

論文の内容の要旨

論文題目 チロシンモチーフを利用した抗体・受容体キメラによるシグナル伝達蛋白質の活性制御

氏名 坂 晃一郎

1. 諸言

サイトカインは、細胞間でシグナルを伝達するための蛋白質性シグナル伝達分子であり、細胞膜に発現したサイトカイン受容体に結合することで細胞内にシグナルを伝達し増殖や分化などの細胞の運命制御を行なっている。

サイトカイン受容体を起点にしたシグナル伝達のメカニズムでは、まずリガンドの結合により受容体鎖が近接し、受容体に恒常的に結合しているチロシンキナーゼである JAK が活性化される。活性化された JAK は受容体の細胞内ドメインのチロシン残基をリン酸化する。細胞内のシグナル伝達分子はこのリン酸化チロシン残基に対して結合することができ、それ自体も JAK によりリン酸化され活性化されると、細胞内にさらなるシグナルを伝達する。受容体に複数存在するどのリン酸化チロシン残基に、どのようなシグナル伝達分子が結合するかは、チロシンの周囲に存在するアミノ酸配列も含めた数残基のモチーフにより決定される。

そこで本研究では受容体の細胞外ドメインに一本鎖抗体を、細胞内ドメインにモチーフを人工的に配置することで、望みの分子を引き金に、望みの蛋白質を活性化できる受容体の構築を目指した (図 1)。このようなキメラ受容体は抗原の添加/除去によって内在性の蛋白質の活性を On/Off に制御できる点で、恒常活性型の外来蛋白質や低分子阻害剤などを用いた既存の細胞活性制御系に対して優位性を有する。またリガンド濃度に依存し、任意のタイミングと強度で目的のシグナル伝達分子を活性化できる。従って本研究は、人為的な細胞運命制御系への応用、さらには受容体蛋白質の再構成を通じてサイトカイン受容体のシグナル伝達メカニズムの解明につながると考えられる。

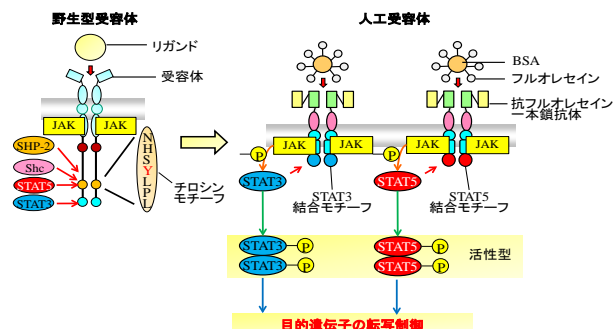


図 1 研究概要

2. 実験方法と結果

2.1 チロシンモチーフを利用した抗体・受容体キメラによるシグナル伝達蛋白質の活性化

サイトカイン受容体のシグナル伝達において主要な細胞内蛋白質である STAT1, 3, 5, PI3K, Shc の 5 種類をそれぞれ結合することが知られている天然の受容体由来のチロシンモチーフを選定した¹⁻⁴⁾。このモチーフをサイトカイン受容体の 1 種である c-Mpl の JAK 結合ドメインの C 末端側に配置した。細胞外ドメインには抗フルオレセイン (FL) 一本鎖抗体を融合し、FL 標識 BSA (BSA-FL) への応答性を付与した (図 2)。

作製した受容体をマウス pro-B 細胞株である Ba/F3 細胞で発現させ、受容体により活性化されたシグナル伝達蛋白質をウエスタンブロットにより検証した。その結果、各モチーフを付加した受容体が目的とするシグナル伝達蛋白質を活性化できたことから、モチーフ配列依存的にシグナルが伝達されることが示された (図 3)。no motif でも一定量の STAT5 の活性化が確認されたが、これは JAK2 に内在する STAT5 結合モチーフに由来すると考えられる⁷⁾。また STAT1 結合モチーフを有する細胞では STAT1 の総蛋白質量の増加が確認された。STAT1 結合モチーフによる強力な STAT1 活性化はこれが原因であることが示唆される。

