

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890012

研究課題名(和文) 実験内分泌学的手法を活用した小胞体サブコンパートメント動態制御機構の解明

研究課題名(英文) New approaches to understanding the regulation of ER-subcompartment dynamics by using experimental techniques in endocrinology.

研究代表者

暮地本 宙己(Bochimoto, Hiroki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60632841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：生体における小胞体の挙動を調べるため、本研究ではGnRH誘導体を投与した雄ラットの下垂体前葉性腺刺激ホルモン(LH/FSH)産生細胞の小胞体を解析した。その結果、GnRHアゴニストの酢酸リュープロレリン充填浸透圧ポンプを皮下移植して1日後のLH/FSH産生細胞内に小胞体シャペロンの集積が出現した。同様の変化は異なるGnRHアゴニストであるブセレリンでも観察された。電顕観察により刺激されたLH/FSH産生細胞内に小胞体シャペロンが集積する特異な管状細網構造の出現が認められた。この構造には小胞体関連分解に関わるE3リガーゼHRD1も局在しており、蛋白品質管理に関連した構造である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To examine the morphological and functional characteristics of the ER in vivo, we analyzed the ER changes of male rat pituitary gonadotropes during sustained treatment with various GnRH analogs. In pituitary gonadotropes at 1 day after subcutaneous implantation of osmotic pumps filled with a GnRH agonist, leuprolide acetate, patch-like accumulations of two representative chaperones, calnexin and BiP appeared. Similar changes were observed under the condition of another GnRH agonist, buserelin. Observation at the electron microscopic level could reveal atypical accumulations of the ER chaperones in anomalous clusters of tubuloreticular membranes within the stimulated gonadotrope. In addition to the chaperones, HRD1, an E3 ligase related to ER associated degradation (ERAD), is localized to the ER patches and surrounding membranes in the stimulated gonadotropes. These findings indicate the anomalous ER clusters provide a scaffold for quality control of secretion proteins in gonadotropes.

研究分野：顕微解剖学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：実験内分泌学的手法 電子顕微鏡 小胞体 小胞体サブコンパートメント 小胞体関連分解 内分泌細胞 下垂体前葉 性腺刺激ホルモン産生細胞

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体 (ER) は細胞の種類や機能状態に応じて多様な形態を示す細胞内膜系小器官であり、連続した膜構造の各部位に独立した機能をもつサブコンパートメントが形成されている。蛋白産生・分泌に関わるものでは、①膜上に付着したリボソームで蛋白質が生合成される粗面小胞体 (rough ER: rER) や、②蛋白質を小胞体からゴルジ装置へと送り出す小胞体出芽領域 (ER exit site; ERES)、③異常な蛋白質を細胞質へと送り出しプロテアソームで分解させる領域 (quality control compartment; QCC) がある。各サブコンパートメントが調和して機能を果たす一連の機構を生体条件下で解明することは、小胞体に関連している、糖尿病や神経疾患など様々な疾病の治療法の研究において重要な意義を持っている。

研究代表者は、機能状態が特異的な調節因子で制御される下垂体前葉内分泌細胞、特に黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) という2種類の性腺刺激ホルモンを血中に分泌する性腺刺激ホルモン (LH/FSH) 産生細胞に注目し、その機能を実験内分泌学的に変化させることで、小胞体の微細構造や機能分子局在を生体内で解析できるのではないかと考えた。

哺乳動物のLH/FSH産生細胞のホルモン分泌は、上位中枢である視床下部から分泌されるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) や、標的臓器である性腺から分泌されるアンドロゲンやエストロゲンなどの性ホルモンによる調節を受けている。この液性調節系に作用する薬剤であるGnRH誘導体は、GnRHの構成アミノ酸を部分的に置換した化合物の総称であり、受容体作動性に働くアゴニストと拮抗的な作用を発揮するアンタゴニストがある。特にGnRHアゴニストは生理的リガンドであるGnRHより強力なLH/FSH分泌促進作用を有し、細胞膜上のGnRH受容体と強く結合したまま細胞内

へと移行するため、投与初期に強くLH/FSH放出を促すが、長期的にはLH/FSHの放出と生合成を抑制するという特徴的な作用を有している。研究代表者は、これらのGnRH誘導体のLH/FSH産生細胞に対する直接的作用に注目し、GnRH誘導体をラットに持続投与することで、LH/FSH産生細胞の機能状態に応じて、生体条件下で小胞体の微細構造と機能分子局在の変化を検討できる動物モデル系を構築した。

