



Title	MHC class IIタンパク質発現を制御するユビキチンリガーゼの機能解析
Author(s)	井上, 綾乃
Description	配架番号 : 2749
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15431号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15431
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89964
Type	doctoral thesis
File Information	INOUE_Ayano.pdf



学位論文

MHC class II タンパク質発現を制御する
ユビキチンリガーゼの機能解析

(Functional analysis of a ubiquitin ligase
that regulate MHC class II expression)

2023年3月

北海道大学

井上 綾乃

学位論文

MHC class II タンパク質発現を制御する
ユビキチンリガーゼの機能解析

(Functional analysis of a ubiquitin ligase
that regulate MHC class II expression)

2023年3月

北海道大学

井上 綾乃

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	11 頁
結果	27 頁
考察	41 頁
結論	45 頁
謝辞	47 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 頁

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。

1 . Ayano Inoue, Masashi Watanabe, Takeshi Kondo, Satoshi Hirano and Shigetsugu Hatakeyama: TRIM22 negatively regulates MHC-II expression. BBA-Molecular Cell Research, 1869 • 119318, (2022)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1.井上綾乃、渡部昌、近藤豪、平野聡、畠山鎮次
MHC タンパク質発現を制御するユビキチンリガーゼの機能解析
第56回日本生化学会北海道支部例会、2019年7月19日・北海道大学獣医学部講堂

要旨

【背景と目的】近年、がん治療は目覚ましい発展を遂げ、中でも免疫チェックポイント阻害療法が注目されている。その治療効率を高めるために、がん細胞において主要組織適合抗原 (Major histocompatibility complex : MHC) class II 量を上昇させ、CD4⁺ T 細胞を活性化させることが重要であるとわかってきた。MHC class II は通常、マクロファージや樹状細胞 (Dendritic cell: DC)、B 細胞などの特定の細胞でのみ定常的に発現しているが、IFN γ 刺激が加わると多くの細胞に発現誘導される。一方、RING 型ユビキチンリガーゼのサブファミリーである Tripartite motif-containing (TRIM) ファミリーは、さまざまなウイルスに対して防御的に働くことが知られており、そのメカニズムの多くは自然免疫の制御を介しているものと理解されており、獲得免疫との関連についてはあまり焦点が当てられてこなかった。さらに、IFN γ シグナルが MHC 分子の発現を制御している一方で、多くの TRIM タンパク質もまた IFN γ シグナルによって発現制御を受けていることから、IFN γ シグナルは TRIM タンパク質を介して MHC 分子の発現を制御する可能性が考えられた。MHC の発現制御に関するこれまでの研究では、そのマスター遺伝子である **NLR family member NOD-, LRR-, and CARD- containing 5 (NLRC5)**や **class II transactivator (CIITA)**に焦点が置かれ、これらがメインの制御機構と考えられていたが、転写後の過程における制御機構についてはあまり注目されてこなかった。以上を踏まえて本研究では、IFN γ 刺激によって誘導される TRIM ファミリー遺伝子を網羅的に探索し、TRIM ファミリータンパク質が MHC class II 抗原提示を調節する可能性について検討することとした。

【材料と方法】網羅的な TRIM 遺伝子群の mRNA の検証および MHC class II 関連因子の mRNA の検証について、リアルタイム PCR 法で解析を行った。レトロウイルスを用いて TRIM22 を過剰発現する U87MG 細胞、あるいは CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトした U87MG 細胞を作製し、ウェスタンブロット法で細胞内タンパク質量、フローサイトメトリー法で細胞表面タンパク質量、蛍光免疫染色法で細胞内・細胞表面双方のタンパク質量について解析を行った。MHC class II タンパク質の分解速度を測定するために、Cycloheximide を用いた分解アッセイを行った。TRIM22 過剰発現 HEK293T 細胞を作製し、免疫沈降・質量分析法により結合タンパク質の網羅的な検索を行った。

【結果】HEK293T 細胞と U87MG 細胞を IFN γ で刺激後、TRIM 遺伝子群の mRNA レベルをリアルタイム PCR 法により網羅的に検証した結果、特に TRIM22 が IFN γ

刺激により最も強く発現上昇していることが明らかとなったため、主に TRIM22 に着目して以降の実験を進めることとした。TRIM22 過剰発現 U87MG 細胞を用いたウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法により、MHC class II の細胞内タンパク質量や細胞表面発現量が大きく減少していることが明らかとなった。一方 IFN γ 刺激で TRIM22 に次いで発現が上昇した TRIM21 を過剰発現する U87MG 細胞では、MHC class II タンパク質量に変動は見られなかった。さらに、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞を用いたウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法、蛍光免疫染色法により、MHC class II の細胞内タンパク質量や細胞表面発現量が増加することが明らかとなった。その一方でリアルタイム PCR 法では、MHC class II ならびに、そのマスター制御因子である CIITA の mRNA 量は TRIM22 による影響を受けていなかった。Cycloheximide を用いた分解アッセイでは TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞において MHC class II タンパク質は不安定化しており、TRIM22 はむしろ MHC class II の分解を抑制していることが明らかとなった。また質量分析では TRIM22 と mTOR、mTOR 複合体構成因子である Raptor、Rictor、G β L との結合が認められた。

【考察】 TRIM22 による MHC class II 発現量の制御は、少なくとも CIITA による転写制御を介していないことが示された。加えて、cycloheximide を用いた分解アッセイでも MHC class II タンパク質の分解を促進することではなく、TRIM22 は翻訳の過程で MHC class II を制御している可能性が考えられた。翻訳の過程で、開始段階を制御している翻訳開始因子 eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) は、eIF4G、eIF4A とともに、eIF4F と呼ばれる複合体を形成してキャップ依存的翻訳を開始する。mTOR を含む分子複合体 mTORC1 はこのキャップ依存的翻訳を促進するが、TRIM22 は mTOR 複合体と結合することから、mTOR/4E-BP1/eIF4E 経路を介して MHC class II の mRNA 翻訳を調節する可能性が示唆された。近年注目を集めている免疫チェックポイント阻害療法が効果を発揮するためには、CD4⁺T 細胞の活性化も重要であることが明らかになってきた。抗原を CD4⁺T 細胞に提示する MHC class II が発現しているがん細胞では、その発現量と免疫チェックポイント阻害療法の効果の間には正の相関があることが示唆されており、がん細胞において MHC class II 量を上昇させることが治療戦略として注目されている。TRIM22 阻害により MHC class II 量を上昇させることが可能であることから、TRIM22 は免疫チェックポイント阻害療法における潜在的な創薬標的となるものと考えられる。留意しなければならない点として、TRIM22 過剰発現細胞において、TRIM58 や TRIM54、TRIM50 など、いくつかの他の TRIM 遺伝子発現が増強していたことが挙げられる。TRIM22 過剰発現による MHC class II 発現減少が他の TRIM ファミリー遺伝子の発現変動を介して影響を及ぼしている可能性については今後の検討課題であると考えられた。

【結論】TRIM タンパク質の一つである TRIM22 が、MHC class II の発現量を負に制御することを発見した。これまで多くの自己免疫疾患やがんにおいて、抗原提示メカニズム、特に T 細胞の関与が明らかにされている。MHC class II 分子は CD4 と結合し T 細胞を活性化させることから、今後、TRIM22 の機能を活性化あるいは抑制することによる、自己免疫疾患やがんに対する治療法の開発が期待できる。とりわけ免疫チェックポイント阻害療法において、TRIM22 がよい創薬標的となりうると考えられた。

略語表

APC	antigen-presenting cell
APS	ammonium peroxodisulfate
BPB	Bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CHX	Cycloheximide
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4
CIITA	class II transactivator
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
E1	ubiquitin-activating enzyme
E2	ubiquitin-conjugating enzyme
E3	ubiquitin ligase
ECL	enhanced chemiluminescence
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
FBS	fetal bovine serum
HAT	histone acetyltransferase
HEK293T	human embryonic kidney 293T
IFN γ	interferon γ
MARCH1	Membrane-associated RING-CH-1
MEM	Minimum Essential Medium
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programed cell death-1
PRR	pattern recognition receptor
stat50	stimulated transacting factor 50 kDa
STAT1	signal transducers and activators of transcription 1
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte.
TRIM	tripartite motif
WCL	whole cell lysate

緒言

1 抗原提示メカニズム

獲得免疫の応答は、MHC による T 細胞への抗原ペプチドの提示から始まる。MHC は、MHC class I と MHC class II に大別され、それぞれ異なる役割を担っているが、いずれもユビキチン化によって深く制御されている (Hershko and Ciechanover, 1998)。細胞内においてユビキチン・プロテアソーム系で分解されるタンパク質は、その一部が小胞体に輸送され、MHC class I 上に抗原ペプチドとして提示されて CD8⁺T 細胞を介した細胞性免疫応答に必須の役割を果たしている。外来性の抗原は、細胞外からエンドサイトーシス経路で取り込まれ、リソソーム内でペプチド断片へと分解され、MHC class II 上に抗原ペプチドとして提示される。一方、オルガネラ由来のタンパク質を含む細胞内タンパク質は、その多くがエンドサイトーシスによって取り込まれ抗原提示されるが、一部はオートファジーによって分解を受けて小胞体に入り、MHC class II 上に抗原ペプチドとして提示される。

2 MHC class II

MHC class II の発現は、マスター制御因子である CIITA によって制御されている (Choi et al., 2011; Romieu-Mourez et al., 2007; van den Elsen, 2011)。CIITA は MHC class II プロモーター上でヒストンアセチル化酵素などのクロマチン修飾因子をリクルートし MHC class II mRNA の転写を活性化する coactivator として機能する (Spilianakis et al., 2000)。また MHC class II は種々のサイトカインによって発現が誘導されることも知られており、特に IFN γ がよく研究されている (Romieu-Mourez et al., 2007)。IFN γ は IFN γ 受容体に結合し、下流の STAT1 のチロシン残基のリン酸化を誘導する。リン酸化された STAT1 ホモ二量体は核に移動して CIITA プロモーター上の GAS 配列と結合し、CIITA mRNA の転写を促し、発現した CIITA がさらに MHC class II の発現を誘導する (Morris et al., 2002; Reith et al., 2005; Wright and Ting, 2006)。MHC class II は、それぞれ膜貫通ドメインをもつ α 鎖と β 鎖からなるヘテロ二量体である。翻訳後に α 鎖および β 鎖はリボソームから小胞体に移動し、シャペロンタンパク質であるインバリアント鎖(Ii)と複合体を形成する。この MHC class II-Ii 複合体はゴルジ体を経て細胞膜へと輸送された後にエンドサイトーシスされ、後期エンドソーム様の細胞内小胞である MHC class II antigen processing compartment (MIIC) へと小胞輸送される。また、Ii は MHC class II と結合することにより CLIP

と呼ばれる領域で抗原結合部位を物理的に塞ぎ、内在性のペプチドが **MIIC** への輸送過程で **MHC class II** に結合するのを防いでいるが、**Ii** はエンドソームに存在するプロテアーゼにより **CLIP** 領域以外の多くの部分が分解され、**MHC class II-Ii** 複合体は **MHC class II-CLIP** となる。一方、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた抗原タンパク質も同様に小胞輸送により **MIIC** へと輸送されるが、この過程でエンドソームのプロテアーゼによって分解され、断片化されたペプチドとなる。**MIIC** では、それまで **MHC class II** 上にあった **CLIP** とこの抗原ペプチドが置き換わる形で交換されることにより、**peptide-MHC class II** 複合体が形成され、そのまま細胞表面へと輸送されて抗原が提示される。**peptide-MHC class II** 複合体は細胞表面に輸送された後、細胞内へエンドサイトーシスされてリソソームで分解されるか、あるいは、リサイクリングエンドソームを通過して再び細胞表面へと輸送されてリサイクルされるが、この分解とリサイクルのバランスによって細胞表面の **MHC class II** の発現量が変化すると考えられている (Moldenhauer et al., 1999)。

3 ユビキチンリガーゼ

ユビキチンはタンパク質翻訳後修飾分子であり、真核生物において高度に保存された 76 残基のアミノ酸からなる (Hershko and Ciechanover, 1998)。ユビキチン化修飾は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) の 3 つの酵素によって触媒され、標的タンパク質のリジン残基にユビキチンのカルボキシル末端がイソペプチド結合することによって完成する。ユビキチンはユビキチン自身のリジン残基やアミノ末端にイソペプチド結合することが知られており、ポリユビキチン鎖を形成することが可能である。このうち、ユビキチンの 48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖はプロテアソームによるタンパク質の分解を誘導する。一方、他のリジン残基を介したポリユビキチン鎖は、様々なシグナルとして機能することが報告されている。ヒトのゲノム遺伝子上において E3 は 600 種類以上コードされており、E1 (2 種) または E2 (30 数種) と比較して突出した多様性を有している。E3 が基質認識を司っていると考えられているため、どの標的をユビキチン化するかどうかについて E3 が決定的な役割を果たしていると考えられる。

