

# ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の生合成

富永伸明

## Biosynthesis of human chorionic gonadotropin.

Nobuaki Tominaga

**ABSTRACT** Human chorionic gonadotropin (hCG) is a glycoprotein hormone composed of dissimilar subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ .

Subunits of hCG are synthesized and associate to form hCG in trophoblastic cells of placenta, and then hCG is secreted to blood and finally excreted in urine. This review discusses the biosynthesis and transport of hCG and its subunits based on the properties of the purified intracellular forms of hCG and its subunits from first trimester placental cells.

### はじめに

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (ヒト絨毛性ゴナドトロピン: human chorionic gonadotropin, hCG) は、二種のサブユニット  $\alpha$ ,  $\beta$  が非共有結合的に会合した  $\alpha\beta$  ダイマー構造を持つ糖タンパク質ホルモンである<sup>1, 2)</sup>。類似の  $\alpha\beta$  構造を持つ糖タンパク質ホルモンとしては、他に下垂体性ゴナドトロピンである黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH)、卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone, FSH) および甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone, TSH) があり、これらのホルモンは共通の  $\alpha$  サブユニットを持ち、 $\beta$  サブユニットがそれぞれのホルモンによって異なっており、ホルモンの特異性を示している<sup>3, 4)</sup>。

hCG は、妊娠中に胎盤絨毛の合胞体栄養細胞 (syncytiotrophoblast) で合成され、妊娠初期三ヶ月にピークに達した後、レベルの低下はみられるが、満期に至るまで血中に分泌されている<sup>5)</sup>。分泌された hCG は主として卵巣に作用し妊娠黄体の維持、あるいは黄体でのプロゲステロンの産生などのホルモン作用を発現するとされているが、真の生理的役割およびその作用機構は完全には解明されていない。また、種々の癌細胞、例えば絨毛癌 (choriocarcinoma)、肺癌などからも hCG と同様の免疫学的活性を持つタンパク質が分泌されていることが報告されている<sup>6-11)</sup>。血中に分泌された hCG は、最終的に尿に排泄される。すなわち、hCG 分子をその存在部位で分類すると、①胎盤細胞で合成された hCG、②血中に分泌された hCG、③尿に排泄された hCG の三種の存在形態が考えられる。

尿に排泄された hCG (尿性 hCG) は、ホルモン活性を有しており、その特性が明らかにされ、hCG の  $\beta$  サブユニットは特徴的な C 末端アミノ酸配列 ( $\beta$ -carboxyl terminal peptide:  $\beta$ -CTP) を持つことも分かった<sup>12)</sup>。また、構造活性相関が種々のタンパク質修飾実験などから明らかになっている<sup>13)</sup>。中でも活性発現には  $\alpha$   $\beta$  ダイマー構造が必須であること、さらに糖鎖部分が重要な役割を担っていることが解明されてきた<sup>14-25)</sup>。

血中 hCG に関しては、主として血中でのホルモンレベルの測定に重点がおかれてきた。妊娠状態の観察はもとより、hCG は前述したように、ある種の癌では、癌化に伴って血中に分泌されることから、腫瘍マーカーとして注目され、測定されている<sup>26-30)</sup>。さきに述べたように、hCG  $\beta$  サブユニットの構造特異性に基づく抗  $\beta$ -CTP 抗体、また各サブユニットあるいは hCG  $\alpha$   $\beta$  ダイマー (hCG) に特異的なモノクローナル抗体などが作製され、正常妊婦血清および種々の癌患者血清中のサブユニット量、hCG 量が測定された。これらの研究から血中には、 $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットが会合した hCG のみならず、生理的役割は現在のところ不明であるが、遊離型サブユニット (フリー  $\alpha$ 、フリー  $\beta$ ) もそれぞれ分泌されていることが明らかになった<sup>6-8, 31-34)</sup>。

血中での hCG 分子の多様性は、尿性 hCG 分子にも見られ、尿性フリーサブユニットが精製され、その糖鎖構造の特異性が指摘された。中でもフリー  $\alpha$  サブユニットの糖鎖構造が hCG を形成する  $\alpha$  サブユニットのそれと異なること、また、フリー  $\alpha$  サブユニットは、 $\beta$  サブユニットとの会合能を持たないことなどが明らかになった<sup>35)</sup>。さらに、癌患者の尿性 hCG およびフリーサブユニットの糖鎖構造が、正常な hCG の糖鎖とは異なることも最近の研究で明らかにされてきた<sup>36-40)</sup>。癌細胞から分泌される hCG とフリーサブユニットの量比は正常胎盤細胞のものとは異なり、フリーサブユニットが多いという報告もある<sup>41)</sup>。

一方、細胞内に存在する hCG に関する研究は少なく、最近、主として hCG を分泌する絨毛癌由来の樹立細胞などを用いて研究され始めた。

以上述べたように、分泌および排泄された hCG、フリーサブユニットには、主として糖鎖構造に不均一性、多様性がみられる。この糖鎖構造の多様性は、必然性があるものか、例えば、ホルモン活性を持つ hCG の持つ糖鎖の構造とフリー  $\alpha$  サブユニットの持つ糖鎖構造は、異なることは分かってきたが、その相違によって、フリー  $\alpha$  サブユニットが別の生物活性を有するのか。また、 $\alpha$   $\beta$  ダイマーを形成するものと同様でありながら、フリーで存在する  $\beta$  サブユニットの役割等については全く未解決である。フリーサブユニットの存在理由を考える上で別の観点からみると、hCG サブユニットは合成されてからどの様に会合するかという疑問が生じる。この様な疑問を解決するためには、細胞内における生合成された hCG の成熟過程 (糖鎖のプロセッシングやサブユニットの会合状態) およびその構造を明らかにすることが不可欠であると考えられる。本総説では、細胞内に存在する hCG の分子種およびその性質について解説し、hCG の細胞内における生合成過程 (成熟過程、細胞内輸送) に

ついて述べる。

## I. 細胞内型 hCG サブユニット分子種

細胞内において分泌糖タンパク質はタンパク部分の生合成後、高マンノース型アスパラギン結合性糖鎖を付加され、一連のプロセスを受け、複合型糖鎖になることが知られている<sup>42, 43)</sup>。Ruddon ら<sup>44-48)</sup> は培養した絨毛癌細胞 (JAR) や絨毛細胞の pulse-chase による研究で尿性 hCG より低分子量の糖鎖構造が高マンノース型である生合成の中間体である細胞内 hCG サブユニット  $\beta$  サブユニット (24, 18 kDa) および  $\alpha$  サブユニット (18, 15 kDa) を検出している。また、彼ら<sup>44)</sup> は、生合成のキネティクスの実験結果から、細胞内型分子種が長い細胞内半減期 (1 時間以上) を持つと報告している。著者ら<sup>49)</sup> は、胎盤細胞内に存在するままの hCG サブユニット分子種を分析するため、新鮮な非培養胎盤細胞抽出液を直ちに SDS-PAGE し、ウェスタンブロッティング後、サブユニット特異抗体を用いるイムノバインディング法で分析した。その結果、抗  $\beta$  抗体で二つの濃いバンドと一つの薄いバンドが検出された (Fig. 1, lane 1)。薄いバンドは分子量 31 kDa で尿性 hCG の  $\beta$  サブユニットと

