The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Crystal structure of the complex of CLEC12A and an antibody that interferes with binding of diverse ligands
Author(s)	森, 正太郎
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96329
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	森　正太郎
論文題名 Title	Crystal structure of the complex of CLEC12A and an antibody that interferes with binding of diverse ligands （CLEC12Aとリガンド結合阻害抗体との複合体のX線結晶構造解析）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

C型レクチン受容体（CLR）はパターン認識受容体の一種であり、細胞外のリガンド結合ドメイン（CRD）を介して様々なリガンドを認識し免疫応答を行う。CLEC12Aは抑制性CLRであり、リガンドの結合により細胞内の抑制性モチーフであるITIM配列を介して免疫抑制に働く。これまでの研究からCLEC12Aは尿酸結晶などの結晶性物質をリガンドとして認識することが知られていた。これに対して所属研究室では最近CLEC12Aの外因性リガンドとして抗酸菌の脂質成分であるミコール酸を認識し、宿主の免疫を抑制することを明らかにした。このためCLEC12Aを特異的に制御する物質をデザインすることができれば新しい抗酸菌治療のアプローチとなることが期待される。しかしCLEC12Aの構造情報は一切不明であった。そこで本研究はCLEC12Aの立体構造決定を目的として、CLEC12A細胞外ドメイン単独および阻害抗体との複合体のX線結晶構造解析を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

《CLEC12A蛋白質の発現・精製・結晶化・構造決定および生化学解析》CLEC12A細胞外ドメイン遺伝子をベクターに組み込み、動物細胞の発現系であるExpi293細胞を用いて分泌蛋白質として大量発現を行った。得られた培養上清から複数のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることにより、CLEC12A蛋白質を高純度に精製した。また阻害抗体はパパイン消化によりFabを精製した。精製したCLEC12A蛋白質は単独および阻害抗体Fabと混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化した。得られた結晶は液体窒素で凍結し、大型放射光施設Photon Factory BL17AビームラインによりX線回折強度データを収集した。位相決定は分子置換法で行った。最終的にはCLEC12Aリガンド結合ドメイン、阻害抗体Fab、CLEC12A細胞外ドメインおよび阻害抗体Fabとの複合体の三種類の結晶構造決定に成功した。また生化学解析としてゲルろ過実験およびBiacore T200を用いた表面プラズモン共鳴法による結合実験を行った。

《CLEC12A細胞外ドメインの変異体解析》CLEC12A CRDの分子表面に露出したアミノ酸を84個選択し、それぞれアラニンに置換した変異体遺伝子を作成し、pMXベクターに組み込み、変異体ライブラリーを構築した。得られた変異体ライブラリー遺伝子をレポーター細胞に感染させ、GFPレポーター細胞ライブラリーを構築した。これらのライブラリーを尿酸結晶およびミコール酸で刺激してGFPの発現の有無で細胞を選別し、RNA解析を行うことで変異体ごとの活性の違いを評価した。

《結果》CLEC12A細胞外ドメインを構造解析したところ、糖鎖をリガンドとするCRDの構造とは大きく異なる表面をしていることが明らかになった。次にCLEC12A細胞外ドメインと阻害抗体の結合について、生化学実験を行った。まず表面プラズモン共鳴法によりCLEC12A細胞外ドメインと阻害抗体との解離定数を算出したところ、70nMであった。続いて発現領域の異なる複数のCLEC12A細胞外ドメインと阻害抗体とを混合し、ゲルろ過実験を行ったところ、阻害抗体はCLEC12AのCRDを介して結合していることが示唆された。CLEC12A細胞外ドメインと阻害抗体Fabとの複合体の結晶構造から、阻害抗体はCLEC12AのCRD上面を認識してリガンド結合を阻害していることが明らかになった。また網羅的な変異体解析の結果、尿酸結晶とミコール酸刺激により共通のアミノ酸がアラニン置換により反応性が低下していた。これらのアミノ酸はCRD上でクラスターを形成しており、この部分がリガンド結合面であることが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究はCLEC12Aに関する最初の立体構造を報告したものである。本研究により、CLEC12Aの阻害機構やリガンド認識機構に関する構造生物学的な知見を得ることができた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　森　正太郎

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	山崎　晶
	副　査	大阪大学教授	小林　剛
	副　査	大阪大学教授	岩永史朗

論文審査の結果の要旨

本研究が対象とするCLEC12Aは痛風の原因となる尿酸結晶や脳性マラリアによって産生されるヘモゾイン結晶を認識して、免疫抑制に働く受容体として知られていた。最近になり抗酸菌の脂質成分であるミコール酸が宿主のCLEC12Aを介して免疫を抑制することが明らかとなり、抗酸菌の持続感染への関与が示唆された。このためCLEC12Aとミコール酸との結合を阻害可能な物質をデザインできれば抗酸菌に対する新しい治療戦略となることが期待される。しかし新規阻害物質のデザインに必要不可欠なCLEC12Aの立体構造情報は一切報告されていなかった。

そこで本研究はExpi293細胞を用いてCLEC12A蛋白質の大量発現系を構築し、X線結晶構造解析によって立体構造を初めて明らかにした。また既知の阻害抗体の生化学的解析およびCLEC12Aとの複合体のX線結晶構造解析を行い、抗体による阻害機構を明らかにした。さらに網羅的変異体解析によって尿酸結晶やミコール酸との結合部位を推定することができた。

これら一連の研究成果は申請者が主導して世界に先駆けて明らかにしたものであり、学位に値するものと考える。