4 Tripartite motif ファミリータンパク質 (TRIM タンパク質)

E3 はその構造的特徴から HECT 型、RBR 型および RING 型の 3 つのグループに大別することができるが、中でも RING 型が E3 酵素群の約 95% を占めている。RING 型 E3 のサブファミリーとして TRIM ファミリータンパク質が知られており、ヒトで

は 80 種類以上の遺伝子が存在する (Ozato et al., 2008)。TRIM タンパク質は、RING ドメインのほか、1 つないし 2 つの B-box ドメイン、Coiled-coil ドメインを持つ。これら 3 つのドメインは TRIM タンパク質のアミノ末端側に共通して存在するが、カルボキシル末端側に存在するドメインの違いによりクラス I からクラス XI の 11 のサブファミリーに分類されており、大多数の TRIM タンパク質は PRY、SPRY、もしくはその両方のドメインを持つ。Coiled-coil ドメインはタンパク質間相互作用を制御しているが、B-box の役割はいまだ不明である。TRIM タンパク質の多くは、その E3 酵素活性を介してインターフェロンや、Toll-like receptor (TLR)・retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) といったパターン認識受容体 (Pattern recognition receptors: PRRs) を介した免疫・炎症シグナルの制御因子として機能することが報告されている (Hatakeyama, 2011; 2017)。また、TRIM タンパク質はオートファゴソーム制御分子や p62 などのユビキチン受容体と TRIMosome と呼ばれる複合体を形成し、選択的オートファジーの足場タンパク質として機能することが報告されており、ユビキチン・プロテアソーム系のみならず、class II 抗原ペプチド生成に関わるオートファジー系にも幅広く関与する可能性を有する酵素群と言える。

5 TRIM22

TRIM22 は staf50 (stimulated transacting factor 50kDa) とも呼ばれる IFN γ 誘導性の TRIM タンパク質のひとつであり、RING ドメイン、1 つの B-box ドメイン、coiled-coil ドメイン、PRYSPRY ドメインを持つ。転写やアポトーシス、免疫応答、抗ウイルス作用などの様々な生体機能に関わっているだけでなく、p53 標的遺伝子として細胞の分化増殖にも影響を及ぼしており、さらに近年では炎症性腸疾患などの自己免疫疾患や、ある種の悪性腫瘍との関連も示唆されている。中でも特に重要な働きがウイルスに対する IFN γ 誘導性の免疫応答である。TRIM22 の過剰発現により、HIV-1 の LTR 配列からの転写を抑制することでマクロファージにおける HIV-1 の複製を阻害することや、インフルエンザ A や B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、風疹ウイルス、EB ウイルス、ヒトパピローマウイルス、脳心筋炎ウイルスなどとの関連が報告されており、その抗ウイルス作用が着目されている (Barr et al., 2008; Hattmann et al., 2012; Lian and Sun, 2017; Vicenzi and Poli, 2018)。

6 抗原提示の破綻と疾患

抗原提示メカニズムの破綻が感染症や多くの自己免疫疾患の発症に寄与することが近年明らかとなってきた。一例として、通常は速やかに分解を受ける細胞内変性タ

ンパク質が、異常な自己抗原として MHC class II 分子により自己応答性の B 細胞へ提示されて自己免疫疾患発症の原因となることが報告されている。また、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患において、MHC class II の発現が増加しているとの報告もある (Jiang et al., 2013; Jin et al., 2014)。

7 免疫チェックポイント阻害療法

抑制性の免疫補助受容体である PD-1 あるいは CTLA-4 を阻害するがん免疫療法、いわゆる免疫チェックポイント阻害療法が近年開発され、幅広いがんに対する治療の選択肢に加えられている (Beatty and Gladney, 2015; Petersson et al., 2012; Ribas and Wolchok, 2018)。免疫チェックポイント阻害療法が効果を発揮するためには、癌抗原が T 細胞によって認識される必要がある。MHC class I 分子は多くの細胞で発現しており、抗原を CD8⁺T 細胞に提示する。一方、MHC class II 分子の発現は一般的にはプロフェッショナル抗原提示細胞に限られ、抗原を CD4⁺T 細胞に提示する (van den Elsen, 2011)。CD8⁺T 細胞が免疫チェックポイント阻害療法における主要なエフェクターであると考えられてきたが、この治療法の成功には CD4⁺T 細胞の活性化も重要であることが明らかになってきた (de Charette et al., 2016; Waldman et al., 2020)。実際に MHC class II が発現しているがん細胞ではその発現量と免疫チェックポイント阻害療法の効果の間には正の相関があることが示唆されており、がん細胞において MHC class II 量を上昇させることが治療戦略として注目されている (Johnson et al., 2016; Thibodeau et al., 2012)。

本研究の目的

以上で述べたように、MHC 分子の発現は多くの自己免疫疾患や腫瘍免疫に深く関与していることから、その詳細な制御機構の解明が以前にも増して重要になってきている (Rodig et al., 2018)。また、免疫担当細胞の自然免疫シグナル伝達過程、特に NFκB シグナルなどにおいて、TRIM タンパク質によるユビキチン化を中心とした制御機構が既に明らかになっている一方、獲得免疫における MHC 分子による抗原提示過程において TRIM タンパク質がどのように関与しているかについては未だ検討されていない。さらに、MHC class II の発現制御に関するこれまでの研究では、そのマスター遺伝子である CIITA に焦点が置かれていたが、転写後の過程における制御機構についてはあまり注目されてこなかった。IFN γ シグナルが MHC 分子の発現を制御しており、一方で多くの TRIM タンパク質もまた IFN γ シグナルによって発現制御を受けていることから、IFN γ シグナルは TRIM タンパク質を介して MHC 分子の発現を制御する可能性があると考えられる。以上より、本研究では IFN γ 刺激によって誘導される

TRIM ファミリー遺伝子を体系的に探索することを出発点とし、TRIM ファミリータンパク質が MHC 抗原提示を調節する可能性について検討することとした。

方法

1 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料の由来及び調整法などを示した。各装置などの製造元の社名は社名の後に社あるいは（株）と略記した。

<1> 培養細胞

HEK293T 細胞（ATCC）

U87MG 細胞（ATCC）

<2> 装置

PCR 装置：

MJ Mini（バイオラッドラボラトリーズ（株））

StepOne™ リアルタイム PCR システム（Applied Biosystems 社）

電気泳動槽：トランスブロットセル（バイオラッドラボラトリーズ（株））

超音波破碎機：Sonifier250（Branson 社）

濾紙：3MM（Whatman 社）

CO₂ インキュベーター：

Forma series II water jacketed CO₂ incubator（Thermo electron 社）

遠心機：

Centrifuge 5415R（Eppendorf 社）

MX-300（TOMY 社）

Avanti J-E centrifuge（Beckman Coulter 社）

顕微鏡：

BX-51（OLYMPUS 社）

LSM710（Carl Zeiss 社）

オートクレーブ装置：KS-323（TOMY 社）

濾過滅菌用フィルター：MILLEXHV（Millipore 社）

<3> キット

cDNA 合成キット：ReverTra Ace（TOYOBO（株））

RNA 抽出キット：RNeasy Plus Mini Kit（QIAGEN 社）

プラスミド抽出キット：

NucleoBond® Xtra Midi EF (タカラバイオ (株))
FastGene™ Plasmid mini kit (日本ジェネティクス (株))
DNA シークエンスキット : BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems 社)
Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)

<4> 各種酵素

DNA 合成酵素 :

KOD plus (TOYOBO(株))

KOD FX (TOYOBO(株))

RNA 分解酵素 :

RNase A (Novagen 社)

トリプシン (Sigma 社)

制限酵素類 (NotI、XhoI) : TaKaRa (株) 製の制限酵素を使用した。

<5> 各種核酸

pQCXIP (タカラバイオ社)

<6> メンブレン

PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜 :

Immobilon-P Transfer membrane (MILLIPORE 社)

MILLEX-HV (0.45 µm フィルター) (MILLIPORE 社)

<7> 細胞培養試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma 社)

Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Merck Biosciences 社)

Fetal bovine serum (FBS) (Gibco 社)

<8> ビーズ類

FLAG M2 agarose (Sigma 社)

<9> 抗生物質類

Puromycin (Sigma 社)

Blasticidin S (Sigma 社)

Cycloheximide (Sigma 社)

<10> 組織細胞染色関連試薬

Bovine Serum Albumin (BSA) (Equitech bio 社)

Saponin (Sigma 社)

ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen 社)

<11> 抗体

マウス抗 FLAG タグモノクローナル抗体 (M2) (F3165, Sigma 社)

マウス抗 GAPDH モノクローナル抗体 (6C5) (AM4300, Ambion 社)

マウス抗 HLA-DR/DP モノクローナル抗体 (HL-40) (11-240-C100, exbio 社)

マウス抗 HLA-DR モノクローナル抗体 (TAL1B5) (sc-53319, Santa Cruz Biotechnology 社)

マウス抗 HLA-DR モノクローナル抗体 (G-7) (sc-55593, Santa Cruz Biotechnology 社)

ウサギ抗 CIITA ポリクローナル抗体 (3793S, Cell Signaling Technology 社)

ウサギ抗 TRIM22 ポリクローナル抗体 (HPA003575, Atlas Antibodies 社)

ウサギ抗 TRIM21 ポリクローナル抗体 (12108-1-AP, Proteintech 社)

ウサギ抗 mTOR モノクローナル抗体 (2983T, Cell Signaling Technology 社)

ウサギ抗 Raptor モノクローナル抗体 (2280T, Cell Signaling Technology 社)

ウサギ抗 Rictor モノクローナル抗体 (2114T, Cell Signaling Technology 社)

ウサギ抗 G β L モノクローナル抗体 (3274T, Cell Signaling Technology 社)

Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (A11029, Invitrogen 社)

Alexa488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (A21206, Invitrogen 社)

<12> 細胞培養関連試薬

遺伝子導入試薬: FuGENE®HD (Roche 社)

Recombinant Human IFN γ (PeproTech 社)

<13> SDS-PAGE、ウエスタンブロット関連試薬

アクリルアミド (Sigma 社)

SDS-PAGE 用タンパク質分子量マーカー:

プレステインドエクセルラダー Broad range (アプロサイエンス (株))

X 線フィルム:

CL-XPosure Film (Thermo Scientific 社)

BioMax Light Film (Carestream 社)

<14> その他試薬

エタノール (Sigma 社)
イソプロパノール (Sigma 社)
SDS (Sigma 社)
Tween20 (Sigma 社)
2-メルカプトエタノール (Sigma 社)
グリセロール (Sigma 社)
Bromophenol blue sodium (BPB) (Sigma 社)
HCl (Sigma 社)
アガロース (Sigma 社)
1kb plus DNA ラダーマーカー (Invitrogen 社)
Trizma base (Sigma 社)
EDTA (Sigma 社)
Glycine (Sigma 社)
NaCl (Nacalai tesque 社)
IGEPAL CA-630 (Sigma 社)
Ammonium Bicarbonate (富士フィルム和光純薬社)
Benzonase (Sigma 社)
Iodoacetamide (Thermo Scientific 社)
Trichloroacetic Acid (TCA) (富士フィルム和光純薬社)
Trifluoroacetic Acid (TFA) (富士フィルム和光純薬社)
Acetonitrile (ACN) (富士フィルム和光純薬社)

<14> 調整試薬類

純水は Milli Q 水を使用した。試薬類は特級試薬、生化学実験用、分子生物学実験用、細胞実験用試薬を所定の濃度に溶解し、オートクレーブ滅菌または濾過滅菌した後を使用した。%という表記は、固体を液体に溶解して調整した際には質量/体積パーセント濃度を表すこととする。

細胞培養用

DMEM

Sigma 社製の DMEM を使用した。血清 (FBS) は 56°C、30 分の非働化を行い、HEK293T 細胞用として FBS を最終濃度 10%となるよう調整した。

MEM

Merck Biosciences 社製の MEM を使用した。血清 (FBS) は 56°C、30 分の非働化を行い、U87MG 細胞用として FBS を最終濃度 10% となるよう調整した。

タンパク質泳動、ウエスタンブロット用試薬

SDS-PAGE 分離ゲル緩衝液

1.5 M Tris/HCl (pH 8.8)

SDS-PAGE 濃縮ゲル緩衝液

0.5 M Tris/HCl (pH 6.8)

20% APS 溶液

2 g の APS を 10ml の純水に溶解後、-20°C に保存した。

0 mM NaCl 細胞溶解緩衝液

50 mM Tris/HCl (pH 7.5)

