

特集：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解
—生理的準安定状態を捉える新技術と応用—

細胞膜上におけるトロンボポエチン受容体の一分子ダイナミクス

坂本明彦¹, 加藤尚志², 船津高志¹

トロンボポエチン (TPO) は、巨核球系列細胞の分化と血小板の産生を担うサイトカインである。TPO が細胞へシグナルを伝達する上で受容体 Mpl の二量体化が必要だが、その動的な過程は不明である。本研究では、Mpl 二量体化の動的な過程と制御機構を、一分子イメージングで解明することにした。全反射蛍光顕微鏡で細胞膜上の Mpl 分子を一分子レベルで観察した。Mpl 分子に対応する個々の輝点の蛍光強度を解析した結果、Mpl が単量体・二量体・多量体の平衡状態で存在することが分かった。また、リガンド TPO の結合や細胞のコレステロールに依存して Mpl 二量体の安定性が向上し、平衡が二量体・多量体側へ移動することが分かった。TPO の結合やコレステロールによる Mpl 二量体の安定化は、TPO シグナルに必須の Mpl リン酸化の制御に重要だと思われる。

はじめに

血小板は、前駆細胞である巨核球の細胞質が断片化することで作られる (図 1A)^{1,2)}。巨核球は造血幹細胞が複数の段階を経て分化した細胞である。トロンボポエチン (TPO) は、造血幹細胞から巨核球への分化を担う主要なサイトカインである^{3,4)}。

TPO の受容体 Mpl は一回膜貫通型受容体で、I 型サイトカイン受容体ファミリーに分類される。多くのサイトカイン受容体やホルモン受容体は、受容体型 Tyr キナーゼと違ってシグナル伝達に関わる酵素活性を持っていない⁵⁾。

そのため、細胞外のサイトカインやホルモンが受容体に結合しても、受容体自身は細胞へシグナルを伝達できない。

この特徴を補完するのが、非受容体型 Tyr キナーゼのヤヌスキナーゼ (JAK) である⁶⁾。JAK はサイトカイン受容体の細胞質領域に結合する (図 1B)。JAK は別の JAK 分子によってリン酸化されることでキナーゼ活性が増強する⁵⁾。すると、リン酸化された JAK はサイトカイン受容体の Tyr 残基をリン酸化する。シグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT) やさまざまなアダプタータンパク質は、サイトカイン受容体のリン酸化された Tyr 残基に結合する。すると、リン酸化された JAK は STAT やさまざまなアダプタータンパク質をリン酸化し、細胞へシグナルが伝達される。TPO も Mpl に結合した後このような分子機構で、巨核球系列細胞の増殖と分化を促進する⁷⁾。

JAK がリン酸化される過程では、足場のサイトカイン受容体が二量体を形成する必要がある。また、エリスロポエチン受容体の結晶構造解析により、サイトカイン受容体がりガンドの結合に伴い、JAK 分子同士の距離が縮まるような立体構造へ変化することが示唆された⁸⁾。そのため、サイトカイン受容体が細胞膜上でどのような化学量論で存在するかについて、二つのモデルが提唱されている。一つは、サイトカイン受容体が単量体として存在し、りガンドの結合に伴い二量体を形成するというモデルである⁹⁾。も

¹ 東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室)

² 早稲田大学教育・総合科学学術院 (〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2 早稲田大学先端生命医学センター) Single molecule dynamics of the thrombopoietin receptor on the plasma membrane

Akihiko Sakamoto¹, Takashi Kato² and Takashi Funatsu¹ (¹Laboratory of Bio-Analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; ²Faculty of Education and Integrated Arts and Sciences, Center for Advanced Biomedical Sciences, Waseda University, TWIns Bldg, 2-2 Wakamatsu, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan)

う一つは、サイトカイン受容体が二量体として存在し、リガンドの結合に伴い立体構造を変化させるというモデルである^{8,10-12)}。いずれのモデルも、蛍光標識した抗体間の蛍光共鳴エネルギー移動により提唱された。だが、サイトカ

イン受容体の化学量論が動的なものか静的なものかが不明なため、いずれのモデルが正しいのかは不明である。

そこで本研究では、Mpl分子のダイナミクスとその制御機構を、一分子イメージングで解明することにした。

1. Mpl分子の一分子観察

Mpl分子を全反射蛍光顕微鏡で観察するために、Mpl分子をACP-PPTase法で蛍光標識した(図2A)。ACP-PPTase法は、補酵素A由来のパンテテインがリン酸化パンテテイン転移酵素(PPTase)によりアシルキャリアタンパク質(ACP)のSer36に共有結合する反応を利用した標識法である¹³⁾。ACP-PPTase法により、ACPを融合したキメラタンパク質一分子に蛍光色素一分子を共有結合させることが可能である。まず、Mplの細胞膜外側にACPを融合したキメラタンパク質をFDC-P2細胞に発現させた。FDC-P2細胞はマウスの骨髓球から樹立した細胞株で¹⁴⁾、Mplを発現していない。だが、Mplを強制発現させるとTPO依存的に増殖するため、TPOシグナルの解析に汎用される細胞株である¹⁵⁾。ACP-PPTase法により、FDC-P2細胞に発現させたACP-Mplキメラタンパク質に蛍光色素を共有結合させた。なお、蛍光色素が結合した補酵素Aを過剰に用

