

論文の内容の要旨

論文題目 脂肪細胞分化因子としての
成長ホルモンの構造と活性に関する研究

氏名 内田 恵理子

成長ホルモン(GH)は個体の正常な成長、発育に不可欠のホルモンで、肝臓でのソマトメジン産生を介する間接作用のほか、増殖、分化、脂質・糖質・蛋白質代謝の調節等の多彩な作用を直接引き起こす。GHの作用は細胞膜に存在する特異的な受容体を介して発現されると考えられるが、GHのどのような構造が受容体との相互作用、活性発現に必要なのか明らかではない。一方、GH受容体に関する研究も進展しているが、GHの多彩な作用が1種類の受容体により発現されるものかどうかは不明である。細胞レベルでGHの直接作用発現がみられる系はいくつか知られているが、Swissマウス由来の脂肪前駆細胞3T3-F442AがGHにより線維芽細胞から脂肪細胞に分化する反応は特異的かつ濃度依存的に低濃度でも顕著に分化が認められることから、GHの構造活性相関や受容体に関する研究を進める上で格好の系を提供するものと思われた。本研究ではヒト成長ホルモン(hGH)の分化活性に着目し、蛋白質工学的手法により作製した種々のhGH変換体を用いてhGHの機能構造を検討した。また、GHと特異的に結合する細胞膜蛋白

質に関して、作用発現との関連を含めて検討した。

I. hGHの構造活性相関

(1) Cys53/Cys165変換体: hGHは191個のアミノ酸単鎖から成る分子量22Kdのポリペプチドで53-165位及び182-189位の2箇所ジスルフィド結合(S-S結合)が存在する。まず、53位、165位のCys残基の活性部位への関与及び53-165位のS-S結合の活性高次構造形成への関与を検討するためCys残基をAlaまたはSerに変換してS-S結合を欠損させた5種のhGH変換体; [Ala165]hGH, [Ser165]hGH, [Ala53]hGH, [Ala53, Ala165]hGH, [Ala53, Ser165]hGH をM13 phageを用いたsite-directed mutagenesis法により作製した。各変換体の分化活性を分化マーカー酵素であるGlycerophosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の発現を指標に検討すると、変換したアミノ酸の位置、種類に関わらず、いずれもnative hGHの50%程度に低下し、最大分化活性も低下する傾向が認められた。native hGHをmercaptoethanolで還元しても同程度の活性低下が認められたので、各変換体の活性低下はCys残基が他のアミノ酸に置換されたことによるCys残基自体の活性発現への役割の喪失ではなく、主にS-S結合の欠失によるものと考えられた。各変換体の受容体への結合能を3T3-F442A細胞を用いたradioreceptor assayで検討すると、いずれもnative hGHより低下していた。この実験から53位及び165位のCys残基はいずれも受容体への結合、活性発現に必須ではないが、S-S結合形成を通して受容体との完全な相互作用に必要な構造の保持に機能していることが示された。

(2) splicing変異体及びTrp86変換体: ヒト下垂体及び血中にはsplicing変異により生成される32-46番目のアミノ酸残基を欠損した20Kd-hGHがhGH全体の5-10%存在し、22Kd-hGHと同等の成長促進作用を示すことが知られている。最近、同様のsplicing変異により32-71番目のアミノ酸残基を欠損した17.5Kd-hGHに相当するmRNAが下垂体中に見いだされたが、ホルモンの存在は未確認である。そこで、20Kd-hGH及び17.5Kd-hGHを人工的に作製して活性を検討した。また、脊椎動物のGHに唯一存在し、共通の位置にみられるTrp86に注目し、Tyrに変換した

W86YhGH, 欠失させた Δ W86hGHを作製した。20Kd-hGHは分化活性でも22Kd-hGHと同等の活性を示したが, 17.5Kd-hGHは全く活性を示さなかった。また, W86YhGHはnative hGHと同等の活性を示したが Δ W86hGHはやや活性低下が認められた。この結果から, 32-46番目のアミノ酸残基は活性部位とは無関係であるが, 47-71番目のアミノ酸残基には活性部位が含まれているか, またはこれらのアミノ酸残基の除去が活性高次構造に大きな変化を与えること, 86番目のTrp残基自体は活性に関与しないが欠失すると活性構造に影響することが示唆された。変換体の構造の変化をCDスペクトルにより観測した。native hGHの遠紫外部スペクトルは α -helix構造に特有の208nm, 222nmのdouble minimumのスペクトルパターンを示し, $[\theta]_{222}$ の値で α -helix含量を比較すると20Kd-hGHはnative hGHの80%, W86YhGHは95%と構造の変化はほとんどないが, Δ W86hGHでは60%, 17.5Kd-hGHでは25%と著しく低下し, 全体構造が大きく変化していることが判明した。

(3)hGHの立体構造モデルと活性発現: hGHと一次構造上約70%のホモロジーをもつブタGHのX線結晶解析で明らかにされた立体構造から類推すると, hGHは4本の α -helix(I:7-32; II:75-96; III:106-128; IV:153-183)がanti parallelに並び, 束状構造を形成していると考えられる。 α -helixを構成しているアミノ酸配列を車輪状に表すと, 各helixの内側に疎水性アミノ酸, 外側に親水性アミノ酸が並ぶ両親媒性を示し, helixの東は疎水結合で緊密にバックされていることが示唆された。立体構造モデルから, 20Kd-hGHの欠損部分はhelix IとIIの間のループの一部で残りのループにより補填されるためにhelixの束状構造は変化しないが, 17.5Kd-hGHではループの大部分が除去されるため大きく崩れ, Δ W86hGHではhelix IIの構造が崩れていると考えられる。これらのことからGHの活性発現におけるhelixの束状構造の保持の重要性が示唆された。一方, ループとhelix IVを結ぶ53-165位のS-S結合を欠損してもhelixの束状構造は変化しないと思われるが活性低下が認められたことから, helixだけではなくループ領域も活性発現に関与し, S-S結合は活性発現に必要な両者を最適な空間配置に保持していること

るとこれらのバンドはいずれも消失するが、prolactinが存在しても影響されないことからすべてsomatogenicな膜蛋白質に由来する特異的なバンドと思われる。非還元-還元二次元SDS-PAGEにより、230Kdなどの高分子複合体には130Kd複合体が含まれていることがわかった。アフィニティーラベル後neuraminidase処理すると、主要なバンドの分子量は130Kdから120Kdに低下した。また、細胞をツニカマイシンで24時間処理すると細胞へのhGHの結合は顕著に低下することから、GHと結合する110Kdの膜蛋白質はシアル酸を有するN-結合型糖鎖を発現していることが明らかとなった。同様の検討を分化能を示さないsubcloneである3T3-C2細胞、GHが糖・脂質代謝に作用することが知られている分化後のF442A脂肪細胞について行ったところ、GHの結合特異性、GHと結合する膜蛋白質の分子量、糖鎖の性状のいずれにおいてもF442A脂肪前駆細胞と同様の性質を示した。

Ⅲ. 結論

タンパク質工学的に作製したhGH変換体の脂肪細胞分化活性を調べることによりhGHの機能構造を検討した。hGHの分化活性発現には4つのhelixからなる束状構造の保持が重要であること、ループの62-67位付近のアミノ酸残基は受容体との結合、活性発現に重要な領域であり、特にArg64は結合に、Glu65は活性発現に、Pro61は活性構造保持に関与していること、53-165位のS-S結合は活性部位の最適な空間配置に寄与していることが本研究により示唆された。一方GHを認識して分化する脂肪前駆細胞において、GHは細胞膜に存在する末端シアル酸10Kd相当を持つN-結合型糖鎖を有する110Kdの糖蛋白質と特異的に結合すること、分化の前後、分化能の異なる細胞でもGHと結合する膜蛋白質の性状は大変類似していることが本研究により判明した。この膜蛋白質がGH受容体あるいは受容体の結合subunitであるとすると、GHの細胞応答の違いは細胞での受容体への結合レベルではなく結合以降の過程の違いによるものと思われる。

ことが予想された。そこで54-74番目のループ領域の変換体について検討した。

(4) ループ領域の変換体：ループ領域の主鎖の角度を固定しているPro59またはPro61をAlaに変換したP59AhGH, P61AhGH, P59A-P61AhGH, 及び立体構造モデルで特に突出している62-67番目のアミノ酸残基を欠損した Δ (62-67)hGHを作製した。分化活性, 結合能は共にP59AhGHではnative hGHと変わらなかったがP61AhGH, P59A-P61AhGHでは約半分に, Δ (62-67)hGHでは0.1%にまで低下した。各変換体のCDスペクトルはnative hGHとほとんど変わらず, 全体の構造はほぼ保持されていると考えられることから, ループ領域のconformationのわずかな変化または62-67位のアミノ酸残基の欠失によるループの構造変化により受容体との結合及び分化活性が変化したと思われる。この結果から62-67位付近のアミノ酸残基は結合及び活性発現に極めて重要な領域(活性部位)の一つであること, Pro61がこの活性部位の適切な空間配置の維持に寄与していることが明らかとなった。この領域で正電荷を持つArg64をTyrまたはGluに変換したR64YhGH, R64EhGH, 負電荷を持つGlu65をProに変換したE65PhGH, 63, 64番目のアミノ酸の間にAlaを挿入した63NARhGHについてさらに検討すると, R64YhGHは分化活性は変化しないが結合はやや低下し, R64EhGHでは分化活性は16%に, 結合は約1%にまで低下した。またE65PhGHでは結合能は変化しないが分化活性は低下し, 63NARhGHでは分化活性, 結合能とも大きく低下した。この結果から, Arg64の正電荷は結合に関与するが活性には影響しないこと, Glu65は活性発現に影響することが示唆された。

II. GHと結合する細胞膜蛋白質

3T3-F442A脂肪前駆細胞には分化活性発現に関与するGH受容体が存在する可能性がある。そこでアフィニティーラベルを行い, GHと特異的に結合する細胞膜蛋白質に関して検討した。¹²⁵I標識hGHを細胞と結合させた後, 二価架橋試薬disuccinimidyl suberateで架橋すると, 130Kdの主要なバンドと300Kd, 230Kd, 60Kdのバンドが検出された。hGHの分子量は22KdであるからGHと結合する主要な膜蛋白質の分子量は110Kdである。標識ホルモン作用時に過剰量のhGHが存在す

脂肪細胞分化因子としての
成長ホルモンの構造と活性に関する研究

内田 恵理子

②

脂肪細胞分化因子としての
成長ホルモンの構造と活性に関する研究

内田 恵理子

アミノ酸の記号

A	Alanine	Ala
C	Cysteine	Cys
D	Aspartic acid	Asp
E	Glutamic acid	Glu
F	Phenylalanine	Phe
G	Glycine	Gly
H	Histidine	His
I	Isoleucine	Ile
K	Lysine	Lys
L	Leucine	Leu
M	Methionine	Met
N	Asparagine	Asn
P	Proline	Pro
Q	Glutamine	Gln
R	Arginine	Arg
S	Serine	Ser
T	Threonine	Thr
V	Valine	Val
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosine	Tyr

略語表

A	adenine
G	guanine
C	cytidine
T	thymidine
dNTP	deoxynucleotide 5'-triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CD	circular dichroism
cdNA	complementary DNA
CS	calf serum
DMEM	Dulbecco-Voet modification of Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double stranded DNA
DSS	disuccineimidyl suberate
DTT	dithiothreitol
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	fetal calf serum
GH	growth hormone
Kd	kiro dalton
hGH	human growth hormone
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IGF-I	insulin-like growth factor I
mRNA	messenger RNA
Mr	molecular weight
NEM	N-ethylmaleimide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PL	placental lactogen
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PRL	prolactin
SDS	sodium dodecyl sulfate
ssDNA	single stranded DNA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

目 次

序 論	2
本 論	
第 1 章 脂肪細胞分化因子としてのヒト成長ホルモン (hGH) の構造活性相関	6
第 1 節 Cys53/Cys165変換体の構造活性相関	10
第 2 節 Splicing変異体及びTrp86変換体の構造活性相関	23
第 3 節 hGHの立体構造モデルによる活性高次構造の考察	30
第 4 節 ループ領域の変換体の構造活性相関	33
第 5 節 まとめと考察	45
第 2 章 脂肪前駆細胞の分化と成長ホルモン受容体	50
第 1 節 成長ホルモンと結合する細胞膜蛋白質の構造	52
第 2 節 成長ホルモンと結合する細胞膜蛋白質の糖鎖	59
第 3 節 まとめと考察	63
結 論	69
引用文献	70
謝 辞	77

序 論

ペプチドホルモンや増殖・分化因子による細胞への情報伝達は、標的細胞の細胞膜上において特異的な相互認識、相互作用により受容体に伝えられ、受容体は受けた情報を細胞内情報に変換し、それによって細胞の遺伝子発現や蛋白質合成の変化が生じ、細胞応答となって発現されると考えられる。情報伝達の第1段階である情報を担う因子と受容体の特異的な結合、相互認識は、正確な情報が細胞に伝達されるための重要な過程であるが、この過程を理解するためには情報を担う因子の構造と情報を受け取る受容体の双方に関して詳細な理解が必要であると思われる。

成長ホルモン(GH)は1921年にEvansとLong⁽¹⁾により見いだされた、脊椎動物の脳下垂体前葉で産生・分泌される個体の正常な成長、発育に不可欠のポリペプチドホルモンで、欠損症としては下垂体性小人症が知られている。GHも他のペプチドホルモンと同様、細胞膜に存在する受容体を介して作用すると考えられている。GHは種族特異性が強く、一般に発生学的に同位か下位にのみ有効で、ヒト成長ホルモン(hGH)は霊長類以外の動物のGHと64-66%のアミノ酸の相同性があり作用を示すにもかかわらず、ヒトには霊長類のGHしか有効ではなく、受容体への結合も認められないことが知られている⁽²⁾。また、GHはProlactin(PRL), Placental Lactogen(PL)ともホモロジーがあり、GH-PRLファミリーと呼ばれている。hGHはGH受容体の他にPRL受容体にも結合することが知られ、成長促進作用(Somatogenic Activity)とプロラクチン様作用(Lactogenic Activity)の両方の作用を示すが、他種のGHはPRL受容体には結合しないなど、GHと受容体との相互認識には興味深い問題が多く含まれている。

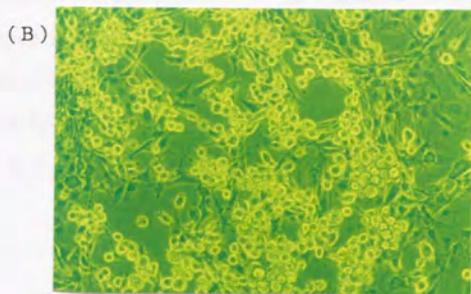
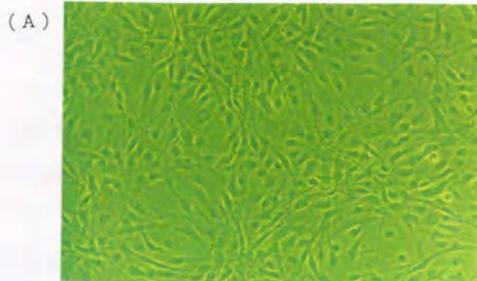
GHは従来は肝臓でのソマトメジンC(IGF-I)の産生を介して間接的

に生体の成長に作用すると考えられてきた。しかし近年になって、肝、腎、脂肪細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、リンパ球など様々な組織、細胞においてGHと特異的に結合するGH受容体(結合蛋白質)が存在することが見だされている⁽⁴⁾。GHが特異的に結合しても細胞応答が明らかでない例もあるが、軟骨細胞や造血幹細胞、T細胞、培養ヒトリンパ球IM-9等ではGHは細胞増殖に働き、筋細胞や脂肪細胞の前駆細胞では細胞分化を引き起こすこと、また脂肪細胞に対しては短時間の一過性の作用として糖・脂質の取り込みを促進するインスリン様作用、長時間の作用としては逆に抑制的に働く抗インスリン作用を示し、筋細胞では蛋白同化作用などの代謝調節に関与するなど、間接作用の他に組織での多彩な作用の発現に直接関与していることがわかってきた^(5,6)。しかし、GHの作用機序はまだほとんど明らかとはなっていない。GHと受容体との相互認識という点に関しても作用の多彩さ、種特異性の問題など複雑な要因が多く明らかではない。GHのどのような構造が受容体との相互作用、活性発現に必要なものであるのか、酵素と基質の反応にみられるような活性部位が存在するのかどうか、またGHの1種類の構造と1種類の受容体の組合せによって多彩な作用が全て発現されるのか、あるいは異なる細胞応答には異なる複数の活性部位もしくは異なる受容体が存在するのか、などは不明である。

ところで、Greenらにより樹立されたcloneであるSwissマウス由来3T3-F442A脂肪前駆細胞⁽⁷⁾は血清に含まれる分化因子によって線維芽細胞から脂肪細胞に分化するが⁽⁸⁾、GHが分化因子として特異的に作用して分化を誘導することが見だされている^(9,10)。分化するに従って細胞は丸くなり、中性脂質が蓄積され、分化した脂肪細胞ではlipid dropletが多数認められるようになる(図1)。分化による形態の変化に伴い脂質合成系の多数の酵素の誘導が起こるが、特にトリグリセリド合成のkey enzymeであるGlycerophos-

phate dehydrogenase (GPDH) 活性は分化に比例して顕著な増加を示す⁽¹¹⁾ことから、GHの分化誘導活性をGPDH活性の変化により定量的に取り扱うことが可能である。分化活性は生理的濃度 (10^{-10} M) 程度の低濃度のGHでも検出され、濃度依存的に分化が起こるため、GHの生物活性を *in vitro* で感度良く捉えることが可能である⁽¹²⁾。3T3-F442A脂肪前駆細胞はGH受容体を発現しているが⁽¹³⁾、PRLには分化活性が認められない⁽⁹⁾ことから、分化活性は somatogenic なGH受容体を介した作用であると考えられる。これらの理由から、3T3-F442A脂肪前駆細胞のGHによる分化系は、GHの構造活性相関や受容体に関する研究を進める上で格好の系を提供するものと考えられた。

本研究ではhGHの脂肪細胞分化活性に着目し、蛋白質工学の手法を用いて作製した種々のhGH変換体の分化活性、細胞への結合、構造等を検討することによりhGHの機能構造の研究を行った。また、3T3-F442A脂肪前駆細胞には分化活性発現に関与するGH受容体が存在する可能性があることから、アフィニティーラベルにより得られる、GHと特異的に結合する細胞膜蛋白質の性状について細胞応答との関連を含めて基礎的に検討した。第1章ではhGHの構造活性相関について、第2章ではGHと結合する細胞膜蛋白質について述べる。



〈図 1〉 3T3-F442A 脂肪前駆細胞の分化

3T3-F442A 脂肪前駆細胞を confluent 後、

A : 分化培地のみ

B : 分化培地 + hGH 5nM

C : 10% FCS + insulin 5 μ g/ml

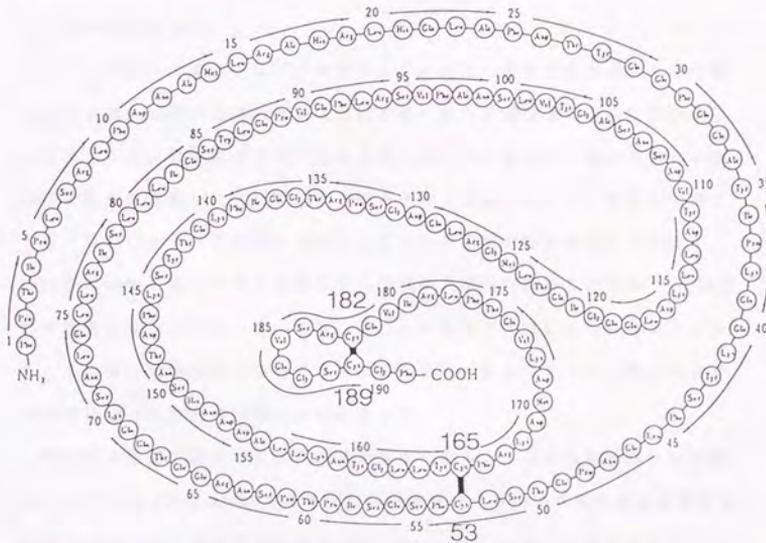
で 6 日間培養した。(分化培地は第 2 章に詳述)