10% Glycerol

0.2% NP40

300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液

300 mM NaCl

50 mM Tris/HCl (pH 7.5)

10% Glycerol

0.2% NP40

100 mM NaCl 免疫沈降用洗浄緩衝液

300 mM NaCl

50 mM Tris/HCl (pH 7.5)

10% Glycerol

0.2% 10% NP40

10× ウエスタンブロットトランスファー緩衝液

0.25 M Tris

1.92 M Glycine

1×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液

10%となるようにメタノールを加え、10×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液を純水にて10倍に希釈した。

10×TBS

0.2 M Tris/HCl (PH7.6)

1.5 M NaCl

1×TBST

10×TBSを純水にて10倍に希釈し、0.05%となるようにTween20を加えた。

10×PBS

1.37 M NaCl

81 mM Na₂HPO₄

27 mM KCl

15 mM KH₂PO₄

1×PBS

10×PBSを純水にて10倍希釈して調整した。

トリプシン/EDTA 溶液

0.05% Trypsin

0.5 mM EDTA 2Na

以上を1×PBSに溶解し、1lになるように調整して濾過滅菌した。

エチジウムブロマイド含有アガロースゲル

アガロースはSigma社のものを使用した。1×TAE溶液中にアガロースゲルが0.7%となるように調製し、さらに200 mlあたり20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を1 µl 加えたゲルを調製した。

アガロース電気泳動用色素

各制限酵素に添付されている10×loading bufferを使用した。

制限酵素用緩衝液

各制限酵素に添付されている 10×buffer を使用した。

蛍光免疫細胞用緩衝液

0.1%	BSA
0.1%	Saponin
	PBS

フローサイトメトリー用緩衝液

0.1%	BSA
0.1%	NaN ₃
	PBS

大腸菌の培地

LB プレート培地

1%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
170 mM	NaCl
1.5%	Bacto Agar
100 µg/ml	Ampicillin
25 µl/ml	Kanamycin

滅菌後約 50℃に冷却し、抗生物質（Ampicillin、Kanamycin）は必要に応じて添加して使用した。

2×YT 培地

1.6%	Bacto Trypton
1%	Yeast Extract
86 mM	NaCl
100 µg/ml	Ampicillin
25 µl/ml	Kanamycin

抗生物質（Ampicillin、Kanamycin）は必要に応じて添加して使用した。

SOB 培地

2%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
10 mM	NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgSO₄

10 mM MgCl₂

Bacto Trypton、Yeast Extract、NaCl、KCl を純水に溶解し、オートクレーブにより滅菌後、フィルター濾過滅菌した MgSO₄、MgCl₂ 混合溶液を加えて調製した。

2 実験方法

2-1 分子生物学実験の方法

< 1 > DNA アガロースゲル電気泳動

1×TAE 溶液中にアガロースゲルが 0.7%となるよう調整し、さらに 200 ml あたり 20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 1 μ l 加えたゲルを調製した。1×TAE 溶液中で電気泳動を行った後、UV トランスイルミネーターを用いて検出および撮影を行った。

< 2 > エタノール沈殿・イソプロパノール沈殿

核酸を含む溶液に 1/20 量の 5 M 塩化ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを加え攪拌後、4℃、16,200×g、5 分間遠心しエタノール沈殿を行った。イソプロパノール沈殿の場合は、0.7 倍量のイソプロパノールを加え、同様に沈殿させた。沈殿物は 70% エタノールで洗浄後乾燥させ、適当量の純水または TE 緩衝液に溶解した。

< 3 > 大腸菌形質転換

(1) コンピテント細胞の調整

各種大腸菌を LB プレートに播種、37℃、14 時間培養し、単一コロニーを 25 ml の SOB 培地にて 37℃、8 時間振盪培養した。100 ml の SOB 培地を 3 つ用意し、それぞれに培養した菌液をそれぞれ 5 ml、2 ml、1 ml 加え、全てを 18℃にて一晚培養した。それぞれの A_{600} 値を測定し、 $A_{600}=0.5$ 前後の培養液のみを選び（またはその程度になるまで培養を続け）、氷上で 10 分間冷却した後に 4℃、2,500×g、10 分間延伸して集菌した。菌体を氷冷した 40ml の TB に再懸濁し、さらに 750 μ l の DMSO を加えて穏やかに混和し、10 分間氷上静置した後、1.5 ml チューブに 100 μ l ずつ分注して直ちに液体窒素中で凍結させ、-80℃で保存した。

(2) 形質転換

凍結コンピテント細胞を氷上で融解し、ライゲーション反応後の DNA 試料またはプラスミド DNA に、100 μ l のコンピテント細胞を加え、氷上で 30 分間静置した。その後 42℃で 45 秒間のヒートショックを与え、再び 2 分間氷上に静置し、4 倍量の 2×YT 培地を加えて 37℃で 30 分間培養した。その後低速遠心で菌体を集菌し、適当量の培地で再懸濁させ、適当な抗生物質を含む LB プレートに播種して 37℃で一晩培養した。

< 4 > プラスミドの調整

(1) キットを使用したシークエンス反応用プラスミドの少量調製
プラスミド抽出キット FastGene™ plasmid mini kit を用いた。手順は、添付したプロトコルに従った。

(2) キットを使用した細胞トランスフェクション用プラスミドの大量調製
プラスミド抽出キット NucleoBond® Xtra Midi EF を用いた。手順は、添付したプロトコルに従った。

< 5 > 塩基配列の決定

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を使用して決定した。BigDye Terminator Kit のプレミックス溶液 4 µl、5×シークエンス緩衝液 2 µl、DNA 400 ng、プライマー 1.6 pmol を混ぜ、純水にて全量を 20 µl として PCR 反応を行った。PCR 条件は、(96°C、10 秒→50°C、5 秒→60°C、4 分) × 25 サイクルで行った。PCR 反応後、反応液をエタノール沈殿し、沈殿物を 80%エタノールで洗浄後乾燥させ、25 µl の Formamide (Sigma 社) に溶解させ、溶解後室温で 15 分間静置した。これを試料として、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer にて配列を決定した。データは付属のソフトウェアにて解析を行った。

< 6 > タンパク質のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

下表に示す組成の分離ゲル溶液を作製し、直ちに SDS-PAGE 用ガラス板に流し込み、イソプロパノールを重層した。アクリルアミドが固化した後、イソプロパノールを水洗し、濃縮用ゲル溶液を作製して分離ゲルの上に重層し、コームを刺してゲルを固化させた。泳動は SDS-PAGE 泳動緩衝液を用いて、150 V の電圧でおよそ 50 分を行った。

分離用ゲル溶液	10%	8%
30%アクリルアミド溶液 (ml)	2.50	2.00
DDW (ml)	3.05	3.55
1.5M Tris pH 8.8 (ml)	1.88	1.88
10% SDS (µl)	75	75
20% APS (µl)	28.1	28.1
TEMED (µl)	7.5	7.5

濃縮用ゲル溶液

30%アクリルアミド溶液 (ml)	0.40
-------------------	------

DDW (ml)	2.01
0.5M Tris pH 6.8 (ml)	0.63
10% SDS (μl)	25
20% APS (μl)	12.5
TEMED (μl)	2.5

< 7 > ウェスタンブロット

ウェットタイプのウェスタンブロット装置を用いた。PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜をあらかじめメタノールに 1~2 分浸した後に、転写緩衝液に濾紙と共に浸した。電気泳動後ゲルを取り出し、ウェスタンブロット装置の陽極から順にスポンジ→濾紙→PVDF 膜→ゲル→濾紙→スポンジとなるように重ね、400 mA の電流で 60 分間転写した。転写後の PVDF 膜はブロッキング溶液に浸し、4℃で一晩または室温で 2 時間抗体反応を行った。抗体反応後、TBST で 3 回洗浄した後さらに 15 分間洗浄し、TBST で希釈した 2 次抗体希釈液に浸し、室温で 1~2 時間抗体反応を行った。TBST で 3 回洗浄した後さらに 30 分間洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents にて化学発光を行い、X 線フィルムに露光して検出した。

< 8 > 細胞の継代培養

全ての細胞は、CO₂ インキュベーター内で、5% CO₂、37℃の条件で培養した。HEK293T 細胞は、Fetal bovine serum (FBS) を 10%添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で、U87MG 細胞は、Fetal bovine serum (FBS) を 10%添加した Minimum Essential Medium Eagle (MEM)で培養した。HEK293T 細胞における TRIM22 過剰発現細胞は、FBS を 10%、Puromycin を 5 μg/ml となるよう添加した DMEM で培養した。U87MG 細胞における TRIM22 過剰発現細胞は、FBS を 10%、Puromycin を 1 μg/ml となるように添加した MEM で培養した。TRIM22 ノックアウト細胞については、FBS が 10%となるように添加した、抗生物質不含の MEM で培養した。継代は、70-90%コンフルエントとなった細胞の培地を吸引除去し、培地の約 1/5 量の PBS で洗浄した。洗浄後 PBS を吸引し、培地の約 1/10 量のトリプシン/EDTA 溶液を加えて 37℃、5 分間静置し、細胞が底面から剥離したことを顕微鏡観察により確認後、培地をトリプシン/EDTA 溶液の 2 倍量加えて中和した。この細胞懸濁液の約 1/10~1/20 量を残して、そこに不足分の培地を加え、ディッシュ内で均一になるように懸濁して 5% CO₂、37℃で培養した。

< 9 > リポフェクション法を用いた細胞への遺伝子導入

Roche 社の FuGENE® HD 試薬を用いた。遺伝子導入を行う細胞をあらかじめ 10

cm ディッシュに撒いておき、一晚程度培養した。導入する遺伝子の DNA を 20 μ l 分注し、Opti-MEM 500 μ l を添加した。この DNA 混合液に FuGENE® HD を 30 μ l 添加し 15 分間静置した後、細胞に滴下し、5% CO₂、37°C で培養した。

< 1 0 > レトロウイルスを用いた安定発現細胞株作製

パッケージ細胞としてあらかじめ 10-cm ディッシュに撒いておき、リポフェクション法によりレトロウイルスベクターを導入し、翌日に感染させたい細胞を 6 穴プレートに 15~30%コンフルエント程度で撒いた。導入より 48 時間後に、レトロウイルスを含むパッケージング細胞の上清を回収し、フィルターで限外濾過した後、感染させたい細胞の培地に添加してレトロウイルスを感染させた。さらに 48 時間培養を続け、Puromycin を含む培地と交換し、1 週間程度培地交換または継代培養を続けて安定細胞株を樹立した。パッケージングプラスミドとしては、pCL10A1 を使用した。

< 1 1 > CRISPR/Cas9 を用いた TRIM22 ノックアウト細胞株作製

CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて、TRIM22 をノックアウトした細胞株を作成した。gRNA の配列は GACATTCCGCATAAACGAGG で、GPP sgRNA Designer を用いてデザインした。SpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 vector にデザインした gRNA を挿入したのち、Polyethylenimine Max をキャリアーとして U87MG 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に、1 μ g/ml の Puromycin を含む培地で 48 時間培養し、その後 Puromycin 耐性を持つ細胞のみを単離して 96 穴プレートに撒き、約 1 週間培養した。ノックアウトのスクリーニングは、まずウエスタンブロット法で TRIM22 の発現量を確認し、目的のバンドが消失しているクローンを、引き続き DNA シークエンス解析にて評価した。KOD FX DNA ポリメラーゼを用い、PCR にて目的の DNA 配列を増幅させた後、ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents にて ExoSAP 処理した。PCR 反応では表 1 に示すプライマーを使用した。塩基の欠失によりフレームシフトが生じていることを確認できた 2 クローンを以降の実験で使用する事とした。

< 1 2 > 細胞溶解液の調整

細胞をディッシュよりトリプシン/EDTA 溶液にて剥離し、15 ml チューブに回収して 4°C、3000 xg、2 分間遠心した。沈殿した細胞を 1 ml の PBS で懸濁して 1.5 ml チューブに移し、4°C、3000 xg、1 分間遠心し上清を除去した。直ちに細胞を溶解しない場合は、この状態で -80°C 保存とした。溶解する場合、300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液を用いるか、または 1×SDS サンプル緩衝液を直接添加して、細胞を氷上で溶解した。各緩衝液を加えて懸濁した後、超音波破碎機にて凝集塊が見えなくなるまで数

秒間破碎後、300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液を用いた場合は 10 分間氷上で静置し、1 ×SDS サンプル緩衝液を用いた場合はそのままヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで-20℃で保存した。

