

特集 ホルモン受容機構異常疾患

G 蛋白異常による 内分泌疾患*

吉本勝彦**
斎藤史郎***

Key words: G protein, GH-producing pituitary adenoma, Thyroid tumor, McCune-Albright syndrome, Pseudohypoparathyroidism

はじめに

G 蛋白は、細胞膜の内側に存在し細胞外からの多数のシグナルを統合して細胞応答を調節する多機能GTP結合蛋白質である。RodbellとGilmanが、"G 蛋白"の領域で1994年のノーベル生理学・医学賞を受賞したことは記憶に新しい。

本稿ではホルモンと神経伝達物質による情報伝達系にトランスデューサーとして機能するヘテロ三量体G 蛋白(以下G 蛋白と呼ぶ)の異常と内分泌疾患に関連する最近の知見を中心に解説する。

G 蛋白の種類

G 蛋白は細胞膜を7回貫通する構造を有する

受容体(例外として細胞膜を1回しか貫通しないIGF-II受容体がGi2を介して作用する)とアデニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼA₂, C, D, イオンチャンネルなどの効果器との間に存在し、細胞外シグナルを細胞内に増幅(場合によっては減弱)して伝達する役割を有する。

G 蛋白は、分子量の大きい順にα (39-46kD), β (37kD), γ (7-8kD)の3つの異なるサブユニットよりなるヘテロ三量体である。このうちαサブユニットが受容体と効果器との間の特異性を決定し、現在までに約20種見出されている(表1)。これらのαサブユニットは構造が類似していても、その機能は著しく異なる。一方βサブユニットは5種、γサブユニットは6種存在することが知られている。βγサブユニットは通常の条件では解離せず、αサブユニットに対す

表1 Gαサブユニットの種類

クラス	メンバー	修飾する毒素	機能
α s	α s, α olf	コレラ毒素	アデニル酸シクラーゼの活性化 Ca ²⁺ チャンネルの調節
α i	α i-1, α i-2, α i-3, α o, α t-1, α t-2, α gust, α z	百日咳毒素	アデニル酸シクラーゼ抑制 K ⁺ , Ca ²⁺ チャンネルの調節 cGMPホスホジエステラーゼの活性化
α q	α q, α 11, α 14, α 15, α 16		ホスホリパーゼCの活性化
α 12	α 12, α 13		Na ⁺ /K ⁺ 交換の調節

* Endocrine disease due to G-protein abnormalities.

** Katsuhiko YOSHIMOTO, M. D.: 徳島大学医学部臨床分子栄養学 [〒770 徳島市蔵本町3-18-15]; Otsuka Department of Clinical and Molecular Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770, JAPAN

*** Shiro SAITO, M. D.: 同 第一内科; The First Department of Internal Medicine

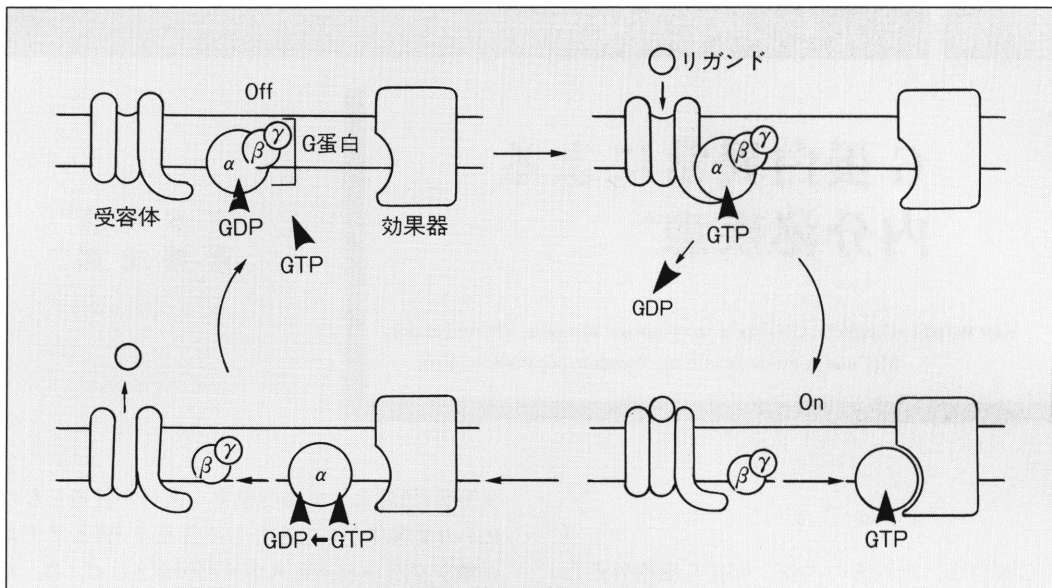


図1 G蛋白の活性化(文献25より引用)

