

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010-2012

課題番号：22570133

研究課題名（和文）神経内分泌細胞のコレステロール代謝とホルモン分泌調節のクロストークを解明する

研究課題名（英文）The cholesterol metabolism of neuroendocrine cells and crosstalk of the hormone secretion

研究代表者

穂坂 正博 (Hosaka Masahiro)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80311603

研究成果の概要（和文）：内分泌細胞で顆粒タンパク質セクレトグラニン III (SgIII) の発現を減弱して、細胞レベルでその機能を解析したところ、1) SgIII は、ペプチドホルモンを分泌顆粒へ運ぶだけでなく、分泌顆粒形成にも関与すること、2) ペプチドホルモンは、その大部分が SgIII で顆粒に運ばれるが、ごく少量のホルモンはセクレトグラニン II (グラニタンパク質群の一つ) により分泌顆粒に運ばれていること、を明らかにした。つまり、ホルモンを分泌顆粒へ運ぶ機構は 2 種類以上あることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Prior to secretion, regulated peptide hormones are selectively sorted to secretory granules (SGs) at the trans-Golgi network (TGN) in endocrine cells. Secretogranin III (SgIII) appears to facilitate SG sorting process by tethering of protein aggregates containing chromogranin A (CgA) and peptide hormones to the cholesterol-rich SG membrane (SGM). Here, we evaluated the role of SgIII in SG sorting in AtT-20 cells transfected with small interfering RNA targeting SgIII. In the SgIII-knockdown cells, the intracellular retention of CgA was greatly impaired, and only a trace amount of CgA was localized within the vacuoles formed in the TGN, confirming the significance of SgIII in both the tethering of CgA-containing aggregates and the establishment of the proper SG morphology. Although the intracellular retention of proopiomelanocortin (POMC) was considerably impaired in SgIII-knockdown cells, residual ACTH/POMC was still localized to some few remaining SGs together with another granin protein, secretogranin II (SgII), and was secreted in a regulated manner. Biochemical analyses indicated that SgII bound directly to the SGM in a cholesterol-dependent manner and was able to retain the aggregated form of POMC, revealing a latent redundancy in the SG sorting and retention mechanisms, that ensures the regulated secretion of bioactive peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	108,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ホルモンと生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

神経内分泌細胞では、ペプチドホルモンや神経ペプチドは、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 (TGN) から分泌顆粒に選別輸送されて、貯留され、細胞外刺激により分泌される (調節性分泌経路)。一方、外部刺激による調節を受けない、成長因子、膜蛋白質、アルブミン等の血清タンパク質等の分泌タンパク質は、TGNから細胞表面に移行する経路で輸送される (構成性分泌経路)。

神経内分泌細胞の分泌顆粒にはペプチドホルモン、グラニンタンパク質群、ペプチドホルモンを活性化するプロセシング酵素群が含まれ、また顆粒上には分泌制御タンパク質や顆粒内環境を整えるイオンチャンネルとポンプが存在している。申請者は、これまで『ペプチドホルモンが分泌顆粒へ選別されるメカニズム』を解析し、グラニンタンパク質のセクレトグラニン III (SgIII ; 471 個のアミノ酸からなる) が、アミノ酸 23 番-186 番目のドメイン SgIII 23-186 で TGN 膜の高コレステロール組成ドメイン (コレステロール組成が 40-45 mol%) に着床して、その一方、SgIII 187-373 でペプチドホルモンとクロモグラニン A (CgA) の凝集体を結合し、ホルモンを顆粒へ選別することを示した (Hosaka et al., Mol. Biol. Cell 13: 3388-99, 02; Hosaka et al., J. Biol. Chem. 279, 3627-3634, 04; Hosaka et al., J. Cell Science 118, 4785-4795, 05; Han et al., Mol. Endocrinol. 22, 1935-1949, 08)。

近年、分泌顆粒形成において顆粒膜コレステロールの重要性が注目されている。顆粒内プロセシング酵素のカルボキシペプチターゼ E (CPE; ホルモンの末端修飾酵素) とプロホルモン転換酵素 (PC1/3, PC2; ホルモンを塩基性アミノ酸対で切断する) は分泌顆粒膜の高コレステロール組成リピッドラフトに結合する (Cell 88, 73-83, 97; J. Biol. Chem. 275, 29887-29893, 00; Biochemistry 42, 10445-10455, 03; Biochemistry 43, 7798-7807, 04)、マウス下垂体由来神経内分

泌細胞 AtT-20 ではコレステロールを減少させると顆粒形成が十分起こらなくなる (Traffic, 1, 952-962, 00)、などが報告されている。

細胞のコレステロールは、細胞内で合成されたものと細胞外から取り込まれたものに由来する。細胞内で合成されるコレステロールは糖や脂肪酸の中間代謝物 Acetyl-CoA から合成され、メバロン酸、スクアレンを経てコレステロールとなる。この一連の反応は小胞体の細胞質側でおこる。一方、コレステロールは細胞外からも取り込まれ、血中コレステロールの運搬体である LDL が細胞膜上にある LDL 受容体と結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に入る。LDL はリソソームで破壊され、コレステロールは細胞質中に取り込まれる。これらのコレステロールは生体膜の構成成分となる。生体膜のコレステロール組成は、核膜、小胞体膜、ミトコンドリア膜で 5 mol%前後と低いのが、ゴルジ膜のトランス側に近づくに従って 15-20 mol %に上昇し、細胞膜では 20-30 mol%になる。更に不思議なことに神経内分泌細胞の分泌顆粒ではコレステロール組成が 45-65 mol%と驚く程高い。

申請者はコレステロール合成経路中間体 (メバロネート、スクアレン) とコレステロール合成阻害剤 (HMG-CoA 還元酵素阻害剤; ラバスタチン) の分泌顆粒形成に与える影響をマウス膵β細胞由来 MIN6 細胞で調べたところ、コレステロール合成経路中間体は顆粒膜コレステロール組成を増強して分泌顆粒数と調節性経路のインスリン分泌を増加すること、一方コレステロール合成阻害剤は顆粒膜コレステロール組成を減弱して顆粒サイズを増大し、インスリンの調節性分泌を破壊すること、を示した (2010 年当時未発表データ)。これらの研究成果に加えて、申請者は SgIII が、Edmunson helical-wheel 解析から α -helix 構造を持つと予想される SgIII 172-186 ドメインで脂質膜成分のコレステロールと結合して、顆粒膜にコレステロールを輸送することを示唆するデータを得ている

(未発表データ)。

2. 研究の目的

申請者は神経内分泌細胞の“ペプチドホルモンが分泌顆粒へ選別されるメカニズム”を解析する過程で、ホルモンを選別し分泌顆粒へ輸送するセクレトグラニン III (SgIII) が高コレステロールである分泌顆粒膜に結合すること、細胞内コレステロール合成を阻害すると顆粒の形態不全が起こること、など顆粒膜コレステロールの重要性に遭遇した。本申請では、分子レベル、細胞レベル、個体レベルでの SgIII 機能の解析を足掛かりに、神経内分泌組織である視床下部、下垂体、膵島での分泌顆粒形成におけるコレステロールの関与を明らかにし、コレステロール代謝とホルモン分泌のクロストークといった高次機能の解明を行う。

3. 研究の方法

本研究では分泌顆粒膜のコレステロールと顆粒タンパク質 SgIII に着目して分泌顆粒形成を解明するために、A) SgIII が顆粒へコレステロール運搬する機構と、B) 細胞レベル、個体レベルでの SgIII 機能の解析、を計画した。

A) SgIII が顆粒へコレステロール運搬する機構

SgIII は SgIII 172-186 ドメインでコレステロールと結合する。そこでコレステロール結合ドメインのコレステロール配位三次構造を NMR (Nuclear Magnetic Resonance) で明らかにする。また SgIII がコレステロールを顆粒へ輸送するか検証する。

B) 細胞レベル、個体レベルでの SgIII 機能の解析

発現抑制細胞と欠損マウスで SgIII の機能を解析する。

4. 研究成果

A) SgIII が顆粒へコレステロール運搬する機構：申請者は SgIII の分泌顆粒膜結合ドメインを SgIII 172-186 まで狭め、この顆粒膜結合ドメインが膜のコレステロールと直接結合することを示している。また連携研究者である山田圭一助教（群馬大学工学部）と SgIII 160-192 のペプチドを化学合成し、Circular Dichroism (CD) Spectra 法で α -helix 構造を持つことを確認した。更に高分解能 NMR 装置を

用いて SgIII 160-192 の 2 次元 NMR 測定 (TOCSY, NOESY) を実施した。現在 NMR データを解析中である。これと並行してコレステロール配位高次構造解析のためのコレステロール含有バイセル (Bicelle) の作成に取り組み、NMR 測定を実施している。また申請者は SgIII 発現抑制細胞を解析中に偶然セクレトグラニン II

(SgII) が膜のコレステロール組成に依存して顆粒に結合することを発見した。顆粒内には SgII のほかプロセッシング酵素である PC1/3 も 7-13 個程度のアミノ酸で形成されるドメインで顆粒膜と結合している。この結合ドメインは SgIII と同様に α -helix 構造を持つことが報告されているが、個々の脂質に対する結合性については記載がない (PNAS, 106, 7408-7413, 09)。そこで SgII、PC1/3 の膜結合ドメインの脂質結合能と NMR による構造解析を進め、SgIII と比較している。