< 1 3 > 免疫沈降実験

前項のような方法で得られた細胞溶解液について、全体の 1/25 量を全細胞溶解液 (Whole cell lysate; WCL) として別の 1.5 ml チューブに移し、その 1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで-20℃で保存した。残りの溶解液は 1000 µl ずつ、50 µl の 50 (v/v) % FLAG M2 agarose を加え 4℃にて 1 時間転倒混和した後、4℃、4000 rpm、1 分間の遠心、上清除去を行うという処置を、溶解液がなくなるまで繰り返した。その後、4℃、6000 rpm、10 秒間の遠心、上清除去と 800 µl の免疫沈降用洗浄緩衝液での懸濁を 5 回繰り返した後、免疫沈降用洗浄緩衝液にて 20 倍に希釈した 1×FLAG ペプチドを 100 µl 加えた。氷上で 10 分間溶出させ、溶出液を回収し、さらにもう一度この操作を繰り返し 200 µl の溶出液を得た。100 µl は質量分析用に-80℃で保存し、残りの 100 µl は 1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100℃、5 分間加熱し、使用時まで-20℃で保存した。

< 1 4 > RNA の抽出

QIAGEN 社の RNeasy Plus Mini Kit を用いて、Total RNA を抽出した。手順は添付したプロトコルに従った。最終的に 50 µl の RNase フリーの滅菌水で溶かし、1 mg/ml に濃度を調整した。

< 1 5 > 逆転写反応

TOYOBO 社の ReverTra Ace® qPCR RT Kit を用いて、mRNA を鋳型に逆転写反応を行い、cDNA を合成した。まず 65℃、5 分間 RNA を熱変性させた後、氷上で急冷した。下記のように各試薬を熱変性済み RNA に加え、さらに下記の条件で逆転写反応を行った。

to 10 µl	Nuclease フリー滅菌水
2 µl	5×RT 緩衝液
0.5 µl	RT Enzyme Mix
0.5 µl	Primer Mix
1 µg	熱変性済み RNA

反応条件: 37℃、15 分 → 98℃、5 分 → 4℃

< 1 6 > IFN γ による細胞刺激

5.9 $\times 10^4$ 個の HEK293T 細胞と U87MG 細胞を 6 穴プレートに撒き、翌日に培地を除去して、必要量の IFN γ をそれぞれ添加した培地 2 ml に交換した。37°Cで培養し、24 時間後に細胞を回収した。

< 1 7 > PCR 反応

PCR 反応に用いたプライマー一覧は、別途表 1 に示す。

(1) Real-time PCR

Power SYBR Green PCR Master Mix を使用し、StepOne™リアルタイム PCR システムにて検出を行った。データは付属のソフトウェアにて解析した。また、テンプレートは別項の記述に従って作成した。PCR 反応液の組成および反応条件を以下に示す。

PCR 反応液組成 (総液量 : 10 μ l)

テンプレート cDNA	1 μ l
各プライマー	0.2 μ M
Power SYBR Green master mix	5 μ l
滅菌水	

PCR 反応条件

(95°C、15 秒→60°C、1 分) $\times$ 40 サイクル

(2) 遺伝子クローニング用 PCR

酵素は KOD FX を使用し、以下の組成で PCR 反応を行った。

KOD FX を使用した PCR 反応液組成 (総液量: 50 μ l)

テンプレート DNA	50 ng
各プライマー	各 0.3 μ M
2 $\times$ PCR 緩衝液	25 μ l
dNTPs	0.2 μ M
KOD FX DNA polymerase	1U
滅菌水	

表 1 PCR 反応に用いたプライマー一覧

Gene symbol	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Gene symbol	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
TRIM1	CCAGCCTCCGTGGTTCTTAAT	ACAGGTCAATTGACACTCCAGT	TRIM61	TCTGTGAGAAAGACCTAGAGCTT	CACGGTGCATTGATTCTCTCC
TRIM2	TGCGCCAGATTGACAAGCA	GCACCTCTCGCAGAAAGTG	TRIM62	CGAGCAGCATCAGGTCACC	CCAGTTGTGCGTTGAGCAG
TRIM3	GCAGCCTGGAGACCAATTTGT	GCTACTGCCGATGTGTTCTCG	TRIM63	CTTCCAGGCTGCAAAATCCCTA	ACACTCCGTGACGATCCATGA
TRIM4	TGAGAAATCAGCACGGAGTTTTTC	CCTGGTCAACACTTCTTTTGGA	TRIM64	TTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	GCTCTCGCACATAGTGTCTTAG
TRIM5	AAGTCCATGCTAGACAAAGGAGA	GTTGGCTACATGCCGATTAGG	TRIM65	CGCCAACCGTCACTTCTATCT	ACAGGGTCAGGGTCTTACC
TRIM6	ACTGGGTTGACGTGACCCCT	TCCCACAAACCTCACTTGTCT	TRIM66	TCCCGGAGACTTCACCTTGTA	GTTCCACCACCTAGGCAGCAT
TRIM7	TCCATGTTCAAGTCCCTCTCC	GGCCAGGTTCTCATTCTGCT	TRIM67	CGTGTCCCGAGCATGAAATG	CCTGAGATAGTTGTGCTTGTG
TRIM8	CGTGGAGATCCGAAGGAATGA	CAGGCGCTTGTCTGACTCG	TRIM68	GGAGCCCATGAGCATTGACT	GACAGGTGAACCCAGTTCT
TRIM9	GTGTGCGGCTCCTTCTATCG	GCTGTATAGGCTCATCTTGCCA	TRIM69	CTTGCCATCCAACAGGGTCAA	TTCTTGTGAGCAGCAATAGC
TRIM10	TGCCCCATCTGTCAGGGTA	GGTATCTCAGTAGAGCGGGTAA	TRIM70	GCACCAAATCTCCCTCATCTT	CTCTGAAGGTTCTGCTCATC
TRIM11	CGGCTGCTCGGAAGAATTAG	TCTACTCTCTGTTCTGTCTC	TRIM71	GTACCCATCTGTCTGTAGTGC	CGGCTTTGACCTCCGACTG
TRIM13	GTTTTGCCCTGCTCCCAACA	TCCTTACGGCATGTAGGACAC	TRIM72	GAGGTGGATGTTGGGACAAA	CCGAAGCTCAGGTAAAGGC
TRIM14	TGAAGGGGAAATTCACCTGAAC	AGCCCTCGACAGGATCCGG	TRIM73	CAGGAGCAGAAGAAGGTGGATG	CCGCACTGTAGCATTAGGGACT
TRIM15	TCCCTGAAGGTGGTCCATGAG	CAGGATCTTGCCCGAGGATT	TRIM74	CAGGAGCAGAAGAAGGTGGATG	AACCTAGTGGTGGTCTCATTTCC
TRIM16	GTCTGTCTAACCTGCATGGT	GGCAGTATGCCAGTTGTG	TRIM76	CAGGTACTAACCCAGGAGAAAG	CCCACTAATCGGAGGTGATT
TRIM17	CGGACAGATTGAAGTGTAAAGA	CTCTCATACAGGAGGAGGTAGG	TRIM77	AGCCTGGACAAAGAGGAATG	GGGAGGTAGAGAAGAGACTGAA
TRIM18	CTGACCTGCCCTATTTGTCTG	GCACAGTGTGATACAGGATGC	HLA-DP	GATTTCTACCCAGGCAGCATT	GGTCATTTCCAGCATCACCAGGA
TRIM19	TGGGAGCTTACTGGGTAGTA	GGATCAAGGAGGAGGTTAATG	HLA-DR	CCGATCACCAATGTACCTCCAG	CAGGAAGGGGAGATAGTGGAAC
TRIM20	TAAGACCCCTAGTGACCATCTG	TTCCCATAGTAGGTGACCAG	CITA	CTGGCTGGAGAAGAAGAGATTG	AGTTCGGCATATTGGCATAA
TRIM21	TGGCTGAGAAGTTGGAAGTG	CAAACTCTGCGTGAATCCCTAGA	ISG15	GAGAGGCAGCGAAGTCTATCTT	CCAGCATCTTCAACCGTCAGG
TRIM22	GTACCCAACATTCGACATAAA	TGATGTCACTCTCCAGCTTCTC	GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGAGTGTGGTCATGAG
TRIM23	TGGTTGTAAACAAGCTCGGAG	ACTCTAGCACCTTCACTACAGC	dSeq	AACCTCTGAGCCTAGATTGTG	CCTGCAGCTTTTCTGTAAAG
TRIM24	GAAGTGGCTGGACTCTCTAAAC	TGCCGTAACCGGTATGTAATC			
TRIM25	AATCGGCTGCGGGAATTTTTTC	TCTCACATCATCCAGTGCTCT			
TRIM26	TGCACTACTACTGTGAGGACG	TCCTTAGGGTACTCAGGTGGT			
TRIM27	CAGAACCAGCTGGACCATTTA	CCCAACAATCTTCTCCCTCTC			
TRIM28	TTTCATGCGTGATAGTGGCAG	GCCTCTACACAGGTCTCACAC			
TRIM29	CTGTTGCGGGCAATGAGT	TGCCCTCCATAGAGTCCATGC			
TRIM31	AACCTGTCCACCATCGACTGTG	TGATTGGTTCTTCTTACGG			
TRIM32	GCGGTGACGAGGAATTTG	CAGATGGTATGGCCACAGT			
TRIM33	ATGTGGAGAGTGGCTATGTAAGA	GGGCGTTGACCAGATGCTC			
TRIM34	GACGCTGGATAAGTTTGAGA	CCACCCATACGCACCATTTT			
TRIM35	TGAAGGAGGACGACGTTTCTT	GCCCAAGTACTTGCAGACATC			
TRIM36	GAGCTGTTTACCCACCCATTG	CTGATCCCACTCGTTGAATGA			
TRIM37	GAGGAGAACTCATGGAAGATG	GGTAGCAGCGAGCATAAA			
TRIM38	GAGCCTGATGACGAACCCAG	TCTTGATCCGCTCTCTTTGAGGG			
TRIM39	GAAAGGGCGAGTTGACTCCAC	GGCTGCATATTGTCCCAAT			
TRIM40	ACATCTCTTCTGTGAGTGTGC	GGCAGATATAGCCTGTCCCTA			
TRIM41	CTGCCGAGTTTGTGAACCCA	CTCCTCCATGTCACCCCTCGTA			
TRIM42	GGCCAATGATCCCAACTGTAA	AGCAGCGGCTCTCATAGTAGT			
TRIM43	AGGGAACCATCACCAGAAATG	TTGTTTGCCTATGGGTCCAC			
TRIM44	CCATCTGGCCGAATACGTCC	TGCCCTCGCTTCTATCTCCCT			
TRIM45	AACTCAGGCAAGACTCACTGC	CCCTCGGATGTCCACTACTG			
TRIM46	TTCCGACCAAGGGCCTTAT	AGAGTTGACATACCAGGCGTT			
TRIM47	CTGAGCATCCAAAGTCTGA	CTACGGCTGCACCTTTGATG			
TRIM48	GGATGTGACCGTCAAAATCCG	CACCCAAGACTAAAGAGTCCCT			
TRIM49	ATCTTACAGGCTTTTCAAGGGG	GCACTGGACAAGAAATGGGAT			
TRIM50	GGCCCTTGAAGGCGCATT	GCAGGGTCCAACCTTGAGAGG			
TRIM51	GGCCCTGTTGTACCTCAACT	TTCTCTGCGCGTTGTCTTC			
TRIM52	ATGGCTGGTTATGCCACTACT	CTCGTCCCTCTTACTCCACAG			
TRIM54	ATCGTGCAGGCATGAGGTTG	CCTCGACATGAGGTGCTG			
TRIM55	TTGTGACGACAACTGTGTAG	CCCATGTCTATCAAAACCACTT			
TRIM56	GCCTGCATACCTACTGCCAAG	GCAGCCATTGACGAAGAAGT			
TRIM58	TACCAGGTAAAGCTCCAGATGG	GAAAGCCACGATGCTTCTCAA			
TRIM59	GACACACACTGGACAGATCTTA	ACTGGAGAACAGCTTCTTATC			
TRIM60	CTCCAAGAGGAGTCTAGCTGT	TCCTTCCAGGATCACTGAGG			

