

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16051

研究課題名(和文)脂質抗原提示分子CD1dの分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis for lipid presenting molecule CD1d

研究代表者

喜多 俊介(Kita, Shunsuke)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：10702003

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、CD1dによる抗原提示とNatural killer T(NKT)細胞の活性化というイベントを中心として、そこから時間的、空間的に隣接して起こるCD1dへの脂質積載や免疫制御分子との関係性も含めて、立体構造解析と物理化学解析に立脚するCD1dの分子基盤を構築することを目的として行った。具体的な成果として、CD1dとGalCer誘導体との複合体についてX線結晶構造を決定し、CD1dによる抗原認識機構について重要な知見を得た。また、CD1dと免疫細胞受容体などのタンパク質間相互作用解析を行い、CD1dと他の生命現象に関わる分子との相互作用について理解を深めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ガン細胞を攻撃するNKT細胞の働きを制御する分子CD1dについて研究を行った。CD1dは脂質と結合した後、NKT細胞に認識されるとNKT細胞が活性化する。本研究ではCD1dと脂質複合体の立体構造解析やCD1dと他の分子との結合の有無などを調べ、CD1dの生体内での機能をより深く理解することに成功した。本研究の成果は、CD1dと脂質の組み合わせによって免疫を制御する可能性を秘めており、将来、患者の免疫力を利用してガンの治療を行うために応用されることを期待している。

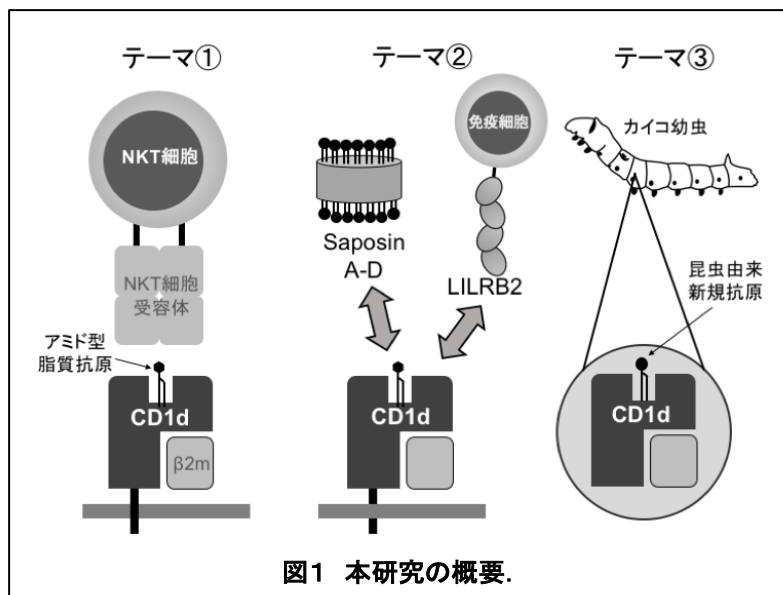
研究成果の概要(英文):This study focuses on the events of antigen presentation by CD1d and activation of Natural killer T (NKT) cells, and the relationship between lipid loading on CD1d and immunoregulatory molecules. The purpose of this study is to construct the molecular basis of CD1d based on three-dimensional structure analysis and biophysical analysis such as surface plasmon resonance and differential scanning calorimetry. As the result, the X-ray crystal structure of the CD1d and GalCer derivative complex was determined. From the structure, important knowledge for antigen recognition mechanism of CD1d was obtained. Further protein-protein interactions between CD1d and immune cell receptors were analyzed. Taken together, molecular basis of CD1d including three dimensional structure and protein-protein interaction was established and that could confer important knowledge for the application of CD1d molecule as biological therapy.

研究分野：構造生物化学

キーワード：CD1 脂質 GalCer NKT細胞 TCR X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

CD1d は自己および非自己の脂質を抗原として認識する MHC クラス I の仲間であり、T 細胞受容体 (TCR) を介して NKT 細胞を刺激し、多様かつ大量のサイトカイン産生を誘導する。NKT 細胞は細胞性免疫を活性化する Th1 型サイトカインと体液性免疫を活性化する Th2 型サイトカインの両方を産生し、免疫応答のバ



