

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18499

研究課題名(和文)免疫制御に関わるNKRP1A-LLT1複合体の立体構造解析

研究課題名(英文)Structural study on the NKRP1A-LLT1 complex involved in the immune regulatory

研究代表者

田所 高志 (TADOKORO, Takashi)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：10762396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトNKRP1Aは、NK細胞およびTh17細胞に高発現する免疫受容体であり、近年注目されているがんの創薬ターゲットである免疫チェックポイント受容体の仲間である。本研究では、NKRP1AとリガンドLLT1の相互作用を物理化学的、構造生物学的に明らかにし、NKRP1Aが関わる免疫制御機構の分子基盤を解明することを目指した。NKRP1A-LLT1複合体モデルから推察される相互作用面に網羅的にアミノ酸置換を導入し相互作用解析を実施した。その結果、相互作用面の僅かなアミノ酸側鎖構造の違いを許容できないほどに緻密に制御されていることを示唆する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Human NKRP1A is an immunoreceptor that highly expressed in NK cells and Th17 cells, and is a member of the immunity checkpoint receptor which is attractive for a cancer drug discovery target in recent years. In this study, we aimed to clarify the interaction between NKRP1A and its ligand, LLT1, by physicochemical and structural biology and to elucidate the molecular basis of immune regulatory mechanism involving NKRP1A. An extensive mutagenesis at the interaction surface inferred from the NKRP1A-LLT1 complex model and binding analysis was carried out. The results suggested that the interaction might be precisely regulated to the extent that even a slight difference in amino acid side chain structure at the interacting surface is unacceptable.

研究分野：タンパク質工学、生物物理化学

キーワード：免疫受容体 相互作用 構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト Natural killer cell receptor-P1A (NKRP1A) は、Natural Killer (NK) 細胞および Th17 細胞に高発現する免疫受容体であり、最近ガン細胞排除に劇的な効果を上げている抗体医薬品のターゲットである免疫チェックポイント受容体の仲間である(引用文献、)。NKRP1A が高発現する NK 細胞や Th17 細胞には次のような役割がある。NK 細胞は自然免疫に関与し、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞の排除に重要な役割を果たす。またヘルパー T 細胞の一種である Th17 細胞は、サイトカインであるインターロイキン 17 (IL-17) を産生し、また自己免疫疾患の病態形成や細菌感染防御、腫瘍細胞の排除に関与していることが明らかになってきた。NKRP1A はこのように自然免疫だけでなく獲得免疫においても重要な役割を担っていることが予想される。しかし、その機能や構造について、リガンドとして Lectin-like transcript 1 (LLT1) が同定された以外は、これまでの研究のほとんどが発現量解析など細胞レベルでの解析にとどまっている。また、NKRP1A と LLT1 はともに C 型レクチン様細胞表面受容体 (CLR) に属するが、CLR ファミリー蛋白質どうしの分子認識機構およびシグナル伝達機構の多くは不明である。これまでに CLR ファミリーどうしの複合体の結合モードについては、2013 年に NKp65 - KACL 複合体構造(引用文献)が初めて報告されているが、本研究で着目する NKRP1A - LLT1 結合は、シグナル伝達に必要と考えられる二量体化や多量体化等について、NKp65 - KACL 結合と異なる事が細胞レベルで示唆されている。そのため、CLR ファミリーどうしが伝達するシグナルの違いを正確に理解する上では、NKRP1A と LLT1 の相互作用が介するシグナル伝達機構を構造生物学的な観点より明らかにすることが不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、免疫制御に関わる NKRP1A と LLT1 の相互作用を物理化学的、構造生物学的に明らかにし、NKRP1A が関わる免疫制御機構の分子基盤を解明することを目指した。そこで、当研究室で実績のある細胞表面受容体の発現技術を応用し、細胞外ドメインを組換え蛋白質として調製し、分子間相互作用解析(表面プラズモン共鳴解析等)と立体構造解析(X線結晶構造解析等)の手法を駆使して免疫チェックポイントとして機能する NKRP1A - LLT1 分子認識機構を明らかにすることを目指した。本研究では、NKRP1A - LLT1 分子認識の構造的な基盤を明らかにし、従来の免疫応答機構に対して新たな知見を与えるだけでなく、NKRP1A - LLT1 の関与が示唆されるがん免疫をターゲットとした創薬の可能性を見出すことを目指している。

