

Title	たんぱく質不安定性を呈する新規TSH受容体変異V711fsの機能解析
Sub Title	Functional characterization of a novel TSH receptor mutation (V711fs) with protein instability
Author	鳴海, 覚志(Narumi, Satoshi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>先天性甲状腺機能低下症患者に認められたTSH受容体変異V711FfsX18を解析した。本変異体はプロテアソーム依存的なタンパク質分解を受けるが、その説明として(1) C末端側正常54残基の喪失(2) C末端への17残基異常配列の付加の2つの説明を考えた。54残基欠失のみ生じる人工変異体V711XのcAMP産生能は保たれており(1)は否定的であった。また、緑色蛍光たんぱく質とルシフェラーゼたんぱく質にそれぞれ異常配列を付加したところ、いずれも著明な活性低下を観察した。以上は(2)を支持しており、変異の影響で付加された17残基の異常配列がV711FfsX18のたんぱく質不安定性の原因と結論した。</p> <p>We analyzed a TSH receptor mutation V711FfsX18, which was observed in a patient with congenital hypothyroidism. This mutation was subject to proteasome-dependent protein degradation. Two models were considered as a explanation for the protein instability of the mutation: Model 1, Loss of intact 54 aa C-terminal sequence; Model 2, Acquisition of frame-shifted 17 aa sequence. The result of cAMP-generating activity of the V711X mutation, which was comparable to wildtype, excluded the Model 1. When the 17-aa sequence was fused to the green fluorescent protein or the luciferase protein, remarkable reduction in their activities were shown. Based on these observations, we concluded that acquisition of 17-aa frame-shifted sequence causes the protein instability of the V711FfsX TSH receptor mutation.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2014 課題番号：24791087 研究分野：小児内分泌学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791087seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791087seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791087

研究課題名(和文) たんぱく質不安定性を呈する新規 TSH 受容体変異 V711fs の機能解析

研究課題名(英文) Functional characterization of a novel TSH receptor mutation (V711fs) with protein instability

研究代表者

鳴海 覚志 (Narumi, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40365317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：先天性甲状腺機能低下症患者に認められた TSH 受容体変異 V711FfsX18 を解析した。本変異体はプロテアソーム依存的なタンパク質分解を受けるが、その説明として (1) C 末端側正常 54 残基の喪失 (2) C 末端への 17 残基異常配列の付加 の 2 つの説明を考えた。54 残基欠失のみ生じる人工変異体 V711X の cAMP 産生能は保たれており (1) は否定的であった。また、緑色蛍光たんぱく質とルシフェラーゼたんぱく質にそれぞれ異常配列を付加したところ、いずれも著明な活性低下を観察した。以上は (2) を支持しており、変異の影響で付加された 17 残基の異常配列が V711Ffsx18 のたんぱく質不安定性の原因と結論した。

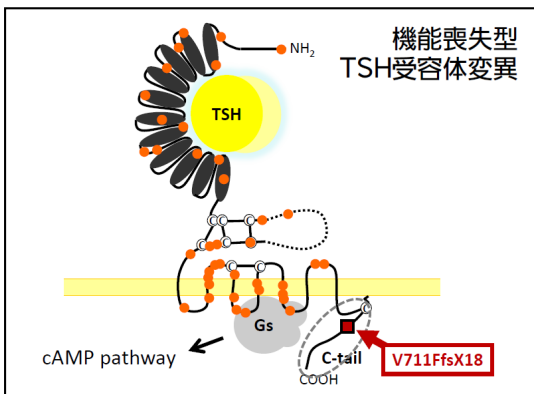
研究成果の概要(英文)：We analyzed a TSH receptor mutation V711FfsX18, which was observed in a patient with congenital hypothyroidism. This mutation was subject to proteasome-dependent protein degradation. Two models were considered as a explanation for the protein instability of the mutation: Model 1, Loss of intact 54 aa C-terminal sequence; Model 2, Acquisition of frame-shifted 17 aa sequence. The result of cAMP-generating activity of the V711X mutation, which was comparable to wildtype, excluded the Model 1. When the 17-aa sequence was fused to the green fluorescent protein or the luciferase protein, remarkable reduction in their activities were shown. Based on these observations, we concluded that acquisition of 17-aa frame-shifted sequence causes the protein instability of the V711FfsX TSH receptor mutation.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：先天性甲状腺機能低下症 TSH 受容体 変異 たんぱく質不安定性 プロテアソーム

