

# Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor (LILR) ファミリーの分子認識

黒木 喜美子, 前 仲 勝 実

Leukocyte Immunoglobulin (Ig)-Like Receptor (LILR) は、細胞外に Ig 様ドメインを二つまたは四つ持ち、免疫系の細胞に広く発現するペア型受容体ファミリーであり、細胞内ドメインの構造から活性化型、抑制型、分泌型の3種類に分類される。1997年以降、現在までに11種類の機能的LILRタンパク質が同定されており、疾患と発現量または遺伝子多型との関連が多数報告されているにも関わらず、その機能・構造・リガンド特異性については未だ不明な点が多い。本稿では特にリガンドとして主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子を認識する抑制性受容体 LILRB1 と LILRB2 に焦点を当て、LILR ファミリーの立体構造およびリガンドとの分子認識機構について、筆者らの研究成果を中心に最近の知見を概説する。

## 1. はじめに

生体防御の最前線において、細胞表面に数多く存在する受容体群とそのリガンドとの相互作用は、細胞の活性化を制御するシグナル伝達系の出発点である。細胞表面受容体はタンパク質や糖などの生体分子と特異的に、固有の親和性を持って相互作用することで個体の恒常性の維持に寄与している。そのため受容体下流のシグナルバランス異常は、多くの免疫系疾患（自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー、がんなど）の発症に関与している。また、細胞表面受容体は外界との接点にもなることから、自己由来のリガンドに限らず微生物やウイルス由来分子の受容体として利用される場合も少なくない。

受容体を介して細胞内へと伝達されたシグナルは、細胞機能を調節する転写活性制御へと収束していくが、細胞内

分子間相互作用は複数のシグナル伝達経路に属する分子群が複雑に絡み合っているために、ターゲットとなるシグナル伝達経路を特異的に人為制御することは大変困難である。一方、細胞表面受容体とリガンドとの相互作用はより特異的に、他のシグナル伝達経路に影響なく制御することが可能であると考えられる。そのために、細胞表面受容体とリガンドとの相互作用を構造的に解析し、阻害剤など免疫制御可能な低分子化合物の設計に必要な情報を抽出することで、より特異性が高く、副作用の少ない疾患の予防・治療薬を開発することができると期待される。

免疫細胞の表面には多様な受容体が存在するが、その中でも免疫グロブリン (Immunoglobulin; Ig) スーパーファミリーは、抗原受容体である T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR), B 細胞受容体 (B cell receptor; BCR) をはじめ、共刺激分子や接着分子として重要な機能を担っている。筆者らはその一員である Leukocyte Ig-like receptor (LILR/LIR) のリガンド認識機構に焦点を当て、立体構造解析および相互作用解析を行ってきた。本稿ではリガンドであるヒト主要組織適合性複合体 (Major histocompatibility complex; MHC) クラス I 分子 (MHCI) と LILRB1, LILRB2 を中心に、LILR ファミリーの立体構造解析および相互作用解析について筆者らの成果を踏まえながら概説する。

北海道大学薬学研究院生体分子機能学研究室 (〒060-0812 北海道札幌市北区北 12 条西 6 丁目)

Structures and molecular recognition for Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor family

Kimiko Kuroki and Katsumi Maenaka (Laboratory of Biomolecular Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-12, Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan)

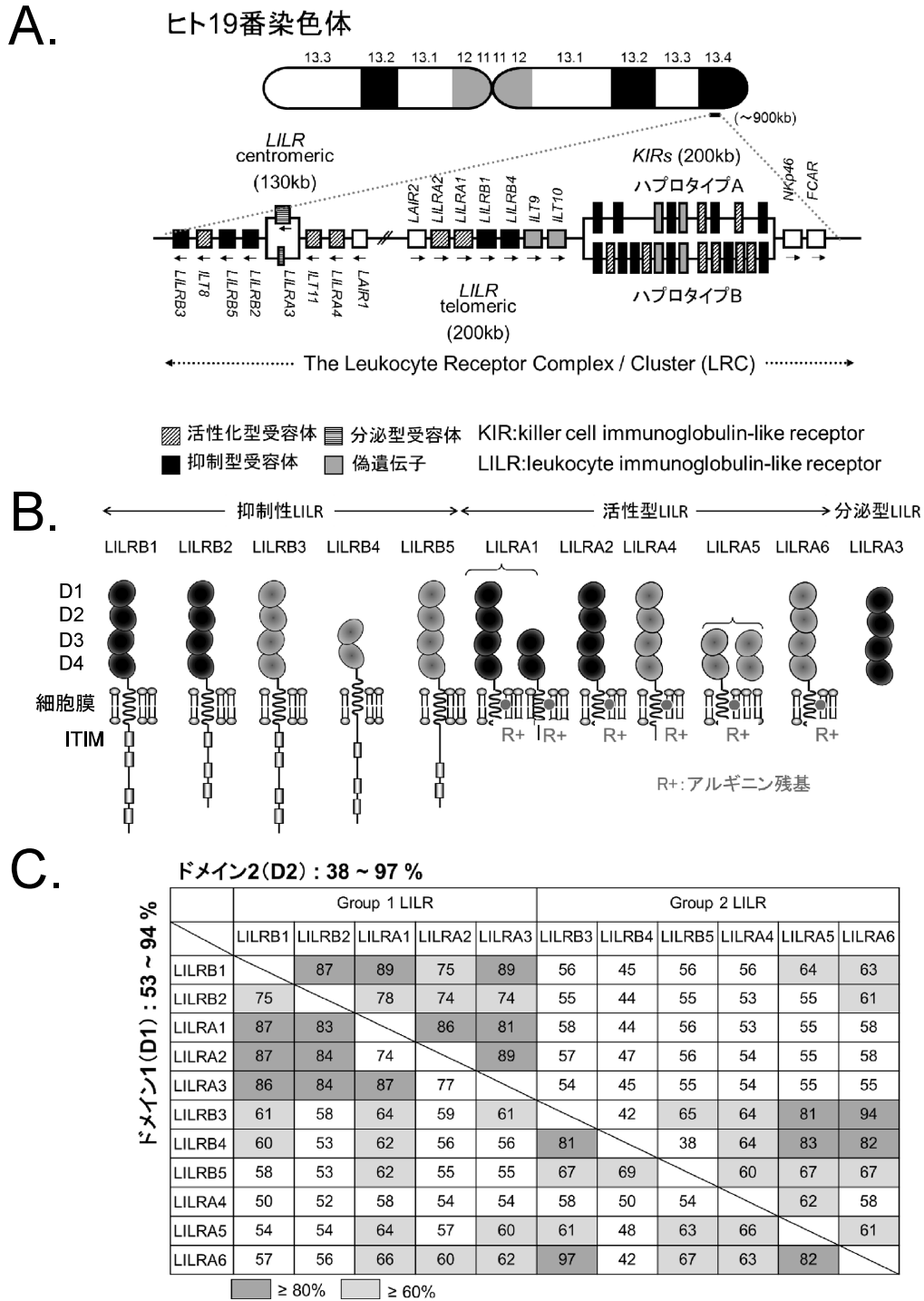


図1 LILR ファミリー

A. LILR ファミリーはヒト19番染色体上のLRC領域にLILR centromeric (130 kb)とLILR telomeric (200 kb) の二つのクラスターを形成して存在している。LILRA3のみ機能的タンパク質を発現しない欠損多型が存在する。

B. LILR ファミリーの分子構造。細胞外のIg様ドメインの配列相同性により、group 1 LILRを黒色で、group 2 LILRを灰色で示した。抑制性LILRは細胞内に2-4個のITIMを、活性型LILRは膜貫通ドメインにアルギニン残基(R+)を持つ。

C. LILR ファミリーのリガンド結合ドメインであるD1, D2の配列相同性(%)。CLUSTAL Wにより求めた。

## 2. LILR ファミリー

LILR は LIR, Ig-like transcript (ILT), Monocyte/Macrophage inhibitory receptor (MIR), CD85 とも呼ばれ, 1997 年以降複数のグループから主に骨髄系細胞 (単球/マクロファージ, 樹状細胞) に発現する Ig スーパーファミリー分子として同定された<sup>1-4)</sup>. 例外的に LILRB1 は, B 細胞や一部の T 細胞, Natural killer (NK) 細胞にも発現する. LILR 遺伝子は, ヒト染色体 19q13.4 上の Leukocyte receptor complex (LRC) 領域に多数の Ig 様免疫受容体群 (Killer cell Ig-like receptor; *KIR*, Leukocyte-associated Ig-like receptor; *LAIR*, *FcAR* など) とともに, 二つの偽遺伝子 (*LILRP1*, *LILRP2*) を含めた計 13 個の遺伝子として二つのクラスターを形成して存在している (図 1A)<sup>5)</sup>. *KIR* は NK 細胞や一部の T 細胞に発現し, MHC I を認識するが, 塩基配列レベルでの多型に加えて遺伝子座自体の有無による多型が存在する, 顕著に多型性の高い受容体である. *KIR* と LILR のアミノ酸配列の相同性は高く (~37%), 進化的に共通の祖先遺伝子から重複と分岐によってできたファミリーであると考えられるが, *KIR* に比べて *LILR* の多型性は低く, 遺伝子座欠損多型が存在するのは *LILRA3* のみである<sup>5,6)</sup>.

