

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19370042

研究課題名（和文） 多様な細胞表面抗原を認識するペア型免疫系受容体群

研究課題名（英文） Molecular basis for recognition of various cell surface ligands by paired immune receptors

研究代表者

前仲 勝実 (MAENAKA KATSUMI)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：10322752

研究成果の概要（和文）：細胞表面抗原は細胞の状況に合わせた多様な分子形態が存在し、その構造的特徴をペア型受容体群が認識することにより免疫応答が調整されている。本課題では代表的なペア型受容体群であるPILRおよびKLRG1などについてリガンドとの相互作用解析、立体構造解析を行った。その結果、リガンドの形態として、PILRについては糖とペプチド部分が、KLRG1では2量体化が制御に関わることがわかり、これらの免疫応答の人為的制御に向けた基盤を明らかに出来た。

研究成果の概要（英文）： Cell surface antigens have various forms depending on states of cells, whose structural characteristics can be recognized by paired immune receptors to control immune responses. Here, in order to clarify the molecular basis for these events, we performed the ligand binding and structural analyses of PILRs and KLRG1. PILRs bind to its ligand, CD99, with sugar- and peptide-dependent manner, furthermore, KLRG1 discriminate the monomer and the dimer configurations of the E-cadherin. These results provided important insights on the immune regulation by paired immune cell receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5200000	1560000	6760000
2008年度	4300000	1290000	5590000
2009年度	3600000	1080000	4680000
年度			
年度			
総計	13100000	3930000	17030000

研究分野：蛋白質科学・分子免疫学

科研費の分科・細目：生物学・構造生物化学

キーワード：(1)ペア型レセプター (2)細胞表面受容体 (3)蛋白質 (4)蛋白質間相互作用 (5)表面プラズモン共鳴 (6)NMR解析 (7)X線結晶構造解析 (8)免疫制御

1. 研究開始当初の背景
ウイルス感染や腫瘍に対するヒトの免疫応

答では、**ナチュラルキラー(NK)細胞**が重要な役割を果たす。このNK細胞は標的細胞の表

面抗原蛋白質を目印に、その細胞が正常か、異常かを判断する。その際に重要となるのが、**標的細胞表面抗原の構造的な変化**である。特に代表的な分子として、**MHC(主要組織適合性抗原)**が挙げられる。MHCはウイルスや腫瘍抗原由来のペプチドを提示できると同時に、軽鎖やペプチドを欠損することができ、**多様な分子形態**を利用して細胞内の異常を知らせる。また、細胞間接着の主役である**Eカドヘリン**はCaイオンに依存したホモダイマー化などの構造変化に伴い、tight junctionを形成するが、腫瘍細胞等の転移にはこのtight junctionの形成不能が影響する。このようにウイルス感染や腫瘍化に伴い、細胞表面抗原の構造変化が誘起され、これをNK細胞表面受容体群が読み取る。しかし、**これらの分子形態と免疫抑制性受容体群との相互作用に関しては十分に理解が進んでいない**。申請者はこれまでにMHCを認識するNK細胞ペア型受容体である**KIR群**や**Leukocyte Ig-like receptor (LILR、別名ILT/LIR/CD85などと呼ばれる)群**に着目し、MHCとKIR群やLILR群との相互作用解析を行ってきた。その中で、抑制型KIR2DL1/2DL3がMHCの一つHLA-Cをペプチド依存的に認識することを見出し、その構造基盤を解明した(Maenaka et al. JBC 1999, Structure 1999など)。他方、抑制型LILRB1/B2が他のMHCに比べ、HLA-Gを強く認識すること、および、T細胞のシグナル伝達を担うCD8のMHC結合を阻害することを示し、HLA-GによるT細胞活性化の新たな制御機構を提唱した(Shiroishi et al. PNAS, 2003)。

