

審査の結果の要旨

氏名 大竹 一輝

本論文は、適応免疫系で重要な役割を担う MHC クラス I (MHC-I) 抗原提示経路について、核抗原もしくは細胞質特異的 MHC-I 抗原提示経路の有無の検証、ならびに MHC-I 抗原提示経路新規因子同定を目的としたものである。ゲノムワイドスクリーニングを実施することにより、MHC-I 抗原提示経路の新規因子として transmembrane emp24 domain-containing (TMED) 2 と TMED10 を同定するに至った。

脊椎動物は病原体感染に対抗するため、適応免疫系と呼ばれる精巧な防御機構を発達させてきた。全ての有核細胞は MHC-I を細胞表面に発現し、細胞内タンパク質由来のペプチドを提示することで細胞の感染状態を細胞傷害性 T 細胞に提示する。プロテアソームはユビキチン化タンパク質の分解を通じて様々な生命現象を制御するタンパク質分解酵素複合体であり、適応免疫系においても重要な役割を果たしている。プロテアソームの分解産物である短いペプチドの一部は transporter associated with antigen processing (TAP) によって小胞体(ER)内に取り込まれ、MHC-I の抗原ペプチドとして利用される。これまでの抗原提示に関する研究では ER 内腔へのペプチドの取り込み以降の研究が主流で、ペプチドが産生される場所について考慮されることはほとんどなかった。抗原ペプチドは単に拡散によって TAP と出逢うことを示唆する報告がある一方で、抗原ペプチドが他のタンパク質と結合することで細胞質に豊富に存在するプロテアーゼによる分解を免れている可能性も示唆されていた。そこで、抗原タンパク質を核または細胞質のみに発現するヒト培養細胞を樹立し、ゲノムワイド siRNA ライブラリーを用いたノックダウンスクリーニングと、CRISPR gRNA ライブラリーを用いたノックアウトスクリーニングの2種類のゲノムワイドスクリーニングを実施し、新規因子を網羅的に探索した。

MHC-I 上には細胞内の様々なタンパク質由来のペプチドが提示されているため、核抗原と細胞質抗原それぞれの提示を見るには特定の抗原ペプチドの MHC-I への提示を定量する必要がある。また、定量的な比較のためには核抗原と細胞質抗原が同一のタンパク質であることが必要である。そこで、chicken ovalbumin (OVA)由来の抗原ペプチド SIINFEKL (OVAp)とマウス MHC-I アリルの1つ H-2K^bとの複合体を特異的抗体により定量することにした。この抗体を用いることで、MHC-I への OVAp の提示のみを定量することができる。C 末端に Venus を付加した H-2K^b-Venus 発現細胞を樹立し、続いて核外移行シグナル(NES)もしくは核移行シグナル(NLS)を付加した抗原タンパク質 OVA を導入することで核抗原もしくは細胞質抗原を発現する細胞を樹立した。

siRNA スクリーニングでは細胞表面の H-2K^b/OVAp のみを allophycocyanin (APC)で蛍光標識された特異的抗体で免疫染色し、細胞全体の APC 平均蛍光強度をハイコンテントイメージアナライザーで定量することで、OVAp の提示量を検出する系を確立した。1 次スクリーニングでは peptide loading complex、IFN γ シグナル経路の構成因子といった抗原提示に関わる既知因子が多数含まれており、スクリーニングの妥当性が確認された。2 次、3 次スクリーニングと、H-2K^b-Venus 自体の発現に影響を与えるものや内在性の HLA-I の発現量に影響のないものを除くカウンタースクリーニングを経て 12 個の候補遺伝子を得た。このうち再現性の得られた細胞質抗原特異的因子 RBM19 と共通因子 ZCCHC14 について解析を進めたが、それぞれ翻訳、転写に関与する遺伝子で MHC-I 抗原提示経路に特異的な因子ではなかった。

