

マウス MHC クラス I 様分子 MILL の生化学的解析

梶川 瑞穂

博士（理学）

総合研究大学院大学

先導科学研究科

生命体科学専攻

平成 18 年度

(2006 年度)

博士論文目次

第 1 章 序論 1

- 1-1 自然免疫：パターン認識による生体防御機構 2
- 1-2 適応免疫：抗原特異的認識による生体防御機構 2
- 1-3 MHC クラス I 分子と MHC クラス II 分子 3
- 1-4 MHC クラス Ia 分子による細胞内抗原提示 3
- 1-5 MHC クラス Ia 分子によるナチュラルキラー細胞の抑制 4
- 1-6 MHC クラス Ib 分子 5
- 1-7 MHC クラス Ib ファミリーの機能多様性 5
- 1-8 MHC Class I-like located near the LRC ; MILL 7
- 1-9 本研究の目的 7

第 2 章 方法 9

- 2-1 細胞株および抗体 10
- 2-2 抗 MILL 抗血清の作製 11
- 2-3 哺乳細胞発現ベクターの作製 12
- 2-4 安定発現株への遺伝子導入 13
- 2-5 ウェスタンブロット法 13
- 2-6 フローサイトメトリーによる細胞表面発現解析 14
- 2-7 糖鎖解析 14
- 2-8 ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PI-PLC) 処理 14
- 2-9 MILL 細胞表面発現と TAP 依存性を調べる実験 15
- 2-10 $\beta 2$ ミクログロブリンとの結合解析 15
- 2-11 細胞表面の酸処理 15
- 2-12 哺乳類培養細胞における組換え MILL の分泌発現 15
- 2-13 大腸菌を用いた組換え MILL 大量調製のための発現ベクターの作成 16
- 2-14 巻き戻し法による MILL の調製 17
- 2-15 免疫染色 17
- 2-16 胸腺髄質細胞の単離 18

第3章 結果 19

- 3-1 MILL安定発現細胞株および抗MILL抗血清の樹立 20
- 3-2 MILL1およびMILL2は細胞表面に発現する 20
- 3-3 MILL1およびMILL2はN型糖鎖の付加したタンパク質である 20
- 3-4 MILL1およびMILL2はGPIアンカー型タンパク質である 21
- 3-5 MILLの細胞表面発現はTAPに依存しない 22
- 3-6 MILL1およびMILL2は $\beta 2$ ミクログロブリンと結合している 22
- 3-7 MILL1の発現は細胞表面の酸処理に影響を受けた 23
- 3-8 ヒト細胞で発現させたマウス MILL は単量体であった 23
- 3-9 大腸菌を用いて発現させた MILL1 および MILL2 を封入体として回収した 24
- 3-10 封入体からの巻き戻しで MILL1 および MILL2 を得た 25
- 3-11 MILL1 は胸腺髄質および内毛根鞘に観察された 25
- 3-12 生体内における MILL1 の発現には $\beta 2$ ミクログロブリンが必要である 26

第4章 考察 27

- 4-1 はじめに 28
- 4-2 MILL を安定発現する細胞株の樹立 26
- 4-3 生体における MILL の発現 29
- 4-4 生化学的性質に関する考察 1: GPI アンカー型の膜蛋白質としての MILL 29
- 4-5 生化学的性質に関する考察 2: N型糖タンパク質としての MILL 29
- 4-6 生化学的性質に関する考察 3: MILL とペプチドの関係 30
- 4-7 生化学的性質に関する考察 4: MILL と $\beta 2$ ミクログロブリンの相互作用 30
- 4-8 構造解析を目指した組換え MILL の生産 32
- 4-9 総括 32

謝辞 34

参考文献 37

図表 45

図 1-1	MHC クラス Ia 分子の基本構造	46
図 1-2	MHC クラス II 分子の基本構造	47
図 1-3	MHC クラス I 分子および MHC クラス II 分子のペプチド結合溝	48
図 1-4	MHC クラス Ia 分子による細胞内抗原の提示	49
図 1-5	哺乳類 MHC クラス I ファミリーの系統樹	50
図 1-6	MHC クラス Ib 分子の立体構造	51
図 2-1	MILL-pQE30 ベクター	52
図 2-2	MILL-pFLAG-CMV3 ベクター	53
図 2-3	MILL-pLEX ベクター	54
図 2-4	フローサイトメトリー法	55
図 2-5	MILL-pGMT7 ベクター	56
図 2-6	希釈法による MILL の巻き戻し	57
図 3-1	MILL1 もしくは MILL2 を安定発現するマウス細胞株の樹立	58
図 3-2	MILL1 および MILL2 の細胞表面における発現解析	59
図 3-3	MILL1 および MILL2 の糖鎖解析	60
図 3-4	細胞表面 MILL の PI-PLC 処理による発現	61
図 3-5	RMA-S における MILL1 および MILL2 の細胞表面発現解析	62
図 3-6	免疫沈降法による MILL1 および MILL2 と $\beta 2$ ミクログロブリンの相互作用解析	63
図 3-7	細胞表面 MILL の酸処理による発現量変化の解析	64
図 3-8	ヒト細胞を用いた可溶型マウス MILL の発現	65
図 3-9	大腸菌における可溶型マウス MILL およびマウス $\beta 2$ ミクログロブリンの発現誘導	66
図 3-10	可溶型 MILL および $\beta 2$ ミクログロブリンを発現させた大腸菌からの封入体画分の精製	67
図 3-11	可溶型 MILL1 のゲルろ過クロマトグラフィーによる精製	68
図 3-12	SDS-PAGE による可溶型 MILL1 溶出画分の確認	69
図 3-13	可溶型 MILL1 の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製	70
図 3-14	可溶型 MILL1 の SDS-PAGE による精製確認	71
図 3-15	可溶型 MILL2 のゲルろ過クロマトグラフィーによる精製	72
図 3-16	SDS-PAGE による可溶型 MILL2 溶出画分の確認	73
図 3-17	可溶型 MILL2 の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製	74
図 3-18	可溶型 MILL2 の SDS-PAGE による精製確認	75
図 3-19	マウス生体組織における MILL1 の発現	76

図 3-20 $\beta 2$ ミクログロブリンノックアウトマウスにおける MILL1 の発現 77

図 4 MILL と MIC の性質比較 78

表 1 ヒトとマウスの主な MHC クラス Ib ファミリー 79

略語一覽

AEBSF; 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride
ATP; adenosine triphosphate
BFA; brefeldin A
CBBR; coomassie brilliant blue
cDNA; complementary DNA
DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium
DNA; deoxyribonucleic acid
EDTA; ethylenediamine-*N,N,N',N'* tetraacetic acid
FITC; fluorescein isothiocyanate
G418; geneticin 418
GPI; glycosylphosphatidylinositol
H2; histocompatibility 2
HEPES; 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HLA ; human leukocyte antigen
HRP; horseradish peroxidase
IPTG; isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
LRC; leukocyte receptor complex
MAIT; mucosal-associated invariant T
MHC; major histocompatibility complex
mRNA; messenger ribonucleic acid
NK; natural killer
NKT; natural killer T
NTA; nitrilotriacetic acid
PBS; phosphate buffer saline
PCR; polymerase chain reaction
PI-PLC; phosphatidylinositol-specific phospholipase C
PNGase F; peptide;*N*-glycosidase F
PVDF; polyvinylidene difluoride
RT-PCR; reverse-transcript PCR
SDS; sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TAP; transporter associated with antigen presentation
TCR; T cell receptor
Tris; tris (hydroxymethyl) aminomethane

第 1 章 序論

1-1 自然免疫:パターン認識による生体防御機構

動物における生体防御の最前線は外界との接点である上皮細胞である。例えばヒトでは乾燥した皮膚組織や呼吸器系・消化管系などの粘液、リゾチームの分泌などにより、病原体などの異物（外来抗原）の進入を物理的・化学的に排除している。それでも上皮組織を越えて体内に侵入した外来抗原は、主に食細胞による貪食により排除される。ヒトではマクロファージや好中球が食細胞として貪食を行い、貪食された外来抗原は各種の消化酵素やスーパーオキシド、一酸化窒素などの毒性物質により排除される。その他にも、外来抗原に結合し連鎖的酵素反応によって破壊を行う補体系や、外来抗原の作用により異常化した細胞を認識し細胞障害を行うナチュラルキラー（natural killer; NK）細胞などがあり、これらは一般に自然免疫と呼ばれている。自然免疫による外来抗原認識は、抗原共通成分、たとえば細菌の細胞壁構成要素などを、パターンとして認識する方法に依存している。このような上皮組織とパターン認識による生体防御は、脊椎動物に限らず無脊椎動物でも広く存在している機構である[1]。

1-2 適応免疫:抗原特異的認識による生体防御機構

有顎脊椎動物では、さらに適応免疫と呼ばれる異物排除系が存在する。適応免疫は、パターン認識に依存する自然免疫とは異なり、特定の外来抗原を認識し集中的に排除することが可能な系である。適応免疫系を有する生物では多くの場合において、自然免疫系は自身による外来抗原の排除と同時に適応免疫の活性化を促す。最近、無顎脊椎動物においても適応免疫を担うと考えられる分子が発見されたが、その分子は有顎脊椎動物には存在せず、無顎脊椎動物における特殊な系であることが予想される[2、3]。

有顎脊椎動物における適応免疫の主要な要素は、B細胞による抗原特異的抗体の産生と、T細胞による細胞性免疫である。外来抗原それぞれに対して特異的かつ強固に結合するタンパク質である抗体は、細胞外において外来抗原と結合して包み込むことでその作用を抑えたり、食細胞などによる外来抗原の取り込み作用を促したりしてその排除に寄与する。一方、抗原提示細胞（マクロファージや樹状細胞）の取り込んだ外来抗原や、ウイルスなどの感染を受け宿主の細胞内で生産された外来抗原を、T細胞が特異的に認識し、B細胞による抗体の産生増強や、自身による異常細胞の直接的排除を行うのが細胞性免疫である。この細胞性免疫において中心的な役割を担うのがT細胞に発現するT細胞受容体（T cell receptor; TCR）と、そのリガンドである主要組織適合性遺伝子複合体（major histocompatibility complex; MHC）クラスI分子およびクラスII分子と呼ばれるタンパク質である。

1-3 MHC クラス I 分子と MHC クラス II 分子

MHC は発見当初、皮膚の移植片の生着を支配する移植抗原として見出された。ヒトでは 6 番染色体の HLA (human leukocyte antigen) 領域、マウスでは 17 番染色体の H2 (histocompatibility 2) 領域がこれに相当する。その後、この MHC 領域にコードされている遺伝子群の中から細胞性免疫に深く関与する分子をコードする遺伝子が発見され、それらの遺伝子産物が先述の MHC クラス I 分子および MHC クラス II 分子である。

MHC クラス I 分子は、ヒトでは HLA-A/B/C 分子、マウスでは H2-K/D/L 分子が該当するが、MHC クラス I 分子には多くの類似分子 (MHC クラス I 様分子) 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。タンパク質としての MHC クラス Ia 分子は大きな α 鎖 (重鎖) と小さな β 鎖 (軽鎖) が会合した二量体であり、 α 鎖はペプチドが結合している溝を形成する $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメイン、 β 鎖との結合に主に関与する $\alpha 3$ ドメイン、膜貫通領域、そして細胞質領域から構成される。MHC クラス Ia 分子における β 鎖は $\beta 2$ ミクログロブリンである (図 1-1)。MHC クラス Ia 分子は細胞表面に存在する膜タンパク質であるが、その膜局在にはこれらペプチドおよび $\beta 2$ ミクログロブリンが必須である[4、5]。

一方の MHC クラス II 分子は、分子量の似た α 鎖と β 鎖のヘテロ複合体であるが、その立体構造は MHC クラス Ia 分子のそれとよく似ている (図 1-2)。 $\alpha 1$ ドメインと $\beta 1$ ドメインの間には、MHC クラス Ia 分子と同じようにペプチド結合溝が形成されている。構造上大きく異なる点は、この結合溝の両端が MHC クラス Ia 分子では閉じているのに比べて、MHC クラス II 分子では開いている点である (図 1-3)。MHC クラス Ia 分子に結合するペプチドの長さが 8 残基から 10 残基であるのに対し、MHC クラス II 分子ではそれ以上に長いペプチドを結合することが可能であるのは、この構造上の差異によると考えられる[6、7]。

両分子の生理機能については、細胞性免疫に関与するという部分は同様であるが、詳しくは MHC クラス Ia 分子が主に細胞内タンパク質由来のペプチドを結合し CD8+T 細胞の TCR により認識されるのに対し、MHC クラス II 分子は主に細胞外来タンパク質を CD4+T 細胞の TCR に提示するという違いがある[8]。

1-4 MHC クラス Ia 分子による細胞内抗原提示

先述したように、MHC クラス Ia 分子の主な働きは細胞内タンパク質由来ペプチド (細胞内抗原) の提示である (図 1-4)。細胞質内に存在するタンパク質はユビキチン-

プロテアソーム系と呼ばれる能動的タンパク質分解経路などにより分解される[9]が、このとき生じたペプチド断片は TAP (transporter associated with antigen presentation) と呼ばれる輸送体によりアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate; ATP) 依存的に小胞体の内腔に取り込まれる[10]。小胞体内腔に入ったペプチドは、場合によってはアミノペプチダーゼなどにより更なる分解を受け[11]、MHC クラス Ia 分子のペプチド結合溝に結合可能になる。一方、リボソームで合成された MHC クラス Ia 分子の α 鎖は小胞体内腔に取り込まれ、まずカルネキシンと結合する。カルネキシンと複合体を形成した MHC クラス Ia 分子の α 鎖は β 2 ミクログロブリンと結合し、カルネキシンから遊離する。その後タパシンを介して TAP と複合体を作り、さらにカルレチクリンおよび Erp57 とともに結合し、その状態でペプチドと結合する[12]。このペプチド・クラス Ia 分子複合体はゴルジ体を経由して細胞表面に運ばれ、これを CD8⁺T 細胞 (キラーT細胞) が $\alpha\beta$ TCR を介して認識する。これが細胞内抗原の提示である。

正常細胞では MHC クラス Ia 分子によって提示されるペプチドは自己由来のものであり、また CD8⁺T 細胞は胸腺教育により自己のペプチドを結合したクラス Ia 分子とは反応しないため、MHC クラス Ia 分子を認識した T 細胞は活性化しない。それに対しウイルス感染細胞や癌化細胞では細胞内で通常とは異なるタンパク質が生産されるため、その結果として MHC クラス Ia 分子に結合するペプチドも正常ではないタンパク質由来のものが混じるようになる。このようなペプチドを結合した MHC クラス Ia 分子が TCR によって認識されると、TCR 下流のシグナル伝達が進行することで CD8⁺T 細胞が活性化し、刺激を入れた異常細胞に穴を開けたり、サイトカインの放出によりアポトーシスを促したりすることで異常細胞を破壊する。この反応は適応免疫の基盤を担う非常に重要なものである。

MHC クラス Ia 分子は集団レベルで高度の多型性を示すが、その多型残基の多くはペプチド結合溝に集中している[13]。MHC クラス Ia 分子のペプチド結合溝における多型により、この部分に結合できるペプチドのレパトアが変化する。TCR とペプチド・MHC クラス Ia 分子複合体の相互作用はペプチドに大きく依存している[14]ため、多型は結果として T 細胞の反応性に影響を及ぼし、最終的に免疫応答能の個体差を生み出し得る。したがって、MHC クラス Ia 分子の多型の程度が高ければ高いほど、種として免疫応答できる抗原の種類が増大することになり、種の存続に有利になると考えられる。

1-5 MHC クラス Ia 分子によるナチュラルキラー細胞の抑制

また、MHC クラス Ia 分子は適応免疫系の中核分子として TCR に細胞内抗原を提示するのみならず、NK 細胞の活性を制御する機能も持つ。NK 細胞は、それが生産する

顆粒によって標的細胞を殺傷する能力をもつ免疫担当細胞であるが、正常細胞の指標として MHC クラス Ia 分子を認識しており、これにより正常な自己細胞をむやみに攻撃しないようになっている[15]。しかし、ウイルス感染などの理由により細胞表面の MHC クラス Ia 分子の発現が減弱した細胞は NK 細胞に抑制性のシグナルを入れることができなくなり、NK 細胞によって傷害される[16]。NK 細胞の細胞障害活性は MHC クラス Ia 分子のみによって制御されているわけではないが、MHC クラス Ia 分子は NK 細胞の活性を制御する主要な分子であるといえる。

1-6 MHC クラス Ib 分子

MHC クラス Ia 遺伝子とファミリーをなす遺伝子が多数存在し、これらは一括して MHC クラス Ib と呼ばれている。図 1-5 からわかるように、ヒトでもマウスでも、MHC クラス I のうち MHC クラス Ia の種類は少数であり、大部分は MHC クラス Ib の範疇に属する。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タンパク質であり、立体構造上も $\alpha 1 \cdot \alpha 2$ ドメインにある二本の α ヘリックスが溝を形成した MHC クラス I 分子独特のフォールドを形成している (図 1-6)。ただし、この溝に結合するのは必ずしもペプチドではなく、CD1 のように糖脂質を結合するものもあり、さらには溝にリガンドがまったく結合していないと考えられる分子 (MICA、MICB、FCGRT、RAE-1 など) 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。基本的にすべての有核細胞の表面に豊富に発現される MHC クラス Ia 分子に対して、MHC クラス Ib 分子の発現量は低く、限定された部位に特異的に発現されていたり、生理的な条件下ではほとんど発現されていないが、何らかの刺激によって発現が誘導されたりする。MICA、MICB のように多型性に富んだ MHC クラス Ib も存在しないわけではないが[17]、これは例外的であり、多型性に乏しいことも MHC クラス Ib の特徴である。

1-7 MHC クラス Ib ファミリーの機能多様性

MHC クラス Ib 遺伝子は、MHC 領域のみに存在するわけではなく、MHC 領域外にも存在する。ヒトのクラス Ib 遺伝子としては、MHC 領域に *HLA-E*、*HLA-F*、*HLA-G*、*MICA*、*MICB*、*HFE* 遺伝子があり、MHC 領域外に *CD1*、*MR1*、*FCGRT* (FcRn)、*AZGP1* (ZAG)、*RAET1* (ULBP)、*PROCR* (EPCR) 遺伝子が存在する。マウスでは、*MICA*、*MICB* 遺伝子が欠落しており、ヒトにはない MHC クラス Ib 遺伝子とし

て、本研究の対象である *Mill* 遺伝子および *blastocyst* MHC 遺伝子が存在する。また、マウスの MHC 領域には MHC クラス Ia 分子をコードする *H2-KD/L* 遺伝子の他に *Q*、*T*、*M* 領域があり、*TL*、*M3*、*M1*、*M10* をはじめとする MHC クラス Ib 分子をコードする遺伝子が存在している。

これら MHC クラス Ib ファミリーの機能は多彩であるが、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 (表 1)。HLA-E は特殊な抗原提示に関与しており、提示されるペプチドの大部分は MHC クラス Ia 分子のシグナル配列に由来しているため、NK 細胞が MHC クラス Ia 分子の発現量をシグナル配列の産生を指標に監視するのに役立っている[18]。HLA-G は胎盤に発現しており、母体の免疫系細胞に対して抑制性のシグナルを入れることにより、妊娠の維持に関与すると考えられている[19]。HLA-E や HLA-G はマウスに存在しないが、HLA-E には *Qa-1*[20]、HLA-G には *Qa-2*[21]や *blastocyst* MHC[22]といったマウス特異的 MHC クラス Ib 分子が機能相同分子として候補に挙げられている。HFE はトランスフェリン受容体と結合する MHC クラス Ib 分子であり、腸管からの鉄の吸収を制御し、その機能喪失はヘモクロマトーシスの原因となる[23]。HFE は免疫系以外で機能する代表的な MHC クラス Ib 分子である。CD1d はペプチド結合溝にあたる部分に糖脂質を結合して細胞表面に提示することにより、ナチュラルキラー T 細胞 (NKT 細胞) の活性化を促す[24]。最近、NKT 細胞によって認識される内在性のリガンドとして、イソグロボトリヘキシシルセラミドが同定された[25]。また、ヒトには存在するがマウスには存在しない CD1a, CD1b, CD1c 分子は、ペプチド結合溝にあたる部分にマイコバクテリア由来の糖脂質を結合して、TCR に提示する。IgG 受容体である FCGTRT (neonatal Fc receptor, FcRn) は母乳から新生児への IgG 抗体の受け渡しを行っているほか、Brambell 受容体として血清中の IgG 量を制御する機能をもつ[26]。AZGP1 (Zn- α 2-glycoprotein, ZAG) はペプチド結合溝に脂質を結合しているらしく、脂肪細胞の脂質分解に関与する[27]。PROCR (EPCR) は血管内皮プロテイン C 受容体であり、プロテイン C 凝固制御系の活性を増強する[28]。マウスの MHC クラス Ib 分子である H2-M3 は、アミノ末端がホルミル化された細菌由来のペプチドを選択的に結合し、TCR に提示する[29]。また、同じくマウスの MHC クラス Ib 分子である H2-M10、H2-M1 ファミリーは、鋤鼻器官に発現され、フェロモン受容体と複合体を形成する[30、31]。MR1 (MHC class I-related molecule) は腸管粘膜固有層に局在する特殊な T 細胞である MAIT 細胞 (mucosal-associated invariant T cells) に対して抗原提示を行っていることが示唆されている[32、33]。ヒトの MHC クラス Ib 分子である MIC (MHC class I-related chain) ファミリー (MICA、MICB) は、その遺伝子の転写上流領域に熱ショックエレメントが存在するためストレスにより誘導され、NK 細胞の活性型受容体である NKG2D のリガンドとして NK 細胞を活性化する[34、35]。さらに $\gamma\delta$ T 細胞[36]、CD8⁺ $\alpha\beta$ T 細胞を活性化[35]することから、自然免疫系にお

いて重要な MHC クラス Ib 分子である。マウスやラットでは、ヒトの MIC ファミリーに対応する分子が欠落しており、RAE-1 および H60 が NKG2D のリガンドとして機能している[37]。

以上のように多様な機能を持つ MHC クラス Ib 分子であるが、HFE や AZGP1 のように、免疫系とは無関係と思われる分子が MHC クラス I フォールドをもっていることは、MHC クラス I フォールドが多目的に転用可能な融通のきく構造であることの現れである。MHC クラス Ib 遺伝子群の起源は正確には分かっていないが、MHC クラス Ia 遺伝子を起源として遺伝子重複を繰り返した過程で誕生したものと考えられている[38]。

1-8 MHC Class I-like located near the LRC ; MILL

2002 年、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[39] [40]。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（したがって、MHC 領域外）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。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) 解析によれば *Mill1* は新生児の胸腺や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 (図 1-5)、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 の機能相同分子ではないかと推測されていた[39]。しかしながら、マウスでは RAE-1 および H60 が MICA、MICB と同様に NK 細胞受容体 NKG2D のリガンドとして機能するため[37]、MILL は MICA、MICB 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。

1-9 本研究の目的

MILL は生理機能が明らかでないばかりではなく、タンパク質レベルでの解析が一切行われていなかったため、本研究において MILL の生化学的特性の解析を行った。研究開始当時は MILL を発現するマウス細胞が同定されていなかったことから、組換え MILL をマウス培養細胞株に遺伝子導入により発現させたものを用いて生化学的解析を行った。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、細胞表面発現は TAP に依存したペプチドとの結合を必要としないことを初めて明らかにした。 $\beta 2$ ミクログロブリンと相互作用することや、GPI で細胞膜に結合していることから、MILL1 および MILL2 は MICA/B とは生化学的性質が異なる MHC クラス Ib 分子であることが示された。また、生体内において MILL1 が胸腺髄質細胞および皮膚毛包の内毛根鞘に発現することも明らかにできた。生化学的性質が明らかになっても、依然 MILL の生理機能に関しては不明であったため、MILL のタンパク質構造解析を行うことを計画した。そのためには大量の MILL が必要となるため、本研究においてマウス MILL を大腸菌の封入体として作製し、 $\beta 2$ ミクログロブリンを加えて巻き戻すことに成功したことで、MILL の大量調製が可能になった。

