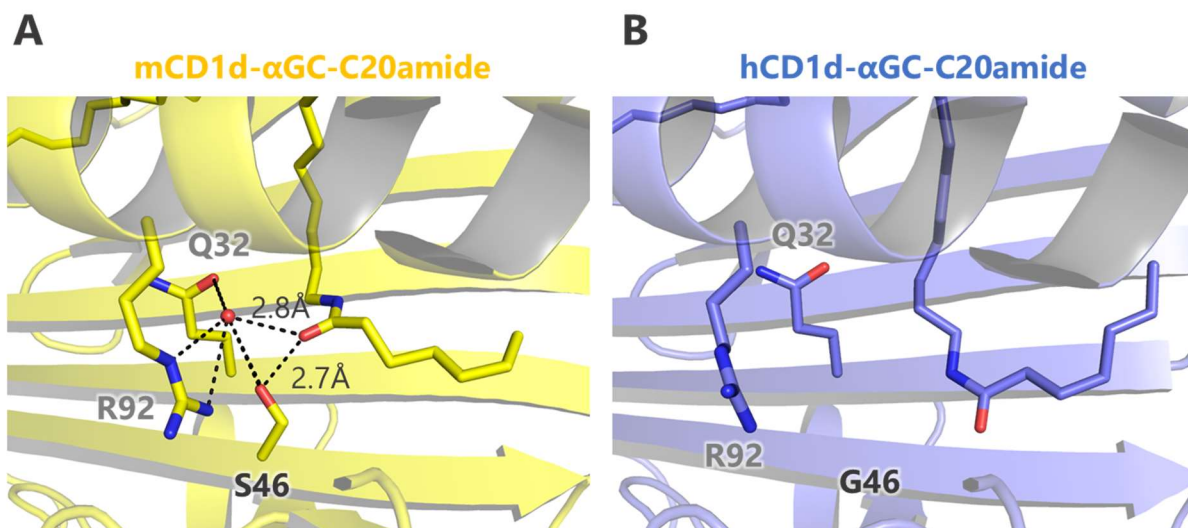


図 3-45 CD1d による α GC-C20amide の認識 (A) マウス CD1d の A'ポケットと抗原のアミド基周辺の相互作用。黒破線で極性相互作用を示した。(B) ヒト CD1d の A'ポケットと抗原のアミド基周辺の相互作用。

ヒト CD1d はアミド型 α -GC と A'ポケットでの極性相互作用を示さなかったが、A'ポケットの疎水性残基は内在性抗原結合時と異なる配向を示した。内在性抗原結合時には F88 の配向が不安定になっていた(図 3-46A)のに対し、アミド型 α -GC は F88 の配向が固定されていた(図 3-46B)。

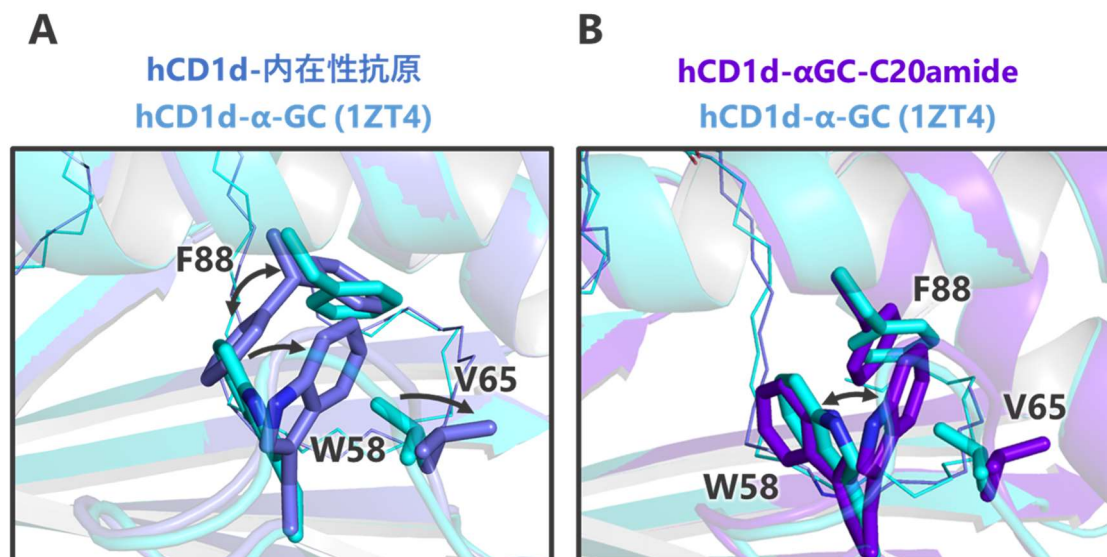


図 3-46 抗原の違いによる A'ポケットの構造変化 (A) 内在性抗原と α -GC 結合時の構造比較。青：hCD1d-内在性抗原 水色：hCD1d- α GC (B) α -GC-C20amide と α -GC 結合時の構造比較。青：hCD1d- α -GC-C20amide 水色：hCD1d- α GC

4章 考察

4-1 CD1d の調製

CD1d 細胞外ドメインと $\beta 2m$ をカイコ体液中に共発現させ、硫酸分画を行い体液中のヒスチジンを除去した後、Ni アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによって精製 CD1d を得た。カイコ体液中に大量に含まれるヒスチジンは His タグタンパク質の Ni アフィニティー精製を困難にしていたが、硫酸分画を行うことにより精製を行うことができた。SDS-PAGE 上で最終精製時の CD1d と $\beta 2m$ のバンド濃度比は分子量の比である 3:1 程度を示し、ゲル濾過での溶出位置が CD1d モノマーに相当する 36 kDa 程度であったことから、CD1d- $\beta 2m$ ヘテロ二量体の精製に成功したと考える。収量はカイコ 1 頭あたり 2-8 μg となった。カイコ発現系を用いて細胞表面受容体を発現した例では IL₄-R α がカイコ 1 頭あたり 55 μg 程度となっており⁸⁵、ヒト CD1d の発現量はそれよりも低かった。これは CD1d が重鎖の安定化のために $\beta 2m$ を必要とするため、単純にそれぞれを分泌発現させる共発現系では二量体形成の前に CD1d の変性が起こり、効率的な二量体形成が行えないためであると考えられる。

昆虫細胞での発現はトランスフェクションによりウイルスを増幅した後に回収したウイルスを用いて発現を行う必要がある。しかしカイコはバクミドをトランスフェクションすることにより短期間でタンパク質を調製することができ、さらに一度感染体液からウイルスを得るとより簡単にタンパク質を調製可能である。本研究はカイコを用いて相互作用解析や結晶構造解析に用いることのできる精製度で十分な量のタンパク質発現法を確立し、カイコ発現系の有用性を示すことができた。

4-2 CD1d の結晶化条件の探索と構造解析

硫酸アンモニウムを含む条件では、幅広い pH で CD1d の結晶が得られた。得られた結晶について X 線回折実験を行い、CD1d- $\beta 2m$ 複合体をサーチモデルとして用いることで分子置換法によって位相を決定し、構造モデルを置くことができた。しかしこれらの結晶は 90%程度と非常に溶媒含量が多く結晶中の分子が疎であるため、自由度が高くなってしまうと推測される(図 4-1A)。CD1d の B-ファクターをマッピングすると、自由度が高いループ構造と $\beta 2m$ の溶媒に面している部分が高い B-ファクターを示した(図 4-1B)。B-ファクターが高いほど原子のゆらぎが大きく、糖鎖修飾を受ける残基付近のループ構造や $\beta 2m$ の高い自由度が分解能の低下を引き起こしていると考えられる。

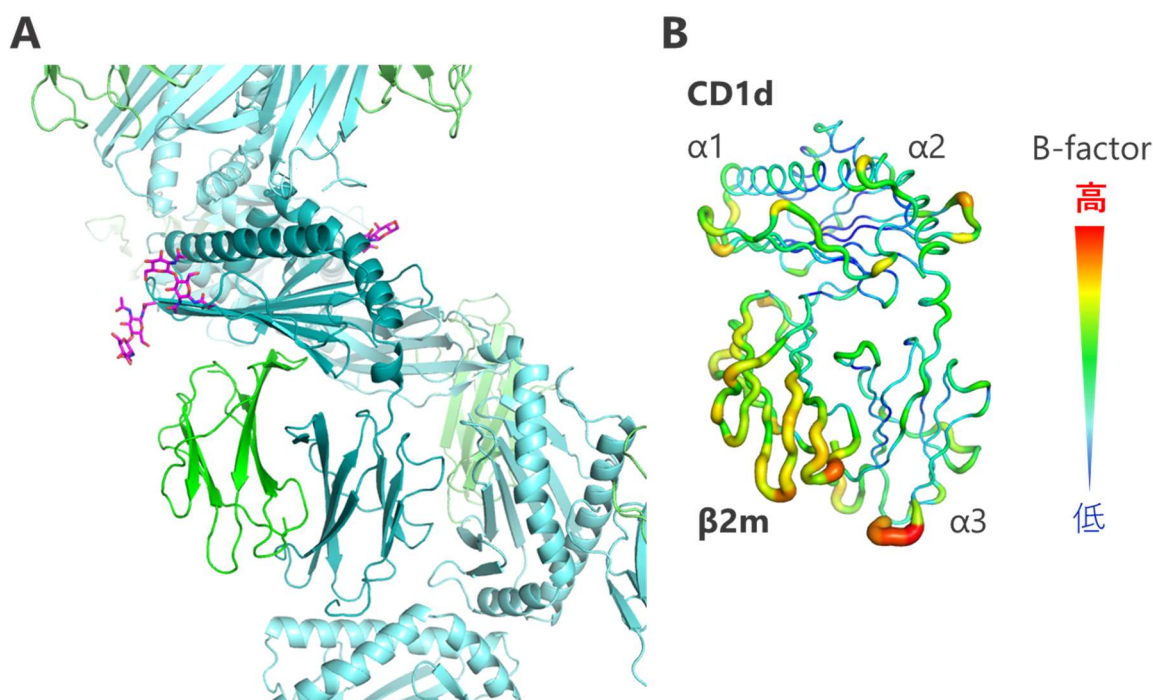


図 4-1 CD1d の結晶中のパッキングと B-factor (A)結晶中の CD1d。CD1d 重鎖を青、 $\beta2m$ を緑で示した。CD1d は結晶中で隣接する CD1d と主に重鎖 $\alpha1$, $\alpha2$ ドメインの頭部と重鎖 $\alpha3$ ドメインの尾部で接触している。 $\beta2m$ は隣の分子とは接触していない。(B) CD1d の B ファクター。B ファクターが高い位置ほど赤く太くなり、低いほど青く細くなっている。

精製時にリガンドを添加していないにもかかわらず CD1d の抗原結合部位近傍にタンパク質由来ではない電子密度が見られた(図 3-7B)ことから、CD1d にカイク由来の抗原が結合していることが示唆された。

また、Isopropanol と PEG4000 を含む CD1d- α -GC-12'Se の結晶は 3.0 Å 程度とこれまでと比較して高い分解能を得ることができたが、抗原を添加したにもかかわらずその電子密度が観測できなかった。この結晶は非常に薄いためにデータの異方性が高く、明瞭な電子密度が得られなかったと推察される。

4-3 SPR による相互作用解析

CD1d-avi の精製は CD1d と同様の方法で行うことができ、収量も同程度となった。His タグの下流に Avi タグを付与したためか、Ni-アフィニティー精製時に CD1d よりも少し低いイミダゾール濃度でカラムから溶出された。ゲル濾過精製では夾雑タンパク質と CD1d-avi とを完全に分離す

ることはできなかったが、センサーチップへのタンパク質の固定化はビオチンを介して特異的に行われるため、夾雑タンパク質の結合実験への影響は小さいものと考えられる。

巻き戻し法により調製した LILRB2 はゲル濾過クロマトグラフィーでモノマーの位置に溶出され、ピークトップ画分を回収することで SDS-PAGE 上でシングルバンドとなる純度で精製できた。

LILRB1 及び LILRB2 と HLA-G の解離定数はそれぞれ 2.6 μM , 2.4 μM であり、文献値(2.0 μM , 4.8 μM)⁷³ と概ね一致した。また LILRB2 と CD1d との解離定数は 22 μM であり、文献値(243 μM)⁷¹ の 10 倍程度の値となった。カイコで発現した CD1d は哺乳細胞で発現された CD1d より強い受容体結合能を持っており、より複合体の構造解析に適していることが示唆された。

非古典的 MHC クラス I 分子である HLA-G は重鎖 $\alpha 3$ ドメインと $\beta 2\text{m}$ を介して LILRB2 と結合する⁷²。HLA-G-LILRB2 複合体構造(図 4-2A)を元にして、CD1d と LILRB2 との結合予測モデルを構築した(図 4-2B)。予測モデルのように CD1d と LILRB2 が結合するならば、相互作用面は CD1d が糖鎖修飾を受ける位置からは離れている。しかし、カイコで発現された CD1d のほうが哺乳細胞で発現されたものより親和性が高かった。カイコでの糖鎖修飾は小さい *N* 型糖鎖が付加されるのみであるため LILRB2 が結合しやすいが、大きな糖鎖が付加される哺乳細胞では立体障害によって結合が阻害されてしまう可能性が示唆された。また、CD1d と LILRB2 の解離定数は $\beta 2\text{m}$ と LILRB2 の解離定数と同程度であったため、CD1d と LILRB2 との結合は $\beta 2\text{m}$ 依存的であり、重鎖 $\alpha 3$ ドメインとの相互作用は弱い可能性が示唆された。しかし、HLA-G と LILRB2 との結合様式をもとに構築した CD1d-LILRB2 結合モデルが正しいとは限らず、今後の複合体の構造解析によって明らかになることを期待する。

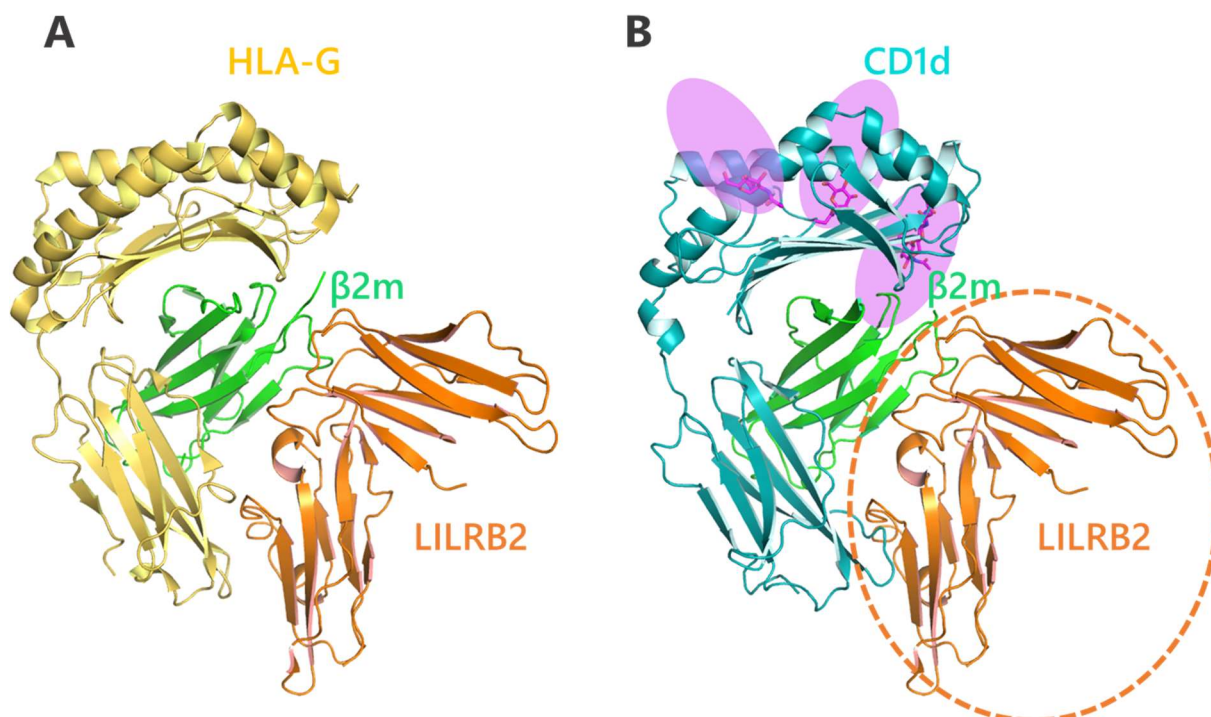


図 4-2 CD1d と LILRB2 の結合モデル (A) HLA-LILRB2 の結晶構造 (PDB ID: 2DYP)。黄: HLA-G 緑: $\beta 2m$ 橙: LILRB2 (B) CD1d-LILRB2 の結合モデル。青: CD1d 重鎖 緑: $\beta 2m$ 紅紫: 糖鎖 橙: LILRB2

