

## 細胞表面におけるヒト成長ホルモン受容体レベルの制御機構に関する研究

齋藤 嘉朗<sup>#</sup>

## Modulations of human growth hormone receptor level on the cell surface

Yoshiro Saito<sup>#</sup>

Using a monoclonal antibody (GHRP2-88) raised against the extracellular portion of human growth hormone receptor (hGHR), the mechanisms on modulations of cellular levels of hGHR were investigated in human IM-9 cells. Upon stimulation with human growth hormone (hGH), hGHRs on the cell surface are down-regulated through internalization and degradation of hGHR. For hGHR internalization, hGH-mediated dimerization of hGHRs, but not staurosporine-sensitive phosphorylation is required. For hGHR degradation, however, staurosporine-sensitive phosphorylation is necessary. In the absence of hGH, hGHRs on the cell surface are cleaved to release human growth hormone-binding proteins (hGH-BPs), probably by a metalloprotease. In the presence of hGH, the hGH-BP release was rather decreased based on the reduction in cell surface hGHRs. Thus, the cell surface level of hGHR may be regulated post-translationally by the two mechanisms depending on the external hGH levels.

**Keywords** : growth hormone receptor, growth hormone-binding protein, modulation, monoclonal antibody

(Received May 30, 1997)

## はじめに

成長ホルモン (GH) は1944年に Li と Evans<sup>1)</sup>により見いだされた脳下垂体ペプチドホルモンの1つである。GHは脳下垂体前葉で産生・分泌され、個体の正常な成長、発育に必須であり、霊長類より魚類に至るまで、広く脊椎動物に存在している<sup>2,3)</sup>。このうち、ヒト成長ホルモン (hGH) は、191個のアミノ酸よりなる単鎖のポリペプチドホルモンで、糖は結合しておらず、その分子量は22,000である。GHの生理作用としては、成長促進に必須な軟骨細胞の増殖・分化作用、筋肉等における蛋白同化作用 (肝、筋におけるアミノ酸取り込み増加、蛋白合成促進)、糖および脂質代謝に関係したインスリン様作用 (糖の細胞への取り込み増加、糖酸化増加、グリコーゲン合成促進、脂肪分解抑制、脂質の合成促進等)、およびそれに引き続いて起こる抗インスリン様作用 (糖の取り込み抑制、脂質分解促進、脂質合成の抑制等) が知られている<sup>3,4)</sup>。さらに最近では神経系・内分泌系・免疫系の相互作用の点から、神経系及び免疫系に対する作用も注目を集めている<sup>5-7)</sup>。

hGHは、脳下垂体よりパルス的に放出され、その血中濃度は、個人により多少異なるものの、10 pM から 1 nM 程

度まで変動する<sup>8)</sup>。このGHの分泌には、視床下部で産生される成長ホルモン放出因子が促進的に、ソマトスタチンが抑制的に作用することが知られ、パルスの放出パターンは、これらの放出制御因子により形成されるものと考えられている<sup>3,9)</sup>。

GHが標的とする臓器の細胞膜上にはGHに特異的な受容体、即ち成長ホルモン受容体(GHR)が存在している。1987年に、LeungらによりウサギおよびヒトGHRがクローニングされ、その一次配列が決定された<sup>10)</sup>。成熟型のヒトGHR(hGHR)は、620個のアミノ酸よりなる単鎖のポリペプチドで、細胞膜を一回貫通する構造をとる。即ち、アミノ酸246個よりなる細胞外ドメイン、24個よりなる細胞膜貫通ドメイン、350個よりなる細胞内ドメインにより構成されている。遺伝子構造の解析も進んでおり、hGHRは9個のエクソンより成ること、即ち第2エクソンはシグナルペプチドと細胞外ドメインの一部、第3-7エクソンは細胞外ドメイン、第8エクソンは細胞膜貫通ドメイン、第9,10エクソンは細胞内ドメインをコードしている<sup>11)</sup>。<sup>125</sup>I-(標識)GHを用いたGHRのアフィニティラベル実験およびイムノブロット法による結果から、GHRの分子量は、110-130 kDaと報告されている<sup>12)</sup>。GHRは、そのmRNAの分布から、生体内のほとんどすべての臓器に存在していることが知られている<sup>13-15)</sup>。

近年の分子生物学および構造生物学の発達により、分子レベルからhGHの作用に関する解析が進んでいる。hGH

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Yoshiro Saito; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 242; Fax: 03-3707-6950; E-mail: yoshiro@nihhs.go.jp

の作用は、標的細胞上の hGHR に結合することにより開始されるが、この際、リガンドである hGH 1 分子に対し、hGHR は 2 分子結合することが、hGH と hGHR の細胞外ドメイン蛋白との X 線結晶構造解析等により明らかとされた<sup>16,17)</sup>。また、hGHR は細胞外ドメイン中のシステイン残基の位置、および細胞外ドメイン中の細胞膜貫通ドメイン近傍にある Trp-Ser-X-Trp-Ser (hGHR では Tyr-Gly-Glu-Phe-Ser) という配列の共通性から、サイトカイン受容体のスーパーファミリーに分類されている<sup>18,19)</sup>。

GH 作用の細胞内情報伝達分子としては、当初、protein kinase C の関与が示唆されていた<sup>20-23)</sup>。しかし、1993年に Argentsinger らにより、GH 作用にチロシンリン酸化酵素 JAK 2 が関与し、GH 刺激により JAK 2 が GHR に会合することが報告された<sup>24)</sup>。現在、GH 刺激により、GHR 分子のうち細胞膜近傍にあるプロリンに富む領域に会合した JAK 2 が活性化されて、これが signal transducer and activator of transcription (STAT) 分子のうち、STAT-1,3,5のいずれか又は複数を活性化し、これらの STAT 分子がホモ 2 量体またはヘテロ 2 量体を形成して核へ移行し、遺伝子の転写を活性化するというスキームが考えられている<sup>25-29)</sup>。

さて上記のように、GH の作用は、標的細胞上の GHR に結合することにより開始され、その情報が細胞内へと伝達される。従って、細胞表面の GHR 数は、GH の作用発現において重要な因子であると考えられる。GHR では、GH 刺激により GHR が細胞内移行 (internalize) し、細胞表面から一定時間消失すること (down-regulation) が、ヒト IM-9 細胞やラット脂肪細胞等で知られていた<sup>30-32)</sup>。この down-regulation は、膜表面の GHR レベルを制御している機構の 1 つ、特にリガンドである GH が制御している機構であると考えられ、細胞が GH 刺激に対して過剰に反応することを防いでいるものと推定される。しかし、細胞内に移行した GHR の運命、及び down-regulation のメカニズムなどに関しては明らかにされておらず、他の受容体での解析に比して進んでいなかった。この理由の一つとして、GHR をイムノプロット法で認識できる抗体が、ウサギの受容体に対するものを除いて、得られていなかったことがあげられる。そこで本研究の目的である、ヒトにおける細胞表面の GHR レベルの制御機構の解明のために、まず hGHR に対するモノクローナル抗体 (MAb) の調製を行った<sup>33)</sup>。その上で、ヒトリンパ球培養細胞 IM-9 を用い<sup>34)</sup>、hGH による hGHR の down-regulation のメカニズムを解析した<sup>35)</sup>。IM-9 細胞は、hGHR を生化学的に解析可能な程度発現していること、hGH が交差的に作用するプロラクチン受容体を発現していないこと、低血清条件下 hGH 依存的な増殖促進を示すことから、本研究に有用と考えた<sup>36,37)</sup>。本細胞は B 細胞株であり、IgG を産生する。なお、免疫担当細胞中で、B 細胞は GHR を最も多く発現していることが報告

されている<sup>38)</sup>。

一方、可溶性の GHR である成長ホルモン結合蛋白 (GH-BP) は、1985年にウサギ血中にその存在が確認された蛋白で、現在では、ほとんどの脊椎動物でその存在が報告されている<sup>39,40)</sup>。このうち、ヒト成長ホルモン結合蛋白 (hGH-BP) は、正常ヒト血漿中に約 1 nM の濃度で存在しており、その hGH に対する親和定数は、約  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、分子量は約 60 kDa である<sup>40-43)</sup>。その生理作用としては、in vivo の系で、血中 hGH の排泄抑制、分解抑制等による hGH の半減期増加や体内動態への影響が報告されている<sup>44,45)</sup>。一方、in vitro 系では、膜結合型受容体への hGH の結合抑制作用が報告されており<sup>46,47)</sup>、生体内における hGH 作用の制御を考える上で重要な因子である。GH-BP の生成機構としては、ラットおよびマウスで、GHR 遺伝子から alternative splicing により生成する 1.2-1.5 kb の mRNA が GH-BP をコードしていることが知られている<sup>48,49)</sup>。一方、ヒトでは、hGHR をコードする mRNA よりも短い mRNA は見いだされているものの、未だこれらの mRNA が hGH-BP をコードしているという確認は、なされていなかった<sup>50)</sup>。これらの知見より、hGH-BP は hGHR の切断により生成する可能性が考えられた。しかし、hGH-BP 生成を解析しうる in vitro 系は見いだされておらず、その生成機構は解明されていなかった。