< 1 9 > 蛍光免疫染色

細胞回収までの条件は、他の実験と原則同じになるように培地交換やトリプシン処理を行った。まず、15-cm dish で維持していた野生型とノックアウト細胞の培地を交換した翌日に、あらかじめ滅菌カバーガラスを敷いた 24 穴プレートに、 1.3×10^4 個ずつの細胞を撒いた。さらに翌日に 100 U/ml の IFN γ で刺激を行い、そのまま 5% CO $_2$ 、37°C で培養して 24 時間後に細胞を回収した。回収した細胞は、4% パラホルムアルデヒドで 37°C にて 30 分間固定した。フローサイトメトリーとの整合性も合わせて評価するため、PBS で洗浄後、細胞表面のみ染色するために界面活性剤 Saponin を含まない蛍光免疫用緩衝液で希釈した 1 次抗体液で、4°C にて over night あるいは室温で

1 時間静置して反応させた。さらに PBS にて 3 回洗浄後、蛍光免疫用緩衝液で希釈した蛍光標識 2 次抗体液で、遮光して室温にて 1 時間静置した。PBS 洗浄後、ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI を用いて封入し、共焦点顕微鏡 LSM710 にて観察、画像を取得し、それぞれの細胞における細胞表面の蛍光強度の定量を行った。

< 2 0 > フローサイトメトリー解析

15-cm dish で維持していた U87MG 細胞を PBS で洗浄し、細胞表面の MHC タンパク質の分解を防ぐため、トリプシン不含の EDTA で細胞を剥がして回収した。細胞数をカウントして 1×10^6 個ずつに揃えた後、細胞を固定しない場合は、氷上で、フローサイトメトリー用緩衝液で希釈した 1 次抗体液と反応させた。細胞を固定する場合は、室温で 0.1% PFA にて 10 分間固定した後、フローサイトメトリー用緩衝液で希釈した 1 次抗体液に 0.1% Saponin を添加して反応させた。1 次抗体液との反応は、いずれも遮光した状態で 1 時間静置した。その後フローサイトメトリー用緩衝液で 2 回洗浄し、フローサイトメトリー用緩衝液で希釈した 2 次抗体液と、室温にて遮光して 30 分間静置し反応させた。洗浄後、フローサイトメトリー用緩衝液 500 μ l で細胞を再懸濁し、7-AAD を 5 μ l ずつ加えた。Cell Strainer を用いて単一細胞へふるい分けた後、フローサイトメトリー解析を行った。解析は、FACS (fluorescence activated cell sorting) Canto™ II (BD bioscience) を使用した。

< 2 1 > cycloheximide (CHX) chase assay

25 μ g/mL の CHX を培地内に添加し、添加から 0 時間、4 時間、8 時間、12 時間の時点で細胞を回収した。回収した細胞は、1 $\times$ SDS サンプル緩衝液を加えて、ヒートブロックにて 100°C、5 分間加熱し、使用時まで -20°C で保存した。

結果

1 IFN γ 応答 TRIM タンパク質のスクリーニング

通常、MHC class II は、マクロファージや DC 細胞、B 細胞などの特定の細胞でのみ定常的に発現しているが、IFN γ 刺激が加わると多くの細胞に発現誘導される (Axelrod et al., 2019)。一方、多くの TRIM タンパク質が Type II IFN である IFN γ により誘導されることがこれまでに報告されているが、網羅的な検討は行われていなかった。そこで IFN γ に応答する細胞であること、遺伝子導入効率が高いこと、外来遺伝子の発現量が高いことから HEK293T 細胞を用いて、IFN γ で刺激後、TRIM 遺伝子群の mRNA レベルをリアルタイム PCR 法により検証した。その結果、TRIM22、TRIM21、TRIM5 α といった TRIM 遺伝子の著明な増幅を認めたが、特に TRIM22 が IFN γ 刺激により最も強く増幅されていた (図 1-1)。HEK293T 細胞は非刺激時において MHC class II の発現が低いため、定常的に MHC class II を発現する細胞株を検討したところ、ヒト膠芽腫細胞株 U87MG が該当することを見出した。そこで、HEK293T 細胞において IFN γ 刺激によって強く発現が誘導された上位 5 つの TRIM 遺伝子について、U87MG 細胞を用いて mRNA レベルをリアルタイム PCR 法にて検証したところ、HEK293T 細胞と同様に TRIM22 が IFN γ 刺激によって最も強く発現上昇していることが明らかとなった (図 1-2)。タンパク質量の変動をウェスタンブロット法によって検証したところ、同様に IFN γ 刺激による TRIM22 の顕著な増加が認められた (図 1-3)。以上を踏まえて、TRIM22 および 2 番目に発現が上昇する TRIM21 に着目して以降の実験を進めることとした。

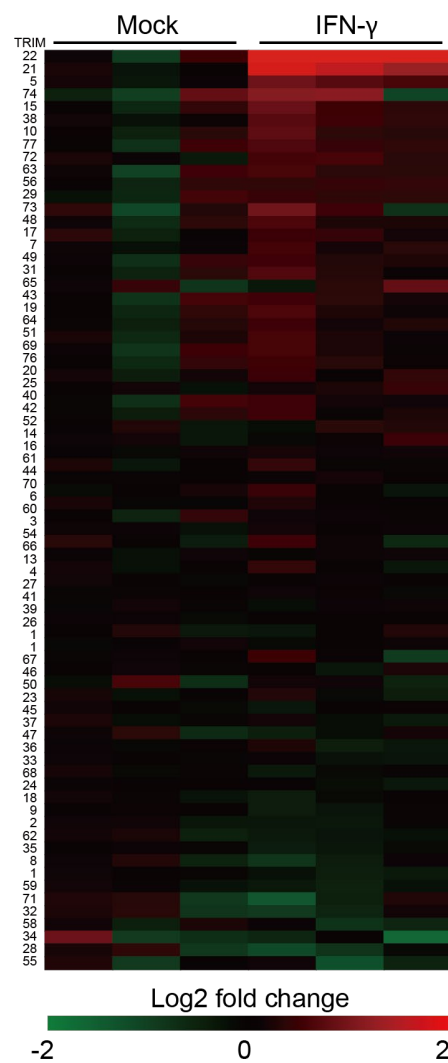


図 1-1 HEK293T 細胞における IFN γ 処理による TRIM 遺伝子群の発現変化

HEK293T 細胞を IFN γ 1,000 U/ml、24 時間で処理し、Real-time PCR 法にて全ヒト TRIM 遺伝子の mRNA を測定した。各 TRIM 遺伝子毎に、IFN γ 非処理時の結果の平均に対する相対値を log2 の倍数変化で示した。

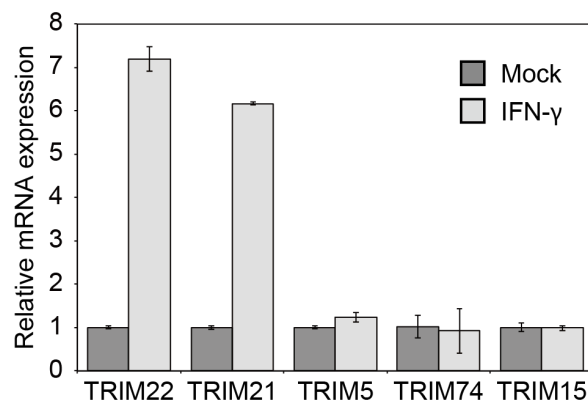


図 1-2 U87MG 細胞における IFN γ 処理による TRIM 遺伝子の発現変化

U87MG 細胞を IFN γ 1,000 U/ml、24 時間で処理し、図 1-1 で IFN γ による誘導が強かった上位 5 つの TRIM 遺伝子について Real-time PCR 法で検討した。

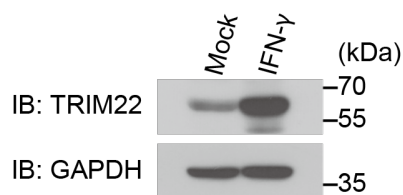


図 1-3 U87MG 細胞における IFN γ 処理による TRIM22 タンパク質量の変化

U87MG 細胞を IFN γ 1,000 U/ml、24 時間で処理し、抗 TRIM22 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

2 TRIM22、TRIM21 過剰発現細胞の樹立

TRIM22 および TRIM21 の MHC class II 発現への影響を検討するために、FLAG-TRIM22 および FLAG-TRIM21 過剰発現 U87MG 細胞を樹立した。FLAG 配列を融合した TRIM22 または TRIM21 遺伝子をレトロウイルスによって安定に導入し、ウエスタンブロットで発現を検証した (図 2-1、2-4)。

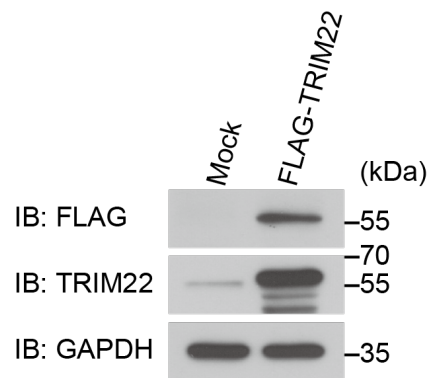


図 2-1 FLAG-TRIM22 過剰発現 U87MG 細胞の樹立

TRIM22 過剰発現 U87MG 細胞と、コントロール U87MG 細胞からサンプルを調製し、抗 FLAG 抗体、抗 TRIM22 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

3 TRIM22 過剰発現による MHC class II の発現抑制

上記で樹立した細胞株の細胞溶解液を調製し、抗 HLA-DR/DP 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、TRIM22 過剰発現細胞で著明に MHC class II タンパク質の発現量が減少していた (図 2-2)。次にフローサイトメトリー解析を行ったところ、TRIM22 過剰発現細胞の細胞表面 MHC class II 量は明らかに減少しており、ウエスタンブロット解析と矛盾しない結果であった (図 2-3)。また、TRIM21 過剰発現細胞を用いて同様のウエスタンブロット解析を行ったところ MHC class II 量に変化を認めなかった (図 2-4)。

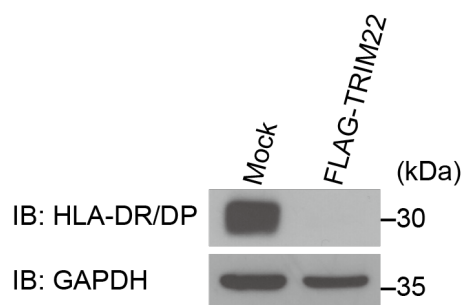


図 2-2 TRIM22 過剰発現細胞における MHC class II のタンパク質発現

TRIM22 過剰発現 U87MG 細胞と、コントロール U87MG 細胞からサンプルを調製し、抗 HLA-DR/DP 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

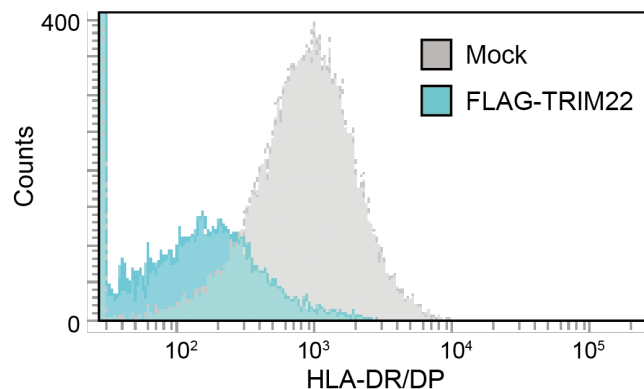


図 2-3 TRIM22 過剰発現細胞における細胞表面 MHC class II タンパク質発現
 コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 過剰発現 U87MG 細胞における MHC class II の細胞表面発現量を、フローサイトメトリーで検討した。
 Gray: mock、Blue: FLAG-TRIM22

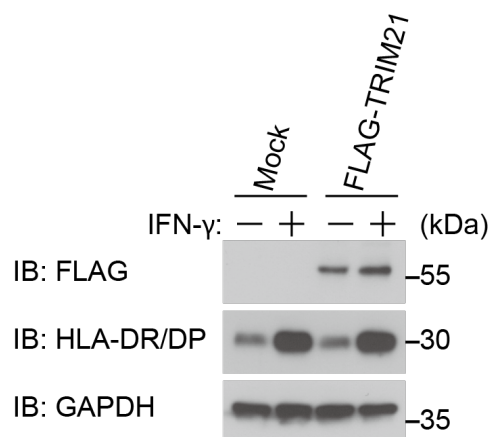


図 2-4 TRIM21 過剰発現細胞における MHC class II タンパク質発現
 TRIM21 過剰発現 U87MG 細胞と、コントロール U87MG 細胞からサンプルを調製し、抗 FLAG 抗体、抗 HLA-DR/DP 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

4 TRIM22 ノックアウト細胞株作製

次に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞株を作製した。樹立した細胞株の細胞溶解液を調製し、抗 TRIM22 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、TRIM22 タンパク質の発現が消失していることを