本 論

第 1 章

脂肪細胞分化因子としての ヒト成長ホルモンの構造活性相関

hGHは191個のアミノ酸単鎖からなるポリペプチドホルモンで、一次構造は1973年に最終的に確定された^(14,15)。分子量22000、等電点4.9、分子内の53-165位と182-189位の2箇所にはジスルフィド(S-S)結合を有する(図2)。hGHの構造と機能に関しては、アミノ酸残基の化学修飾⁽¹⁶⁻¹⁹⁾、酵素による部分分解と再構成⁽²⁰⁻²⁴⁾、合成フラグメント⁽²⁵⁻²⁷⁾、モノクローナル抗体⁽²⁸⁾等を利用して研究が行われてきた(総説:29,30)。しかし、これらの結



〈図2〉 ヒト成長ホルモンの一次構造

果からは活性部位が特定されるには至らなかった。結果が錯綜している原因のひとつには、GHの活性構造はGHの作用により異なることが考えられる。GHのインスリン様作用はN末の数残基のフラグメントのみで活性が発現されることが報告されている⁽²⁵⁻²⁷⁾が、受容体結合活性、成長促進活性に関してはフラグメントのみでは活性が認められず、活性発現には立体構造が重要であることが示唆されている⁽³¹⁾。3T3-F442A脂肪前駆細胞に対する分化活性に関してもN末1-139及びC末150-191の各フラグメントは単独では活性がないことが報告されている⁽¹²⁾。また、初期の研究ではホルモンの純度も問題で、混在物の影響があったと思われる。構造活性相関の研究法に関しても、化学修飾による研究法は活性に関与するアミノ酸残基についての情報を得ることができるが、修飾できる側鎖は限られ、立体構造的にも変化が起こる可能性があるという限界があり、その他の方法も同様で、活性部位を特定することは困難であった。

しかし、近年の遺伝子工学の発展により天然には微量にしか存在しない蛋白質が大量かつ純粋に得られるようになり、さらに遺伝子の塩基配列の一部を変換して蛋白質を改造するいわゆる蛋白質工学に発展し、特定のアミノ酸残基を任意に変換した変換体蛋白を得ることも可能となった。hGHについても、以前はヒトの下垂体から抽出したものが治療や研究に用いられたが、1979年にcDNAを用いてhGH遺伝子の発現が大腸菌で初めて行われ⁽³⁾、現在では組換えhGHが小児症の治療に用いられるほど大量に得られるようになり、また構造活性相関に関しても蛋白質工学的手法によりアミノ酸レベルでの機能発現への役割の解明が可能となった。

構造活性相関の研究では活性測定が重要であるが、GHの生物活性の定量法としてはin vivo assayである下垂体摘出ラットを用いた頸骨骨端軟骨幅増加法(Tibia test)や体重増加法(Weight gain test)が用いられている⁽³⁵⁾。

In vivo assayはGHの本来の活性である成長促進作用を見ることができが、assayには数10 μ gが必要で感度、精度とも低く、活性の僅かな変化を捉えるのは困難であると思われる。In vitroでhGHの生物活性を定量する方法としてはrat Nb-2 lymphomaの増殖活性を見る方法⁽⁵⁷⁾があるが、これはPRL受容体を介する作用であって、GH受容体を介した作用をみることはできない。GH受容体との結合性、あるいは抗体との反応性による機能構造の検討も行われているが、受容体結合性と生物活性とは必ずしも相関するわけではなく、機能構造の解明には生物活性の発現を検討することが大事である。序論で述べたように、3T3-F442A脂肪前駆細胞はin vitroでhGHにより定量的に感度よく脂肪細胞に分化することから、hGHの構造活性相関を検討するうえで有用な系であると思われる。

Ikeharaらは大腸菌の至適コドンを使用したhGH遺伝子(図3)を化学合成により作製し、これをTrpプロモーターをもつpBR322由来のベクターに組み込んだプラスミドpGH-L9を作製し、*E. coli* HB101に導入することによりhGHを大量発現させる系を確立している⁽³²⁾。そこで本章ではこの合成遺伝子を利用してsite-directed mutagenesisの方法でhGHの種々の変換体を作製し、分化活性を測定することによりhGHの機能構造を検討した。

1 10 20
 Met Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe
 Cla I UO U2 U3 U4
 CCGE ATG TTC CCA ACT ATT CCA CTG AGT GCG CTG TTC GAT AAC GCG ATG CTG CGT GCG CAT CGT CTG CAC CAA CTG GCT TTC
 L8 TAC AAG GGT TGA TAA GGT GAC TCA GCG GAC AAG CTA TTG CCG TAC GAC GCA GCG GTA GCA GAC GTG GTT GAC CGA AAG
 L0 L1 L2 L3 L4

A part

30 40 50
 Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr
 U5 U6 U7 U8 U9 U10 U11 U12
 GAC ACT TAC CAG GAG TTC GAA GAA GCA TAC ATC CCG AAA GAA CAG AAA TAC AGC TTC CTT CAG AAC CCA CAG ACC
 CTG TGA ATG GTC CTC AAG CTT CTT CGT ATG TAG GGC TTT CTT GTC TTT ATG TCG AAG GAA GTC GTG GGT GTC TGG
 L4 L5 L6 L7 L8 L9

B part

60 70
 Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu
 U13 U14 U15 U16 U17 U18 U19 U20
 TCG TTG TGT TCT TCT GAA AGT ATC CCG ACC CCT TCT AAC CCG GAA GAG ACC CAG CAG AAA TCG AAC CTT GAA CTG
 AGC AAC ACA AAG AGA CTT TCA TAG GGC TGG GCA AGA TTG GCG CTT CTC TGG GTC GTC TTT AGC TTG GAA CTT GAC
 L1 L2 L3 L4 L5 L6

80 90 100
 Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser
 U21 U22 U23 U24 U25 U26 U27 U28 U29 U30
 CTT CGT ATC TCG CTT CTT CTT ATT CAG TCG TCG CTG GAG CCA GTA CAG TTC CTG GGT CCG GTT TTC GCA AAC TCA
 GAA GCA TAG AGC GAC GAA GAG TAA GTC AGC ACC GAC CTC GGT CAT GTC AAG GAC GCA AGC CAA AAG CGT TTG AGT
 L6 L7 L8 L9 L10

110 120
 Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met
 U31 U32 U33 U34 U35 U36 U37 U38 U39 U40
 CTG GTT TAC GGT GCG TCT GAC AGT AAC GTT TAC GAC CTG CTG AAA GAC CTT GAA GAA GCG ATC CAG ACC CTG ATG
 GAC CAA ATG CCA CGC AGA CTG TCA TTG CAA ATG CTG GAC GAC TTT CTG GAA CTT CTT CCG TAG TGC TGG GAC TAC
 L11 L12 L13 L14 L15

130 140 150
 Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 U41 U42 U43 U44 U45 U46 U47 U48 U49 U50
 GGT CGC CTG GAA GAT GGT TCA CCA CGC ACT GGT CAG ATC TTC AAA CAG ACT TAC TCC AAA TTC GAT ACT AAC TCT
 CCA CGC GAC CTT CTA CCA AGT GGT GCG TGA CCA GTC TAG TAG TTT GTC TGA ATG AGC TTT AAG CTA TGA TTG AGA
 L16 L17 L18 L19 L20 L21 L22

C part

160 170
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr
 U51 U52 U53 U54 U55 U56 U57 U58 U59 U60
 CAT AAC GAT GAT GCT CTG CTG AAA AAC TAC GGC CTG CTG TAC TGT TTC CGT AAA GAT ATG GAT AAA GTT GAA ACT
 GTA TTG CTA CTA CGA GAC GAC TTT TTG ATG CCG GAC GAC ATG ACA AAG GCA TTT CTA TAC CTA TTT CAA CTT TGA
 L3 L4 L5 L6 L7

180 190
 Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe StopStop
 U61 U62 U63 U64 U65 U66 U67 U68 U69 U70
 TTC CTG CGT ATC GTT CAG TGT CGT TCT GTT GAA GGG TCG TGT GGC TTC TAA TAG
 AAG GAC GCA TAG CAA GTC ACA GCA AGA CAA CTT CCG AGC ACA CCG AAG ATT ATC acc
 L8 L9 L10 L11

〔図3〕 hGHの合成遺伝子の塩基配列(33)

△はT4DNAリガーゼによる結合箇所を示す。

第1節 Cys53/Cys165変換体の構造活性相関

hGHは分子内のCys53とCys165の間及びCys182とCys189の間の2つのジスルフィド(S-S)結合によりfoldingされている(図2)。一般に、S-S結合は立体構造の形成に重要であると考えられるが、hGHではS-S結合を還元、アルキル化してもラットtibia testなどのバイオアッセイでは活性に変化がみられないことが報告されていた^(33,34)。また、hGHを還元、アルキル化後、プラスミンあるいはトロンビン分解によって得られるN末側2/3のフラグメントとC末側1/3のフラグメントを各々単離してから再混合すると、非共有結合的相互作用によりhGHが再構成され、立体構造、活性を回復する⁽²⁰⁻²⁴⁾ことも報告され、hGHではS-S結合が活性構造の形成に必要ではないとされてきた。しかしアルキル化は立体構造に影響する可能性があり、また、従来の生物活性測定法では活性の微妙な変化は捉えられないと考えられることから、hGHのS-S結合及びS-S結合形成に関わるCys残基の活性発現における役割を正確に評価することは困難であると思われた。還元、アルキル化したhGHは受容体結合性や抗体の反応性が低下している⁽³¹⁾ことも最近では報告されている。また、同じfamilyに属するovine PRLではS-S結合が3箇所存在するが、58-174位のS-S結合を失うと活性は消失する⁽³⁶⁾という。

Tokunagaら⁽³⁷⁾は純粋にS-S結合の活性発現への役割を検討するために、Ikeharaらにより作製された化学合成hGH遺伝子⁽³²⁾を利用して遺伝子工学的にCys165をAlaに変換し、53-165位のS-S結合を欠損させたhGH変換体[Ala165]hGHを作製した。抗体反応性、ラット体重増加法では活性が保持されていると報告している。本節では同じく53位、165位のCys残基に着目し、これらをAla残基またはSer残基に変換したhGH変換体をさらに4種類作製し、[Ala165]hGHとともに分化活性を検討することにより、53位、165位のCys残基

の活性部位への関与、並びに53-165位のS-S結合の活性高次構造形成における役割を検討した⁽³⁸⁾。変換するアミノ酸として選択したAla残基は側鎖が小型で他のアミノ酸との相互作用が小さく主鎖の構造に影響を与えにくいという性質、Ser残基は側鎖のOH基により水素結合を形成しやすいという性質を持っている。

1. 1 hGH変換体の作製

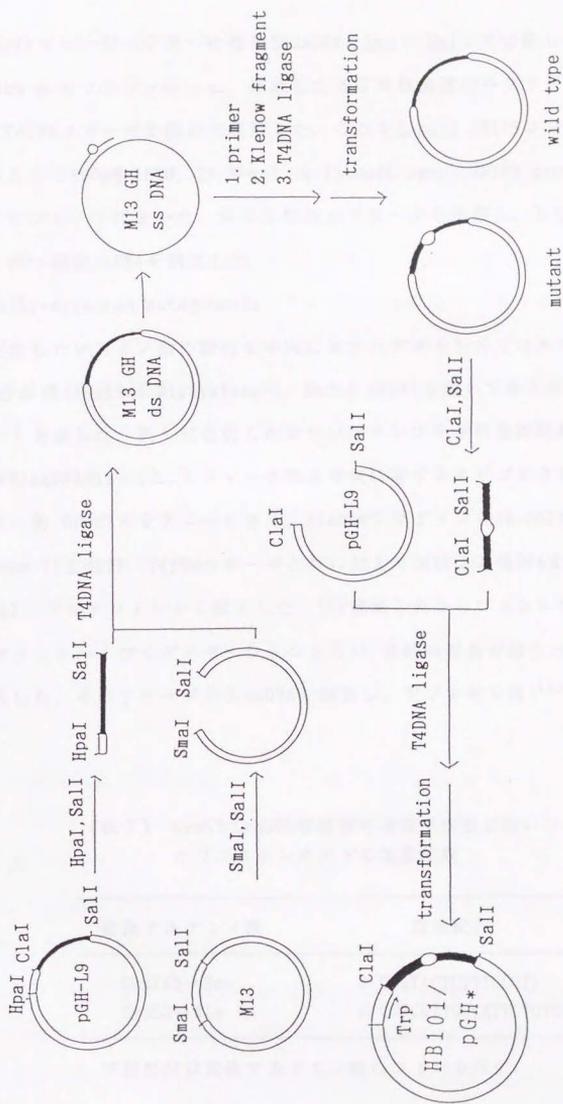
変換体の種類及び試薬

hGH変換体のうちCys165をAlaに変換した[Ala165]hGHはTokunagaらにより作製されたプラスミドpGHG-165⁽³⁷⁾から調製した。Cys165をSerに変換した[Ser165]hGH、Cys53をAlaに変換した[Ala53]hGH、Cys53とCys165を共にAlaに変換した[Ala53,Ala165]hGH、Cys53をAlaに、Cys165をSerに変換した[Ala53,Ser165]hGHの4種類は後述する方法で作製した。変換体遺伝子の作製に用いた制限酵素類、DNAポリメラーゼKlenowフラグメント、T4DNAリガーゼ、T4ポリヌクレオチドキナーゼはすべて宝酒造(株)より購入した。シークエンシングにはM13シークエンシングキット(宝酒造)を用いた。DNA合成用の試薬はApplied Biosystems社より購入した。

変換体遺伝子の作製

(1) 鋳型DNAの調製

hGHの変換体はM13ファージDNAを用いたsite-directed mutagenesis(部位特異的変異)法⁽³⁹⁾により作製した。概略を図4に示す。hGH遺伝子を組み込んだプラスミドpGH-L9を導入した*E. coli* HB101⁽³²⁾からプラスミドを単離し、制限酵素Hpa I, Sal Iで切断して得られる、hGH構造遺伝子を含む0.62kb.p.のフラグメントを1%アガロースゲル電気泳動により単離した。



〔図4〕 hGH変換体遺伝子の作製法

M13mp11ファージベクターの複製型dsDNAをSma I, Sal Iで切断して得られる7.24kb.p.のフラグメントに、単離したhGH構造遺伝子フラグメントを挿入し、T4DNAリガーゼを用いて連結した。これをE.coli JM109コンピテントセルに導入して100mM IPTG, 2% X-gal, 0.7% soft ager, JM109 grown cellと共にY Tプレートにまいた。生じた無色のブランクを培養し、hGH構造遺伝子を持つ鋳型ssDNAを調製した。

(2) Site-directed mutagenesis

変換したいアミノ酸の配列を中央に有するデオキシオリゴヌクレオチドをDNA合成機 (Applied Biosystems社, Model 380A)を用いてホスホアミダイト法により合成した。表1に合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

鋳型ssDNA約1μgと、ミスマッチ部を中央に有するオリゴヌクレオチドプライマー約6pmolとをアニールさせ、Klenowフラグメント (E.coli DNA polymerase I)をdNTP, T4DNAリガーゼと共に加えて環状二本鎖DNAを合成した後、JM101コンピテントセルに導入した。³²P標識したオリゴヌクレオチドを用いてブランクハイブリダイゼーションを行い、目的の変異が起こったブランクを選択した。そのファージからssDNAを調製し、シアオキシ法⁽⁴⁰⁾により塩基配

〈表1〉 Cys53/Cys165変換体の遺伝子作製に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列

変換するアミノ酸	塩基配列
Cys165→Ser	d (CTGTACTCT <u>TT</u> CCGT)
Cys53→Ala	d (CCTCGTTGGC <u>AT</u> CTCTG)

下線部分は変換するアミノ酸のコドンを示す。

列を調べて目的の変異が導入されていること、その他の部分では変異が起っていないことを確認した。

(3) 発現ベクターへの組込み

変異を持つファージのdsDNAを調製し、制限酵素Cla I, Sal Iで切断して0.62kb.p.のフラグメントを単離した。また、別にプラスミドpGH-L9を制限酵素Cla I, Sal Iで切断して得られる4.33kb.p.の発現ベクターを単離し、さきに単離した、変異をもつ遺伝子フラグメントを組込んで発現用プラスミドを作製した。[Ser165]hGHの変換体遺伝子を持つプラスミドをpGH-L9-CS3, [Ala53]hGHの遺伝子を持つプラスミドをpGH-L9-AC5とした。[Ala165]hGHの遺伝子をもつプラスミドpHGH-165はTokunagaらにより調製されたもの⁽³⁷⁾を用いた。[Ala53, Ala165]hGH, [Ala53, Ser165]hGHの2アミノ酸変換体はpGH-L9の代わりにpHGH-165及びpGH-L9-AC5から調製した鋳型DNAを用いて、同様にsite-directed mutagenesisを行うことにより変換体遺伝子を取得した。この変換体遺伝子をE.coli HB101コンピテントセルに導入し、各変換体を発現する組換え体を得た。この時点でプラスミドを調製し、ジデオキシ法により再度シーケンスを確認した。

hGH変換体の発現と精製

組換え体はアンピシリン40 µg/mlを添加したLB培地、さらにM9-0.2%カザミノ酸-アンピシリン培地で拡大培養し、3-インドールアクリル酸(40 µg/ml)によりTrpプロモーターのinductionをかけて変換体蛋白質の発現を行わせた⁽³²⁾。hGH変換体蛋白は菌体内に封入体(inclusion body)と呼ばれる不溶性画分として発現される。1Lの培養から約4gの菌体を得られた。これを2-mercaptoethanol 5mMを含むTris-HCl緩衝液(pH8.0)に懸濁し、超音波処理による破碎後、15000rpm, 0°C, 15分間の遠心で得られる沈澱画分を6M塩酸グ

アニジンまたは7Mウレアを含む緩衝液に溶かして変性させた。これを2時間毎に5M, 3M, 1M, 0Mと段階的に変性剤濃度を下げた50mM NaClを含むTris-HCl緩衝液対して透析することにより再生(refolding)を行い、最後に塩を含まない緩衝液で透析後、15000rpmで15分間遠心した。上清を除イオン交換樹脂Q-Sepharoseカラムクロマトグラフィー(1.6x25 cm)にapplyし、20mM Tris-HCl (pH8.0), NaCl 0-0.5Mのグラジェントにより精製した。蛋白量はLowry法⁽⁴¹⁾で定量した。

1. 2 hGHの生物活性測定法

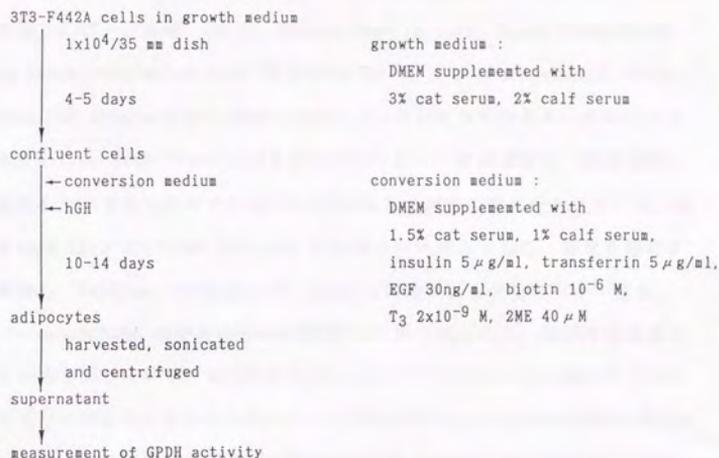
試薬及び細胞

3T3-F442A脂肪前駆細胞はHarvard Medical SchoolのH.Green教授より東京免疫薬理研究所の森川実博士を通して供与して頂いた。細胞はウシ血清(CS: Flow Laboratories社)10%を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; GIBCO社)で4日毎に継代培養した。分化用培地に添加するネコ血清はCololado serum companyより購入した。また活性測定のコントロールに用いたhGH(native hGH)は住友製薬(株)製の組換えhGHを用いた。Insulinは衛生試験所標準品を、マウスEGF(Epidermal growth factor)は宝酒造(株)製を使用した。Na¹²⁵I(740MBq(20mCi)/ml in NaOH)はNew England Nuclear社より購入した。その他の試薬はSigma社あるいは和光純薬の特級品を使用した。

hGHの脂肪細胞分化誘導活性測定(Adipose conversion assay)

Adipose conversion assayはMorikawaらの方法⁽¹²⁾に従った(図5)。すなわち、対数増殖期の3T3-F442A脂肪前駆細胞を0.25%トリプシン-1mM EDTA溶液で単離し、35mmの培養用dish(Falcon)に1-2x10⁴細胞/dishとなるように播種し、増殖用培地(3%ネコ血清及び2%CSを含むDMEM)を用いて増殖させた。

〈図5〉 3T3-F442A脂肪前駆細胞の分化誘導プロトコール



〈図6〉 GPDH活性測定条件

assay components	volume (μl)	Final Conc. (mM)
Water	50	
TEA buffer	50	50
NADH 500 μM	200	0.2
DHAP* 5 mM	100	1
GPDH sample and water	100	

*DHAP: Dihydroxyacetone phosphate

Triethanolamine (TEA) buffer:

0.5 M TEA/10 mM EDTA/10 mM 2-mercaptoethanol (pH7.5)

反応 DHAP + NADH → G-3-P + NAD

$E_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ CM}^{-1}$

30℃で340 nmの吸光度をTime scanし, Δ340/min を求める.