本研究において、著者らは、hGHR の動態を解析する過程で、IM-9 細胞が hGH-BP を生成することを初めて見いだした。細胞表面における hGHR レベルの制御機構を解明する上で、この hGH-BP の生成も考慮に入れて解析することが必要であると考え、その生成機構の解明も行った<sup>51)</sup>。

## 1. 抗 hGHR ペプチド MAb の調製

本研究開始以前に、ラット GHR に対する MAb (MAb263, 細胞外ドメインを認識) が、ヒト GHR と交差反応性を示し、その免疫沈降および免疫組織染色に使用しうることが報告されていた<sup>52,53)</sup>。しかし、イムノプロット法に使用しうる抗体は報告されていなかった。そこで本研究ではまず、イムノプロット法への適用を主目的として、hGHR の細胞外ドメインペプチドに対する MAb を調製し、その詳しい性質を調べた。hGHR の細胞外ドメイン中親水性の部分 4 カ所を選び、それぞれのペプチド (GHRP 1 : N 末端より 30-47 残基, GHRP 2 : N 末端より 41-60 残基, GHRP 3 : N 末端より 70-89 残基, GHRP 4 : N 末端より 203-221 残基) を合成し、これをキャリアー蛋白 (牛血清アルブミン) と結合させた。これらのペプチドを免疫原として、MAb を産生する 20 株のハイブリドーマを樹立した。この 20 種の MAb のうち、4 種類の抗体 (GHRP 1-174, GHRP 2-88, GHRP 2-179 及び GHRP 3-56) が、ELISA (enzyme-linked immuno-

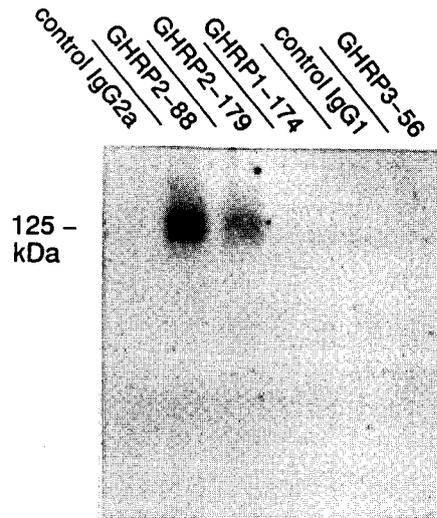


Fig. 1. Immunoblotting of crude membrane fractions from IM-9 cells using anti-hGHR monoclonal antibodies. The crude membrane fraction from human IM-9 cells was subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-hGHR monoclonal antibodies.

sorbent assay) 法において hGHR の細胞外ドメイン蛋白 (hGHR-ED)<sup>54)</sup> と高い反応性を示した。この中、ペプチドおよび hGHR-ED, いずれの固相抗原に対しても, GHRP 2-88 抗体が最も高い反応性を示した。これら 4 種類の抗体のアイソタイプを調べた結果, すべて IgG クラスであり, GHRP 3-56 抗体が ( $\gamma 1, \kappa$ ), 他の 3 種が ( $\gamma 2 a, \kappa$ ) であった。さらに, これら 4 種類の抗体が hGHR および hGH-BP のイムノプロット法による解析に使用しうるか否かを検討した。ヒトリンパ球培養細胞 IM-9 の粗膜画分を用いて, hGHR に対する反応性を検討したところ, GHRP 2-88 および GHRP 2-179 抗体を用いた場合に, 125 kDa の位置にバンドが出現した (Fig. 1)。これは以前, <sup>125</sup>I-hGH との化学架橋実験により報告された hGHR の分子量とほぼ同じである<sup>55)</sup>。しかし, GHRP 1-174, GHRP 3-56 抗体を用いた場合には出現しなかった。ELISA 法及びイムノプロット法における結果を総合すると, GHRP 2-88 抗体が最も高い反応性を有していた。従って, 以下の実験では, この GHRP 2-88 抗体を用いることとした。本 GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法における感度を検討した。IM-9 細胞の hGHR に対する感度を調べたところ, その検出限界は IM-9 細胞の数にして約  $3.0 \times 10^5$  であった。IM-9 細胞 1 個当たり約 3,000 分子の hGHR が存在している<sup>56)</sup>, 計算により hGHR 量に換算すると, 約 200 pg となった。

hGHR 蛋白には Asn 結合型の糖鎖が結合していることが知られている<sup>55)</sup>, 抗体の反応性が受容体における糖鎖の有無により, 影響を受けるかどうかを検討した。IM-9 細胞を tunicamycin で処理することにより<sup>56)</sup>, hGHR の分子量は 125 kDa から 85 kDa に変化した。しかし, 抗体の反応性は変化しなかった。このことから, GHRP 2-88 抗体は糖鎖の有無にかかわらず, hGHR を認識していることが示唆された。

ヒト血中には hGH-BP が約 1 nM の濃度で存在している<sup>40)</sup>。GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法系がこの蛋白の検出に適用できるかどうか検討したところ, 2 種の正常ヒト血漿中, その両者において, 分子量 55 kDa のバンドが得られた。IM-9 細胞の粗膜画分中の hGHR を対照とするデンシトメトリーにより, その血中濃度を算出したところ, それぞれ 1.6 nM 及び 1.7 nM であった。本結果より, GHRP 2-88 抗体は hGH-BP とともに反応性を示すことが示唆された。

なお, 本 GHRP 2-88 抗体のイムノプロット法以外への適用であるが, 細胞の免疫染色法には使用可能であったが, 免疫沈降法には使用不能であった。

## 2. hGHR の internalization と分解

GHR を発現している細胞に GH を作用させると, 細胞膜表面の GHR が細胞内移行 (internalize) し, 細胞表面から一定時間消失すること (down-regulation) が, IM-9 細胞を含む種々の細胞で知られている。これはリガンド自らが, 作用する膜表面の受容体レベルを制御している 1 つの例と考えられる。結合後, 細胞内移行したリガンド GH はリソゾームへと送られ, そのほとんどが分解される<sup>57, 58)</sup>。

一方, GH 結合後の GHR の運命に関して, Roupas と Herington らは, ラット脂肪細胞において internalize された hGH の少なくとも 75% が分解されること<sup>59)</sup>, および受容体が recycle する場合に internalize したリガンドと受容体が解離する細胞内小器官であるエンドソーム内の pH とほぼ同じ pH 5.5 で細胞膜表面の GHR に結合した hGH を処理しても hGH は 20% しか解離しないことから<sup>60)</sup>, GHR は recycle しないのではないかと推測した<sup>61)</sup>。一方, Bick らは, ラット肝臓において, GH 刺激により膜表面の GHR レベル (<sup>125</sup>I-hGH の結合活性) が減少し Golgi 体画分における

GHR レベルが上昇すること, GH レベルの低下とともに細胞膜上の GHR レベルが回復することから, GHR は recycle していると推定した<sup>62)</sup>. しかし, 細胞内移行した GHR の運命について, 直接 GHR を対象に解析した研究は, 動物種を問わずなされておらず, さらに down-regulation のメカニズムについての報告は皆無であった. そこで, ヒトにおける細胞表面の hGHR レベルの制御機構解明のために, 筆者らが調製した抗 hGHR 抗体 GHRP 2-88 を用い, IM-9 細胞における hGH による hGHR の down-regulation のメカニズムを解析した.

## 2.1 hGH 依存的な hGHR の down-regulation の実体

hGHR は, hGH 処理により細胞膜表面から細胞内へと internalize し, 細胞膜表面から一定時間消失すること (down-regulation) が知られているが, その機構は明らかにされていない. まず, GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法によりこの機構を解析した. hGH 処理により, IM-9 細胞の粗膜画分において, hGHR のバンド (分子量 125 kDa) の時間依存的な減少が見られた. hGH 無処理の細胞では, このような減少はみられなかった. 同条件下で, cytosol 画分及び培養上清において, GHRP 2-88 抗体反応物は量的に非常に少ないことから, hGHR は分解されたと考えられた. hGHR のバンドの放射能を BAS2000 により定量し, その減少量を解析したところ, 45 nM hGH 処理 120 分で細胞の受容体量は, 約 8.5% にまで減少した. hGH (45 nM) による hGHR の internalization をフローサイトメトリーで, 分解をイムノプロット法 (BAS2000 使用) で解析し, その時間依存性を検討した結果を Fig. 2 に示した. 45 nM hGH により, 膜表面の hGHR が 50% internalize される時間は, 刺激後 7.5 分, 50% 分解される時間は 27 分であった. 以上の結果から, hGH 刺激による hGHR の down-regulation の実体

は, 受容体の internalization 及びその細胞内における速やかな分解であることが明らかとなった.

次に受容体の分解に対するいくつかの薬物の影響を検討した. hGH による受容体の分解は, 細胞内酸性小器官の pH を上昇させる bafilomycin A<sub>1</sub> や chloroquine により<sup>63-65)</sup>, ほぼ完全に阻害された. また, 蛋白分解酵素阻害剤 leupeptin 及び pepstatin A によっても部分的に阻害された. なお, これらの薬物処理により, hGHR の internalization は阻害されなかった. これらの結果は, 細胞内における hGHR の分解はリソゾーム等の細胞内酸性小器官内で, 酵素的に引き起こされることを示唆するものと考えられた.