## 3. 研究の方法

(1) 構造解析に適した NKRP1A 蛋白質の調製法の確立とリガンド LLT1 との複合体の立体構造解析

これまでに哺乳細胞 HEK293T を用いた系で機能的な NKRP1A 蛋白質の発現に成功しているが、立体構造解析をするには十分な量の蛋白質が調製できていない。他に昆虫細胞等の様々な発現系を試みたが発現が見られていない。そこで、リガンド LLT1 単独の結晶構造(引用文献)と NKp65 - KACL 複合体構造の比較により構築した NKRP1A - LLT1 複合体モデルに基づき相互作用に影響がないと予想される位置に変異を導入した変異体を作製し、大腸菌発現系を用いて発現と巻き戻し条件の検討を実施する。十分な量の組換え蛋白質が調製できたら、結晶化を試行し X 線結晶構造解析を実施する。

(2) NKRP1A とリガンド LLT1 の網羅的な相互作用解析

リガンド LLT1 単独の結晶構造と NKp65 - KACL 複合体構造の比較により構築した NKRP1A - LLT1 複合体モデルから推察される相互作用面に網羅的にアミノ酸置換(変異)を加えることで、複合体モデルの妥当性を評価する。相互作用解析には、表面プラズモン共鳴法を用いる。

## 4. 研究成果

(1) 構造解析に適した NKRP1A 蛋白質の調製法の確立とリガンド LLT1 との複合体の立体構造解析

これまで立体構造解析に十分な量の組換え NKRP1A 蛋白質が調製できていなかった。本研究では、組換え蛋白質の大量調製が期待できる大腸菌発現系を用い、NKRP1A - LLT1 複合体モデルに基づき変異体作製を行うことでこの問題の打開を試みた。変異は相互作用に影響がないと予想される位置で、かつ安定に調製できることが報告されている NKRP1A のホモログであるマウス由来 Nkrp1 と保存性の低い部位に導入することとした。大腸菌発現系を用いた場合、NKRP1A 野生型は封入体として得られることが知られていたため、巻き戻しとゲル濾過クロマトグラフィーによる調製を試行することにした。巻き戻しの初期条件には当研究室で細胞表面受容体蛋白質の巻き戻しに実績のある条件を用いることとした。その結果、8 つの変異体を作製し、それらのうち複数の変異体で巻き戻り効率が向上した。巻き戻り効率が野生型に比べて向上した変異体について、更に巻き戻し際の溶媒条件や酸化-還元剤の濃度バランスの条件、ゲル濾過クロマトグラフィーの条件を丹念に検討することで複数の変異体で収量が当初の 1.5 倍から数倍

程度に改善した ( 図 1 )。

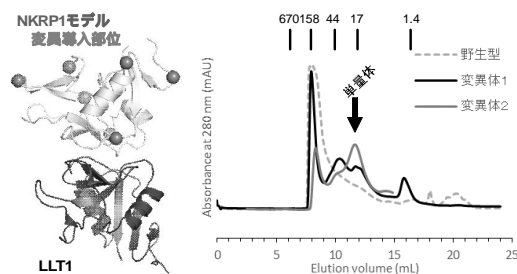


図 1 蛋白質調製のための変異導入 ( 左 ) NKR1A 野生型および変異体のゲルろ過クロマトグラフィー ( 右 )

これら変異体について円偏光二色性スペクトル測定による構造解析を行ったところ、野生型については解析できていないものの、いずれも - 蛋白質を反映するスペクトルを示した。NKR1A が属する C 型レクチン蛋白質は ヘリックスと シートで構成されていることが知られており、調製した NKR1A が正しい構造をとっている可能性が高いことが示唆された。複合体の X 線結晶構造解析を目指し結晶化に着手したが、現在までに X 線回折実験を実施するのに適当な良質な単結晶が得られていない。現在、結晶の作製を継続しており、将来的には複合体の構造解析へとつながることを期待している。

## ( 2 ) NKR1A とリガンド LLT1 の網羅的な相互作用解析

NKR1A と LLT1 の相互作用については、安定な LLT1 の変異体と哺乳細胞系により精製した NKR1A を用いた表面プラズモン共鳴法による解析手法が既に確立されている ( 引用文献 )。LLT1 単独の結晶構造に基づいて構築した NKR1A - LLT1 複合体モデルから推察される LLT1 と NKR1A の相互作用面に網羅的に変異を加えることで、相互作用に重要なアミノ酸残基の組合せを同定することを試みた。新たに NKR1A で 19 種、LLT1 で 9 種の変異体を構築し表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を実施した ( 図 2 )。

