

| Title | MHC class IIの発現制御機構に関する研究 | | | | |
|------------------|----------------------------------|--|--|--|--|
| Author(s) | 春日,優介 | | | | |
| Citation | 北海道大学. 博士(医学) 甲第15888号 | | | | |
| Issue Date | 2024-03-25 | | | | |
| DOI | 10.14943/doctoral.k15888 | | | | |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/92014 | | | | |
| Туре | theses (doctoral) | | | | |
| File Information | KASUGA_Yusuke.pdf | | | | |



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

MHC class II の発現制御機構に関する研究 (Studies on the regulatory mechanism of MHC class II expression)

> 2024年3月 北海道大学

春日 優介

学位論文

MHC class II の発現制御機構に関する研究 (Studies on the regulatory mechanism of MHC class II expression)

2024年3月 北海道大学

春日 優介

目次

| 【発表論文目録および学会発表目録】 | 1 |
|-------------------|----|
| 【要旨】 | 2 |
| 【略語表】 | 5 |
| 【緒言】 | 7 |
| 【実験方法】 | 10 |
| 【実験結果】 | 23 |
| 【考察】 | 57 |
| 【結論】 | 61 |
| 【謝辞】 | 63 |
| 【利益相反】 | 64 |
| 【参考文献】 | 65 |

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

 Yusuke Kasuga, Ryota Ouda, Masashi Watanabe, Xin Sun, Miki Kimura, Shigetsugu Hatakeyama, Koichi S Kobayashi.
 FBXO11 constitutes a major negative regulator of MHC class II through ubiquitindependent proteasomal degradation of CIITA.
 Proceedings of the National Academy of Sciences, 120(24), e2218955120, 2023

本研究の一部は以下の学会に発表した。

 Yusuke Kasuga, Masashi Watanabe, Ryota Ouda, Masashi Watanabe, Shigetsugu Hatakeyama, Koichi S Kobayashi.
 "Identification of E3 ligase for CIITA"
 第 51 回日本免疫学会総会・学術集会
 2022 年 12 月 7 日-2022 年 12 月 9 日、熊本城ホール

【要旨】

背景と目的

主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) class II (MHC-II) は抗原提示と呼ばれる、微生物や病原体などの外来抗原情報を免疫細胞間で伝達する ために必須の分子である。MHC-II は主に樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示 細胞と呼ばれる特定の免疫細胞に発現しており、これらの細胞内に取り込まれた細胞 外抗原タンパク質は分解され、その一部が抗原として MHC-II と結合して複合体を形 成する。抗原と結合した MHC-II 複合体は細胞表面に移動して CD4+ T 細胞に抗原情 報を伝達する。この刺激によって CD4+ T 細胞が活性化し、以降の獲得免疫の活性化 に繋がる。MHC-II は細胞種ごとに複雑な発現パターンを示すが、この発現調節を行な っているのが class II transactivator (CIITA) というマスター制御因子である。CIITA は 免疫細胞に高発現しており、IFN-γ によって誘導される。CIITA は獲得免疫が活性化す る際に誘導されて中心的役割を果たすにもかかわらず、CIITA タンパク質量がどのよ うに制御されているかは不明であった。本研究では CIITA タンパク質量の調整メカニ ズムを解明して、獲得免疫に重要な MHC-II 経路のブレーキとなるシステムに迫るこ とを目指した。

材料と方法

FLAG タグ付き CIITA 安定発現 HeLa 細胞を樹立し、免疫沈降法とそれに続く質量分析によって CIITA 結合タンパク質を同定した。FBXO11 の機能解析について、プロモーター活性評価はルシフェラーゼレポーターアッセイを、mRNA 発現は定量 PCR を、タンパク質発現はイムノブロッティング法を、細胞表面発現はフローサイトメトリーをそれぞれ用いて評価した。FBXO11 の発現解析に用いた生検サンプルの RNA-seq による遺伝子発現データと、対応する患者の生存データは UNSC XENA (https://xenabrowser.net/datapages/) より入手した。RNA-seq の log2(x+1)変換 RSEM 正規化カウントをzスコア正規化し、各遺伝子が患者の生存と関連するかどうかを解析した。全生存期間はRの survminer パッケージにより Kaplan-Meier 曲線で可視化した。

結果

FLAG タグ付き CIITA 安定発現細胞を用いた免疫沈降法及びそれに続く質量分析に より、ユビキチン化酵素である FBXO11 が CIITA 特異的な結合タンパク質候補として 同定された。また、免疫沈降に続くイムノブロッティング解析により FBXO11 は CIITA に特異的に結合することが確認された。FBXO11 の過剰発現により、CIITA 依存的な MHC-II プロモーター活性の抑制が認められ、また CIITA タンパク質量の減少も認め られた。さらに、FBXO11 過剰発現によって MHC-II の転写レベル及び表面発現レベ ルの低下が認められ、FBXO11 が CIITA タンパク質量調節を介した MHC-II の抑制性 制御因子であることが示唆された。

次にFBXO11 が MHC-II を負に制御することをさらに確かめるため、マウス由来マク ロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて Fbxo11 欠損細胞株を樹立した。 Fbxo11 欠損 RAW264.7 細胞では、MHC-II および関連遺伝子の発現レベルが上昇して いた。他のグループが行なったヒト FBXO11 ノックアウト細胞と野生型細胞を比較し た RNA-seq データを再解析したところ、MHC-II 及び関連遺伝子は FBXO11 ノックア ウトによって発現量が上昇したが、CIITA の発現量の変化は認められなかった。これら の結果から FBXO11 が CIITA の翻訳後調節に関与することが示唆され、その結果とし て MHC-II 発現経路を制御していると推測された。

次に FBXO11 がユビキチンリガーゼであることより、FBXO11 が CIITA をユビキチ ン化依存的な分解に導くかどうかを確認した。タンパク質の半減期を調べるシクロへ キシミドチェイスアッセイおよびユビキチン化アッセイにより、CIITA の分解は主に ユビキチン-プロテアソーム系を介して FBXO11 により制御されていることが示され た。FBXO11 による CIITA タンパク質量の制御を患者検体でも確認するために、ヒト の FBXO11 と CIITA および MHC-II 遺伝子の発現量を解析した。正常組織および癌組 織において、FBXO11 の発現レベルは CIITA とは相関関係を示さず、MHC-II と負の相 関があることが明らかになった。興味深いことに、FBXO11 と CIITA の発現レベルの 組み合わせは、乳癌患者の MHC-II 発現と患者予後と関連していた。

これらの結果から、FBXO11はCIITAを分解するユビキチンリガーゼであり、MHC-IIの発現量を決定する重要な負の制御因子であることが示唆され、MHC-II経路のブレーキとなるシステムが明らかになった。

考察

MHC-IIの制御は獲得免疫の理解に重要である。CIITAは1993年に発見されて以来、 MHC-II 遺伝子発現のマスター制御因子として知られている。タンパク質量の制御に は大きく分けて遺伝子からの転写レベルと、翻訳後のタンパク質レベルにおける制御 の2つが関わっている。MHC-IIのマスター制御因子であるCIITAはこれまで転写レ ベルの研究が多くなされてきた。CIITAタンパク質の制御に関しては、その分解速度 が速いことは報告されていたが、その仕組みに関しては未解明であった。CIITA分子 はタンパク質として機能するため、転写レベルの制御よりもタンパクレベルでの制御 が、免疫細胞でのCIITAの働きにより重要であると考えた。本研究では、偏りのない プロテオミクス的アプローチを用いてCIITAとの結合タンパク質をスクリーニングし、 FBX011をCIITAの結合パートナーとして同定した。FBX011はCIITAと相互作用し、 ユビキチン化とプロテアソーム依存性分解を促進する。本研究によってFBX011が CIITA のタンパク質レベルと MHC-II の発現レベルの制御に重要な役割を果たしていることが示された。

また FBXO11 と癌患者の生存率との相関も観察された。MHC-II の異所性発現は、 通常は MHC-II が発現しない複数の固形癌で観察されるが、このような MHC-II 発現 の腫瘍における役割はまだ完全には解明されていない。しかし、腫瘍特異的 MHC-II と 呼ばれる腫瘍における MHC-II 発現は、様々な腫瘍型において癌免疫の重要な役割の 一端を担っており、腫瘍特異的 MHC-II の高発現は良好な予後や免疫チェックポイン ト阻害剤に対する反応性と関連している可能性があることが報告されている。我々の 解析によって FBXO11 と CIITA の発現レベルの組み合わせは MHC-II 発現と大きく相 関し、乳癌患者の予後バイオマーカーとして有用となる可能性があることを示唆して いる。

冒頭に述べたように、MHC-II は病原体から生体を守るために欠かせない分子であり、 その MHC-II の発現を司る CIITA の制御メカニズムは獲得免疫を完全に理解するため に必須である。私が今回明らかにした MHC-II の抑制性制御メカニズムは、免疫系が 正しく制御されていないことで発症する自己免疫疾患の病態解明や、癌免疫による腫 瘍排除メカニズム、またこれらの疾患の創薬ターゲットとなる可能性がある。

結論

我々はFBXO11 が CIITA の真のユビキチンリガーゼであることを同定した。FBXO11 は、翻訳後修飾により CIITA タンパク質量を決定することによって、MHC-II の発現 制御に重要な役割を果たしている。今後、FBXO11 を介した CIITA の分解を研究する ことで、MHC-II が関与する様々な疾患や癌のバイオマーカーの治療標的となり得る 可能性がある。

【略語表】

| AAD | acidic activation domain | | | |
|--------|--|--|--|--|
| BAHD1 | Bromo Adjacent Homology Domain Containing 1 | | | |
| BCL6 | BCL6 Transcription Repressor | | | |
| BLIMP1 | B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 | | | |
| BRCA | breast cancer | | | |
| CASH | carbohydrate-binding proteins and sugar hydrolase domain | | | |
| CBP | CREB-binding protein | | | |
| CD | cluster of differentiation | | | |
| CDC25A | Cell Division Cycle 25A | | | |
| CDT2 | cellodextrin transporte 2 | | | |
| CHX | cycloheximide | | | |
| CIITA | class II transactivator | | | |
| CUL1 | Cullin 1 | | | |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium | | | |
| FBS | fetal bovine serum | | | |
| FBXO11 | F-Box Protein 11 | | | |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase | | | |
| HEK | human embryonic kidney | | | |
| HLA | Human Leukocyte Antigen | | | |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography | | | |
| HRP | Horseradish peroxidase | | | |
| IFN | interferon | | | |
| IRF1 | Interferon Regulatory Factor 1 | | | |
| LB | Lysogeny Broth | | | |
| LRR | leucine-rich repeat | | | |
| MDS | Myelodysplastic Syndromes | | | |
| MHC | major histocompatibility complex | | | |
| MHC-I | MHC class I | | | |
| MHC-II | MHC class II | | | |
| n.s. | not significant | | | |
| NF-Y | Nuclear Factor Y Box | | | |
| NLRC5 | NLR Family CARD Domain Containing 5" | | | |
| NOD2 | Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2 | | | |
| NP-40 | Nonidet P-40 | | | |

| P/S/T | proline/serine/threonine | | | |
|-----------|--|--|--|--|
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | | | |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells | | | |
| PBS | Phosphate-buffered saline | | | |
| PCAF | P300/CBP-associated factor | | | |
| PCR | polymerase chain reaction | | | |
| PEI | Polyethylenimine | | | |
| PSMs | peptide spectrum matches | | | |
| PVDF | Polyvinylidene difluoride | | | |
| RFX | Regulatory Factor binding to the X-box | | | |
| RSEM | RNA-Seq Expectation Maximization | | | |
| SCF | Skp1-Cullin-1-F-box | | | |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate | | | |
| sgRNA | single-guide RNA | | | |
| SKP1 | S-Phase Kinase Associated Protein 1 | | | |
| STAT1 | Signal Transducer And Activator Of Transcription 1 | | | |
| TBST | Tris-buffered saline with tween 20 | | | |
| TFA | Trifluoroacetic Acid | | | |
| TPM | Transcripts Per Kilobase Million | | | |
| ts-MHC-II | tumor cell-specific MHC-II | | | |
| UBR | ubiquitin-protein ligase E3 component N-recognin | | | |

【緒言】

1. MHC class II

主要組織適合遺伝子複合体クラス II (major histocompatibility complex class II; MHC-II) 分子は、CD4+ T細胞への抗原提示と活性化に必須であり、体液性免疫と細胞性免疫 の両方において重要な役割を果たしている。あらゆる細胞種で発現する MHC-I とは異 なり、MHC-II 分子は限られた細胞種で発現し、抗原提示やペプチドローディングを行 う。抗原提示を担う MHC-II 分子は、ヒトでは HLA-DP, -DQ, -DR、マウスでは H2-A, -E であり、ペプチド負荷を担う分子はヒトでは HLA-DM, -DO、マウスでは H2-A, -E であり、ペプチド負荷を担う分子はヒトでは HLA-DM, -DO、マウスでは H2-M, -O である。MHC-II の発現は厳密に制御されており、その定常発現は樹状細胞、マクロフ ァージ、B 細胞などの古典的抗原提示細胞や胸腺上皮細胞に限定されている(Reith *et al*, 2005)。ほとんどの非免疫細胞は MHC-II を発現しないが、インターフェロン (interferon; IFN) - γ 刺激による発現誘導が様々な細胞型で広く観察される(Kambayashi & Laufer, 2014)。MHC-II の発現は、通常は MHC-II を発現しない固形癌でも観察されることが ある(Axelrod *et al*, 2019)。このような癌における MHC-II の正確な役割は明らかではな いが、チェックポイント阻害免疫療法の治療効果が、これらの癌における MHC-II 発 現レベルと正の相関があることが報告されている(Johnson *et al*, 2016; Thibodeau *et al*, 2012)。