4-4 CD1d の糖鎖修飾

グリコシダーゼ処理により SDS-AGAE 上でバンドシフトが起き、MALDI-TOF MS 解析ではアミノ酸配列による分子量より大きい分子量を持っていたことから、カイコで発現した場合においても *N* 型糖鎖修飾を受けていると考えられる。また結晶構造解析において、*N* 型糖鎖修飾を受けると予測された残基郡の近傍にアミノ酸由来ではない電子密度がみられ、それらをグルタミンに変異させた CD1d 変異体は著しく発現量が低下したことも CD1d の *N* 型糖鎖の存在を支持している。糖鎖付加による分子量の増加は 4 kDa 程度である一方、構造解析により複数個のアスパラギン残基に糖鎖が付加されていると推測されることから、カイコ発現では比較的小さな糖鎖が CD1d に付加されることが示唆された。

Endo H_f 消化によって生じたバンドよりも PNGase F 消化によって生じたバンドのほうが高い位置であったことから、CD1d は Endo H_f によって消化されず、PNGase F によって消化される糖鎖を持っているといえる。また、Endo H_f 消化によって CD1d は 2 本のバンドに分かれ、PNGase F 消化によって 1 本のバンドになったことから、CD1d は Endo H_f で消化されず、PNGase F には消化される糖鎖を持っているといえる。そして、Endo H_f 消化によってバンドが 2 つに別れたことから

CD1d は Endo H_f 消化を受ける糖鎖のみもつものと、Endo H_f 消化を受けない糖鎖を持つものがあるとわかる。昆虫細胞特有の糖鎖として α -1,6 結合したフコースが 1 番目の GlcNAc に付加されることがあり、これは Endo H_f では消化されず、PNGase F では消化される。このフコースの有無にばらつきがあるために今回のような結果になったと考えられる。

4-5 scCD1d の調製

CD1d 重鎖と β 2m を一本鎖化した scCD1d の収量はカイコ 1 頭あたり 50-70 μ g であり、CD1d と β 2m を共発現させたものの 10 倍以上の収量となった。scCD1d は β 2m が先に翻訳された後に CD1d 重鎖が翻訳されるため、CD1d 重鎖の翻訳時に β 2m が近傍に存在した状態となる。これにより、scCD1d は別々に翻訳された CD1d と β 2m がヘテロ二量体を形成するよりも効率よく CD1d- β 2m 複合体構造を取ることができると推測される。CD1d 重鎖は β 2m がなければ非常に不安定であり、一本鎖化によって複合体構造を取りやすくなったために発現量が向上したと考えられる。

ゲル濾過クロマトグラフィーでの溶出位置から推算された分子量は 36 kDa であり、一本鎖化していない CD1d と同じ値となった。よって CD1d と scCD1d の分子の大きさは同程度であると言え、一本鎖化によるドメインの配向等への影響が十分に小さいことが示唆された。

4-6 scCD1d の性状解析

4-6-1 DSC

CD1d 及び scCD1d の熱容量曲線は 1 成分モデルでほぼ説明することができたため、CD1d 重鎖と β 2m の変性はほぼ同時に起こっていることが示唆された。また、scCD1d の変性温度は CD1d の変性温度よりも高く、一本鎖化によって分子の安定性が向上したことが示唆された。

2 成分モデルでは CD1d の T_{m1} と scCD1d の T_{m2} がほぼ一致したが、CD1d の T_{m1} とみられる成分が、scCD1d では変性温度が上昇し T_{m2} として現れた。この小さいピーク成分は β 2m の熱容量曲線とは一致しないことから β 2m 由来ではないと考えられ、ヘテロ二量体の乖離などの状態変化を反映したものである可能性がある。一本鎖化によって大きく熱安定性が向上したこの成分がヘテロ二量体の乖離であるとする、一本鎖化はヘテロ二量体構造の安定化に寄与していることが示唆される。

4-6-2 CD スペクトル解析

pH 8.0 条件で scCD1d の CD スペクトルは、222 nm 付近に負の極大があり 207 nm 付近に肩があることから α ヘリックスの存在が確認できる。また 216 nm 付近で大きな負の値をとっており、CD1d の β シートに富んだ構造を反映している。スペクトルの形状はペプチドフリーの MHC クラス II 分子よりもペプチド結合 MHC クラス I 分子に類似しており⁸⁶、CD1d が正しいフォールドをとっていることとともに、何らかの抗原が結合していることを示唆している。

scCD1d の CD スペクトルは pH 8.0 から pH 4.6 までは変化しなかったことから、pH 4.6 までは二次構造が保たれていると考えられる。また pH 4.0 に変化させた後に pH 8.0 へと戻したときのスペクトルが、元々の pH 8.0 におけるスペクトルと一致しなかったことから、pH 4.0 から scCD1d の不可逆的な変性が起こることが示唆された。しかし、強力な抗原である α -GC を添加した場合には pH 8.0 に戻した際にもとと同様のスペクトルへと回復した。このことは、pH 4.0 では CD1d に結合した内在性抗原が乖離して戻らないために pH 8.0 に戻してもスペクトルが回復しないが、強く結合する α -GC が乖離した内在性抗原にかわって結合することで pH 8.0 に戻しても脂質を結合したもとの状態と同じ構造をとることを示唆している。このことから、pH 4.0 に変化させて内在性抗原を乖離させ、その後任意の脂質を添加しつつ pH 8.0 に戻すという手法をとることで、効率的な CD1d と脂質の複合体形成を行えることが示唆された。

また、カイコ体液からの粗精製の際に pH を 4.6 まで低下させることで夾雑タンパク質を変性させつつ、陽イオン交換クロマトグラフィーによって scCD1d を精製することができると考えられ、硫酸分画に替わる精製法として検討していきたい。

4-7 scCD1d の結晶構造解析

scCD1d の結晶構造は一本鎖化されていない CD1d と一致した(図 3-37B)ことから、一本鎖化による CD1d への構造への影響はほぼないことが明らかとなった。

クエン酸三アンモニウムと PEG 3350 を含む条件でこれまでとは異なる空間群の結晶が得られ、scCD1d- α GC-12'Se の結晶構造を決定することに成功した。この結晶では CD1d 重鎖が隣接する分子と広い面で接触しており、分解能の向上に寄与していると推察される(図 4-3A)。また低分解能構造ではループ構造と同程度に高かった β 2m の B ファクターが scCD1d 結晶構造では低下しており(図 4-3B)、明瞭な電子密度が得られたことから(図 4-3C)、 β 2m の結晶中での自由度が低下したことが示唆された。今回のパッキングでは β 2m が隣接する分子と接触しているため自由度が低下したと考えられ、また一本鎖化によって β 2m の自由度が低下し、分解能の向上に寄与した可能性も示唆された。

scCD1d- α GC-12³Se 結晶構造は、抗原の頭部に位置するガラクトースの配座が CD1d- α GC 結晶構造におけるそれとわずかに異なっていた(図 4-4A)。頭部の配座が変化した要因として、周囲の分子との相互作用の違いが考えられる。結晶中の CD1d のパッキングは結晶によってそれぞれ異なるため、隣接する CD1d 分子と抗原との相互作用はそれぞれの結晶によって異なる。セラミド骨格の水酸基やアミドと CD1d 抗原結合部位の側鎖との相互作用は一致していた一方で頭部のみ配座の変化が見られたことから、隣接する分子との相互作用の違いによって抗原頭部の配座がわずかに変化したことが推察される。