## 1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症は約 1/4,000 出生の頻度を持つ最も高頻度の先天性内分泌疾患である。甲状腺の機能は上位ホルモンの甲状腺刺激ホルモン(TSH)により制御される。このため、TSH 受容体(TSHR)の機能低下型変異は先天性甲状腺機能低下症を惹起する。TSHR は G たんぱく質共役型の 7 回膜貫通受容体であり、大きな細胞外リガンド結合ドメイン、7 回膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン(C 末端テイル)の 3 つの部分からなる。TSHR 機能喪失型変異はこれまで約 60 例の患者が文献的に報告されている。研究開始当時までに見えられていた TSHR 変異はいずれも細胞外ドメインもしくは 7 回膜貫通ドメインに存在し、C 末端テイルの変異の報告はなかった(下図)。我々は、先天性甲状腺機能低下症患者に対する TSHR 遺伝子解析研究の結果、世界初の C 末端テイルの変異である V711FfsX18 を同定していた。この変異では、TSHR の C 末端側 54 アミノ酸残基が欠失し、フレームのずれた異常な 17 アミノ酸残基が付加される。我々が行った予備実験から、この V711FfsX18-TSHR は、たんぱく質不安定性を有することを見いだしていた。本研究課題ではこの変異体の機能解析を行い、なぜ C 末端テイルの変異によりたんぱく質不安定性が誘導されるのかを解析した。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、先天性甲状腺機能低下症患者で同定した TSH 受容体新規変異 V711FfsX18 を解析し、本変異のたんぱく質不安定性の機序を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) たんぱく質分解機構の特定

プロテアソーム阻害剤 MG132、およびリソソーム阻害剤 Bafilomycin A を添加した条件下での TSH 受容体(野生型、変異型)の発現量をウェスタンブロット法で評価した。

(2) たんぱく質不安定性が 54 残基正常配列の喪失によるのか 17 残基異常配列の付加によるのかの検証

54 残基正常配列の喪失のみ生じ異常配列を持たない人工変異体 V711X を作製し、野生型、V711X、V711FfsX18 のそれぞれの TSH 依存的 cAMP 産生能を比較した。

(3) たんぱく質不安定性が 17 残基異常配列の付加により生じることの確認実験

赤色蛍光たんぱく質(RFP)の C 末端に 17 残基異常配列を付加し、蛍光強度を野生型と比較した。

ルシフェラーゼたんぱく質の C 末端に 17 残基異常配列を付加し、ルシフェラーゼ活性を野生型と比較した。

(4) 17 残基異常配列の系統的変異導入実験

17 残基異常配列の生化学的特徴を明確にするため、ルシフェラーゼに 17 残基異常配列を付加したコンストラクトを鋳型に、それぞれを 1 残基ずつフェニルアラニン(疎水性)、アルギニン(親水性)、セリン(中性)に置換した人工変異体を系統的に作製し、それぞれのルシフェラーゼ活性を比較した。

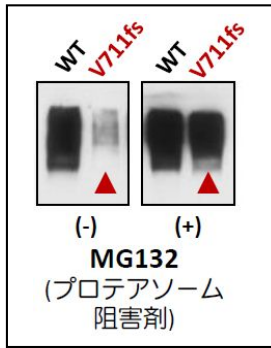
(5) タンデムフェニルアラニン連結実験

分子 C 末端側の疎水性がたんぱく質不安定性の規定因子であることを示すため、ルシフェラーゼの C 末端側にタンデムにフェニルアラニン(1 個、2 個、3 個、4 個、8 個、12 個)を連結したコンストラクトを作製し、それぞれのルシフェラーゼ活性を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) たんぱく質分解機構の特定

V711FfsX18-TSHR のたんぱく質発現量はプロテアソーム阻害剤 MG132 を添加した条件での細胞培養により、野生型と同等レベルまで回復した(下図)。このたんぱく質発現量の回復は、リソソーム阻害剤 Bafilomycin A の添加では認めなかった。このことから、V711FfsX18-TSHR はプロテアソームで分解を受けと考えられた。

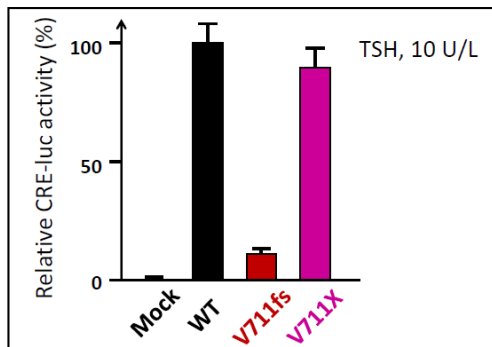


この観察結果をさらに確認するため、より特異性の高いプロテアソーム阻害剤である Lactacystin を添加した条件で細胞培養を行いウェスタンブロットを行ったところ、MG132 と同様にたんぱく質発現量の回復が認められた。

以上から V711FfsX18-TSHR はプロテアソームで分解を受けると結論した。

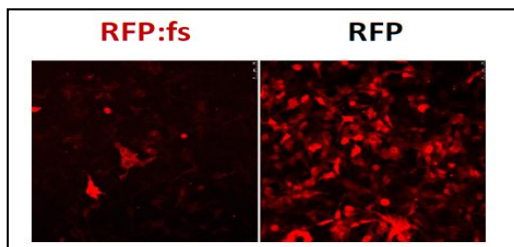
(2) たんぱく質不安定性が 54 残基正常配列の喪失によるのか 17 残基異常配列の付加によるのかの検証