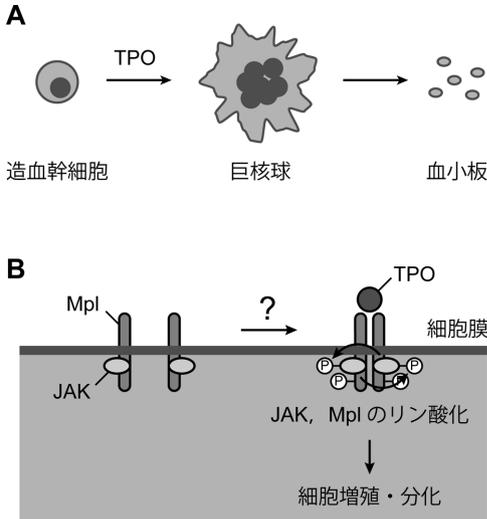


図1 TPOシグナルの概要
(A) 血小板産生の概要、(B) Mpl二量体とTPOシグナル。

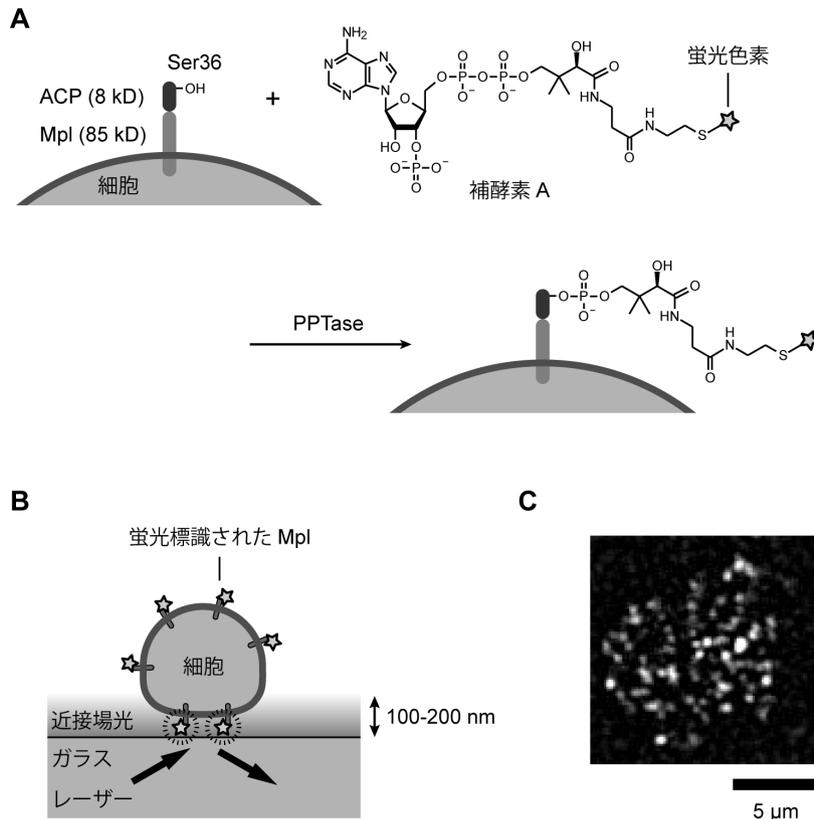


図2 全反射蛍光顕微鏡によるMpl分子の観察
(A) ACP-PPTase法によるMpl分子の蛍光標識、(B) 全反射蛍光顕微鏡によるMpl分子の観察、(C) Mpl分子の全反射蛍光顕微鏡像。個々の輝点がMpl分子に相当する。

いたので、ほとんどの Mpl 分子が蛍光標識されたと期待される。

次に、細胞を不飽和脂肪酸で修飾したガラス表面に接着させた¹⁶⁾。FDC-P2 細胞のような浮遊細胞を顕微鏡で観察する場合、脂質修飾したガラス表面に細胞を接着させるのが一般的である。今回用いた修飾剤は細胞への毒性がないとされる。また、後述する Mpl 分子の拡散運動解析により、Mpl 分子の拡散運動が修飾剤により影響を受けないことを確かめた。

全反射蛍光顕微鏡でガラス近傍側の細胞膜上に存在する Mpl 分子を観察した (図 2B)。全反射蛍光顕微鏡では、レーザーをガラス表面で全反射させたときに発生する近接場光で、蛍光分子を励起して観察する。近接場光の強度は、ガラス表面から遠くなるにつれ指数関数的に減衰する。実質的にガラス表面から 100–200 nm に存在する蛍光分子だけが近接場光で励起されるため、背景光を大幅に除

去でき、蛍光分子を一分子レベルで観察することができる。蛍光標識した Mpl 分子は直径 600–800 nm の輝点として検出され (図 2C)、個々の輝点は拡散運動をしていた。また、輝点同士が重なったり離れたりを繰り返す様子が観察された。

2. Mpl 分子は単量体・二量体・多量体の平衡状態で存在した

全反射蛍光顕微鏡で検出された輝点の蛍光強度から、各輝点が Mpl 何分子に相当するかを見積もった。まず、Mpl 一分子に相当する蛍光強度を定量した (図 3A)。蛍光分子を近接場光で励起し続けると、蛍光分子は瞬間的に退色し、それ以後蛍光を発しなくなる。全反射蛍光顕微鏡で検出されるこのような退色は、階段退色と呼ばれる。各蛍光分子は確率的に階段退色するため、ある瞬間に二分子が同時に階段退色する確率は十分小さい。そのため、階段退色