る調節因子として作用しているが、最近 $\beta\gamma$ サブユニット自体も効果器に対して機能的に作用していることが明らかにされつつある。通常は1種の受容体と1種のG蛋白を介して情報が伝達されるが、1つの受容体が2種のG蛋白を介して作用する例(TRH受容体やPTH受容体は、 G_s や G_q を介してcAMP産生や IP_3 産生を高める)が明らかにされている。

G蛋白の活性化機構

α サブユニット上にGTPの結合部位と分解活性(GTPase)がある。不活性(休止)状態では α 、 β 、 γ サブユニットは複合体を形成し、GDPが α サブユニットに結合している。ホルモンなどのアゴニストが受容体に結合すると、受容体の構造変化が起こり、 α サブユニットよりGDPが遊離する。そして細胞内に多く存在するGTPが空いた結合部位に入り α サブユニットの構造変化を引き起こす。GTPが結合して活性化された α サブユニットは $\beta\gamma$ サブユニットと解離し、細胞内内側に沿って拡散し、アデニル酸シクラーゼなどのエフェクター分子と連関する。通常、数秒の間に α サブユニット自体が有するGTPase活性によりGTPをGDPに分解し、自分自身でスイッチを切る(図1)。最近の話題として α サブユニッ

トのN端側に脂肪酸が付加され、共役する受容体の活性化に伴い、アシル化と脱アシル化が可逆的に起こり、細胞内での局在(細胞膜あるいは細胞質)を決定していることが示されている。

内分泌疾患におけるG蛋白異常

1. 成長ホルモン産生下垂体腺腫

VallarらはGH産生下垂体腺腫において、GH基礎分泌と細胞内cAMPの基礎値が高く、細胞膜アデニル酸シクラーゼ活性が著しい高値を示すものが約40%存在することを見だし、この原因は G_s の異常によるアデニル酸シクラーゼの持続的活性化によると推定したり。その後、これらの腺腫の $G_s\alpha$ 遺伝子の解析が行われ、ADPリボシル化を受けるコドン201のアルギニン残基、またはGTP結合ドメイン内のコドン227のグルタミン残基にミスセンス変異が認められた²⁾。これらのアミノ酸置換部位はいずれも $G_s\alpha$ の機能発現に重要であり(図2)、アミノ酸置換によりGTPase活性の阻害が引き起こされ $G_s\alpha$ が活性状態のままになる。変異 $G_s\alpha$ は欧米においてGH産生腺腫の30~40%に検出され、この変異遺伝子をgsp癌遺伝子とよぶことが提唱されている³⁾。

我々は、下垂体腺腫、甲状腺腫瘍、副甲状腺腫瘍、膵内分泌腫瘍、副腎皮質腫瘍、褐色細胞

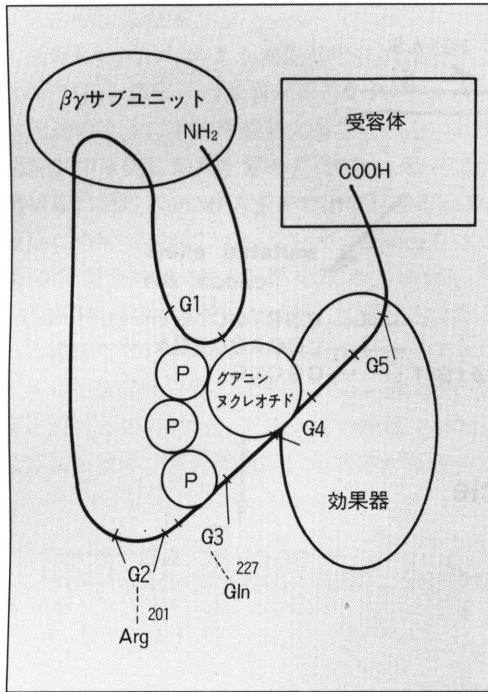


図2 Gsαサブユニットの構造の模型図

C端は受容体との結合に関与する。N端と、その他の一部の部位はβγサブユニットとの結合に関与する。G1, G4, G5部位はGTPとの結合に、G2, G3はGTPase活性とGTP, GDPの交換に関与する。

