論文の内容の要旨

論文題目　制御性 T 細胞の遺伝子発現制御における forkhead 転写因子の DNA 認識特性の重要性

氏名　木村　翔彦

【背景と目的】

Forkhead (FKH) 転写因子 Foxp3 を発現する制御性 T (regulatory T, Treg) 細胞は、自己免疫など病的な免疫応答を抑制して生体の恒常性維持に中心的な役割を担っている。Foxp3 は Treg 細胞の分化と機能に必須であり、ヒト immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) 症候群患者は Foxp3 変異のために機能的な Treg 細胞が分化せず、致死性の自己免疫疾患を発症する。近年、Foxo1 も Treg 細胞の分化と機能に重要であることが報告されている。しかしながら、これら FKH 転写因子による Treg 細胞の遺伝子発現制御機構は未解明の点が多く残されている。

本研究室の先行研究から、Treg 細胞の遺伝子発現制御において Foxp3 の DNA 結合特異性が重要であることが示唆されている。IPEX 患者に見られるミスセンス変異 A384T (Ala384 の Thr への置換) は、*Ctla4* など大半の Foxp3 の標的遺伝子の発現を変化させずに抑制機能を選択的に障害する。その機能破綻の一因は転写因子をコードする *Batf* 遺伝子の転写抑制であった。そして、A384T は FKH ドメインの DNA 認識ヘリックスに位置しており、Foxp3 の DNA 結合特異性を変化させる gain-of-function 変異であることがわかった。一方、P サブファミリー以外の FKH 転写因子では当該アミノ酸は Ser または Thr であり、DNA と相互作用することが報告されている。

以上の知見から私は、DNA 認識ヘリックスの当該アミノ酸残基が Foxp3 では Ala、他の FKH 蛋白では Ser/Thr であることがそれぞれの DNA 認識特性と遺伝子発現制御活性を規定する一つの重要な因子であるという仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証するため、Foxp3 の Ala384 を Ser/Thr に、Foxo1 の Ser209 を Ala/Thr に置換した変異体を作製し、これら変異がそれぞれの DNA 認識特性と BATF や CTLA-4 など Treg 細胞機能分子の発現制御活性に与える影響を解析した。

【方法と結果】

第二章では Foxp3 Ala384 の機能解析を行った。A384S の DNA 結合活性を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により調べた結果、A384S は A384T と同様に canonical FKH モチーフ配列 GTAAACA に対して野生型 (WT) よりも強

く結合し、加えて WT が認識しない類似配列 GTCAACA などにも結合した。A384S の遺伝子発現制御活性を調べるため、Foxp3⁻CD4⁺ T 細胞にレトロウイルス（RV）を用いて WT、変異型 Foxp3 を導入して RNA-seq により網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、他の IPEX 変異とは異なり、A384S は WT 次いで A384T に近い遺伝子発現パターンを示した。この際、A384S は A384T と同様に *Batf* 発現を抑制する一方、*Ctla4* など Foxp3 の標的遺伝子については WT と同程度に発現を誘導した。さらに A384S/T は FKH モチーフ配列依存的に *Batf* プロモーター活性を WT より強く抑制した。以上の結果から、A384S は A384T と類似した DNA 結合の gain-of-function 変異であり、逆に言えば、Foxp3 では当該アミノ酸残基が Ala であることが *Batf* など特定の遺伝子の発現制御に重要であることがわかった。

第三章では Foxo1 Ser209 の機能解析を行った。Foxo1 の認識する FKH モチーフを ChIP-seq 解析により調べた結果、Foxo1 は GTAAACA や GTCAACA に加えて insulin response element（IRE）配列 CAAAACA を認識することが示唆された。Foxo1 S209A/T 変異体蛋白を作製して EMSA を行った結果、S209A/T はともに GTAAACA や GTCAACA などの FKH モチーフ配列に対して WT と同程度に結合した一方で、CAAAACA に対して WT と比べて結合活性を大きく低下していた。Foxo1 による Treg 細胞の遺伝子発現制御について調べるため、2 種類の Foxo1 コンディショナルノックアウト（cKO）マウス（*Foxp3*$^{YFPCre/hCD2}$*Foxo1*^{flox} 雌および *ROSA26*^{CreERT2}*Foxo1*^{flox}）を作製して解析した。その結果、Foxo1 は Treg 細胞の BATF および CTLA-4 発現を正に制御することがわかった。Foxo1 の遺伝子発現制御活性における Ser209 の機能を調べるため、*ROSA26*^{CreERT2}*Foxo1*^{flox} マウスより作製した Foxo1 cKO Treg 細胞に RV を用いて WT または S209A/T Foxo1 を導入したところ、S209A/T はともに WT と比べて BATF や CTLA-4 などの発現誘導能の低下を示した。しかし S209A 変異によって Foxo1 の *Batf* プロモーター活性化能は障害されなかった。以上の結果から、Foxo1 Ser209 は GTAAACA や GTCAACA などの FKH モチーフ配列認識および *Batf* プロモーター活性化能には顕著な影響を与えない一方で、IRE 配列認識に必須であり、それによって BATF や CTLA-4 など Treg 細胞機能分子の発現制御に重要である可能性が示唆された。

