

## 論文内容の要旨

### 論文題目

# Studies on the recognition of MHC class I molecules by the NK cell receptor Ly49A (NK細胞レセプターLy49AによるMHCクラスI認識に関する研究)

氏名 三ツ木 元章

### 序論

ナチュラルキラー(NK)細胞は、細胞傷害活性をもつリンパ球であり、NK 細胞表面上の活性化レセプターと抑制性レセプターによって、その傷害活性が制御されている。NK 細胞の自己・非自己認識には、細胞表面上に発現している主要組織適合性複合体(MHC)クラス I 分子が重要であることが明らかになってきた。MHC クラス I 分子は核や細胞質由来のペプチドを細胞表面上に提示するための分子であり、重鎖、 $\beta_2$ -ミクロglobulin( $\beta_2m$ )、そして 8-9 アミノ酸のペプチドから構成されている。

マウス NK 細胞レセプターLy49A は、C タイプレクチン様構造をもち、NK 細胞の細胞傷害を抑える抑制性レセプターである。Ly49A は、MHC クラス I 分子 H-2D<sup>d</sup>、H-2D<sup>k</sup>、そして H-2D<sup>p</sup> を認識することが明らかにされたが、その MHC クラス I 上の認識部位は同定されていなかった。そこで、Ly49A が認識する H-2D<sup>d</sup> 分子上の領域を同定することを目的に研究を開始した。研究を遂行している最中に発表された Ly49A/H-2D<sup>d</sup> 複合体の結晶構造解析の結果は、H-2D<sup>d</sup> 一分子に対して、Ly49A ホモダイマーが二つの領域(サイト 1、2)に結合することが示された(図 1)。彼らは、サイト 1 には多型を示す残基が含まれるのに対して、サイ

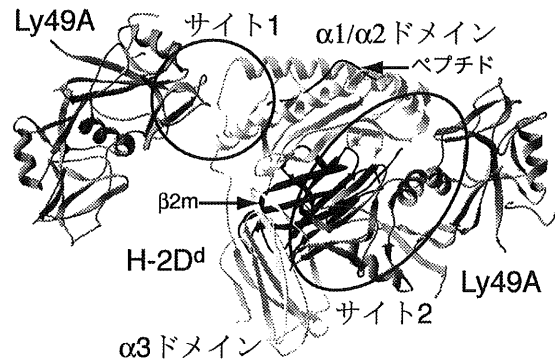


図 1. Ly49A と H-2D<sup>d</sup> 複合体結晶解析

Ly49A と H-2D<sup>d</sup> の複合体(PBD 1QO3)をリボンモデルで表した。サイト 1 は H-2D<sup>d</sup> の $\alpha 1/\alpha 2$  ドメイン、サイト 2 は $\alpha 1/\alpha 2$ 、 $\alpha 3$  ドメイン、 $\beta_2m$  にまたがる領域である。

が示された(図 1)。彼らは、サイト 1 には多型を示す残基が含まれるのに対して、サイ

ト 2 には含まれないなどの理由から、 $\beta_2m$  が関与しないサイト 1 が機能的結合部位であると予想した。しかしながら、抗マウス $\beta_2m$  抗体が Ly49A と H-2D<sup>d</sup> の相互作用を阻害すること、さらにヒト $\beta_2m$  と結合した H-2D<sup>d</sup> は Ly49A により認識を受けない結果 (発表論文 1) は、 $\beta_2m$  が Ly49A による H-2D<sup>d</sup> 認識に関与していることを示していた。

