

免疫系レセプター群の蛋白質間分子認識解明を目指したX結晶構造解析データの収集

●前仲 勝実

九州大学生体防御医学研究所

〈研究の目的と進め方〉

ゲノム解析の進展により人間の病理に関わる多くの細胞表面レセプター群が見出されてくると、現在全体の約半数近くを占めている免疫グロブリン(Ig)様ドメインを持つレセプターを統合的に解析することは重要である。本研究では免疫系細胞に幅広く見られるIg様ドメインを持つレセプター群の多様なリガンドに対する分子認識に着目した。この分子認識機構を機能(速度論的および熱力学的側面)と構造(X線結晶構造解析)の両面から解析し、普遍性と多様性を整理し、汎用性の高いIg様レセプター群の分子認識予測のための統合的なデータの収集を目的とした。具体的には主要組織適合性抗原(MHC)を認識し、機能制御するKiller cell Ig-like receptor (KIR)やIg-like transcript (ILT)、免疫複合体を認識するFc γ Rなどを対象とした

〈研究開始時の研究計画〉

本研究は (1) 免疫細胞表面レセプター遺伝子群の発現系の構築、(2)機能評価(速度論的解析と熱力学的解析)、(3)レセプター群とリガンドとの複合体の結晶化とX線結晶構造解析、(4)レセプター群の分子認識データベースの構築と一般的細胞表面レセプターへの発展性の評価、からなる。(1)ではクローニングした免疫細胞表面レセプターであるKIRとILT/LILRの遺伝子を用いて、代表者の開発してきた大腸菌での発現および巻き戻しの系に組み入れて組換え体レセプターを調製する。(2)研究代表者が発現系を確立したMHCリガンドを用いて、(1)のレセプターとの相互作用を速度論的解析(表面プラズマ共鳴)および熱力学的解析(滴定型カロリメトリー)により分子認識能を評価する。(3)レセプターとMHCリガンドとの共結晶の作製、X線結晶構造解析を行う。(4)(2)と(3)で得られた知見を他のレセプターの立体構造に基づく分子認識の知見とあわせ、小規模データベースを構築し、統合的な理解を試みる。さらにこれらの結果を評価して他にどのようなデータが必要なのか、より良いデータベースを構築するにはさらにどのような視点が必要なのかをフィードバックして検討する。

〈研究期間の成果〉

本研究は平成12年度に公募研究として採用され、その後の4年間は班友として参加したものである。以下レセプターごとに成果を記述する。

1. Fc γ R

Fc γ RとIgG抗体Fcとの相互作用の解析に取り組んだ。2つのIg様ドメインをもつ低親和性Fc γ R3種(Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII)とFcとの相互作用を解析した結果、3種類全てが速い速度論パラメーターを示し、我々がこれまで解析を行ってきたKIRを含む他の細胞表面レセプターの結果と類似していた。このことはFc γ R群が免疫複合体上の抗体Fc部分を細胞表面リガンドと同様に認識していることを示唆していた(Maenaka et al. J. Biol. Chem. (2001))。

2. Leukocyte Ig-like receptor (LILR/LIR/ILT/ CD85)

Ig-like transcript (ILT) (leukocyte Ig-like receptor (LILR/LIR), CD85, LILR)レセプター群はNK細胞やT細胞サブセットを含む白血球細胞全般に広く分布する。ILT2/LILRB1とILT4/LILRB2はMHCクラスI分子(MHCI)を幅広く認識し、抑制性モチーフ(ITIM)を細胞内ドメインにもち、SHP-1などを介して細胞の活性化を抑制する。代表者らは、ILTのMHCIに対する分子認識機構について相互作用解析を行い、ILTが非古典的MHCであるHLA-Gに対してより強い結合を示し、MHCIとの結合に対してCD8と拮抗阻害することを明らかにした。これは免疫系においてILT/HLA-Gの認識の重要性を示し、また、ILT2とCD8のMHC結合に対する競争阻害によるT細胞の活性化調節の可能性を示唆した。(Shiroishi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2003))。

ILT2/LILRB1はサイトメガロウイルス由来のMHCクラスI様ホモログUL18に非常に強く結合する(Kd \sim 数nM)。サイトメガロウイルスの集団の中にはUL18分子の変異体が見られる。これらの変異によるレセプター結合への影響を調べるため、変異体UL18とILT2/LILRB1との相互作用解析を行った。その結果、ある変異体では結合が数倍程度上昇することがわかった。このようなUL18分子変異により、ウイルスが免疫系の監視の目から逃避する機構を有することが示唆された(Vales-Gomez et al., J. Virol. (2004))。