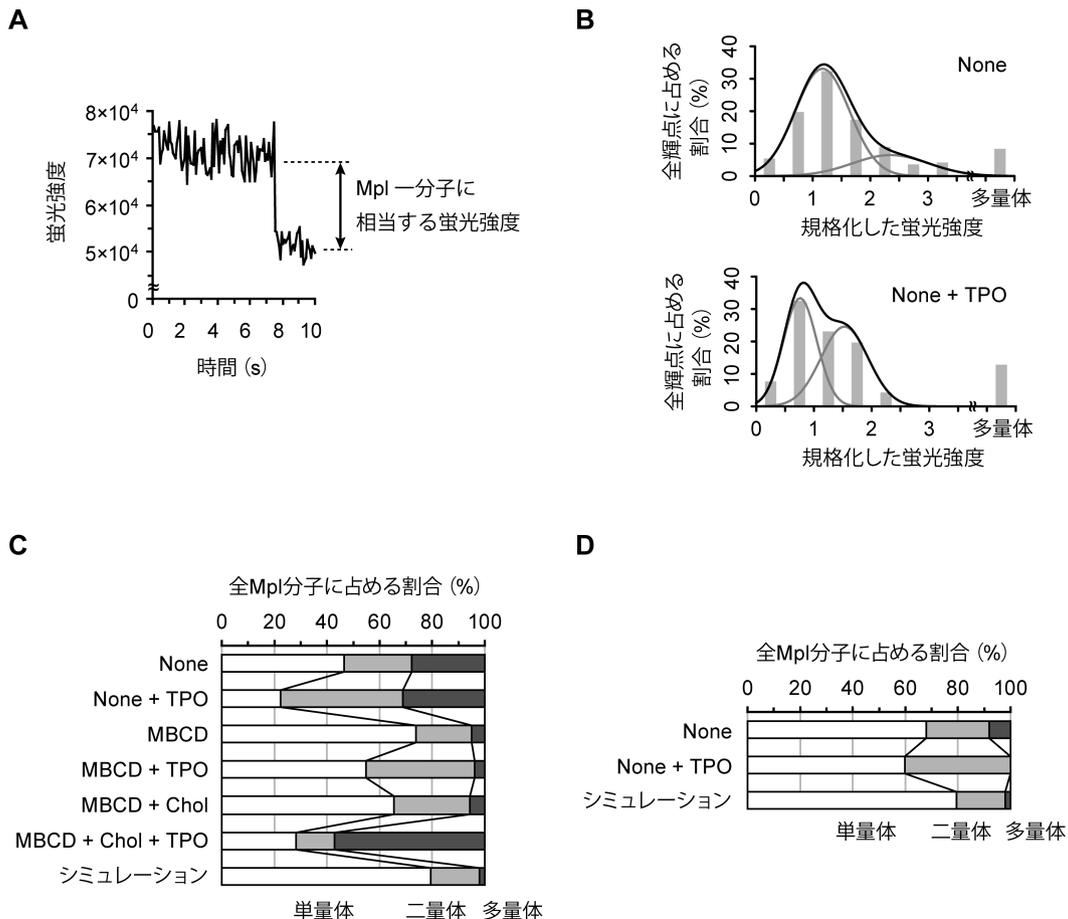


図 3 Mpl 単量体・二量体・多量体の存在比

(A) 階段退色から、Mpl 一分子に相当する蛍光強度を見積もった。(B) ある瞬間に全反射蛍光顕微鏡で検出された全輝点の蛍光強度のヒストグラム。二成分の正規分布の和で近似して、Mpl 単量体・二量体・多量体の存在比を見積もった。(C, D) ある瞬間の Mpl 単量体・二量体・多量体の存在比。Mpl は、ACP-PPTase 法 (C) または EGFP との融合 (D) で蛍光標識した。TPO, 10 ng/mL TPO, 25°C, 15 min; MBCD, 3 mM MBCD, 25°C, 10 min; MBCD+Chol, 3 mM MBCD+0.1 mM コレステロール, 25°C, 10 min; シミュレーション, Mpl 分子を無作為に配置する 500 回のシミュレーションの平均。

時の蛍光強度差から、蛍光分子一分子に相当する蛍光強度を見積もることができる。この方法で、Mpl 一分子に相当する蛍光強度を各細胞で見積もった。

次に、ある瞬間に検出された全輝点の蛍光強度のヒストグラムを作成した (図 3B)。なお、各輝点の蛍光強度は、Mpl 一分子に相当する蛍光強度で規格化した。得られたヒストグラム $f(x)$ を単量体・二量体二成分の正規分布の和で近似した。

$$f(x) = \frac{a_m}{\sqrt{2\pi}\sigma_m} \exp\left[-\frac{(x-\mu_m)^2}{2\sigma_m^2}\right] + \frac{a_d}{\sqrt{2\pi}\sigma_d} \exp\left[-\frac{(x-\mu_d)^2}{2\sigma_d^2}\right] \quad (1)$$

$$\mu_d = 2\mu_m \quad (2)$$

$$\sigma_d = \sqrt{2}\sigma_m \quad (3)$$

なお、 x は規格化した蛍光強度； μ_m 、 σ_m はそれぞれ単量体の蛍光強度の平均、標準偏差； μ_d 、 σ_d はそれぞれ二量体の蛍光強度の平均、標準偏差である。正規分布の性質から、二量体の蛍光強度分布の 95% は $\mu_d + 1.65\sigma_d$ 以下の蛍光強度を有する。そこで、 $\mu_d + 1.65\sigma_d$ 以上の蛍光強度を有する輝点を多量体とみなした。

リガンドの TPO 非存在下、Mpl 分子が単量体・二量体・多量体の平衡状態で存在することが分かった (図 3B, C)。全反射蛍光顕微鏡で検出される輝点の半径が実際の分解能だとされる¹⁷⁾。Mpl 由来の輝点の半径は 300–400 nm だったので、中心間距離が 300–400 nm 以下の二分子は、見かけ上二量体に見える。そこで、Mpl 分子と同じ分子密度で細胞膜上に複数の分子を無作為に配置したとき二量体・多量体を形成したように見える確率を、シミュレーションにより求めた (図 3C)。その結果、蛍光強度分布の解析から二量体・多量体と判断した Mpl 分子の割合は、Mpl 分子を無作為に配置したとき、見かけ上二量体・多量体と判断される Mpl 分子の割合より多いことが分かった。すなわち、Mpl 分子は Mpl 分子同士の相互作用によって二量体・多量体を形成することが示唆された。