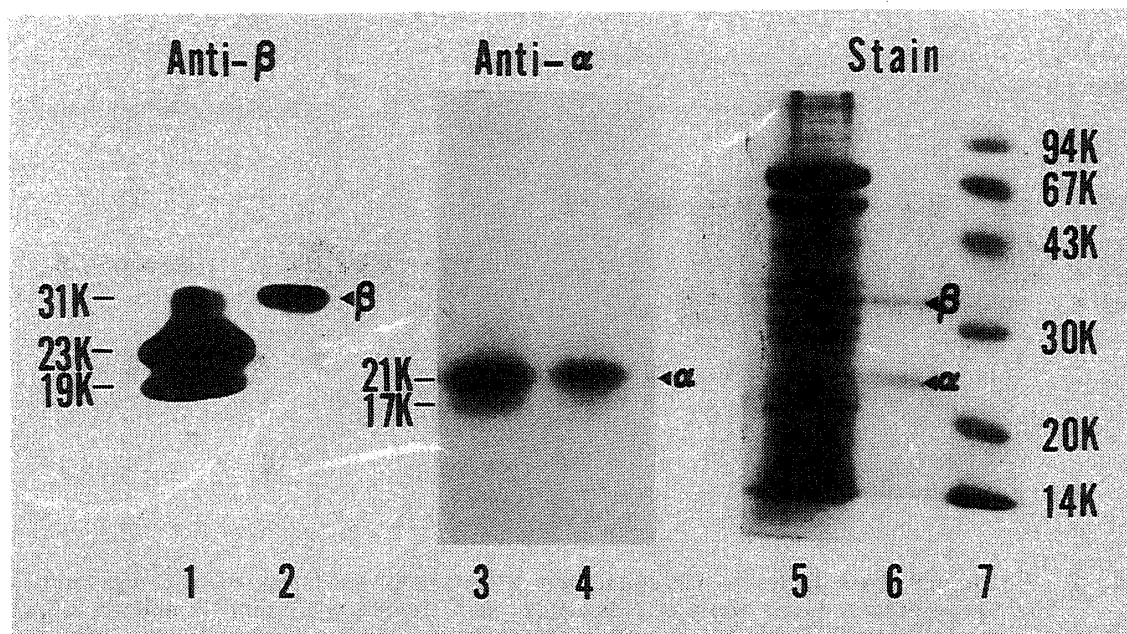


Fig. 1 Identification of intracellular forms of hCG subunits in first trimester placental tissues. Proteins of tissue extract from aborted first trimester placenta (10th week of pregnancy) were separated by SDS-PAGE and then analyzed by immunobinding method using anti- $\alpha$  and anti- $\beta$ . Lanes 2, 4, and 6, urinary hCG; lanes 1, 3, and 5, tissue extracts; lane 7, marker proteins;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -subunit;  $\beta$ ,  $\beta$ -subunit.

同じ分子量を示し、濃いバンドはより低分子量の23, 19 kDaであった。抗 $\alpha$ 抗体では尿性のサブユニットと同じ分子量の21 kDaのバンドがほとんどで、低分子量17 kDaのバンドがごくわずかに検出された (lane 4)。図には示していないが、これらのバンドは抗体反応時にそれぞれ対応する過剰のサブユニットを加えることで消失した。また、これら分子種は、妊娠初期の胎盤 (8 から11週) からその分泌量に応じた量 (尿中分泌量は8 から9週でピークになる) で検出された。

hCG の $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットには二本ずつのアスパラギン結合性糖鎖が付加されており、 $\beta$ サブユニットには、さらに四本のセリン結合性糖鎖に付加されている<sup>50, 51)</sup>。そこで細胞内に検出されたサブユニット分子種の糖鎖の高マンノース型及びハイブリット型糖鎖を特異的に分解するエンドグリコシダーゼH (endo H) に対する感受性について、酵素処理によって生じる分子量の変化を指標にして調べた。その結果、 $\beta$ サブユニットの23, 19 kDaのバンドはともに減少し、かわりに15 kDaの新しいバンドが生じた。しかし、31 kDaのバンドにはなんら変化はみられなかった (Fig. 2, A)。一方、 $\alpha$ サブユニットではendo H処理後、元の分子量の21 kDaのバンドが減少し、14 kDaの新しいバンドが検出されたが、17 kDaのバンドは酵素処理前後でのバンドの変化はなかった (Fig. 2, B)。

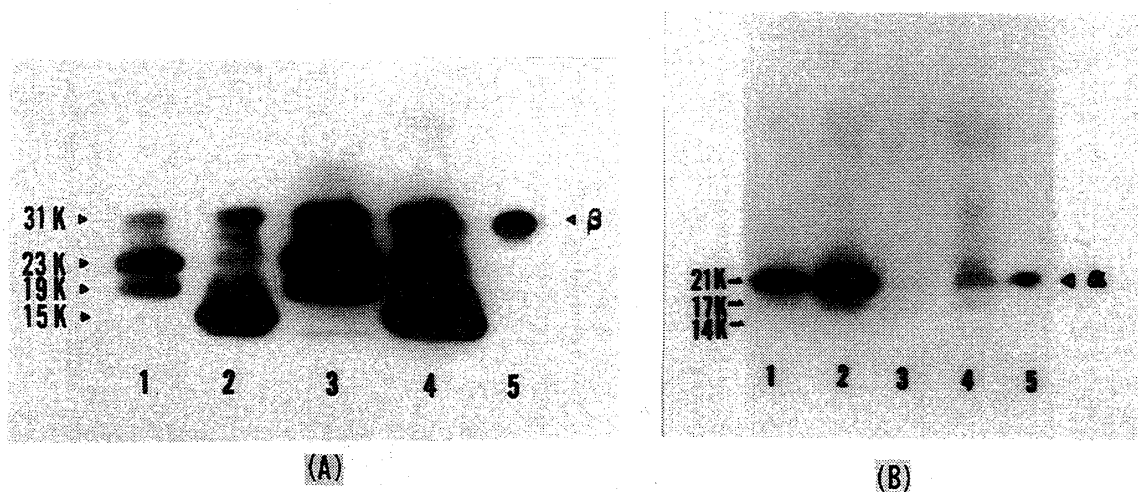


Fig. 2 Endoglycosidase H (endo H) sensitivity of intracellular forms of hCG subunits. The tissue extract (10th week of pregnancy) was treated with endo H and an aliquot was subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunobinding method using with anti- $\beta$  (A) or anti- $\alpha$  (B). (A): lanes 1 and 3, 0 time of endo H treatment (70  $\mu$ g and 140  $\mu$ g of proteins for lanes 1 and 3, respectively); lanes 2 and 4, 12 h treatment of the same proteins as lanes 1 and 3, respectively; lane 5, urinary hCG (1.9  $\mu$ g). (B): lanes 1 and 2, 0 time of endo H treatment (70  $\mu$ g and 140  $\mu$ g of proteins for lanes 1 and 2, respectively); lanes 3 and 4, 12 h treatment of the same proteins as lanes 1 and 2, respectively; lane 5, urinary hCG;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -subunit;  $\beta$ ,  $\beta$ -subunit.

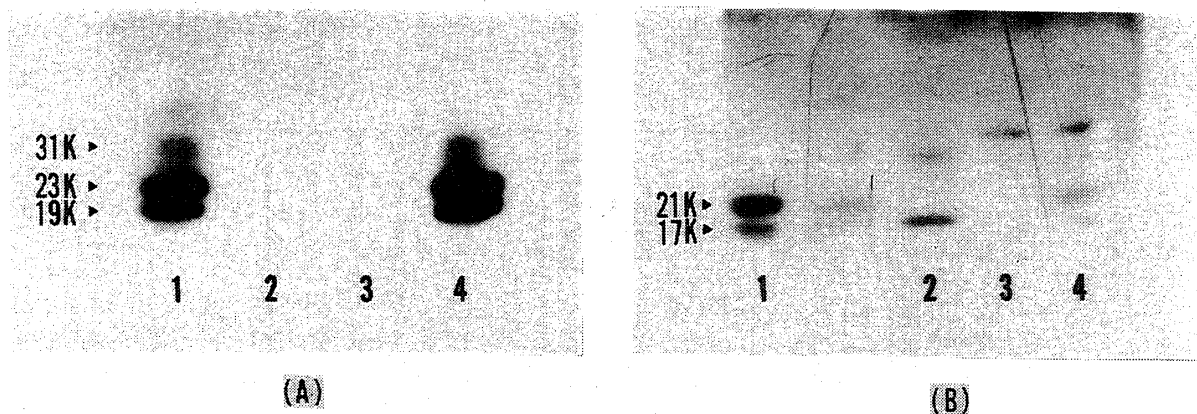


Fig. 3 Affinity of intracellular forms of hCG subunits to Con A-Sepharose. Tissue extract was dialyzed against Tris buffered saline containing 0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and loaded on a column (1.5 ml) of Con A-Sepharose. Proteins were eluted with the above buffer containing 10 mM (lane 3) and 500 mM (lane 4) of methyl- $\alpha$ -D-glucoside. Aliquots were subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunobinding method using with anti- $\beta$  (A) or anti- $\alpha$  (B). Lane 1, loaded sample ; lane 2, non-adsorbed fraction.

さらに、Con A カラムに対する吸着能を調べたところ、 $\beta$  サブユニットの全ての細胞内型分子種が、Con A カラムに強く吸着した (Fig. 3, A)。一方、 $\alpha$  サブユニットは Con A カラムに 21 kDa だけが強く吸着し、17 kDa は吸着しなかった (Fig. 3, B)。そこで、 $\beta$  サブユニットの 23, 19 kDa は高マンノース型糖鎖を 2 あるいは 1 本持ち、31 kDa はその分子量からもおそらく複合型糖鎖を持つ成熟型であり、 $\alpha$  サブユニットの 21 kDa は高マンノース型の未成熟型と複合型の成熟型のものを両方含んでいると推定された。これら未成熟な分子種は先の Ruddon らによる報告の分子種と対応したものであろうと考えられる。また、著者らが細胞内に中間体分子種をおもに検出したことは、hCG の成熟過程において糖鎖の成熟と分泌の速度が非常に速いことを示すものであると考えられる。

## II. 細胞内型 hCG サブユニット分子種の諸性質

細胞内型 hCG サブユニット分子種の詳細な性質を調べるためには、純粋な標品を得る必要があるが、細胞内に存在する hCG 分子種の精製は最近までほとんど行われていなかった。Wang ら<sup>52, 53)</sup> は胎盤細胞のアセトン乾燥粉末から hCG を抽出し、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーを用いて、尿性 hCG より低分子量の hCG 分子種を精製し、その諸性質について報告している。

著者ら<sup>54)</sup> は新鮮な胎盤絨毛細胞中に存在する細胞内型 hCG サブユニット分子種の精製を試みた。得られる胎盤細胞はきわめて少量であるため、効率よく行うことが必要であったが、

ゲル濾過と逆相カラムを用いることによって各サブユニット分子種を精製することができた。逆相カラムによる溶出パターンとそのピークの SDS-PAGE の銀染色像を示す (Fig. 4)。

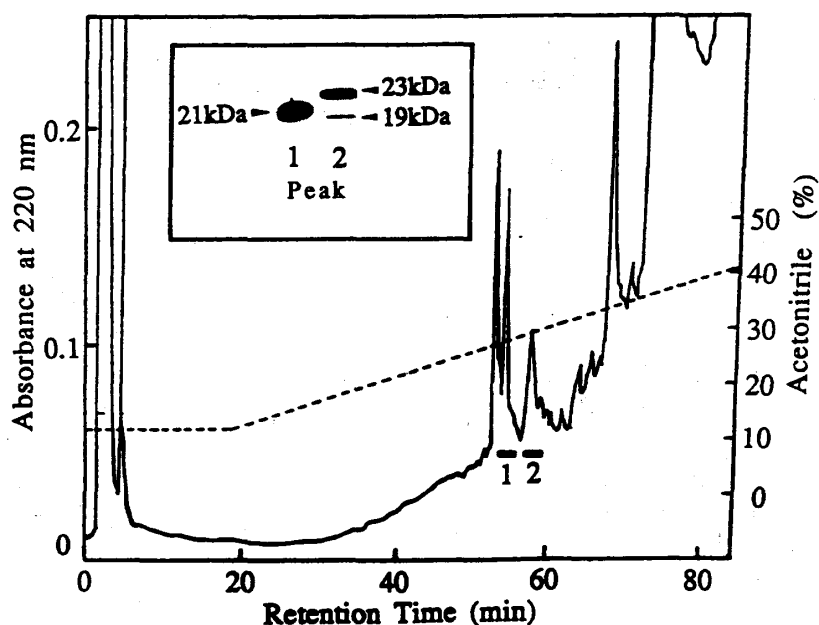


Fig. 4 Separation of intracellular hCG subunits by reverse-phase HPLC. Fractions from gel-filtration (Sephacryl S-300) containing intracellular hCG subunits were subjected to a column of Wakosil 5C18-200 (4.6x150 mm), and the proteins were separated on a linear gradient of 10 to 60 % acetonitrile in 0.1 % TFA. Each peak was analyzed by SDS-PAGE followed by staining with silver reagent and immunobinding. The insert shows SDS-PAGE stained with silver reagent of peaks 1 and 2.

残念ながら  $\beta$  サブユニットの 23 と 19 kDa の分子種を分けて精製することはできなかったが、アセトニトリル濃度 35 % 以上の位置に各サブユニット分子種が回収された。それら分子種は endo H に感受性を示す未成熟型分子種であった。そこで、 $\beta$  サブユニット 23 および 19 kDa を含む画分と  $\alpha$  サブユニット 21 kDa の N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、尿性サブユニットと同じそれぞれ一つの配列しか見つからなかった (Table 1)。また、これらサブユ

TABLE I. Sequence analysis of peaks 1 and 2 of Fig. 2. The yields of cycles (pmol) are shown below each residue.

Peak	Cycle number														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Ala-Pro-Asp-Val-Gln-Asp-x-Pro-Glu-x-Thr-Leu-Gln-Glu-Asp														
	109	145	27	107	40	41	—	71	40	—	31	38	25	23	17
2	Ser-Lys-Gln-Pro-Leu-Arg-Pro-Arg-x-Arg-Pro-Ile-x-Ala-Thr														
	70	108	86	81	84	17	71	39	—	40	54	51	—	48	27

ニット分子種の糖鎖の各種 glycosidase に対する感受性を調べた。アスパラギン結合性糖鎖については、endo H、エキソ酵素である  $\alpha$ -mannosidase および複合型糖鎖の末端にあるシアル酸に特異性を持つ sialidase に対する各サブユニットの感受性を調べた。前章で述べたように未成熟型  $\beta$  サブユニットの 23, 19 kDa の二本のタンパク質バンドは、これを endo H で処理すると二本のバンドが消失し、代わって新しく 15 kDa 付近のバンドへと分子量の明かな減少がみられた (Fig. 5, lane 2)。また、 $\alpha$ -mannosidase による処理でも明らかに分子量の減少がみられた (lane 1)。成熟型サブユニットはこの二つの酵素では何等変化がなかった (lane 9, 10)。逆に sialidase では成熟型サブユニットは明らかに分子

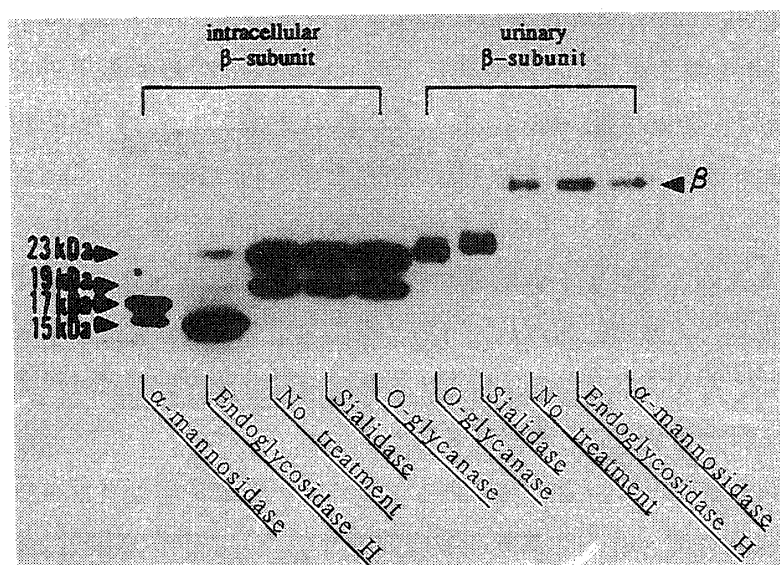


Fig. 5 Glycosidase sensitivity of  $\beta$ -subunit. Intracellular (peak 2 of Fig. 4) and urinary  $\beta$ -subunits were treated with various glycosidases and analyzed by SDS-PAGE followed by staining with silver reagent.

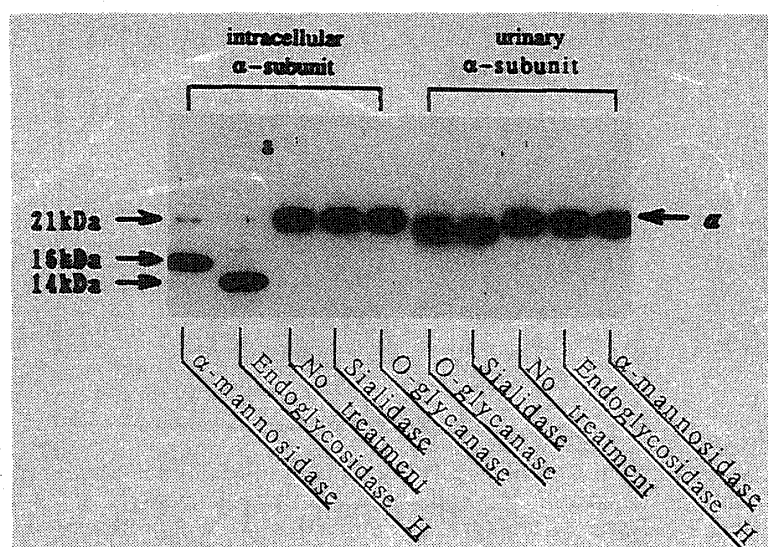


Fig. 6 Glycosidase sensitivity of  $\alpha$ -subunit. Intracellular (peak 1 of Fig. 4) and urinary  $\alpha$ -subunits were treated with various glycosidases and analyzed with SDS-PAGE followed by staining with silver reagent.