(文献26より一部改変して引用)

腫の計200例(表2)において、Gsα遺伝子の変異をPCR-PIRA(Primer-Introduced Restriction Analysis)法(図3)によりスクリーニングを行い、塩基配列決定により異常を同定した⁴⁾。PCR-PIRA法は、Gsα遺伝子コドン201あるいは227に変異が存在すれば、PCR産物が特定の制限酵素で切断可能となるような mismatches をPCRのプライマーに導入して、変異の有無を切断断片の長さでスクリーニングできる方法である。PCR産物を制限酵素処理後、ポリアクリルアミドゲルで泳動し、エチジウムブロマイド染色により、切断の有無を検出する。Gsα遺伝子コドン201のCGT(Arg)からTGT(Cys)への変異検出用に、上流プライマーとして mismatches のAを導入したプライマーを合成した。これらのプライマーを用いると101bpが増幅され、PvuII処理により、変異を有するDNA断片より78bpと23bpの2つの断片が生じるが、正常DNAは切断されない(図

表2 内分泌腫瘍におけるGsα遺伝子の変異

腫瘍組織	症例数	変異例数
下垂体腫瘍(53)		
GH産生腺腫	43	4
プロラクチノーマ	1	0
非機能性腺腫	9	0
甲状腺腫瘍(66)		
濾胞腺腫	24	0
乳頭癌	30	4
低分化癌	2	0
未分化癌	2	0
髄様癌	8	0
副甲状腺腫瘍	21	0
脾内分泌腫瘍	15	0
副腎皮質腫瘍	22	1
褐色細胞腫	23	0
計	200	9

3). 図4に多発性内分泌腫瘍症1型(MEN 1)患者のGHおよびPRL産生下垂体腺腫のPCR-PIRAの結果を示す。4例のGH産生下垂体腺腫の他に4例の甲状腺乳頭癌、1例のアルドステロン産生副腎皮質腺腫にコドン201の塩基置換を認めた(表2)。変異が認められた4例のGH産生下垂体腺腫症例のうち、GHRH負荷試験を行った3例のGHの反応はすべて低反応を示した(表3)。形態学的には、症例1を除いて3例とも高密度に分泌顆粒が存在するタイプであった。またPCR-直接塩基配列決定法でも、45例中2例(4.4%)に変異を検出したのみであった⁵⁾。我国の症例でGH産生下垂体腺腫の短期培養を用いた成績⁶⁾では、cAMPの基礎値が高く、GHRHに対するcAMP反応の不良なタイプは認められないことより、我国ではGsα遺伝子の異常を伴うGH産生下垂体腺腫の頻度は低いと考えられる。

Gsα遺伝子の有無による年齢、性別、罹病期間、手術による治療率、再発率の差異は特に認められない。Spadaらの報告によれば、小さな腺腫の割合が多く、in vivoにおいてGHRHに対する反応が低反応であり、TRHやドーパミン、ソマトスタチンに対する感受性が亢進している傾向を認めるという⁷⁾。

