

論文内容の要旨

論文題目

NK 細胞レセプターCD94/NKG2 による ヒト白血球抗原 HLA-E 認識に関する研究

(Studies on the recognition of human leucocyte antigen-E (HLA-E)
by the NK cell receptors CD94/NKG2)

氏名 和田はるか

序論

ナチュラルキラー細胞(NK 細胞)は、がん細胞やウイルス感染細胞を傷害する免疫担当細胞である。NK 細胞による標的細胞の識別機構については、NK 細胞は“自己の目印”である主要組織適合性抗原複合体(MHC)クラス I の発現を監視し、発現の低下した細胞を傷害するというMissing Self 仮説が提唱されている。実際に、自己の MHC クラス I を認識し NK 細胞に抑制のシグナルを伝達する抑制性レセプターが数多く報告されている。一方で、抑制性レセプターと同じリガンドを共有する活性化レセプターの存在も報告されているが、この活性化レセプターの役割についてはよくわかっていない。

NK 細胞レセプターの一つである CD94/NKG2 は、ほとんどすべての NK 細胞および一部の T 細胞上で発現している。NKG2 には数種類の分子種が存在することが知られており、A は抑制性レセプターとして、C は活性化レセプターとして機能するが、ともにヒト白血球抗原-E(HLA-E)を認識する。

HLA-E は重鎖、 β_2 ミクログロブリン(β_2m)、重鎖の溝に結合するペプチドの三者からなる複合体である(図 1)。重鎖は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の 3 つのドメインからなる。ペプチドは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 領域にあるペプチド結合溝に横たわっている。HLA-E は重鎖の溝に結合するペプチドとして主に他の MHC クラス I のシグナルペプチド——HLA-A、-B、-C、-G のシグナルペプチドを必要とする特殊な MHC クラス I であり、細胞表面上における HLA-E の発現量は、その細胞の MHC クラス I の発現量を反映していると考えられている。

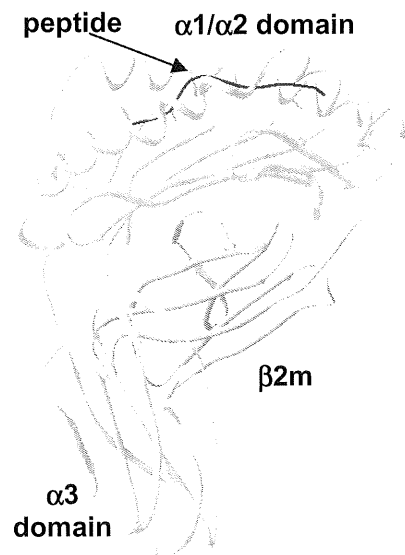


図1. HLA-Eを含むMHCクラスIの構造
HLA-Eを含むMHCクラスIの構造をリボンモデルで示した。白色は重鎖、灰色は $\beta 2m$ 、黒色は重鎖の溝に結合しているペプチドを示す。重鎖は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の3ドメインから成る。ペプチドは、重鎖の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメインに結合している。

NK 細胞は抑制性の CD94/NKG2レセプターを介して HLA-E の発現をモニターし、標的細胞上の MHC クラス I の発現の総和を監視していると考えられている。一方で活性化レセプターである CD94/NKG2C も HLA-E を結合するが、その意義については不明である。

これまでに HLA-E、CD94 ホモダイマーのそれぞれ単独の構造は明らかになっているものの、CD94/NKG2 による HLA-E 認識様式の詳細は不明である。本研究では CD94/NKG2A、C による HLA-E 上認識領域の同定、及び CD94/NKG2 による HLA-E 認識における HLA-E 重鎖に結合するペプチドの影響を解析した。CD94/NKG2A、C による HLA-E 認識には違いがあることが明らかになったことから、HLA-E 認識の違いを規定する NKG2 上残基の同定も行った。

1. CD94/NKG2A、CD94/NKG2C による HLA-E 上認識領域の同定

CD94/NKG2A、C が認識する HLA-E 上領域の同定を行うために、各種 HLA-E 変異体を作製し、ヒト CD94/NKG2A、C 発現細胞に対する結合解析を行った (図 2)。