B) 細胞レベル、個体レベルでの SgIII 機能の解析：申請者は本研究で SgIII 発現抑制細胞を解析してトランスゴルジネットワークから分泌顆粒にホルモンを輸送する経路として SgII が関与する経路とは別の経路が存在することを見出した。平成 22-24 年度にわたり SgIII 発現抑制細胞を調べ、ホルモン修飾、電子顕微鏡による微細構造の解析、細胞分画によるオルガネラマーカータンパク質について調べ、SgIII がホルモンを分泌顆粒に運ぶこと、SgII も SgIII 同様ホルモンを輸送する能力を持つこと、を明らかにした。申請者は上記結果をまとめ Traffic 14, 205-218, 2013 に報告した。SgIII を欠損したノックアウトマウス破現在解析中であるが、内分泌臓器でホルモンのプロセッシング（限定切断）が減弱していること、ホルモン分泌に絡む病態を持つこと、を見出している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Tsuchiya, M., Manabe Y., Yamada, K., Furuichi, Y., Hosaka, M., Fujii, N.; Chronic exercise enhances insulin secretion ability of pancreatic islets without change in insulin content in non-diabetic rats. BBRC 430, 676-682, 2013

- 2) Sun, M., Watanabe, T., Bochimoto, H., Sakai, Y., Torii, S., Takeuchi, T., Hosaka, M.; Multiple sorting systems for secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones. *Traffic* 14, 205-218, 2013
- 3) Watanabe, T., Sakai, Y., Koga, D., Bochimoto, H., Hira, Y., Hosaka, M., Ushiki, T.; A unique ball-shaped Golgi apparatus in the rat pituitary gonadotrope: its functional implications in relation to the arrangement of microtubule network. *J. Histochem. Cytochem.* 60, 588-602, 2012
- 4) Yoshihara, T., Yamaguchi, Y., Hosaka, M., Takeuchi, T., Tobita, S.: Ratiometric Molecular Sensor for Monitoring Oxygen Levels in Living Cells. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51, 4148-4151, 2012
- 5) Horiuchi, H., Kameya, T., Hosaka, M., Yoshimura, K., Kyushin, S., Matsumoto, H., Okutsu, T., Takeuchi, T., Hiratsuka, H.: Silylation Enhancement of Photodynamic Activity of Tetraphenylporphyrin Derivative. *J. Photochem. Photobiol.* 221, 98-104, 2011
- 6) Yamaguchi, R., Hosaka, M., Torii, S., Hou, N., Saito, N., Yoshimoto, Y., Imai, H., Takeuchi, T.: Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages. *Brain Res.* 1397, 55-65, 2011
- 7) Saito, N., Takeuchi, T., Kawano, A., Hosaka, M., Hou, N., Torii, S.: Luminal Interaction of Phogrin with Carboxypeptidase E for Effective Targeting to Secretory Granules. *Traffic* 12, 499-506, 2011
- 8) Tsuchiya, M., Hosaka, M., Moriguchi, T., Zhang, S., Suda, M., Yokota-Hashimoto, H., Shinozuka, K., Takeuchi, T. (The first two authors contributed equally to this work.): Cholesterol Biosynthesis Pathway Intermediates and Inhibitors Regulate Glucose-stimulated Insulin Secretion and Secretory Granule Formation in Pancreatic beta-Cells. *Endocrinology* 151, 4705-4716, 2010
- 9) Zhang, S., Hosaka, M., Yoshihara, T., Negishi, K., Iida, Y., Tobita, S., Takeuchi, T. (The first three authors contributed equally to this work.): Phosphorescent Light-emitting Iridium Complexes Serve as a Hypoxia-sensing Probe for Tumor Imaging in Living Animals. *Cancer Research*, 70, 4490-4498, 2010
- 10) Hosaka M., Watanabe T.: Secretogranin III: a bridge between core hormone aggregates and the secretory granule membrane. *Endocrine J.* 57, 275-286, 2010
- [学会発表] (計 8 件)
1. 穂坂 正博, 孫夢, 鳥居征司, 竹内利行, 暮地本宙己, 渡部剛: 内分泌細胞の分泌顆粒形成におけるグラニタンパク質の役割: 第85回日本生化学会大会 (福岡) : 2012年12月
 2. 寺田幹, 吉原利忠, 飛田成史, 穂坂正博: イリジウム錯体で低酸素病態をイメージングする: 第 21 回秋田応用生命科学研究会 (秋田) : 2012年12月
 3. 穂坂正博, 孫夢, 暮地本宙己, 渡部剛: 内分泌細胞の分泌顆粒形成におけるグラニタンパク質の役割: 第 20 回秋田応用生命科学研究会 (秋田) : 2012年6月
 4. 穂坂正博, 寺田幹, 吉原利忠, 竹内利行, 飛田成史: 低酸素病態イメージングプローブの開発: イリジウム錯体による腫瘍のイメージング: 第78回日本生化学会東北支部例会 (山形) : 2012年5月
 5. 暮地本宙己, 甲賀大輔, 穂坂正博, 牛木辰男, 渡部剛: 様々な分泌刺激に対する細胞内膜系小器官の応答の解析: 下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞をモデルとして: 第 117 回日本解剖学会総会 (甲府) : 2012年3月
 6. Tobita, S., Yoshihara, T., Kobayashi, A., Ichikawa, K., Hosaka, M., Takeuchi, T.: Iridium complex probes for monitoring of cellular oxygen levels and imaging of hypoxic tissues: SPIE (San Francisco): 2012年1月

