

令和元年5月31日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08078

研究課題名(和文) ペプチドホルモンの分泌顆粒形成と分解機構(分泌顆粒の生涯)の解明

研究課題名(英文) Elucidation of formation and degradation mechanism of peptide hormone-containing secretory granules (the life of secretory granules)

研究代表者

五味 浩司(GOMI, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90293240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵細胞の分泌顆粒形成から分解までの過程に注目し、顆粒膜発現タンパク質であるフォグリン遺伝子欠損マウスにおいて、電子顕微鏡観察による膵細胞の形態解析並びに分泌顆粒発現タンパク質の発現変化について解析し、細胞内分泌顆粒のエイジングに関連する動態について考察した。フォグリン欠損により、インスリン顆粒の加齢性減少、低電子密度凝集顆粒の減少、中性糖検出反応によるリソソームのサイズと密度の加齢性増加などを認めた。一方、ホルモン選別輸送タンパク質であるSg3欠損では、顆粒膜での糖局在の変化が示唆された。また、Sg3が副腎クロム親和性細胞のうち、ノルアドレナリン細胞で優位な発現を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内分泌細胞における分泌顆粒の細胞内輸送や開口放出に関わる分子基盤や分泌調節機序に関しては、学術的知見の蓄積が豊富である。これに対し、分泌顆粒の形成から分解の機構の詳細は十分に分かっていなかった。本研究では、マウスリバーシブル遺伝子工学を駆使し、分泌顆粒膜に局在し、ペプチドホルモンのソーティングや凝集に関わっている分子がこの機構にどのように関わっているのかについて、一定の考察をすることができた。得られた結果は、生理的なホルモン産生低下の機序や内分泌代謝疾患の病態の理解にも繋がる基礎的な知見といえる。また、電顕糖質細胞化学により、内分泌顆粒の性状を解析した前例は無く、斬新性を有する。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the properties of secretory granules devoid of phogrin and secretogranin 3 expressed in pancreatic beta cells. We have found novel findings of intracellular lysosomal morphology in phogrin-deficient beta cells. Our findings were different from those reported in previous studies showing drastic changes in lysosomal morphology. On the other hand, secretogranin 3-deficient beta cells were suggested a change in neutral sugar localization in the granule membranes. It has been clarified that secretogranin 3 is expressed in active amine producing cells in nerves, adrenal glands, in addition to peptide hormone-producing cells. Secretogranin 3 was revealed to be predominantly expressed in noradrenaline cells in adrenal gland. Furthermore, we focused on the expression of secretogranin 3 in the central nervous system and found expression in cerebellar glial cells including Bergmann glia.

研究分野：獣医解剖学・組織学

キーワード：内分泌細胞 分泌顆粒 フォグリン セクレトグラニン ペプチドホルモン トランスゴルジネットワーク リソソーム 遺伝子欠損マウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

内分泌細胞では、ペプチドホルモン前駆体は粗面小胞体上で合成された後、ゴルジ装置を経て、トランス・ゴルジ・ネットワークから分泌顆粒内に選別輸送されて成熟ホルモンとなり、分泌顆粒内に蓄積される。このようにして形成された分泌顆粒には、ホルモンの成熟・濃縮と安定化に関わると考えられているタンパク質のみならず、顆粒形成に直接的に関わっているタンパク質が存在し、形成された顆粒が分泌刺激により細胞外へ開口放出される際には、細胞内小胞輸送系や細胞骨格系のタンパク質が関与している。一方、分泌刺激により細胞外へ分泌される顆粒は細胞全体の顆粒総数に対して、ごく一部のものに過ぎないことが知られており、申請者らは分泌顆粒の輸送あるいは開口放出に関わるタンパク質の遺伝子欠損マウスの解析によって、膵β細胞あるいは下垂体コルチコトロフにおいて生理学的条件下で分泌されるホルモン量は細胞内に含まれる総量のわずか1%にも満たないものであることを報告している。このことは、分泌に至らない多くの顆粒がオートファジーを介して退行的に処理されるのか、あるいは前進的にリサイクルされるのかといった点について未解決な問題が存在している。