しかしGH産生細胞にコレラ毒素を発現させて、Gsαを持続的に活性化させたトランスジェ

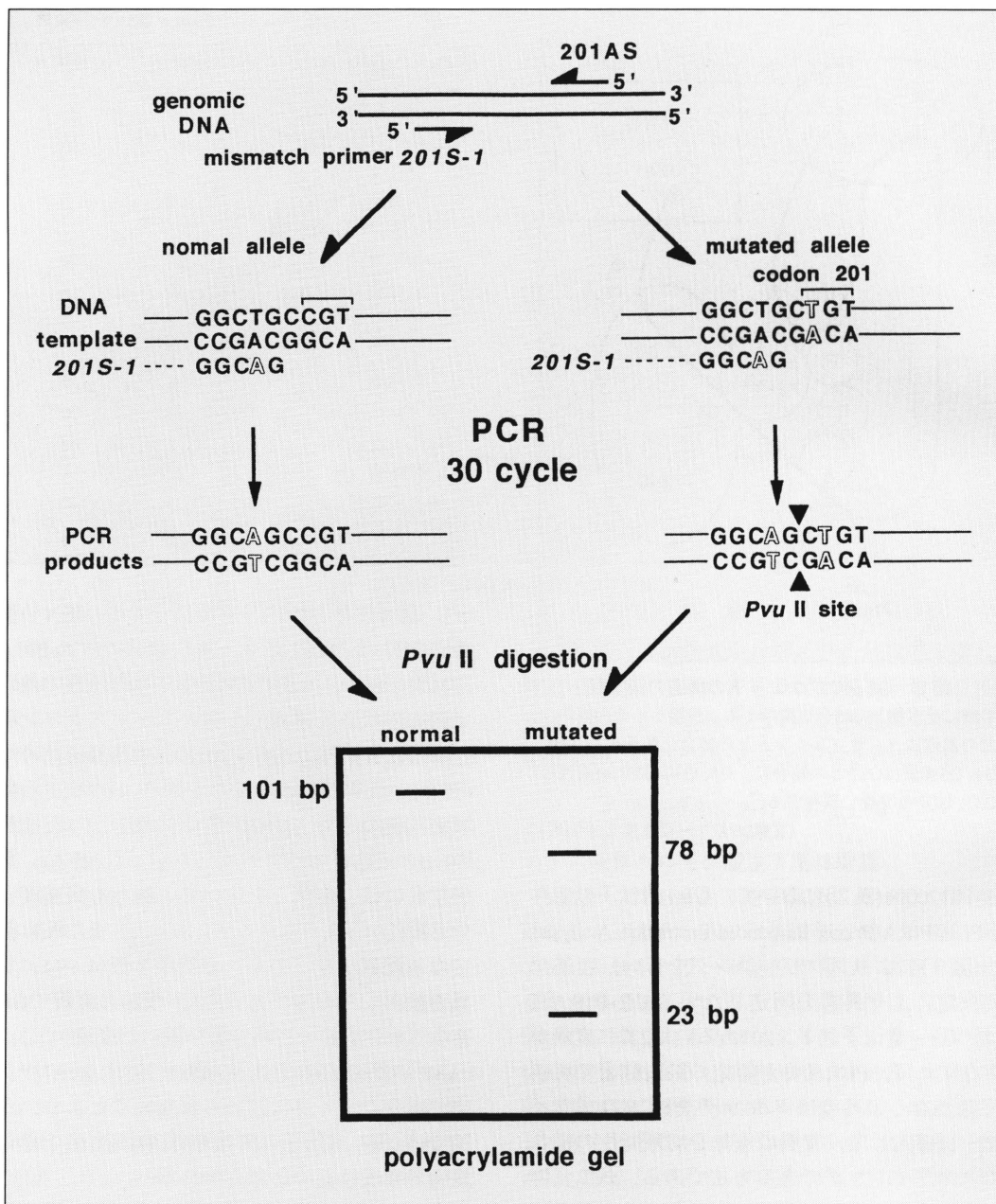


図3 PCR-PIRA法の概要

ニックマウスにおいては、GH産生細胞の過形成を認めるのみで、腺腫は発生しないことより⁸⁾、過形成から腺腫への移行には、他の遺伝子変化が関与していると考えられる。

一方、GH産生腺腫以外の下垂体腺腫においては、Tordjmanら⁹⁾は非機能性腺腫21例中2例にGs

α遺伝子の変異を、またWilliamsonら¹⁰⁾は22例中2例にGsα遺伝子およびGi2α遺伝子の変異を、別の1例ではGi2α遺伝子単独の変異を認めている。しかし、これらの非機能性腺腫におけるGsα遺伝子の変異の意義については明らかでない。

2. 甲状腺腫瘍

最初にLyonsらにより機能性甲状腺腺腫の約30%にGsα遺伝子の変異が報告された³⁾。我々は先述のように甲状腺機能亢進を伴わない乳頭癌30例中4例に変異を認めた(表2)。我々は腫瘍組織におけるcAMP含量やTSHに対するcAMP反応について検討していないが、Suarezらは35例の乳頭癌中3例に変異を認め、いずれもcAMPの基礎値が高くTSHに対して低反応であったと報告している¹¹⁾。またGoretzkiらは、アメリカ人の甲状腺分化癌では20%にGsα遺伝子の変異を認めるのに対し、ドイツ人の腫瘍では73%に変異を認め、変異の頻度に地域差が存在する