LILR は細胞外にリガンドを認識する 10 kDa 程度の Ig

様ドメインが 2 個 (D1, D2) または 4 個 (D1-D4) タンデムに並んでおり, 細胞内の構造から機能的に 3 種類に分類される (図 1B). LILRB1-5 は細胞内に 2-4 個の immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を持ち, Src-homology 2-containing tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) または Src-homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) を介して細胞内に抑制性のシグナルを伝達する抑制性受容体である. 一方, LILRA1, 2, 4-6 は細胞内ドメインが短く, 膜貫通ドメイン内の正電荷を持つアルギニン残基 (Arg) を介して, 細胞内ドメインに immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を持つアダプタータンパク質 Fcγ 鎖と会合し, 細胞内に活性化シグナルを伝達する活性化受容体である. LILRA3 は唯一膜貫通ドメインを欠損しているため分泌型として発現するが, その機能はまだ明らかになっていない.

LILR のリガンドについては未だ同定されていないものが多いものの, 一部は *KIR* と同様に MHC I を認識することが報告されている (表 1)<sup>1-3,7,8)</sup>. しかし, *KIR* が MHC I をアレル特異的に認識するのに比べて, LILRB1, LILRB2 はともに古典的・非古典的 MHC I を広範に認識する. MHC I を認識する LILRB1 とリガンド結合ドメインである N 末端側二つの Ig 様ドメイン (D1D2) のアミノ酸配列を比較することによって, 相同性の高い LILR を group 1

表 1 ヒト LILR ファミリー

タンパク質名					機 能 性	リガンド	発現細胞
LILR	LIR	ILT	MIR	CD85			
LILRB1	LIR1	ILT2	MIR7	CD85j	抑制性	HLA-A, B, C, E, F, UL18	単球, マクロファージ, 樹状細胞 B 細胞, 一部の T 細胞, NK 細胞
LILRB2	LIR2	ILT4	MIR10	CD85d	抑制性	HLA-A, B, C, E, F	単球, マクロファージ, 樹状細胞
LILRB3	LIR3	ILT5		CD85a	抑制性	不明	単球, マクロファージ, 樹状細胞 好中球, 好酸球
LILRB4	LIR5	ILT3		CD85k	抑制性	不明	単球, マクロファージ, 樹状細胞
LILRB5	LIR8			CD85c	抑制性	不明	単球, マクロファージ, 樹状細胞
LILRA1	LIR6			CD85i	活性型	HLA-B27, HLA-C fHC	単球, マクロファージ, 樹状細胞
LILRA2	LIR7	ILT1		CD85h	活性型	不明	単球, マクロファージ, 樹状細胞 好中球, 好酸球
LILRA4		ILT7		CD85g	活性型	BST2	単球, マクロファージ, 樹状細胞
LILRA5	LIR9	ILT11		CD85f	活性型	不明	単球, マクロファージ, 樹状細胞 好中球
LILRA6		ILT8			活性型	不明	単球, マクロファージ, 樹状細胞
LILRA3	LIR4	ILT6		CD85e	分泌型	HLA-C fHC	単球, マクロファージ, 樹状細胞
LILRP1		ILT9			偽遺伝子		
LILRP2		ILT10			偽遺伝子		

表2 LILR ファミリーと疾患との関連

疾 患	関 連	文献
関節リウマチ	細胞表面の発現量が低下する LILRB1 ハプロタイプが有意に増加 関節組織内で LILRB2, LILRB3, LILRA2 発現量増加, 治療後発現量低下	13) 37)
全身性エリテマトーデス	LILRA2 細胞外リンカー領域内 3 アミノ酸残基欠損多型 が有意に増加	14)
顕微鏡的多発血管炎	LILRA2 細胞外リンカー領域内 3 アミノ酸残基欠損多型 が有意に増加	14)
多発性硬化症	LILRA3 欠損が有意に増加	12)
シェーグレン症候群	LILRA3 欠損が有意に増加	38)
サイトメガロウイルス感染	発症前に LILRB1 発現量増加	39-42)
類結核型らい	LILRA2 発現量がらい腫型らいと異なる	40)
慢性リンパ性白血病	LILRB4 が通常発現しない B 細胞上に発現	41)

LILR, 低い LILR を group 2 LILR と分類することができる (図 1B, C)<sup>9)</sup>. group 1 LILR (LILRA1, A2, A3, B1, B2) は LILRB1 との相同性が 70% 以上と高く, リガンドとして MHC I または類似タンパク質を認識することが予想される. 一方, group 2 LILR (LILRA4, A5, A6, B3, B4, B5) は LILRB1 との相同性が 60% 以下と低く, MHC I 結合領域に相当する部分のアミノ酸配列が変化していることから, リガンドとして MHC I および MHC I 様タンパク質以外の分子を認識すると考えられる. 実際, group 2 LILR は MHC I に結合しないとの報告<sup>3,7,8,10)</sup>があるものの, 新規リガンドの同定は進まず, 近年 LILRA4 のリガンドが bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2)/CD317 であることが同定されたのみである<sup>11)</sup>.

LILR は疾患との関連が多数知られている MHC I をリガンドとすることから, 疾患との関連の有無が注目されてきた (表 2). LILR ファミリーの中で, 唯一遺伝子座欠損多型が存在する LILRA3 についてその欠損頻度と多発性硬化症<sup>12)</sup>など自己免疫疾患との関連や, LILRB1 の発現量に關与する多型と関節リウマチ<sup>13)</sup>, LILRA2 多型と全身性エリテマトーデス<sup>14)</sup>など主に免疫系疾患との遺伝学的関連が報告されている. また, LILRB4 の発現は, 抗原提示細胞が免疫寛容を獲得し, tolerogenic dendritic cell (DC) に分化する際に必須である<sup>15)</sup>. さらに興味深いことに, 可溶性の組換え LILRB4 タンパク質 (LILRB4-Fc) も膜型 LILRB4 と同様に免疫抑制機能を持ち, 実際にヒト化マウスにおいて移植片拒絶反応を抑制したとの報告もある<sup>16)</sup>. 現在までにリガンドが明らかになっている LILR 分子は LILRB1, B2, A1, A4 のみであり, 生体内での機能および疾患発症における機序を理解するためにも, 今後の解析が期待される.

### 3. Group 1 LILR

#### 3-1 Group 1 LILR とリガンド

group 1 LILR の中でも, 機能的・構造的に最も研究が進んでいるのは LILRB1, B2 である. これらはリガンドとして古典的 MHC I (HLA-A, -B, -C) および非古典的 MHC I (HLA-E, -F, -G) を広く認識する. MHC I は LILR 以外に TCR, KIR にも認識される分子であり, 構造的には三つの Ig 様ドメイン ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ドメイン) からなる MHC I 重鎖, 単一の Ig 様ドメインからなる軽鎖 ( $\beta 2m$ ), および 8-10 残基からなるペプチドのヘテロ三量体である (図 2). 重鎖の種類により MHC I のクラスが区別され, 細胞質内でプロセッシングを受けたペプチドを  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ドメインが形成するペプチド溝に乗せ, CD8 陽性 T 細胞に提示することによって自己・非自己認識に関わっている. 一方で, KIR や LILR は正常な自己細胞が発現する MHC I を認識することにより, 正常細胞に対する免疫細胞活性化の閾値を上げて攻撃を抑制している (図 3). 一部のウイルス感染細胞や腫瘍細胞は MHC I 発現量が低下するために抑制性受容体が結合できず, 免疫細胞活性化の閾値が下がるため免疫細胞が攻撃しやすくなり, 除去される (missing self 仮説). MHC I の多様性を生む多数の多型部位は MHC I 重鎖の  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ドメインに集積しているためにペプチド溝に多様性が生じ, 膨大な種類の自己・非自己由来のペプチドを提示できるようになっている.

