

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870019

研究課題名(和文)ドメイン欠損型HLA-G6アイソフォームと受容体LILRB2の立体構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of HLA-G6 isoform bound to LILRB2 receptor

研究代表者

黒木 喜美子 (KUROKI, KIMIKO)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90553313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-G6アイソフォームの立体構造解析およびin vivoでの機能解析を行った。まず、電子顕微鏡解析によるHLA-G6単独の立体構造解析を行い、ジスルフィド結合を介さないホモ二量体形成が示唆される分子像を得ることに成功した。また、in vivoでのHLA-G6アイソフォームの免疫抑制能を調べるために、CIAマウスを用いた関節炎抑制効果の有無について検討した。その結果、HLA-G6がマウス受容体に結合し、関節炎抑制効果を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I performed structural and functional analysis of the HLA-G6 isoform. Electron microscopy technique revealed the three-dimensional structure of HLA-G2/G6 homodimer which resemble HLA class I and HLA class II heterodimer molecule. In addition, I examined the function of HLA-G6 isoform in CIA mice. HLA-G6 specifically bound to the mouse receptor, PIR-B, and showed significant anti-inflammatory effects in vivo.

研究分野：生物学

キーワード：HLA-G6 電子顕微鏡解析 表面プラスモン共鳴法 CIAマウス

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 2 ミクログロブリン ($\beta 2m$) 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、主要な HLA-G1 (膜型) および HLA-G5 (分泌型) アイソフォーム以外の分子については議論が進んでいない。申請者はこれまでに HLA-G 及び HLA-G を認識する受容体である Leukocyte Immunoglobulin-like receptor (LILR) 受容体群に着目し、網羅的な立体構造解析および相互作用解析を進めてきた。その中で、HLA-G1 のダイマー型がモノマー型に比べ LILR とより強固な結合を誘導し、強いシグナル伝達を示す事を明らかにするとともに、ダイマー型の X 線結晶構造解析に成功し、その構造基盤を明らかにした。HLA-G6 については、その分子形態、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、HLA-G1 (-G5) と同様に分子レベルの詳細な解析が必要であった。また、HLA-G6 単独の *in vivo* での機能についても、きちんと解析されて来なかった。

2. 研究の目的

(1) 安定な HLA-G6 蛋白質の調製法を確立する。

(2) LILR ファミリー群との結合実験を行い、特異的な受容体が LILRB2 以外に存在するか調べる。

(3) HLA-G6 および HLA-G6 と LILRB2 の複合体の立体構造解析を行う。

(4) HLA-G6 の *in vivo* での作用を調べる。

3. 研究の方法

(1) 安定な HLA-G6 蛋白質調製法の確立
これまで、HLA-G6 は大腸菌封入体の希釈法による巻き戻し法を用いて調製し、ゲル濾過クロマトグラフィー法による精製を行ってきたが、精製後の安定性が低く、X 線結晶構造解析が困難であった。そのため、巻き戻し後の濃縮から精製までの手法を改善した。

(2) LILR ファミリー群との結合実験
LILR ファミリー分子については、すべて大腸菌の巻き戻し系により調製した。HLA-G6 との結合を表面プラスモン共鳴法によって調べた。

(3) HLA-G6 および HLA-G6 と LILRB2 の複合体の立体構造解析

HLA-G6 単独の構造解析については、電子顕微鏡解析を行なった。また、HLA-G6 と受容体 LILRB2 との複合体の立体構造解析は、X 線結晶構造解析を試行した。

(4) HLA-G6 の *in vivo* での作用機構の解析
HLA-G6 蛋白質が、LILRB2 のマウスホモログである PIR-B 受容体に結合するか否か調べたうえで、HLA-G 蛋白質が持つ免疫抑制能を HLA-G6 アイソフォームが保有するかについて、関節リウマチモデルマウスである CIA マウスを用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 安定な HLA-G6 蛋白質調製法の確立
これまで用いてきた HLA-G6 調製法をより改善し、安定な蛋白質を得るために、封入体の調製法、希釈による巻き戻し後の濃縮からゲル濾過クロマトグラフィーまでの条件を詳細に検討し、比較的長期保存しても安定な HLA-G6 蛋白質の調製法を確立した。

(2) LILR ファミリー群との結合実験
LILR ファミリーの N 末端側 2 つの免疫グロブリン様ドメインを調製し、HLA-G6 との結合能を表面プラスモン共鳴法によって網羅的に調べた。既知受容体である LILRB2 に比べて優位に HLA-G6 に結合する受容体は存在しなかったが、結合する可能性のある受容体の存在も示唆された。今後詳細に特異性などを確認していく。