と報告している¹²⁾。その他に、multinodular goiter 20例中1例に、濾胞腺腫37例中1例に変異が存在するとの報告がある¹³⁾。

コドン201に変異を有するGsα遺伝子を甲状腺濾胞細胞に発現させるトランスジェニックマウスを作成したところ、生後8か月頃より機能性甲状腺腺腫が発生した¹⁴⁾。この結果は、変異Gsα遺伝子が細胞内cAMP濃度を高め、¹²⁵I-iodineの取り込みを増し、血漿甲状腺ホルモンの増加のみならず、腫瘍形成にも関与していることを示す。またMucaらは甲状腺細胞株であるFRTL5細胞に変異を導入したGsα遺伝子を発現させると、TSH非依存性にFRTL5細胞の増殖、分化が促進することを報告している¹⁵⁾。

*in vivo*および*in vitro*での甲状腺濾胞細胞におけるGiα-1遺伝子の発現は、TSHによって厳密に調節されている。しかしながら機能性甲状腺腺腫ではTSHの有無にかかわらず、その発現が常に認められることより、腫瘍の自律増殖に関与していると考えられる¹⁶⁾。

3. 副腎皮質腫瘍および卵巣腫瘍

Lyonsらにより副腎皮質腺腫および卵巣顆粒膜細胞腫の一部にGi2α遺伝子の変異の存在が報告された³⁾。その後、18個の副腎腫瘍について検討されたが、Gsα遺伝子およびGi2α遺伝子の変異はいずれも認められていない¹⁷⁾。

幼児の両側性副腎皮質結節性過形成によるクッシング症候群では副腎組織や同一症例の肝と白血球にGsα遺伝子の変異が報告されている¹⁸⁾。

4. McCune-Albright症候群

McCune-Albright症候群は、下垂体腫瘍、甲状腺機能亢進症、性腺機能亢進症、高コレステロール血症などの多内分泌腺の機能亢進と、汎発性線維素性骨炎および皮膚にカフェオレ様の色素

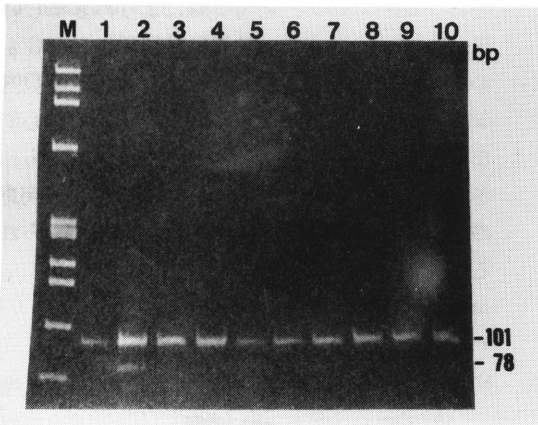


図4 PCR-PIRA法によるGsα遺伝子コドン201変異の検出

ミスマッチプライマーを用いてPCRで増幅後、PvuII処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。レーン1:患者白血球、レーン2:下垂体腺腫、レーン3, 4:副甲状腺過形成、レーン5-7:脾内分泌腫瘍、レーン8, 9:母親の副甲状腺過形成、レーン10:母親白血球(MEN 1)。レーン2にのみ変異由来の78bpのバンドと正常アレル由来の101bpのバンドが認められ、この変異はヘテロ接合性を示すことが明らかとなった。

表3 Gsα変異を有するGH産生下垂体腺腫症例の臨床像

症例	GH基礎値 (ng/dl)	PRL基礎値 (ng/dl)	GHRH負荷		トルコ鞍形態*
			GH基礎値 (ng/dl)	GH15分値 (ng/dl)	
1	16	180	11.7	16.9	II-A
2	640	2.3	not done		VI-A
3	9	8.6	7.9	11.0	II-O
4	48	6.0	43.9	48.8	VI-O