私は、Ly49A が認識する MHC クラス I 分子上の残基を同定することを目的に、様々な MHC クラス I 分子変異体を作成して解析を行った。

## 結果と考察

### 1. Ly49A による H-2D<sup>d</sup> 重鎖上の認識部位の同定

Ly49A が認識する H-2D<sup>d</sup> 重鎖上の領域を決めるために、H-2D<sup>d</sup> 重鎖に種々の Ala 点変異を導入した Ala 置換 H-2D<sup>d</sup> 変異体を作成した。点変異導入にあたって、その側鎖が分子表面上に露出し、Ly49A との結合が可能と考えられる残基を選んだ。それぞれの残基の単変異体を作成したほか、サイト 1 については二重変異体も作成した。H-2D<sup>d</sup> を発現しないマウス T リンパ腫細胞株 C1498 に、H-2D<sup>d</sup> 変異体を安定発現させ、野生型 H-2D<sup>d</sup> を発現させた細胞と同程度の H-2D<sup>d</sup> 発現量を示すクローンを得た。

Ly49A と H-2D<sup>d</sup> 変異体発現細胞との物理的結合を可溶性 Ly49A を用いて H-2D<sup>d</sup> 変異体発現細胞との結合を測定することにより調べた。可溶性 Ly49A は野生型 H-2D<sup>d</sup> 発現細胞に結合したが、R6A、D122A、K243A の各

H-2D<sup>d</sup> 変異体発現細胞には全く結合を示さなかった。さらに Ly49A による H-2D<sup>d</sup> 変異体の認識が機能的なものかを調べた。H-2D<sup>d</sup> 変異体発現細胞を標的細胞として、Ly49A 陽性 NK 細胞による傷害試験を行った (図 2)。Ly49A との結合が見られなかった、R6A、D122A、K243A の各変異体発現細胞は Ly49A を介した傷害抑制効果が全く見られなかった。この結果は、Arg6、Asp122 と Lys243 の三残基を全て含むサイト 2 が Ly49A による機能的認識部位であることを示す。

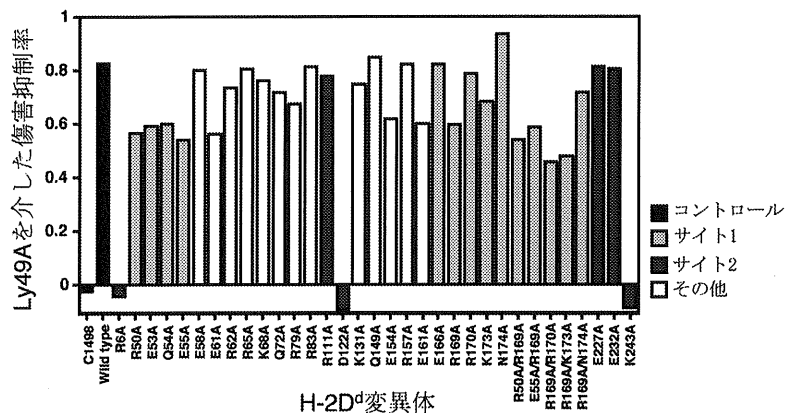


図 2. H-2D<sup>d</sup> 変異体発現細胞に対する Ly49A<sup>+</sup> NK 細胞の傷害活性  
縦軸は Ly49A を介した Ly49A<sup>+</sup> NK 細胞の傷害抑制率、横軸は H-2D<sup>d</sup> 変異体を表す。黒はコントロール、薄い灰色はサイト 1 に含まれる残基の変異体、濃い灰色はサイト 2 に含まれる変異体、白はその他の領域に含まれる変異体を示す。

### 2. Ly49A による MHC クラス I 分子内の $\beta_2m$ に対する認識部位の同定

Ly49A による H-2D<sup>d</sup> 内の $\beta_2m$  に対する認識部位の同定を試みたが、技術上の問題により実験系の構築が出来なかった。そこで、Ly49A のもうひとつのリガンド分子 H-2D<sup>k</sup> を用いて調べた。Ly49A は、構成成分である $\beta_2m$  をマウスからヒトへと交換された H-2D<sup>d</sup> を認識出来なくなる。Ly49A による H-2D<sup>k</sup> 認識においてもこの種特異性が見られるかを調べた。

マウス細胞株 R1.E は、H-2D<sup>k</sup> 重鎖を持っているが、 $\beta_2m$  遺伝子欠損のため、H-2D<sup>k</sup> 分子が