量の低下がみられるのに対して、未成熟型は全く変化しなかった (lane 4, 7)。 $\alpha$ サブユニットにおいても endo H による処理で未成熟型 21 kDa は消失して 14 kDa が生じ、 $\alpha$ -mannosidase でも分子量が低下した。(Fig. 6, lane 1, 2)。 $\beta$ サブユニットの場合と同様に成熟型サブユニットは変化しなかった (lane 9, 10)。sialidase の場合も同様に成熟型は分子量の減少が見られたのに対して、未成熟型は変化しなかった。次にセリン結合性糖鎖について調べた。セリン結合性糖鎖は hCG の  $\beta$ サブユニットにしか付加されていないが、フリー  $\alpha$ サブユニットにも付加されているという報告がある<sup>35)</sup> ため、サブユニットとして精製した両サブユニットについて酵素処理実験を行った。セリン結合性糖鎖に特異的な O-glycanase を用いたが、この酵素は末端にシアル酸が存在すると作用しないため、反応時には sialidase を共存させた。成熟型  $\beta$ サブユニットは sialidase 処理時より明らかに分子量の低下がみられた (Fig. 5, lane 6) が、他のサブユニット、すなわち未成熟型  $\beta$ 、成熟、未成熟型の  $\alpha$ サブユニットは感受性を持たなかった (Fig. 5, lane 5, Fig. 6, lane 5, 6)。以上のことから、未成熟型  $\beta$ サブユニット 23, 19 kDa の二つの分子種の分子量の相違は、アスパラギン結合性糖鎖の数がそれぞれ 23 kDa は二本、19 kDa は一本ということに起因することが考えられた。一方、未成熟型分子種は完全なセリン結合性糖鎖を付加されていないことが明らかになったことから、セリン結合性糖鎖はペプチド合成後おそらくゴルジ装置で付加されることが示唆された。

さらに、これらサブユニットを再会合させたところ、未成熟型サブユニットは成熟型サブユニットと同様再会合能を有しており、未成熟型サブユニットから成る hCG が形成された (Fig. 7)。得られた未成熟型サブユニットからなる hCG が活性を持つかどうか調べるため

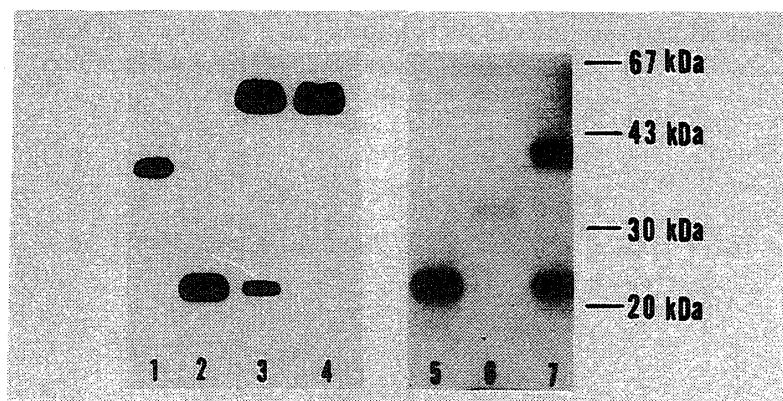


Fig. 7 Reconstitution of hCG with subunits.

Subunits association was analyzed using SDS-PAGE under non-reducing conditions after incubating the mixed  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit in a ratio of 3 : 1 for 48 h at 37 °C (lanes 3 and 7). Lane 1, urinary  $\beta$ -subunit ; lane 2, urinary  $\alpha$ -subunit ; lane 4, intact urinary hCG ; lane 5, intracellular  $\alpha$ -subunit ; lane 6, intracellular  $\beta$ -subunit.



に、in vitro における生物活性をラット精巣 Leydig 細胞のテストステロン産生能で測定した。その結果、その活性は標準 hCG あるいは成熟型サブユニットの再会合体と比べおよそ 1/100 程度しかみられなかったが、濃度依存的にテストステロンを産生させ、最大産生量は標準 hCG とほとんど変わらなかった (Fig. 8)。

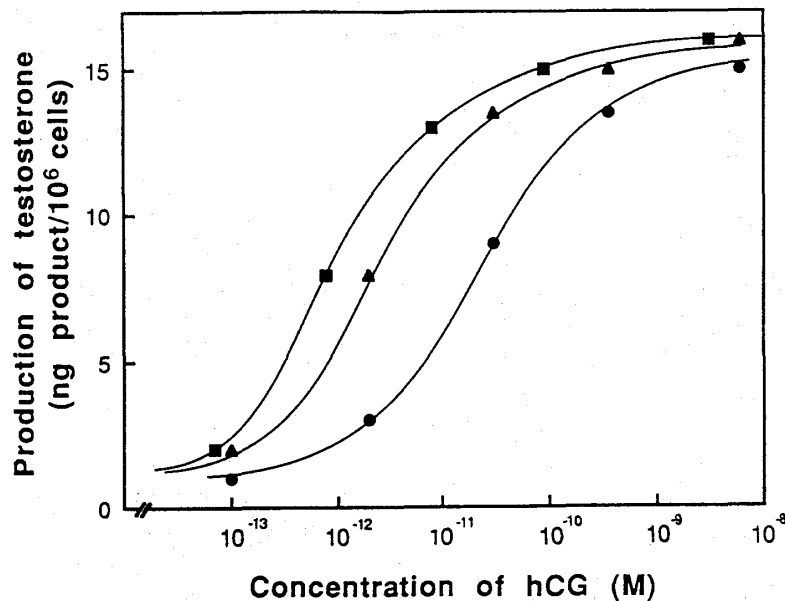


Fig. 8 Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by hCG (■), reconstituted urinary hCG (▲), and reconstituted intracellular hCG (●). Leydig cells were incubated with the indicated doses of samples for 2h and then testosterone production was determined by RIA. Each point is the mean of three separated experiments.

Matzuk ら<sup>25, 55-58)</sup> は、site-directed mutagenesis によって、hCG サブユニットから糖鎖を欠如することに伴う機能変化について報告している。それによると、hCG  $\alpha$  サブユニット上の Asn52 に付加された糖鎖を欠如させると、サブユニットの会合とステロイド産生能が著しく低下し、また、Asn78 に付加された糖鎖の欠如によって分泌が強く阻害された。その他のアスパラギン結合性糖鎖の欠如でも分泌速度の抑制あるいは会合能の減少傾向が見られたのに対し、セリン結合性糖鎖を欠如した hCG ではそれは変化しなかった。一方、尿性 hCG から化学的あるいは酵素的に糖鎖を除去するとステロイド産生能を失うこと<sup>17-21)</sup> も報告されており、細胞内型分子種の性質を考え合わせると、hCG のアスパラギン結合性糖鎖は、ステロイド産生、サブユニットの会合に必須であると考えられた。

### III. 細胞内型 hCG サブユニット分子種の細胞内局在性

I で述べたように、非培養正常胎盤絨毛細胞中に検出される hCG サブユニット分子種はマンノース型糖鎖を持つ中間体がほとんどである。このことから hCG は細胞内で未成熟型の中間体から成熟型へとプロセスされるとすぐに分泌されることが予想される。しかし、細胞内型 hCG サブユニットの持つ糖鎖のプロセスおよび細胞内輸送について知るには、その分子種の細胞内局在性を明らかにすることが必須である。著者ら<sup>59)</sup>は、胎盤絨毛細胞の簡便な分画法を考案し、分画で得られた細胞画分をイムノバインディング法で分析した。ショ糖の 0.5 M から 2.0 M の不連続密度勾配遠心法を行い、ゴルジ装置、滑面小胞体および粗面小胞体由来のミクロソーム画分を得、その画分を分析した。その結果、endo H に感受性をもつ高マンノース型糖鎖のプロセシング中間体 ( $\beta$  サブユニット 23, 19 kDa 分子種と  $\alpha$  サブユニット 21 kDa の大部分を占める分子種) は主として粗面小胞体画分に、複合型糖鎖を持つ成熟型サブユニット分子種はゴルジ装置、滑面小胞体画分のみに局在していた (Fig. 9)。

