HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular mechanism of ligand recognition by the immune activation receptor LILRA2 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	王, 嘉琪
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16107号
Issue Date	2024-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93678
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jiaqi_Wang_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　　王　嘉琪

審査担当者	主査	教　授	前　仲　勝　実
	副査	教　授	黒　木　喜美子
	副査	講　師	米　田　　宏
	副査	准教授	古　川　　敦（金沢大学大学院医薬保健学総合研究科）

学 位 論 文 題 名

Molecular mechanism of ligand recognition by the immune activation receptor LILRA2

（免疫活性化受容体 LILRA2 によるリガンド認識の分子機構）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

免疫細胞の表面受容体は、免疫応答の適切な制御のために重要である。細胞内に免疫活性化モチーフ ITAM を持つ、もしくは、ITAM と会合する受容体は、主に細胞外に存在する病原体などを細胞外ドメインが認識し、免疫細胞を活性化することで病原体の排除に関わる。一方で、細胞内に免疫抑制化モチーフ ITIM を有する分子は、細胞外ドメインで主に自己細胞の表面に発現する分子に結合し、自己への免疫細胞の攻撃を防いでいると考えられている。このような受容体の中でもペア型受容体群は、細胞外ドメインの相同性が高いにも関わらず、細胞内は活性性もしくは抑制性の相反するモチーフを有する。そのペア型受容体群の中で、LILR(Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor)群は、細胞外にイムノグロブリンフォールドを有するドメインを用い、免疫活性化モチーフ ITAM をもつ受容体群を LILRA 群、免疫抑制化モチーフ ITIM を持つ受容体群をもつ LILRB 群に大別される。これまでに、LILRB 群についての機能や構造については多くの点が明らかにされており、LILRB1 や LILRB2 は、主要組織適合性複合体クラスⅠ（MHCI）分子を認識して、自己細胞に対する免疫寛容することが明らかになっている。一方で、LILRA 群については長らく機能が不明であった。しかし、近年、LILRA 群の中の LILRA2 は、細菌分泌するプロテアーゼによって抗体の VH と CH1 間が切断され、抗原認識部位を失った抗体（切断抗体）を認識することが明らかとなった。さらに、LILRA2 は血液凝固因子のフィブリノーゲンに結合することが明らかになった。しかし、その認識機構は不明な点が多い。そこで本研究では、LILRA2 はフィブリノーゲンの認識機構を明らかにすることを目的とした。

LILRA2 の 4 つのドメイン（ドメイン 1～4(D1～4)）の組み換えタンパク質を用いて表面プラズモン共鳴法により結合実験を行った。その結果、LILRA2 とフィブリノーゲンは、直接結合すること、その相互作用は 10 μM 程度であり、切断抗体への結合と同程度であることがわかった。また、同じ LILR ファミリーの LILRB1 はフィブリノーゲンに結合しないことも明らかにした。これまでに LILRA2 の細胞外ドメインの中でも切断抗体の結合には、D2 が関わっていることが明らかになっている。フィブリノーゲンへの結合においても D2 が関わっているかどうかを検証するために、LILRA2 細胞外 4 つのドメインのうち、N 末側 2 つのドメインタンパク質（LILRA2D1D2）を調製し、結合実験を行った。その結果、このタンパク質は、切断抗体に結合するのに対し、フィブリノーゲンには結合しないことがわかった。さらに、clone135 と呼ばれる LILRA2 抗体の LILRA2 の結合によって、LILRA2 の切断抗体への結合が阻害されるのに対して、フィブリノーゲンの結合は阻害

されないことも明らかにした。そのため、LILRA2 はフィブリノーゲンに切断抗体と異なるメカニズムで結合することが明らかになった。さらに結合ドメインを明らかにするために、３つのドメインを有する LILRA2D1D2D3 を調製し、結合実験を行った結果、LILRA2D1D2D3 は切断抗体に結合するのに対し、フィブリノーゲンには結合しなかった。そのため、LILRA2 の D4 がフィブリノーゲンへの結合に重要であることを強く示唆された。

LILRA2 の変異体解析から、フィブリノーゲン結合に関わるアミノ酸残基の同定を行った。まず、切断抗体の認識することが明らかになっており、フィブリノーゲンの結合に関わらないとされるドメイン 2 の変異体を用いて、結合実験を行った。その結果、ほとんどのドメイン 2 の変異がフィブリノーゲンの結合に影響をしなかったのに対し、切断抗体の認識にも関わる 154 番目のトリプトファンが結合に影響することがわかった。そのため、切断抗体の認識とは異なり、LILRA2 は D2 から D4 に渡った広い範囲でフィブリノーゲンに結合することを明らかにした。さらに、D4 の変異体についても解析を行ったところ、作製した多くのアミノ酸が結合に関わらないことが示唆された一方で、D3 との境界部分に存在するリンカー領域に存在するアミノ酸変異で結合に違いが見られたことから、D4 の中でも D3 に近接した部分が結合することが示唆された。クライオ電子顕微鏡を用いて、LILRA2 単体、さらには LILRA2 と抗体の Fab との複合体を用いて、構造解析を行い低分解能ながらも構造解析に成功した。さらに、Alphafold3 を用いた in silico 解析と同定した結合部位の情報をもとに、結合モデルを構築した。

以上のように、著者は相互作用解析が可能な各種 LILRA2 タンパク質の調製に成功し、網羅的変異解析によって、LILRA2 のフィブリノーゲン結合部位は、これまで既知の切断抗体との結合部位とは異なることを見出した。この成果は、LILRA2 だけでなく、生体内で多様なリガンドと結合できる LILR ファミリーのリガンド認識能獲得の進化学的解明や他のファミリー分子の機能解明にもつながる知見である。

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