GPDH 1 U = 1 nanomole NADH / min

4,5 日後, 細胞がsubconfluentまたはconfluentに増殖した時点で培地を分化用培地 (1.5%ネコ血清, 1% CS, Bovine Insulin $5\mu\text{g}$, Human Transferrin $5\mu\text{g}$, Triiodothyronine $2 \times 10^{-9}\text{M}$, Biotin 10^{-6}M , 2-mercaptoethanol $40\mu\text{g}$, Mouse EGF 30ng/ml を含むDMEM)と交換した。これにhGHあるいはhGH変換体をMillex GV(Millipore社)を用いてフィルター濾過滅菌後, 段階希釈して添加した。培地交換せずに10-14日間培養して脂肪細胞に分化させた後, 細胞を25mM Tris-HCl-1mM EDTA (pH7.5)溶液でハーベストした。細胞を超音波で破碎し, 12000g , 5分間遠心し, cytosolに含まれる分化マーカー酵素, Glycerophosphate dehydrogenase(GPDH)の活性を測定した。GPDH活性測定の反応条件を図6に示す。GPDH活性をジヒドロキシアセトンリン酸がグリセロール3リン酸にかわる反応の際おこる, NADHの酸化による340nmの吸光度変化により測定した⁽¹¹⁾。GPDH 1UはNADHの酸化量 1nmol/min と定義した。一方, サンプルの蛋白量をBradfordの方法⁽⁴²⁾ (Bio Rad Protein assay kit)で定量し, GPDH活性をunits/mg proteinで表した。

hGHの¹²⁵I標識

クロラミンT法⁽⁴³⁾によりhGHを¹²⁵I標識した。即ち, 0.5Mのリン酸緩衝液 (pH7.2) $100\mu\text{l}$ に Na^{125}I を $50\mu\text{l}$ ($37\text{MBq}=1\text{mCi}$), hGH (0.5mg/ml)を $6\mu\text{l}$ ($3\mu\text{g}$)混合したものに, 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4)で 5mg/ml に用時調製したクロラミンTを $40\mu\text{l}$ 添加し, 室温で攪拌する。20秒後ピロ亜硫酸ナトリウム (10mg/ml in 0.1Mリン酸緩衝液, pH7.4) $100\mu\text{l}$ を加えて反応を止め, さらにBSA 0.2%を含むリン酸緩衝液 (pH7.4)で 2mg/ml に調製したヨウ化カリウム700 μl を加えた後, Sephadex G-25カラムによるゲル濾過を行い, void画分を回収して比放射能 $2.6-4.6\text{MBq}$ ($70-125\mu\text{Ci}$)/ μg の¹²⁵I-hGH標品を得た。分注, 凍結保存して実験に用いた。

hGHの受容体結合活性測定(Radioreceptor assay)

3T3-F442A脂肪前駆細胞を 2×10^4 細胞/35mm dishとなるよう播種し、3%ネコ血清、2%CSを含むDMEMで培養し、confluentに増殖した単層培養細胞を調製した。0.1% (W/V) ウシ血清アルブミン(BSA)、10mM HEPESを含有するHanks' Balanced Salt Solution(HBSS)を用いて細胞をdishに附着した状態で3回洗浄した後、段階希釈したhGH変換体及び ^{125}I -hGH (10nM)を加えて90分間、23°Cでインキュベートした。培地を除去して結合反応を止め、さらにHBSSで3回洗浄した後、細胞を回収し、細胞に結合した ^{125}I -hGHの量をオートガンマカウンターで測定した。

1. 3 Cys53/Cys165変換体の生物活性

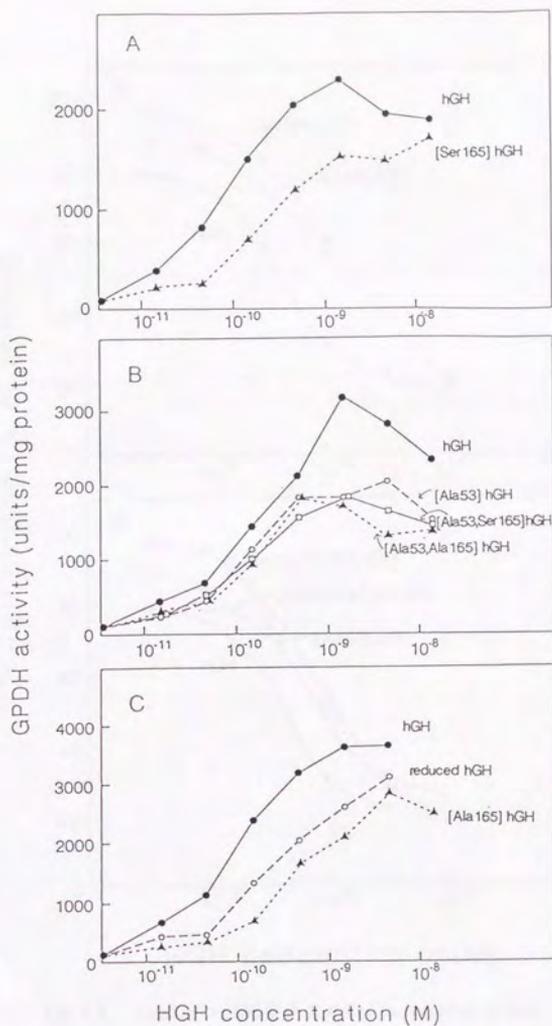
hGHのCys53/Cys165変換体5種類の脂肪前駆細胞に対する分化誘導活性をマーカー酵素であるGPDH活性の誘導を指標にして測定した。典型的な用量反応曲線を図7に示す。Cys165をAlaあるいはSerに変換したためにジスルフィド結合形成を失った[Ala165]hGHと[Ser165]hGHでは、50%有効濃度(ED_{50})がnative hGHの $0.8\text{--}2.1 \times 10^{-10}$ Mの数倍に増加し、 ED_{50} から活性を求めると各々nativeの14-40%、8-18%と低下していた(表2)。また最大活性も低下する傾向が認められた(図7, A, C)。一方、Cys53をAlaに変換した[Ala53]hGHでも同様の活性低下が認められた(図7, B)。しかし、[Ala53]hGHのCys165をさらにAlaあるいはSerに変換した[Ala53, Ala165]hGH, [Ala53, Ser165]hGHでは活性は[Ala165]hGHと変わらなかった(図7, B)。native hGHを2-mercaptoethanolとincubateして還元すると、Cys変換体と同様の活性低下を示した(図7, C)。

各変換体の受容体結合能を3T3-F442A脂肪前駆細胞を用いたradioreceptor assayにより検討した(図8)。どの変換体も阻害曲線がnative hGHから同程

度右に移動しており、50%阻害濃度 (IC_{50}) から結合活性を求めると、native hGH の43-58% に低下していることが判明した (表3)。比活性は受容体結合活性と分化活性とではほとんどパラレルであることから、アミノ酸の変換により受容体への結合が低下し、結果として分化活性が低下したと考えられる。

Cys53, Cys165 の活性発現における役割としては (1) Cys 残基自体が受容体結合部位あるいは活性部位に包含されている可能性、(2) Cys 残基自体は活性発現に関与しないが、S-S 結合の形成を通じて活性高次構造の保持に寄与している可能性、が考えられる。今回の結果では、変換したアミノ酸の種類、位置に関わらず同程度の活性低下が認められた。このことは、Cys 残基自体が結合、活性発現に関与しており、変換されたことによりその役割を喪失したためではなく、主に Cys53, Cys165 間の S-S 結合の欠失により立体構造にひずみが生じることにより結合及び活性発現に必要な構造にも影響が及ぶためと考えられた。しかし、活性の低下はあまり大きくなかったことから、53-165 位の S-S 結合が存在しなくても活性高次構造はかなり保持されることも判明した。

この実験から、53 位及び 165 位の Cys 残基は受容体への結合、活性発現に直接関与はしないが、S-S 結合の形成を通して受容体との完全な相互作用をするために必要な構造の保持に機能していることが示された。

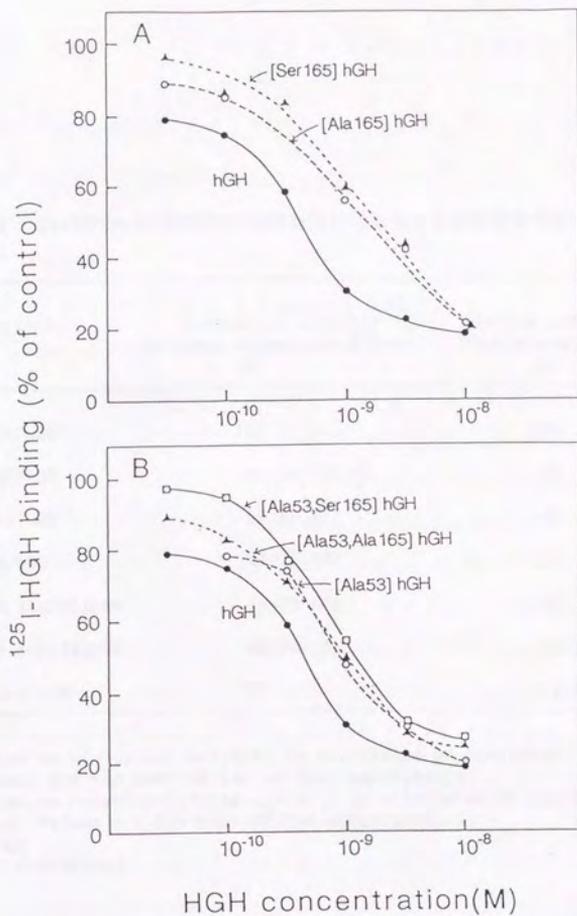


《 図 7 》 Cys53/Cys165変換体の脂肪細胞分化活性

A: hGH(●); [Ser165]hGH(▲)

B: hGH(●); [Ala53]hGH(○); [Ala53, Ala165]hGH(▲); [Ala53, Ser165]hGH(□)

C: hGH(●); [Ala165]hGH(▲); 10mM 2-mercaptoethanolで還元したhGH(○)



〔図 8〕 Cys53/Cys165変換体のRadioreceptor assay

A: hGH (●); [Ser165]hGH (▲); [Ala165]hGH (○)
 B: hGH (●); [Ala53]hGH (○); [Ala53, Ala165]hGH (▲);
 [Ala53, Ser165]hGH (□)

〈表 2〉 Cys53/Cys165変換体の脂肪細胞分化活性と受容体結合活性の比較

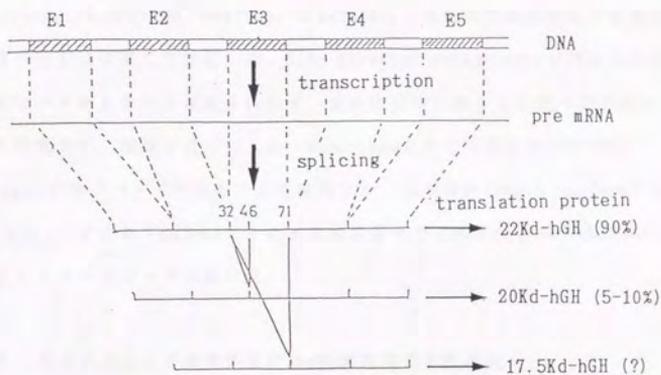
hGH variants	Biological activity a) (adipose conversion assay) (%)	Binding activity b) (Radioreceptor assay) (%)
Intact hGH	100	100
[Ala165]hGH	28 (14-40) c)	58
[Ser165]hGH	14 (8-18)	43
[Ala53]hGH	49 (35-63)	54
[Ala53, Ala165]hGH	44 (18-63)	53
[Ala53, Ser165]hGH	36 (30-40)	53
Reduced hGH	27	n. d. d)

- a) Relative biological activity is calculated by comparison with ED₅₀. Values are the mean of two to four experiments.
 b) Relative receptor-binding activity is calculated by comparison with IC₅₀. Values are the mean of two experiments.
 c) range
 d) not determined

第2節 スプライシング変異体及びTrp86変換体の構造活性相関

hGHの遺伝子は第17染色体にあり、5つのcoding sequence(exon)と4つのintervening sequence(intron)からなっている⁽⁴⁴⁾(図9)。この遺伝子はhGHの191アミノ酸のほかにN末に細胞外に分泌するための26アミノ酸からなるシグナルペプチドをコードしている。hGH遺伝子はpre mRNAに転写された後、スプライシングをうけてmature m-RNAとなり、さらに蛋白に翻訳後、プロセッシングにより分子量22000のhGH(22Kd-hGH)が合成される⁽²⁾。hGHにはheterogeneityが存在することが知られており、ヒト下垂体中には32-46番目のアミノ酸を欠損した分子量20000のhGH(20Kd-hGH)^(45,46)がhGH全体の5-10%存在する⁽⁴⁷⁾。20Kd-hGHは22Kd-hGHと同等の成長促進作用を示す⁽⁴⁸⁾が、hGHの副作用となる催糖尿病作用(diabetogenic activity)やインスリン様作用に関しては22Kd-hGHより低い^(49,50)といわれるが、変わらないという報告⁽⁴⁸⁾もある。20Kd-hGHはスプライシングの異常(alternative splicing)により生ずることが知られている^(51,52)。最近、同様のスプライシング変異により32-71番目のアミノ酸を欠損した分子量17500のhGH(17.5K-hGH)に相当するm-RNAが下垂体中に存在することが明らかとなったが、蛋白の存在は未確認である⁽⁵³⁾。そこで本節では人工的に20Kd-hGH及び17.5Kd-hGHを作製し、脂肪細胞分化活性、及び円二色性(CD)スペクトルを測定し、生物活性と高次構造について検討した⁽⁵⁴⁾。

またhGHと霊長類以外のGHとは70%近いアミノ酸の相同性があるが、Trp86は知られている全てのGHで保存され、hGHでは唯一のTrp残基である。このように保存されているアミノ酸を置換すると構造や機能に変化が生じる可能性が考えられた。本節ではさらにTrp86をTyrに置換したW86YhGH及びTrp86を欠失させた Δ W86hGHを作製し、生物活性と構造を検討した⁽⁵⁴⁾。



〈図9〉 hGHの発現様式

〈表3〉 splicing変異体, Trp86変換体の遺伝子作製に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列

変換体の種類	塩基配列
20Kd-hGH (Δ32-46)	d(TACCAGGAGTTCAACCCACAGACC)
17.5Kd-hGH (Δ32-71)	d(TACCAGGAGTTCAACCTTGAAGT)
W86YhGH (Trp86→Tyr)	d(TTCAGTCGT <u>T</u> ACCTGGAGCC)
ΔW86hGH (ΔTrp86)	d(TTCAGTCGTGGAGCC)

下線部分は変換するアミノ酸のコドンを示す。

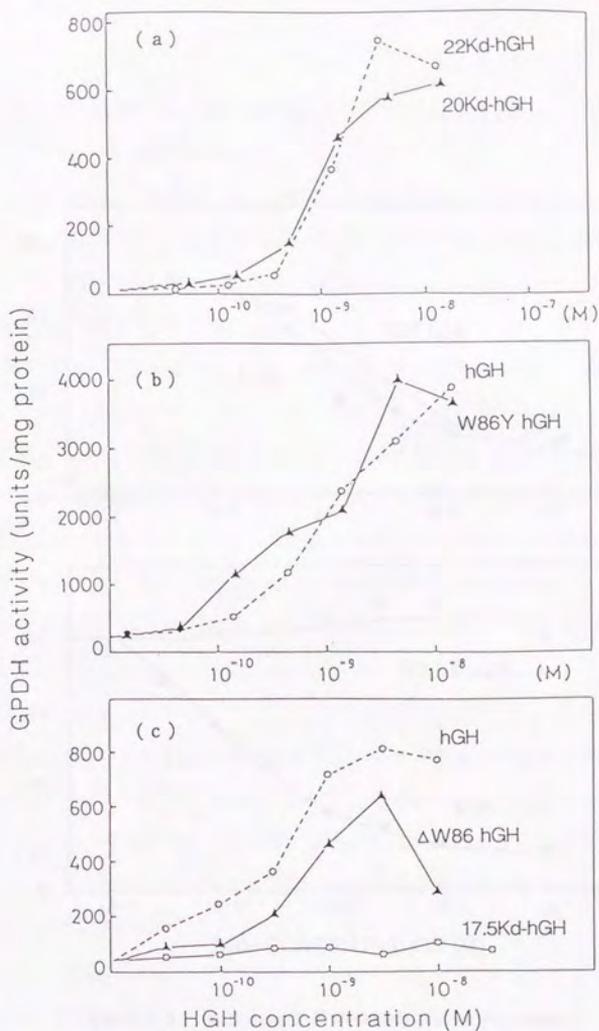
2. 1 hGH変換体の作製

20Kd-hGH, 17.5Kd-hGH, W86YhGH, Δ W86hGHの4種類の変換体遺伝子を第1節に述べた方法に準じて作製した。Site-directed mutagenesisに用いたデオキシオリゴヌクレオチドは表3に示す。変換体蛋白は第1節に述べた方法に準じて発現させ、精製を行った。Q-Sepharoseにかけた蛋白はSDS-PAGE (15% gel)で単一バンドであることを確認した。収率は約10mg/l cultureであった。なお、プラスミドpGH-L9をそのまま発現させたものをnative hGH (22Kd-hGH)としてコントロールに用いた。

