HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海綿由来タンパク質ThCから視る糖鎖を介したトロンボポエチン受容体活性化機構［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	辺, 浩美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第14761号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86108
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiromi_Watari_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：辺　浩美

学 位 論 文 題 目

海綿由来タンパク質 ThC から視る糖鎖を介したトロンボポエチン受容体活性化機構

ヒトの血球は赤血球、白血球、血小板に大別されるが、それらは全て造血幹細胞（Hematopoietic stem cell: HSC）という 1 種類の細胞に由来する．HSC は主に骨髄に存在し、様々な造血サイトカインの作用により、どの細胞に分化するか運命付けられる．また、血球はヒトの全細胞数の 90%を占めるとも言われており、体内において重要な生理的役割を担っているが、血球の寿命は短いものは数日であり、絶えず生産され入れ替わっている．この過程において血球の産生は厳密に制御されており、異常な血球の生産や分解は様々な疾患の原因となるため、血球の生産を制御する医薬品のシーズとなる化合物の探索が盛んに行われてきた．しかし、スクリーニングで活性を示す化合物はきわめて少なく、difficult target とも称され、創薬上挑戦性の高い分野とされてきた．そこで、これまで多くのユニークな構造・生理活性を示す化合物が見出されてきた海洋生物に着目し、探索を行うこととした．

先行研究によるスクリーニングの結果、ミクロネシア産海綿の一種がトロンボポエチン（Thrombopoietin: TPO）に類似した活性を示し、その活性本体として分子量約 14 kDa の新規タンパク質、トロンボコルチシン（Thrombocorticin: ThC）が見出された．TPO とは HSC を血小板へと分化誘導する造血サイトカインである．TPO は、細胞表面に発現する TPO 受容体のリガンド結合部位へ結合することにより受容体を活性化し、細胞内にシグナルを伝達することで細胞の分化や増殖を促進する．一方で、本研究で見出された ThC のアミノ酸配列はバクテリア由来レクチンと相同性を示したが、TPO とは類似していないことから、ThC がどのようなメカニズムで TPO 様の活性を発揮しているのかについては未解明であった．そこで本研究では ThC の構造の詳細を解明し、どのような機構で TPO 受容体に作用するのかを解明することを目的とした．

まず初めに海綿水抽出物から ThC の効率的な精製方法の検討を行った後、ThC の X 線結晶構造解析を行った．その結果、ThC はホモダイマーを組むレクチンであることが明らかとなった．また、立体構造においても TPO とは類似していないことが確認された．さらに、Ba/F3-HuMpl 細胞を用いた活性評価、等温滴定型カロリメトリーを用いた実験から、ThC はフコース・マンノース両者に結合するものの、フコースへの親和性がより強いことが示された．以上の結果から、ThC は受容体の糖鎖に結合することで活性化を導いていると考え、これを検証するためまず GDP-フコース合成酵素（FX）の阻害剤 6-alkynyl-fucose（6-Alk-Fuc）で細胞を処理することで細胞のフコシル化糖鎖を欠損させた後に、ThC による活性を調べたところ活性は著しく阻害された．したがって、ThC による TPO 受容体の活性化には糖鎖中のフコース残基が必要であることが示された．次に α(1,6)fucose に特異的に結合する紅藻由来レクチン hypnin を ThC と同時に細胞に添加し、その影響を調べたところ、hypnin は濃度依存的に ThC の活性を阻害した．この結果は、ThC が TPO 受容体上糖鎖の α(1,6)fucose を標的としていることを示唆した．

TPO 受容体の細胞外ドメインには 4 ヶ所の N-グリカン結合部位（N117, N178, N298, N358）が存在する事が知られており、これらのアスパラギン（N）をグルタミン（Q）に置換することで N-グリカン欠損受容体を作成することができる．そこで、HEK293T 細胞に変異受容体の遺伝子をトラ