### 2. 研究の目的

内分泌細胞において、ペプチドホルモンの生成と分泌顆粒の形成は密接に関連している。また、形成された分泌顆粒のうち分泌刺激によって細胞外に開口放出されるものはごく一部のことであり、多くは分泌されること無くその役割を終えるものと考えられている。本研究は、ペプチドホルモン産生細胞の分泌顆粒内あるいは顆粒膜上に局在し、顆粒内へのホルモンの選別輸送、顆粒形成及び分解経路に関わる分子として IA-2 ファミリー、グラニン、プロホルモンプロセッシング酵素及び亜鉛トランスポーターなどのタンパク質に着目し、これら分子の遺伝子欠損マウスに由来する細胞・組織を解析することにより、分泌顆粒の形成・成熟から分解までの過程、すなわち「分泌顆粒の生涯」に関する新たな知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

フォグリン (IA-2β) およびセクレトグラニン 3 (Sg3) といった分泌顆粒形成に関わるタンパク質の遺伝子欠損マウスの組織において、(1) 分泌顆粒形成、プロホルモンプロセッシング、分泌顆粒輸送、リサイクリングおよびリソソーム性分解機構の各経路に関わるタンパク質の発現についてイムノブロット法で解析を行い、顆粒の形成と成熟から細胞内輸送あるいは分解とリサイクリングに至る過程に何らかの変化が生じていないかについて調べた。(2) 共免疫沈降法により、フォグリンとプロホルモンプロセッシング酵素 CPE、Sg3 と CgA あるいは CPE との相互作用について解析し、特に分泌顆粒の選別輸送に変化が起きていないかどうかについて調べた。(3) 光顕及び電顕免疫組織化学的手法と電顕糖質細胞化学的手法により、各タンパク質の細胞内または顆粒内局在の変化、あるいは顆粒膜における糖鎖修飾の変化について解析した。(4) 電子顕微鏡による分泌顆粒の形態観察を行い、分泌顆粒がリソソームとの融合によって示されるようなオートファジーに関連した分解像 (クリノファジー) について質的・量的に解析した。(5) 各動物種において、内分泌細胞のみならず、外分泌細胞についても顆粒の形成と成熟から細胞内輸送に関するタンパク質の発現解析並びに共免疫沈降法による分子間相互作用について解析した。これらの解析により、欠損遺伝子と分泌顆粒の形成・成熟から分解までの過程における関連性ならびに分泌顆粒における個々の特性について検討した。

### 4. 研究成果

(1) 膵β細胞特異的フォグリン遺伝子欠損マウス (PhbK0) と野生型マウス (WT) の灌流固定後、実体顕微鏡下で膵臓より膵島組織片を採材し、エポキシ樹脂包埋した電子顕微鏡用標本を作成し、観察した。膵β細胞の形態評価法として、ホルモン顆粒中のインスリンペプチド凝集体以外の物質や低電子密度凝集物の蓄積頻度、及びリソソームの数的ないしは質的变化を指標とした。解析は、連携研究者のみが遺伝子型を把握しているブラインドテストにより実施した。PhbK0 の電顕所見として、①加齢性にインスリン顆粒の減少が認められた。②顆粒内に見られるホルモン結晶以外の構造物の出現頻度においては差がなかったが、低電子密度凝集顆粒が減少していた。③リソソームとリポコンドリアの加齢性増加を認めたが、数的な変化はなかった。以上の結果は、先行研究が報告している全身性フォグリン欠損マウスにおける極めて顕著な膵β細胞の形態異常 (Cai et al., Diabetologia, 54:2347, 2011) とは大きく異なっており、全身性か膵β細胞特異的かで欠損効果が異なるものとして注目される。

(2) 膵β細胞を含む内分泌細胞の分泌顆粒膜に局在するフォグリンと顆粒膜タンパク質などの糖修飾との関連性について、PhbK0とWTの膵β細胞における糖質の局在を電顕細胞化学的に解析した。コラゲナーゼ法により膵島を単離し、4%PFA-0.5%GAにて固定した後、LR-White樹脂包埋標本を作成した。中性糖の検出は、過ヨウ素酸一チオカルボヒドラジド-タンパク銀-物理現像法により行い、観察した。中性糖は分泌顆粒膜、リソソーム、ゴルジ装置などに陽性反応が検出され、ハローのある目玉状顆粒の顆粒膜よりも、非目玉状顆粒の顆粒膜で強い反応を示した。一方、陽性反応を示すリソソームの密度が高い傾向が認められ、そのサイズも大きい傾向であった。また、Sg3遺伝子欠損マウス (Sg3K0) では、分泌顆粒膜とその周囲に陽性反応を示す細胞が観察さ