2. 2 スプライシング変異体及びTrp86変換体の生物活性

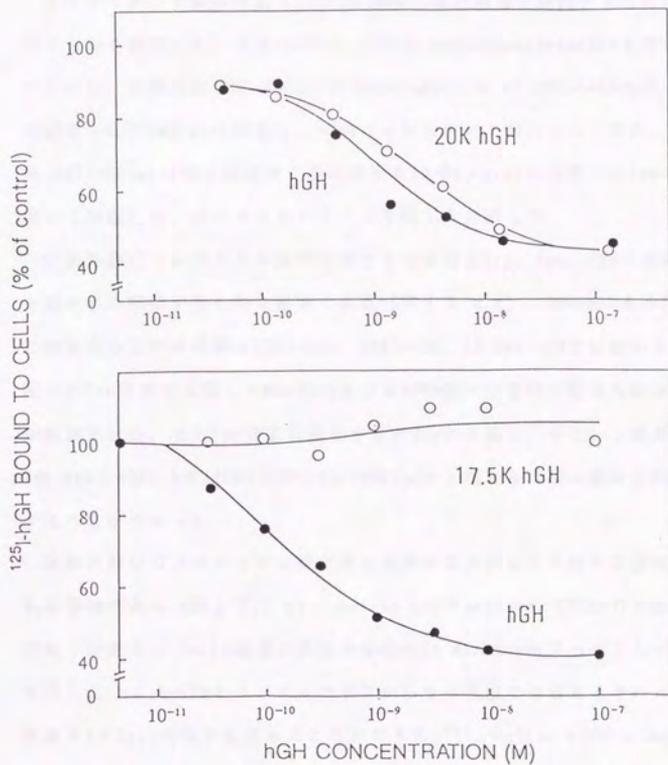
作製した変換体の脂肪細胞分化活性を第1節で述べた方法で測定した(図10)。20Kd-hGHは ED_{50} の値、最大分化活性とも22Kd-hGH (native hGH)と同等であったが(図10, a), 17.5Kd-hGHは測定の範囲では全く活性を示さなかった(図10, c)。また、受容体への結合能も20Kd-hGHではほとんど22Kd-hGHと変わらないが、17.5Kd-hGHでは全く結合が認められなかった(図11)。従って、hGHの32-46番目のアミノ酸残基は活性部位とは無関係であること、また47-71番目のアミノ酸残基には受容体への結合と活性発現に関与する領域が含まれている可能性、あるいはこれらのアミノ酸残基の除去によって活性高次構造に重大な変化が生じる可能性が示唆された。

一方、Trp86をTyrに変換したW86YhGHはnative hGHと同等の分化活性を示したが(図10, b), Trp86を除去すると、 ED_{50} の値がnative hGHの 3×10^{-10} Mから Δ 86YhGHでは 1×10^{-9} Mに変化し、活性の低下が認められた(図10, c)。この結果から、86番目のTrp残基自体は活性発現に関与するわけではないが、欠失すると活性構造に影響が及ぶ可能性が考えられた。



〔図 10〕 splicing変異体, Trp86変換体の脂肪細胞分化活性

- a: 22Kd-hGH (○); 20Kd-hGH (▲)
 b: 22Kd-hGH (○); W86YhGH (▲)
 c: 22Kd-hGH (○); 17.5Kd-hGH (□); ΔW86hGH (▲)



〈図 11〉 splicing変異体のRadioreceptor assay

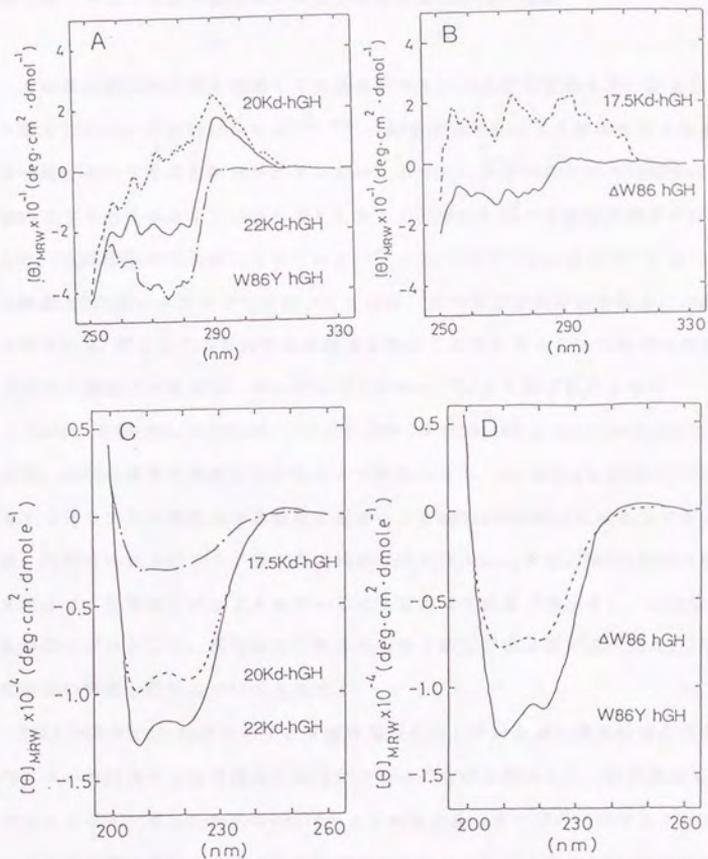
a: 22Kd-hGH (●); 20Kd-hGH (○)
 b: 22Kd-hGH (●); 17.5Kd-hGH (○)

2.3 円二色性(Circular Dichroism: CD)スペクトルによるhGH変換体の高次構造の検討

スプライシング変異体及びTrp86変換体の高次構造を検討するためにCDスペクトルを測定した。測定はJASCO J-500A spectropolarimeterを用いて25℃で行った。近紫外部(250-320nm)は10mMのammonium bicarbonate(pH8.4)で蛋白濃度を0.5-2mg/mlに調製し、10mmのセルを用いて測定した。また、遠紫外部(200-250nm)は同じ緩衝液で蛋白濃度を10-30 μ g/mlに調製し、1mmのセルを用いて測定した。スペクトルパターンを図12に示した。

近紫外部CDスペクトルは芳香族アミノ酸残基Trp, Tyr, Pheの側鎖の状態を反映する吸収が見られる領域である(図12, A, B)。290nmにあるTrp残基に特異的な正の吸収帯は22Kd-hGH, 20Kd-hGH, 17.5Kd-hGHでは認められたが、唯一のTrp残基を欠損したW86YhGH及び Δ W86hGHでは吸収が認められないことが確認された。またTyr残基に由来する278nmの θ 値は、チロシン残基の数が6個(20Kd-hGH), 8個(22Kd-hGH), 9個(W86YhGH)と増えるに従い負の方向に増大することがわかった。

遠紫外部CDスペクトルは蛋白質の主鎖の高次構造を反映する吸収がみられる領域である(図12, C, D)。native hGHでは208nm, 220nmの2箇所吸収極小がある α -helix構造に典型的なdouble minimumのスペクトルパターンを示した。 α -helixとランダムコイルからなる蛋白ではおよそその α -helix含量を $[\theta]_{222}$ の値から求めることができる⁽⁵⁵⁾。native hGHの α -helix含量を100%とすると、W86YhGHでは95%, 20Kd-hGHでは80%とほとんど変化なく、立体構造も保持されていると考えられるが、 Δ W86hGHではhelix含量が60%に、17.5Kd-hGHでは25%に著しく低下しており、全体構造が大きく変化していることが判明した。



【図 1.2】 splicing変異体, Trp86変換体のCDスペクトル

A, B: 近紫外外部CDスペクトル

C, D: 遠紫外外部CDスペクトル

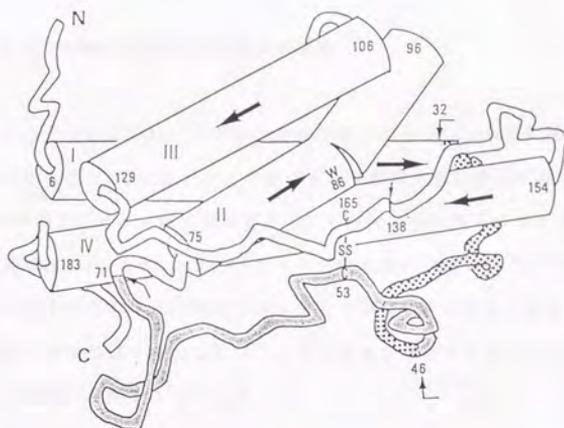
第3節 hGHの立体構造モデルによる活性高次構造の考察

hGHは遺伝子工学を利用して大量生産されているにも関わらず、結晶化が成功したという報告はあるが⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾、結晶構造解析による確固たる立体構造は現在のところまだ解明されていない。しかし、GHのなかでは1987年に初めてブタ成長ホルモン(pGH)に関して分解能2.8ÅのX線結晶解析が行われ、立体構造が明らかにされている⁽⁶⁰⁾。hGH⁽⁶¹⁾とpGH⁽⁶²⁾とは一次構造上70%近いホモロジーを持つことから、ほぼ同じ立体構造を取ることが予想される。図13にpGHの立体構造を基にしたhGHの3次元構造モデルを示す。構造上の特徴は、ランダムコイルループにより結ばれた4本の α -helix: I (6-33), II (75-96), III (106-129), IV (153-183)がanti-parallelに並び、束状の構造を形成していることである。4本の α -helixを構成しているhGHのアミノ酸配列を車輪状に表すと、各helixの内側には疎水性アミノ酸、外側には親水性アミノ酸が並ぶ両親媒性を示すことから、helixの束は疎水結合により緊密にパックされていることが示唆される(図14)。この立体構造モデルとCD、活性測定の結果から第1節及び第2節で述べたhGH変換体の構造と活性について考察する。

20Kd-hGHでは32-46番目のアミノ酸残基が欠損しているが、遠紫外部CDスペクトルの結果から全体構造の変化は少ないことが予想された。立体構造モデルによると欠損した部分はhelix I と II の間の長いループの一部であり、ループ領域の残りの部分によって欠損が補填されるために4本のhelixからなる束状構造には影響が及ばなかったと考えられる。17.5Kd-hGHではCDスペクトルから構造の大きな変化が認められたが、これはアミノ酸32-71番目までと長いループ領域の大部分が失われたため補填が効かず、helixの束状構造が大きく崩れていると考えられる。

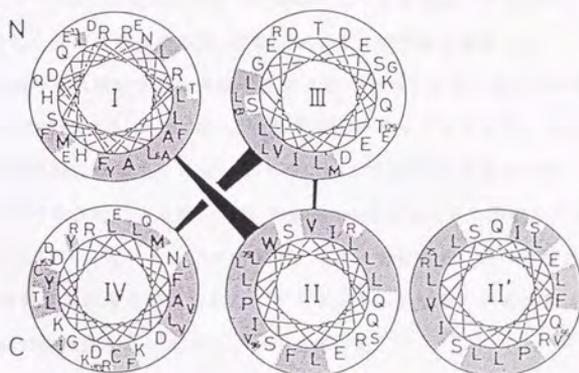
一方、 Δ W86hGHでは α -helix含量がnative hGHの60%に低下した。これは Trp86がhelix II の中程に存在するために、除去すると図14のhelix II' に示したように疎水性アミノ酸が片側に集まる傾向が失われ、helix構造が崩れることが推測された。W86YhGHでは、疎水性アミノ酸のTrpを親水性アミノ酸のTyrに変換したが、その他のアミノ酸のhelixにおける位置は変化しないため、helix構造は保持され、全体構造はほとんど変化しなかったと思われる。束状構造が崩れていると考えられる17.5Kd-hGHでは生物活性が認められず、 Δ W86hGHでも活性低下が認められた(図10)ようにhelix構造の変化と活性発現が比例することから、hGHの活性発現には4本のhelixからなる束状構造の保持が重要であることが示唆された。

一方、hGHの立体構造モデルにおいて、Cys53はhelix I と II の間のループ領域の中央に、Cys165はhelix IV の中程に位置し、53-165位のS-S結合の形成によりループとhelixの束状構造とは一定の位置に保たれていると考えられる。還元、アルキル化後プラスミンで限定分解して単離したN末1-134、C末141-191の各フラグメントを混合するとCDスペクトル上hGHの立体構造が回復する⁽²⁰⁾ことから、53-165位のS-S結合がなくても4本のhelixからなる束状構造は疎水結合により再構成されることが考えられる。従って、このS-S結合を失っても束状構造はかなり保持されるが、ループ領域は解けた状態になると思われる。第1節においてこの変化によって活性低下が認められたことから、hGHは束状構造だけではなく、ループ領域も含めて活性発現に寄与しており、53-165位のS-S結合は束状構造とループの活性発現に寄与する領域の両者を最大活性を生じるための最適な空間配置に保持していることが予想された。17.5Kd-hGHで活性が発現されない理由には、全体構造が変化したこと以外に、ループの活性発現に関与する領域が17.5Kd-hGHでは失われている可能性も含まれる。



〈図13〉 ブタGHの立体構造⁽⁶⁰⁾を基にしたhGHの立体構造モデル

α -helixをシリンダーで示し、I-IVと表示した。helix中の矢印はN末からC末の方向を、アラビア数字はhGHのアミノ酸残基の位置を示す。



〈図14〉 hGHの α -helixのアミノ酸残基の車輪状表示

α -helix (I-IV) のアミノ酸残基を車輪状に並べ、親水性アミノ酸を白で、疎水性アミノ酸を陰影で表示した。
II' は Δ W86hGHのhelix IIを車輪状表示したもの。

第4節 ループ領域の変換体の構造活性相関

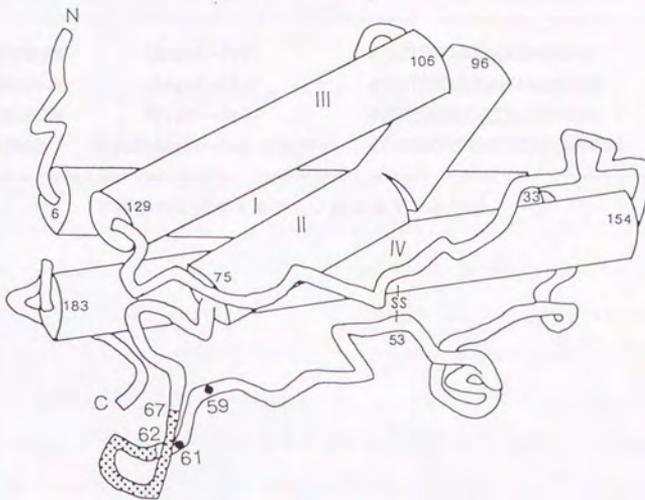
前節までに述べたように、hGHの活性発現には α -helixの束状構造の保持が重要であること、helix IとIIの間のループ領域も活性発現に寄与しているが、32-46番目のアミノ酸残基は関与していないことが明らかとなった。そこで、本節ではCys53とhelix IIの間のループ領域(54-74番目のアミノ酸残基)の突出した構造が受容体との相互作用に重要ではないかと考えて変換体を作製し、構造と活性発現を検討した⁽⁶³⁾。hGH及びマウスGH⁽⁶⁴⁾の54-74番目のアミノ酸配列を図15に示した。

4.1 変換体の作製

ループ領域の主鎖の骨格構造を固定している59番目と61番目に存在するPro残基を側鎖が小さく主鎖がflexibleになるAlaに各々置換したP59AhGH、P61AhGH、ともにAlaに置換したP59A-P61AhGH、また立体構造モデル(図16)で特に突出した部分に相当する62-67番目のアミノ酸残基を除去した Δ (62-67)hGHの4種類の変換体遺伝子を第1節に述べた方法に準じて作製した。Site-directed mutagenesisに用いたデオキシオリゴヌクレオチドは表4に示す。変換体蛋白は第1節に述べた方法に準じてHB101で発現させた。精製は第1節に述べた方法により行い、Q-Sepharoseで回収された蛋白をさらにMonoQ(HR5/5) FPLCを用いてリクロマトグラフィーを行った。2Lの培養液から10-15mgの精製変換体蛋白が得られた。プラスミドpGH-L9をそのまま発現させたものをnativeのhGHとしてコントロールに用いた。

	54					59	61	62	63	64	65	66	67						74		
hGH	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu
mGH	-	-	-	Thr	-	-	Ala	-	Thr	Gly	Lys	-	-	Ala	-	-	Arg	Thr	Asp	Met	-

〈図15〉 hGH⁽⁵²⁾とマウスGH(mGH)⁽⁶⁴⁾のループ領域(54-74)のアミノ酸配列



〈図16〉 hGHのループ領域の変換体

〈表4〉 ループ領域の変換体の遺伝子作製に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列

変換体の種類		塩基配列
P59AhGH	(Pro59→Ala)	d(GAAAGTATCG <u>CG</u> ACCCCT)
P61AhGH	(Pro61→Ala)	d(ATCCCGACCG <u>CTT</u> CTAAC)
P59A-P61AhGH	(Pro59, Pro61→Ala)	d(GAAAGTATCG <u>CG</u> ACCG <u>CTT</u> CTAAC)
Δ(62-67)hGH	(62-67 delete)	d(ATCCCGACCCCTCAGCAGAAATCG)

R64YhGH	(Arg64→Tyr)	d(CCTTCTAACT <u>AC</u> GAAAGAGACC)
R64EhGH	(Arg64→Glu)	d(CCTTCTAA <u>CGA</u> GAAAGAGACC)
E65PhGH	(Glu65→Pro)	d(TCTA <u>ACCGCC</u> CTGAGACCCAG)
63NAR	(Asp63-Arg64→Asp-Ala-Arg)	d(ACCCCTTCTA <u>AC</u> GCTCGCGAAGAG)

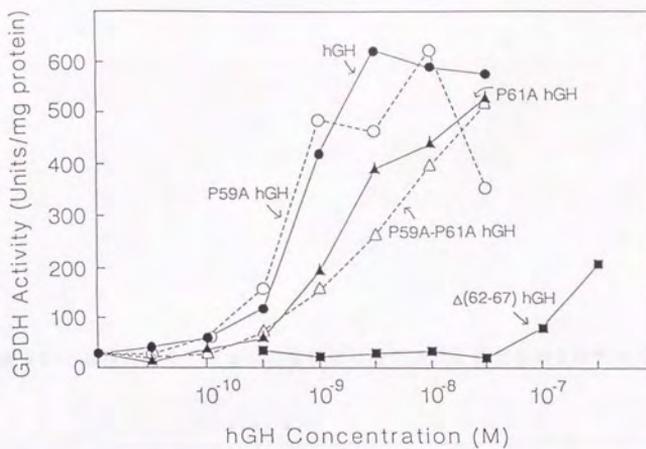
下線部分は変換するアミノ酸のコードンを示す。

4. 2 ループ領域の変換体の活性

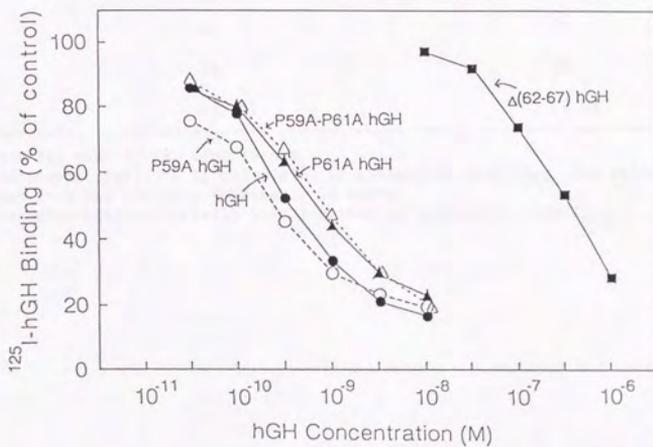
各変換体の3T3-F442A脂肪前駆細胞に対する脂肪細胞分化活性を第1節に述べた方法に従って測定した。図17に示すように、P59AhGHはnative hGHと同等の活性を示したが、P61AhGH及びP59A-P61AhGHは同程度の活性低下を示し、 ED_{50} より比活性を求めると約1/2に低下していた(表5)。さらに $\Delta(62-67)$ hGHでは極めて大きな活性低下が認められ、native hGHの約0.1%しか活性が発現されなかった。一方、各変換体の3T3-F442A脂肪前駆細胞のGH受容体への結合活性をやはり第1節に述べた方法により測定した。図18および表5に示すように、分化活性の低下とほとんどパラレルな受容体結合の低下が認められ、特に $\Delta(62-67)$ hGHでは受容体結合が極めて低下していることが判明した。これらの結果から、62-67番目のアミノ酸残基の除去は受容体と相互作用する活性構造に非常に重大な変化をもたらすこと、Pro61は活性構造形成に関与するが、Pro59は無関係であることが分かった。