2. Class II transactivator (CIITA)

MHC-II の発現は転写レベルで制御されており、マスター制御因子である CIITA が MHC-II の細胞種特異的発現と誘導性発現の両方を担っている(Masternak et al, 2000; Steimle et al, 1993)。CIITA は 1130 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端から順に、 転写活性に重要な acidic activation ドメイン (AAD)、プロリン、セリン、スレオニンに 富む proline/serine/threonine (P/S/T)領域、ヌクレオチド結合ドメイン、C 末端にはロ イシンリッチリピート(LRR)を有する(León Machado & Steimle, 2021)。3つのプロモ ーターが、それぞれ N 末端の長さが異なる CIITA のアイソフォーム I、II、III を生成 する(Muhlethaler-Mottet et al, 1997; Nickerson et al, 2001; Piskurich et al, 1999)。 CIITA は DNA 結合ドメインを持たないため直接 DNA に結合することはできないが、Regulatory Factor binding to the X-box (RFX) タンパク質複合体、NF-Y (Nuclear Factor Y Box) 複 合体、p300/CBP (CREB-binding protein)、P300/CBP-associated factor (PCAF) などの複 数の転写因子やクロマチン修飾コアクチベーターと会合し、MHC-II の近位プロモー ター上に MHC enhanceosome と呼ばれるタンパク質/DNA 複合体を生成する(Nash et al, 2022)。CIITA の活性は、ユビキチン化、リン酸化、アセチル化といった様々な翻訳後 修飾によって制御されている。リン酸化は転写活性、核局在化、多量体化、タンパク 質間相互作用に重要であり、アセチル化は CIITA の核内移行に重要である(Greer et al, 2004; Li *et al*, 2001; Spilianakis *et al*, 2000; Tosi *et al*, 2002)。CIITA のモノユビキチン化は 転写活性を高めるが、ポリユビキチン化は CIITA の核内移行と分解に関与する(Greer *et al*, 2003; Morgan *et al*, 2015)。AAD を持つタンパク質は一般にターンオーバーが早い ことが知られており、CIITA の半減期も約 30 分ほどと短いことが報告されている (Schnappauf *et al*, 2003)。転写活性化ドメインはしばしばデグロンと呼ばれるタンパク 質の分解に重要な配列モチーフと密接に重なっており、CIITA の場合、P/S/T ドメイン、 AAD、アイソフォーム III のN 末端にある最初の 10 アミノ酸内の領域が分解に関わる ことが知られている(Beaulieu *et al*, 2016; Bhat *et al*, 2010; Schnappauf *et al*, 2003)。しかし ながら、CIITA の分解を導くユビキチン化酵素が不明であるため、CIITA の分解機構 は明らかになっていない。

3. ユビキチン-プロテアソーム系

ユビキチン・プロテアソーム系は、標的タンパク質を分解するためのシステムであり、 様々な細胞内プロセスにおいて重要な役割を果たしている。ユビキチンは76アミノ酸 からなる小さなタンパクで、基質のリジン残基に共有結合することにより細胞内シグ ナルを生み出す(Swatek & Komander, 2016)。ユビキチンは既に基質に修飾されたユビキ チンに対してさらに付加することができ、様々な種類のユビキチン鎖を作り出し、そ のユビキチン鎖の種類によって、異なるシグナルを発生させる。ユビキチンには7個 のリジン残基があるが、そのうち48番目のリジンを用いたユビキチン鎖は一般的にプ ロテアソームによって認識され、基質タンパク質の分解に繋がる(Tracz & Bialek, 2021)。 ユビキチン化は3つの酵素、すなわちユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵 素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)によって触媒される。E3リガーゼは標的タンパ ク質と会合することによって基質を決定する(Zheng & Shabek, 2017)。

4. FBX011

Skp1-Cullin-1-F-box (SCF) E3 リガーゼ複合体は、E3 リガーゼの最大のファミリーで あり、CUL1、SKP1、F-box タンパク質からなる(Harper & Schulman, 2021)。FBXO11 は 927 アミノ酸長を持つ F-box ファミリーのメンバーである(Abida *et al*, 2007)。FBXO11 の構造は N 末端より、プロリンリッチドメイン、F-box ドメイン、中間部に 3 つの carbohydrate-binding proteins and sugar hydrolase domain (CASH) ドメインがあり、C 末 端には ubiquitin-protein ligase E3 component N-recognin (UBR) ドメインと呼ばれるジン クフィンガー様ドメインを有する(Abida *et al.*, 2007; Gregor *et al*, 2018)。F-box ドメイン は SCF 複合体中の SKP1 タンパク質との結合に必須であり、F-box タンパク質が E3 リ ガーゼとして機能するために必要である(Abida *et al.*, 2007)。FBXO11 のユビキチン化 基質として、BCL6(Duan *et al.*, 2012)、CDT2(Abbas *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2013)、p53(Abida *et al.*, 2007)、SNAIL(Jin *et al*, 2015; Zheng *et al*, 2014)、BAHD1(Xu *et al*, 2021)、CDC25A(Liu *et al*, 2022)、BLIMP-1(Horn *et al*, 2014)など複数のタンパク質が報告されている。

5. 本研究の目的と概要

本研究では CIITA タンパク質の分解メカニズムを明らかにし、獲得免疫に重要な MHC-II 経路の抑制システムを解明することを目的とした。

具体的には、プロテオミクススクリーニングによって CIITA 特異的に結合するユビ キチンリガーゼを探索し、そのユビキチンリガーゼが CIITA を分解に導くことを MHC-II のプロモーターアッセイ、定量 PCR、イムノブロッティング法を用いて検討 した。また既存のヒトでの mRNA 発現量データベースを活用し、生理的意義も検討し た。

【実験方法】

1. 実験材料

以下に本研究で用いた実験装置、消耗品、実験試薬を示す。

〈1〉 装置類

培養器: Forma Direct Heat CO2 Incubator, 184 L (Thermo Fisher、Waltham、MA、USA)

PCR 装置: S1000TM サーマルサイクラー (Bio-Rad、Hercules、CA、USA)

StepOne Realtime PCR System (Thermo Fisher、Waltham、MA、USA)

微量分光光度計: NanoDrop One(Thermo Fisher、Waltham、MA、USA)

レポーターの検出機: Lumat LB 9507 (Berthold technologies、Bad Wildbad、 Germany)

電気泳動槽: ミニプロティアン Tetra セル (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) ゲルメンブラン転写装置 KS-8451 (オリエンタル インスツルメン ツ、神奈川)

パワーサプライ:パワーパック HC (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) イメージング装置: ImageQuant LAS 500 (cytiva、Marlborough、MA、USA) 超音波破砕装置: TOMY 超音波発生装置 model UR-20P (トミー精工、東京) ボルテックスミキサー: VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries、Bohemia、NY、

USA)

遠心機:冷却微量高速遠心機 5417R(Eppendorf、Hamburg、Germany) 質量分析装置:Orbitrap Elite(Thermo Fisher、Waltham、MA、USA)

〈2〉 消耗品

遠沈管:50ml コニカルチューブ (Thermo Fisher、Waltham、MA、USA) 15ml コニカルチューブ (Corning Inc.、Corning、NY、USA) 1.5ml マイクロチューブ (イナ・オプティカ、大阪) PCR 用チューブ:0.2 ml フラットキャップ (アズワン、大阪) ディッシュ:15 cm ディッシュ (アズワン、大阪) 10 cm ディッシュ (アズワン、大阪) 6 cm ディッシュ (Thermo Fisher、Waltham、MA、USA) 6 ウェルプレート (アズワン、大阪) 12 ウェルプレート (アズワン、大阪) 24 ウェルプレート (アズワン、大阪) 96 ウェルプレート (アズワン、大阪)

PCR 用マイクロプレート: 48×0.1 ml Plate (BIOplastics、Netherlands)

マイクロプレート用カバーフィルム: VWR, Ultra-Clear Films for qPCR (VWR、

Radnor, PA, USA)

PVDF 膜: Immobilon-P メンブレン、PVDF、0.45 µm (Millipore、Burlington、MA、USA)

ハイブリバッグ: Hybri-Bag Hard (コスモ・バイオ、東京)

0.45 µm フィルター: Minisart 高流量シリンジフィルター (Sartorius、Germany)

〈3〉 試薬類

ダルベッコ変法イーグル培地(ナカライテクス、京都)

Fetal bovine serum (FBS; NICHIREI、東京)

2.5 g/L トリプシン/1 mmol/EDTA 溶液(ナカライテクス、京都)

ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(安定化)(ナカライテクス、京都)

ピューロマイシン (Invivogen、San Diego、CA、USA)

Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

PEI Max -Transfection Grade Linear Polyethylenimine Hydrochloride (MW 40,000) (Polyscience, Warrington, PA, USA)

Sepasol-RNAI Super G (ナカライテクス、京都)

クロロホルム(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

イソプロパノール(ナカライテクス、京都)

エタノール(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO、大阪)

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO、大阪)

Nuclease-free water (ナカライテクス、京都)

シクロヘキシミド (ナカライテクス、京都)

30% アクリルアミドおよびビズアクリルアミド溶液、29:1 (Bio-Rad、Hercules、CA、 USA)

ドデシル硫酸ナトリウム(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

2-メルカプトエタノール(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (ナカライテクス、京都)

グリシン (ナカライテクス、京都)

塩化ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

塩酸(ナカライテクス、京都)

ブロモフェノールブルーナトリウム(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

メタノール (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)

スキムミルク粉末(森永乳業株式会社、東京)

ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

NP-40 (S Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

cOmplete[™] プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)

抗 FLAG M2 抗体 アフィニティーゲル (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)

ジチオスレイトール (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)

ヨードアセトアミド (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)

エチルマレイミド (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)

4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF; Roche, Branchburg, NJ, USA)

MG132(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

PhosStop phosphatase inhibitors (Roche, Branchburg, NJ, USA)

RapiGest SF (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

TFA(富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)

GL-Tip GC(ジーエルサイエンス、東京)

GL-Tip SDB (ジーエルサイエンス、東京)

Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate (タカラバイオ、滋賀)

NucleoSpin Plasmid EasyPure (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG、Düren、Germany) NucleoBond Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG、Düren、Germany)

※ ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)の調整

DMEM 培地全量 500 ml に、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を 5.5 ml、あらかじ め 56°C で 30 分非働化した FBS を 50 ml 混合して調整した。それぞれの最終濃度は、 ペニシリン G は 100 U/ml、ストレプトマイシンは 100 μ g/ml、FBS は 10% (v/v) であ る。以下の本文中の DMEM 培地は調整済みのものとする。

※SDS-PAGE(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)Running buffer の調整

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 30.3 g、グリシン 144.1 g、ドデシル硫酸ナ トリウム 10 g を 1 L の滅菌蒸留水に溶解して 10 倍濃度の SDS-PAGE Running buffer を 作製した。使用時に滅菌蒸留水で 10 倍に希釈して使用した。 ※転写バッファーの調整

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 3.03 g、グリシン 14.41 g、を1 Lの滅菌蒸 留水に溶解して保存した。使用時に 10 倍に希釈し、10%のメタノールを添加して使用 した。

※TBST (0.1%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート含有 Tris-buffered saline)の調整

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン24g、塩化ナトリウム88gを1Lの滅菌蒸留水に溶解し、塩酸を用いてpH7.6に調整して10倍濃度のTBS(Tris-buffered saline)を作製した。TBSを10倍希釈したのちにポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを0.1%加えて撹拌し、TBSTを作製した。

2. 細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 human embryonic kidney(HEK)293T 細胞およびヒト子宮頸癌由 来細胞株 HeLa 細胞は理研バイオリソース研究センター(茨城)より入手した。 RAW264.7 細胞は American Type Culture Collection (Manassas、VA、USA)から入手した。 細胞は、10% FBS およびペニシリン-ストレプトマイシンを添加した DMEM で 5% CO2 の加湿インキュベーター内で培養した。pQCXIPFLAG-CIITA、pQCXIP-FLAG-NLRC5、pQCXIP-FLAG-NOD2 ベクター1 µg を、Novus Biologicals(Centennial、CO、 USA)から入手した pCL10A1 ベクターと共に 1×10⁶ 個の HEK293T 細胞にトランス フェクトし、組換えレトロウイルスを作製した。ポリブレン(1 µg/ml)存在下で HeLa 細胞1×10⁵ 個に組換えレトロウイルスを感染させ、ピューロマイシン(2 µg/mL)に て選択することにより、FLAG タグ付きヒト CIITA、NLRC5、NOD2 発現安定細胞株 を作製した。テトラサイクリン誘導性(Tet-ON)FLAG タグ化ヒト FBX011 安発現 HeLa 細胞株は、pTRIPZ FLAG-FBX011 ベクターをトランスフェクションし、次いでピュー ロマイシン(2 µg/mL)選択により、HeLa 細胞を用いて作製した。

3. プラスミド構築

pcGN 発現ベクター (pcGN-HA)、p3×FLAG-CMV7.1 および pQCXIP プラスミドは 畠山先生 (北海道大学) から譲渡されたものを使用した。pRL Renilla null コントロー ルレポーターベクターは Promega (Madison、WI、USA) から購入した。FBXO11 発現 ベクターは、HeLa 細胞の RNA から逆転写した cDNA を用いて FBXO11 (NM_001374325.1)コード配列を増幅することにより作成した。PCR で増幅した DNA 断片を、Sall と Notl を用いて pcGN ベクターにクローニングした。pTRIPZ FLAG-FBXO11 は、PCR で増幅した FLAG-FBXO11 を、Addgene (Watertown、MA、USA) から入手した pTRIPZ (M)-HT-Cbx6 (# 82514) に XhoI と MluI を用いて挿入すること により作製した。CIITA、NLRC5 および NOD2 発現ベクターは、HeLa 細胞の RNA か ら逆転写した cDNA を用いて各コード配列を増幅し、CIITA および NLRC5 について は XbaI および SalI を用いて、NOD2 については NotI および SalI を用いて、それぞれ p3×FLAG ベクターにクローニングすることにより作製した。FBXO11 または CIITA の変異体は、設計したプライマーセットを用いた PCR による標準的な部位特異的変異 誘発法によって作製した。HLA プロモーター用のルシフェラーゼレポータープラスミ ド、pGL3-HLA-DRA、pGL3-HLA-DPA および pGL3-HLA-A は、van den Elsen 博士(オ ランダ、Leiden University)から譲渡されたものを使用した。クローニングされたすべ ての構築物の配列は Sanger sequencing により確認された。