作られず、細胞表面上に H-2D<sup>k</sup> を発現していない。この細胞にマウスあるいはヒトの野生型β<sub>2</sub>m 遺伝子を強制発現させると、マウスあるいはヒトβ<sub>2</sub>m は内在する H-2D<sup>k</sup> 重鎖と結合し、細胞表面上に H-2D<sup>k</sup> を誘導させた。これら、変異体β<sub>2</sub>m 発現細胞をもちいて Ly49A 陽性 NK 細胞による傷害性試験を行った。マウスβ<sub>2</sub>m を構成要素として持つ H-2D<sup>k</sup> を発現する細胞に対する、Ly49A 陽性 NK 細胞による傷害は Ly49A を介して抑制されたのに対し、ヒトβ<sub>2</sub>m を構成要素として持つ H-2D<sup>k</sup> を発現する細胞に対しては、Ly49A を介した傷害の抑制は見られなかった (図 3)。この結果は H-2D<sup>d</sup> 同様、H-2D<sup>k</sup> においても構成成分であるβ<sub>2</sub>m の種特異性が、Ly49A による認識に重要な役割をしいることを示している。

そこで、このβ<sub>2</sub>m の種特異性を決めている残基の同定を行った。Ly49A は、H-2D<sup>d</sup> 内のβ<sub>2</sub>m をマウスまたはラットβ<sub>2</sub>m と交換しても認識するのに対し、ヒトあるいはウシβ<sub>2</sub>m に交換すると認識しないことが知られている。そこで、(a)マウスとラットで保存され、ヒトとウシでは異なっている (b) H-2D<sup>d</sup> の分子表面上に側鎖が露出している、の二つの条件を満たす 6 残基(Lys3、Gln6、Gln29、Thr75、Glu89、Thr92)を選んだ。これらのアミノ酸残基をそれぞれヒトβ<sub>2</sub>m で用いられているアミノ酸残基へ置換したマウスβ<sub>2</sub>m 変異体を作成した。さらに、Ly49A/H-2D<sup>d</sup> 複合体で Ly49A と水素結合を形成しているβ<sub>2</sub>m の Lys58 を Ala へ置換したマウスβ<sub>2</sub>m 変異体も併せて作成し R1.E 細胞に安定発現させた。細胞表面上へ H-2D<sup>k</sup> を誘導したβ<sub>2</sub>m 変異体発現 R1.E 細胞を用い、Ly49A 陽性 NK 細胞による傷害

性試験を行った。その結果 K58A(mβ<sub>2</sub>m)変異体発現細胞への Ly49A 陽性 NK 細胞の細胞傷害活性の抑制は完全に失われたことから、Lys58 は Ly49A による H-2D<sup>k</sup> 認識に必要な残基であることが明らかとなった。さらに、Q29G(mβ<sub>2</sub>m)変異体細胞への細胞傷害活性の抑制は部分的に失われたことから、Gln29 は Ly49A による認識に関与していることが示唆された。

Ly49A/H-2D<sup>d</sup> 複合体では、マウスβ<sub>2</sub>m 上の Gln29 と Lys3 はともに Ly49A と水素結合を形成しており、Gln29 の側鎖と Lys3 の側鎖は近接している。K3R(mβ<sub>2</sub>m)変異体は R1.E 細胞上へ H-2D<sup>k</sup> の発現を誘導出来なかったが、Lys3 も Ly49A との結合に関与しているのではないかと考え、Lys3 ならびに Gln29 を、それぞれヒトβ<sub>2</sub>m で用いられている残基に置換した二重変異体 K3R/Q29G(mβ<sub>2</sub>m)を作成し R1.E 細胞に強制発現させた。この変異体発現細胞を用いた細胞傷害性試験の結果、Ly49A を介した傷害抑制は見られなかった (図 3)。この結果は Lys3 と Gln29 が Ly49A による機能的認識に必要な残基であることを示唆し、さらにβ<sub>2</sub>m の種特異性を規定している残基である可能性を示唆する。

