



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13972
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94381
Type	doctoral thesis
File Information	Rika_YAMAZAKI.pdf



博士学位論文

細菌分解抗体を検知する免疫受容体 LILRA2 の分子認識機構

山崎 莉佳

北海道大学 大学院生命科学院 臨床薬学専攻
生体分子機能学研究室

2020 年 3 月

目次

1. 略語一覧	1
2. 研究背景と目的	3
3. 結果.....	6
4. 考察.....	31
5. 実験材料と手法	42
6. 参考文献	48
7. 謝辞.....	54

1. 略語一覧

CBB; Coomassie brilliant blue

CD; circular dichroism

DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium

DSC; differential scanning calorimetry

DTT; dithiothreitol

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

Fab; antigen-binding fragment

FBS; fetal bovine serum

HBS; HEPES-buffered saline

HEK; human embryo kidney

HEPES; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HLA; human leukocyte antigen

HS-AFM; high-speed atomic force microscopy

Ig; Immunoglobulin

ILT; immunoglobulin-like transcript

IPTG; isopropyl 1-thio- β -D-galactoside

ITAM; immunoglobulin tyrosine-based activation motif

ITIM; immunoglobulin tyrosine-based inhibitory motif

KIR; killer cell immunoglobulin-like receptor

LILR; leukocyte immunoglobulin-like receptor

MHC; major histocompatibility complex

MIB; *Mycoplasma* Ig binding protein

MIP; *Mycoplasma* Ig protease

PCR; polymerase chain reaction

PEI; polyethyleneimine

SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis

SLE; systemic lupus erythematosus

SNP; single nucleotide polymorphism

SP; signal peptide

SPR; surface plasmon resonance

TCR; T cell receptor

TM; transmembrane

VH; variable domain fragment of immunoglobulin heavy chain

VL; variable domain fragment of immunoglobulin light chain

WT; wild type

LILRA2 変異体の略称

例) LILRA2Q31E; LILRA2 の Gln31 を Glu に置換した変異体

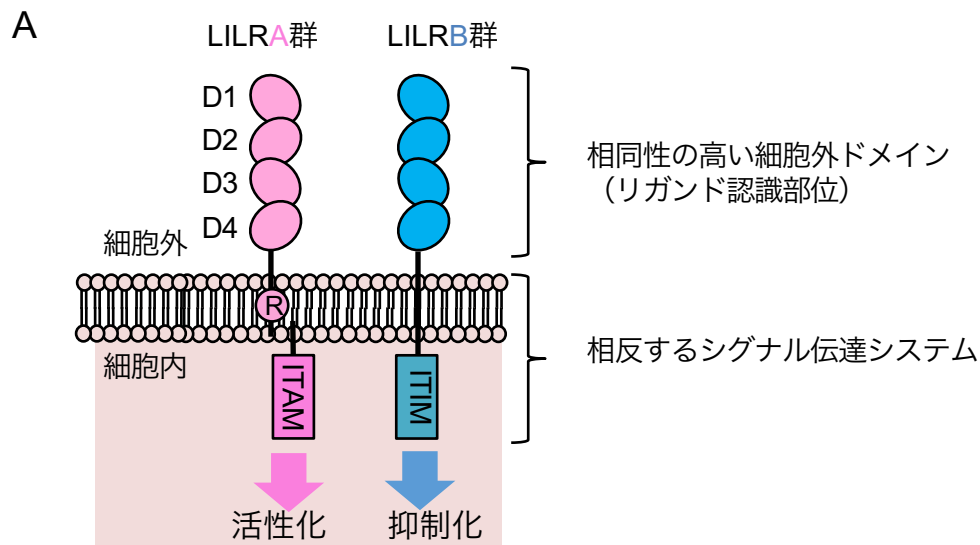
2. 研究背景と目的

LILR (Leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor) は, LIR, ILT (Ig-like transcript), CD85 としても知られる受容体ファミリーであり, 主に骨髄系細胞 (単球/マクロファージ, 樹状細胞) に発現している (Kuroki et al., 2012). LILR 遺伝子は, ヒト染色体 19q13.4 上の白血球受容体複合体 LRC (Leukocyte receptor complex) 領域に存在する. LRC 領域には, LILR のほかに, KIR (Killer cell Ig-like receptor) や LAIR (Leukocyte-associated Ig-like receptor), NKp46, FcαR などの免疫系受容体群がコードされている (Martin et al., 2002). LILR 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システムを持つ受容体群であるペア型受容体のひとつである (**Fig. 1A**). LILR の細胞外ドメインは約 10 kDa のイムノグロブリン様ドメインが 2 個 (D1D2) もしくは 4 個 (D1-D4) 並んだ構造をとる. LILRB 群 (LILRB1, -B2, -B3, -B4, -B5) は細胞内に ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を持ち, 抑制性のシグナルを伝達する受容体群である. 例えば, 免疫細胞上に発現する LILRB1 や LILRB2 は, ターゲット細胞の HLA (human leukocyte antigen) を認識し, 細胞の活性化を抑制する (Borges et al., 1997; Chapman et al., 1999; Cosman et al., 1997; Shiroishi et al., 2003). そのため, LILRB 群は, PD-1 や CTLA-4 のような免疫チェックポイント分子のひとつとして分類される (Kang et al., 2016; Sharma and Allison, 2015). 一方で, LILRA 群 (LILRA1, -A2, -A4, -A5, -A6) は細胞内に活性化シグナルを伝達する受容体群である. LILRA 群は, 膜貫通領域に正電荷を持つアルギニン残基を持ち, このアルギニン残基を介して細胞内ドメインに ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を持つ分子と会合し, 細胞内に活性化シグナルを伝達する. 例えば, LILRA1 は, 強直性脊椎炎との関連が知られる HLA-B27 と結合する (Allen et al., 2001). また, LILRA1 や LILRA3 は, β2 ミクログロブリンフリーの HLA-C と結合する (Jones et al., 2011). LILRA2 と配列相同性が 70%以上ある LILR (LILRA1, A3, B1, B2) の中で, LILRA2 以外の分子は HLA を認識することが報告されているが, LILRA2 は HLA との結合は確認されなかった. LILRA2 は活性化受容体であるため, 非自己リガンドを認識し生体防御に関わる可能性も考えられてきたが, リガンドはひとつも同定されていなかった.

LILRA2 は, 単球/マクロファージ, 好中球, 好酸球, 好塩基球のような自然免疫に関わる細胞の表面に発現している (Lu et al., 2012). LILRA2 は膜貫通領域に存在する正電荷を持つアルギニン残基を介して FcγR と会合し, ITAM を会して細胞内に活性化シグナルを伝達する (Nakajima et al., 1999). 抗 LILRA2 抗体を用いて, 単球細胞表面上の LILRA2 をクロスリンクすると, ITAM を会したシグナル伝達に関わるキナーゼである p38 や ERK のリン酸化や, カルシウム流入, TNF-α, I-6, IL-8, IL-12, IL-10 などの炎症性サイトカインの産生が引き起こされる (Huynh et al., 2007; Lee et al., 2007; Nakajima et al., 1999). 同様に, 抗 LILRA2 抗体を用いて, 好酸球および好塩基球表面上の LILRA2 をクロスリンクすると, 脱顆粒が起き, 炎症性メディエーターやサイトカインの産生が引き起こされる (Sloane et al., 2004; Tedla et al.,

2003). また, LILRA2 を活性化すると, GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) 刺激による単球から樹状細胞への分化が抑制されたり, T 細胞の MHC クラス II 分子への抗原提示が抑制されるという報告もある(Lee et al., 2007). 以上の報告から, LILRA2 は, 免疫活性化および調節機能を持つ受容体だと考えられている. LILRA2 は, 感染症や自己免疫疾患との関連も報告されている. 例えば, らい腫型ハンセン病患者の病変部位では, LILRA2 の発現量が上昇していることから, ハンセン病の病態と LILRA2 との関連性が示唆されている(Bleharski et al., 2003). また, 滑膜組織における LILRA2 発現細胞平均数と, 関節リウマチの重症度に相関があった (Tedla et al., 2011). さらに, LILRA2 遺伝子には, イントロン 6 のスプライスアクセプター部位に変異が入った一塩基多型 (SNP; single nucleotide polymorphism) が存在する(Mamegano et al., 2008). この多型の遺伝子産物として, 細胞外リンカー領域内の 3 アミノ酸残基が欠失した LILRA2 アイソフォームが発現する. この多型が, 健常対照群の 7.0%に対して, 全身性エリテマトーデス (SLE; systemic lupus erythematosus) では 12.1%, 顕微鏡的多発血管炎では 16.0%と有意に増加していた. 以上の報告から, LILRA2 が感染症や自己免疫疾患に関わることが示唆されてきたが, 生理的リガンドが不明だったため, 研究が進んでいなかった.

しかし, 近年, LILRA2 がレジオネラ菌やマイコプラズマのような細菌が分泌するプロテアーゼによって VH ドメインが切断された抗体 (以下, N-truncated Ig) を認識し, 免疫を活性化させることが平安らによって報告された(Hirayasu et al., 2016) (**Fig. 1B**). これは, 細菌による切断を受けて“非自己”へと変化した抗体を LILRA2 が認識することで, 生体内に異物が侵入したことを検知する新規の機構である. 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. 平安らは, フローサイトメトリーを用いた実験により, 全ての LILR と, CD79 α / β と共発現させた膜結合型 N-truncated Ig との結合の有無を調べた. その結果, Fc-fusion LILRA2 のみが膜結合型 N-truncated Ig に結合し, LILRA2 以外の LILR は膜結合型 N-truncated Ig に結合しなかった(Hirayasu et al., 2016). LILRA2 との配列相同性が約 79%と高い LILRB2 も N-truncated Ig と結合しなかったが, LILRA2 とのリガンド認識能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 による分子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.



B

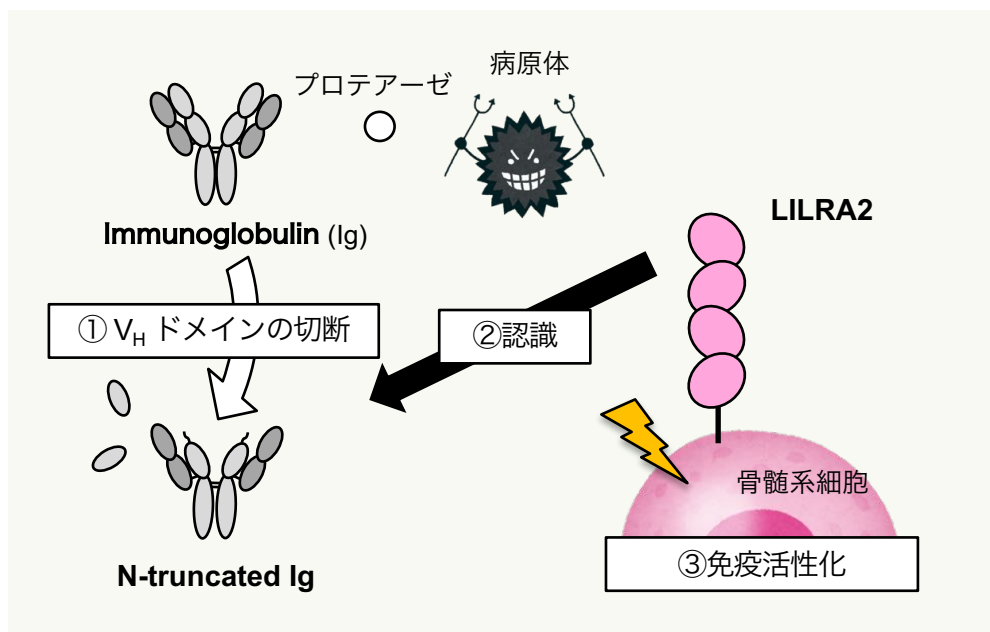


Fig. 1 研究背景

(A) ペア型受容体の概略図. 細胞外に4つのイムノグロブリン様ドメインを持つLILR群を例として示した.

ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif.

ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif.

(B) 細菌による抗体分解と, それを検知する宿主免疫機構の概略図.

3. 結果

LILRA2 の発現および精製

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 (LILRA2D1D2), D1-D4 ドメイン (LILRA2D1D4) および LILRA2D1D4 に Fc を融合させたタンパク質 (Fc-fusion LILRA2D1D4) を調製した (**Fig. 2A**)。

LILRA2D1D2 は、大腸菌発現系を用いて調製した。LILRA2D1D2 をコードする遺伝子断片を含むプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株に導入した。1L 培養あたり、100-150 mg の LILRA2D1D2 を含む封入体を得た。得られた封入体を可溶化してから巻き戻し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した (**Fig. 2B**)。巻き戻したタンパク質のゲルろ過クロマトグラフィーでの溶出位置が、LILRA2 単量体の分子量から予想される溶出位置であることから、本来の構造に巻き戻ったと判断した。精製度を SDS-PAGE により解析した (**Fig. 2C**)。リフォールディング効率は 0.5-1%だった。

LILRA2D1D4 は、His タグ融合タンパク質として、HEK293S GnTI(-)細胞を用いて調製した。Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製したのちに、ゲルろ過クロマトグラフィーで精製した (**Fig. 2D**)。LILRA2D1D4 は単量体の分子量から予想される位置に溶出された。精製度を SDS-PAGE により解析した (**Fig. 2E**)。収量は、1L 培養あたり約 0.5 mg だった。

Fc-fusion LILRA2D1D4 は、HEK293T 細胞を用いて発現させた。Protein G アフィニティークロマトグラフィーののちに、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した (**Fig. 2F**)。精製度を SDS-PAGE により解析した (**Fig. 2G**)。収量は、培養上清 1L あたり約 4 mg だった。コントロールタンパク質として、細胞アッセイで N-truncated Ig と結合せず、LILRA2 との配列相同性が約 79%ある LILRB2 の細胞外ドメイン D1-D2 (LILRB2D1D2) を LILRA2D1D2 の調製方法に準じて発現および精製した (**Fig. 2H, I**)。リフォールディング効率は 3%程度だった。

N-truncated Ig の発現および精製

N-truncated Ig および full-length Ig は、軽鎖と N 末端を短くした重鎖または全長重鎖をコードする遺伝子を含むプラスミドを HEK293T 細胞にコ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 (**Fig. 3A**)。Protein G アフィニティークロマトグラフィーののちに、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した (**Fig. 3B, C**)。精製度を SDS-PAGE により解析した (**Fig. 3D**)。N-truncated Ig の収量は、1L 培養あたり約 1.7 mg, full-length Ig の収量は約 7.7 mg だった。

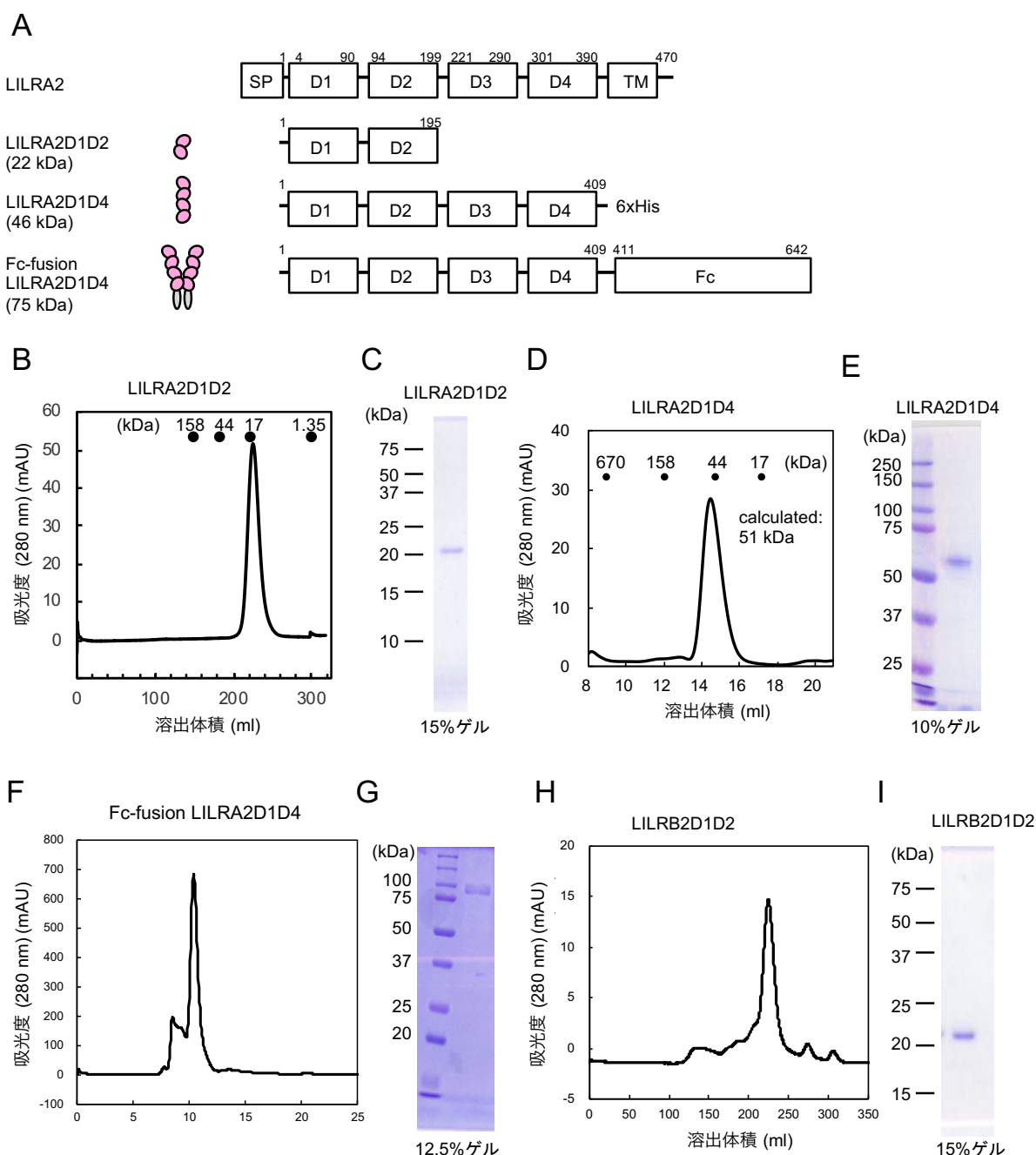


Fig. 2 LILRA2 および LILRB2 の調製

(A) LILRA2 タンパク質全長および組換えタンパク質 LILRA2D1D2, LILRA2D1D4, Fc-fusion LILRA2D1D4 の一次構造. SP: シグナルペプチド, D: ドメイン, TM: 膜貫通ドメイン

(B) LILRA2D1D2 のゲルろ過クロマトグラム.
標準タンパク質の溶出体積をクロマトグラム上部に示した.