ンスフェクションし発現させ、これを用いて ThC による活性を評価したところ、N117Q 変異体でのみ活性が有意に阻害された．この結果は、ThC が受容体の最も末端に位置する N117 結合糖鎖に結合することで作用していることを示すものである．これまで糖鎖を介した TPO 受容体の活性化が存在することを立証した例はなく、本研究は海洋生物由来のレクチンを用いてそれを示した初めての報告である．

一方で、骨髄増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasms：MPN）という血液ガンの一種において、分子シャペロンとして知られる CALR のフレームシフト変異に起因した変異体（CALRmut）による TPO 受容体の異常な活性化が知られている．CALR は通常、小胞体に局在しタンパク質のリフォールディングを担っているが、CALRmut は小胞体で TPO 受容体と結合した後に受容体-CALRmut 複合体として細胞表面に発現し、TPO の非存在下で TPO 受容体を常時活性化する．そのため、細胞の異常な増殖や分化が起こると考えられている．この際に CALRmut は TPO 受容体の N117 結合糖鎖に結合していることが示唆されており、ThC による受容体の活性化と非常に類似した機構が推察される．しかしながら、ThC とは異なりリコンビナント CALRmut は、細胞外から添加しても活性を示さない．これは CALRmut が結合できる糖鎖が未成熟糖鎖であり、細胞表面に発現している MPL 上の成熟糖鎖には結合できないためと考えられている．したがって ThC はこれまでに立証が困難であった CALRmut による作用メカニズムを再現する新規プローブである．本研究の結果は、正常細胞においても糖鎖を介した活性化機構が存在する可能性を示すものである．そこでまず、TPO による活性化機構と糖鎖を介した活性化機構の関連性を調べるために、ThC 存在下での TPO の作用を、モデル細胞を用いて検討した．すなわち、Ba/F3-HuMpl 細胞に細胞増殖を示さない低濃度の ThC を添加、TPO による細胞増殖作用を調べたところ、TPO の作用は ThC 非存在下に比べて約 10 倍に増幅され、ThC と TPO は強い相乗効果を示すことを見出した．次に、受容体活性化による細胞内シグナルの持続時間を調べたところ ThC の存在下では TPO 単独添加時に比べシグナルが長時間持続していることが示唆された．この現象は CALRmut による活性化や ThC を単独で添加した際にも確認されており、糖鎖を介した活性化機序では細胞内シグナルが長時間持続する事が判明した．さらに、この持続性の原因として TPO による活性化では細胞表面の受容体がエンドサイトーシスで直ちに内在化するのに対し、糖鎖を介した機序では内在化が抑制されていることが分かった．このように TPO 受容体は活性化のモードにより細胞内へ伝達するシグナルの質と量に大きな差異が生じることが明らかとなった．

本研究における ThC による TPO 受容体の糖鎖を介した活性化機構に関する知見は、TPO 受容体をはじめとするサイトカイン受容体には既知の生理的アゴニストによる活性化以外にも多様な活性化機構が存在し、その違いが細胞の分化や運命付けにも影響している可能性を示すものである．TPO は血球前駆細胞を血小板へと分化誘導するだけでなく、HSC の分化や自己増殖にも寄与している．HSC を体外で培養し、増殖させることができれば血液疾患の治療は飛躍的に改善されると言われているが、未だその方法は確立されていない．また、iPS 細胞由来の血小板を輸血に使用する臨床実験が行われているが、その際にも TPO 受容体アゴニストが必須である．このように再生医療の発展に伴い、特異な作用機序で細胞の増殖を制御することができるサイトカイン受容体アゴニストの役割は今後さらに大きくなると考えられる．本研究は、海洋生物に含まれる生理活性物質の探索を行い、活性成分の構造と作用機序を詳細に調べることで、サイトカイン受容体が糖鎖を介した新規の機構で活性化するという極めて重要な知見に至った独創性の高い研究であり、得られた化合物の応用を含む研究をさらに発展させることは、次世代の医療への貢献へとつながるであろう．