

A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation

Nature Communications (2022)

Hiromi Watari, Hiromu Kageyama, Nami Masubuchi, Hiroya Nakajima, Kako Onodera, Pamela Focia, Takumi Oshiro, Takashi Matsui, Yoshio Koder, Tomohisa Ogawa, Takeshi Yokoyama, Makoto Hirayama, Kanji Hori, Douglas Freymann, Misa Imai, Norio Komatsu, Marito Araki, Yoshikazu Tanaka, and Ryuichi Sakai

Summary

血液の成分である赤血球、白血球、血小板はいずれも血球前駆細胞からの分化により発生する。血小板への分化は、血球前駆細胞の表面に存在するトロンボポエチン受容体(MPL)にトロンボポエチン(TPO)が結合することにより誘導されるが、TPOと全く異なるタンパク質にもかかわらずMPLを活性化することができるタンパク質 トロンボコルチシン(ThC)が海綿から発見された(Watari et al., *CBPC* 2019)。本研究では、ThCのアミノ酸配列の決定、立体構造解析、分子特性評価、細胞生物学的解析を行い、ThCがMPLのAsn177のN型糖鎖修飾中のフコースに結合することによりMPLを強制的に2量体化させて活性化シグナルを誘導することを明らかにした。N型糖鎖修飾を介したMPLの異常な活性化は、カルレティキュリンの変異により誘導される骨髄増殖性腫瘍の原因として知られており、ThCによるMPLの活性化シグナルの誘導の詳細な解析からは骨髄増殖性腫瘍の解明につながる知見が得られた。本来のリガンドとは異なる「糖鎖を介したMPL活性化」の存在により、生体における受容体活性化が予測不可能なほど多様であることが示唆された。

ThCの立体構造解析と

アミノ酸配列の決定

エドマン分解と質量分析により推定されたアミノ酸配列をもとに、大腸菌発現系でThCを大量調製したが、TPO様の活性は確認できなかった(図2)。海綿から抽出したThC(天然ThC)のX線結晶構造解析を行なったところ、25番目の残基がLysではなく、GluもしくはGlnであることが推察された(図1A, B)。そこで、25番目の残基をGluもしくはGlnに置換した変異体タンパク質を調製したところ、TPO様の活性が確認できた(図2)。その後、最先端の質量分析装置を用いた解析から、天然ThCの25残基目の残基はGlnであることが同定された。

アミノ酸配列および立体構造から、ThCが糖結合タンパク質であることが示唆されたため、種々の糖との結合活性を評価したところ、ThCはCa²⁺イオン依存的にフコース、マンノースに特異的に結合することがわかった(図3, 4)。フコースとの複合体の立体構造からは、ThCは2量体を形成しており、プロトマー同士の間にて2つのCa²⁺イオンを介して糖と結合することがあきらかになった(図1A, C)。

細胞を用いたThCの機能評価

ThCのTPO様活性が糖結合活性に起因するかどうかを確認するために、各種糖の存在下でのTPO様活性を評価した(図5)。その結果、フコースとマンノースを添加した場合にのみ活性が阻害された。フコースやマンノースがThCの活性部位に結合することで、TPO様の活性が阻害されたと考えられ、この結果より、ThCはMPLの糖鎖修飾に結合してTPO様の活性を発現していることがわかった。

次に、MPL上に存在する4つの糖鎖修飾部位(N117, N178, N298, N358)をGlnに置換したMPLを発現するBa/F3細胞株を作成し、その細胞へのThCの作用を比較したところ、N117を置換した場合にのみ活性が低下した(図6)。これにより、ThCはMPLのN117の糖鎖修飾に結合してTPO様の活性を発現していることがわかった。

