

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06518

研究課題名(和文)免疫活性化受容体LILRA2のリガンド認識機構の解明

研究課題名(英文)The ligand recognition mechanism of immune activation receptor, LILRA2

研究代表者

古川 敦 (Furukawa, Atsushi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30727699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：LILR(Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor)群は免疫細胞に発現する膜貫通受容体型のタンパク質である。細胞外は似たような構造をしているにも関わらず、細胞内に免疫活性化モチーフITAMをもつLILRA群、もしくは免疫抑制化モチーフITIMをLILRB群に大別される。近年、LILRA2は、細菌分泌するプロテアーゼによって抗体のVHとCH1間が切断され、抗原認識部位を失った抗体(切断抗体)を認識することが明らかとなっている。本課題では、その切断抗体や新たに見出された2種類のリガンド(リガンドAおよびB)のLILRA2の認識機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫細胞の表面に発現する受容体は、病原体の認識に関わっているだけでなく、がん細胞の排除への関与に関わっている。一方で、受容体を介して、過剰な免疫応答も引き起こされることもわかっている。本研究では、LILRA2と呼ばれる分子がどのように病原体の侵入に関わっているか明らかにした。さらに、LILRA2は自分自身の分子に結合することも明らかになってきた。本研究によって、LILRA2タンパク質の病原体侵入に関わる部分と、自分自身の分子に結合する部分が違うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The LILR (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor) group is a transmembrane receptor-type protein expressed in immune cells. Although they have similar extracellular structures, they are broadly classified into the LILRA group, which has an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), or the LILRB group, which has Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM). Recently, it was reported that LILRA2 recognizes antibodies that have lost their antigen-recognition sites (cleaved antibodies) after cleavage between VH and CH1 of antibodies by protease secreted by bacteria. Here, we uncovered the the recognition mechanism of LILRA2 for its truncated antibody and two newly discovered ligands (ligands A and B).

研究分野：分子免疫学

キーワード：免疫受容体 相互作用解析 感染症 構造解析 タンパク質 抗体 免疫活性化

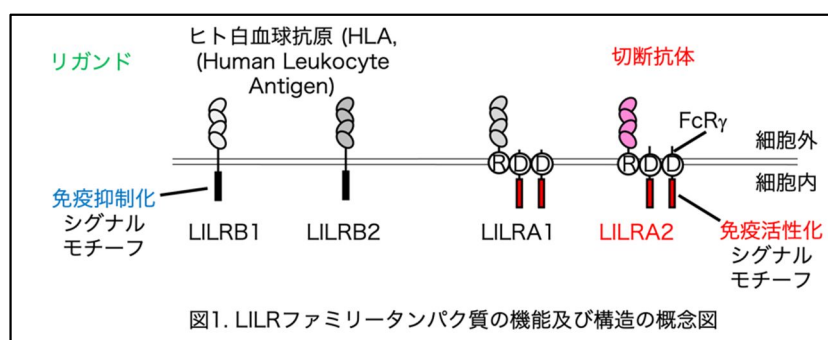
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の表面には多くのタンパク質が発現しており、それらは病原体の侵入の感知による活性化や、自己細胞や組織の認識による過剰な免疫応答の負の制御に関わっている。その中でも LILR (Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor) に属するタンパク質は、ペア型受容体としてユニークな性質を持っている。ペア型受容体とは、細胞外領域は類似した構造を持つのに対し、細胞内領域は活性化や抑制化の反対の免疫シグナルモチーフを持ち、適切な免疫制御のために重要な分子群である。免疫抑制シグナルを伝達する Immune Tyrosine Inhibitory Motif (ITIM) を持つ LILRB1 や LILRB2 などの LILRB 群は正常細胞に発現する Human Leukocyte Antigen (HLA) と結合し、正常細胞への免疫細胞の攻撃を抑制している(1, 2)。一方で、免疫を活性化する Immune Tyrosine Activation Motif (ITAM) を持つ LILRA 群に関しては、脊椎関節炎に関与していることが明らかにされたが、生理的な機能は長らく不明であった(図1)。

