

Title	NF- κ B 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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文につい て 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山本浩靖
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- κ B 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NF κ B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-55Ig κ Luc (3つの κ B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- κ B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、NF κ Bの活性化に関わる κ Bのcomponentを調べた。その結果、 κ B結合領域をもつdouble stranded-oligonucleotideを用いたEMSAでも、 κ B componentとoligo DNAの複合体がbandとして認められ、NF- κ Bの活性化が確認された。さらに、 κ B 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- κ B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 tagging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- κ B 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- κ B 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 NF- κ B 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- κ B 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- κ B 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- κ B 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- κ B 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, TRAF3 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- κ B の活性化があることを明らかにした。この NF- κ B 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- κ B 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- κ B 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。