(C) LILRA2D1D2 の SDS-PAGE 結果 (CBB 染色, 還元条件)

(D) LILRA2D1D4 のゲルろ過クロマトグラム.
標準タンパク質の溶出体積をクロマトグラム上部に示した.

(E) LILRA2D1D4 の SDS-PAGE 結果 (CBB 染色, 還元条件)

(F) Fc-fusion LILRA2D1D4 のゲルろ過クロマトグラム.

(G) Fc-fusion LILRA2D1D4 の SDS-PAGE 結果 (CBB 染色, 還元条件)

(H) LILRB2D1D2 のゲルろ過クロマトグラム.

(I) LILRB2D1D2 の SDS-PAGE 結果 (CBB 染色, 還元条件)

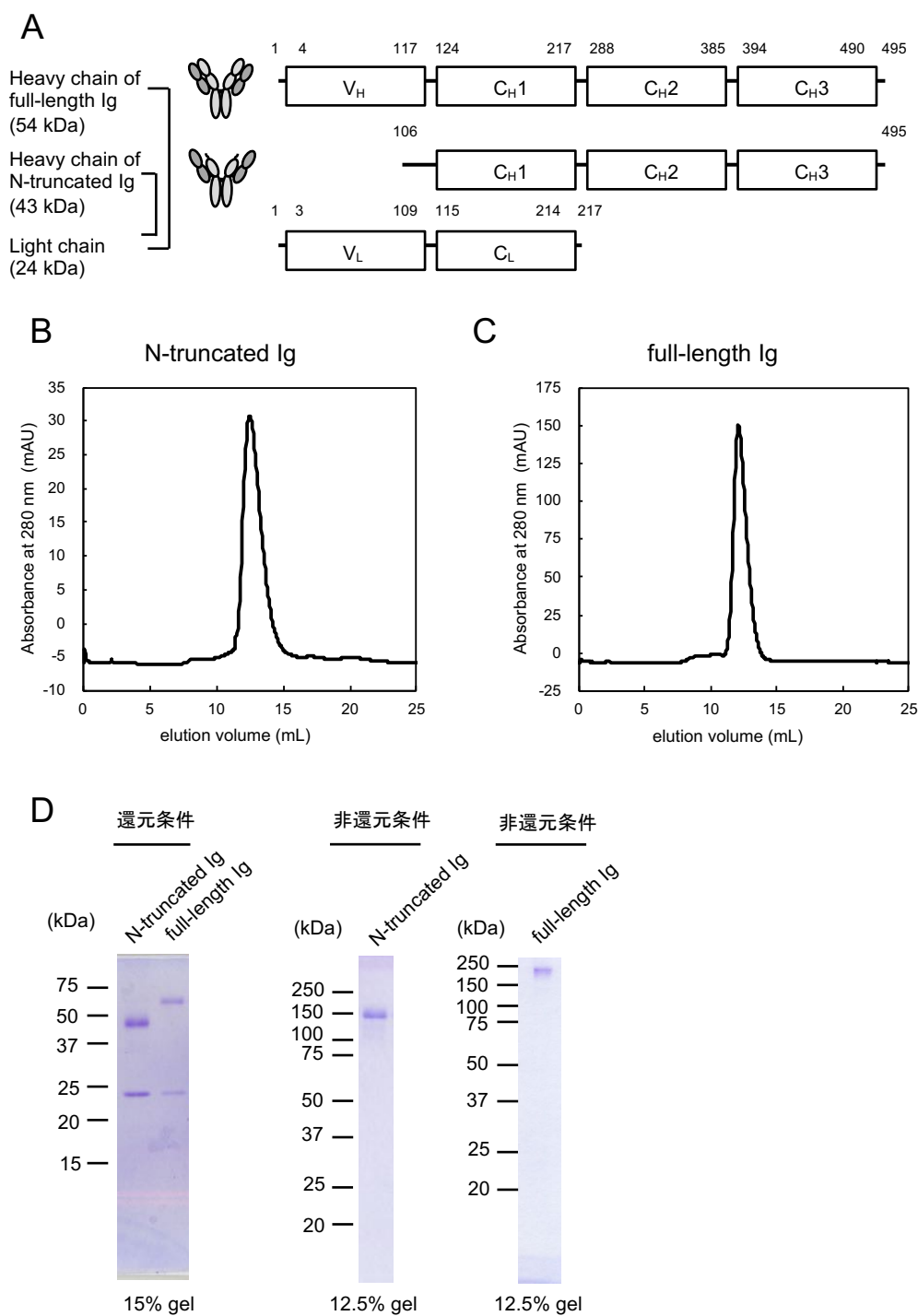


Fig. 3 N-truncated Ig および full-length Ig の調製

(A) Full-length Ig および N-truncated Ig の一次構造.

(B) N-truncated Ig のゲルろ過クロマトグラム.

(C) full-length Ig のゲルろ過クロマトグラム.

(D) N-truncated Ig および full-length Ig の SDS-PAGE 結果 (CBB 染色, 還元および非還元条件)

表面プラズモン共鳴法による LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用解析

本相互作用の特異性や親和性を調べるため、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 もしくは full-length Ig をチップに固定化し、アナライトとして LILRA2D1D2 を添加した。その結果、LILRA2D1D2 は N-truncated Ig と直接特異的に結合したが、full-length Ig と結合しなかった (**Fig. 4A**)。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。次に、LILRA2D1D2 と配列相同性が約 79%である LILRB2D1D2 をアナライトとして添加したところ、N-truncated Ig と結合しなかった (**Fig. 4B**)。この結果は、平安らが行った細胞アッセイの結果と一致していた。

次に、0.16-40 μM の LILRA2D1D2 および 0.12-15 μM の LILRA2D1D4 を添加した (**Fig. 4C, D**)。各濃度におけるレスポンス量をプロットし、非線形 Langmuir 結合等温曲線でフィッティングした。その結果、解離定数はそれぞれ $4.9 \pm 0.0 \mu\text{M}$, $13 \pm 0.0 \mu\text{M}$ だった。

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。0.63, 1.3, 2.5 μM の LILRA2D1D2 を N-truncated Ig が結合したチップに添加した (**Fig. 4E**)。1:1 の Langmuir 結合モデルの式を用いたグローバルフィッティング解析により結合速度定数 (k_{on}) と解離速度定数 (k_{off}) を求めた。その結果、 k_{on} が $1.1 \pm 0.2 (10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$, k_{off} が $0.23 \pm 0.00 (\text{s}^{-1})$ だった。 $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ より k_{on} , k_{off} から求めた K_d は $2.0 \pm 0.0 \mu\text{M}$ だった。速度論的解析から求めた K_d が平衡値解析から求めた K_d と同等であったことから、数 μM オーダーの解離定数であることが示唆された。

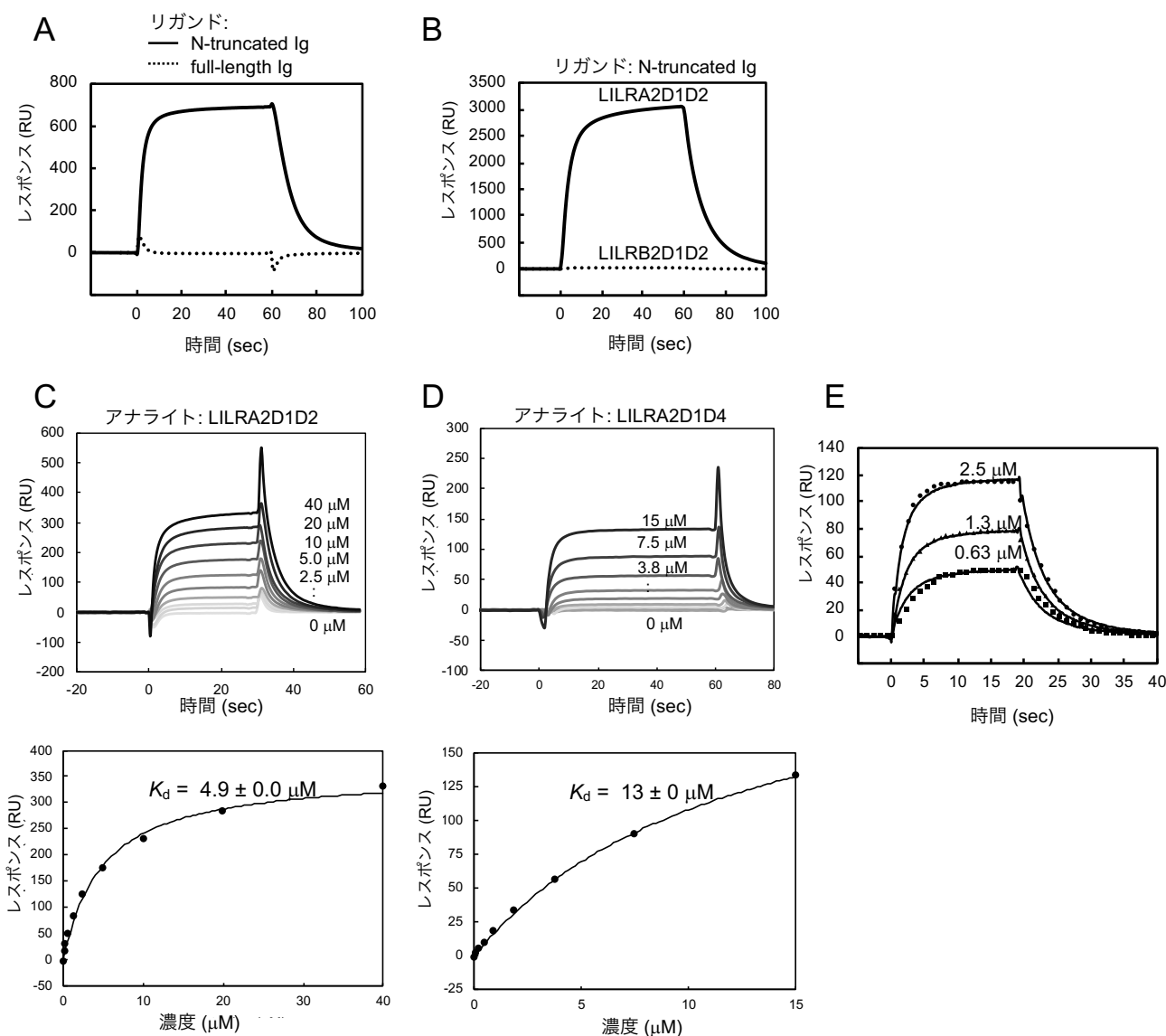


Fig. 4 表面プラズモン共鳴法による LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用解析

(A) 20 μ M LILRA2D1D2 を N-truncated Ig (実線) または full-length Ig (点線) を固定化したフローセルにインジェクトした. N-truncated Ig と full-length Ig の固定化量はそれぞれ 1400 RU と 1300 RU だった.

(B) N-truncated Ig を固定化したフローセル (固定化量: 20000 RU) に 9 μ M LILRA2D1D2 (実線) および LILRB2D1D2 (点線) をインジェクトした.

(C) (上) N-truncated Ig を固定化したフローセルに, 0.16-40 μ M の LILRA2D1D2 をインジェクトした. (下) 平衡値解析. 1:1 の Langmuir 結合モデルの式を用いた非線形フィッティングをした (実線). K_d : 平均 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$)

(D) (上) N-truncated Ig を固定化したフローセルに, 0.16-40 μ M の LILRA2D1D4 をインジェクトした. (下) 平衡値解析. 1:1 の Langmuir 結合モデルの式を用いた非線形フィッティングをした (実線). K_d : 平均 $\pm$ 誤差 ($n=2$)

(E) LILRA2D1D2 の N-truncated Ig に対する相互作用のグローバルフィッティング結果. 各濃度の LILRA2D1D2 を N-truncated Ig (固定化量: 1400 RU) を固定化したフローセルにインジェクトした.

LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用の多価効果の検証

一般的に抗体は2つ以上の抗原認識部位を持つため、細胞膜上に発現する抗原に対して多価効果による強い結合能を持つ。N-truncated Ig も、通常の抗体と同様に、受容体と結合する部位が2つあると考えられるので、細胞膜上に発現する LILRA2 に対して多価効果による強い結合能を示す可能性がある。この可能性を検証するため、LILRA2D1D2 をチップに固定化し、N-truncated Ig をアナライトとして添加した。その結果、N-truncated Ig をチップに固定化して LILRA2D1D2 を添加したとき (**Fig. 4C**) と比較して、解離が遅延した (**Fig. 5A**)。見かけの K_d は 103 nM だった。

多価効果による結合能の増強をさらに調べるため、LILRA2D1D2 または Fc-fusion LILRA2D1D4 と N-truncated Ig を混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、複合体形成能を調べた。 $A+B \rightleftharpoons AB$ (解離定数: K_d) の平衡反応があるとき、A, B の初期濃度をそれぞれ $[A]_0, [B]_0$ とすると、 $K_d = [A][B]/[AB] = ([A]_0 - [AB])([B]_0 - [AB])/[AB]$ ((1)式) である。今回、終濃度が 1.7 μM LILRA2D1D2, 0.87 μM N-truncated Ig になるように混合した。SPR により求めた K_d は 4.9 μM であり、N-truncated Ig 1 分子につき2カ所の LILRA2 結合部位があるとする、(1)式より LILRA2D1D2/N-truncated Ig 複合体の濃度は 0.37 μM と計算される。そのため、混合液中に存在する LILRA2D1D2 のうち複合体を形成している割合は、22%と計算される。同様に、Fc-fusion LILRA2D1D4 と N-truncated Ig も、終濃度をそれぞれ 0.87 μM になるように混合したこと、 K_d が 103 nM であることから、(1)式を用いて Fc-fusion LILRA2D1D4/N-truncated Ig 複合体の濃度は、0.62 μM と計算される。そのため、混合液中に存在する Fc-fusion LILRA2D1D4 のうち複合体を形成している割合は、71%と計算される。混合溶液をゲルろ過クロマトグラフィーすると、溶液は希釈されるため、複合体形成率は計算値よりも下がると考えられるが、LILRA2D1D2/N-truncated Ig 相互作用と、Fc-fusion LILRA2D1D4/N-truncated Ig 相互作用との解離定数には20倍程度の違いがあるので、複合体形成率の違いを観察できると予想される。LILRA2D1D2/N-truncated Ig 混合溶液の解析結果では、LILRA2D1D2 および N-truncated Ig それぞれの溶出位置にタンパク質が溶出された (**Fig. 5B**)。一方、Fc-fusion LILRA2D1D4/N-truncated Ig 混合溶液の解析結果では、Fc-fusion LILRA2D1D4 および N-truncated Ig それぞれの溶出位置とは異なる早い溶出位置に新たなピークが現れた (**Fig. 5C**)。この画分を SDS-PAGE により展開し、ゲルを CBB 染色した結果、Fc-fusion LILRA2D1D4 と N-truncated Ig が含まれることがわかった (**Fig. 5D**)。このことから、Fc-fusion LILRA2D1D4 と N-truncated Ig とが複合体を形成し、同位置に溶出されたと考えられる。以上の結果より、N-truncated Ig は2つの LILRA2 結合部位を持ち、多価効果を示すことが示唆された。

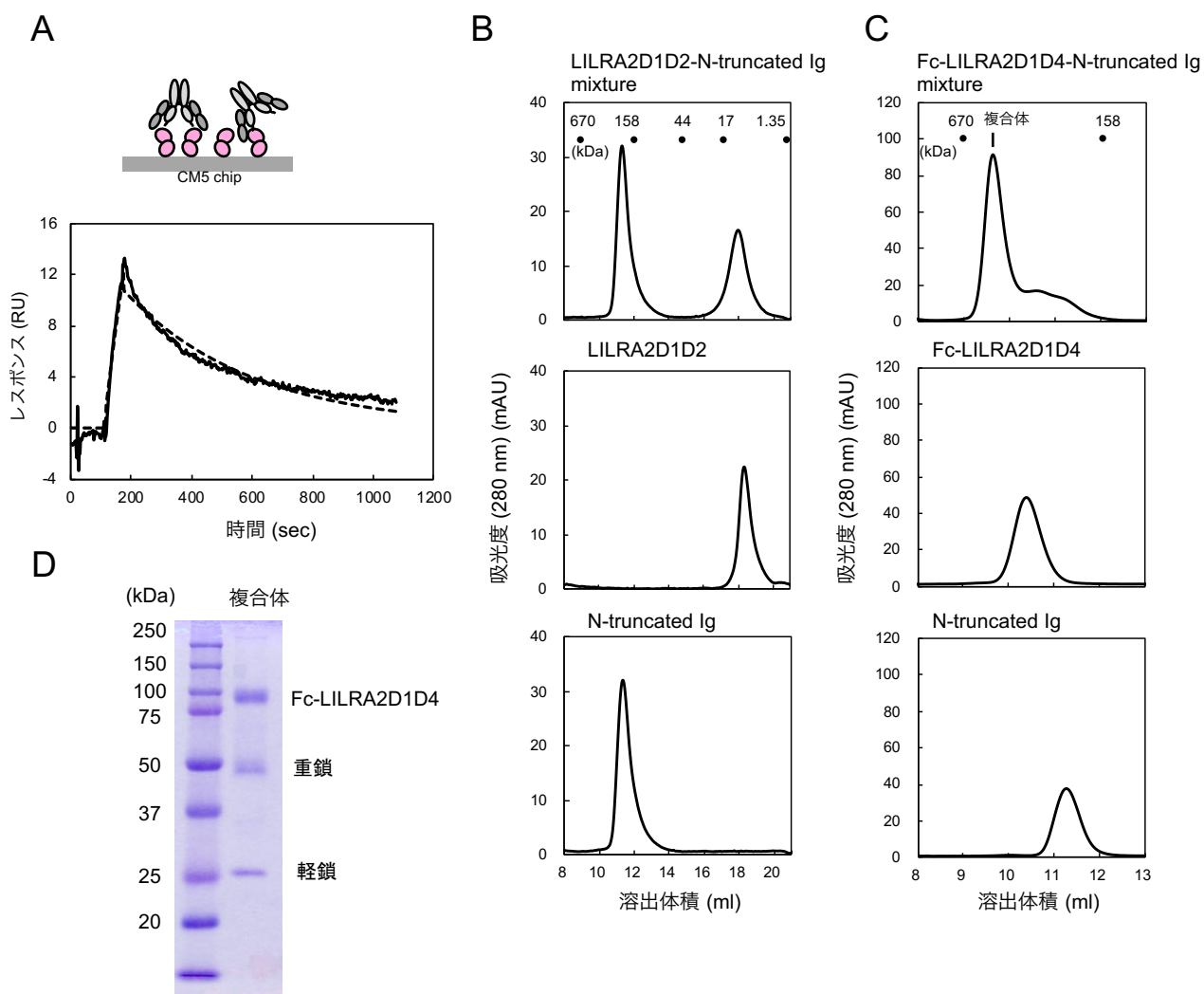


Fig. 5 LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用の多価効果の検証

(A) LILRA2D1D2 を固定化したフローセル（固定化量：100 RU）に 47 μ M N-truncated Ig をインジェクトした（実線）。1:1 の Langmuir 結合モデルの式を用いた非線形フィッティングをした（点線）。

