

論 文 内 容 の 要 旨

論文題目 ヒト・トロンボポエチンの活性発現および
活性制御に関する構造的解析

氏 名 松 本 篤 志

止血において重要な役割を担う血小板は、骨髄中の造血幹細胞が増殖・分化して生じた巨核球により産生されるが、この巨核球分化や血小板産生を誘導する重要な制御因子がトロンボポエチン (Thrombopoietin: TPO) である。ヒト TPO は 332 アミノ酸残基から成る分子量が約 95K の糖蛋白質であるが、その構造上、2つの機能ドメインに分けられる。すなわち、エリスロポエチン (EPO) と最も高い相同性を示し、TPOの活性発現に必要なかつ十分な“レセプター結合ドメイン” (1~153 アミノ酸残基) と 154 アミノ酸残基以降の N 型、O 型糖鎖に富む“カルボキシ末端ドメイン”である。後者の“カルボキシ末端ドメイン”は“糖鎖リッチドメイン”とも呼ばれるが、その生体内における機能は未だ明らかになっていない。TPOは 1994 年、独立に 4つのグループによって血小板減少状態の各種動物から精製、同定されたが、そこで取得された TPOはいずれもこのカルボキシ末端ドメインを不均一に欠いた部分長型であった。この部分長型がどのようなメカニズムにより生じるのか？また、この TPOの部分長化は血小板の恒常性維持において何らかの重要な役割を有するのか？依然不明なままである。

そこで本研究では、この TPOの部分長化と血小板産生制御の関係を探り、その生理学的意義を解明する糸口として、まず、TPOが部分長化するメカニズムについて検討を行った。その結果、ヒト TPOはヒト血小板共存下において切断を

受け、部分長化することを明らかにした。そして、その部分長化に関わる直接因子がトロンビンであることを、トロンビン特異的阻害剤であるヒルジンや精製トロンビンを用いた検討によって確認した。トロンビンにより切断を受ける部位は主に2箇所あり、トロンビンはヒトTPO分子を最初に AR191-T192 で切断し、その後 GR117-T118 で切断する。この順序が逆転することは無く、このことはTPOの立体構造上の特徴を反映していると考えられた。つまり、EPOと最も高い相同性を示すTPOのレセプター結合ドメインは、非常に堅い疎水性コアをもつ4本ヘリックスバンドル構造を持つと推測される。一方、カルボキシ末端ドメインはグリシン、ロイシンに富み、糖鎖も多く付加されることから親水性が高く、何らかの rigid な構造をとっているとは考えにくい。そのためトロンビンは最初にアクセスが容易なカルボキシ末端ドメイン中の AR191-T192 を切断し、その後、レセプター結合ドメイン中の GR117-T118 を切断すると考えられた。またさらに、GR117-T118 部位が切断されるとTPOの活性が失われることも観察され、このことから、この部位を含む近辺領域はTPOの立体構造の維持もしくはレセプターとの結合に関わっていることが推測された。トロンビンによるTPOの部分長化においてさらに重要なことは、全長型のTPOがトロンビンにより AR191-T192 部位で切断され、分子量約 34K の部分長型に変換するにつれてTPOの活性が変化し、全長型に対する1分子あたりの比活性が最大約 1.5 倍まで上昇することである。これはTPOの部分長化の生理学的意義を考察する上で大変重要な知見である。これまでTPO分子の発現量や濃度調整によって血小板産生を制御するシステムは報告されてきた。しかしながら、TPOの構造変化と血小板産生制御の関連を示唆する報告は未だ無い。本研究において得られた知見と、トロンビンは血小板の活性化に伴いプロトロンビンから生じることを考え合わせると、血小板の活性化、ひいては体内の血小板数の増減とTPOの部分長化の間には何らかの関係があることが推測された。そこで、血小板の増減を伴う様々な血液疾患とTPOの部分長化の関連について検討するため、ヒト生体内における内因性TPOの性状解析を行った。

まず、血液中に微量にしか存在しないヒト内因性TPOの分子量解析を可能とする分析系を構築した上で、最初に健常人の血液由来TPOを解析した。その結果、ほぼ全長（332 アミノ酸残基）と考えられるTPO分子がドミナントである