V711FfsX18-TSHR の TSH 依存的 cAMP 産生能は、野生型 TSHR の約 10% であったのに対し、V711X-TSHR の cAMP 産生能は野生型とほぼ同等レベルであった (下図)。このことから、V711FfsX18-TSHR のたんぱく質不安定性は、54 残基正常配列の喪失ではなく 17 残基以上配列の獲得により生じたことが示唆された。

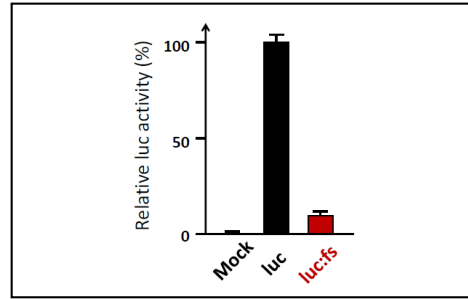


(3) たんぱく質不安定性が 17 残基異常配列の付加により生じることを確認実験

RFP の C 末端に 17 残基異常配列を付加したところ、その蛍光強度は野生型と比較し著明に減弱した (下図)。



ルシフェラーゼたんぱく質の C 末端に 17 残基異常配列を付加したところ、その酵素活性は野生型と比較し著明に減弱した (下図)。



(4) 17 残基異常配列の系統的変異導入実験

ルシフェラーゼに 17 残基異常配列を付加したコンストラクトを鋳型にそれぞれを 1 残基ずつフェニルアラニン、アルギニン、セリンに置換したところ、フェニルアラニン置換はいずれの部位の置換においてもルシフェラーゼ活性を低下させた。このような効果はセリンへの置換、アルギニンへの置換では認められなかった。

またフェニルアラニンへの置換により最もルシフェラーゼ活性が低下したのは、疎水性残基が 5 残基中 4 残基出現する配列 LIFRF (疎水性残基をアンダーラインで示す) を全て疎水性残基とした場合 (LIFFF) であり、鋳型のルシフェラーゼに比し約 10% までの活性低下が認められた。以上から、疎水性残基が連続して出現することがたんぱく質不安定性を増強すると考えられた。

(5) タンデムフェニルアラニン連結実験

疎水性残基の連続出現がたんぱく質不安定性を増強することを直接的に示すため、ルシフェラーゼ分子 C 末端側にタンデムにフェニルアラニンを連結し、ルシフェラーゼ活性を測定した。連結数が長ければ長いほどルシフェラーゼ活性の低下が認められた (下図)。

Construct	Relative luciferase activity (% of native)
luc-F	84
-FF	84
-FFF	46
-FFFF	19
-FFFFFFFF (8)	5.3
-FFFFFFFFFFFFFF (12)	1.9

## 【考察と結論】

以上の実験データから、TSHR 新規変異 V711FfsX18 は、フレームシフト変異により獲得された 17 残基異常配列によってたんぱく質不安定性が誘導され、プロテアソームにおいて分解されたと考えられた。フレームシフト変異によりたんぱく質不安定化シグナルが獲得される自然発生変異は、ヒト約 20,000 遺伝子において前例がなく、新しいタイプの機能喪失型変異である。

このような分解機構の生理学的意義は現時点では不明である。一般的にたんぱく質において、疎水性のドメインは分子内部に折りたたまれ、それによって親水環境である細胞質内で安定となる。受容体であれ蛍光たんぱく質であれ酵素であれ、C 末端側に異所性に高疎水性の配列が組み込まれることにより、たんぱく質は異常な構造をとることが予測され、不安定性を誘導することにより構造異常を有するたんぱく質が除去される。すなわち、合目的なたんぱく質品質管理機構の一部との解釈が可能と考える。

臨床的な観点では、C 末端配列の疎水性の変化により TSHR の機能をドラスティックに減弱できる点は注目に値する。TSHR シグナルは、自己免疫性甲状腺機能亢進症（バセドウ病）、甲状腺分化癌など複数の病態への関与が知られているが、そのシグナルを安全に抑制する方法はいまだ確立していない。本知見は、新規の TSHR シグナル制御方法を開発する上での戦略に応用可能と考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Narumi S, Hasegawa T. TSH receptor revisited. *Endocr J*. 査読有 2015 (in press)  
DOI <http://doi.org/10.1507/endocrj. EJ15-0131>

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 鳴海 覚志ら、変異 TSH 受容体 V711FfsX18 の機能解析：1 塩基欠失によるたんぱく質不安定化シグナルの獲得、第 48 回日本小児内分泌学会、2014 年 9 月 25 日、静岡県浜松市（アクトシティ浜松）
2. Narumi S et al., Functional Characterization of a Novel Mutant TSH Receptor (V711FfsX18): Acquisition of a Degradation Signal via a Single-Base Deletion、第 48 回日本小児内分泌学会、2014 年 9 月 27 日、静岡県浜松市（アクトシティ浜松）
3. 鳴海 覚志ら、変異 TSH 受容体 V711FfsX18 の機能解析：1 塩基欠失によるたんぱく質不安定化シグナルの獲得、

第 57 回日本甲状腺学会、2014 年 11 月 15 日、大阪府大阪市、グランキューブ大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳴海 覚志 (NARUMI Satoshi)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号 40365317

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし