



Title	The role of the carboxyl-terminal 6 amino acid extension of human TSH $\beta$ subunit
Author(s)	高田, 憲一
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37994">https://hdl.handle.net/11094/37994</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	高 田 憲 一
博 士 の 専 攻	博 士 ( 医 学 )
分 野 の 名 称	
学 位 記 番 号	第 1 0 1 5 0 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 TSH $\beta$ subunit (ヒト甲状腺刺激ホルモン $\beta$ 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 $\alpha$ 鎖と、それぞれの機能に応じて異なる $\beta$ 鎖のヘテロダイマーにより構成される。ヒト TSH $\beta$ 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： hTSH $\alpha$  の発現プラスミド (p SV 2 - dhfr -  $\alpha$ ) 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 $\alpha$ 鎖 cDNA を挿入し、選択マーカーの mouse-dhfr を含むよう作製した。 $\beta$ 鎖の発現プラスミド (p SV-TSH- $\beta$ ) は、発現ベクター (p SV) に、正常な TSH $\beta$  の cDNA (p T $\beta$ c750) 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 TSH $\beta$  cDNA (p T $\beta$ c801) を挿入した p SV-TSH- $\alpha$   $\beta$  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 p SV 2 - dhfr -  $\alpha$  と共に、p SV-TSH- $\beta$  または p SV-TSH-d $\beta$  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。hTSH $\beta$  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- $\beta$ 使用の方では、培養液中へのTSH分泌217  $\mu\text{U}/\text{ml}$ のCP 43 D 20株を得た。また、pSV-TSH-d  $\beta$ 使用の方では180  $\mu\text{U}/\text{ml}$ のCP 70A 20株を得た。これらのクローンでは、約100倍のTSH  $\beta$ のDNA増幅が認められた。

## II CHO細胞CP 43 D 20の產生する hTSHの $\beta$ 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1hのstarvationをかけた後、100  $\mu\text{Ci}$  の [ $^3\text{H}$ ] 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TSH  $\beta$ 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. hTSH  $\beta$ 鎖のC末端のアミノ酸残基解析: [ $^3\text{H}$ ] アミノ酸で標識した17.5 kdの精製TSH  $\beta$ 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  $\beta$ 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細胞の產生するTSH  $\beta$ 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  $\beta$ 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 $\beta$ 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單一体と考えるより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の產生する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の產生する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 エンドグリコンダーゼ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  $\alpha$ と13.5 kd  $\beta$ 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  $\beta$ 鎖抗体で $\alpha$ 、 $\beta$ 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 $\alpha$ 鎖24 kd、 $\beta$ 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、 $\beta$ 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 $\alpha$  cDNAとC末端6アミノ酸のコドンを欠失させた $\beta$  cDNAを共発現させ、分子量24kd, 17.5kdの $\alpha$ ,  $\beta$ 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hTSH $\beta$ 鎖のC末端6アミノ酸は、生合成過程での $\alpha$ 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。 $\beta$ 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 $\alpha\beta$ ヘテロダイマーを構成し、その特異性を $\beta$ 鎖によって与えられている。しかし、 $\beta$ 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、 $\alpha\beta$ ヘテロダイマーを構成する $\beta$ 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 $\beta$ 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、 $\beta$ 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 $\beta$ 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TSH $\beta$ 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。