(B) LILRA2D1D2（終濃度：1.7 μ M）と N-truncated Ig（終濃度：0.87 μ M）との混合溶液のゲルろ過クロマトグラム。

(C) Fc-fusion LILRA2D1D4（終濃度：0.87 μ M）と N-truncated Ig（終濃度：0.87 μ M）との混合溶液のゲルろ過クロマトグラム。

(D) (C)で得られた複合体画分の SDS-PAGE 結果（CBB 染色，還元条件）。

LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用の熱力学的解析

本相互作用の熱力学的特徴を理解するために、示差走査熱量計 (DSC; differential scanning calorimetry) を用いて full-length Ig および N-truncated Ig の熱安定性解析を行った。Full-length Ig を解析した結果、変性中点温度 (T_m) 69.0°C および 73.5°C を示す 2 つのピークが得られた (**Fig. 6A**)。過去の報告 (Garber and Demarest, 2007) と合わせて考えると、前者が Fc 変性由来、後者が Fab 変性由来のピークだと考えられる (**Fig. 6C**)。N-truncated Ig を解析した結果、変性中点温度 57.8°C および 66.3°C を示す 2 のピークが得られた (**Fig. 6B**)。後者のピークのカロリメトリックエンタルピー変化と full-length Ig の Fc 変性由来と考えられるピークのそれが同様であることから、後者のピークは Fc 変性由来だと考えられる。もう一方のピークが Fab 変性由来だと考えられる。N-truncated Ig の T_m 、中でも Fab 変性由来と考えられるピークの T_m は full-length Ig の T_m のそれよりも低かった。このことから、抗体 N 末端の欠損により、N-truncated Ig 全体、特に Fab の安定性が低下したことが示唆された。

さらに本相互作用の熱力学的特徴を明らかにするため、非線形ファントホッフ解析を行った (**Fig. 6D**)。相互作用の熱力学的パラメータを求めたところ、25°C において $-T\Delta S$ (T : ケルビン温度, ΔS : 結合エントロピー変化) が $0.85 \pm 0.03 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, ΔH (ΔH : 結合エンタルピー変化) が $-8.2 \pm 0.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, ΔC_p (ΔC_p : 熱容量変化) が $0.56 \pm 0.02 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ だった (**Fig. 6E, Table 1**)。このことから、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。

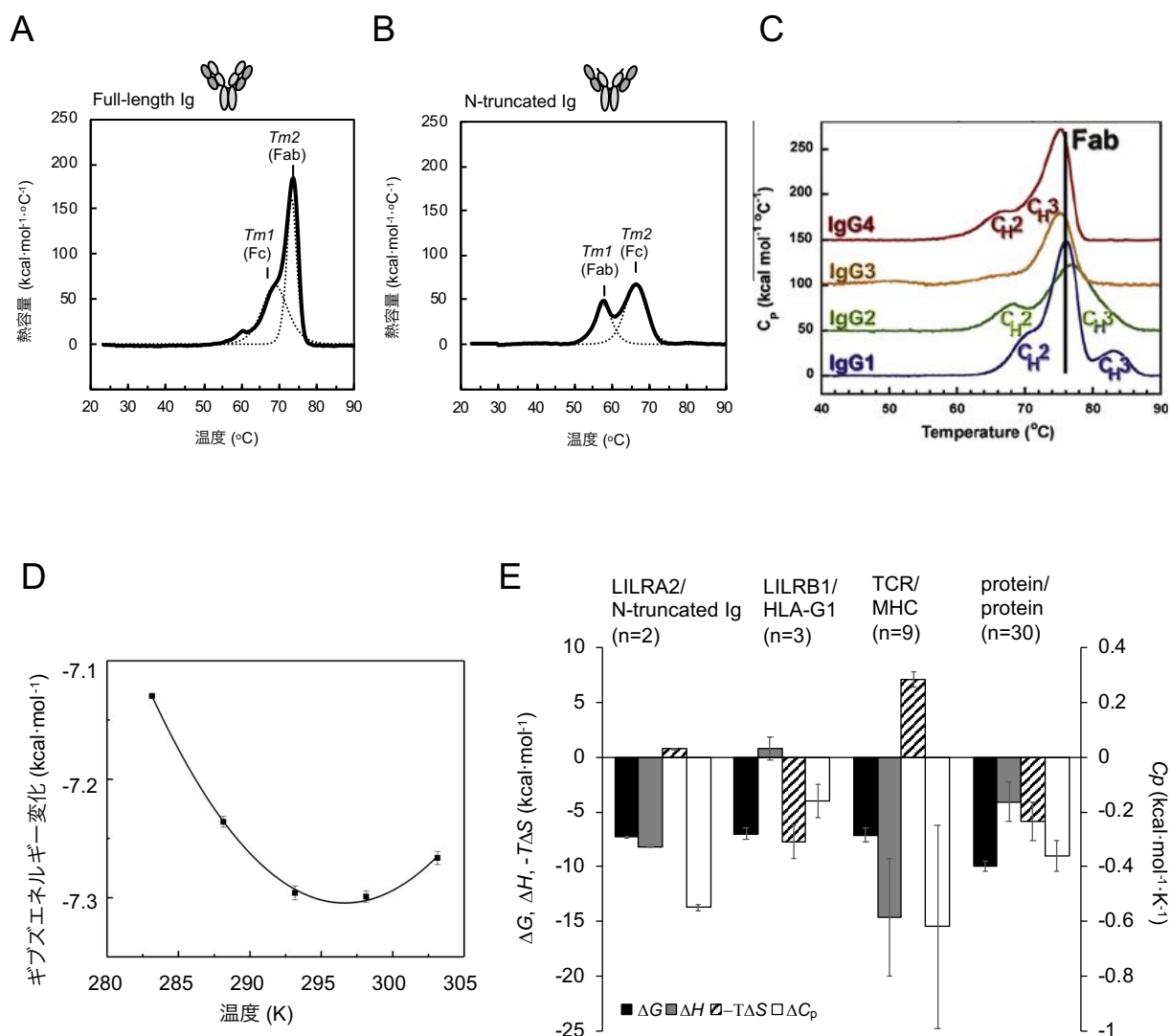


Fig. 6 LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用の熱力学的解析

(A) (B) Full-length Ig (A) と N-truncated Ig (B)の DSC 解析結果. 実線は生データを, 点線はフィッティングカーブを示す.

(C) (Garber and Demarest, 2007)より引用した IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 の DSC 解析結果.

(D) LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用のギブズエネルギーの温度に対するプロット. 5 点の温度 (10-30°C) におけるギブズエネルギーを平衡値解析により求めた K_d から算出した.

(E) 細胞表面の分子間相互作用の熱力学的パラメータの比較. LILRB1/HLA-G1 相互作用のデータは(Shiroishi et al., 2006b)を, TCR/ペプチド-MHC 相互作用のデータは, (Anikeeva et al., 2003; Boniface et al., 1999; Davis-Harrison et al., 2005; Garcia et al., 2001; Lee et al., 2004; Willcox et al., 1999)を参考にした. 30 種類のタンパク質-タンパク質間相互作用の熱力学的パラメータ (抗体-抗原反応を除く) の平均±標準偏差を(Stites, 1997)から算出した.

Table 1. LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用およびその他の細胞表面受容体-リガンド相互作用の熱力学的パラメータのまとめ

Analyte	Immobilized	ΔG (kcal·mol ⁻¹)	ΔH (kcal·mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal·mol ⁻¹)	ΔC_p (kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
LILRA2	N-truncated Ig	-7.3 ± 0.0	-8.2 ± 0.0	0.85 ± 0.03	-0.56 ± 0.02
LILRB1	HLA-G1	-7.5 ± 0.3	1.9 ± 0.7	-9.4 ± 0.8	-0.22 ± 0.06
TCR	peptide-MHC	-7.1 ± 0.6	-14.6 ± 5.4	7.1 ± 5.7	-0.62 ± 0.37

LILRB1/HLA-G1 相互作用の熱力学的パラメータは, (Shiroishi et al., 2006b)から引用した. TCR/peptide-MHC 相互作用の熱力学的パラメータは, (Boniface et al., 1999; Davis-Harrison et al., 2005; Garcia et al., 2001; Lee et al., 2004; Willcox et al., 1999)から引用した.

高速原子間力顕微鏡を用いた N-truncated Ig と full-length Ig の構造的特徴の解析

N-truncated Ig と full-length Ig の構造的特徴を調べるために, 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM; High-speed atomic force microscopy) を用いた解析をした. full-length Ig は 2 つの代表的な構造, Y 字型 (flat-on) およびダンベル型 (side-on) を示した (**Fig. 7A, Fig. 8**). Fab-Fc 間の距離は, 21 ± 3 nm (mean ± S.D., $n=5$ (分子)) だった. IgG1 の Fab-Fc 間の距離と比較すると (Umakoshi et al., 2018), IgG3 の Fab-Fc 間の距離は離れていた. さらに, Fab-Fc 間は可動性が高かった (最長距離 26 nm) (**Fig. 7C**). full-length Ig は長いヒンジ領域を持つ IgG3 であることを考えると, AFM 測定で観察された構造およびダイナミックな動きは妥当だといえる. 一方で, N-truncated Ig は, full-length Ig と同様に, Y 字型 (flat-on) およびダンベル型 (side-on) を示した (**Fig. 7B, Fig. 9**). full-length Ig と同様にヒンジ領域の高い可動性を示し, Fab-Fc 間の距離は, 20 ± 4 nm (mean ± S.D., $n=5$ (分子)) だった (**Fig. 7D**). これらの結果から, 抗体 N 末端の切断は全体構造に大きな変化を与えないこと, full-length Ig と同様に N-truncated Ig の Fab の動きは Fc の動きとは独立していることが示唆された.

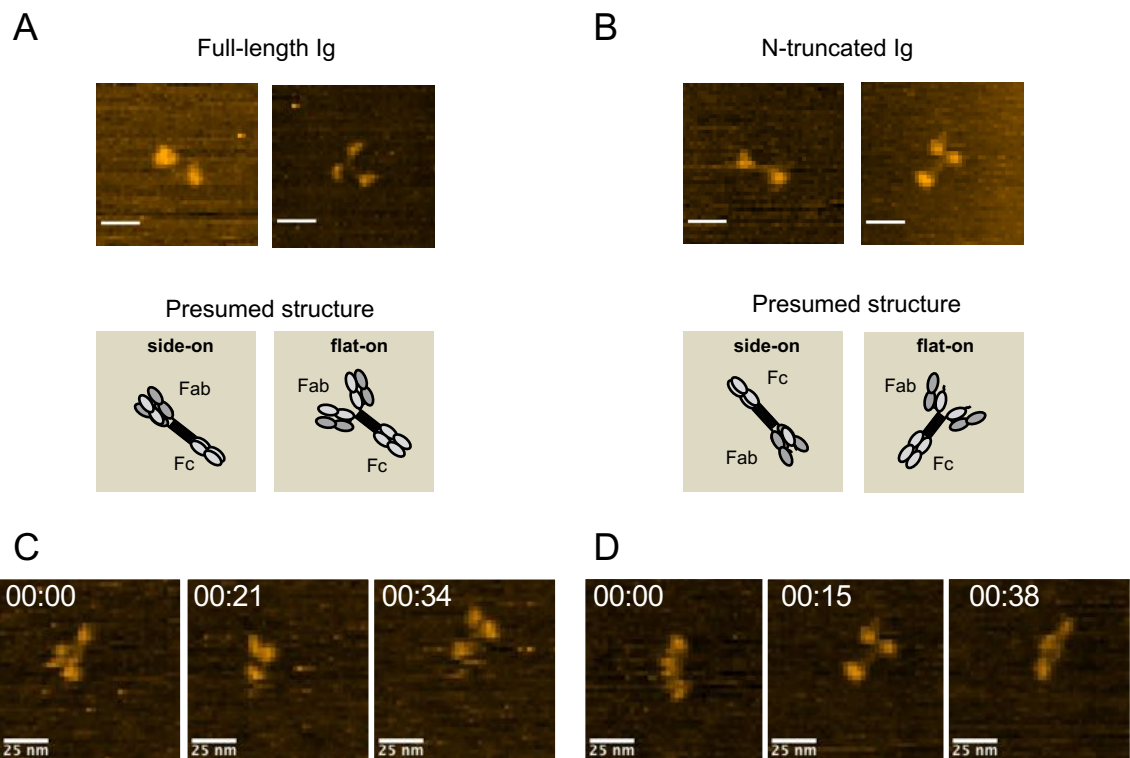


Fig. 7 N-truncated Ig と full-length Ig の分子構造

(A) (B) full-length Ig (A) と N-truncated Ig (B) の HS-AFM 解析. スケールバーは, 25 nm である. 下図は full-length Ig と N-truncated Ig のマイカへの固定化の向きのイメージである.

(C) full-length Ig 構造のタイムラプス解析. タイムスタンプは分:秒を示す.

(D) N-truncated Ig 構造のタイムラプス解析. タイムスタンプは分:秒を示す.

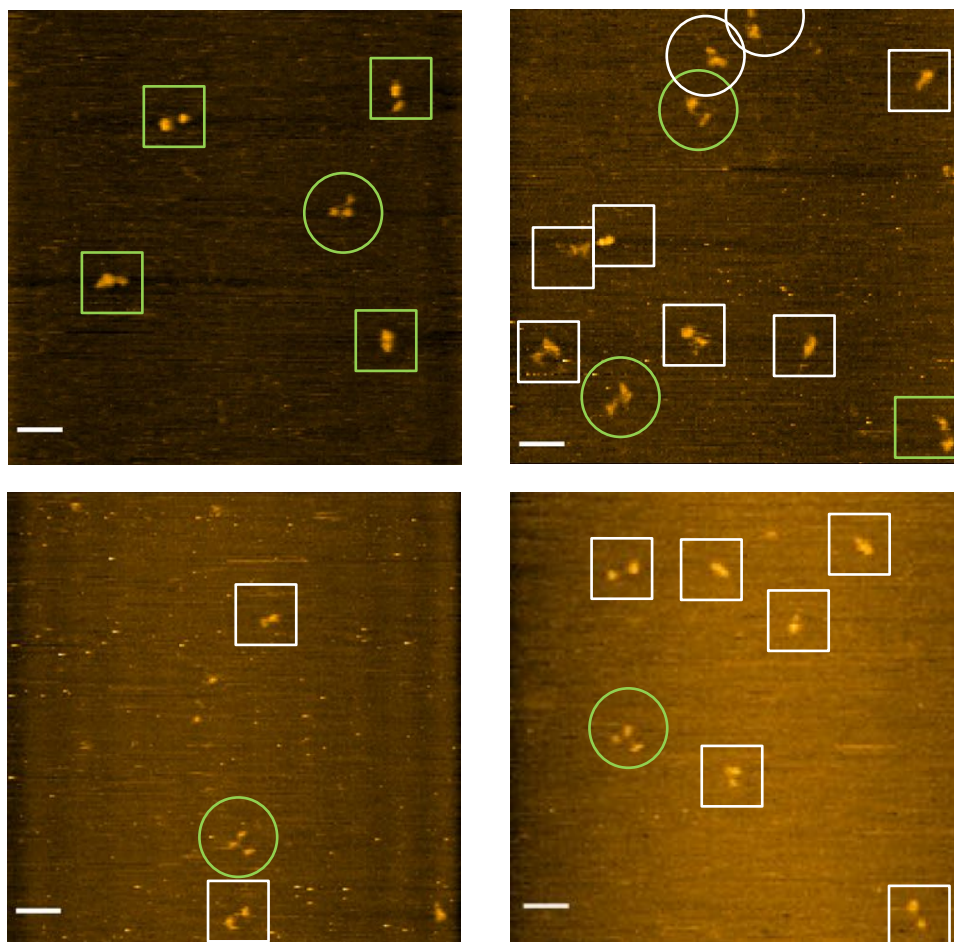


Fig. 8 full-length Ig の HS-AFM 解析

丸で囲った分子像を Y 字型, 四角で囲った分子像をダンベル型と分類した. それぞれの図は, 同一マイカ上の異なるエリアの観察結果である. Y 字型の分子の Fab-Fc 間の距離は, 緑色の丸で囲った像を用いて計算した. 緑色の四角で囲った分子像を用いて, ダンベル型を示す構造の 2 点間の距離を測定した (19 ± 5 nm, 平均 $\pm$ 標準偏差, $n=5$ (分子)). スケールバーは 50 nm である.