HLA-E の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 領域に存在する残基である R65、Q72、R75、R79、D162、E166 の HLA-E 重鎖アラニン変異体および重鎖の溝に結合するペプチド (野生型: VMAPRTVLL) の 4 残基目を Lys (Pp4K)、5 残基目を Glu (Rp5E)、8 残基目を Lys (Lp8K) にした変異体で CD94/NKG2A、C への結合が低下した。これらの結果から、CD94/NKG2A、C は共に HLA-E 上の上部部——HLA-E 重鎖に結合しているペプチドを含む領域を認識していることが明らかになった (図 3)。

予期していなかったことに、HLA-E 重鎖上の D69、H155 へのアラニン変異導入は CD94/NKG2A への結合を低下させたものの、CD94/NKG2C への結合には大きな影響を与えなかった。これらの結果は、CD94/NKG2A、C は HLA-E 上のほぼ同じ領域に結合するものの、結合に関与する残基は一部異なることを示している。D69、H155 の残基はそれぞれ $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 領域の上面に存在することから、HLA-E 重鎖が結合するペプチドの種類によって、CD94/NKG2A、C による HLA-E 認識に異なる影響を与える可能性が示唆された。

以上の実験は、ヒト CD94/NKG2A、C を発現するマウス細胞トランスフェクタントと HLA-E の結合解析の結果であるが、CD94/NKG2A、C を発現するヒト NK 細胞株、ヒト末梢血由来 NK 細胞を用いた実験でも同様の傾向を示す結果を得ている。

CD94/NKG2A、C が認識する HLA-E 上領域は、NKG2D が認識する MICA 上領域と類似していた (図 3)。よって、CD94/NKG2A、C の HLA-E 結合モードは、NKG2D と MICA の結合モードと類似していること

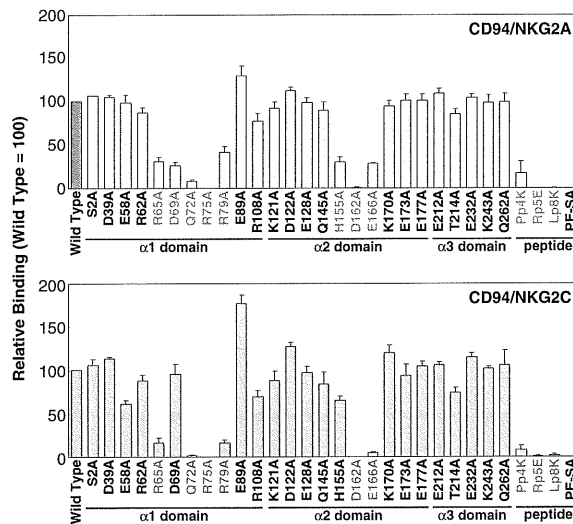


図 2. CD94/NKG2 と HLA-E の結合解析
可溶性 HLA-E アラニン点変異体を PE 標識ストレプトアビジン (PE-SA) でテトラマー化し、CD94/NKG2A (上図)、CD94/NKG2C (下図) への結合を解析した。結合の割合は以下の式で標準化した。(HLA-E 変異体の結合 - PE-SA の結合) / (野生型 HLA-E の結合 - PE-SA の結合) × 100。

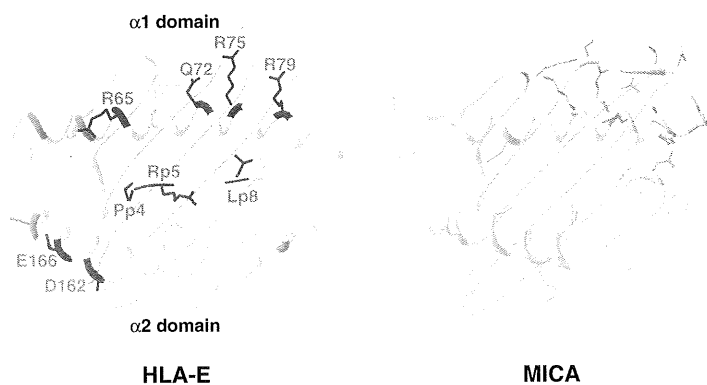


図 3. CD94/NKG2 が認識する HLA-E 上領域

HLA-E の $\alpha 1/\alpha 2$ 領域の上面をリボンモデルで示した (左)。アラニン点変異を導入した残基を水色、ピンク色、黄色で示した。また、CD94/NKG2A、C への結合に影響があった残基の側鎖を表示し、ピンク色で示した。ただし、CD94/NKG2A への結合のみに影響があった残基については黄色で示した。NKG2D-MICA 複合体をリボンモデルで示した (右)。NKG2D が結合する MICA 上の残基を緑色、藤色で着色した残基は。