4. 3 ループ領域の変換体の構造

変換体の立体構造の変化を調べるためにCDスペクトルの測定を行った。測定条件は、近紫外部(250-320nm)では20mMのTris-HCl(pH 8.4)を用いて蛋白濃度を1.1-1.7mg/mlに調製し、10mmのセルを用いて測定した。また、遠紫外部(200-250nm)は50mMの炭酸アンモニウム(pH 8.0)で蛋白濃度を100-140 μ g/mlに調製し、1mmのセルを用いて測定した。測定温度はいずれも20℃で行った。スペクトルパターンを図19に示す。各変換体は近紫外部CDスペクトル(図19, A1-3)、遠紫外部CDスペクトル(図19, B1-3)ともにnative hGHとはほぼ一致していた。このことから芳香環側鎖の環境、 α -helix含量の変化はほとんどなく、立体構造はhGHとよく似ていることが分かった。



【図17】 hGHのループ領域の変換体の脂肪細胞分化活性



【図18】 hGHのループ領域の変換体のRadioreceptor assay

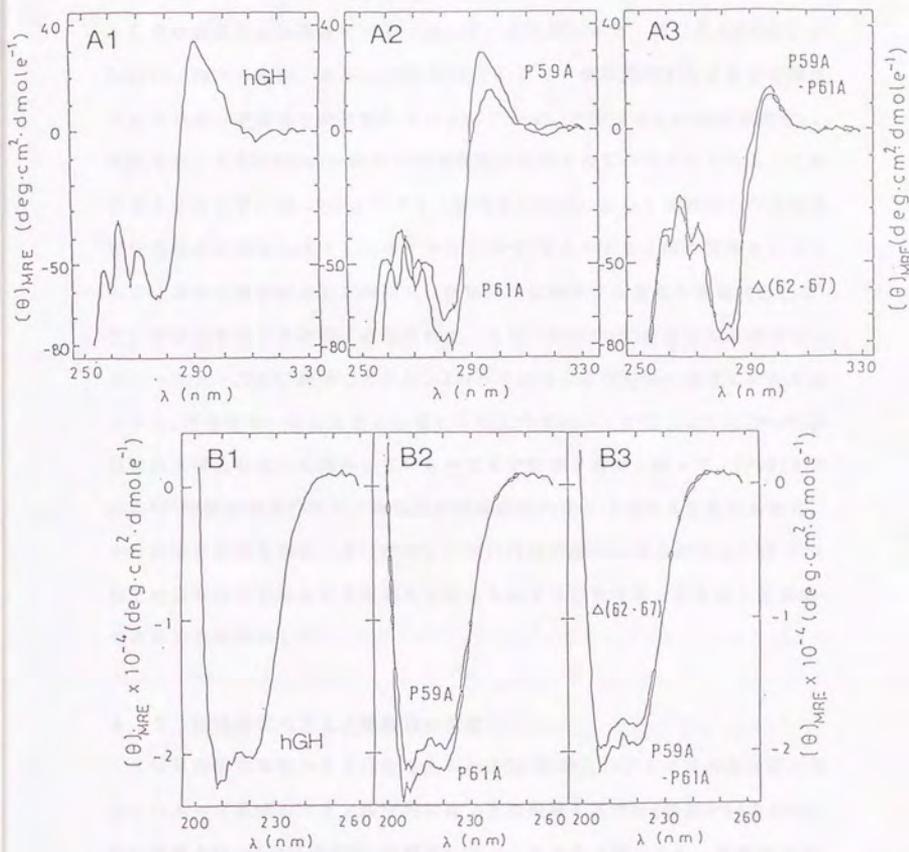
【表5】 hGHのループ領域の変換体の分化活性と受容体結合活性の比較

hGH Variants	Relative Biological Activity* (Adipose conversion assay) (%)	Relative Receptor-binding Activity** (Radioreceptor assay) (%)
hGH	100	100
P59A	102	138
P61A	46	67
P59A-P61A	39	36
Δ (62-67)	(0.16)	0.08

All values are the mean of two experiments.

* Relative adipogenic activity is calculated by comparison with ED₅₀. The value in parentheses was obtained from the putative dose-response curve.

**Relative receptor-binding activity is calculated by comparison with IC₅₀.



〈図19〉 hGHのループ領域の変換体のCDスペクトル

A 1-3 : 近紫外外部CDスペクトル

B 1-3 : 遠紫外外部CDスペクトル

4. 4 ループ領域の活性発現における役割

CDの結果と立体構造モデル(図16)から考えると、hGHのPro59、Pro61のAlaへの変換、あるいは62-67番目のアミノ酸残基除去による立体構造の変化はループ領域の局所的なコンホメーションの変化あるいは構造変化に限定され、4本のhelixからなる束状構造は保持されていると思われる。それにもかかわらず、62-67番目のアミノ酸残基の除去によって受容体への結合及び分化活性が顕著に低下したことから、62-67番目のアミノ酸残基あるいはそのごく近傍に受容体と相互作用し、活性発現に関与する重要な領域(活性部位)が存在することが強く示唆された。また、Pro61は活性部位の最適なコンホメーション形成に関与しており、Alaへの変換により主鎖の構造に変化が生じると、活性領域の空間配置に影響して相互作用の低下が起こること、Pro59は活性高次構造形成には関与していないことが推察された。従って、Pro61を含めた62-67番目付近のアミノ酸残基が活性部位のひとつであると考えられる。さらに受容体結合活性と分化活性との間に相関が見られることから、62-67位付近は受容体への結合に直接関与することにより活性発現を引き起こす領域であることが判明した。

4. 5 活性部位のアミノ酸残基の改変

hGHの活性部位のひとつと考えられる62-67番目のアミノ酸残基付近の突出したループ領域のアミノ酸配列には、正の荷電を持つArg残基が64番目に、負の荷電を持つGlu残基が65,66番目に存在しており(図15)、受容体との相互作用に関与している可能性が考えられた。そこでこれらのアミノ酸残基の活性発現における役割を詳細に検討するため、電荷やループのコンホメーションを変化させた次のような4種類の変換体を作製した。(1)Arg64を荷電を持たないが側鎖の体積がArgに近く水素結合を形成できるTyrに変換した

R64YhGH, (2) Arg64を負電荷を持つGluに変換したR64EhGH, (3) Glu65を荷電を持たず主鎖の角度を固定するProに変換したE65PhGH, (4) Asn63とArg64の間に荷電を持たないAlaを挿入した63NARhGH. 変換体作製に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列は表4に示した. 第4節4.1と同様の方法でこれらの変換体の遺伝子を作製し, 変換体蛋白の精製を行った.

4. 6 活性部位のアミノ酸残基の機能

各変換体の分化活性を図20に示した. Arg64をTyrに変換しても活性の変化は認められなかったが, Gluに変換したR64EhGHでは比活性がnative hGHの16%に低下した. また, Glu65をProに変換すると分化活性は約1/2に低下した. さらに63NARhGHでは活性がnative hGHの2%しか認められず, 顕著な低下が観察された.

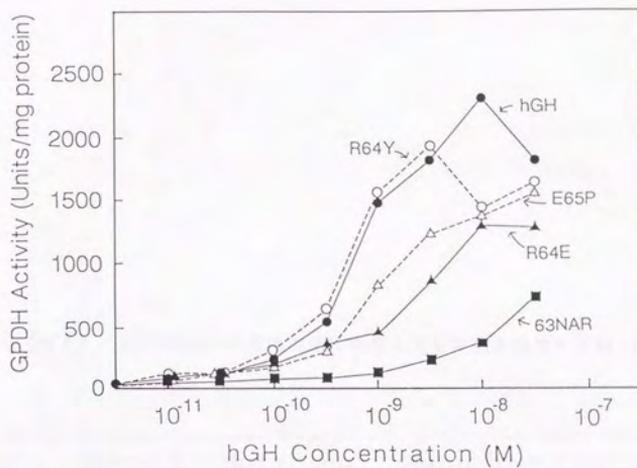
各変換体の結合活性を図21に示した. R64YhGHは分化活性の変化は認められなかったが結合活性は約1/4に低下していた. R64EhGHでも結合活性の低下は分化活性の低下よりも顕著で, native hGHの1%程度であった. 一方, 分化活性の低下を示したE65PhGHは, 受容体への結合性では変化がみられなかった. 63NARhGHでは分化活性と同様, 結合活性も大幅な低下を示した. 比活性を表6にまとめた. 分化活性と受容体への結合とはパラレルではなく, hGHと受容体との相互作用を考える上で興味深い結果が得られた.

また, 各変換体のCDスペクトルを4.3と同じ条件で測定した. 近紫外部スペクトルを図22に, 遠紫外部スペクトルを図23に示した. α -helix含量はR64YhGH, R64EhGHではnative hGHより若干増加しており, E65PhGH, 63NARhGHでは若干減少し, 290nmのTrp86に由来する吸収にも僅かに変化が認められたが, 大きな違いは認められなかったことから全体構造には重大な変化は生じていないと思われる.

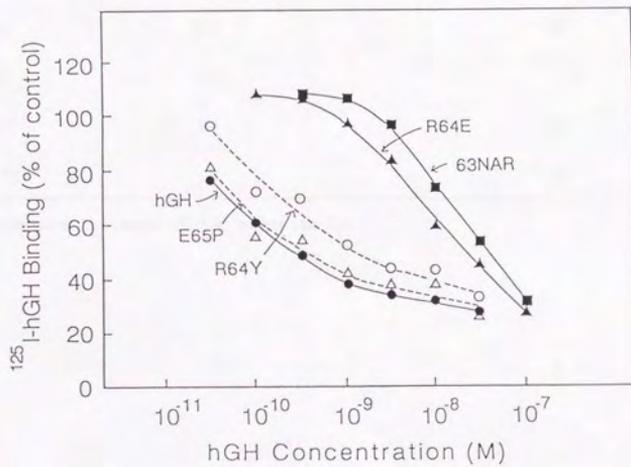
これらの結果から、各残基の役割について以下のような考察が可能である。まず、Arg64残基の側鎖の正電荷はおそらく受容体側の負電荷との結合に関与していると考えられる。Tyrに変換すると荷電を失い、この静電的相互作用は水素結合では代替されないために結合が低下し、負電荷を持つGluに変換すると反発が生じるために結合の低下が顕著におこるのであろう。しかし、R64Yでは活性は変わらず、R64Eでも活性発現の低下は結合の低下ほど大きくはなかったことから、Arg64は結合には重要であるが分化活性の発現には必要ではなく、むしろ障害的に働いているのかもしれない。データは示さないが、Arg64を荷電を持たないAlaに変換したR64AhGHについて同様の検討を行ったところ、結合は約1/2に低下したが、分化活性はnative hGHよりやや高い活性が認められていることも上に述べたことと矛盾しない。

一方、Glu65残基のProへの変換による側鎖の負電荷の消失とループ構造の固定化によって、結合活性は変化しないにもかかわらず分化活性の低下が認められた。このことからGlu65は結合には直接関与しないが、活性発現には寄与していると思われる。

Asn63とArg64の間にAla残基を挿入すると結合、分化活性とも大きく低下したが、これは1残基の挿入により受容体との相互作用に関わるhGHのアミノ酸残基の位置にずれが生じるためと推測された。このことからArg64、Glu65両残基が結合及び活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆される。



【図 20】 活性部位の変換体の脂肪細胞分化活性

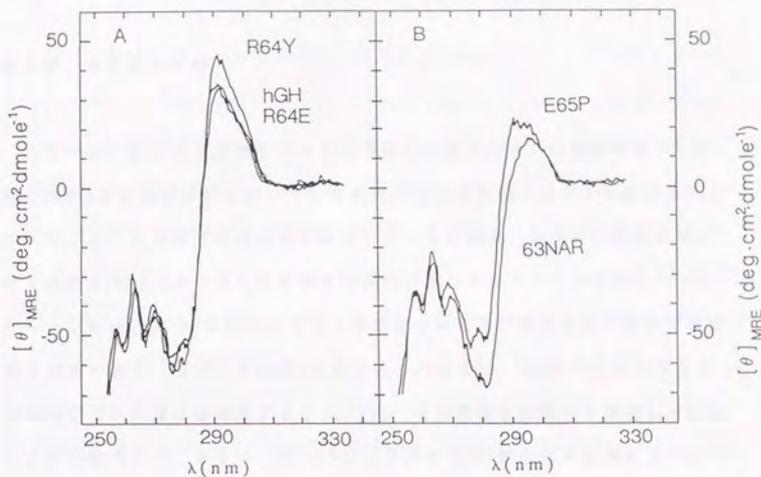


【図 21】 活性部位の変換体のRadioreceptor assay

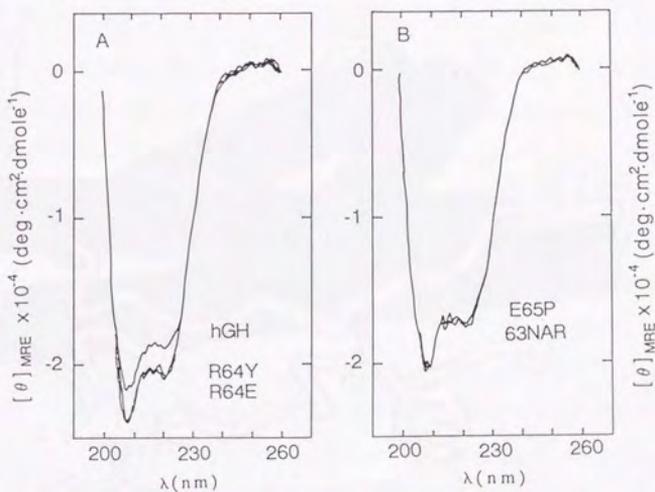
〈表 6〉 活性部位の変換体の分化活性と受容体結合活性の比較

hGH Variants	Relative Biological Activity (Adipose conversion assay) (%)	Relative Receptor-binding Activity (Radioreceptor assay) (%)
hGH	100	100
R64YhGH	112	28
R64EhGH	16	1.5
E65PhGH	44	96
63NARhGH	2	0.7

All values are the mean of two experiments.



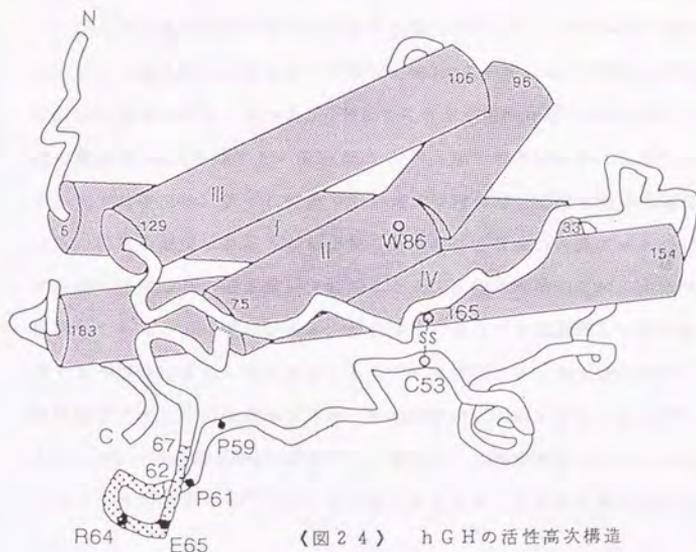
【図 2.2】 活性部位の変換体の近紫外外部 CD スペクトル



【図 2.3】 活性部位の変換体の遠紫外外部 CD スペクトル

第5節 まとめと考察

本章では、蛋白質工学的手法により作製した種々のhGH変換体について、3T3-F442A脂肪前駆細胞を用いてhGHの分化活性発現と構造を検討することにより、hGHの構造活性相関を研究した。その結果、hGHの活性発現には4本の α -helixからなる束状構造の保持が重要であることが判明した。またループ領域の62-67位付近のアミノ酸残基が結合及び活性発現に關する重要な領域であり、なかでもArg64は受容体との結合に、Glu65は結合には關与しないが活性発現には寄与すること、Pro61は活性構造の保持に機能していることが示唆された。さらに、53-165位に存在するS-S結合は束状構造とループに存在する活性領域との両者の最適な空間配置を保持するために機能していることが示唆された(図24)。



〈図24〉 hGHの活性高次構造

Trp86に関しては、これ自体は活性発現に関与しないが、欠失することによってhelix構造が崩れるために活性に影響すると考えられる。hGHと相同性を持ちlactogen活性を示すhPL(191アミノ酸)でも、やはり唯一のTrp残基であるTrp86を酸化剤BNPS-scatoleで酸化すると、修飾による構造変化のために受容体結合性、生物活性がやや低下するが、Trp残基自体は活性に必須ではないことが報告されている⁽⁶⁵⁾。bovine PRLでも、蛋白質工学的にhelixの中央付近にあるアミノ酸1残基を欠失させると、おそらく構造変化のために活性が消失することが報告されている⁽⁶⁶⁾。

蛋白質工学的手法によりhGHの受容体結合に関与する領域、アミノ酸残基を検索する試みは最近いくつか報告されている。Cunninghamらは、7-30残基からなるセグメント毎に、hGHとホモロジーがあるがヒトのGH受容体には結合しないhPRL、hPL、pGHのセグメントと交換するHomolog-Scanning、さらにアミノ酸1残基毎にAlaに変換するAla-Scanningという方法でhGHのヒト肝GH受容体に対する結合部位を検索した^(67,68)。その結果、54-74番目のアミノ酸残基からなるループ領域、helixIVの中央からC末までの領域(167-191番目のアミノ酸残基)、そしてこれらよりやや弱いhelixIのN末側の領域(2-19番目のアミノ酸残基)という3箇所の不連続な、しかし立体モデル上では空間的に近くに位置する領域が受容体結合部位であると報告している。彼らの研究はhGHとヒト肝GH受容体との結合を見ているのに対し、本研究ではマウスの系を用いていることと、生物活性発現に関与する構造を検討しているという違いがある。受容体への結合と活性発現とは必ずしも相関するわけではなく、たとえば、hGHのN末13アミノ酸を除去すると、受容体結合ではhGHと競合するが、生物活性は引き起こさないこと^(69,70)、あるいはbovine GHのhelixIIIのアミノ酸をいくつか変換するとアンタゴニストとして作用すること⁽⁷¹⁾などが報告されており、受容体と相互作用して活

