

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 坂本 明彦

血小板は造血幹細胞が巨核球へと分化し、巨核球が断片化することで作られる。巨核球系列の細胞には一回膜貫通型受容体の Mpl が特異的に発現していて、そのリガンドがトロンボポエチン(TPO)である。TPO は巨核球系列の細胞の増殖と分化を促進するサイトカインで、血小板産生の主要な制御因子だとされている。Mpl にはキナーゼ活性を有するドメインがなく、代わりに JAK2 と呼ばれるキナーゼが細胞質側の領域に結合する。TPO が Mpl に結合すると、Mpl、JAK2 がリン酸化し、STAT (signal transducers and activators of transcription)、MAPK (mitogen-activated protein kinase)、PI3K (phosphoinositide 3-kinase) のリン酸化を介して細胞の増殖と分化を促進する。このような TPO シグナルが不十分だと血小板減少症や再生不良性貧血に、逆に過剰だと骨髄増殖性症候群になると考えられている。そのため、多くの研究者が細胞内における TPO シグナルの制御機構を研究してきた。近年、TPO シグナルを負に制御する分子機構が大きく分けて 2 つあることが分かってきた。ひとつは suppressors of cytokine signaling や Lnk、Lyn など TPO シグナルを抑制するタンパク質の誘導で、もうひとつはリソソームやプロテアソームでの分解による Mpl の発現量の低下である。それに比べると、TPO シグナルを正に制御する分子機構はほとんど分かっていない。ところで、細胞膜上にはコレステロールやスフィンゴ糖脂質に富んだ脂質ラフトと呼ばれる大きさが数十 nm の膜ドメインが存在していて、さまざまなタンパク質のシグナル伝達を制御していると考えられている。本論文は TPO の初期シグナルによる Mpl や JAK2 のリン酸化が脂質ラフトによって制御されていることについて述べられている。

まずイントロダクションでは、TPO の機能と本研究の背景が述べられている。

第1章では、TPO の蛍光標識法の開発が述べられている。TPO の細胞内分布を蛍光顕微鏡で観察するためには、TPO を蛍光標識する必要がある。タンパク質の蛍光標識によく使われる試薬のひとつにチオール基反応性色素が知られている。しかし、TPO には Mpl を介して増殖シグナルを伝達するのに必須な 2 組のジスルフィド結合が存在する。そこで、ピューロマイシンを用いた方法で TPO を蛍光標識した。ピューロマイシンにはタンパク質の翻訳過程において翻訳されたポリペプチド鎖の C 末端に共有結合する性質がある。そこでアフィニティー精製のデスチオビオチンタグと蛍光色素の Cy5x を結合させたピューロマイシンを化学合成し、その存在下で無細胞タンパク質合成系 PURESYSTEM S-S を用いて TPO を翻訳した。その結果、C 末端にデスチオビオチンタグと Cy5 が共有結合した TPO (TPO-Cy5x) が合成された。デスチオビオチンタグとあらかじめ TPO の C 末端に導入しておいたヒスチジンタグを用いて、蛍光標識された TPO をアフィニティー精製した。TPO-Cy5x には Mpl 発現細胞を増殖させる活性があること、生細胞において Mpl に特異的に結合することが確かめられている。

第2章では、TPO-Mpl 複合体の脂質ラフトでのクラスター化が TPO の初期シグナルを増強することが述べられている。まず、筆者は、Mpl の一部が脂質ラフトと相互作用していることを明らかにした。Mpl が脂質ラフト上に局在するか否かを 3 つの方法で調べた。脂質ラフトは低温下で Triton

X-100に不溶性の低密度の構造物を形成する。この性質を利用すると、脂質ラフトと相互作用するタンパク質をシヨ糖密度勾配遠心法により分離することができる。マウス骨髓球細胞由来の細胞株 FDC-P2 は Mpl を発現していないが、遺伝子導入により Mpl を強制発現させると TPO に依存して増殖するようになる。Mpl を発現させた FDC-P2 細胞を低温下で Triton X-100 により溶解し、シヨ糖密度勾配遠心法により分離した結果、Mpl、JAK2 の一部が Triton X-100 に不溶性の画分 (DIM 画分) に検出された。一方、メチル-β-シクロデキストリン (MBCD) により脂質ラフトの形成を阻害すると Mpl、JAK2 は DIM 画分に検出されなくなった。また、UT-7/TPO 細胞は白血病患者を由来とする細胞株で、Mpl を発現していて、形態が巨核球の特長を有している。前述の結果が内在性の Mpl においても得られるかを調べるために、UT-7/TPO 細胞の Triton X-100 に対する溶解性を調べた。その結果、内在性の Mpl、JAK2 も一部が DIM 画分に検出された。次に、Mpl の細胞膜上における拡散運動が脂質ラフトの構成因子のひとつであるコレステロールに依存するかを一分子輝点追跡法で調べた。ACP タグを融合した Mpl に酵素を用いることで蛍光色素を共有結合させることができる。ACP 融合型 Mpl を FDC-P2 細胞に発現させ、蛍光色素の DY-547 で標識した。この細胞を不飽和脂肪酸で修飾したガラス表面に接着させ、ガラス近傍側の細胞膜上における Mpl を全反射照明により一分子観察した。一分子輝点追跡法により、Mpl が拡散する領域の大きさ、拡散定数の両方がコレステロールに依存することが分かった。次に、この細胞を化学固定し、Mpl が脂質ラフトマーカーの GM1 と共局在するかを調べた。その結果、Mpl の一部が GM1 と共局在することが分かった。以上 3 つの結果により、Mpl の一部が一過的に脂質ラフトと相互作用することが分かった。