*Hardyの分類による。

沈着を示す疾患である。一般に家族性発症が認められないため胎生期における体細胞変異によるものと推測されていた。1990年、Weinsteinらにより、本症候群の種々の組織にGs α 遺伝子コドン201のアルギニン残基よりヒスチジンあるいはシステイン残基への置換をおこす変異が存在することが明らかにされた^{19)~20)}。その結果、cAMPの持続的産生亢進が下垂体腫瘍あるいは甲状腺や性腺の機能亢進を招いたものと考えられる。特に注目されるのは、Gs α 遺伝子の変異が全ての細胞に一樣に認められるのではなく、モザイク状に分布していることで、Gs α 遺伝子が正常である組織も多く認められる。この遺伝子異常は、発生の初期段階で胚の一部に突然変異がおこり、それが発生の進展とともに体内にモザイク状に分布したためと考えられる。

本症候群では、腫瘍部位のみならず、正常と考えられる組織にも変異が検出される場合がある。これらの組織では変異Gs α が発現していないのか、あるいはcAMPの増加が組織の腫瘍化に関与していないのか、今後の検討が必要である。

5. 偽性副甲状腺機能低下症

Ellsworth-Howard試験において、cAMP産生能を欠く偽性副甲状腺機能低下症I型(PHPI)の約半数の症例では、赤血球膜のGs α の活性低下が認められる。これらの症例では低身長、丸顔、第4中手骨の短縮などのAlbright遺伝性骨異栄養症(Albright hereditary osteodystrophy:AHO)、甲状腺機能低下症、性腺機能低下症などが認められ、PHPIa型と分類されている。これに対し赤血球膜のGs α の活性低下を認めないPHPIはPHPIb型と分類される。これまでにPHPIa型症例のGs α 遺伝子に、点突然変異や欠失などの遺伝子変化が報告されている。コドン1(ミスセンス変異、翻訳開始の阻害)、エクソン4における43bpの欠失、コドン99(ミスセンス変異)、コドン165(ミスセンス変異)、コドン214(4bpの欠失)、コドン272(1bpの欠失)、コドン280(スプライシング部位の変異)、コドン385(ミスセンス変異、受容体との連関不良)などに、それぞれ機能消失型の変異が報告されており、その異常は一樣ではない^{21)~23)}。一方、PHPIa症例がACTH、抗利尿ホルモン(ADH)などのGs α を活性化するホルモンに

対し不応状態を示さない理由については明らかにされていない。

また飯利らはGs α 遺伝子コドン366の変異はPHPIaを発症させるだけでなく、睾丸からのテストステロン分泌を持続的に亢進させ、性早熟症(testotoxicosis)を起こすことを明らかにした²⁴⁾。この変異は37℃では不安定であるが、睾丸内の温度の32~33℃では安定である。また正常のGs α よりGTPase活性が20倍高く、GDPの解離速度も80倍高いことが明らかにされた。

おわりに

情報伝達に關与するG蛋白の研究は、G蛋白自体あるいは關連する受容体やエフェクター分子のクローニングと発現実験によりめざましい進歩を遂げつつある。X線結晶解析によりG α の高次構造もようやく明らかにされた。細胞内シグナルの複雑なネットワークのなかで中心的な役割を担うG蛋白の構造と機能の解析から、さらにシグナル伝達系の異常による内分泌疾患の分子的背景が明らかにされるものと考えられる。

文 献

- 1) Vallar, L., Spada, A. & Giannattasio, G.: Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature*, 330:566~568, 1987.
- 2) Landis, C. A., Masters, S. B., Spada, A., et al.: GTPase inhibiting mutations activate the α chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumors. *Nature*, 340:692~696, 1989.
- 3) Lyons, J., Landis, C. A., Harsh, G., et al.: Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*, 249:655~659, 1990.
- 4) Yoshimoto, K., Iwahana, H., Fukuda, A., et al.: Rare mutations of the Gs alpha gene in human endocrine tumors: Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. *Cancer*, 72:1386~1393, 1993.
- 5) Hosoi, E., Yokogoshi, Y., Hosoi, E., et al.: Analysis of the Gs α gene in growth hormone-secreting pituitary adenomas by the polymerase chain reaction-direct sequencing method using paraffin-embedded tissues. *Acta*