一方、リガンドの TPO 存在下、Mpl 分子の化学量論平衡が二量体・多量体側へ移動した (図 3B, C)。TPO には構造的に Mpl 結合部位が二ヶ所存在することが分かっている¹⁸⁾。TPO 存在下では Mpl 分子同士が TPO を介して相互作用できるために、Mpl 分子の化学量論平衡が二量体・多量体側へ移動したと考えられる。

ここまでで得られた結果を、別法で蛍光標識した Mpl 分子を用いて再検討した。ACP-PPTase 法では、細胞に発現させた ACP-Mpl キメラタンパク質に後から蛍光色素を共有結合させるため、必ずしも全 ACP-Mpl キメラタンパク質が蛍光標識されるわけではない。この場合、Mpl 分子が実際より多く単量体として存在するように見える可能性がある。そこで、Mpl の細胞膜外側に緑色蛍光タンパク質

EGFP を融合したキメラタンパク質 EGFP-Mpl を FDC-P2 細胞に発現させた。ここで、EGFP は分子間相互作用が小さい A206K 変異体¹⁹⁾を用いた。全反射蛍光顕微鏡で検出される輝点の蛍光強度分布から、Mpl 分子の化学量論を解析した。リガンドの TPO 非存在下、EGFP-Mpl キメラタンパク質は単量体・二量体・多量体の平衡状態で存在した (図 3D)。だが、EGFP-Mpl 二量体・多量体の割合は、ACP-PPTase 法で蛍光標識した Mpl 二量体・多量体の割合よりも小さかった。また、TPO の存在に伴い EGFP-Mpl 分子の化学量論平衡が二量体・多量体側へ移動したが、その変化量も ACP-PPTase 法で蛍光標識した Mpl 分子で見られた変化量より小さかった。

EGFP-Mpl キメラタンパク質の方が ACP-PPTase 法で蛍光標識した Mpl 分子よりも、単量体の存在比が大きかった理由は二つ考えられる。一つは EGFP 分子の発光率である。細胞内に発現させた EGFP 分子の 67–80% しか実際に蛍光を発しないことが報告されている^{20–22)}。これは、立体構造形成や発光団形成が不完全な EGFP 分子が存在するからだとされる。もう一つは、EGFP の立体障害である。ACP の分子量は 8,000 だが、EGFP の分子量は 27,000 である。そのため、EGFP の立体障害で Mpl 分子同士の相互作用が抑制されたのかもしれない。リガンド TPO の存在に伴い Mpl 分子の化学量論平衡が二量体・多量体側へ移動したが、その変化量は ACP-PPTase 法で蛍光標識した Mpl 分子の方が EGFP-Mpl キメラタンパク質より大きかった。そこで以後は、ACP-PPTase 法で蛍光標識した Mpl 分子の化学量論平衡を解析した。

3. コレステロールは Mpl が二量体・多量体を形成するのに重要だった

Mpl 化学量論平衡の制御機構を考察するために二つの研究を参考にした。近年、Mpl の膜貫通領域が Mpl 分子同士の相互作用を制御することが報告された²³⁾。一回膜貫通型受容体 Mpl の膜貫通領域を一残基ずつ Cys に置換し、大腸菌に発現させた Mpl 変異体を酸化条件の電気泳動で分離し、Mpl 変異体分子間の S-S 結合の有無を解析した。その結果、TPO アゴニスト存在下と非存在下で Mpl 膜貫通領域の相互作用面が変化することが分かった。この結果は、Mpl 膜貫通領域同士の相互作用が Mpl の二量体化に重要であることを示唆する。

また、造血幹細胞の細胞周期の制御に必要な TPO シグナルがコレステロールに依存することが報告された²⁴⁾。一般に造血幹細胞は細胞周期の G0 期で停止し未分化能を維持しているが、TPO と幹細胞因子 (SCF) の刺激を受けると G0 期から脱して増殖する。ところが、メチル- β -シクロデキストリン (MBCD) により細胞からコレステロールを除去すると、TPO と SCF 存在下でも造血幹細胞は G0 期

から脱しなかった。この結果はコレステロールがTPOシグナルの制御に重要なことを示唆する。これら二つの研究から、コレステロールがMpl分子の化学量論平衡の制御に重要だという仮説を立てた。

Mpl分子の化学量論平衡について、コレステロールの有無による影響を検討した。MBCDにより細胞からコレステロールを除去すると、Mpl二量体・多量体の存在比が減少した(図3C)。一方、細胞にコレステロールを戻すと、Mpl二量体・多量体の存在比は回復した。

ここで興味深いのは、上皮増殖因子(EGF)受容体との違いである。EGF受容体はMpl同様、一回膜貫通型受容体だが、Mplと違ってそれ自身がキナーゼ活性を有する。EGF受容体とEGFPのキメラタンパク質をCHO細胞に発現させ、特定の微小領域を通過するキメラタンパク質由来の蛍光強度分布から、キメラタンパク質の化学量論を解析した報告がある²⁵⁾。EGF受容体も単量体・二量体・多量体の平衡状態で存在した。だが細胞からコレステロールを除去すると、EGF受容体の二量体・多量体の存在比が増加した。EGF受容体はそれ自身がキナーゼ活性を有するので、シグナルの誤信を防ぐ制御機構が必要なのに対し、Mplはそれ自身がキナーゼ活性を有さないため、シグナル伝達を容易にする制御機構が必要なかもしれない。

