



## 異なるクラスの MHC 分子の特徴的構造をあわせ持つ 免疫抑制タンパク質 HLA-G の新規構造解明 —免疫抑制バイオ医薬品としての期待—

### 研究成果のポイント

- ・ HLA-G タンパク質はヒトの胎盤に主に発現し、母体免疫から胎児を守り、妊娠を成立させることに貢献するとともに、全身の免疫反応を抑制する天然の免疫抑制分子である。
- ・ 多様なかたちで存在する HLA-G タンパク質の一つである HLA-G2 が、対の形態をとることで安定な分子として存在すること、その形態は本来所属する MHC クラス I よりも MHC クラス II の構造に類似していることを生化学的・構造解析により初めて明らかにした。
- ・ HLA-G2 タンパク質は、対の形態をとることで、受容体と強固に結合する機能を獲得していた。
- ・ 今回明らかにした新規構造は、遺伝子進化上、MHC のクラスが分岐するきっかけを知るための新しい知見の一つになるとともに、免疫抑制生物学的製剤への発展につながることで期待される。

### 研究成果の概要

HLA-G (ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) ※1 の一つ) は胎盤、胸腺、腫瘍細胞に特異的に発現する非古典的 MHC クラス I の一つです。妊娠時の胎盤では、胎児側の細胞で発現する HLA-G が母胎免疫抑制受容体と結合して母胎免疫を抑制し、胎児を母体免疫から回避させて、妊娠の成立に重要な役割を担っています。HLA-G は多様な分子形態をとることが知られており、前仲教授の研究室では、これまでに、主要な成分である HLA-G1 の構造解析及び機能解析を進めてきました。今回、 $\alpha 2$  ドメインを欠損しているにも関わらず、通常型の HLA-G1 を補う活性を保持している HLA-G2 の構造及び受容体との結合様式を明らかにしました。その結果、HLA-G2 タンパク質は、これまでに予想されてきた配向とは異なる向きで対のタンパク質を形成し、HLA-G1 に比べてより強く受容体と結合すること、受容体特異性が HLA-G1 とは異なることを明らかにしました。前仲研究室では HLA-G2 タンパク質がコラーゲン誘導型関節炎モデルマウスにおいて炎症抑制効果を持つことを明らかにしており、新たなバイオ医薬品としての製剤化が期待できます。

本研究は、科学研究費補助金、CREST、内藤記念科学振興財団、JSPS、北海道大学女性支援室などの助成を受けて実施されました。

### 論文発表の概要

研究論文名 : Class II-like structural features and strong binding of the nonclassical HLA-G2 isoform homodimer (MHC クラス II に似た分子構造を持ち、受容体と強固に結合する HLA-G2 タンパク質)

著者：黒木 喜美子<sup>1</sup>，三尾 和弘<sup>2</sup>，高橋 愛実<sup>1</sup>，松原 永季<sup>1</sup>，笠井 宣征<sup>1</sup>，間中 幸絵<sup>2</sup>，吉川 雅英<sup>3</sup>，浜田 大三<sup>4</sup>，佐藤 主税<sup>5</sup>，前仲 勝実<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 北海道大学大学院薬学研究院，<sup>2</sup> 産総研－東大 先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ，<sup>3</sup> 東京大学大学院医学系研究科，<sup>4</sup> 神戸大学大学院医学系研究科，<sup>5</sup> 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門)

公表雑誌：The Journal of Immunology (米国免疫学雑誌)

公表日：米国東部時間 2017年3月27日(月) (オンライン公開)

## 研究成果の概要

### (背景)

HLA-G は、ヒトの体内において、免疫反応を抑制するためにはたらくタンパク質です。一つの遺伝子から、多様なかたちを持つタンパク質として存在することで、広範な免疫細胞の活性化を抑制していると考えられています。最も存在量が多いと考えられる HLA-G1 タンパク質は、さらにシステイン残基を介した対のタンパク質を形成し、単独として存在する時に比べて、より強い免疫抑制シグナルを伝達します(図 1)。その理由として、対のタンパク質(ダイマー)として存在する HLA-G1 に対して、抑制シグナルを伝達する受容体が 2 つ結合することで受容体と解離しにくくなるとともに、細胞内シグナル伝達因子群が集積して細胞内へのシグナル伝達がより効果的になることを、研究グループは構造解析によって明らかにしていました(JBC, 2006)。一方、他の HLA-G タンパク質が実際にどのようなかたちで存在し、どういう機能を果たしているのかについての知見はありませんでした。今回注目した HLA-G2 タンパク質は、HLA-G1 タンパク質に比べて、一つの構造単位を欠損しているため、これまでは対の HLA-G1 タンパク質と同様に、システイン残基を介した対のタンパク質として生体内で安定に存在すると予想されてきましたが、その実体については不明なままでした(図 1)。また、HLA-G1 タンパク質を産生できないヒトが、HLA-G2 タンパク質を中心とする他のかたちの HLA-G を生成することによって、HLA-G2 は HLA-G1 と同等の機能を持っている重要なタンパク質であると考えられています。そのため、HLA-G2 タンパク質のかたちを明らかにし、免疫抑制能を HLA-G1 と比較し、理解することは、今後の HLA-G タンパク質のバイオ医薬品としての応用における重要な知見となると期待されていました。

