

論 文 内 容 要 旨

題目 Foxn1- β 5t transcriptional axis controls CD8+ T-cell production in the thymus

(Foxn1- β 5t 転写制御軸は胸腺での CD8 陽性 T 細胞生成を制御する)

著者 Muhammad Myn Uddin, Izumi Ohigashi, Ryo Motosugi, Tomomi Nakayama, Mie Sakata, Jun Hamazaki, Yasumasa Nishito, Immanuel Rode, Keiji Tanaka, Tatsuya Takemoto, Shigeo Murata & Yousuke Takahama

Nature Communications 2017年2月8日付け電子版

第8巻 第14419号 1 ページから 10 ページに発表済

内容要旨

胸腺プロテアソーム構成鎖 β 5tは胸腺皮質上皮細胞で特異的に発現し、正の選択を惹起するMHCクラスI拘束性の自己ペプチドを産生し、胸腺でのCD8陽性T細胞の生成を担う。しかし、 β 5tの胸腺皮質上皮細胞での特異的発現を制御する分子メカニズムは明らかになっていない。一方、胸腺上皮細胞の分化に必須の転写因子であるFoxn1を欠損するヌードマウスの胎仔胸腺では、 β 5tの発現は検出されない。しかし、Foxn1は β 5tの発現を直接制御しているのか、それとも、Foxn1欠損胎仔胸腺での β 5t発現の消失は胸腺上皮細胞の分化異常に因るものなのかは明らかになっていない。そこで、Foxn1が β 5tの発現を直接制御する可能性について検討するために、 β 5tゲノム上のFoxn1結合領域を検索した。Foxn1はACGCのコア配列を含む11塩基のコンセンサス配列を認識して結合することが知られており、 β 5tゲノム上には18個のACGC配列が検出された。これらの領域の中からFoxn1が結合する領域を同定するために、HEK293T細胞に β 5tゲノム領域をクローニングしたプラスミドとFoxn1発現プラスミドを導入し、DNA免疫沈降アッセイを行ったところ、 β 5tの転写開始点近傍の領域 (site13) への

様式 (8)

Foxn1の結合が検出された。一方、他の17領域への結合は検出されなかった。また、site13を含む $\beta 5t$ ゲノム領域下に緑色蛍光タンパクEGFPを繋いだレポータープラスミドを用いたレポーター解析から、EGFPの発現はFoxn1存在下で促進されるが、site13のコア配列への変異導入によりFoxn1依存的なEGFP発現の促進は消失することが明らかになった。さらに、マウスから精製した胸腺上皮細胞を対象にクロマチン免疫沈降アッセイを行ったところ、皮質上皮細胞ではsite13へのFoxn1の結合が検出されたが、同じくFoxn1を発現する髓質上皮細胞ではsite13へのFoxn1結合は検出されなかった。これらのことから、Foxn1は胸腺皮質上皮細胞において、 $\beta 5t$ の転写開始点近傍のsite13に結合し遺伝子発現を制御することが示唆された。そこで、生体内でのFoxn1による $\beta 5t$ 発現制御について検討するために、site13のFoxn1結合コア配列に変異を導入したマウスをCRISPR/Cas9によるゲノム編集法で作製した。まず、変異マウスの胸腺上皮細胞におけるsite13へのFoxn1結合をクロマチン免疫沈降アッセイで検討したところ、Foxn1結合の低下が検出された。また、site13変異ホモ接合体マウスでは、胸腺皮質上皮細胞での $\beta 5t$ のmRNA発現、およびタンパク発現が低下していた。さらに、胸腺でのCD8陽性T細胞の産生が低下し、二次リンパ組織におけるCD8陽性T細胞数も減少していた。これらのことから、Foxn1は $\beta 5t$ ゲノム上のシス制御領域に結合することにより胸腺皮質上皮細胞での $\beta 5t$ 発現を制御しており、Foxn1- $\beta 5t$ の転写制御軸は胸腺におけるCD8陽性T細胞の生成に重要であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1343 号	氏名	MD,MYN UDDIN
審査委員	主査 安友 康二 副査 岡崎 拓 副査 松本 満		

題目 Foxn1-β5t transcriptional axis controls CD8⁺ T-cell production in the thymus

(Foxn1-β5t 転写制御軸は胸腺での CD8 陽性 T 細胞生成を制御する)

著者 Muhammad Myn Uddin, Izumi Ohigashi, Ryo Motosugi, Tomomi Nakayama, Mie Sakata, Jun Hamazaki, Yasumasa Nishito, Immanuel Rode, Keiji Tanaka, Tatsuya Takemoto, Shigeo Murata & Yousuke Takahama

平成 29 年 2 月 8 日付け電子版 Nature Communications

第 8 巻 論文番号 14419

1 ページから 10 ページに発表済

(主任教授 高濱 洋介)

要旨 胸腺皮質上皮細胞で特異的に発現される胸腺プロテアソーム構成鎖 β5t は、正の選択を惹起する MHC クラス I 拘束性の自己ペプチド産生と CD8 陽性 T 細胞の生成を担う。しかし、β5t の胸腺皮質上皮細胞特異的発現を制御する分子機構は明らかでなかった。申請者は、胸腺上皮細胞の分化に必須の転写因子である Foxn1 を欠損するヌードマウスの胎仔胸腺では β5t の発現が検出されないことに着目し、Foxn1 が β5t の発現を直接制御する可能性を検討した。得られた結果は以下の通りである。

1. 培養細胞を用いた DNA 免疫沈降法により、Foxn1 は β5t ゲノ

ム上の Foxn1 結合コア配列を持つ 18 領域のうち、 $\beta 5t$ 転写開始点近傍にある「第 13 領域 (site 13)」に結合することを見出し、レポーターアッセイにより Foxn1 が site 13 への結合を介してレポーター遺伝子の転写を正に制御することを明らかにした。

2. マウス個体から精製された細胞を対象としたクロマチン免疫沈降法により、Foxn1 の site 13 への結合は胸腺皮質上皮細胞特異的に検出されることを明らかにした。
3. ゲノム編集技術によりゲノム上の site 13 に点変異を導入したマウス(site 13 変異マウス)を作製し、このマウスでは胸腺皮質上皮細胞における site 13 への Foxn1 結合が低下すること、胸腺皮質上皮細胞での $\beta 5t$ の mRNA 発現とタンパク質発現が低下することを示し、生体内でも Foxn1 は site 13 を介して $\beta 5t$ の発現を正に制御することを明らかにした。
4. Site 13 変異マウスでは、胸腺と二次リンパ組織における CD8 陽性 T 細胞数が減少していた。

以上の研究から、Foxn1 は胸腺皮質上皮の $\beta 5t$ 発現調節を介して CD8 陽性 T 細胞の生成を制御していることが明らかになった。本研究成果は、胸腺上皮細胞による T 細胞分化調節を担う分子機構解明に貢献し、免疫学の発展に寄与するところが大きく、学位授与に値すると判定した。