- Endocrinol., 129:301~306, 1993.
- 6) Nakagawa, K., Ishizuka, T., Shimizu, C., et al.: cAMP production by GHRH in GH-producing pituitary adenoma cells. *Horm. Metab. Res.*, 24:446~447, 1992.
 - 7) Spada, A., Arosio, M., Bochicchio, D., et al.: Clinical, biochemical, and morphological correlates in patients bearing growth hormone-secreting pituitary tumors with or without constitutively active adenyllyl cyclase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71:1421~1426, 1990.
 - 8) Burton, F. H., Hasel, K. W., Bloom, F. E., et al.: Pituitary hyperplasia and gigantism in mice caused by a cholera toxin transgene. *Nature*, 350:74~77, 1991.
 - 9) Tordjman, K., Stern, N., Quaknine, G., et al.: Activating mutations of the Gs α gene in nonfunctioning pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:765~769, 1993.
 - 10) Williamson, E.A., Daniels, M., Foster, S., et al.: Gs α and Gi2 α mutations in clinically non-functioning pituitary tumours. *Clin. Endocrinol.*, 41:815~820, 1994.
 - 11) Suarez, H. G., Du Villard, J. A., Caillou, B., et al.: Gsp mutations in human thyroid tumors. *Oncogene*, 6:677~679, 1991.
 - 12) Goretzki, P. E., Lyons, J., Stacy-Phipps, S., et al.: Mutational activation of RAS and GSP oncogenes in differentiated thyroid cancer and their biological implications. *World J. Surg.*, 16:576~582, 1992.
 - 13) Matsuo, K., Friedman, E., Gejman, P. V., et al.: The thyrotropin receptor (TSH-R) is not an oncogene for thyroid tumors: Structural studies of the TSH-R and the α -subunit of Gs in human thyroid neoplasms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76:1446~1451, 1993.
 - 14) Michiels, F.-M., Caillou, B., Talbot, M., et al.: Oncogenic potential of guanine nucleotide stimulatory factor α subunit in the thyroid glands of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91:10488~10492, 1994.
 - 15) Muca, C. & Vallar, L.: Expression of mutationally activated Gs α stimulates growth and differentiation of thyroid FRTL5 cells. *Oncogene*, 9:3647~3653, 1994.
 - 16) Selzer, E., Wilfing, A., Schiferer, A., et al.: Stimulation of human thyroid growth via the inhibitory guanine nucleotide binding (G) protein Gi: Constitutive expression of the G-protein α subunit Gi α -1 in autonomous adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:1609~1613, 1993.
 - 17) Reincke, M., Karl, M., Travis, W., et al.: No evidence for oncogenic mutations in guanine nucleotide-binding proteins of human adrenocortical neoplasms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:1419~1422, 1993.
 - 18) Boston, B. A., Mandel, S., Lafranchi, S., et al.: Activating mutation in the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in an infant with Cushing's syndrome and nodular hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79:890~893, 1994.
 - 19) Weinstein, L. S., Shenker, A., Gejman, P., et al.: Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 325:1688~1695, 1991.
 - 20) Schwindinger, W. F., Francomano, C. A. & Levine, M. A.: Identification of a mutation in the gene coding the α subunit of the stimulatory G protein of adenyllyl cyclase in McCune-Albright syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89:5152~5156, 1992.
 - 21) Patten, J. L., Johns, D. R., Valle, D., et al.: Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N. Engl. J. Med.*, 322:1412~1419, 1990.
 - 22) Weinstein, L. S., Gejman, P. V., Friedman, E., et al.: Mutations of the Gs α -subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:8287~8290, 1990.
 - 23) Schwindinger, W. F., Miric, A., Zimmerman, D., et al.: A novel Gs α mutant in a patient with Albright hereditary osteodystrophy uncouples cell surface receptors from adenyllyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 269:25387~25391, 1994.
 - 24) Irii, T., Herzmark, P., Nakamoto, J. M., et al.: Rapid GDP release from Gs α in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature*, 371:164~168, 1994.
 - 25) Lefkowitz, R., L.: Clinical implications of basal research: G proteins in medicine. *N. Engl. J. Med.*, 332:186~187, 1995.
 - 26) Gordeladze, J. O., Johansen, P. W., Paulssen, R. H., et al.: G-proteins: implications for pathophysiology and disease. *Eur. J. Endocrinol.*, 131:557~574, 1994.