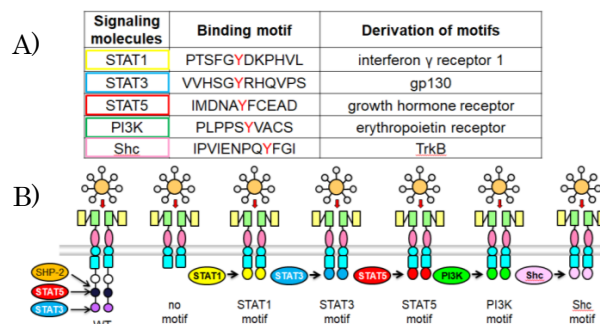


図 2 各モチーフを融合した人工受容体構造

A) 選定したチロシンモチーフと由来とした受容体 B) 受容体構造

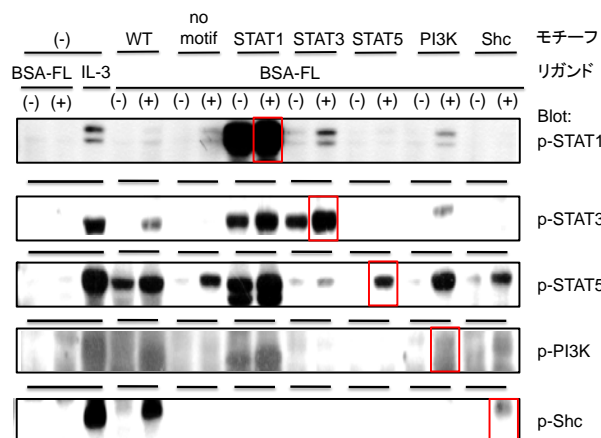


図3 モチーフ依存的なシグナル伝達蛋白質の活性化 BSA-FL: 1 ug/ml, IL-3: 1 ng/ml, 15 分間刺激

また、STAT3 と Shc の結合モチーフの両方を組み込んだ受容体を構築し Ba/F3細胞に発現させたところ、BSA-FL 刺激によって STAT3 と Shc を同時に活性化させることに成功した (図4)。モチーフ間の距離が異なる受容体における活性化強度を比較すると、リンカーを挿入していない受容体 (S3) について Shc のリン酸化が弱いことが示された。また、この「S3」の STAT3 結合モチーフのチロシンをフェニルアラニンに置換することで STAT3 結合能を失わせた受容体を構築したところ、Shc の活性化強度が回復した。この結果から、モチーフの近接は受容体に対する複数のシグナル伝達蛋白質の競合的な結合を促し、双方の活性化強度を弱めたと考えられる。

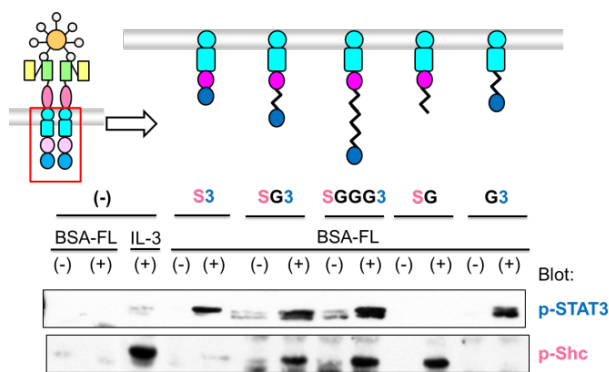


図4 STAT3, Shc の同時活性化
S: Shc 結合モチーフ、3: STAT3 結合モチーフ、G: (G₄S)₃ リンカー

つぎに結合モチーフを融合した受容体によってリン酸化されたタンパク質が、下流へ正しくシグナルを伝達できるか検証した。転写因子である STAT3 についてはターゲット遺伝子である Pim-1 の mRNA 量を RT-PCR により測定、MAPK 経路の上流蛋白質である Shc については ERK のリン酸化を

ウェスタンブロットにより検証した。

Pim-1 の mRNA 量は STAT3 結合モチーフを有する G3, SG3 において BSA-FL 刺激時に上昇し、Erk のリン酸化レベルは Shc 結合モチーフを有する SG, SG3 において同じく BSA-FL 刺激時に大きく上昇することを確認した (図5)。以上のことから両シグナル伝達蛋白質は下流へ正しくシグナルを伝達することが示された。

