

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770102

研究課題名（和文）ドメイン欠損型 HLA-G6 アイソフォームと免疫制御受容体 LILR 群の分子認識

研究課題名（英文）Molecular recognition of HLA-G6 isoform with LILR family

研究代表者

黒木 喜美子（KUROKI KIMIKO）

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：90553313

研究成果の概要（和文）：

HLA-G6 および LILR 受容体との相互作用について、蛋白質レベルでの解析を行った。まず、複数の発現コンストラクトを構築し、大腸菌を用いた封入体巻き戻しの系を用いて、解析に適した安定な HLA-G6 蛋白質を調製することに成功した。また、HLA-G6 単独および受容体 LILRB2 との複合体の立体構造解析を複数の手法（X 線結晶構造解析、電子顕微鏡解析、NMR 解析）で行った。

研究成果の概要（英文）：

I performed the analysis at the protein level about the interaction with HLA-G6 isoform and the LILR receptor. At first I established the expression system of stable HLA-G6 protein by *E. coli*. In addition, I performed structural analyses of HLA-G6 and the complex with its receptor, LILRB2, by several techniques (X-ray crystallography, cryo-EM, NMR).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：HLA-G6、構造解析、相互作用解析

## 1. 研究開始当初の背景

HLA-G は胎盤、胸腺、腫瘍細胞に組織特異的に発現する非古典的 HLA クラス I のひとつである。妊娠時の胎盤では、胎児側の細胞が発現する HLA-G が母体側の免疫反応を抑制し、異物である胎児が拒絶されずに無事に出産へと至る。一方、腫瘍細胞や制御性 T 細胞は HLA-G を発現することによって周囲の免疫細胞の機能を抑制し、免疫寛容を誘導していると考えられている。

HLA-G は他の HLA クラス I と同様に多種類のペプチドを提示するとともに、ジスルフィド結合を介するダイマー型、軽鎖β2 ミクログロブリン（β2m）やペプチド欠損型、選択的

スプライシングによる一部のドメインを欠損した型など多様な分子形態を有することが明らかとなっている。中でも、機能的な HLA-G1 欠損女性が生存可能なだけでなく、妊娠も通常通り可能であったことから、正常に発現している HLA-G2（膜型）および HLA-G6（分泌型）アイソフォームが、通常型である HLA-G1 欠損者において機能を十分に補完することができると考えられている。（以下、研究に用いた HLA-G2/G6 細胞外ドメイン可溶性蛋白質を共通して HLA-G6 と表記する。）このように、HLA-G 蛋白質の多様な分子群の機能的差異を明らかにすることの重要性は示唆されているものの、各特異的抗体の反応性

の不確かさが未だ解決されないために、議論が進まず、HLA-G6 の分子形態、機能、免疫制御受容体との分子認識機構については明らかになっておらず、分子レベルの詳細な解析が必要であった。

## 2. 研究の目的

(1) 結晶化に適した安定な HLA-G6 蛋白質の調製法を確立する

(2) 免疫制御受容体 LILR 群との網羅的な結合実験を行い、HLA-G6 特異的な受容体の有無を検討する。

(3) LILRB2 および新規 HLA-G6 受容体と HLA-G6 蛋白質との相互作用解析を行い、分子認識機構を明らかにする。

(4) HLA-G6 単独および受容体との複合体の結晶構造解析を行い、構造基盤をあきらかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換え蛋白質の調製