ランスを制御している。NKT 細胞の産生するサイトカインの種類は CD1d が提示する抗原に依存することから、抗原の化学構造と NKT 細胞活性化能との相関研究は精力的に取り組まれてきたが、未だに新たな抗原の合理的設計は容易ではない。原因の1つとして、これまでに報告されている CD1d と抗原の複合体構造においては、抗原の電子密度が不明瞭なものが多く、抗原開発に十分な情報を提供できていないことにある。また、NKT 細胞の活性化機構を CD1d と TCR の相互作用のみから議論しており、CD1d-抗原複合体の安定性等の物理化学的側面が欠如している点にある。 **CD1d がどのようにして脂質抗原を積載するか、他の免疫細胞受容体との関係性においてどのような役割を果たしているか等の部分も多くは未解明であり、抗原が生体内で引き起こす現象について CD1d を中心として統合的に理解する必要がある。**

2. 研究の目的

具体的研究内容として以下の3項目に取り組んだ(図1)。テーマ①では CD1d の代表的な抗原である α GalCer にアミド基を導入した効果を構造生物学、生物物理学の観点から議論することを目的とした。 α GalCer は NKT 細胞を強く刺激するが Th1/Th2 選択性はなく、崩れた免疫バランス調整にはサイトカイン選択性の高い抗原の開発が必要である。共同研究者の藤本らが開発したアミド型 α GalCer は、サイトカイン産性能が向上しており、Th1/Th2 指向性も変化している (Inuki S et al., *ACS Chem Biol.*, 2016)。そこで抗原にアミド基を導入した効果を、TCR による認識機構と CD1d-抗原複合体の安定性から考察した。

テーマ②では CD1d と相互作用する蛋白質群に焦点を当てた。②-1 では免疫細胞に発現しているペア型受容体 LILRB2 による CD1d の認識機構を解明することを目指した。LILRB2 は MHC クラス I と結合し抑制性のシグナルを伝達するが、CD1d とも結合する。MHC クラス I と LILRB2 の結合するサイトは、MHC クラス I では保存されているが、CD1d では配列が全く異なる。 **LILRB2 と CD1d の相互作用が、MHC クラス I のそれとどのように異なるのか、また抗原の種類によって LILRB2 と CD1d の結合親和性は変化するのかを結合実験や X 線結晶構造解析から考察することとした。** ②-2 では Saposin による CD1d への脂質積載の分子基盤に着目した。CD1d は 1 分子の脂質を抗原結合ポケットに収めるが、脂質は通常ミセルやベシクルなどの集合体を形成しており、CD1d がどのようにして集合体から 1 分子の脂質を積載するのかは不明である。Saposin はエン

ドソームにおいて CD1d への外来性脂質の積載に関与することが知られていた。ヒト CD1d の脂質積載には 4 種類の SaposinA-D が関与するが、特に SaposinB が重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では Saposin による CD1d への脂質抗原積載を *in vitro* で再現し、CD1d と Saposin の結合実験や CD1d-Saposin 複合体の X 線結晶構造解析を行うこととした。

テーマ③ではこれまでの研究から派生した昆虫由来脂質と CD1d との関係性についての研究を行った。カイコ幼虫を用いて調製した CD1d は、カイコの内在性脂質を結合していることが結晶構造や脂質解析から明らかとなっていたので詳細な解析を行うことにした。

3. 研究の方法

①アミド型 α GalCer による CD1d を介した NKT 細胞活性化機構の解明

アミド型 α GalCer を対象とし、サイトカイン産性能や Th1/Th2 指向性の分子機構を立体構造解析と物理化学解析から明らかにする。本研究では、CD1d- α GalCer 複合体に対する TCR の結合親和性が、アミド基の導入によってどのように変化するかを表面プラズモン共鳴 (SPR) によって比較する。またアミド基の有無、脂肪酸鎖の長さが CD1d-抗原複合体の熱安定性に与える影響を示差走査熱量解析 (DSC) によって評価する。

② CD1d と相互作用する分子群との複合体構造解析

②-1 ペア型受容体 LILRB2 による CD1d の認識機構の解明

CD1d-LILRB2 複合体の X 線結晶構造解析を行う。CD1d-LILRB2 複合体が安定して存在する条件の検討を行い、結晶化条件の探索を行うまた並行して、CD1d と LILRB2 の結合が抗原依存的であるかを、複数種類の抗原について CD1d-抗原複合体を調製し SPR で調べる。

②-2 Saposin による CD1d の脂質積載機構の解明

CD1d への Saposin の結合がリガンド依存的に起こるか、また pH 依存的に起こるかどうかをブルダウンアッセイやゲルろ過で簡易的に評価し、CD1d と Saposin 複合体が最も安定に存在する条件について結合親和性を SPR で評価し、複合体の X 線結晶構造解析を行う。