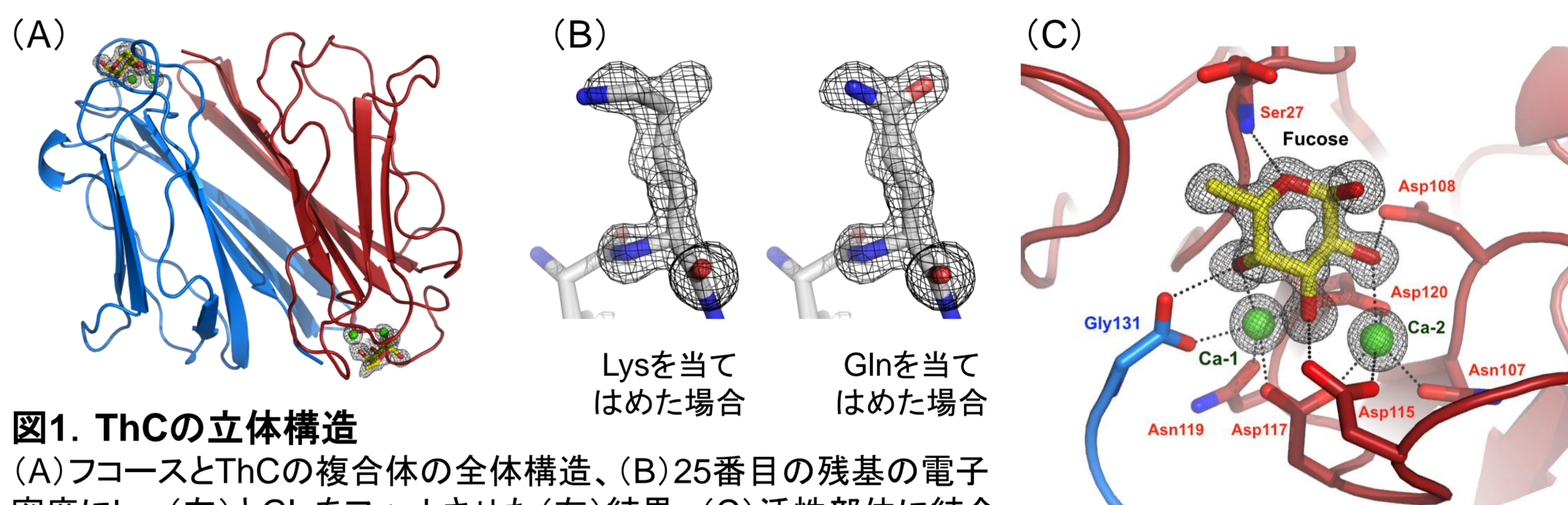


図1. ThCの立体構造

(A)フコースとThCの複合体の全体構造、(B)25番目の残基の電子密度にLys(左)とGlnをフィットさせた(右)結果、(C)活性部位に結合したフコースの構造

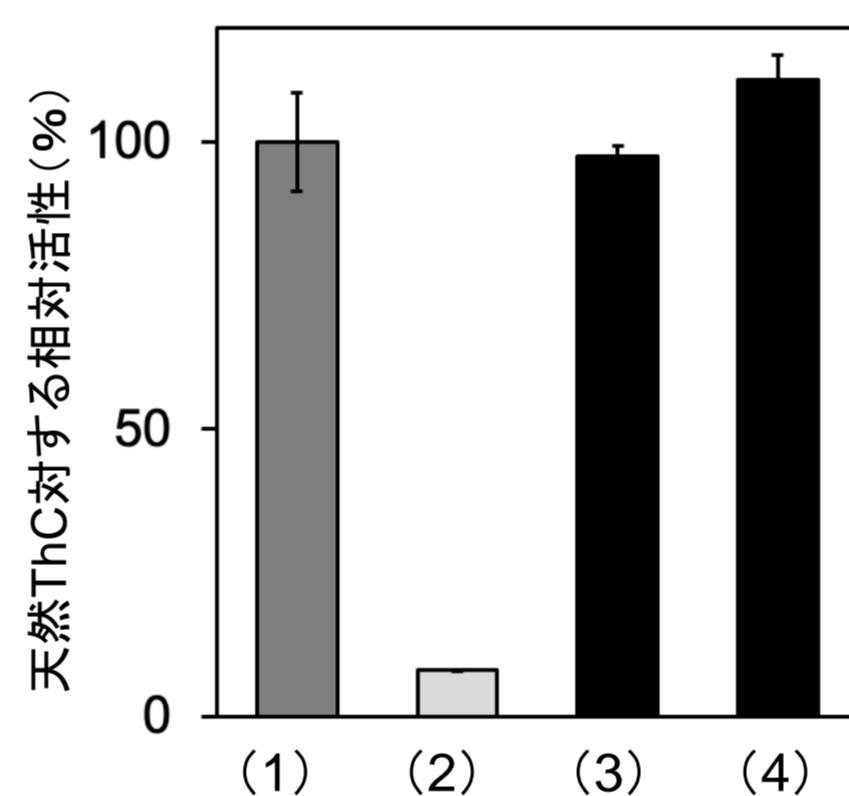


図2. TPO様活性の比較

(1)天然ThC、(2-4)25番目の残基がLys(2)、Gln(3)、Glu(4)の大腸菌発現ThC

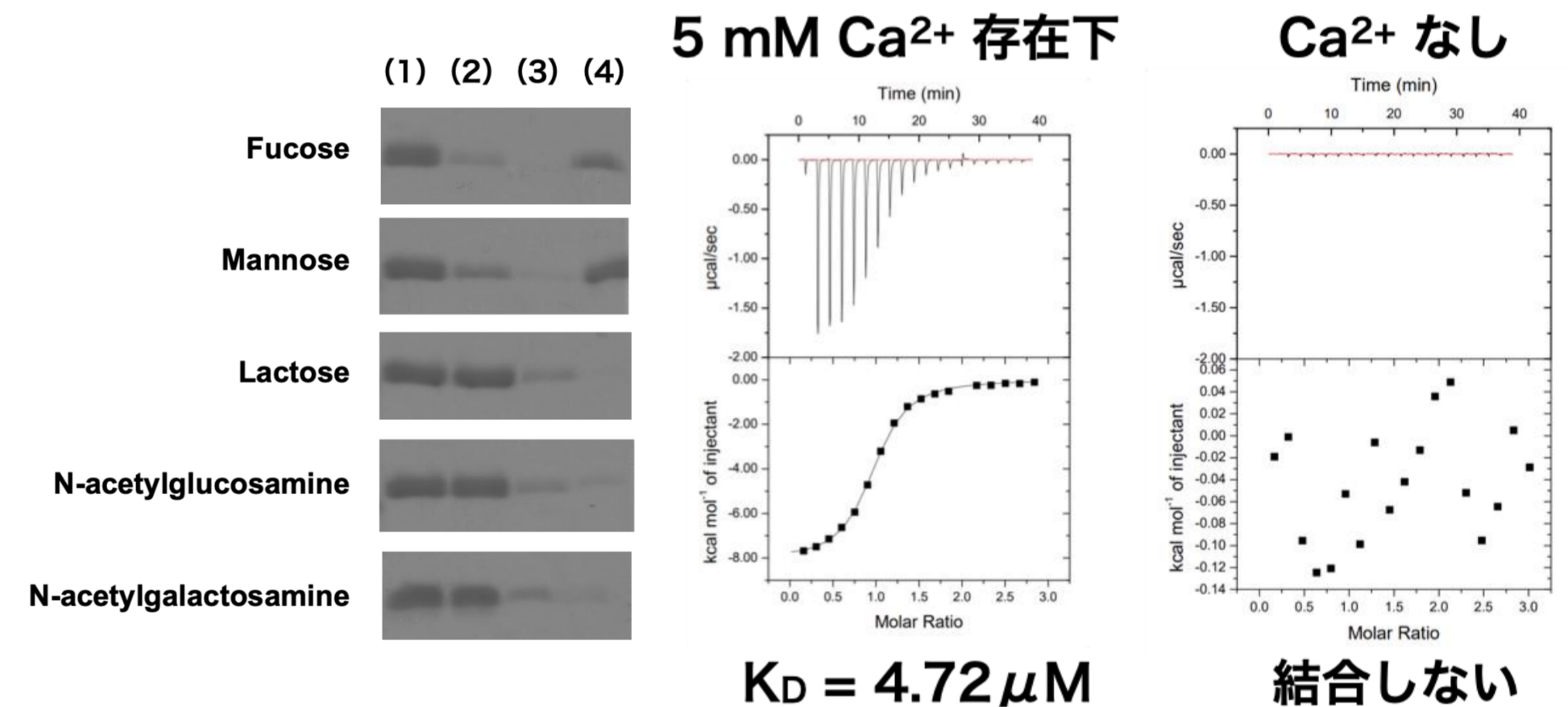


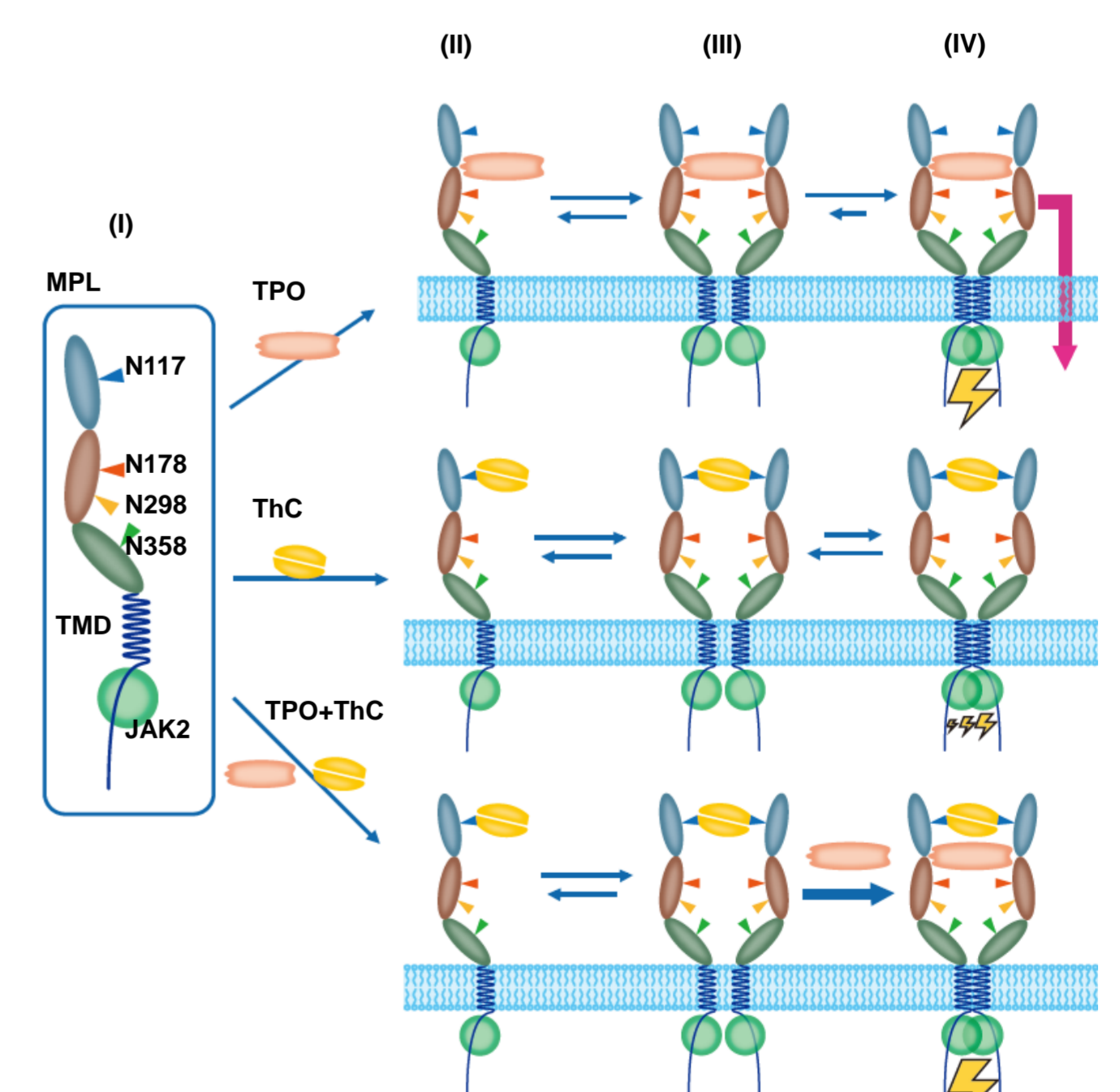
図3. ThCの糖結合活性評価

種々の糖が結合した樹脂へのThCの結合活性の比較。(1)樹脂に添加したThC、(2)素通り画分、(3)洗浄画分、(4)溶出画分

図4. フコースへの結合活性

Ca²⁺存在下(左)と非存在下(右)でのフコースへの結合活性を等温滴定型熱量測定(ITC)で評価した結果

ThCによるTPO様活性の発現機構



MPLの本来のリガンドであるTPOは、MPLと特異的に結合したのち、細胞内に取り込まれ、強く細胞分化シグナルを誘導する(上段)。一方、ThCはMPLのN117の糖鎖修飾に結合してMPLを強制的に二量体化させ、細胞分化シグナルをONにすると考えられる(中段)。ThCが結合しても、細胞内への取り込みがおこなないため、シグナルの強度は弱く、また長くつづく。TPOとThCには相乗効果があるため、TPOとThCは競合せずに別々の部位に結合すると考えられる(下段)。