4. リガンドの結合とコレステロールはMpl二量体を安定にした

2.の最後で述べたとおり、Mpl分子は二量体を形成したまま安定に存在せず、結合・解離を繰り返した。そこで、Mpl二量体の分子寿命を計測した。なお、時間分解能は31msとした。Mpl分子が結合・解離を繰り返す場合、Mpl分子に相当する輝点の蛍光強度も増減を繰り返すはずである。また2.で測定したMpl一分子に相当する蛍光強度から、Mpl分子の化学量論の時間変化が分かる。そこで、いくつかの輝点の蛍光強度と対応するMpl分子の化学量論の時間変化をグラフにした(図4A)。解析した輝点の蛍光強度が減少する原因としては、Mpl二量体・多量体の解離だけでなく、蛍光色素の退色やMpl分子の内在化が考えられる。Mpl二量体・多量体が解離したときは、一個の輝点が複数個に分かれるが、蛍光色素が退色したりMpl分子が内在化したりした場合は、一個の輝点が消失するはずである。そこで、蛍光強度の時間変化のグラフと蛍光顕微鏡像のビデオを比較し、Mpl二量体・多量体の解離が原因で対応する輝点の蛍光強度が減少した場合だけを解析した。

リガンドやコレステロールの有無によるMpl二量体の分子寿命への影響を検討した。リガンドのTPO存在下では、Mpl二量体の分子寿命が増加した(図4B)。TPOには構造的にMpl結合部位が二ヶ所存在するので¹⁸⁾、この結果

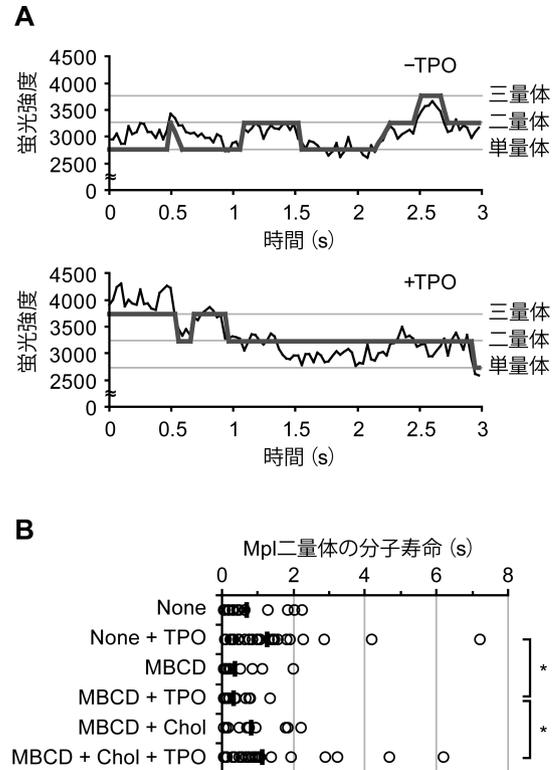


図4 Mpl二量体の寿命

(A) 全反射蛍光顕微鏡で検出された各輝点の蛍光強度の時間変化。(B) Mpl二量体の寿命。バーは平均。TPO, 10 ng/mL TPO, 25°C, 15 min; MBCD, 3 mM MBCD, 25°C, 10 min; MBCD + Chol, 3 mM MBCD + 0.1 mM コレステロール, 25°C, 10 min. *, $P < 0.05$ (Steel-Dwass法)。

は、Mpl二量体がTPOの結合を介して安定化したことを示唆する。

一方、MBCDにより細胞からコレステロールを除去すると、Mpl二量体の分子寿命が減少した(図4B)。また、細胞にコレステロールを戻すと、Mpl二量体の分子寿命が回復した。このことから、コレステロールがMpl二量体を安定にしていると考えられる。

だが、コレステロールがMpl二量体の安定性に寄与する分子機構はよく分からない。細胞膜上では、スフィンゴ糖脂質やコレステロールが脂質ラフトという数十nmのドメイン構造を形成すると考えられている^{26,27)}。脂質ラフトに局在するタンパク質は、低温で細胞をTriton X-100で溶解し、シヨ糖密度勾配の中で超遠心することで分離できる²⁶⁾。だが、Mplはリガンドの有無に関係なく、脂質ラフト画分にほとんど検出されなかった(図5)。また、全反射蛍光顕微鏡で観察した結果、Mplは脂質ラフトマーカーの糖脂質GM1とほとんど共局在しなかった(データ非掲載)。これらの結果から、Mplが脂質ラフト上で安定な二量体を形成するとは考えにくい。3.で述べたとおり、Mplの膜貫通領域は α ヘリックスで、その向きがMpl分子同士の相互作用を制御している²³⁾。そのため、細胞膜を

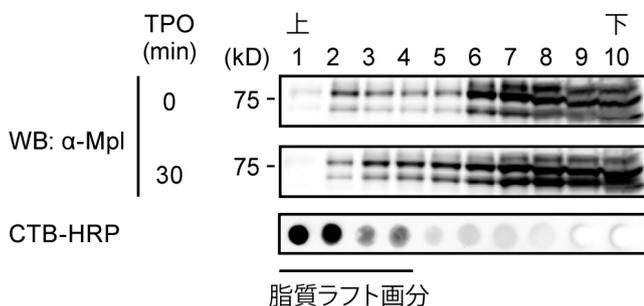


図5 Mplの脂質ラフト親和性

Mplを発現させたFDC-P2細胞を1% Triton X-100で溶解し、スクロースのシヨ糖密度勾配(5%:35%:40%=1:5:4)で分離した。上・中パネル、Mplのウェスタンブロット。3本のバンドはすべてMpl由来である。TPO, 5 ng/mL TPO, 4°C。下パネル、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したコレラ毒素(CTB-HRP)のドットブロット。CTB-HRPは脂質ラフト画分マーカーである。

構成するコレステロールなどの脂質の組成がMplの膜貫通領域の向きを制御しているのではないかと考えている。

5. Mpl分子の化学量論平衡の移動速度はリガンドの結合やコレステロールと無関係だった

次に、Mpl分子の拡散運動に着目した。細胞膜はアクチンを基本とした細胞骨格(膜骨格)により区画化されている²⁸⁾。膜貫通タンパク質は、細胞質領域が膜骨格に衝突するため、ひとつの膜骨格内でしか拡散しない(図6A)。だが、膜骨格と細胞膜との距離は熱揺らぎにより変化する。そのため、膜骨格が細胞膜から十分離れた瞬間、膜貫通タンパク質は隣接する膜骨格へホップできる。このような拡散は、京都大学の楠見明弘教授らにより発見され、ホップ拡散と名付けられた²⁷⁾。