性発現に関わる活性部位には結合部位とは別に活性発現のみに関与する部位が存在する可能性があり、活性部位の解明には生物活性の検討が必要である。

本研究で、受容体との結合及び分化活性発現に重要な領域と考えられた62-67位付近のアミノ酸残基はCunninghamら^(67,68)の指摘した結合部位と重複している。hGH遺伝子のexon 3は32-71位のアミノ酸をコードしているが、exon 3をrat PRLの配列に変換するとsomatogenicなGH受容体との結合が低下すること⁽⁷²⁾、exon 3の3残基(P37, E65, E66)を変換すると結合が低下すること⁽⁷³⁾も報告されていることから、この領域は種を問わず一般的にGHとGH受容体との結合に極めて重要な領域であると考えられる。特に、CunninghamらによるとArg64をAlaに変換すると受容体への結合が1/30にも低下するという。本研究ではArg64をAlaに変換すると3T3-F442A脂肪前駆細胞への結合は約1/2に低下することを確認している。結合低下の程度の違いはGH受容体の種特異性、すなわちマウスのGH受容体はヒトのGH受容体と比べて認識の厳密さが低いためではないかと推測される。しかしArg64をGluに変換するとマウスのGH受容体に対しても結合が1/70にも低下することから、GHと受容体との結合において64番目のアミノ酸残基の正電荷は重要であると思われる。Arg, Lys残基の結合、活性発現における役割は化学修飾によっても研究されてきた⁽¹⁶⁻¹⁸⁾が、特定の位置のアミノ酸残基について役割を検討することは蛋白質工学的手法によりはじめて可能となった。

Glu65に関してはこれまで活性発現との関連が報告されたことはない。しかし、hGHの受容体への結合がCa²⁺依存的に増加することから、負電荷をもつアミノ酸残基が結合に関与することが予測され、Glu31, Glu33が想定されている^(74,75)。本研究では検討しなかったが、62-67位付近の活性領域に存在するGlu66も受容体との相互作用に関与している可能性が高く、今後の検討によりループの活性領域にあるアミノ酸残基の活性発現における役割がより詳

細に解明されるものと思われる。

また、Cunninghamらによるとループ領域の他にN末、C末領域がsomatogenic receptorへの結合に関与するという。hGHのsomatogenic receptorとlactogenic receptorに対する結合部位の検討により^(76,77)、N末1-7番目のアミノ酸残基がsomatogenic receptorとの相互作用に重要であるということも報告されている。今後さらにN末、C末のアミノ酸残基に関しても分化活性発現への関与を詳細に検討することにより、hGHの機能構造がより明らかになるものと期待される。

第 2 章

脂肪前駆細胞の分化と 成長ホルモン受容体

序論で述べたように、GHの作用は他のポリペプチドホルモンと同様、細胞膜に存在する受容体を介して発現されると考えられているが、GHは極めて広範な作用発現に関与していることから、果してこれらの細胞応答が1種類の受容体を介して引き起こされているものなのか、あるいは複数の受容体が存在してそれぞれ別の作用発現に関与しているのか明らかではない。GH受容体に対するモノクローナル抗体との反応性の違いによりGH受容体は3つのサブタイプに分類されるという報告⁽⁷⁸⁾、IM-9と脂肪細胞とでは20Kd-hGHと22Kd-hGHとの結合比活性に差があることから成長促進作用とインスリン様作用では関与する受容体が異なるという報告^(79,80)等、GH受容体にはheterogeneityが存在する可能性が示唆されている。受容体のタイプの違いは共通のGH受容体あるいは受容体の結合subunitが、組織に特異的に存在する蛋白あるいはsubunitとassociateすることにより生じるのではないかという説もある⁽⁸¹⁾。分子レベルでのheterogeneityは明らかにはなっていない。

3T3-F442A脂肪前駆細胞ではGHは脂肪細胞への分化因子として直接作用すると考えられるが、分化後の3T3-F442A脂肪細胞ではGHが糖質・脂質の代謝調節作用に働くこと、分化前ではこの作用は認められないことが報告されている^(82,83)。これらの作用はいずれもGH受容体を介して発現されると考えられるが、そうであるとすると3T3-F442A脂肪前駆細胞で発現されているGH受容体は分化活性に関与するが、分化後の細胞には代謝調節という全く異なる働きに関与する受容体が発現されていることになる。従って、分化の前後でGH受容体が変化していることが予想される。しかし、GH受容体の数

($0.8-1.4 \times 10^4$ /cell), 親和性 (10^9 M^{-1}), 受容体の内在化(internalization)や分解は分化の前後で差異は認められないことが報告されている⁽¹³⁾。また, 3T3-F442A細胞のsubcloneで, GHによる分化を示さない3T3-C2細胞においてもGH受容体の数, 親和性, 受容体の内在化・分解は3T3-F442A脂肪前駆細胞と変わらないという⁽¹³⁾。従って, これらの細胞のGH受容体は数や親和性では区別ができないが分子種としては異なる可能性, あるいはGHと結合する分子種は同一だが受容体結合以降の情報伝達過程が細胞により差異があるために作用発現が異なる可能性が考えられる。そこで, 本章では3T3-F442A脂肪前駆細胞のGH受容体分子種に関する情報を得る目的で, アフィニティーラベルにより得られるGHと特異的に結合する細胞膜蛋白質分子種を基礎的に検討し, さらに分化後のF442A脂肪細胞, 分化能の異なる3T3-C2細胞と比較することにより作用発現との関連を検討した⁽⁸⁴⁾。

第1節 成長ホルモンと結合する細胞膜蛋白質の構造

1. 1 材料及び実験方法

試薬及び細胞

3T3-C2細胞は森川実博士（東京免疫薬理研究所）より供与していただいた。組換えhGHは住友製薬より入手した。 ^{125}I -hGHは第1章第1節1.1に述べた方法で標識した。ブタインスリン（局方標準品）は国立衛生試験所より入手した。二価架橋試薬であるDisuccinimidyl suberate (DSS)はPierce社より、ヒツジプロラクチン(oPRL)、PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride)はSigma社より購入した。その他の試薬はSigma社、和光純薬の特級品を用いた。

細胞培養

3T3-F442A脂肪前駆細胞及び3T3-C2細胞は10%CS含有DMEM培地を用いて継代培養した。実験には各細胞を100mm dishに 1×10^5 個播種し、CS10%を含むDMEM培地でconfluentまで増殖させ、confluent後2,3日以内のものを脂肪前駆細胞あるいは3T3-C2細胞として用いた。また脂肪細胞としては、3T3-F442A脂肪前駆細胞をdishにまき込んだ後、10%の牛胎児血清(FCS)とインスリン $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むDMEM培地を3日毎に交換し、confluent後さらに約10日間培養して十分に分化させたものを3T3-F442A脂肪細胞として用いた。このとき脂肪細胞が全細胞の90%以上存在することを確認している。

アフィニティーラベル

3T3-F442A脂肪前駆細胞、3T3-F442A脂肪細胞及び3T3-C2細胞は各々単層培養dish(100mm dish 10-20枚)より1 mM EDTA/PBS(pH 7.4)を用いて単離し、同じbufferで3回遠心洗浄後、0.1%(W/V) BSAを含むHanks' balanced salt

solution (HBSS) に 1×10^7 細胞/ml となるように懸濁した。この細胞懸濁液 0.5-1ml を、 ^{125}I -hGH (10nM) と共に 23°C で 1 時間インキュベートすることにより ^{125}I -hGH と細胞との結合を行わせた。hGH の結合特異性を検討する場合には過剰量 (3 μM) の非標識 hGH あるいは oPRL を共存させてインキュベートを行った。インキュベート後、細胞を氷冷した albumin 不含 HBSS で 3 回遠心洗浄して結合しない ^{125}I -hGH を除き、直前に DMSO (Dimethylsulfoxide) に溶かした二価架橋試薬 DSS を終濃度 1mM となるように添加し、15°C で 15 分間架橋反応を行った。反応は 10 倍量の氷冷 10mM Tris-HCl (pH 7.4) / 1mM EDTA / 5mM N-ethylmaleimide (NEM) 溶液を加えて停止した。細胞を PBS を用いて洗浄後、2mM PMSF, 5mM NEM を含む 0.25M ショ糖溶液に懸濁し、ダウンスホモジナイザーで 200-300 ストロークによりホモジナイズした。500xg で 10 分間遠心して核及び未破壊の細胞を沈渣として除き、上清を 100,000xg で 30 分間の超遠心を行うことにより細胞の粗膜画分を pellet として得た。

電気泳動, オートラジオグラフィー

得られた粗膜画分の pellet は還元剤 Dithiothreitol (DTT) 100mM を含むあるいは含まない電気泳動用 sample buffer (6M Urea, 3% (W/v) SDS, 10% (W/V) glycerol, 5 mM NEM, 0.001% Bromophenol Blue, 60mM Tris-HCl pH 6.8) を加え、95°C, 5 分間加熱して可溶化した。等量の可溶化膜蛋白を Laemmli の方法⁽¹⁰⁸⁾に基づいて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。ゲル濃度は濃縮ゲル 4%, 分離ゲルは 7.5% または 5% を用いた。通常、1 レーンに 5000-12000 c. p. m. の sample を泳動した。分子量マーカーとして Bio Rad 社の高分子量マーカーを同時に泳動した。ゲルは染色液 (0.25% Coomassie brilliant blue R / 45% エタノール / 10% 酢酸) で染色し、脱染後乾燥した。オートラジオグラフィーは増感紙を装着したカセット中で、乾燥したゲルを

Kodak社のX-OmatAR5フィルムと密着させ、 -70°C で1,2週間露光した。

非還元-還元二次元ゲル電気泳動

二次元電気泳動の場合、まず粗膜画分を還元剤を含まない電気泳動用 sample bufferに可溶化し、5%のポリアクリルアミドゲルで一次元目の電気泳動を行った。適当なレーンを切断し、100mM DTTを含むsample buffer中で 23°C 、10分間振とう後、7.5%のポリアクリルアミドゲルの上に切断したレーン を載せ、二次元目の電気泳動を行った。以後同様に染色、脱染、乾燥後オートラジオグラフィーを行った。

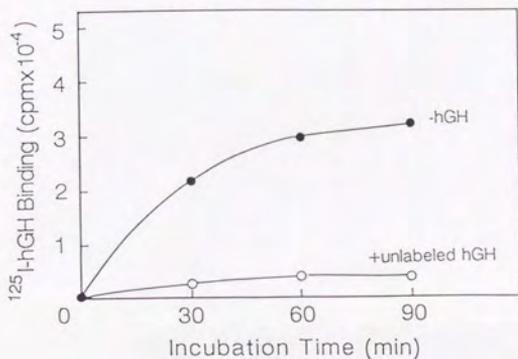
1. 2 3T3-F442A脂肪前駆細胞のアフィニティーラベル

3T3-F442A脂肪前駆細胞においてGHと特異的に結合する膜蛋白質をアフィニティーラベルにより検討した。細胞と ^{125}I -hGHの結合Kineticsを調べると(図25)、 23°C では1時間では飽和に達することから、この条件で結合反応を行った後にcrosslinkingを行った。細胞膜画分を7.5%のポリアクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラフィーを行ったところ、主要なバンドは分子量130Kdに得られ、さらに低分子量(Mr 60Kd)、及び高分子量(Mr 230Kd及び230Kd以上)のバンドも検出された(図26)。60Kdのバンドはかなり薄弱で、実験によっては検出されないこともあった(図29, lane a)。細胞膜画分を5%のゲルで分離すると、130Kd、230Kd、300Kdのバンドが認められた(図29, lane e)。いずれのバンドも細胞と標識hGHの結合時に過剰量の非標識hGHが存在すると消失した(図26, lane b,e)。hGHはGH受容体の他にプロラクチン受容体にも結合することが知られているが、いずれのバンドもプロラクチンでは阻害されなかった(図26, lane c,f)ことから、130Kd、60Kd、230Kd、300KdのバンドはすべてhGHとsomatogenic

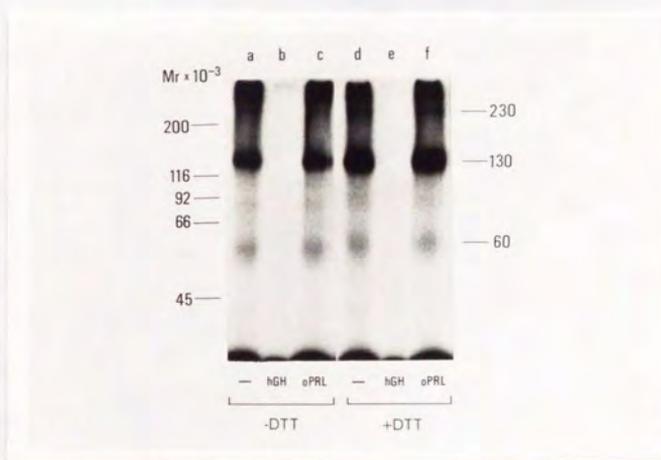
な結合性を示す膜蛋白質との複合体に由来する特異的なバンドであると考えられた。hGHの分子量は22KdなのでGHと結合する主要な膜蛋白質の分子量は約110Kdと計算される。バンドの構成は還元剤DTTの有無で変化がみられなかったが、DTTが存在すると60Kd、130Kdのバンドの泳動距離がわずかながら変化することから、これらの分子種は分子内ジスルフィド結合を有すると思われる(図26)。非還元-還元二次元電気泳動を行ったところ、230Kd等の高分子量バンドから130Kdの複合体が生じていることが示された(図27)。このことから、高分子量の複合体は110Kdの膜蛋白質あるいはその分解物とhGHとの複合体が分子間ジスルフィド結合や架橋剤により多量体化したものと考えられる。

1. 3 3T3-F442A脂肪細胞及び3T3-C2細胞のアフィニティーラベル

3T3-F442A脂肪細胞、3T3-C2細胞について同様にアフィニティーラベルを行い、GHと結合する膜蛋白質を3T3-F442A脂肪前駆細胞のものと比較した。図28に示すように3T3-F442A脂肪前駆細胞と3T3-F442A脂肪細胞ではGHと膜蛋白質との複合体の主要バンドは130Kdの同じ位置に得られ、その他のバンドに関しても、同時に標識を行った3T3-F442A脂肪前駆細胞と同様に検出された(図28, lane a-d)。5%ゲルで分析すると、3T3-F442A脂肪前駆細胞と同様に130Kd, 230Kd, 300Kdの3本のバンドが認められ、結合特異性にも差異は認められなかった(図28, lane e-g)。また、3T3-C2細胞の場合でもバンドの位置、結合特異性とも3T3-F442A脂肪前駆細胞と同じ結果が得られた(図29)。また非還元-還元二次元電気泳動により、3T3-F442A脂肪細胞、3T3-C2細胞の場合でも高分子複合体から130Kd複合体を生じた(data not shown)。このことからC2細胞、F442A脂肪細胞膜に存在するGHと結合する膜蛋白質はF442A脂肪前駆細胞に発現されているものと極めて類似していることが判明した。



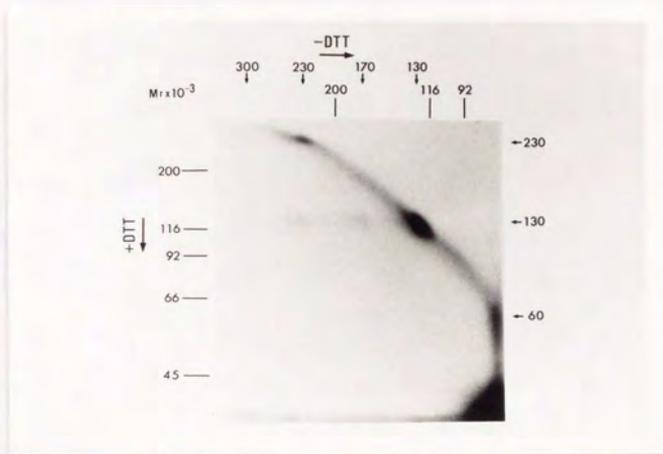
《図 2 5》 3T3-F442A脂肪前駆細胞への ^{125}I -hGHの結合Kinetics



《図 2 6》 3T3-F442A脂肪前駆細胞の ^{125}I -hGHによるアフィニティー標識

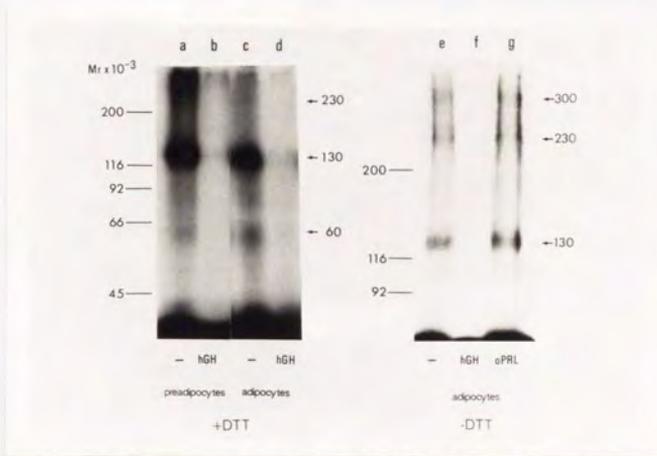
3T3-F442A脂肪前駆細胞と ^{125}I -hGHを過剰量の非標識hGH(lane b, e), ovine PRL(lane c, f)存在下,あるいは非存在下(lane a, d), 23°C, 1時間incubate後, DSS 1mMで架橋した. 細胞膜画分を調製し, 7.5% gelでSDS-PAGEを行った.

lane a-c:-DTT; lane d-f: +DTT 100mM



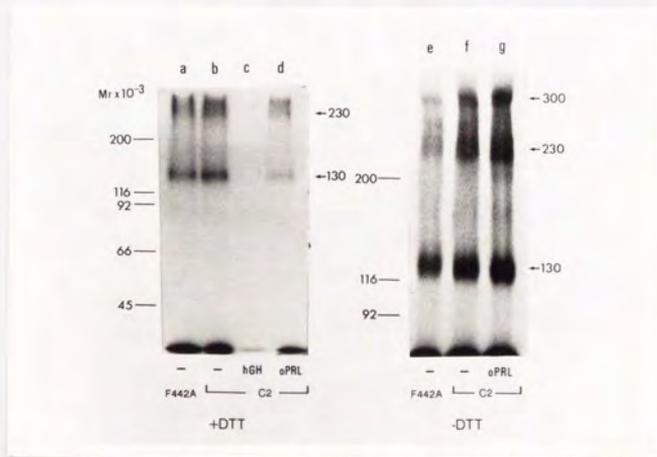
《図 2 7》 3T3-F442A脂肪前駆細胞のhGH-膜蛋白質複合体の非還元-還元二次元電気泳動

3T3-F442A脂肪前駆細胞と ^{125}I -hGHをDSSで架橋後，膜画分を調製し，一次元目-DTT, 5% gel, 二次元目+DTT, 7.5% gelの条件でSDS-PAGEを行った。



《図 2 8》 3T3-F442A脂肪前駆細胞と3T3-F442A脂肪細胞の ^{125}I -hGHによるアフィニティーラベルの比較

3T3-F442A脂肪前駆細胞及び3T3-F442A脂肪細胞を過剰量の非標識hGH (lane b, d, f), oPRL (lane g) 存在下または非存在下 (lane a, c, e), ^{125}I -hGHと23°C, 1時間incubate後, DSSで架橋した. 細胞膜画分を調製し, +DTT, 7.5% gel (lane a-d), または-DTT, 5% gel (lane e-g) の条件でSDS-PAGEを行った.