が予想される。NKG2D はホモダイマーであるが、CD94/NKG2 はヘテロダイマーであるので、CD94/NKG2 と HLA-E の結合の方向性は 2 通り考えられる。CD94 ホモダイマー単独、HLA-E 単独の X 線結晶構造解析によると(図 4)、CD94、HLA-E $\alpha 1$ 領域にそれぞれ疎水性領域があり、また CD94 には酸性領域、HLA-E の $\alpha 1$ 領域には塩基性領域が存在する。これらの領域同士がそれぞれ疎水的、静電的に結合すると推測され CD94 は HLA-E の $\alpha 1$ 領域側に結合する可能性が示唆された。

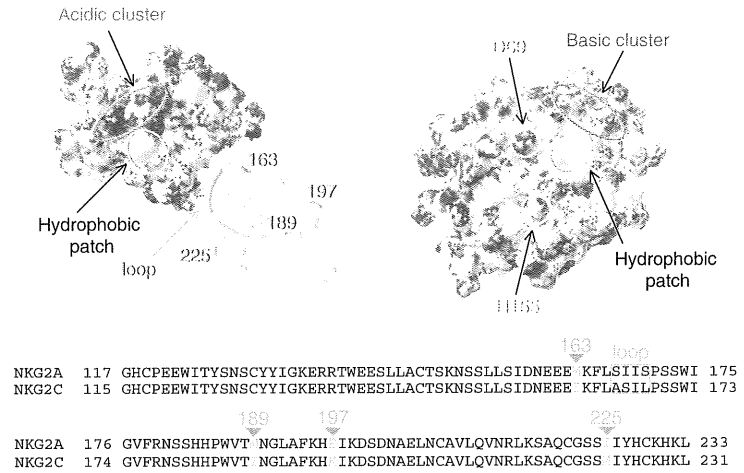


図 4. CD94/NKG2A モデルと HLA-E サーフェイスモデル
CD94 (A)、HLA-E (B) はサーフェイスモデルを、NKG2A はリボンモデル (A) を示した。また、NKG2A、C のレクチン様ドメインのアミノ酸配列を示した。

2. HLA-E 認識の違いを規定する NKG2 上残基の同定

HLA-E 認識の違いを規定する NKG2A、C 上残基を明らかにするため、NKG2A と異なる NKG2C の残基を NKG2A に導入した NKG2A 変異体を発現する細胞株を樹立し、各種 HLA-E 変異体との結合を解析した。

NKG2A 上の M163、M189、E197、I225 をそれぞれ NKG2C 型に置換した NKG2A 単変異体の野生型 HLA-E への結合は大きくは変化しなかった。また、loop3 の変異体を除く上記 4 つの NKG2A 単変異体は、野生型 CD94/NKG2A と同じ HLA-E 変異体の結合パターンを示した。この結果から、HLA-E 認識の違いを規定する NKG2A、C 上残基は loop3 であることが予想された。しかし、loop3 の置換により野生型 HLA-E の結合能が著しく低下した。そこで、loop3 以外の他の残基の置換によって、loop3 に起因する HLA-E への結合の低下が相補される可能性を考え、loop3 に加えさらに別の残基も NKG2C 型に置換した NKG2A 二重変異体を作製し、HLA-E との結合解析を行なった。

すべての NKG2A 二重変異体で、程度の差はあるものの野生型 HLA-E との結合が回復した。この結果は loop3 に起因する結合の低下分をこれらの残基が相補する効果をもっていることを示している。また NKG2A 二重変異体と HLA-E 変異体との結合解析の結果、すべての NKG2A 二重変異体で野生型 CD94/NKG2C と同様の HLA-E 変異体の結合パターンを示した。これらの結果から、CD94/NKG2A、C による HLA-E 認識の違いは NKG2 上の loop3 によって規定されていることが明らかになった。興味深いことに、loop3 は抑制性の NKG2 レセプターでは SIIS、活性化では ASIL というアミノ酸配列が保存されており、NKG2 上の loop3 は HLA-E 認識における要衝であると考えられる。