2. で述べたとおり、リガンドTPOの存在に伴いMpl二量体、多量体の存在比が増加した(図3C)。この過程をホップ拡散のモデルでシミュレーションした。まずMpl二量体の分子寿命から、Mpl二量体が次の瞬間(31 ms後)も二量体である確率 P_{oligo} を見積もった。次にMpl分子が隣接する膜骨格へホップする確率 P_{hop} を任意に入力し、Mpl二量体・多量体の存在比の時間変化をシミュレーションした(図6B)。ただし、Mpl分子同士が蛍光顕微鏡の分解能300-400 nmよりも接近した場合を二量体・多量体化したとみなした。十分時間が経過した後のMpl二量体・多量体の存在比は P_{hop} に依存しなかった。一方、Mpl分子の化学量論平衡の移動は P_{hop} が大きいほど速かった。すなわち、リガンドTPOの存在に伴いMpl二量体、多量体の存在比が増加する速さがMpl分子のホップ拡散に依存することが分かった。

そこで、Mpl単量体のホップ拡散を一分子追跡法で解析した。Mpl単量体に相当する輝点の重心を追跡し(図6C)、

ある時間 Δt に対する平均二乗変位(MSD)を Δt に対してプロットした。

$$\text{MSD}(\Delta t) = \overline{(\Delta x(\Delta t))^2 + (\Delta y(\Delta t))^2} \quad (4)$$

隣接する膜骨格へホップするより短い時間では、Mpl分子は膜骨格内でのみ拡散する(図6D)。そこで、各Mpl単量体について得られたMSD- Δt プロット($\Delta t < 310$ ms)を以下のモデルで近似することで、Mpl単量体の拡散係数 D_{micro} と膜骨格の大きさ L を見積もった(図6E-G)²⁹⁾。

$$\text{MSD}(\Delta t) = \frac{L^2}{3} \left[1 - \exp\left(-\frac{12D_{\text{micro}}\Delta t}{L^2}\right) \right] \quad (5)$$

Mpl単量体の拡散係数 D_{micro} 、膜骨格の大きさ L のいずれも、リガンドTPOやコレステロールの有無によらず不変だった(図6F, G)。短い時間でのMpl単量体の拡散運動は、細胞膜流動に起因する。そのため、リガンドTPOやコレステロールの有無は、細胞膜流動や膜骨格に影響を与えないことが分かった。また、Mpl単量体の拡散係数 D_{micro} は他の膜タンパク質の拡散係数と同等だった^{30,31)}。膜骨格の大きさ L も、他の膜タンパク質の拡散運動から見積もった値^{29,31)}や電子顕微鏡での測定値²⁸⁾と同等だった。そのため、FDC-P2細胞を、脂質修飾したガラス表面に接着させた影響はほとんどないと考えられる。

一方、隣接する膜骨格へホップするより十分長い時間では、膜骨格内での拡散はほとんど無視でき、Mpl分子は膜骨格間を自由拡散するように見える(図6H)。そこで、複数のMpl単量体について得られたMSD- Δt プロット($310 \text{ ms} < \Delta t < 1.5 \text{ s}$)を平均化して以下のモデルで近似することで、Mpl単量体の拡散係数 D_{macro} とホップ頻度 $1/\tau$ を見積もった(図6I, J)³¹⁾。

$$\text{MSD}(\Delta t) = \text{MSD}(0) + 4D_{\text{macro}}\Delta t \quad (6)$$

$$L^2 = 4D_{\text{macro}}\tau \quad (7)$$

Mpl単量体のホップ頻度 $1/\tau$ は、リガンドTPOやコレステロールの有無によらず不変だった(図6J)。この節の前半でシミュレーションしたとおり、Mpl分子の化学量論平衡の移動速度はMpl分子のホップ頻度に依存した(図6B)。そのため、リガンドTPOやコレステロールはMpl分子の化学量論平衡を制御するが、その移動速度は制御しないと考えられる。

6. TPO結合やコレステロールによるMpl二量体の安定化はMplのリン酸化に重要だった

ここまでで、Mpl分子がリガンドTPOやコレステロールにより二量体・多量体化しやすくなっていて、その原因がMpl二量体の安定性向上だと分かった。最後に、Mpl二量体の安定性とTPO結合に伴うMplのリン酸化の関係を検討した。TPO結合に伴うMplのリン酸化をコレステロールの有無で比較した。コレステロールの除去により、TPO結合に伴うMplのリン酸化が阻害された(図7)。

