

学 位 論 文 題 名

ヒト精巣卵胞刺激ホルモン受容体 cDNA の  
クローニングおよびその機能解析

学位論文内容の要旨

緒 言

ヒト卵胞刺激ホルモン受容体 (hFSH-R) は精巣や卵巣の発達および生殖機能の維持に重要な役割を果たしており, hFSH-R 遺伝子のクローニングおよびその機能解析は生殖内分泌学的に大きな意義を有すると考えられる。

本研究では, ラット FSH 受容体の塩基配列をもとにヒト精巣 FSH 受容体 cDNA をクローニングし, その機能解析を行った。さらに, 既に報告されているヒト卵巣 FSH-R と本研究においてクローニングされた hFSH-R cDNA の 2039 番塩基に違いのあることに着目し, hFSH-R の遺伝子多型についても若干の検討を加えた。

実験内容

PMSG 処理をした未熟ラット卵巣から得られた全 RNA を用いて, ラット FSH-R cDNA の塩基番号 621 から 1031 に対応する cDNA 断片を RT-PCR 法により得た。この cDNA 断片を  $^{32}\text{P}$  で放射性標識しプローブとして用い, ラムダ gt11 ヒト精巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い, hFSH-R をコードすると考えられる cDNA が得られたので, ジデオキシ法によりその塩基配列を決定した。

得られた cDNA を発現ベクターに組み込み, リン酸カルシウム沈殿法により, 293 細胞 (ヒト胎児腎由来の細胞株) にトランスフェクションして,  $^{125}\text{I}$  で標識された hFSH に対する特異的結合部位の発現の有無, 続いて, hFSH を添加したときの cAMP およびイノシトールリン酸の産生能について検討した。さらに, 293 細胞に発現された受容体に対する, hFSH の結合能と FSH 以外の各種ゴナドトロピンあるいはヒト以外の動物 (ラット, ヒツジ, ウマ, ブタ) のゴナドトロピンの結合能との比較を行った。

ヒト卵胞期卵巣および月経周期 21 日目のヒト黄体から poly (A) mRNA を抽出した後に, hFSH-R cDNA の塩基番号 744 から 1026 に対応する放射性標識 cRNA プローブを作製し, ノーザンブロット分析を行った。

トランスフェクションされた 293 細胞を  $^{125}\text{I}$ -hFSH とともに, 1,000 倍過剰量の非標識 hFSH の存在下あるいは非存在下で培養した後, disuccinimidyl suberate (DSS) を用い, hFSH と hFSH-R とのクロスリンクを起こした後に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, ゲルを  $-70^{\circ}\text{C}$ , 14 日間のオートラジオグラフィーに用いた。

インフォームドコンセントを得た後に, 患者 70 名の末梢血リンパ球から DNA を抽出し, これを鋳型として PCR 法を行い, hFSH-R 遺伝子の塩基番号 1624 から 2143 までを増幅した。本研究でクローニングされた cDNA の 2039 番塩基はアデニンであり, 既報のヒト

卵巣 FSH-R cDNA では同位置の塩基がグアニンであることから、後者では制限酵素 BsrI により、520bp の PCR 産物が 413bp と 107bp に切断されることによる RFLP 解析で遺伝子多型の頻度を調べた。

## 結 果

クローニングされた cDNA の塩基配列から、hFSH-R はシグナルペプチドも含め 695 個のアミノ酸からなり、N 末端には 366 個のアミノ酸からなる非常に大きな細胞外領域を有し、また、7 個の膜貫通領域を有すると推定された。

トランスフェクションされた 293 細胞に対して  $^{125}\text{I}$ -hFSH は強い結合を示し、解離定数は  $1.5 \times 10^{-9}\text{M}$  であった。しかし、ヒト CG はほとんど結合を示さず、ヒト LH も高濃度で弱い結合を示しただけであった。さらに、ヒト以外の動物のゴナドトロピンではラット FSH が hFSH に類似した結合を示したが、ブタやヒツジの FSH およびウマの CG の結合能は著しく低いものであった。