### (研究手法)

HLA-G2 タンパク質の立体構造を明らかにするために、HLA-G2 タンパク質を大腸菌封入体の巻き戻し法<sup>※2</sup>によって大量調製しました。高純度に精製できていることを電気泳動にて確認したうえで、ネガティブ染色法<sup>※3</sup>による電子顕微鏡解析で、HLA-G1 タンパク質との全体構造比較及び HLA-G2 タンパク質の構造解析を行いました。また、ヒト受容体 LILRB1, LILRB2 との結合特異性及び結合様式を、表面プラズモン共鳴法<sup>※4</sup>を用いた相互作用解析によって明らかにしました。同時に、対のタンパク質形成様式を確認するために、対のタンパク質形成に必須であると予想されていたシステイン残基をセリン残基に置換した変異体 HLA-G2 タンパク質を調製し、その分子量や性質を野生型 HLA-G2 と比較しました。

### (研究成果)

HLA-G2 タンパク質を精製タンパク質として調製したところ、これまでに予想されたシステイン残基

を介する対のタンパク質として存在するのではなく、システイン残基に依存しない対のタンパク質として存在することがわかりました。これは、HLA-G1 タンパク質とは異なるダイマー形成様式でした(図 2)。システイン残基をセリン残基に置換した変異体 HLA-G2 タンパク質が野生型と変わらない挙動を示すことから、システイン残基がダイマー形成に必須ではないことがわかりました。電子顕微鏡解析によって得られた三次元電子マップに、HLA-G1 結晶構造を当てはめてみると、システイン残基(Cys)はダイマー接触面ではなく外側に露出していること、同様に糖鎖修飾部位であるアスパラギン残基(Asn)も外側に露出し、糖鎖結合がダイマー形成に影響しないことが示唆されました。興味深いことに、HLA-G2 構造は、HLA-G が属する MHC クラス I よりも MHC クラス II に類似した立体構造を取っていることがわかりました(図 2)。このことは、進化上、遺伝子重複によって形成されたと考えられる MHC クラス I 及びクラス II の遺伝子進化においても新たな知見となると考えています。また、HLA-G2 は HLA-G1 と異なる形をとることで、結合する受容体が LILRB2 に限られること、ダイマー形成により、結合解離しにくい強固な結合を示すことが、表面プラズモン共鳴法により明らかになりました。

#### (今後への期待)

本研究の結果から、HLA-G2 はダイマー形成により、受容体に強固に結合することが明らかとなりました。また、結合する受容体はミエロイド系抗原提示細胞に限られているため、HLA-G2 は直接 B 細胞や T 細胞機能に影響しない、標的細胞が限局的である副作用の少ない新規免疫抑制バイオ医薬品としての発展が期待されます。研究グループは、HLA-G2 タンパク質を関節リウマチモデルマウスに投与することで、単回投与により長期間の抗炎症効果を示すことを明らかにしており(2016, Hum Immunol)、今後の研究によって、ヒトへの応用が期待できると考えています。

#### お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 教授 前仲 勝実(まえなか かつみ)

TEL: 011-706-3970 FAX: 011-706-4986 E-mail: maenaka@pharm.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://convallaria.pharm.hokudai.ac.jp/bunshi/index.html>

#### [用語解説]

1. ヒト主要組織適合性複合体(MHC): ヒトのほぼすべての細胞上に存在する細胞表面タンパク質。自己または非自己由来の抗原ペプチドを結合することによって、免疫細胞が自己と非自己を見分けることに関与している。その分子構造、発現分布、機能からクラス I とクラス II に分類される。
2. 巻き戻し法: 不活性な変性状態で発現させた組換えタンパク質を、活性を持つ本来の立体構造へと戻す方法。
3. ネガティブ染色法: 精製したタンパク質を電子顕微鏡を用いて観察する手法の一つ。タンパク質を固定化し、染色、観察することによって、分子の輪郭を得ることができる。
4. 表面プラズモン共鳴法: 分子間の相互作用解析法の一つ。試料をラベルする必要が無く、分子