しかし、共同研究者の大阪大学の荒瀬らによって、LILRA 群の中のうち、好中球などに多く発現している LILRA2 が、細菌により分泌したプロテアーゼによって分解された抗体を認識していることが明らかとなった(3)。これは、本来存在しないはずの "V_H 領域が欠損する抗体" という非天然分子をバクテリアの感染として感知し、免疫を活性化する仕組みであり、新たな免疫活性化機構であると考えられる。しかし、LILRA2 が切断された抗体をどのように認識しているか不明であった。

さらに、我々は独自に LILRA2 に結合する分子として新規分子 A を見出した。また、共同研究者の平安らは LILRA2 に結合する分子として新規分子 B を見出している。いずれも、血中に存在する分子であるが、両リガンドともその詳細な認識機構は明らかになっていなかった。



2. 研究の目的

上述した通り、LILRB1 や LILRB2 は HLA に結合する。X 線構造解析などの構造生物学的アプローチによって、認識機構が明らかになっている。一方で、V_H 領域が欠損する抗体や他のリガンドを含めて、LILRA2 がどのように、リガンドを認識しているか不明であった。そのため、構造生物学を含めた生物物理学的方法によって、その認識機構を明らかにすることを目的とした。また、レポーター細胞を用いて、実際のリガンド結合が細胞に与える影響についても評価することも目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質発現

LILRA2 のリガンド認識に関わる細胞外ドメインは、4つのドメインが存在する(細胞外の4つのドメインのうちアミノ酸配列のN末端側からそれぞれD1-D4とする)。LILRA2 のD1からD4を全て含むタンパク質(LILRA2D1D4)は、His タグ融合タンパク質として、HEK293細胞を用いて発現させた。発現用プラスミドをトランスフェクションし、約5日間培養した後、培養上清を回収し、Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製し、ゲルろ過クロマトグラフィーで精製した。一方で、これまでにLILRB1やLILRB2では、アミノ酸配列のN末端側の2つのドメインD1D2がHLAとの結合に関わっていることが知られている。そのため、LILRA2も同様にD1D2がリガンドとの結合に関わっていることが考えられた。そのため、D1D2もD1D4同様にHEK293細胞株を用いて発現させた。X線構造解析のためにはより多くのタンパク質が必要となる。そのため、LILRAD1D2タンパク質は、多くのタンパク質が得られることが期待される大腸菌を用いても発現し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。精製度はSDS-PAGEにより解析した。また、コントロール実験に使用するLILRB2タンパク質のD1D2ドメインも大腸菌を用いて発現した。また、切断された抗体は、軽鎖とN末端を短くした重鎖または全長重鎖をコードする遺伝子を含むプラスミドをHEK293細胞にコトランスフェクションすることで、培養上清に一過性過剰発現させた。Protein G アフィニティークロマトグラフィーの後に、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製度はSDS-PAGEにより解析した。

表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いた結合実験

LILRA2 とリガンドとの相互作用解析は、Cytiva社のBiacore3000やBiacore T200を用いて行った。切断した抗体、さらには新たに見出したリガンドを、アミンカップリング法を用いて、

CM5 センサーchip(Cytiva 社)に固定化した。各種濃度の異なる LILRA2 タンパク質を調製し、切断抗体やリガンドを固定化したセンサーChip に流した。平衡値解析により、1:1 の解離定数の算出を行なった。また、変異体 LILRA2 をアナライトとして流すことによって、結合部位の同定を行なった。

一方で、生体内では、LILRA2 は細胞表面に固定化されており、切断された抗体や新たに見出されたリガンドは血中を流れている。その生体環境を模倣するために、LILRA2 を、アミンカップリング法を用いて、CM5 センサーchip に固定化した。LILRA2 を固定化した Chip に切断抗体や見出したリガンドを流すことで結合解析を行った。

レポーター細胞を用いた活性化実験

共同研究者の平安らが作製した LILRA2 が細胞表面に発現し、リガンドの結合に伴って、GFP 蛍光強度の上昇が見られる LILRA2 発現レポーター細胞を用いて実験を行なった(3)。新規に同定したリガンドを 96 well plate に固相化し、Flow cytometer を用いて、GFP 蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) 結合実験および複合体構造解析