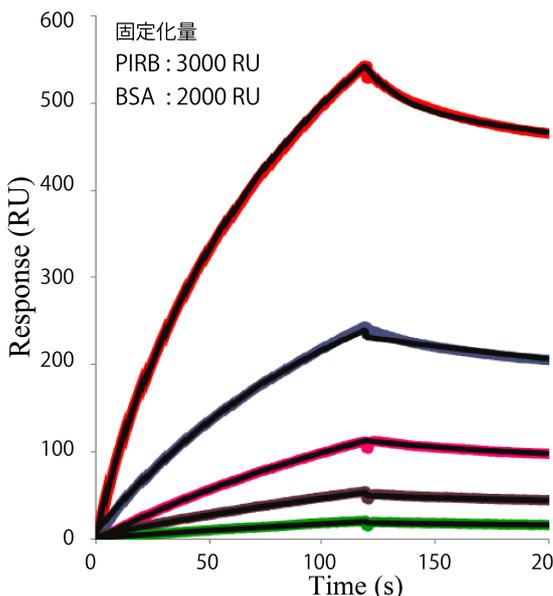
(3) HLA-G6 および HLA-G6 と LILRB2 の複合体の立体構造解析

HLA-G6 単独の結晶構造解析は困難であったため、これまでに電子顕微鏡による解析を進めてきた。本研究期間においても解析を継続して行い、分子の 3 次元構造を明らかにすることができた。その結果、HLA-G6 は溶液中で、予想された通りホモ二量体を形成することが分かった。その反面、予想に反して全体的に安定した粒子形の分子像を取っているこ

とが明らかとなった。また、私たちは、HLA-G1 (-G5) がジスルフィド結合を介するホモ二量体を形成するのに対して、HLA-G6 はジスルフィド結合を介さないホモ二量体を形成することをこれまでに生化学的に明らかにしてきたが、電子顕微鏡解析から得られた像に対して、既に結晶構造解析により明らかとなっている HLA-G1 のドメイン構造をフィッティングした結果、構造的にもジスルフィド結合を介さないホモ二量体形成を示唆する結果を得ることができた。

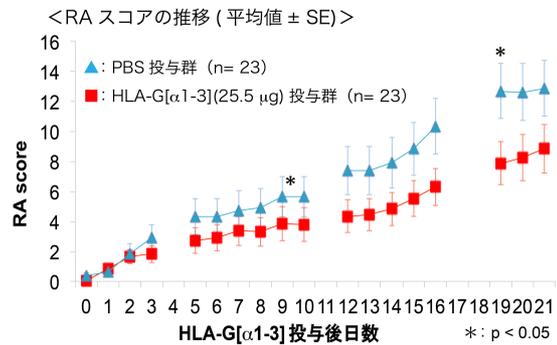
HLA-G6 と受容体 LILRB2 との複合体の構造解析については、X 線結晶構造解析を行った。HLA-G6 はホモ二量体であるため、HLA-G6 蛋白質 1 分子に LILRB2 が 2 分子結合すると予想し、モル比 1 : 2 で混合後、結晶化を試行したが、解析可能な蛋白質結晶は得られなかった。今後は、クロスリンクなどによる複合体の安定化処理後の電子顕微鏡解析による複合体全体の分子像を得ることも目指す予定である。

(4) HLA-G6 の in vivo での作用機構の解析
HLA-G6 が HLA-G1 同様に免疫抑制効果を in vivo で示すか否かを調べた。受容体 LILRB2 はヒトにのみ存在する受容体であるため、マウスホモログである PIR-B に (1) の手法で調製した HLA-G6 が結合するかを、事前に表面プラスモン共鳴法により調べた。その結果、HLA-G1 と PIR-B と同様に十分な親和性で特異的に結合することがわかった (下図)



LILRB2 と発現細胞が同じであるマウス受容体 PIR-B との結合が確認されたため、関節炎モデルマウスである CIA マウスを用いた関節炎抑制効果について検討した。CIA 発症前に HLA-G6 蛋白質溶液または PBS 溶液を皮下投与し、その後の四肢の関節炎を RA スコアとして観察したところ、私たちが既に報告した HLA-G1 アイソフォームと同等の関節炎抑制効果が認められた。単回投与により、副作用

を伴わずに 1 ~ 2 カ月間の長期にわたって抑制効果は持続していた (下図)。



以上から、HLA-G6 アイソフォームはヒト生体内でも、LILRB2 受容体に結合することによって、免疫細胞の活性化を抑制する効果を持つことが示唆された。

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1件)

HLA クラス I 受容体-LILR のあらたな知見
黒木喜美子
医学のあゆみ. 2014. 251 (4), 311-316.
査読無

[学会発表](計2件)

Ami Takahashi, Kimiko Kuroki, Katsumi Maenaka
The effect of human HLA-G2/G6 isoform proteins.
日本生物物理学会北海道支部例会
2015年3月15日、北海道大学(北海道・札幌)

Ami Takahashi, Kimiko Kuroki, Katsumi Maenaka
The immunosuppressive effect of non-covalent diimer of HLA-G domain deletion type in collagen-induced arthritis mie.
第43回日本免疫学会学術集会
2014年12月10日、国立京都国際会館(京都府・京都)

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：