さらに、HLA-Gのダイマー化による強いシグナル伝達効果を見つけ、ダイマーやLILRB2との複合体の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(Shiroishi et al. JBC, 2006, PNAS, 2006)。このように申請者のグループは世界に先駆け、NK細胞受容体群による免疫抑制システムを明らかにしてきた。しかし、多様な細胞表面抗原のさらに多様な分子形態に対する免疫細胞表面受容体群の分子認識という視点からみれば、まだ研究は始まったばかりと言える。そこで、本申請では以下の代表的なペア型受容体群に絞り、研究を進める。(1) CD160: HLA-Cを認識するCD160受容体に関しては、機能構造解析が全く進んでおらず、ペプチド依存性などに対する認識は、分子レベルでの確かな情報がない。(2) KLR-G1: Eカドヘリンは上皮細胞の細胞間接着の中心分子であり、これを標的とするNK細胞受容体がKLR-G1であることが最近明らかにされた。腫瘍細胞などの転移に関わる細胞間接着が崩れた時に露出するEカドヘリンを標的にする可能性がある。EカドヘリンはCa依存的にドメイン間の構造を固定し、ホモダイマーを形成する。しかし、

KLR-G1がEカドヘリンのどの分子形態を認識するのかが不明である。(3) PILR群: ムチン様リガンドPILR-Lを認識するPILR受容体群については、如何に強固な構造を持たないリガンド分子を認識するのか、分子認識機構は全く不明である。これまでの申請者のKIR受容体群やLILR受容体群との相互作用の実績を生かして、MHC、Eカドヘリンやムチン様分子などの細胞表面抗原の複雑な分子形態と、これを認識する(可能性のある)免疫系受容体分子との相互作用解析を行い、その分子基盤を構造と機能の両面から明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

ヒト細胞表面抗原蛋白質には、細胞の状況に合わせた**多様な分子形態**が存在する。これらの構造的特徴をターゲットとして**免疫細胞表面受容体群が認識し、免疫応答を調整する**。これらの受容体には、活性化型と抑制化型の相反するシグナルを伝達するペアのメンバーを有する受容体群が存在し、両型の巧妙なバランスにより免疫応答が制御されている。これらの分子認識の構造基盤を明らかにするため、代表的なペア型受容体群である**CD160(主要組織適合性抗原(MHC)を認識する)、KLR-G1(Eカドヘリンを認識する)、PILR群(ムチン様分子を認識する)などについて相互作用解析、立体構造解析を駆使して明らかにする**。これによりペア型受容体群による免疫抑制機構を解明し、可溶性受容体あるいはリガンド抗原蛋白質を含む制御分子を設計し、**免疫応答の人為的制御の基盤を築く**ことを目的とする。

3. 研究の方法

MHC蛋白質とLILRB1/LILRB2蛋白質を用いた相互作用解析については、表面プラズモン共鳴解析(Biacore)、滴定型カロリメーター、結晶構造解析、NMR解析を駆使してきた実績を持つ。本課題では(1)大腸菌による発現と巻き戻し、(2)カイコでの体液への分泌発現、(3)ヒト293細胞による分泌発現のいずれかの方法で発現精製に成功している。これにより、細胞表面抗原の多様な形態による免疫制御の複雑な分子機構の全体像を明らかにする。研究方法は以下の項目からなる。

(1) 細胞表面抗原の様々な分子形態を組換え蛋白質として調製

実験対象である細胞表面抗原蛋白質のうち、MHCとEカドヘリンについては組換え蛋白質として大腸菌で封入体として発現、軽鎖とペプチドを加え、巻き戻しを行う系を確立済みである(Eカドヘリンについてはトロント大学・伊倉教授からの供与を受け、当研究室で改変したもの)。他方、PILRリガンドであるPILR-L1(CD99)は大腸菌での発現は難