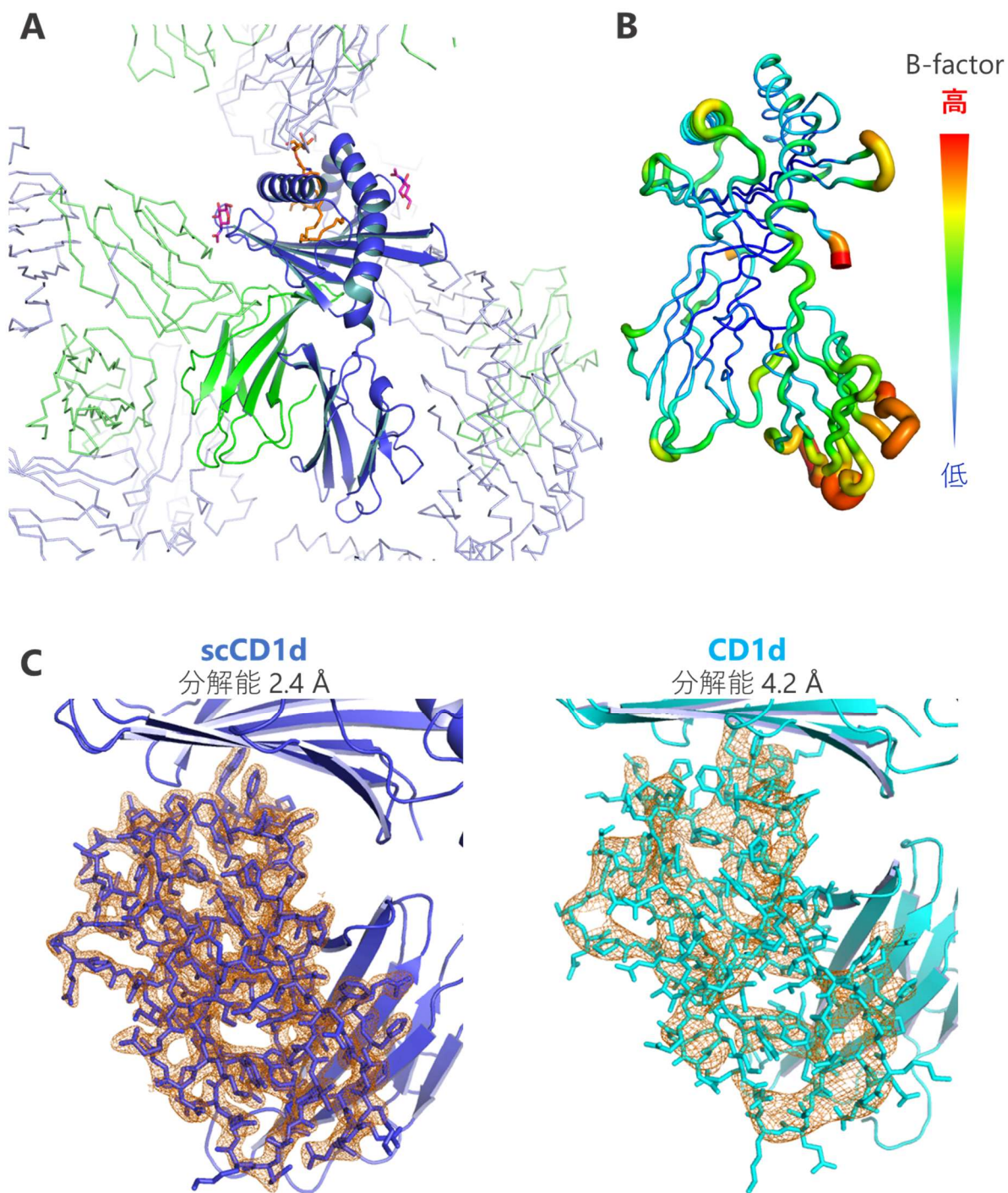


図 4-3 scCD1d 結晶 (A) 結晶中の scCD1d のパッキング。CD1d 重鎖を青、 β 2m を緑で示した。CD1d は広い面で隣接する分子と接触し、 β 2m も隣もパッキングに関与している。(B) scCD1d の B ファクター。B ファクターが高い位置ほど赤く太くなり、低いほど青く細くなっている。(C) β 2m の $2F_o - F_c$ マップと構造モデル。分解能 4.2 Å 構造に比べて β 2m の電子密度が明瞭化している。

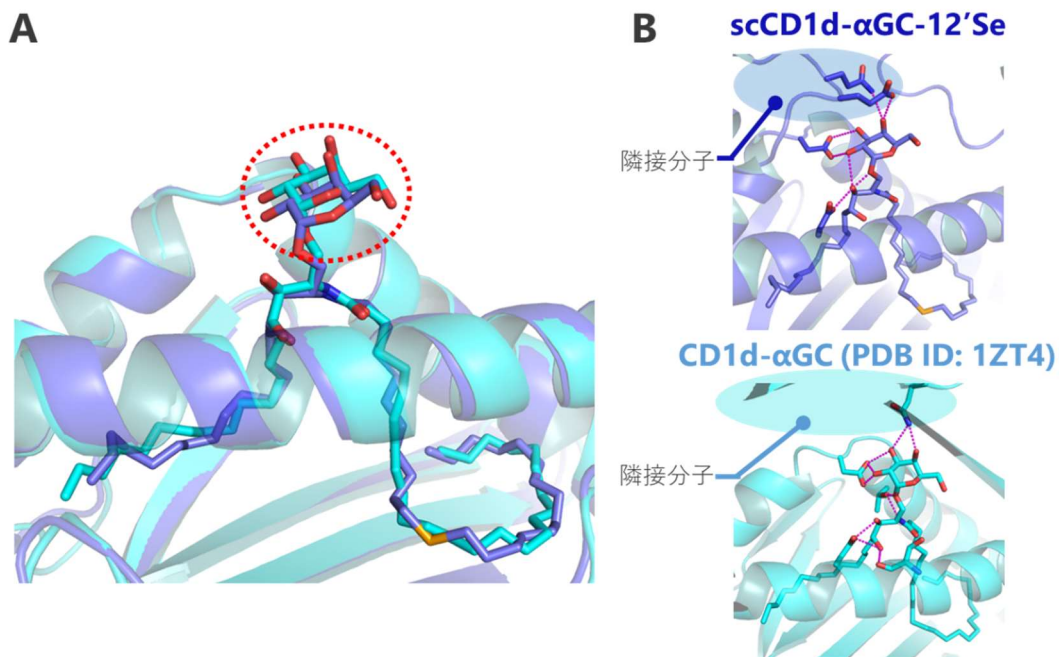


図 4-4 α -GC 頭部の配座 (A) scCD1d- α GC-12'Se と CD1d- α GC の重ね合わせ図。scCD1d を青で示し、CD1d を水色で示した。抗原頭部のガラクトース部分を赤破線で囲った。**(B)** scCD1d 及び CD1d 結晶中の抗原頭部の相互作用。抗原のガラクトース部分は抗原が結合している CD1d の抗原結合部位とだけでなく、結晶中で隣接する CD1d の抗原結合部位ではない残基とも相互作用している。

α -GC-12'Se と α -GC のアシル鎖の二面角を比較したところ両者に大きな差異はなく、ほぼ同一の配向を示した(図 4-5)ことから、セレン原子導入による抗原の配座への影響は十分小さいと考えられる。しかし、両者ともにシンペリプラナー配座を多く含んでおり(図 4-5B)、不安定な配座で α -GC のアシル鎖が固定されていることが明らかとなった。