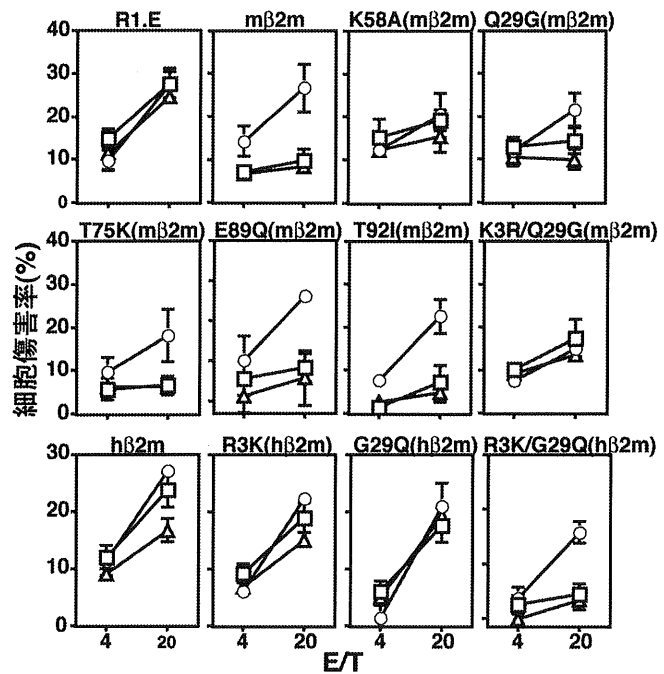


図 3.β<sub>2</sub>m 変異体発現細胞に対する Ly49A 陽性 NK 細胞の細胞傷害率

縦軸は細胞傷害率、横軸は E/T 比を表す。□は培地のみ、○は抗 Ly49A 抗体、△はコントロール抗体を添加した事を示す。R1.E は親株、その他はβ<sub>2</sub>m 変異体発現細胞を表す。mβ<sub>2</sub>m はマウスβ<sub>2</sub>m、hβ<sub>2</sub>m はヒトβ<sub>2</sub>m 発現細胞を表す。

この可能性を逆方向から検証した。ヒト野生型 $\beta_2m$ 、R3K(h $\beta_2m$ )、G29Q(h $\beta_2m$ )発現 R1.E 細胞に対する、Ly49A を介した傷害活性は抑制されたのに対し、R3K/G29Q(h $\beta_2m$ )発現 R1.E 細胞に対する、Ly49A を介した傷害活性の抑制は見られなかった (図 3)。これらの結果は Ly49A による H-2D<sup>k</sup> 認識における $\beta_2m$  の種特異性を規定しているのは、3 番および 29 番目のアミノ酸残基であることを示す。

## まとめ

マウス抑制性 NK 細胞レセプターLy49A によって認識される MHC クラス I 上の残基を同定する事を目的とし、様々な MHC クラス I 変異体を作成し解析を行った。その結果 Ly49A による H-2D<sup>d</sup> 認識には重鎖上の Arg6、Asp122 と Lys243 が必要であることが明らかにした。また、Ly49A による H-2D<sup>k</sup> 認識は $\beta_2m$  の種に影響され、マウスとヒトの種特異性を規定している残基は 3 番目と 29 番目の残基であることを明らかにした。これらの結果は Ly49 ファミリーの MHC クラス I 認識機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。

## 発表論文

1. Matsumoto, N., Mitsuki, M., Tajima, K., Yokoyama, W.M., and Yamamoto, K. 2001. The functional Binding Site for the C-type Lectin-like Natural Killer Cell Receptor Ly49A Spans Three Domains of Its Major Histocompatibility Complex Class I Ligand. *J Exp Med* 193,147-158
2. Mitsuki, M., Matsumoto, N., and Yamamoto, K. A species-specific determinant on  $\beta_2$ -microglobulin required for Ly49A recognition of its MHC class I ligand. *Int Immunol* (in press)