トランスフェクションされた 293 細胞に hFSH を加えると、その用量に依存した cAMP の産生の増加を認めた。イノシトールリン酸の産生に関しては、ヒト LH/CG 受容体を発現した 293 細胞に対するヒト CG の効果に比して弱いものであったが、hFSH の用量に依存しての増加を認めた。

hFSH-R の mRNA のノーザンブロット分析ではヒト卵胞期卵巣において 7.0, 4.2, 2.5 kb の 3 本のバンドが認められたが、月経周期 21 日目の黄体においては hFSH-R の mRNA のバンドは検出されなかった。

$^{125}\text{I}$ -hFSH と hFSH-R とのクロスリンク実験では分子質量が約 109kDa と推定される蛋白質のバンドが検出されたが、1,000 倍過剰量の hFSH の存在下では検出されなかった。

本研究で得られたクローンを A 型、既報の卵巣から得られたクローンを M 型とすると、70 名のうち AA は 33 名(47.1%)、AM は 31 名(44.3%)、MM は 6 名(8.6%)であった。少数例の検討であるためか疾患による差は認められなかった。

## 考 察

本研究においてクローニングされた cDNA を 293 細胞にトランスフェクションすることにより、 $^{125}\text{I}$ -hFSH に対して高い親和性を有する受容体の発現が確認された。

受容体を発現した 293 細胞は hFSH の用量に依存して cAMP を産生することが示された。また、ヒト LH/CG 受容体に対するヒト CG の効果に比して弱いものではあったが、hFSH-R においてもより高濃度の hFSH の刺激によりイノシトールリン酸の産生の高まることが認められた。これらの結果から、hFSH-R の細胞内情報伝達には A キナーゼ系だけでなく C キナーゼ系の関与も推測された。

ノーザンブロット分析に関しては今回の結果のみから結論を導くことは困難である。今後、多くのサンプルを分析することにより月経周期の各時期における mRNA の発現レベルの変化を検討する必要がある。

クロスリンク実験において検出された分子質量 109kDa の蛋白質のバンドは、過剰量の非標識 hFSH の存在下では検出されなかったことから、hFSH と受容体のクロスリンクしたものと考えられ、リガンドの分子質量を引くと約 76kDa となり、これは hFSH-R のアミノ酸配列から推定された分子量 76,000 にほぼ一致していた。

以上の結果から、本研究において発現された hFSH-R は機能的な蛋白として産生されていることが確認された。

hFSH-R の遺伝子多型と疾患との間には関連性を認めなかったが、今後症例数を増やすことにより、血中のゴナドトロピン値やエストラジオール値あるいは黄体機能などの機能的側面との関連を検討していきたい。

ヒト組織の大量入手には制限があり，hFSH-R の蛋白レベルでの研究には困難が伴うが，hFSH-R cDNA のクローニングに成功したことで受容体自身の構造や機能の解析だけではなく，各種の生殖内分泌異常と受容体異常との関連性に関する研究にも大きく貢献できると考えられる．

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征一郎

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

## ヒト精巣卵胞刺激ホルモン受容体 cDNA の クローニングおよびその機能解析

PMSG処理をした未熟ラット卵巢から得られた全RNAを用いて、ラット卵胞刺激ホルモン受容体 (FSH-R) cDNAの塩基番号621から1031に対応するcDNA断片をRT-PCR法により得た。このcDNA断片を<sup>32</sup>Pで放射性標識しプローブとして用い、ラムダgt11ヒト精巣cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、hFSH-Rをコードすると考えられるcDNAが得られたので、その塩基配列を決定した。得られたcDNAを発現ベクターに組み込み、293細胞 (ヒト胎児腎由来の細胞株) にトランスフェクションして、<sup>125</sup>Iで標識されたhFSHに対する特異的結合部位の発現の有無、続いて、hFSHを添加したときのcAMPおよびイノシトールリン酸の産生能について検討した。さらに、293細胞に発現された受容体に対する、hFSHの結合能とFSH以外の各種ヒトゴナドトロピンあるいは動物のゴナドトロピンの結合能との比較を行った。ヒト卵胞期卵巢および月経周期21日目の黄体からpoly (A) mRNAを抽出した後に、hFSH-R cDNAの塩基番号744から1026に対応する放射性標識cRNAプローブを作製し、ノーザンブロット分析を行った。

トランスフェクションされた293細胞を<sup>125</sup>I-hFSHとともに、1,000倍過剰量の非標識hFSHの存在下あるいは非存在下で培養した後、disuccinimidyl suberate (DSS)を用い、hFSHとhFSH-Rとのクロスリンクを起こした後にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲルを-70°C、14日間のオートラジオグラフィーに用いた。