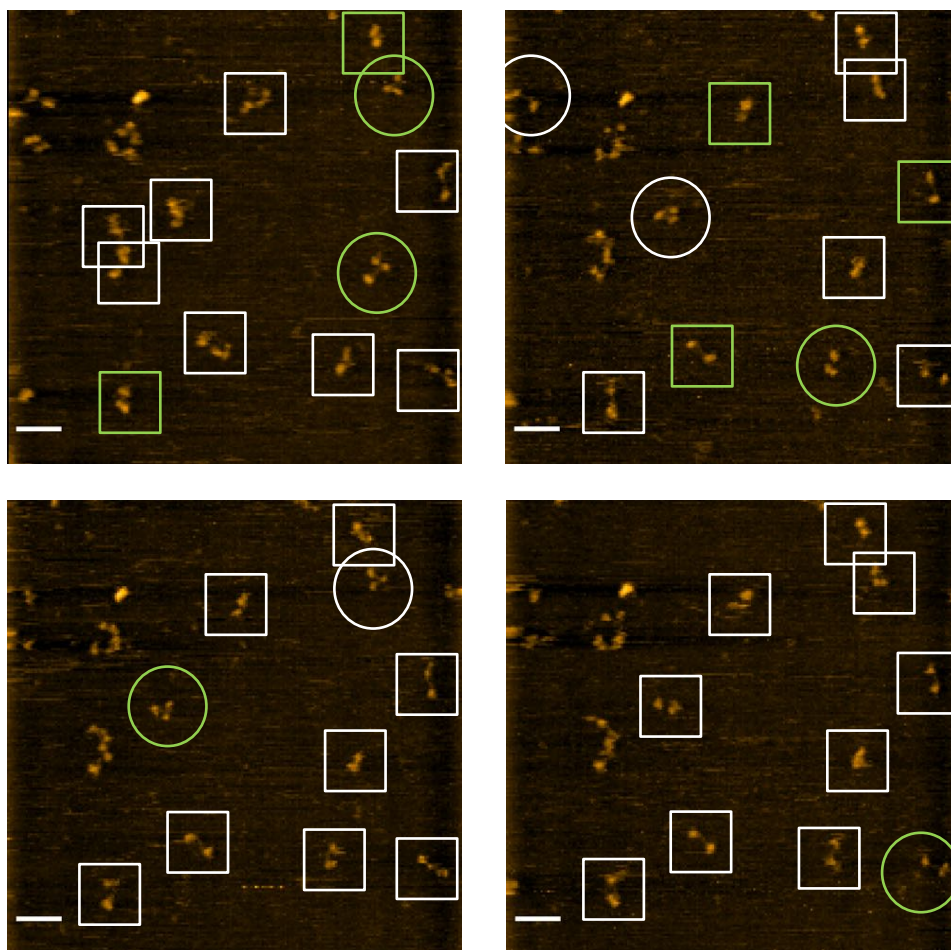
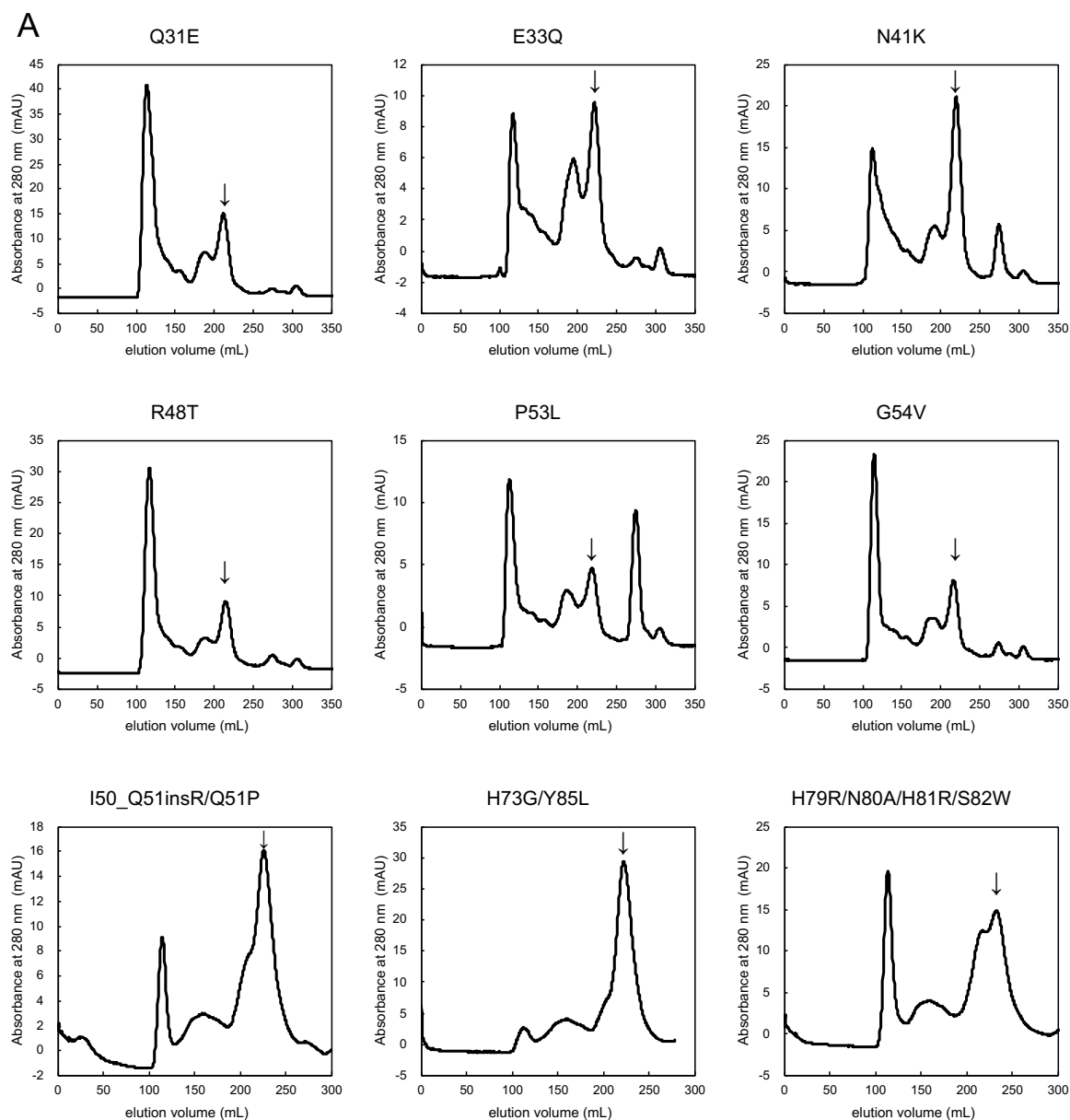


Fig. 9 N-truncated Ig の HS-AFM 解析

丸で囲った分子像を Y 字型，四角で囲った分子像をダンベル型と分類した．Y 字型の分子の Fab-Fc 間の距離は，緑色の丸で囲った像を用いて計算した．緑色の四角で囲った分子像を用いて，ダンベル型を示す構造の 2 点間の距離を測定した (18 ± 4 nm, 平均 $\pm$ 標準偏差, $n=5$ (分子))．スケールバーは 50 nm である．

変異体解析による LILRA2 上の N-truncated Ig 結合領域の同定

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 (**Fig. 10**). はじめに、LILRA2 以外の group1 LILR と比較して、LILRA2 のみで異なるアミノ酸残基に基づいて、LILRB2 のアミノ酸に置換した LILRA2 変異体 (Q31E, E33Q, N41K, R48T, P53L, G54V, L112S, R142S, W154R) を作製した (ただし、R142 については、対応する LILRB2 のアミノ酸残基がジスルフィド結合を組みうる Cys であったことから、変異導入による構造変化を避けるために Ser に置換した.) (**Fig. 11A, B**, **Fig. 12A, B**). さらに、group1 LILR で多様性が高いサイトに着目して、3 つの LILRA2 変異体 (I50_Q51insR/Q51P, H73G/Y85L, H79R/N80A/H81R/S82W) を作製した (**Fig. 11A, B**). 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 (**Fig. 13**). SPR 解析の結果、すべてのドメイン 1 変異体 (Q31E, E33Q, N41K, R48T, P53L, G54V, I50_Q51insR/Q51P, H73G/Y85L, H79R/N80A/H81R/S82W) と 2 つのドメイン 2 変異体 (L112S, R142S) は野生型と同様の K_d を示したが、W154R は N-truncated Ig と全く結合しなかった (**Fig. 14**, **Fig. 15**, **Fig. 16**). 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、LILRB2D1-LILRA2D2 キメラタンパク質と LILRA2D1-LILRB2D2 キメラタンパク質を調製し、N-truncated Ig 結合能を調べることにした. しかし、LILRB2D1-LILRA2D2 キメラタンパク質は発現したが、巻き戻らなかったため、結合能を評価することはできなかった (**Fig. 17A-C**). LILRA2D1-LILRB2D2 キメラタンパク質は調製できた (リフォールディング効率: 35%) (**Fig. 17D, E**). 結合解析の結果、LILRA2D1-LILRB2D2 キメラタンパク質は N-truncated Ig と結合しなかった (**Fig. 17F**). 以上の結果から、LILRA2 ドメイン 2 の W154 周辺が 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、W154 周辺の LILRA2 変異体 (V121E, D127G, H146Q, S147P, W152S) を作製し、N-truncated Ig 結合能を調べた (**Fig. 10**, **Fig. 12A, B**, **Fig. 13**). その結果、D127G, H146Q および S147P は野生型と同様の K_d で N-truncated Ig と結合したが、V121E および W152S は結合しなかった (**Fig. 18**). 以上の結果より、V121, W152, W154 が N-truncated Ig 結合に関わることが示された (**Table 2**). LILRA2 単量体構造の報告がないため、LILRB2 構造 (Willcox et al., 2002) 上に相互作用残基をマッピングした (**Fig. 19A**). 変異体解析の結果から予想される LILRA2/N-truncated Ig 相互作用モデル図を示した (**Fig. 19B**).



B

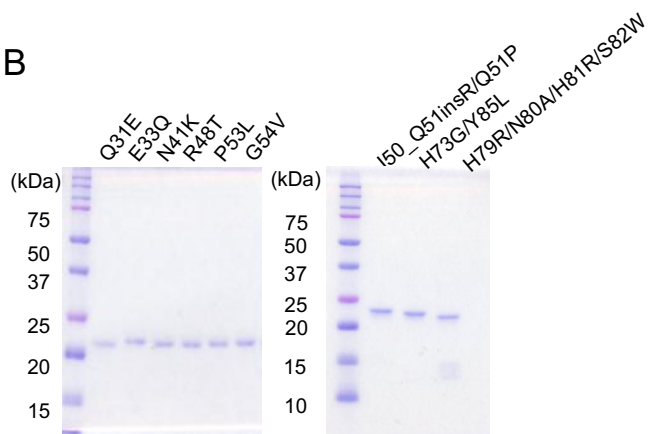


Fig. 11 LILRA2 ドメイン 1 変異体の調製

(A) LILRA2 ドメイン 1 変異体のゲルろ過クロマトグラム. 矢印で示したピークを含む画分を回収し、SPR 解析に用いた.

(B) LILRA2 ドメイン 1 変異体の SDS-PAGE (CBB 染色, 還元条件)

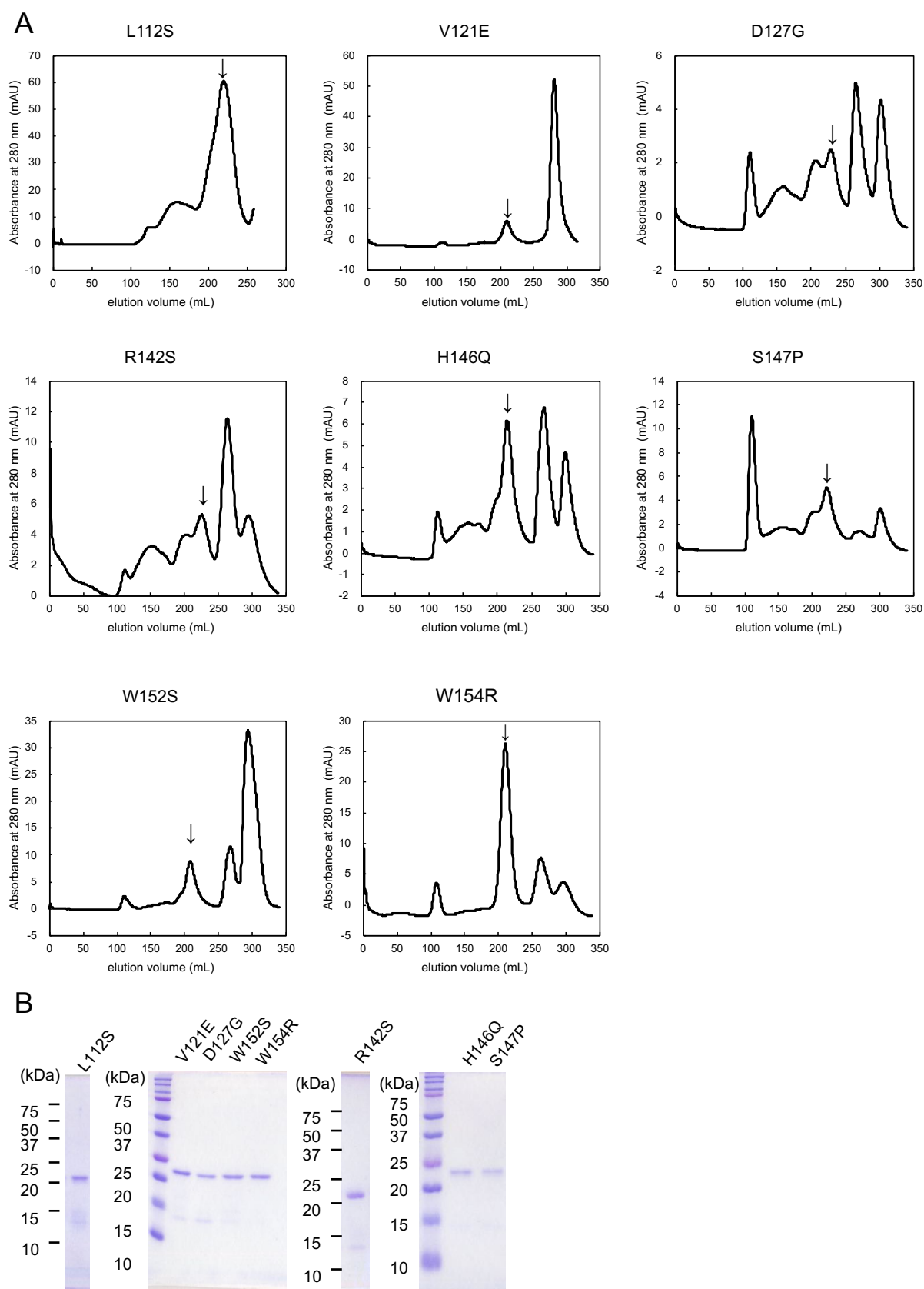


Fig. 12 LILRA2 ドメイン 2 変異体の調製

(A) LILRA2 ドメイン 2 変異体のゲルろ過クロマトグラム. 矢印で示したピークを含む画分を回収し、SPR 解析に用いた.

(B) LILRA2 ドメイン 2 変異体の SDS-PAGE (CBB 染色, 還元条件)

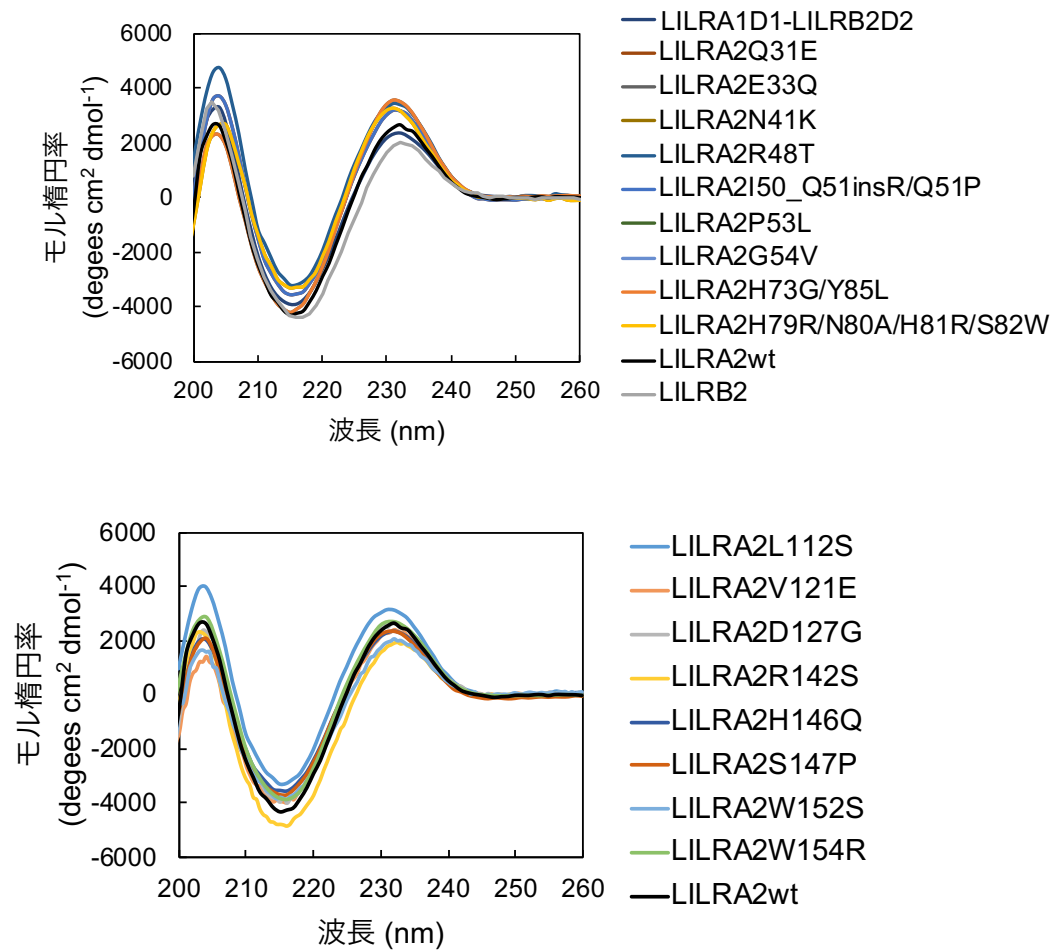


Fig. 13 LILRA2 野生型および変異体, LILRB2, キメラタンパク質の円偏光二色性スペクトル測定結果

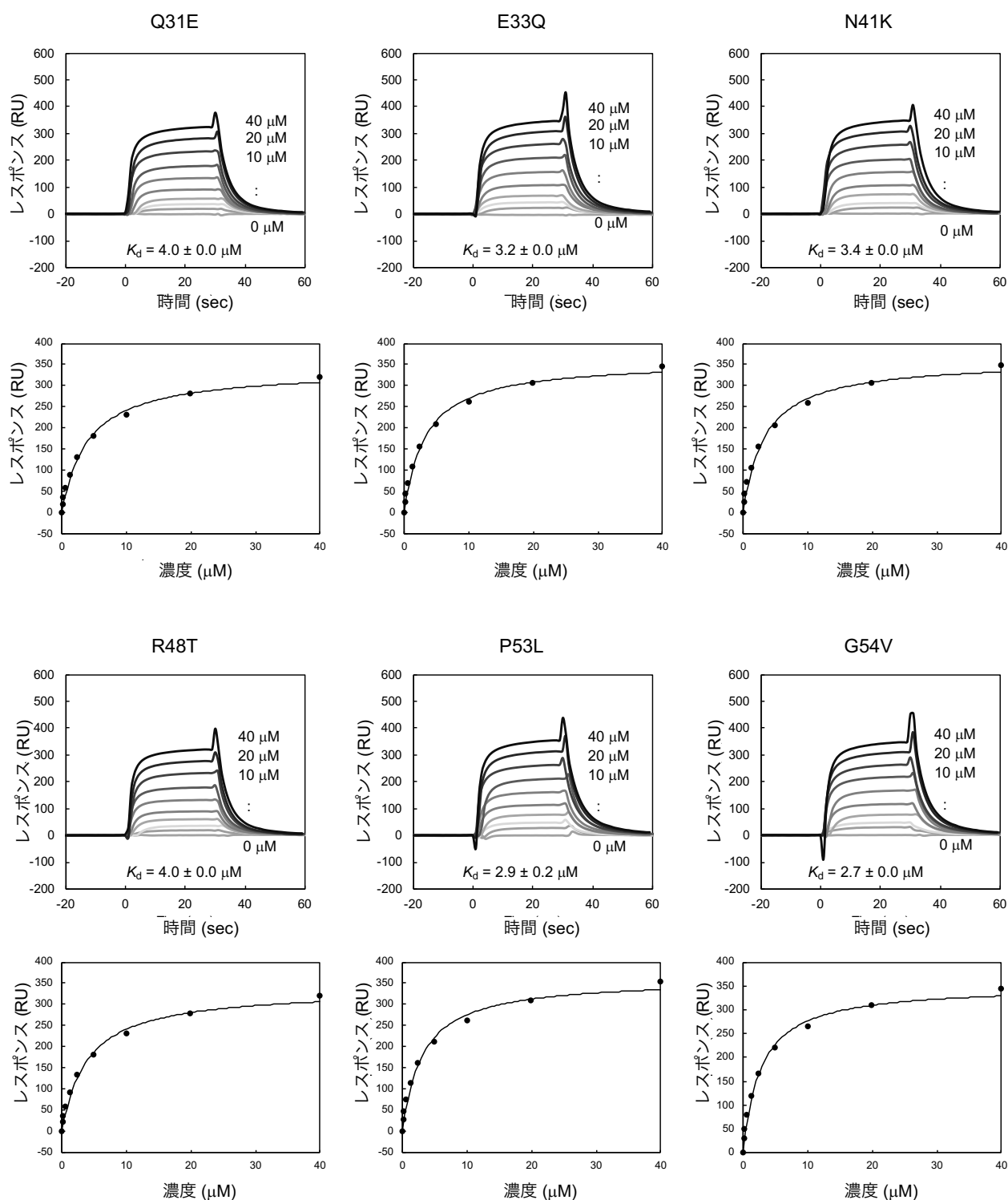


Fig. 14 LILRA2 ドメイン 1 シングル変異体と N-truncated Ig との結合解析

0.16-40 μM LILRA2 変異体を, N-truncated Ig 固定化フローセルに対してインジェクトした. 平衡値解析により K_d を求めた.