TCR と KIR はともに, より多様性の高い  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ドメインおよびペプチドを認識する (図 2)<sup>17,18)</sup>. そのため, TCR は自己 MHC I に提示されたペプチドを認識して自己・非自己を判断することができ, KIR は MHC I アリル特異的に結合する特徴を示す. 一方, LILRB1 は後述する

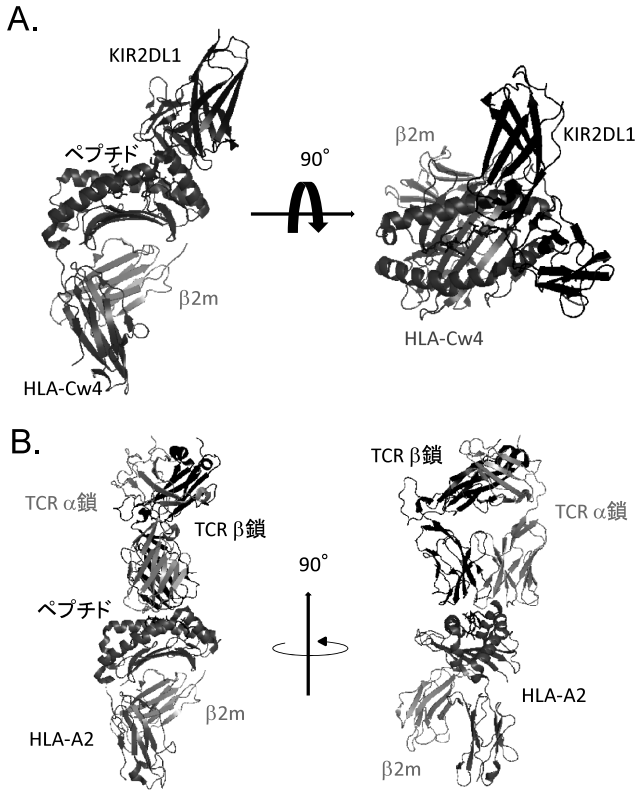


図2 MHC1とKIR2DL1およびTCRとの複合体の構造  
 MHC1は、HLA-Cw4重鎖を黒、β2mを灰色のリボンモデルで、ペプチドを黒のスティックモデルで示した。  
 A. HLA-Cw4/KIR2DL1複合体 (1IM9)の構造。KIR2DL1はHLA-Cw4のペプチドC末端とα1-α2ドメインからなるペプチド溝を認識する。この領域にKIR2DLのHLA-Cw4アレル特異性を決定する77N/Sおよび80K/N残基が存在する。  
 B. HLA-A2/TCR複合体 (2VLR)の構造。TCR α鎖を灰色、β鎖を黒で示した。TCRはHLA-A2のペプチド中央部およびペプチド溝を認識している。  
 本稿で示す立体構造はProtein Data Bank (PDB)に登録されており、分子名の後に括弧で登録番号を示した。

ように、N末端側のIg様ドメイン二つ (D1D2) を用いてMHC1のα3ドメインとβ2mを認識する。抑制性受容体LILRB1およびLILRB2は、多様性の低いα3ドメインを認識することによってMHC1を広範に認識し、正常な自己細胞に対する免疫を全般的に抑制していると考えられる。

LILRA1はHLA-B27との結合<sup>8)</sup>が、LILRA1およびLILRA3はHLA-Cのβ2m-free heavy chain (fHC) との結合が報告されているが<sup>19)</sup>、これらがLILRB1およびLILRB2と異なり、なぜMHC1アレル特異的なのかなど詳細な分子認識機構は不明である。報告されているMHC1関連リガンドとの詳細な機能、構造解析とともに、LILRB1はサイトメガロウイルスのMHC1様タンパク質UL18にも結合する<sup>1)</sup>ため、非自己リガンドが存在する可能性も含め、未同定リガンドの探索が今後検討されるべきである。

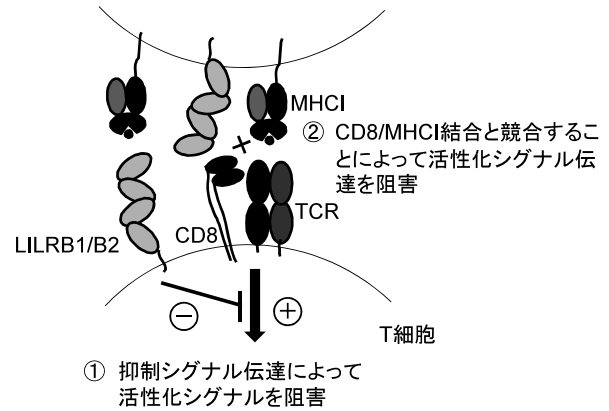


図3 LILRB1, LILRB2によるT細胞活性化抑制機構  
 LILRB1, LILRB2はMHC1とトランスに結合することによって、TCRを介するT細胞活性化シグナルを阻害する抑制性シグナルを伝達する (①)。さらに、シスにMHC1と結合することによってCD8がMHC1を認識するのを阻害し、正常な自己細胞に対してT細胞が活性化しないよう、恒常性を維持している (②)。

### 3-2 LILRB1, LILRB2の結晶構造解析

LILRB1はサイトメガロウイルスのMHC1様タンパク質UL18の受容体として1997年に同定された<sup>1,2)</sup>。UL18はヒトMHC1と細胞外領域で25%のアミノ酸配列相同性 (identity) を持ち、感染した宿主細胞上で、ヒトMHC1と同様にヒトβ2mと複合体を形成してペプチドを提示することができる。感染時、サイトメガロウイルスは宿主のMHC1発現量を低下させることでTCRを介した細胞傷害を逃れ、さらにNK細胞上の抑制性受容体LILRB1のリガンドとしてMHC1様分子UL18を発現し、NK細胞による細胞傷害も逃れている。

LILRB1は前述したように、細胞外に四つのIg様ドメインを持つが、LILRB1のドメイン欠損変異体を用いたUL18との結合実験でN末端のドメイン (D1) がUL18のα3ドメインを認識すると推測された<sup>20)</sup>ように、実際にリガンド認識に関与しているのはN末端側の二つのドメイン (D1D2) であるため、ChapmanらはLILRB1 (D1D2) について2000年に構造決定した<sup>21)</sup>。大腸菌でLILRB1 (D1D2) を封入体として大量発現し、変性剤による可溶性後に巻き戻しを行うことによって可溶性タンパク質として調製し、結晶化を行い、2.1 Åの分解能で構造決定した。その全体構造はKIR2DLに類似して、二つの逆平行βシートからなるIg様ドメイン二つが鋭角状に連なった構造を持つことがわかった (図4A)。二つのドメイン間はKIR2DLの場合と同様に主に疎水性相互作用により結合していた。LILRB1固有の特徴としては、KIR2DLではβ構造をとる部分に3<sub>10</sub>ヘリックス構造が散在している点と、二つのドメイン内にポリプロリンIIヘリックスが存在する点であった (図4A)。

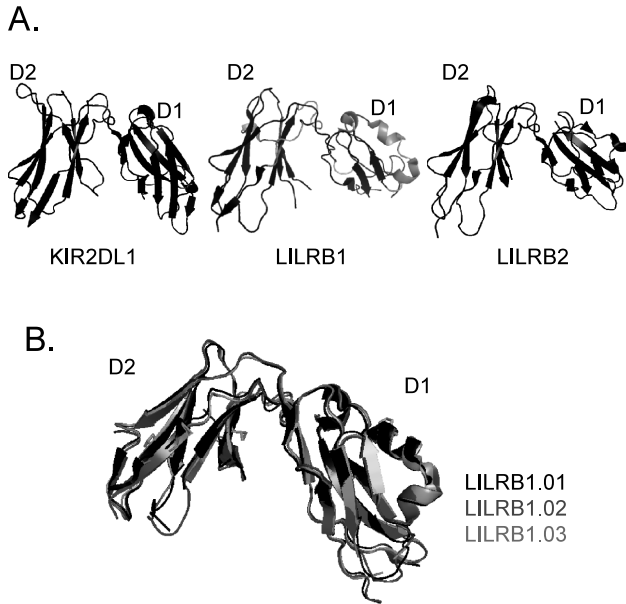


図4 LILRB1, LILRB2 単独の結晶構造

A. KIR2DL1(1NKR), LILRB1(1G0X), LILRB2(2GW5) の立体構造. LILRB1 の特徴的な<sub>3</sub><sub>10</sub>ヘリックスおよびポリプロリンIIヘリックスを灰色で示した. いずれも二つのIg様ドメインが鋭角に曲がった構造をとっていることがわかる.

