



Title	Loss of biological activity of human chorionic gonadotropin (hCG) by the amino acid substitution on "CMGCC" region of α subunit
Author(s)	菊地, 知之
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39381
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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	菊 地 知 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 4 4 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 5 月 1 9 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Loss of biological activity of human chorionic gonadotropin (hCG) by the amino acid substitution on "CMGCC" region of α subunit (ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) α サブユニットの "CMGCC" 領域におけるアミノ酸変異が hCG の生物活性に及ぼす影響)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 網野 信行 教 授 中村 敏一

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

ヒト糖タンパクホルモンhCG, hLH, hFSH 及び hTSH はいずれも α 鎖と β 鎖の共有結合による二量体構造とする。 β 鎖は各ホルモンによりアミノ酸配列が異なり生物学的活性の特異性を示すが、 α 鎖は4種のホルモンの共通の構造をとる。 β 鎖には $\text{Cys}^{34} - \text{Ala}^{35} - \text{Gly}^{36} - \text{Tyr}^{37} - \text{Cys}^{38}$ からなる "CAGYC" 配列があり、 Gly^{36} のアミノ酸変異はホルモン活性を消失させ、先天性 TSH 欠損症の原因となることが知られている。一方 α 鎖には β 鎖の "CAGYC" に対応した $\text{Cys}^{28} - \text{Met}^{29} - \text{Gly}^{30} - \text{Cys}^{31} - \text{Cys}^{32}$ からなる "CMGCC" 配列が存在する。本研究では hCG α cDNA 中の "CMGCC" 領域に注目し、site directed mutagenesis を用いて選択的に突然変異を導入し、いまだ未検討のこの部位のアミノ酸変異が hCG の二量体形成及び生物活性にどのような変化を与えるかを解析した。

【方法ならびに成績】

1) 変異 hCG α cDNA および変異 hCG α mRNA の作成

hCG α cDNA および hCG β cDNA は Dr. Fiddes により供与を受けた。ブルースクリプトベクター中にサブクローニングされた hCG α cDNA と1種類の5' オリゴヌクレオチドプライマー及び5種類の1塩基を置換させた3' オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR法にて hCG α cDNA 中に "CMGCC" 領域に5種類のアミノ酸変異 ($\text{Cys}^{28} \rightarrow \text{Tyr}^{28}$, $\text{Met}^{29} \rightarrow \text{Arg}^{29}$, $-\text{Gly}^{30} \rightarrow \text{Arg}^{30}$, Ala^{30} , Asp^{30}) を導入した。変異 hCG α cDNA はダイデオキシ法によるシーケンスにより、点突然変異が正しく導入されていることを確認した。次に変異 hCG α cDNA は T₃RNA ポリメラーゼを用いて試験管内転写を行い、変異 hCG α mRNA を合成した。同様にブルースクリプトベクター中にサブクローニングされた hCG β cDNA から hCG β mRNA を合成した。

2) 変異 hCG の合成および測定

合成された変異 hCG α mRNA および hCG β mRNA はタンパクへの翻訳のためアフリカツメガエル卵母細胞中に微量注入し、その後卵母細胞を培養液中で19℃で3日間培養した。培養液中に分泌された hCG は、hCG β 鎖中の carboxyl terminal peptide (CTP) に対するモノクローナル抗体と horseradish peroxidase (HRP) でラ

ベルされた hCG に対するポリクローナル抗体とを用いたサンドイッチ法によるエンザイムイムノアッセイにて測定した。その結果、すべての培養液中に hCG の存在を認め、これらのアミノ酸変異は hCG の産生に影響を与えなかった。

3) テストステロンの産生からみた変異 hCG の生物活性の測定

これら変異 hCG がホルモン活性を有するかを確認するためにマウスの Leydig 細胞を用いた bioassay を行った。変異 hCG とマウスの Leydig 細胞は培養液中で 34℃ で 3 時間培養し、ラジオイムノアッセイにて培養液中のテストステロンを測定した。その結果、Met²⁹ が Arg²⁹ に変異した hCG の添加においてのみテストステロンの産生を認め、その他の変異 hCG の添加ではテストステロンの産生は認めなかった。また Chou - Fasman および Robson モデルにおいて、hCG α の立体構造を解析すると“CMGCC”領域に extended β -sheet から β turn 構造への変化を認め、立体構造からも“CMGCC”領域はホルモン活性に重要な部位であることを明らかにした。

【総括】

1. hCG α 鎖に存在する Cys²⁸, Met²⁹, Gly³⁰, Cys³¹, Cys³² からなる“CMGCC”領域に点突然変異を導入し 5 種類のアミノ酸変異変異 hCG α cDNA を作成した。
2. RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写により 5 種類の変異 hCG α mRNA および hCG β mRNA を合成し、それらのアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入することによりタンパクを合成し、培養液中の変異 hCG をエンザイムイムノアッセイで測定した。
3. テストステロンの産生能からみた bioassay にて、これら変異 hCG のうち Cys²⁸ および Gly³⁰ のアミノ酸変異は生物活性を消失させ、hCG α 鎖の“CMGCC”領域が生物活性に重要であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

hCG は妊娠の成立、維持において重要な働きをするホルモンであるが、そのホルモン活性部位については未だ明らかでない。

本論文では hCG α 鎖の CMGCC 領域に分子生物学的手法を用いてアミノ酸変異を導入し、変異 hCG の免疫活性及び生物活性を検討した。またこの領域でのタンパクの 2 次構造を Chou - Fasman 及び Robson モデルを用いて解析し、立体構造を推測した。

その結果、hCG α 鎖の CMGCC 領域において、extended β sheet 構造から β turn 構造への立体構造変化を認めた。また Cys²⁸ 及び Gly³⁰ のアミノ酸変異 hCG は免疫活性は保持するものの生物活性の消失をもたらした。この領域が hCG のホルモン活性に重要な部位であることを証明したものである。

以上の研究は hCG を含めた糖タンパクホルモンの活性部位の解明に重要な貢献をするものであり、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。