LILRA2 と切断抗体の結合実験および複合体構造解析

全ての細胞外ドメインを含む LILRA2D1D4 と切断抗体の解離定数は $12.7 \mu\text{M}$ と見積もられた。結合部位を明らかにするために、LILRA2D1D2 と切断抗体の解離定数を算出したところ、解離定数は、 $4.83 \mu\text{M}$ と見積もられた。このことから、LILRA2 においても、LILRB1 や B2 と同様に D1D2 ドメインが結合に重要であることが示唆された。さらに、各種変異体 LILRA2D1D2 を用いて結合実験を行なった。その結果、LILRB1 では主に D1 が結合に関与しているのに対し、LILRA2 では D2 が関与していることを明らかにした(4)。また、LILRA2 をセンサーchip に固定化し、切断抗体をアナライトとして流したところ、切断抗体の LILRA2 からの解離の遅延が見られた。これは、切断抗体にはリガンド結合サイトが2つあることによるアビディティ効果によるものであると考えられた。生体内では、このアビディティ効果が免疫の活性化に重要であることが示唆された。

一方で、その認識機構を明らかにするために、X線構造解析に向けた結晶化を試行したが、結晶化には至っていない。抗体は、ヒンジ部分の揺らぎが大きいため、結晶化が困難と考えられた。そのため、Fab 部分のみを HEK293T 細胞で発現を試みた。しかし、切断された抗体は Fab 部分だけでは発現量が極めて低いことがわかった。このことは、切断された Fab 部分のみでは、安定性が極めて低いことが示唆された。また、クライオ電子顕微鏡を用いた複合体の構造解析も進めた。クライオ電子顕微鏡で複合体を観察したところ、比較的弱い相互作用のため、複合体と見られる粒子が少ないことがわかった。そのため、架橋剤を用いた複合体の安定化を行い、クライオ電子顕微鏡で単粒子解析を行なった。しかし、粒子の均一性が低く、構造解析には至っていない。そのため、均一性の高い複合体の調製を目指し、実験を進めている。

LILRA2 と新たなリガンドとの結合実験および複合体構造解析

我々が見出したリガンド A と LILRA2 との結合実験を行なった。その結果、リガンド A と LILRA2 の解離定数は $14 \mu\text{M}$ 程度であることがわかった。さらに詳細を明らかにするために、上記の実験で用いた LILRA2D1D2 に変異アミノ酸を有するタンパク質を用いて結合実験を行なった。しかし、いずれのアミノ酸変異も結合に影響を及ぼさなかった。現在、他の変異体を作製し、結合実験を行っている。また、LILRA2 との複合体の X線構造解析に向けた結晶化を試行している。

一方で、リガンド B については、全長の LILRA2 との解離定数は $13 \mu\text{M}$ 程度であることがわかった(図2)。また、上記同様に LILRA2 をセンサーchip に固定化し、切断抗体をアナライトとして流したところ、リガンドの LILRA2 からの解離の遅延が見られた。これは、多量体形成するリガンド B のアビディティ効果によるものであると考えられた。切断抗体同様に、生体内ではこのアビディティ効果が免疫の活性化に重要であることが示唆された。

さらに、詳細に結合部位を明らかにするために、LILRA2 の D1D2 を用いて結合実験を行なった。切断抗体やリガンド A とは異なり、リガンド B は LILRA2 の D1D2 に結合しなかった。そのため、我々