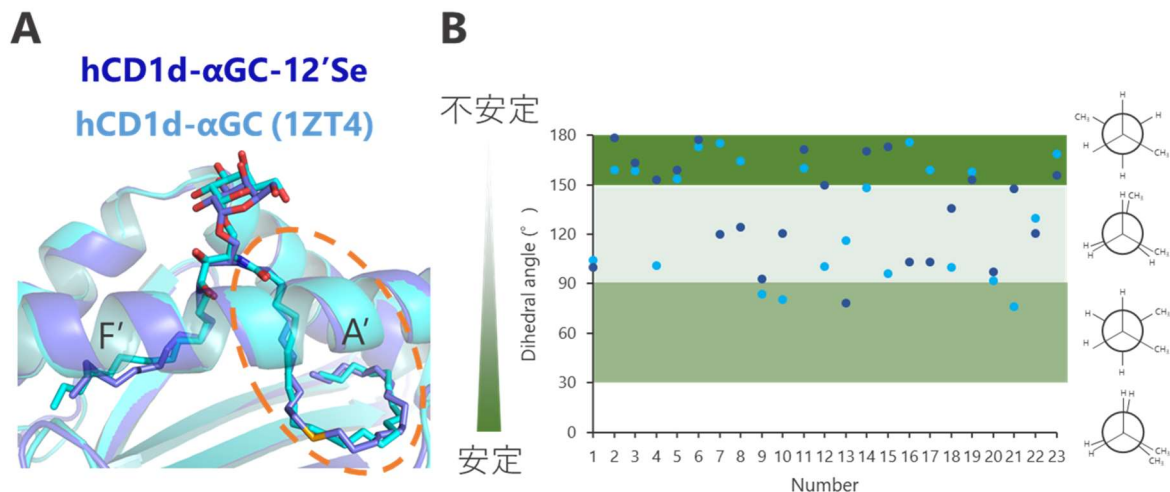


図 4-5 hCD1d に結合した α -GC と α -GC-12'Se の立体配座 (A) α -GC とアミド型 α -GC 結晶構造の重ね合わせ図。青： α -GC 紺： α -GC-12'Se (B) アシル鎖 (A'ポケットに結合した疎水鎖、(A) 橙破線で囲った領域) の二面角プロット図とニューマン投影式。緑色が濃いほどエネルギーが低く安定な配座であることを示す。

4-8 ヒトおよびマウス CD1d による内在性抗原認識

ヒト CD1d の内在性抗原として置いた PE の構造モデルと α -GC との極性頭部における立体配座を比較したところ、PE は S94 と T172 に認識されている(図 4-6A)一方、 α -GC は D98、D169 および T172 に認識され(図 4-6B)、PE よりも多くの水素結合を形成していた。これにより、頭部の配座が PE よりも強く固定されていると推測される。 α -GC は iNKT TCR との結合において TCR の S27、N29 および R93 と複数の水素結合を形成することで強く認識される(図 4-6B)。一方 PE は TCR の残基と水素結合を形成できる距離にない(図 4-6C)ために iNKT TCR に強く結合せず、自己反応性を示さないと考えられる。

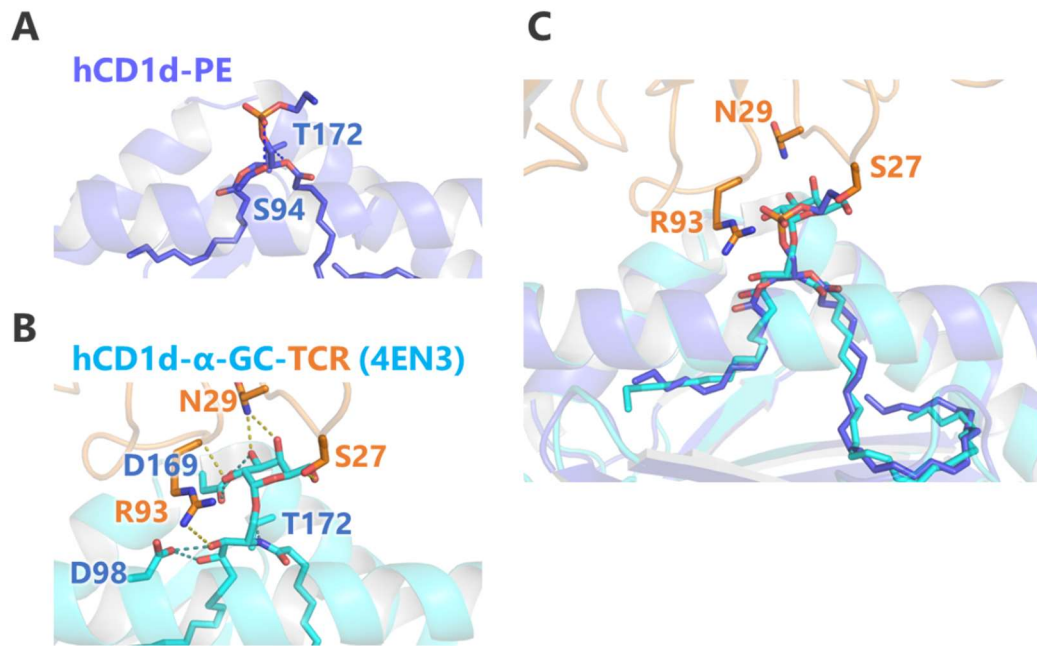


図 4-6 リン脂質と CD1d および TCR との相互作用 (A) 側面から見た scCD1d-PE の抗原結合部位。(B) 側面から見た hCD1d-α-GC-TCR の抗原結合部位。(PDB ID: 4EN3) 橙：TCR (C) scCD1d-PE と hCD1d-α-GC-TCR の重ね合わせ図。

TLC や LC-MS 解析ではヒト CD1d と mCD1d における結合脂質の種類について大きな差異は見られなかった。しかし、立体構造解析で得られた電子密度から、ヒト CD1d では抗原結合部位に極性頭部を配置した脂質が結合しやすく、マウス CD1d では A'ポケット深部の S46 が形成する局所的極性部位に頭部を向けて脂肪酸が結合しやすいことが示唆された(図 1-1 図 4-7)。NKT 細胞刺激活性を示さない内在性抗原は CD1d との親和性が低いため、より強い CD1d 親和性を持つ脂質が優先的に結合するが、ヒトとマウスにおいて異なる内在性抗原の傾向は CD1d 免疫応答における種差の要因となっていることが考えられるため、さらなる検証が必要である。

