

氏 名 梶川 瑞穂

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1011 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命体科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 マウス MHC クラス I 様分子 MILL の生化学的解析

論文審査委員 主 査 助教授 深川 竜郎  
教授 堀内 嵩  
助教授 田辺 秀之  
教授 笠原 正典（北海道大学）  
教授 橋本 敬一郎（藤田保健衛生  
大学）

## 論文内容の要旨

主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) は、皮膚移植片の生着を支配する分子 (移植抗原) をコードする遺伝領域として発見された。ヒトでは6番染色体の *HLA* 領域、マウスでは17番染色体の *H2* 領域がこれに相当する。その後、移植抗原の生理的機能は、抗原ペプチドをT細胞レセプターに提示することにあることが判明し、今日では、これらの抗原はMHCクラスI分子およびMHCクラスII分子として広く知られるにいたっている。ヒトでは *HLA-A/B/C* 分子、マウスでは *H2-K/D/L* 分子がMHCクラスI分子に相当する。MHCクラスI分子には多くの類似分子が存在するため、これらは他のMHCクラスI様分子と区別して、特にMHCクラスIa分子と呼ばれている。MHCクラスIa分子はペプチドおよび $\beta 2$ ミクログロブリンと結合する膜表面局在型の糖タンパク質であり、細胞質内タンパク質由来のペプチドのCD8+T細胞への提示が主な機能である。

MHCクラスIa分子以外のクラスI分子はMHCクラスIb分子と呼ばれている。ヒトでもマウスでも、MHCクラスI様分子の中でのMHCクラスIa分子の種類は少数であり、大部分はMHCクラスIb分子である。MHCクラスIb分子は、一部の例外を除けば、MHCクラスIa分子と同様に $\beta 2$ ミクログロブリンと結合する膜表面局在型の糖タンパク質であり、その立体構造もMHCクラスIa分子と似たフォールドを形成している。ただし、結合する低分子は必ずしもペプチドではなく、例えば糖脂質を結合するMHCクラスIb分子も存在する。さらに、リガンドがまったく結合していないと考えられるMHCクラスIb分子も存在する。したがって、MHCクラスIb分子の機能はペプチドの提示にとどまらず多様である。これらMHCクラスIbファミリーの多彩な機能は、1) 特殊な抗原提示を行なうもの、2) 抗原提示以外の免疫機能を持っているもの、3) 免疫系以外で機能するものに大別される。

最近、Kasaharaらはこれまでに知られているMHCクラスIbのいずれとも異なるMHCクラスIbファミリー遺伝子をマウスで (後にラットでも) 発見した。この遺伝子はマウス7番染色体上の白血球受容体複合体 (leukocyte receptor complex; LRC) 領域近傍でコードされることから *Mill* (MHC Class I-like located near the LRC) と命名された。*Mill* は *Mill1* および *Mill2* の二つからなるファミリーで、多型が少なく、その遺伝子産物である *MILL1* および *MILL2* の生体組織における発現量は低いと考えられている。RT-PCR解析によれば *Mill1* は胸腺や新生児の皮膚といった限られた組織で転写されているが、*Mill2* はほとんどの組織で低いレベルで転写されている。遺伝子配列から予測されるアミノ酸配列からは、*MILL1* および *MILL2* はMHCクラスIa分子と同様に三つの細胞外ドメイン ( $\alpha 1$  から  $\alpha 3$ ) からなる糖タンパク質であると推測された。しかしながら $\alpha 1$ ドメインおよび $\alpha 2$ ドメインの、ペプチドとの相互作用に重要な部位が欠落していることも推測され、*MILL* はペプチドを結合しないことが示唆された。

また、MILL1 と MILL2 の配列は、既知の MHC クラス I ファミリーの中では MICA/B に最も近く、げっ歯類に MICA/B ファミリーは存在せず、一方ヒトには *Mill* ファミリー遺伝子が存在しないことから、MILL は MICA/B の機能的対応分子ではないかと推測されていた。MICA/B はナチュラルキラー (natural killer; NK) 細胞受容体 NKG2D のリガンドとして、NK 細胞を活性化する分子である。しかしながら、マウスでは RAE-1 および H60 が MICA/B と同様に NKG2D のリガンドとして機能するため、MILL は MICA/B の機能的対応分子ではなく、別の機能をもっている可能性も考えられた。