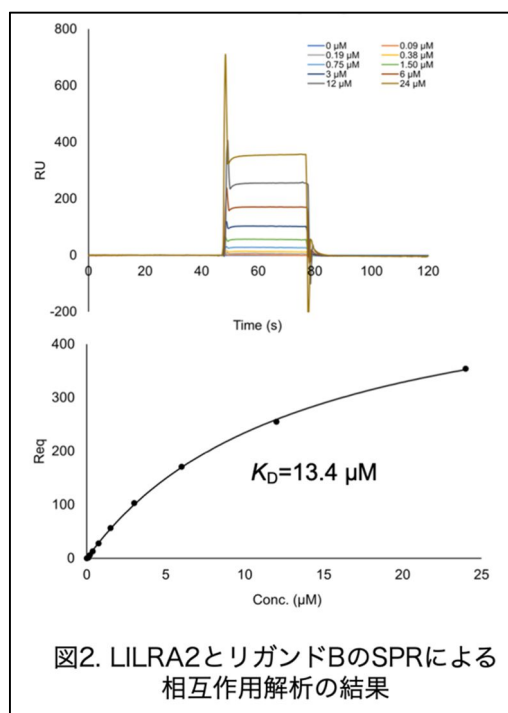


図2. LILRA2とリガンドBのSPRによる相互作用解析の結果

は LILRA2 の D3D4 がリガンドへの結合に関わっていると考え、D3D4 ドメインを有するタンパク質を調製し、結合実験を行なった。その結果、LILRA2 の D3D4 タンパク質もリガンド B に結合しなかった。このことから、我々は、結合部位が他のリガンドと異なり、広範に渡っている可能性を考えている。現在、更なる変異体 LILRA2 を作製し、結合に関わるアミノ酸の同定を進めている。また、LILRA2 との複合体の X 線構造解析に向けた結晶化を試行している。

(2) レポーター細胞アッセイ

これまでの研究結果から、切断された抗体は LILRA2 を発現するレポーター細胞を活性化することが知られている(3)。上記で相互作用が見られたリガンド A については、レポーター細胞を活性化することが明らかとなった。一方で、リガンド B については、レポーター細胞の活性効果が見られなかった。現在その原因の追究を行なっている。