《図 2 9》 3T3-F442A脂肪前駆細胞と3T3-C2細胞の ^{125}I -hGHによるアフィニティーラベルの比較

3T3-F442A脂肪前駆細胞及び3T3-C2細胞を過剰量の非標識hGH (lane c), oPRL (lane d, g) 存在下または非存在下 (lane a, b, e, f), ^{125}I -hGHと23°C, 1時間incubate後, DSSで架橋した. 細胞膜画分を調製し, +DTT, 7.5% gel (lane a-d), または-DTT, 5% gel (lane e-g) の条件でSDS-PAGEを行った.

第2節 成長ホルモンと結合する細胞膜蛋白質の糖鎖

2.1 材料及び実験方法

細胞膜蛋白質のシアリダーゼ処理

細胞と ^{125}I -hGHとを本章第1節に述べた方法で架橋反応を行い、細胞を1回PBSで洗浄した後、シアリダーゼ(Neuraminidase, *Vibrio cholerae*; Calbiochem Boehringer社) 25U/1を加え、37°Cで10分間反応させた。細胞を洗浄後、第1節に述べた方法に従って膜画分を調製し、オートラジオグラフィを行った。

細胞のツニカマイシン処理と ^{125}I -hGH結合実験

35mmの培養用dishに 1×10^4 個の3T3-F442A脂肪前駆細胞及び3T3-C2細胞をまき込み、本章第1節に述べたのと同様の方法で3T3-F442A脂肪前駆細胞、3T3-F442A脂肪細胞、及び3T3-C2細胞のconfluentの単層培養細胞を調製した。1mlの10%CS含有DMEM培地にツニカマイシンを添加して細胞を37°Cで24時間培養した後、dishのまま0.1%(W/V)のBSAを含むHBSSで3回洗浄し、同じ緩衝液中で ^{125}I -hGH(0.3nM)と共に23°Cで1時間インキュベートして結合反応を行った。緩衝液を除去して反応を止め、さらに3回洗浄した後、細胞を回収して細胞に結合した放射能をオートガンマカウンターで測定した。特異的結合量は、非標識hGH(3 μM)を結合反応に共存させて非特異結合を求め、全結合量から差し引いて算出した。また同時に培養した細胞をトリプシン処理し、ヘモサイトメーター及びコールターカウンターで細胞数を求めた。

2. 2 シアリダーゼによる影響

3T3-F442A脂肪前駆細胞においてGHが結合する膜蛋白質の糖鎖に関して検討するために、アフィニティーラベル後さらにシアリダーゼ処理してオートラジオグラフィーを行ったところ、主要なバンドの分子量は130Kdから120Kdに低下した(図30, lane a, b)。このことは3T3-F442A脂肪前駆細胞で発現されている、GHと結合する110Kdの膜蛋白質は末端に10Kd相当のシアル酸が付加した糖鎖を有していることを示している。

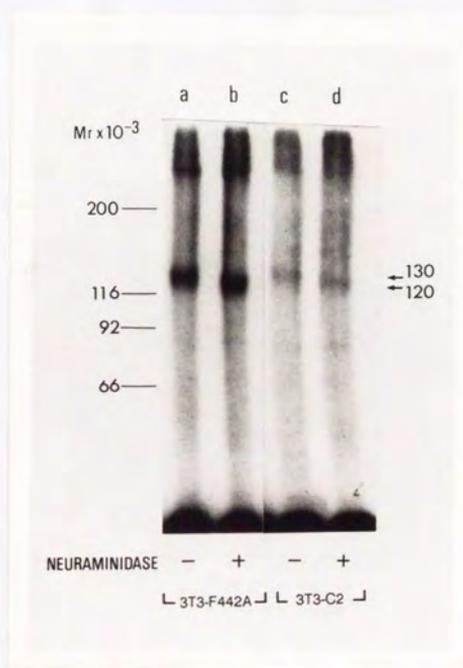
3T3-C2細胞(図30, lane c, d)及び3T3-F442A脂肪細胞(data not shown)に関してもシアリダーゼ処理を行い、オートラジオグラフィーを行った。この場合も3T3-F442A脂肪前駆細胞の場合と同様に主要バンドの分子量が130Kdから120Kdへ低下した。このことから3T3-C2細胞、3T3-F442A脂肪細胞に発現されているGHと結合する110Kdの膜蛋白質も3T3-F442A脂肪前駆細胞の場合と同様にシアル酸が結合した糖鎖を表現していることが判明した。

2. 3 hGH結合のツニカマイシンによる影響

アスバラギンN-結合型糖鎖の合成を阻害するツニカマイシン^(85,86)と共に3T3-F442A脂肪前駆細胞を24時間培養後、¹²⁵I-hGHの特異的結合の変化を調べた。ツニカマイシン0.1 μ g/mlの添加では細胞数に変化はおこらないが、¹²⁵I-hGHの結合の有意な低下が認められた(表7)。ツニカマイシン0.3 μ g/mlを作用させると細胞数がわずかに低下するが、hGHの結合の低下はさらに顕著で、無処理の16%の結合しか認められなかった。

3T3-F442A脂肪細胞、3T3-C2細胞の場合も、ツニカマイシン処理によりhGHの結合が3T3-F442A脂肪前駆細胞の場合と同程度に低下した。ツニカマイシンでアスバラギンN-結合型糖鎖の合成を阻害することによりhGHの結合が低下したことから、いずれの細胞でもGHと結合する膜蛋白質にはアス

パラギンN-結合型糖鎖が発現されており、この糖鎖がGHとの結合性に重要な役割を果たしていることが示唆された。



【図30】 hGH-膜蛋白質複合体のneuraminidaseによる変化

3T3-F442A脂肪前駆細胞 (lane a,b) または3T3-C2細胞 (lane c,d) と¹²⁵I-hGHをDSSで架橋後、neuraminidase(25 units/l)で処理した。膜画分を調製し、7.5% gelでSDS-PAGEを行った。

lane a,c: 無処理; lane b,d: neuraminidase処理

【表 7】 ^{125}I -hGHの3T3細胞への結合に対するtunicamycin前処理の影響

confluentに増殖した細胞をtunicamycin各濃度で37°C, 24時間処理した後,
 ^{125}I -hGHと23°C, 1時間incubateして細胞への特異的結合を調べた。同時に
 細胞数をカウントし, dish当りで表示した。

各値はtriplicate dishでの mean±S.D. で表示した。

Tunicamycin ($\mu\text{g/ml}$)	3T3-F442A preadipocytes		3T3-F442A adipocytes		3T3-C2 cells	
	Cell number ($\times 10^{-5}$)	^{125}I -labelled hGH bound/cell (%)	Cell number ($\times 10^{-5}$)	^{125}I -labelled hGH bound/cell (%)	Cell number ($\times 10^{-5}$)	^{125}I -labelled hGH bound/cell (%)
0	2.8±0.3	100.0±4.9	2.9±0.4	100.0±13.3	6.0±0.2	100.0±7.8
0.1	2.7±0.3	73.8±2.9*	3.6±0.4	56.9±13.0*	5.3±0.4	75.0±8.9*
0.3	2.1±0.2*	16.1±7.3**	2.7±0.3*	17.8±6.0**	5.0±0.4*	13.2±7.0**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control (Student's *t*-test).

第3節 まとめと考察

本章では3T3-F442A脂肪前駆細胞のGH受容体分子に関して検討する目的でアフィニティーラベルを行い、GHと特異的に結合する膜蛋白質の性状、糖鎖について検討した。また分化後の脂肪細胞、分化能を示さない3T3-C2細胞の場合と比較した。3T3-F442A脂肪前駆細胞に発現されているGHと結合する主要な膜蛋白質は、末端にシアル酸10Kd相当を有するN-結合型糖鎖を表現した。分子内S-S結合をもつと考えられる分子量110Kdの糖蛋白質であることが判明した。GHが受容体に結合することにより分化活性を発現するのであれば、アフィニティーラベルにより分化発現に関与するGH受容体が検出されることが期待されることから、この110Kdの膜蛋白質はGH受容体そのもの、あるいはGH受容体の結合subunitである可能性がある。アフィニティーラベルでは110Kd蛋白質とhGHとの複合体に由来する130Kdの他に300Kd, 230Kd, 60Kdの複合体が得られたが、これらも受容体に関連した複合体である可能性が考えられる。

SchwartzとCarter-Suは3T3-F442A脂肪前駆細胞及び3T3-F442A脂肪細胞のGH受容体のアフィニティーラベルについて報告している⁽⁸⁷⁾。彼らの結果は本章で得られた複合体の分子量とほぼ一致している。主要なGH・受容体複合体は分子量134Kdに得られ、高分子量複合体(239Kd, 332Kd, 450Kd)の存在も報告しているが、低分子量の複合体は認めていない。

GH受容体のアフィニティーラベルによる解析は種々の細胞に関して報告されている。主な結果を表8にまとめた。生細胞を用いた場合、ラット肝細胞⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾、ラット脂肪細胞⁽⁹¹⁻⁹³⁾、ヒトIM-9リンパ球^(94,96)のいずれの細胞でも3T3-F442A脂肪前駆細胞の場合と同様、分子量130-140Kdの主要なhGH・受容体複合体が高分子量、低分子量複合体と共に得られることが報告され

《表8》GH受容体のアフィニティーラベルにより得られるhGH・受容体complexの分子量

受容体の由来		complexの分子量	文献
intact cell	human IM-9	130K	96
		140K, 270K	94
	rat hepatocytes	130K, 220K, 300K	88, 89
		40K, 63K, 130K, 220K, 300K	90
	rat adipocytes	56K, 130K, 240K, 310K	92
		134K, 270K	91, 92
	mouse F442A preadipocytes adipocytes	134K, 239K, 332K, 450K	87
		134K, 239K, 332K, 450K	87
microsome membrane	human liver	75K, 124K	102
		rat liver	117K
	rabbit liver	58K, 80K, 140K	98
		75K	96
		54K, 130K	101
	rabbit adipose	54K, 130K	101
	mouse liver	56K, 62K, 125K	97
solubilized membrane	rat liver	43K, 55K, 86K, 95K	99
		54K	100

ている。一方、ウサギ、マウスの肝細胞膜あるいは精製受容体のアフィニティーラベルからは分子量50-80Kdの複合体が多く得られている⁽⁹⁵⁻⁹⁸⁾。

1987年にLeungら⁽¹⁰³⁾によりウサギ肝細胞から精製されたGH受容体を用いて、ウサギ及びヒトのGH受容体のcDNAがクローニングされた。塩基配列によるとGH受容体は620個のアミノ酸からなる分子量70Kdの蛋白で、精製受容体蛋白の分子量130Kdとの差は糖鎖の結合によるものと考えられている。この受容体蛋白は分解を受け易いことも報告されており、細胞膜画分及び精製受容体のアフィニティーラベルにより得られる50-80Kdの複合体は蛋白分解産物であると思われる。ウサギ肝GH受容体と他の種、他の細胞系のGH受容体との相同性は不明であるが、本研究でアフィニティーラベルにより低分子量に現れた複合体も受容体分子と思われる110Kd分子種の分解産物である可能性が高いが、受容体のsubunit、あるいは受容体とassociateした分子である可能性も考えられる。また高分子量に出現する複合体は二次元電気泳動の結果から110Kd分子あるいはその分解産物とhGHとの複合体が多量体化したものと考えられる。しかし、これらの複合体は各々受容体の別の役割を担っているものである可能性も有り、これらの可能性についてはさらに検討が必要である。

GH受容体の糖鎖に関しては、ウサギ肝GH受容体がシアロ糖蛋白であること^(104,105)、またIM-9リンパ球のGH受容体に関しては種々のglycosidaseを用いて検討され、N-結合complex型糖鎖を持つことが明らかにされている⁽⁹⁴⁾。クローニングされたGH受容体の塩基配列にはN-結合型糖鎖の結合部位であるAsnが8箇所ある⁽¹⁰³⁾。本章で述べたように、3T3-F442A脂肪前駆細胞でGHと結合する110Kdの膜蛋白質はシアリダーゼにより分子量が低下すること、IM-9で認められたのと同様に⁽¹⁰⁶⁾、ツニカマイシン処理によって細胞へのGH結合の低下が起こることから、GHの結合に関与する分子種は

シアル酸を有するN-結合型糖鎖を持ち、しかもこの糖鎖はGHとの結合性に重要な役割を果たしていると考えられる。最近、ラット脂肪細胞のGH受容体について、受容体がシアル酸を10Kd相当を有すること、N-結合型糖鎖は受容体の親和性に影響することが報告され⁽¹⁰⁷⁾、本研究の結果と一致している。

本章ではGHの作用発現の違いがGH受容体分子の差異によるものかどうかを検討するために、分化後の3T3-F442A脂肪細胞、分化能を持たない3T3-C2細胞についてもアフィニティーラベルを行い3T3-F442A脂肪前駆細胞と比較した。しかしこれらの細胞において、GHによる細胞応答は明らかに異なるにも関わらず、GHと結合する主要膜蛋白質はいずれも110Kdで、結合特異性、糖鎖結合性にも差異が認められなかった。この膜蛋白質がGH受容体であるとする、これらの細胞で発現されているGH受容体の性状は大変類似していると考えられる。アフィニティーラベルでは分子量の僅かな違いを検出することが困難であり、また糖鎖に関してより詳細な検討をすると差異が認められることも考えられる。細胞内に存在するsubunit等は架橋が困難で検出されないことがあるため、受容体のsubunit構成が異なっているにもかかわらず差異が見いだされなかったという可能性も考えられる。しかしGH受容体あるいは結合subunitは各々の細胞で酷似しているということから、細胞応答の違いはGHの受容体への結合のレベルではなく、受容体にGHが結合した後細胞内に二次反応を引き起こすための機構、例えば機能発現に関与する受容体のsubunit、受容体とassociateする分子、細胞内でのシグナル伝達経路等が異なるために引き起こされるのではないかと考えられる。

Leungらにより報告されたGH受容体の一次構造はPRL受容体^(109,110)と類似しているが、最近の受容体に関する研究の進展に伴い、IL-2受容体 β 鎖、IL-6受容体、エリスロポエチン受容体とも構造上ホモロジーがあることが指

摘され、さらにIL-3, IL-4, IL-7, GM-CSFの各受容体と共に新しいサイトカインレセプターファミリーを形成していることが判明した^(111,112)。このレセプターファミリーはすべてN末側が細胞外、C末側が細胞内にある膜貫通部位が1箇所の糖蛋白質で、細胞外ドメインの約200アミノ酸からなる領域は相同性があり、特にN末側にある4個のCys残基の位置及びTrp-Ser-X-Trp-Ser (WSxWS)モチーフ (GH受容体には存在しない) が保存されているという共通の構造を持つ。一方、細胞内ドメインは各受容体で全く異なるが、いずれも既知のプロテインキナーゼなどシグナル伝達に関与する機能を持つ構造と相同な配列は存在せず、シグナル伝達経路についてはほとんどわかっていない。しかし、IL-6受容体では80Kdの受容体がIL-6と結合後、gp130というアフィニティーラベルでは検出されない分子と会合し、この分子がシグナル伝達分子として機能することが報告されている⁽¹¹³⁾。同じ受容体ファミリーに属することからGHの場合も同様のシグナル伝達メカニズムが存在する可能性も考えられる。すなわち、GH受容体によるシグナル伝達にはgp130のように受容体と会合することにより機能するシグナル伝達分子が存在し、その分子の違いにより異なる細胞応答が起こることかもしれない。今後はGH受容体と会合する分子の存在に関して検討を行うことが必要であろう。

GHの細胞内シグナル伝達経路はまだ不明であるが、この1,2年でGHにより発現される初期反応に関する知見が得られつつある。クローニングされたGH受容体には既知のチロシンキナーゼと相同の配列は認められない⁽¹⁰³⁾が、3T3-F442A細胞において、GH受容体自身あるいは受容体にassociateしていると思われるチロシンキナーゼによりGH受容体のチロシンリン酸化が起こることが報告され^(114,115)。他の細胞系でもチロシンリン酸化が認められるという⁽¹¹⁶⁾。また3T3-F442A脂肪前駆細胞ではCキナーゼの活性化により一過性にc-fos, c-junの誘導が認められる⁽¹¹⁷⁾。3T3-F442Aと同様にGHによ

り分化する脂肪前駆細胞であるOb1771ではGHによりphosphatidyl cholineからジアシルグリセロール遊離がおこり⁽¹¹⁸⁾、C-キナーゼを介してc-fosの一過性発現が観察されている⁽¹¹⁹⁾。GHと受容体の相互認識とそれにより引き起こされる初期応答という極めて短時間での事象の各々が、本当に細胞分化という長時間かけて起こる結果に結びつくものであるのかどうか明らかにすることは容易ではないが、分化活性発現に関与するシグナル伝達経路の解明により、GHの細胞応答に関する理解が深まるものと思われる。

本研究では脂肪細胞分化因子としてのhGHの構造と分化活性発現について検討した。

蛋白質工学的に作製したhGH変換体を用いた機能構造の検討により、

- (1) hGHの受容体との結合及び分化活性発現には4つのhelixからなる束状構造の保持が必須であること。
- (2) ループ領域の62-67位付近のアミノ酸残基は結合及び活性発現に重要な役割を果たすactive siteのひとつであり、Arg64は結合に、Glu65は活性発現に関与しており、Pro61はactive siteの活性高次構造の保持に関与していること。
- (3) 53-165位のS-S結合はhelixの束状構造とループのactive siteとの最適な空間配置に寄与していること。

が明らかとなった。

一方、GHにより分化する3T3-F442A脂肪前駆細胞において、GHと特異的に結合する膜蛋白質は、末端にシアル酸10Kd相当を含有するアスパラギンN-結合型糖鎖を有する分子量110Kdの糖蛋白質で、分子内S-S結合を有する分子であることが判明した。また、分化後の3T3-F442A脂肪細胞、分化能を持たない3T3-C2細胞について検討したところ、GHと結合する膜蛋白質の性状は3T3-F442A脂肪前駆細胞に発現されているものと大変類似していた。この分子がGHを認識して細胞応答を引き起こすGH受容体であるとする、細胞によるGHの応答の違いは受容体(結合蛋白質)レベルの違いによるのではなく、受容体結合以降の過程によるものと考えられる。

引用文献

- 1) Evans, H.M. and Long, I.A., *Anat. Rec.*, 21, 61 (1921).
- 2) 鎮目和夫, "成長ホルモン・GRF・IGF", 鎮目和夫編, 朝倉書店 (1989).
- 3) Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yasura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R., and Seeburg, P.H., *Nature (London)*, 281, 544 (1979).
- 4) Waters, M.J., Barnard, R.T., Lobie, P.E., Lim, L., Hamlin, G., Spencer, S.A., Hammonds, R.G., Leung, D.W., and Wood, W.I., *Acta. Paediatr. Scand. (Suppl)*, 366, 60 (1990).
- 5) Isaksson, O.G.P., Eden, S., and Jansson, J.-O., *Ann. Rev. Physiol.*, 47, 483 (1985).
- 6) Wallis, M., "Hormones and their actions, Part II", eds. Cooke, B.A., King, R. J.B. and Van Der Molen, H.J., p265, Elsevier Science Publishers BV, (1988).
- 7) Green, H. and Kehinde, O., *Cell*, 7, 105 (1976).
- 8) Kuri-Harcuch, W. and Green, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 6107 (1978).
- 9) Morikawa, M., Nixon, T., and Green, H., *Cell*, 29, 783 (1982).
- 10) Nixon, T. and Green, H., *Endocrinology*, 114, 527 (1984).
- 11) Wise, L.S. and Green, H., *J. Biol. Chem.*, 254, 273 (1979).
- 12) Morikawa, M., Green, H., and Lewis, U.J., *Mol. Cell. Biol.*, 4, 228 (1984).
- 13) Nixon, T. and Green, H., *J. Cell. Phys.*, 115, 291 (1983).
- 14) Niall, H.D. et al., *Recent Prog. Horm. Res.*, 29, 387 (1973).
- 15) Li, C.H., Dixon, J.S., and Chung, D., *Arch. Biochem. Biophys.*, 155, 95 (1973).
- 16) Martel, J., Chene, N., and De La Llosa, P., *FEBS Lett.*, 180, 295 (1985).
- 17) Teh, L.-C. and Chapman, G.E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150, 391 (1988).
- 18) Atlasovich, F.M., Caridad, J.J., Nowicki, C., Santome, J.A., and Wolfenstein-Todel, C., *Arc. Biochem. Biophys.*, 281, 1 (1990).
- 19) Fukushima, J.G., Biscoglio de Jimenes Bonino, M.J., Cascone, O., and Santome, J.A., *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B, 797 (1990).
- 20) Li, C.H. and Bewly, T.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1476 (1976).