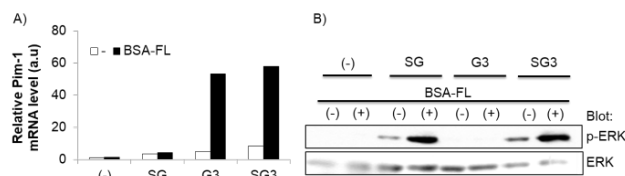


図5 下流シグナル伝達蛋白質の活性化

A) Pim-1 の mRNA 量 Pim-1 の mRNA レベルを HPRT1 レベルで規格化し、parental Ba/F3 BSA-FL 未刺激を 1 とした $\Delta \Delta Ct$ により値を算出した。B) Erk のリン酸化

さらに STAT3 の結合モチーフを受容体に 2 つ、または 3 つ組み込むことで STAT3 の活性化レベルを制御できるか検証したところ、結合モチーフを 1 つ有するものに比べ強い STAT3 のリン酸化を確認することができた (図6)。従ってモチーフ導入数を変更することで、標的シグナル伝達蛋白質の最大活性を向上できることが示された。またこれにより異なるモチーフ由来のシグナル伝達蛋白質の活性化比も制御できると考えられる。

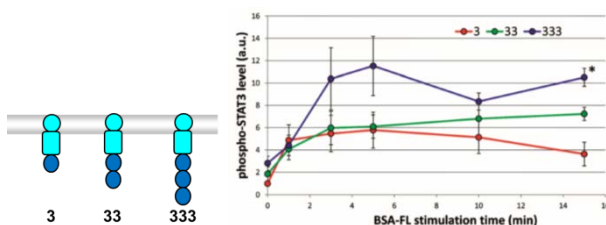


図6 複数の STAT3 結合モチーフによる活性化強度の変化 3: STAT3 結合モチーフ、G: (G₄S)₃ リンカー
p-STAT3 量を STAT3 の発現量、受容体の表面発現量で規格化し、キメラ受容体「3」(BSA-FL: 1 ug/ml, 0 min)の p-STAT3 量を 1 とした。

また、JAK 結合ドメインとモチーフ間の距離を変更したところ、複数のモチーフによる活性化強度の増強に比べ、有意な増減は確認されなかった (図7)。従ってモチーフの配置位置による影響は小さく、望む数のモチーフを一つの受容体に組み込むことができると考えられる。

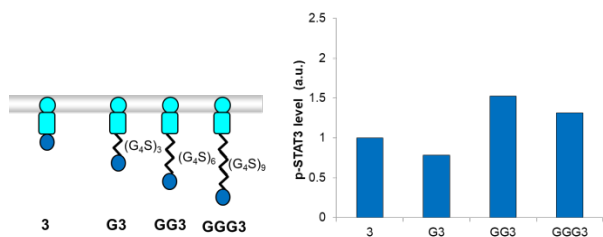


図7 モチーフ融合箇所とシグナル伝達分子活性化強度の関係

p-STAT3量をSTAT3の発現量、受容体の表面発現量で規格化し、キメラ受容体「3」(+BSA-FL)のp-STAT3量を1とした。

2.2 モチーフ融合受容体のHSC体外増幅への応用
血球系疾患に対する治療においては、移植細胞として全血球の源である造血幹細胞(HSC)が適しており、治療に要する十分な細胞数を確保するため、生体外でのHSC増殖促進技術と、その実現に必要な細胞内シグナル経路の解明が求められている。そこで、本研究で構築した受容体をHSCの生体外増幅に応用することを試みた。

モチーフなし、またはSTAT1からShcまでの結合モチーフを1つ含む6種類の受容体とc-Mplの細胞内ドメインを全長で有する受容体(WT)を、マウスから取得したHSC分画であるCD34⁺KSL細胞に発現させ、リガンド刺激時の増殖アッセイと、染色によるフェノタイプ解析を行うことでin vitroでの増幅能と分化能を評価した(図8)。

まず増殖アッセイの結果、導入したすべての受容体について、天然のリガンドである幹細胞因子(SCF)のみの刺激と比較して、SCF+BSA-FLでは有意な増殖促進効果を確認できた(図9)。no motifが示すJAKの活性化のみでもCD34-KSL細胞の増殖が微弱ながら促進されるため、no motifと比較したときのさらなる上昇が受容体にリクルートされたシグナル伝達分子の活性化に伴うものであることがわかる。各受容体を比較すると、WTが最もSCF+BSA-FL刺激による増殖能が高く、WTには劣るがモチーフの中ではSTAT5結合モチーフが強い増殖能を示していることが確認された。

