

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松本篤志

松本篤志氏は血小板産生制御因子であるトロンボポエチン (TPO) の翻訳後プロセッシングによる活性制御の検討と、TPOとTPOレセプター (c-Mpl) の結合様式を明らかにする研究を行った。そのために、TPOの翻訳後プロセッシングにおける血小板の役割や、健常人および血小板数の増減を伴う血液疾患由来のTPOの性状を明らかにした。そして、TPOの立体構造を明らかにし、レセプターとの相互作用を検討することにより、TPOの活性発現および活性制御について構造面から考察した。

まず、血小板減少症の各種動物から精製された内因性TPOがいずれも部分長型であった原因を解明するため、TPOの翻訳後プロセッシングのメカニズムについて検討を行った。その結果、ヒトTPOは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。トロンビンによるTPO分子の切断は2段階から成り、順にR191-T192とR117-T118を切断した。また、R191-T192の切断により生じる部分長型TPOの増加と生物学的活性の増加に関連性を認め、トロンビンを介した翻訳後プロセッシングによるTPO活性の調節機構が示唆された。

トロンビンは血小板が活性化することにより生成する。そこで次に、血小板の活性化、ひいては体内の血小板数の増減とTPOの部分長化の間に何らかの生理学的な関連性を推測し、ヒト血液中の内因性TPOの性状解析を行い、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を行った。血液中の微量のTPOを解析する高感度分析系を構築した上で、健常人の血液中のTPOを評価したところ、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確認した。また、これが *in vitro* で生物学的活性を有することも確認した。さらに、体内の血小板数とTPOの部分長化の程度に関連を調べるために、血小板数の変動を伴う様々な血液疾患に由来するTPOを解析したところ、健常人と同様に全長型のTPOがドミナントであることを明らかにし、TPOの翻訳後プロセッシングによる部分長化が、全身性の血小板産生制御機構として機能している可能性は低いことを示した。

さらに、TPOの立体構造からTPOとレセプター (c-Mpl) との結合様式を解明するために、TPOレセプター結合ドメインと中和抗体 Fab フラグメントの複合体についてX線結晶構造解析を行った。その結果、TPOレセプター結合ドメインは、4本 $\alpha$ ヘリックスバンドル構造を形成しており、立体構造上エリスロポエチンと高い相同性を持つことを確認した。加えて、合わせ

て明らかとなった中和抗体の結合部位や、カロリメトリーを用いた解析から、TPOは2つの異なるレセプター結合部位を持ち、結合比が TPO:c-Mpl=1:2 で結合することを明らかにした。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を示した。以上の結果より、TPOの活性発現はレセプター結合ドメインのみで必要十分であることを構造的に示し、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を明らかにした。

このように松本篤志氏は、血小板に由来するトロンビンによりTPOがプロセッシングされることと、その生理学的役割の可能性を示すとともに、ヒト血液中のTPO分子は、血小板数によらず 332 アミノ酸から成る全長型と考えられる分子がドミナントであることを初めて明らかにした。さらにTPOレセプター結合ドメインの立体構造を明らかにし、レセプターとの結合部位およびその結合様式を明らかにした。

以上のように本論文は、有効な血小板減少症治療薬の開発において基礎的および応用的にも大いに貢献すると考えられる。よって審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。