さらに, Percoll 密度勾配遠心法で IM-9 細胞を分画し, 細胞膜を含む細胞内小器官を 6 つの画分に分け, それぞれにおける hGHR 量を GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法で検討した. hGH 無処理の条件下, hGHR のほとんどは低密度画分に存在し, リソゾームのマーカー蛋白 (cathepsin D) が存在する高密度側には存在しなかった. しかし, hGH (45 nM) で 60 分処理すると, hGHR は高密度側にも分布するようになった. さらに, この時, hGHR の絶対量は, hGH 無処理時の約 25% に減少していた. この系に 200  $\mu$ M の chloroquine を加えると, hGHR は低密度画分に分布するようになり, 高密度画分には存在しなかった. リソゾームのマーカー蛋白の分布も chloroquine 処理により, 高密度側から低密度側に移行し, その分布パターンが hGHR のものと類似していることから, この結果も hGHR がリソゾームで分解されることを支持するものと考えられた.

## 2.2 hGHR の internalization 及び分解に関与する因子について

hGHR のエンドサイトーシス過程をより詳細に検討し, これに関与する因子を同定するため, 受容体の細胞膜表面

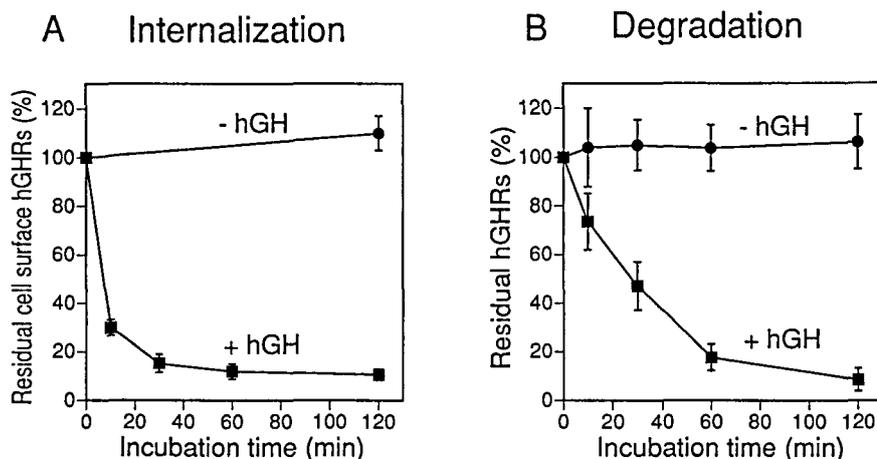


Fig. 2. Time course of hGH-induced internalization (A) and degradation (B) of hGHR. IM-9 cells were incubated with or without hGH (45 nM) at 37°C for indicated periods of time. (A) The cells were treated with MAb263 (anti-GHR) and *R*-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. (B) The crude membrane fractions from these cells were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88. The radioactivity of hGHR bands was determined with BAS2000.

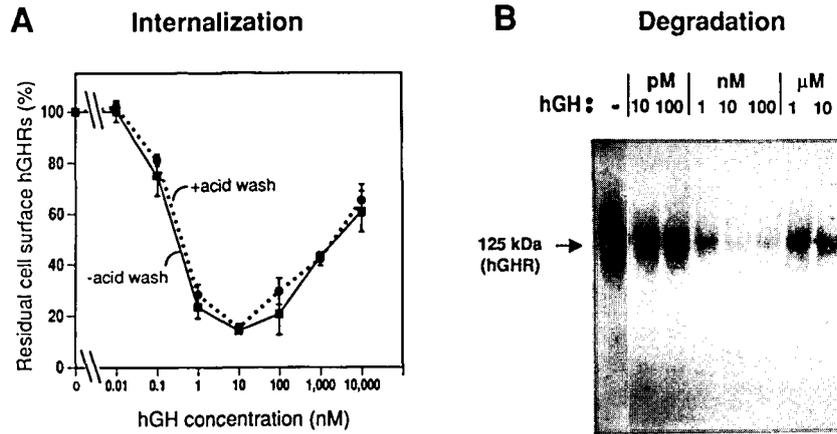


Fig. 3. Effect of hGH concentration on the internalization (A) and degradation (B) of hGHR. IM-9 cells were incubated with varying concentrations of hGH for 60 min at 37 °C. (A) The cells, acid-washed or unwashed, were treated with MAb263 and R-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. (B) The crude membrane fractions from these cells were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88.

からの internalization と細胞内での分解に分けて解析を行った。受容体の細胞膜表面からの internalization はフローサイトメトリーにより、細胞内での分解はイムノプロット法により解析した。

まず、hGH 濃度の影響を検討した。hGHR の internalization は、10 nM で最大となる逆釣り鐘状のパターンを示した(Fig. 3A)。分解についても同様のパターンを示した(Fig. 3B)。hGH は脳下垂体より間欠的に放出され、血中 hGH 濃度は約 10 pM から 1 nM の幅で変動することが報告されている<sup>8)</sup>。本結果により、10 pM の hGH では、受容体はほとんど internalize および分解されず、1 nM では約 80% がされることから、細胞表面の受容体レベルは、血中 hGH レベルに応じて、きわめて効率的に制御されていると考えられた。また、hGH は受容体と 1 : 2 の分子比で結合し、過剰量の hGH 濃度、即ち約 1 μM 以上では、この比が崩れ 1 : 1 の結合をすることが報告されている<sup>16,66)</sup>。hGH による受容体の internalization、さらには分解が、100 pM 以下及び 1 μM 以上で共に起きにくいことから、hGHR の internalization 及び分解には、hGH を介する受容体の 2 量体化が必要であることを示唆する結果であると考えられた。internalization における受容体 2 量体化の必要性に関しては、最近 Ilondo らも、hGHR と 1 : 1 の複合体しか形成しない hGH 変異体を用いた実験より、その必要性を示唆している<sup>67)</sup>。

次に、蛋白質リン酸化反応が GH の細胞内情報伝達に関与していると考えられているが、この蛋白質リン酸化反応が、受容体 internalization 及び分解にも関与しているの可否かを調べるため、蛋白質リン酸化酵素阻害剤 staurosporine の影響を検討した。staurosporine は、protein kinase C をはじめとして、protein kinase A, calcium/calmodulin kinase, tyrosine kinase 等、リン酸化酵素を幅広く阻害することが知られている<sup>68-71)</sup>。まず、実際に hGH 刺激により受容体会合蛋白が

リン酸化され、さらに staurosporine がそのリン酸化を阻害することを確認するために、<sup>32</sup>P により IM-9 細胞をラベルし、その粗膜画分を用いて抗 GHR 抗体 MAb263 による免疫沈降を行った。hGH 刺激後、2.5 分において分子量 135, 69, 60, 35 及び 28 kDa の蛋白質のリン酸化が認められ、これらのリン酸化は staurosporine 処理により阻害された(Fig. 4)。さらにこれらのリン酸化される蛋白の中、135 kDa の蛋白はチロシンキナーゼ JAK 2 であり、hGH 刺激により hGHR に会合すると共に、チロシンリン酸化を受けることを免疫化学的に確認した。これらのリン酸化実験と同一条件の staurosporine 処理により、受容体の internalization

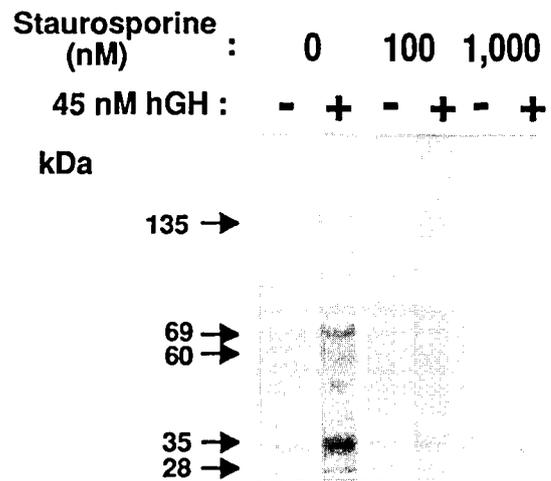


Fig. 4. hGH-induced phosphorylation of hGHR-associated proteins. IM-9 cells were metabolically labeled with [<sup>32</sup>P] Pi for 60 min at 37 °C. The cells were preincubated with staurosporine or vehicle (DMSO) for 15 min at 37 °C. After addition of hGH (45 nM) or medium alone, the cells were incubated for 2.5 min at 37 °C. Solubilized crude membrane fractions from these cells were immunoprecipitated with MAb263 and the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography.