- 21) Li, C. H., Hayashida, T., Doneen, B. A., and Rao, A. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3463 (1976).
- 22) Goodman, H. M. and Kostyo, J. L., Endocrinology, 108, 553 (1981).
- 23) Reagan, C. R., Kostyo, J. L., Mills, J. B., Gennick, S. E., Messina, J. L., Wagner, S. A., and Wilhelmi, A. E., Endocrinology, 109, 1663 (1981).
- 24) Mills, J. B., Kostyo, J. L., Reagan, C. R., Wagner, S. A., Moseley, M. H., and Wilhelmi, A. E., Endocrinology, 107, 391 (1980).
- 25) Yudaev, N. A., Pankov, Y. A., Keda, Y. M., Sazina, E. T., Osipova, T. A., Shwachkin, Y. P., and Ryabtesev, M. N., Biochem. Biophys. Res. Commun., 110, 866 (1983).
- 26) Salem, M. A. M., Endocrinology, 123, 1565 (1988).
- 27) Mondon, C. E., Reaven, G. M., Ling, N., Lewis, U. J., and Frigeri, L. G., Endocrinology, 123, 827 (1988).
- 28) Retegui, L. A., De Meyts, P., Pena, C., and Masson, P. L., Endocrinology, 111, 668 (1982).
- 29) Li, C. H., Mol. Cell. Biochem., 46, 31 (1982).
- 30) Nicoll, C. S., Mayer, G. L., and Russel, S. M., Endocrine Rev., 7, 169 (1986).
- 31) Aubert, M. L., Bewly, T. A., Grumbach, M. M., Kaplan, S. L., and Li, C. H., Int. J. Peptide Protein Res., 28, 45 (1986).
- 32) Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Taniyama, Y., Iwai, S., Kitano, K., Miyamoto, S., Ohgi, T., Sakuragawa, Y., Fujiyama, K., Ikari, T., Kobayashi, M., Miyake, T., Shibahara, S., Ono, A., Ueda, T., Tanaka, T., Baba, H., Miki, T., Sakurai, A., Oishi, T., Chisaka, O., and Matsubara, K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5956 (1984).
- 33) Dixon, J. S. and Li, C. H., Science, 154, 785 (1966).
- 34) Bewly, T. A., Brovetto-Cruz, J., and Li, C. H., Biochemistry, 8, 4701 (1969).
- 35) Li, C. H., "Hormonal Proteins and Peptides," Vol. 4, ed. by Li, C. H., Academic Press, New York, pp1-41 (1977).
- 36) Doneen, B. A., Bewly, T. A., and Li, C. H., Biochemistry, 18, 4851 (1979).
- 37) Tokunaga, T., Tanaka, T., Ikehara, M., and Ohtsuka, E., Eur. J. Biochem., 153, 445 (1985).

- 38) Uchida, E., Uemura, H., Tanaka, T., Nishikawa, S., Uesugi, S., Tanaka, A., Morikawa, M., Hayakawa, T., and Ikehara, M., *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 150 (1991).
- 39) Zoller, M. J. and Smith, M., "Method in Enzymology", Vol. 100, ed. by Wu, R., Academic Press, New York, p468 (1983).
- 40) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977).
- 41) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 42) Bradford, M. M., *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976).
- 43) Greenwood, F. C., Hunter, W. M., and Glover, J. S., *Biochem. J.*, 89, 114 (1963).
- 44) Moore, D. D., Walker, M. D., Diamond, D. J., et al., *Recent Prog. Horm. Res.*, 38, 197 (1982).
- 45) Lewis, U. J., Bonewald, L. F., and Lewis, L. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 511 (1980).
- 46) Chapman, G. E., Rogers, K. M., Brittain, T., Bradshaw, R. A., Bates, O. J., Turner, C., Cary, P. D., and Crane-Robinson, C., *J. Biol. Chem.*, 256, 2395 (1981).
- 47) Lewis, U. J., Dunn, J. T., Bonewald, L. F., Seavey, B. K., and VanderLean, W. P., *J. Biol. Chem.*, 253, 2679 (1978).
- 48) Kostyo, J. L., Cameron, C. M., Olson, K. C., Jones, A. J. S., and Pai, R. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4250 (1985).
- 49) Lewis, U. J., Singh, R. N. P., and Tutwiler, G. F., *Endocr. Res. Commun.*, 8, 155 (1981).
- 50) Frigeri, L. G., Peterson, S. M., and Lewis, U. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91, 778 (1979).
- 51) Wallis, M., *Nature*, 284, 512 (1980).
- 52) DeNoto, F. M., Moore, D. D., and Goodman, H. M., *Nucl. Acids Res.*, 9, 3719 (1981).
- 53) Lecomte, C. M., Renard, A., and Martial, J. A., *Nucl. Acids Res.*, 15, 6331 (1987).
- 54) Nishikawa, S., Nishida, Y., Uemura, H., Yamada, Y., Tanaka, T., Uesugi, S., Morikawa, M., Uchida, E., Hayakawa, T., and Ikehara, M., *Protein Eng.* 3, 49 (1989).

- 55) 池田潔, 浜口浩三. "タンパク質の化学Ⅲ (生化学実験講座)" 日本生化学会編, p.167 (1976), 東京化学同人.
- 56) Abdel-Meguid, S.S. et al., *J. Mol. Biol.*, 192, 159 (1986).
- 57) Becker, G.W. et al., *Biotechnology*, 5, 499 ((1987).
- 58) Borisova, S.N. et al., *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 301, 474 (1988).
- 59) Clarkson, J. et al., *J. Mol. Biol.*, 208, 719 (1989).
- 60) Abdel-Meguid, S.S., Shieh, H.-S., Smith, W.W., Dayringer, H.E., Violand, B.N., and Bentle, L.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6434 (1987).
- 61) Tanaka, T., Shiu, R.P.C., Gout, P.W., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51, 1058 (1980)
- 62) Seeburg, P.H., Sias, S., Adelman, J., De Boer, H.A., Hayglick, J., Jhrani, P., Goeddel, D.V., and Heyneker, H.L., *DNA*, 2, 37 (1983).
- 63) Uchida, E., Shimokawa, S., Nishida, Y., Takasu, H., Ikehara, M., Uesugi, S., Tomita, K., Tanaka, A., Morikawa, M., Hayakawa, T., and Nishikawa, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 357 (1990).
- 64) Linzer, D.H. and Talamantes, F., *J. Biol. Chem.*, 260, 9574 (1985).
- 65) Russell, J., Katzhendler, J., Kowalski, K., Schneider, A.B., and Sherwood, L.M., *J. Biol. Chem.*, 256, 304 (1981).
- 66) Luck, D.N., Gout, P.W., Kelsay, K., Atkinson, T., Beer, C.T., and Smith, M., *Mol. Endocrinol.*, 4, 1011 (1990).
- 67) Cunningham, B.C., Jhurani, P., Ng, P., and Wells, J.A., *Science*, 243, 1330 (1989).
- 68) Cunningham, B.C. and Wells, J.A., *Science*, 244, 1081 (1989).
- 69) Gertler, A., Shamay, A., Cohen, N., Ashkenazi, A., Friesen, H.G., Levanon, A., Gorecki, M., Aviv, H., Hadary, D., and Vogel, T., *Endocrinology*, 118, 720 (1986).
- 70) Ashkenazi, A., Vogel, T., Barash, I., Hadari, D., Levanon, A., Gorecki, M., and Gertler, A., *Endocrinology*, 121, 414, (1987).
- 71) Chen, W.Y., Wight, D.C., Wagner, T.E., and Kophick, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5061 (1990).

- 72) Ray, J., Okamura, H., Kelly, P. A., Liebhaber, S. A., and Cooke, N. E.,
Mol. Endocrinol., 4, 101 (1990).
- 73) Ray, J., Okamura, H., Kelly, P. A., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A.,
J. Biol. Chem., 265, 7939 (1990).
- 74) Barnard, R. and Waters, M. J., Biochem. J., 250, 533 (1988).
- 75) Barnard, R., Rowlinson, S. W., and Waters, M. J., J. Theor. Biol., 140, 355
(1989).
- 76) Binder, L., Gertler, A., Elberg, G., Guy, R., and Vogel, T., Mol. Endocrinol., 4,
1060 (1990).
- 77) Binder, L., Vogel, T., Hadary, D., Eldberg, G., and Gertler, A.,
Mol. Endocrinol., 3, 923 (1989).
- 78) Barnard, R., Bundesen, P. G., Rylatt, D. B., and Waters, M. J., Biochem. J., 231,
459 (1985).
- 79) Smal, J., Closset, J., Hennen, G., and De Meyts, P., Biochem. Biophys. Res. Commun.
134, 159 (1986).
- 80) Smal, J., Closset, J., Hennen, G., and De Meyts, P., J. Biol. Chem., 262, 11071
(1987).
- 81) Barnard, R., Rowlinson, S. W., and Waters, M. J., Biochem. J., 267, 471 (1990).
- 82) Schwartz, J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 125, 237 (1984).
- 83) Schwartz, J., Foster, C. M., and Satin, M. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8724
(1985).
- 84) Uchida, E., Hayakawa, T., Niimi, S., Tanaka, A., and Moriawa, M.,
J. Mol. Endocrinol., 3, 239 (1989).
- 85) Takatsuki, A., Kohno, K., and Tamura, G., Agricultural and Biological
Chemistry, 262, 2213 (1975).
- 86) Tkacz, J. S. and Lampen, J. O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 248 (1984).
- 87) Schwartz, J. and Carter-Su, C., Endocrinology, 122, 2247 (1988).
- 88) Donner, D. B., J. Biol. Chem., 258, 2736 (1983).
- 89) Yamada, K. and Donner, D. B., Biochem. J., 220, 361 (1984).
- 90) Yamada, K., Lipson, K. E., and Donner, D. B., Biochemistry, 26, 4438 (1987).

- 91) Carter-Su, C., Schwartz, J., and Kikuchi, G., *J. Biol. Chem.*, 259, 1099 (1984).
- 92) Gorin, G. and Goodman, H. M., *Endocrinology*, 114, 1279 (1984).
- 93) Schwartz, J. and Carter-Su, C., *Hormone and Metabolic Res.*, 19, 242 (1987).
- 94) Asakawa, K., Hedo, J. A., McElduff, A., Rouiller, D. G., Waters, M. J., and Gorden, P., *Biochem. J.*, 238, 379 (1986).
- 95) Haeuptle, M.-T., Aubert, M. L., Djiane, J., and Kraehenbuhl, J.-P., *J. Biol. Chem.*, 258, 305 (1983).
- 96) Huges, J. P., Simpson, J. S. A., and Friesen, H. G., *Endocrinology*, 112, 1980 (1983).
- 97) Smith, W. C. and Talamantes, F., *J. Biol. Chem.*, 262, 2213 (1987).
- 98) Ymer, S. I. and Herington, A. C., *Biochem. J.*, 242, 713 (1987).
- 99) Husman, B., Haldosen, L.-A., Andersson, G., and Gustafsson, J. A., *J. Biol. Chem.*, 263, 3963 (1988).
- 100) Haldosen, L.-A. and Gustafsson, J. A., *Biochem. J.*, 252, 509 (1988).
- 101) Barnard, R., Rowlinson, S. W., and Waters, M. J., *Biochem. J.*, 267, 471 (1990).
- 102) Hocquette, J.-F., Postel-Vinay, M.-C., Djiane, J., Tar, A., and Kelly, P. A., *Endocrinology*, 127, 1665 (1990).
- 103) Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J., and Wood, W. I., *Nature*, 330, 537 (1987).
- 104) Waters, M. J. and Friesen, H. G., *J. Biol. Chem.*, 254, 6815 (1979).
- 105) Tsushima, T., Sasaki, N., Imai, Y., Matsuzaki, F., and Friesen, H. G., *Biochem. J.* 187, 479 (1980).
- 106) Keefer, L. M. and De Meyts, P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 22 (1981).
- 107) Szecuwka, J., Tai, L.-R., and Goodman, H. M., *Endocrinology*, 126, 1834 (1990).
- 108) Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680 (1970).
- 109) Boutin, J. M., Jolicoeur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Edery, M., Shiota, M., Banville, D., Dusanter-Fourt, I., Djiane, J., and Kelly, P. A., *Cell*, 53, 69 (1988).
- 110) Edery, M., Jolicoeur, C., Leve-Meyrueis, C., Dusanter-Fourt, I., Petridou, B., Boutin, J.-M., Leseur, L., Kelly, P. A., and Djiane, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2112 (1989).

- 111) Bazan, J.F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 788 (1989).
- 112) Bazan, J.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6934 (1990).
- 113) Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T., *Cell*, 58, 573 (1989).
- 114) Foster, C.M., Shafer, J.A., Rozsa, F.W., Wang, X., Lewis, S.D., Renken, D.A., Natale, J.E., Schwartz, J., and Carter-Su, C., *Biochemistry*, 27, 326 (1988).
- 115) Carter-Su, C., Stubbart, J.R., Wang, X., Stred, S.E., Argetsinger, L.S., and Shafer, J.A., *J. Biol. Chem.*, 264, 18654 (1989).
- 116) Sted, S.E., Stubbart, J.R., Argetsinger, L.E., Shafer, J.A., and Carter-Su, C., *Endocrinology*, 127, 2506 (1990).
- 117) Gurland, G., Ashcom, G., Cochran, B.E., and Schwartz, J., *Endocrinology*, 127, 3187 (1990).
- 118) Catalioto, R.-M., Ailhaud, G., and Negreal, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173, 840 (1990).
- 119) Doglio, A., Dani, C., Grimaldi, P., and Ailhaud, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1148 (1989).

謝辞 舌辛

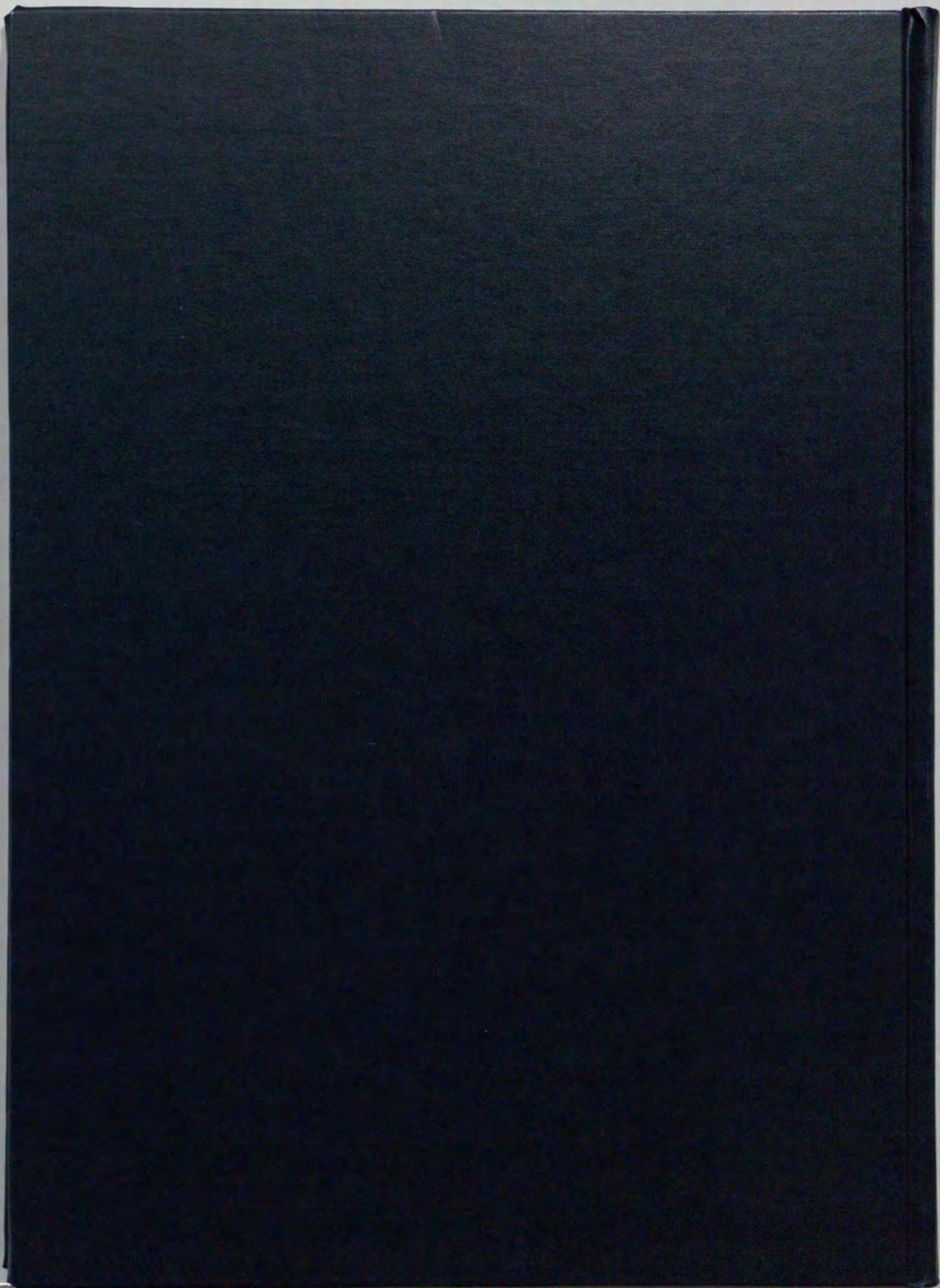
本論文の作製に際し、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学薬学部生体異物免疫化学教室大沢利昭教授ならびに豊島聡助教授に深く感謝致します。

本研究を行う機会を与えて下さり、終始多大なる激励と御指導、有益な後助言を賜りました国立衛生試験所生物薬品部田中彰部長ならびに早川舜夫室長に心から感謝致します。

貴重な脂肪前駆細胞を供与していただき、御懇切なる御指導と御助言を賜りました東京免疫薬理研究所森川実博士に深く感謝致します。

成長ホルモン変換体の研究に際し、終始ご懇切なる御指導と有益な御助言、御便宜を賜りました工業技術院微生物工業研究所西川諭室長、大阪大学薬学部薬化学教室上杉晴一助教授、薬品物理化学教室富田研一教授ならびに蛋白工学研究所所長池原森男博士に深く感謝致します。また、変換体の作製とCDスペクトル測定に御協力いただきました大阪大学薬学部の下川誠太郎氏、高須尚氏、西田好孝氏、山田泰樹氏、田中俊樹博士、上村春樹博士に心から感謝致します。

最後になりましたが、本研究に際し、御協力と御助言、多大の御激励をいただきました国立衛生試験所生物薬品部山口照英主任研究官、新見伸吾博士をはじめ国立衛生試験所の諸先生方に深く感謝致します。



Kodak
cm 1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8
19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