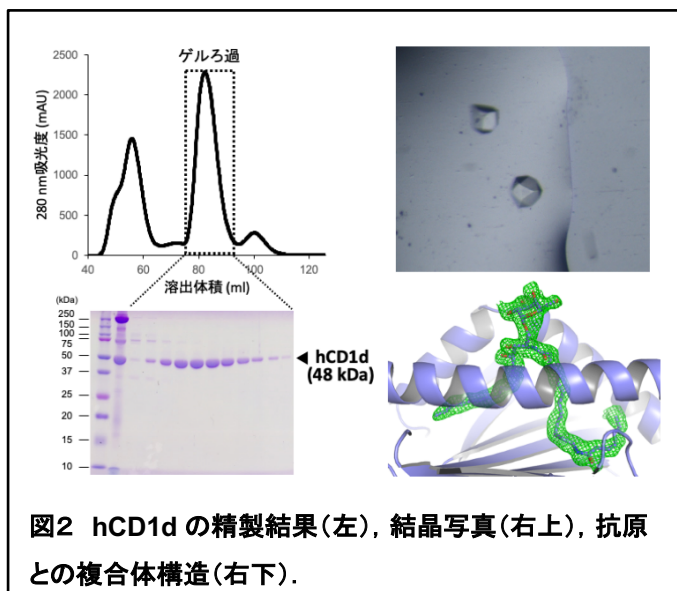
③ CD1d が認識する昆虫由来脂質成分の解析

カイコ幼虫を用いて調製した CD1d からカイコの内在性脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した後、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) で解析する。

4. 研究成果

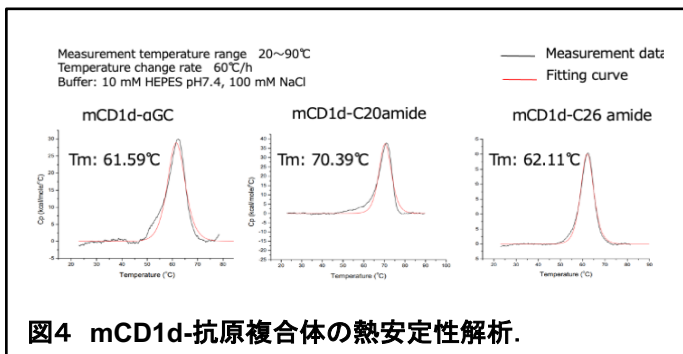
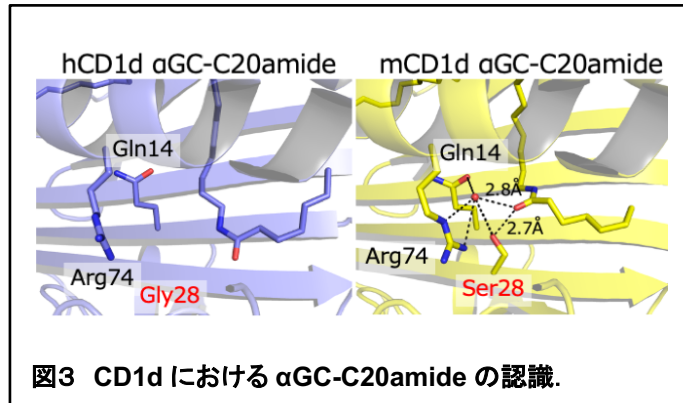
①アミド型 α GalCer による CD1d を介した NKT 細胞活性化機構の解明

ヒト CD1d (hCD1d)、マウス CD1d1 (mCD1d) について、カイコ幼虫を用いたカイコ-バキュロウイルス発現系で調製し、高純度に精製した (図 2)。高純度に精製した CD1d タンパク質とアミド型 α GalCer (α GCamide) との複合体を作製し、ゲルろ過で精製した後、結晶化条件の探索を行い、hCD1d- α GC-



C20amide, hCD1d- α GC-C26amide, mCD1d- α GC-C20amide, mCD1d- α GC-C26amide, の4種類について、それぞれ構造を決定した。4つの構造中において、抗原中のアミド基の電子密度は明瞭に観察された。4つの構造を重ね合わせると、hCD1dとmCD1dではアミド基の位置が大きく異なることが判明した。mCD1dでは、アミド基は、mCD1dのSer28を含む残基と水素結合ネットワークを形成していた(図3)。他方、hCD1dにおいては、疎水性環境下にアミド基は位置しており、水素結合などによって特異的に認識されていることはなかった。また、hCD1dにおいてアミド基はシス型となっていたのに対して、mCD1dにおいてはトランス型であり、hCD1dにおいて抗原は歪んで結合していることなどが明らかとなった。以上のことからhCD1d- α GCamideはmCD1d- α GCamideと比べて不安定であること、mCD1d- α GCamideはmCD1d- α GCよりも安定であることなどが示唆されたため、示差走査熱量解析(DSC)によ