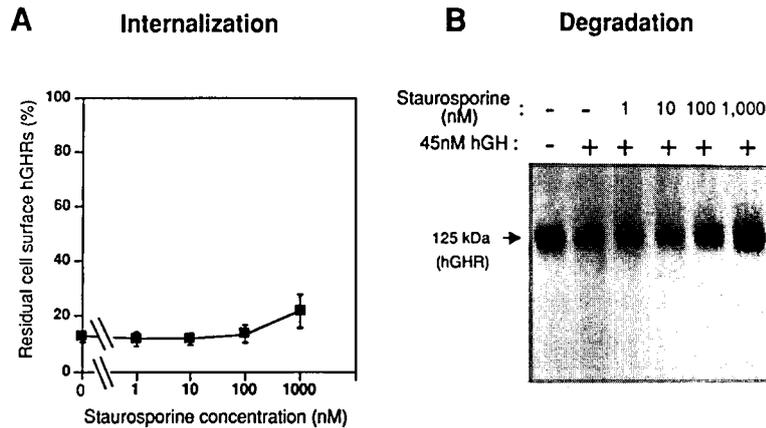


Fig. 5. Effect of staurosporine on the internalization (A) and degradation (B) of hGHR. IM-9 cells were preincubated with staurosporine or vehicle (DMSO) for 15 min at 37°C. After addition of hGH (45nM) or medium alone, the cells were incubated for 60 min at 37°C. (A) The cells were treated with MAb263 and *R*-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. (B) The crude membrane fractions from these cells were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP2-88.

は殆ど阻害されなかったが、分解は濃度依存的に阻害された (Fig. 5)。以上の結果から、hGHR の internalization には、hGH により引き起こされる staurosporine 感受性のリン酸化反応が必要とされないこと、しかし分解に至る過程には、何らかの蛋白リン酸化反応が関与していることが示唆された。

staurosporine 処理した IM-9 細胞を、Percoll 密度勾配遠心法で分画し、それぞれの hGHR 分布量を GHRP 2-88 抗体を用いたイムノプロット法で検討した。hGH 刺激により hGHR は高密度側に分布するようになるが、staurosporine 処理により、hGHR は、そのほとんどが低密度画分に存在するようになった。staurosporine 処理は Rab 5, cathepsin D の分布には、ほとんど影響を与えなかった。staurosporine 処理しても hGHR は internalize されること、初期エンドソームのマーカー蛋白である Rab 5 が低密度画分に存在し、かつその分布パターンが hGHR のものと類似していることから、staurosporine 処理により、hGHR は初期エンドソームに留まっている可能性が考えられた。

以上の結果より、hGH 刺激による受容体の down-regulation の実体が、hGHR の internalization に続く、その速やかな分解であることを明らかにした。また、そのメカニズムを解析し、hGHR の internalization には、hGH により引き起こされる受容体 2 量体化が必要であることを示唆する結果が得られた。この際、staurosporine 感受性のリン酸化は不必要であることが示唆された。しかし、hGHR が分解にいたる過程には staurosporine 感受性のリン酸化反応が必要であることが示唆された。

受容体の internalization におけるリン酸化反応の役割に関する研究は、EGF 受容体で最も進んでいる。EGF 受容体はその細胞内ドメインにリン酸化酵素活性を持っており、受容体自身もリガンドの結合によりリン酸化される

が、そのリン酸化酵素活性を失った変異体を用いても、internalization は起こることが知られている<sup>72)</sup>。また、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 受容体についても同様の結果が得られている<sup>73)</sup>。一方、insulin 受容体では、その internalization に受容体 kinase の活性が必要であることが報告されている<sup>74)</sup>。hGHR はそれ自体リン酸化酵素活性を持っていないが、本研究でも示唆されたように、hGH 刺激により hGHR にリン酸化酵素 JAK 2 が会合する。しかし、hGH 刺激により hGHR は、EGF 受容体や M-CSF 受容体と同様に、リン酸化に関係なく internalize されることが、本研究の結果から予想された。最近、Allevato らは、ラットの GHR 変異体をサル COS-7 細胞に transfect した系を用いて、Phe<sup>327</sup>-Ile-Glu-Leu の Phe を Ala に変異させると hGH 刺激による GHR の internalization が見られなくなること、GHR の細胞内ドメイン中 JAK 2 が会合する領域を除去しても internalization は見られることを報告した<sup>75)</sup>。この部分のアミノ酸は、ヒト GHR でも保存されていることから (Phe<sup>326</sup>-Ile-Glu-Leu)、ヒトにおいてもこの配列が internalization モチーフとして機能していると推定される。

EGF 受容体や M-CSF 受容体は、リガンドと共に internalize された後、分解されるが、この分解を受けるには受容体のリン酸化酵素活性が必要であり、受容体の自己リン酸化は必要ないことが知られている<sup>76-78)</sup>。一方、PDGF 受容体では、その分解に phosphatidylinositol 3-kinase または Nck の受容体への会合が必要である<sup>79)</sup>。本研究においてもリン酸化酵素阻害剤 staurosporine により hGHR の分解が抑えられたことから、受容体に会合するリン酸化酵素、または細胞内の別のリン酸化酵素による蛋白リン酸化が、受容体の分解に至る過程で、重要な役割を果たしているものと予想される。この候補として、まずは受容体に会合し

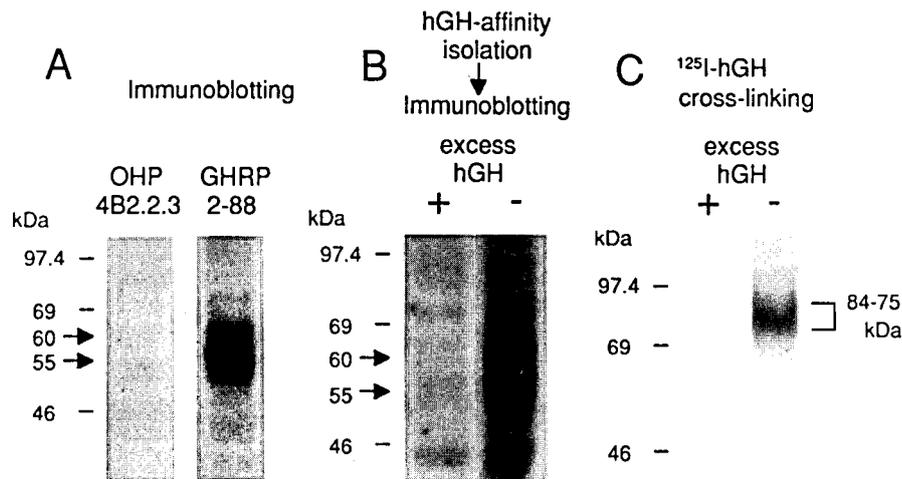
ている JAK 2 が挙げられる。この会合は、hGH 刺激後、2.5 分で最大となり、10分まで JAK 2 の会合が見られ、30分では見られなかった。hGHR の分解が30分で50%程度であることを考えると、もし JAK 2 が分解に関与しているとするれば、かなり早い段階で関与していると思われる。Percoll 密度勾配遠心法の結果から、staurosporine 処理により、hGHR は初期エンドソームに留まっていると推定されたことから、hGHR の分解過程、特に初期エンドソームにおいて、JAK 2 又は何らかのリン酸化酵素が作用している可能性が考えられる。一方、hGHR 会合蛋白に関しては、JAK 2 以外の蛋白の同定はできていない。EGF 受容体において、会合している annexin I が multivesicular body (後期エンドソーム) 内で、リン酸化されるという報告がある<sup>80)</sup>。そのため、hGHR に会合している35 kDa の蛋白は、annexin ではないかと考え、抗 GHR 抗体で免疫沈降した画分を、抗 annexin 抗体でイムノブロット法により解析した。しかし、抗 annexin 抗体に反応するバンドは得られず、35 kDa の蛋白は annexin 以外の蛋白であると考えられた。GH 刺激による細胞内蛋白質のリン酸化の解析は、主にマウス前脂肪細胞 (3T3-F442A) の系で、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロット法による実験により、数多く報告されており<sup>24,81,82)</sup>、GH 刺激によりリン酸化される蛋白として、JAK 2 および STAT 以外に、insulin receptor substrate-1 (185 kDa)<sup>83)</sup> および MAP kinase (約40 kDa)<sup>84)</sup> が報告されている。しかし、<sup>32</sup>P を用いた metabolic labeling の実験は本研究以外に1報しかなく、Ser/Thr リン酸化の解析は進んでいない。

### 3. hGHR からの hGH-BP の生成

筆者らは、hGHR の down-regulation に関する実験において、hGH 非存在下の IM-9 細胞培養上清中に、抗 hGHR 抗体 GHRP 2-88 と反応する蛋白が存在することを見い出した。この蛋白は可溶性の受容体である hGH-BP の可能性が高いものと考えられた。研究開始時、hGH-BP の産生を解析しうる in vitro 系は報告されておらず、その hGH-BP の生成機構は解明されていなかった。そこで、細胞表面における hGHR レベルの制御機構を解明する上で、この hGH-BP の生成も考慮に入れて解析することが必要であると考え、その生成機構の解明を行った。