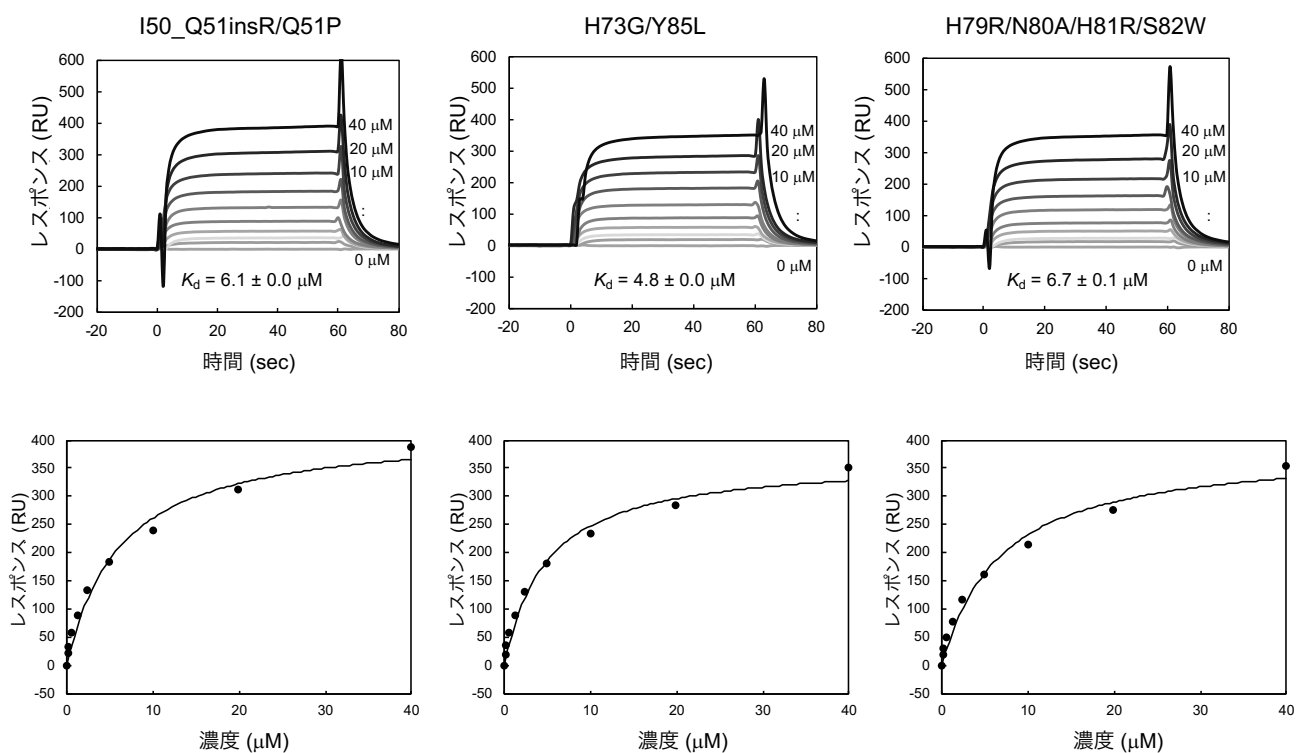


Fig. 15 LILRA2 ドメイン 1 多重変異体と N-truncated Ig との結合解析

0.16-40 μM LILRA2 変異体を, N-truncated Ig 固定化フローセルに対してインジェクトした, 平衡値解析により K_d を求めた.

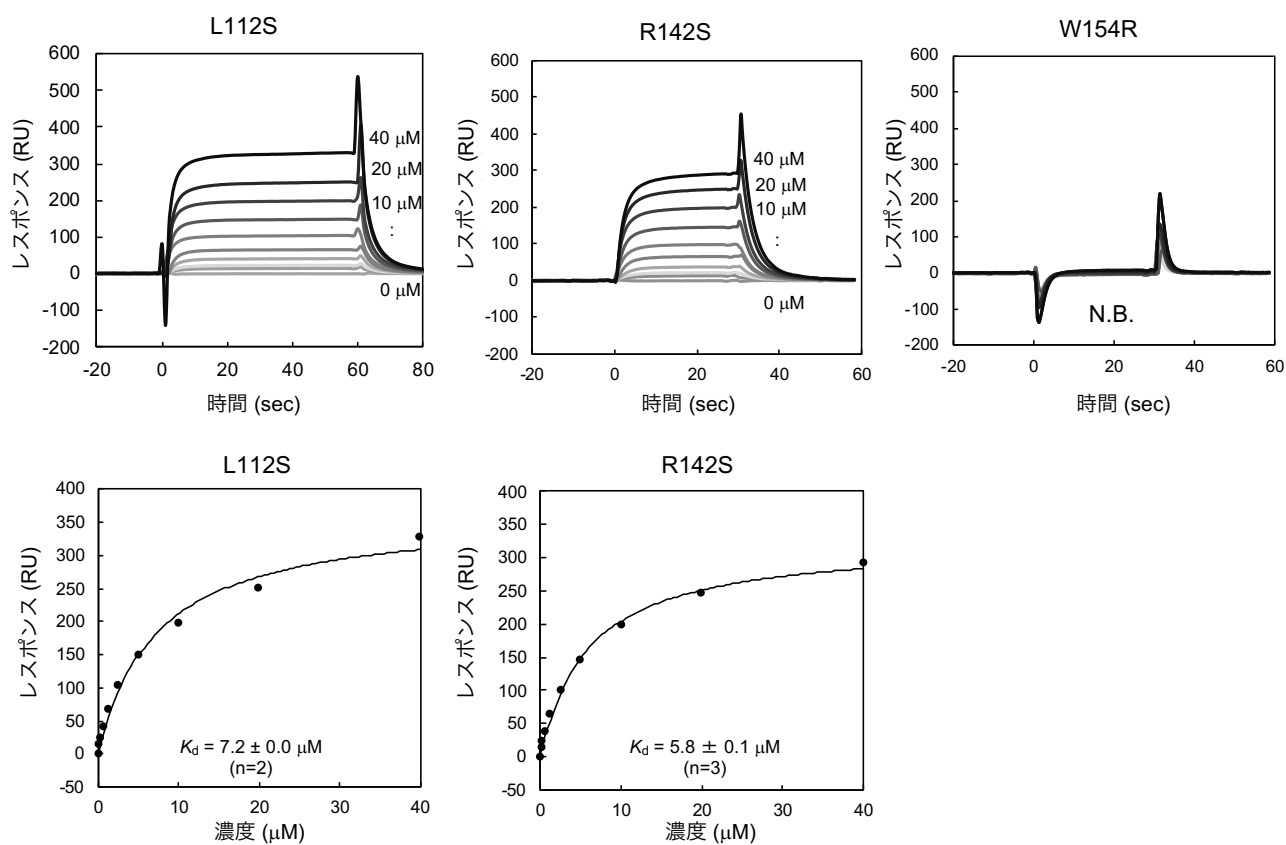


Fig. 16 LILRA2 ドメイン 2 変異体と N-truncated Ig との結合解析

0.16-40 μM LILRA2 ドメイン 2 変異体を, N-truncated Ig 固定化フローセルに対してインジェクトした. 平衡値解析により K_d を求めた. N.B.は No detectable binding を意味する.

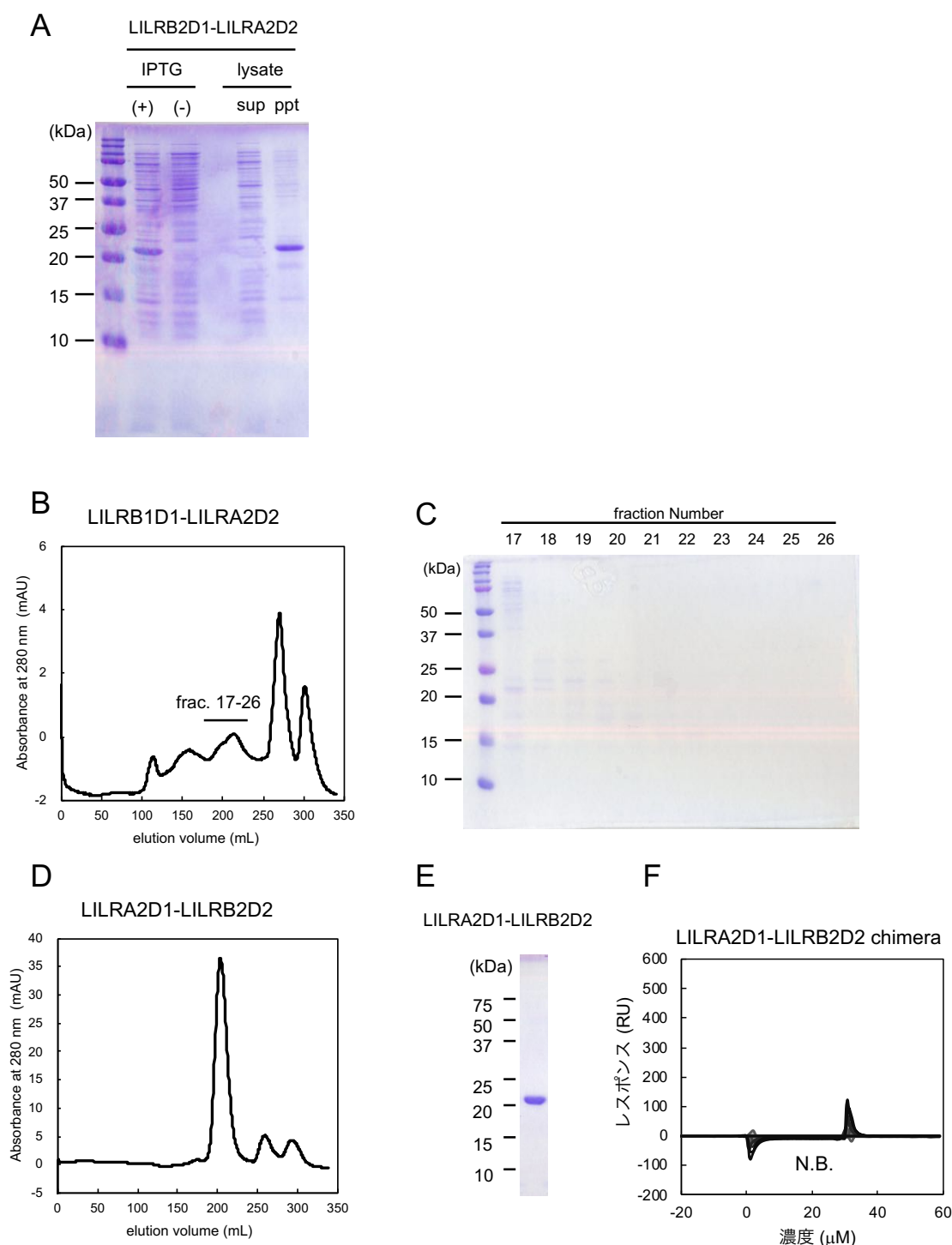


Fig. 17 キメラタンパク質の調製

(A) LILRB2D1-LILRA2D2 キメラタンパク質の発現を、タンパク質発現誘導(+)/(-)の菌体および破碎後の菌体の上清(sup)と沈殿画分 (ppt) を SDS-PAGE により解析した (CBB 染色, 還元条件)。

(B) LILRB2D1-LILRA2D2 キメラタンパク質のゲルろ過クロマトグラム。

(C) (B)で得られた画分の SDS-PAGE (CBB 染色, 還元条件)。

(D) LILRA2D1-LILRB2D2 キメラタンパク質のゲルろ過クロマトグラム。

(E) (D)で得られた画分の SDS-PAGE (CBB 染色, 還元条件)。

(F) 0.16-40 μ M LILRA2D1-LILRB2D2 キメラタンパク質を, N-truncated Ig 固定化フローセルに対してインジェクトした。N.B.は No detectable binding を意味する。

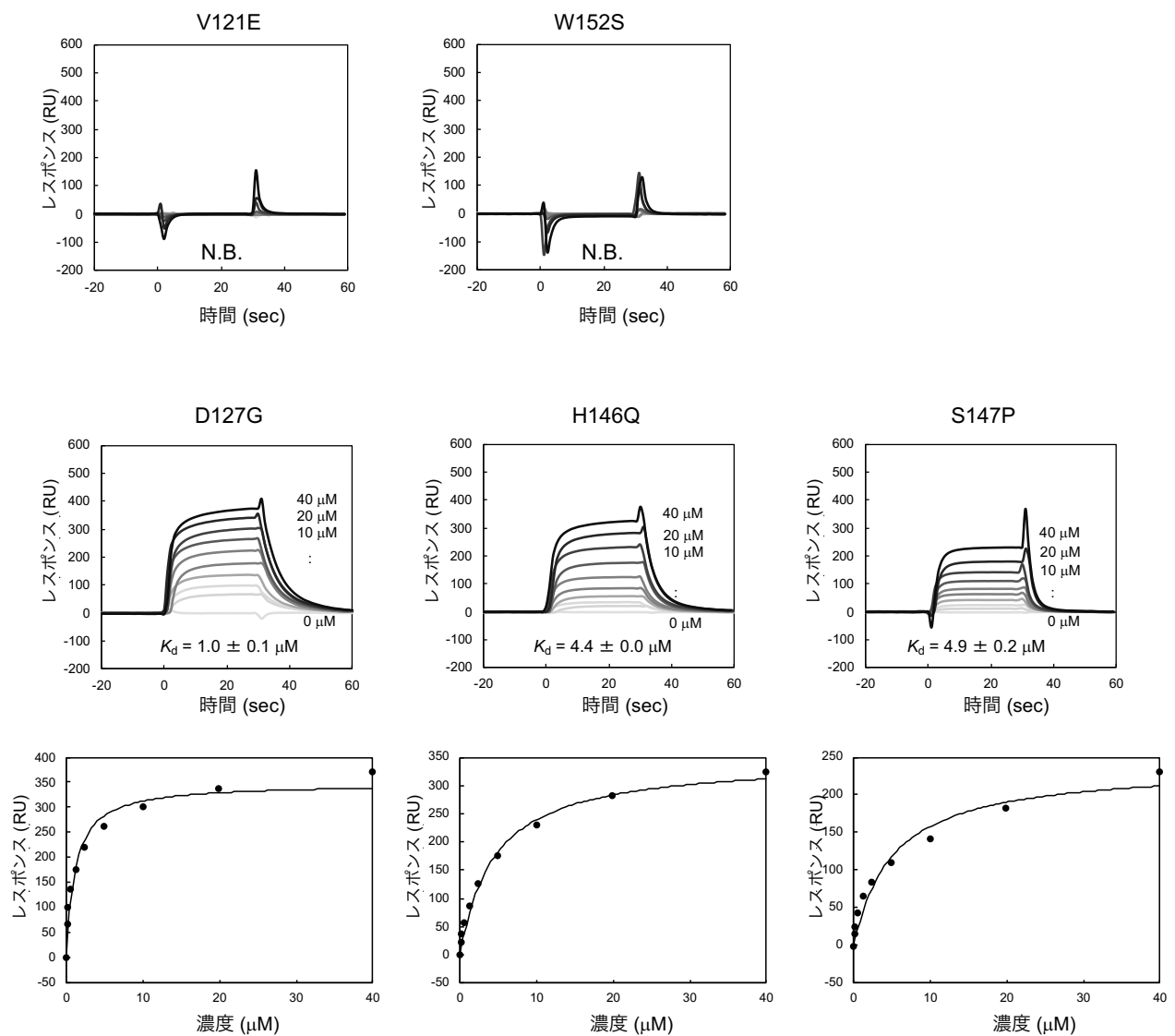


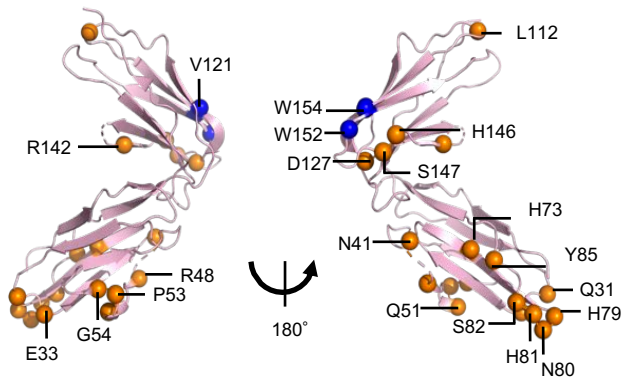
Fig. 18 W154 周辺の LILRA2 ドメイン 2 変異体と N-truncated Ig との結合解析
 0.16-40 μM LILRA2 ドメイン 2 変異体を、N-truncated Ig 固定化フローセルに対してインジェクトした。平衡値解析により K_d を求めた。N.B.は No detectable binding を意味する。

Table 2. LILRA2 変異体と N-truncated Ig との相互作用の解離定数のまとめ

LILRA2D1D2	n	K_d (μ M)
wild type	3	4.9 ± 0.0
Q31E	3	4.0 ± 0.0
E33Q	2	3.2 ± 0.0
N41K	3	3.4 ± 0.0
R48T	3	4.0 ± 0.0
P53L	2	2.9 ± 0.2
G54V	3	2.7 ± 0.0
I50_Q51insR/Q51P	2	6.1 ± 0.0
H73G/Y85L	2	4.8 ± 0.0
H79R/N80A/H81R/S82W	2	6.7 ± 0.1
L112S	2	7.2 ± 0.0
V121E	3	N.B.
D127G	2	1.0 ± 0.1
R142S	3	5.8 ± 0.1
H146Q	3	4.4 ± 0.0
S147P	3	4.9 ± 0.2
W152S	3	N.B.
W154R	3	N.B.

n は実験数, N.B.は no detectable binding を意味する. K_d は平均 $\pm$ 誤差 ($n=2$ のとき) または平均 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$ のとき) である.