LILR ファミリーおよび HLA-G6 を大腸菌封入体巻き戻しの系により調製した。

### (2) 免疫制御受容体 LILR 群と HLA-G6 との網羅的な相互作用の検討

HLA-G6 受容体を表面プラスモン共鳴法によって LILR ファミリーとの結合実験を行うことによって同定した。

### (3) HLA-G6 蛋白質と LILR 受容体との相互作用の評価

表面プラスモン共鳴法を用いて速度論的解析を行った。

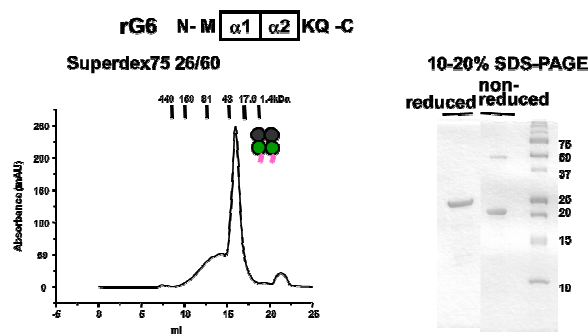
### (4) HLA-G6 単独および受容体との複合体の立体構造解析

X 線結晶構造解析を目的として結晶化の試行を行った。また、NMR 解析による LILRB2 分子内の B272 相互作用部位の同定を目指した。さらに電子顕微鏡解析による単粒子解析を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 結晶化に適した安定な HLA-G6 蛋白質の調製法の確立

大腸菌封入体の巻き戻し法により、構造的に不安定な部分を削ることによって、解析に適した安定な HLA-G6 組換え蛋白質を大量調製する系を確立できた。予備実験の結果と一致して、ジスルフィド結合を介さないダイマーを形成することがわかった。

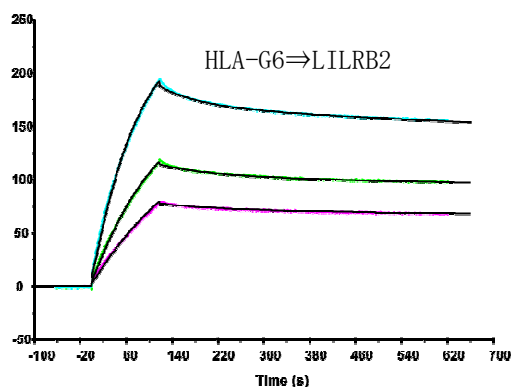


### (2) HLA-G6 と LILR ファミリーの相互作用解析

既知の LILRB2 以外に HLA-G6 を認識する LILR ファミリーが存在するか、表面プラスモン共鳴法により網羅的に解析を行った結果、LILRB2 以外に HLA-G6 を特異的に認識する LILR 受容体は存在しなかった。そのため、その後の相互作用解析および構造解析は LILRB2 を受容体として用いた。

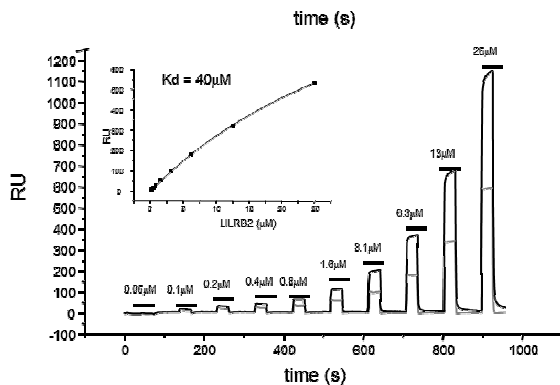
### (3) HLA-G6 と LILRB2 の速度論的解析

HLA-G6 と LILRB2 との相互作用について、表面プラスモン共鳴法を用いた速度論的解析を行った。LILRB2 受容体をチップ表面に固定化し、HLA-G6 をチップ上に流すことによって結合を調べた結果、結合・解離がともに遅い結合をすることが分かった。通常の HLA-G1 は LILRB2 と結合・解離ともとても速い相互作用をするため、受容体 LILRB2 に対して、HLA-G1 と HLA-G6 は異なる様式で結合することが分かった。HLA-G6 は非共有結合によるホモダイマーの形態をとっているため、avidity 効果によってより強固に LILRB2 に結合することが考えられた。