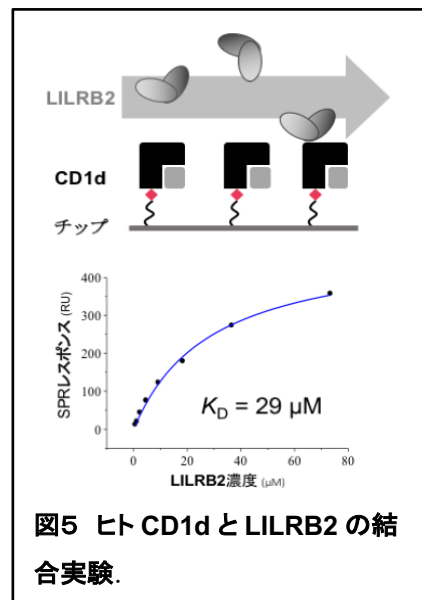
って熱安定性を評価した(図4)。現在、DSCの解析を進めており、mCD1d- α GC-C20amideはmCD1d- α GCやmCD1d- α GC-C26amideと比べて熱安定性が高いことがわかっていく。この結果は、共同研究者の行ったサイトカイン産生能と符合しており、 α GC-C20amideについては熱安定性が高いことがサイトカイン産生能に影響していると考えられる。しかしアミド基を有する抗原であっても、炭化水素鎖の長さによって熱安定性が異なる機構などは不明であるため、今後は分子動力学を利用したエネルギー計算にも取り組む予定である。



② CD1dと相互作用する分子群との複合体構造解析

②-1ペラ型受容体LILRB2によるCD1dの認識機構の解明

申請者は研究開始時に、既に表面プラズモン共鳴(SPR)を用いてCD1dとLILRB2との結合について、解析を済ませており、解離定数を算出していた(図5)。この結果からCD1dとLILRB2との相互作用は弱いことが判明しており、複合体の結晶を得るために、タンパク質濃度やCD1dとLILRB2の比率を検討してみたが、複合体の結晶を得ることはできなかった。そこで、CD1dのコンストラクトや抗原の種類について条件検討を行い、SPRを用いて評価してみたが、これまでのところCD1dとLILRB2の結合を強くする条件は見つかっていない。現在は、CD1d以外のCD1分子であるCD1bについて、LILRB2との相互作用を調べる準備を進めている。



②-2 SaposinによるCD1dの脂質積載機構の解明

4種類のヒト Saposin (SapA-D) について大腸菌を用いて調製し、CD1 との結合をプルダウンアッセイで調べた。実験では、まず CD1b 分子を用いたところ、CD1b と SapC の結合が認められた。また様々な条件でプルダウンアッセイを行うことで、CD1b と SapC の結合が pH や塩濃度に影響を受けることが明らかとなった(図6)。SapC は濃度依存的、pH 依存的に多量体を形成することが申請者らの実験で明らかとなっている。

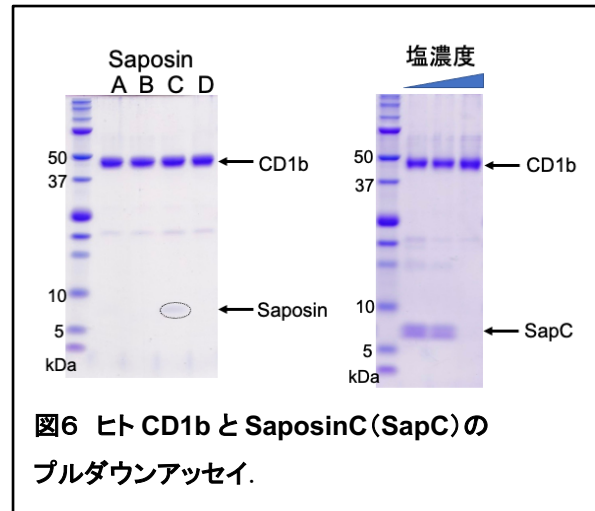


図6 ヒト CD1b と SaposinC(SapC) のプルダウンアッセイ。

SapC の多量体形成と CD1b との結合の関連について、プルダウンアッセイや SPR を用いて調べているが、はっきりしたことはまだ不明である。CD1b-SapC 複合体の結晶化にも着手し、複合体の結晶は得られなかったが、CD1b と内在性脂質複合体の構造解析に成功した。CD1b の構造については、次の項で述べる(図7)。