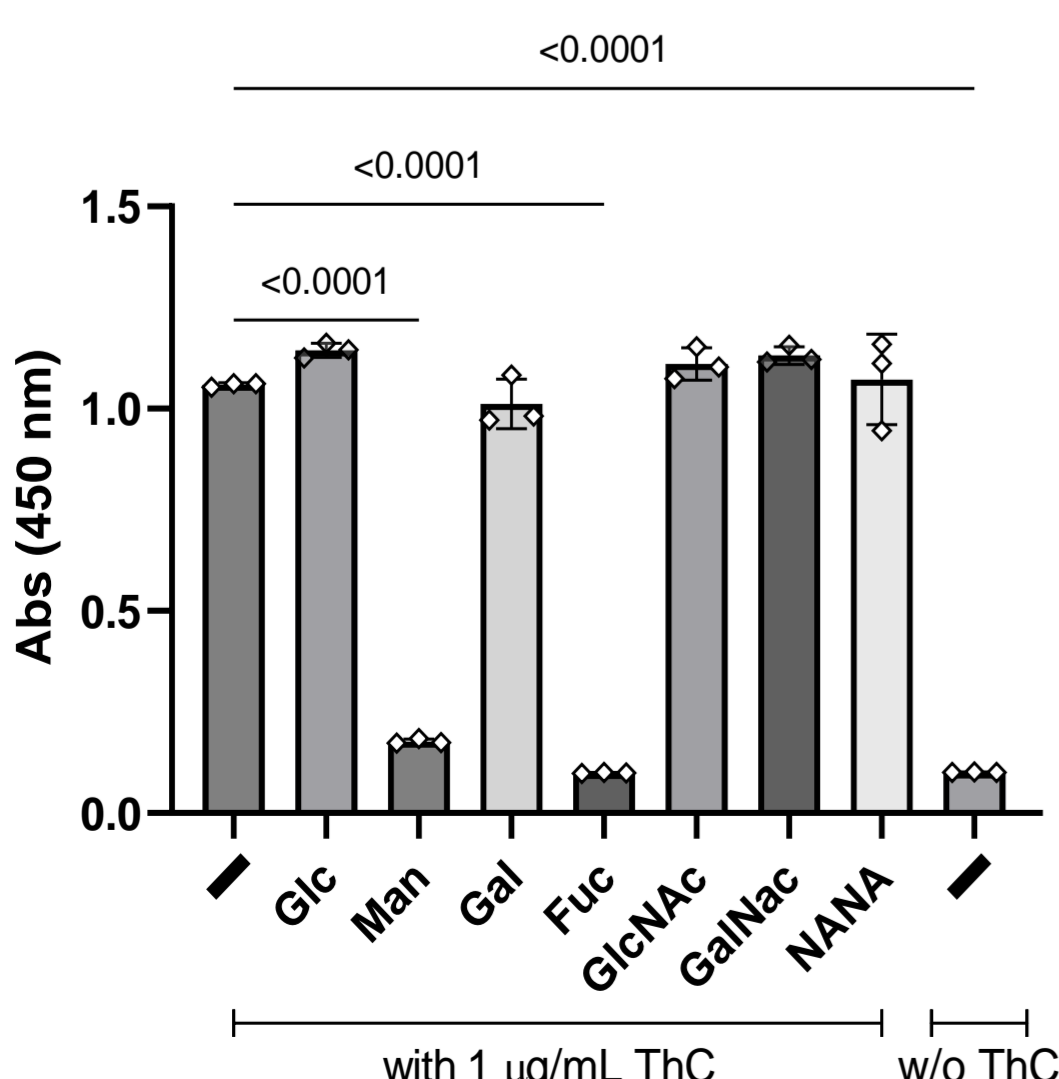


図5. 各糖がThCのTPO様活性に及ぼす影響
マンノースとフコースを添加した場合にのみ活性が阻害された

