

京都大学	博士（医学）	氏 名	阪 本 貴 士
論文題目	CKIP-1 Is an Intrinsic Negative Regulator of T-cell Activation through an Interaction with CARMA1 (CKIP-1 は、CARMA1 との相互作用を介して、T 細胞活性化を抑制的に制御する)		
(論文内容の要旨)			
転写因子 NF-κB は、リンパ球の活性化や免疫応答において重要な役割を果たしている。T 細胞受容体の刺激により、CARMA1 は PKC θ によるリン酸化を受け、lipid raft において CARMA1-Bcl10-MALT1 (CBM) complex を形成し、その結果 NF-κB 活性化を誘導する。NF-κB 活性化に関しては多くの論文で報告されているが、その活性化をどう抑制しているかは十分に解明されていない。そこで、遺伝子変異誘発とそれを相補する遺伝子をクローニングする戦略を用いて、T 細胞受容体を介した NF-κB 活性化の抑制的制御因子のスクリーニングを行い、casein kinase-2 interacting protein-1 (CKIP-1) が、PKC θ-CBM-NF-κB signaling を抑制することを見出した。 κB プロモーター依存性に EGFP を発現する Jurkat T 細胞株 (JR-GFP 細胞) を遺伝子変異導入剤で処理した後、PKC 阻害剤処理下で EGFP 陽性細胞を sorting することにより、NF-κB 活性化変異細胞株を樹立した。この NF-κB 活性化細胞株にレンチウイルス cDNA ライブラリを感染させ、EGFP が陰性に戻った細胞を sorting し、導入された遺伝子をライブラリベクター固有のプライマーを使用して PCR を行うことにより、複数の抑制的制御因子の候補を得た。JR-GFP 細胞に各候補遺伝子の siRNA を導入したところ、CKIP-1 のノックダウンにより EGFP の誘導が認められた。Jurkat T 細胞を用いた Luciferase reporter assay 及び NF-κB p65 DNA-binding ELISA assay においても、CKIP-1 のノックダウンにより NF-κB の活性が増強した。Jurkat T 細胞を用いた Luciferase assay において、CKIP-1 は、TNF α により誘導される NF-κB 活性は抑制しなかったが、CD3 単独や PMA、PMA/CD28 により誘導される NF-κB 活性を抑制した。興味深いことに、CKIP-1 は、CD3/CD28 共刺激により誘導される NF-κB 活性を抑制しなかった。Jurkat T 細胞において、無刺激の状態では CKIP-1 の一部が lipid raft に局在したが、CD3/CD28 を共刺激した際には CKIP-1 が lipid raft に存在しないことが示され、CD3/CD28 共刺激の際に CKIP-1 が抑制効果を示さない理由と考えられた。 Jurkat T 細胞を用いた Luciferase assay において、CKIP-1 は、PKC θ の恒常活性型変異体の発現により誘導される NF-κB 活性を抑制したが、より下流の signaling component である CARMA1, Bcl10, IKK β, NF-κB p65 の強発現により誘導される NF-κB 活性を抑制しなかった。逆に、CKIP-1 をノックダウンすると、PKC θ の恒常活性型変異体や CARMA1 の発現により誘導される NF-κB 活性を増強した。これらの結果から、CKIP-1 は PKC θ 周辺の情報伝達経路に関わっている可能性が考えられた。HEK293T 細胞、及び、CARMA1 欠損 Jurkat T 細胞に Myc-CARMA1 を再構築した細胞株を用いて、免疫共沈降法により調べると、CKIP-1 と CARMA1 が共沈することが判明した。CKIP-1 はその N 末端に Pleckstrin homology (PH) domain を、C 末端に Leucin zipper (LZ) domain を有するが、このうち PH domain が、CARMA1 との結合においても、また NF-κB 抑制効果においても必要であることが分かった。 CARMA1 は、その Linker 部分が PKC θ によりリン酸化を受けて、Bcl10 と CARD-CARD interaction を通して結合できるようになる。HEK293T 細胞を用いて免疫沈降法により調べると、CKIP-1 の強発現は、CARMA1 と Bcl10 との結合には影響を及ぼさないが、PKC θ と CARMA1 との結合を阻害することが分かった。 以上のデータから、CKIP-1 は、CARMA1 と結合し、PKC θ と CARMA1 との相互作用を阻害することにより、NF-κB シグナルを抑制すると考えられた。しかし、CD3/CD28 共刺激の際は、CKIP-1 の局在が変化し CARMA1 と結合できなくなることで、NF-κB 活性への抑制効果が認められないようになることが明らかとなった。生理的には CKIP-1 は、不適切なシグナルによって T 細胞が活性化することを防ぐことで CD3/CD28 signaling のための gatekeeper のような役割を果たしていると予想される。			

（論文審査の結果の要旨）
転写因子NF- κ Bは、免疫応答においてリンパ球が活性化する際重要な役割を演じている。T細胞受容体の刺激により、CARMA1はPKC θ によるリン酸化を受け、lipid raftにおいてCARMA1-Bcl10-MALT1 (CBM) complexを形成し、その結果NF- κ B活性化を誘導する。NF- κ Bの活性化機序に関しては多くの報告がなされているが、その活性化の抑制機序は十分に解明されていない。そこで、遺伝子変異誘発とそれを相補する遺伝子をクローニングする戦略を用いて、T細胞受容体を介したNF- κ B活性化の抑制的制御因子のスクリーニングを行い、casein kinase-2 interacting protein-1 (CKIP-1)を同定した。CKIP-1はCARMA1と結合し、PKC θ とCARMA1との相互作用を阻害することでPKC θ -CBM-NF- κ B signalingを抑制することが示された。CKIP-1のPleckstrin homology (PH) domainが、CARMA1との結合においても、またNF- κ B抑制効果においても必要であった。CKIP-1は、TNF α により誘導されるNF- κ B活性は抑制せず、CD3単独やPMA、PMA/CD28により誘導されるNF- κ B活性を抑制する一方、CD3/CD28共刺激により誘導されるNF- κ B活性を抑制しなかった。その機序としてCD3/CD28共刺激の際は、CKIP-1の細胞内局在が変化しCARMA1と結合できなくなり、NF- κ B活性への抑制効果を示せないことが明らかとなった。CKIP-1は、NF- κ B活性を定常状態に維持したり、不適切なシグナルによってT細胞が活性化することを防いだりすることで、適切なCD3/CD28シグナル伝達のためのgatekeeperのような役割を果たしていると予想される。
以上の研究は、T 細胞受容体を介した NF- κ B 活性化の制御機構の解明に貢献し、悪性リンパ腫や自己免疫疾患の病態解明に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成26年 4月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降