しく、大阪大学・荒瀬教授との共同研究により供与されたヒト 293 培養細胞系での発現を行う。

(2) 受容体群および候補受容体分子群の組換え蛋白質の調製

他方、受容体群の KLR-G1 と PILR 群の一部については発現系を構築済みで、一部はすでに十分な蛋白質が得られ、解析を進めている。まだ十分な蛋白質量が取れていないものに関しては現在大量生産と精製を試みている。CD160 については申請者らが KIR2DL1 受容体などで発現に成功しているヒト 293 細胞あるいはカイコによる発現により、糖鎖修飾された天然型に近い構造を有する蛋白質として調製する。

(3) 1 と 2 で得られた蛋白質群を用いて相互作用解析

得られた蛋白質群を用いて、CD160/KLR-G1/PILR と各細胞表面抗原リガンドの様々な分子形態との分子認識について、申請者が実績のある表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により結合の有無を明らかにする。特殊な形態との特徴的な相互作用が見られた組み合わせには、詳細な SPR 測定、滴定型カロリメーターや分析用超遠心を組み合わせて、結合の強さだけでなく、結合の熱力学的および速度論的特徴を明らかにする。これにより細胞表面抗原が如何に免疫受容体を認識し、そのシグナル応答を制御しているのかを分子レベルで明らかにできる。

(4) 細胞表面抗原と受容体の複合体の結晶構造解析と NMR 解析

これまでに HLA-G ダイマー型、リウマチ疾患に関連する LILRB1 の一塩基多型産物、LILRA5、LILRB2-HLA-G 複合体について結晶構造解析を有する (Shiroishi et al., PNAS 2006, JBC 2006)。さらに、当研究室の神田大輔教授や名古屋市立大学の加藤晃一教授の協力を得て、LILRB1 や HLA-G の軽鎖 (b2m) の ^{15}N ラベル化体を用いた相互作用解析に成功してきた実績も有する (Shiroishi et al. JMB 2006)。そのため、これらの分子認識について、結晶構造解析と NMR 解析の両方を用いて解析できる背景を持つ。もし複合体の結晶化が難しい場合には、NMR 解析により結合様式の差異と特徴を抽出し、その分子認識機構の構造基盤を明らかにしたい。

4. 研究成果

(1) PILR (Paired type 2 Ig-like receptor)

PILR (Paired type 2 Ig-like receptor) は CD99 のシアル酸が付加した O 型糖鎖を認識する。そこで、マウス由来の活性型 (PILR β) および抑制型 (PILR α) PILR 細胞外全長と免疫グロブリンフォールド Vset ドメインのみの

2 種類を大腸菌で封入体として作製し、これを巻き戻すことにより組換えタンパク質を調製した。mPILR β -WT (40-156) には Cys が 1 つ含まれており (Cys48)、封入体の巻き戻しにおいてジスルフィド結合により二量体を形成する可能性がある。これを避ける為に、Cys を Ser に置換した変異体、mPILR β を用いることにした。巻き戻しは通常の希釈法で行った (Tabata et al. JBC 2008, Shiroishi et al. PNAS 2003 など参照)。精製にはゲルろ過クロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて最終精製品を得た。

CD99 (PILR-L1) は PILR との相互作用の糖鎖修飾が必要であることから、天然状態とほぼ同じ翻訳後修飾が期待できる 293T 細胞発現系により調製した (ベクターは大阪大学 荒瀬教授から供与)。図 1 にあるようなコンストラクトで、ヒト IgG1 の FC 領域を C 末端側につなげた、Fc 融合タンパクとして調製し、この Fc タグを利用して Protein A と Fc タグとの親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

N マウス CD150 シグナル配列 目的遺伝子の細胞外領域 ヒト IgG1 Fc 領域 C

図 1 CD99 (PILR-L1) のコンストラクト (目的遺伝子のところに CD99 遺伝子を導入した)。

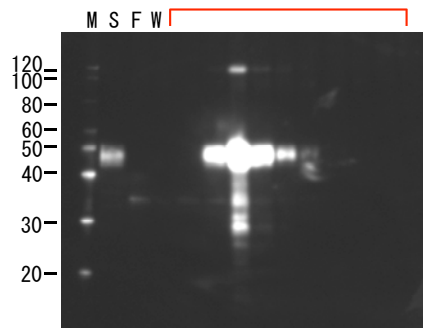


図 2 CD99 の Protein A カラムからの溶出のウェスタンブロットング
M: 分子量マーカー。横の数字はマーカーの分子量 (kDa) を表している。

これらを用いて表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon resonance (SPR)) による相互作用解析を行ったところ、CD99 とマウス PILR α 、マウス PILR β の Ig 様 V-set ドメイン (以下、それぞれ mPILR α 、mPILR β と記述) を用い、詳細な相互作用解析を行った。その結果、 α 、 β ともに対して特異的に結合した。また、PILR の認識に必須の O 型糖鎖修飾が起らないように Thr、Ser をすべて Ala に置換した変異体 CD99-FM に対しては、ネガティブコントロールの BSA と同程度のレスポ

ンスであった。各変異体を含めた相互作用の解離定数を表1にまとめる。これは PILR の CD99 認識が糖鎖に依存することを強く示唆するものであった。他方、PILR β のレスポンスは α よりも小さいが、PILR β の CD99 に対する親和性は α よりも低い可能性が指摘されており (Shiratori et al. JEM)、この結果と一致する。

表1 PILR の CD99 に対する解離定数

Analyte Immobilized	K_d (μ M)	
PILR α CD99-WT	2.2 \pm	
	CD99-FM	n.b.
	CD99-T45A	3.3 \pm 0.2
	CD99-T50A	2.8 \pm
PILR β CD99-WT	85 \pm 15	
	CD99-FM	n.b.
	CD99-T45A	n.b.
	CD99-T50A	154 \pm

さらに、速度論解析および熱力学的解析を行った。PILR-CD99 相互作用は、会合に伴う不利なエントロピー変化を、エネルギー的に有利なエンタルピー変化で補う、エンタルピー駆動型の反応で、また会合、解離ともに早く進行するということがわかった (図3参照)。不利なエントロピー変化は、通常はフレキシブルな糖鎖の構造が、PILR との結合によって構造が固定化されることに起因し、また会合、解離が速いことから、タンパク質全体のコンホメーション変化のような時間を要する変化ではなく、糖鎖、もしくはその近傍のペプチドまでの、局所的なコンホメーション変化であると推測された。また、Thr を Ala に置換した変異体を用いた解析から、mPILR α は CD99 の Thr45 と Thr50 をそれぞれ独立した認識サイトとしていた。一方、mPILR β は、Thr50 は認識せず、Thr45 のみを認識

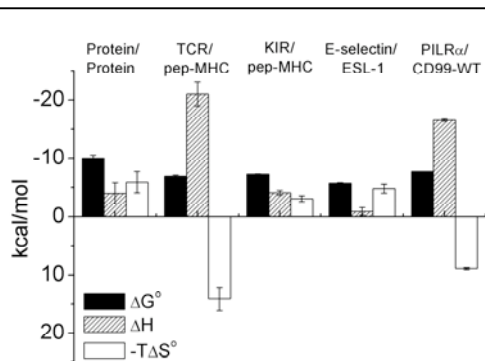


図3 PILR α -CD99 相互作用の熱力学パラメータと他の相互作用との比較

していることを示唆する結果が得られた。このことから、PILR は単純に糖鎖を認識しているのではなく、その近傍のペプチドも認識していると予想された。

PILR の結晶化は、タンパク質の安定性を考慮して、ヒト PILR α Ig 様 V-set ドメイン (以下、hPILR α と記述) を用いた。図4にあるように高純度に精製を行ったものを結晶化し、野生型結晶から 1.4Å 程度の高分解能データの収集に成功し、単波長異常分散 (SAD) 法による構造決定のため、ヨウ素誘導体の結晶データを収集した。その結果、最終的に 1.4 Å という高分解能で立体構造を決定した。PILR と比較的相同性の高い受容体である、Sialoadhesin と構造を比較したところ、Sialoadhesin を初めとする Sialic acid binding Ig-like Lectin (Siglec) ファミリーに共通して保存されている Arg (Essential R) が、PILR にも保存されていることがわかった。Siglec ファミリーはシアル酸を認識する、Ig フォールドの受容体で、Essential R がシアル酸認識に重要な役割を果たしている。PILR が認識する糖鎖はシアル酸修飾が必須であり、また Essential R が PILR にも保存されていることから、PILR は Siglec ファミリーと同様の機構でシアル酸を認識していると考えられた。

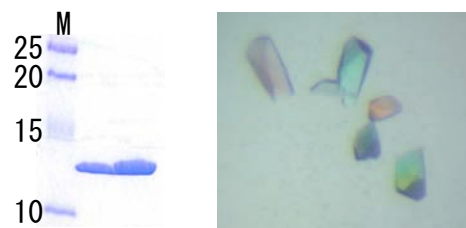


図4 hPILR α Native のイオン交換後の SDS-PAGE (左) と結晶 (右) M: 分子量マーカー。横の数字はマーカーの分子量 (kDa) を表している。

(2) Killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1)

Killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) とリガンドである E-カドヘリン認識の分子レベルで解明するため、KLRG1 および E-カドヘリン組換え蛋白質の大量調製、表面プラズモン共鳴実験、核磁気共鳴 (NMR) 解析、分析用超遠心と多岐にわたる物理化学的手法を駆使して相互作用解析を行った。また、KLRG1 の細胞レベルでの E-カドヘリン認識とその機能への影響を調べるために、KLRG1 テトラマーを用いた結合実験、KLRG1 発現レポーター細胞解析、さらには KLRG1 発現 NK 細胞を用いた細胞傷害活性実験を行った。

まず KLRG1 と E-カドヘリンを大腸菌の封

入体で発現させ、巻き戻しにより調整することに成功した。次に、KLRG1 をチップ表面に固定化し、SPR による相互作用解析を行った (図 5) KLRG1 が E-カドヘリンの N 末端ドメイン 1 とドメイン 2 を認識し、ドメイン 2 とドメイン 3 の組み合わせを認識しなかった。また、通常の細胞表面受容体の相互作用と同程度の解離定数 $7\text{--}12\ \mu\text{M}$ 程度で結合することがわかった。また、Ca に依存しない相互作用であることがわかった (図 5)。

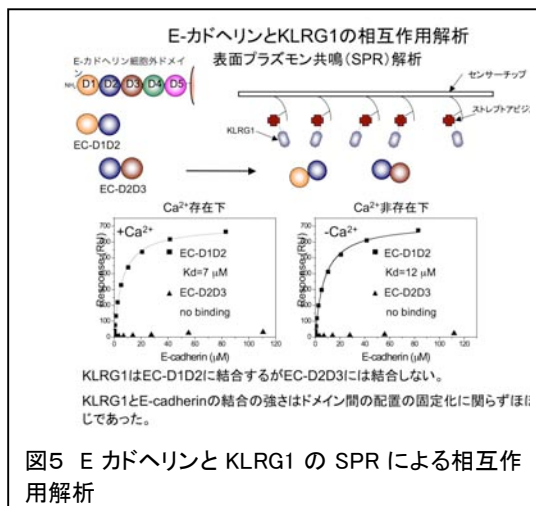


図5 E カドヘリンと KLRG1 の SPR による相互作用解析

NMR の HSQC スペクトル測定による結合実験では、相互作用が明確にシグナルの変化を伴う条件の検討を詳細に行った。その結果、結合に伴うシグナルの変化が観測され、E-カドヘリンのドメイン 1 に集中して局在することがわかった。特に、N 末端領域に存在するアミノ酸のシグナルが KLRG1 の結合により大きく変化することが観測された (図 6)。この N 末端領域は E-カドヘリン同士が結合し、細胞接着を形成する際に用いられる領域でもあった。