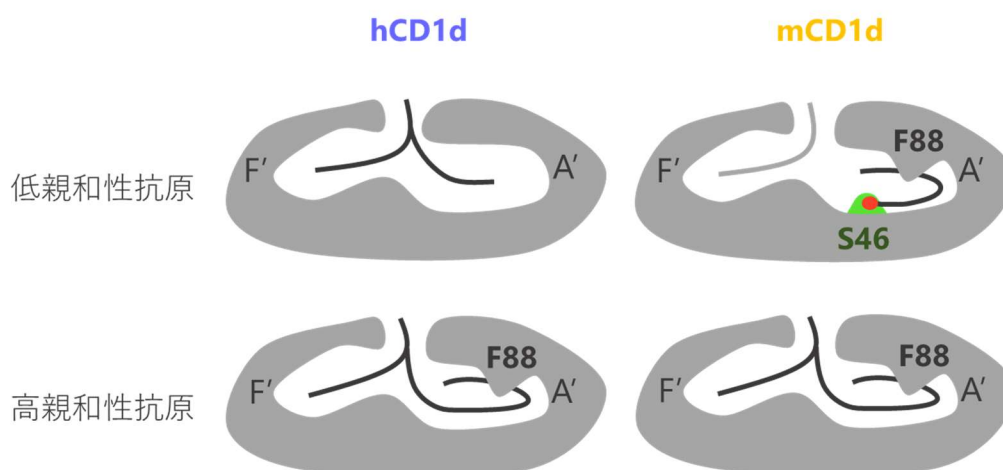


図 4-7 CD1d の抗原結合モデル

4-9 アミド型 α -GC の認識機構

アミド型 α -GC と α -GC の極性頭部の構造を比較したところ、両者はほぼ同一の配向を示した(図 4-8)。スフィンゴシン鎖と D98、セラミドのアミド基と T174、およびガラクトース頭部が D171 とそれぞれ水素結合を形成していた(図 4-8A, B)。アミド型 α -GC と α -GC は頭部の構造が全く同じであり、配向も同じであることから TCR によって同様に頭部が認識されと考えられるが(図 4-8C)、アミド型 α -GC は α -GC よりも強い活性を示すことが報告されている。これは、アシル鎖に導入されたアミド基による CD1d との相互作用によってより強く CD1d に結合するようになった可能性がある。また、アミド基が mCD1d の A'ポケット内部の局所的極性部位に結合することで抗原の立体配座が強く制限され、抗原頭部のゆらぎが小さくなることで TCR 結合によるエントロピー喪失が小さくなり、TCR との結合が亢進している可能性がある。TCR との相互作用解析や TCR 複合体の立体構造解析を行うことで、アミド型 α -GC が高活性を示す機構を明らかにするとともに、CD1d 抗原の活性や Th 選択性発現の機構への理解が深まることと期待される。

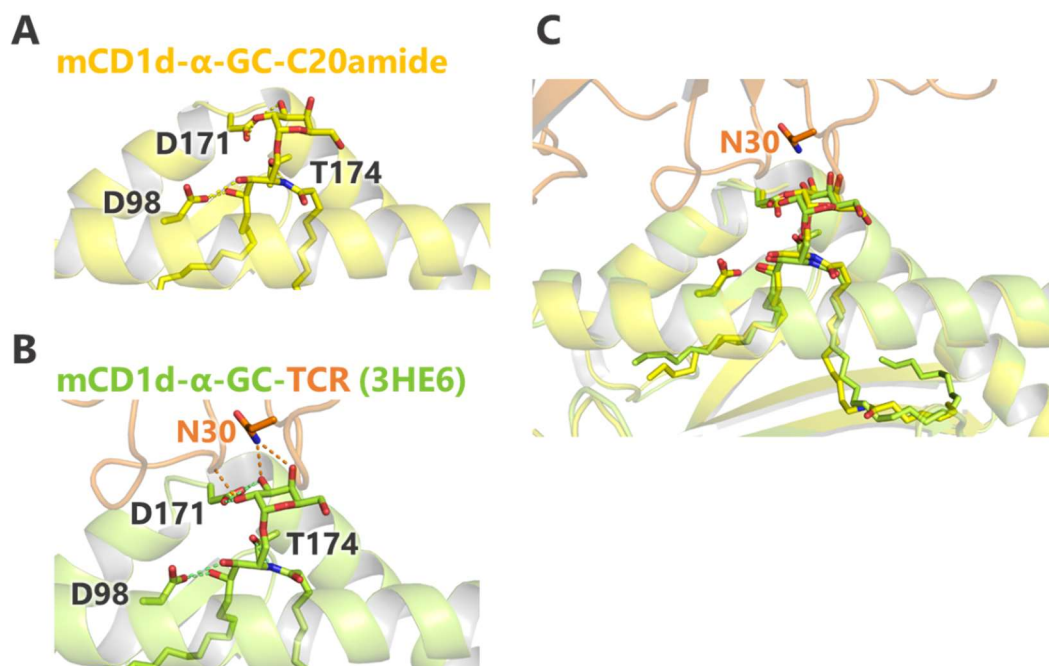


図 4-8 αGC-amide と CD1d および TCR との相互作用 (A) 側面から見た mCD1d-α-GC-C20amide の抗原結合部位。(B) 側面から見た mCD1d-α-GC-TCR の抗原結合部位。橙：TCR (C) mCD1d-α-GC-C20amide と CD1d-α-GC-TCR の重ね合わせ図。

ヒト CD1d とアミド型 α -GC との複合体構造解析では、 α -GC-C20amide 複合体が 1.8 Å と極めて高い分解能での構造解析に成功した。これはこれまで報告されているヒト CD1d の中で最も高い分解能の構造であり、抗原の立体配座の自由度が低いことが高い分解能につながったと推察される。アミド型 α -GC と α -GC の配座を比較したところ、全体の位置や頭部の配座はほぼ一致していた(図 4-9A)。しかし、A'ポケット内部に位置するアシル鎖の二面角を比較したところ、 α -GC-C20amide では α -GC より安定な配座が多く、 α -GC-C26amide は α -GC より不安定な配座を多くとっていた(図 4-9B)。ヒト CD1d の A'ポケット内部には極性部分は存在せず、アシル鎖中のアミド基が極性相互作用を形成していなかったが、アミド基部分は炭化水素より嵩高く、立体配座の制限をもたらす。 α -GC-C20amide は α -GC よりも短いアシル鎖を持つが、A'ポケット内部での抗原の自由度が安定な配座で制限されることで CD1d に強く結合していることが推察される。一方、 α -GC-C26amide は α -GC と同じアシル鎖長を持ちながらも α -GC より嵩高いため、不安定な配座のまま CD1d と結合したことで抗原の自由度が高くなり、結晶構造の分解能が低くなったと考えられる。アミド型 α -GC のヒト NKT 細胞を用いた活性試験は未だ行われていないが、 α -GC-C20amide はヒト CD1d に強く結合するため、高い活性を発揮する有望な化合物であると期待される。

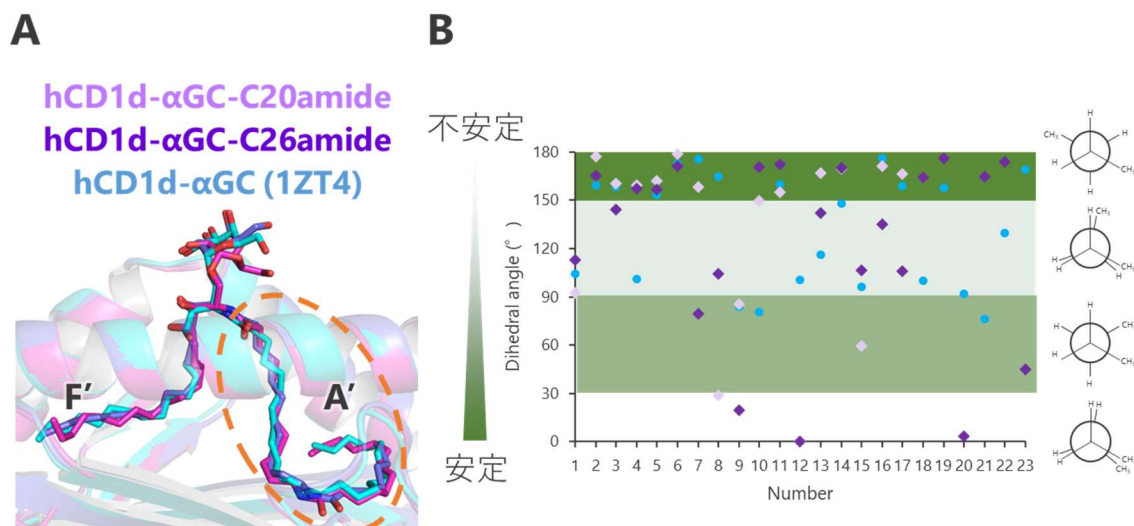


図 4-9 hCD1d に結合した α -GC とアミド型 α -GC の立体配座 (A) α -GC とアミド型 α -GC 結晶構造の重ね合わせ図。青： α -GC 藤： α -GC-C20amide 紫： α -GC-C26amide (B) アシル鎖 (A'ポケットに結合した疎水鎖、(A)橙破線で囲った領域) の二面角プロット図とニューマン投影式。緑色が濃いほどエネルギーが低く安定な配座であることを示す。

