

## 抑制型受容体 PIR-B による免疫応答制御の 細胞内分子動態の解析

### [1] 組織

代表者：坂本 譲

(東北工業大学)

対応者：高井 俊行

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費20万円

### [2] 研究経過

Paired immunoglobulin-like receptor (PIR) は免疫グロブリン様受容体ファミリーに属し、B 細胞、マクロファージ、マスト細胞、樹状細胞など多くの免疫系細胞に発現している活性化型の PIR-A と抑制型の PIR-B からなるペア型受容体である。このうち抑制型の PIR-B は、免疫受容体チロシン抑制モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif: ITIM) を細胞内領域に有し、ITIM のリン酸化されたチロシン残基に src homology 2 (SH2) containing tyrosine phosphatase (SHP)-1 などの脱リン酸化酵素を動員することで活性化シグナルを抑制している。また、PIR-B は主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) クラス I (MHC-I) 分子をリガンドとして認識することが報告されており、その結合形態は同一細胞表面で MHC-I 分子と結合する。最近になり中枢神経系においての PIR-B の発現と新たなリガンドとして Nogo、MAG、OMgp が報告され、さらに免疫細胞においても Nogo の発現が確認された。一方、免疫細胞上に発現する PIR-B と Nogo との結合の可能性について検討した前年度の研究結果から、PIR-B と Nogo が同一細胞表面上において結合している可能性を示す知見を得た。この結果は免疫細胞において PIR-B、Nogo、そしてこれまでに PIR-B のリガンドとして報告されている MHC-I が同一細胞表面上で結合している可能性を示唆している。そこで、本共同研究では、この3分子の同一細胞表面上における結合状態について検討することを目的とした。

以下、研究活動状況の概要を記す。

2011年5月11日 研究計画打合せ(遺伝子導入研

### 究分野)

2011年5月18日～ 研究計画の実施(遺伝子導入研究分野)主に、Nogo66-Fc 融合タンパク質およびリコンビナント HLA-G モノマーを用いて PIR-B に対する HLA-G および Nogo66-Fc の競合的結合試験を行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず、PIR-B transfected E.G7 (E.G7-PirB) 細胞株もしくは mock transfected E.G7 (E.G7-mock) 細胞株を用いて PIR-B に対する未標識 HLA-G と AlexaFluor546 標識 Nogo66-Fc の結合を共焦点レ

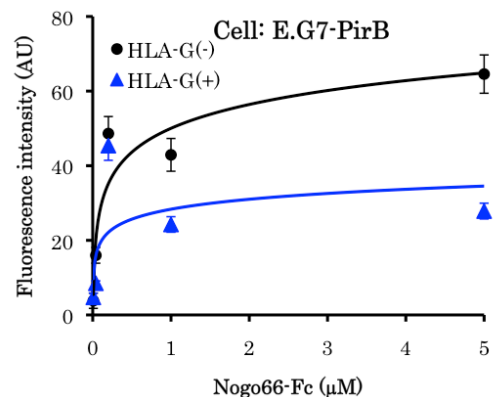
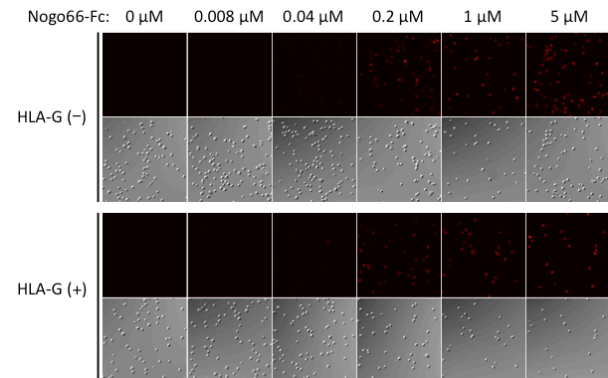


図1. PIR-B に対する HLA-G と Nogo66-Fc の競合的結合 (E.G7-PirB 細胞) HLA-G (0 or 7μM), AlexaFluor546 標識 Nogo66-Fc (0 to 5μM)。

一ザ一頭微鏡で観察後、画像解析を行い Nogo66-Fc の各濃度における蛍光強度を算出し競合試験についての評価を行った。その結果、HLA-G と Nogo66-Fc が同一細胞表面上で PIR-B と競合的に結合することを見いだした (図 1)。また、この結合では PIR-B に対して MHC-I および Nogo が競合的ではあるが同時に結合することから結合部位は異なることが示唆された (図 1、2)。

Sakamoto Y, Kobayashi K, Kitaguchi K, Kuroki K, Söderhäll A, Maenaka K, Nakamura A, Strittmatter SM, Takai T. Differential but competitive binding of Nogo protein and class I major histocompatibility complex (MHC I) to the PIR-B ectodomain provides an inhibition of cells. *J Biol Chem* 286(29): 25739-47 (2011).

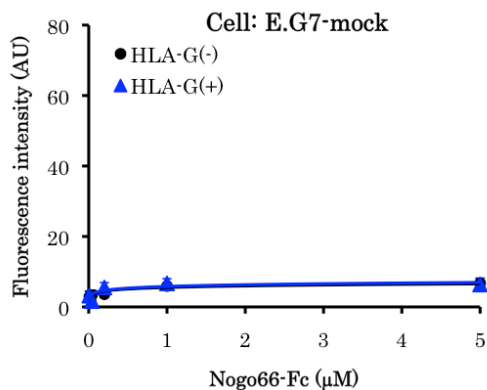


図 2. PIR-B に対する HLA-G と Nogo66-Fc の競合的結合 (E.G7-mock 細胞). HLA-G (0 or 7μM), AlexaFluor546 標識 Nogo66-Fc (0 to 5μM).

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では、PIR-B がリガンドである HLA-G/Nogo66-Fc と同一細胞表面上で競合的に結合することを見いだした。この結果は、複数の異なるリガンド分子が同一の抑制型受容体と競合的に結合することでマスト細胞の免疫応答を制御することを明らかにした研究成果をもたらした (Matsushita H. 2011)。今後は、MHC-I と同様に同一細胞表面上での結合が示された Nogo と PIR-B との結合および MHC-I/Nogo の PIR-B に対する競合的な結合の状態における PIR-B、MHC-I、Nogo と脱リン酸化酵素 SHP-1 および SHIP (SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase) それぞれの局在と細胞内動態について焦点を当て、これら複数の異なるリガンド分子が同一の抑制型受容体と競合的に結合することでもたらされる免疫応答制御のメカニズムについての詳細な検討を進めていくことで、新たな抑制機構の解明へと発展する可能性が考えられる。

### [4] 成果資料

(1) Matsushita H\*, Endo S\*, Kobayashi E\*,