第 2 章 方法

2-1 細胞株および抗体

マウス白血病細胞株である RMA 細胞 (MHC クラス I 分子 H2^b 陽性) およびその TAP2 欠損株 RMA-S 細胞[41]は Karre 博士 (Karolinska Institute、Stockholm、Sweden) より譲渡していただいた。RPMI 1640 培地 (Invitrogen、Carlsbad、CA) に終濃度 10% の非働化ウシ胎児血清 (MP Biochemicals Inc.、OH) を加えたものを培養液として用い、37℃、5% CO₂ の環境下で培養した。ヒト胎児腎臓由来である HEK293S GnTI⁻ (HEK293S 細胞の *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I の機能欠損株) 細胞[42]は Khorana 博士 (Massachusetts Institute of technology、MA) より譲渡していただいた。Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地 (Sigma-Aldrich、Saint Louis、MO) に終濃度 10% の非働化ウシ胎児血清、終濃度 2 mM の L-グルタミン (Invitrogen)、終濃度 0.1 mM の非必須アミノ酸 (Invitrogen) を加えたものを培養液として用い、37℃、5% CO₂ の環境下で培養した。

ウエスタンブロット法およびフローサイトメトリーのための一次抗体として、抗 FLAG モノクローナル抗体 (クローン M2、F3165) は Sigma-Aldrich、抗マウス β 2 ミクログロブリンヤギポリクローナル抗体 (sc-8361) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz、CA) より購入した。抗マウス H2-K^b モノクローナル抗体 (クローン AF6-88.5) および抗マウス CD45 モノクローナル抗体 (クローン 30-F11) は BD PharMingen (San Diego、CA) より購入した。蛍光流動法に用いた二次抗体として、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate; FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG F(ab)₂

(IM0819) は Beckman Coulter (Fullerton、CA)、FITC 標識ブタ抗ウサギ Ig F(ab)₂ フラグメント (F0054) は DakoCytomation (Glostrup、Denmark) より購入した。ウエスタンブロット法の二次抗体として、西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) 標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (NA931)、HRP 標識モルモット抗ウサギ IgG 抗体 (NA934) は Amersham Biosciences (Piscataway、NJ)、HRP 標識モルモット抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2056) は Santa Cruz より購入した。免疫染色用の抗体としては、一次抗体として抗ヒトサイトケラチンモノクローナル抗体 AE1/AE3 (M1590) および抗ヒト毛幹サイトケラチンモノクローナル抗体 AE13 (ab16113) をそれぞれ DakoCytomation および Abcam (Cambridge、UK) から、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (A11001)、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (A11072) を Molecular Probes (Leiden、Netherlands) より購入した。フローサイトメトリーに用いたアイソタイプコントロールとしては、マウス IgG (PP100) は Chemicon International Inc. (Temecula、CA) より、正常ウサギ血清 (CL1000) は Cedarlane Laboratory Ltd. (Ontario、Canada) より購入した。抗マウス MILL1 抗血清および抗マウス MILL2 抗血清は後で述べる方法により作製した。

2-2 抗 MILL 抗血清の作製

マウス *Mill1* およびマウス *Mill2* の $\alpha 1$ ドメインから $\alpha 3$ ドメインを pQE30 ベクター (QIAGEN、Hilden、Germany) に組み込んだ。まずマウス *Mill* の $\alpha 1$ から $\alpha 3$ ドメインにかけてのデオキシリボヌクレオチド核酸 (deoxyribonucleic acid; DNA) 断片を得るために、BALB/c マウス由来 *Mill* 相補鎖 DNA (complementary DNA; cDNA) [39] を鋳型として、以下のプライマーによりポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法で増幅した。用いたプライマーセットは、*Mill1* は 5'-TTGCGAGCTCCACACTCTGCGCTATGACCT-3' (*SacI* 認識部位を含む) および 5'-CCCAAGCTTATATTGTGGTTGCCGTGCTT-3' (*HindIII* 認識部位を含む)、*Mill2* は 5'-GTGGATCCACCCACACTCTGCGCTATAA-3' (*BamHI* 認識部位を含む) および 5'-CCCAAGCTTCATCCTGACTGTCCTCAGCA-3' (*HindIII* 認識部位を含む) である。PCR 産物は、*Mill1* 断片については *SacI* および *HindIII*、*Mill2* 断片については *BamHI* および *HindIII* を用いてアミノ末端にヒスチジンタグ (6 \times His) が付加するように pQE ベクターに挿入し、これを発現ベクターとした (図 2-1)。両発現ベクターの DNA 配列を解析して変異のないことを確認し、大腸菌 M15 株に形質転換し、37 $^{\circ}$ C で対数増殖期まで増殖したもののについて終濃度が 1 mM になるようにイソプロピル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノシド (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside; IPTG) を培地に加えて組換え MILL の発現を誘導した。組換え MILL の精製は QIAGEN の提供する方法に従った。細胞を回収し、緩衝液 B (100 mM リン酸二水素ナトリウム、10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris(hydroxymethyl) aminomethane; Tris) -塩酸、6 M グアニジン塩酸塩、pH 8.0) に溶解し、室温下 10,000 \times g で 20 分間遠心分離した。上清にニッケル-ニトロソ三酢酸 (nitrilotriacetic acid; NTA) 樹脂を加え、ゆるやかに攪拌した。この混合液を空カラムに詰め、緩衝液 C (100 mM リン酸二水素ナトリウム、10 mM Tris-塩酸、6 M グアニジン塩酸塩、pH 5.9) で二回洗浄した。樹脂に結合したタンパク質は緩衝液 D (100 mM リン酸二水素ナトリウム、10 mM Tris-塩酸、6 M グアニジン塩酸塩、pH 4.5) で溶出し、溶出画分について調製用ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) を行い、組換え MILL を回収して濃縮した。ウサギへの免疫は HOKUDO (Sapporo, Japan) に委託した。免疫は精製した組換え MILL を完全フロイントアジュバントと混合し、ウサギに注射することで行った。2、4、および 6 週間後に同量の組換え MILL を不完全フロイントアジュバントと共に注射した。さらに一週間後に最後の増強を行い、全血を回収して血清を調製し、これを抗血清とした。

2-3 哺乳細胞発現ベクターの作製

安定発現株作製のために、pFLAG-CMV3 ベクター (Sigma Aldrich) に *Mill* の DNA 断片を組み込んだ。シグナル配列およびエキソン 2 配列を除くマウス *Mill1* および *Mill2* の DNA 断片は、*Mill* の cDNA[39]を鋳型として PCR 法により増幅することで得た。用いたプライマーセットは、*Mill1* が 5'-CCAAGCTTGAACCCACACTCTGCGCTA-3' (*Hind*III 認識部位を含む) と 5'-GTGGATCCCTACCAACACTGTAGAAAAGAGC-3' (*Bam*HI 認識部位を含む)、*Mill2* が 5'-CCAAGCTTACCCACACTCTGCGCTATAA-3' (*Hind*III 認識部位を含む) と 5'-GTGGATCCTCAGTTGGCTCTGGCCAGTG-3' (*Bam*HI 認識部位を含む) である。増幅した DNA 断片は *Hind*III および *Bam*HI で切断後、同じく *Hind*III および *Bam*HI で切断した pFLAG-CMV-3 ベクターに挿入した。このベクターは発現タンパク質のアミノ末端にプレプロトリプシンシグナル配列および FLAG タグ(DYDDDDK) が付加される。このようにして作製した発現ベクターはそれぞれ MILL1-pFLAG-CMV-3 および MILL2-pFLAG-CMV-3 と名づけた (図 2-2)。両発現ベクターは DNA 配列を解析して変異のないことを確認し、Endofree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) により精製したものを遺伝子導入に使用した。

哺乳類培養細胞における組換え MILL の分泌発現のために、pLEX ベクターに *Mill* の DNA 断片を組み込んだ。マウス *Mill1* および *Mill2* のシグナル配列から $\alpha 3$ ドメインまでの DNA 断片は、*Mill* の cDNA[39]を鋳型として PCR 法により増幅することで得た。用いたプライマーセットは、*Mill1* が 5'-CGGAATTCCGATGCTGCTGTCCAGGAACCTCAGA-3' (*Eco*RI 認識部位を含む) と 5'-CGGAATTCCGCTAATGGTGATGGTGATGATGATTGATATTGTGGTTGCCGTG-3' (*Eco*RI 認識部位およびヒスチジンタグを含む)、*Mill2* が 5'-CGGAATTCCGATGAAAGCCAGTTCTGGAAAGCCC-3' (*Eco*RI 認識部位を含む) と 5'-CGGAATTCCGTCAATGGTGATGGTGATGATGCATGATGCTATGGTTGCCATG-3' (*Eco*RI 認識部位およびヒスチジンタグを含む) である。pLEX ベクターは Aricescu 博士 (University of Oxford, Oxford, UK) から譲渡していただいた。増幅した DNA 断片は *Eco*RI で切断後、同じく *Eco*RI で切断した pLEX ベクターに挿入した。このベクターは発現タンパク質のカルボキシル末端にヒスチジンタグが付加される。このようにして作製した発現ベクターはそれぞれ MILL1-pLEX および MILL2-pLEX と名づけた (図 2-3)。両発現ベクターは DNA 配列を解析して変異のないことを確認し、Endofree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) により精製したものをさらにフェノールクロロホルム処理して遺伝子導入に使用した。

2-4 安定発現株のへの遺伝子導入

マウス MILL を安定発現する細胞株を樹立するため、RMA 細胞および RMA-S 細胞に、*ScaI* でリニア化した MILL1-pFLAG-CMV-3 および MILL2-pFLAG-CMV-3 を電気穿孔法で導入した。電気穿孔法は BioRad (Hercules, CA) の Gene Pulser II を用い、0.5 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline; PBS) (pH 7.4) に懸濁した 2×10^7 個の細胞に 24 μ g のプラスミドを加え、250 V \cdot 950 μ F の条件で行った。電気穿孔から 48 時間後にジェネティシン 418 (geneticin 418; G418) を RMA 細胞では終濃度 600 μ g/ml、RMA-S 細胞では終濃度 800 μ g/ml になるように加え、限界希釈放により G418 耐性細胞の単一クローンを複数得た。抗 FLAG 抗体および抗 MILL 抗血清を用いたウエスタンブロット法およびフローサイトメトリーにより、クローンそれぞれにおける MILL の発現量を評価し、それぞれ高発現クローンについて RMA-MILL1 細胞、RMA-MILL2 細胞、RMA-S-MILL1 細胞、RMA-S-MILL2 細胞と名づけ、後の実験に用いた。

2-5 ウエスタンブロット法

1×10^8 個の細胞を氷冷 PBS (pH 7.4) で洗浄し、氷冷した 1 ml の溶解緩衝液 (50 mM Tris-塩酸、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; EDTA)、150 mM 塩化ナトリウム、1% Triton X-100、0.2 mM フッ化 4-(2-アミノエチル)-ベンジルスルホニル塩酸塩 (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride; AEBSF)、20 μ M ロイペプチン、1 μ M ペプスタチン、pH 7.5) で 30 分、4°C の処理で溶解した。細胞核や不溶性画分を除くため、溶解液は 13,000 \times g、10 分、4°C の遠心処理を行った。遠心上清は SDS サンプル緩衝液 (50 mM Tris-塩酸、2% SDS、6% 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール、pH 6.8) 中で 95°C、10 分の変性処理を行い、12% アクリルアミド濃度の SDS-PAGE により分離した。分離終了後のゲルからポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride; PVDF) 膜への転写は、セミドライ式ブロッティング装置 Transblot SD cell (BioRad) を用いて 15V、室温で 45 分を行った。転写後の PVDF 膜は 5% スキムミルクもしくは 3% ウシ血清アルブミンを含む PBS-T (0.1% ポリオキシレン(20)ソルビタンモノラウレート含有 PBS) によるブロッキング処理を室温で 1 時間行った。PBS-T に希釈した 500 倍希釈の抗血清もしくは 1 μ g/ml の一次抗体を室温で 1 時間処理し、PBS-T による二回の洗浄後に 25000 倍希釈の HRP 標識二次抗体と室温で 1 時間反応させた。PBS-T による三回の洗浄の後、ECL

Plus (Amersham Biosciences) もしくは Super Signal West Dura (Pierce, Rockford, IL) による発色を行い、LAS-1000mini (FUJIFILM, Minamiashigara, Japan) を用いて化学発光を検出した。

2-6 フローサイトメトリーによる細胞表面発現解析

細胞表面のタンパク質発現を解析するため、フローサイトメトリー法による解析を行った (図 2-4)。 1×10^6 個の細胞を氷冷 PBS (pH 7.4) で洗浄し、一次抗体もしくは抗血清を、終濃度 0.01% のアジ化ナトリウムを含む PBS (pH 7.4) 中で 30 分間反応させた。氷冷 PBS (pH 7.4) での洗浄の後、FITC 標識した抗体 F(ab)₂ フラグメントを、終濃度 0.01% のアジ化ナトリウムを含む PBS (pH 7.4) 中で 30 分間反応させた。細胞を氷冷 PBS (pH 7.4) で洗浄し、0.5 ml の PBS (pH 7.4) に懸濁し、EPICS ALTRA (Beckman Coulter) を用いて細胞の蛍光強度を測定した。データは EPICS ALTRA 付属の EXPO32 ソフトウェアにより解析した。

2-7 糖鎖解析

1×10^8 個の RMA-MILL1 細胞および RMA-MILL2 細胞について 2-5 の方法で溶解液を調製した。溶解液にプロテイン G-セファロースビーズ (Amersham Biosciences) を加えて 4°C で 1 時間の前処理を行った。遠心によりビーズを取り除いた上清に、新たに抗 FLAG 抗体を結合させたプロテイン G-セファロースビーズを加え、4°C で 1 時間の反応を行った。溶解緩衝液で 4 回洗浄した後、ビーズに吸着したタンパク質は 0.1 M グリシン-塩酸 (pH 3.0) で溶出し、これをただちに 0.1 M Tris-塩酸 (pH 9.0) で中和した。溶出したタンパク質は熱および界面活性剤 Nonidet-P40 により変性させ、ペプチド:N-グリカナーゼ F (peptide:N-glycosidase F; PNGase F, New England BioLabs, Beverly, MA) を加え 37°C で 18 時間の脱糖鎖反応を行い、これをウェスタンブロット法により解析した。

2-8 ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PI-PLC) 処理

RMA-MILL1 細胞および RMA-MILL2 細胞を PBS (pH 7.4) で洗浄し、PBS (pH 7.4) 中で 1 U/ml の PI-PLC (Sigma-Aldrich) を 37°C で 1 時間反応させた。反応後に細胞を

氷冷 PBS で洗浄し、抗 FLAG 抗体および抗 H2-K^b 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、それぞれの細胞について MILL と H2-K^b の細胞表面発現を解析した。

2-9 MILL 細胞表面発現と TAP 依存性を調べる実験

RMA-MILL1 細胞と RMA-MILL2 細胞、およびそれぞれの TAP2 欠損体である RMA-S-MILL1 細胞および RMA-S-MILL2 細胞について、37℃および 25℃で 18 時間培養した。それぞれの 1×10^6 個の細胞について、抗 FLAG 抗体および抗 H2-K^b 抗体を用いたフローサイトメトリーにより、それぞれの細胞について MILL と H2-K^b の細胞表面発現を解析した。

2-10 β 2 ミクログロブリンとの結合解析

細胞表面に発現している MILL と β 2 ミクログロブリンとの相互作用を調べるため、 1×10^8 個の RMA-MILL1 細胞および RMA-MILL2 細胞を PI-PLC 処理した。細胞を遠心除去し、上清画分について抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、抗 β 2 ミクログロブリン抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

2-11 細胞表面の酸処理

RMA-MILL1 細胞と RMA-MILL2 細胞を PBS (pH 7.4) で洗浄し、グリシン-塩酸緩衝液中 (pH 3.0) に懸濁し 4℃で 2 分静置させ、すぐに通常の培地に戻し、さらに新規に合成された膜タンパク質の輸送を停止させるためブレフェルジン A (brefeldin A; BFA) を加えて 6 時間培養した。それぞれの 1×10^6 個の細胞について、抗 FLAG 抗体および抗 H2-K^b 抗体を用いたフローサイトメトリーを行い、H2-K^b および MILL の細胞表面発現を解析した。

2-12 哺乳類培養細胞における組換え MILL の分泌発現

15 cm ディッシュに 90%コンフルエントになるように HEK293S GnTI⁻細胞を用意した。MILL1-pLEX および MILL2-pLEX を DMEM 培地中でポリエチレンジイミン (Sigma-Aldrich) と混合し、室温で 5 分間静置して DNA-ポリエチレンジイミンの複合

体を形成させた。ディッシュの細胞から培養液を取り除き、DNA-ポリエチレンイミン複合体を加えた。3 時間後に DNA-ポリエチレンイミン複合体を取り除き、2%のウシ血清アルブミンを含有した DMEM 培地に置き換えて 4 日間培養を続けた。培養上清をろ過して細胞塊を取り除き、10×結合緩衝液 (500 mM リン酸二水素ナトリウム、1.5 M 塩化ナトリウム、100 mM イミダゾール、pH 8.0) を 10 分の 1 量加えたものを 0.22 μ m のフィルターに通した。ニッケル-NTA 樹脂を詰めたカラムに通してヒスチジンタグ付タンパク質を吸着させ、1×結合緩衝液 (50 mM リン酸二水素ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、10 mM イミダゾール、pH 8.0) による洗浄を行った後、溶出緩衝液 (50 mM リン酸二水素ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、500 mM イミダゾール、pH 8.0) による溶出を行った。15%アクリルアミドの SDS-PAGE およびクマシーブリアントブルーR250 (coomassie brilliant blue; CBBR) 染色により目的タンパク質の精製を確認した。

2-13 大腸菌を用いた組換え MILL 大量調製のための発現ベクターの作製

マウス *Mill1* および *Mill2* の α 1 ドメインから α 3 ドメインまでの DNA 断片は、*Mill* の cDNA[39]を鋳型として PCR 法により増幅することで得た。マウス β 2 ミクログロブリンの DNA 断片は、BALB/c マウス成体由来 cDNA を鋳型として PCR 法により増幅することで得た。用いたプライマーセットは、*Mill1* が 5'-TACTATTAATGGACAACCAAAGACTGGTGGC-3' (*Psh*BI 認識部位を含む) と 5'-ATGAAAGCTTCTATTAGGCAGCAGGTTCATTGA-3' (*Hind*III 認識部位を含む)、*Mill2* が 5'-TACTATTAATGTCCAGCATCCAAGGAACC-3' (*Psh*BI 認識部位を含む) と 5'-ATGAAAGCTTCTATTAGACAGCTGTCTGCATGATGC-3' (*Hind*III 認識部位を含む)、 β 2 ミクログロブリンが 5'-TACTATTAATGATCCAGAAAACCCCTCAAATTC-3' (*Psh*BI 認識部位を含む) と 5'-ATGAAAGCTTCTATTACATGTCTCGATCCCAGTAGACG-3' (*Hind*III 認識部位を含む) である。増幅した DNA 断片は *Psh*BI および *Hind*III で切断後、*Nde*I および *Hind*III で切断した pGMT7 ベクターに挿入した。このようにして作製した発現ベクターはそれぞれ MILL1-pGMT7、MILL2-pGMT7 および β 2m-pGMT7 と名づけた(図 2-5)。それぞれの発現ベクターは DNA 配列を解析して変異のないことを確認し、大腸菌 BL21 (DE3)pLysS 株に形質転換し、37°C で対数増殖期まで増殖したもののについて終濃度が 1 mM になるように IPTG を培地に加えて組換え MILL の発現を誘導した。細胞を回収して懸濁緩衝液 (20 mM Tris-塩酸、100 mM 塩化ナトリウム、pH 8.0) に懸濁し、氷上で超音波破碎を行った。10,000 \times g、4°C で 15 分間遠心分離し、沈殿を洗浄緩衝液 (20 mM Tris-塩酸、100 mM 塩化ナトリウム、1% Triton X-100、pH 8.0) で洗

浄し、 $10,000 \times g$ 、 4°C で15分間遠心分離したときの沈殿を封入体画分として回収した。封入体はグアニジン緩衝液(50 mM Tris-塩酸、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM EDTA、6 M グアニジン塩酸塩、pH 8.0)を加え 4°C で一晩攪拌処理をすることで溶解し、これを変性画分として巻き戻しに用いた。

2-14 巻き戻し法による MILL の調製

6 M グアニジン緩衝液に溶解した変性 $\beta 2$ ミクログロブリン 5 μmol について、1 L の希釈緩衝液 (100 mM 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid; HEPES)-水酸化ナトリウム、1 M L-アルギニン、6.5 mM システアミン、3.7 mM シスタミン、pH 7.0) への希釈法により 4°C で1時間の攪拌を行った。この溶液を用いてさらに変性MILL1(1 μmol)を希釈法により巻き戻した(図 2-6)。 4°C で二日間攪拌したものを、VIVAFLOW システムを用いて10 ml まで濃縮し、HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade、Amersham Biosciences) によるゲルろ過クロマトグラフィーを行った。溶出液の組成は 20 mM Tris-塩酸 (pH 8.0) ならびに 100 mM 塩化ナトリウムで、流速は 2.5 ml/min で行った。溶出画分について 12.5%アクリルアミド濃度の SDS-PAGE および CBBR 染色を行い、MILL1 と $\beta 2$ ミクログロブリンの複合体が溶出した画分を決定した。この画分を 20 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0) により透析後、Resource Q カラム (Amersham Biosciences) に吸着させ、A 液 (20 mM Tris-塩酸 pH 8.0) ならびに B 液 (20 mM Tris-塩酸、1 M 塩化ナトリウム、pH 8.0) を用い、0%から 100%までの B 液濃度の直線的勾配 (0 から 1 M までの塩化ナトリウム勾配) による陰イオン交換クロマトグラフィーを、流速 0.5 ml/min で行った。溶出画分のうち鋭利な単一ピークを回収し、15%アクリルアミド濃度の SDS-PAGE および CBBR 染色により MILL1 の精製を確認した。

MILL2 の巻き戻し方法は、基本的に MILL1 の方法と同様であるが、希釈緩衝液の組成が異なる (200 mM Tris-塩酸、1 M L-アルギニン、6.5 mM システアミン、3.7 mM シスタミン、pH 8.0) こと、透析液に 20 mM Tris-塩酸 (pH 9.0) を用いたこと、そして Resource Q からの溶出における A 液と B 液の組成が異なること (A 液; 20 mM Tris-塩酸、pH 9.0、B 液; 20 mM Tris-塩酸、1 M 塩化ナトリウム、pH 9.0) が、MILL1 の巻き戻し法との相違点である。

2-15 免疫染色

免疫染色による MILL1 の検出は、北海道大学大学院医学研究科の馬場智久博士との

共同研究として行った。3 日齢もしくは 10 日齢の BALB/c マウスから単離した胸腺および皮膚の組織切片について氷冷アセトンで固定し、抗 MILL1 抗血清もしくは抗ケラチン抗体と反応させた。二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体もしくは Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて蛍光標識を行い、蛍光顕微鏡（ECRIPS E600、NIKON、Tokyo、Japan）で観察した。

2-16 胸腺髄質細胞の単離

マウス胸腺髄質細胞における MILL1 の検出は、北海道大学大学院医学研究科の外丸詩野講師、近畿大学医学部免疫学教室の宮澤正顕教授ならびに河原佐智代講師との共同研究として行った。胸腺は 4 週齢の C57BL/6 マウスおよび $\beta 2$ ミクログロブリンノックアウトマウスから単離した。 $\beta 2$ ミクログロブリンノックアウトマウスは近畿大学免疫学教室が The Jackson Laboratory から購入した B6.129P2-*B2mtm1*UndJ (stock no. 002087) の子孫を用いた。胸腺髄質細胞の単離は、まずそれぞれのマウスより単離した胸腺の断片をコラゲナーゼ D および DNase I（どちらも Roche Diagnostics、Basel、Switzerland）で 37°C 15 分間の処理を行った。この操作を三回繰り返し、細胞を集めて抗マウス CD45 モノクローナル抗体で染色した。胸腺髄質細胞を含む CD45 陰性の細胞群について、抗 MILL1 抗血清を用いたフローサイトメトリーより MILL1 の発現を解析した。

第3章 結果

3-1 MILL安定発現細胞株および抗MILL抗血清の樹立

本研究を開始した時点で、MILLをタンパク質レベルで有意に発現するマウス細胞は細胞株・生体細胞ともに発見されていなかった。そこで生化学的な解析を行うにあたり、マウスTリンパ腫由来細胞株であるRMA細胞およびRMA-S細胞に、アミノ末端にFLAGタグ（DYKDDDDK）を連結したマウスMILL1およびMILL2を発現する遺伝子の組み込みを行った。電気穿孔法により遺伝子導入した細胞から、G418を添加した培地で長期（三週間以上）生存を続けることが可能になったクローンを選択した。動物細胞に導入したプラスミドはその細胞内では増殖しないため、細胞分裂が進んでも生存が可能なクローンは、染色体中にプラスミド由来の遺伝子が組み込まれたものである可能性が高い。このような細胞についてMILLの発現を確認する実験を行った。抗FLAG抗体および抗MILL抗血清を用いたウェスタンブロット解析の結果を図3-1に示した。RMA-MILL1細胞について、抗FLAG抗体により48 kDaおよび41 kDaの二つの主たるバンドが検出された。41 kDaのバンドは遺伝子導入を行っていないRMA細胞でも検出されたため、非特異的に染色されたバンドと考えられる。48 kDaのバンドに加えて、44 kDaのマイナーバンドが抗MILL1抗血清による染色で確認された。これらのバンドは抗MILL2抗血清では染色されなかった。44 kDaのバンドが抗FLAG抗体で確認できなかったことについては、今回の実験において抗FLAG抗体による検出感度が抗MILL1抗血清を下回ったためであると考えられる。RMA-MILL2細胞では抗FLAG抗体により43 kDaおよび41 kDaのバンドが出現し、これは抗MILL2抗血清により確認されたが、抗MILL1抗血清では染色されなかった。抗FLAG抗体で染色される41 kDaの非特異的バンドがあることから、RMA-MILL2細胞で観察された41 kDaのバンドは、MILL2のシグナルと非特異的なシグナルの両方の重なったバンドであると考えられる。このようなRMA細胞での結果は、RMA-S細胞でも同様に得られた。

3-2 MILL1およびMILL2は細胞表面に発現する

RMA-MILL1細胞およびRMA-MILL2細胞について、抗FLAG抗体および抗MILL抗血清を用いたフローサイトメトリーにより細胞表面発現を解析した結果、それぞれの細胞表面でMILLの発現が確認された（図3-2）。このことから、MILL1およびMILL2はアミノ末端が細胞の外側になるように細胞膜上に発現するタンパク質であることが明らかになった。

3-3 MILL1およびMILL2はN型糖鎖の付加したタンパク質である

遺伝子配列から予測されるMILL1およびMILL2のアミノ酸配列から、アスパラギン *N*結合型糖鎖 (*N*型糖鎖) が付加する可能性をもつ部位がそれぞれ三箇所存在すると予測されていた[39]。MILLに対する糖鎖付加の有無を調べるため、MILLを脱糖鎖酵素処理する解析を行った。RMA-MILL1細胞およびRMA-MILL2細胞の溶解液について、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降法によりMILL1およびMILL2を精製した。精製したMILL1およびMILL2は、タンパク質の*N*型糖鎖をアスパラギンから切除する酵素であるPNGase Fで処理し、その反応後産物について抗MILL抗血清を用いたウェスタンブロット法により解析した(図3-3)。酵素処理をしていないMILL1からは44 kDaおよび48 kDaの二本のバンドが検出されたが、酵素処理後のMILL1からは38 kDaのバンドが観察された。同様に、酵素処理をしていないMILL2からは41 kDaおよび43 kDaの二本のバンドが検出されたが、酵素処理後のMILL2からは35 kDaのバンドが観察された。安定発現株の作製に用いた発現ベクターMILL1-pFLAG-CMV-3およびMILL2-pFLAG-CMV-3によりコードされたFLAGタグ付MILLの予想分子量はMILL1が39 kDa、MILL2が35 kDaである。つまり、脱糖鎖酵素処理をして糖鎖を除いた後の分子量は、遺伝子配列から予測されるアミノ酸から計算した理論値と比較して、妥当な値であるといえる。以上の結果より、MILL1およびMILL2は*N*型糖鎖の付加した糖タンパク質であることが明らかになった。

3-4 MILL1およびMILL2はGPIアンカー型タンパク質である

MILL1およびMILL2は一回膜貫通領域をもつ膜貫通型タンパク質と考えられていた[39]。しかしながら、配列解析によりMILL1およびMILL2がGPIアンカー型タンパク質である可能性も示唆された。この可能性について調べるため、PI-PLC処理による解析を行った。PI-PLCはGPIを特異的に認識して切断する酵素であり、この酵素で細胞表面を処理することで細胞表面のGPIは切断され、その結果としてGPIアンカー型タンパク質は細胞表面から遊離する。この作用を利用して、RMA-MILL1細胞およびRMA-MILL2細胞をPI-PLCで処理し、洗浄後に抗FLAG抗体によるフローサイトメトリーを行い、未処理細胞に対するMILLの細胞表面発現量の変化を解析した(図3-4)。MILLがGPIアンカー型タンパク質であればPI-PLCによりGPIを切断されるため、細胞表面の発現量が減少するはずである。実際、RMA-MILL1細胞およびRMA-MILL2細胞のどちらにおいても、細胞表面の抗FLAG抗体による染色量は大きく減少した。GPIアンカー型ではなく一回膜貫通型のMHCクラスI分子であるH2-K^bの細胞表面発現量を抗H2-K^b抗体による染色で観察したところ、発現量の変化は見られなかった。以上の結果から、MILL1およびMILL2はどちらもGPIアンカー型の膜タンパク質であることが

明らかになった。

3-5 MILLの細胞表面発現はTAPに依存しない

RMA-S細胞はRMA細胞と同じ細胞由来であるが、TAP輸送体を構成するTAP2サブユニットの欠損により小胞体内腔へのペプチド輸送機能が失われた細胞株である[43、44]。RMA-S細胞では細胞質で生産されたペプチドが小胞体に輸送されないため、MHCクラスIa分子や、ペプチドを結合するタイプのMHCクラスIb分子は、それらの $\alpha 1$ ドメインおよび $\alpha 2$ ドメインで形成される溝にペプチドが結合できない。このようなMHCクラスI分子の細胞表面における発現量はRMA細胞に比べて大きく減少する。しかしながら、この細胞を通常の37°Cよりも低い温度（例えば25°C）で培養した場合は、MHCクラスI分子の細胞表面での発現量が回復することが明らかになっている[45]。これらの現象から、“空の”MHCクラスI分子は熱力学的に構造不安定であると考えられている。このRMA細胞とRMA-S細胞を利用して、あるMHCクラスI分子の細胞表面発現がTAPの機能に依存するかどうかを解析することが可能であり、TAP依存性の有無から内在性ペプチドと結合するかどうかを推測できる。

そこで本研究において、MILLがRMA-S細胞表面に発現するかどうかを調べることで、MILLのTAP依存性を明らかにし、ペプチドの結合の有無を推察することを試みた。RMA-MILL1細胞、RMA-MILL2細胞、RMA-S-MILL1細胞、およびRMA-S-MILL2を37°Cおよび25°Cで培養し、それぞれについて抗FLAG抗体および抗H2-K^b抗体によるフローサイトメトリー解析を行い、MILLおよびH2-K^b分子の細胞表面発現を評価した（図3-5）。予想された通り、MHCクラスIa分子であるH2-K^b分子の細胞表面発現量は、37°CではRMA-S細胞においてRMA細胞のそれよりも低く、25°Cでは回復した。これに対し、MILL1およびMILL2のRMA-S細胞における発現量は、25°Cと37°Cでほとんど変化がなかった。この結果から、MILL1およびMILL2の細胞表面発現は、TAPに依存しないことが明らかになり、両分子とも内在性のペプチドと結合しない可能性が示唆された。

3-6 MILL1およびMILL2は $\beta 2$ ミクログロブリンと結合している

MILL1およびMILL2が $\beta 2$ ミクログロブリンと結合しているかどうかを解析するため、MILLの免疫沈降の実験を行った。RMA-MILL1細胞およびRMA-MILL2細胞の表面をPI-PLCで処理し、上清に遊離したMILL1およびMILL2について、プロテインGを介して抗FLAG抗体を結合させたセファロースビーズによる免疫沈降を行った。ビーズに吸着したタンパク質はSDS-PAGEを行い、抗FLAG抗体および抗 $\beta 2$ ミクログロブリン抗

体によるウェスタンブロット解析を行った（図3-6）。抗FLAG抗体による検出により、MILL1およびMILL2が抗FLAG抗体による免疫沈降により精製されたことが示された。同時に $\beta 2$ ミクログロブリンが検出されたことから、抗FLAG抗体によりMILL1およびMILL2と $\beta 2$ ミクログロブリンが共沈したことから、つまり、MILL1およびMILL2が細胞表面上で $\beta 2$ ミクログロブリンと結合した状態で存在していることが明らかになった。

3-7 MILL1の発現は細胞表面の酸処理に影響を受けた

MHC クラス Ia 分子には $\beta 2$ ミクログロブリンおよびペプチドが結合している。これらの結合がないと MHC クラス Ia 分子はおそらく熱力学的に不安定化し、結果として細胞表面発現が減少する。これは細胞表面への到達量の低下および細胞表面からのエンドサイトーシス等による除去量の増加が考えられる。後者の可能性について、細胞表面に発現している MHC クラス Ia 分子について、細胞表面を酸処理することにより能動的にペプチドおよび $\beta 2$ ミクログロブリンを解離させたとき、MHC クラス Ia 分子の細胞表面における発現量が顕著に低下するという実験が良く知られている[46]。この実験事実を応用し、細胞表面を酸処理することにより、ある MHC クラス I 分子の細胞表面発現が、ペプチドや $\beta 2$ ミクログロブリンなどの、MHC クラス I 分子の安定化に影響を与え得る分子に依存するかどうかを推察することができる。

そこで MILL1 および MILL2 が細胞表面の酸処理により発現量に影響を受けるかどうかを調べるため、RMA-MILL1 細胞および RMA-MILL2 細胞を、4℃において pH 3.0 のグリシン-塩酸緩衝液により短時間の酸処理をした。処理後はすぐに終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ の BFA を含む培地で培養し、新規に合成される膜タンパク質が細胞表面に到達できないようにした。6 時間後、それぞれについて抗 FLAG 抗体および抗 H2-K^b 抗体によるフローサイトメトリ解析を行い、MILL および H2-K^b 分子の細胞表面発現を評価した（図 3-7）。予想された通り、MHC クラス Ia 分子である H2-K^b 分子の細胞表面発現量は、酸処理+BFA 処理により、そうでない場合に比べて顕著に低下した。MILL1 は、H2-K^b と比較すると割合は低いものの、若干の発現低下が認められた。MILL2 の発現量はほぼ影響を受けなかった。MILL1 および MILL2 はペプチドと結合している可能性は低いものの、 $\beta 2$ ミクログロブリンと結合しているため、MILL1 は $\beta 2$ ミクログロブリンを解離して不安定化した可能性が考えられる。MILL2 については、MILL1 とは逆に $\beta 2$ ミクログロブリンを解離しても細胞表面に留まり得る可能性が示された。

3-8 ヒト細胞で発現させたマウス MILL は単量体であった

MILL の機能・構造解析を進める上で、立体構造の決定を行い、機能の類推に応用することが有効であると考えられた。そこで MILL の立体構造情報を得るために、X 線結晶構造解析に取り組むことを計画した。しかしながら、結晶構造解析には多くの場合において大量（1 mg 以上）のタンパク質が必要であるため、まずは哺乳類培養細胞を用い、大量調製を目指した可溶型 MILL の分泌発現を試みた。

構造解析を目指した組換えタンパク質の大量生産が可能なマウス培養細胞はほとんど報告がない。そこで、本研究ではヒト胎児腎由来の HEK293S GnTI⁻細胞を用いた可溶型マウス MILL の生産を試みた。HEK293S GnTI⁻細胞は、ゴルジ体に存在する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I の機能が欠損した細胞株であり、長さは不完全であるが均一な *N* 型糖鎖が付加するために、結晶構造解析を目指した糖タンパク質の生産に使用されている[47]。MILL の結晶構造解析を目指すにあたり、*N* 型糖鎖の不均一性由来する結晶化障害が予想されたため、この細胞を用いて均一な *N* 型糖鎖を持つ可溶型 MILL を培養上清に分泌させることを試みた。マウスとヒトの $\beta 2$ ミクログロブリンはアミノ酸配列の相同性が高く（70%）、多くの場合マウス MHC クラス I 分子とヒト $\beta 2$ ミクログロブリンの結合は可能である[48]。そこで、MILL がヒト $\beta 2$ ミクログロブリンと複合体を形成して培養上清に分泌されることを期待した。

ポリエチレンジイミンによる遺伝子導入後に培養上清を回収し、ヒスチジンタグを利用してニッケル NTA 樹脂による精製を行い、SDS-PAGE で精製を確認した（図 3-8）。その結果、MILL1 および MILL2 は期待されたとおりにイミダゾール溶出画分に含まれていたが、同画分に $\beta 2$ ミクログロブリンは含まれていなかった。これは、ヒト細胞で発現し培養上清に放出されたマウス MILL 分子が、ヒト $\beta 2$ ミクログロブリンと結合せずに単量体として存在していることを示すものであった。

これまでの結果から、MILL1 および MILL2 は $\beta 2$ ミクログロブリンと結合して存在する分子であり（図 3-6）、特に MILL1 は $\beta 2$ ミクログロブリンの非存在下では不安定であることが予想されている（図 3-7）。そこで、ヒト細胞を用いたマウス MILL の分泌発現は不適格であるとし、大腸菌を用いた発現を行うことにした。

3-9 大腸菌を用いて発現させた MILL1 および MILL2 を封入体として回収した

MILL1-pGMT7、MILL2-pGMT7 および $\beta 2m$ -pGMT7 を大腸菌株 BL21(DE3)pLysS に形質転換し、IPTG で誘導することで、大腸菌でのマウス由来タンパク質の発現を促した。IPTG 誘導から 4 時間以内で、MILL1 および $\beta 2$ ミクログロブリンの発現が期待通り誘導された。しかしながら、この時点では MILL2 の発現は確認できなかった（図 3-9）。

$\beta 2$ ミクログロブリンや MHC クラス I 分子内には複数のジスルフィド結合が存在し、

これは天然構造の維持に必須である。しかし大腸菌の細胞内は還元的であるため、立体構造維持にジスルフィド結合が不可欠な外来タンパク質を発現させた場合、天然構造をとることができずに外来タンパク質同士で凝集し、封入体と呼ばれる界面活性剤不溶性の沈殿を生じる。MILL および $\beta 2$ ミクログロブリンも封入体を形成することが予想されたため、回収した大腸菌を超音波で破碎し、界面活性剤による処理で可溶化しない封入体画分を精製した。この画分に含まれるタンパク質について 15%アクリルアミド濃度の SDS-PAGE を行い、CBBR 染色により解析した (図 3-10)。その結果、MILL1、 $\beta 2$ ミクログロブリン、そして MILL2 も封入体画分に回収されており、しかも目的以外のタンパク質の混入はほとんどないことが明らかになった。回収した封入体はグアニジンの変性作用による可溶化を行い、これを変性画分とした。

3-10 封入体からの巻き戻しで MILL1 および MILL2 を得た

大腸菌で発現させた封入体を材料に天然構造をもつ MILL を得るため、希釈法による巻き戻しを行った (図 2-6)。6 M グアニジン緩衝液中で変性している $\beta 2$ ミクログロブリン (5 μmol , 1 ml) を 1 L の希釈緩衝液に希釈することでグアニジンの濃度を薄め、変性作用を低下させることで天然構造への移行を促した。4°C で 1 時間の攪拌処理後、この溶液を用いて今度は変性 MILL1 (1 μmol) を同様に希釈させて天然構造への巻き戻しを促した。これまで明らかになっている結果 (図 3-6) から、天然構造をとった MILL1 は、 $\beta 2$ ミクログロブリンと会合していることが期待される。4°C で 48 時間の攪拌処理後に、溶液を濃縮してゲルろ過クロマトグラフィーによる分画を行ったところ、溶出画分には 280 nm の吸光度において 4 つのピークが検出された (図 3-11)。分子量的に妥当であると思われたピーク 1 からピーク 3 までについて 15%アクリルアミド濃度の SDS-PAGE ならびに CBBR 染色を行い、MILL1 と $\beta 2$ ミクログロブリンが共存しているピーク 2 を回収した (図 3-12)。この画分についてさらに陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、得られた単一ピークを回収した (図 3-13)。再び 15%アクリルアミド濃度の SDS-PAGE を行い、この画分が MILL1 と $\beta 2$ ミクログロブリンの複合体であり、高純度に精製されていることを確認した (図 3-14)。

MILL2 も MILL1 と同様に巻き戻しを行い、ゲルろ過クロマトグラフィー (図 3-15 および図 3-16) および陰イオン交換クロマトグラフィー (図 3-17) による精製を行った。15%アクリルアミド濃度の SDS-PAGE ならびに CBBR 染色により、MILL2 と $\beta 2$ ミクログロブリンの複合体の高純度精製を確認した (図 3-18)。

3-11 MILL1 は胸腺髄質および内毛根鞘に観察された

3日齢のマウス新生児から胸腺を単離し、その切片について抗MILL1抗血清ならびに抗ケラチン抗体による染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、胸腺の髄質細胞が抗MILL1抗血清により染色された（図3-19A）。同様の実験を、3日齢および10日齢のマウスから単離した皮膚について行ったところ、毛包の内毛根鞘が抗MILL1抗血清により染色された（図3-19B）。

3-12 生体内における MILL1 の発現には β 2 ミクログロブリンが必要である

MILLと β 2ミクログロブリンとの相互作用が、生体内でも観察されるかどうかを調べるために、 β 2ミクログロブリンノックアウトマウスを用いた実験を行った。図3-19Aに示したようにMILL1は胸腺髄質に発現するが、 β 2ミクログロブリンノックアウトマウスの胸腺髄質細胞がMILL1を発現するかどうかを調べることで、MILL1の発現における β 2ミクログロブリンの必要性について解析できる。図3-20に、野生型マウスおよび β 2ミクログロブリンノックアウトマウスからそれぞれ単離した胸腺髄質細胞について、抗MILL1抗血清によるフローサイトメトリーを行った結果を示した。野生型マウスの胸腺髄質細胞は抗MILL1抗血清で染色されたのに対して、 β 2ミクログロブリンノックアウトマウスの胸腺髄質細胞は染色されなかった。このことから、生体内におけるMILL1の細胞表面への発現には β 2ミクログロブリンが必要であることが明らかになった。

第4章 考察

4-1 はじめに

MILL は 2002 年に発見された、MHC 領域外にコードされる MHC クラス I ファミリーである。Kasahara ら[39]および Watanabe ら[40]の先行研究において MILL について興味深い知見が得られている。第一に、MILL はすべての哺乳類に存在するわけではなく、マウスとラットには存在するがヒトには存在しないことである。種分化に伴いヒトでは失われた MHC クラス I 分子なのかもしれない。第二に、他の MHC クラス Ib 分子とは異なり、マウス MILL をコードする遺伝子はシグナルペプチドと $\alpha 1$ ドメインの間にエキソンを持つことである。第三に、MILL ファミリーは MHC クラス Ib ファミリーの中では系統分類学的に最も MICA/B ファミリーに近い。そして MILL ファミリーはヒトには存在せず、それと対照的に MICA/B ファミリーを欠くマウスとラットには存在している。そのため MILL はげっ歯類における MICA/B の機能相同分子である可能性が示唆されていた。第四に、*Mill* 遺伝子から予測されるアミノ酸配列は MHC クラス Ia 分子がペプチドを結合する領域によく保存されているアミノ酸が失われていたことから、MILL はペプチドを結合しないことが推測されていた。第五に、RT-PCR 解析の結果、MILL ファミリーはほとんどの成体組織における転写量が多くなく、抗原提示ではない機能を有することが示唆された。第六に、ラットおよびマウスの配列解析から、*Mill* は MHC クラス I ファミリーの中で最も配列保存性の低い遺伝子であった[40]。これは免疫関連遺伝子全体の傾向がそうであることと矛盾しない[49]。これらの要点を踏まえると、MILL は特殊な免疫機能を有している可能性があると考えられる。

4-2 MILL を安定発現する細胞株の樹立

MILL の生化学的性質の研究を行うためにまず必要とされたのが、MILL を発現するマウス細胞株の樹立であった。研究開始当初、生化学的解析が可能なレベルで MILL を発現する細胞は同定されておらず、生体を近似した材料として、マウス MILL1 および MILL2 を安定に発現するマウス培養細胞株を樹立した（図 3-1）。材料に用いたのはタンパク質レベルでマウス MILL を発現していないマウス RMA 細胞と RMA-S 細胞の二種類であった。RMA-S 細胞が RMA 細胞の TAP 機能欠損株であることから、両細胞の組み合わせ使用は MHC クラス I 分子の解析にしばしば使用されてきた。本研究で樹立した四種類の細胞株、RMA-MILL1 細胞、RMA-MILL2 細胞、RMA-S-MILL1 細胞、ならびに RMA-S-MILL2 細胞は、MILL の研究を行う上で、本研究での生化学的解析に用いることが可能であったことはもちろん、今後は細胞生物学的解析にも応用の利く、非常に有用な道具となり得ると考える。

4-3 生体における MILL の発現

北海道大学大学院医学研究科の馬場智久博士らとの共同研究により、MILL1 がマウス胸腺髄質細胞ならびに皮膚毛包の内毛根鞘の限られた部分に発現していることが明らかになった（図 3-19）。特に胸腺での発現は、MILL1 が免疫系で働く可能性を示唆するものである。一方、毛包の内毛根鞘が抗 MILL1 抗血清で染色されたことは予想外の結果であった。MILL の内毛根鞘での発現と機能については不明であるが、毛包は免疫特権の場であることから[50、51]、MILL1 は毛包における免疫特権の確立と維持に関与しているのかもしれない。

一方、MILL2 を発現する細胞については今のところ特定されていない。*Mill2* は調べられた組織について普遍的に低いレベルの転写量を示すが、実際はかなり限定された細胞でのみ発現しているのかもしれない。また、これは *Mill1* にも共通することであるが、何らかの刺激により転写が強く誘導されるのかもしれない。生体内における MILL ファミリーの発現については更に詳細な解析が必要であろう。

4-4 生化学的性質に関する考察 1: GPI アンカー型の膜蛋白質としての MILL

MILL を発現する細胞株を利用してまず明らかになったことは、MILL1 および MILL2 が他の MHC クラス I 分子と同様にアミノ末端を細胞外側に配置して細胞膜に発現するタンパク質であったことである（図 3-2）。その膜存在様式については、予測アミノ酸配列からは他の MHC クラス I 分子のほとんどがそうであるように一回膜貫通領域をもって細胞膜に局在していると考えられていた[39]。しかしながら、実際は MILL1 と MILL2 は膜貫通領域をもたず、GPI で細胞膜外にアンカーされたタンパク質であった（図 3-4）。GPI アンカーを持つ MHC は先例がないわけではなく、Qa-2[52]、RAE-1[37]、および ULBP[53]は GPI 型のタンパク質である。他の GPI アンカー型タンパク質のように、MILL は脂質マイクロドメインに局在して何らかのシグナル伝達系とかかわっているのかもしれない[54、55]。

4-5 生化学的性質に関する考察 2: N型糖タンパク質としての MILL

他の MHC クラス I 分子を含む多くの膜タンパク質がそうであるように、MILL1 および MILL2 も N型糖鎖を有するタンパク質であった（図 3-3）。生体内における糖鎖の役割は非常に広範にわたるが、たとえばタンパク質分子の構造安定化や[56]、タンパ

ク質-タンパク質相互作用の調節などが挙げられる[57]。MILL の *N* 型糖鎖と機能の関係は不明であるが、*N* 型糖鎖の付加しない大腸菌で発現させた後に $\beta 2$ ミクログロブリン存在下で巻き戻した MILL は、糖鎖がないながらも構造を維持していると考えられるため、MILL の *N* 型糖鎖の構造安定への寄与は少ないと思われる。もし MILL が細胞表面受容体として何らかのリガンドと結合するとしたら、その相互作用に関係している可能性があるかもしれない。

4-6 生化学的性質に関する考察 3: MILL とペプチドの関係

MILL1 および MILL2 の細胞表面への発現は TAP の機能に依存しなかった(図 3-5)。これは MILL1 および MILL2 が細胞内タンパク質由来のペプチド断片の非存在下でも細胞表面に発現できることを意味しており、すなわちペプチドと結合していない可能性を示唆するものである。このことは、予測アミノ酸配列レベルで MILL がペプチドとの結合に重要なアミノ酸残基を持たなかったこと[39]と矛盾しない結果となった。さらに、大腸菌で発現させた MILL1 および MILL2 の封入体からの巻き戻しを行った際には $\beta 2$ ミクログロブリンのみ必要であり、ペプチドの非存在下での巻き戻しが成功した(図 3-9 から図 3-18)。大腸菌で発現させた MHC クラス Ia 分子 α 鎖の巻き戻しには $\beta 2$ ミクログロブリンの他にペプチドが必要であること[58]とは対照的な結果である。これらの事実は、MILL ファミリーがペプチド抗原の提示以外の機能を持っている可能性を示唆するものである。

4-7 生化学的性質に関する考察 4: MILL と $\beta 2$ ミクログロブリンの相互作用

予測アミノ酸配列の解析では、MILL1 および MILL2 は MHC クラス Ia 分子が $\beta 2$ ミクログロブリンと相互作用するのに重要な残基の多くが欠落していたことから、 $\beta 2$ ミクログロブリンと結合しないであろうと推測されていた[39]。しかしながら、細胞表面から精製した MILL1 および MILL2 は、共に $\beta 2$ ミクログロブリンと相互作用していた(図 3-6)。この予期せぬ結果は、同じように $\beta 2$ ミクログロブリンとの相互作用に重要なモチーフが存在しないにもかかわらず $\beta 2$ ミクログロブリンと相互作用する MR1 の場合と似ている[59]。

東京大学大学院新領域創成科学研究科の小金井悟博士らとの共同研究により、1) 大腸菌で発現させた MILL の細胞外ドメインの巻き戻しには MILL1 が必須であること、2) MILL2 は $\beta 2$ ミクログロブリン存在下のほうが巻き戻り効率が良いこと、3) 巻き戻った MILL1 および MILL2 と $\beta 2$ ミクログロブリンの比率は 1:1 であること、の三点が明

らかになった(データは示していない)。このことから、 $\beta 2$ ミクログロブリンは MILL の構成要素のひとつであることが示唆される。しかしながら、MILL2 は $\beta 2$ ミクログロブリンの非存在下でも巻き戻ることから、MILL の構造安定性に対する $\beta 2$ ミクログロブリンの要求性は、MILL1 と MILL2 で異なっているとも考えられる。

細胞表面の酸処理による MILL1 および MILL2 の発現量変化に関する実験結果は、この推論を支持するものであった。MHC クラス Ia 分子は、酸処理により $\beta 2$ ミクログロブリンとペプチドが MHC クラス Ia α 鎖から解離し、不安定化を起こして細胞表面上の発現量が低下する[46]。実際、本研究においても、RMA 細胞表面に発現している MHC クラス Ia 分子である H2-K^b 分子は、酸処理により発現量の低下が観察された。そして MILL1 も酸処理により細胞表面上の発現量が若干低下した。しかしながら、同様の処理を行ったにもかかわらず、MILL2 の発現量はほぼ変化が見られなかった(図 3-7)。この結果は、MILL1 の安定化にとっては $\beta 2$ ミクログロブリンの存在が重要であるが、MILL2 は $\beta 2$ ミクログロブリンの非存在下でも安定を保ち得ることを示唆するものかもしれない。MILL2 の細胞表面発現にとって $\beta 2$ ミクログロブリンが必須のものではないとしたら、通常は $\beta 2$ ミクログロブリンと結合する MHC クラス Ib 分子である CD1 分子が、 $\beta 2$ ミクログロブリン非依存的に腸上皮細胞表面に発現するという報告[60]のように、興味深い現象かもしれない。

また、構造解析のために大量の MILL タンパク質を得る目的で、ヒト HEK293S GnTI⁻細胞を用いてマウス MILL1 および MILL2 の $\alpha 1$ ドメインから $\alpha 3$ ドメインまでを可溶性分子として発現させたところ、期待されたとおりに MILL1 および MILL2 共に培養上清に発現した。しかしながら、MILL1 および MILL2 は、どちらも $\beta 2$ ミクログロブリンを結合していなかった(図 3-8)。

多くの場合において MHC クラス I 分子と $\beta 2$ ミクログロブリンのヒト・マウス間での種間交差が観察されているが[48]、もともと種が違うためにマウス MILL とヒト $\beta 2$ ミクログロブリン相互作用しなかったとしても不思議なことではないかもしれない。しかし、MILL1 および MILL2 が $\beta 2$ ミクログロブリンを結合せず単量体として培養上清に存在し得ていることには注目したい。通常、培養上清に可溶性を保ったまま存在し続けることは構造上安定な分子であることを意味するが、 $\beta 2$ ミクログロブリンとの相互作用の必然性が MILL1 に比べて弱いと考えられる MILL2 はともかく、巻き戻しに $\beta 2$ ミクログロブリンを必須とする MILL1 の場合、 $\beta 2$ ミクログロブリンの非存在下で安定な MILL1 が生産されるとは考えにくい。実際、北海道大学大学院医学研究科の外丸詩野講師らとの共同研究において、 $\beta 2$ ミクログロブリンノックアウトマウス由来の胸腺細胞での MILL1 の細胞表面発現が見られなかった(図 3-20) ことから、ヒト細胞で分泌発現させたマウス MILL 分子は、可溶性は獲得しているものの機能的ではない可能性を含んでいるのではないだろうか。それとも、 $\beta 2$ ミクログロブリンを欠く MILL1 は、小胞体内では何とか巻き戻るが、細胞表面上での安定性が低いためにエンドサイト

ーシスが進行し、その結果として発現量が低いのかかもしれない。この場合は可溶型として発現させた場合のみ安定であることの説明も可能である。

4-8 構造解析を目指した組換え MILL の生産

本研究において、天然構造をとっているであろうと思われる可溶型の組換えマウス MILL1 および MILL2 を、大腸菌の系を用いて生産することに成功した（図 3-9 から図 3-18）。構造内にジスルフィド結合を持つことが予想される MILL は、予想に違わず大腸菌体内で封入体を形成した。現在までに多くの MHC クラス I 様分子の立体構造が決定されているが[61]、それらの解析に用いられたタンパク質はほとんどの場合において大腸菌を用いて生産された組換えタンパク質であり、それは同時に封入体からの巻き戻しにより調製されたものでもある。そこで本研究においても MILL の封入体からの巻き戻しを行い、巻き戻った MILL 1 および MILL2 を二段階のクロマトグラフィーにより精製した。その結果、マウス β 2 ミクログロブリンと 1:1 で結合した MILL1 および MILL2 を高純度に精製することができた（図 3-14 および図 3-18）。高純度のみならず、これらのタンパク質は X 線結晶構造解析のための結晶化に用いることが可能な量であった。生体内での発現量が決して多くない MILL についてのタンパク質レベルでの研究を進める上で、これらの組換えタンパク質は非常に有効な材料となるであろう。

4-9 総括

結論として、本研究は MILL の生化学的性質が MICA/B ファミリーとは異なっていることを明らかにした。MILL は TAP 非依存的で β 2 ミクログロブリンと相互作用する GPI アンカー型の膜タンパク質である。それに対し、MICA/B は TAP 非依存的で β 2 ミクログロブリンと相互作用しない、膜貫通型のタンパク質である（図 4）。その他にも、MICA および MICB はストレス誘導型の分子で[34]、一部の組織を除いて正常細胞表面には発現していないが、*Mill1* および *Mill2* の messenger ribonucleic acid (mRNA) は熱ショックなどでは誘導されなかったことや(未発表データ)、MILL1 が毛包に発現することは、MICA/B ファミリーとは異なる特徴である。その上、NK 細胞は MILL テトラマーで染色されなかった（未発表データ）。これは MICA/B のリガンドである NKG2D を含む NK 細胞受容体の中で MILL と有意に結合する分子がないことを示唆するものである。これらの結果から、MILL がげっ歯類において MICA/B の機能相同分子である可能性はないといえるかもしれない。今後はノックアウトマウスの樹立や、本研究で作製した組換え MILL を用いた X 線結晶構造解析を遂行することで、MILL

ファミリーの生理機能の解明への糸口が掴めるかもしれない。

謝辭

本論文は三年半の研究成果によるものであり、前半の一年半が本学葉山キャンパス、後半の二年が九州大学生体防御医学研究所にて行われました。

まずは、指導教官である元本学先導科学研究科生命体科学専攻（現北海道大学大学院医学研究科教授）の笠原正典教授に深甚の謝意を示します。葉山キャンパス時代はもちろんのこと、先生が北海道大学へ転出され、同時に私が九州大学へ特別研究学生として配属された後も丁寧なご指導ご鞭撻を承ることができ、本研究を完遂することができました。

笠原先生の北海道大学転出に伴いまして、指導教官として数々のご指導ご尽力を承りましたとともに、本論文の副査を務めていただきました、先導科学研究科生命体科学専攻教授の堀内嵩先生に深く感謝の意を表します。

副指導教官としてご意見ご指導を承りましたとともに、本論文の主査としてご尽力を承りました、本学先導科学研究科生命体科学専攻助教授の深川竜郎先生に深く感謝の意を表します。

同じく副指導教官としてご意見ご指導を承りましたとともに、本論文の副査を務めていただきました、本学先導科学研究科生命体科学専攻助教授の田辺秀之先生に深く感謝の意を表します。

群馬大学に転出されるまで副指導教官を務めていただきました、元本学先導科学研究科生命体科学専攻助教授（現群馬大学大学院医学研究科教授）の柳川右千夫先生に、深く感謝の意を表します。

また、本論文の学外審査委員として副査をお引き受けいただきました、藤田保健衛生大学総合医科学研究所医高分子学研究部門教授の橋本敬一郎先生に、深く感謝の意を表します。

本研究の後半は、九州大学生体防御医学研究所ワクチン開発構造生物学分野で行われました。受託指導教官として数々のご指導ご助言をいただきました、九州大学生体防御医学研究所ワクチン開発構造生物学分野教授の神田大輔先生に、深く感謝の意を表します。

九州大学での研究課題を遂行する上で多大なご指導ご鞭撻を承りました、九州大学生体防御医学研究所ワクチン開発構造生物学分野助教授の前仲勝実先生に、深く感謝の意を表します。

本研究に関する共同研究を引き受けてくださいました、東京大学大学院新領域創成科学研究科の山本一夫教授、松本直樹助教授、ならびに小金井悟博士、北海道大学大学院医学研究科の石津明洋助教授、外丸詩野講師ならびに馬場智久博士、近畿大学医学部免疫学教室の宮澤正顕教授ならびに河原佐智代講師に深く感謝いたします。

前半の一年半を過ごさせていただきました本学先導科学研究科の笠原研究室の皆様方に深く感謝いたします。さまざまな実験においてお世話になりました教務補佐員の永田妙子博士ならびに久野香さんに感謝いたします。本論文で扱った MILL についての遺伝学的・進化学的研究をされていたことから数々のご指導ご助言を承りましたとともに有益な議論をしていただきました渡邊豊博士に感謝いたします。先輩として数多くのご指導を承りました鈴木隆志博士ならびに高橋朋子博士、同じ大学院生として本研究への協力やご助言を賜りました学生の春田千晶さん、丸岡尊子さん、ならびに笠松純さんに感謝いたします。

後半の二年間を特別研究学生として過ごさせていただきました九州大学生体防御医学研究所の神田研究室の皆様方に深く感謝いたします。構造生物学の専門家として数々の有益なご指導ご助言を承りました、畠中秀樹助教授、真板宣夫助手、ならびに齊藤貴士助手に感謝いたします。タンパク質科学についてご指導ご意見を承りました博士研究員の大木出博士、リンダラスバラ博士、帯田孝之博士、尾瀬農之博士、佐々木香織博士、白石充典博士、ならびに黒木喜美子博士に感謝いたします。研究生活を送る上でお世話になりました、研究補佐員の福永裕子さん、岡部由紀さん、ならびにタニアヤスミン博士、事務員の中川裕美子さん、大学院生の井倉真由美さん、田畑栄一さん、上敷領淳さん、中村聖子さん、ならびに小島理恵子さんに感謝いたします。

笠原研究室および神田研究室以外の本学先導科学研究科および九州大学生体防御医学研究所に所属する皆様方、両大学の事務の皆様方、北海道大学大学院医学研究科笠原研究室の皆様方に深く感謝いたします。

本研究は以上の皆様方を含む多くの方々のご尽力により完成することができました。重ねて御礼申し上げます。

参考文献

1. Iwanaga S, Lee BL., Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol.* 2005. 38: 128-150.
2. Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD., Somatic diversification of lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature.* 2004. 430: 174-180.
3. Pancer Z, Saha NR, Kasamatsu J, Suzuki T, Amemiya CT, Kasahara M, Cooper MD., Variable lymphocyte receptors in hagfish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102: 9224-9229.
4. Solheim JC, Cook JR, Hansen TH., Conformational changes induced in the MHC class I molecule by peptide and beta 2-microglobulin. *Immunol Res.* 1995. 14: 200-217.
5. Otten GR, Bikoff E, Ribaud RK, Kozlowski S, Margulies DH, Germain RN., Peptide and beta 2-microglobulin regulation of cell surface MHC class I conformation and expression. *J Immunol.* 1992.148: 3723-3732.
6. Stern LJ, Wiley DC., Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 1994. 2: 245-251.
7. Rammensee HG., Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol.* 1995. 7: 85-96.
8. Zamoyska R., CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol.* 1998. 10: 82-87.
9. Tanaka K, Kasahara M., The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev.* 1998. 163: 161-176.
10. van Endert PM., Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing? *Immunol Res.* 1996. 15: 265-279.

11. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL., The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102: 17107-17112.
12. Bouvier M., Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol*. 2003. 39: 697-706.
13. Nikolich-Zugich J, Fremont DH, Miley MJ, Messaoudi I., The role of mhc polymorphism in anti-microbial resistance. *Microbes Infect*. 2004. 6: 501-512.
14. Wang JH, Reinherz EL., Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol*. 2002. 38: 1039-1049.
15. Yokoyama WM, Kim S., How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity*. 2006. 24: 249-257.
16. Boname JM, de Lima BD, Lehner PJ, Stevenson PG., Viral degradation of the MHC class I peptide loading complex. *Immunity*. 2004. 20: 305-317.
17. Stephens HA., MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol*. 2001. 22: 378-385.
18. Braud V, Jones EY, McMichael A., The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol*. 1997. 27: 1164-1169.
19. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, Allan DS, Makadzange A, Rowland-Jones S, Willcox B, Jones EY, van der Merwe PA, Kumagai I, Maenaka K., 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 USA*. 2003. 100: 8856-8861.
20. Jensen PE, Sullivan BA, Reed-Loisel LM, Weber DA., Qa-1, a nonclassical class I histocompatibility molecule with roles in innate and adaptive immunity. *Immunol Res*. 2004. 29: 81-92.

21. Comiskey M, Goldstein CY, De Fazio SR, Mammolenti M, Newmark JA, Warner CM., Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product. *Hum Immunol.* 2003. 64: 999-1004.
22. Tajima A, Tanaka T, Ebata T, Takeda K, Kawasaki A, Kelly JM, Darcy PK, Vance RE, Raulet DH, Kinoshita K, Okumura K, Smyth MJ, Yagita H., Blastocyst MHC, a putative murine homologue of HLA-G, protects TAP-deficient tumor cells from natural killer cell-mediated rejection in vivo. *J Immunol.* 2003. 171: 1715-1721.
23. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK., A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996. 13: 399-408.
24. Brozovic S, Nagaishi T, Yoshida M, Betz S, Salas A, Chen D, Kaser A, Glickman J, Kuo T, Little A, Morrison J, Corazza N, Kim JY, Colgan SP, Young SG, Exley M, Blumberg RS., CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein. *Nat Med.* 2004. 10: 535-539.
25. Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Lavery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A., Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004. 306: 1786-1789.
26. Simister NE, Mostov KE., An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 1989. 337: 184-187.
27. Todorov PT, McDevitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I, Tisdale MJ., Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. *Cancer Res.* 1998. 58: 2353-2358.
28. Fukudome K, Esmon CT., Molecular cloning and expression of murine and

bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *J Biol Chem.* 1995. 270: 5571-5577.

29. Lindahl KF, Byers DE, Dabhi VM, Hovik R, Jones EP, Smith GP, Wang CR, Xiao H, Yoshino M., H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen. *Annu Rev Immunol.* 1997. 15: 851-879.

30. Loconto J, Papes F, Chang E, Stowers L, Jones EP, Takada T, Kumanovics A, Fischer Lindahl K, Dulac C., Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell* 2003. 112: 607-618.

31. Ishii T, Hirota J. Mombaerts P. Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons. *Curr Biol.* 2003. 13: 394-400.

32. Hashimoto K, Hirai M, Kurosawa Y., A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science* 1995. 269: 693-695.

33. Kawachi I, Maldonado J, Strader C, Gilfillan S., MR1-restricted V alpha 19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol.* 2006. 176: 1618-1627.

34. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T., Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. 93: 12445-12450.

35. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T., Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999. 285: 727-729.

36. Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF., MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001. 15: 83-93.

37. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL., Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000. 12: 721-727.
38. Hughes AL, Nei M., Evolution of the major histocompatibility complex: independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. *Mol Biol Evol.* 1989. 6: 559-579.
39. Kasahara M, Watanabe Y, Sumasu M, Nagata T., A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. 99: 13687-13692.
40. Watanabe Y, Maruoka T, Walter L, Kasahara M., Comparative genomics of the Mill family: a rapidly evolving MHC class I gene family. *Eur J Immunol.* 2004. 34: 1597-1607.
41. Ljunggren HG, Karre K., Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med.* 1985. 162: 1745-1759.
42. Reeves PJ, Callewaert N, Contreras R, Khorana HG., Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. 99: 13419-13424.
43. Attaya M, Jameson S, Martinez CK, Hermel E, Aldrich C, Forman J, Lindahl KF, Bevan MJ., Monaco JJ., Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature* 1992. 355: 647-649.
44. Yang Y, Fruh K, Chambers J, Waters JB, Wu L, Spies T, Peterson PA., Major histocompatibility complex (MHC)-encoded HAM2 is necessary for antigenic peptide loading onto class I MHC molecules. *J Biol Chem.* 1992. 267: 11669-11672.
45. Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlen C, Neefjes JJ, Hoglund P, Heemels MT, Bastin J,

Schumacher TN, Townsend A, Karre K, Ploegh HL., Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 1990. 346: 476-480.

46. Sugawara S, Abo T, Kumagai K., A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J Immunol Methods*. 1987. 100: 83-90.

47. Aricescu AR, Hon WC, Siebold C, Lu W, van der Merwe PA, Jones EY., Molecular analysis of receptor protein tyrosine phosphatase mu-mediated cell adhesion. *EMBO J*. 2006. 25: 701-712.

48. Shields MJ, Moffat LE, Ribaldo RK., Functional comparison of bovine, murine, and human beta2-microglobulin: interactions with murine MHC I molecules. *Mol Immunol*. 1998. 35: 919-928.

49. Trowsdale J, Parham P., Defense strategies and immunity-related genes. *Eur. J. Immunol*. 2004. 34: 7-17.

50. Niederkorn JY., Mechanisms of immune privilege in the eye and hair follicle. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2003. 8: 168-172.

51. Paus R, Nickoloff BJ, Ito T., A 'hairy' privilege. *Trends Immunol*. 2005. 26: 32-40.

52. Robinson PJ, Millrain M, Antoniou J, Simpson E, Mellor AL., A glycopospholipid anchor is required for Qa-2-mediated T cell activation. *Nature* 1989. 342: 85-87.

53. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ., ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001. 14: 123-133.

54. Horejsi V, Drbal K, Cebecauer M, Cerny J, Brdicka T, Angelisova P, Stockinger H., GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today*. 1999. 20: 356-361.

55. Pizzo P, Viola A., Lipid rafts in lymphocyte activation. *Microbes Infect.* 2004. 6: 686-692.
56. Rajan N, Tsarbopoulos A, Kumarasamy R, O'Donnell R, Taremi SS, Baldwin SW, Seelig GF, Fan X, Pramanik B, Le HV., Characterization of recombinant human interleukin 4 receptor from CHO cells: role of N-linked oligosaccharides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. 206: 694-702.
57. Radaev S, Sun P., Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors. *Mol Immunol.* 2002. 38: 1073-1083.
58. Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC., HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992. 89: 3429-3433.
59. Yamaguchi H, Hashimoto K., Association of MR1 protein, an MHC class I-related molecule, with beta(2)-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 290: 722-729.
60. Balk SP, Burke S, Polischuk JE, Frantz ME, Yang L, Porcelli S, Colgan SP, Blumberg RS., Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science* 1994. 265: 259-262.
61. Maenaka K, Jones EY., MHC superfamily structure and the immune system. *Curr Opin Struct Biol.* 1999. 9: 745-753.