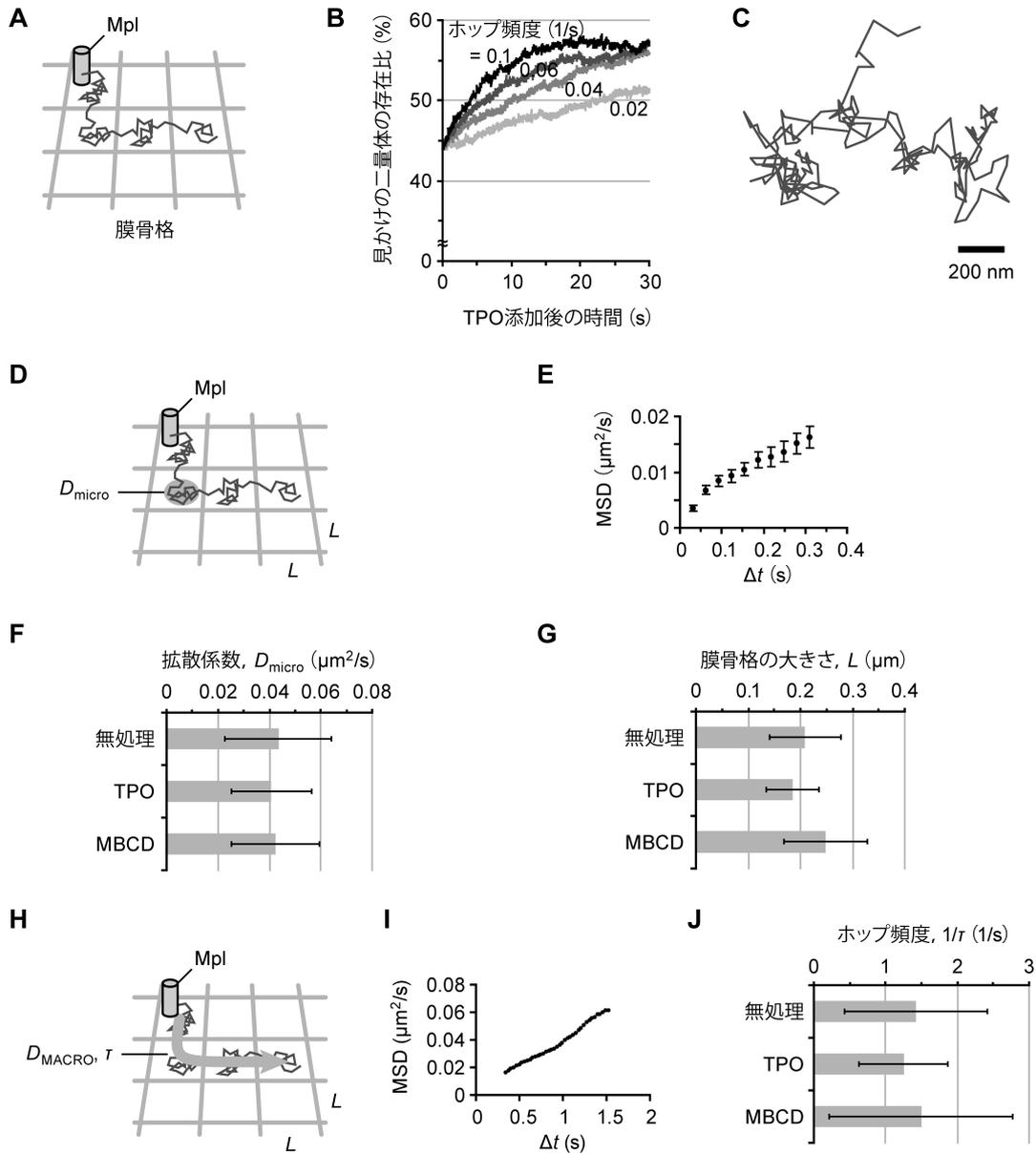


図6 Mpl分子のホップ拡散

(A) ホップ拡散のモデル。(B) TPO添加に伴うMpl化学量論平衡移動のシミュレーション。(C) Mpl分子の軌跡の代表例(〜7 s, 31 ms 間隔)。(D) 短い時間スケールでのMpl分子の拡散運動。(E) 短い時間スケールでのMpl分子のMSD- Δt プロット。平均±標準誤差。(F) 短い時間スケールでのMpl分子の拡散係数。平均±標準偏差。(G) Mpl分子の拡散運動から見積もった膜骨格の大きさ。平均±標準偏差。(H) 長い時間スケールでのMpl分子の拡散運動。(I) 長い時間スケールでのMpl分子のMSD- Δt プロット。(J) Mpl単量体のホップ頻度。平均±標準偏差。TPO, 10 ng/mL TPO, 25°C, 15 min; MBCD, 3 mM MBCD, 25°C, 10 min.

4. で述べたとおり, コレステロールの除去により, Mpl二量体の安定性が低下した(図4B)。そのため, Mpl二量体の安定性がTPO結合に伴うMplのリン酸化を制御するかもしれない。Mpl二量体の細胞質側に結合したJAKは, 別のJAK分子をリン酸化する⁵⁾。リン酸化されたJAKは, キナーゼ活性が増強するので, MplのTyr残基をリン酸化できるようになる。TPO結合やコレステロールによるMpl二量体の安定化は, このようなMplリン酸化の制

御に重要だと思われる。

JAKがサイトカイン受容体に結合したままか, 結合・解離を繰り返すかは不明である。他の受容体では, シグナル伝達タンパク質が受容体に結合・解離する様子が観察されている^{32,33)}。その場合, シグナル伝達タンパク質が受容体に結合している時間がシグナル伝達の制御に重要である。本研究では, Mpl二量体の安定性がシグナル伝達に重要なことが分かった。今後は, JAKとMplの結合時間を

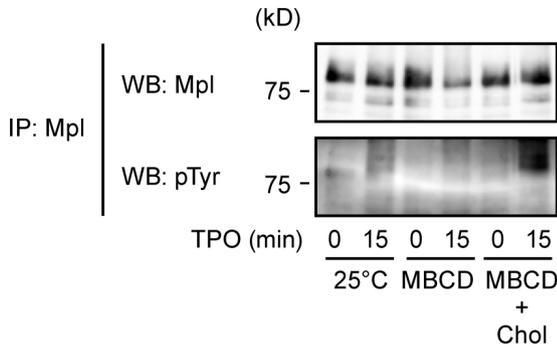


図7 コレステロールのMplリン酸化への影響
 TPO, 10 ng/mL TPO, 25°C; MBCD, 10 mM MBCD, 25°C, 30 min; MBCD+Chol, 10 mM MBCD+1 mM コレステロール, 25°C, 30 min.