確認した (図 3-1)。

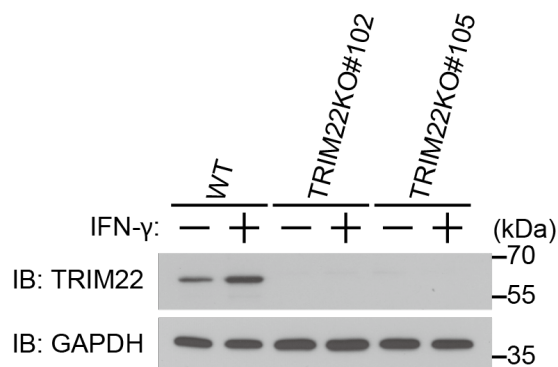


図 3-1 TRIM22 ノックアウト細胞の樹立

CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞株を作製した。樹立した細胞からサンプルを調製し、抗 TRIM22 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。IFN γ 刺激は 1000 U/ml、24 時間で行った。

5 TRIM22 ノックアウトによる MHC class II 発現量の増加

TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞を用いて、IFN γ 刺激・非刺激後にウエスタンブロット法にて MHC class II タンパク質量および MHC class II のマスター遺伝子である CIITA タンパク質量を検討した。その結果、IFN γ 刺激の有無に関わらずノックアウト細胞で MHC class II タンパク質量は増加していた一方、CIITA タンパク質量は変化していなかった (図 3-2)。さらに、MHC class II を認識する抗体として用いた抗 HLA-DR/DP モノクローナル抗体 (HL-40) は HLA-DP と HLA-DR の両方を認識する抗体であるため、HLA-DR を特異的に認識する 2 つの異なるモノクローナル抗体 (TAL1B5 および G-7) を使用し同様の実験を行った。その結果、HLA-DR タンパク質は、IFN γ 刺激がない場合では TRIM22 ノックアウト細胞で増加したが、IFN γ 刺激下では、野生型とノックアウト細胞間で HLA-DR 発現レベルの増加率に差は認められなかった (図 3-2)。これは TRIM22 ノックアウト細胞において、IFN γ 刺激により HLA-DP がより増加していたことを示唆していると考えられる。

次に、TRIM22 ノックアウト細胞における MHC class II タンパク質の細胞表面発現量を抗 HLA-DR/DP モノクローナル抗体 (HL-40) を用いたフローサイトメトリー法で検討した (図 3-3)。その結果、IFN γ 刺激の有無に関わらず、野生型に比べて TRIM22 ノックアウト細胞において細胞表面の MHC class II 発現量が増加していた。また、野生型とノックアウト細胞の両方で、IFN γ 刺激により細胞表面の MHC class II が増加していた。いずれの結果についても、異なるクローンの TRIM22 ノックアウト細胞を用いても同様の結果であった。

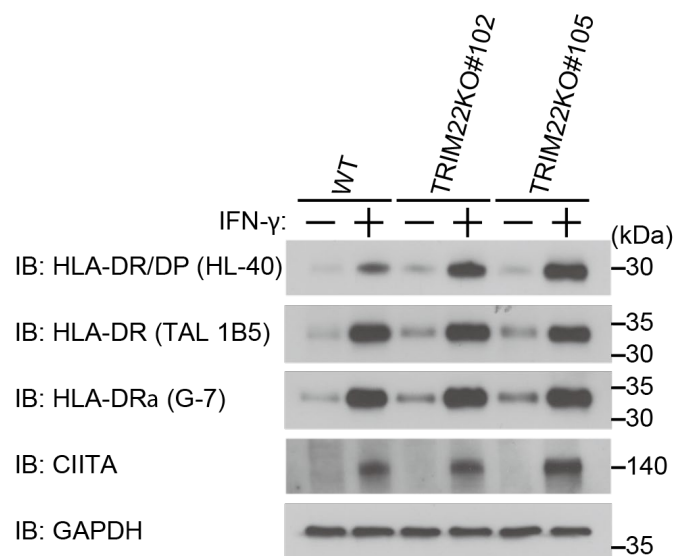


図 3-2 コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞における MHC class II および CIITA のタンパク質量

TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞と、コントロール U87MG 細胞からサンプルを調製し、抗 HLA-DR/DP 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗 HLA-DRA 抗体、抗 CIITA 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。IFN γ 刺激は 100 U/ml、24 時間で行った。

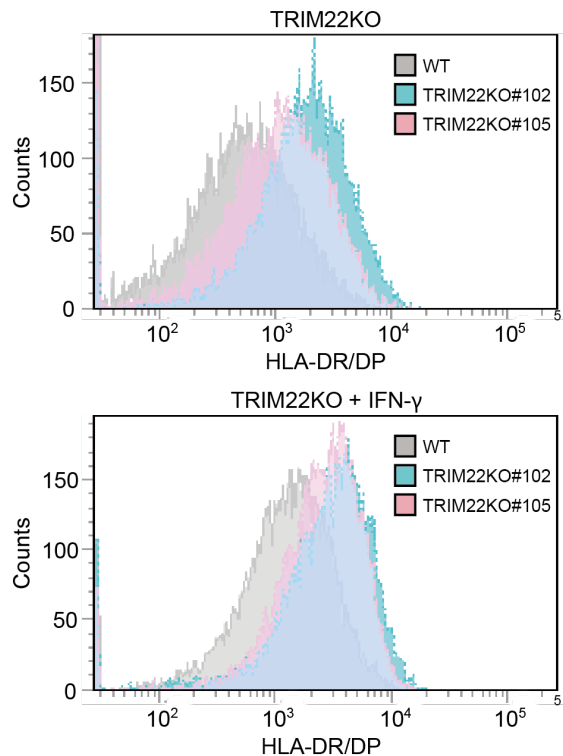


図3-3 コントロールU87MG細胞と、TRIM22ノックアウトU87MG細胞におけるMHC class IIの細胞表面発現量

コントロールU87MG細胞と、TRIM22ノックアウトU87MG細胞におけるMHC class IIの細胞表面発現量を、フローサイトメトリーで検討した。

上：IFN γ 刺激なし

下：100 U/mlのIFN γ で24時間刺激した。

Gray: WT、Blue: TRIM22KO#102、Pink: TRIM22KO#105

6 蛍光免疫染色におけるMHC class II発現量の変化

TRIM 22ノックアウトU87MG細胞におけるMHC class IIタンパク質量の変化を、蛍光免疫染色で評価した(図3-4)。その結果、野生型に比べノックアウト細胞で著明に細胞表面のMHC class IIが増加しており、その傾向はIFN γ 刺激下でより顕著であった。また、この蛍光強度の変化はフローサイトメトリーの結果と一貫性があった(図3-5)。

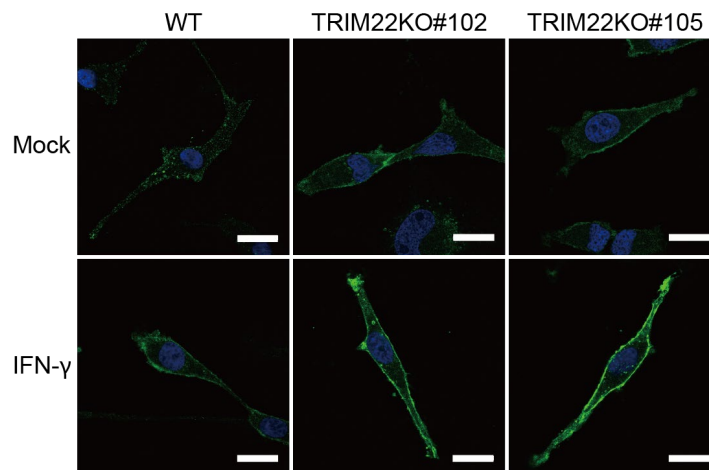


図 3-4 コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞における MHC class II の蛍光免疫染色

コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞において、MHC class II（緑）の局在を蛍光免疫染色で観察した。

上段：IFN γ 未刺激時

下段：IFN γ 刺激時

IFN γ による刺激は、100U/ml、24 時間で行った。核は DAPI(青)で染色した。

Scale bar, 20 μ m

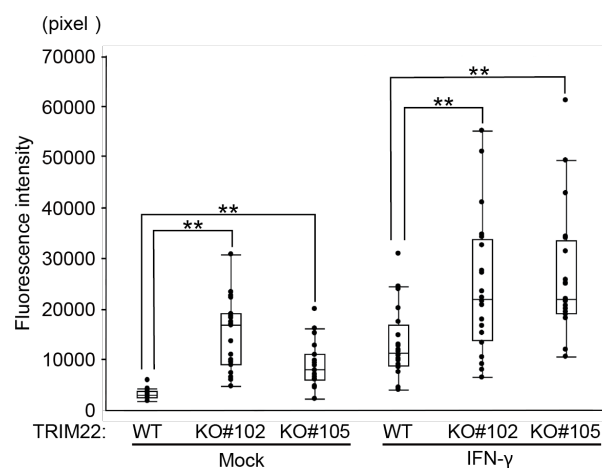


図 3-5 コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞の細胞表面の蛍光強度

コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞の細胞表面の蛍光強度を、ZEN2012 ソフトウェア (ZEISS) を用いて解析した。ANOVA を行なっ

たのちに Dunnett 検定を行い、P 値を算出した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

7 TRIM 22 による MHC class II および CIITA の発現変化

TRIM22 ノックアウトによる MHC class II タンパク質量の増加メカニズムを検討するために、MHC class II および MHC class II のマスター遺伝子である CIITA の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で定量した。その結果、野生型 U87MG 細胞と TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞のいずれも IFN γ 刺激で MHC class II、CIITA 双方の mRNA 量が増加するが、TRIM22 ノックアウトの有無によって増加量に有意な差は認められなかった (図 4)。

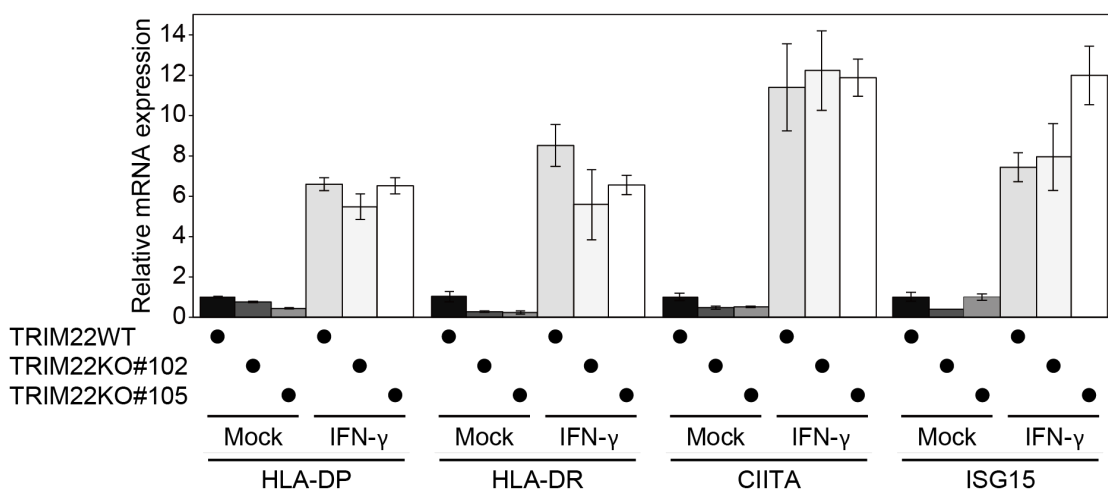


図 4 コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞における MHC class II と CIITA の mRNA 量

コントロール U87MG 細胞と、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞における MHC class II と CIITA の mRNA 量を qRT-PCR で検討した。IFN γ 刺激は 100U/ml、24 時間で行った。

8 MHC class II タンパク質の安定性の検討

MHC class II のタンパク質レベルでの量的制御機構として、ユビキチンリガーゼ MARCH1 によるものがよく知られている(De Gassart et al., 2008; Matsuki et al., 2007; Wilson et al., 2018)。MHC class II が MARCH 1 によりユビキチン化を受けると、endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)によって認識されて後期エンドソームへと輸送され、リソソームにおいて分解される。TRIM22 はユビ

キチンリガーゼ活性を持つ RING ドメインを保持していることから、TRIM22 が MARCH1 のように分解を介して MHC class II を制御している可能性が考えられた。そこで CHX を用いた chase assay を行い、TRIM22 による MHC class II タンパク質の安定性を評価した (図 5-1、5-2)。その結果、TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞では、野生型 U87MG 細胞と比べてむしろ MHC class II の分解が促進されていた。したがって、TRIM22 は分解以外のメカニズムを通じて MHC class II タンパク質を減少させることが示唆された。

