

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591383

研究課題名(和文) RNAヘリケースMOV10によるNF-kappaBの負の制御の解析

研究課題名(英文) Research on RNA helicase, MOV10, which negatively regulates NF-kappaB activation

研究代表者

小林 正行 (Kobayashi, Masayuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90513820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：MOV10は強発現によりNF-kappaBを負に制御することを確認したが、発現を低下させることでNF-kappaB活性に影響しないことが判明したため、他の候補分子であるCKIP-1の解析を開始した。CKIP-1はCARMA1と結合し、PKCthetaとCARMA1との相互作用を阻害することでPKCtheta-CBM-NF-kappaB signalingを抑制することが認められた。CKIP-1は、NF-kappaB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。

研究成果の概要(英文)：Ectopic MOV10 expression clearly suppressed NF-kappaB activation in Jurkat T cells. But knock down of MOV10 in Jurkat T cells didn't affect NF-kappaB activation. Alternatively we performed a cell-based screening for negative regulators of TCR-mediated NF-kappaB activation. We found that casein kinase-2 interacting protein-1 (CKIP-1) suppresses PKCtheta-CBM-NF-kappaB signaling. We found that CKIP-1 interacts with CARMA1 and competes with PKCtheta for association. CKIP-1 represses NF-kappaB activity in unstimulated cells, and inhibits NF-kappaB activation induced by stimulation with PMA or constitutively active PKCtheta, but not by stimulation with TNFalpha. These data suggest that CKIP-1 contributes maintenance of a resting state on NF-kappaB activity or prevents T cells from being activated by inadequate signaling. In conclusion, we demonstrate that CKIP-1 interacts with CARMA1 and has an inhibitory effect on PKCtheta-CBM-NF-kappaB signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：NF-kappaB TCR

1. 研究開始当初の背景

転写因子の1つである NF- κ B は様々な刺激により活性化され、抗アポトーシスや細胞増殖にかかわる遺伝子の転写を開始します。この刺激伝達系は通常厳密にコントロールされていますが、いったん破綻し恒常的な NF- κ B の活性化をきたすことで多くの細胞が腫瘍化を惹起することが報告されています。T細胞において T細胞受容体刺激後 NF- κ B が活性化されることは T細胞の免疫応答に非常に重要であり多くの研究がなされてきましたが、一旦活性化した NF- κ B の刺激伝達系がどのようにして定常状態に戻るかの検討はあまりなされてきていません。NF κ B の非活性化に関わる機序の解明は細胞の腫瘍化や自己免疫疾患発症機序の解明に非常に重要と考え新規分子の同定とその解析を目指し研究を開始しました。我々はフレームシフト変異誘発剤を用いて NF- κ B が恒常的に活性化している遺伝子変異導入細胞株を樹立しており、この細胞において Bcl10 が恒常的にユビキチン化されていることが分かり Bcl10 との結合蛋白を共免疫沈降法、質量解析にて検討した結果 MOV10 という候補分子を得ました。

2. 研究の目的

NF- κ B の刺激後に非活性化に関わる機序の解明を目的として作成した NF- κ B が恒常的に活性化している遺伝子変異導入細胞株、より同定した MOV10 の NF- κ B の負の調節機能の詳細を明らかにする

3. 研究の方法

- 1) MOV10 に対する shRNA を用いて発現を抑えた T細胞株や MOV10 を高発現させた T細胞株を作成し分子生物学的手法を用いて NF- κ B への関与を検証する。
- 2) 次世代シーケンサーGS ジュニアシステムを用いて T細胞株において MOV10 が結合

している mRNA を網羅的に解析し、NF- κ B へ影響していると思われる分子を検証する。

- 3) 成人 T細胞性白血病/リンパ腫や T細胞性リンパ腫、T細胞性白血病の患者検体を用いて MOV10 の発現を Real time PCR やウェスタンブロット法にて解析する。
上記の方法がうまくいかなかった場合、すでにクローニングしてある NF- κ B が恒常的に活性化している遺伝子変異導入細胞株から新規分子候補を検索する。

