

[別紙2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 常川 豊吉

大腸菌を用いて分泌生産法により大量調製が可能となったタンパク質の一つに 22 kDa ヒト成長ホルモン (22K-hGH) がある。天然型の高次構造を有する 22K-hGH の大量調製が可能となり、22K-hGH と hGH 受容体との結合が詳細に解析されている。一方、22K-hGH と共に 20 kDa のアイソフォーム (20K-hGH) が下垂体前葉にて発現する。20K-hGH はオルターナティブスプライシングにより 22K-hGH の 32~46 番目に相当する 15 アミノ酸を欠失しており、下垂体の全 hGH の 5~10% の割合で存在している。20K-hGH に関しては、高純度の天然型試料の入手が困難であることから、生理作用や作用機序に関する詳細な知見は得られていない。本論文は、大腸菌に分泌生産させた高純度の天然型 20K-hGH を用いて、*in vitro* での生物活性、各種受容体との会合様式を詳細に解析したものである。

第 1 章では、20K-hGH のヒトプロラクチン (hPRL) 受容体を介した作用が検討されている。hGH は PRL 受容体にも結合するため、22K-hGH をヒトに投与した場合、乳癌や男性の乳房女性化等の副作用に、hPRL 受容体が関与していることが示唆されていた。しかし、hPRL 受容体を介した 20K-hGH の作用に関する詳細な報告は無かった。hPRL 受容体を発現させた Ba/F3 細胞を用いた細胞増殖実験、及び hPRL 受容体を発現させた CHO 細胞と Spi2.1 遺伝子プロモーター領域を用いた遺伝子転写活性化実験において、20K-hGH の作用は 22K-hGH よりも弱いことを明らかにした。また、hPRL 受容体を介した細胞内シグナル伝達物質 (JAK2-STAT5) のチロシン残基リン酸化においても、20K-hGH の活性は 22K-hGH よりも低いことを明らかにした。従って、20K-hGH はヒトに投与した場合、副作用の可能性が低いことが期待される。

第 2 章では、20K-hGH と hGH 受容体との複合体形成機構に関し解析されている。22K-hGH と同じく、20K-hGH は受容体との 1 : 1 複合体を経由して、1 : 2 (hGH : hGH 受容体) 複合体が形成される。1 つめの受容体に対する 20K-hGH の親和性は、22K-hGH の 10 分の 1 程度であるにも関わらず、20K-hGH が 22K-hGH と同等以上の hGH 受容体を介した生理作用を示す理由は不明であった。受容体同士の結合領域に存在すると考えられる 15 個のアミノ酸を各々アラニンへ置換した変異型受容体を Ba/F3 細胞株で発現し、変異型受容体を介した hGH の作用 (細胞増殖活性) を解析した。その結果、受容体上のアミノ酸 Thr-147、Ile-149、His-150、Tyr-200 は、20K-hGH の細胞増殖活性に、特異的に重要であることが判明した。これは、20K-hGH と hGH 受容体が 1 : 2 複合体を形成する際には、受容体同士の結合親和性が特異的に上昇するため、20K-hGH と hGH 受容体間での

結合親和性を補っていることを示している。

第 3 章では、20K-hGH のラット GH (rGH) 受容体を介した作用及び結合様式に関する検討を行った。ラットは hGH の *in vivo* での作用評価動物として頻繁に使用されており、hGH の成長促進活性、浮腫誘発性などに関する検討がなされている。rGH 受容体細胞外領域と 20K-及び 22K-hGH との複合体形成を検討し、20K-hGH の rGH 受容体に対する親和性は 22K-hGH よりも低いことを確認した。また、rGH 受容体を発現する培養細胞株を用いて、rGH 受容体を介した細胞増殖活性は 20K-hGH の方が低く、ラットの GH 受容体に対する親和性と相関すること、一方、遺伝子転写活性化能は 20K-hGH と 22K-hGH とで等しく、rGH 受容体親和性と相関しないことを見出した。このような違いは hGH 受容体や hPRL 受容体には見られないことから、rGH 受容体に特異的な現象である可能性がある。

以上本論文は、大腸菌を用いた分泌生産系により多量かつ高純度とその製造が可能となった天然型 20K-hGH を使用することによって、これまで不明であった 20K-hGH の生理作用について検討したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。