参考文献

1. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, et al. 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 U S A*. 2003;100(15):8856-61.
2. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*. 1997;7(2):273-82.
3. Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, et al. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol*. 2016;1(6):16054.
4. Yamazaki R, Furukawa A, Hirayasu K, Yumoto K, Fukuhara H, Arase H, et al. Molecular mechanism of the recognition of bacterially cleaved immunoglobulin by the immune regulatory receptor LILRA2. *J Biol Chem*. 2020;295(28):9531-41.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Doi Ryohei, Shimizu Koji, Ikemoto Yuma, Uchiyama Masashi, Koshiba Mikiko, Furukawa Atsushi, Maenaka Katsumi, Watanabe Satoshi, Sato Yoshihiro | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Nickel Catalyzed Acyl Group Transfer of <i>o</i> -Alkynylphenol Esters Accompanied by C-O Bond Fission for Synthesis of Benzo[b]furan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 ChemCatChem | 6. 最初と最後の頁 2086-2092 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cctc.202001949 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamazaki Rika, Furukawa Atsushi, Hirayasu Kouyuki, Yumoto Kohei, Fukuhara Hideo, Arase Hisashi, Maenaka Katsumi | 4. 巻 295 |
| 2. 論文標題 Molecular mechanism of the recognition of bacterially cleaved immunoglobulin by the immune regulatory receptor LILRA2 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 9531 ~ 9541 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013354 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Tomita Eiki, Kojima Masahiro, Nagashima Yuki, Tanaka Ken, Sugiyama Haruki, Segawa Yasutomo, Furukawa Atsushi, Maenaka Katsumi, Maeda Satoshi, Yoshino Tatsuhiko, Matsunaga Shigeki | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 An Electron Deficient Cp ^E Iridium(III) Catalyst: Synthesis, Characterization, and Application to Ether Directed C-H Amidation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition | 6. 最初と最後の頁 n. a. |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202301259 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 古川敦、山崎莉佳、平安恒幸、湯本航平、福原秀雄、黒木喜美子、荒瀬尚、前仲勝実 |
| 2. 発表標題 Molecular mechanism of the recognition of bacterially cleaved immunoglobulin by the immune regulatory receptor LILRA2 |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 王 嘉琪、古川 敦、山崎 莉佳、平安 恒幸、門松 毅、尾池 雄一、荒瀬 尚、前仲 勝実 |
| 2. 発表標題 免疫活性化受容体LILRA2のANGPTL6認識機構の解明 |
| 3. 学会等名 第141回日本薬学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 赤岩 愛記、黒木 喜美子、引地 和馬、古川 敦、前田 直良、前仲 勝実 |
| 2. 発表標題 免疫抑制分子HLA-G2特異的新規モノクローナル抗体の作製 |
| 3. 学会等名 第141回日本薬学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石原萌宏、長田夕佳、古川敦、鈴木亮 |
| 2. 発表標題 大気環境中微粒子による肺胞マクロファージへの毒性発現機構の解析 |
| 3. 学会等名 2022年度日本薬学会北陸支部 第134回例会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 倉坪真千、中矢姫菜子、古川敦、長田夕佳、鈴木亮、 |
| 2. 発表標題 親和性の異なる混合アレルギーを用いたIgE受容体活性化調節機構の解析 |
| 3. 学会等名 2022年度日本薬学会北陸支部 第134回例会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 五十嵐杏実, 長田夕佳, 古川敦, 鈴木亮 |
| 2. 発表標題 好中球由来タンパク質Ly6Gによるアレルギー応答制御機構の解析, |
| 3. 学会等名 2022年度日本薬学会北陸支部 第134回例会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 富田 永希, 小島 正寛, 永島 佑貴, 田中 健, 杉山 晴紀, 瀬川 泰知, 古川 敦, 前仲 勝実, 前田 理, 吉野 達彦, 松永 茂樹 |
| 2. 発表標題 電子不足CpEIr(III)錯体の合成及びエーテルを配向基として用いたC-H官能基化反応への応用 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Guillen Poza Pablo Adrian, Manuel Gonzalez-Cuesta, Carmen Ortiz Mellet, Jose; Manuel Garcia Ferndez, Atsushi Furukawa, Katsumi Maenaka |
| 2. 発表標題 Activating Mincle through new branched urea and thiourea trehalolipid derivatives |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 下柿元 咲瑛, 黒木 喜美子, 引地 和馬, 赤岩 愛記, 古川 敦, 前田 直良, 前仲 勝実 |
| 2. 発表標題 腫瘍免疫活性化を目指したHLA-G抗体スクリーニング |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Jiaqi Wang, Atsushi Furukawa, Rika Yamazaki, Kouyuki Hirayasu, Tsuyoshi Kadomatsu, Yuichi Oike, Hisashi Arase, Katsumi Maenaka, |
| 2. 発表標題 Molecular mechanism of ANGPTL6 recognition by immune activation receptor LILRA2 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂本真凜, 長田夕佳, 古川敦, 草田智之, 稲本奨平, 千田知美, 平嶋尚英, 鈴木亮 |
| 2. 発表標題 マスト細胞の分泌顆粒の不均質性と分泌メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 古川敦, 安間千智, 長田夕佳, 瀬戸章文, 鈴木亮 |
| 2. 発表標題 カーボンブラックナノ粒子の肺胞上皮細胞への取り込みおよび毒性発現機構の解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 古川敦, 猪股弥生, 安間千智, 河野里沙, 佐武南, 長田夕佳, 瀬戸章文, 鈴木亮 |
| 2. 発表標題 環境の異なる国内2サイトのPM2.5捕集結果と捕集サンプルの曝露による細胞応答の解析 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 王嘉琪, 古川敦, 山崎莉佳, 平安恒幸, 門松毅, 尾池雄一, 荒瀬尚, 前仲勝実 |
| 2. 発表標題 免疫活性化受容体LILRA2のANGPTL6認識機構の解明 |
| 3. 学会等名 第141回日本生物物理学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 古川敦 |
| 2. 発表標題 免疫受容体のリガンド認識機構の解明と創薬への応用, |
| 3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会サテライトミーティング(第35回 分子生物学・生理生化学研究会)(招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 古川敦、三谷知也(津本浩平、前仲勝実/編) | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 368 |
| 3. 書名 創薬研究のための相互作用解析パーフェクト：低中分子・抗体創薬におけるスクリーニング戦略と実例, in silico解析, 一歩進んだ分析技術まで (第1章 創薬における相互作用解析のスタンダード, 1 低中分子創薬, 3 SPR を用いたヒットバリデーション, 最適化のためのキャラクタリゼーション) | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|