7. 穂坂正博:神経内分泌細胞の分泌顆粒形成機序:第18回秋田応用生命科学研究会(秋田):2011年5月
8. Masahiro Hosaka: Iridium complex, a phosphorescent light-emitting diode material, serves as a novel chemical probe for imaging hypoxic tumor tissues: 2010 World Molecular Imaging Congress (Kyoto): 2010年9月11日

〔図書〕(計2件)

北村忠弘、北川浩史、穂坂正博、小島至著:
第一線の科学者が語る 生活習慣病研究の最前線—メタボ・老化・がん研究から iPS 細胞まで: 上毛新聞社

飛田成史、吉原利忠、穂坂正博、竹内利行:
疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー;
りん光プローブの設計・開発に基づく in vivo
低酸素環境イメージング: 実験医学増刊
Vol. 30 No. 7, 2012年: 羊土社

〔産業財産権〕

○出願状況 (計4件)

名称: 新規化合物およびそれを含む機能性発光プローブ
発明者: 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行
権利者: 国立大学法人群馬大学
種類: 特願
出願番号: 特願 2010-533937
出願日(移行日): 平成 21 年 10 月 16 日 (平成 23 年 4 月 13 日)
国内外の別: 日本

名称: Novel Compound and Functional Luminescent Probe Comprising the Same (新規化合物およびそれを含む機能性発光プローブ)
発明者: 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行
権利者: 国立大学法人群馬大学
種類: 特願
出願番号: 13/124, 166
出願日(移行日): 平成 21 年 10 月 16 日 (平成 23 年 4 月 14 日)
国内外の別: 米国
出願番号: 13/124, 166

名称: Novel Compound and Functional Luminescent Probe Comprising the Same (新規化合物およびそれを含む機能性発光プローブ)

発明者: 飛田成史, 吉原利忠, 穂坂正博, 竹内利行

権利者: 国立大学法人群馬大学

種類: 特願

出願番号: 13/124, 166

出願日(移行日): 平成 21 年 10 月 16 日 (平成 23 年 4 月 21 日)

国内外の別: 欧州 (EPC)

発明者: 堀内宏明、穂坂正博、平塚浩士、竹内利行、久新莊一郎、石田真太郎

権利者: 国立大学法人群馬大学

種類: 特願

特願 2012-531819:

出願番号: 日本移行日: 2013 年 2 月 5 日 (出願日: 2011 年 8 月 24 日)

発明の名称: 含ケイ素置換基を導入した化合物、並びにそれを含む一重項酸素発生剤及び癌治療薬

○取得状況 (計2件)

発明の名称: 新規蛍光化合物およびそれを用いた細胞内コレステロールの検出方法

発明者: 吉原利忠、飛田成史、竹内利行、穂坂正博

権利者: 国立大学法人群馬大学

種類: 特許

番号: 特許第 5229700 号

登録日: 平成 25 年 3 月 29 日

国内外の別: 国内

発明の名称: 含ケイ素蛍光化合物および該化合物を用いた蛍光標識剤

発明者: 篠塚和夫、森口朋尚、竹内利行、穂坂正博

権利者: 国立大学法人群馬大学

種類: 特許

番号: 特許第 4945760 号

登録日: 平成 24 年 3 月 16 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

研究室開設ホームページ：

<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/index.html>

大学運営研究者総覧：

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=270>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

穂坂 正博 (HOSAKA MASAHIRO)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80311603

(2) 研究分担者：該当無し

(3) 連携研究者

渡部 剛 (WATANABE TSUYOSHI)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：80220903

山田 圭一 (YAMADA KEIICHI)

群馬大学・工学研究科・助教

研究者番号：70323334