

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06999

研究課題名(和文)統合的構造解析で解明するLAIRの機能発現メカニズム

研究課題名(英文)Integrated structural analyses of LAIR

研究代表者

吉田 卓也 (Yoshida, Takuya)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：00294116

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)：本研究では、LAIRファミリーが担うコラーゲン依存的な免疫抑制メカニズムの構造基盤について明らかにするため、NMRによる化学シフト摂動解析により、コラーゲン結合時に構造変化を起こす部位を特定した。また分子モデリングにより、LAIR1、LAIR2のコラーゲン結合モデルを構築し、LAIR分子が1個ないし2個結合できるコラーゲンモデルペプチドを複数設計した。合成されたペプチドは、ゲル濾過により予想通りの結合比を示すことを確認した。LAIR2/モデルペプチド複合体の共結晶化について検討した。また、MDシミュレーションによりLAIR2-コラーゲンモデルペプチド間の結合自由エネルギーを評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LAIRファミリーは自己免疫疾患やがんといった疾病に関わっており、免疫制御に関連する創薬標的としての可能性を有する。LAIRによるシグナル伝達には、棒状のコラーゲン分子に対し複数のLAIRが適切な配向や位置で結合することが重要である。本研究ではLAIRに結合する適切なコラーゲンモデルペプチドを得て、LAIRのコラーゲン認識モデルを構築することで、その作用機序に関する基礎的な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the structural basis of the collagen-dependent immunosuppressive mechanism of the LAIR family, we identified the site of structural change upon collagen binding by chemical shift perturbation analysis using NMR. Molecular modeling was used to construct collagen-binding models of LAIR1 and LAIR2, and collagen model peptides were designed to bind one or two LAIR molecules. Co-crystallization of LAIR2/model peptide complexes was investigated. The binding free energies between LAIR2 and collagen model peptides were evaluated by MD simulation.

研究分野：構造生物学

キーワード：LAIR コラーゲン NMR MDシミュレーション 結晶化

## 1. 研究開始当初の背景

LAIR-1(leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1) はNK細胞の機能を抑制する受容体として見出された。現在では、T細胞、B細胞、単球など末梢血単核球の多くに普遍的に発現することが知られており、免疫系を制御する免疫抑制受容体の一つとして認知されている。LAIR-1遺伝子は、染色体上でKIRs (Killer cell inhibitory receptors)、LIRs(Leukocyte Ig-like receptors)などの免疫抑制受容体と共に、白血球受容体複合体(LRC)と呼ばれるクラスターを形成している。しかし、これらの受容体の多くが、MHC class I分子をリガンドとしているのに対し、LAIR-1は細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンを認識し、MHC class I非依存的な免疫抑制作用を示す。またLAIR-1には、可溶性ホモログであるLAIR-2が存在し、LAIR-1のデコイ受容体としてコラーゲンを認識して、LAIR-1の免疫抑制作用を抑え、免疫系の適正な制御を担っていると考えられている。LAIRは種々の疾患との関連について様々な研究がなされてきた。例えば、がん細胞はコラーゲンを過剰発現し、LAIR-1の免疫抑制機構を利用して、免疫系からの攻撃を回避しているとの報告がある。また関節リウマチや自己免疫性甲状腺疾患において、LAIR-2の発現亢進が認められており、過剰な免疫反応の一因となっていると考えられる。このような疾患の理解と、新たな治療法開拓に向けて、LAIRによるコラーゲン認識および免疫抑制機構をより詳細に解明することが求められている。

これまでに、コラーゲンペプチドライブラリーを用いた研究により、LAIRが認識するコラーゲン配列を探索する試みがなされている。例えばⅢ型コラーゲン上には、8箇所のLAIR-1結合部位、13箇所のLAIR-2結合部位が報告された。しかし、それらに規則性は見られず、特定の結合モチーフは見出されていない。したがって、LAIRがコラーゲン上のどのような構造を認識しているかは未解明なままである。また、LAIR-1による免疫抑制シグナルの発信には、LAIR-1分子同士の接近・架橋による細胞内の免疫受容体抑制性チロシンモチーフのリン酸化が必要である。そのため、コラーゲン分子に対し複数のLAIR-1がどのような配置で相互作用するかは、活性制御の上で重要なファクターであると考えられるが、その詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、LAIRのコラーゲン認識メカニズムと、免疫抑制シグナルの発信に重要な、コラーゲンを介したLAIR分子同士の相互作用の詳細を明らかにすることにある。免疫細胞に普遍的に発現し、細胞外マトリックスの基本構成分子であるコラーゲンをリガンドとする免疫抑制受容体LAIRは、免疫制御を担う重要な分子である。本研究によりそのコラーゲン認識機構を解明することは、その生物学的意義の解明のみならず、LAIR-1/2選択的結合ペプチドの設計といった、免疫制御を標的とした新たな中分子創薬への貢献が期待できる。

## 3. 研究の方法

NMR/結晶構造解析/MDシミュレーションを統合的に活用して、LAIRの担うコラーゲン認識メカニズムと、コラーゲンを介したLAIR分子同士の相互作用を解析する。まずNMRを用いて、コラーゲンモデルペプチドによる化学シフト摂動や、常磁性タグを利用した解析などにより、分子間相互作用に関する情報を得る。一般にコラーゲンはその三重らせん形成による棒状構造や、対称性による結合部位の多重性により、構造決定に適した複合体を調製することが困難であるが、NMRによる相互作用情報と、MDシミュレーションによる結合モデル構築に基づいて、数が限定されたLAIR分子が決まった配向で結合できるコラーゲンモデル配列を設計、作成する。作成したモデルペプチドとLAIRタンパク質との相互作用を、NMRなどにより確認し、適切な複合体形成条件を見出す。また、このペプチドとLAIRとの複合体の共結晶化について検討する。

## 4. 研究成果

LAIR(LAIR-1およびLAIR-2)のNMRシグナルを帰属し、Ⅲ型コラーゲンの部分配列や単純なコラーゲンモデルペプチド(POG)<sub>10</sub>とのNMRによる化学シフト摂動解析を実施した。その結果、コラーゲンとの相互作用部位および結合時に構造変化を起こす部位を特定した。また、ペプチド添加量に対してシグナルが非線形に減弱し、化学交換が起こっていることが示された。またLAIRがコラーゲンペプチドの複数箇所でも相互作用していることが示唆された。また、LAIR2の配向系試料を作成して、残余双極子カップリングの測定を行った結果、結晶構造に基づく予測値からのずれが明らかになり、溶液中での構造ゆらぎが大きいことが示唆された。一方、MDシミュレ

シオンにより LAIR とコラーゲンモデルペプチド間の結合自由エネルギーを評価する系を立ち上げた。分子モデリングにより、LAIR のコラーゲン結合モデルを構築し、LAIR 分子が 1 個ないし 2 個のみが結合できるコラーゲンモデルペプチドを設計することができた。合成されたペプチドは LAIR と強く結合し、NMR 実験では slow exchange 状態であることを示した。さらに複合体をゲル濾過で単離することが可能であることを確認した。また、その化学量論比は予想通り 1:1 ないし 1:2 であることが示唆された。これらの条件に基づいて LAIR2/モデルペプチド複合体の共結晶化について検討した結果、微結晶を得た。現在までに複合体の構造決定には至らなかったが、今後の構造決定に向けて有用な情報が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Imori Minato, Imoto Yuka, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Muroga Yuki, Yoshida Akihiro, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Nakamura Shota	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for the toxin-coregulated pilus-dependent secretion of <i>Vibrio cholerae</i> colonization factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo3013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hikaru, Hase Hiroaki, Yoshida Takuya, Tashiro Junki, Hirade Yoshihiro, Kitae Kaori, Tsujikawa Kazutake	4. 巻 100
2. 論文標題 Discovery of two novel ALKBH5 selective inhibitors that exhibit uncompetitive or competitive type and suppress the growth activity of glioblastoma multiforme	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Biology & Drug Design	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cbdd.14051	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------