#### 3.1 IM-9 細胞からの hGH-BP の生成

IM-9 細胞を37°Cで一定時間インキュベートし、その培養上清を濃縮後、抗 hGHR 抗体を用いたイムノブロット法により解析したところ、分子量60 kDa 及び55 kDa のバンドが検出された (Fig. 6A)。GHRP 2-88抗体と同じクラス (IgG 2 a) の MAb である OHP 4B2.2.3抗体 (抗17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 抗体; コントロール)<sup>85)</sup> では、これらのバンドは見られなかった。次に、hGH 固定化ゲルに結合した画分のイムノブロット法による解析により、これら2種の蛋白の hGH 結合能を調べたところ、これらに相当する分子量の位置に、バンドが得られた (Fig. 6B)。また、2価架橋試薬 DSS を用いた化学架橋反応を利用して、培養上清中に存在する、<sup>125</sup>I-hGH 結合活性のある蛋白を解析したところ、分子量84-75 kDa の幅の広いバンドが得られた (Fig. 6C)。hGH の分子量 (22 kDa) を84-75 kDa から引く



**Fig. 6.** Human growth hormone-binding proteins (hGH-BPs) release from IM-9 cells. (A) IM-9 cells were incubated for 120 min at 37°C. The supernatants were concentrated and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using OHP 4B2.2.3 (control antibody) or GHRP 2-88 (anti-hGHR). (B) The concentrated supernatants were absorbed with hGH-agarose in the presence or absence of excess hGH, and the absorbed proteins were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88. (C) hGH-BPs in the concentrated supernatants were cross-linked with <sup>125</sup>I-labeled hGH in the presence or absence of excess hGH and immunoprecipitated with MAb263 (anti-GHR). The immunoprecipitants were subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography.

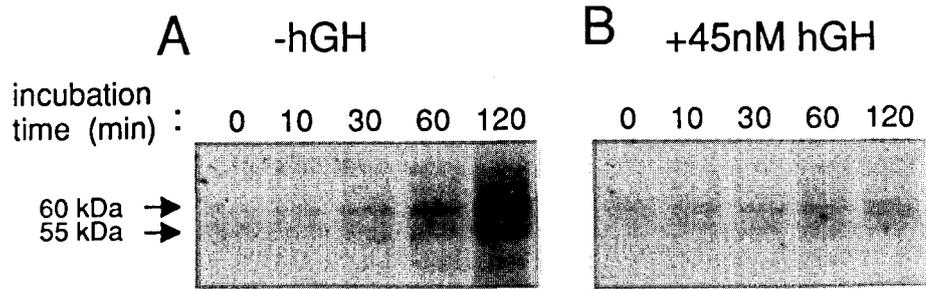


Fig. 7. Effect of hGH addition on hGH-BPs release. The IM-9 cells were incubated with medium alone (A) or 45nM hGH (B) at 37°C for indicated periods of time. The supernatants were concentrated and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP 2-88.

と、62-53 kDa となり、イムノプロット法により検出されたバンドの分子量に相当する。

さらに、IM-9 細胞培養上清中に放出されてくる hGH-BP の、hGH に対する親和定数を、Scatchard plot により解析したところ、 $4.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  であった。また、放出量は、1時間当たり、細胞膜上の hGHR の約 5% 相当であった。

次に hGH-BP 放出の時間依存性を検討した。インキュベーション時間 2 時間までの条件下では、hGH-BP は時間依存的に放出された。この系にリガンドである hGH (45 nM) を添加した条件下では、hGH-BP の時間依存的放出が認められるものの、その放出量は逆に減少していた (Fig. 7)。

以上の結果より、IM-9 細胞より hGH 結合能を持つ分子量 60 kDa 及び 55 kDa の可溶性蛋白、即ち、hGH-BP が放出されてくることが示唆された。ヒト血清中に存在する hGH-BP の分子量は、約 60 kDa、また親和定数は  $3 - 9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  と報告されており、今回の結果は極めて近い値を示した<sup>40-43</sup>。さらに、インキュベーション時間 2 時間までの条件下では、hGH は hGH-BP 放出に負の制御因子として作用することが示唆されたが、これは膜表面の hGHR が hGH 刺激により internalize され、膜表面の hGHR レベルが低下することに起因するものと考えられる。また、2つの分子量の hGH-BP が認められたが、IM-9 細胞には、full-length の hGHR mRNA の他に、第 3 エクソンを欠損した hGHR mRNA が存在していることが知られている<sup>86</sup>。さらに、hGH に対する親和定数は、この第 3 エクソンの欠損により、全く影響を受けないことも報告されている<sup>87</sup>。従って、本研究において検出された、55 kDa の hGH-BP は、60 kDa の hGH-BP から第 3 エクソン部分が欠損したものであると推定される。この第 3 エクソンを欠損した hGHR は、欠損していない hGHR と共に (臓器によりその比率は異なるもの) ヒトのすべての臓器に分布している<sup>88</sup>。

### 3.2 hGH-BP の生成機構

まず、IM-9 細胞における hGH-BP の生成に、新たな蛋白合成が必要か否かを調べる目的で、IM-9 細胞を蛋白合成阻害剤、cycloheximide (50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) で処理した。これらの処理により、hGH-BP 放出量に変化はなかったこ

とから、新たな蛋白合成は必要ないことが示唆された。なお、これらの濃度の cycloheximide で蛋白合成は確かに阻害されていた。

さらに IM-9 細胞における hGH-BP の生成に、合成された蛋白の輸送系が必要か否かを調べる目的で、IM-9 細胞を、主に小胞体からゴルジ体への輸送を阻害することにより合成された蛋白の分泌を阻害する brefeldin A (0.2, 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) で処理した<sup>89,90</sup>。これらの処理により、hGH-BP 放出量に変化はなかったことから、合成蛋白の輸送系は必要ないことが示唆された。これらの濃度の brefeldin A 処理した IM-9 細胞の粗膜画分中には、新たに分子量 105 kDa の hGHR が得られた。これは brefeldin A の作用により小胞体中に留まっている、糖鎖をプロセッシングされる前の hGHR と考えられた。

次に、hGH-BP が細胞膜上に存在する hGHR に由来することを明らかにする目的で、hGH 前処理を行った。これは hGH (45 nM, 2時間) 処理により細胞膜上の受容体の 90% 以上が internalize し、さらに速やかに分解されるという性質を利用したものである (Fig. 2)。この hGH 前処理によ

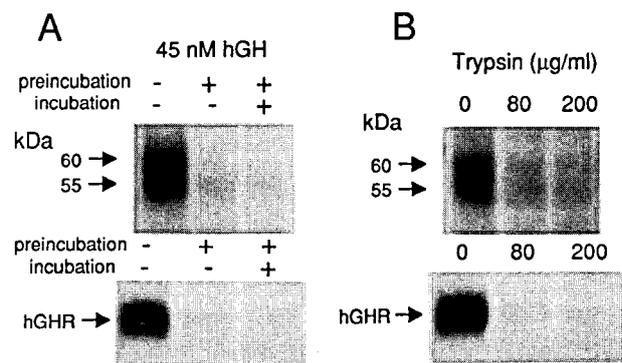


Fig. 8. Effect of hGH-and trypsin-pretreatment on hGH-BPs release. (A) IM-9 cells were preincubated with or without hGH for 120 min at 37°C, washed and further incubated with or without hGH for 120 min at 37°C. (B) IM-9 cells were pretreated with or without trypsin for 6 min at 37°C, then added trypsin inhibitor (1 mg/ml). The cells were washed and further incubated for 120 min at 37°C. The supernatants and membrane fractions obtained in (A) and (B) were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP2-88.

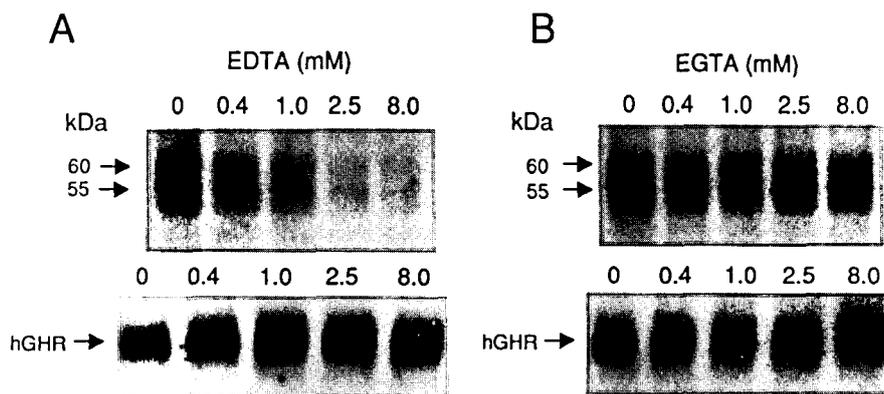


Fig. 9. Effect of EDTA or EGTA on hGH-BPs release. IM-9 cells were incubated with EDTA (A) or EGTA (B) for 120 min at 37°C. The supernatants and membrane fractions were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting using GHRP2-88.

