

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21511

研究課題名（和文）プロテオーム解析とCROP-seq技術を用いた新規MHC-I遺伝子誘導因子の同定

研究課題名（英文）Identification of novel MHC class I gene-inducing factors by proteomics and CROP-seq technology

研究代表者

小林 弘一（Kobayashi, Koichi）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：60817162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々はMHC-I遺伝子の転写活性化因子として、NLRC5を同定した。NLRC5はDNA結合ドメインを持たないが、MHC-Iプロモーター上で様々な因子と転写複合体を形成する事によりMHC-I依存性の抗原提示経路の主要遺伝子群を網羅的に制御する。しかしながら、NLRC5転写因子複合体の全貌は未知である。NLRC5特異的に結合する新規分子の同定を試みた結果、複数の新規タンパク質の同定に成功した。これらNLRC5結合タンパク質についてノックダウンやCRISPR/Cas9によるノックアウトによる解析の結果、NLRC5を介したMHC-I発現制御に関与する新規分子が得られたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MHC-I分子は癌抗原やウイルス抗原などをCD8T細胞に提示することにより、癌細胞やウイルスの排除に必須である。このMHC-I分子の発現に必要な主要転写因子NLRC5同定に我々のグループは成功した。しかしながら、NLRC5によるMHC-I遺伝子発現の制御メカニズムは未だ大きく不明であった。本研究により、NLRC5に結合することによりMHC-I遺伝子発現の制御に関わる新しい遺伝子の発見することができた。MHC-I分子は癌やウイルス感染症に密接に関わっており、その制御メカニズムを解析することから新たな治療薬の発見開発が進展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：MHC class I transactivator (CITA), also known as NLRC5, serves as a key components in the transactivation of MHC class I and related genes, which are required for the immune responses against virus or cancer by activating CD8 T cells. Although NLRC5 lacks a DNA-binding domain, it generates a large DNA/protein complex termed CITA enhanceosome on the MHC class I promoter. However, the factors involved in this process is poorly understood. We performed non-biased proteomic approach and found several molecules involved in the MHC class I transactivation. This study would contribute to our understanding of the antigen presentation pathway for viral or cancer antigens.

研究分野：免疫

キーワード：MHC class I NLRC5 CIITA

## 1. 研究開始当初の背景

MHC class I 分子の転写メカニズムは長きに渡って不明であった。最近の我々のグループによる NLRC5 / CIITA の機能の発見は、MHC class I 分子経路への理解を大きく変えるものであり、我々のグループは当分野をリードしてきている。我々は NLRC5 が MHC class I の主要転写制御因子であることを見出した。さらに、NLRC5 の NTP 分解活性がその機能および核内移行に必要であること、他の転写因子と共に活性転写因子複合体をプロモーター上で形成することにより、MHC class I および MHC-I 抗原提示経路の主要分子群の発現を誘導することを発見した。これらの発見は他のグループにより追試され、in vivo での NLRC5 の機能は我々および他グループによる NLRC5 欠損マウスを用いた個別の研究にて確認されてきている。NLRC5 は DNA 結合ドメインを持たないが、MHC-I プロモーター上で様々な因子と転写複合体を形成する事により MHC-I 依存性の抗原提示経路の主要遺伝子群を網羅的に制御する。しかしながら、NLRC5 の機能に必要な cis 領域(W/S)にて NLRC5 に結合する転写因子は未だ不明であり、NLRC5 転写因子複合体の全貌は未知である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は NLRC5 を介した MHC-I 発現誘導機構の全容を NLRC5 結合タンパク質をスクリーニングすることにより解明する事である。NLRC5 は DNA 結合ドメインを持たないが、MHC-I プロモーター上で様々な因子と転写複合体を形成する事により MHC-I 依存性の抗原提示経路の主要遺伝子群を網羅的に制御する。しかしながら、NLRC5 の機能に必要な cis 領域(W/S)にて NLRC5 に結合する転写因子は未だ不明である。また、MHC class I は MHC class II と似た cis elements をプロモーター上に持つにもかかわらず、NLRC5 は MHC class I 遺伝子のみを、CIITA は MHC class II 遺伝子のみを発現を誘導することから、それぞれに特異的な転写因子が存在する可能性がある。我々の研究により NLRC5 と結合し MHC class I 遺伝子発現を制御するすべての因子の発見、解析する事が目標である。

## 3. 研究の方法

Flag-tag を付与した NLRC5 タンパク質安定発現 HeLa 細胞を作成した。コントロールとして同じ NLR タンパク質ファミリーの属する CIITA 安定発現 HeLa 細胞や NOD2 安定発現 HeLa 細胞も作成した。NLRC5 特異的に結合する新規分子を anti-FLAG 抗体で分離し、質量分析法によって同定を試みた。