第四章では仮説から派生した疑問として、A384T Foxp3 が Foxo1 の機能を障害する可能性を検討した。Foxo1 のゲノム DNA 結合が A384T Foxp3 によって受ける影響を調べるため、A384T Foxp3⁺ Treg 細胞の Foxo1 ChIP-seq 解析を行った。その結果、*Batf* プロモーターを含む全ゲノムレベルにおいて、A384T Foxp3 が WT Foxp3 よりも強く結合する領域で Foxo1 の結合が低下する傾向は見られなかった。また A384T ノックイン Foxo1 cKO マウス（*Foxp3*^{A384T}*ROSA26*^{CreERT2}*Foxo1*^{flox}）を解析す

ると、Foxo1 による BATF 発現制御活性は WT および A384T Foxp3^{+} Treg 細胞で同程度に見られた。以上の結果から、A384T Foxp3 の示す BATF 発現抑制活性は Foxo1 に対する機能障害によるものではないことがわかった。

【総括と考察】

本研究で私は、Foxp3 と Foxo1 の Ala と Ser の違いがそれぞれの DNA 認識特性と遺伝子発現制御機能に重要であることを明らかにした。

Foxp3 A384S/T 変異は GTAAACA に対する結合活性を増強し、GTCAACA に対する結合活性を新たに賦与する。一方 Foxo1 S209A/T 変異は、これらの配列認識には顕著な影響を与えず、IRE など特定の FKH モチーフ配列に対する結合障害を引き起こす。このことは、DNA 認識ヘリックスの当該アミノ酸残基が Foxp3 と Foxo1 それぞれの DNA 認識特性に異なった影響を与えることを意味しており、配列認識の違いには他の構造的差異も重要であることを示唆している。

Foxp3 A384S/T 変異はともに *Ctla4* など大半の Foxp3 標的遺伝子の発現制御に影響を与えないが、Treg 細胞の抑制機能に不可欠な *Batf* 遺伝子のプロモーター活性を強く抑制する。逆に言えば、Foxp3 Ala384 は *Batf* プロモーター活性への抑制効果の減弱に重要であると考えられる。一方 Foxo1 では、S209A/T 変異により BATF や CTLA-4 などの発現誘導能が障害されることから、Ser209 はこれらの発現制御に重要である。しかし S209A 変異は *Batf* プロモーター活性化能に顕著な影響を与えず、*Batf* プロモーターに存在する 5 つの FKH モチーフ配列のうち 4 つの配列への結合活性を障害しない。このことから、S209A 変異による BATF 発現誘導能の低下はプロモーター活性以外の要因によると考えられる。

本研究により、Foxp3 と Foxo1 の 1 アミノ酸残基の違いがそれぞれの DNA 認識特性と遺伝子発現制御機能を変化させる一つの重要な決定因子であることが明らかになった。Treg 細胞において Foxp3 と Foxo1 は同様の配列認識によって競合的に働くことが提唱されているが、今回の結果において A384T Foxp3 が Foxo1 の結合を障害しないことから、両者の競合関係は DNA 結合活性の強さによって配列を奪い合うものではないことが示唆される。また Foxp3 と Foxo1 の当該アミノ酸残基を介した DNA 認識特性の結果を総合すると、遺伝子発現制御における競合関係は標的遺伝子に依存していると考えられる。Foxp3 は Ala384 により GTCAACA など特定の配列への結合活性を失っているため、制御領域にこれらの配列を含む *Batf* などの標的遺伝子の発現制御においては Foxo1 と競合しないと推測される。FKH 転写因子群の進化の過程で、P サブファミリーにおいて当該アミノ酸が Ser から Ala に変化することが他の FKH 転写因子との遺伝子発現制御における競合を避けるために重要な変化であったと考えられる。