

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」

平成 21 年度採択研究代表者

荒瀬 尚

大阪大学 微生物病研究所 免疫化学分野・教授

ペア型レセプターを標的とした免疫・感染制御技術の開発

## § 1. 研究実施の概要

ペア型レセプターは、活性化と抑制化レセプターから成る一連のレセプター群であり、免疫細胞に広く発現し、免疫応答の制御に重要な機能を担っている。抑制化ペア型レセプターは自己抗原を認識し、免疫細胞の自己応答性を抑制しているのに対し、活性化ペア型レセプターは、病原体等の異物を認識することにより、免疫制御や生体防御に重要な機能を担っていると考えられる。そこで、本研究では、一連のペア型レセプター群のリガンド認識機構および免疫病や感染症等における機能を解明することを目的に研究を実施した。水痘帯状疱疹ウイルスは水疱瘡や帯状疱疹の原因ウイルスであるが、感染の際の膜融合機構は長年明らかでなかった。種々のペア型レセプターと水痘帯状疱疹ウイルスとの相互作用を解析することにより、ペア型レセプターの一つである Siglec-4 (Myelin associated glycoprotein) が、水痘帯状疱疹ウイルスの Glycoprotein B と会合し、水痘帯状疱疹ウイルス感染の際の膜融合に関与していることを明らかにした。また、ペア型レセプターの一つである PILR は免疫応答の制御に深く関与していると考えられるが、PILR のリガンド認識機構を解析することにより、PILR は特定の糖鎖構造とタンパク構造の双方を認識するユニークなペア型レセプターであることが明らかになった。これらのことから、ペア型レセプターの認識機構の制御法の開発が免疫疾患や感染症の制御に有用であると考えられた。

## § 2. 研究実施体制

### (1) 「荒瀬」グループ

① 研究分担グループ長: 荒瀬 尚 (大阪大学、教授)

② 研究項目

- ペア型レセプターと病原体との相互作用の機能解析
- ペア型レセプターと宿主分子との相互作用の機能解析

### (2) 「前仲」グループ

① 研究分担グループ長:前仲 勝実(九州大学、准教授)

② 研究項目

- ペア型受容体-リガンド複合体の解析
- PILR/Siglec-リガンド複合体の結晶解析と改良

### § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

NK細胞やマクロファージ等の特異的抗原認識機構を持たないリンパ球は、自己の細胞を識別するために、MHC クラス I 抗原等の自己抗原を認識する抑制化レセプターを用いて自己応答性を抑制する。ところが、持続感染する病原体には、抑制化ペア型レセプターのリガンドを獲得することにより、免疫システムから逃避するものがある。一方、活性化ペア型レセプターは、抑制化レセプターに対する病原体リガンドを認識することにより、宿主の感染抵抗性に関与する。これらのことから、ペア型レセプターは、自己に対する応答性を制御すると同時に、病原体とともに進化してきた生体防御分子ではないかと考えられる。実際、ウイルスの中には MHC 類似分子を含めて様々な宿主類似分子が存在し、それらはペア型レセプターである NK 細胞レセプター等に認識される。また、NK 細胞レセプターばかりでなく免疫細胞に広く発現するペア型レセプターも存在し、免疫応答の制御に関与していると考えられる。

#### A. ペア型レセプターの病原体との相互作用の解析

我々は、いままでに、ほとんど全ての哺乳動物に保存されており、ある種の樹状細胞やマクロファージ等に発現しているペア型レセプターとして PILR を明らかにしてきた。さらに、PILR の宿主リガンドを検索することにより、PILR が CD99 を認識し、免疫制御に関与していることを明らかにした。抑制化レセプターは免疫応答の制御に重要な機能を担っている一方、病原体の中には抑制化レセプターを利用して病原体に対する免疫応答を抑制するものが知られている。PILR は哺乳動物に幅広く存在するペア型抑制化レセプターであり、抑制化 PILR が病原体の免疫逃避に利用されている可能性が考えられる。実際、PILR は単純ヘルペスウイルスのエンベロップ分子 Glycoprotein B (gB)と特異的に会合し、免疫応答を抑制するのに利用されるばかりでなく、PILR と gB の相互作用が単純ヘルペスウイルスの細胞内侵入時の膜融合に関与する。そこで、本研究では、種々のペア型レセプターについてウイルス分子との相互作用を検索することにより、水痘・带状疱疹ウイルスの gB とペア型レセプターの一つである Siglec family 分子、Siglec-4 (Myelin associated glycoprotein)とが会合し、水痘带状疱疹ウイルスの感染時の膜融合に関与していることを見だし、水痘带状疱疹ウイルス感染の分子機構を初めて解明した(Suenaga et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010、文献1)。つまり、ウイルス等の病原体は抑制化レセプターを用いて免疫応答を制御するばかりでなく、宿主細胞への感染そのものにも利用されていることが明らかになった。そこで、さらにペア型レセプターと種々の病原体との相互作用の解明、および宿主分子との相互作用の解明を行い、感染症や免疫疾患の発症にペア型レセプターがどの様に関わっているかの解明を進めている。

#### B. ペア型レセプターPILR の構造解析

一方、PILR は単純ヘルペスウイルスのエンベロップ分子 GlycoproteinB (gB)と会合しウイルスの細胞内侵入に関与するが、未だ PILR $\alpha$ による gB 認識機構の構造的な基盤は解明されていない。そこで、私たちは PILR $\alpha$ による gB 認識の詳細なメカニズムを相互作用解析及び複合体の結晶構造解析により明らかにすることを目的とした。ヒト PILR $\alpha$ 蛋白質の発現系を構築し、封入体として大腸菌に発現させ、巻き戻しにより調製した。さらに結晶化に成功し、単結晶を得られる結

晶化条件が見つけた。放射光施設 Spring8(兵庫)と Photon factory(筑波)で X 線回折実験を行い、野生型蛋白質から 1.4 Å の高分解能データが得られた。single anomalous dispersion (SAD)法によりヒト PILR $\alpha$ の結晶構造を決定した。その構造はシアル酸特異的に結合するレクチンの一種である Sialic acid binding immunoglobulin like lectin (Siglec)ファミリーと類似しているが、糖鎖結合部位の立体構造には差異が見られた。更に、結合様式の詳細を明らかにするために、複合体の結晶構造解析を行った。初期スクリーニングにより得られた結晶の X 線回折データについて、PILR $\alpha$ のフリーの結晶構造をテンプレートとして分子置換法により解析を行った。その結果、2.5 Å の分解能で複合体の結晶構造を決定することに成功した。複合体の結晶構造から、PILR $\alpha$ は gB の糖とペプチドを同時に認識しており、その認識には大きな構造変化を伴うことが明らかとなった。これらの結合部位と考えられる領域のアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作成し、相互作用解析を行った。リガンドである gB は 293T 培養細胞発現系により Fc 融合タンパクとして調製し、これと変異体 PILR $\alpha$ との相互作用の差異を Surface Plasmon Resonance (SPR)法により解析した。その結果、結晶構造上で gB 認識部位となっている広範囲の領域において結合能の低下が見られ、PILR $\alpha$ は gB の糖鎖とペプチドの両方を同時に認識していることが明らかとなった。そこで、これらの構造学的の情報を基に、PILR の制御法の開発を行っている。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

・論文詳細情報

1. Suenaga, T., Satoh, T., Somboonthum, P., Kawaguchi, Y., Mori, Y., and Arase, H. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:866-871. 2010 DOI: 10.1073/pnas.0913351107