上記のプラスミドは形質転換した大腸菌を3 mlの Lysogeny Broth (LB) 液体培地を 用いて一晩37℃で振盪培養したのち、NucleoSpin Plasmid EasyPure 用いて mini prep、 もしくは形質転換した大腸菌を50 mlのLB液体培地を用いて一晩37℃で振盪培養し たのち NucleoBond Xtra Midi を用いて midi prep を行い、精製した。クローニングに用 いたプライマーの配列情報を表1に示す。

| primer name | sequence (5' to 3') use | | | | |
|------------------|--|-------------------|-----------|--|--|
| FBXO11-F | ATAGTCGACATGGTTGCAGAAGAATCAG Cloning for human | | | | |
| FBXO11-R | AGCGGCGCCTCAGTTGTGCTGCAATG | GCTGCAATG FBX011 | | | |
| FBXO11-ΔFbox-F | GAAGTATTTGAATATACTCGCCCTATG | FBXO11 F-box | Inverse | | |
| FBXO11-∆Fbox-R | TTCAGCAGGTGCTGCTGA | deletion | PCR | | |
| pcGN-CIITA-F | TTTCTAGAATGCGTTGCCTGGCTCCACGCCCT | Cloning for CIITA | XbaI and | | |
| pcGN-CIITA-R | AATAATGTCGACGCGTCATCTCAGGCTGATCCGTGAAT | expression vector | SalI | | |
| pcGN-NLRC5-F | TTTCTAGAATGGACCCCGTTGGCCT | Cloning for | XbaI and | | |
| pcGN-NLRC5-R | GGGGTCGACTCAAGTACCCCAAGG | NLRC5 expression | SalI | | |
| | | vector | | | |
| pcGN-NOD2-F | AATGCGGCCGCACCATGTGCTCGCAGGAGGCT | Cloning for NOD2 | NotI and | | |
| pcGN-NOD2-R | AATAATGTCGACGCGTCAAAGCAAGAGTCTGGTGTC | expression vector | SalI | | |
| pQCXIP-CIITA-F | AATGAATTCACCATGCGTTGCCTGGCTCCACGCCCT | Cloning for CIITA | EcoRI and | | |
| pQCXIP-CIITA-R | CCCCTCGAGTCATCTCAGGCTGATCCGTGAAT | retrovirus vector | XhoI | | |
| pQCXIP-NLRC5-F | AATGCGGCCGCACCATGGACCCCGTTGGCCTCC | Cloning for | NotI and | | |
| pQCXIP-NLRC5-R | CCCCTCGAGTCAAGTACCCCAAGGGGGCCT | NLRC5 retrovirus | XhoI | | |
| | | vector | | | |
| pQCXIP-NOD2-F | AATGCGGCCGCACCATGTGCTCGCAGGAGGCTT | Cloning for NOD2 | NotI and | | |
| pQCXIP-NOD2-R | CCCCTCGAGTCAAAGCAAGAGTCTGGTGTC | retrovirus vector | XhoI | | |
| CIITA-ΔP/S/T-F | GCAGCTGGAGAGGTCTCC | CIITA P/S/T | Inverse | | |
| CIITA-ΔP/S/T-R | CTCAGCTGGCTTCCAGTG deletion | | PCR | | |
| CIITA-ANACHT-F | AGTGGCGAAATCAAGGACAAGG | CIITA NACHT | | | |
| CIITA-ANACHT-R | TGTCTCACGCGGCC | deletion | | | |
| CIITA-Δ725-984-F | AAGAAACTGGAGTTTGCGCTGG CIITA 725-984aa | | Inverse | | |
| CIITA-Δ725-984-R | CAGAGCCAGCCACAGG | deletion | | | |
| CIITA-ΔLRR-F | TATCTAGAATGCGTTGCCT CIITA LRR | | XbaI and | | |
| CIITA-ΔLRR-R | LRR-R ATAGAATTCTCATCTCAGGCTGAT deletion | | SalI | | |

表1. クローニングに用いたプライマーリスト

4. 遺伝子導入

細胞への遺伝子導入は Polyethylenimine (PEI) Max を用いた。Opti-MEM に精製プ ラスミドを加えて、別のチューブに Opti-MEM とプラスミド 1 µg あたり 5 µl の PEI を 加えて室温で 5 分間静置した。その後プラスミド溶液と PEI 溶液を混合してさらに 15 分間室温で静置した後、細胞培養液中に加えた。

5. レポーターアッセイ

ルシフェラーゼアッセイのために、 1×10^4 個の HEK293T を 24 ウェルプレートに播 種した。MHC プロモーター活性に対する FBXO11 の効果を解析するために、50ng の HLA プロモーターレポーターベクターと pRL Renilla null コントロールレポーターベ クター10ng を、FBXO11 発現ベクター、および CIITA または NLRC5 と共導入した。 36 時間培養後、細胞を回収し、dual Luciferase Assay System (Promega、Madison、WI、 USA))を用いて細胞溶解物を分析した。

6. Total RNA の抽出および定量 PCR による mRNA の発現評価

 1×10^{5} 個の HeLa 細胞もしくは 2×10^{5} 個の RAW264.7 細胞を 12 ウェルプレートに播 種した。24 時間後、実験に応じてプラスミドをトランスフェクションし、必要であれ ばその 24 時間後に IFN-γ で細胞を刺激した。トランスフェクションより 48 時間後、 培養液を取り除き PBS で洗浄した。洗浄後各ウェルに 500 µl の Sepasol-RNA I Super G を加えて細胞を溶解、1.5mlチューブに回収し、5分間室温で静置した。チューブにク ロロホルムを 100 µl 加えて 10 秒間振盪し、12,000 g、4℃で 15 分遠心した。遠心後、 上清の水相のみを新しい 1.5 ml チューブに移して、500 µl のイソプロパノールを加え て転倒混和した。10分間室温で静置した後に12,000g、4℃で10分遠心した。遠心後、 上清を全て取り除き、75%エタノールを1ml加えて軽く混ぜた後に12,000g、4℃で5 分遠心した。上清を捨てて風乾し、nuclease free water を加えて RNA 濃度を測定し、 400 ng/µl に揃えた。0.4 µg の RNA を 65℃で 5 分間変性させた後に氷上で急速に冷却 し、ReverTra Ace gPCR RT Kit を用いて genome DNA を除去、cDNA に逆転写した。 cDNA 合成プロトコルを表2に示す。mRNA 発現を評価するために、ヒト CIITA、HLA-DRA、マウス H2-Aa、H2-Kb 遺伝子を標的とする特異的プライマーセットと THUNDERBIRDTM SYBRTM qPCR Mix を用いて、StepOne Realtime PCR System にて 定量的逆転写 PCR を行った。内部コントロールとして、ヒトおよびマウスの GAPDH 遺伝子を標的にし、増幅し、標準化に使用した。相対的な遺伝子発現レベルを計算し、 未処理のコントロールに対する相対変化を示した。定量 PCR に用いたプライマーの配 列情報を表3に示す。

表 2. cDNA 合成プロトコル

| | 以下の操作は全て氷上で行われた。 | | | |
|---|--|--|--|--|
| 1 | 0.4 µgのRNAにNuclease-free waterを加えて6µlになるように調整した。 | | | |
| 2 | 65℃で5分間インキュベートし、氷上で急冷した。 | | | |
| 3 | 2 µl の 4x DN Master Mix (gDNA Remover 添加済み)を加えた。 | | | |
| 4 | 37℃で5分間インキュベートした。 | | | |
| 5 | 2 µl の 5xRT Master Mix II を添加し、よく撹拌した。 | | | |
| 6 | 以下のステップを Thermal cycler を利用して実行した。 | | | |
| | 37°C 15 分間 | | | |
| | 50℃ 5分間 | | | |
| | 98℃ 5分間 | | | |
| 7 | 4°Cに冷却後、Nuclease-free water を 90 µl 加えて希釈し、定量 PCR に使用した。 | | | |

表 3. 定量 PCR に用いたプライマー

| primer name | sequence (5' to 3') | use | | |
|-------------|-------------------------|--------------------------------------|--|--|
| HLA-DRA-F | GCCAACCTGGAAATCATGACA | | | |
| HLA-DRA-R | AGGGCTGTTCGTGAGCACA | | | |
| HLA-A-F | AAAAGGAGGGAGTTACACTCAGG | | | |
| HLA-A-R | GCTGTGAGGGACACATCAGAG | aDCB primary for human gana analysis | | |
| CIITA -F | ACAGAGCACCAAGACAGAGC | qrCR primers for numan gene analysis | | |
| CIITA-R | CTCTGAGAGCTGGCACACTG | | | |
| GAPDH-F | GAAGGTGAAGGTCGGAGT | | | |
| GAPDH-R | GAAGATGGTGATGGGATTTC | | | |
| mH2-Aa-F | CAACCGTGACTATTCCTTCC | | | |
| mH2-Aa-R | CCACAGTCTCTGTCAGCTC | | | |
| mH2-Kb-F | GTGATCTCTGGCTGTGAAGT | | | |
| mH2-Kb-R | GTCTCCACAAGCTCCATGTC | DCD mimor for mouse cone englysis | | |
| mFBXO11-F | CGTGCAAGAGTGTCTGGAAA | qPCR primers for mouse gene analysis | | |
| mFBXO11-R | ACACGCAAGCAGCTCTACAA | | | |
| mGAPDH-F | GTGTTCCTACCCCCAATGT | | | |
| mGAPDH-R | TGTCATCATACTTGGCAGGTTTC | | | |

7. イムノブロット分析

 2×10^{5} 個の HeLa 細胞もしくは 4×10^{5} 個の HEK293T 細胞もしくは 4×10^{5} 個の RAW264.7 細胞を6ウェルプレートに播種した。24時間後、実験に応じてプラスミド をトランスフェクションし、必要であればその 24 時間後に IFN-γ で細胞を刺激した。 トランスフェクションより 48 時間後、培養液を取り除き、HEK293T 細胞は 1 ml の PBS によって物理的に、HeLa 細胞と RAW264.7 細胞はトリプシン処理によって細胞 を剥がし、900g、4℃で1分間遠心した。遠心後上清を取り除き、Laemmli サンプルバ ッファー (50 mM Tris-HCL (pH 6.8)、2-メルカプトエタノール (6% v/v)、ドデシル硫 酸ナトリウム (2% w/v)、グリセロール (10% v/v)、ブロモフェノールブルー (0.01% w/v)) 100 µl を加えて超音波処理により細胞を溶解した。95℃で5分間煮沸した後、 サンプルを SDS-PAGE Running buffer を用いてドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリ ルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、300mA 固定の条件において転写バッ ファー中で2時間 Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写後、PVDF 膜 を 0.1%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート含有トリス緩衝生理食塩 水(TBST)によって希釈した 10% 脱脂乳で 30 分間振盪しブロッキングを行った。 PVDF 膜をを3回 TBST で洗浄した後、TBST で希釈した一次抗体と共にハイブリバ ッグ内に PVDF 膜を密封して 4℃で一晩振盪した。翌朝 PVDF 膜を TBST で 3 回洗浄 し、2%スキムミルクを含む TBST で希釈した二次抗体 (ホースラディッシュペルオキ シダーゼ標識抗マウスまたはラビット免疫グロブリンG抗体)を用いて室温で2時間 振盪した。PVDF 膜は TBST で 3 回洗浄した後、Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate に反応させ、ImageQuant[™] LAS 500 を用いて検出した。一次および二次抗体 は以下の割合で希釈した。抗 FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、1:1000; 抗HA 抗体 (BioLegend、San Diego、CA、USA)、1:1000;抗Myc タグ抗体 (Cell Signaling) Technology, Danvers, MA, USA)、1:1000;抗pSTAT1 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers、MA、USA)、1:1000;抗IRF1抗体 (Cell Signaling Technology、Danvers、MA、 USA)、1: 1000;抗FBXO11抗体 (Bethyl、Montgomery、Texas、USA)、1:100;抗CIITA (Santa Cruz Biotechnology、Dallas、Texas、USA)、1:500; 抗ユビキチン P4D1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), 1:1000; 抗ベータアクチン (Proteintech, Rosemont, IL、USA)、1:5000;ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリ ンG抗体 (GE Healthcare、Chicago、IL、USA)、1:3000;ホースラディッシュペルオキ シダーゼ標識抗ラビット免疫グロブリンG抗体(GE Healthcare、Chicago、IL、USA)、 1:3000

8. 変性および非変性免疫沈降法

非変性免疫沈降法では、 8×10^5 個の HEK293T 細胞もしくは RAW264.7 細胞を 6 cm ディッシュに播種した。24 時間後、実験に応じてプラスミドをトランスフェクション し、48 時間後に細胞を回収し、0.2% Nonidet P-40 (NP40) 溶解バッファー (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.2% NP40、cOmpleteTM プロテアーゼ阻害剤カク テル)で溶解し、超音波処理した。変性免疫沈降では、細胞を変性溶解バッファー (50 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、1% SDS、protease inhibitor cocktail) で溶解し、超 音波処理した後、95℃で 10 分間煮沸した。変性後、細胞溶解液を溶解バッファーで 10 倍に希釈し、SDS 濃度を 0.1%以下にした。細胞抽出液を抗抗 FLAG M2 抗体 アフィ ニティーゲルと 4℃で 2 時間インキュベートした。免疫沈降物に細胞溶解バッファー を 600 µl 加えて 400 g で 1 分間遠心することによって洗浄し、これを 3 回繰り返した。 洗浄後、免疫沈降物を 80 µl の Laemmli サンプルバッファーに再懸濁し、95℃で 5 分 間煮沸し、400 g で 1 分間遠心、別なチューブに移した後に再度 400 g で 1 分間遠心 し、上清をイムノブロッティング解析した。

