Osaka University Knowledge Archive

Title	The role of the carboxyl-terminal 6 amino acid extension of human TSH β subunit
Author(s)	高田, 憲一
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37994
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【12】

氏　　名	高　田　憲　一（たかだ　けんいち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学位記番号	第　10150　号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科　生理系専攻
学位論文名	**The role of the carboxyl-terminal 6 amino acid extension of human TSHβ subunit** **（ヒト甲状腺刺激ホルモンβ鎖C末端に存在する6アミノ酸の役割）**
論文審査委員	（主査） 教　授　松原　謙一 （副査） 教　授　宮井　　潔　　教　授　大河内寿一

論文内容の要旨

（目　　的）

甲状腺刺激ホルモン（TSH）は，CG，LHおよびFSHを含む糖蛋白ホルモンの一員である。これらのホルモンは共通のα鎖と，それぞれの機能に応じて異なるβ鎖のヘテロダイマーより構成される。ヒトTSHβ鎖遺伝子のcDNAシークエンスが決定されて，ヒト下垂体より単離されたhuman TSH（hTSH）は，C末端の6アミノ酸が翻訳後プロセシングを受けていることが分かった。本研究はこのC末端に存在する疎水性の余分のアミノ酸の，TSHの生合成過程や，その生理活性への役割を検討することを目的とした。

（方法ならびに成績）

I　CHO細胞でのhTSHの発現

1．発現プラスミドの構築：hTSHαの発現プラスミド（pSV 2－dhfr－α）は，SV 40初期プロモーターとアデニル化部位の間に糖蛋白ホルモンに共通のα鎖cDNAを挿入し，選択マーカーのmouse-dhfrを含むよう作製した。β鎖の発現プラスミド（pSV－TSH－β）は，発現ベクター（pSV）に，正常なTSHβのcDNA（pTβc750）を挿入し構築した。同様にして，C末端の6アミノ酸相当の18 bpを欠くTSHβ cDNA（pTβc801）を挿入したpSV－TSH－αβを構築した。

2．CHO細胞の形質転換とメトトレキセート（MTX）選択：hTSH遺伝子は，dhfr-deficient CHO細胞（DXB 11株）にpSV 2-dhfr-αと共に，pSV－TSH－βまたはpSV－TSH－dβを用いリン酸カルシウム法で導入した。安定形質転換細胞は，MTX濃度を段階的に上げて選択を行った。hTSHβ cDNA probeを用いたサザンハイブリダイゼーションで遺伝子増幅の確認を行った。その結

果，RIA による TSH 測定で，pSV－TSH－β使用の方では，培養液中への TSH 分泌217 μU／ml の CP 43 D 20株を得た。また，pSV－TSH－dβ使用の方では180 μU／ml の CP 70A 20株を得た。これらのクローンでは，約100倍の TSHβの DNA 増幅が認められた。

II　CHO 細胞 CP 43 D 20の産生する hTSH のβ鎖 C 末端アミノ酸シークエンス

1．細胞の代謝性標識：CP 43 D 20細胞を24h 培養後，PBS で 2 度洗い，Val, Ser, Phe, Gly, Leu, Tyr および Lys のそれぞれについて，2％ FCS を含む minimal essential medium 中で 1 h の starvation をかけた後，100 μCi の［^{3}H］アミノ酸を加えて72-96h標識し培養液を回収した。培養液より抗 TSHβモノクローナル抗体を用いて，ラベルした hTSH を免疫沈降し，15％ SDS－PAGE 上で size fractionation を行い末端アミノ酸の解析に用いた。