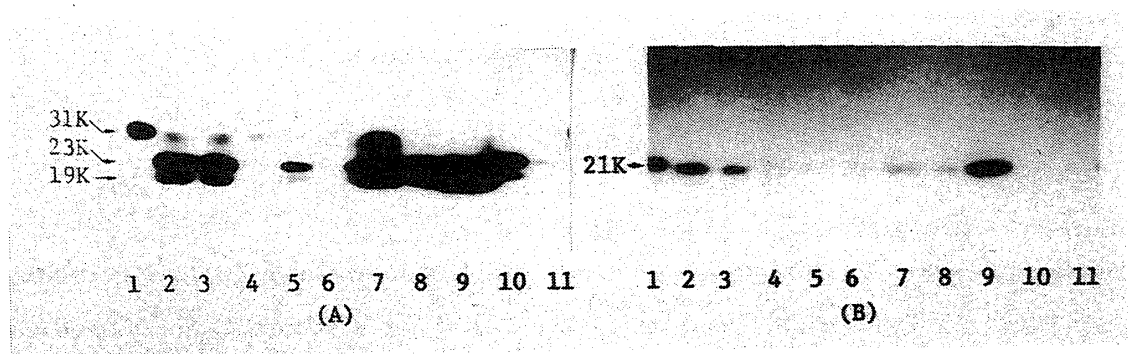


Fig. 9 Subcellular distribution of intracellular forms of hCG subunits.

Each subcellular fraction (10  $\mu$ g protein) was subjected to SDS-PAGE followed by immunobinding analysis for  $\beta$ -subunit (A) and  $\alpha$ -subunit (B) using anti- $\beta$  and anti- $\alpha$ , respectively. Lanes: 1, urinary hCG; 2, tissue extract; 7, Golgi/sER rich fraction; 8 and 9, rER rich fractions.

一般的に分泌糖タンパク質のアスパラギン結合性糖鎖は、タンパクの生合成時に粗面小胞体で付加された高マンノース型が、小胞体からゴルジ装置を通る間に複合型にプロセスされると言われている<sup>60)</sup>。著者らが得たゴルジ装置/滑面小胞体画分を sialidase で処理すると、この画分に局在するサブユニット分子種の分子量の低下がみられた。このことは、糖鎖末端にシアル酸が付加されていることを示すもので、アスパラギン結合性糖鎖の完全な成熟化過程は、ゴルジ装置で起こっていると考えられる。

#### IV. 正常胎盤絨毛細胞における高分子量体 hCG の存在およびその形成

胎盤絨毛細胞で hCG の  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットは異なる比率で生合成され、通常は  $\alpha$  サブユニットが  $\beta$  サブユニットより多いことが知られている<sup>61)</sup>。フリー  $\alpha$  サブユニットは妊婦血清中で hCG ダイマーと同程度検出される。Cole ら<sup>62)</sup> は、培養絨毛細胞、JEG-3 絨毛癌細胞、妊婦血清、絨毛癌患者血清から hCG ダイマー、フリー  $\alpha$  およびフリー  $\beta$  サブユニットを検出している。また、Burnside ら<sup>63)</sup> は、JEG-3 絨毛癌細胞において  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの mRNA は 8-bromo-cAMP によって別々に調節されていることを報告している。これらのことから胎盤絨毛細胞において  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニット、 $\alpha\beta$  が会合した hCG はそれぞれ個々に存在し、異なる糖鎖のプロセッシングを受けていると考えられる。最近、Coreless ら<sup>64, 65)</sup>、Bielinska ら<sup>66)</sup> は、 $\alpha$  サブユニットのフリー体と会合体はプロセッシングが異なること、また、 $\beta$  サブユニットがサブユニットとの会合体を形成する速度をラットの感染細胞で示している。Ruddon ら<sup>67-69)</sup> は、hCG サブユニットの会合において、 $\beta$  サブユニットの分子内ジスルフィド結合の形成が律速段階になる可能性と、 $\alpha$  サブユニットが異なる糖鎖のプロセスを受けることで、 $\beta$  サブユニットとの会合能を失い、フリーサブユニットとなる可能性を示唆した。しかし、hCG とそのフリー体の生合成機構あるいは細胞内での存在状態は依然明らかではない。

著者ら<sup>70)</sup> は胎盤細胞抽出液中の hCG サブユニット分子種の存在形態を調べた。胎盤細胞抽出液をゲル濾過し、その画分をイムノバインディング法で分析すると、SDS-PAGE において成熟型サブユニットより低分子量を示す未成熟型サブユニット分子種が、意外なことに成熟型サブユニットから成る hCG より高分子量画分に溶出されることを見いだした (Fig. 10)。このことから細胞内型サブユニット分子種が、高分子性の凝集体を形成するか、他のタンパク質と結合している可能性が示唆された。

そこで、凝集体を形成しているであろう細胞内サブユニット分子種の会合状態について調べた。胎盤細胞抽出液を直接、二次元 SDS-PAGE によって分析した。一次元目に熱、還元処理をしない条件下 SDS-PAGE を行い (hCG はこの条件下ではそのサブユニットに解離せず、一つのタンパク質バンドとして得られる)、一次元目のゲルからレーンを切り出し、2-メルカプトエタノールで還元処理した (この操作で hCG はサブユニットに解離する) 後、レーンを二次元目の濃縮用ゲルの上部に密着させ、SDS-PAGE を行った。垂直方向に生じたスポットは、一次元目の同じバンドに由来するものであり、フリーのサブユニットは対角線上に現れるはずである。胎盤絨毛細胞抽出液をこの方法で分離した後、イムノバインディング法で分析した (Fig. 11)。Fig. 11, A と B のスポットの移動度を比較すると  $\alpha$  サブユニットの a, b, c のスポットとそれぞれ  $\beta$  サブユニットの 1 (31 kDa), 2 (23 kDa), 3 (19 kDa) のスポットとは一次元目 SDS-PAGE で同一のタンパク質バンドから生じていた。また、成熟型サブユニットの  $\alpha$  サブユニット a と  $\beta$  サブユニット 1 は、一次元目の同

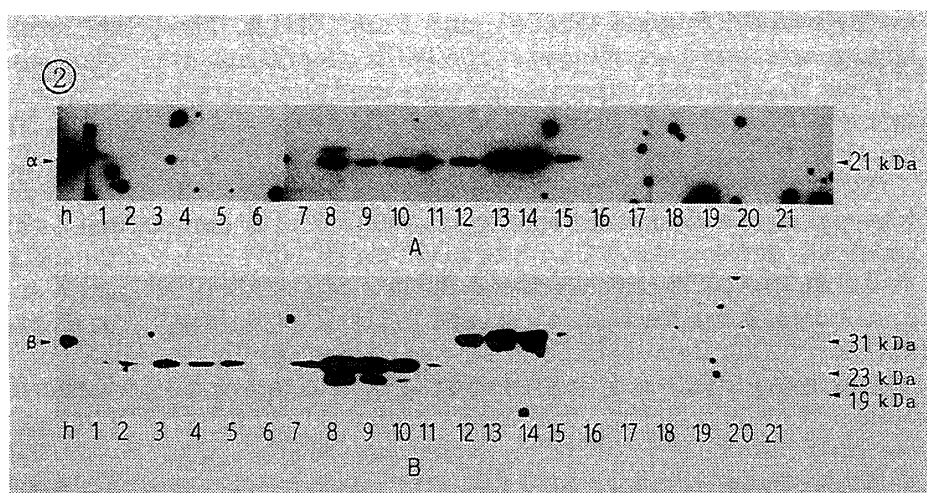
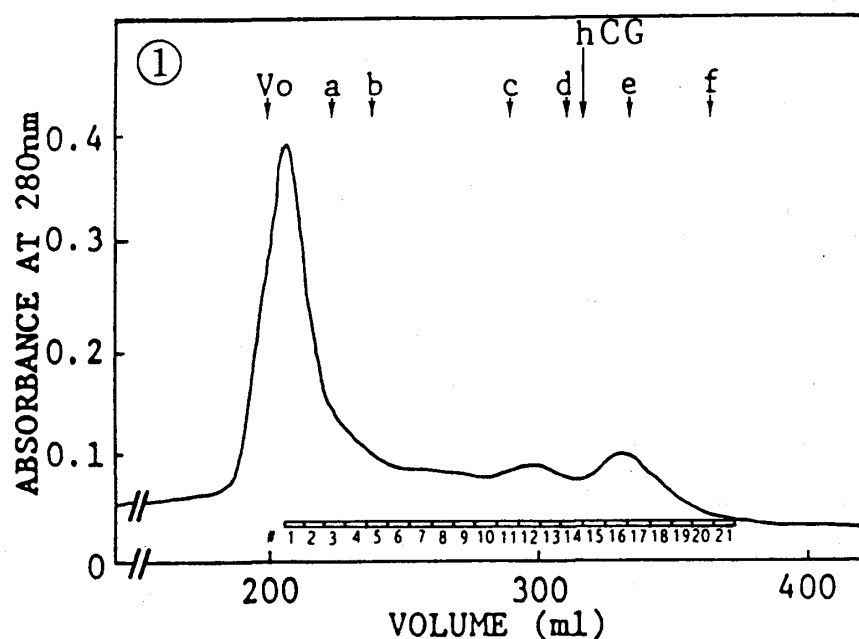