B. 日本人における多型解析の結果明らかになった3種のハプロタイプ産物 LILRB1.01(1VDG), LILRB1.02(1UGN), LILRB1.03(1UFU) の構造比較. 全体構造に大きな変化は認められなかった.

筆者らは LILRB1 の機能の重要性に着目し、日本人を対象とした多型解析および自己免疫疾患との関連研究を行った。その結果、日本人において LILRB1 リガンド結合ドメインは4箇所のアミノ酸置換および2箇所の5'上流領域の塩基置換の組み合わせにより主に3種類 (LILRB1.01~LILRB1.03) であること、そのうち LILRB1.01 が関節リウマチ感受性に関与していることを明らかにした<sup>13)</sup>。アミノ酸置換によるリガンドとの結合能への影響を調べるために、3種類の LILRB1 多型産物の結晶構造解析および相互作用解析を行ったが、顕著な構造変化は認められず (図4B), MHC I との結合能にも差はなかった。結局 LILRB1.01 ハプロタイプでは発現量が有意に低下し、疾患発症に関与していることが明らかになったが、リガンド結合ドメイン内にアミノ酸置換を伴う多型が保存されているにも関わらず、構造および機能に差異が認められなかったことは、LILRB1 の免疫系における機能の重要性を反映していると考えられる。一方で、感染微生物リガンドの抑制性受容体として利用されないよう、感染症との関連で MHC I 結合領域外に多型が保存されている可能性も示唆される。

LILRB1 (D1D2) 単独の結晶構造解析の結果、LILRB1 は KIR2DL とアミノ酸配列だけではなく、全体構造も似ていることが明らかになった。しかし、LILRB1 と KIR2DL の MHC クラス I 上の結合領域は異なり、リガン

ド特異性も KIR2DL がアレル特異的であるのに対して、LILRB1 は広範な MHC I およびウイルスタンパク質 UL18 も認識する。その認識機構の違いは2003年に Willcox らが HLA-A2 と LILRB1 の複合体の結晶構造を 3.4 Å の分解能で決定し、詳細が明らかになった<sup>9)</sup>。Willcox らは HIV pol 由来のペプチド (ILKEPVHGV) を提示した HLA-A\*0201 と LILRB1 の組換えタンパク質をそれぞれ大腸菌の封入体の巻き戻し法によって調製し、精製後にモル比 1:1 (14.5 mg/ml) で混合することで複合体の結晶を得た。その結果、LILRB1 の D1-D2 ドメイン間ヒンジ領域と β2m (site 1) が、LILRB1 の D1 と HLA-A2 の α3 ドメイン (site 2) が相互作用していることが明らかになり (図5A), LILRB1 は MHC I の多型性の低い領域である α3 ドメインと全ての MHC I および UL18 に共通の β2m を認識することによって、広範な MHC I に結合することがわかった。

UL18 は MHC I と比べて高度に糖鎖修飾される分子であり、これまで構造解析が困難であったため、LILRB1 のドメイン欠損変異体を用いた UL18 との結合実験が行われ、LILRB1 は N 末端のドメイン (D1) を用いて UL18 の α3 ドメインを認識すると推測されていた<sup>20)</sup>。2008年に Yang らは N 型糖鎖付加可能な13箇所のうち3箇所を改変した UL18 を昆虫細胞の発現系で調製することによって糖鎖修飾を限定し、LILRB1/UL18 複合体の結晶構造を 2.2 Å の分解能で決定した<sup>22)</sup>。全体構造は LILRB1/HLA-A2 複合体および後述する LILRB2/HLA-G 複合体の構造に似ており、LILRB1 は UL18 の α3 ドメインおよび β2m の2箇所で相互作用していた (図5B)。実際に LILRB1 と相互作用しているアミノ酸残基を MHC I の場合と比較すると、α3 ドメイン内の残基が異なっており (図5C), LILRB1 との結合が解離定数 ( $K_d$ ) で nM オーダーと MHC I の μM オーダーに比べて非常に強く結合する親和性の違いを反映していると考えられた。一方で、LILRB1 に結合しない MHC I 様タンパク質 neonatal Fc receptor (FcRn), HFE, Zn-α2-glycoprotein (ZAG) の α3 ドメインのアミノ酸配列の保存性は低い (図5C)。さらに、UL18 の計13箇所の N 型糖鎖修飾部位にモデルで糖鎖を付加させたところ、10箇所の修飾部位が集積する α1-α2 ドメインは糖鎖で全体が覆われるために KIR や TCR は結合できないこと、α3 ドメインにおいても CD8 結合領域が部分的に糖鎖で覆われることにより CD8 が結合できないことが予想された。結果的に、UL18 は抑制性受容体 LILRB1 にも強く結合し、他の受容体との結合能を糖鎖修飾により失うことで、より効果的に感染細胞に対する免疫を抑制していると予想された。

LILRB2 は LILRB1 ファミリーの中で最も LILRB1 との相同性の高い抑制性受容体 (細胞外領域のアミノ酸 identity 82%) で、LILRB1 同様に MHC I を広く認識するが、UL18

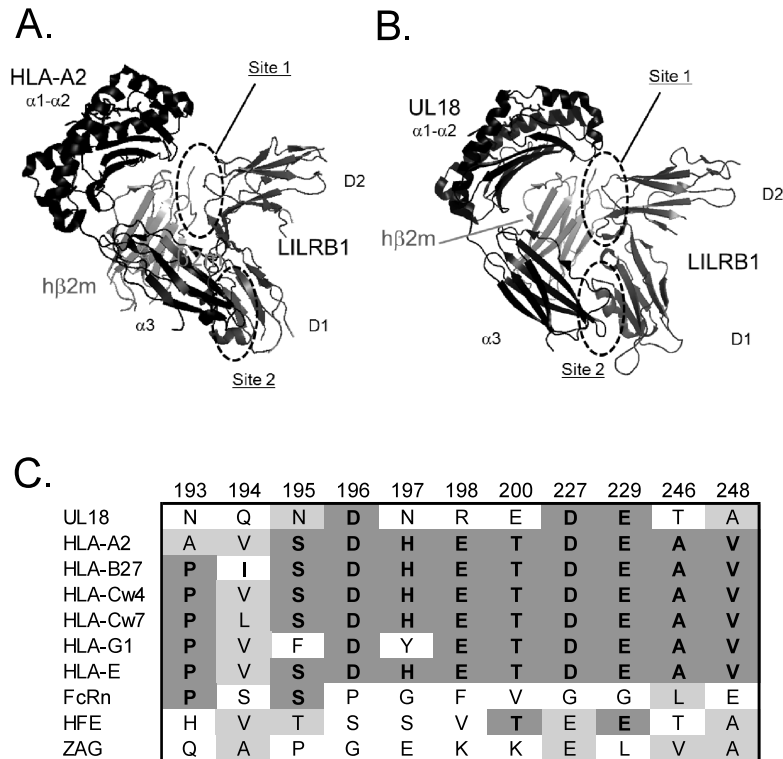


図5 LILRB1とリガンドとの複合体の構造

A. LILRB1とHLA-A2の複合体(1P7Q). 2箇所( Site 1, Site 2)の相互作用面のうち、LILRB1ドメイン間のヒンジ領域とhβ2mとの接触面をsite 1, LILRB1D1とα3ドメインとの接触面をsite 2とする。

B. LILRB1とUL18の複合体(3D2U). LILRB1/MHCI複合体と同様にSite 1, 2の2箇所( Site 1, Site 2)で相互作用している。

C. MHCI, UL18-LILRB1, B2相互作用部位のアミノ酸配列比較. コンセンサス配列を太字で, 保存性残基を灰色で示した. HLA-A2のアミノ酸残基番号を上部に示した。

との親和性はLILRB1に比べて1,000倍程度弱い。LILRB1が骨髄系細胞以外にもB細胞や一部のT細胞, NK細胞でも発現するのに対して, LILRB2は骨髄系細胞に限定して発現する。LILRB2のリガンド結合ドメイン(D1D2)単独の結晶構造は2002年に1.8Åの分解能で決定された(図4A)<sup>23)</sup>。LILRB1の単独構造と比較すると, 全体構造は非常に類似しており, βシートからなる二つのIg様ドメインが鋭角に曲がった形をとっていた。また, 筆者らが2006年に明らかにしたHLA-GとLILRB2の複合体の結晶構造もLILRB1/HLA-A2の複合体の構造と全体像が類似しており, LILRB2はLILRB1と同様に, LILRB2D1とα3ドメイン, LILRB2ドメイン間のヒンジ領域とβ2mが相互作用していた(図6A)<sup>24)</sup>。