図表

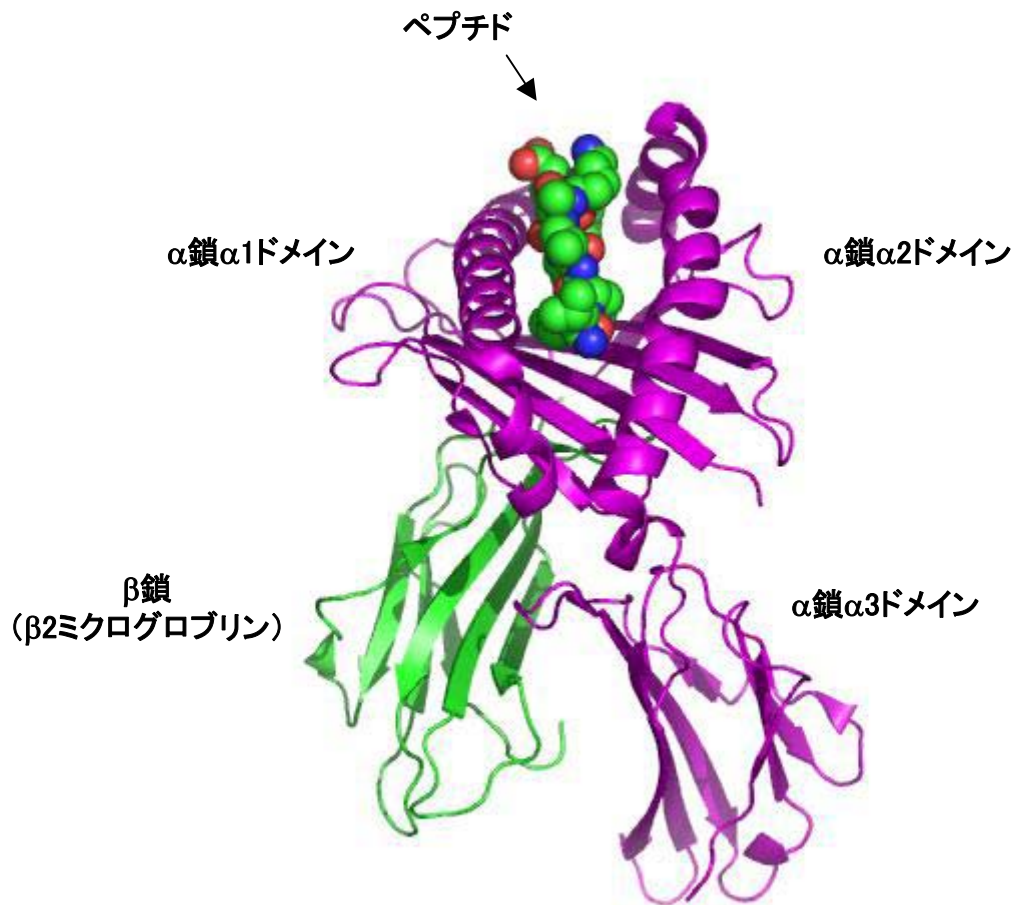


図1-1 MHCクラスIa分子の基本構造

代表的なMHCクラスIa分子の基本構造として、ヒトHLA-B分子（Protein Data Bank ID: 1E27）を例に示した。 α 鎖 $\alpha 1$ ドメインと α 鎖 $\alpha 2$ ドメインでは、 β シート上に α ヘリックスが並立した構造が形成され、両ヘリックス間の溝にペプチドが結合する。 α 鎖 $\alpha 3$ ドメインは β シートで構成された免疫グロブリン様ドメインであり、 β 鎖（ $\beta 2$ ミクログロブリン）との結合に重要である。図には細胞外ドメインの構造のみを示してあるが、実際の分子には α 鎖の $\alpha 3$ ドメインからカルボキシル末端側に膜貫通領域および細胞質領域が存在する。

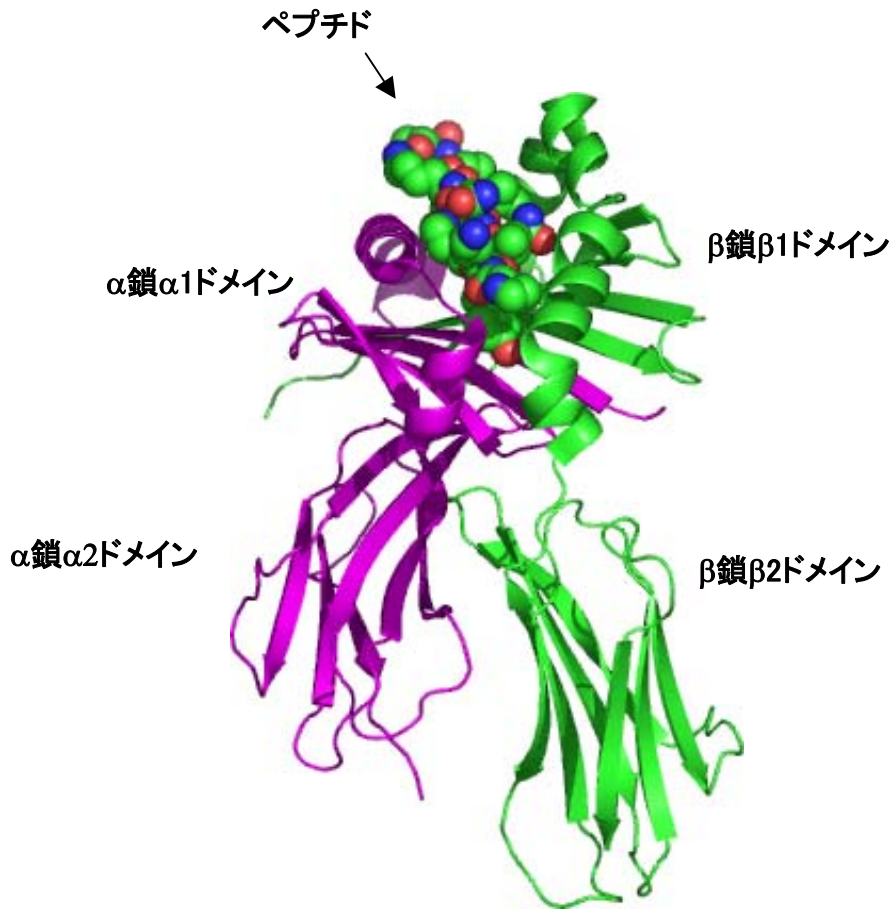


図1-2 MHCクラスII分子の基本構造

代表的なMHCクラスII分子の基本構造として、ヒトHLA-DR1分子（Protein Data Bank ID: 1DLH）を例に示した。 α 鎖 α 1ドメインと β 鎖 β 1ドメインでは、 β シート上に α ヘリックスが並立した構造が形成され、両ヘリックス間の溝にペプチドが結合する。 α 鎖 α 2ドメインおよび β 鎖 β 2ドメインは β シートで構成された免疫グロブリン様ドメインである。図には細胞外ドメインの構造のみを示してあるが、実際の分子には α 鎖の α 2ドメインおよび β 鎖の β 2ドメインからカルボキシル末端側に膜貫通領域および細胞質領域が存在する。

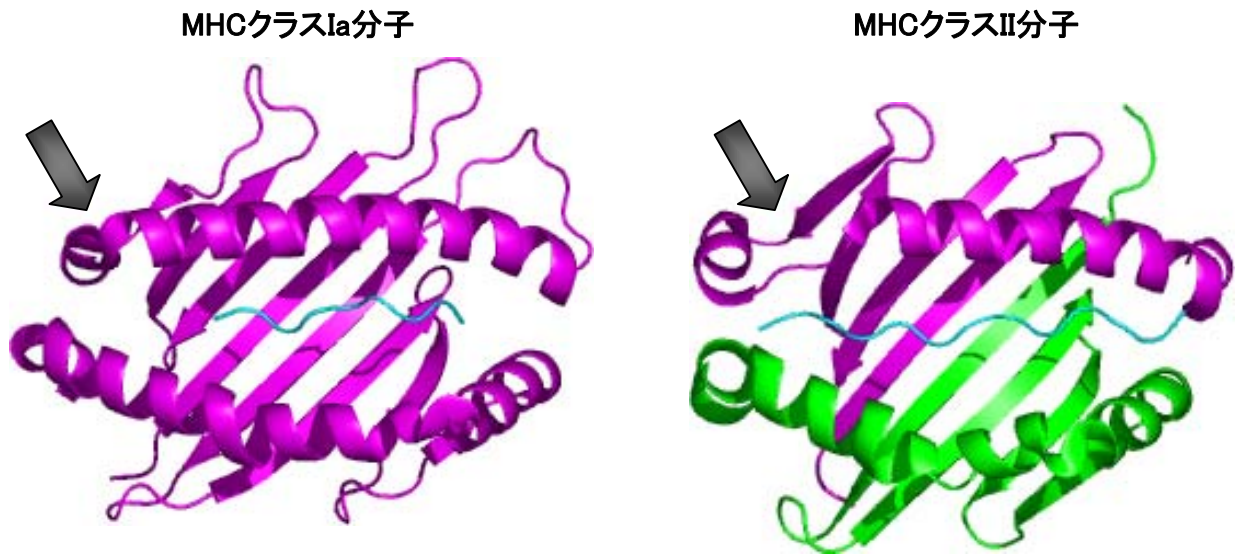


図1-3 MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子のペプチド結合溝

ヒトHLA-B分子およびヒトHLA-DR1分子を例に、MHCクラスIa分子とMHCクラスII分子のペプチド結合溝の構造を比較した。 α 鎖はマゼンダ色、 β 鎖は緑色、ペプチドは水色で示した。MHCクラスIa分子のペプチド結合溝の端（矢印の辺り）は、MHCクラスII分子に比べて閉じていることがわかる。

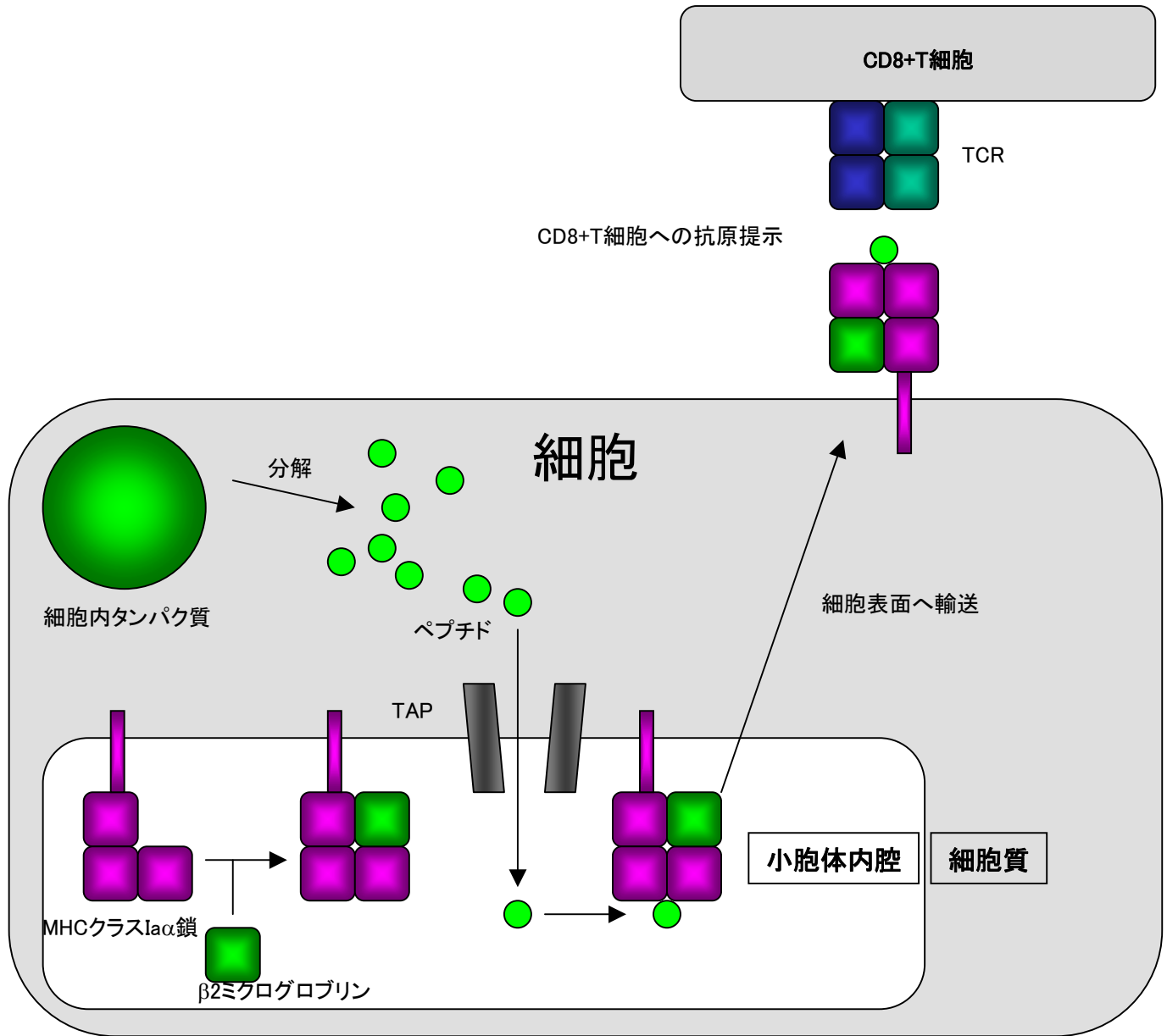


図1-4 MHCクラスIa分子による細胞内抗原の提示

細胞内抗原がT細胞に提示されるまでを簡潔に示した。細胞内のタンパク質がタンパク質分解酵素により分解を受けた結果生じたペプチドは、TAPによりATP依存的に小胞体内腔に輸送される。ここでペプチドはMHCクラスIa分子に結合し、ゴルジ体を経て細胞表面へと運ばれ、CD8+T細胞のTCRにより監視される。細胞内に正常ではないタンパク質が存在する場合、MHCに提示されるペプチドの中にそれら由来のものが存在するようになり、このようなペプチド・MHCクラスIa分子複合体を表面に提示する細胞は、T細胞により破壊される。

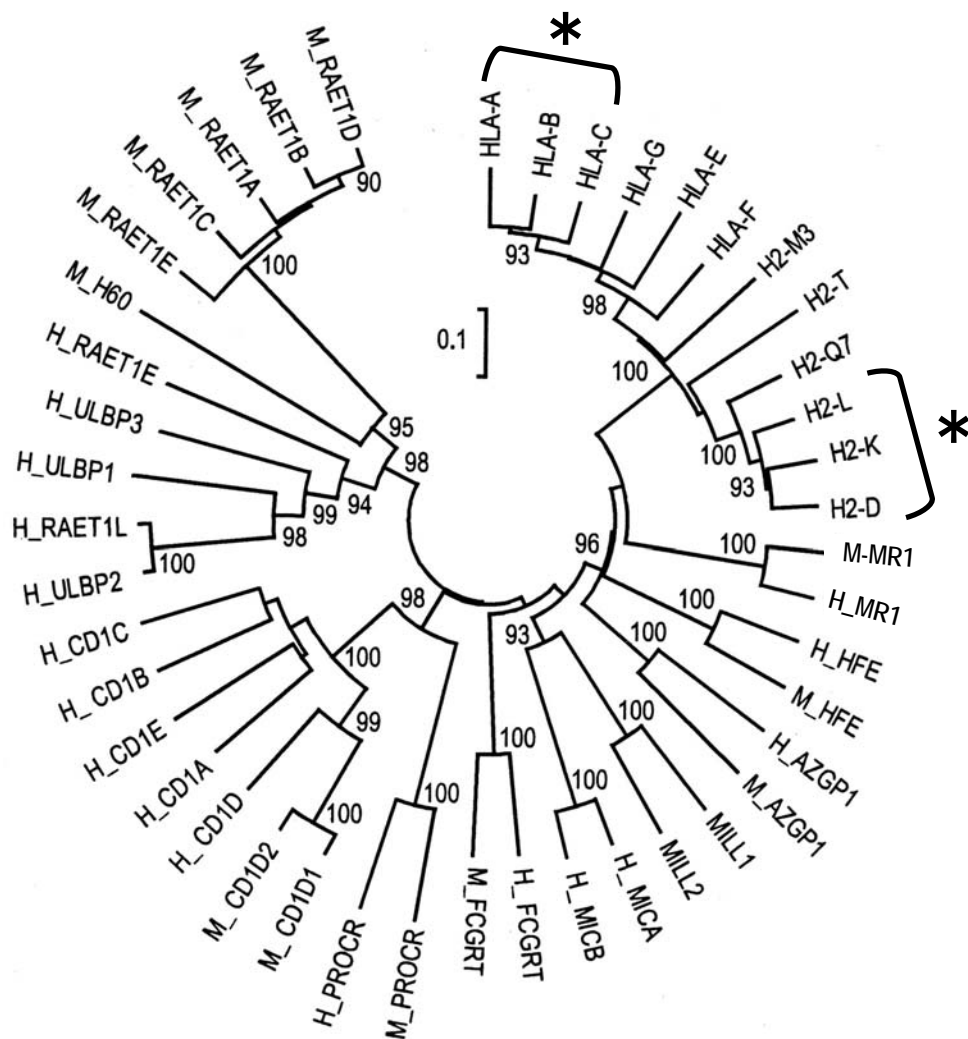


図1-5 哺乳類MHCクラスIファミリーの系統樹

ヒトとマウスの代表的なMHCクラスIa分子およびMHCクラスIb分子のアミノ酸配列（ $\alpha 1$ ドメインから $\alpha 3$ ドメインまで）に基づいて、近隣結合法により作成した系統樹。HLAはヒト、H2はマウスのMHCクラスIa分子である。それ以外のMHCクラスIb分子については、H_ はヒト、M_ はマウスの分子を指す。MILLはマウスの配列である。アステリスク（*）はMHCクラスIa分子を示す。文献39より引用したものを改変して使用した。

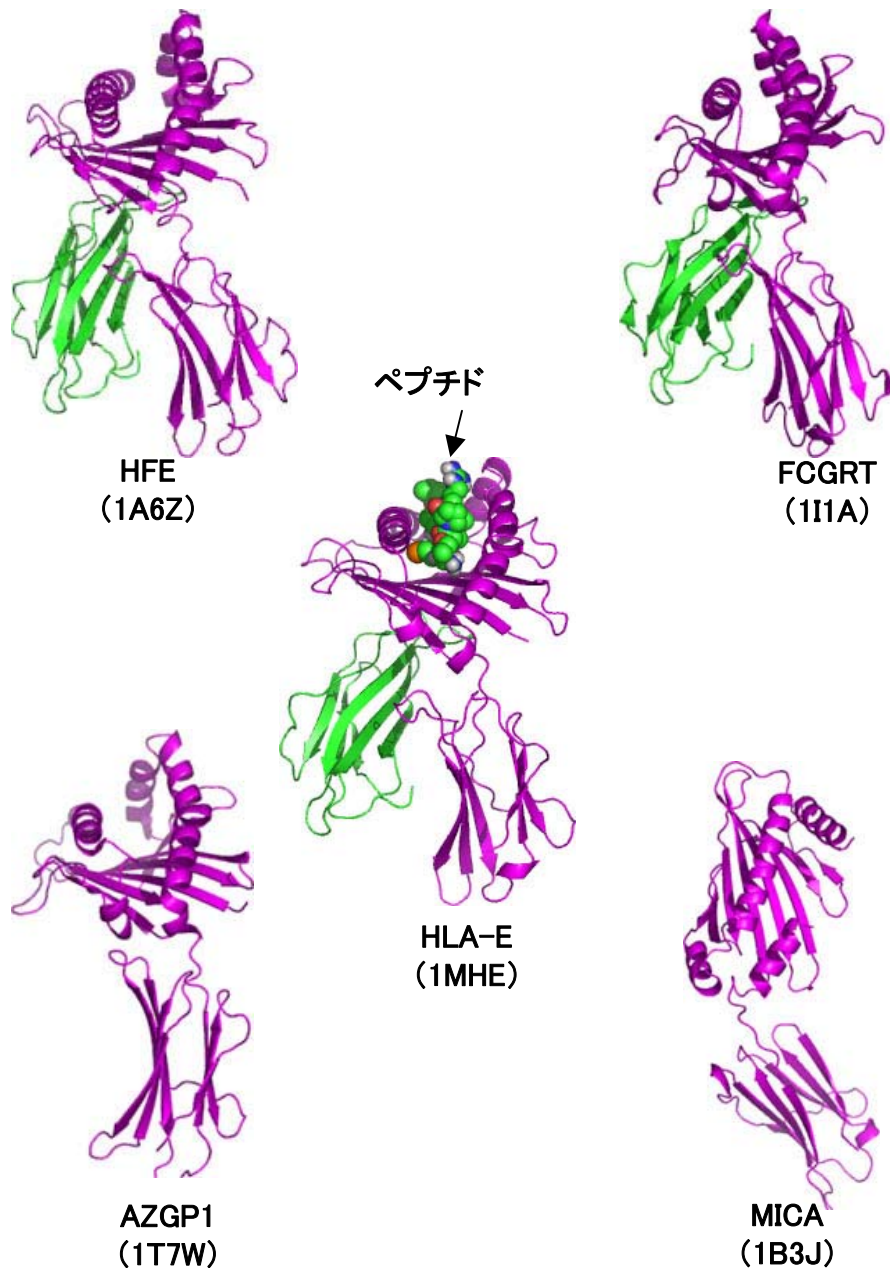


図1-6 MHCクラスIb分子の立体構造

すでに立体構造が決定されているMHCクラスIb分子の中から、ヒトHFE、ヒトFCGRT、ヒトHLA-E、ヒトAZGP1、およびヒトMICAの立体構造を示した。名称下のかっこ内はProtein Data BankのID番号。 α 鎖をマゼンダ色、 β 2ミクログロブリンを緑色で表した。図1-1と比較してわかるように、MHCクラスIb分子はMHCクラスIa分子に非常に構造が似ている。しかし β 2ミクログロブリンやペプチドとの結合がない分子もあり、その機能も特殊な抗原提示（HFEおよびCD1）、抗体輸送（FCGRT）、鉄輸送（HFE）脂質分解（AZGP1）、NK細胞の活性化（MICA）など多様である。

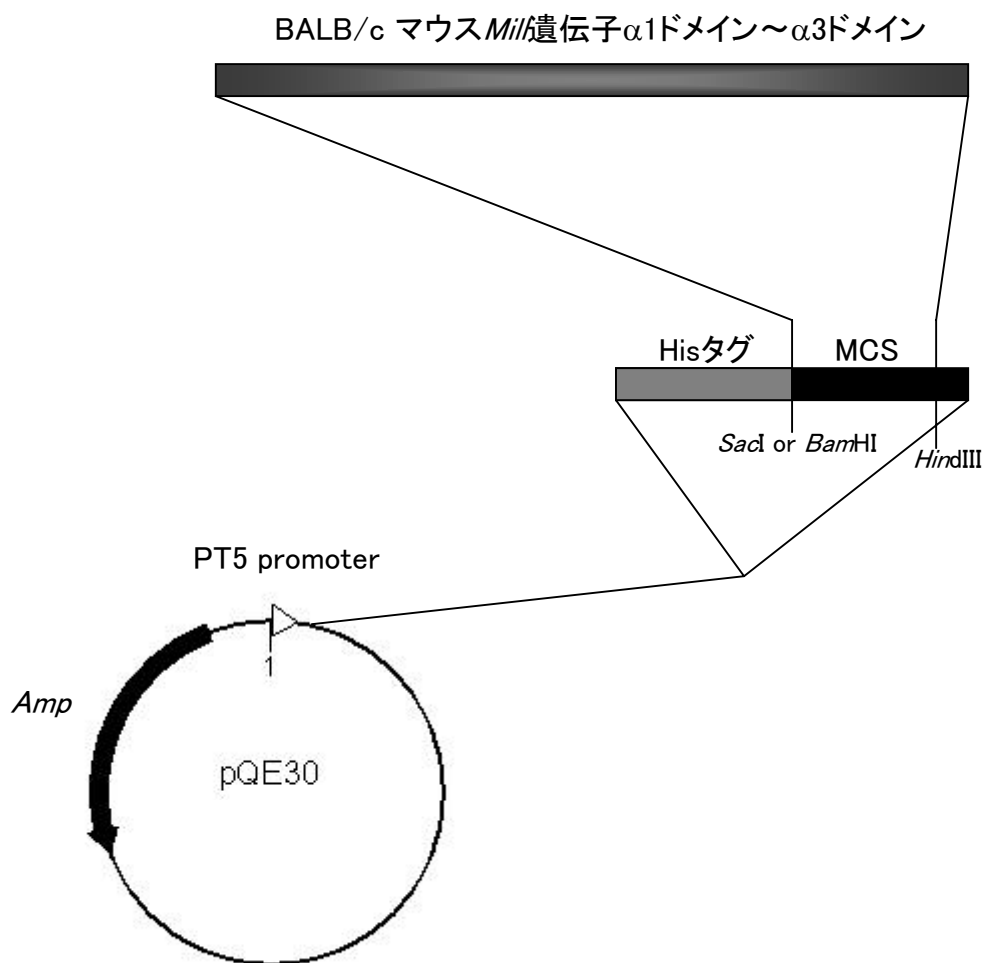


図2-1 MILL-pQE30ベクター

pQE30ベクターのマルチクローニングサイト（MCS）に、方法2-2に従ってマウス *Mill1* およびマウス *Mill2* の $\alpha 1$ ドメインから $\alpha 3$ ドメインまでを導入したものを作製し、それぞれMILL1-pQE30およびMILL2-pQE30とした。この発現ベクターは抗MILL抗血清の作製に必要なMILLを得るために使用した。