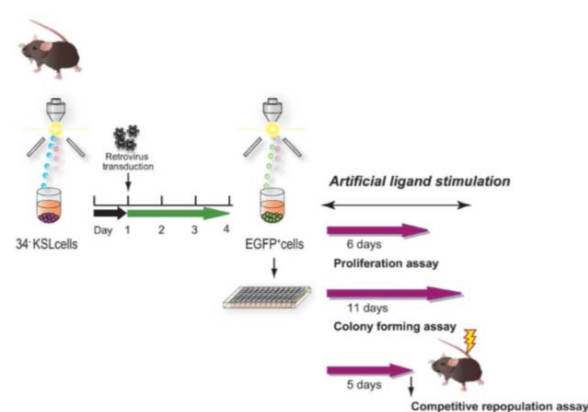


図8 HSCアッセイ概要

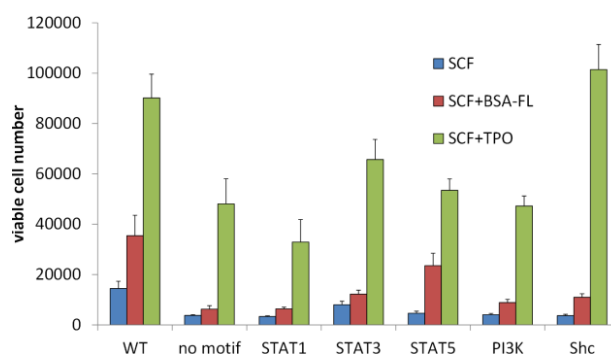


図9 HSC増殖アッセイ

25 cells/well, n=5, SCF : 50 ng/ml, TPO : 50 ng/ml, BSA-FL : 5 ug/ml 6日間培養

また、増殖した細胞のフェノタイプ解析の結果から、SCF+BSA-FL刺激において、WT, STAT5は好中球、マクロファージ、赤芽球、巨核球いずれへの分化能も有していることを示すウェルが存在した(図10)。

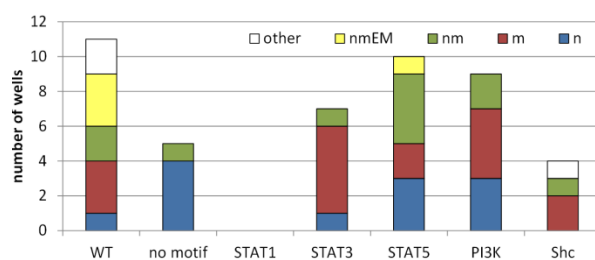


図10 HSCフェノタイプ解析

n : neutrophil, m : macrophage, E : erythroblast, M : megakaryocyte
1 cell/well, n=48, SCF (10 ng/ml)+ BSA-FL (5 ug/ml) 11日間培養

以上の結果から、5種類の細胞内蛋白質の中ではSTAT5が最もCD34-KSL細胞の増幅と多分化促進効果を有していることが示された。またSTAT1を含むあらゆる分子を強く活性化するSTAT1結合モチーフによるシグナルでは、細胞の増殖が抑制されることが示された。これは強いシグナルによって細胞が急速に分化ステップを進み細胞分裂のできない

成熟細胞に移行してしまうためであると考えられる。

STAT5 活性化による HSC の長期自己複製能を検証するため、competitive repopulation アッセイを実施した。キメラ受容体を発現したドナーの造血細胞とともにレシピエントの造血細胞を移植し、全造血細胞中のドナー由来細胞の割合を調べることで、その細胞が長期の自己複製能、多分化能を有しているか検証することができる。

アッセイの結果、1 次移植さらには 2 次移植後においても、WT とともに STAT5 結合モチーフを有する受容体を発現するドナー細胞の存在が確認された (図 1 1)。この結果から STAT5 の活性化は長期の自己複製能に寄与することが示された。また、ドナー細胞を分化マーカーで分画したところ、STAT5 活性化はミエロイド系に比べリンパ系細胞の再構築能を促すことが示された。