り、hGH-BPの放出はほとんど阻害された (Fig. 8A)。さらに、trypsin 前処理により細胞外部分の蛋白を分解した場合には、hGH-BP 放出は全く見られなかった (Fig. 8B)。なお、使用した濃度の trypsin により、細胞の cytosol 画分の蛋白の電気泳動パターンは、全く変わらないことから、trypsin は細胞内まで入っていないと考えられた。以上の結果から、IM-9 細胞より放出される hGH-BP は、細胞膜上の受容体に由来することが示唆された。

次に、hGH-BP 放出に対する蛋白分解酵素阻害剤の影響を検討した。試みた thiol-, serine-, acid-protease の阻害剤 (250  $\mu$ M APMSF, 10  $\mu$ M aprotinin, 100  $\mu$ M leupeptin 及び 100  $\mu$ M pepstatin A) および 250  $\mu$ M phosphoramidon (collagenase 等を阻害する) により、hGH-BP 放出は阻害されなかったが、0.4 mM EDTA では部分的に阻害された。この EDTA、および 1, 10-phenanthroline は hGH-BP 放出を濃度依存的に阻害したが、EGTA による阻害は部分的であった (Fig. 9)。種々の金属イオンに対するキレート安定度定数において、EDTA が EGTA よりも高い値を持つイオンのうち、特にその差の大きい  $Mg^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  および  $Zn^{2+}$  について<sup>91-93)</sup>、EDTA の hGH-BP 放出阻害効果に対する回復作用を調べたところ、 $Mg^{2+}$  および  $Co^{2+}$  イオンの添加により、阻害の顕著な回復がみられたが、 $Mn^{2+}$  および  $Zn^{2+}$  の効果は部分的であった。これらの結果から、hGH-BP の放出には、細胞膜上の hGHR の、金属プロテアーゼによる切断が関与する可能性が考えられた。

以上の結果より、IM-9 細胞からの hGH-BP の放出には新たな蛋白合成は必要なく、細胞膜上の hGHR が切断されて生成することが示唆された。従って、細胞表面の hGHR レベルの制御を考える上で、その切断による hGH-BP 放出も考慮に入れる必要性が示唆された。さらに、この切断における金属プロテアーゼの関与の可能性が考えられた。

最近、ヒト Hep G 2 細胞および Hep 3 B 細胞より、hGH-BP が放出されることが相次いで報告された<sup>94,95)</sup>。まず、<sup>125</sup>I-hGH との化学架橋反応を利用した実験により、Hep G 2

細胞から、分子量 94 および 58 kDa の hGH-BP が放出されてくることが示された<sup>94)</sup>。しかし、著者らの研究では Hep G 2 細胞の膜表面に hGHR はほとんど存在せず、これらの報告の結果は追試できなかった。また、Hep 3 B 細胞からも <sup>125</sup>I-hGH で処理した培養上清のゲル濾過法による分析により、hGH 結合能を持つ可溶性蛋白 (分子量は不明) が放出されてくることが見出された<sup>95)</sup>。しかし、いずれの場合も、詳しい性質や生成機構に関する研究はなされていない。また、IM-9 細胞および Hep G 2 細胞を、SH 試薬 (20 mM 程度の iodoacetamide, 5-10 mM N-ethylmaleimide 等) と共にインキュベートすると、分子量 80 kDa の hGH 結合能を持つ可溶性蛋白が培養上清中に放出されてくることが報告されている<sup>96,97)</sup>。しかし、分子量が異なること、これらチオール基に作用する薬物は、生体内では存在しないことから、生理的な現象ではないと思われる。

ヒトにおいて血清中の hGH-BP のレベルが hGH により制御されるか否かについては、in vitro の報告はないが、in vivo での報告は多数存在する。しかし、相反する報告があり、未だ結論は得られていない<sup>98)</sup>。本研究の結果から、IM-9 細胞からの hGH-BP の放出には新たな蛋白合成は必要なく、細胞膜上の hGHR が切断されて生成することが示唆された。このことから、hGH-BP 放出は細胞膜上の hGHR レベルに依存するものと考えられ、in vivo においても、少なくとも短期的には、hGH 過剰の条件下では、hGH-BP 放出は hGHR の down-regulation に伴って減少するものと予想される。従って、本研究の結果は、hGH による hGH-BP 放出の負の制御という考えを支持する結果となった。しかし、hGHR をコードする mRNA 量の増減等が関与すると思われる、hGH による長期的な制御については、結論を出す段階ではない。

collagenase や gelatinase 等のマトリックスメタロプロテアーゼは、代表的な金属プロテアーゼであり、その活性中心には Zn 分子が存在する<sup>99)</sup>。近年、TNF- $\alpha$  前駆体の細胞膜表面における切断への、マトリックスメタロプロテアー

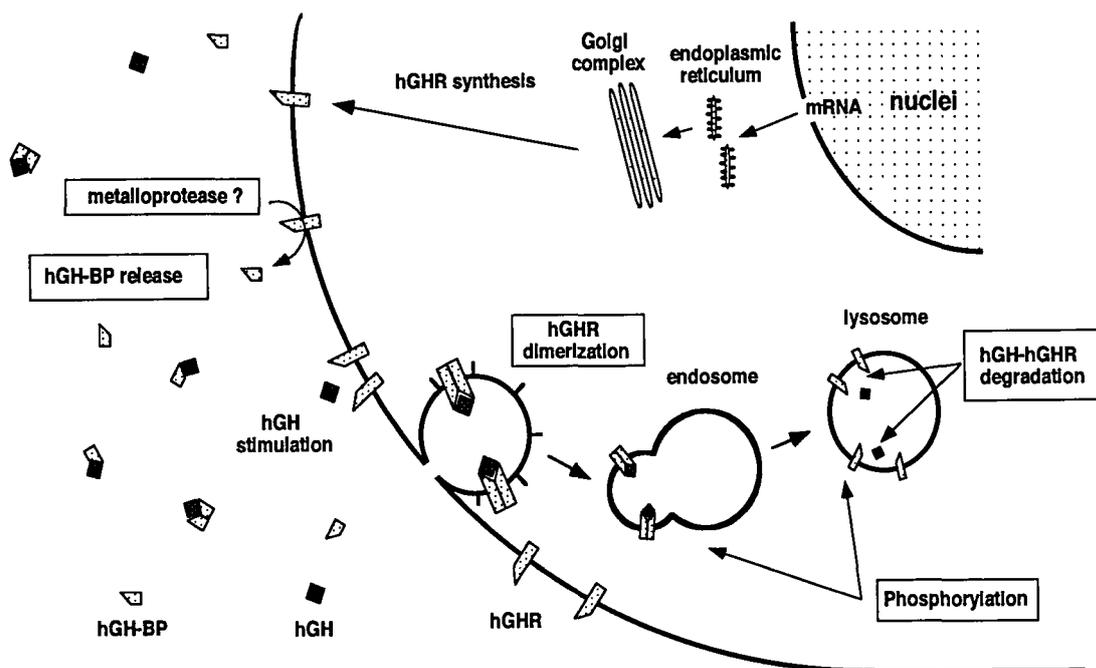


Fig.10. Modulations of hGHR level on the cell surface by internalization and degradation of hGHR, and by hGHR cleavage to generate hGH-BP.

への関与が有力となってきた。即ち、EDTAによるTNF- $\alpha$ 放出の阻害がZnCl<sub>2</sub>の添加により回復すること<sup>100)</sup>、TNF- $\alpha$ 前駆体の切断部位のアミノ酸配列が、collagenや $\alpha_1$ -macroglobulinのマトリックスメタロプロテアーゼによる切断部位の配列と相同性があること<sup>101)</sup>、マトリックスメタロプロテアーゼの添加によりTNF- $\alpha$ の放出がみられること<sup>102)</sup>、等の知見が得られてきている。しかし、EDTAによるhGH-BP放出の阻害がZn<sup>2+</sup>を添加しても部分的にしか回復しないこと、phosphoramidonによりhGH-BP放出が阻害されないことから、TNF- $\alpha$ 放出に関与するマトリックスメタロプロテアーゼがhGH-BP放出に関与している可能性は低いと思われる。

#### おわりに

ヒトにおける細胞膜表面hGHRレベルの制御機構を解析するため、hGH刺激によるhGHRのdown-regulation(internalizationおよび分解)及びhGHRの切断によるhGH-BP放出について検討した。現在までに得られた結果によれば、hGH刺激による受容体のdown-regulationはリガンドによる能動的な制御、hGH-BPの放出は構成的な制御と理解することができると思われる(Fig.10)。

hGH非存在下、IM-9細胞における膜表面のhGHRの半減期(50%代謝される時間)は約10時間であること<sup>30,61)</sup>、および本研究の結果、1時間当たり約5%の受容体が結合蛋白として放出されてくることが示唆されたので、10時間では約50%が放出されると算出される。即ち、hGHが存在しない状態、または濃度の低い状態(hGH非放出期の濃度である10 pM程度)では、hGH-BP放出が、hGHRの主

な代謝経路であり、一方、hGH濃度が高い状態(パルスのhGH放出のピーク濃度である1 nM程度)では細胞内へのinternalizationが主な代謝経路であるという仮説が考えられた。