### 3-3 LILRB1, LILRB2とMHCIの相互作用解析

LILRB1, B2は共にMHCIを広く認識し, 抑制性シグナルを伝達するが, そのリガンド親和性に差はないのだろうか。また, T細胞の活性化に重要なCD8も同じくMHCI

のα3ドメインを認識するが, LILRBとの結合は競合するのだろうか。

筆者らは組換えタンパク質を用いてLILRB1およびCD8とMHCI間の相互作用をBIAcoreを用いた表面プラズモン共鳴法により詳細に解析した<sup>25)</sup>。まずLILRB(D1D2)およびMHCIの組換えタンパク質を大腸菌で封入体として大量発現させ, 変性剤により可溶化後, 希釈法による巻き戻しを行ってゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。BIAcoreを用いた実験は, センサーチップ上にMHCIを固定化し, アナライトとしてLILRB溶液を流すことで得られたレスポンスを解析し解離定数( $K_d$ )を求めた。MHCIはC末端にビオチン化タグを付加することにより*in vitro*でビオチン修飾し, ストレプトアビジンを直接固定化したチップ表面に固定化した。ビオチン-ストレプトアビジンを介してMHCIを固定化することにより, チップ表面でLILRB1結合領域が隠されることなく, 細胞表面の分子配向を再現させることができた。MHCIタンパク質を網羅的に解析した結果, LILRB1, B2はともにMHCIと

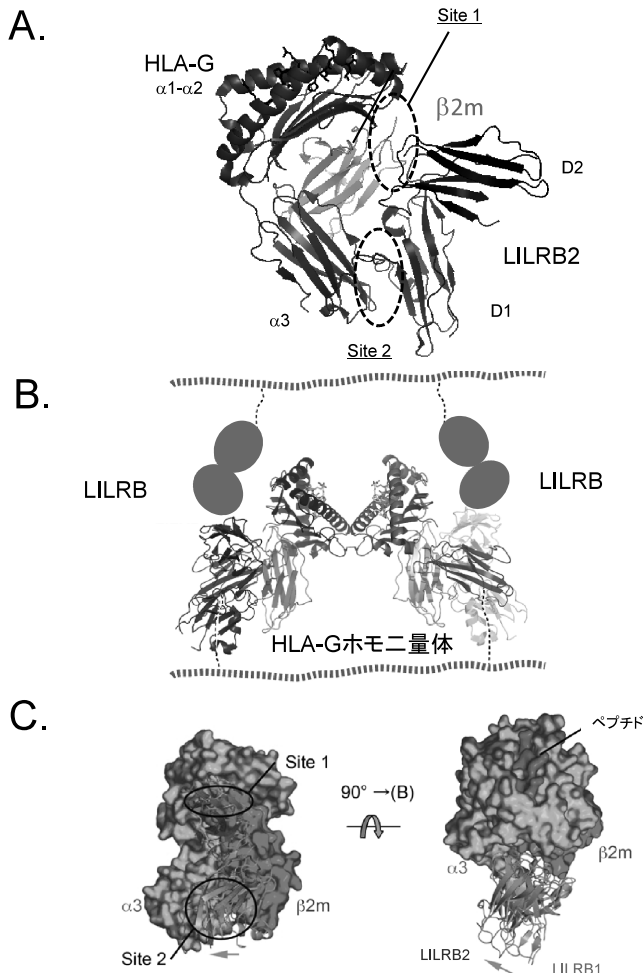


図6 LILRB2とリガンドとの複合体の構造

A. LILRB2とHLA-Gの複合体(2DYP)。2箇所の相互作用面のうち、LILRB2ドメイン間のヒンジ領域と $\beta 2m$ との接触面をsite 1、LILRB2D1と $\alpha 3$ ドメインとの接触面をsite 2とする。

B. LILRB1, B2はHLA-Gホモ二量体1分子に対して2分子結合する。LILRBのD1D2はリボンモデルで、D3D4は円で示した。

C. HLA-A2/LILRB1(1P7Q)とHLA-G/LILRB2(2DYP)の重ね合わせ。LILRB1に比べ、LILRB2はMHCの $\alpha 3$ ドメインに寄り結合している。MHCを分子表面モデル、LILRBをリボンモデルで示した。

$K_d$ 値が $10^{-5} \sim 10^{-6}$  Mオーダーの親和性であり、一般的な免疫細胞表面受容体の親和性の範囲内であることがわかった。また、LILRB1の方が全体的に高い親和性を示した。MHC間で比較すると、LILRB1, B2ともに非古典的MHCクラスIであるHLA-Gに特に高い親和性を示した(LILRB1:  $K_d = 2.0 \mu M$ , LILRB2:  $K_d = 4.8 \mu M$ )。HLA-Gは、ヒトの胎盤や一部の腫瘍細胞で局所的に発現する特徴的なMHCである。胎盤では母体免疫を逃れ妊娠を成立させるため、また腫瘍細胞では免疫細胞からの攻撃を逃れ増殖するために、HLA-Gが免疫抑制に寄与している。最近では制御性T細胞に特異的に発現することが報告さ

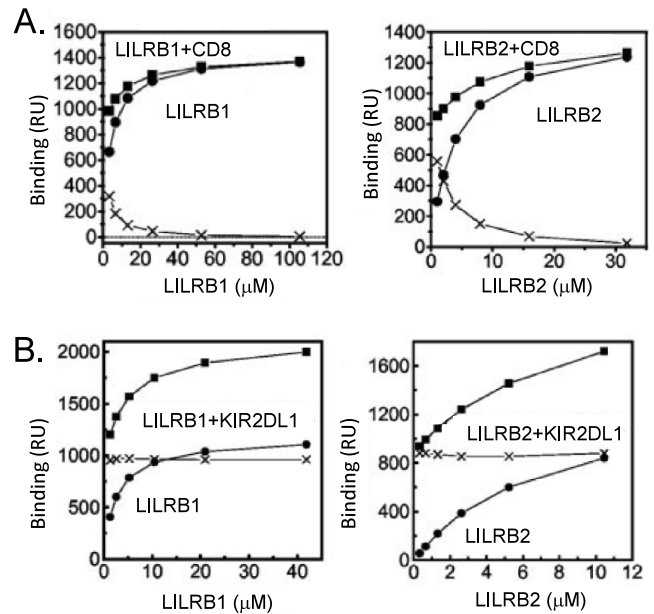


図7 LILRB-MHCI相互作用におけるCD8とKIR2DL1の競合性

A. LILRB1(左)およびLILRB2(右)の単独(●), CD8(92  $\mu M$ )と混合時(■)の結合レスポンス, CD8存在時, 非存在時の差を求めプロットした(×). LILRB濃度に依存してCD8の結合量(×)が減少している。

B. LILRB1(左)およびLILRB2(右)の単独(●), KIR2DL1(38  $\mu M$ )と混合時(■)の結合レスポンス, CD8存在時, 非存在時の差を求めプロットした(×). LILRB存在によりCD8の結合量(×)は変化していない。

れ<sup>26)</sup>, LILRBなどの抑制性受容体を介した免疫抑制機構が注目されている。LILRBとHLA-Gの認識機構に関しては、これまでの筆者らの研究から明らかになった点について後述する。

次に、T細胞活性化に重要なCD8とLILRBとの競合についてもBIAcoreを用いて解析を行った<sup>25)</sup>。CD8はHLA-Gと $K_d = 72 \mu M$ の親和性で結合する。そのため、十分量のCD8(92  $\mu M$ )存在下, 非存在下においてLILRB1, LILRB2のHLA-Gへの結合実験を行い, CD8のHLA-Gへの結合がLILRBの存在によって変化するか調べた。その結果, 図7に示すようにHLA-GへのCD8の結合量はLILRB1, B2ともに濃度依存的に減少していた。つまり, CD8とLILRB1, B2はともにHLA-Gへの結合に競合的であることがわかった。同様の結果はHLA-B35, HLA-Cw4に対しても得られた。一方HLA-Cw4の $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ドメインおよびペプチドを認識するKIR2DL1とHLA-Cw4で行ったところ, LILRB1, B2ともに競合しなかった(図7)。

以上の結果より, LILRB1, B2はT細胞活性化を抑制する際に, 細胞内のITIMを介して抑制性シグナルを伝達すると同時に, CD8がMHCに結合するのを物理的に競合することで, T細胞活性化シグナル伝達の始動を制御している可能性(図3)が示唆された。この二重の抑制機構は



表3 免疫細胞受容体とリガンドとの熱力学パラメーター

アナライト	リガンド	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$-\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta C_p$ (kcal/mol · K)
LILRB1	HLA-G1	- 7.5	1.9	- 9.4	-0.22
LILRB1	HLA-B35	- 6.6	0.6	- 7.2	-0.10
LILRB1	HLA-Cw4	- 6.8	- 0.2	- 6.6	-0.16
KIR2DL3	HLA-Cw7/DS11	- 7.2	- 4.1	- 3.1	-0.1
NKG2D	RaeI	- 8.6	- 5.2	- 3.4	
NKG2D	H60	-10.5	-23.6	13.1	
PILR $\alpha$	CD99	- 7.7	-16.6	8.9	-0.44
CD22	CD45	- 5.1	-10.1	5.0	-0.08
Fc $\gamma$ RIIa, IIb	hFc1	- 7.9~-8.3	- 4.4~-6.4	- 1.9~-3.3	-0.22~-0.43
Fc $\gamma$ RIII	hFc1	- 8.0	-15.4	7.4	-0.7
TCR	MHC/peptide	- 7.1	-14.6	7.1	-0.62
E-selectin	ESL-1	- 5.7	- 0.9	- 4.8	

$\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $-\Delta S$ ,  $\Delta C_p$  はそれぞれギブスエネルギー変化, エンタルピー変化, エントロピー変化, 比熱の変化を示す. これらの解析は非線形ファントホッフの式による.