Fig. 10 ① Elution profile of placental extracts on a Sephacryl S-300 column. Placental extracts were applied to the column of Sephacryl S-300. Arrows indicated the position of the void volume of the column ( $V_o$ ) and the elution positions of marker proteins : a, thyroglobulin (670 kDa) ; b, ferritin (540 kDa) ; c, catalase (240 kDa) ; d, bovine serum albumin (67 kDa) ; e, ovalbumin (45 kDa) ; f,  $\beta$ -lactoglobulin (18.4 kDa) ; hCG, standard urinary hCG (60 kDa).  
 ② Immunobinding analysis of proteins in each fraction. Aliquots ( $20\mu\text{l}$ ) of the indicated fractions in ① (1 to 21) were subjected to SDS-PAGE and immunobinding analysis. A and B : immunobinding analyses with anti- $\alpha$  and  $\beta$ , respectively ; h, standard urinary hCG ;  $\alpha$ , standard  $\alpha$ -subunit ;  $\beta$ , standard  $\beta$ -subunit.

一バンドから生じているだけではなく、標準 hCG で行ったものと同一位置であった。また、b と 2、c と 3 が由来する一次元目のバンドは、抗 hCG 抗体による免疫沈降法で得られた未成熟型 hCG のバンドに相当した。この方法を用いることで、サブユニットの会合状態および会合体を形成しているサブユニットの分子種まで、一度に知ることが出来た。また、 $\alpha$  サブユニットのスポット d と  $\beta$  サブユニットの 4 から 9 はそれぞれ対応するサブユニットが検出されないことから細胞内でフリー体として存在しており、さらに  $\beta$  サブユニットの 6 から 9 は高分子の凝集体分子 (home-oligomer) として存在することが示唆された。

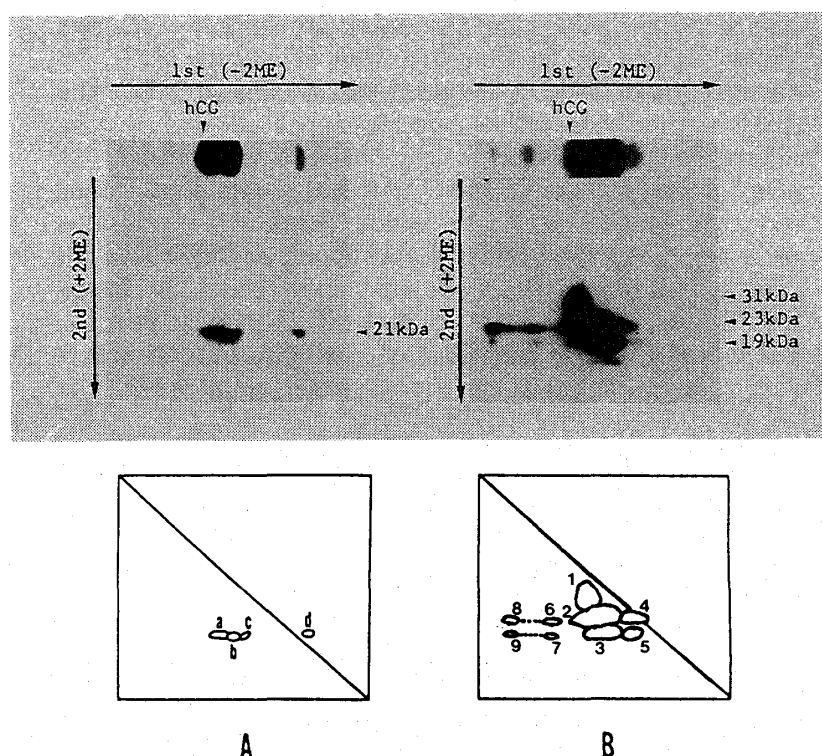


Fig. 11 Analysis of the assembly of intracellular subunits by 2-D SDS-PAGE. An aliquot ( $5\mu\text{l}$ ) of a placental extract prepared only in the presence of SDS was subjected to a first-dimensional SDS-PAGE (1st, -2ME). After incubation of the gel lane with 100 mM 2-mercaptoethanol, second-dimensional SDS-PAGE and then immunobinding analysis with anti- $\alpha$  (A) and - $\beta$  (B). (Upper panels) Autoradiograms of immunoblots. hCG, migration position of the combined  $\alpha\beta$  dimer of hCG on first-dimensional SDS-PAGE. (Lower panels) Traces of the upper autoradiograms. Letters (a to d) and numerals (1 to 9) denote the numbers of detected spots for  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, respectively

また、IIIで示した細胞内型分子種の局在性から、ゴルジ装置中の成熟型サブユニットはもちろん粗面小胞体中存在する未成熟型サブユニットも会合していることが考えられる。このことから $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットの会合は、粗面小胞体中で起こっていることが予想された。一方、未成熟型 hCG サブユニットは $\alpha\beta$ ダイマーだけでなく、個々のフリー型 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットとして存在して粗面小胞体に局在することが分かり、会合体とフリーサブユニットの

生合成あるいはプロセッシングに違いがあることが考えられた。さらに、未成熟型分子種は細胞内で凝集しておそらく home-oligomer を形成している可能性が示唆された。

従来から、糖タンパク質ホルモンのサブユニットの  $\alpha\beta$  会合体形成時期については、多くの議論がされてきた。Chin ら<sup>71)</sup> は、パルスラベル実験で TSH の  $\alpha\beta$  ダイマーの形成は分泌直前の最終段階に起こると報告している。一方、Hoshina ら<sup>72)</sup> は、アイソトープによる極短時間のパルス直後から、LH の未成熟な  $\alpha\beta$  ダイマーを検出したことから、粗面小胞体で、また、Magner ら<sup>73)</sup> も TSH の会合体形成は粗面小胞体で始まるが、おもに滑面小胞体、ゴルジ装置で起こっていると報告している。hCG については、Ruddon ら<sup>45)</sup> が JAR 細胞において、<sup>35</sup>S で標識したメチニオンで 10 分 pulse 後に高マンノース型糖鎖を持つ前駆体サブユニットの  $\alpha\beta$  ダイマーを検出したことから生合成直後、粗面小胞体で会合が起こっていると報告している。また、最近  $\beta$  サブユニットの粗面小胞体での立体構造の構築が会合体形成の律速段階になっているとも報告している<sup>68, 74)</sup>。著者らの実験結果は、正常絨毛細胞においては hCG の  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの会合が、生合成後、粗面小胞体で起こっていることを直接的に証明するものであった。

ところで、糖タンパク質の細胞内輸送において、水疱性口内炎ウイルス (VSV) にコードされた G タンパク質などでは、粗面小胞体での G タンパク質のオリゴマー化が粗面小胞体からゴルジ装置への輸送のシグナルとして必須であることが分かってきており、タンパク質の四次構造の構築が粗面小胞体からゴルジ装置への輸送の調節要因になることが考えられている<sup>75, 76)</sup>。このことと関連させて考えると、hCG がその生合成過程において未成熟型分子種の凝集体として主に細胞内の粗面小胞体に蓄積されていることは、未成熟型 hCG のオリゴマー化がゴルジ装置への輸送を調節する役割、すなわち未成熟型 hCG の膜小胞中への濃縮という点に大きな役割を持つ可能性があることを示唆した。