9. シクロヘキシミドチェイスアッセイ

 1×10^{6} 個の HEK293T 細胞もしくは RAW264.7 細胞を 10 cm ディッシュに播種した。 24 時間後、4 µg の p3xFLAG-CIITA と 4 µg の pcGN HA-empty、野生型 FBXO11 また は FBXO11 Δ F 変異体のいずれかを実験に応じてトランスフェクションし、6 時間後に 細胞をトリプシン処理によって剥がして、6 ウェルディッシュに撒き直し、さらに 18 時間培養した。その後細胞を 10 µM のシクロへキシミドで 0、0.5、1、1.5、2 時間処理 し、サンプルを回収し、イムノブロッティングのために Laemmli サンプルバッファー で溶解した。

10. フローサイトメトリー

MHC-I および MHC-II の表面発現を解析するため、2×10⁵ 個の RAW264.7 細胞を 12 ウェルプレートに播種した。24 時間後、実験に応じて HA タグ付き FBXO11 発現ベク ターまたは FBXO11 ΔF 変異体発現ベクターをトランスフェクションし、必要であれ ばその 24 時間後に IFN-γ で細胞を刺激した。トランスフェクションから 48 時間後も しくは IFN-γ 刺激から 24 時間後、細胞を解析に用いた。トリプシンで細胞を剥がした 後に、1 ml の PBS を加えて 400 g、4 °C で 1 分間遠心することで洗浄し、FACS buffer

(2% FBS/PBS) で 200 倍に希釈した PE 標識アイソタイプコントロール (BioLegend、 San Diego、CA、USA)、FITC 標識アイソタイプコントロール (BioLegend、San Diego、 CA、USA)、PE 標識抗マウス I-A/I-E 抗体 (BioLegend、San Diego、CA、USA) または
FITC 標識抗マウス H-2Kb/H-2Db 抗体 (BioLegend、San Diego、CA、USA) を用いて、 氷上で 30 分間染色した。細胞を FACS バッファーで 2 回洗浄し、200 µl の FACS buffer で再懸濁し、FACS Canto II (BD、Becton Drive Franklin Lakes、NJ、USA)を用いたフ ローサイトメトリー解析に用いた。データ解析は FlowJo ソフトウェア (BD、Becton Drive Franklin Lakes、NJ、USA)を用いて行った。

11. CRISPR/Cas9 を用いた Fbxo11 欠損細胞の作製

マウス Fbxoll(NC 000083.7 REGION: 88298287. 88373473)の sgRNA 配列は、IDT デ ザ ツ gRNA イ ン ル (https://sg.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR SEQUENCE)を用いて設計した。 選択した 2 つの sgRNA 配列(GCAAAGCGTGCAAGAGTGTC、エクソン 3 を標的; TTGTAGAGCTGCTTGCGTGT、エクソン4を標的)を pLentiCRISPRv2 にクローニン グした(Beucher & Cebola, 2019)。レンチウイルスを産生するために、 4×10^5 個の HEK 293T 細胞を6 ウェルプレートにプレーティングし、24 時間後に pLentiCRISPRv2 (0.67 µg)、psPAX2 (0.67µg) および pMD2.G (0.67µg) をトランスフェクションした。6 時 間後、培地を交換して、トランスフェクションから 48 時間後に上清懸濁液を回収し た。回収後、400gで遠心した後に 0.45 µm フィルターを通し、細胞成分を完全に取り 除いた。前日に6ウェルに8×10⁵個播種した RAW264.7 細胞に5 μg/ml のポリブレン とウイルスを含む上清を添加し、形質導入した。導入から24時間後、培地を10µg/ml のピューロマイシンを含む培地に交換し、さらに3日間培養した。ピューロマイシン 耐性細胞を限界希釈によりクローニングし、単一細胞クローンを選択した。Fbxoll 遺 伝子のエクソン3および4の一部のホモ接合性欠失の遺伝子型は、領域特異的プライ マー (フォワードプライマー: CAGGTCCTGGTGCACAAAATAG、リバースプライマ ー: ACACACCGTCCGTCTTTCAA)を用いたゲノム DNA の PCR 増幅により確認 した。Fbxoll 遺伝子の転写産物が存在しないこと、およびタンパク質が発現していな いことは、mRNAの定量PCR、およびイムノブロッティングによりそれぞれ確認した。 pLenti-CRISPRv2 empty ベクターレンチウイルスを、同様の方法で作製したコントロー ル細胞として用いた。

12. 質量分析用サンプルの調製

 2×10^7 個の FLAG タグ付き CIITA、NLRC5 または NOD2 安定発現 HeLa 細胞を、細胞溶解バッファー (50 mM Tris-HCl (pH7.6)、300 mM NaCl、10% グリセロール、0.2% NP-40、10 mM ヨードアセトアミド、10 mM ネチルマレイミド、0.5 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)、20 μ M MG132、PhosStop phosphatase inhibitors) 中で溶解した。細胞溶解液を超音波処理し、20,000 g、4°Cで 10 分間遠心し、得られた上清を抗 FLAG M2 抗体 アフィニティーゲルと4°Cで2 時間イ

ンキュベートした。遠心分離で抗 FLAG M2 抗体 アフィニティーゲルを分離し、氷冷 した溶解バッファーで5回洗浄し、0.25 mg/ml FLAGペプチド(Sigma-Aldrich、St.Louis、 MO、USA)を含む 50 µl の溶解バッファーで2回溶出した。溶出したペプチドを真空 遠心で乾燥させ、55 mM ジチオスレイトールを加えて 95 °C で 5 分間煮沸することに よって還元し、10 mM ヨードアセトアミドでインキュベートしてアルキル化し、0.01% RapiGest SF を用いて 50 ng/µl のトリプシンを用いて 37°Cで一晩消化した。トリプシン 消化後、サンプルを Trifluoroacetic Acid (TFA)で酸性化し、GL-Tip GC および GL-Tip SDB を用いた固相抽出で脱塩精製した。

13. 質量分析

脱塩したトリプシン消化物を、Orbitrap Elite 装置にオンラインで結合したナノフロー ultra-HPLC (EASYnLC 1000; Thermo Fisher Scientific、Waltham、 MA、USA) で分析し た。移動相は、0.1%ギ酸溶液(溶媒 A) と 100%アセトニトリル中 0.1%ギ酸溶液(溶 媒 B) であった。ペプチドを C18 Reprosil 分析カラム(粒子径 3 µm、内径 75 µm、長 さ 12 cm; 日京テクノス、東京、日本) に直接ロードし、300 nl/分の一定流速で 150 分 間の 2 段階グラジエント(溶媒 B の 0-35%で 130 分間、35-100%で 5 分間、100%で 15 分間)を用いて分離した。イオン化には、1.6 kV の液体ジャンクション電圧と 200℃の キャピラリー温度を使用した。Orbitrap Elite 装置は、Xcalibur ソフトウェア(Thermo Fisher Scientific、Waltham、 MA、USA)を使用したデータ依存 MS/MS モードで操作 され、m/z 400 で 120,000 の分解能でサーベイスキャンが取得された。2 から4 の電荷 を持つ最も豊富なアイソトープパターン上位 10 個を、2.0 m/z の分離ウィンドウでサ ーベイスキャンから選択し、正規化コリジョンエネルギー35 で衝突誘起解離によりフ ラグメンテーションした。サーベイおよび MS/MS スキャンの最大イオン注入時間は 60ms で、イオンターゲット値はサーベイおよび MS/MS スキャンで 1e6 に設定した。

14. MS データからのタンパク質同定

Proteome Discoverer ソフトウェア(バージョン 2.2; Thermo Fisher Scientific、Waltham、 MA、USA)を使用してピークリストを作成した。MS/MS スペクトルは、SequestHT 検 索エンジンを用いて UniProt Knowledgebase(バージョン 2017_10)と検索した。プリ カーサーおよびフラグメントの質量許容差は、それぞれ 10 ppm および 0.6 Da に設定 した。メチオニン酸化、タンパク質アミノ末端アセチル化、Asn/Gln 脱アミド化、 Ser/Thr/Tyr リン酸化、Lys 側鎖のジグリシン修飾、および Cys カルバミドメチル修飾 は、データベース検索のための可変修飾として設定した。ペプチドの同定は、1%の偽 発見率でフィルターをかけた。

15. Myelodysplastic Syndromes (MDS) 細胞の RNA 配列データ解析

RNA seq データはアクセッション番号 GSE156708 から得た。MDS-Cas9 および MDS-L-Cas9-FBXO11 KO サンプルのデータは、TCC-GUI を使用し、DESeq2 推定を用いて デフォルトパラメーター(反復回数=3、FDR カットオフ=0.1、DEG 候補の排除=0.05) で再解析した。

16. 乳癌患者の RNA 配列データ解析と生存解析

生検サンプルの遺伝子発現の RNA-seq データと乳房浸潤癌(BRCA)の遺伝子発現の 生存データ生検の RNA-seq テーブルと患者の生存データは UNSC XENA (https://xenabrowser.net/datapages/)を通してアクセスした。RNA-seq の log2(x+1)変換 RSEM 正規化カウントをzスコア正規化し、各遺伝子が患者の生存と関連するかどう かを解析した。各遺伝子について、zスコア>0の患者を高発現群、zスコア<0の患 者を低発現群と定義した。全生存期間が 3650 日以上の患者は生存解析から除外した。 乳房浸潤癌患者の生存に対する FBXO11 と CIITA の相乗効果を示すために、FBXO11 のzスコアが0未満で CIITA>0の患者を「FBXO11_{low} CIITA_{high}」群と定義した。同様 に、FBXO11>0かつ CIITA<0の患者を「FBXO11_{high} CIITA_{low}」群と定義した。全生存 期間の結果は、R の survminer パッケージにより Kaplan-Meier 曲線で可視化した。

17. 相関分析

RNA-seq の log2(x+1)変換 RSEM 正規化カウントを用いて、*FBXO11 と CIITA*、または MHC クラス II との間の遺伝子発現の相関を調べた。ピアソン相関係数を用いて、 BRCA 生検サンプルにおける *FBXO11 と* MHC クラス II 遺伝子の発現の相関を評価し た。帰無仮説は p 値<0.05 で棄却された。

18. 統計解析

全ての統計解析は特に断りのない限り 3 回以上の独立した実験より得られた平均値 ±標準偏差で表示し、RNA-seq データセットの解析を除き、両側対応のない t 検定に よって行われた。p 値は、*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; n.s. 有意差なしと表記さ れ、p 値が 0.05 未満を統計学的有意差ありと判断した。

【実験結果】

1. CIITA 分解に関与する E3 リガーゼ候補の探索

まず CIITA 分解に関わるタンパク質を質量分析によって探索した。CIITA 特異的結合 タンパク質を同定するため、FLAG タグ付き CIITA を安定に発現する HeLa 細胞を樹 立した。NLR タンパク質ファミリーの構造は互いに類似しているため、比較として他 の NLR タンパク質ファミリーである NLRC5 と NOD2 を安定に発現する細胞も同時 に作製した。全細胞抽出液を抗 FLAG 抗体ビーズで免疫精製し、精製した CIITA、 NLRC5、NOD2 複合体を質量分析で解析した(図1A)。質量分析により、各タンパク 質に対する特異的結合タンパク質候補が特定された。精製された FLAG タグ付き CIITA、NLRC5、NOD2 複合体のペプチドスペクトラムマッチ (PSM) 数を比較し、最 小 PSM 数より2 倍以上の PSM 数を示したタンパク質を特異的結合タンパク質として 含めた (図 1B および表 4)。 質量分析に用いたサンプルを銀染色し、特異的結合タン パク質と推定されるタンパク質の存在を確認した(図1C)。ベイト由来のペプチドは、 それぞれの安定発現細胞で最も豊富であり、解析の妥当性が示された。同定された結 合タンパク質のうち、E3 リガーゼとして知られる FBXO11 は CIITA 結合タンパク質 としてのみ同定され、同様に、F-box タンパク質と SCF 複合体を形成する CUL1 も CIITA に対して特異的な結合を有することが認められた(Xie et al, 2019)。SKP1 に由来 するペプチドは、CIITA発現細胞ではNLRC5発現細胞やNOD2発現細胞と比較して、 特異的ではないが、CIITA 結合タンパク質中に最も多く認められた(表 4)。CIITA と FBXO11 の特異的結合を確認するために、HA タグ付き FBXO11 と FLAG タグ付き CIITA もしくは NLRC5 を HEK293T 細胞に過剰発現させた。 抗 FLAG 抗体による免疫 沈降の結果、FBXO11 は CIITA と共沈したが、NLRC5 とは共沈しなかった(図 2A)、 このことから、FBX011 と CIITA との特異的な結合が確認された。FBX011 が認識す る CIITA のドメインを決定するために、CIITA のドメイン欠失変異体の発現ベクター を作製した。それぞれの FLAG タグ付き CIITA 変異体と HA タグ付き FBXO11 の免疫 沈降により、CIITA の P/S/T ドメインが FBXO11 との結合に必要であることが明らか になった(図2B、C)。