③ CD1d が認識する昆虫由来脂質成分の解析

表1 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 |

カイコで発現させた CD1d や CD1b から脂質を抽出し、TLC で分離した後、LC-MS で解析した(表1)。CD1d には主にアシル鎖長が 16-18 の脂質 (FA: 脂肪酸、DG: ジアシルグリセロール、PE: フォスファチジルエタノールアミン、PC: フォスファチジルコリン、SM: スフィンゴミエリン) が結合していた。hCD1d 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。また、CD1b から抽出した脂質においては、脂肪酸が検出された(図7)。CD1b-SaposinC 複合体の結晶化を試行したところ、

CD1b のみの結晶構造が得られた。CD1b の抗原結合ポケットには、長細い電子密度が観察されたことから、この電子密度は脂肪酸であることが示唆された。電子密度の大きさからパルミチン酸やステアリン酸であることが予想されたため、CD1b から抽出した脂肪酸を LC-MS によって解析する予定である。

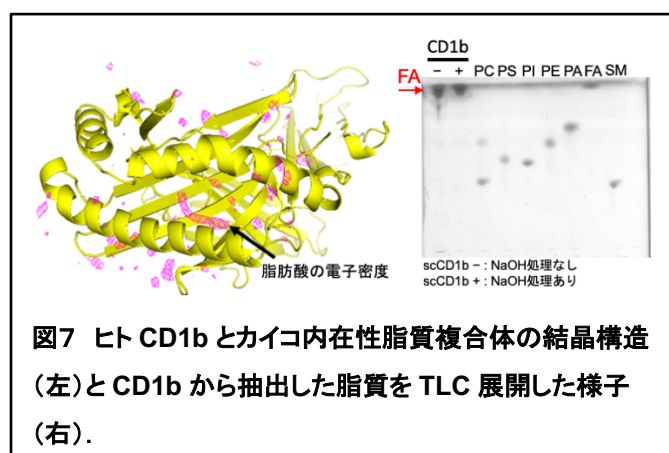


図7 ヒト CD1b とカイコ内在性脂質複合体の結晶構造(左)と CD1b から抽出した脂質を TLC 展開した様子(右)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kusaka Hiroki, Kita Shunsuke, Tadokoro Takashi, Yoshida Kouki, Kasai Yoshiyuki, Niiyama Harumi, Fujimoto Yukari, Hanashima Shinya, Murata Michio, Sugiyama Shigeru, Ose Toyoyuki, Kuroki Kimiko, Maenaka Katsumi | 4. 巻 172 |
| 2. 論文標題 Efficient preparation of human and mouse CD1d proteins using silkworm baculovirus expression system | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Protein Expression and Purification | 6. 最初と最後の頁 105631 - 105631 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2020.105631 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 喜多 俊介、日下 裕規、井貫 晋輔、Md. Imran Hossain、花島 慎弥、田所 高志、新山 真由美、杉山 成、相羽 俊彦、尾瀬 農之、黒木 喜美子、深瀬 浩一、村田 道雄、藤本 ゆかり、前仲 勝実 |
| 2. 発表標題 CD1dとアミド基導入抗原複合体のX線結晶構造解析 |
| 3. 学会等名 日本結晶学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Cong Tian, Hiroki Kusaka, Takashi Tadokoro, Shunsuke Kita and Katsumi Maenaka |
| 2. 発表標題 Protein expression and purification of human CD1b- 2m complex using silkworm - baculovirus expression system |
| 3. 学会等名 日本生化学会 北海道支部例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Cong Tian, Hiroki Kusaka, Takashi Tadokoro, Shunsuke Kita and Katsumi Maenaka |
| 2. 発表標題 X-ray crystal structure analysis of lipid antigen presenting molecule CD1b |
| 3. 学会等名 PFシンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 前仲 勝実、喜多 俊介、古川 敦、野村 尚生、福原 秀雄、前田 直良 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 エヌ・ティー・エス | 5. 総ページ数 624 |
| 3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック 第2編第7章1 免疫系表面受容体と細胞コミュニケーション | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|