細胞表面のhGHRレベルが変化している遺伝病として、Laron型小人症が知られている。この疾患は成長障害が起きているにも関わらず、血中hGHは高値であり、hGH治療に抵抗性の小人症である<sup>103)</sup>。本症の患者では、肝組織膜画分にhGHが結合しないこと、血中hGH-BPが欠損、あるいはわずかにしか存在しないことが報告されている<sup>104-106)</sup>。本症の原因として、hGHR遺伝子の欠失、点突然変異が報告されているが<sup>103,107)</sup>、多くの症例ではhGHR遺伝子の異常は認められておらず、本症の原因は多岐にわたると思われる。一方、Laron型小人症と同様に、hGH抵抗性を示すにもかかわらず、血中hGH-BPレベルの正常な疾患が報告されている<sup>108)</sup>。本研究の結果より、仮にhGH抵抗性であっても(即ち、細胞内情報伝達系等に欠陥が存在しても)、hGH結合活性のあるhGHRが膜表面に発現していれば、hGH-BPは構成的に放出され、hGH-BPレベルは正常値を示すと推定される。

さらに、hGHの生理的分泌が増加しているにも関わらず、血中のhGH-BP濃度が正常人の30-110倍高く、部分的な(hGH感受性の)成長障害を起こしている遺伝病も報告されている<sup>109)</sup>。また、肝内胆管減少症であるAlagille症候群でも、hGHの生理的分泌の増加、血中のhGH-BP濃度の上昇およびinsulin-like growth factor-I濃度の低下が起こることが知られており、その50%のヒトに成長障害がみられる<sup>110)</sup>。これらの原因は現在不明であるが、その可能性

の1つとして、細胞膜表面におけるhGHRの切断の亢進によるhGH-BP放出の増加が考えられる。このような遺伝病および疾病の原因解明および治療のためにも、切断酵素の同定を始めとする膜表面GHRレベルの制御機構のより詳細な解析が必要となろう。

### 謝 辞

本研究は、機能生化学部において、寺尾允男前部長および澤田純一現部長のご指導の下行われたものであり、両先生、および当初、直接ご指導いただいた鈴木和博現代謝生化学部室長に深く感謝いたします。また、終始、ご指導ご助言を賜りました、機能生化学部の皆様に深く感謝いたします。本論文は、著者の博士論文より一部抜粋したものであります。

### 文 献

- 1) Li, C. and Evans, H. M.: *Science*, **99**, 183~184 (1944)
- 2) 早川亮夫、内田恵理子: “ヒト成長ホルモン”, pp. 12-33, 岡田義昭編, メディカルレビュー社, 東京 (1994)
- 3) Strobl, J. S. and Thomas, M. J.: *Pharmacol. Rev.*, **46**, 1~34 (1994)
- 4) 対馬敏夫: “ヒト成長ホルモン”, pp. 74-97, 岡田義昭編, メディカルレビュー社, 東京 (1994)
- 5) Berci, I.: *Neuroimmunomodulation* **1**, 201~216 (1994)
- 6) Murphy, W. J., Rui, H. and Longo, D. L.: *Life Sci.*, **57**, 1~14 (1995)
- 7) Harvey, S.: “Growth hormone”, pp. 437-449, eds. Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H., CRC Press, Boca Raton, FL (1995)
- 8) Winer, L. M., Shaw, M. A. and Baumann, G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 1678~1686 (1990)
- 9) 加治秀介、千原和夫: “ヒト成長ホルモン”, pp. 174-194, 岡田義昭編, メディカルレビュー社, 東京 (1994)
- 10) 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**, 537~543 (1987)
- 11) Godowski, P. J., Leung, D. W., Meacham, L. R., Galgani, J. P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P. S., Parks, J. S., Laron, Z. and Wood, W. I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8083~8087 (1989)
- 12) Kerry, P. A., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C. and Edery, M.: *Endocrine Rev.*, **12**, 235~251 (1991)
- 13) Mertani, H. C., Delehay-Zervas, M. C., Martini, J. F., Postel-Vinay, M. C. and Morel, G.: *Endocrine*, **3**, 135~142 (1995)
- 14) Mertani, H. C. and Morel, G.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **109**, 47~61 (1995)
- 15) Burton, K. A., Kabigting, E. B., Clifton, D. K. and Steiner, R. A.: *Endocrinology*, **131**, 958~963 (1992)
- 16) Cunningham, B. C., Ultsch, M., de Vos, A. M., Mulkerrin, M. G., Clauser, K. R. and Wells, J. A.: *Science*, **254**, 821~825 (1991)
- 17) de Vos, A. M., Ultsch, M. and Kossiakoff, A. A.: *Science*, **255**, 306~312 (1992)
- 18) Bazan, J. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 788~795 (1989)
- 19) Cosman, D., Lyman, S. D., Idzerda, R. L., Beckmann, M. P., Park, L. S., Goodwin, R. G. and March, C. J.: *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 265~270 (1990)
- 20) Smal, J. and De Meyts, P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1232~1240 (1987)
- 21) Doglio, A., Dani, C., Grimaldi, P. and Ailhaud, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1148~1152 (1989)
- 22) Smal, J. and De Meyts, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4705~4709 (1989)
- 23) Slootweg, M. C., de Groot, R. P., Herrmann-Erlee, M. P. M., Koornneef, I., Kruijer, W. and Kramer, Y. M.: *J. Mol. Endocrinol.*, **6**, 179~188 (1991)
- 24) Argetsinger, L. S., Campbell, G. S., Yang, X., Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Ihle, J. N. and Carter-Su, C.: *Cell*, **74**, 237~244 (1993)
- 25) Goujon, L., Allevato, G., Simonin, G., Paquereau, L., Le Cam, A., Clark, J., Nielsen, J. H., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C., Edery, M. and Kelly, P. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 957~961 (1994)
- 26) VanderKuur, J. A., Wang, X., Zhang, L., Campbell, G. S., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 21709~21717 (1994)
- 27) Finbloom, D. S., Petricoin, E. F. III, Hackett, R. H., David, M., Feldman, G. M., Igarashi, K., Fibach, E., Weber, M. J., Thorner, M. O., Silva, C. M. and Lerner, A. C.: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2113~2118 (1994)
- 28) Campbell, G. S., Meyer, D. J., Raz, R., Levy, D. E., Schwartz, J. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 3974~3979 (1995)
- 29) Wood, T. J. J., Silva, D., Lobie, P. E., Pircher, T. J., Gouilleux, F., Wakao, H., Gustafsson, J. A., Groner, B., Norstedt, G. and Haldosen, L. A.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 9448~9453 (1995)
- 30) Lesniak, M. A. and Roth, J.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 3720~3729 (1976)
- 31) Gorin, E., Grichting, G. and Goodman, H. M.: *Endocrinology*, **115**, 467~475 (1984)
- 32) Wakai, K., Tsushima, T., Isozaki, O., Sato, Y., Sato, K. and Shizume, K.: *Endocrinology*, **114**, 1475~1482 (1984)
- 33) Saito, Y., Yamazaki, T., Suzuki, K., Ikebuchi, H., Asakura, A., Ota, Y., Sawada, J. and Terao, T.: *Biol. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **17**, 983~986 (1994)
- 34) Fahey, J. L., Buell, D. N. and Sox, H. C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **190**, 221~234 (1971)
- 35) Saito, Y., Teshima, R., Yamazaki, T., Ikebuchi, H., and Sawada, J.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **106**, 67~74 (1994)
- 36) Suzuki, K., Suzuki, S., Saito, Y., Ikebuchi, H. and Terao, T.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 11320~11327 (1990)
- 37) Lesniak, M. A., Gorden, P., Roth, J. and Gavin, J. R. III.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 1661~1667 (1974)
- 38) Badolato, R., Bond, H. M., Valerio, G., Petrella, A., Morrone, G., Waters, M. J., Venuta, S. and Tenore, A.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 984~990 (1994)
- 39) Ymer, S. I. and Herington, A. C.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **41**, 153~161 (1985)
- 40) Baumann, G., Shaw, M. A. and Amburn, K.: *J. Endocrinol. Invest.*, **17**, 67~81 (1994)
- 41) Baumann, G., Stolar, M. W., Amburn, K., Barsano, C. P. and De Vries, B. C.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**, 134~141 (1986)
- 42) Herington, A. C., Ymer, S. I. and Stevenson, J. L.: *J. Clin. Invest.*, **77**, 1817~1823 (1986)
- 43) Herington, A. C., Ymer, S. I. and Stevenson, J. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 150~155 (1986)