ことをゲルろ過および SDS-PAGE により初めて確認した。また、この内因性 TPO が *in vitro* で生物学的活性を有することも確認された。さらに、体内の血小板数の増減、つまりは体内の血小板需要と TPO の部分長化の関連を調べるために、種々の血小板数の増減を伴う血液疾患に由来する血液から TPO を粗精製し、その分子量分布を解析した。その結果、いずれも全長型の TPO がドミナントであって、TPO の部分長化と血液中の血小板数との関連は観察されなかった。TGF- β や IL-1 がプロセッシングを受けることで活性化し、その活性を発現するように、TPO も部分長化により高活性型となることで体内の血小板需要の増加に対応することが推測されたが、これは血中 TPO の性状解析の結果から判断する限り、あてはまらないようである。一方興味深いことに、ヒト血小板の破碎液から得られた TPO は、血液同様に全長型がドミナントであった。この TPO が血小板表面の TPO レセプター: c-Mpl に結合していたものなのか、それとも血小板中の顆粒内に蓄えられていたものなのか、その由来は不明である。また、血小板由来 TPO については、血液と同様に一部、部分長型が検出されたが、血小板とヒルジンをインキュベートすることにより、部分長型の量が減少することも観察された。このことから組換え型 TPO で観察されたトロンビンによる部分長化が、内因性 TPO においても同様に起こり得ることが示された。以上、ヒト血液由来 TPO の一連の解析からは、TPO の部分長化と血小板産生制御の関連は見出せなかったが、組織内の微小環境下においては、トロンビン等による TPO のスプライシングが TPO の活性制御の一部として機能している可能性は依然として残されており、今後の課題と考える。

このようにヒト血液中の内因性 TPO の解析からは、カルボキシ末端ドメインが TPO の活性制御に関わっていることを示す知見は得られなかった。しかしながらカルボキシ末端ドメインの機能としては、ほかに産生細胞からの TPO 分泌の効率化や体内半減期の延長への寄与が報告されている。また一方で、このカルボキシ末端ドメインは TPO 活性の発現自体には関与しないことが各種変異体を用いた解析より明らかとなっている。この知見は、本研究において明らかとなった TPO の立体構造ならびにレセプターとの結合様式からも確認された。TPO の立体構造を X 線結晶構造解析により解明するにあたっては、これまでヒト TPO の 1~163 アミノ酸残基から成る部分長型 (rhTPO₁₆₃) 単独での結晶化が試みられてきたが、困難を極めた。そこで TPO の中和抗体である TN1 の Fab フラ

グメントと rhTPO₁₆₃ の複合体の結晶化を試みたところ結晶化に成功した。この Fab フラグメントと rhTPO₁₆₃ を共結晶化することは、構造解析上も有用で、重原子置換法によらず、Fab の構造情報を基に単独のデータセットから計算により rhTPO₁₆₃ の立体構造解明に成功した。TPO のレセプター結合ドメインは、EPO との高い相同性から予想されたとおり、4 本ヘリックスバンドル構造を形成しており、ループ部を含め、構造上の特徴は EPO と非常に類似していた。得られた構造情報と、合わせて明らかとなった TPO 中和抗体である TN1 の結合部位、そして、様々な変異体を用いた解析より得られているリガンドーレセプター結合解析の諸知見から、rhTPO₁₆₃ は 2 つの異なるレセプター結合部位を持つことが予想された。またこれを更に裏付ける知見として、カロリメトリーを用いた解析より、rhTPO₁₆₃ はレセプターである c-Mpl と結合比 rhTPO₁₆₃ : c-Mpl=1:2 で結合することが判明し、さらに、2 つの異なるレセプター結合部位の 1 つはレセプターに対して高親和性を、他のもう一方は低親和性を持つことが明らかとなった。このような特徴は EPO などにおいても知られており、レセプターの 2 量体化を介した造血系サイトカインのレセプター活性化機構が TPO においても高度に保存されていることが明らかとなった。

以上、本研究においては、ヒト TPO の構造的側面から、その活性発現と活性制御の可能性について一連の検討を行った。しかしながら、TPO 活性制御におけるカルボキシ末端ドメインの寄与については未だ明確になっていない。本研究により得られた知見を基に、さらに今後、血小板/TPO 相互の制御機構の解明を進めることにより、TPO を中心とした血小板恒常性維持の機構が明らかにされ、それを基に、より安全で、かつ効果の高い血小板減少症治療薬の創薬につながることを期待される。