The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	NF-κB Activation in CD27 Signaling : Involvement of TNF Receptor-Associated Factors (TRAFs) in Its Signaling and Identification of Functional Region of CD27
Author(s)	山本, 浩靖
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41712
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【64】

氏　　名	山本浩靖（やまもと ひろやす）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　14493　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	NF－κB Activation in CD27 Signaling : Involvement of TNF Receptor-Associated Factors (TRAFs) in Its Signaling and Identification of Functional Region of CD27 （CD27分子のシグナルにおけるNFκBの活性化：このシグナルでのTRAFの関与，及びこれに関与するCD27分子の機能的部位の同定）
論文審査委員	（主査） 教　授　松澤　佑次 （副査） 教　授　吉崎　和幸　　教　授　長田　重一

論文内容の要旨

【目的】

CD27は55－kDaの分子がS－S結合にて120－kDaの分子量のhomodimerを形成するTumor Necrosis Factor (TNF) － Receptor familyに属する膜貫通分子である。この分子は胸腺髄質の細胞，末梢血中のT細胞，B細胞，NK (natural killer) 細胞などに発現している。そして，TCR－CD3複合体によるT細胞の活性化によりCD27の一過性の発現上昇が見られる。一方，TNF familyに属するCD70分子は，CD27のリガンドとして知られている。このCD27／CD70の受容体・リガンドの結合によりT，B，NK細胞の機能の活性化が起こる。しかしながら，これまでCD27の活性化に関わる細胞内シグナル伝達については，細胞内カルシウム濃度変化や，プロテインキナーゼCの活性化や，ZAP－70などのチロシンリン酸化に関わるプロテインチロシンキナーゼの活性化などが報告されているものの，ほとんど解明されていなかった。そこで，今回，CD27の細胞内シグナル伝達の新たな経路について検討を行った。

【方法ならびに成績】

ヒト末梢血リンパ球のmRNAよりRT－PCRにてクローニングしたCD27およびCD70分子を，それぞれpCDM8 vector, pEF・BOS vectorに組み込み，発現ベクターを構築した。この2つのベクターをp－55IgκLuc（3つのκB結合モチーフをルシフェラーゼ遺伝子上流につないだレポーターベクター）と共に，リン酸カルシウム法を用いてHuman Embryonic Kidney (HEK) 293細胞に発現させ，ルシフェラーゼ・アッセイを行った。その結果，CD27とCD70の共発現によってNF－κBの活性化が認められた。

更に，CD27とCD70を共発現させたHEK293細胞から抽出した核蛋白分画を用い，EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) により，NFκBの活性化に関わるκBのcomponentを調べた。その結果，κB結合領域をもつdouble stranded-oligonucleotideを用いたEMSAでも，κB componentとoligo DNAの複合体がbandとして認められ，NF－κBの活性化が確認された。さらに，κB componentのうちp52に対する抗体の共存下では，EMSAでのbandはsupershiftしなかったが，p50及びp65に対する抗体の共存下ではsupershiftを認めたため，NF－κBの活性化には少なくともp50とp65が関わっていることが示された。

一方，CD27分子とTRAF分子との結合を，HEK293細胞へのCD27分子と，MycをepitopeタggingしたTRAF

分子の共発現後，抗CD27抗体と抗Myc抗体を用いた免疫的共沈実験にて検討した。その結果，抗CD27抗体にてMyc－TRAF2及びMyc－TRAF3が共沈し，TRAF2及び，TRAF3分子はCD27分子と結合することが確認された。

そこで，NF－κBの活性化というCD27分子の新規の細胞内シグナル伝達経路がTRAFを介するか否か，intact TRAF 1，2，3もしくは，dominant negative TRAF2（dnTRAF2）をCD27，CD70発現ベクターと共にHEK293細胞に発現させ，TRAF分子の，CD27とCD70の共発現によるNF－κB活性化に与える影響を再度ルシフェラーゼ・アッセイを用いて調べた。その結果，dnTRAF2とintact TRAF3は共に，CD27とCD70の共発現によるNFκBの活性化をほぼ完全に抑えることから，CD27分子の様々な細胞内シグナル伝達経路のうち，NF－κBの活性化には，少なくともTRAF2がmediatorとして，TRAF3がinhibitorとして働き得ると考えられた。

最後に，NF－κBの活性化に関わるCD27分子の機能的部位を検討するため，CD27のmutantsを作製し，HEK293細胞へこれらmutant CD27分子とCD70分子を発現させて前述のルシフェラーゼ・アッセイを行った。カルボキシ末端より10アミノ酸を欠失したCD27分子（CD27（－10AA））を用いてもNF－κB活性化の抑制は認められなかったが，カルボキシ末端より23及び，41アミノ酸を欠失したCD27分子（CD27（－23AA）及びCD27（－41AA））を用いると，NF－κBの活性化は消失した。続いて，このmutant CD27分子のTRAF分子との結合能を免疫的共沈実験により調べた結果，CD27（－10AA）ではintactのCD27分子と同様にTRAF2，TRAF3との結合が見られたが，CD27（－23AA）ではTRAF2，TRAR3との結合は認められなかった。

【総括】

CD27分子を介する細胞内シグナル伝達の一つに，NF－κBの活性化があることを明らかにした。このNF－κBの活性化は，CD27分子と結合するTRAF分子を介して起こり，TRAF2がそのmediator，TRAF3がそのinhibitorとして働き得る。また，TRAF分子との結合，及びNF－κBの活性化には，CD27分子のカルボキシ末端より23番目から11番目の13アミノ酸が必要であることが認められた。

論文審査の結果の要旨

当論文は，TNF（Tumor Necrosis Factor）受容体ファミリーの一つであるCD27分子について，転写因子であるNF－κBの活性化という新規の細胞内シグナル伝達経路の存在を証明し，その経路の活性化および抑制にTRAF分子が関与していること，およびそれに関与するCD27分子の細胞内の機能ドメインを明らかにしている。この研究は，未だ十分な解析がなされていないCD27分子の生体内での働きの解明や，様々な疾患の新しい治療法の一つとなるであろう免疫系細胞のコントロールを検討していく上で今後，非常に有益なものとなると考えられ，博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。