れた。本結果は、フォグリンがリソソーム、Sg3が分泌顆粒の構造に関与することを示すとともに、分泌顆粒では陽性反応と顆粒成熟度の関連が推測される点において、興味深い結果を示した。また、本アプローチは内分泌細胞における電顕レベルでの中性糖検出という世界初の所見である。(3) 分泌に至らない顆粒の多くがどのような末路を辿るのかを知る手がかりとして、トランスゴルジネットワークを経由した分泌顆粒の誕生から成熟過程に関わる分子機構について解析するための生化学的手法を確立した。注目したのは細胞内小胞膜の膜融合に関わる SNARE タンパク質の相互作用である。Syntaxin-6 は、TGN からエンドソームへのクラスリン被覆小胞輸送に関与し、膵β細胞のゴルジ領域に位置する未成熟顆粒の限界膜に局在することが示されており、分泌顆粒成熟における役割が示唆されている。一方、VAMP4 はゴルジ体、TGN、クラスリン被覆および非被覆小胞、エンドソームのみならず未成熟分泌顆粒に局在しており、Syntaxin-6 と共局在してタンパク質複合体を形成することが一部の内分泌細胞で明らかにされており、両者の相互作用が成熟分泌顆粒の形成を含む TGN-エンドソーム輸送に関与していることが推測される。そこで、組織レベル解析が比較的容易な外分泌組織（唾液腺）を材料として用い、内在性タンパク質を共免疫沈降法により解析したところ、Syntaxin-6 と VAMP4 の SNARE 複合体形成が検出された。従来、分泌顆粒膜に局在する VAMP2 と Syntaxin-1 あるいは Syntaxin-3 といった SNARE 複合体の形成が顆粒成分の細胞外開口放出の過程で重要であることが示されているが、Syntaxin-6/VAMP4 複合体形成が顆粒のエイジングに関わっている可能性があり、免疫電顕法による細胞内顆粒の識別ができる可能性を示唆した。現在、PhbK0 および Sg3K0 の膵β細胞において、Syntaxin-6/VAMP4 の共局在と標識顆粒分布に関する免疫電顕解析を実施している。

(4) PhbK0 および Sg3K0 において、単離膵島を用い、各種条件下でサンプルを調整し、形態・生化学的解析を実施した。PhbK0 の膵β細胞におけるインスリンの顆粒への選別輸送や糖刺激時の細胞増殖への関与を調べる目的で、ホルモン含有、顆粒輸送、ホルモン分解および細胞増殖性などの指標となる分子群（インスリン、IA-2、Rab27a、細胞増殖マーカーPCNA、カテプシン）の発現解析を行った。PCNA の発現解析から、糖負荷などのインスリン分泌の誘導をかけない定常時では、膵β細胞の増殖性変化は細胞系と比べ顕著な変化は認められなかった。一方、高脂肪食を負荷した一群では顕著な違いが認められ、詳しい解析を進めている。また、イムのプロット解析により、PhbK0 の膵島では顆粒輸送タンパク質 Rab27a に変化は見られないものの、リソソームタンパク質であるカテプシンDの発現が亢進している可能性が示された。同酵素はオートファジーに関わるアスパラギン酸プロテアーゼであることから、細胞内顆粒の代謝においてフォグリンが何らかの関与を有するものと考えられた。

(5) Sg3 は内分泌細胞におけるペプチドホルモンの選別輸送において、プロホルモン凝集体を分泌顆粒内へ輸送する機能を持つ分子であり、従来、ウサギポリクローナル抗体が用いられてきたため、共発現分子の解析に制約があった。そこで、免疫組織化学的解析により有効なツールを得ることを目的として、新規マウスモノクローナル抗体を作成した。得られたクローンにおいて、野生型マウス組織で検出された陽性シグナルが Sg3 遺伝子欠損マウスの組織では陰性であることが確認でき、本モノクローナル抗体の有用性が期待できる。また、研究協力者穂坂博士らと作成した Sg3K0 では、ジーントラップ法によって作成された遺伝子欠損マウスであり、トラッピングベクターに挿入された *LacZ* レポーター遺伝子の発現解析を行なったところ、*LacZ* 発現が従来の Sg3 発現組織での発現パターンと一致していることが確認できた。