## まとめ

hCG の生合成、細胞内プロセッシングおよび輸送に関しては未だ不明な点が多い。しかしながら、現在までに得られた知見から、筆者らは、hCG が Fig. 12 に示すような細胞内での生合成、プロセッシングおよび輸送経路を経ると推定している。すなわち、粗面小胞体で生合成された hCG の各サブユニットは、ペプチド合成と同時にあるいはその後に高マンノース型糖鎖を付加されて直ちに会合体 (hCG) を形成し、オリゴマー化する。オリゴマー化あるいは糖鎖のプロセスが、何らかのシグナルになり、オリゴマー体は hCG 粗面小胞体からゴルジ装置に輸送される。そこで糖鎖のプロセス (マンノースのトリミングを受け、N-アセチルグルコサミンを付加される) を受け、最終的にガラクトースとシアル酸を付加され、複合型糖鎖の成熟型 hCG となり細胞外に分泌される。一方、Fig. 12 には hCG の場合しか

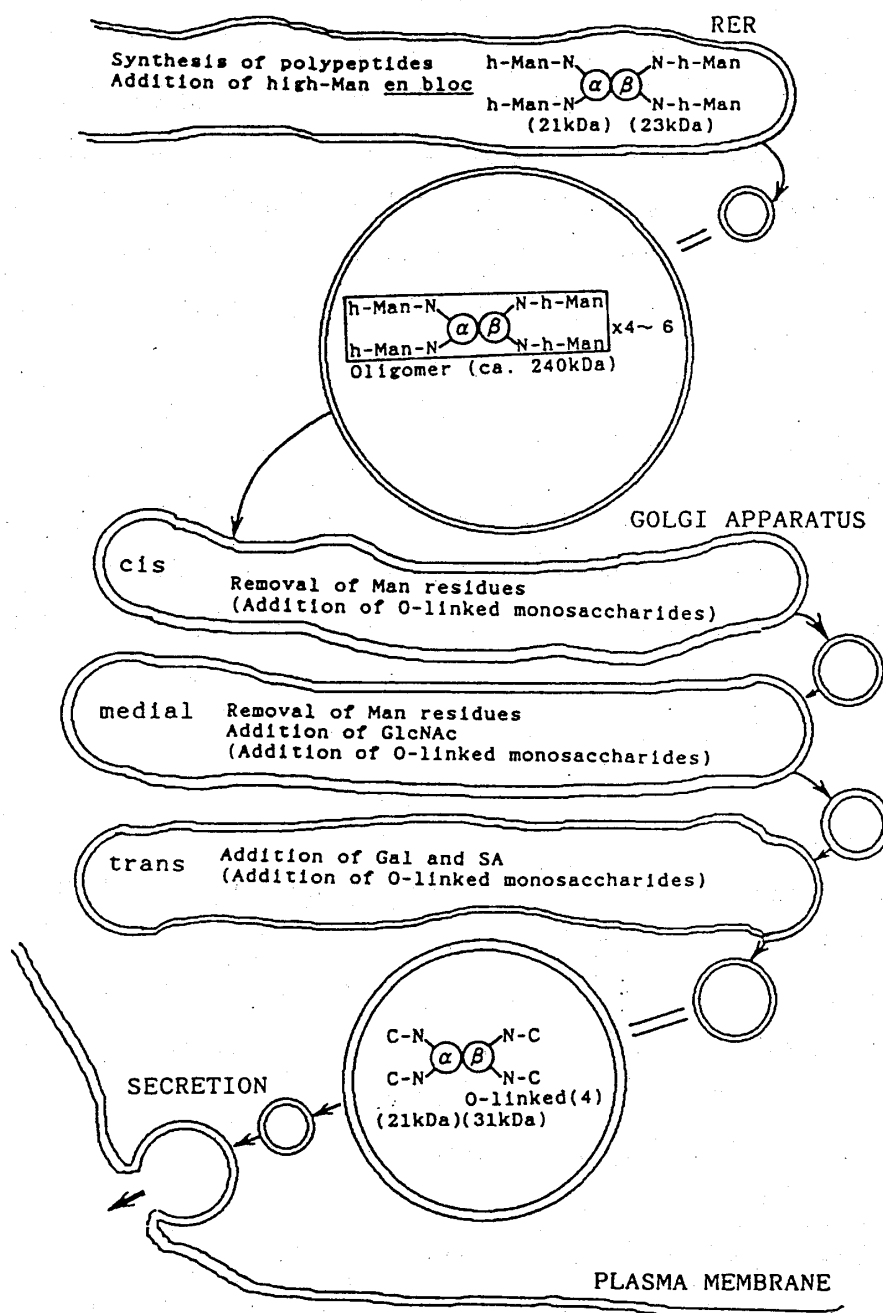


Fig. 12 Proposed model of hCG (subunits) biosynthesis.

示していないが、フリーのサブユニットも、会合体とは別個にオリゴマー体を形成し、細胞内を輸送されることが考えられる。

近年、糖タンパク質の機能発現における糖鎖の役割が注目されており、多数の糖タンパク質において糖鎖構造の研究がなされてきた。また、糖鎖のプロセッシングは、糖タンパク質の輸送と密接な関係があると考えられている。アスパラギン結合性糖鎖の粗面小胞体およびゴ

ルジ装置におけるプロセシングの過程は、Kornfeldら<sup>60)</sup>の総説にまとめられているが、実際には個別の糖タンパク質あるいは細胞によって、その輸送速度が異なること、高マンノース型糖鎖上のマンノース残基の小胞体での切断数が異なることも分かっており、さらにはプロセシング酵素の局在性も明確になっていないなど詳細については不明な点が数々ある。hCGも糖鎖がその機能発現および細胞内での輸送、細胞からの分泌に密接に関係することは明らかである。しかし、特異的なプロセシング酵素あるいは細胞内で多数存在するであろうプロセシング中間体等に関しては未解決であり、今後その全容が明らかになることを期待する。

## 謝 辞

本研究は長崎大学薬学部薬品生物化学教室で行ったものであり、御指導、御校閲頂いた長崎大学薬学部薬品生物化学教室榊原隆三助教授、石黒正恒教授に深く感謝致します。また、本総説を作成するにあたって御助言頂きました本学生化学第一研究室植木寛教授に感謝致します。

## 引用文献

- 1) J. J. Bell, R. E. Canfield, and J. J. Sciarra, *Endocrinology*, **84**, 298-307 (1969).
- 2) D. Puett, *BioEssays*, **4**, 70-75 (1987).
- 3) J. G. Pierce, *Endocrinology*, **89**, 1331-1344 (1971).
- 4) J. L. Vaitukaitis, G. T. Ross, and G. D. Braunstein, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **32**, 289-331 (1976).
- 5) L. A. Cole, T. G. Kroll, R. W. Ruddon, and R. O. Husa, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58**, 1200-1202 (1984).
- 6) G. T. Ross, *IARC Sci. Publ.*, **7**, 115-120 (1973).
- 7) R. O. Husa, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **44**, 1153-1162 (1973).
- 8) R. O. Husa, M. T. Story, and R. A. Pattillo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**, 338-340 (1974).
- 9) S. B. Nagelberg, J. Burnside, A. Maniatis, S. S. Lippman, and B. D. Weintraub, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**, 972-980 (1985).
- 10) T. Yoshimoto, K. Higashino, T. Hada, S. Tamura, K. Nakanishi, M. Mitsunobu, K. Uematsu, T. Matsuoka, and K. Taketa, *Cancer*, **60**, 2744-2750 (1988).
- 11) C. A. Kuida, G. D. Braunstein, P. Shintaku, and M. D. Said, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **112**, 282-285 (1988).