図1. CIITA 特異的結合タンパク質の探索

(A) CIITA 結合タンパク質を同定するワークフローを示す。(B) 質量分析によって CIITA 結合タンパク質、NLRC5 結合タンパク質、NOD2 結合タンパク質を同定した。 同定されたタンパク質の数をベン図で示す。(C) 野生型および FLAG-NOD2、-CIITA、 -NLRC5 安定発現 HeLa 細胞からの全細胞タンパク質抽出物を FLAG 抗体で免疫沈降 した後にドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で 展開し、銀染色を行った。黒矢印は左からそれぞれ FLAG-NOD2、-CIITA、-NLRC5 を、 赤矢印は推定される FBXO11 を示す。

| Rank | Accession | Gene name | MOCK | CIITA | NLRC5 | NOD2 |
|------|-----------|-----------|------|-------|-------|------|
| 1 | P33076 | CIITA | | 332 | | |
| 2 | Q96T76 | MMS19 | | 44 | 2 | 7 |
| 3 | Q9NVI7 | ATAD3A | | 33 | 8 | 7 |
| 4 | Q86XK2 | FBXO11 | | 31 | | |
| 5 | P51531 | SMARCA2 | | 29 | | |
| 6 | P34931 | HSPA1L | 11 | 25 | 58 | 15 |
| 7 | Q5T9A4 | ATAD3B | | 25 | 4 | 5 |
| 8 | Q13616 | CUL1 | | 17 | 1 | |
| • | • | • | • | • | • | • |
| ٠ | ٠ | • | • | ٠ | • | ٠ |
| ٠ | • | • | ٠ | ٠ | • | • |
| 20 | P63208 | SKP1 | | 7 | 2 | 4 |
| | | | | | | |

表 4. CIITA 特異的結合タンパク質の PSMs (peptide spectrum matches)



図2. CIITA 結合タンパク質としての FBXO11 の同定

(A) HEK293T 細胞に、FLAG-CIITA または-NLRC5 発現ベクターを、HA-empty または HA-FBXO11 発現ベクターと共にトランスフェクションした。48 時間後、細胞溶 解液を抗 FLAG M2 ビーズで免疫沈降し、示された抗体を用いてイムノブロッティン グで解析した。(B) CIITA のドメイン欠失変異体の模式図を示す。(C) HEK293T 細胞 に FLAG-empty、CIITA Δ P/S/T、 Δ NACHT、 Δ 725-957、または Δ LRR 発現ベクターを HA-FBXO11 と共にトランスフェクションした。48 時間培養後細胞を回収し、抗 FLAG M2 ビーズで免疫沈降させ、示された抗体を用いてイムノブロッティングで解析した。

2. FBXO11 は CIITA 依存的 MHC-II 発現を抑制する。

FBX011 が MHC-II の転写に影響を及ぼすかどうかを調べるために、ルシフェラーゼ レポーターアッセイを行った。FBXO11 と CIITA 発現ベクターを、HLA-DRA もしく は HLA-DPA プロモーターを用いたレポーターコンストラクトと共に HEK293T 細胞 に共発現し、36時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。HLA-DRA と HLA-DPA の 両方について、CIITA が介在する MHC-II プロモーターの活性化が FBXO11 の用量依 存的に阻害された(図 3A)。しかし、FBXO11 は NLRC5 によって誘導される MHC-I プロモーターの活性化に対する影響は認められなかった(図3B)。さらに、内因性CIITA も FBXO11 によってその転写活性が抑制されるかどうか検討した。HeLa 細胞に FBXO11 発現ベクターを、HLA-DRA プロモーターを用いたレポーターコンストラク トと同時に共発現し、24時間後にインターフェロン-γ(IFN-γ)で刺激した(100 U/ml)。 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定したところ、外因性 CIITA 過剰発現の場合と同 様に、FBXO11 は IFN-γ 誘導 MHC-II プロモーター活性を用量依存的に抑制した。一 方で FBXO11 による MHC-I プロモーター活性の変化は認められなかった(図 3C)。 FBXO11 の F-box は SKP1 と結合し SCF 複合体を形成するのに必要であることか ら、FBXO11 の E3 リガーゼ活性には F-box が重要であることが示されている (Hynes-Smith *et al*, 2020; Rossi *et al.*, 2013)。FBXO11 の F-box 欠失変異体(ΔF)を作製 し、FBXO11の F-box が MHC-IIの転写活性の抑制に必要であるかどうか検討した。 CIITA と野生型 FBXO11 または ΔF 変異体 FBXO11 を HEK293T 細胞に共発現させた ところ、ΔF 変異体は CIITA を介した HLA-DRA プロモーター活性を抑制しなかった (図 4A)。さらに、野生型 FBXO11 もしくは △F 変異体 FBXO11 を HeLa 細胞に発現 させ、IFN-γ にて刺激して HLA-DRA のプロモーター活性を測定した。 ΔF 変異体 FBXO11 は IFN-y 処理によって誘導される HLA-DRA プロモーター活性の阻害効果が 認められなかったことから、FBXO11 の F-box は内因性 CIITA と外因性 CIITA の両方 の阻害に重要であることが示された(図4B)





図 3. FBXO11 による CIITA 依存性 MHC-II プロモーター活性の用量依存的検討

(A) HEK293T 細胞に、50 ng の FLAG-CIITA 発現ベクター、段階的に増加する用量 の HA-FBXO11 発現ベクター、50 ng の HLA-DRA または HLA-DPA ルシフェラーゼレ ポーターコンストラクトをトランスフェクションした。36 時間後、ルシフェラーゼ活 性を測定した。(B) HEK293T に 50 ng の FLAG-NLRC5 発現ベクター、800 ng の HA-FBXO11 発現ベクター、50 ng の HLA-A ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを トランスフェクションした。36 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。(C) HeLa 細 胞に、段階的に増加する用量の HA-FBXO11 発現ベクターと 100 ng の HLA-DRA また は HLA-A ルシフェラーゼレポーターコンストラクトをトランスフェクトした。24 時 間後、細胞を IFN-γ (500 U/mL) で 18 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。



図4. FBXO11 Δ F 変異体による CIITA 依存性 MHC-II プロモーター活性への影響 (A) HEK293T 細胞に 50 ng の FLAG-CIITA 発現ベクターと 800 ng の HA-empty、野 生型 FBXO11 または Δ F 変異体発現ベクターと 50 ng の HLA-DRA ルシフェラーゼレ ポーターコンストラクトをトランスフェクションした。36 時間後、ルシフェラーゼ活 性を測定した。(B) HeLa 細胞に、800 ng の HA-empty、野生型 FBXO11 または Δ F 変 異体発現ベクターと 100 ng の HLA-DRA ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを トランスフェクションした。24 時間後、細胞を IFN-γ (500 U/mL) で 18 時間刺激し、 ルシフェラーゼ活性を測定した。

3. FBXO11 は CIITA のタンパク量を負に制御する。

FBX011 が CIITA タンパク質レベルに影響を及ぼすかどうかを決定するために、 CIITA または NLRC5 発現ベクターとともに FBX011 をトランスフェクトした HEK293T を用いてイムノブロッティングを行った。野生型 FBX011 を CIITA と共発 現させると、CIITA のタンパク質量が低下した。しかし FBX011 は NLRC5 タンパク 質量を抑制しなかったことより、FBX011 は CIITA タンパク量を特異的に減少させる ことが示された (図 5A)。また Δ F 変異体 FBX011 は CIITA タンパク量に影響を与え なかったことから、FBX011 による CIITA タンパク量の減少は F-box 依存的であるこ とが明らかになった。

同様に、HeLa 細胞で IFN- γ 処理によって誘導された CIITA 依存性遺伝子である HLA-DRA の mRNA 発現量は、FBXO11 の過剰発現によって抑制されたが、FBXO11 の過 剰発現は HLA-A または CIITA の mRNA 発現量に影響を示さなかった(図 5B、C、 D)。そのため FBXO11 は CIITA の mRNA 転写以降の段階で、MHC-II 経路を特異的に 負に制御している。またこの効果は Δ F 変異体 FBXO11 では観察されなかったため、 FBXO11 による MHC-II の mRNA 量の減少は、F-box 依存的な機構であることがここ でも示された。

これらの観察より、FBXO11 は CIITA の mRNA ではなく、タンパク質を標的として そのタンパク量を減少させることで、MHC-II 経路を負に制御することが示唆された。 FBXO11 が CIITA タンパク量に影響を与えることをより生理的な条件下で検討した。 HeLa 細胞に FBXO11 を過剰発現させ、IFN-γ 処理して内因性 CIITA タンパク量をイム ノブロッティング法にて確認したところ、野生型 FBXO11 は内因性 CIITA タンパク量 を減少させ、FBXO11 が CIITA タンパクを標的として、タンパク量を減少させるとい う可能性がさらに支持された。(図 5E)。





С







D



CIITA

Ε



31
図 5. FBXO11 過剰発現による CIITA タンパクへの影響

(A) HEK293T 細胞に 50 ng の FLAG-CIITA 発現ベクターと 800 ng の HA-empty、野 生型 FBX011 または Δ F 変異体発現ベクターをトランスフェクションした。36 時間後、 細胞を溶解しイムノブロッティング法により示された抗体を用いて評価した。(B、C、 D) HeLa 細胞に、800 ng の HA-empty、野生型 FBX011 または Δ F 変異体発現ベクタ ーをトランスフェクションした。24 時間後、細胞を IFN-γ(500 U/mL)で 18 時間刺激 し、(B) HLA-DRA(C) HLA-A(D) CIITA の mRNA 発現量を定量 PCR によって測 定した。(E) HeLa 細胞に、800 ng の HA-empty、野生型 FBX011 または Δ F 変異体発 現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後、細胞を IFN-γ(500 U/mL)で 18 時間刺激し、細胞を溶解しイムノブロッティング法により示された抗体を用いて評価 した。

4. 誘導型 FBXO11 は容量依存的に MHC-II 経路を抑制し、免疫細胞における FBXO11 過剰発現も MHC-II 経路を負に制御する。

FBXO11 による MHC-II の負の制御をさらに確認するために、HeLa 細胞でテトラサ イクリン誘導性 FBXO11 系を確立した。この系では、ドキシサイクリンの添加によっ てその濃度依存的に FBXO11 の発現量を調整することが可能で、CIITA は依然として IFN-γ 刺激によって誘導される。ドキシサイクリンで処理すると、IFN-γ 依存的な HLA-DRA の mRNA 量が減少したが、CIITA の mRNA 量には影響が見られず、MHC-II 遺伝 子発現における FBXO11 の調節的役割がさらに支持された(図 6)。

MHC-II は主に抗原提示細胞で機能するため、免疫細胞においても FBXO11 が MHC-II の発現も負に制御するかを検討した。マウスマクロファージ由来の RAW264.7 はトランスフェクション効率が比較的高いので、実験に使用した(Cheung *et al*, 2015; Izadi *et al*, 2007)。FBXO11 の過剰発現は、非免疫細胞で確認されたように、MHC-I の mRNA 発現量には影響を与えずに MHC-II の mRNA レベルを抑制し、その抑制は酵素的に不活性な Δ F 変異体 FBXO11 では観察されなかった(図 7)。



図 6. 誘導発現型 FBXO11 による CIITA と MHC-II 発現量への影響

HeLa Tet-On FLAG-FBXO11 細胞を、IFN-γ(500 U/ml)とドキシサイクリン(0 ng、 100 ng、3 μg/ml)で同時に処理し、処理後 0、8、24、36 時間に細胞を回収して、(A) *HLA-DRA*(B)*FBXO11*(C)*CIITA*の定量 PCR によって測定した。



図 7. 免疫細胞における FBXO11 過剰発現による MHC-I、MHC-II 発現への影響 RAW264.7 細胞に、800 ng の HA-empty、野生型 FBXO11 またはΔF 変異体発現ベク ターをトランスフェクションした。24 時間後、細胞を IFN-γ(100 U/mL)で 18 時間刺 激し、(A) *H2-Aa* (B) *H2-Kb* の mRNA 発現量を定量 PCR によって測定した。

5. FBXO11 欠損 RAW264.7 細胞では MHC-II の発現が上昇した。

MHC-II 発現に対する FBXO11 の影響をさらに調べるため、CRISPR/Cas9 システムを 用いて Fbxol1 欠損 RAW264.7 細胞を作製した(図 8A) (Beucher & Cebola, 2019)。ゲノ ム配列を確認したところ、酵素的に重要な F-box をコードしているエクソン3 および 4 は大部分が欠失していた(図 8A、B) (Jiang et al, 2019; Jin et al., 2015)。Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞の遺伝子型は PCR で確認され、Fbxoll 転写産物が存在しないことは定 量 PCR で確認された(図 8B、C)。定量 PCR にて MHC-II 及び MHC-I の mRNA 発現 量を確認したところ、Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞では、IFN-γ 非存在下、存在下のど ちらにおいても MHC-II mRNA 発現が上昇していたが、MHC-I 発現には変化が認めら れなかった(図 9A)。フローサイトメトリーを用いて Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞の MHC-II と MHC-I の表面発現を検討したところ、mRNA で得られた結果と一致して、 MHC-IIの表面発現が Fbxoll 欠損細胞で上昇していたが、MHC-Iの表面発現量は変化 していなかった(図 9B、C、D、E) FBXO11 が IFN-y シグナル伝達に何らかの影響 を及ぼすかどうかを調べるため、STAT1と IRF1 のタンパク質発現レベルを評価した。 Fbxoll 野生型細胞と Fbxoll 欠損細胞の間で、IFN-yの存在下、非存在下のどちらにお いても、これらの転写因子のタンパク質レベルには明らかな差が見られなかったこと から、CIITA/MHC-II レベルにおける FBXO11 の調節的役割は、IFN-γ シグナル伝達経 路の変化によるものではないことが示された(図 10A)。 Fbxo11 欠損 RAW264.7 細胞 の表現型をレスキューするために、ヒト FBXO11 の発現ベクターを Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞に導入した。ヒト FBXO11 の isoform1 とマウス Fbxo11 の isoform2 を 比較すると、2アミノ酸の違いしかなく、高度に保存されていることから、ヒトとマウ スの FBXO11 は同様の挙動を示す可能性が高い。Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞でヒト FBXO11を過剰発現させると、WTと同レベルのMHC-II表面発現が得られたが、ΔF 変異体を導入しても表現型を回復させることはできなかった(図 10B)。そのため Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞で確認された MHC-II の発現低下は、FBXO11 によるもの であることが示され、FBXO11 が MHC-II 経路における負の制御因子であることが明 らかとなった。