次に筆者は、TPO が内在化する前に細胞表面でクラスター化することを明らかにした。Mpl、JAK2 の脂質ラフト親和性の TPO 刺激による影響を、Triton X-100 に対する溶解性を指標にして調べた。その結果、Mpl、JAK2 の脂質ラフト親和性が TPO 刺激に伴い低下することが分かった。このような変化が培養細胞においてどのように観察されるかを共焦点顕微鏡で調べた。蛍光標識した Mpl は TPO 刺激に伴い、内在化する前に細胞表面でクラスター化することが分かった。また、MBCD により脂質ラフトの形成を阻害すると、Mpl のクラスター化が阻害された。このことから Mpl のクラスター化は脂質ラフトに依存することが分かった。Mpl を発現させた FDC-P2 細胞を TPO-Cy5x 存在下で培養し、共焦点顕微鏡で TPO-Cy5x の細胞内分布を観察した。その結果、TPO は細胞表面に一樣に結合した後クラスター化し、そのまま内在化することが分かった。MBCD により脂質ラフトの形成を阻害すると、TPO は細胞表面に一樣に結合したままでクラスター化せず、内在化もしなかった。この結果から、TPO の結合した Mpl は脂質ラフトに依存して細胞表面でクラスター化すると考えられる。

さらに筆者は、TPO の細胞内分布が TPO シグナルの初期段階に与える影響について述べている。TPO 刺激に伴い Mpl の細胞質内領域の Y112 と Y117 がリン酸化することが知られている。そこで、これらのリン酸化部位すべてに変異を入れた変異体を用い、TPO のクラスター化が Mpl のリン酸化により制御されるかを調べた。この Mpl 変異体を発現させた FDC-P2 細胞を TPO-Cy5x 存在下で培養しても、TPO が細胞表面でクラスター化することが共焦点顕微鏡により分かった。このことから、TPO のクラスター化は Mpl のリン酸化に依存しないことが分かった。TPO のクラスター化が Mpl のリン酸化に依存しなかったことから、逆に Mpl のリン酸化が TPO のクラスター化に依存す

る可能性がある。そこで、TPO のクラスター化が Mpl、JAK2 のリン酸化に与える影響を免疫沈降法により調べた。細胞を低温で培養することで TPO の内在化を抑制しただけでは Mpl、JAK2 のリン酸化は顕著な影響を受けなかった。一方、MBCD により TPO の内在化だけでなくクラスター化も抑制すると、Mpl、JAK2 いずれのリン酸化も抑制された。この結果から、TPO の結合した Mpl は脂質ラフトに依存して細胞表面でクラスター化し、その結果、Mpl、JAK2 のリン酸化を促進していると考えられる。

本研究により、TPO 刺激に伴い Mpl は脂質ラフトに依存してクラスター化し、その結果、Mpl や JAK2 のリン酸化が増幅されることが分かった。Mpl の発現量は巨核球系列の細胞が分化するにつれ増加することが分かっている。本研究により明らかになった脂質ラフトを介した TPO シグナルの増幅機構は、巨核球分化の初期段階において、発現量の少ない Mpl を介して効率よく TPO シグナルを細胞に伝える上で重要な働きをしているのかもしれない。

以上のように、学位申請者は、TPO 刺激に伴い Mpl が脂質ラフトに依存してクラスター化し、その結果、Mpl や JAK2 のリン酸化が増幅されることを明らかにした。Mpl の発現量は巨核球系列の細胞が分化するにつれ増加することが分かっている。本研究により明らかになった脂質ラフトを介した TPO シグナルの増幅機構が、巨核球分化の初期段階において、発現量の少ない Mpl を介して効率よく TPO シグナルを細胞に伝える上で重要な働きをしている可能性を示した。よって、本研究を行った坂本明彦は博士（薬学）の学位を受けるにふさわしいと判断した。