- 12) S. Matsuura, M. Ohashi, H-C. Chen, and G. D. Hodgen, *Endocrinology*, **104**, 396-401 (1979).
- 13) T. F. Parsons, and J. G. Pierce, *J. Biol. Chem.*, **254**, 6010-6015 (1979).
- 14) S. M. Aloj, H. Edelhoch, K. C. Ingham, F. J. Morgan, and R. E. Canfield, *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 497-504 (1973).
- 15) N. K. Kalyan and O. P. Bahl, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 1246-1253 (1981).
- 16) H. M. Madnik, N. K. Kalyan, H. L. Segal, and O. P. Bahl, *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 432-442 (1981).
- 17) P. Manjunath, and M. R. Sairam, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7109-7115 (1982).
- 18) N. K. Kalyan, H. A. Lippes, and O. P. Bahl, *J. Biol. Chem.*, **257**, 12624-12631 (1982).
- 19) H-C. Chen, Y. Shimohigashi, M. L. Dufau, and K. J. Catt, *J. Biol. Chem.*, **257**, 14446-14452 (1982).
- 20) J. M. Goverman, T. F. Parsons, and J. G. Pierce, *J. Biol. Chem.*, **257**, 15059-15064 (1982).
- 21) N. K. Kalyan, and O. P. Bahl, *J. Biol. Chem.*, **258**, 67-74 (1984).
- 22) H. T. Keutmann, P. J. McIlroy, E. R. Bergert, and R. J. Ryan, *Biochemistry*, **22**, 3067-3072 (1983).
- 23) M. I. Berman, M. B. Anand-Srivastava, and M. R. Sairam, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **42**, 49-57 (1985).
- 24) H. T. Sojar, and O. P. Bahl, *Arch. Biochem. Bioohys.*, **259**, 52-57 (1987).
- 25) M. M. Matzuk, J. L. Keene, and I. Boime, *J. Biol. Chem.*, **264**, 2409-2414 (1989).
- 26) Y. Ashitaka, R. Nishimura, K. Futamura, M. Ohashi, and S. Tojo, *Endocrinol. Japon.*, **21**, 547-550 (1974).
- 27) L. Frost and J. Møller, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **66**, 631-632 (1987).
- 28) R. J. Norman, R. H. Buck, S. M. Joubert, *Obstet. Gynecol.*, **71**, 315-318 (1988).
- 29) E. Confino, R. H. Demir, J. Friberg, and N. Gleicher, *Fertil. Steril.*, **45**, 526-531 (1986).
- 30) H-C. Liu, G. Jones, D. Kreiner, H. Jones, Jr, S. J. Muasher, and Z. Rosenwaks, *Fertil. Steril.*, **50**, 89-94 (1988).
- 31) J. L. Vaitukaitis, G. T. Ross, G. D. Braunstein, and P. L. Rayfold, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **32**, 289-331 (1976).
- 32) R. Benveniste, J. Lindner, D. Puett, and D. Rabin, *Endocrinology*, **105**, 581

- 587 (1979).

- 33) D. L. Blithe, and B. D. Nisula, *Endocrinology*, **117**, 2218-2228 (1985).
- 34) R. J. Norman, M. Menabawey, C. Lowings, R. H. Buck, and T. Chard, *Obste. Gynecol.* **69**, 590-593 (1987).
- 35) L. A. Cole, F. Perini, S. Birken, and R. W. Ruddon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1260-1267 (1984).
- 36) J. Amano, R. Nishimura, M. Mochizuki, and A. Kobata, *J. Biol. Chem.* **263**, 1157-1165 (1988).
- 37) R. Nishimura, Y. Endo, K. Tanabe, Y. Ashitaka, and S. Tojo, *J. Endocrinol. Invest.*, **4**, 349-358 (1981).
- 38) T. Mizuochi, R. Nishimura, C. M. Derappe, and A. Kubota, *J. Biol. Chem.*, **258**, 14126-14129 (1983).
- 39) L. A. Cole, *Trophoblast Research*, **2**, 139-148 (1987).
- 40) L. A. Cole, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **65**, 811-813 (1987).
- 41) M. Ozturk, D. Bellet, L. Manil, G. Hennen, R. Frydman, and J. Wands, *Endocrinology*, **120**, 549-558 (1987).
- 42) P. W. Robbins, S. C. Hubbard, S. J. Turco, and D. F. Wirth, *Cell*, **12**, 893-900 (1977).
- 43) I. Tabas, S. Schlesinger, and S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.*, **253**, 716-722 (1978).
- 44) R. W. Ruddon, A. H. Bryan, C. A. Hanson, F. Perini, L. M. Ceccorulli, and B. P. Peters, *J. Biol. Chem.*, **256**, 5189-5196 (1981).
- 45) B. P. Peters, R. F. Krzesicki, R. J. Hartle, F. Perini, and R. W. Ruddon, *J. Biol. Chem.*, **259**, 15123-15130 (1984).
- 46) R. W. Ruddon, R. J. Hartle, B. P. Peters, C. Anderson, R. I. Huot, and K. Stromberg, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11389-11392 (1981).
- 47) R. W. Ruddon, C. A. Hanson, A. H. Bryan, G. J. Putterman, E. L. White, F. Perini, K. S. Meade, and P. H. Aldenderfer, *J. Biol. Chem.*, **255**, 1000-1007 (1980).
- 48) R. W. Ruddon, C. A. Hanson, and N. J. Addison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5143-5147 (1979).
- 49) R. Sakakibara, N. Tominaga, and M. Ishiguro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 443-452 (1986).
- 50) M. J. Kessler, M. S. Reddy, R. H. Shah, and O. P. Bahl, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7901-7908 (1979).

- 51) M. J. Kessler, T. Mise, R. D. Ghai, and O. P. Bahl, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7909-7914 (1979).
- 52) H. Wang, S. J. Segal, and S. S. Koide, *Endocrinology*, **123**, 795-803 (1988).
- 53) H. Wang, S. J. Segal, and S. S. Koide, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **62**, 13-22 (1989).
- 54) N. Tominaga, R. Sakakibara, M. Shimojo, and M. Ishiguro, *J. Biochem. (Tokyo)*, **109**, 99-105 (1991).
- 55) M. M. Matzuk, and I. Boime, *J. Cell Biol.*, **106**, 1049-1059 (1988).
- 56) M. M. Matzuk, and I. Boime, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17106-17111 (1988).
- 57) M. M. Matzuk, and I. Boime, *Biol. Reprod.*, **40**, 48-53 (1989).
- 58) M. M. Matzuk, M. Krieger, C. L. Coreless, and I. Boime, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6354-6358 (1987).
- 59) R. Sakakibara, Y. Yokoo, K. Yoshikoshi, N. Tominaga, K. Eida and M. Ishiguro, *J. Biochem. (Tokyo)*, **102**, 993-1001 (1987).
- 60) R. Kornfeld, and S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 631-664 (1985).
- 61) J. L. Vaitukaitis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**, 755-760 (1974).
- 62) L. A. Cole, R. J. Hartle, J. J. Laferla, and R. W. Ruddon, *Endocrinology*, **113**, 1176-1178 (1983).
- 63) J. Burnside, S. B. Nagelberg, S. S. Lippman, and B. D. Weintraub, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12705-12709 (1985).
- 64) C. L. Coreless, M. Bielinska, T. V. Ramabhadran, S. Daniels-McQueen, T. Otani, B. A. Reitz, D. C. Tiemeier, and I. Boime, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14197-14203 (1987).
- 65) C. L. Coreless, M. M. Matzuk, T. V. Ramabhadran, A. Krichevsky, and I. Boime, *J. Cell Biol.*, **104**, 1173-1181 (1987).
- 66) M. Bielinska, M. M. Matzuk, and I. Boime, *J. Biol. Chem.*, **264**, 17113-17118 (1989).
- 67) R. W. Ruddon, R. F. Krzesicki, S. E. Norton, J. S. Beebe, B. P. Peters, and F. Perini, *J. Biol. Chem.*, **262**, 12533-12540 (1987).
- 68) B. P. Peters, R. F. Krzesicki, F. Perini, and R. W. Ruddon, *Endocrinology*, **124**, 1602-1612 (1989).
- 69) J. S. Beebe, R. F. Krzesicki, S. E. Norton, F. Perini, B. P. Peters, and R. W. Ruddon, *Endocrinology*, **124**, 1613-1624 (1989).
- 70) N. Tominaga, R. Sakakibara, Y. Yokoo, and M. Ishiguro, *J. Biochem. (Tokyo)*, **105**, 992-997 (1989).

- 71) W. Chin, F. Maloof, and J. Habener, J. Biol. Chem., **256**, 3059–3066 (1981).
- 72) H. Hoshina, and I. Boime, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 7649–7653 (1982).
- 73) J. A. Magner, and B. D. Weintraub, J. Biol. Chem., **257**, 6709–6715 (1982).
- 74) R. W. Ruddon, R. F. Krzesicki, J. S. Beebe, L. Loesel, F. Perini, and B. P. Peters, Endocrinology, **124**, 862–869 (1989).
- 75) T. E. Kreis, and H. F. Lodish, Cell, **46**, 929–937 (1986).
- 76) H. F. Lodish, J. Biol. Chem., **263**, 2107–2110 (1988).