A



B

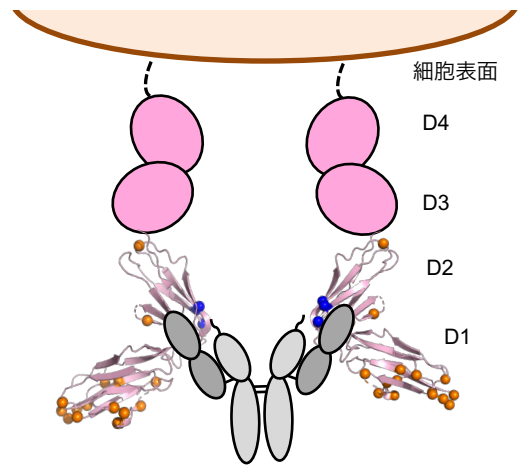


Fig. 19 LILRA2 変異体解析のまとめ

(A) 変異導入したアミノ酸残基の LILRB2 構造へのマッピング (PDB ID: 2GW5).

変異導入の結果 N-truncated Ig に結合しなくなった残基を青色, 変異導入後も N-truncated Ig に結合した残基をオレンジ色で示した.

(B) LILRA2/N-truncated Ig 相互作用のモデル構造.

4. 考察

本研究では、組換えタンパク質として LILRA2 野生型の細胞外領域を調製することに成功した。これまでに Chen らが、LILRA2R142C 変異体のドメインスワップダイマーの構造を報告している (Chen et al., 2007; Chen et al., 2009)。しかし、本研究で調製した LILRA2 野生型 (LILRA2D1D2 および LILRA2D1D4) はいずれもゲルろ過クロマトグラフィーの結果から単量体だと示唆されたことから、ダイマー化は R142C 変異導入による影響だった可能性がある。

SPR 法を用いた速度論的解析により、LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用メカニズムの詳細を調べた。一般的なタンパク質-タンパク質間相互作用と比較すると、LILRA2 は比較的速い結合 ($k_{on} : 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)・速い解離 ($k_{off} : 0.23 \text{ s}^{-1}$) 様式で N-truncated Ig に結合した。このことから、LILRA2 は素早く血中の N-truncated Ig を認識していることが考えられる。LILRA2/N-truncated Ig 相互作用は弱い結合であった ($K_d \sim 4.9 \mu\text{M}$)。この値は、免疫反応における細胞表面受容体とリガンドとの相互作用で典型的にみられる値の範囲内である (Table 3)。

Table 3. LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用およびその他の細胞表面受容体-リガンド相互作用の速度論的パラメータおよび解離定数のまとめ

Analyte	Immobilized	$k_{on} (\times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$k_{off} (\text{s}^{-1})$	$K_d (\mu\text{M})$	References
LILRA2	N-truncated Ig	1.1 ± 0.2	0.23 ± 0.00	2.1 ± 0.0	This study
LILRB1	HLA-G1	9.2 ± 1.3	2.1 ± 0.4	2.4 ± 0.8	(Shiroishi et al., 2006b)
TCR	peptide-MHC	0.009-0.2	0.01-0.1	1-90	(Ding et al., 1999; Willcox et al., 1999)
PILR α	CD99 wt	3.9	1.2	3.0	(Tabata et al., 2008)
Fc γ RIIa	hFc1	4.4	0.31	0.72	(Maenaka et al., 2001)
Fc γ RIIb	hFc1	4.3	0.96	2.4	(Maenaka et al., 2001)
Fc γ RIII	hFc1	3.8	0.69	1.9	(Maenaka et al., 2001)
KIR2DL3	HLA-Cw7	2.1	1.1	5.2	(Maenaka et al., 1999)
CD8 $\alpha\alpha$	MHC class I	≥ 1.0	≥ 18	~ 200	(Gao et al., 2000)
CD22	CD45	≥ 1.5	≥ 18	117	(Bakker et al., 2002)
CD80	CTLA-4	9.4	0.43	0.46	(van der Merwe et al., 1997)
CD80	CD28	6.6	1.6	2.4	

SPR による結合実験において、LILRA2 を固定化したチップに対して、N-truncated Ig をインジェクトしたときに、アビディティ効果が観察された (**Fig. 5A**)。さらに、Fc-fusion LILRA2D1D4 と N-truncated Ig との混合溶液をゲルろ過クロマトグラフィーカラムに添加したところ、Fc-fusion LILRA2D1D4 と N-truncated Ig それぞれのピークよりも早い溶出体積に新たなピークが出現した (**Fig. 5C**)。一方で、LILRA2D1D2 と N-truncated Ig の混合溶液をゲルろ過クロマトグラフィーカラムに添加したところ、新たなピークは出現せず、それぞれのタンパク質の溶出体積に溶出された (**Fig. 5B**)。新たに出現した画分を SDS-PAGE により解析したところ、Fc-fusion LILRA2D1D4 と N-truncated Ig が含まれていた (**Fig. 5D**)。LILRA2D1D2 および LILRA2D1D4 と N-truncated Ig との相互作用の K_d が同様であった (**Fig. 4C, D**)。ことと合わせて考えると、LILRA2 は N-truncated Ig にアビディティ効果により強い結合を示すことが示唆された。アビディティ効果による結合能の増強は、他の ITAM/ITIM を持つ分子である Fc α R, LILRB1, LILRB2 でも報告されている (Appel et al., 2000; De Crescenzo et al., 2003; Herr et al., 2003a; Herr et al., 2003b; Shiroishi et al., 2006a)。以上より、N-truncated Ig 結合によって LILRA2 が細胞膜表面上でクロスリンクされることで、LILRA2 を介した刺激が十分に入ると予想される。その場合、LILRA2 の発現レベルも免疫の調節に関わると考えられる。

LILRA2 リガンドの特徴について考察すると、細菌と共培養した IgM 発現細胞は、N 末端が切断された重鎖のみならず、未切断の重鎖も発現していた (Hirayasu et al., 2016)。また、F(ab')₂ をマイコプラズマ由来のプロテアーゼで消化すると、非還元条件のウェスタンブロッティングで、片方の Fab が切断されていて、もう片方の Fab が切断されていない F(ab')₂ の分子量の相当位置にバンドが検出されていた (Arfi et al., 2016)。このことから、血中には、抗体の 2 つの Fab ドメインのうち、1 つのドメインの N 末端だけが欠損したタンパク質が存在しうると予想される。LILRA2 と N-truncated Ig の 1:1 の結合は弱かった ($K_d \sim 4.9 \mu\text{M}$) こと、一方で、2 つの Fab の N 末端が切断された抗体は、強い結合を示す ($K_d \sim 103 \text{ nM}$) ことから、1 つのドメインの N 末端だけが欠損した抗体のタンパク質の作用は、2 つのドメインの N 末端が切断された抗体のそれよりも弱いと考えられる。ここで提唱した相互作用様式をさらに検証するために、今後は抗体の 2 つの Fab ドメインのうち、1 つのドメインの N 末端だけが欠損したタンパク質を調製し、LILRA2 発現細胞に添加したときに刺激が入るか調べる必要がある。

LILRA2 は N-truncated Ig には結合したが、full-length Ig には結合しなかったことから、LILRA2 は、N 末端切断により露出した VL ドメインか切断後に残った VH ドメイン、もしくはその両方を認識することが予想される (**Fig. 4A**)。DSC 解析から、N 末端を切断された Fab の不安定性が示された (**Fig. 6A, B**)。一般的に、VL ドメインと VH ドメインは相互作用していることが知られている (Padlan, 1994)。N 末端を切断された Fab では、VL ドメインと VH ドメインの相互作用が失われ、残った VL ドメインがフレキシブルになったことから安定性が

低下した可能性がある。抗体の変性中点温度 T_m と血中半減期には弱い相関がみられた (Goulet et al., 2018)。抗体医薬品の T_m は主に 70~80°C であり、 T_m が 1°C 低下すると、血中半減期が 1 日短くなる傾向にあった。 T_m が 60°C 以下の抗体とその血中半減期との相関関係を示すデータは報告がないため、 T_m が 58°C の N-truncated Ig の血中半減期の予想は困難であるが、 T_m が 1°C 低下すると、血中半減期が 1 日短くなるというデータを考慮すると、N-truncated Ig の血中半減期は full-length Ig のそれと比較して、数十日程度短くなるのではないか。この場合、N-truncated Ig による LILRA2 を介した免疫活性化は、細菌侵入時に短期的に起きる現象だと予想される。

LILRA2/N-truncated Ig 相互作用は、エントロピー損失の少ないエンタルピー駆動型の相互作用様式だった (**Fig. 6D, E, Table 1**)。当初は、N-truncated Ig に LILRA2 が結合することにより、N-truncated Ig の揺らぎが抑えられることで、エントロピー損失の大きい結合様式を示すと予想していた。しかし、実際に測定してみると、誘導適合するため大きくエントロピーロスする TCR/MHC 相互作用 ($-T\Delta S$: 7.1 ± 5.3 kcal·mol⁻¹) よりもエントロピー損失は小さく ($-T\Delta S$: 0.85 ± 0.03 kcal·mol⁻¹)、タンパク質-タンパク質間相互作用の平均 ($-T\Delta S$: -5.91 kcal·mol⁻¹) よりも大きかった (Stites, 1997) (**Fig. 6E**)。さらに、結合時の熱容量変化を求めた。結合時の熱容量変化は、水和状態の変化を反映し構造変化の程度を示すことが知られている (Lo Conte et al., 1999; Vega et al., 2016)。例えば、gp120 が CD4 と結合するとき大きく構造変化する (Myszka et al., 2000)。そのときの熱容量変化は、 -1.8 kcal·mol⁻¹·K⁻¹ と大きな値であった。gp120/CD4 や LILRB1/HLA-G1 相互作用を含む細胞表面の受容体-リガンド相互作用と比較すると、LILRA2/N-truncated Ig 相互作用の熱容量変化は中程度だった (0.56 ± 0.02 kcal·mol⁻¹·K⁻¹) ことから、結合によってタンパク質の揺らぎの程度に変化があると考えられる。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 (後述) 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。

N-truncated Ig と full-length Ig の AFM 観察の結果、どちらも Y 型だけでなく、ダンベル型の構造を示すことがわかった。これらの構造の違いは、IgG1 の AFM による構造解析で報告されたように (Vilhena et al., 2016)、マイカへの固定化の方向の違いに起因すると考えられる。N-truncated Ig および full-length Ig の Fab-Fc 間が長いヒンジ領域により可動性があることも観察された。N-truncated Ig と full-length Ig の構造や動き方が同様であることから、N 末端の切断は抗体の全体構造および動きに大きな影響を与えないと考えられる (**Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9**)。AFM 解析からは抗体の Fab 間の角度の大きな変化は観察されなかったものの、マイカへの固定化の向きが観察される抗体像の Fab 間の角度に影響するため、正確な角度を議論することが困難である。抗体のドメイン間の角度をより詳細に調べるためには、X 線小角散乱法のように、溶液状態におけるタンパク質全体構造を解析できる手法を用いて実験する必要がある。

LILRA2D1D2 および LILRA2D1D4 と N-truncated Ig との相互作用の K_d が同様であった (Fig. 4C, D). さらに, LILRA2D1-LILRB2D2 タンパク質は N-truncated Ig と結合しなかった (Fig. 17F). これらの結果から, LILRA2 のドメイン 2 が N-truncated Ig 結合に重要なことが示唆された. 変異体解析の結果から, LILRA2 ドメイン 2 のストランド B 上の V121, ストランド C' と E の間のループ上の W152 と W154 が N-truncated Ig 結合に関わっていることがわかった. LILRA2 単量体構造の報告がないため, LILRB2 構造 (PDB ID: 2GW5) 上にこれらのアミノ酸残基をマッピングすると, いずれのアミノ酸残基もヒンジ領域の近くの位置に存在していることがわかる (Fig. 19A). 同定したアミノ酸残基 V121, W152, W154 により構成される疎水的な表面が, 露出した VL ドメインか切れ残った VH ドメインもしくはその両方と相互作用していることが予想される. LILRA2 の V121, W152, W154 の疎水性は group 1 LILR の中で, 特徴的である. 例えば, LILRA2 の W154 に対応する group 1 LILR のアミノ酸残基は, 正電荷を持つアルギニンである (Fig. 10). LILR ファミリーの中で, LILRA2 のみが N-truncated Ig に特異的な結合を示すのは, LILRA2 ドメイン 2 表面の疎水的な性質に起因していると考えられる. また, LILRA2 は複数種類の N 末端が切断された抗体を認識するが, 露出面の疎水性は共通している. そのため, 疎水性相互作用によって LILRA2 が広い種類の N-truncated Ig を特異的に認識できている可能性がある. LILRA2 の N-truncated Ig 結合領域は, group 1 LILR ファミリーや, HLA に結合するイムノグロブリン様受容体である KIR2DS2 のリガンド認識部位とは異なっている (Fig. 20). *LILR* 遺伝子は, pathogen-driven evolution によって速い進化を遂げてきたと考えられている (Canavez et al., 2001). LILR group1 の中で LILRA2 のみが HLA に結合しないこととリガンド認識部位の差を考えると, LILRA2 は HLA 結合能を犠牲にすることで, 非自己抗原を認識する受容体として特化して進化してきたのかもしれない.

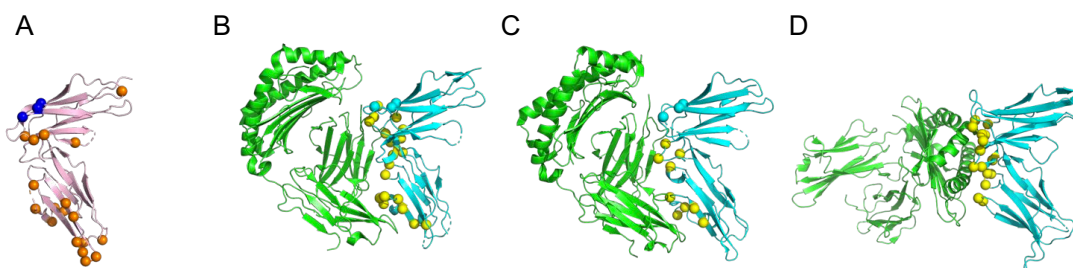


Fig. 20 免疫グロブリン様受容体のリガンド認識部位の比較

(A) LILRA2 構造のモデルとして LILRB2 構造を示した (PDB ID: 2GW5)

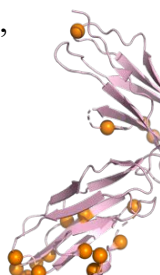
変異導入の結果 N-truncated Ig に結合しなくなった残基を青色の球, 変異導入後も N-truncated Ig に結合した残基をオレンジ色の球で示した.

(B) LILRB1 (シアン) / HLA-A (緑) 複合体構造 (PDB ID: 1P7Q)

(C) LILRB2 (シアン) / HLA-G (緑) 複合体構造 (PDB ID: 2DYP)

(D) KIR2DS2 (シアン) / HLA-A (緑) (PDB ID: 3N8V)

(B)-(D)で, リガンド結合に関わるアミノ酸残基を黄色の球で示した. LILRA2 V121, W152, W154 に対応するアミノ酸残基をシアンの球で示した.



N-truncated Ig の LILRA2 との相互作用残基について、平安らは次のような報告をしている。まず、VL については、LILRA2 と結合する軽鎖と結合しない軽鎖がある。LILRA2 と結合しない軽鎖のアミノ酸残基を、結合する軽鎖で対応するアミノ酸残基に置換する変異実験によって、T10 および P95 が結合に重要だと示された (Fig. 21)。ただ、一次構造で T10 および P95 を持つ軽鎖の中にも LILRA2 と結合しないものが存在することから、T10 および P95 が LILRA2 に結合する軽鎖で共通のアミノ酸残基とは言えない。一方で、VH については、重鎖の定常領域から 15 番目のアミノ酸で切断された抗体と重鎖の可変部領域を全て切断された抗体は LILRA2 と結合せず、11, 12, 13, 14 番目のアミノ酸残基で切断された抗体は LILRA2 と結合した。切れ残った VH ドメインにはチロシン、トリプトファンのような疎水的な残基が含まれていた。以上の点から、露出した軽鎖のいくつかのアミノ酸残基と、切れ残った VH が LILRA2 結合には重要であることが考えられる。軽鎖の違いによって LILRA2 結合能が異なるのは、切れ残った VH ドメインとそれぞれの軽鎖との相互作用様式が異なり、VH ドメインの三次構造に違いが生じるからではないだろうか。LILRA2 上の N-truncated Ig 相互作用残基はいずれも疎水的な特徴を持つことと合わせて考えると、切断された抗体の VH ドメインの構造が疎水性を持った特徴的な構造になったときに、LILRA2 によって認識される可能性がある。

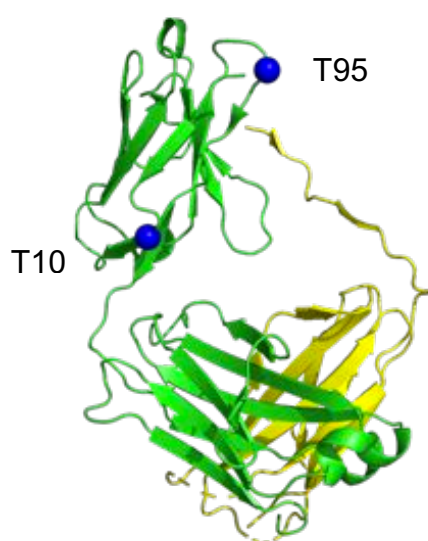


Fig. 21 N-truncated Ig の Fab 構造のモデル図

LILRA2 に結合する軽鎖と同様の軽鎖を持つ Fab (PDB ID: 1DN0) の重鎖 N 末端が切断された構造のモデル図。軽鎖と重鎖はそれぞれ緑色、黄色で示されている。T10 および P95 を青色の球で示した。

構造, 遺伝子パターン, リガンドの共通性などから, マウスの免疫グロブリン様受容体 PIR (Paired immunoglobulin-like receptor) や LILRC1 が, LILR に対するマウスの相同分子として考えられている. PIR は, LILR と同様に, ペア型受容体であり, 活性型の PIR-A (PIR-A1, A2, A3, A4, A5, A6, A11) と抑制性の PIR-B から構成される. 平安らは LILRA2 のマウスホモログを同定するために, 5 種の候補分子 (PIR-A1, A2, A6, A7 および Lilrc1) と N-truncated Ig との結合の有無を評価した. その結果, いずれの PIR-A も N-truncated Ig への結合を示さなかった. Lilr1 は結合によるわずかなピークシフトを示したが, LILRA2 と比べると非常に弱かった. そのため, 平安らは, いずれの分子も LILRA2 のマウスホモログではないと結論付けた. この結果について, 本研究で同定した N-truncated Ig 結合に関わる LILRA2 のアミノ酸残基を踏まえて考察する. 結合を示さなかった PIR-A1, A2, A6, A7 において, LILRA2 の V121, W152, W154 に対応するアミノ酸残基は, それぞれ E122, K154, H156 である (**Fig. 22**). 結合に関わると同定した LILRA2 のアミノ酸残基はいずれも疎水的な性質を持つが, PIR-A1, A2, A6, A7 で対応するアミノ酸残基はいずれも極性を持つ. この電荷的な特徴の違いから, PIR-A1, A2, A6, A7 が N-truncated Ig に結合しなかった可能性が考えられる. 弱い結合を示した Lilrc1 において, LILRA2 の V121, W152, W154 に対応するアミノ酸残基は, それぞれ V122, Q154, Q156 だった. Lilrc1 は N-truncated Ig に弱い結合を示したのは, バリンを共通して持つことが要因かもしれない. これまでに N-truncated Ig との結合能を調べられていない PIR-A3-5, A11 も, LILRA2 の V121, W152, W154 に対応するアミノ酸残基は, PIR-A1, A2, A6, A7 と同じ E122, K154, H156 であることから, N-truncated Ig には結合しない可能性が高い. 今後は, LILRA2 の N-truncated Ig 結合に関わるアミノ酸残基との保存性を新たな指標に, LILRA2 のマウスホモログの同定を試みたい.