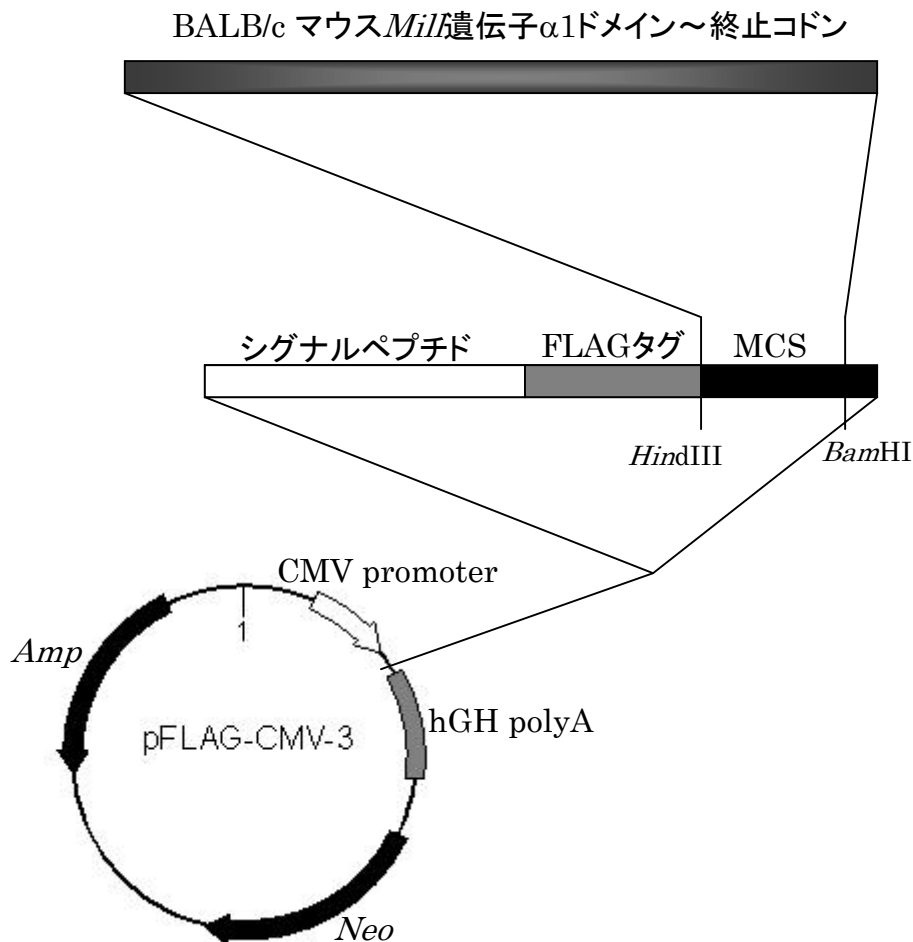


図2-2 MILL-pFLAG-CMV3ベクター

pFLAG-CMV3ベクターのマルチクローニングサイト（MCS）に、方法2-3に従ってマウス *Mill1* およびマウス *Mill2* の $\alpha 1$ ドメインから終止コドンまでを導入したものを作製し、それぞれMILL1-pFLAG-CMV3およびMILL2-pFLAG-CMV3とした。この発現ベクターはマウスMILL安定発現株の作製に用いた。リニア化に用いた *Sca*I の認識部位は *Amp* 内に一箇所のみ存在する。

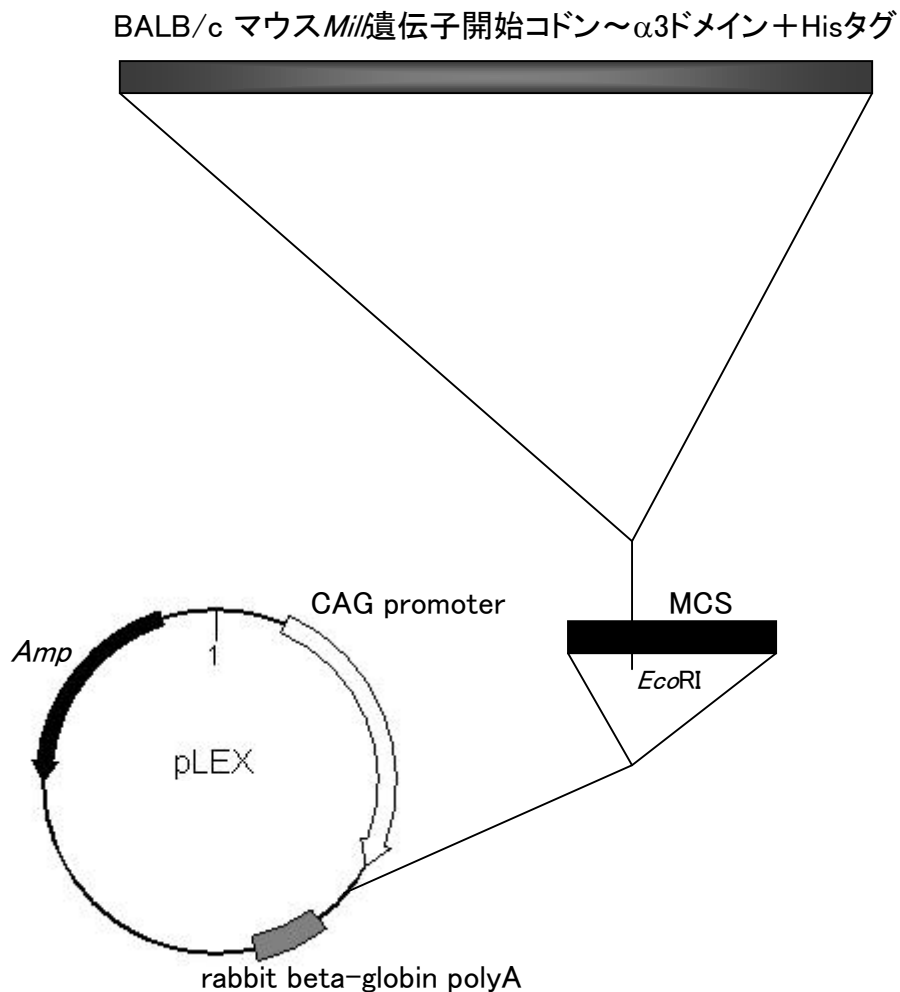


図2-3 MILL-pLEXベクター

pLEXベクターのマルチクローニングサイト（MCS）に、方法2-3に従ってマウス *Mill1* およびマウス *Mill2* の開始コドンから $\alpha 3$ ドメインまでにHisタグを連結したものを導入したものを作製し、それぞれMILL1-pLEXおよびMILL2-pLEXとした。この発現ベクターは哺乳類培養細胞による組換えMILLの分泌発現に用いた。

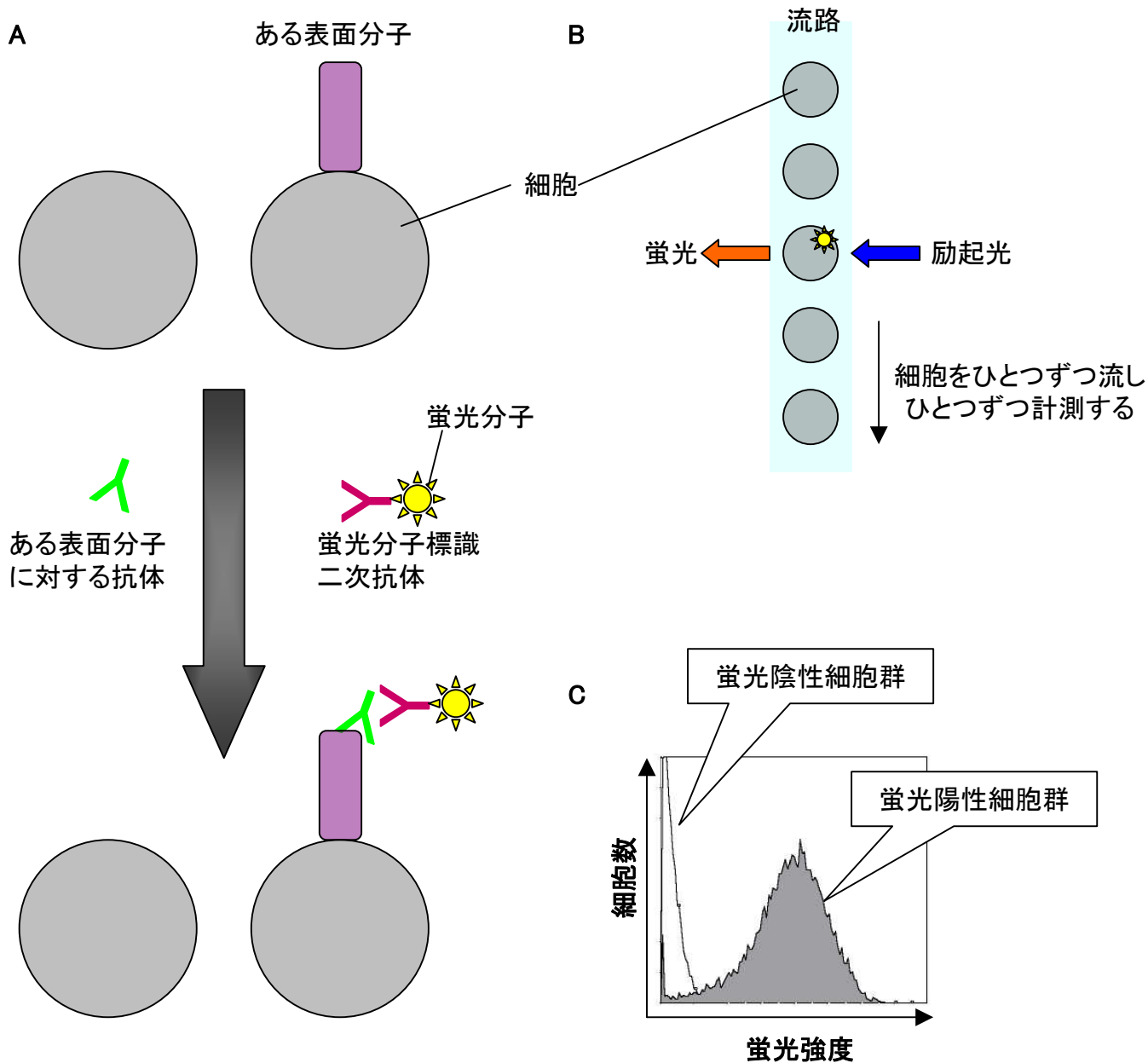


図2-4 フローサイトメトリー法

本研究で多用した、フローサイトメトリー法を用いた細胞表面分子発現の検出法（方法2-6）について図示した。ある表面分子に対する抗体を細胞群に作用させると、その表面分子が発現している細胞には抗体が結合する。その後に蛍光分子で標識した二次抗体を作用させることで、その表面分子を発現する細胞は蛍光分子で標識される(A)。抗体作用後の細胞群は、フローサイトメーターを用いて細胞をひとつひとつに励起光（レーザー）を当てて蛍光を検出する(B)。本研究では細胞集団中のそれぞれの細胞から得られた蛍光強度について、細胞数との関係をヒストグラム化して解析を行った(C)。

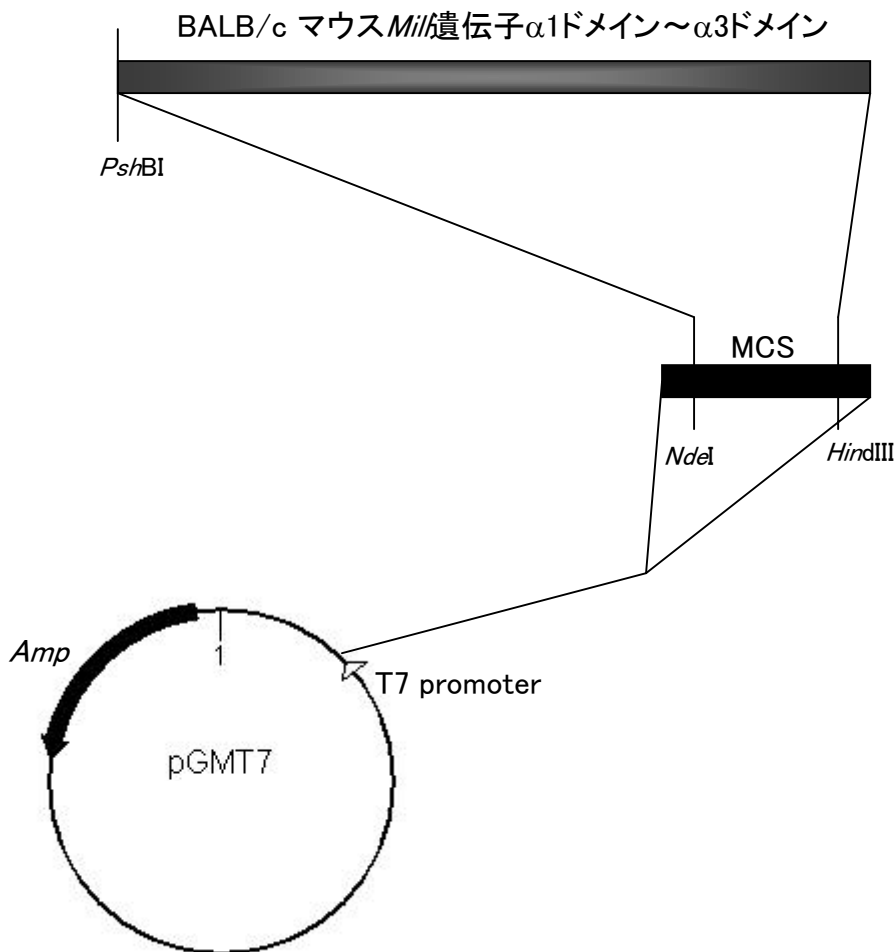


図2-5 MILL-pGMT7ベクター

pGMT7ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) に、方法2-13に従ってマウス *Mill1* およびマウス *Mill2* の $\alpha 1$ ドメインから $\alpha 3$ ドメインまでを導入したものを作製し、それぞれMILL1-pGMT7およびMILL2-pGMT7とした。*Mill* 遺伝子内に *Nde*I の認識部位があることから、認識配列が異なるものの切断面が *Nde*I と合致する *Psh*BI で処理し、pGMT7側の *Nde*I 切断部位に組み込んだ。この発現ベクターは巻き戻し法によるMILLの調製に用いた。

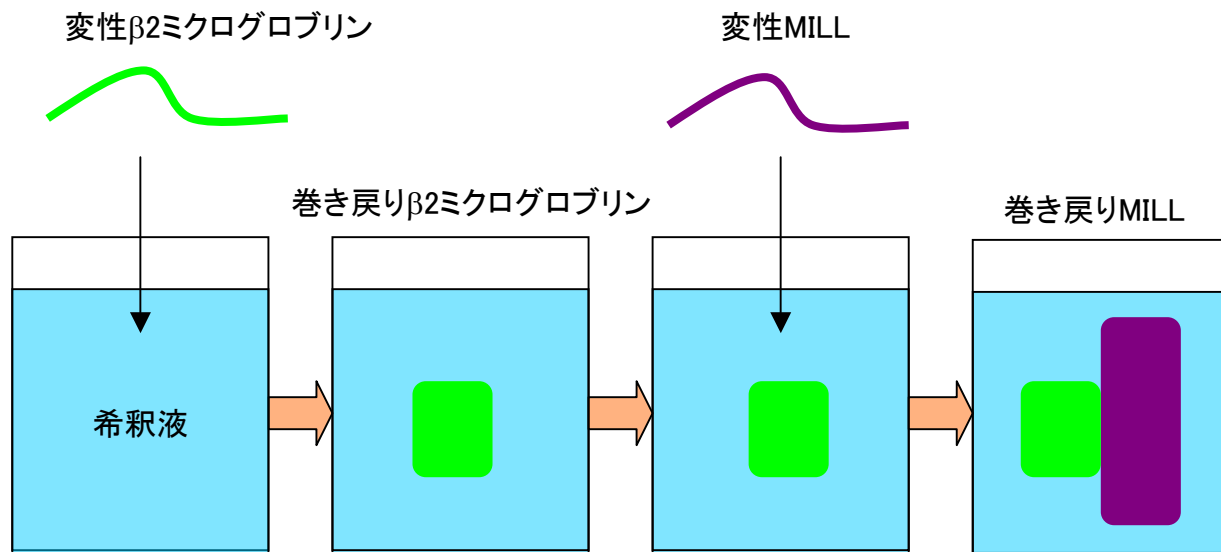


図2-6 希釈法によるMILLの巻き戻し

大腸菌で発現させたβ2ミクログロブリンとMILLは、正しい立体構造をとらず、大腸菌内で凝集して封入体を形成する。そこで正しい立体構造をとったMILLを得るために希釈法による巻き戻しを行った。まずは封入体を単離し、変性剤の作用で可溶化する（変性タンパク質）。次に変性タンパク質を多量の希釈液で希釈することで、変性剤濃度を下げて正しい立体構造をとるように促す（巻き戻す）。巻き戻ったタンパク質は変性剤の作用がなくても溶液に溶けるようになる。MILLの巻き戻しは、まず変性β2ミクログロブリンの巻き戻しを行い、続いて変性MILLを加えることで複合体となるように巻き戻しを行った。

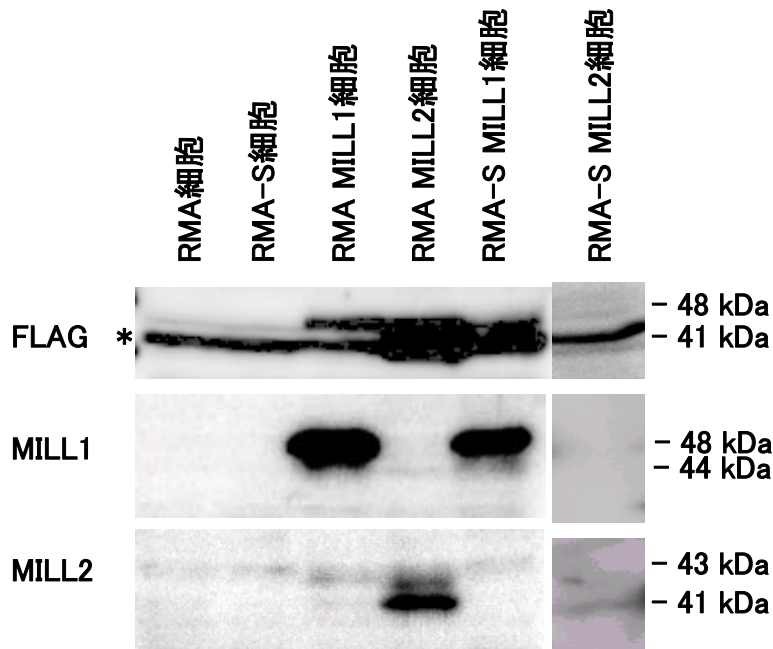


図3-1 MILL1もしくはMILL2を安定発現するマウス細胞株の樹立

RMA細胞、RMA-MILL1細胞、RMA-MILL2細胞、RMA-S細胞、RMA-S-MILL1細胞、およびRMA-S-MILL2細胞を可溶化液について、アクリルアミド濃度12%のSDS-PAGEおよびウエスタンブロット解析を行った。検出は抗FLAG抗体（上段）、抗MILL1抗血清（中段）、および抗MILL2抗血清（下段）により行った。アステリスク（*）は非特異的な反応によるバンド。抗FLAG抗体と抗MILL抗体に対する反応性の違いからか、同一のバンドでもそれぞれの抗体による染色強度は異なっている。

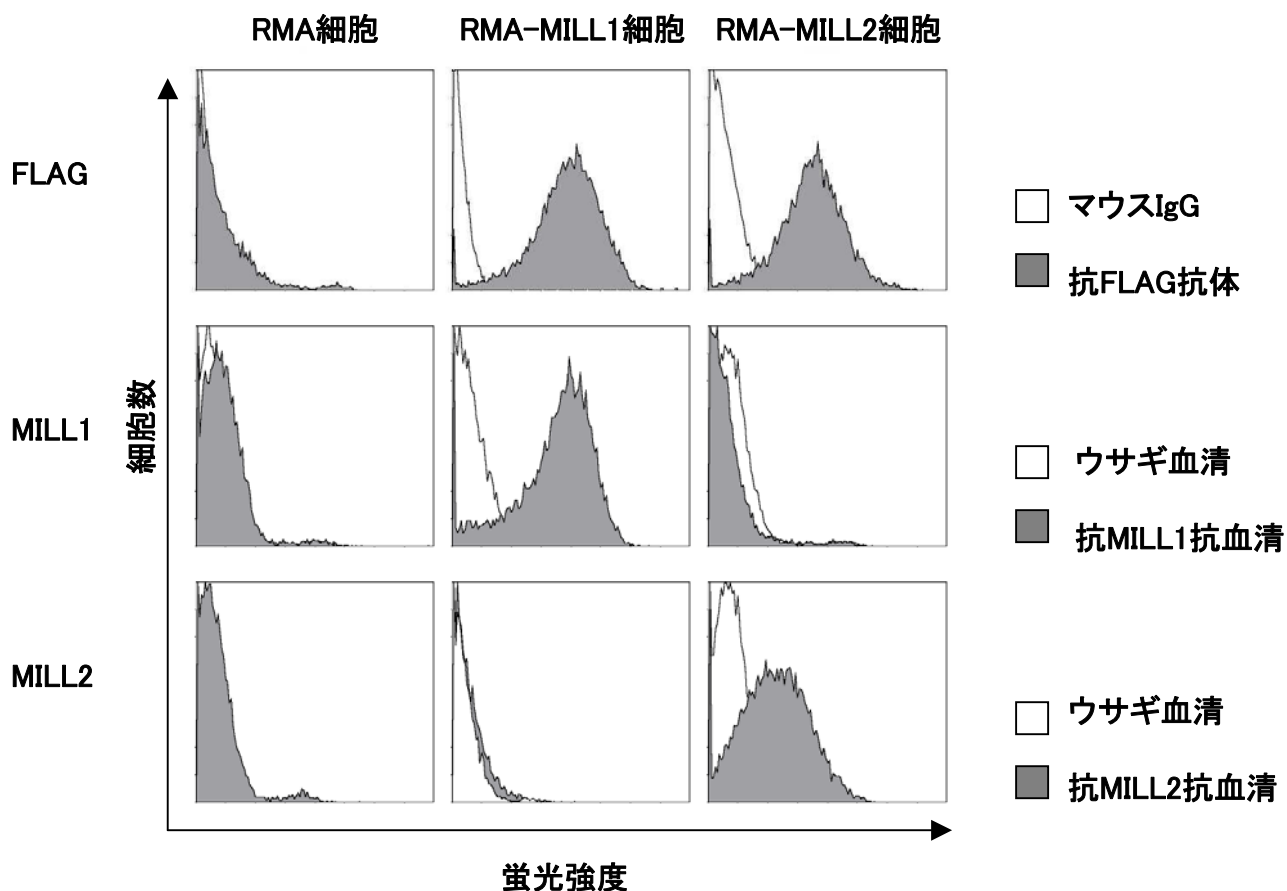


図3-2 MILL1およびMILL2の細胞表面における発現解析

RMA細胞、RMA-MILL1細胞、およびRMA-MILL2細胞について、抗FLAG抗体、抗MILL1抗血清、および抗MILL2抗血清によるフローサイトメトリーを行った（灰色のヒストグラム）。陰性コントロール（白いヒストグラム）はアイソタイプマウス抗体（上段）もしくは通常ウサギ血清（中段および下段）を用いた。MILL1およびMILL2が細胞表面に発現することが、抗FLAG抗体と抗MILL抗血清により確かめられた。

