

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 坂 晃一郎

細胞質内に存在するシグナル伝達蛋白質は、細胞外からの刺激を遺伝子の転写制御システムに伝達する役割を有する蛋白質であり、その活性を人為的に制御できる技術は、医薬・薬学・工学応用に貢献すると考えられる。

本論文ではサイトカイン受容体の細胞外ドメインに一本鎖抗体を、細胞内ドメインに特定のシグナル伝達蛋白質を結合できるチロシンモチーフを人工的に融合することで、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が検討された。本論文は全 7 章で構成され、第 1 章は緒言、第 7 章は将来展望と総括となっている。

第 2 章では、トップダウン型モチーフエンジニアリングを利用し細胞の運命を制御した研究成果について記述されている。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、生体外で HSC を増殖促進する技術と、その実現に必要な細胞内シグナルの解明が求められている。そこで、HSC の自己複製能に重要な因子であるトロンボポエチンに対する受容体(c-Mpl)の改変により優れた自己複製能を誘導できる受容体の構築を試みている。抗フルオレセイン一本鎖抗体と c-Mpl の細胞内ドメインを有する抗体-受容体キメラ(S-Mpl)に対し、STAT5 の活性増強と STAT3 の活性抑制を目的に、STAT3 結合モチーフを削除した受容体(trunc.)や、その STAT3 結合モチーフを STAT5 結合モチーフのコンセンサス配列に置換した受容体(QtoL)が構築された。各受容体を HSC に発現させたところ、trunc.においては S-Mpl と比較し SCF+BSA-FL 刺激条件において 2 倍以上細胞増殖能が上昇した。またこの増殖能向上は受容体の発現量の改善が寄与していることが示唆された。

第 3 章では、ボトムアップ型モチーフエンジニアリングを利用し、特定のシグナル伝達蛋白質に結合するモチーフを受容体に融合することで、望みのシグナルを活性化できることが示されている。検証のため STAT1、STAT3、STAT5、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が選定され、S-Mpl の JAK 結合ドメインの C 末端側に融合された。作製した受容体を Ba/F3 細胞に発現させ、リン酸化シグナル伝達蛋白質量をウェスタンブロットにより検出したところ、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、構築された受容体はモチーフ配列依存的にシグナルを伝達することが示された。

第 4 章では、異なるモチーフを融合することで複数のシグナルを対象に活性化できる受容体の構築について述べられている。STAT3 と Shc の結合モチーフの両方を組み込んだ受容体が構築され、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ている。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について Shc のリン酸化が弱いことが示された。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すと考察している。

第 5 章では、同種のモチーフを融合することでシグナルの活性化強度を制御した受容体の構築が試みられている。STAT3 の結合モチーフを受容体に 2 つ、または 3 つ融合したところ、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。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。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た。

第 6 章では第 3 章で構築された受容体を利用し、HSC の自己複製に寄与するシグナルの同定が検討された。5 種類の結合モチーフを 1 つずつ含む受容体と c-Mpl の細胞内ドメインを全長で有する受容体(WT)を HSC で発現させ *in vitro* での増幅能と分化能を評価した。増殖アッセイの結果から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、モチーフの中では STAT5 結合モチーフが強い増殖能を示すことが確認された。またフェノタイプ解析の結果から、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確認された。STAT5 活性化による HSC の長期自己複製能を *in vivo* で検証したところ、WT とともに STAT5 結合モチーフを有する受容体を発現する移植造血細胞が長期にわたってマウス体内に存在することが確認された。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 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。

以上のとおり、本論文では、チロシンモチーフの機能に着目した受容体のエンジニアリングにより、汎用的な細胞内シグナル伝達蛋白質の活性制御系の構築に成功している。低分子阻害剤のような既存ツールと比較し、scFv の融合により望みの分子を応答リガンドとして使用できる、人工リガンドにより標的細胞特異的にシグナルの活性化を誘導できる、蛋白質を活性化に促す OFF から ON への制御が可能である、1 遺伝子由来の受容体から同時に複数種類の蛋白質を標的に活性化することが可能であるなど、バイオエンジニアリング分野において複数の点から優位性の高い技術であるといえる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。