LILRB のマウスホモログである PIR-B と CD8 で *in vivo* でも認められることがわかり<sup>27)</sup>, 恒常的に免疫細胞が自己細胞を攻撃しないように活性化の閾値を上げるのに重要であると考えられる.

また筆者らは LILRB のリガンド認識機構についてさらに詳細に調べるために, LILRB1-MHC クラス I 間の相互作用の熱力学および速度論的特徴を解析した<sup>28)</sup>. BIAcore および等温滴定カロリメトリー (isothermal titration calorimetry; ITC) を用いた熱力学的解析の結果, 結合エンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) がほぼゼロに近い, つまりギブスエネルギー変化 ( $\Delta G$ ) のほとんどが, 好ましい方向へのエントロピー変化 ( $\Delta S$ ) に由来するエントロピー駆動型の相互作用であることがわかった (表 3). また, 比熱 ( $\Delta C_p$ ) の変化が  $-0.10 \sim -0.22 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  と小さく, 結合時に大きな構造変化がないことが示唆された (表 3). 現在までに解析されている免疫細胞表面受容体とリガンドとの相互作用のうち, TCR/MHC 相互作用は多くがエンタルピー駆動型, KIR や NKG2D, Fc 受容体の相互作用はエンタルピー・エントロピー駆動型であり, 完全なエントロピー駆動型の相互作用は LILRB1/MHCI が初めての例であった. 速度論的には, 免疫系受容体の中でも特に速い結合・解離速度 ( $k_a = 5.0 \sim 9.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_d = 2.1 \sim 5.0 \text{ s}^{-1}$ ) を持ち, MHC1 分子上の結合領域が競合する CD8 ( $k_a \geq 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_d \geq 18 \text{ s}^{-1}$ ) よりも結合速度が速く, 解離速度が遅いことがわかった. つまり, LILRB1 は CD8 の MHC1 への結合を速度論的に優勢に阻害することによって, 不必要な T 細胞活性化が起こらないよう活性化の閾値をより効果的に上げていることが示唆された.

このようにエンタルピー損失や比熱の変化が小さく, 非常に結合・解離速度が速い相互作用は典型的な rigid body (剛体) モデルの特徴であるが, 筆者らが NMR を用いて MHC1 結合時の LILRB1 側の構造変化を観察したところ,

直接 MHC1 と相互作用する領域以外にも, ドメイン間のヒンジ領域にコンフォメーション変化が起こっていることを示唆する heteronuclear single quantum coherence (HSQC) スペクトル変化が得られた<sup>28)</sup>. この点からも, LILRB1/MHC1 相互作用は induced-fit 様結合である TCR/MHC1 と異なる複合体形成モデルであることが示唆された. 今後, 複合体形成時の熱力学的, 速度論学的パラメータモデルを構築することが創薬デザインなど人為的なタンパク質間相互作用の制御に必要であり, これには実際の実験データの蓄積が進むことが期待される.

### 3-4 LILRB1 と LILRB2 のリガンド認識機構の違い

LILRB1 と LILRB2 は上述したようにリガンド認識ドメインの配列相同性が高く (81%), ともにリガンド MHC1 の  $\alpha 3$  ドメインと  $\beta 2m$  を認識しているが, MHC1 との結合親和性は全体的に LILRB1 の方が強く, 中でも MHC1 様タンパク質 UL18 との親和力は 1,000 倍以上の差がある (LILRB1 :  $K_d = \sim 2 \text{ nM}$ , LILRB2 :  $K_d = \sim 14 \mu\text{M}$ )<sup>21)</sup>. また興味深いことに,  $\beta 2m$  を欠いた HLA-B27 fHC は LILRB1 には結合せず, LILRB2 および LILRA1 には結合するという結果が LILR 発現細胞を用いた HLA-B27 fHC テトラマー染色実験により報告された<sup>8)</sup>. HLA-B27 は通常为重鎖/ペプチド/ $\beta 2m$  ヘテロ三量体としてのみならず, 異常型の  $\beta 2m$  欠損型重鎖ホモ二量体としても発現し, その存在が強直性脊椎炎など一部のリュウマチ性自己免疫疾患の原因である可能性が示唆されている. さらに, 近年細胞表面には通常ヘテロ三量体を形成した MHC1 に加えて,  $\beta 2m$  およびペプチドと会合していないフリーの MHC1 重鎖 (fHC) が存在することが明らかになってきた. これらは, 特に活性化した細胞表面で fHC 同士ホモ二量体または多数の他の受容体 (CD8, TCR/CD3, MHC1, MHCII, IL15R, インスリン受容体など) とヘテロ二量体を形成し

やすい<sup>29)</sup>。これらのホモ/ヘテロ二量体形成により受容体を介するシグナル伝達や細胞内への受容体の取り込みが調節されていると予想されており、MHC I 分子の新たな機能として注目される。MHC I fHC に対する受容体は現在 LILRB2, LILRA1 以外に報告されておらず、これらの受容体がどの形態の MHC I fHC を認識するのか、他の LILR が MHC I ヘテロ二量体と結合するのか、など今後の解析が重要である。

筆者らは LILRB1 と LILRB2 のリガンド認識特異性を明らかにするために、LILRB2/HLA-G 複合体の結晶構造解析を行い、Willcox らの LILRB1/HLA-A2 の構造と比較した<sup>24)</sup>。前述したように、LILRB1/HLA-A2 (図 5A) と LILRB2/HLA-G (図 6A) の全体構造は似通っており、site 1 および site 2 の 2 箇所 で相互作用していた。しかし、LILRB1/HLA-A2 複合体に比べ、LILRB2 は HLA-G の  $\alpha 3$  ドメインをより強く認識していた。このことは、HLA-G が他の MHC I に比べて LILRB1/B2 相互作用部位の疎水性領域が広い特徴を持つためであり、MHC I の中で LILRB1/B2 が HLA-G を最も強く認識することと一致していた。

次に LILRB1/HLA-A2 および LILRB2/HLA-G 複合体の相互作用領域をさらに詳細に比較すると、 $\alpha 3$  ドメイン、 $\beta 2m$  両方の認識機構に異なる点が見出された。図 6C に示すように、MHC I に対する LILRB の位置を比較すると、全体的に LILRB2 は LILRB1 に比べてより  $\alpha 3$  ドメイン側に結合しているのがわかる<sup>20)</sup>。実際に相互作用面積を比較すると、LILRB2 は HLA-G  $\alpha 3$  ドメインと  $460 \text{ \AA}$ 、 $\beta 2m$  と  $610 \text{ \AA}$  で、LILRB1 は HLA-A2  $\alpha 3$  ドメインと  $280 \text{ \AA}$ 、 $\beta 2m$  と  $570 \text{ \AA}$  で相互作用する。つまり、LILRB2 は LILRB1 よりもより  $\alpha 3$  ドメイン優位に、LILRB1 はより  $\beta 2m$  依存的に MHC I と結合していることがわかる。筆者らはさらに、同一の MHC I タンパク質として LILRB1, B2 と HLA-Cw7 との結合に  $\beta 2m$  依存性の傾向が認められるか、NMR 法により解析した。<sup>15</sup>N ラベル  $\beta 2m$  を調製し、非標識 MHC I 重鎖およびペプチドと巻き戻すことによって、 $\beta 2m$  上の LILRB1 または LILRB2 との相互作用部位を <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定により検出したところ、結晶構造で得られた結果と同様に、LILRB1 の方が LILRB2 に比べてより広い領域で  $\beta 2m$  と相互作用していることがわかった。以上の結果から、LILRB2 は  $\beta 2m$  を失っても  $\alpha 3$  ドメインを介して MHC I fHC に結合できるが、LILRB1 は  $\beta 2m$  がないと MHC I fHC との結合を維持できないと考えられる。前述したように、近年 MHC I fHC の機能の重要性が注目されており、LILRB2 との認識機構および実際のシグナル伝達の解明が期待される。

HLA-G は他の MHC I にはないフリーのシステイン残基 (Cys42) を持っており、生体内でジスルフィド結合を介したホモ二量体を形成することが知られている。筆者らは

ホモ二量体の立体構造と同時に、単量体に比べてホモ二量体は 100 倍程度強いシグナル抑制能を持つことを明らかにした<sup>30)</sup>。また、HLA-G/LILRB2 の複合体の結晶構造より、ホモ二量体形成によって LILRB2 の結合領域は隠れることなく、HLA-G ホモ二量体 1 分子に対して図 6B のように LILRB2 は 2 分子結合することが示唆された。このことから、HLA-G はホモ二量体形成により LILRB2 または LILRB1 を効果的にリクルートし、細胞内の抑制シグナルをより強固なものにしていると考えられた。

### 3-5 LILRA2

LILRA2 は group 1 に属する活性型 LILR で、LILRB1, B2 と配列相同性 80% であるが、リガンドは未だ不明である。group 1 に属することから、MHC I または MHC I 様分子を認識すると予想されるが、ヒト MICA (MHC I-related chain A), MICB との結合は確認されず、非自己リガンドの可能性も示唆されている。Chen らは LILRA2 単独の結晶構造を  $2.6 \text{ \AA}$  の分解能で明らかにし、MHC I を認識しない理由について構造的に考察した<sup>31)</sup>。LILRB1/HLA-A2 および LILRB2/HLA-G 複合体の立体構造に LILRA2 (D1D2) の構造を重ねると、全体の配列相同性が高いにも関わらず、相互作用領域のアミノ酸残基は異なっている部分が多く、局所構造を変化させることで MHC I との親和性を下げていることがわかった。しかし、LILRA2 は LILRB1, B2 と異なりドメイン交換型のホモ二量体として構造が解かれており、今後リガンドの同定とともに生体内でのタンパク質の性質と機能についてさらなる検討が必要である。

## 4. Group 2 LILR

group 2 LILR は LILRB1 との配列相同性が低く、リガンドについては長い間不明であったが、最近活性型 LILRA4 のリガンドとして BST2/tetherin/CD317 が同定された<sup>11)</sup>。BST2 は IFN 誘導性 II 型膜タンパク質で、HIV などレトロウイルス粒子の感染細胞からの遊離を阻害する。HIV は Vpu タンパク質により BST2 の機能を阻害し、効率的にウイルス粒子を放出するため、阻害剤開発におけるターゲットとして BST2 が注目されている。一方、LILRA4 は形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell; pDC) に特徴的な活性型受容体であり、IFN 誘導により発現する BST2 を認識することで Toll like receptor (TLR) シグナルによって活性化された pDC の IFN 過剰産生を抑える機能を持つと考えられている。ウイルス感染のみならず、I 型 IFN との関連が示唆される全身性エリテマトーデスや乾癬における機能も予想され、今後のリガンドとの詳細な相互作用解析および立体構造解析が注目される。

構造解析においては、group 2 LILR の中で唯一 LILRA5 の構造が決定されている。LILRA5 は、膜型の受容体とし

だけでなく、分泌型としても発現する。細胞外には二つの Ig 様ドメインを持ち、主に単球上に発現して活性化シグナルを伝達して炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6) 産生に関与している<sup>32</sup>。分類上は group 2 LILR に属し、LILRB1, B2 と HLA クラス I 認識領域の配列保存性は低い。LILRA5 のリガンドは未だ同定されていないが、筆者らは LILRA5 細胞外ドメイン単独の結晶構造解析を行った。細胞外ドメイン (1~196 残基) を大腸菌の封入体として発現させ、巻き戻すことにより可溶性タンパク質として調製し、分解能 1.85 Å で構造決定した<sup>33</sup>。その結果、全体像は group 1 の LILRB1, B2 および KIR2DL2, KIR2DL3, NKp46 とドメイン間の角度も含め類似していた。一方 group 1 LILR の MHC I 結合領域に相当する部分を比較すると、LILRA5 は LILRB1 および LILRB2 と異なる構造をとっていることがわかった。具体的には、MHC I の  $\alpha 3$  ドメインと直接結合する D1 内の 3<sub>10</sub> ヘリックス構造が LILRA5 では  $\beta$  シートに変化していた。また、D1D2 表面の電荷の分布が LILRB1 や KIR とは異なっており、MHC I 以外のリガンドの存在を示唆していた。

### 5. 構造解析のための受容体タンパク質調製法

細胞表面受容体は本来糖鎖修飾されるものやジスルフィド結合を有するものが多いため、構造解析に適した濃度、純度、および安定性を維持した組換えタンパク質の調製が困難なものが多い。今回紹介した LILR ファミリーの一部と MHC I タンパク質については、大腸菌で封入体として大量発現させた後に巻き戻すことが可能で、さらに LILR/MHC I 相互作用においてそれぞれの糖鎖修飾が必須ではない。しかし、同じ LILR ファミリーの中でも、大腸菌では発現しないものや封入体として発現はするが、巻き戻らないものも存在する。また、リガンドとの相互作用やタンパク質の安定性に糖鎖修飾が必須なものも存在する。そのため筆者らの研究室では、前述した大腸菌を用いた発現系のほかに、目的に応じて複数の発現系を使い分けているので、本稿で紹介したい。

まず、哺乳類培養細胞の発現系として、HEK293S GnTI 欠損株を用いる方法がある。N-アセチルグルコサミン転移酵素 I (GnTI) は、N 型糖鎖修飾経路において複合型糖鎖生成に必要な酵素である。GnTI 欠損株においては複合型糖鎖が生成されないために、高マンノース型糖鎖で糖鎖生成が止まる。この株を用いて発現させたタンパク質は均一な高マンノース型の糖鎖修飾 (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) を受けており、糖鎖が構造安定化に必須なタンパク質の調製および構造解析における結晶のパッキングに適している。また、分泌シグナル配列および His タグ配列を付加することで、目的の組換えタンパク質精製の簡便化も確立した。実際に筆者らは麻疹ウイルスヘマグルチニンタンパク質 (MV-H)

単独<sup>34</sup>および signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) との複合体<sup>35</sup>の結晶構造解析に成功した。

また、筆者らの研究室ではカイコ個体を用いた発現系も確立している。カイコの高いタンパク質合成能を利用した系で、こちらも単純な糖鎖修飾が可能であることと、培養細胞に比べ手技が簡便であるという利点がある。さらに筆者らは、大腸菌を用いて作成した組換え DNA (BmNPV バクミド DNA) をカイコ個体に直接接種することにより体液中への機能的なタンパク質の大量発現を可能とした<sup>36</sup>。また、糖鎖修飾もパウチマンノース型の 2 種類に限られており<sup>36</sup>、今後構造解析への応用も期待される。

### 6. おわりに

以上のように、LILR ファミリーの構造解析および機能解析は、リガンドがわかっている LILRB1, LILRB2 中心に行われており、他の LILR については未だ不明な点が多い。また、既知リガンドである MHC I についても、近年通常の MHC I 重鎖/ $\beta 2m$ /ペプチドヘテロ三量体以外に多様な形態を持つことが明らかになり、それぞれの分子形態の MHC I と LILR の相互作用機構の解析も詳細に検討する必要がある。今後、未同定リガンドの探索とともに、LILR ファミリーの機能解析を進めることで、免疫系のシグナル制御機構の解明につながることを期待される。また、ペア型受容体のもう一つの側面である感染微生物のリガンドのターゲットとしての解析が進めば、より疾患の分子機構が明らかになり、創薬へとつながることが期待される。

### 謝辞

本稿で紹介した仕事のうち、多くの仕事は九州大学生体防御医学研究所所属中に白石充典氏 (現九州大学大学院薬学研究院) を中心とした研究室の方々および共同研究者の方々と共に行われたものであり、心から感謝の意を申し上げます。