(6) Sg3 がペプチドホルモン産生細胞の他に、神経、副腎などにおいて活性アミン産生細胞で発現していることを明らかにしている。副腎において、アドレナリン合成酵素であるフェニルエタノールアミン-N-メチルトランスフェラーゼ (PNMT) との二重染色により、PNMT 弱陽性細胞での Sg3 が強い発現を認めたことから、ノルアドレナリン細胞での優位な発現が明らかとなった。一方、ソマトスタチンおよびVIPといったホルモン産生細胞との共発現は認められなかった。さらに、Sg3 の神経系細胞での発現に注目し、従来の神経-内分泌細胞といった発現細胞種に加え、バーグマンングリアを含む小脳神経膠細胞における発現を見出した。Sg3 の神経膠細胞における機能解析に関して、培養細胞株であるラットグリオーマ RGC-6 と C6 細胞株での発現を確認した。現在、各種刺激に伴う発現変化とプロセッシングパターンの変化について解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計5件)

① Eri Sato, Yoshinori Maeda, Yui Sato, Airi Hinata, Hiroshi Gomi, Daisuke Koga, Seiji Torii, Tsuyoshi Watanabe, Masahiro Hosaka (2019). Culture in 10% O<sub>2</sub> enhances the production of active hormones in neuro-endocrine cells by up-regulating the expression of processing enzymes. *Biochemical Journal*, 476(5), 827-842. 査読有.

② Seiji Torii, Chisato Kubota, Naoya Saito, Ayumi Kawano, Ni Hou, Masaki Kobayashi, Ryoko Torii, Masahiro Hosaka, Tadahiro Kitamura, Toshiyuki Takeuchi, Hiroshi Gomi (2018). The

pseudophosphatase phogrin enables glucose-stimulated insulin signaling in pancreatic  $\beta$  cells. *Journal of Biological Chemistry*, 293(16), 5920-5933. 査読有.

③ Yoshinori Maeda, Saki Kudo, Ken Tsushima, Eri Sato, Chisato Kubota, Aika Kayamori, Hiroki Bochimoto, Daisuke Koga, Seiji Torii, Hiroshi Gomi, Tsuyoshi Watanabe, Masahiro Hosaka (2018). Impaired processing of prohormones in secretogranin III-null mice causes maladaptation to an inadequate diet and stress. *Endocrinology*, 159(2), 1213-1227. 査読有.

④ Hiroshi Gomi, Hiromi Osawa, Rie Uno, Tadashi Yasui, Masahiro Hosaka, Seiji Torii, Azuma Tsukise (2017). Canine salivary glands: analysis of Rab and SNARE protein expression and SNARE complex formation with diverse tissue properties. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 65(11), 637-653. 査読有.

⑤ Tadashi Yasui, Hiroshi Gomi, Taishi Kitahara, Azuma Tsukise (2017). Ultrastructure and immunohistochemical characterization of proteins concerned with the secretory machinery in goat ceruminous glands. *European Journal of Histochemistry*, 61(3), 222-230. 査読有.

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 久保田知里, 齊藤直也, 河野あゆみ, 竹内利行, 小林雅樹, 北村忠弘, 穂坂正博, 五味浩司, 鳥居征司. 分泌顆粒蛋白質フォグリンによるインスリン分泌とシグナルの連結機構. 第 91 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 (京都府・京都市), 2018 年 9 月 26 日.

② 安井禎, 五味浩司. イヌ涙腺における糖質ならびに免疫組織化学的解析. 第 161 回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場 (茨城県・つくば市), 2018 年 9 月 13 日.

③ 五味浩司, 大澤裕美, 宇野理恵, 安井禎, 鳥居征司, 穂坂正博, 月瀬東. イヌ口腔腺における Rab および SNARE タンパク質の発現解析. 第 161 回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場 (茨城県・つくば市), 2018 年 9 月 13 日.

④ 五味浩司, 安井禎, 鳥居征司, 穂坂正博. ニワトリ内分泌器官におけるセクレトグラニン III の発現解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市), 2016 年 9 月 8 日.

⑤ 安井禎, 五味浩司. シバヤギ耳道腺における抗菌物質と分泌制御タンパク質の免疫組織化学的解析. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市), 2016 年 9 月 8 日.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/91/0009062/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：安井 禎

ローマ字氏名：(YASUI, Tadashi)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70434107

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：鳥居 征司

ローマ字氏名：(TORII, Seiji)

研究協力者氏名：穂坂 正博

ローマ字氏名：(HOSAKA, Masahiro)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。