2．hTSHβ鎖の C 末端のアミノ酸残基解析：［^{3}H］アミノ酸で標識した17.5 kd の精製 TSH βポリペプチドはカルボキシペプチダーゼ A（CPA）で水解した。CPA はエクソペプチダーゼであり，TSH β鎖に対しては C 末端の138番目の Val から131番目の Ser まで水解するはずである。水解によって遊離したカウントを CPA 消化に用いた総カウントから予想される遊離カウントと比較して計算された各アミノ酸残基の切り出し率は，138番目の Val で39％，137番目の Ser は49％，136 番目の Phe は52％，そして132番目の Tyr は100％であった。よって CP 43 D 20細胞の産生する TSH βポリペプチドは，C 末端がすべて保存されているものから 6 個のアミノ酸が欠けているものまで 7 種のヘテロな C 末端を有していることが判明した。ヒト下垂体 TSH β鎖のアミノ酸シークエンス決定のもととなった実験を検討したところ，C 末端がヘテロな混合物の場合マイナーなポリペプチドのアミノ酸残基まで検出するには不十分であることが分かった。したがってヒト下垂体細胞の TSH のβ鎖 C 末端も特異的な蛋白分解酵素によりプロセシングされた単一体と考えるより CHO 細胞と同様にヘテロな混合体である可能性が示唆された。

III　ラット甲状腺細胞株 FRTL－5 を用いた TSH バイオアッセイ

TSH 依存性の c AMP レベルを測定して，natural hTSH，CP 43 D 20及び CP 70 A 20の産生する hTSH の生理活性を比較検討した結果，CP 43 D 20及び CP 70 A 20の産生する hTSH は authentic な下垂体の hTSH と同等の生理活性を有することが分かった。

IV　エンドグリコシダーゼ F（EndoF）処理

CP 43 D 20および CP 70 A 20より得られた免疫沈降サンプル（2000cpm）の糖鎖を2.4 U の EndoF で切断した結果，共に14.5 kd αと13.5kd βを生じた。即ち C 末端の 6 アミノ残基の有無によらず，同様の糖鎖の付加が行われていることが示唆された。

（総　　括）

1．CHO 細胞による hTSH の発現系を確立した。TSH 活性は，FRTL－5 バイオアッセイ系にて確認した。発現した hTSH は，抗 TSH β鎖抗体でα，β両鎖が共沈したのでヘテロダイマーを形成しており，15％ SDS－PAGE による分子量はα鎖24 kd，β鎖17.5 kdであった。これらは EndoF による糖鎖の切断により14.5 kd，13.5 kd となった。培養液中に分泌された TSH を解析し，β鎖の C 末端は，最も末端の Val まですべて保存されているものからアミノ酸が 1 個ずつプロセシングされて 7 番目

のTyrで終わっているものまで7種のヘテロなものからなることが分かった。

2．同様にしてα cDNAとC末端6アミノ酸のコドンを欠失させたβ cDNAを共発現させ，分子量24kd，17.5kdのα，β鎖のヘテロダイマーを得た。FRTL－5バイオアッセイ系で，下垂体より単離されたhTSHと同等の活性が認められた。その結果hTSHβ鎖のC末端6アミノ酸は，生合成過程でのα鎖との結合，糖鎖の付加および分泌を含むhTSHの成熟および生理活性に必ずしも必要のないことが分かった。β鎖のC末端の6個のアミノ酸がプロセシングされていると思われてきたヒト下垂体細胞の活性TSHは，CHO細胞と同様にヘテロなC末端を有している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖タンパクホルモンの一員である甲状腺刺激ホルモンはαβヘテロダイマーを構成し，その特異性をβ鎖によって与えられている。しかし，β鎖のC末端6アミノ酸の翻訳後プロセシングがTSH活性発現にどのような役割を有しているか解決されていなかった。本研究は，遺伝子組換えを用いてCHO細胞でヒトTSHを発現させ，αβヘテロダイマーを構成するβ鎖のC末端の役割及び構造の解明に迫った。その結果，従来の方法では解明できなかったβ鎖のC末端が，末端のValまですべて保存されているものから，アミノ酸が1個ずつプロセシングされて7番目のTyrで終わっているものまで7種のヘテロなものからなることが判明した。同時に，β鎖C末端6アミノ酸相当の18bpを削除した遺伝子組換えcDNA由来のTSHの発現実験を行い，このヘテロなTSHが，C末端の6アミノ酸が除かれ132番目のTyrで終わるβ鎖から構成されるTSHとも，下垂体由来のTSHとも，同等の生理活性を有することを証明した。

本研究によりヒト下垂体細胞のTSHβ鎖のC末端が7種のヘテロな混合体で，しかも同等の生理活性を有する可能性が初めて示された。これらの研究成果は意義深いものであり，学位に値するものである。