アミド型 α -GC の認識は、マウス CD1d ではアシル鎖に導入されたアミド基が A'ポケット内部の S46 と相互作用することでアシル鎖が短く A'ポケット全体を占有しない抗原でも強く結合し、活性を発現することが明らかとなった。よって、マウス CD1d 抗原の活性の大きさには抗原の疎水性や長さよりもマウス CD1d への抗原の結合能が重要であり、Th2 極性には抗原のアシル鎖の長さが重要であることが示唆された。しかし、A'ポケット内部に極性部分をもたないヒト CD1d にも α -GC-C20amide は結合した。 α -GC 結合時との比較から、抗原認識において重要な F88 の配向が固定されていたことから A'ポケット内部と強く相互作用していることが示唆された。

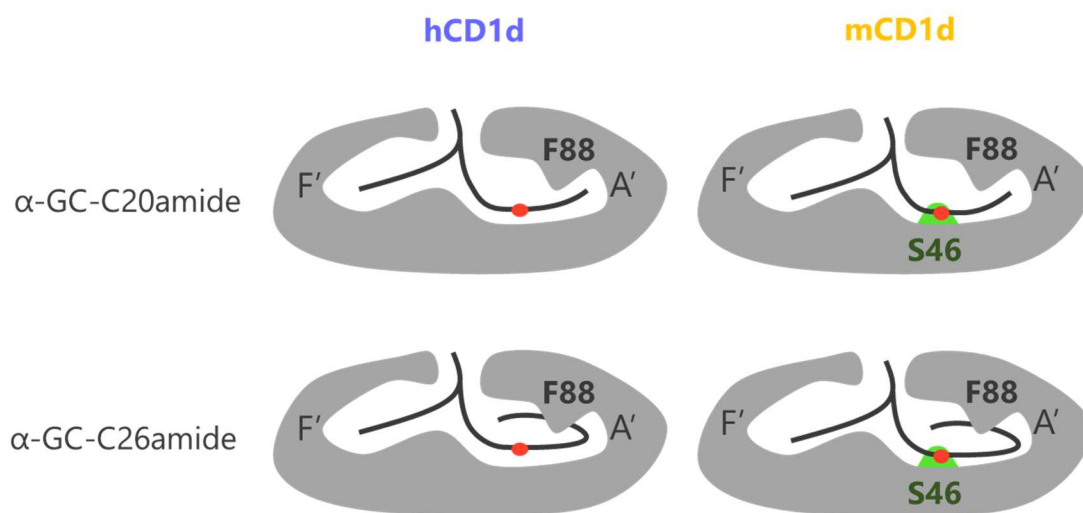


図 4-10 アミド型 α -GC の結合モデル

5章 総括

カイク発現系を用いることで CD1d- β 2m 複合体を調製することに成功した。また、硫安分画を用いることで、ヒスチジンを大量に含むカイク体液中から His タグ付き CD1d を精製する方法を確立した。さらに調製した CD1d を用いて結晶構造解析を行い、4.2 Å で結晶構造を決定した。

また CD1d-avi を作製して LILRB2 との相互作用実験を行った。哺乳細胞で調製したものに比べてカイク発現 CD1d は LILRB2 とより強く結合し、複合体の結晶構造解析にカイク発現 CD1d が有用であることが示唆された。

CD1d 複合体の安定化を目的として CD1d と β 2m を一本鎖化した scCD1d を作製し、高い収量を得た。さらに、scCD1d は本来の構造を保ちながらも一本鎖化していない CD1d に比べて高い安定性を持ち、今後の解析において非常に有用であると示された。

scCD1d と α -GC-12'Se を用いて結晶化を行い、精緻な立体構造を得ることに成功した。 α -GC は A'ポケットに高いエネルギーの配座で結合していることが明らかとなった。

scCD1d と mCD1d と内在性脂質複合体の立体構造解析を行い、ヒト CD1d では低親和性抗原として短い2本のアシル鎖を持つ脂質を結合しやすい一方、マウス CD1d では脂肪酸が結合しやすいことが示唆された。

アミド型 α -GC との立体構造解析を行い、マウス CD1d では A'ポケット内部で水素結合ネットワークを構築することで短いアシル鎖でも高活性を発現することが示唆された。ヒト CD1d との結合では極性相互作用は観測されなかったが、A'ポケットの F88 と相互作用して結合していた。

今後は TCR を用いて CD1d と各種抗原複合体との相互作用解析や複合体の立体構造解析を行うことで、CD1d 結合における抗原の結合親和性と立体的自由度が活性に与える影響について理解が深まり、活性やサイトカイン選択性を高めた CD1d 抗原の開発が進むと期待される。

参考文献

1. Porcelli, S. A. & Modlin, R. L. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 297–329 (1999).
2. Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. & Roark, J. H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 535–62 (1997).
3. Brigl, M. & Brenner, M. B. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 817–90 (2004).
4. Shamshiev, A. *et al.* Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. *J. Exp. Med.* **195**, 1013–21 (2002).
5. Kinjo, Y. *et al.* Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* **434**, 520–5 (2005).
6. Mattner, J. *et al.* Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* **434**, 525–529 (2005).
7. Beckman, E. M. *et al.* Recognition of a lipid antigen by GDI-restricted $\alpha\beta^+$ T cells. *Nature* **372**, 691–694 (1994).
8. Sieling, P. a *et al.* CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* **269**, 227–230 (1995).
9. Briken, V., Jackman, R. M., Dasgupta, S., Hoening, S. & Porcelli, S. A. Intracellular trafficking pathway of newly synthesized CD1b molecules. *EMBO J.* **21**, 825–34 (2002).
10. Moody, D. B. & Porcelli, S. A. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 11–22 (2003).
11. Calabi, F., Jarvis, J. M., Martin, L. & Milstein, C. Two classes of CD1 genes. *Eur. J. Immunol.* **19**, 285–92 (1989).
12. Ho, B. K. & Gruswitz, F. HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures. *BMC Struct. Biol.* **8**, 49 (2008).
13. Koch, M. *et al.* The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *Nat. Immunol.* **6**, 819–826 (2005).
14. Rhind, S. M. CD1--the pathology perspective. *Vet. Pathol.* **38**, 611–9 (2001).
15. Joyce, S. *et al.* Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* **279**, 1541–4 (1998).
16. De Silva, A. D. *et al.* Lipid protein interactions: the assembly of CD1d1 with cellular phospholipids occurs in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.* **168**, 723–33 (2002).
17. Park, J.-J. *et al.* Lipid-protein interactions: biosynthetic assembly of CD1 with lipids in the endoplasmic reticulum is evolutionarily conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1022–6 (2004).

18. Facciotti, F. *et al.* Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat. Immunol.* **13**, 474–80 (2012).
19. Dougan, S. K. *et al.* Microsomal triglyceride transfer protein lipidation and control of CD1d on antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* **202**, 529–39 (2005).
20. Brozovic, S. *et al.* CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein. *Nat. Med.* **10**, 535–9 (2004).
21. Yuan, W. *et al.* Saposin B is the dominant saposin that facilitates lipid binding to human CD1d molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5551–6 (2007).
22. Hiraiwa, M., Soeda, S., Kishimoto, Y. & O'Brien, J. S. Binding and transport of gangliosides by prosaposin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11254–8 (1992).
23. Ciaffoni, F. *et al.* Saposin B binds and transfers phospholipids. *J. Lipid Res.* **47**, 1045–53 (2006).
24. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. & Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 231–237 (2004).
25. Ito, H. & Seishima, M. Regulation of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes by natural killer T cell. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 641757 (2010).
26. Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L. & Bendelac, A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* **195**, 637–41 (2002).
27. Kronenberg, M. & Gapin, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 557–68 (2002).
28. Kitamura, H. *et al.* The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand α -Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-12 Production by Dendritic Cells and IL-12 Receptor Expression on NKT Cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1121–1128 (1999).
29. Im, J. S. *et al.* Kinetics and Cellular Site of Glycolipid Loading Control the Outcome of Natural Killer T Cell Activation. *Immunity* **30**, 888–898 (2009).
30. Kojo, S., Adachi, Y., Keino, H., Taniguchi, M. & Sumida, T. Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* **44**, 1127–38 (2001).
31. Oishi, Y. *et al.* CD4-CD8- T cells bearing invariant Valpha24JalphaQ TCR alpha-chain are decreased in patients with atopic diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **119**, 404–11 (2000).
32. Godfrey, D. I. & Kronenberg, M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *Journal of Clinical Investigation* vol. 114 1379–1388 (2004).
33. Nieuwenhuis, E. E. S. *et al.* CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat. Med.* **8**, 588–593 (2002).
34. Akbari, O. *et al.* Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* **9**, 582–588 (2003).