7種の哺乳類（チンパンジー、ボノボ、スマトラオランウータン、キタホオジロテナガザル、アカゲザル、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ、チャイニーズハムスター）のLILRA2遺伝子がデータベース Uniprot 上に登録されている。アミノ酸配列を比較したところ、霊長類であるチンパンジー、ボノボ、スマトラオランウータン、キタホオジロテナガザル、アカゲザルのLILRA2はヒトLILRA2との配列相同性がそれぞれ94, 94, 91, 91, 85%だった。N-truncated Ig 結合に関わるLILRA2のアミノ酸残基であるW152とW154が保存されていた(**Fig. 23A**)。一方、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ、チャイニーズハムスターのLILRA2は、ヒトLILRA2との配列相同性がそれぞれ44, 44, 31%だった(**Fig. 23B**)。N-truncated Ig 結合に関わるLILRA2のアミノ酸残基であるV121, W152, W154はいずれも保存されていなかった。ヒトLILRA2のオルソログとN-truncated Igとの相互作用はこれまでに調べられていないが、アミノ酸残基の保存性から霊長類のLILRA2はN-truncated Igと結合し、ラクダ、チャイニーズハムスターのLILRA2はN-truncated Igと結合しないことが予想される。

各種LILRA2

B

Fig. 23 LILRA2 オルソログとのアミノ酸配列の比較

39

平安らは、マイコプラズマ、インフルエンザ菌、肺炎球菌、カンジダ菌が抗体を切断することを報告した。その中で、肺炎球菌が分泌するプロテアーゼとして Msp (Major secretory protein)を同定した(Hirayasu et al., 2016)。Msp による抗体切断サイトは同定されていないが、抗体の定常領域から 11, 12, 13, 14 番目のアミノ酸で切断された抗体が、細菌に分解された抗体の分子量と同程度の分子量であること、そして LILRA2 と結合することが示されている。また、定常領域のみの抗体は LILRA2 と結合しなかった。切れ残った VH ドメインは、チロシンやトリプトファンのような疎水的なアミノ酸残基を持つため、同定した LILRA2 上の N-truncated Ig 相互作用残基であるバリニンやトリプトファンと相互作用する可能性がある。別の研究グループは、複数種類のマイコプラズマが分泌する MIB (*Mycoplasma* Ig binding protein) と MIP (*Mycoplasma* Ig protease) とが協働して抗体の VH ドメインを切断することを報告した(Arfi et al., 2016)。N 末端アミノ酸配列分析により MIP による抗体切断サイトが調べられている (Fig. 24)。平安らが想定している抗体切断サイトよりも数アミノ酸残基短くなるサイトを切断するが、定常領域から数アミノ酸残基が残存しているため、LILRA2 と弱く結合する可能性がある。MIB-MIP システムは、ヒト以外の動物に感染するマイコプラズマにも存在することから、ヒト以外の動物における LILRA2 ホモログの存在が示唆される。

	VH domain (4-117)	
full-length Ig	E V N L V E S G G D L V Q P G G S L R L S C E A S G F T I T S Y G M H W V R Q A P G K G L V W V S E I D N D G R D A T Y 60	
N-truncated Ig	-----	
	MIP切断サイト	
full-length Ig	A D S V K G R F T S L P D R A N N T L Y L Q M N S L R V D D T A V Y Y C V R G N G Q K C F D Y W G Q G T L V T V S S A S 120	
N-truncated Ig	----- D Y W G Q G T L V T V S S A S 16	
	CH1 (124-217)	
full-length Ig	T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L 180	
N-truncated Ig	T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L 76	
full-length Ig	Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C D T 240	
N-truncated Ig	Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C D T 136	
	CH2 (288-385)	
full-length Ig	P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M 300	
N-truncated Ig	P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M 196	
full-length Ig	I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V L H Q D 360	
N-truncated Ig	I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V L H Q D 256	
	CH3 (394-490)	
full-length Ig	W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F 420	
N-truncated Ig	W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F 316	
full-length Ig	Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E A L 480	
N-truncated Ig	Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E A L 376	
full-length Ig	H N R F T Q K S L S L S P G K 495	
N-truncated Ig	H N R F T Q K S L S L S P G K 391	

Fig. 24 full-length Ig と N-truncated Ig とのアミノ酸配列の比較
MIP 切断サイトを矢印で示した。

まとめ

LILRA2 と N-truncated Ig との相互作用は、速い結合・速い解離、弱い結合 ($K_d \sim 4.9 \mu\text{M}$) 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。

5. 実験材料と手法

LILRA2 の細胞外ドメイン 1-2 の発現および精製

LILRA2 の細胞外ドメイン(1-195 残基；LILRA2D1D2)をコードする DNA 断片を発現ベクター-pGMT7 に挿入したプラスミド (pGMT7-LILRA2D1D2) を、大腸菌 BL21(DE3)PlysS 株 (Promega) に導入した。菌液を、終濃度 0.1 mg/mL アンピシリンを含む LB 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養した。得られたコロニーを、終濃度 0.1 mg/mL アンピシリンを含む 2xYT 培地 10 mL に加え、37°C で 2 時間培養した。培養液を終濃度 0.1 mg/mL アンピシリンを含む 2xYT 培地 1L へ植え継ぎ、37°C で OD₆₀₀ = 0.4-0.6 になるまで培養した。終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 4 時間培養して発現誘導した。菌体を超音波によって破碎し、LILRA2D1D2 が含まれる封入体を得た。得られた封入体を、洗浄バッファ (0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) で 2-3 回洗浄した。続いて、懸濁バッファ (50 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) で 2-3 回洗浄した。洗浄した封入体に、可溶化バッファ (6 M グアニジン塩酸塩, 50 mM MES pH6.5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) を加えて、4°C で一晩転倒混和した。可溶化した封入体を、5-10 mg/mL となるように可溶化バッファで希釈した。終濃度 10 mM となるように DTT を加え、室温で 30 分反応させた。タンパク質溶液のグアニジン塩酸塩濃度が 1.5 M になるまで、あらかじめ 4°C に冷却した巻き戻しバッファ (100 mM Tris-HCl pH8.0, 1M L-Arginine Hydrochloride, 3.7 mM Cystamine, 6.3 mM Cysteamine, 2 mM EDTA) をタンパク質溶液に加えた。そのタンパク質溶液を、終濃度 0.1 mg/mL になるように巻き戻しバッファに滴下し、4°C で二晩攪拌した。巻き戻しバッファをろ過して沈殿物を取り除いた後に、VIVAFLOW50 システム (分画分子量; 10 kDa, Sartorius) を用いて濃縮した。濃縮したサンプルを透析膜 (分画分子量; 10 kDa, Spectrum Laboratories) に入れ、透析バッファ (20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) に加えた。透析後のタンパク質溶液をろ過して沈殿物を取り除いた後に、Amicon Ultra (分画分子量; 10 kDa, Merk Millipore) を用いて、さらに濃縮した。濃縮したタンパク質溶液を、ゲルろ過バッファ (20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) で平衡化したカラム Hiload 26/60 Superdex75 pg (GE Healthcare) にアプライし、精製した。得られた溶出画分について SDS-PAGE を行い、CBB 染色によりバンドを検出した。

Fc-fusion LILRA2D1D4 の発現および精製

タンパク質発現には、15 cm dish に培養した HEK293T 細胞を用いた。細胞培養液 1 mL 当たり、2.5 µg の Fc-fusion LILRA2D1D4 発現プラスミド (大阪大学 荒瀬尚教授から供与, Fig. 25) と 5 µg の PEI max (Polysciences) を混合した。プラスミド/PEI 混合溶液を無血清培地中の HEK293T 細胞に加え、37°C, 5%CO₂ 条件下で 3-4 日間培養した。培養上清を Protein G Sepharose (GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。目的タンパク質を含む画分を Superdex200 10/300GL (GE Healthcare) およびゲルろ過溶液 (20

mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

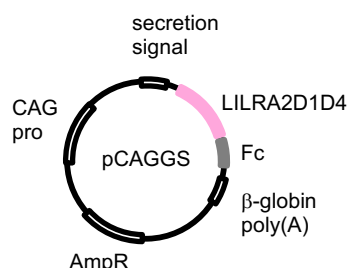


Fig. 25 Fc-fusion LILRA2D1D4 発現プラスミドのベクターマップ

LILRA2 の細胞外ドメイン 1-4 の発現および精製

LILRA2 の細胞外ドメイン(1-409 残基；LILRA2D1D4)をコードする DNA 断片を，Fc-fusion LILRA2D1D4 発現プラスミド（大阪大学 荒瀬尚教授から供与）から，以下のプライマーセットを用いて PCR で増幅した。

forward primer: 5'-AATACCGGTGGGCACCTCCCCAAGCCCAC-3'

reverse primer: 5'- AGCGGTACCATTCTCCACTGTGTAATCCTGGGGG-3'

AgeI と KpnI の制限酵素サイトを下線で示した。増幅した断片を制限酵素 AgeI と KpnI で消化し，発現ベクターpHLsec（Addgene）に挿入した（pHLsec-LILRA2D1D4, **Fig. 26**）。作製したプラスミドの配列を，DNA シークエンス解析により確認した。タンパク質発現には，15 cm dish に培養した HEK293S GnTI(-)細胞を用いた。細胞培養液 1 mL 当たり，2.5 μ g の pHLsec-LILRA2D1D4 と 5 μ g の PEI max（Polysciences）を混合した。プラスミド/PEI 混合溶液を無血清培地中の HEK293S GnTI(-)細胞に加えることで遺伝子導入し，37°C，5%CO₂ 条件下で 3-4 日間培養した。培養上清を HisTrap FF（GE Healthcare）を用いた Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。目的タンパク質を含む画分を Superdex200 10/300GL（GE Healthcare）およびゲルろ過バッファー（20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl）を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

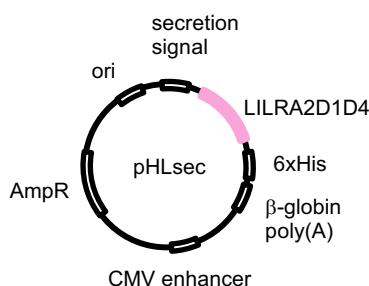


Fig. 26 LILRA2D1D4 発現プラスミドのベクターマップ

LILRA2 変異体の発現および精製

LILRA2 変異体 (Q31E, E33Q, N41K, R48T, P53L, G54V, I50_Q51insR/Q51P, H73G/Y85L, H79R/N80A/H81R/S82W, L112S, V121E, D127G, R142S, H146Q, S147P, W152S, W154R) 発現プラスミドを pGMT7-LILRA2D1D2 を鋳型としてインバース PCR 法または相補的なプライマーを用いる方法により作製した(Carey et al., 2013; Ochman et al., 1988). LILRA2 H73G/Y85L 発現プラスミドは, LILRA2 H73G を鋳型として作製した. PCR には, 以下のプライマーセットを用いた (Table 4). 作製したプラスミドの配列を, DNA シークエンス解析により確認した. LILRA2D1D2 野生型と同様の方法で発現および精製を行った.

Table 4 変異体発現ベクター作製に使用したプライマー

LILRA2D1D2 Mutant	forward primer	reverse primer
Q31E	<u>G</u> AGGCTGAGGAGTACCATCTATATAGGG	AAGGCTCCCCTGACACCTGAGGGTC
E33Q	<u>C</u> AGGAGTACCATCTATATAGGGAAAACA	AGCCTGAAGGCTCCCCTGAC
N41K	<u>A</u> AGGAAAACAAATCAGCATCCTGGG	ATATAGATGGTACTCCTCAGCCTGA
R48T	<u>A</u> CCCGGATACAAGAGCCTGGGAAGAATG	AACCCAGGATGCTGATTTGTTTTCC
P53L	<u>C</u> TGGGGAAGAATGGCCAGTTCCCCATCC	CTCTTGATCCGCTCTAACCCAGGAT
G54V	<u>G</u> TGAAGAATGGCCAGTTCCCCATCCCAT	AGGCTCTTGATCCGCTAACCCAG
I50_Q51insR/Q51P	<u>C</u> GCCCCGAGCCTGGGAAGAATGGCCA	TATCCGCTCTAACCCAGGATGCTGA
H73G	ACGCAGGGCGGTAT <u>G</u> GCTGTCTAGTACTACAG	CTGTAGTACTGACAG <u>C</u> CCATACCGCCCTGCGT
Y85L	ATCACTCATCAGAG <u>C</u> TGAGTGACCCCTGGA	TCCAGGGGGTCACT <u>C</u> AGCTCTGATGAGTGAT
H79R/N80A/H81R/S82W	<u>C</u> GCGCCCGCTGGTCAGAGTACAGTGACCCCTG	GCTGTAGTACTGACAGTGATACCGCCCTGC
L112S	<u>T</u> CCGGAGGGAACGTGACCCTCCAGTGTG	GGTCACCACAGGGCTGGGCAGAGCT
V121E	CCCTCCAGTGT <u>G</u> AATCACAGGTGGC	GCCACCTGTGAT <u>T</u> CACACTGGAGGG
D127G	AGGTGGCATTT <u>G</u> CGGGCTTCATTCT	AGAATGAAGCC <u>G</u> CCAAATGCCACCT
R142S	AACACCCACAA <u>A</u> GCCTGAACTCCCA	TGGGAGTTCA <u>G</u> GCTTTGTGGGTGTT
H146Q	GCCTGAACTCC <u>C</u> AGTCCCATGCCCG	CGGGCATGGGACT <u>T</u> GGGAGTTCAAGGC
S147P	TGAACTCCCAT <u>C</u> CGCATGCCCGTGG	CCACGGGCATG <u>C</u> GGATGGGAGTTCA
W152S	ATGCCCGTGGG <u>A</u> GCTCCTGGGCCAT	ATGGCCCAGGAG <u>C</u> TCCCACGGGCAT
W154R	<u>C</u> GTGCCATCTTCTCCGTGGG	GGACCAACCCACGGGCAT

下線は変異箇所を示す.

キメラタンパク質の発現および精製

LILRA2D1-LILRB2D2 キメラタンパク質 (LILRA2 の 1-97 残基と LILRB2 の 99-196 残基) と LILRB2D1-LILRA2D2 キメラタンパク質 (LILRB2 の 1-98 残基と LILRA2 の 98-195 残基) 発現プラスミドを, Gibson Assembly システム (NEB) により構築した. 具体的には, LILRA2D1D2 および LILRB2D1D2 発現プラスミドをテンプレートとして, 以下のプライマーセットを用いて DNA 断片を増幅した. 得られた DNA 断片を, Gibson Assembly Master Mix (NEB)を用いて, つなぎ合わせ, 発現プラスミドを構築した. 作製したプラスミドの配列を, DNA シークエンス解析により確認した. LILRA2D1D2 野生型と同様の方法で発現および精製を行った.