次に、E-カドヘリン変異体を用いた SPR 解析およびテトラマー結合実験を行った (図 6)。基本的にアラニンに変異を行い、上述のように組み換え蛋白質をおおよそ 10 数種類作成した。その結果、N 末端のアミノ酸変異体は KLRG1 との相互作用が見られなくなるか、弱まることになり、NMR 解析の結果と一致するものであった。

更に、KLRG1 発現 NK 細胞を用いた細胞傷害活性とレポーター細胞を用いたシグナル伝達能が E-カドヘリンの N 末端領域の変異により低下あるいは消失することが分かった。これにより、KLRG1 は E カドヘリンのモノマーのみに結合することが示唆された。これは、通常の接着組織で E カドヘリンがダイマーで存在する時には機能せず、特殊なモノマーが細胞表面に露出する時 (細胞の形態がおかしくなった時のガン細胞やウイルス感染細胞等が考えられる) にのみ、選択的に KLRG1 が機能すると考えられる。KLRG1 はおそらく NK

細胞の過剰な活性化を抑制する役割を果たすために重要な分子であると考えられる。

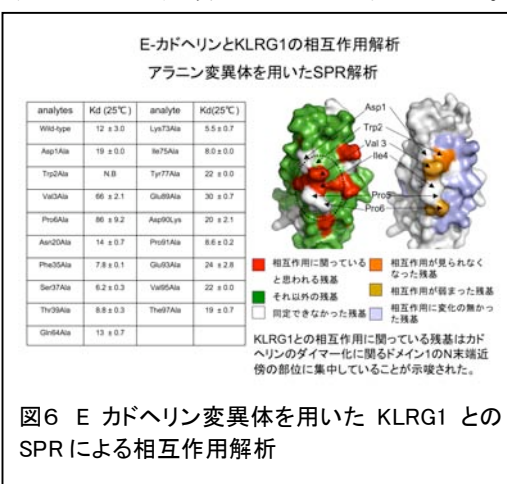


図6 E カドヘリン変異体を用いた KLRG1 との SPR による相互作用解析

(3) CD160

CD160 については細胞外ドメインの大腸菌での大量発現系を確立し、さらに巻き戻しによるサンプル調製に成功した。今後は新たに見つかった HVEM という細胞表面抗原との相互作用解析を行う予定である。

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 4 件)

Nakamura S, Kuroki K, Ohki I, Sasaki K, Kajikawa M, Maruyama T, Ito M, Kameda Y, Ikura M, Yamamoto K, Matsumoto K, Maenaka K* (2009). Molecular basis for E-cadherin recognition by killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). J Biol Chem. 284, 27327-35.

Tabata S, Kuroki K, Wang J, Kajikawa M, Shiratori I, Kohda D, Arase H, Maenaka K* (2008). Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired Ig-like type 2 receptors (PILR). J Biol Chem. 283, 8893-901.

Tabata S, Kuroki K, Maita N, Wang J, Shiratori I, Arase H, Kohda D, Maenaka K* (2008). Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human paired Ig-like type 2 receptor alpha (PILRalpha). Acta Cryst. F 64, 44-6.

Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y*, Maenaka K* (2007). Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides

novel insight into effective vaccines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 19535-40.

〔学会発表〕(計3件)

Tabata et al. Molecular Basis for
Recognition of Paired Ig-Like type2
Receptor(PILR) 第37回日本免疫学会総会
2007, 11/20-11/22 東京・品川

Nakamura ら Molecular basis for
E-cadherin recognition by killer cell
lectin-like receptor G1 (KLRG1) 第38
回日本免疫学会総会・学術集会 2008、
12/1-3 京都

前仲勝実 生体防御に関わる細胞表面受容
体の分子認識機構 第38回日本免疫学会総
会・学術集会 2008、12/1-3 京都

〔図書〕(計1件)

前仲 勝実 南江堂 薬系免疫学(編者)(2007)
238

〔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

前仲 勝実 (MAENAKA KATSUMI)
九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：10322752

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：