4. 研究成果

MOV10 を Jurkat 細胞に強発現させ PMA などの刺激を加えると、NF κ B の抑制が認められ MOV10 が NF κ B のインヒビターとして働くことが示唆されたが、shRNA により MOV10 の発現を低下させたところ NF κ B の活性化に変化が認められなかった。また我々の同定した NF- κ B が恒常的に活性化している遺伝子変異導入細胞株とその親細胞である Jurkat T細胞とを遺伝子アレイ解析したところ MOV10 の発現量に違いが認められなかった。そのため MOV10 に関するこれ以上の解析が困難となったため、次に我々は NF- κ B が恒常的に活性化している遺伝子変異導入細胞株にレンチウイルス cDNA ライブラリーを導入し NF κ B の抑制的に働く遺伝子を再スクリーニングした。その結果いくつかの分子候補が出てきたため、それらの候補遺伝子の siRNA を作成し Jurkat T細胞に導入して NF- κ B 活性を検討した。候補分子のうち Casein kinase-2 interacting protein-1 (CKIP-1)分子の発現を抑制した時 NF- κ B がより強く誘導されたため、我々は CKIP-1 分子に焦点を当て、NF- κ B を負に制御する機序の検討を行うこととした。CKIP-1 は Casein Kinase2 と結合する蛋白として同定され、その後の研究の結果様々なシグナル経路において足場蛋白として働いていることが報告されてい

る。CKIP-1 欠損マウスにおける解析では成長するに従い骨量が増加することが分かり、その原因として MEKK-2 JNKc-Jun/AP-1 のシグナルが活性化し骨形成を過剰にしていることが分かった。しかしながらこの分子の NF-kappaB 活性に関しての報告はない。まず CKIP-1 を Jurkat 細胞に過剰発現させたところ刺激後の NF-kappaB 活性が抑制されることを確認した。次に siRNA により CKIP-1 の発現を Jurkat 細胞において低下させたところ NF - kappaB 活性を増強することが分かったため CKIP-1 が T 細胞において抑制因子として働いていることが示唆された。次に CKIP-1 の作用部位の検討を行ったところ、CKIP-1 は CARMA1 と結合し、PKCtheta と CARMA1 との相互作用を阻害することで PKCtheta-CBM NF-kappaB signaling を抑制することが認められた。CKIP-1 の Pleckstrin homology (PH) domain が、CARMA1 との結合においても、また NF-kappaB 抑制効果においても必要であった。CKIP-1 は、TNFalpha により誘導される NF-kappaB 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-kappaB 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-kappaB 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-kappaB 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。CKIP-1 に関する新たな知見は日本血液学会学術集会において発表するとともに PLOS ONE に投稿し掲載されることとなった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Takashi Sakamoto, **Masayuki Kobayashi**, Kohei Tada, Masanobu Shinohara, Katsuhiko Iio, Kayoko Nagata, Fumie Iwai, Yoko Takiuchi, Yasuyuki Arai, Kouhei Yamashita, Keisuke Shindo, Norimitsu Kadowaki, Yoshio Koyanagi and Akifumi Takaori-Kondo
CKIP-1 is an intrinsic negative regulator of T-cell activation through an interaction with CARMA1
PLOS One 2014 Jan 17;9(1):e85762

2) Matsui M, Shindo K, Nagata K, Iio K, Tada K, Iwai F, **Kobayashi M**, Kadowaki N, Harris RS, Takaori-Kondo A.
Defining HIV-1 Vif residues that interact with CBF-beta by site-directed mutagenesis
Virology. 2014 Jan 20 449:82-87

[学会発表] (計 2 件)

1) Takashi Sakamoto, **Masayuki Kobayashi**, Kohei Tada, Yuya Nagai, Masanobu Shinohara, Katsuhiko Iio, Masashi Matsui, Keisuke Shindo, Yoshio Koyanagi, Akifumi Takaori-Kondo
Search for negative regulators in T cell receptor-mediated NFkappaB activation
T 細胞受容体からの NF-kappaB シグナル伝達を負に制御する新規分子の探索
第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋。
2011 年 10 月 14 日 16 日

2) Takashi Sakamoto, **Masayuki Kobayashi**, Kohei Tada, Masanobu Shinohara, Katsuhiko Ito, Yasuyuki Arai, Kouhei Yamashita, Keisuke Shindo, Norimitsu Kadowaki, Yoshio Koyanagi, Akifumi Takaori-Kondo
CKIP-1 is an intrinsic negative regulator for T cell activation through interacting with CARMA1

第 75 回日本血液学会学術集会、札幌。2013 年 10 月 11 日 - 13 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小林正行 (Kobayashi Masayuki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 90513820