### 文 献

- 1) Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., & Hsu, M.L. (1997) *Immunity*, 7, 273-282.
- 2) Colonna, M., Navarro, F., Bellón, T., Llano, M., García, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., & López-Botet, M. (1997) *J. Exp. Med.*, 186, 1809-1818.
- 3) Borges, L., Hsu, M.L., Fanger, N., Kubin, M., & Cosman, D. (1997) *J. Immunol.*, 159, 5192-5196.
- 4) Samaridis, J. & Colonna, M. (1997) *Eur. J. Immunol.*, 27, 660-665.
- 5) Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., & Trowsdale, J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4778-4783.
- 6) Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Beck, S., Trowsdale, J., &

- Wilson, M.J. (2000) *Eur. J. Immunol.*, **30**, 3655–3662.
- 7) Colonna, M., Samaridis, J., Cella, M., Angman, L., Allen, R.L., O'Callaghan, C.A., Dunbar, R., Ogg, G.S., Cerundolo, V., & Rolink, A. (1998) *J. Immunol.*, **160**, 3096–3100.
  - 8) Allen, R.L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J., & Wilson, M. J. (2001) *J. Immunol.*, **167**, 5543–5547.
  - 9) Willcox, B.E., Thomas, L.M., & Bjorkman, P.J. (2003) *Nat. Immunol.*, **4**, 913–919.
  - 10) Cella, M., Döhning, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., & Colonna, M. (1997) *J. Exp. Med.*, **185**, 1743–1751.
  - 11) Cao, W., Rosen, D.B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L.L., & Liu, Y.J. (2006) *J. Exp. Med.*, **203**, 1399–1405.
  - 12) Koch, S., Goedde, R., Nigmatova, V., Epplen, J.T., Müller, N., de Seze, J., Vermersch, P., Momot, T., Schmidt, R.E., & Witte, T. (2005) *Genes Immun.*, **6**, 445–447.
  - 13) Kuroki, K., Tsuchiya, N., Shiroishi, M., Rasubala, L., Yamashita, Y., Matsuta, K., Fukazawa, T., Kusaoi, M., Murakami, Y., Takiguchi, M., Juji, T., Hashimoto, H., Kohda, D., Maenaka, K., & Tokunaga, K. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2469–2480.
  - 14) Mamegano, K., Kuroki, K., Miyashita, R., Kusaoi, M., Kobayashi, S., Matsuta, K., Maenaka, K., Colonna, M., Ozaki, S., Hashimoto, H., Takasaki, Y., Tokunaga, K., & Tsuchiya, N. (2008) *Genes Immun.*, **9**, 214–223.
  - 15) Chang, C.C., Ciubotariu, R., Manavalan, J.S., Yuan, J., Colovai, A.I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., & Suci-Foca, N. (2002) *Nat. Immunol.*, **3**, 237–243.
  - 16) Suci-Foca, N., Feirt, N., Zhang, Q.Y., Vlad, G., Liu, Z., Lin, H., Chang, C.C., Ho, E.K., Colovai, A.I., Kaufman, H., D'Agati, V.D., Thaker, H.M., Remotti, H., Galluzzo, S., Cinti, P., Rabitti, C., Allendorf, J., Chabot, J., Caricato, M., Coppola, R., Berloco, P., & Cortesini, R. (2007) *J. Immunol.*, **178**, 7432–7441.
  - 17) Fan, Q.R., Long, E.O., & Wiley, D.C. (2001) *Nat. Immunol.*, **2**, 452–460.
  - 18) Ishizuka, J., Stewart-Jones, G.B., van der Merwe, A., Bell, J.I., McMichael, A.J., & Jones, E.Y. (2008) *Immunity*, **28**, 171–182.
  - 19) Jones, D.C., Kosmoliaptis, V., Apps, R., Lapaque, N., Smith, I., Kono, A., Chang, C., Boyle, L.H., Taylor, C.J., Trowsdale, J., & Allen, R.L. (2011) *J. Immunol.*, **186**, 2990–2997.
  - 20) Chapman, T.L., Heikeman, A.P., & Bjorkman, P.J. (1999) *Immunity*, **11**, 603–613.
  - 21) Chapman, T.L., Heikema, A.P., West, A.P. Jr., & Bjorkman, P. J. (1999) *Immunity*, **13**, 727–736.
  - 22) Yang, Z. & Bjorkman, P.J. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10095–10100.
  - 23) Willcox, B.E., Thomas, L.M., Chapman, T.L., Heikema, A.P., West, A.P. Jr., & Bjorkman, P.J. (2002) *BMC Struct. Biol.*, **2**, 6.
  - 24) Shiroishi, M., Kuroki, K., Rasubala, L., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kurimoto, E., Kato, K., Kohda, D., & Maenaka, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16412–16417.
  - 25) Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E.Y., van der Merwe, P.A., Kumagai, I., & Maenaka, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8856–8861.
  - 26) Feger, U., Tolosa, E., Huang, Y.H., Waschbisch, A., Biedermann, T., Melms, A., & Wiendl, H. (2007) *Blood*, **110**, 568–577.
  - 27) Endo, S., Sakamoto, Y., Kobayashi, E., Nakamura, A., & Takai, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14515–14520.
  - 28) Shiroishi, M., Kuroki, K., Tsumoto, K., Yokota, A., Sasaki, T., Amano, K., Shimojima, T., Shirakihara, Y., Rasubala, L., van der Merwe, P.A., Kumagai, I., Kohda, D., & Maenaka, K. (2006) *J. Mol. Biol.*, **355**, 237–248.
  - 29) Arosa, F.A., Santos, S.G., & Powis, S.J. (2007) *Trends Immunol.*, **28**, 115–123.
  - 30) Shiroishi, M., Kuroki, K., Ose, T., Rasubala, L., Shiratori, I., Arase, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Kohda, D., & Maenaka, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 10439–10447.
  - 31) Chen, Y., Gao, F., Chu, F., Peng, H., Zong, L., Liu, Y., Tien, P., & Gao, G.F. (2009) *J. Mol. Biol.*, **386**, 841–853.
  - 32) Borges, L., Kubin, M., & Kuhlman, T. (2003) *Blood*, **101**, 1484–1486.
  - 33) Shiroishi, M., Kajikawa, M., Kuroki, K., Ose, T., Kohda, D., & Maenaka, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 19536–19544.
  - 34) Hashiguchi, T., Kajikawa, M., Maita, N., Takeda, M., Kuroki, K., Sasaki, K., Kohda, D., Yanagi, Y., & Maenaka, K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19535–19540.
  - 35) Hashiguchi, T., Ose, T., Kubota, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Maenaka, K., & Yanagi, Y. (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 135–141.
  - 36) Sasaki, K., Kajikawa, M., Kuroki, K., Motohashi, T., Shimojima, T., Park, E.Y., Kondo, S., Yagi, H., Kato, K., & Maenaka, K. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 575–580.
  - 37) Huynh, O.A., Hampartzoumian, T., Arm, J.P., Hunt, J., Borges, L., Ahern, M., Smith, M., Geczy, C.L., McNeil, H.P., & Tedla, N. (2007) *Rheumatology*, **46**, 742–751.
  - 38) Kabalak, G., Dobberstein, S.B., Matthias, T., Reuter, S., The, Y.H., Dörner, T., Schmidt, R.E., & Witte, T. (2009) *Arthritis Rheum.*, **10**, 2923–2925.
  - 39) Antrobus, R.D., Khan, N., Hislop, A.D., Montamat-Sicotte, D., Garner, L.I., Rickinson, A.B., Moss, P.A., & Willcox, B.E. (2005) *J. Infect. Dis.*, **191**, 1842–1853.
  - 40) Northfield, J., Lucas, M., Jones, H., Young, N.T., & Klenerman, P. (2005) *Immunol. Cell. Biol.*, **83**, 182–188.
  - 41) Berg, L., Riise, G.C., Cosman, D., Bergstrom, T., Olofsson, S., Karre, K., & Carbone, E. (2003) *Lancet*, **361**, 1099–1101.
  - 42) Wagner, C.S., Riise, G.C., Bergström, T., Kärre, K., Carbone, E., & Berg, L. (2007) *J. Immunol.*, **178**, 3536–3543.
  - 43) Bleharski, J.R., Li, H., Meinken, C., Graeber, T.G., Ochoa, M. T., Yamamura, M., Burdick, A., Sarno, E.N., Wagner, M., Röllinghoff, M., Rea, T.H., Colonna, M., Stenger, S., Bloom, B.R., Eisenberg, D., & Modlin, R.L. (2003) *Science*, **301**, 1527–1530.
  - 44) Colovai, A.I., Tsao, L., Wang, S., Lin, H., Wang, C., Seki, T., Fisher, J.G., Menes, M., Bhagat, G., Alobeid, B., & Suci-Foca, N. (2007) *Cytometry B Clin. Cytom.*, **72**, 354–362.