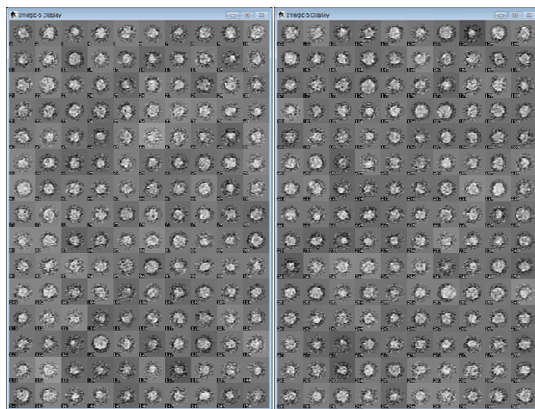


そのため、次に、HLA-G6 をチップ表面に固定化し、LILRB2 を流すことによって、HLA-G6 の avidity 効果を考慮しない系で実験を行ったところ、やはり結合・解離ともに速い相互作用様式を示した。

以上から、HLA-G6 はドメイン構造が異なることと、ホモダイマーを形成していることから、HLA-G1 とは異なる様式で LILRB2 に結合することがわかった。



(4) HLA-G6 単独および受容体 LILRB2 との複合体の立体構造解析を複数の手法で行った。



①X線結晶構造解析

HLA-G6 単独および受容体 LILRB2 との複合体の結晶化を行ったが、LILRB2 単独の結晶もしくは解析に適さない微結晶であったため、さらに条件の最適化を進めている、

②電子顕微鏡解析

共同研究により、HLA-G6 単独および HLA-G1 の単粒子解析を行った。その結果、比較的均一な形態の像を得ることができたため、現在 5000 強の粒子像について解析を進めている。

③NMR 解析

共同研究により、NMR 解析による LILRB2 分子上の HLA-G6 相互作用部位の同定を行うために、LILRB2 蛋白質の HSQC 測定条件の検討を進めている。条件が決まれば、HLA-G6 を加えることによって、相互作用部位を同定する予定である。

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 2 件)

(1) Structural and functional mosaic nature of MHC class I molecules in their peptide-free form.  
Kurimoto E, Kuroki K, Yamaguchi Y,

Yagi-Utsumi M, Igaki T, Iguchi T, Maenaka K, Kato K.

Mol Immunol. 2013, 55(3-4):393-9.

doi: 10.1016/j.molimm.2013.03.014.

査読有

(2) The long-term immunosuppressive effects of disulfide-linked HLA-G dimer in mice with collagen-induced arthritis.

Kuroki K, Hirose K, Okabe Y, Fukunaga Y, Takahashi A, Shiroishi M, Kajikawa M, Tabata S, Nakamura S, Takai T, Koyanagi S, Ohdo S, Maenaka K.

Hum Immunol. 2013, 74(4):433-8.

doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.060.

査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 黒木喜美子

ヒト免疫制御受容体 LILRB1 とリガンド HLA-G の複合体の結晶構造解析  
分子生物学会  
2012 年 12 月 11-14 日  
福岡・福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

② Kimiko Kuroki

Structural basis for recognition of nonclassical MHC molecule HLA-G by the LILRB1 The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care  
Oct 02-03, 2012  
The Alumni Hall "Frater", Graduate School of Medicine, Hokkaido University

③ Haruki Matsubara

Structural basis for recognition of nonclassical MHC molecule HLA-G by the LILRB1.  
6th International conference on HLA-G,  
July 09-11, 2012  
Paris, Fondation Del Duca

④ Kimiko Kuroki

Immunosuppressive effects of treatment with HLA-G dimer in collagen-induced mouse arthritis.  
6th International conference on HLA-G,  
July 09-11, 2012  
Paris, Fondation Del Duca

⑤ 黒木喜美子

免疫抑制分子 HLA-G ダイマーの局所投与による関節炎抑制効果の検討

分子生物学会  
2011年12月13-16日  
横浜・パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 喜美子 (KUROKI KIMIKO)  
北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：90553313

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし