



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細菌分解抗体を検知する免疫受容体LILRA2の分子認識機構 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山崎, 莉佳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13972号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78000
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Rika_YAMAZAKI_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏 名 山崎 莉佳

審査担当者	主 査	教 授	前 仲 勝 実
	副 査	教 授	松 田 正
	副 査	准教授	黒 木 喜 美 子
	副 査	講 師	柏 倉 淳 一

学 位 論 文 題 名

細菌分解抗体を検知する免疫受容体 LILRA2 の分子認識機構

博士学位論文審査等の結果について（報告）

ヒト体内では侵入した細菌を抗体が認識し、生体防御反応を誘導する。しかし、いくつかの細菌は抗体の抗原認識部位を切断し、不能化することにより免疫逃避する。近年、免疫細胞表面に発現する免疫活性化受容体 LILRA2 (Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor A2)が、細菌により切断された抗体（以下、N-truncated Ig）を検知し、その免疫逃避を免れていることが明らかとなった。しかしながら、N-truncated Ig の LILRA2 による分子認識機構は未解明であった。LILRA2 が属する LILR ファミリー分子は、細胞外には相同性の高いリガンド認識部位を持ちながら、細胞内には相反するシグナル伝達モチーフを持つペア型受容体群である。免疫活性化シグナルを持つ LILRA 群と免疫抑制化シグナルを持つ LILRB 群がある。これまでに LILRB 群はヒトの MHC (Main Histocompatibility complex)分子である HLA (Human Leukocyte Antigen) と結合し、自己細胞の攻撃を防いでいることが知られている。一方で、LILRA 群については長らく生理的な機能やリガンドが明らかとなっていなかった。しかし、近年上述した通り、LILRA2 は、N-truncated Ig を認識し免疫細胞を活性化することが明らかとなった。しかし、N-truncated Ig と結合するのは LILR 群の分子の中でも LILRA2 だけであり、その特異性が生まれる要因は未解明であった。

著者はそこで、生物物理学的手法を用いて、N-truncated Ig の LILRA2 による認識機構を詳細に解析することで、LILRA2 を介した免疫制御機構解明を目指した。本論文ではその研究の成果が述べられている。

最初に、本研究の研究背景および概要を述べた後、分子認識機構の解明に必要なタンパク質調製について述べられている。HEK293 およびその由来株を用いて、N-truncated Ig や LILRA2 の細胞外に存在する 4 つのドメイン 1-4（以下、LILRA2D1D4）の His タグ融合タンパク質を発現させた。さらには 4 つの細胞外ドメインのうち、他の LILR ファミリーのリガンド結合に関わる N 末端部分の 2 つのドメイン 1-2（以下、LILRA2D1D2）を大腸菌により発現した。いずれのタンパク質も各種精製法を用いて、精製を行い、その後の相互作用解析等に必要な純度および収量を得ることに成功している。

本相互作用の特異性や強さを調べるため、表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance 法, SPR 法)による相互作用解析を行った。最初に LILRA2D1D4 と LILRA2D1D2 の N-truncated Ig の結合能を比較した。その結果、LILRA2 も既報の他の LILR ファミリー分子と同様にドメイン 1 と 2 がリガンド結合に重要であることがわかった。さらには、解離定数を算出した結果、これまでの LILRB ファミリーと HLA 分子と同様、細胞外タンパク質間相互作用でよく見られる比較的弱い相互作用であることがわかった。一方で、細菌による切断を受ける前の抗体である full-length Ig と LILRA2 は結合しなかった。このことから、抗体の切断によって露出した面が結合に関わっていることが考えられた。

これまでに、LILRB 群のタンパク質においては、リガンド分子の 2 量体による結合の増強が免疫抑制シグナルの伝達に重要であることが知られている。そこで、LILRA2 分子においても同様の現象が起きえるかを検証するために、チップを細胞膜表面と見立てて LILRA2D1D2 を SPR チップに固定化し、アナライトとして N-truncated Ig を添加した。その結果、解離が遅延し、結合が

強まった。これは、N-truncated Ig1 分子につき、2つの Fab ドメインを有するので、LILRA2 を架橋するように相互作用し、結合が強まったためだと考えられる。そのため、LILRA2 においても LILRB 群と同様に架橋効果による結合能増強が、免疫系細胞への十分なシグナル伝達を可能にしていると考えられる。

N-truncated Ig の構造的安定性を理解するために、N-truncated Ig の熱安定性解析を行った。その結果、N-truncated Ig の Fc および Fab ドメインの変性温度は、full-length Ig のそれらと比較して、3°C および 15°C 低下していることがわかった。このことから、抗体 N 末端の欠損は N-truncated Ig 全体、特に Fab の安定性を低下させることが示唆された。一方で、高速原子間力顕微鏡による N-truncated Ig の観察の結果、full-length Ig と比較して、Fab 領域の運動性や大きな構造変化は見られないことを明らかにしている。

最後に、LILRA2 上の N-truncated Ig 結合領域を同定するため、LILRA2 と配列相同性が 70%以上ある LILR 群 (group1 LILR) との配列比較に基づいて、LILRA2 変異やキメラ体を作製し、N-truncated Ig 結合能を調べた。その結果、LILRA2 ドメイン 2 の 3 残基が N-truncated Ig 結合に重要であることを明らかにした。LILRA2 単量体構造の報告がないため、LILRB2 構造上に相互作用残基をマッピングしたところ、LILRA2 のリガンド認識部位は、他の LILR ファミリータンパク質のリガンド認識部位とは異なっていたことから、LILRA2 は N-truncated Ig 認識に特化して進化してきたことが考えられる。

本論文によって、LILRA2 の N-truncated Ig 認識における生物物理学的特徴が明らかとなった。さらには、LILRA2 の N-truncated Ig の結合領域を同定することによって、LILR 群がどのようにリガンド認識特異性を獲得したか、進化的な特徴も明らかにした。

よって著者は、北海道大学博士（臨床薬学）の学位を授与される資格あるものと認める。