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［全文の要約］
Author(s)	山﨑, 莉佳
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/78002
Type	doctoral thesis
File Information	Rika_YAMAZAKI_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（臨床薬学）　氏　名　　山﨑　莉佳

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

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，数種類の細菌は抗体の抗原認識部位を切断することで，抗体による認識を不能化して，免疫逃避する．近年，免疫逃避への対抗手段として，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，免疫活性化する機構が明らかにされた．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．LILR ファミリーは，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．免疫を活性化するLILRA 群と免疫を抑制するLILRB 群があり，N-truncated Ig と結合するのはLILRA2 だけであるが，この違いが生まれる要因は未解明であった．そこで，本研究では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．
LILRA2 の細胞外ドメインは，イムノグロブリン様フォールドを持つドメインが 4 個(D1-D4)タンデムに並んだ構造をとる．本研究では，細胞外ドメインのうちD1-D2 ドメイン(LILRA2D1D2)と，D1-D4 ドメイン（LILRA2D1D4)を調製した．LILRA2D1D2 は，大腸菌発現系を用いて封入体として大量発現させて希釈法により巻き戻し，ゲルろ過クロマトグラフィー（Size exclusion chromatography, SEC）により精製した．巻き戻したタンパク質のSEC での溶出位置が，分子量から予想される溶出位置と同じであることから，適切にフォールディングできたと判断した．
LILRA2D1D4 は，His タグ融合タンパク質として，ヒト培養細胞発現系を用いて調製した．Ni アフィニティクロマトグラフィーで精製した後に，SEC で精製した．N-truncated Ig は，軽鎖と細菌による切断を受けた重鎖をコードする遺伝子を含むプラスミドをHEK293T 細胞にトランスフェクションすることで，培養上清に一過性過剰発現させた．ProteinG アフィニティクロマトグラフィーの後にSEC により精製した．精製度をSDS-PAGE により解析した．
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．N-truncated Ig をチップに固定化し，アナライトとしてLILRA2D1D2 もしくはLILRA2D1D4 を添加した結果，それぞれがN-truncated Ig に直接特異的に結合することを示した．LILRA2D1D2 またはLILRA2D1D4 とN-truncated Ig との相互作用の解離定数が同様であることから，D1D2 ドメインがN-truncated Ig 認識に関わることが示された．また，細菌による切断を受ける前の抗体であるfull-length Ig とLILRA2D1D2 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．
本相互作用の速度論的な特徴を理解するために，SPR 法による速度論的解析を行った．N-truncated Ig をチップに固定化し,アナライトとしてLILRA2D1D2 を添加して,結合速度定数（k_{on}）と解離速度定数(k_{off})を求めた．その結果，k_{on} が 1.1±0.0×10^5 $M^{-1}s^{-1}$，k_{off} が 0.23±0.00 s^{-1} だった．このことから，一般的なタンパク質間相互作用と比較して，本相互作用は比較的速い結合・速い解離を示すことがわかった．生体内での配向を再現するためにチップを細胞膜表面と見立てて，LILRA2D1D2 を固定化し，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．この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．
本相互作用の熱力学的特徴を理解するために，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℃および15℃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．
非線形ファントホッフ解析を行い，相互作用の熱力学的パラメータを求めたところ，熱容量変化が中程度で，エントロピーロスが少ないエンタルピー駆動型の相互作用であることがわかった．速い結合・速い解離を示すことと，相互作用部位が疎水的であることを合わせて考えると，本相互作用では，複合体形成時の構造的揺らぎの維持や，疎水性相互作用によるエントロピーの増大，あるいはその両方が起きていると考えられる．
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 変異体を作製し，N-truncated Ig 結合能を調べた．group1 LILR と比較して LILRA2 でのみ保存されていないアミノ酸残基と，group1 LILR で保存性の低いアミノ酸残基に着目して，LILRB2 のアミノ酸に置換した LILRA2 変異体を作製した．円偏光二色性スペクトル測定により，変異体と野生型の二次構造に大きな変化がないことを調べた．SPR 解析の結果，すべてのドメイン 1 変異体と 2 つのドメイン 2 変異体は野生型と同様の K_d 値を示したが，ドメイン 2 変異体のひとつが N-truncated Ig と全く結合しなかった．これらの結果から，LILRA2 ドメイン 2 が N-truncated Ig 結合に関わると考え，LILRA2D1-LILRB2D2 キメラタンパク質を調製した．SPR 解析の結果，キメラタンパク質は N-truncated Ig と結合しなかった．以上の結果から，LILRA2 ドメイン 2 が N-truncated Ig 結合領域だと考えられた．さらに，LILRA2 結合領域を明らかにするため，LILR ファミリータンパク質の構造に基づいて，同定した相互作用残基周辺の LILRA2 変異体を 5 種作製し，N-truncated Ig 結合能を調べた．その結果，2 つの疎水性残基が N-truncated Ig 結合に関わることが示された．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．
LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用は，速い結合・速い解離，弱い結合を示すが，N-truncated Ig の多価効果により，固定化された LILRA2 に対して，解離が遅くなり，結合が強まることがわかった．このことから，細胞表面に発現する LILRA2 はすばやく抗体をチェックし，細菌によって複数カ所が切断された抗体を認識すると強く結合して，免疫系を活性化することが示唆された．
また，熱力学的解析から，本相互作用は，熱容量変化が中程度で，エントロピーロスが少ないエンタルピー駆動型相互作用であることがわかった．さらに，変異体解析により，LILRA2 の D2 ドメインの疎水性表面が N-truncated Ig 結合に関わることが明らかとなった．以上の結果より，複合体形成時には，構造的揺らぎの維持あるいは疎水性効果が起きていることが示唆された．本研究で同定した相互作用部位をターゲットにすることで，LILRA2 を標的とした感染症治療薬開発に繋がることを期待できる．