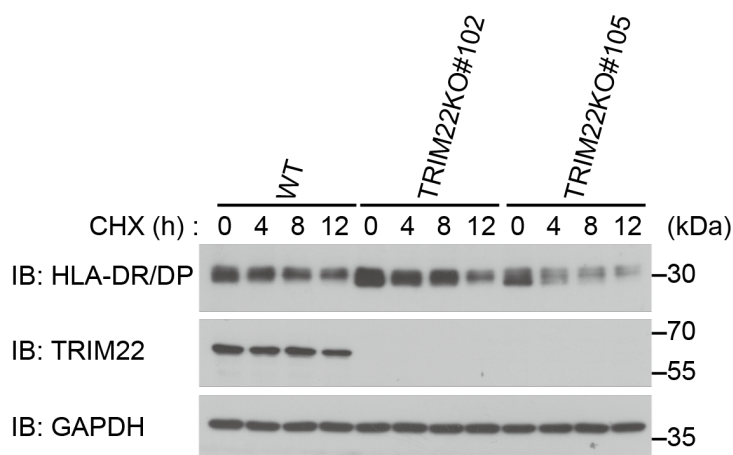


図 5-1 CHX を用いた chase assay

25 μ g/mL の CHX をコントロール U87MG 細胞と TRIM22 ノックアウト U87MG 細胞の培地内に添加し、添加から 0 時間、4 時間、8 時間、12 時間の時点で細胞を回収した。回収した細胞からサンプルを調製し、抗 HLA-DR/DP 抗体、抗 TRIM22 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

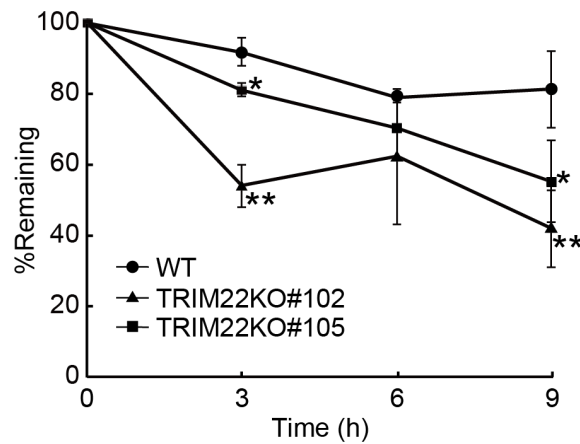


図 5-2 バンド濃度の定量化による MHC class II タンパク質の安定性評価

図 5-1 で行なったウエスタンブロットにおける MHC classII のバンド濃度を定量し、対応する GAPDH のバンド濃度で補正した。0 h を 100%とした際の相対的な濃度の変化を縦軸に%で示した。

9 MS 解析による検討

TRIM22 による MHC class II の発現制御に関与する分子を検討するために、TRIM22 結合分子の同定を質量分析により行った (図 6-1)。FLAG 配列を融合した TRIM22 を安定発現した HEK293T 細胞を溶解し、抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、これにより精製したタンパク質をトリプシンで消化して Iontrap Orbitrap 型質量分析計にて解析を行ったところ、TRIM22 結合タンパク質として mTOR を同定した。次に、HEK293T 細胞と U87MG 細胞における TRIM22 と mTOR および mTOR 関連分子との結合をウエスタンブロットにて検討した。その結果、mTOR だけでなく、mTOR 複合体構成因子である Raptor、Rictor、GβL についても同様に共沈降が認められた (図 6-2)。これらのことから、TRIM22 が mTOR 複合体を介して MHC class II の発現を制御している可能性が示唆された。

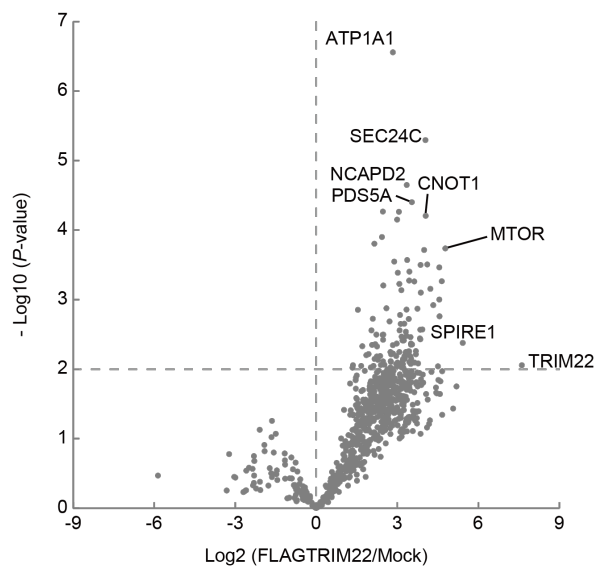


図6-1 MS 解析による TRIM22 結合分子の同定

コントロール HEK293T 細胞 (Mock) と FLAG 配列を融合した TRIM22 を安定発現した HEK293T 細胞 (FLAG-TRIM22) からサンプルを調整し MS 解析を行なった。ボルケーノプロットで示す。全てのサンプルは生物学的に独立したサンプルである。スチューデントの t 検定を行い、p 値を算出した。

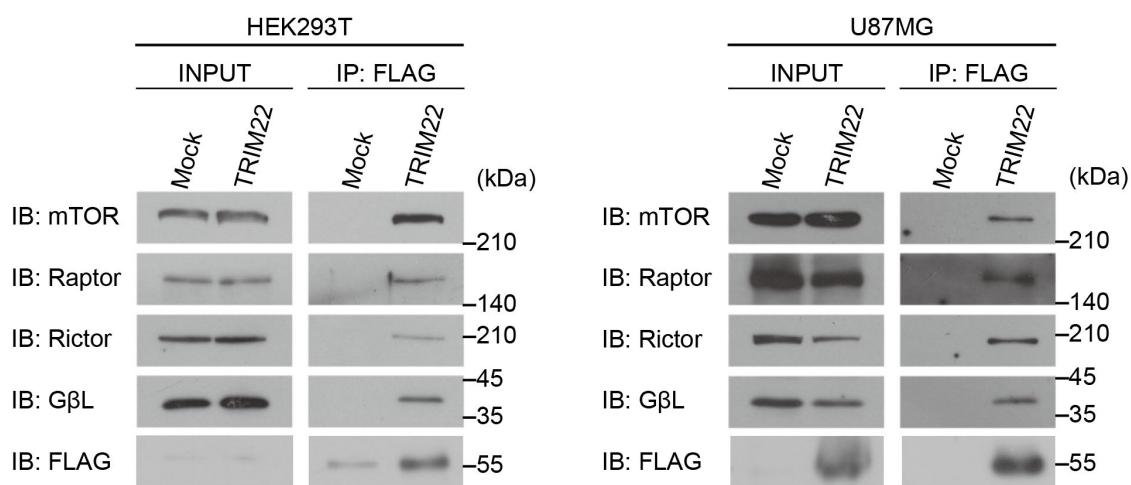


図6-2 HEK293T 細胞と U87MG 細胞における TRIM22 と mTOR、mTOR 関連分子との結合

HEK293T 細胞と U87MG 細胞において、それぞれコントロール細胞 (Mock) と FLAG 配列を融合した TRIM22 を安定発現した細胞 (FLAG-TRIM22) を作製した。

樹立した細胞からサンプルを調製し、抗 TRIM22 抗体、抗 Raptor 抗体、抗 Rictor 抗体、抗 GβL 抗体、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

考察

いくつかの TRIM 遺伝子が IFN γ 応答性を有することは過去に報告されているが、本研究によって TRIM 遺伝子のなかで TRIM22 が特に強く誘導されることが明らかとなった。さらに、TRIM22 が MHC class II の発現量を負に制御することが示された。したがってこれらのことから、TRIM22 の生理学的役割の 1 つは、負のフィードバック機構により、MHC class II タンパク質の量を抑制し、MHC class II の誘導を制御することであると考えられる。

しかしながら、その変化は MHC class II mRNA 量に依存しないことから、TRIM22 は、従来多く報告されているような、MHC class II の転写を司る CIITA を介したプロセス以外に作用して、MHC class II の発現量を制御している可能性が示唆された。

さらに、今回我々が行った chase assay の結果からは、TRIM22 ノックアウト細胞では MHC class II タンパク質の安定性が低下することが示されたが、この結果は TRIM22 が MHC class II タンパク質レベルを負に制御するという事実とは矛盾している。したがって以上のことから、TRIM22 による MHC class II タンパク質の抑制には、転写あるいは分解以外のメカニズム、すなわち翻訳などの過程による制御が関与している可能性がある。

翻訳の過程の中で、特に厳密な制御を受けているのが開始段階であり、その制御因子のひとつとして翻訳開始因子 eIF4E がある。eIF4E はキャップ結合タンパク質であり、mRNA の 5' 末端に存在するキャップ構造 (5'-cap) を認識する。その後 eIF4E は、足場結合タンパク質である eIF4G、RNA ヘリカーゼである eIF4A とともに、eIF4F と呼ばれる複合体を形成して翻訳が開始する (Amorim et al., 2018)。この翻訳機構はキャップ依存的翻訳と呼ばれている。eIF 結合タンパク質 4E-BPs (eIF4E-binding proteins) は、eIF4E と結合することで eIF4E/eIF4G 複合体の形成を阻害し、キャップ依存的翻訳を阻害するが、その一方で、mTOR を含む分子複合体 mTORC1 は 4E-BPs をリン酸化し、その結果 eIF4E への結合能が失われて翻訳は再開する。eIF4E を介したキャップ依存的翻訳は、特定の mRNA の翻訳を優先的に制御することが知られている。過去には TRIM22 が eIF4E と eIF4G の結合を阻害することで、キャップ依存的翻訳を阻害するとの報告がある (Petersson et al., 2012)。さらに、本研究の結果によれば TRIM22 は mTOR 複合体と結合することから、mTOR/4E-BP1/eIF4E 経路を介して、MHC class II の mRNA 翻訳を調節する可能性がある (図 7)。

また、キャップ依存的翻訳は細胞増殖に深く関与することが知られているので、その機能異常は細胞のがん化を惹起すると考えられる (Avdulov et al., 2004)。したがっ

て、キャップ依存的翻訳を抑制する化合物の開発はがんの化学療法につながる可能性がある。実際、現在までに PIK3/Akt/mTOR 経路や eIF4F をターゲットとした低分子化合物が多数開発されており、TRIM22 も同様に新たな治療薬としての可能性が期待できる。

議論すべきもう一つの点としては、TRIM22 が MHC class II の細胞表面への輸送を調整している可能性である。その点を検証するために、ウエスタンブロットのバンド濃度（すなわち細胞全体の MHC class II 量）を定量し、細胞表面蛍光強度（すなわち細胞表面のみの MHC class II 量）の平均値と比較した（表 2）。その結果、IFN γ 刺激がない場合は、野生型細胞に対するノックアウト細胞群での MHC class II 増加量は細胞表面で多いが、IFN γ 刺激が加わると、MHC class II 増加量はほとんど変わらないか、あるいは逆に細胞表面の方が少なくなった。したがって、少なくとも IFN γ 刺激がない定常状態においては、TRIM22 が MHC class II の細胞表面への輸送を抑制している可能性が示唆された。実際に蛍光免疫染色では、IFN γ 刺激がない場合の野生型細胞では MHC class II は主に細胞内に存在している一方、TRIM22 ノックアウト細胞では主に細胞表面に MHC class II が存在しており、両者で局在が異なっていた（図 3-4 上段）。一方 IFN γ 刺激下では、野生型と TRIM22 ノックアウト細胞の両方で、ほとんどの MHC class II タンパク質が細胞表面で観察された（図 3-4 下段）。この局在変化は、単に MHC class II の発現量の違いから生じるものである可能性もあるが、TRIM22 が MHC class II の発現量を制御するだけでなく、その局在変化にも影響を及ぼす可能性を示唆している。

これまで多くの研究で、腫瘍細胞における MHC class II 高発現が、抗 PD-1 療法で治療された特定のがん患者、例えば悪性黒色腫や乳癌、卵巣がん患者の予後を改善することが明らかにされてきた(Axelrod *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2018; Thibodeau *et al.*, 2012)。がん組織内にはいくつかの T 細胞サブセットが存在することが知られており、CD4⁺T ヘルパー1 (Th1) 細胞は、IFN γ などのサイトカインを産生して抗腫瘍反応に寄与する(Disis *et al.*, 2014)。IFN γ は癌細胞に MHC class II 分子の発現を促す一方で、TRIM22 の発現も上昇させる。TRIM22 が MHC class II の発現量を抑制することを踏まえると、TRIM22 は Th1 細胞による抗腫瘍活性に拮抗するものと思われる。TRIM22 の機能阻害は、免疫チェックポイント阻害療法の効果を十分に発揮させるための良い創薬標的となる可能性がある。

