

137 hCG β サブユニットにおけるセリン結合性糖鎖の付加部位認識機構

神戸大, ワシントン大分子生物, 薬理*
菅原 正, アービング ボイメ*, 房 正規,
望月真人

〔目的〕 hCG β サブユニットには, 血中半減期などの生物学的特性保持に重要な役割をはたす, 2箇所のアスパラギン (Asn) 結合性糖鎖と 4 箇所のセリン (Ser) 結合性糖鎖が存在する. Asn 結合性糖鎖の付加部位認識には普遍性がある

(Asn-X-Ser or Thr) のに対し, Ser 結合性糖鎖の付加部位認識については特定の配列は認められていない. 本研究では *in vitro* mutagenesis を用いて hCG β サブユニットの Ser 結合性糖鎖の付加部位認識機構を検討した.

〔方法〕 オーバーラップ PCR 法を用いて種々の長さに C 末端側を短縮した hCG β サブユニット変異体遺伝子を作成し発現ベクターに組み込んだ後, CHO 細胞に遺伝子導入した. 35 S 標識アミノ酸添加培養液中で産生された蛋白に対し, 免疫沈降反応, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動, オートラジオグラフィを行ない, 分子量の変化を比較することで糖鎖の付加の有無を検討した.

〔成績〕 最も N 末端に近い Ser 結合性糖鎖の付加部位である Ser121 を含み, アラニン123 を C 末端とする hCG β サブユニット変異体は CHO 細胞にて産生される際, 糖鎖の付加を受けなかったが, これより C 末端側を正常のアミノ酸配列に従って順次延長した場合, 変異体蛋白は, その延長の程度に応じた Ser 結合性糖鎖の付加を受けた.

〔結論〕 hCG β サブユニットにおける 4 箇所の Ser 結合性糖鎖付加部位は各々独立した認識信号により糖鎖の付加を受けるものと思われる. その認識信号の C 末端側における境界は糖鎖付加を受ける Ser から次の糖鎖付加部位にあたる Ser までであることが示唆された.

138 In situ hybridization 法を用いた卵管特異糖蛋白質発現の解析

山形大学 小宮ひろみ 荒木慶彦 広井正彦

目的 哺乳動物の卵管上皮よりある種の糖蛋白質が分泌され受精、初期胚発生に関与することが報告されてきた。今回我々はハムスター卵管特異糖蛋白質 cDNA の単離に成功したので、これを用い *in situ* hybridization (ISH) による mRNA の組織上における局在と発現の解析を試みた。

方法 卵管特異糖蛋白質塩基配列決定時に作製した deletion mutant cDNA を用い、非対称 PCR 法によりジボキシゲニン標識一本鎖 DNA プローブを調整した。次にノザンプロットにより目的とする mRNA の存在を確認後 ISH を施行した。組織は 4% PFA/PBS により固定しパラフィン切片を用いた。発色は NBT/BCIP を基質とするアルカリフォスファターゼシステムにて行った。

成績 ノザンプロットでは、ハムスター卵管に約 2.4Kb の鮮明なシグナルが検出された。卵管以外の組織では検出されなかった。ISH を施行したところ、卵管上皮に特異的にシグナルを認めた。卵管膨大部は卵管峡部に比較し特にシグナルが強かった。細胞内では基底側及び核周囲部に局在を認めた。性周期、個体発生を検討したところ、性周期では、proestrus 期に明らかなシグナルの減弱を認めた。また、局在も estrus 期から diestrus 期にかけて卵管膨大部のシグナルは増強される傾向を示した。個体発生では 2 週令ごろより弱いシグナルが発現し 5 週令にて成熟ハムスターと同様の発現パターンを示した。

結論 卵管特異糖蛋白質は性周期及び性成熟に同調して卵管上皮に発現されることが明らかになった。このことからこの物質の発現は、性ホルモンに制御されることが示唆される。