LILRA2D1-LILRB2D2

- ・ LILRA2D1 増幅用プライマーセット

forward primer: 5'- GAAGGAGATATACATATGGGTCACC-3'

reverse primer: 5'-TGGGTAGGCTCCTGTCCACCACCAGCTCCAGGGGGT-3'

・ LILRB2D1 増幅用プライマーセット

forward primer: 5'-ACAGGAGCCTACCCAAAACCCACCCTCTCAGCCCA-3'

reverse primer: 5'-GATCGGAATTCAAGCTTATGGGACCAGGAGCT-3'

LILRB2D1-LILRA2D2

・ LILRB2D1 増幅用プライマーセット

forward primer: 5'- GAAGGAGATATACATATGGGGACCA-3'

reverse primer: 5'-GAGGGTGGGTTTGCTGTAGGCTCCT-3'

・ LILRA2D2 増幅用プライマーセット

forward primer: 5'- AGCAAACCCACCCTCTCAGCTCTGC-3'

reverse primer: 5'- GATCGGAATTCAAGCTTATGGGACC -3'

LILRB2 の細胞外ドメイン 1-2 の発現および精製

LILRB2 の細胞外ドメイン (1-196 残基の C 末端に Gly を付与; LILRB2D1D2) を LILRA2D1D2 調製法に準じて作製した。LILRB2D1D2 のリフォールディングには、巻き戻し溶液 (100 mM Tris-HCl pH8.0, 0.4 M L-Arginine, 3.7 mM Cystamine, 6.3 mM Cysteamine, 2 mM EDTA) を用いた。LILRA2 と同様の方法で精製した。

LILRA2wt, LILRA2 変異体, LILRB2wt の円偏光二色性スペクトル測定

遠紫外の円偏光二色性スペクトル測定は、JASCO J-820 CD spectrometer. を用いた。PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) に置換した 5-10 μM の各タンパク質溶液を、光路長 1 mm の石英セルに入れた。室温で、200-260 nm におけるスペクトルを 8 回測定し、積算した。

N-truncated Ig および full-length Ig の発現および精製

タンパク質発現には、15 cm dish に培養した HEK293T 細胞を用いた。細胞培養液 1 mL 当たり、各 1.25 μg の軽鎖および重鎖の発現プラスミド (大阪大学 荒瀬尚教授から供与, Fig. 27) と 5 μg の PEI max (Polysciences) を混合した (Hirayasu et al., 2016)。プラスミド/PEI 混合溶液を無血清培地中の HEK293T 細胞に加え、37°C, 5%CO₂ 条件下で 3-4 日間培養した。培養上清を Protein G Sepharose (GE Healthcare) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。目的タンパク質を含む画分を Superdex200 10/300GL (GE Healthcare) およびゲルろ過溶液 (20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

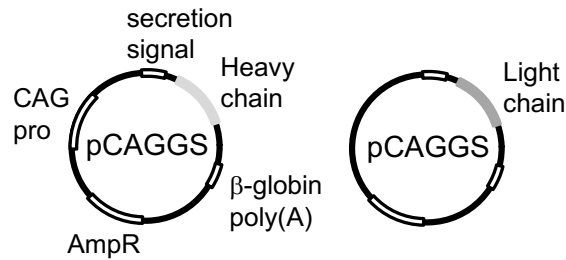


Fig. 27 抗体の軽鎖および重鎖の発現プラスミドのベクターマップ

表面プラズモン共鳴法による相互作用解析

表面プラズモン共鳴法による実験は、BIAcore3000 (GE Healthcare) を用いて実施した。

・平衡値解析

N-truncated Ig または full-length Ig (ネガティブコントロール) を Sensor Chip CM5 (GE Healthcare) に共有結合でそれぞれ 1400 RU および 1300 RU 固定化した。各リガンドを固定化したフローセルに、HBS-EP (10 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20) に置換した 0.16, 0.32, 0.63, 1.3, 2.5, 5, 10, 20, 40 μ M の LILRA2D1D2 野生型および変異体を流速 10 μ L/min で 0.5-1min 流した。それぞれのアナライト濃度における N-truncated Ig に対するレスポンス量は、N-truncated Ig に対するレスポンス量から full-length Ig に対するレスポンス量を差し引くことにより求めた。データを BIAevaluation software (v4.1) を用いて解析した。解離定数 (K_d) を非線形 Langmuir 結合等温曲線から求めた ((2) 式)。
 R_{eq} : 結合レスポンス量, C : アナライト濃度, R_{max} : 最大結合レスポンス量, K_d : 解離定数
 $R_{eq} = C \cdot R_{max} / (C + K_d)$ (2)

0.12, 0.23, 0.47, 0.94, 1.9, 3.8, 7.5, 15 μ M の LILRA2D1D4 を流速 10 μ L/min で 1min 流し、同様の解析を行った。

・速度論的解析

N-truncated Ig または full-length Ig (ネガティブコントロール) を Sensor Chip CM5 (GE Healthcare) に共有結合でそれぞれ 1400 RU および 1300 RU 固定化した。各リガンドを固定化したフローセルに、HBS-EP に置換した 0.63, 1.3, 2.5 μ M の LILRA2D1D2 を流速 30 μ L/min で流した。各濃度のアナライトを流したときの結合および解離カーブに対して、1:1 の Lagnmuir 結合モデルの式を用いたグローバルフィッティング解析を行い、結合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) を求めた。

・アビディティ効果の検証

LILRA2D1D2 を Sensor Chip CM5 (GE Healthcare) に共有結合で 100 RU 固定化した。HBS-EP に置換した 47 nM の N-truncated Ig を流速 10 μ L/min で 1min 流した。結合および解離カ

ープに対して、1:1 の Lagnmuir 結合モデルの式を用いたフィッティング解析を行い、見かけの解離定数を求めた。

ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた結合実験

ゲルろ過バッファー (20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl) に置換した Fc-fusion LILRA2D1D4 (終濃度 0.87 μ M) もしくは LILRA2D1D2 (終濃度 1.7 μ M) と N-truncated Ig (終濃度 0.87 μ M) を混合し、1 時間室温で静置した。Superdex200 10/300GL (GE Healthcare 社) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した。

熱安定性解析

microCal VP-capillary DSC (Malvern)を用いた。HBS-N (10 mM HEPES pH7.4, 150 mM NaCl) に置換した 0.3 mg/mL の N-truncated Ig および full-length Ig を、20-90°C まで 60°C/h のスキャンレートで解析した。得られたサーモグラムをプログラム Origin7.0 (OriginLab) を用いて解析した。N-truncated Ig および full-length Ig のサーモグラムから、バッファーリファレンスのサーモグラムを差し引いた。得られたサーモグラムを Non two-state transition model でフィッティングし、変性中点温度 (T_m) を求めた。

熱力学的解析

5 点の温度 (10, 15, 20, 25, 30°C) で、LILRA2D1D2 と N-truncated Ig との相互作用の解離定数 (K_d) を平衡値解析から求めた。アミンカップリング法による N-truncated Ig の固定化レベルは、1300 RU で実験を行った。結合のギブズエネルギー変化は、(3)式より求めた。

ΔG : ギブズエネルギー変化, R: 気体定数, T: ケルビン温度

$$\Delta G = -RT \ln K_d \quad (3)$$

各温度における ΔG を温度に対してプロットし、非線形ファントホッフの式 (4) でフィッティングした。

ΔH : 結合エンタルピー変化, ΔG : 結合エントロピー変化, ΔC_p : 熱容量変化

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S + \Delta C_p(T-298.15) - \Delta C_p T \ln(T/298.15) \quad (4)$$

高速原子間力顕微鏡を用いた構造解析

Nano Explorer High-Speed atomic force microscope (生体分子計測研究所) とカンチレバー BL-AC10DS-A2 (オリンパス) を用いた。ゲルろ過精製後の N-truncated Ig および full-length Ig 溶液を 10 nM 程度になるように、ゲルろ過バッファーで希釈した。タンパク質溶液をマイカに 3 分間吸着させたのちに、マイカ表面を超純水で 2-3 度洗浄した。走査範囲 500 x 500 nm², 分解能 200 x 200 pixels, スキャン速度 1 frame/sec の条件で、AFM 画像を取得した。全ての AFM 画像は、ソフトウェア Eagle または ImageJ を用いて解析した。

6. 参考文献

- Allen, R.L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J., and Wilson, M.J. (2001). Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J Immunol* 167, 5543-5547.
- Anikeeva, N., Lebedeva, T., Krogsgaard, M., Tetin, S.Y., Martinez-Hackert, E., Kalams, S.A., Davis, M.M., and Sykulev, Y. (2003). Distinct molecular mechanisms account for the specificity of two different T-cell receptors. *Biochemistry* 42, 4709-4716.
- Appel, H., Gauthier, L., Pyrdol, J., and Wucherpfennig, K.W. (2000). Kinetics of T-cell receptor binding by bivalent HLA-DR. Peptide complexes that activate antigen-specific human T-cells. *J Biol Chem* 275, 312-321.
- Arfi, Y., Minder, L., Di Primo, C., Le Roy, A., Ebel, C., Coquet, L., Claverol, S., Vashee, S., Jores, J., Blanchard, A., *et al.* (2016). MIB-MIP is a mycoplasma system that captures and cleaves immunoglobulin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5406-5411.
- Bakker, T.R., Piperi, C., Davies, E.A., and Merwe, P.A. (2002). Comparison of CD22 binding to native CD45 and synthetic oligosaccharide. *Eur J Immunol* 32, 1924-1932.
- Bleharski, J.R., Li, H., Meinken, C., Graeber, T.G., Ochoa, M.T., Yamamura, M., Burdick, A., Sarno, E.N., Wagner, M., Röllinghoff, M., *et al.* (2003). Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science* 301, 1527-1530.
- Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D.S., and Davis, M.M. (1999). Thermodynamics of T cell receptor binding to peptide-MHC: evidence for a general mechanism of molecular scanning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11446-11451.
- Borges, L., Hsu, M.L., Fanger, N., Kubin, M., and Cosman, D. (1997). A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* 159, 5192-5196.
- Canavez, F., Young, N.T., Guethlein, L.A., Rajalingam, R., Khakoo, S.I., Shum, B.P., and Parham, P. (2001). Comparison of chimpanzee and human leukocyte Ig-like receptor genes reveals framework and rapidly evolving genes. *J Immunol* 167, 5786-5794.
- Carey, M.F., Peterson, C.L., and Smale, S.T. (2013). PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Cold*

Spring Harb Protoc 2013, 738-742.

Chapman, T.L., Heikeman, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11, 603-613.

Chen, Y., Chu, F., Gao, F., Zhou, B., and Gao, G.F. (2007). Stability engineering, biophysical, and biological characterization of the myeloid activating receptor immunoglobulin-like transcript 1 (ILT1/LIR-7/LILRA2). *Protein Expr Purif* 56, 253-260.

Chen, Y., Gao, F., Chu, F., Peng, H., Zong, L., Liu, Y., Tien, P., and Gao, G.F. (2009). Crystal structure of myeloid cell activating receptor leukocyte Ig-like receptor A2 (LILRA2/ILT1/LIR-7) domain swapped dimer: molecular basis for its non-binding to MHC complexes. *J Mol Biol* 386, 841-853.

Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., and Hsu, M.L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7, 273-282.

Davis-Harrison, R.L., Armstrong, K.M., and Baker, B.M. (2005). Two different T cell receptors use different thermodynamic strategies to recognize the same peptide/MHC ligand. *J Mol Biol* 346, 533-550.

De Crescenzo, G., Pham, P.L., Durocher, Y., and O'Connor-McCourt, M.D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *J Mol Biol* 328, 1173-1183.

Ding, Y.H., Baker, B.M., Garboczi, D.N., Biddison, W.E., and Wiley, D.C. (1999). Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity* 11, 45-56.

Gao, G.F., Willcox, B.E., Wyer, J.R., Boulter, J.M., O'Callaghan, C.A., Maenaka, K., Stuart, D.I., Jones, E.Y., Van Der Merwe, P.A., Bell, J.I., *et al.* (2000). Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8alpha. *J Biol Chem* 275, 15232-15238.

Garber, E., and Demarest, S.J. (2007). A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355, 751-757.

- Garcia, K.C., Radu, C.G., Ho, J., Ober, R.J., and Ward, E.S. (2001). Kinetics and thermodynamics of T cell receptor- autoantigen interactions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6818-6823.
- Goulet, D.R., Watson, M.J., Tam, S.H., Zwolak, A., Chiu, M.L., Atkins, W.M., and Nath, A. (2018). Toward a Combinatorial Approach for the Prediction of IgG Half-Life and Clearance. *Drug Metab Dispos* 46, 1900-1907.
- Herr, A.B., Ballister, E.R., and Bjorkman, P.J. (2003a). Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc α RI and its complex with IgA1-Fc. *Nature* 423, 614-620.
- Herr, A.B., White, C.L., Milburn, C., Wu, C., and Bjorkman, P.J. (2003b). Bivalent binding of IgA1 to Fc α RI suggests a mechanism for cytokine activation of IgA phagocytosis. *J Mol Biol* 327, 645-657.
- Hirayasu, K., Saito, F., Suenaga, T., Shida, K., Arase, N., Oikawa, K., Yamaoka, T., Murota, H., Chibana, H., Nakagawa, I., *et al.* (2016). Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol* 1, 16054.
- Huynh, O.A., Hampartzoumian, T., Arm, J.P., Hunt, J., Borges, L., Ahern, M., Smith, M., Geczy, C.L., McNeil, H.P., and Tedla, N. (2007). Down-regulation of leucocyte immunoglobulin-like receptor expression in the synovium of rheumatoid arthritis patients after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)* 46, 742-751.
- Jones, D.C., Kosmoliaptsis, V., Apps, R., Lapaque, N., Smith, I., Kono, A., Chang, C., Boyle, L.H., Taylor, C.J., Trowsdale, J., *et al.* (2011). HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding. *J Immunol* 186, 2990-2997.
- Kang, X., Kim, J., Deng, M., John, S., Chen, H., Wu, G., Phan, H., and Zhang, C.C. (2016). Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle* 15, 25-40.
- Kuroki, K., Furukawa, A., and Maenaka, K. (2012). Molecular recognition of paired receptors in the immune system. *Front Microbiol* 3, 429.
- Lee, D.J., Sieling, P.A., Ochoa, M.T., Krutzik, S.R., Guo, B., Hernandez, M., Rea, T.H., Cheng, G., Colonna, M., and Modlin, R.L. (2007). LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol* 179, 8128-8136.

- Lee, J.K., Stewart-Jones, G., Dong, T., Harlos, K., Di Gleria, K., Dorrell, L., Douek, D.C., van der Merwe, P.A., Jones, E.Y., and McMichael, A.J. (2004). T cell cross-reactivity and conformational changes during TCR engagement. *J Exp Med* 200, 1455-1466.
- Lo Conte, L., Chothia, C., and Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 285, 2177-2198.
- Lu, H.K., Mitchell, A., Endoh, Y., Hampartzoumian, T., Huynh, O., Borges, L., Geczy, C., Bryant, K., and Tedla, N. (2012). LILRA2 selectively modulates LPS-mediated cytokine production and inhibits phagocytosis by monocytes. *PLoS One* 7, e33478.
- Maenaka, K., Juji, T., Nakayama, T., Wyer, J.R., Gao, G.F., Maenaka, T., Zaccari, N.R., Kikuchi, A., Yabe, T., Tokunaga, K., *et al.* (1999). Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. *J Biol Chem* 274, 28329-28334.
- Maenaka, K., van der Merwe, P.A., Stuart, D.I., Jones, E.Y., and Sodermann, P. (2001). The human low affinity Fcγ receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem* 276, 44898-44904.
- Mamegano, K., Kuroki, K., Miyashita, R., Kusaoi, M., Kobayashi, S., Matsuta, K., Maenaka, K., Colonna, M., Ozaki, S., Hashimoto, H., *et al.* (2008). Association of LILRA2 (ILT1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. *Genes Immun* 9, 214-223.
- Martin, A.M., Kulski, J.K., Witt, C., Pontarotti, P., and Christiansen, F.T. (2002). Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends Immunol* 23, 81-88.
- Myszka, D.G., Sweet, R.W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P.D., Hendrickson, W.A., Wyatt, R., Sodroski, J., and Doyle, M.L. (2000). Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9026-9031.
- Nakajima, H., Samaridis, J., Angman, L., and Colonna, M. (1999). Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* 162, 5-8.
- Ochman, H., Gerber, A.S., and Hartl, D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120, 621-623.
- Padlan, E.A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.

- Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 161, 205-214.
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Ose, T., Rasubala, L., Shiratori, I., Arase, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kohda, D., and Maenaka, K. (2006a). Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *J Biol Chem* 281, 10439-10447.
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Tsumoto, K., Yokota, A., Sasaki, T., Amano, K., Shimojima, T., Shirakihara, Y., Rasubala, L., van der Merwe, P.A., *et al.* (2006b). Entropically driven MHC class I recognition by human inhibitory receptor leukocyte Ig-like receptor B1 (LILRB1/ILT2/CD85j). *J Mol Biol* 355, 237-248.
- Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., *et al.* (2003). Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8856-8861.
- Sloane, D.E., Tedla, N., Awoniyi, M., Macglashan, D.W., Borges, L., Austen, K.F., and Arm, J.P. (2004). Leukocyte immunoglobulin-like receptors: novel innate receptors for human basophil activation and inhibition. *Blood* 104, 2832-2839.
- Stites, W.E. (1997). Protein-protein interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. *Chem Rev* 97, 1233-1250.
- Tabata, S., Kuroki, K., Wang, J., Kajikawa, M., Shiratori, I., Kohda, D., Arase, H., and Maenaka, K. (2008). Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired Ig-like type 2 receptors. *J Biol Chem* 283, 8893-8901.
- Tedla, N., An, H., Borges, L., Vollmer-Conna, U., Bryant, K., Geczy, C., and McNeil, H.P. (2011). Expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium: correlations to disease activity. *Tissue Antigens* 77, 305-316.
- Tedla, N., Bandeira-Melo, C., Tassinari, P., Sloane, D.E., Samplaski, M., Cosman, D., Borges, L., Weller, P.F., and Arm, J.P. (2003). Activation of human eosinophils through leukocyte immunoglobulin-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1174-1179.
- Umakoshi, T., Udaka, H., Uchihashi, T., Ando, T., Suzuki, M., and Fukuda, T. (2018). Quantum-dot antibody conjugation visualized at the single-molecule scale with high-speed atomic force microscopy.

Colloids Surf B Biointerfaces 167, 267-274.

van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., Daenke, S., Linsley, P., and Davis, S.J. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185, 393-403.

Vega, S., Abian, O., and Velazquez-Campoy, A. (2016). On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity. *Biochim Biophys Acta* 1860, 868-878.

Vilhena, J.G., Dumitru, A.C., Herruzo, E.T., Mendieta-Moreno, J.I., Garcia, R., Serena, P.A., and Pérez, R. (2016). Adsorption orientations and immunological recognition of antibodies on graphene. *Nanoscale* 8, 13463-13475.

Willcox, B.E., Gao, G.F., Wyer, J.R., Ladbury, J.E., Bell, J.I., Jakobsen, B.K., and van der Merwe, P.A. (1999). TCR binding to peptide-MHC stabilizes a flexible recognition interface. *Immunity* 10, 357-365.

Willcox, B.E., Thomas, L.M., Chapman, T.L., Heikema, A.P., West, A.P., and Bjorkman, P.J. (2002). Crystal structure of LIR-2 (ILT4) at 1.8 Å: differences from LIR-1 (ILT2) in regions implicated in the binding of the Human Cytomegalovirus class I MHC homolog UL18. *BMC Struct Biol* 2, 6.

7. 謝辞

北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 前仲勝実 教授には本研究を行うにあたり、ご指導を賜り、深く感謝いたします。また、本論文の審査をいただいたことにも重ねてお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、直接のご指導ならびに実験手法に関して多くのご助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 古川敦 助教に感謝いたします。

日々研究のご指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室 黒木喜美子 准教授、北海道大学大学院薬学研究院 創薬科学研究教育センター 福原秀雄 特任助教、田所 高志 特任助教、喜多俊介 特任助教に感謝いたします。黒木喜美子 准教授には、本論文の審査をいただいたことにも重ねてお礼申し上げます。

ご多忙の中、本論文を審査・ご指導頂きました北海道大学大学院薬学研究院 衛生化学研究室 松田正 教授、柏倉淳一 講師に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、実験材料を供与頂きました大阪大学 微生物病研究所 荒瀬尚 教授、金沢大学 先進予防医学研究センター 平安恒幸 特任准教授に感謝いたします。

本専攻で研究するにあたり、指導教員をお引き受けいただいた北海道大学薬学研究院 山田勇磨 准教授に感謝いたします。