図8. Fbxo11 欠損 RAW264.7 細胞株の樹立

(A) *Fbxoll ノックアウト方法の概略図。gRNA*は Exon3 と Exon4(赤矢印)にデザインし、約1.0 kb を欠失させた。黒い矢印はジェノタイピングに使用したプライマーを示す。(B) PCR による野生型 *Fbxoll*(+/+) および *Fbxoll* 欠損(-/-) RAW264.7 細胞における *Fbxoll* コード領域の遺伝子型決定。野生型では約1.3 kb、変異型では約0.3 kbの DNA が増幅された。(C) *Fbxoll* 欠損 RAW264.7 細胞において *Fbxoll* 転写産物が存在しないことを RT-PCR で確認した。内部コントロールとして *Gapdh* の発現を用いた。



図9. Fbxoll 欠損細胞における MHC-II 発現の増加

(A、B) 野生型および *Fbxol1* 欠損 RAW264.7 細胞を IFN-γ(100 U/mL)で 18 時間 処理した。(A) MHC-II (*H2-Aa*) と MHC-I (*H2-kb*)の発現を定量 PCR によって測定 した。(B-E) MHC-II と MHC-I の表面発現をフローサイトメトリーによって測定した。

(B) MHC-II と MHC-II 発現のヒストグラム (C) H2-Kb (D) H2-Aa (E) アイソタイ プコントロールの散布図



図 10. *Fbxo11* 欠損 RAW264.7 細胞における IFN-γ 経路への影響と、外来性 FBXO11 の導入による MHC-II 表面発現の変化

(A) 野生型および *Fbxol1* 欠損 RAW264.7 細胞を IFN-γ(100 U/ml)で 18 時間処理した。細胞を溶解し、示された抗体を用いたイムノブロッティング法により評価した。

(B) *Fbxo11* 欠損 RAW264.7 細胞に、800 ng の HA-empty、野生型 FBXO11、またはΔ
F 変異体発現ベクターをトランスフェクションした。MHC-II の表面発現をフローサイ
トメトリーで測定し、*Fbxo11* 野生型 RAW264.7 細胞と比較した。

6. FBXO11 欠損細胞におけるトランスクリプトーム解析

FBXOII 欠損細胞における転写変化を包括的に扱うため、骨髄異形成症候群患者から 樹立された FBXOII 野生型細胞と FBXOII 欠損 MDS-L 細胞の RNA-seq データを再分 析した(Schieber et al, 2020)。遺伝子発現のボルケーノプロットは、FBXOII 欠損が MHC-II 遺伝の発現上昇と関連していることを示したが、そのマスター制御因子である CIITA の発現変化は認められなかった(図 11A)。このことは、FBXOI1 による MHC-II 発現 の変化は CIITA 転写の後に起こることを示唆しており、FBXOI1 がタンパク質レベル で CIITA を減少させるという我々の研究結果と一致している。MHC とそのトランス アクチベーター遺伝子の発現ヒートマップでは、様々な MHC-II 遺伝子において発現 レベルの上昇が観察されたが、MHC-I、STATI、NLRC5、または CIITA では観察されな かった(図 11B)。これらの結果を総合すると、FBXOI1 は MHC-I 経路や CIITA 転写 に影響を与えることなく、MHC-II の発現を特異的に抑制することが示された。



図 11. MHC に着目した FBX011 欠損 MDS-L 細胞の RNA-seq データ再解析

(A) RNA-seq によって測定された FBXOII 欠損 MDS-L 細胞における遺伝子発現レベルのボルケーノプロット。データは倍数変化で計算し、野生型 MDS-L 細胞と比較した。2 倍以上の発現上昇は赤い点で、半分以下の発現減少は緑の点で示されている。

(B) MHC-I および MHC-II 関連遺伝子の発現を野生型 MDS-L 細胞と FBXO11 欠損 MDS-L 細胞で比較したヒートマップ。

7. FBXO11 は CIITA をユビキチン化する

これまでの結果により FBXO11 が CIITA のタンパク質レベルを抑制することが明ら かになった。FBXO11 は E3 リガーゼとして知られているため、次に FBXO11 による MHC-II 経路抑制のメカニズムが CIITA のユビキチン化に起因するかどうか検討した。 FLAG タグ付き CIITA、HA タグ付き FBXO11、His タグ付きユビキチンをそれぞれ過 剰発現させた HEK293T 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理し、抗 FLAG 抗 体による免疫沈降と抗 His 抗体によるイムノブロッティングで CIITA のユビキチン化 レベルが FBXO11 によって変化するかを評価した。CIITA のユビキチン化は FBXO11 との共導入によって促進されたが、ΔF変異体 FBXO11 は CIITA のユビキチン化状態 を変化させなかった(図12A)。より生理的な条件下で調べるため、内因性ユビキチン についても同様のユビキチン化アッセイを行った。ここでも野生型 FBXO11 の過剰発 現は CIITA のユビキチン化を増加させたが、ΔF 変異体 FBXO11 は野生型 FBXO11 ほ ど強くユビキチン化を増加させなかった(図12B)。注目すべきことに、プロテアソー ム阻害剤非存在下ではユビキチン化された CIITA は消失したため、ユビキチン化され た CIITA はおそらくプロテアソームで分解される可能性が高いことが示唆された(図 12B)。これらの結果から、FBXO11 が CIITA のユビキチン化を担う E3 リガーゼであ ると結論した。



3xHis-Ub

図 12. FBXO11 による CIITA のユビキチン化の影響

(A) HEK293T 細胞に、FLAG-CIITA と His-ubiquitin(His-Ub)の発現ベクターと、 HA-empty、野生型 FBXO11、または Δ F 変異体発現ベクターをトランスフェクション し、MG132(20µM)で6時間処理した後、細胞を回収した。細胞溶解物を1%SDS 下 で煮沸することで変性させた上で、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。サンプルをイムノ ブロッティング法により示された抗体を用いて評価した。(B) HEK293T 細胞に、FLAG-CIITA 発現ベクターと、HA-empty、野生型 FBXO11、または Δ F 変異体発現ベクター をトランスフェクションし、MG132(20µM)で6時間処理した後、細胞を回収した。 細胞溶解物を1%SDS 下で煮沸することで変性させた上で、抗 FLAG 抗体で免疫沈降 した。サンプルをイムノブロッティング法により示された抗体を用いて評価した。

8. FBXO11 は CIITA を分解する E3 リガーゼである。

次に、FBXO11 によるユビキチン化が CIITA の分解につながるかどうかを調べるた めに、シクロヘキシミドチェイスアッセイを行った。以前に報告されたように、CIITA の半減期は非常に短かったが(Schnappauf et al., 2003)、FBXO11の過剰発現により半減 期はさらに短くなった(図13A)。ここでも、ΔF変異体の過剰発現ではCIITAの半減 期の短縮を認めず、FBXO11による CIITA タンパクの分解は F-box 依存的であった。 これらの結果をさらに検証するために、Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞において CIITA の 半減期に影響があるかどうかを調べた。Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞では、CIITA の半 減期は大幅に延長され、CIITAはほとんど分解されなかった(図13B)。Fbxoll 欠損細 胞で FBXO11 を過剰発現させると、CIITA の半減期の短さは回復したが、 ΔF 変異体 FBX011 では CIITA 半減期の回復が見られなかった(図 13B)。さらに、FBX011 の過 剰発現による CIITA の分解がプロテアソーム経路によって媒介されるかどうかを調べ た。CIITA と FBXO11 の発現ベクターを HEK293T に共導入し、プロテアソーム阻害 剤 MG132 の存在下または非存在下で CIITA のタンパク質レベルを評価した。プロテ アソームの阻害は、FBXO11の過剰発現による CIITA の分解を妨げた(図 13C)。これ らの結果から、FBXO11はCIITAのユビキチン化とプロテアソーム依存的な分解を促 進することにより、CIITAのタンパク質レベルを制御していることが示された。



С



図 13. FBXO11 による CIITA のプロテアソーム依存的分解速度の変化

(A) HEK293 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、FLAG-CIITA 発現ベクターと、HAempty、野生型FBXO11、またはΔF変異体発現ベクターをトランスフェクションした。 6時間後、細胞を6ウェルプレートに分け、さらに18時間インキュベートした後、シ クロヘキシミド (CHX) を 50 µg/ml の濃度で、0、0.5、1、1.5、2 時間処理した。その 後細胞を溶解し、示された抗体を用いたイムノブロッティング法により評価した。(B) 10 cm ディッシュの野生型または Fbxoll 欠損 RAW264.7 細胞に、FLAG-CIITA 発現べ クターと HA-empty ベクターをトランスフェクションした。Fbxoll 欠損 RAW264.7 細 胞はさらに HA-野生型 FBXO11、またはΔF 変異体発現ベクターをトランスフェクシ ョンした。6時間後、細胞を6ウェルディッシュに分け、さらに18時間インキュベー トした後、シクロヘキシミド (CHX) を 100 µg/ml の濃度で、0、0.5、1、1.5、2 時間 処理した。その後細胞を溶解しイムノブロッティング法により示された抗体を用いて 評価した。グラフは、バンド強度に基づいてβ-アクチンによって正規化された CIITA タンパク質レベルの経時的変化を示している。CHX 処理 0 時間における CIITA タン パク質のバンド強度を1とした。(C) HEK293T 細胞を FLAG-CIITA と HA-empty ま たはFBXO11 発現ベクターを発現するプラスミドでトランスフェクトし、DMSO また は20 µMのMG132 で6時間処理した後、細胞を回収した。細胞を溶解しイムノブロ ッティング法により示された抗体を用いて評価した。

9. ヒト免疫細胞の FBXO11 と MHC-II の発現は負に相関する。

我々は、FBXO11 が CIITA のユビキチン化と分解に関与し、MHC-II の発現を負に制 御していることを示した。FBXO11 はヒトの様々な組織で発現しており、抗原提示に 関与する免疫細胞でも発現していることが確認された(図 14A)。これらの知見を大規 模なヒトコホートで検証するため、Immuno-Navigator データベースを用いてヒト末梢 血単核球 (PBMC) における FBXO11 と MHC-II または CIITA の発現との相関を調べた ところ、FBXO11 の発現は CIITA とは相関しなかったが、MHC-II と負の相関を示した (図 14B) (Vandenbon *et al*, 2016)。さらに、MHC-II を構成的に発現している末梢血 B

細胞やマクロファージにおいても、同様の負の相関が観察された(図 14C、D)。これ らの結果から、正常ヒト免疫細胞において FBXO11 と MHC-II の発現は負に相関する ことが明らかになった。



図 14. 正常細胞における FBX011 の発現と MHC-II 発現との負の相関

(A) 免疫細胞における *FBXO11* 発現を示す正規化 Transcripts Per Kilobase Million
(nTPM)。データは Human protein atlas RNA single cell type data
(<u>https://www.proteinatlas.org/about/download</u>) からダウンロードし、免疫細胞について解析した。(B-D)(B) PBMC(C) マクロファージおよび(D) 末梢血 B 細胞における
FBXO11 と HLA-DRA または CIITA 発現の散布図。

10. 腫瘍細胞における FBXO11 発現は MHC-II 発現と負に相関し、癌患者の予後予測 因子となる可能性がある。

癌患者における MHC-II 発現における FBXO11 の役割についても調べた。MHC-II の 異所性発現は、本来の細胞型がMHC-IIを示さない固形癌を含む様々な癌で観察され、 その高発現はしばしば良好な予後と関連している(Accolla et al, 2019; Johnson et al., 2016; Thibodeau et al., 2012)。乳癌においても、MHC-IIの発現が患者予後と関連することが 示されており、実際、我々が行った Kaplan-Meier 解析でも、MHC-II が高発現している 乳癌患者は、MHC-II が低発現している患者よりも良好な生存期間を示した(図 15A、 B) (Accolla et al., 2019; Forero et al, 2016)。CIITA の発現が高い患者も、MHC-II の発現 ほど強い関係ではなかったが、全生存期間が延長していた(図 15C)。そこで我々は、 CIITAの転写レベルに加えて、FBXOIIの発現が乳癌における MHC-IIの発現、ひいて は患者の生存に寄与しているのではないかと考えた。FBXOI1 の発現は、乳癌におい て MHC-II と負の相関を示したが、CIITA とは相関しなかった(図 16A)。患者コホー トは、各遺伝子の中央値で割った CIITA と FBXOI1 の発現レベルに基づいて、CIITAhinh FBX011low、CIITAhigh FBX011high、CIITAlow FBX011low、CIITAlow FBX011highの4群に分類 された。その結果、MHC-II 遺伝子の発現は CIITAhigh FBXOII low 群で最も高く、CIITAhow FBXOII high 群で最も低かったことから、CIITAの高発現と FBXOII の低発現が協調して MHC-II の高発現を誘導していることが示唆された(図 16B)。さらに、FBXOII の発 現に基づいて乳癌患者の Kaplan-Meier 生存解析を行った。FBXO11 の発現が低い患者 では生存期間がわずかに延長したが(図 16C)、CIITAhigh FBXOI1 low 群は CIITAhow FBXO1/high 群よりもはるかに良好な生存率を示した(図 16D)。このことから、FBXO11 と CIITA の遺伝子発現レベルは生存率に協調的に関連していることが示された。この ようなFBXOIIとCIITAの連携は、乳癌の臨床的予後の特徴として知られているHER2、 プロゲステロン受容体、エストロゲン受容体陽性の乳癌でも観察され、CIITA と FBX011 がこれらの受容体の発現状態とは無関係に予後に影響を及ぼすことが示唆さ れた (図17)。



図 15. 乳癌患者における腫瘍の MHC-II 発現と臨床転機の相関

(A) 図 15 および図 16 の解析に使用した乳癌患者コホートにおける各レセプター陽 性数と臨床病期分類を示す。(B、C)(B)MHC-II 遺伝子または(C)*CIITA*の発現高 低によって分類された乳癌患者の Kaplan-Meier 生存曲線を示す。各遺伝子について、 zスコア>0の患者を高発現群、zスコア<0の患者を低発現群と定義した。





図 16. 乳癌細胞における FBX011 の発現と MHC-II 発現との負の相関

(A) 乳癌の生検サンプルにおける RNA-seq データを用いて、log2(x+1)変換 RSEM 正 規化カウントにおける FBXOI1 と CIITA、または MHC クラス II の発現を散布図で示 した。図中にピアソン相関係数(R) と p 値を示した。データ解析には、UNSC XENA から入手した 1215 例の BRCA 生検サンプルを使用した。(B) CIITA と FBXOI1 の発 現レベルの高低の組み合わせによって分類した乳癌患者における MHC-II 遺伝子発現 を示した。(C、D)(C) FBXOI1 単独の発現高低または(C) CIITA と FBXOI1 の発現 高低の組み合わせによってグループ化された乳癌患者の Kaplan-Meier 生存曲線を示す。 各遺伝子について、z スコア>0 の患者を高発現群、z スコア<0 の患者を低発現群と 定義した。



図 17. 各受容体陽性乳癌における CIITA と FBX011 発現高低の組み合わせと患者予後の相関

(A-C)(A) プロゲステロン受容体、(B) エストロゲン受容体または(C) HER2 陽 性乳癌患者において、*CIITA と FBXOI1*の発現高低の組み合わせによってグループ化 された乳癌患者の Kaplan-Meier 生存曲線を示す。各遺伝子について、zスコア>0の患 者を高発現群、zスコア<0の患者を低発現群と定義した。

11. FBX011 と CIITA 発現量は、早期乳癌において生存率に関連するが、進行癌においては影響しない。

これまで観察された FBXOI1 と CIITA の発現量がもたらす乳癌患者予後への影響は、 臨床病期によって変化するかを検討した。興味深いことに、FBXOI1 と CIITA の発現 の組み合わせによる乳癌患者予後に対する協調的効果は、早期臨床病期(II期および II 期)の患者予後とは相関したが、進行病期(III 期および IV 期)の患者には影響を与 えなかった。この背後にある分子メカニズムを検討したが不明であったため、今後の 研究が待たれる(図18A)。最後に、潜在的な交絡因子を考慮するために、FBXOI1の 既知の基質のうち、腫瘍と関連がある基質の発現が乳癌患者の生存に影響するかどう かを検討した。その結果、BCL6、TP53、SNAI1の高発現、低発現によってグループ分 けされた乳癌患者の生存率に差は認められなかった。予後と BLIMP1の発現量との間 には緩やかな相関が認められ(図18B)、FBXOI1low BLIMP1high 群と FBXOI1high Blimp1low 群との間には予後にさらに有意な差が認められた(図18C)。乳癌と MHC における BLIMP1の役割は部分的にしか理解されていないが(Sciortino et al, 2017)、これらの観察 結果は、BLIMP1 の発現も乳癌患者の予後に関与している可能性があることを示唆し ている。これらのデータを総合すると、CIITA と FBXOI1 の発現レベルは、MHC-II の 発現と相関し、乳癌患者の予後に協調的に働くことを示している。



図 18. CIITA と FBX011 の発現高低の組み合わせと、臨床病期もしくは他の FBXO11 基質との患者予後に対する影響

(A) 各臨床病期の乳癌患者において、*CIITA と FBXOI1*の発現高低の組み合わせに よってグループ化された乳癌患者の Kaplan-Meier 生存曲線を示す。(B) 各遺伝子の発 現高低の組み合わせによってグループ化された乳癌患者の Kaplan-Meier 生存曲線を示 す。(C) *FBXOI1* と各遺伝子の発現高低の組み合わせによってグループ化された乳癌 患者の Kaplan-Meier 生存曲線を示す。各遺伝子について、z スコア>0 の患者を高発現 群、z スコア<0 の患者を低発現群と定義した。

【考察】

CIITA は1993年に発見されて以来、MHC-II 遺伝子発現のマスター制御因子として知 られている(Steimle et al., 1993)。CIITA の活性には転写調節と翻訳後調節の両方が重要 であるが、CIITA タンパク質レベルを決定する調節機構は解明されていない(León Machado & Steimle, 2021; Wright & Ting, 2006)。本研究では、プロテオミクスアプローチ を用いて CIITA との結合タンパク質をスクリーニングし、FBXO11 を CIITA の結合パ ートナーとして同定した。FBXO11 は CIITA と相互作用し、CIITA のユビキチン化と プロテアソーム依存性分解を促進する。いくつかのデータから、FBXO11が CIITAの タンパク質レベルと MHC-II の発現レベルの制御に重要な役割を果たしていることが 示された。第一に、Fbxoll 欠損細胞では CIITA の半減期の大幅な延長が観察されたこ とから、FBXO11 は CIITA の分解に重要である(図 12、13B)。第二に、FBXO11 の過 剰発現は CIITA タンパク質量を低下させ、さらに MHC-II の転写と表面発現を低下さ せた (図 3-7)。 第三に、 FBXOII 欠損細胞における MHC-II の発現は、 マウスとヒトど ちらでも有意に増加した(図9、11)。最後に、FBXO11の発現レベルと MHC-IIの発 現は、正常な血液細胞でも腫瘍細胞においても負の相関を示し、FBXO11 がこれらの 細胞における MHC-II の制御に重要な役割を果たしていることが示された(図 14、16)。 驚くべきことに、FBXO11 による制御は MHC-II に特異的であり、MHC-I との関連は 見られなかった。FBXO11 が MHC-I 発現には影響を与えずに、MHC-II を特異的に負 に制御する上で重要な役割を果たしていることが、MHC トランスアクチベーターで ある CIITA 及び NLRC5 のタンパク質レベル (図 5A、E)、MHC のプロモーター活性 (図3)、MHCのmRNA レベル(図7、図9A、図11)、MHCの表面発現レベル(図 9B、C)で観察された。このような特異性は、FBXO11 が CIITA には特異的に結合す るが、NLRC5 には結合しないことに起因すると考える(図 2A および表 4)。MHC-II 発現における FBXO11 の負の制御的役割は、我々が調べたすべてのデータで一貫して いるが、FBXO11の過剰発現による MHC-II の抑制割合は、時間経過を追った場合で も、実験対照群の半分程度であった(図3A、C、図4A、B、図2A、C、D、F、図6)。 この結果と一致して、FBXO11によってユビキチン化された CIITAの、修飾されてい ない CIITA に対する比率はそれほど高くなかった (図 12)。これらの結果は、CIITA の 一部のみが FBXO11 を介した分解経路を通して制御されている可能性があり、 FBXO11に対する耐性を付与するメカニズムが存在する可能性を示唆している。

CIITA では 3 つの領域がタンパク質の分解を担うことが示されているが、FBXO11 は P/S/T ドメインのみを介して CIITA と会合する(図 2B)。実際、P/S/T ドメインを欠 失させると、FBXO11 と結合できなくなる CIITA タンパク質の量が増加した(図 2B)。 これは、FBXO11 が P/S/T ドメインに存在するデグロンを認識することにより、CIITA の分解を担う E3 リガーゼとして機能していることを示している。CIITA の AAD とア イソフォーム III のN 末端最初の10アミノ酸を含む他の2つの領域もCIITAの分解に 関与しているが、本研究によって FBXO11 を介した P/S/T ドメインによる分解が、 CIITA タンパク量においてより決定的な経路であることが示唆された(図2C、図13B) (Beaulieu *et al.*, 2016; Bhat *et al.*, 2010; Schnappauf *et al.*, 2003)。実際、野生型細胞において CIITA isoform III はシクロヘキシミドを用いたタンパク質半減期アッセイにて急速に 分解されたが、Fbxo11 欠損細胞において CIITA は非常に緩やかな速度で分解された (図13B)。我々はCIITA を介した MHC-II の発現制御について、以下のモデルを提案 する。CIITA の発現レベルは主に転写調節と翻訳後調節によって調節される。転写ア ップレギュレーションは、主に IFN-γ によって誘発される STAT1 依存性の炎症性サイ トカインシグナルによって媒介される(Meraz *et al.*, 1996)。そして FBXO11 依存的な分 解を含む複数の修飾がCIITA 上で行われ、CIITA タンパク質のレベルを制御している。 FBXO11 の発現が低い細胞では、翻訳された CIITA は緩やかな分解を受けることによ って、MHC-II の高発現に繋がる(図19 左)。しかし、FBXO11 の発現量が多い細胞で は、CIITA はユビキチンを介した急速な分解を受け、MHC-II の発現量が低くなる(図

19右)。



FBXO11 low expression

FBXO11 high expression

図 19. FBXO11 による CIITA-MHC-II 経路の制御の模式的モデル

(左) FBXO11 低発現細胞では、CIITA の分解速度は遅く、高い MHC-II の表面発現を可能にする。(右) FBXO11 高発現細胞では、CIITA は急速に分解され、CIITA を介した MHC -II の表面発現が減少する。

MHC-II 依存的抗原提示経路の制御における FBXO11 の阻害的役割に基づいて、 FBXO11 依存的 CIITA のユビキチン化機構の生物学的意義が以下のように推察される。 MHC-II の発現は、一般に、CD4+ T 細胞への効率的な抗原提示を行うために、感染 時や炎症時に炎症性サイトカインを通じて上昇する(Thibodeau *et al.*,2012)。感染や炎症 が治まれば、免疫応答は定常状態のホメオスタシスレベルに戻る必要性があるが、 FBXO11 による CIITA の分解を介した迅速な負の制御機構は、この目的のために進化 したのではないかと考察する。また不要になった MHC-II の過剰発現を抑制すると同 時に宿主防御に十分なレベルの MHC-II 発現を維持するために、CIITA に FBXO11 抵 抗性を付与する機構が成立することで、CIITA の安定性を維持するように進化した可 能性も推測される(図 19)。

FBX011 と癌患者の生存率との相関も観察された(図 16)。MHC-II の異所性発現は、 通常は MHC-II 発現が存在しない複数の固形癌で観察される。このような MHC-II 発 現の役割は解明されていないが、腫瘍特異的 MHC-II (ts-MHC-II: tumor cell-specific MHC-II)と呼ばれる腫瘍における MHC-II 発現は、様々な腫瘍型において癌免疫にお いて重要な役割の一端を担っており、ts-MHC-IIの高発現は良好な予後や免疫チェック ポイント阻害剤に対する反応性と関連していることが提唱されている(Accolla et al., 2019; Axelrod et al., 2019; Johnson et al., 2016; Thibodeau et al., 2012), BCL6, p53, SNAIL1, BLIMP1 などの腫瘍関連タンパク質は FBXO11 の基質として知られているが、癌にお ける FBXO11 の役割はまだ明らかでない(Bagger et al, 2018; Fan et al, 2019; Jin et al., 2015; Schieber *et al.*, 2020; Shao *et al*, 2020; Sun *et al*, 2018; Xue *et al*, 2016; Yang *et al*, 2015)。 これ らの FBXO11 の基質と乳癌患者の生存率との関係を検討したところ、BCL6、TP53、 SNAII の発現レベルは全生存率に影響を及ぼさないことが明らかになった(図 18B)。 BLIMP1の発現量が高い患者は、生存期間において有利であったことから、FBXO11の 影響の一部は BLIMP1 によって媒介されている可能性が示唆されたが、BLIMP1 の発 現量の影響は MHC-II によるものよりも小さかった。乳癌の Kaplan-Meier 生存率のデ ータは、MHC-II 発現とともに、FBXO11 と CIITA の発現レベルの組み合わせが乳癌患 者の予後バイオマーカーとして有用となりうる可能性があることを示している(図 $16)_{\circ}$

【結論】

- 1. 本研究全体から得られた新知見
 - CIITA、NLRC5、NOD2 に対する結合分子を探索し、CIITA 特異的な結合分子候補として 46 個、NLRC5 特異的な結合分子候補として 94 個、NOD2 特異的な結合分子候補として 265 個のタンパク質を得た。
 - CIITA に対する新規結合分子として E3 リガーゼである FBXO11 を同定した。
 - FBXO11 は CIITA の P/S/T ドメインを認識する E3 リガーゼである。
 - FBX011 は CIITA をユビキチン化し、プロテアソーム依存的な分解を誘導する。
 - FBXO11 は CIITA の半減期に対して決定的な役割を果たす。
 - ヒト正常組織、腫瘍組織の両者において FBXO11 発現量は MHC-II 発現量と 負の相関を示した。
 - FBXO11 と CIITA の発現高低の組み合わせは MHC-II 表面発現と強く相関する。
 - FBX011 と CIITA の発現高低の組み合わせは早期乳癌患者の予後と相関がある。

2. 新知見の意義

我々は FBXO11 が CIITA の真の E3 リガーゼであることを同定した。FBXO11 は、 CIITA タンパク質レベルを決定することにより、MHC-II の発現制御に重要な役割を果 たしている。これによって MHC-II 発現のマスター制御因子である CIITA のタンパク レベルの制御が初めて明らかとなった。FBXO11 と CIITA の発現高低の組み合わせは 乳癌患者の予後と相関が観察され、乳癌のバイオマーカーや治療標的となり得る可能 性がある。

3. 今後の研究展開と課題

本研究により得られた結果に基づいて、以下の研究を検討している。

① FBXO11 による MHC-II 抑制メカニズムの生理的意義の検討

本研究において FBXO11 が CIITA をユビキチン化し、分解に導くことが明らか となったが、このシステムの生理的意義の検討が必要と考えられる。具体的には FBXO11 欠損マウスを作成し、MHC-II 発現量の確認、免疫細胞の分化や感染防御 能の評価、また自己免疫疾患感受性を検討する。 ② FBXO11 による CIITA 認識の詳細機構の解明

本研究によって FBXO11 が CIITA の P/S/T ドメインを認識して分解に導くこと が明らかとなったが、その詳細な認識メカニズムの検討が必要と考えられる。 CIITA の P/S/T ドメインのうち、どの配列や構造を認識しているかを部位特異的変 異導入によって絞り込む。また FBXO11 がどのドメインを用いて CIITA を認識し ているかも、同様に FBXO11 ドメイン欠失変異体を作製して決定する。

③ CIITA のユビキチン化部位の同定

本研究によってFBXO11がCIITAをユビキチン化することが明らかとなったが、 そのユビキチン化部位はまだ未解明である。質量分析によって CIITA のユビキチン化部位を網羅的に探索し、ユビキチン化の候補残基を部位特異的変異導入によって変異導入し、FBXO11によるユビキチン化を評価する。

④ ヒトにおける FBXO11 や CIITA の発現量、SNP による免疫関連疾患への影響の評価

本研究によって FBXO11 が MHC-II の負の制御因子であることが明らかになった。また腫瘍細胞おいて FBXO11 と CIITA の発現高低の組み合わせが乳癌患者の 予後と相関が見られることを示したが、自己免疫疾患などの免疫関連疾患におけ る FBXO11-CIITA-MHC-II 経路の役割はまだ未解明である。FBXO11 の発現量や CIITA の FBXO11 認識部位における変異が、MHC-II に関連する自己免疫疾患にど のような影響を与えるか、患者検体データを解析することによって解明する。

【謝辞】

本研究を行い、学位論文をまとめるにあたり、北海道大学 大学院 医学研究院・病 理系部門 微生物学免疫学分野 免疫学教室 教授 小林弘一先生、北海道大学 大学院 医学研究院・生理系部門 生化学分野 医化学教室 教授 畠山鎮次先生より多くのご支 援とご指導を賜りました。ここに深謝致します。また学部生の頃から実験や研究手法 をご指導いただきました北海道大学 大学院 医学研究院・生理系部門 生化学分野 医 化学教室 講師 渡部昌先生、大学院1年目にご指導いただきました Kyungpook National University Assistant Professor である Ji-Seung Yoo 先生に深くお礼申し上げます。アステ ラス製薬株式会社 研究員 應田涼太先生、北海道大学 大学院 医学研究院・病理系部 門 微生物学免疫学分野 免疫学教室 助教 田中努先生を始めとする同教室員の皆様に も重ねてお礼申し上げます。

本研究の一部は、日本学術振興会 科学研究費助成事業(19K21250、20K21511、 22H0288302、22KK011202、19K1668109、22K19415)、日本医療研究開発機構

(JP223fa627005)、武田科学振興財団、ブリストル・マイヤーズ スクイブ、先進医薬研究振興財団、日立財団、小林財団、東洋水産財団による助成により遂行されました。 また本研究の遂行にあたり、公益財団法人武田科学振興財団には医学部博士課程奨学 助成によってご支援いただきました。ここに感謝申し上げます。

最後に、私のことを何でも支えていただき、ここまで育て上げていただいた祖母、 両親、家族に心より感謝いたします。

【利益相反】

開示すべき利益相反はない。

【参考文献】

Abbas T, Mueller AC, Shibata E, Keaton M, Rossi M, Dutta A (2013) CRL1-FBXO11 promotes Cdt2 ubiquitylation and degradation and regulates Pr-Set7/Set8-mediated cellular migration. *Mol Cell* 49: 1147-1158

Abida WM, Nikolaev A, Zhao W, Zhang W, Gu W (2007) FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 282: 1797-1804

Accolla RS, Ramia E, Tedeschi A, Forlani G (2019) CIITA-Driven MHC Class II Expressing Tumor Cells as Antigen Presenting Cell Performers: Toward the Construction of an Optimal Antitumor Vaccine. *Front Immunol* 10: 1806

Axelrod ML, Cook RS, Johnson DB, Balko JM (2019) Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer. *Clin Cancer Res* 25: 2392-2402

Bagger SO, Hopkinson BM, Pandey DP, Bak M, Brydholm AV, Villadsen R, Helin K, Rønnov-Jessen L, Petersen OW, Kim J (2018) Aggressiveness of non-EMT breast cancer cells relies on FBXO11 activity. *Mol Cancer* 17: 171

Beaulieu YB, Leon Machado JA, Ethier S, Gaudreau L, Steimle V (2016) Degradation, Promoter Recruitment and Transactivation Mediated by the Extreme N-Terminus of MHC Class II Transactivator CIITA Isoform III. *PLoS One* 11: e0148753

Beucher A, Cebola I, 2019. One-step dual CRISPR/Cas9 guide RNA cloning protocol.

Bhat KP, Truax AD, Greer SF (2010) Phosphorylation and ubiquitination of degron proximal residues are essential for class II transactivator (CIITA) transactivation and major histocompatibility class II expression. *J Biol Chem* 285: 25893-25903

Cheung ST, Shakibakho S, So EY, Mui AL (2015) Transfecting RAW264.7 Cells with a Luciferase Reporter Gene. *J Vis Exp*: e52807

Duan S, Cermak L, Pagan JK, Rossi M, Martinengo C, di Celle PF, Chapuy B, Shipp M, Chiarle R, Pagano M (2012) FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas. *Nature* 481: 90-93

Fan B, Wang W, Zhang X, Sun M, Wang X, Chen Z, Liu W, Wang Q, Yu N, Li X (2019) Prevalence and prognostic value of FBXO11 expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 19: 534

Forero A, Li Y, Chen D, Grizzle WE, Updike KL, Merz ND, Downs-Kelly E, Burwell TC, Vaklavas C, Buchsbaum DJ *et al* (2016) Expression of the MHC Class II Pathway in Triple-Negative Breast Cancer Tumor Cells Is Associated with a Good Prognosis and Infiltrating Lymphocytes. *Cancer Immunol Res* 4: 390-399

Greer SF, Harton JA, Linhoff MW, Janczak CA, Ting JP, Cressman DE (2004) Serine residues 286, 288, and 293 within the CIITA: a mechanism for down-regulating CIITA activity through phosphorylation. *J Immunol* 173: 376-383

Greer SF, Zika E, Conti B, Zhu XS, Ting JP (2003) Enhancement of CIITA transcriptional function by ubiquitin. *Nat Immunol* 4: 1074-1082

Gregor A, Sadleir LG, Asadollahi R, Azzarello-Burri S, Battaglia A, Ousager LB, Boonsawat P, Bruel AL, Buchert R, Calpena E *et al* (2018) De Novo Variants in the F-Box Protein FBXO11 in 20 Individuals with a Variable Neurodevelopmental Disorder. *Am J Hum Genet* 103: 305-316

Harper JW, Schulman BA (2021) Cullin-RING Ubiquitin Ligase Regulatory Circuits: A Quarter Century Beyond the F-Box Hypothesis. *Annu Rev Biochem* 90: 403-429

Horn M, Geisen C, Cermak L, Becker B, Nakamura S, Klein C, Pagano M, Antebi A (2014) DRE-1/FBXO11-dependent degradation of BLMP-1/BLIMP-1 governs C. elegans developmental timing and maturation. *Dev Cell* 28: 697-710

Hynes-Smith RW, Wittorf KJ, Buckley SM (2020) Regulation of Normal and Malignant Hematopoiesis by FBOX Ubiquitin E3 Ligases. *Trends Immunol* 41: 1128-1140

Izadi H, Motameni AT, Bates TC, Olivera ER, Villar-Suarez V, Joshi I, Garg R, Osborne BA, Davis RJ, Rincón M *et al* (2007) c-Jun N-terminal kinase 1 is required for Toll-like receptor 1 gene expression in macrophages. *Infect Immun* 75: 5027-5034

Jiang C, Trudeau SJ, Cheong TC, Guo R, Teng M, Wang LW, Wang Z, Pighi C, Gautier-Courteille

C, Ma Y *et al* (2019) CRISPR/Cas9 Screens Reveal Multiple Layers of B cell CD40 Regulation. *Cell Rep* 28: 1307-1322.e1308

Jin Y, Shenoy AK, Doernberg S, Chen H, Luo H, Shen H, Lin T, Tarrash M, Cai Q, Hu X *et al* (2015) FBXO11 promotes ubiquitination of the Snail family of transcription factors in cancer progression and epidermal development. *Cancer Lett* 362: 70-82

Johnson DB, Estrada MV, Salgado R, Sanchez V, Doxie DB, Opalenik SR, Vilgelm AE, Feld E, Johnson AS, Greenplate AR *et al* (2016) Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun* 7: 10582

Kambayashi T, Laufer TM (2014) Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol* 14: 719-730

León Machado JA, Steimle V (2021) The MHC Class II Transactivator CIITA: Not (Quite) the Odd-One-Out Anymore among NLR Proteins. *Int J Mol Sci* 22

Li G, Harton JA, Zhu X, Ting JP (2001) Downregulation of CIITA function by protein kinase a (PKA)-mediated phosphorylation: mechanism of prostaglandin E, cyclic AMP, and PKA inhibition of class II major histocompatibility complex expression in monocytic lines. *Mol Cell Biol* 21: 4626-4635

Liu C, Chen X, Zhang L, Liu J, Li C, Zhao J, Pu J, Tang P, Liu B, Huang X (2022) F-Box Protein 11 Suppresses Cell Proliferation and Aerobic Glycolysis in Glioblastomas by Mediating the Ubiquitin Degradation of Cdc25A. *J Neuropathol Exp Neurol* 81: 511-521

Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Zufferey M, Steimle V, Reith W (2000) CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 14: 1156-1166

Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D *et al* (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84: 431-442
Morgan JE, Shanderson RL, Boyd NH, Cacan E, Greer SF (2015) The class II transactivator (CIITA) is regulated by post-translational modification cross-talk between ERK1/2 phosphorylation, mono-ubiquitination and Lys63 ubiquitination. *Biosci Rep* 35

Muhlethaler-Mottet A, Otten LA, Steimle V, Mach B (1997) Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J* 16: 2851-2860

Nash G, Paidimuddala B, Zhang L (2022) Structural aspects of the MHC expression control system. *Biophys Chem* 284: 106781

Nickerson K, Sisk TJ, Inohara N, Yee CS, Kennell J, Cho MC, Yannie PJ, Nunez G, Chang CH (2001) Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. *J Biol Chem* 276: 19089-19093

Piskurich JF, Linhoff MW, Wang Y, Ting JP (1999) Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* 19: 431-440

Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM (2005) Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 5: 793-806

Rossi M, Duan S, Jeong YT, Horn M, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Antebi A, Pagano M (2013) Regulation of the CRL4(Cdt2) ubiquitin ligase and cell-cycle exit by the SCF(Fbxo11) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 49: 1159-1166

Schieber M, Marinaccio C, Bolanos LC, Haffey WD, Greis KD, Starczynowski DT, Crispino JD (2020) FBXO11 is a candidate tumor suppressor in the leukemic transformation of myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer J* 10: 98

Schnappauf F, Hake SB, Camacho Carvajal MM, Bontron S, Lisowska-Grospierre B, Steimle V (2003) N-terminal destruction signals lead to rapid degradation of the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA. *Eur J Immunol* 33: 2337-2347

Sciortino M, Camacho-Leal MDP, Orso F, Grassi E, Costamagna A, Provero P, Tam W, Turco E, Defilippi P, Taverna D *et al* (2017) Dysregulation of Blimp1 transcriptional repressor unleashes p130Cas/ErbB2 breast cancer invasion. *Sci Rep* 7: 1145

Shao L, Zhang X, Yao Q (2020) The F-box protein FBXO11 restrains hepatocellular carcinoma stemness via promotion of ubiquitin-mediated degradation of Snail. *FEBS Open Bio* 10: 1810-1820

Spilianakis C, Papamatheakis J, Kretsovali A (2000) Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 20: 8489-8498

Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75: 135-146

Sun C, Tao Y, Gao Y, Xia Y, Liu Y, Wang G, Gu Y (2018) F-box protein 11 promotes the growth and metastasis of gastric cancer via PI3K/AKT pathway-mediated EMT. *Biomed Pharmacother* 98: 416-423

Swatek KN, Komander D (2016) Ubiquitin modifications. Cell Res 26: 399-422

Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Lapointe R (2012) Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 1: 908-916

Tosi G, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM (2002) Phosphorylation of CIITA directs its oligomerization, accumulation and increased activity on MHCII promoters. *EMBO J* 21: 5467-5476

Tracz M, Bialek W (2021) Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination. *Cell Mol Biol Lett* 26: 1

Vandenbon A, Dinh VH, Mikami N, Kitagawa Y, Teraguchi S, Ohkura N, Sakaguchi S (2016) Immuno-Navigator, a batch-corrected coexpression database, reveals cell type-specific gene networks in the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E2393-2402 Wright KL, Ting JP (2006) Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes. *Trends Immunol* 27: 405-412

Xie J, Jin Y, Wang G (2019) The role of SCF ubiquitin-ligase complex at the beginning of life. *Reprod Biol Endocrinol* 17: 101

Xu P, Scott DC, Xu B, Yao Y, Feng R, Cheng L, Mayberry K, Wang YD, Bi W, Palmer LE *et al* (2021) FBXO11-mediated proteolysis of BAHD1 relieves PRC2-dependent transcriptional repression in erythropoiesis. *Blood* 137: 155-167

Xue J, Chi Y, Chen Y, Huang S, Ye X, Niu J, Wang W, Pfeffer LM, Shao ZM, Wu ZH *et al* (2016) MiRNA-621 sensitizes breast cancer to chemotherapy by suppressing FBXO11 and enhancing p53 activity. *Oncogene* 35: 448-458

Yang CH, Pfeffer SR, Sims M, Yue J, Wang Y, Linga VG, Paulus E, Davidoff AM, Pfeffer LM (2015) The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis. *J Biol Chem* 290: 6037-6046

Zheng H, Shen M, Zha YL, Li W, Wei Y, Blanco MA, Ren G, Zhou T, Storz P, Wang HY *et al* (2014) PKD1 phosphorylation-dependent degradation of SNAIL by SCF-FBXO11 regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Cell* 26: 358-373

Zheng N, Shabek N (2017) Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem* 86: 129-157