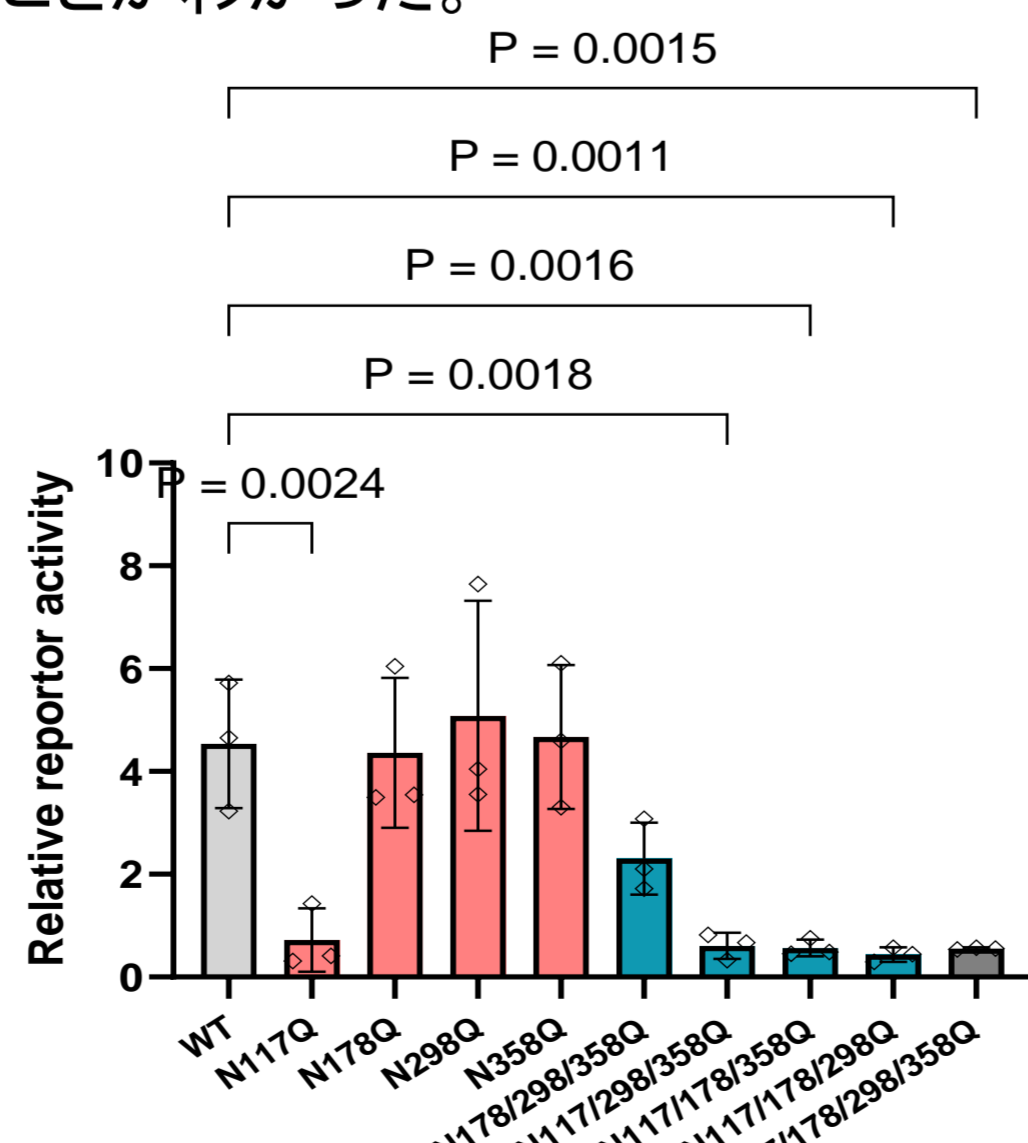


図6. MPLの糖鎖修飾部位の変異株に対するThCの活性の比較

ピンク:1残基変異体、緑:3残基変異体、灰色:4残基変異体