内分泌疾患を有する女性患者70名の末梢血リンパ球からDNAを抽出し、これを鋳型としてPCR法を行い、hFSH-R遺伝子の塩基番号1624から2143までを増幅した。本研究でクローニングされたcDNAの2039番塩基はアデニンであり、既報のヒト卵巢FSH-R cDNAではグアニンであることから、後者では制限酵素BsrIにより、520bpのPCR産物が413bpと107bpに切断されることによるRFLP解析で遺伝子多型の頻度を調べた。

これらの実験結果を要約すると、クローニングされたcDNAの塩基配列から、hFSH-Rはシグナルペプチドも含め695個のアミノ酸からなり、N末端には366個のアミノ酸から

なる細胞外領域を有し、また、7個の膜貫通領域を有すると推定された。トランスフェクションされた293細胞に対して $^{125}\text{I}$ -hFSHは強い結合を示し、解離定数は $1.5 \times 10^{-9}\text{M}$ であった。しかし、hCGはほとんど結合を示さず、hLHも高濃度で弱い結合を示しただけであった。動物のゴナドトロピンでは、ラットFSHがhFSHに類似した結合を示したが、ブタやヒツジのFSHおよびウマのCGの結合能は著しく低いものであった。トランスフェクションされた293細胞にhFSHを加えると、用量に依存したcAMPの産生増加を認めた。イノシトールリン酸の産生は、ヒトLH/CG受容体を発現した293細胞に対するhCGの効果に比して弱いものであったが、hFSHの用量に依存しての増加を認めた。これらの結果から、hFSH-Rの細胞内情報伝達にはAキナーゼ系だけではなくCキナーゼ系の関与も推測された。hFSH-R mRNAのノーザンブロット分析ではヒト卵胞期卵巣において7.0, 4.2, 2.5 kbの3本のバンドが認められたが、月経周期21日目の黄体においてはバンドは検出されなかった。

$^{125}\text{I}$ -hFSHとhFSH-Rとのクロスリンク実験では分子質量が約109kDaと推定されるバンドが検出されたが、1,000倍過剰量のhFSHの存在下では検出されなかった。この蛋白はhFSHと受容体のクロスリンクしたものと考えられ、リガンドの分子質量を引くと約76kDaとなり、hFSH-Rのアミノ酸配列から推定された分子量76,000に一致していた。

本研究のクローンをA型、既報の卵巣から得られたクローンをM型とすると、70名のうちAAは33名(47.1%)、AMは31名(44.3%)、MMは6名(8.6%)であった。hFSH-Rの遺伝子多型と疾患との間には関連性を認めなかったが、血中ゴナドトロピン値やエストラジオール値あるいは黄体機能などとの関連を今後は検討していきたい。

以上の結果から、本研究において発現されたhFSH-Rは機能的な蛋白として産生されていることが確認された。

公開発表に際し、石橋教授より、ヒト精巣を研究対象として用いた理由、スキッチャード解析でのプロット数が少ない理由、total cAMPの意味、添加したhFSHの生理的な濃度範囲、イノシトールリン酸の産生量の有意性、ノーザンブロット分析で4.2kbのバンドが優勢な理由について、また、西教授より、cDNAのサイズとノーザンブロット分析の4.2kbのバンドとの関係、1種類のcDNA導入により2本のバンドが検出された理由、塩基・アミノ酸レベルでの卵巣のFSH受容体との比較、卵巣からのクローンとの相違点と本研究の受容体遺伝子の多型との関係、ラットFSH受容体との比較における本研究のクローンの正当性、遺伝子型でMMの頻度が低かった理由などについて、質問があった。また藤本教授からは、高濃度のヒトLH添加でcAMPの産生増加が観察された理由、最終的な受容体の機能解析に最適の細胞株、黄体期の時期による黄体の受容体mRNAの検出の差の可能性、遺伝子多型の臨床的意義について質問があった。申請者はこれらの質問に対して、研究結果と文献的見解とから、概ね妥当な解答をなしえたものと判断された。

審査員一同は、これらの研究成果を評価し、申請者が博士(医学)の学位を授与されるのに資格を有するものと判定した。