35. Kawakami, K. *et al.* Critical role of Valpha14⁺ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3322–3330 (2003).
36. Hayakawa, Y. *et al.* Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1720–7 (2001).
37. Carnaud, C. *et al.* Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* **163**, 4647–50 (1999).
38. Nishimura, T. *et al.* The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* **12**, 987–94 (2000).
39. Kawano, T. *et al.* Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5690–3 (1998).
40. Kinjo, Y. *et al.* Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat. Immunol.* **7**, 978–86 (2006).
41. Amprey, J. L. *et al.* A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **200**, 895–904 (2004).
42. Morita, M. *et al.* Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J. Med. Chem.* **38**, 2176–87 (1995).
43. Natori, T., Koezuka, Y. & Higa, T. Agelasphins, novel α -galactosylceramides from the marine sponge *Agelas mauritanus*. *Tetrahedron Lett.* **34**, 5591–5592 (1993).
44. Kawano, T. *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626–9 (1997).
45. Sidobre, S. *et al.* The T cell antigen receptor expressed by Valpha14i NKT cells has a unique mode of glycosphingolipid antigen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12254–9 (2004).
46. Chang, Y.-J. *et al.* Potent immune-modulating and anticancer effects of NKT cell stimulatory glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10299–304 (2007).
47. Schiefner, A., Fujio, M., Wu, D., Wong, C.-H. & Wilson, I. A. Structural evaluation of potent NKT cell agonists: implications for design of novel stimulatory ligands. *J. Mol. Biol.* **394**, 71–82 (2009).
48. Goff, R. D. *et al.* Effects of lipid chain lengths in alpha-galactosylceramides on cytokine release by natural killer T cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13602–3 (2004).
49. Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G. & Smyth, M. J. Alpha-galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9464–9 (2003).
50. Burdin, N. *et al.* Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14⁺ NK T lymphocytes. *J. Immunol.* **161**, 3271–81 (1998).

51. Toura, I. *et al.* Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J. Immunol.* **163**, 2387–91 (1999).
52. Waldowska, M., Bojarska-Junak, A. & Roliński, J. A brief review of clinical trials involving manipulation of invariant NKT cells as a promising approach in future cancer therapies. *Cent. J. Immunol.* **42**, 181–195 (2017).
53. Matsuoka, S. *et al.* Water-Mediated Recognition of Simple Alkyl Chains by Heart-Type Fatty-Acid-Binding Protein. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 1508–1511 (2015).
54. Le Nours, J. *et al.* Atypical natural killer T-cell receptor recognition of CD1d-lipid antigens. *Nat. Commun.* **7**, 10570 (2016).
55. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
56. Waterman, D. G. *et al.* Diffraction-geometry refinement in the DIALS framework. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **72**, 558–575 (2016).
57. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* vol. 67 235–242 (2011).
58. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* vol. 276 307–326 (1997).
59. Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. W. iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 271–281 (2011).
60. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
61. Vagin, A. & Teplyakov, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst* **30**, 1022–1025 (1997).
62. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
63. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
64. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
65. BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–7 (1959).
66. Karadimitris, A. *et al.* Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3294–8 (2001).
67. Altamirano, M. M. *et al.* Ligand-independent assembly of recombinant human CD1 by using oxidative refolding chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3288–93 (2001).

68. Contreras-Gómez, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. & Chisti, Y. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnol. Prog.* **30**, 1–18 (2014).
69. van Oers, M. M., Pijlman, G. P. & Vlak, J. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J. Gen. Virol.* **96**, 6–23 (2015).
70. Zhang, Z., Yang, J. & Barford, D. Recombinant expression and reconstitution of multiprotein complexes by the USER cloning method in the insect cell-baculovirus expression system. *Methods* **95**, 13–25 (2016).
71. Li, D. *et al.* A novel role of CD1c in regulating CD1d-mediated NKT cell recognition by competitive binding to Ig-like transcript 4. *Int. Immunol.* **24**, 729–37 (2012).
72. Shiroishi, M. *et al.* Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16412–16417 (2006).
73. Shiroishi, M. *et al.* Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8856–61 (2003).
74. Paduraru, C. *et al.* An N-linked glycan modulates the interaction between the CD1d heavy chain and beta 2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* **281**, 40369–78 (2006).
75. Li, D., Chen, N., McMichael, A. J., Screaton, G. R. & Xu, X. N. Generation and characterisation of CD1d tetramer produced by a lentiviral expression system. *J. Immunol. Methods* **330**, 57–63 (2008).
76. Nieuwenhuis, E. E. S. *et al.* CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat. Med.* **8**, 588–593 (2002).
77. Wu, D. *et al.* Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1351–6 (2005).
78. Kinjo, Y. *et al.* Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* **434**, 520–5 (2005).
79. Guillaume, J. *et al.* Galactosylsphingamides: new α -GalCer analogues to probe the F'-pocket of CD1d. *Sci. Rep.* **7**, 4276 (2017).
80. McCarthy, C. *et al.* The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J. Exp. Med.* **204**, 1131–44 (2007).
81. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–8 (2007).
82. Inuki, S. *et al.* Isolated Polar Amino Acid Residues Modulate Lipid Binding in the Large Hydrophobic Cavity of CD1d. *ACS Chem. Biol.* **11**, 3132–3139 (2016).
83. Inuki, S. *et al.* Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands: Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**, 9655–9659 (2018).

84. Miyamoto, K., Miyake, S. & Yamamura, T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* **413**, 531–4 (2001).
85. Honjo, E. *et al.* Expression of the extracellular region of the human interleukin-4 receptor alpha chain and interleukin-13 receptor alpha1 chain by a silkworm-baculovirus system. *Protein Expr. Purif.* **60**, 25–30 (2008).
86. Kurimoto, E. *et al.* Structural and functional mosaic nature of MHC class I molecules in their peptide-free form. *Mol. Immunol.* **55**, 393–9 (2013).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導御鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 教授 前仲勝実 先生に深く感謝致します。

本研究に際し、直接の御指導、御助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 創薬科学教育研究センター 特任助教 喜多俊介 先生に心より感謝申し上げます。

本論文の査定および研究へのご協力を頂きました北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室 教授 木原章雄 先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に際してご協力いただきました北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室 助教 大野祐介 先生に深く感謝申し上げます。

本論文を査定していただきました北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室 准教授 佐々貴之 先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、御協力および試料を御提供くださいました大阪大学大学院理学研究科 化学専攻 教授 村田道雄 先生、講師 花島慎弥 先生および Md Imran Hossain 博士並びに慶応大学理工学部化学科 教授 藤本ゆかり 先生並びに京都大学大学院薬学研究科 助教 井貫晋輔 先生並びに高知大学教育研究部自然科学系理学部門 教授 杉山成 先生に深く感謝申し上げます。

本研究を終始監修し、丁寧な御指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 准教授 黒木喜美子 先生、助教 古川敦 先生 並びに 創薬科学研究教育センター 特任助教 福原秀雄 先生、特任助教 田所高志 先生 並びに 北海道大学大学院先端生命科学研究院 X線構造生物学研究室 准教授 尾瀬農之 先生に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、様々な面で御助言並びに御協力を頂きました北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 並びに 創薬科学教育研究センターの皆様心より感謝申し上げます。

最後に、日頃から様々な面で支えてくださった家族並びに友人に心より感謝申し上げます。