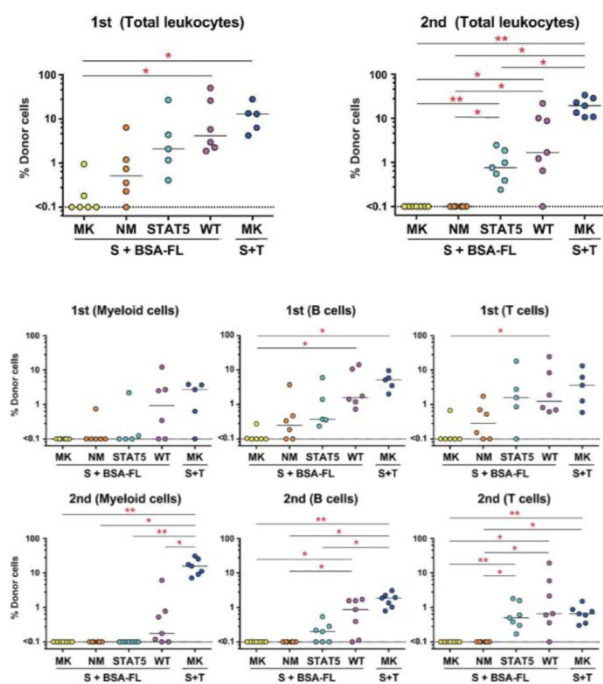


図 1 1 Competitive repopulation アッセイ

MK: EGFP 遺伝子のみ導入, NM: no motif 移植前培養条件 : SCF : 50 ng/ml, TPO : 50 ng/ml, BSA-FL : 5 ug/ml. n=7
Myeloid cells (peripheral blood myeloid-lineage cells): CD4⁺CD8⁺Gr1⁺Mac1⁺B220⁻, B cells (peripheral blood B cells): CD4⁺CD8⁺Gr1⁺Mac1⁺B220⁺, T cells (peripheral blood T cells): CD4⁺CD8⁺Gr1⁺Mac1⁺B220⁻

3. 結言

本研究により、任意のチロシンモチーフを任意の個数受容体に導入することで、望みのシグナル伝達蛋白質を望みの強度比で活性化できる可能性が示された。結合活性を指標としたスクリーニングにより、単一のシグナル伝達蛋白質を特異的に活性化させる

人工的なチロシンモチーフ配列を選定できる可能性もあり、それにより標的とする既知シグナル伝達蛋白質の機能をより精緻に解析できると考えられる。またチロシンモチーフを多様化させた受容体ライブラリーを、対象とする細胞に発現させ、細胞活性を指標としたスクリーニングをおこなうことで、同定したモチーフ配列に立脚したシグナル伝達蛋白質の機能解析、さらにはそのモチーフを活用した人為的な細胞の運命制御による医療応用が行えると考えられる。

本研究では、作製した受容体を用いて HSC の生体外増幅への応用を試み、STAT5 結合モチーフが HSC の自己複製能に寄与することが示された。STAT5 はその他のシグナル伝達蛋白質との相乗的な活性化により HSC の自己複製能を高めることが知られているため⁵⁾、さらなるチロシンモチーフを受容体に組み込むことで、その効果を高めることができる可能性がある。任意のリガンドにより活性化できる人工受容体は、体内でも発現細胞特異的に活性化させることができるため、移植後の運命制御も可能であると考えられる。

4. 参考文献

- 1) Wiederkehr-Adam M, et al. Characterization of phosphopeptide motifs specific for the Src homology 2 domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3. J Biol Chem, 278 : 16117-28, 2003
- 2) Uyttendaele I, et al. Mammalian protein-protein interaction trap (MAPPIT) analysis of STAT5, CIS, and SOCS2 interactions with the growth hormone receptor. Mol Endocrinol, 21 : 2821-31, 2007
- 3) Damen JE, et al. Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. J Biol Chem, 270 : 23402-8, 1995
- 4) Smith MJ, et al. Screening for PTB domain binding partners and ligand specificity using proteome-derived NPXY peptide arrays. Mol Cell Biol, 26 : 8461-74, 2006
- 5) Ishizuka S, et al. Designing Motif-Engineered Receptors To Elucidate Signaling Molecules Important for Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. ACS Synth Biol. 20;7(7):1709-1714, 2018