間の結合，解離をリアルタイムに観察することができる。

【参考図】

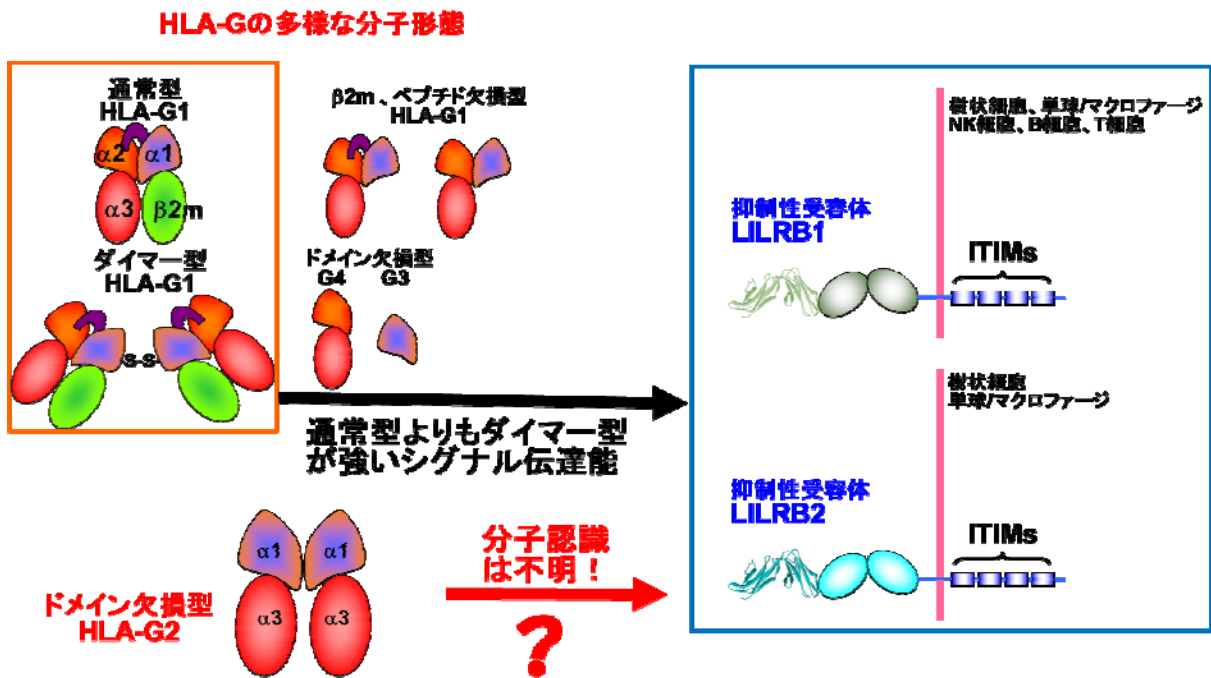
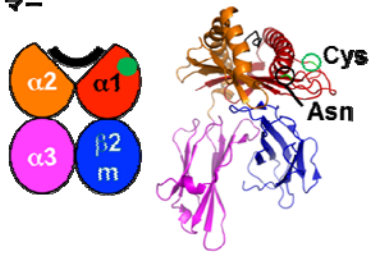


図1 研究の背景

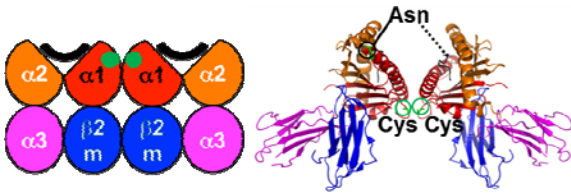
これまでに、HLA-G1 タンパク質は通常型（モノマー）も対の形態（ダイマー）も、免疫抑制性受容体 LILRB1, LILRB2 の両方に結合すること、ダイマーはモノマーよりもより強固に結合することによって、強いシグナル伝達が可能であることを明らかにされてきた（JBC, 2006）。

## HLA-G1構造

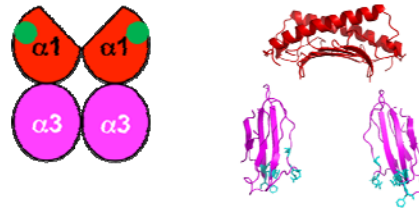
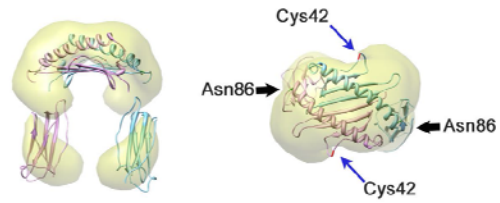
### HLA-G1 モノマー



### HLA-G1 ダイマー



## HLA-G2構造



## HLA class II構造



図2 HLAの立体構造

HLA-G1 タンパク質は典型的な HLA クラス I の構造をとる (左)。また、システイン残基 (Cys42) を介するジスルフィド結合によって、対の形態 (ダイマー) を形成する。一方、今回得られた HLA-G2 タンパク質は、Cys42 が分子表面に位置しており、ジスルフィド結合に依存しないダイマーを形成することが明らかとなった。また、その分子構造は、同様にジスルフィド結合を介さないダイマーを形成する HLA クラス II 分子に類似していた。模式図において、Cys42 を緑色で示した。