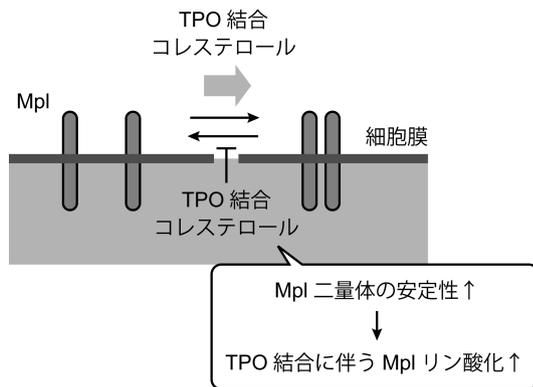


図8 Mpl 二量体の安定化のモデル

調べ、シグナル伝達への影響を明らかにしたい。

おわりに

Mpl は単量体・二量体・多量体の平衡状態で存在した (図8)。また、リガンドの結合やコレステロールに依存して Mpl 二量体の安定性が向上し、平衡が二量体・多量体側へ移動することが分かった。リガンドの結合やコレステロールによる Mpl 二量体の安定化は、Mpl のリン酸化の制御に重要だと思われる。

最後に、本研究で使用した FDC-P2 細胞を分与いただいた協和発酵キリン株式会社の宮崎洋博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Kaushansky, K. (2009) *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, 147-152.
- 2) Kaushansky, K. (2008) *Blood*, 111, 981-986.
- 3) Kato, T., Matsumoto, A., Ogami, K., Tahara, T., Morita, H., & Miyazaki, H. (1998) *Stem Cells*, 16, 322-328.
- 4) 加藤尚志 (1997) *生化学*, 69, 433-438.
- 5) Hibi, M. & Hirano, T. (1998) *Int. Rev. Immunol.*, 17, 75-102.

- 6) Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V.E., 3rd, Silvennoinen, O., & O'Shea, J.J. (2004) *Genome Biol.*, 5, 253.
- 7) Kaushansky, K. (2005) *J. Clin. Invest.*, 115, 3339-3347.
- 8) Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., & Wilson, I.A. (1999) *Science*, 283, 987-990.
- 9) Broudy, V.C., Lin, N.L., Buhning, H.J., Komatsu, N., & Kavanagh, T.J. (1998) *Blood*, 91, 898-906.
- 10) Constantinescu, S.N., Keren, T., Socolovsky, M., Nam, H., Henis, Y.I., & Lodish, H.F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 4379-4384.
- 11) Kaushansky, K. (2006) *N. Engl. J. Med.*, 354, 2034-2045.
- 12) Brooks, A.J. & Waters, M.J. (2010) *Nat. Rev. Endocrinol.*, 6, 515-525.
- 13) George, N., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, N., & Johnsson, K. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 8896-8897.
- 14) Dexter, T.M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E., & Metcalf, D. (1980) *J. Exp. Med.*, 152, 1036-1047.
- 15) Morita, H., Tahara, T., Matsumoto, A., Kato, T., Miyazaki, H., & Ohashi, H. (1996) *FEBS Lett.*, 395, 228-234.
- 16) Kato, K., Umezawa, K., Funeriu, D.P., Miyake, M., Miyake, J., & Nagamune, T. (2003) *BioTechniques*, 35, 1014-1018, 1020-1021.
- 17) Toomre, D. & Bewersdorf, J. (2010) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 26, 285-314.
- 18) Feese, M.D., Tamada, T., Kato, Y., Maeda, Y., Hirose, M., Matsukura, Y., Shigematsu, H., Muto, T., Matsumoto, A., Watarai, H., Ogami, K., Tahara, T., Kato, T., Miyazaki, H., & Kuroki, R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 1816-1821.
- 19) Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., & Tsien, R.Y. (2002) *Science*, 296, 913-916.
- 20) Sugiyama, Y., Kawabata, I., Sobue, K., & Okabe, S. (2005) *Nat. Methods*, 2, 677-684.
- 21) Ulbrich, M.H. & Isacoff, E.Y. (2007) *Nat. Methods*, 4, 319-321.
- 22) Kasai, R.S., Suzuki, K.G., Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T.K., & Kusumi, A. (2011) *J. Cell Biol.*, 192, 463-480.
- 23) Matthews, E.E., Thevenin, D., Rogers, J.M., Gotow, L., Lira, P.D., Reiter, L.A., Brissette, W.H., & Engelman, D.M. (2011) *FASEB J.*, 25, 2234-2244.
- 24) Yamazaki, S., Iwama, A., Morita, Y., Eto, K., Ema, H., & Nakauchi, H. (2007) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1106, 54-63.
- 25) Saffarian, S., Li, Y., Elson, E.L., & Pike, L.J. (2007) *Biophys. J.*, 93, 1021-1031.
- 26) Simons, K. & Ikonen, E. (1997) *Nature*, 387, 569-572.
- 27) Kusumi, A., Shirai, Y.M., Koyama-Honda, I., Suzuki, K.G., & Fujiwara, T.K. (2010) *FEBS Lett.*, 584, 1814-1823.
- 28) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., & Kusumi, A. (2006) *J. Cell Biol.*, 174, 851-862.
- 29) Kusumi, A., Sako, Y., & Yamamoto, M. (1993) *Biophys. J.*, 65, 2021-2040.
- 30) Iino, R., Koyama, I., & Kusumi, A. (2001) *Biophys. J.*, 80, 2667-2677.
- 31) Sako, Y. & Kusumi, A. (1994) *J. Cell Biol.*, 125, 1251-1264.
- 32) Suzuki, K.G., Fujiwara, T.K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., & Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.*, 177, 717-730.
- 33) Suzuki, K.G., Fujiwara, T.K., Edidin, M., & Kusumi, A. (2007) *J. Cell Biol.*, 177, 731-742.