本研究においては、MILL 分子の生化学的特性を明らかにすべく、主としてマウス培養細胞株で発現させた組換え MILL 分子を用いて詳細な解析を行った。その結果、MILL1 および MILL2 が  $\beta 2$  ミクログロブリンと相互作用する、グリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol; GPI) アンカー型の糖タンパク質であることを明らかにした。また、MILL 分子の細胞表面発現は TAP 機能に依存しないことを明らかにした。後者の結果は MILL1 および MILL2 が抗原ペプチドを結合しないことを示唆するものであった。MILL1、MILL2 は  $\beta 2$  ミクログロブリンと相互作用すること、GPI で細胞膜に結合していることなどの点で、MICA/B と異なっており、両者は生化学的特性を異にする MHC クラス Ib 分子であることが示された。

さらに、マウス MILL 分子を大腸菌の封入体として作成し、 $\beta 2$  ミクログロブリンを加えることにより、同分子を巻き戻すことに成功した。この成果は、立体構造解析を含め、MILL 分子の詳細なタンパク質構造解析に道を拓くものである。

## 論文の審査結果の要旨

主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC)分子は、皮膚の移植片の生着を支配する移植抗原として見いだされた。その後、移植抗原の生理機能は、抗原ペプチドを T 細胞レセプターに提示することが判明し、今日では、これらの抗原は MHC クラス I 分子およびクラス II 分子として広く知られている。MHC クラス I 様分子は多数存在することが知られているが、Kasahara らは、アミノ酸配列のホモロジーから、既知の MHC クラス I 様分子とは異なる新規の MHC クラス I 様分子のファミリー遺伝子を見いだした。この遺伝子ファミリーを *Mill* と命名した。*Mill* は、*Mill1* および *Mill2* の 2 つの遺伝子からなるファミリーで、その遺伝子産物である MILL1 および MILL2 の生体組織における発現量は、低いことが明らかになっている。MILL 分子のアミノ酸配列は、既知の MHC クラス I 分子では、MICA/B と類似しており、ヒトにおいては、*Mill* ファミリー遺伝子が存在せず、マウスでは MICA/B ファミリー遺伝子が存在しないため、MILL 分子は MICA/B の機能対応分子の可能性も推測されていた。しかしながら、マウスでは、RAE1 および H60 が MICA/B と同様に NKG2D のリガンドとして機能することから、MILL 分子が MICA/B の機能対応分子でない可能性も考えられ、MILL 分子の特性については、明らかになっていなかった。

そこで、本論文では、MILL 分子の機能を理解するうえで、MILL 分子の生化学的特性を明らかにすることを目的とした研究を行い、以下の結果が得られた。1) マウス培養細胞に発現させた MILL 分子の解析から、MILL 分子が細胞表面に発現することを明らかにした。2) また、その MILL 分子の細胞表面の発現は、古典的な MHC クラス I 分子と異なり、TAP 機能に依存しないことも明らかにした。このことは、MILL 分子が抗原ペプチドを結合しないことを示唆するものである。3) 免疫沈降実験を行い、MILL1 および MILL2 が  $\beta 2$  ミクログロブリンと相互作用することがわかった。4) MILL 分子は、膜貫通型タンパク質と考えられていたが、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) で細胞を処理した後、フローサイトメーターを用いた解析を行うことで、MILL 分子がグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型の糖タンパク質であることを明らかにした。本実験を行う前は、タンパク質のアミノ酸配列の解析から MILL 分子は、MHC クラス I ファミリーの MICA/B に近い機能を持っている可能性も推測されていたが、以上の一連の生化学的な解析によって、MILL 分子は、MICA/B 分子とは、生化学的特性を異にする MHC クラス I 分子であることが明確に示された。さらに、将来的な MILL 分子のタンパク質構造解析を視野に入れた研究として、MILL 分子の大量発現を行った。具体的には、マウス MILL1 および MILL2 を大腸菌内で発現させ封入体のなかにタンパク質を得た。これらの MILL 分子に精製  $\beta 2$  ミクログロブリンを加えることで巻き戻すことに成功し、正常な立体構造を保った MILL 分子を得た。この成果は、タンパク質立体構造解析を含めた MILL 分子の詳細なタンパク質構造解析のための下地になると思われる。

以上の研究結果は、これまで生化学的特性が不明確であった MILL 分子の特性を明確に示した点で高い学術的価値を持っている。今後の MILL 分子を含めた MHC クラス I 様分子の抗原認識機構の研究にとって重要な基盤情報を提示したものとして評価できる。