- 44) Baumann, G., Amburn, K. D. and Buchanan, T. A.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **64**, 657~660 (1987)
- 45) Fairhall, K. M., Carmignac, D. F. and Robinson, I. C. A. F.: *Endocrinology*, **131**, 1963~1969 (1992)
- 46) Lim, L., Spencer, S. A., McKay, P. and Waters, M. J.: *Endocrinology*, **127**, 1287~1291 (1990)
- 47) Mannor, D. A., Winer, L. M., Shaw, M. A. and Baumann, G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 30~34 (1991)
- 48) Baumbach, W. R., Horner, D. L. and Logan, J. S.: *Genes & Dev.*, **3**, 1199~1205 (1989)
- 49) Smith, W. C., Kuniyoshi, J. and Talamantes, F.: *Mol. Endocrinol.*, **3**, 984~990 (1989)
- 50) Herington, A. C., Tiong, T. S. and Ymer, S. I.: *Acta Paediatr. Scand. (suppl)*, **379**, 61~69 (1991)
- 51) Saito, Y., Ikebuchi, H., Yamazaki, T. and Sawada, J.: *J. Biochem.*, **118**, 521~525 (1995)
- 52) Barnard, R., Bundesen, P. G., Rylatt, D. B. and Waters, M. J.: *Biochem. J.*, **231**, 459~468 (1985)
- 53) Werther, G. A., Haynes, K. M., Barnard, R. and Waters, M. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**, 1725~1731 (1990)
- 54) Ota, Y., Asakura, A., Matsuura, Y., Kondo, H., Hitoshio, A., Iwane, A., Tanaka, T., Kikuchi, M. and Ikehara, M.: *Gene*, **106**, 159~164 (1991)
- 55) Asakawa, K., Hedro, J. A., McElduff, A., Rouiller, D. G., Waters, M. J. and Gorden, P.: *Biochem. J.*, **238**, 379~386 (1986)
- 56) Keefer, L. M. and Meyts, P. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 22~29 (1981)
- 57) Barazzone, P., Lesniak, M. A., Gorden, P., Van Obberghen, E., Carpentier, J. L. and Orci, L.: *J. Cell Biol.*, **87**, 360~369 (1980)
- 58) Hizuka, N., Gorden, P., Lesniak, M. A., Van Obberghen, E., Carpentier, J. L. and Orci, L.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 4591~4597 (1981)
- 59) Roupas, P. and Herington, A. C.: *Endocrinology*, **120**, 2158~2165 (1987)
- 60) Roupas, P. and Herington, A. C.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **57**, 93~99 (1988)
- 61) Roupas, P. and Herington, A. C.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **61**, 1~12 (1989)
- 62) Bick, T., Youdim, M. B. H. and Hochberg, Z.: *Endocrinology*, **125**, 1718~1722 (1989)
- 63) Bowman, E. J., Siebers, A. and Altendorf, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7972~7976 (1988)
- 64) Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 17707~17712 (1991)
- 65) Seglen, P. O.: *Meth. Enzymol.*, **96**, 737~764 (1983)
- 66) Fuh, G., Cunningham, B. C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D. V. and Wells, J. A.: *Science*, **256**, 1677~1680 (1992)
- 67) Ilondo, M. M., Damholt, A. B., Cunningham, B. A., Wells, J. A., De Meyts, P. and Shymko, R. M.: *Endocrinology*, **134**, 2397~2403 (1994)
- 68) Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397~402 (1986)
- 69) Nakano, H., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., Kuzuu, Y. and Iba, H.: *J. Antibiot.*, **40**, 706~708 (1987)
- 70) Yanagihara, N., Tachikawa, E., Izumi, F., Yasugawa, S., Yamamoto, H. and Miyamoto, E.: *J. Neurochem.*, **56**, 294~298 (1991)
- 71) Fujita-Yamaguchi, Y. and Kathuria, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 955~962 (1988)
- 72) Honegger, A. M., Dull, T. J., Felder, S., Van Obberghen, E., Bellot, F., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A. and Schlessinger, J.: *Cell*, **51**, 199~209 (1987)
- 73) Carlberg, K., Tapley, P., Haystead, C. and Rohrschneider, L.: *EMBOJ*, **10**, 877~883 (1991)
- 74) McClain, D. A., Maegawa, H., Lee, J., Dull, T. J., Ulrich, A. and Olefsky, J. M.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 14663~14671 (1987)
- 75) Allevalo, G., Billestrup, N., Goujon, L., Galsgaard, E. D., Norstedt, G., Postel-Vinay, M. C., Kelly, P. A. and Nielsen, J. H.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 17210~17214 (1995)
- 76) Honegger, A. M., Dull, T. J., Bellot, F., Van Obberghen, E., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A. and Schlessinger, J.: *EMBOJ*, **7**, 3045-3052 (1988)
- 77) Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Hopkins, C. R.: *Cell*, **61**, 623~634 (1990)
- 78) Honegger, A. M., Schmidt, A., Ullrich, A. and Schlessinger, J.: *J. Cell Biol.*, **110**, 1541~1548 (1990)
- 79) Joly, M., Kazlauskas, A., Fay, F. S. and Corvera, S.: *Science*, **263**, 684~687 (1994)
- 80) Futter, C. E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Hopkins, C. R.: *J. Cell Biol.*, **120**, 77~83 (1993)
- 81) Wang, X., Uhler, M. D., Billestrup, N., Norstedt, G., Talamantes, F., Nielsen, J. H. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 17390~17396 (1992)
- 82) Campbell, G. S., Christian, L. J. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **268**, 7427~7434 (1993)
- 83) Souza, S. C., Frick, G. P., Yip, R., Lobo, R. B., Tai, L. R. and Goodman, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 30085~30088 (1994)
- 84) Campbell, G. S., Pang, L., Miyasaka, T., Saltiel, A. R. and Carter-Su, C.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 6074~6080 (1992)
- 85) Sawada, J., Terao, T., Itoh, S., Maeda, M., Tsuji, A., Hosoda, H. and Nambara, T.: *J. Steroid Biochem.*, **28**, 405~410 (1987)
- 86) Urbanek, M., MacLeod, J. N., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A.: *Mol. Endocrinol.*, **6**, 279~287 (1992)
- 87) Sobrier, M. L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Amselem, S., and Goossens, M.: *FEBS Lett.*, **319**, 16~20 (1993)
- 88) Mercado, M., Davila, N., McLeod, J. F. and Baumann, G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **78**, 731~735 (1994)
- 89) Takatsuki, A. and Tamura, G.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 899~902 (1985)
- 90) Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J.: *J. Cell Biol.*, **116**, 1071~1080 (1992)
- 91) Schwarzenbach, G., Gut, R., and Anderegg, G.: *Helv. Chim. Acta*, **37**, 937~957 (1954)
- 92) Schwarzenbach, G., and Anderegg, G.: *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1773~1792 (1957)
- 93) Holloway, J. H., and Reilly, C. N.: *Anal. Chem.*, **32**, 249~256 (1960)
- 94) Amit, T., Hacham, H., Daily, O., Hertz, P., Barkey, R. J., and Hochberg, Z.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **101**, 29~36 (1994)
- 95) Esposito, N., Paterlini, P., Kelly, P. A., Postel-Vinay, M. C., and Finidori, J.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **103**, 13~20 (1994)
- 96) McGuffin, Jr, W. L., Gavin, III, J. R., Lesniak, M. A., Gorden, P., and Roth, J.: *Endocrinology*, **98**, 1401~1407 (1976)

- 97) Trivedi, B., and Daughaday, W. H.: *Endocrinology*, **123**, 2201~2206 (1988)
- 98) Baumann, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **202**, 392~400 (1993)
- 99) Woessner Jr., J. F.: *FASEBJ*, **5**, 2145~2154 (1991)
- 100) Mohler, K. M., Sleath, P. R., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S. S., Torrance, D. S., Otten ~ Evance, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., Kronheim, S. R., Petersen, M., Gerhart, M., Kozlosky, C. J., March, C. J. and Black, R. A.: *Nature*, **370**, 218~220 (1994)
- 101) Gearing, A. J. H., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J. M., Crimmin, M., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., Leber, T. M., Mangan, M., Miller, K., Nayee, P., Owen, K., Patal, S., Thomas, W., Wells, G., Wood, L. M. and Woolley, K.: *J. Leuk. Biol.*, **57**, 774~777 (1995)
- 102) Gearing, A. J. H., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J. M., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., Leber, T. M., Mangan, M., Miller, K., Nayee, P., Owen, K., Patal, S., Thomas, W., Wells, G., Wood, L. M. and Woolley, K.: *Nature*, **370**, 555~557 (1994)
- 103) Rosenfeld, R. G., Rosenbloom, A. L. and Guevara-Aguirre, J.: *Endocr. Rev.*, **15**, 369~390 (1994)
- 104) Eshet, R., Laron, Z., Pertzalan, A., Arnon, R. and Dintzman, M.: *Isr. J. Med. Sci.*, **20**, 8-11 (1984)
- 105) Baumann, G., Shaw, M. A. and Winter, R. J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **65**, 814~816 (1987)
- 106) Daughaday, W. H. and Trivedi, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4636~4640 (1987)
- 107) Duquesnoy, P., Sobrier, M. L., Amselem, S. and Goossens, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10272~10276 (1991)
- 108) Buchanan, C. R., Maheshwari, H. G., Norman, M. R., Morrell, D. J. and Preece, M. A.: *Clin. Endocrinol.*, **35**, 179~185 (1991)
- 109) Rieu, M., Le Bouc, Y., Villares, S. M. and Postel-Vinay MC.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 857~860 (1993)
- 110) Bucuvalas, J. C., Horn, J. A., Carlsson, L., Balistreri, W. F. and Chernaused, S. D.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 1477~1482 (1993)