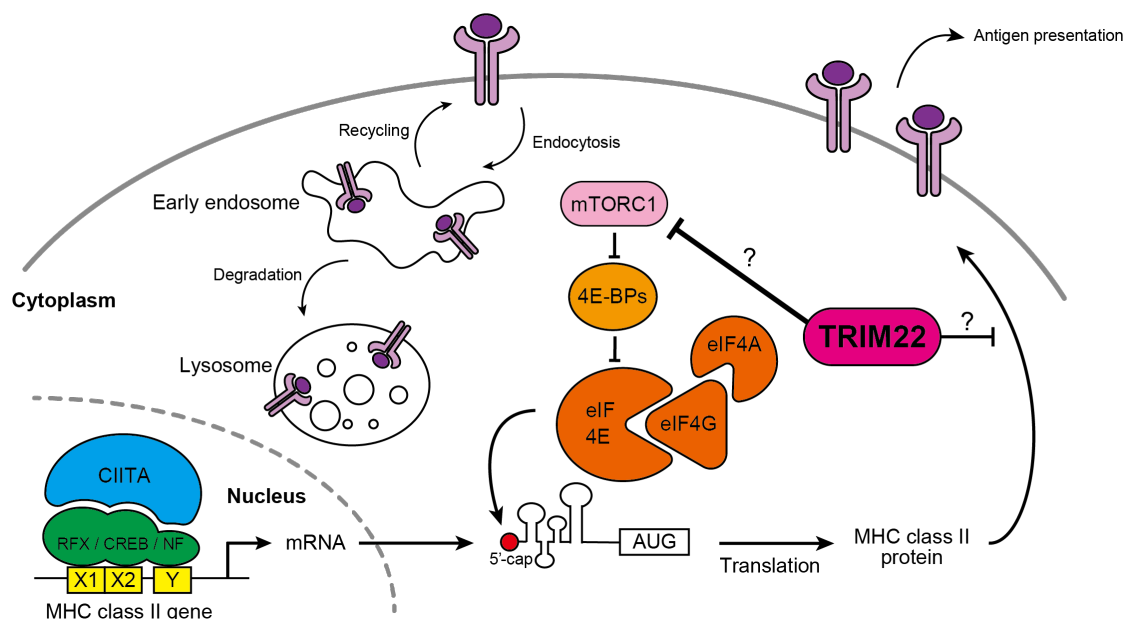


図7 TRIM22によるMHC class IIの発現制御モデル

CIITAは、MHC class II プロモーター上でエンハンソームを形成し、その転写を活性化する。転写された mRNA はプロセッシングされた後にサイトゾルに輸送され、リボソームによってポリペプチドに翻訳される。eIF4E は eIF4G および eIF4A に結合して eIF4F 複合体を形成する。eIF4F 複合体は、mRNA の 5' キャップに結合し、リボソームのリクルートによる翻訳、いわゆるキャップ依存性翻訳の開始を可能にする。TRIM22 は eIF4E の eIF4G への結合を阻害し、そのキャップ依存性翻訳を抑制するため、MHC class II 発現が TRIM22-eIF4E-eIF4G 軸を介して負に調節される可能性があると考えられる。また外来抗原はエンドサイトーシスによって貪食された後、ペプチドとして MHC class II に提示され、T 細胞により認識される。表面に発現したペプチド-MHC class II 複合体は、クラスリン非依存性のエンドサイトーシスにより取り込まれ、リソソームにおいて分解されるか、リサイクルされる。本研究で行なった chase assay の結果から TRIM22 は何らかのメカニズムによって MHC class II タンパク質の安定性を高めている可能性があるが、その効果は、翻訳の過程を介した MHC class II 抑制効果よりも弱いと考えられる。

表 2 バンド輝度と細胞表面蛍光強度との比較

	Mock		IFN- γ	
	Western blot	Flow cytometry	Western blot	Flow cytometry
Wild-type	1.0	1.0	1.0	1.0
TRIM22-knockout#102	2.5	4.7	2.0	1.8
TRIM22-knockout#105	2.1	2.8	2.9	2.0

図 3-2 で示したウエスタンブロットのバンド輝度（すなわち細胞全体の MHC class II 量）を定量し、図 3-5 で示した細胞表面蛍光強度（すなわち細胞表面のみの MHC class II 量）の平均値と比較した。いずれも野生型細胞の値を 1 とした相対値を算出した。

結論

①本研究全体から得られた新知見

- **TRIM** 遺伝子のなかで **TRIM22** が特に強く誘導されることが明らかとなった。
- **TRIM22** が **MHC class II** の発現量を負に制御することが示された。
- **TRIM22** は翻訳の過程で **MHC class II** を制御している可能性が考えられた。

②新知見の意義

近年注目を集めている免疫チェックポイント阻害療法が効果を発揮するためには、**CD4⁺T** 細胞の活性化も重要であることが明らかになってきた。抗原を **CD4⁺T** 細胞に提示する **MHC class II** が発現しているがん細胞では、その発現量と免疫チェックポイント阻害療法の効果の間には正の相関があることが示唆されており、がん細胞において **MHC class II** 量を上昇させることが治療戦略として注目されている。

MHC class II の発現制御機構については、そのマスター遺伝子である **NLRC5** や **CIITA** に過去の研究で焦点が置かれていた。また、**TRIM** ファミリー遺伝子と自然免疫との関連について数多く報告がある一方で、獲得免疫との関連については未だ検討されていなかった。本研究では、**MHC class II** は **IFN γ** 刺激によって発現が誘導されることから、**IFN γ** 刺激によって同様に発現が上昇する **TRIM** ファミリー遺伝子を体系的に探索した。その結果、最も有意に誘導される遺伝子として **TRIM22** を同定し、さらに **TRIM22** は **MHC class II** 量をタンパク質レベルで負に制御していることを明らかにした。**TRIM22** 阻害により **MHC class II** 量を上昇させることが可能であることから、**TRIM22** は免疫チェックポイント阻害療法における潜在的な創薬標的となるものと考えられる。

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

がん組織内にはいくつかの **T** 細胞サブセットが存在することが知られており、**CD4⁺T** ヘルパー1 (**Th1**) 細胞は、**IFN γ** などのサイトカインを産生して抗腫瘍反応に寄与する。**IFN γ** は癌細胞に **MHC** クラス II 分子の発現を促す一方で、**TRIM22** の発現も上昇させる。**TRIM22** が **MHC** クラス II の発現量を抑制することを踏まえると、**TRIM22** は **Th1** 細胞による抗腫瘍活性に拮抗するものと思われる。免疫チェックポイント阻害療法の効果を十分に発揮させるためには、**TRIM22** の機能阻害に重点を置いた研究が期待される。

④今後の課題

MHCII の調節メカニズムとして autophagy との関連が過去に報告されており、加えて、TRIM22 と autophagy の関連を報告する論文もある。Autophagy が MHCII への抗原ペプチド提示を促進するという既報は多いが、MHCII の量的調節について議論したものは少ない。MHCII の量自体は変化しないという報告もあるが、今後検討の余地があると考えられる。

謝辞

本論文の作成にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

北海道大学医学研究院の平野聡教授と畠山鎮次教授には、研究の着想から論文執筆まで、終始適切で温かい激励とご指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。

また、医化学分野の方々にも大変お世話になりました。特に、渡部昌講師、近藤豪助教には、貴重な時間を割いて熱心にご協力いただきました。先生方のご助言なくしては本研究の遂行は不可能であったことを記すとともに、厚く御礼申し上げます。

試料や器具など実験を実施するための環境を整備していただいた、技術補助員の坂田紫帆氏や教室秘書の松崎由美氏にも感謝申し上げます。

最後に、研究室のメンバーの方々には、常に刺激的な議論をいただき、精神的にも支えられました。本当にありがとうございました。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Amorim, I.S., Lach, G., and Gkogkas, C.G. (2018). The Role of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) in Neuropsychiatric Disorders. *Front Genet* *9*, 561.

Avdulov, S., Li, S., Michalek, V., Burrichter, D., Peterson, M., Perlman, D.M., Manivel, J.C., Sonenberg, N., Yee, D., Bitterman, P.B., and Polunovsky, V.A. (2004). Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* *5*, 553-563.

Axelrod, M.L., Cook, R.S., Johnson, D.B., and Balko, J.M. (2019). Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer. *Clin Cancer Res* *25*, 2392-2402.

Barr, S.D., Smiley, J.R., and Bushman, F.D. (2008). The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathog* *4*, e1000007.

Beatty, G.L., and Gladney, W.L. (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* *21*, 687-692.

Choi, N.M., Majumder, P., and Boss, J.M. (2011). Regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Curr Opin Immunol* *23*, 81-87.

de Charette, M., Marabelle, A., and Houot, R. (2016). Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? *Eur J Cancer* *68*, 134-147.

De Gassart, A., Camosseto, V., Thibodeau, J., Ceppi, M., Catalan, N., Pierre, P., and Gatti, E. (2008). MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3491-3496.

Disis, M.L., Watt, W.C., and Cecil, D.L. (2014). Th1 epitope selection for clinically effective cancer vaccines. *Oncoimmunology* *3*, e954971.

Hatakeyama, S. (2011). TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer* *11*, 792-804.

Hatakeyama, S. (2017). TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem Sci* *42*, 297-311.

Hattlmann, C.J., Kelly, J.N., and Barr, S.D. (2012). TRIM22: A Diverse and Dynamic Antiviral Protein. *Mol Biol Int* *2012*, 153415.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* *67*, 425-479.

Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., Lanier, L.L., Saito, T., and Arase, H. (2013). Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int Immunol* *25*, 235-246.

Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoka, S., Ebina, K., Shi, K., et al. (2014). Autoantibodies to IgG/HLA class II

complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 3787-3792.

Johnson, D.B., Estrada, M.V., Salgado, R., Sanchez, V., Doxie, D.B., Opalenik, S.R., Vilgelm, A.E., Feld, E., Johnson, A.S., Greenplate, A.R., 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.

Johnson, D.B., Nixon, M.J., Wang, Y., Wang, D.Y., Castellanos, E., Estrada, M.V., Ericsson-Gonzalez, P.I., Cote, C.H., Salgado, R., Sanchez, V., et al. (2018). Tumor-specific MHC-II expression drives a unique pattern of resistance to immunotherapy via LAG-3/FCRL6 engagement. *JCI Insight* *3*.

Lian, Q., and Sun, B. (2017). Interferons command Trim22 to fight against viruses. *Cell Mol Immunol* *14*, 794-796.

Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Aoki, M., Mito-Yoshida, M., Uematsu, M., Hasegawa, T., Koseki, H., Ohara, O., Nakayama, M., et al. (2007). Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J* *26*, 846-854.

Moldenhauer, G., Henne, C., Karhausen, J., and Moller, P. (1999). Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leucocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments. *Immunology* *96*, 473-484.

Morris, A.C., Beresford, G.W., Mooney, M.R., and Boss, J.M. (2002). Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol* *22*, 4781-4791.

Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., and Morse, H.C., 3rd (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* *8*, 849-860.

Petersson, J., Ageberg, M., Sanden, C., Olofsson, T., Gullberg, U., and Drott, K. (2012). The p53 target gene TRIM22 directly or indirectly interacts with the translation initiation factor eIF4E and inhibits the binding of eIF4E to eIF4G. *Biol Cell* *104*, 462-475.

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

Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* *359*, 1350-1355.

Rodig, S.J., Gusenleitner, D., Jackson, D.G., Gjini, E., Giobbie-Hurder, A., Jin, C., Chang, H., Lovitch, S.B., Horak, C., Weber, J.S., et al. (2018). MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med* *10*.

Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M.N., Stagg, J., and Galipeau, J. (2007). Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* *179*, 1549-1558.

Spilianakis, C., Papamatheakis, J., and 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.

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

van den Elsen, P.J. (2011). Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Front Immunol* *2*, 48.

Vicenzi, E., and Poli, G. (2018). The interferon-stimulated gene TRIM22: A double-edged sword in HIV-1 infection. *Cytokine Growth Factor Rev* *40*, 40-47.

Waldman, A.D., Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* *20*, 651-668.

Wilson, K.R., Liu, H., Healey, G., Vuong, V., Ishido, S., Herold, M.J., Villadangos, J.A., and Mintern, J.D. (2018). MARCH1-mediated ubiquitination of MHC II impacts the MHC I antigen presentation pathway. *PLoS One* *13*, e0200540.

Wright, K.L., and Ting, J.P. (2006). Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes. *Trends Immunol* *27*, 405-412.