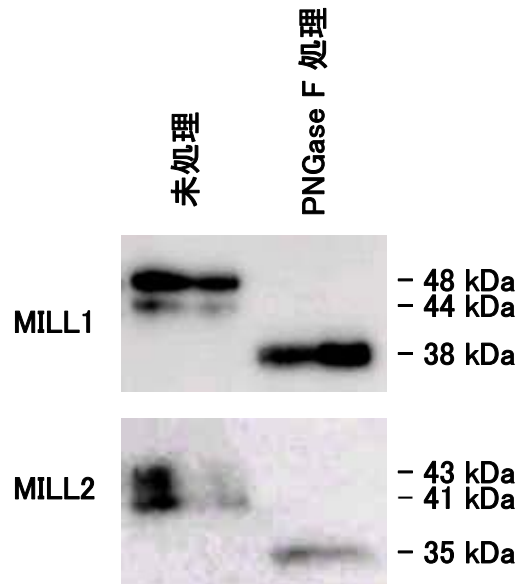


図3-3 MILL1およびMILL2の糖鎖解析

RMA-MILL1細胞およびRMA-MILL2細胞を界面活性剤を含む緩衝液で可溶化し、抗FLAG抗体を結合させたプロテインG-セファロースビーズで免疫沈降を行った。PNGase F処理を37℃で18時間行い、アクリルアミド濃度12%のSDS-PAGEにより分離、抗MILL1抗血清もしくは抗MILL2抗血清でウエスタンブロット解析を行った。MILL1およびMILL2ともにPNGase F処理によりSDS-PAGEにおける移動度が増加した。

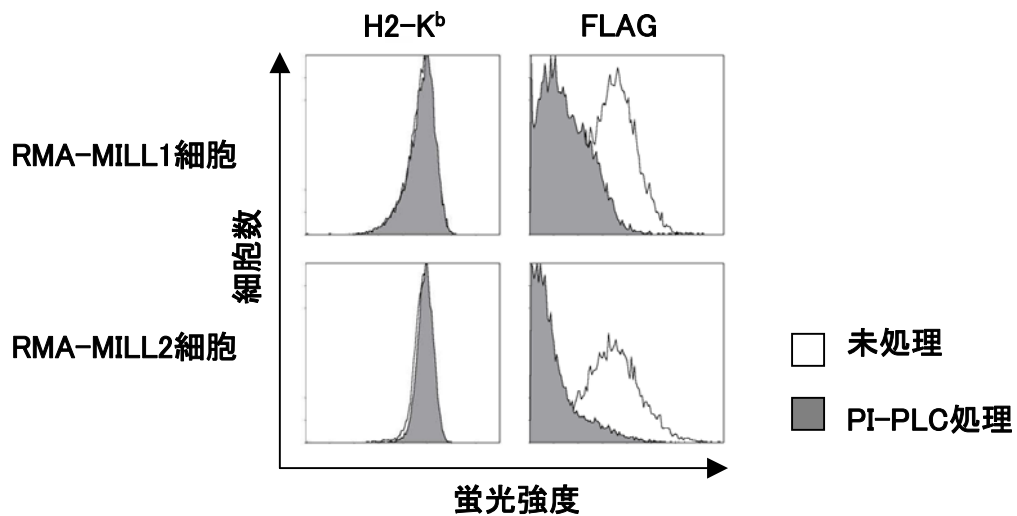


図3-4 細胞表面MILLのPI-PLC処理による発現

RMA-MILL1細胞（上段）およびRMA-MILL2細胞（上段）をPI-PLC（灰色のヒストグラム）もしくはPBS（白のヒストグラム）で処理し、抗H2-K^b抗体（左）および抗FLAG抗体（右）を用いたフローサイトメトリーを行った。一回膜貫通型であるH2-K^bの細胞表面発現量はPI-PLC処理後も変わらなかったが、MILLの細胞表面発現量はPI-PLC処理後に減少した。

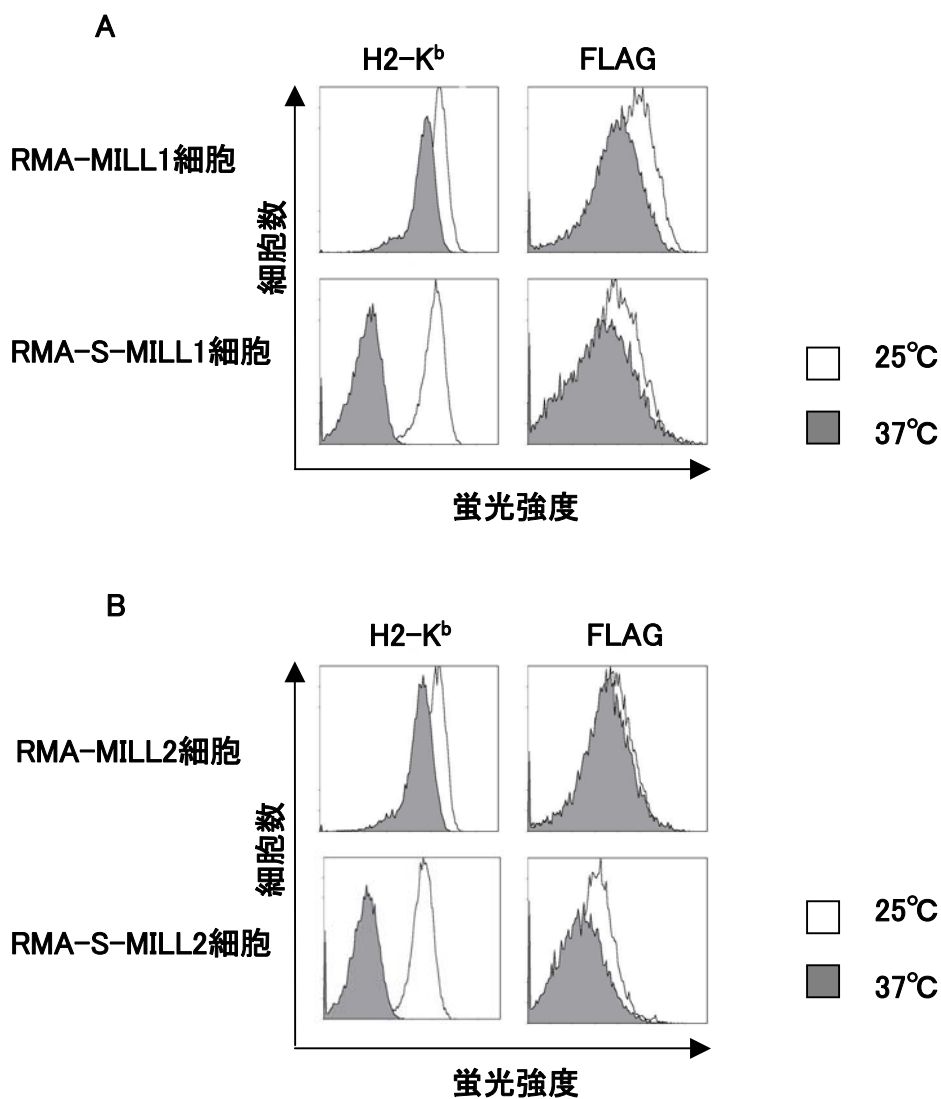


図3-5 RMA-SにおけるMILL1およびMILL2の細胞表面発現解析

RMA-MILL1細胞と RMA-S-MILL1細胞 (A)もしくはRMA-MILL2細胞およびRMA-S-MILL2細胞 (B) について、25℃ (白のヒストグラム)および37℃ (灰色のヒストグラム)で18時間培養し、抗H2-K^b抗体(左)および抗FLAG抗体 (右)を用いてフローサイトメトリーによる解析を行った。H2-K^bはRMA-Sにおいて温度依存性があるが、MILLはほぼ変化がなかった。

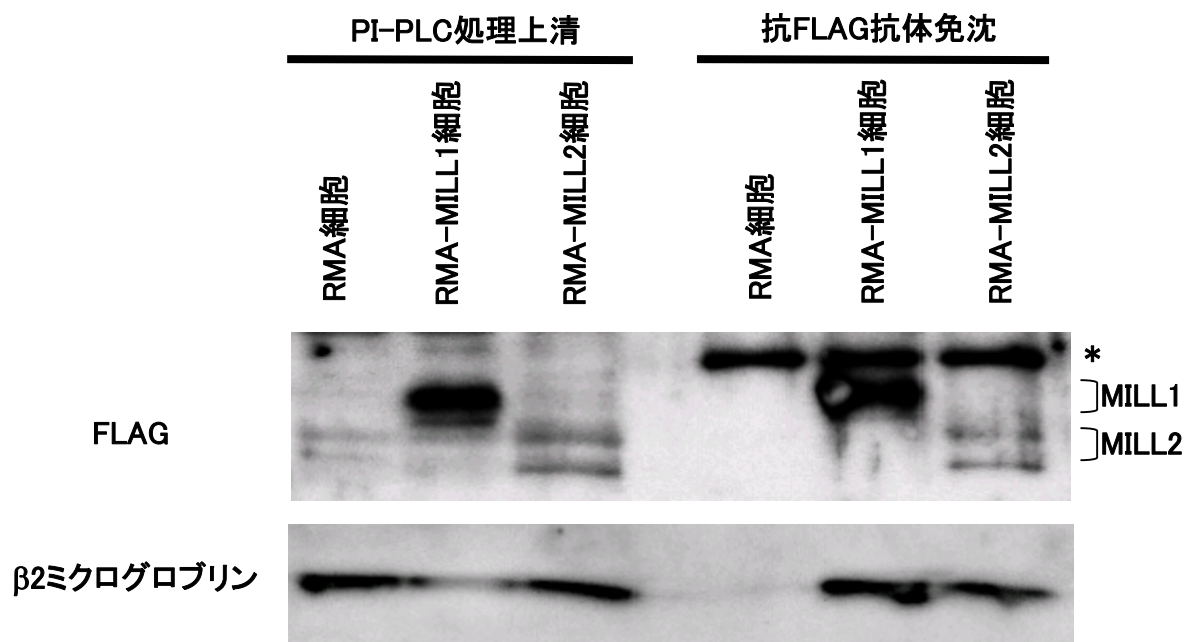


図3-6 免疫沈降法によるMILL1およびMILL2と β 2ミクログロブリンの相互作用解析

細胞表面からMILLを遊離させるため、RMA-MILL1細胞およびRMA-MILL2細胞をPI-PLCで処理した。遊離したMILLについて抗FLAG抗体を結合させたプロテインG-セファロースビーズによる免疫沈降を行った。アクリルアミド濃度12%（上段）および14%（下段）のSDS-PAGEを行い、抗FLAG抗体（上段）および抗 β 2ミクログロブリン抗体（下段）を用いたウエスタンブロット法による検出を行った。アステリスク（*）は免疫沈降に用いた抗FLAG抗体の重鎖由来。MILL1およびMILL2ともに β 2ミクログロブリンと共沈した（右側）。PI-PLC処理上清についてもウエスタンブロット法を行い、MILLが期待通りに遊離していることを確認した（左側）。

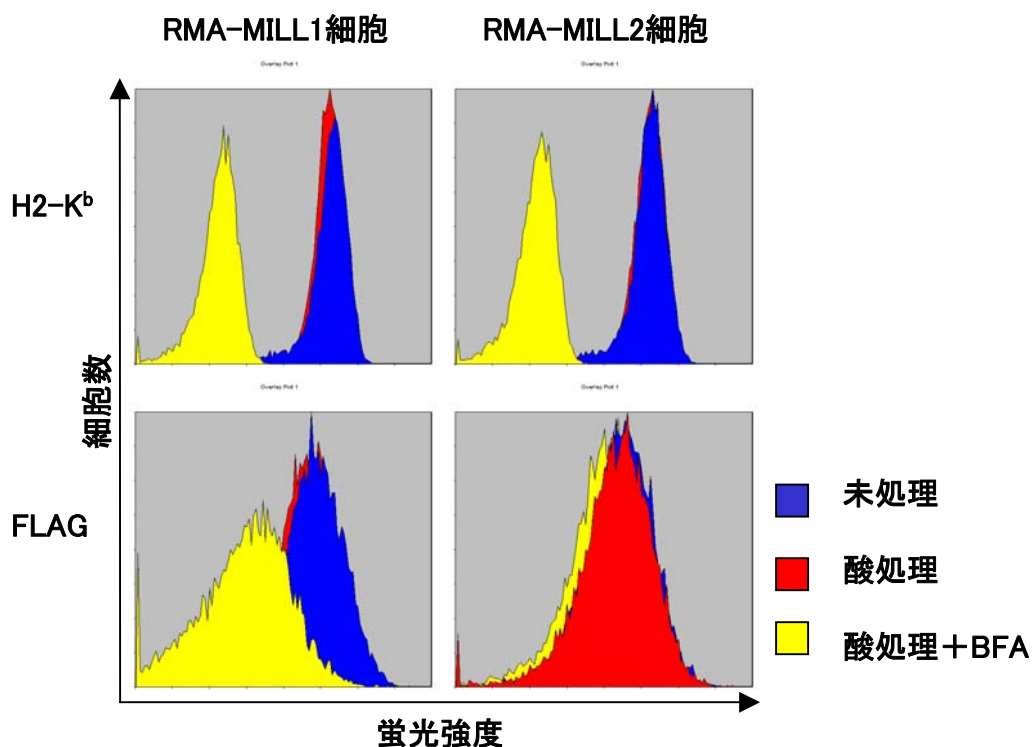


図3-7 細胞表面MILLの酸処理による発現量変化の解析

RMA-MILL1細胞（左）およびRMA-MILL2細胞（右）を4℃において酸（pH3.0）処理し、その後BFAを含む培地で6時間、37℃で培養した後、抗H2-K^b抗体（上段）もしくは抗FLAG抗体（下段）を用いたフローサイトメトリー解析を行った。酸処理後、BFAにより新規合成された膜タンパク質の輸送を停止した場合（黄色のヒストグラム）、H2-K^bは発現量が大きく減少した。MILL1はわずかに減少した。MILL2はほぼ減少しなかった。

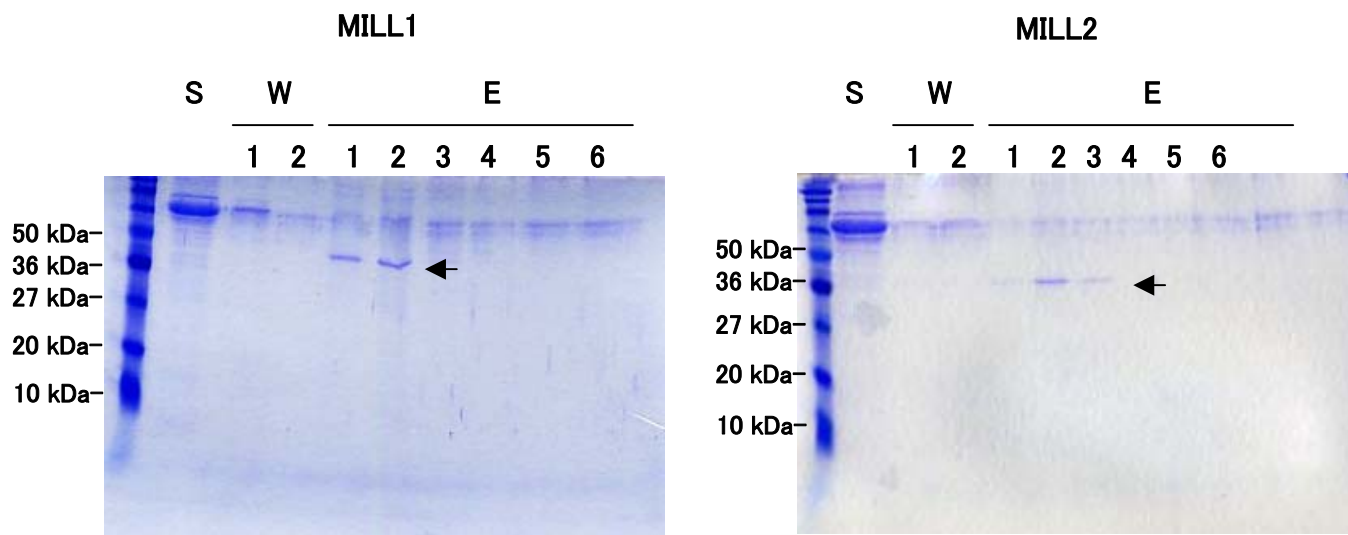


図3-8 ヒト細胞を用いた可溶型マウスMILLの発現

ヒスチジンタグ付のマウスMILL1およびマウスMILL2の $\alpha 1$ ドメインから $\alpha 3$ ドメインを可溶型としてHEK293S GnTI⁻細胞の培養上清に分泌させた。上清に含まれるMILLをニッケル-NTA樹脂に吸着させ、二回の洗浄の後、500 mMのイミダゾール緩衝液で溶出した。精製の確認はアクリルアミド濃度15%のSDS-PAGEおよびCBBR染色で行った（上段がMILL1、下段がMILL2）。各ウェルについては、Sが培養上清、W1およびW2が洗浄画分、E1～6が溶出画分である。一番左のレーンはサイズマーカー。矢印が精製されたMILLであるが、MILL1・MILL2ともに $\beta 2$ ミクログロブリンは結合していなかった。

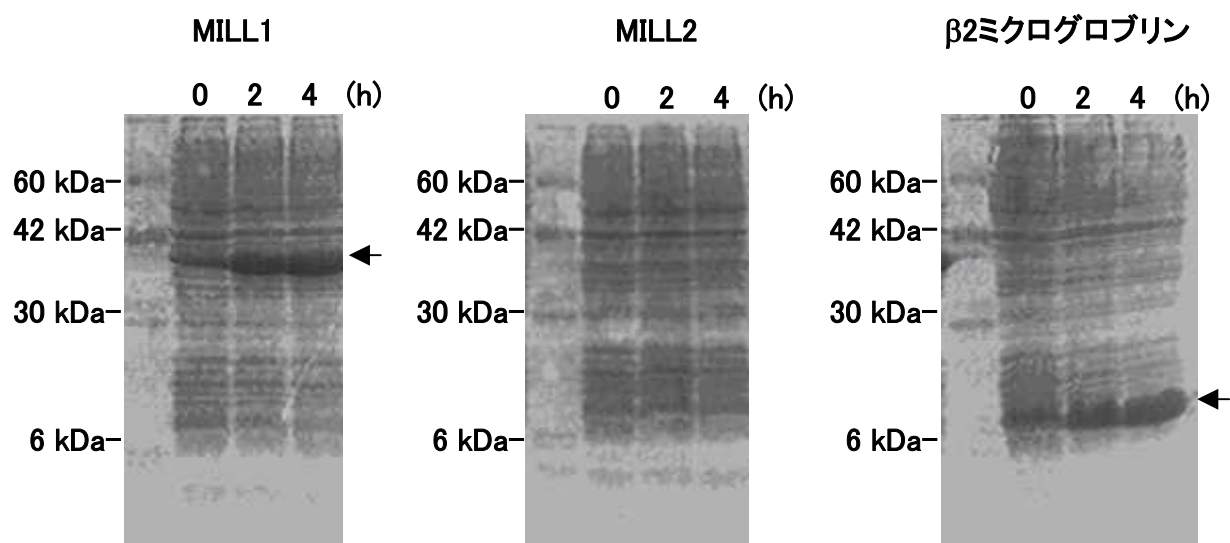


図3-9 大腸菌における可溶型マウスMILLおよびマウスβ2ミクログロブリンの発現誘導

マウス MILL1 および MILL2 の $\alpha 1$ ドメインから $\alpha 3$ ドメインまでを大腸菌 BL21(DE3)pLysS株に発現させた。IPTGにより0、2、および4時間の誘導を行った。それぞれの時間における菌体の全タンパク質を15%アクリルアミド濃度のSDS-PAGEで分離しCBBR染色を行った。左端レーンはサイズマーカー。矢印が目的タンパク質。MILL1（左）およびβ2ミクログロブリン（右）は誘導時間依存的に大量に発現したが、MILL2（中央）はこの段階では確認できなかった。

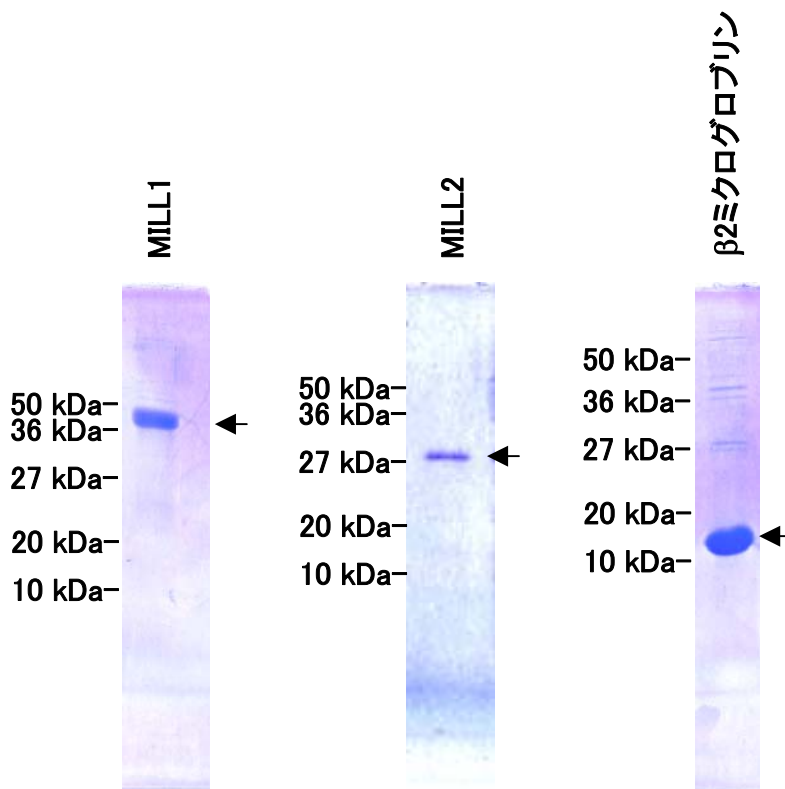


図3-10 可溶型MILLおよびβ2ミクログロブリンを発現させた大腸菌からの封入体画分の精製

大腸菌BL21(DE3)pLysSにおいて発現させたMILLおよびβ2ミクログロブリンは、封入体を形成した。菌体は超音波破碎と界面活性剤処理を行い、封入体を界面活性剤不溶性の沈殿画分として回収した。精製の確認のため、それぞれ15%アクリルアミド濃度のSDS-PAGEを行いCBBR染色により検出した。矢印が目的タンパク質である。封入体はほぼ単一の目的タンパク質で構成されていた。

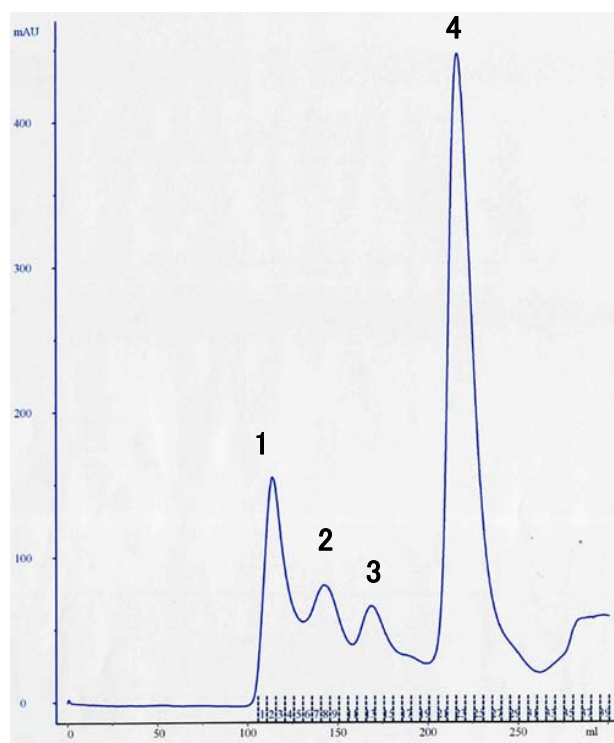


図3-11 可溶型MILL1のゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

大腸菌BL21(DE3)pLysS株で封入体として発現したMILL1を、 β 2ミクログロブリンと共に希釈法により巻き戻し、濃縮後にHiLoad 26/60 Superdex 75 prep gradeカラムによるゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。青のクロマトグラムは吸光度を示す。分離されたピークについて、溶出の早いものから順にピーク1、2、3、4とした。