〈国内外での成果の位置づけ〉

免疫細胞表面受容体の機能および構造解析に取り組むグループは国内外を通じて限られている。研究代表者は当初予定の様々な免疫細胞表面受容体について、構造解析を進めることに成功してきた。特にILT/LILR群は現在までに複数のメンバーの構造解析に成功し(Shiroishi et al., J. Mol. Biol. (2006)、未発表)、そのリガンドであるMHC分子の構造解析にも成功した(Maenaka et al., J. Immunol. (2000), Shiroishi et al., J. Biol. Chem. (2006))。また、現在これらの複合体のX線回折データの収集に成功し、順調に計画を進め、同時にリガンドレセプター間の相互作用解析を詳細に行っている。特に弱い結合である細胞-細胞間のレセプターリガンド認識の系について、熱力学的パラメーターを収集しているグループは海外も含めても極めて限られた数しかない。そのため、代表者らが発表してきたデータが、これまでに細胞表面受容体のリガンド認識について熱力学パラメーターを決定した報告例全体の中のかなりのウェイトを占めることになっている。その中でも、最近見出したエントロピー駆動型のLILRB1-HLA-Gの相互作用については、相互作用の新しい知見を得た。これまでにコンフォメーション変化を大きく伴う場合、エントロピーの損失がかなり大きいと考えられてきたが、LILRB1のケースにおいてはエントロピー的に有利な方向での結合であり、新規の結合様式であると考えられた。すなわち、細胞表面受容体のように速い速度論的認識では、結合時においてもエン

トロピー損失が少なく、フリーの状態と変わらずに、MHCIを認識できるのかもしれない。このような新規な知見を世界に先駆けて発表することができている。

distinct thermodynamic properties. *J. Biol. Chem.* 276, 44898-44904.

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

公募研究期間の1年間でFc γ Rの解析を進めることができた。また、班友として参加している4年間は主にILT/LILR/LIR分子群の解析を進めることに成功し、PNASの表紙を飾ることができる成果を挙げることができた。達成度としては当初予想を上回るものであったと思う。しかし、ゲノムワイドへの成果の還元という部分では、現時点では各レセプターの生化学的および構造生物学的データの収集を進める段階であり、他のレセプターの機能の予測というところにはまでは遠い。まだ実験データ量の不足であるため、ハイスループットの解析方法についても検討を行わなければいけない。これまでの少数の例からでも、細胞表面受容体の共通の性質（速い速度論的認識である、比較的エントロピー駆動が好まれる熱力学的な性質を持つ、静電的相互作用が多い蛍光にある、など）が明らかとなってきた。これらの性質から、詳細な解析には予想以上のサンプル量が要求されることがわかった。生理的な機能を持つレセプター分子作製のためには、大量の発現系の検討を行わねばならず、特に真核細胞由来の細胞による発現を行わない限り、難しい場合が考えられる。

〈今後の課題〉

上述のように各レセプターに対する知見を蓄積し、その特徴を掴みつつある。しかし、まだ絶対的に実験データが不足しているため、しばらくは個々の生物学的に意義深いレセプターを取り上げ、データベースを充実させることが必須である。特に細胞表面レセプターには糖鎖修飾の問題等がタンパク質の発現を困難にし、ハイスループット化を進めることができない。これからは、糖鎖修飾等が行える真核細胞、特にカイコ個体での発現やヒト293細胞による発現をルーチン化することを検討したい。すでに代表者のグループでは、両者の系を立ち上げ、一部ルーチン化へ向かわせようと条件検討を行っているため、将来のめどをつけつつある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

M. Vales-Gomez, M. Shiroishi, K. Maenaka and H. T. Reyburn (2005). Genetic variability of the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus leads to differential binding to the inhibitory receptor ILT2. *J. Virol.* 79, 2251-60.

H. Wada, N. Matsumoto, K. Maenaka, K. Suzuki and K. Yamamoto (2004). Two HLA-E Mutants Segregate the Inhibitory NK Cell Receptor CD94/NKG2A and the Activating Receptor CD94/NKG2C, Both of Which Bind the Top of HLA-E. *Eur. J. Immunol.* 34, 81-90.

M. Shiroishi, K. Tsumoto, K. Amano, Y. Shirakihara, M. Colonna, V.M. Braud, D.S. J. Allan, A. Makadzange, S. Rowland-Jones, B. Willcox, E.Y. Jones, P.A. van der Merwe, I. Kumagai, & K. Maenaka. (2003). Human inhibitory receptors ILT2 and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8856-61.

K. Maenaka, P.A. van der Merwe, D.I. Stuart, E.Y. Jones, & P. Sonderrmann. (2001). The human low-affinity Fc γ receptors IIa, IIb and III bind IgG with fast kinetics and