## 4. 研究成果

23 種類のタンパク質が NLRC5 特異的に結合している事が明らかとなった。これらの NLRC5 結合タンパク質について siRNA によってノックダウンを行い、MHC-I 遺伝子発現を qPCR によって調べた。その結果、ノックダウンによって MHC-I 遺伝子発現の減少が見られ、NLRC5 を介した MHC-I 発現制御に関与する新規分子が得られたことが示唆された。現在までに 3 つの新規 MHC-I 遺伝子誘導因子を解析しており、その 1 つはほぼ in vitro での解析が終わっており、ノックアウトマウスを作成中である。また、NLRC5 のコントロールとして用いた MHC-II 遺伝子の転写活性化因子 CIITA 発現細胞より、CIITA の新しい制御因子の発見に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Cho Steven X., Vijayan Saptha, Yoo Ji Seung, Watanabe Toshiyuki, Ouda Ryota, An Ning, Kobayashi Koichi S.	4. 巻 162
2. 論文標題 MHC class I transactivator NLRC5 in host immunity, cancer and beyond	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 252 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imm.13235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshihama Sayuri, Cho Steven X., Yeung Jason, Pan Xuedong, Lizee Gregory, Konganti Kranti, Johnson Valen E., Kobayashi Koichi S.	4. 巻 11
2. 論文標題 NLRC5/CITA expression correlates with efficient response to checkpoint blockade immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82729-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoo Ji-Seung, Sasaki Michihito, Cho Steven X., Kasuga Yusuke, Zhu Baohui, Ouda Ryota, Orba Yasuko, de Figueiredo Paul, Sawa Hirofumi, Kobayashi Koichi S.	4. 巻 12
2. 論文標題 SARS-CoV-2 inhibits induction of the MHC class I pathway by targeting the STAT1-IRF1-NLRC5 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26910-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Guo Fengguang, Das Jugal K, Kobayashi Koichi S, Qin Qing-Ming, A Ficht Thomas, Alaniz Robert C, Song Jianxun, Figueiredo Paul De	4. 巻 10
2. 論文標題 Live attenuated bacterium limits cancer resistance to CAR-T therapy by remodeling the tumor microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e003760 ~ e003760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-003760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Das Jugal Kishore, Guo Fengguang, Hunt Carrie, Steinmeyer Shelby, Plocica Julia A, Kobayashi Koichi S., Ding Yufang, Jayaraman Arul, Ficht Thomas A, Alaniz Robert C., de Figueiredo Paul, Song Jianxun	4. 巻 14
2. 論文標題 A metabolically engineered bacterium controls autoimmunity and inflammation by remodeling the pro-inflammatory microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gut Microbes	6. 最初と最後の頁 2143222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19490976.2022.2143222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen Ying-Shiuan, Li Jia, Neja Sultan, Kapoor Sabeeta, Tovar Perez Jorge, Tripathi Chakrapani, Menon Rani, Jayaraman Arul, Lee Kyongbum, Dashwood Wan, Wang Shan, Zhang Ke, Kobayashi Koichi, Rajendran Praveen, Dashwood Roderick	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolomics of Acute vs. Chronic Spinach Intake in an Apc-Mutant Genetic Background: Linoleate and Butanoate Metabolites Targeting HDAC Activity and IFN- Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 573 ~ 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mathe Justine, Benhammedi Mohamed, Kobayashi Koichi S., Brochu Sylvie, Perreault Claude	4. 巻 208
2. 論文標題 Regulation of MHC Class I Expression in Lung Epithelial Cells during Inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Plocica Julia, Guo Fengguang, Das Jugal Kishore, Kobayashi Koichi S., Ficht Thomas A., Alaniz Robert C., Song Jianxun, de Figueiredo Paul	4. 巻 6
2. 論文標題 Engineering live attenuated vaccines: Old dogs learning new tricks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Translational Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 100198 ~ 100198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtauto.2023.100198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichi Kobayashi
2. 発表標題 Function of Nod2 in the regulation of microbiota and inflammatory diseases
3. 学会等名 FMI2022 conference (Prague, Czech Republic) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koichi Kobayashi
2. 発表標題 MHC class I 転写活性因子 (CITA) NLRC5: ウイルス感染、癌の免疫逃避システムにおける役割
3. 学会等名 令和4年度「感染・免疫・がん・炎症」全国共同研究拠点シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ning An, Toshiyuki Watanabe, Koichi S. Kobayashi
2. 発表標題 Epigenetic regulation of MHC class I genes through NLRC5 in cancer
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春日 優介, 應田涼太, 渡部昌, Xin Sun, 木村実希, 畠山鎮次, 小林弘一
2. 発表標題 FBX011 constitute a major negative regulator of MHC class II
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 應田涼太, 坐間のゆり, Xin Sun, 渡部昌, 畠山鎮次, 小林弘一
2. 発表標題 MHCクラスI遺伝子の転写制御における新規タンパク質の同定
3. 学会等名 免疫サマースクール
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 應田涼太, 坐間のゆり, Xin Sun, 渡部昌, 畠山鎮次, 小林弘一
2. 発表標題 Identification of Zinc Finger protein as a novel regulator of MHC class I
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sun Xin, 渡邊 俊之, An Ning, 應田 涼太, 八木田 秀雄, 小林 弘一
2. 発表標題 NLRC5 deletion suppress host CD8+ T cell anti-cancer immunity through MHC-I
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Baohui Zhu, Ryota Ouda, Ning An, Koichi Kobayashi
2. 発表標題 Activation of MHC class I by controlling NLRC5 nucleocytoplasmic trafficking
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Baohui Zhu
2. 発表標題 SARS-CoV-2 immune evasion mechanism by targeting MHC class I pathway
3. 学会等名 55th Hokkaido Summer Symposium of the Japanese Society of Virology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	畠山 鎮次  (Hatakeyama Shigetsugu)  (70294973)	北海道大学・医学研究院・教授   (10101)	
研究 分担者	應田 涼太  (Ouda Ryota)  (90817321)	北海道大学・医学研究院・助教   (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	ポール デフィグエイレード  (Paul de Figueiredo)	テキサスエイアンドエム大学・College of Medicine・ Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

米国	Texas A&M University			
----	----------------------	--	--	--