

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20589

研究課題名（和文）海綿由来レクチンを基盤とする糖鎖を介したサイトカイン受容体新規活性化機構の解明

研究課題名（英文）Novel mechanism of glycan-mediated activation of cytokine receptors by lectins from marine sponges

研究代表者

辺 浩美（Watari, Hiromi）

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：30962758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究において私たちが見出した海綿由来新規レクチン、トロンボコルチシン（ThC）によるTPO受容体活性化の機構を明らかにしたことを基盤とし、本研究では各種ThC変異体や類似レクチンの組み換えタンパク質を作成し、様々な角度からレクチンによる糖鎖を介したTPO受容体活性化の詳細を明らかにすることを試みた。その結果、野生型ThCが群を抜いて強い活性を示すことが明らかとなったが、タンパク質立体構造予測ツールによる発現レクチンの立体構造はThCとの差がほとんど無いことから、活性の差を説明し得る決定的な理由は明らかになっていない。今後はTPO受容体との複合体としての構造比較など、更なる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄増殖性腫瘍という疾患においてThCによるTPO受容体活性化と同様の機構の存在が示唆されていたが、その詳細は不明であった。ThCによる活性化機構の解明により、TPO受容体上の糖鎖を介した活性化が、疾患の原因として実際に体内で生じていることを間接的ではあるものの、示した。本研究においてThCに類似した構造を持つレクチンがTPO受容体にどのような活性を示すかを調べることは、レクチンがTPO受容体の活性化をどのように調節しているのか、その疑問に対し新たな知見を与え、延いては未だ明らかとなっていない疾患の詳細の理解につながる。

研究成果の概要（英文）：In our previous study, we clarified the mechanism of TPO receptor activation by thrombocortecin (ThC), a novel lectin derived from a marine sponge. We have expressed here recombinant proteins of various ThC mutants to reveal the details of TPO receptor activation by lectins via glycan. It was showed that wild-type ThC exhibited by far the strongest activity, but the three-dimensional structure of the expressed lectin was almost identical to ThC using a protein three-dimensional structure prediction tool, so the definitive reason that could explain the difference in activity has not been clarified. Further investigation is required, such as structural comparison of the complex with the TPO receptor.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：トロンボポエチン受容体 レクチン 糖鎖 海洋天然物

## 1. 研究開始当初の背景

TPO (トロンボポエチン) とは血球の“おおもと”である造血幹細胞に作用し、血小板への分化を誘導する造血サイトカインである。また、造血幹細胞の維持や増殖にも関与することが知られている。すなわち TPO は全ての血球産生に関与しており、最も重要なサイトカインの一つであると言える (1)。TPO は細胞表面の TPO 受容体に結合し、2 分子の受容体を架橋、複合体を形成することで活性化に導く。TPO 受容体の活性化機構は、生理的リガンド TPO によるもの以外にも、低分子医薬エルトロンボパグが受容体膜貫通ドメインへ作用することで活性化するモードが存在する (2)。これまでの研究で応募者はマイクロネシア産海綿に含まれる新規フコース結合性レクチンであるトロンボコルチシン (ThC) が TPO 受容体の糖鎖に結合し活性化することを発見した (3, 4)。TPO 受容体の糖鎖を介した活性化機構はこれまで報告例がなく、上述の 2 種の活性化機構に加え、第 3 の TPO 受容体活性化機構が存在することを初めて明らかにした。この結果から、レクチン一般に TPO 受容体を活性化する可能性が示唆されたため、市販の各種レクチンで活性評価を行った。その結果、バクテリア由来レクチン PA-IIL のみが活性を示した。そこで、PA-IIL と ThC の構造と活性を比較したところ、2 者の立体構造は酷似しており、糖への結合性においては PA-IIL の方が強いにもかかわらず、PA-IIL は ThC の約 1/70 程度の活性に留まった。これは両者の僅かな立体構造の差が受容体と形成した複合体の構造に差異をもたらすためであると推察した。

## 2. 研究の目的

上述の通り、TPO 受容体の活性化は哺乳動物において極めて重要な役割を担っており、これまで多くの研究者が TPO 受容体活性化の分子機構について研究してきたが、その詳細は未解明である。このような状況下で、全く新しいレクチンアゴニストの登場は、研究を進めることが困難であった TPO 受容体の活性化複合体に関する知見を得るうえで格好のプロブとなる。ThC のアミノ酸配列を blast 検索すると hypothetical protein (HP) としてバクテリア由来タンパク質が多くヒットする。本研究では、これらバクテリアゲノムに眠る ThC 類似レクチンを大腸菌を用いて発現し、ThC/PA-IIL と比較しながらアゴニストとしての活性を詳細に調べ、レクチンの構造活性相関を調べることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では主にマウス由来 Mpl-Ba/F3 細胞もしくはヒト由来 UT-7/TPO 細胞の増殖を指標に TPO 様活性の評価を行った。組み換えタンパク質作成は大腸菌発現系を用いて行った。レクチンによる血球凝集活性はウサギ保存血液を用いて評価した。

## 4. 研究成果・考察

ThC のアミノ酸配列を Blast 検索すると 28 種の類似タンパク質がヒットし、その内 26 種は hypothetical protein であった (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2022 年 4 月時点)。これらの中から上位を占める 4 種のタンパク質 (*Okeania* sp.由来 HP, *Spartinivincinus* sp.由来 HP, *Zooshikella* sp.由来 HP, *Myxococcales* sp.由来 RICIN domain-containing protein) を選出し、AlphaFold2 を用いて立体構造を予測したところ、Fig.1 のように ThC に非常に類似した構造を示したことから、大腸菌を用い組み換えタンパク質を作成した。次に、これらが実際にレクチンとして機能しているかを調べるため、ウサギ保存血液を用い血球凝集活性を評価したところ、*Okeania* 由来レクチンを除き血球凝集活性を示した。続いて Mpl-Ba/F3 細胞を用いた TPO 様活性の評価においても *Okeania* 由来レクチンは活性を示さなかった。*Spartinivincinus* sp., *Zooshikella* sp.,



Gray: ThC  
Green: *Okeania* (HP)  
Cyan: *Myxococcales* sp.  
Magenta: *Spartinivincinus* sp. (HP)  
Yellow: *Zooshikella* sp. (HP)

Figure.1 AlphaFold2 を用いた ThC 類似レクチンの立体構造予測

*Myxococcales* sp.由来の3種のレクチンは活性を示したものの、ThCと比較して著しく弱い結果となった (Fig. 2). また通常、TPO もしくは TPO 受容体アゴニストの存在下で Mpl-Ba/F3 細胞を培養すると比較的均一に細胞が増殖するが、これらレクチン存在下では細胞の著しい凝集を観察した (Fig. 3). ThC 存在下においても非常に高濃度で添加した際にのみ凝集が観察されたが、この結果から TPO 様活性と細胞もしくは血球の凝集は比例しないことが窺える。

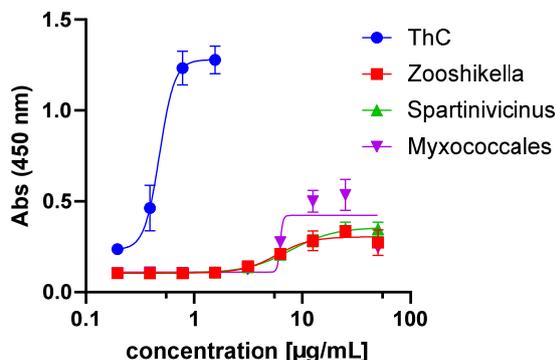


Figure.2 各種レクチンによる Mpl-Ba/F3 細胞の増殖

ThC および、ほとんどの類似レクチンの C 末端はグリシン残基が保存されている。これまでの研究から、C 末端残基は糖との結合の直接関与しているアミノ酸残基であるため、グリシンであることが重要と推測していた。これを裏付けるため、C 末端 G131 を欠損させた  $\Delta$ G131、アラニンに置換した G131A、トリプトファンに置換した G131W の 3 種の変異体を作成しその活性評価を行った。その結果、予想通り  $\Delta$ G131 は TPO 様活性、血球凝集活性のどちらも示さなかったため、糖との結合能が完全に失われたと考えられる。一方、予想に反し、G131A、G131W どちらの変異体も活性を示し、G131W においては血球凝集活性が野生型 ThC の 2 倍近く上昇し、それに伴って Mpl-Ba/F3 細胞の強い凝集も確認された。

本研究により、バクテリア遺伝子中に眠る ThC 類似タンパク質 (HP) はレクチンとして機能し、ThC には及ばないものの、TPO 受容体を活性化することが示された。また上述の通り、ThC 様レクチン、もしくは ThC 変異体はそれぞれ独自の血球凝集活性と Mpl-Ba/F3 細胞の凝集、TPO 様活性を示した。これら 3

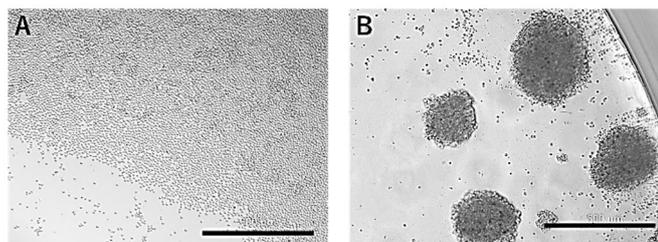


Figure. 3 Mpl-Ba/F3 細胞の増殖様式. A)TPO 存在下での均一な増殖. B)レクチン存在下で凝集した様子

つの活性に明らかな相関を見出すことはできなかったが、この結果を基に更なる変異体の作成・活性評価を行っていくことで、血球あるいは細胞凝集を最小限に抑え TPO 様活性のみを強く発揮する変異体の創出なども可能になるかもしれない。

本研究期間中にこれまで困難とされてきた TPO-TPO 受容体の複合体の立体構造がクライオ電顕を用いて観察した論文が発表された (5)。しかし、この結果をそのまま ThC に置き換えると矛盾が生じることから、TPO により形成される受容体の活性化複合体と ThC により形成される複合体は異なることが示唆された。さらに当論文では TPO 中のアミノ酸残基を改変することにより受容体とのインタラクションを若干変化させることで、受容体活性化における細胞内シグナル伝達にも変化が起こることを見出している。これはこれまで私たちが行ってきた ThC を用いた観察とも矛盾しない結果であり、TPO 受容体には各種の活性化機構とそれに伴う多様なシグナリングが存在することが明白となった。このように、技術の進歩により TPO 受容体研究も研究開始当時とは異なるフェーズに入っており、新規のアゴニストの発見やそれによる未知の活性化機構の発見は多様な TPO 受容体活性化の輪郭を捉えるため、今後より重要性が高まると考える。

## 5. 参考文献

1. Nakamura-Ishizu et al., Ann N Y Acad Sci, 2020.
2. Raslova et al., Haematologica, 2016.
3. Watari et al., Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2019.
4. Watari et al., Nat. commun, 2022.
5. Tsutsumi et al., Cell, 2023.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watari Hiromi, Kageyama Hiromu, Masubuchi Nami, Nakajima Hiroya, Onodera Kako, Focia Pamela J., Oshiro Takumi, Matsui Takashi, Kodera Yoshio, Ogawa Tomohisa, Yokoyama Takeshi, Hirayama Makoto, Hori Kanji, Freymann Douglas M., Imai Misa, Komatsu Norio, Araki Marito, Tanaka Yoshikazu, Sakai Ryuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34921-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watari Hiromi, Kishi Reimi, Matsunaga Satoko, Nishikawa Takayuki, Sawada Yuji, Honda Akito, Fujita Masaki J, Sakai Ryuichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Interaction of Polyamine-modified Marine Peptide Aculeine A with Cell Membranes: Disruption or Entry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 185 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.230009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 辺 浩美, 酒井 隆一	4. 巻 62
2. 論文標題 海綿レクチンで迫るトロンボポエチン受容体の多様な活性化機構の謎	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 166 - 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 辺浩美
2. 発表標題 海綿由来レクチンをプローブとしたサイトカイン受容体 新規活性化機構の解明
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辺浩美
2. 発表標題 海綿由来レクチン ThC によるサイトカイン受容体 新規活性化機構の解明
3. 学会等名 令和4年度 日本農芸化学会 北海道・東北支部 合同支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辺浩美
2. 発表標題 受容体の新規活性化機構を掘り起こす海洋天然物
3. 学会等名 第15回化学生態学研究会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiromi Watari, Hiroki Kageyama, Nami Masubuchi, Marito Araki, Yoshikazu Tanaka and Ryuichi Sakai
2. 発表標題 MECHANISM OF CYTOKINE RECEPTOR ACTIVATION BY MARINE SPONGE LECTIN.
3. 学会等名 XVII International Symposium on Marine Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiromi Watari, Masaya Kitano, Yuri Ishibashi, Ryuichi Sakai
2. 発表標題 Cytological effects of a novel sponge derived protein toxin, soritesidine
3. 学会等名 The 38th Symposium on Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	酒井 隆一  (Sakai Ryuichi)	北海道大学・水産科学研究院・教授  (10101)	
研究協力者	田中 良和  (Tanaka Yoshikazu)	東北大学・大学院生命科学研究科・教授  (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------