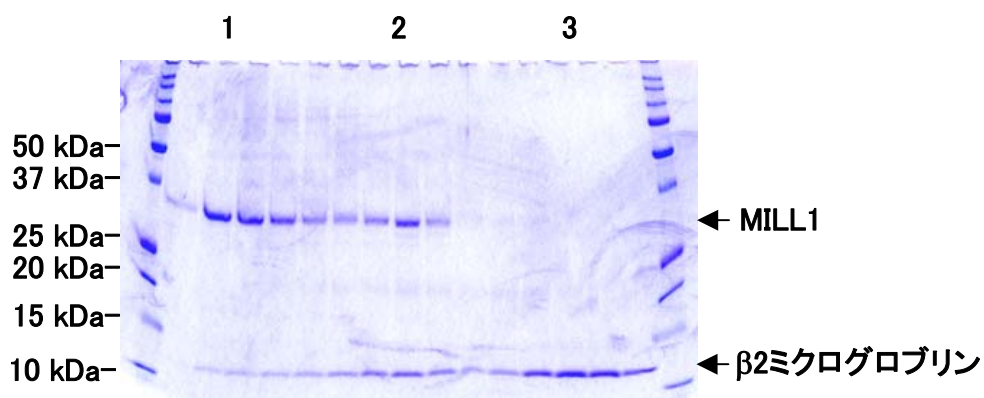


図3-12 SDS-PAGEによる可溶型MILL1溶出画分の確認

図3-11のゲルろ過クロマトグラフィーによる溶出画分のうち、ピーク1からピーク3までを含む画分について12.5%アクリルアミド濃度のSDS-PAGEおよびCBBR染色を行った。レーン上の数字はクロマトグラムのピーク番号を示す。左右端のレーンはサイズマーカー。MILL1とβ2ミクログロブリンの複合体がピーク2であることが確認された。

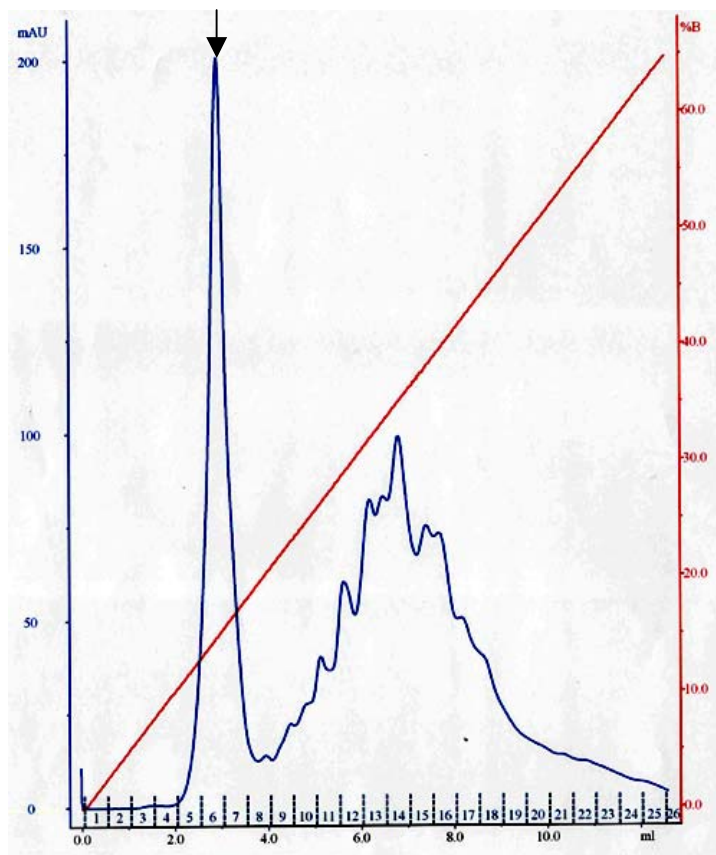


図3-13 可溶型MILL1の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

ゲルろ過クロマトグラフィー後のMILL1について、Resource Qカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーにより最終精製を行った。A液（20 mM Tris-塩酸、pH 8.0）からB液（20 mM Tris-塩酸、1 M 塩化ナトリウム、pH 8.0）の直線的濃度勾配による吸着タンパク質の溶出を行った。青のクロマトグラムは280 nmの吸光度、赤のクロマトグラムはB液の濃度を示す。20%のB液濃度付近（200 mM 塩化ナトリウム）にMILL1と β 2ミクログロブリンの複合体のピーク（矢印）を得た。

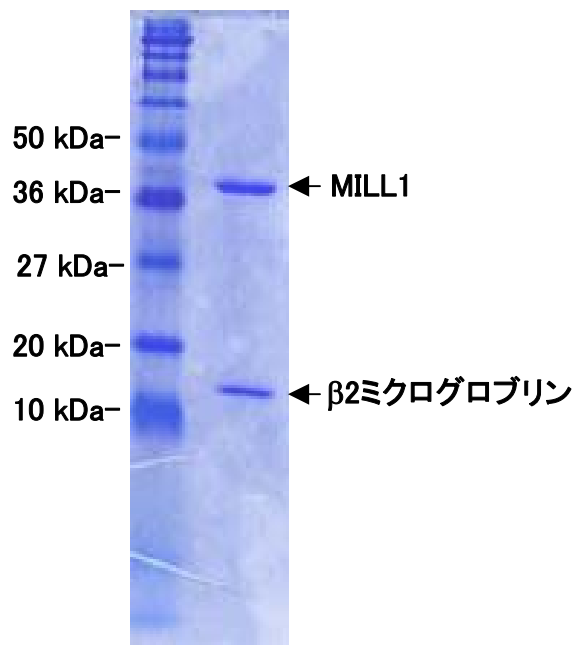


図3-14 可溶型MILL1のSDS-PAGEによる精製確認

陰イオン交換クロマトグラフィー後のMILL1について、15%アクリルアミド濃度のSDS-PAGEを行い、続いてCBBR染色を行った。左レーンにはサイズマーカー。MILL1とβ2ミクログロブリンの他にバンドは確認できない。

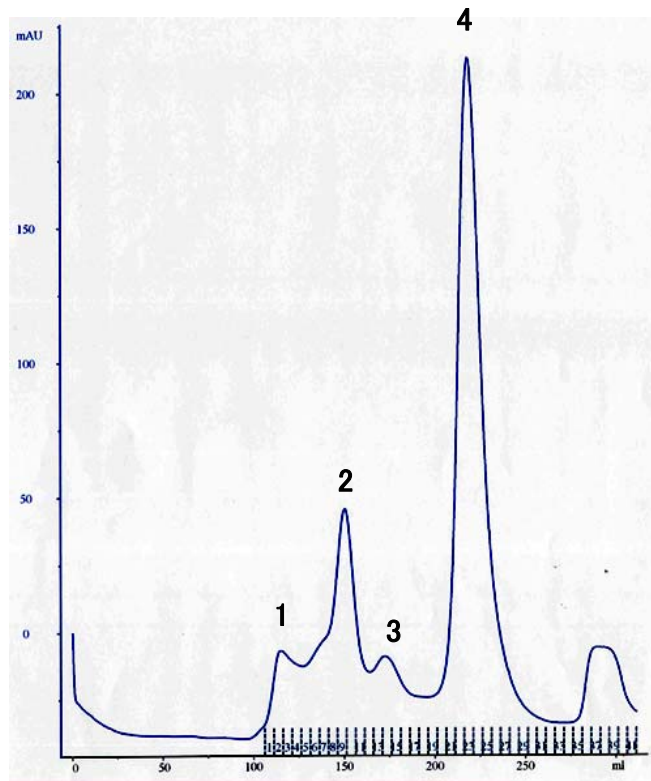


図3-15 可溶型MILL2のゲルろ過クロマトグラフィーによる精製

大腸菌BL21(DE3)pLysS株で封入体として発現したMILL2を、 β 2ミクログロブリンと共に希釈法により巻き戻し、濃縮後にHiLoad 26/60 Superdex 75 prep gradeカラムによるゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。青のクロマトグラムは吸光度を示す。分離されたピークについて、溶出の早いものから順にピーク 1、2、3、4とした。

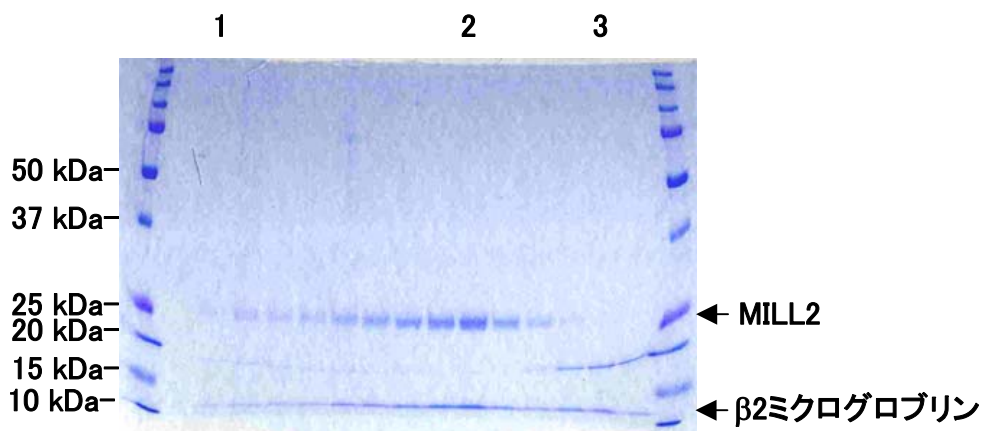


図3-16 SDS-PAGEによる可溶型MILL2溶出画分の確認

図3-15のゲルろ過クロマトグラフィーによる溶出画分のうち、ピーク1からピーク3までを含む画分について12.5%アクリルアミド濃度のSDS-PAGEおよびCBBR染色を行った。レーン上の数字はクロマトグラムのピーク番号を示す。左右端のレーンはサイズマーカー。MILL2とβ2ミクログロブリンの複合体がピーク2であることが確認された。

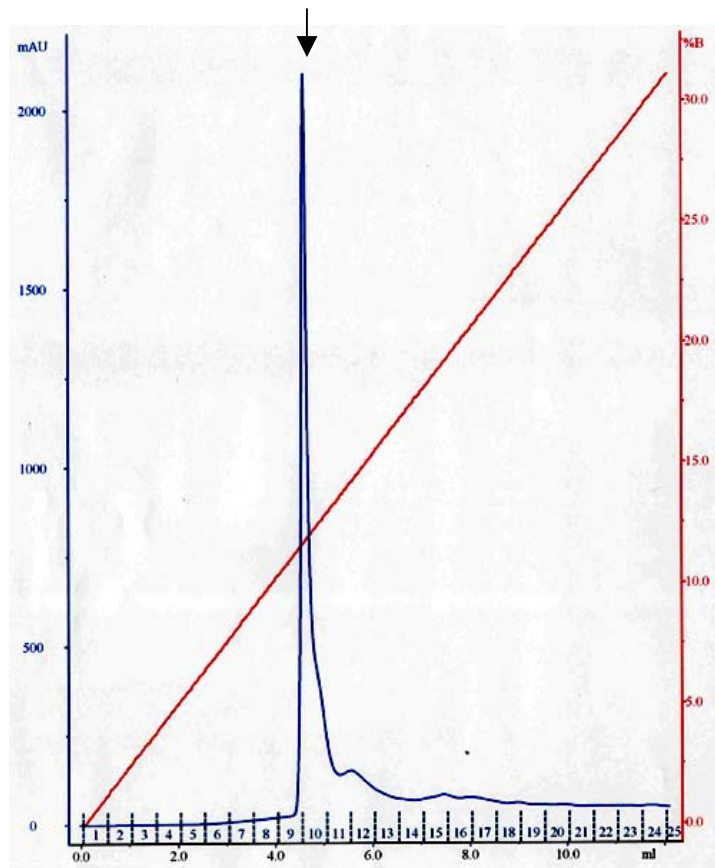


図3-17 可溶型MILL2の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

ゲルろ過クロマトグラフィー後のMILL2について、Resource Qカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーにより最終精製を行った。A液（20 mM Tris-塩酸、pH 9.0）からB液（20 mM Tris-塩酸、1 M 塩化ナトリウム、pH 9.0）への直線的濃度勾配による吸着タンパク質の溶出を行った。青のクロマトグラムは280 nmの吸光度、赤のクロマトグラムはB液の濃度を示す。40%のB液濃度付近（400 mM 塩化ナトリウム）にMILL2と β 2ミクログロブリンの複合体の単一ピーク（矢印）を得た。

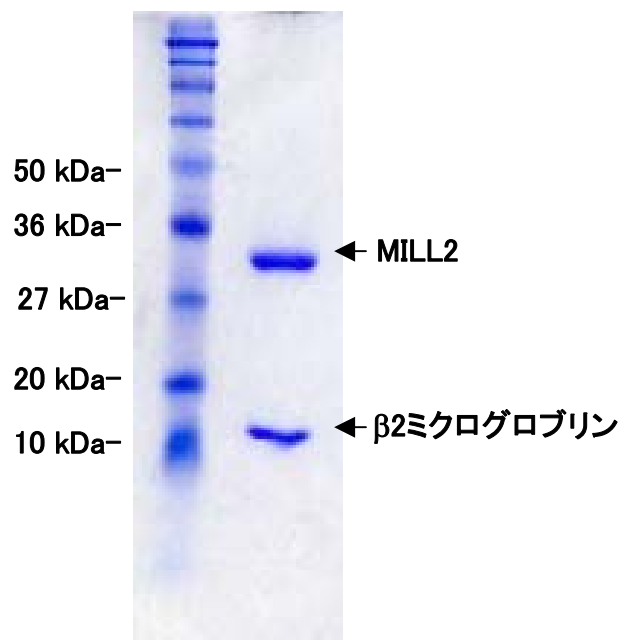


図3-18 可溶型MILL2のSDS-PAGEによる精製確認

陰イオン交換クロマトグラフィー後のMILL2について、15%アクリルアミド濃度のSDS-PAGEを行い、続いてCBBR染色を行った。左レーンにはサイズマーカー。MILL2とβ2ミクログロブリンの他にバンドは確認できない。

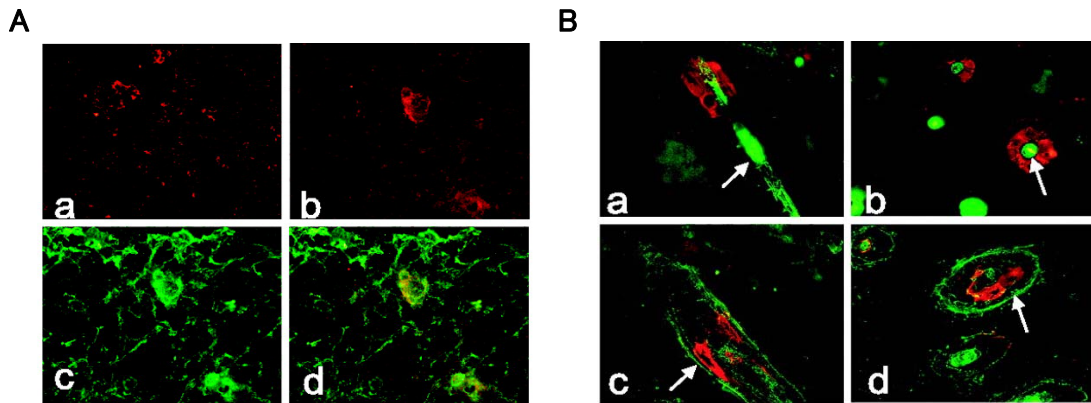


図3-19 マウス生体組織におけるMILL1の発現

BALB/cマウスの胸腺ならびに皮膚について切片を作製し、抗MILL1抗血清による染色を行い、蛍光顕微鏡で観察したもの。（A）は3日齢の胸腺組織の染色像で、赤色がMILL1、緑色がサイトケラチンを示す。aは低出力、bおよびcは高出力の顕微鏡写真。dはbおよびcを重ね合わせたもの。MILL1は胸腺の髄質細胞に観察された。（B）は皮膚組織の染色像で、aおよびcが3日齢、bおよびdが10日齢由来。赤色がMILL1、緑色がサイトケラチンを示す。aおよびbの矢印は毛皮質、cおよびdの矢印は外毛根鞘を示す。MILL1は皮膚毛包内毛根鞘に観察された。北海道大学大学院医学研究科の馬場智久博士との共同研究による。

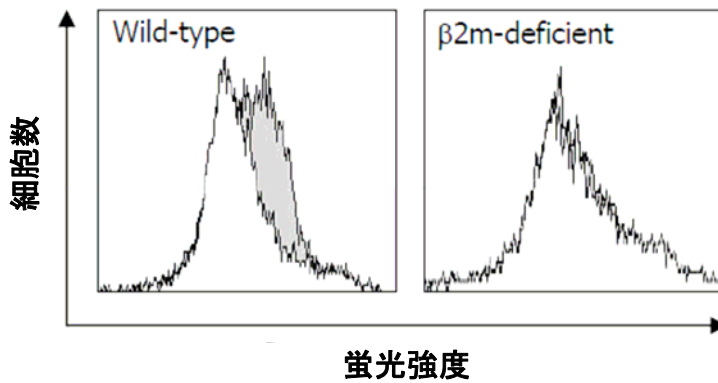


図3-20 β 2ミクログロブリンノックアウトマウスにおけるMILL1の発現

正常C57BL/6マウス（左）および β 2ミクログロブリンノックアウトマウス（右）の胸腺髄質細胞を単離し、抗MILL1抗血清を用いたフローサイトメトリーによりMILL1の細胞表面発現を解析したもの。白いヒストグラムは未染色、灰色のヒストグラムは抗MILL1抗血清により染色した細胞群。 β 2ミクログロブリンノックアウトマウスでは抗MILL1抗血清による染色細胞が観察されなかった（未染色時と染色時でヒストグラムが重なっている）。北海道大学大学院医学研究科の外丸詩野講師、近畿大学医学部免疫学教室の宮澤正顕教授および河原佐智代講師との共同研究による。

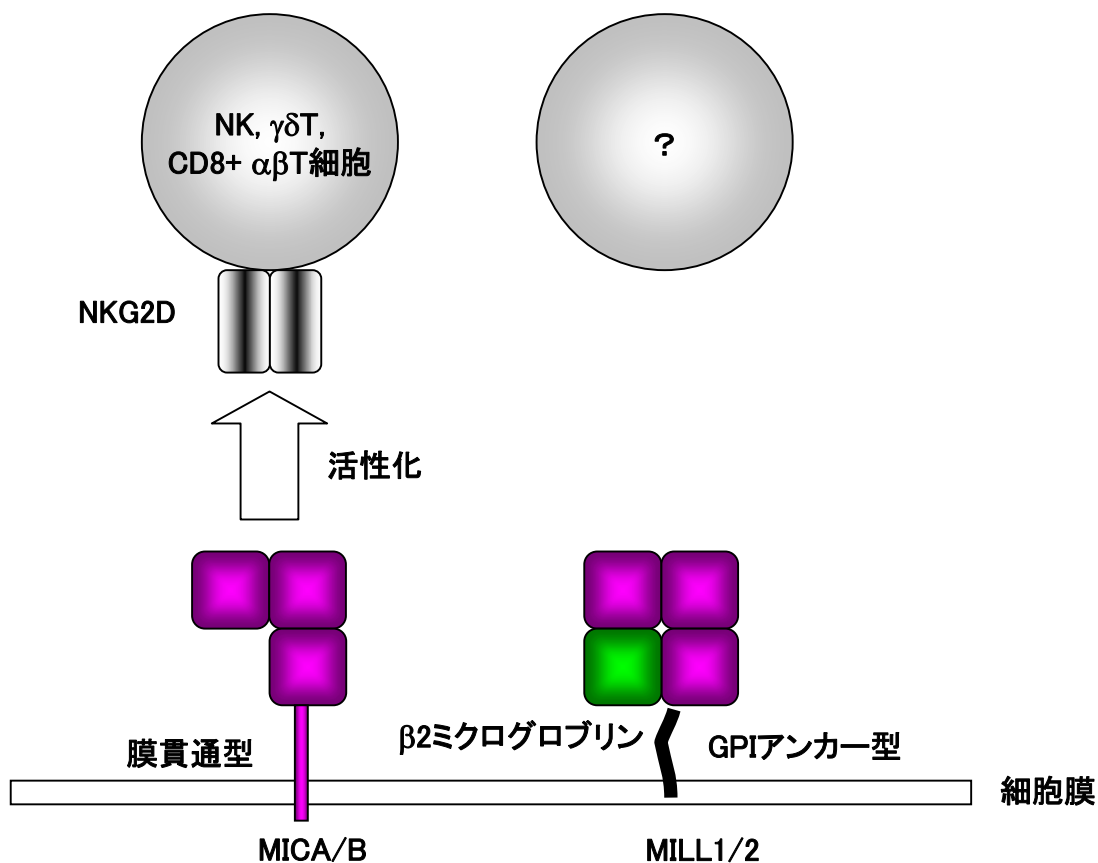


図4 MILLとMICの性質比較

本研究において、MILLの生化学的性質がMICA/Bファミリーとは異なっていることが明らかになった。MILL1およびMILL2はTAP非依存的で β 2ミクログロブリンと相互作用するGPIアンカー型の膜タンパク質であったことに対し、MICA/BはTAP非依存的で β 2ミクログロブリンと相互作用しない、膜貫通型のタンパク質である。MICA/Bの主な機能はリガンドのNKG2Dを介してNK細胞やT細胞へ活性化シグナルを導入することであるが、MILLについてはリガンドとなる分子や細胞などはわかっていない。

表1 ヒトとマウスの主なMHCクラスIbファミリー

MHCクラスIb	ヒト遺伝子の染色体局在	マウス遺伝子の染色体局在	B2ミクログロブリンとの結合	相互作用分子	結合低分子	機能
CD1a、b、c	1q22-q23	欠損	あり	$\alpha\beta$ TCR	糖脂質	マイコバクテリア由来抗原のT細胞への提示
CD1d	1q22-q23	3F1	あり	Semi invariant TCR	イソグロボトリヘキシシルセラミド	NKT細胞の活性化
MR1	1q25.3	1H1	あり	TCR ?	?	MAIT細胞の活性化
MICA/B	6p21.3	欠損	なし	NKG2D	なし	NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD8+ $\alpha\beta$ T細胞の活性化
HFE	6p21.3	13A2-A4	あり	トランスフェリン受容体	なし	消化管からの鉄の吸収調節
AZGP1	7q22	5G2	なし	?	脂肪酸 ?	脂肪異化
FCGRT	19q13.3	7B3	あり	IgG	なし	IgGの腸上皮横断輸送と血中濃度調節
PROCR	20q11.2	2H1-3	なし	プロテインC	?	プロテインC凝固制御系の活性を増強
ULBP/RAE-1	6q25	10A3	なし	NKG2D	なし	NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD8+ $\alpha\beta$ T細胞の活性化
MILL1、MILL2	欠損	7A2	あり	?	なし?	?
HLA-E	6p21.3	17B1 (Qa-1)	あり	CD94/NKG2A、CD94/NKG2C	MHCクラスI分子シグナル配列由来ペプチド	NK細胞の活性調節
HLA-F	6p21.3	欠損	あり	LILRB1、LILRB2 ?	?	NK細胞の活性調節 ?
HLA-G	6p21.3	?	あり	LILRB1、LILRB2、KIR2DL4 ?	ペプチド	NK細胞の活性調節
H2-M3	欠損	17B1	あり	$\alpha\beta$ TCR	N-ホルミル化ペプチド	細菌由来のペプチドの提示
H2-M1、H2-M10	欠損	17B1	あり	V2Rフェロモン受容体	?	V2Rフェロモン受容体の細胞表面への輸送