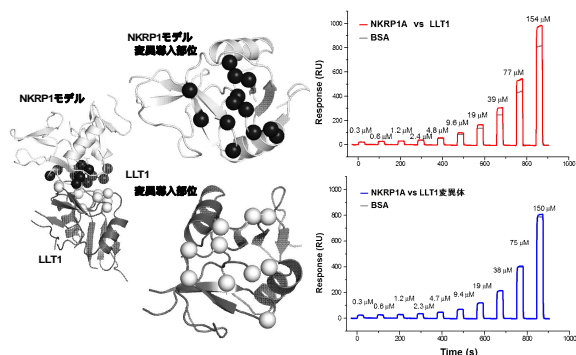


図 2 NKR1A と LLT1 の変異導入部位 ( 左 ) と各変異体を用いた表面プラズモン共鳴による相互作用解析例

その結果、ほとんどの NKR1A 変異体と LLT1 変異体の組合せにおいて、相互作用の親和性が低下していた ( 図 2 )。これは、変異を導入した相互作用面に点在するアミノ酸残基のほとんどが NKR1A と LLT1 の相互作用に重要であることを意味する。一方で、相互作用には多くのアミノ酸残基の関与が示唆されたにもかかわらず、ほとんどの一アミノ酸置換変異体において親和性が低下していたことから、NKR1A と LLT1 は相互作用平面の微細な構造の違いにより相互作用できなくなることを示唆する。NKR1A と LLT1 の相互作用は非常に緻密に制御されていることを示唆している。

現在も継続して変異体作製と相互作用解析を実施しており、実験結果に基づいた NKR1A-LLT1 複合体モデルのアップデートを目指している。これら知見に基づく詳細な分子認識機構の解明を目指している。

## < 引用文献 >

- Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BF, Fremont DH, Yokoyama WM. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR1 family of natural killer cell receptors. *Nat Immunol.* 2003, 4, 801-807.
- Roth P, Mittelbronn M, Wick W, Meyermann R, Tatagiba M, Weller M. Malignant glioma cells counteract antitumor immune responses through expression of lectin-like transcript-1. *Cancer Res.* 2007, 67, 3540-3544.
- Germain C, Guillaudeux T, Galsgaard ED, Hervouet C, Tekaya N, Gallouet AS, Fassy J, Bihl F, Poupon G, Lazzari A, Spee P, Anjuère F, Pangault C, Tarte K, Tas P, Xerri L, Braud VM. Lectin-like transcript 1 is a marker of germinal center-derived B-cell non-Hodgkin's lymphomas dampening natural killer cell functions. *Oncoimmunology.* 2015, 4, e1026503.
- Li Y, Wang Q, Chen S, Brown PH, Mariuzza RA. Structure of NKp65 bound to its keratinocyte ligand reveals basis for genetically linked recognition in natural killer gene complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 10, 11505-11510.
- Kita S, Matsubara H, Kasai Y, Tamaoki T, Okabe Y, Fukuhara H, Kamishikiryo J, Krayukhina E, Uchiyama S, Ose T, Kuroki K, Maenaka K. Crystal structure of extracellular domain of human lectin-like transcript 1 (LLT1), the ligand for natural killer receptor-P1A. *Eur J Immunol.* 2015, 45, 1605-1613

Kamishikiryo J, Fukuhara H, Okabe Y, Kuroki K, Maenaka K. Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKRP1A/KLRB1). J Biol Chem. 2011, 286, 23823-23830.

研究者番号：10762396

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

田所高志、喜多俊介、松原永季、笠井宣征、玉置貴晴、岡部由紀、日下裕規、石山夢美、福原秀雄、上敷領淳、尾瀬農之、黒木喜美子、前仲勝実 ヒト免疫受容体 NKRP1A によるリガンド LLT1 の分子認識機構 2017 年 ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会

〔図書〕(計 1 件)

Furukawa A, Kita S, Tadokoro T, Fukuhara H, Maenaka K. Chapter 12; Structural aspects of C-type lectin receptors. C-Type Lectin Receptors in Immunity (Yamasaki, S. ed.) 2016 pp 179-190, Springer Book, Springer Japan.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田所 高志 (TADOKORO, Takashi)  
北海道大学・薬学研究院・特任助教