3. HLA-E 重鎖に結合するペプチド 4 残基目が CD94/NKG2 への結合に及ぼす影響の解析

CD94/NKG2A モデルを HLA-E に重ね合わせると NKG2A の loop3 はちょうど HLA-E の D69、H155 の残基に重なる。この D69、H155 のアラニン変異体は CD94/NKG2A、C に対する結合に異なる影響を与えたが、そのような HLA-E 変異体は自然界には存在しない。しかし、HLA-E 重鎖に結合するペプチドとしては、MHC クラス I 由来のもの以外にもさまざまなペプチドを結合できることが示されており、ペプチドの種類によって HLA-E には多様なバリエーションが存在することになる。

D69、H155 の 2 残基は、それぞれ $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 領域上面の α ヘリックス中央にあり、HLA-E 重鎖が結合するペプチドの 4 残基目を挟むところに位置している。そこで、HLA-E 重鎖が結合するペプチドの 4 残基目を各種アミノ酸に置換した HLA-E と、CD94/NKG2A、C との結合を解析した(図 5)。

ペプチド 4 残基目を Ala、Lys、Met、Arg に置換した HLA-E は CD94/NKG2A、C に対しての結合が著しく低下したが、His、Trp に置換した HLA-E は、CD94/NKG2A、C に対しての結合が野生型(Pro)よりも増強された。特に、His に置換した HLA-E では、CD94/NKG2C への結合が顕著に増加したことから、HLA-E に結合するペプチド次第では、CD94/NKG2C に選択的に結合する HLA-E (ペプチド)が存在する可能性が示唆された。CD94/NKG2A によっては認識されないが、CD94/NKG2C により認識されるような HLA-E(ペプチド)、例えば、がん化やストレス負荷に伴って産生されるような HLA-E(ペプチド)が存在すれば、NK 細胞による異常細胞検知という点で非常に合理的であり、興味深い。

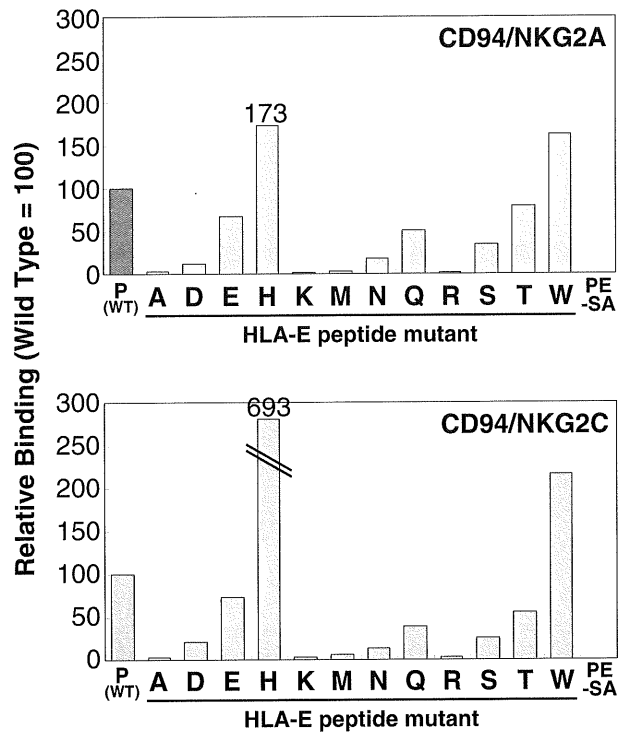


図 5. HLA-E 重鎖に結合するペプチド 4 残基目の変異体と CD94/NKG2 への結合

HLA-E 重鎖が結合するペプチドの 4 残基目をさまざまなアミノ酸に変化させたペプチドを用いて可溶性 HLA-E を作製し、CD94/NKG2A、CD94/NKG2C への結合を解析した。結合は図 2 と同様の方法で標準化した。

結論

CD94/NKG2A、C はともに HLA-E のペプチドを含む $\alpha 1/\alpha 2$ 領域上面を認識するものの、結合に関与している HLA-E 上残基が一部異なっていることが明らかになった。

HLA-E 重鎖に結合するペプチド次第では CD94/NKG2A、C による HLA-E の認識に異なる影響を与え、特に CD94/NKG2C に選択的に結合する HLA-E(ペプチド)が存在する可能性が示唆された。

CD94/NKG2A、C による HLA-E 認識の違いは NKG2 上の loop3 の違いに起因していることが明らかになった。