siRNA スクリーニングの欠点としてオフターゲット効果による偽陽性に加え、ノックダウン後の残存遺伝子発現により遺伝子が機能し続ける場合があり偽陰性に繋がるということが知られている。そこで核抗原もしくは細胞質抗原特異的 MHC-I 抗原提示制御因子および MHC-I 抗原提示経路の新規因子を同定するために、遺伝子発現を完全に欠損させられる CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトスクリーニングを行うこととした。このスクリーニングには遺伝子ノックアウトの容易な一倍体の HAP1 細胞を用いた。レンチウイルス感染により HAP1 細胞に gRNA ライブラリーを導入し、細胞表面の HLA-I および H-2K^b/OVAp の発現が減少した細胞集団をソートした。次世代シーケンサーの結果の解析には、CRISPR スクリーニング用の解析パイプラインとして開発された MAGeCK-VISPR を利用し、p 値<0.05 かつ最尤推定によって得られた遺伝子の評価値 (β score) 上位の 125 個を各スクリーニングのヒットとした。ヒット遺伝子の上位には siRNA スクリーニング同様に、peptide loading complex、IFN γ シグナル経路の構成因子が多数含まれており、スクリーニングの妥当性が確認された。核抗原と細胞質抗原それぞれのスクリーニングの結果は類似しており、特に β score 上位の遺伝子については大半がどちらのスクリーニングにおいても得られていたため、核抗原もしくは細胞質抗原特異的因子ではなく、まずは共通して得られた因子を優先して解析を進めることとした。スクリーニングのヒット遺伝子各 125 遺伝子のうち共通して得られた約半数の 63 遺伝子に絞り、Gene ontology 解析によりリボソーム合成、基本転写因子、IFN γ シグナル経路、既知の MHC-I 抗原提示関連遺伝子、RNA エキソソームに関与する遺伝子を除いた結果、最終的に 10 個の候補遺伝子が得られた。

ゲノムワイド CRISPR スクリーニングでは、ヒトにおいて 9 種類存在する TMED タンパク質のうち、MHC-I 抗原提示を制御する分子として、TMED2 と TMED10 の 2 つが同定された。TMED タンパク質は p24 ファミリーに属しており、p24 タンパク質は COPI および COPII タンパク質と結合するモチーフを有し、積荷受容体として輸送小胞への積み込みに関わるタンパク質である。TMED タンパク質は異なる組み合わせで会合し、ヘテロ二量体もしくは四量体を形成する。これまで TMED2、TMED10 の積荷タンパク質としては glycosylphosphatidylinositol-anchor タンパク質 (GPI-AP) と一部の G-protein-coupled receptors (GPCRs) が知られていたが、MHC-I の小胞輸送への関与は不明であった。MHC-I の小胞輸送については Bap31 という分子が ER-ゴルジ体間の輸送に関与することが報告されているが、Bap31 の過剰発現で MHC-I の細胞表面発現が上昇する一方で、欠損もしくはノックダウンでは変化しないことから Bap31 は MHC-I の順行輸送を促進するが必須の因子ではなく、他の積荷受容体が存在すると考えられている。そこで、TMED2、TMED10 が MHC-I の積荷受容体である可能性について検討した。GPI-AP の輸送の際に TMED2、TMED10 と協調して働くことが報告されていた TMED5 と比較したところ、TMED2 と TMED10 ノックアウトにおいてのみ MHC-I 抗原提示が減少した。また、このとき細胞膜タンパク質の輸送全般に対する影響は見られなかったことから TMED2 と TMED10 は MHC-I の輸送に選択的に関与すると考えられる。HLA-I が TMED2、TMED10 ノックダウン時に ER ではなく cis-Golgi に蓄積していたことから、これらは cis-Golgi から細胞膜への順行輸送もしくは cis-Golgi から ER へと逆行輸送する MHC-I の品質管理機構に関与していることが示唆された。

以上の研究から、大竹一輝は以下の成果を示した。まず、核抗原または細胞質抗原をそれぞれ MHC-I 上に提示する細胞を樹立し、siRNA スクリーニングと CRISPR スクリーニングの 2 種類のゲノムワイドスクリーニングにより制御因子を探索した。そして、核抗原と細胞質抗原の両スクリーニングで共通して得られた因子の解析から MHC-I 抗原提示経路の新規因子として TMED2 と TMED10 を同定し、TMED2 と TMED10 が MHC-I の積荷受容体タンパク質であることを明らかにした。本研究は病原体感染に対する生体防御反応において重要な役割を担う MHC-I 抗原提示についての理解を深めるものであり、がんや病原体感染の新たな治療戦略に繋がることが期待される。よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。