本研究で研究代表者は、これまで蓄積されてきた小胞体サブコンパートメントの研究を基礎としつつ、上記のGnRH誘導体投与動物モデルの使用することで生体条件下における細胞の機能状態に応じて、小胞体の微細構造や機能分子局在がいかに変化するかという点について、特に形態学的観点から詳細に解析する事を計画した。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では以下の2点を明らかにする事を目的とした。

- (1) GnRH誘導体の持続投与によるLH/FSH産生細胞の機能状態の変化に応じて、小胞体の微細構造がどのように変化するか。
- (2) 小胞体の微細構造の変化に応じて、小胞体サブコンパートメントをはじめとする小胞体関連機能分子の局在はどのように変化するか。

以上の解析で得られる所見から、生体条件下で機能が変化したLH/FSH産生細胞における、小胞体の詳細な挙動を解明したいと考えた。

## 3. 研究の方法

- (1) GnRH誘導体持続投与ラットモデル作成  
8週齢のWister系雄ラット (体重: 200-250g) を用いて、①酢酸リユープロレリン (Sigma Aldrich, 15  $\mu$ g/day) を充填した浸透圧ポンプ (ALZET mini-osmotic pump model 2001、以下同型を使用) の背部皮下への包埋、②GnRHアゴニストである酢酸ブセレリン (Sigma Aldrich, 15  $\mu$ g/day)

を充填した浸透圧ポンプの背部皮下への包埋、③GnRHアンタゴニストであるアンチド (Sigma Aldrich, 7  $\mu$ g/day) を充填した浸透圧ポンプの背部皮下への包埋、の各処置を施した3実験群を作成し、時系列毎に解析に用いた。

## (2) 形態学的解析

### ①標本の作製

光顕免疫組織化学用の組織標本は4% パラフォルムアルデヒド (PFA) と4% スクロースを含む0.1M リン酸緩衝液 (PB, pH7.4) で上記ラット実験群を灌流固定して作成した。灌流固定した動物から切り出した下垂体前葉組織の一部はエタノール系列で脱水し、プロピレンオキサイドを仲介剤としてEpon812樹脂を浸透させた後、24時間、60°Cの条件で重合し包埋した。また残りの組織はO.C.T compoundに包埋した。

微細構造解析のための透過電顕観察用標本は2% グルタルアルデヒド (GA) と2% PFAを含む0.1M PBで上記ラット実験群を灌流固定して作成した。切り出した下垂体前葉組織は1% 四酸化オスミウム (OsO<sub>4</sub>) を含む0.1M PB溶液で2時間、4°Cで後固定した後、前述の方法でEpon812樹脂に包埋した。

機能分子局在解析のための透過電顕観察用標本は0.5% GAと0.5% PFAを含む0.1M PBで上記ラット実験群を灌流固定して作成した。切り出した下垂体前葉組織は速やかに0.5% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液で1時間、4°Cで後固定した後、1% 燐タンゲステン酸を含む70% エタノールで20分×3、4°Cで脱水した後、L.R. White樹脂を浸透させ、24時間、60°Cの条件で重合し包埋した。

走査電顕観察のための組織標本は0.5% GAと0.5% PFAを含む0.1M PBで上記ラット実験群を灌流固定して作成した。切り出

した下垂体前葉組織は速やかに1% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液で2時間、4°Cで後固定した後、25%および50% DMSO溶液に30分ずつ浸漬して氷晶防止処理を行った。氷晶防止処理した試料を液体窒素中で凍結切断した後、0.1M PBで良く洗浄し、0.1% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液に移動して点灯した蛍光灯下で72時間、20°Cで浸軟処理を施した。浸軟後の試料を1% OsO<sub>4</sub>を含む0.1M PB溶液で1時間、4°Cで再固定後に0.1M PBで良く洗浄し、1% タンニン酸 - 1% OsO<sub>4</sub>による導電染色を施した。導電染色後の試料はエタノール系および酢酸イソペンチルで脱水した後、臨界点乾燥機 (HCP-2、日立) を用いて臨界点乾燥した。

### ②光顕免疫組織化学

Epon包埋下垂体標本から作成し、Sodium Methoxide処理で樹脂を除去した0.5  $\mu$ 厚の切片あるいはO.C.T compound包埋下垂体標本から作成した15  $\mu$ 厚の切片を用いて、多重蛍光抗体法によりLHおよび小胞体関連機能分子を標識した。脱樹脂した切片は1.5% 正常ウマ血清による非特異的吸着のブロッキング後に一次抗体を12時間、20°Cで結合させ、緩衝液 (0.5M NaCl - 0.01M PB) で洗浄し、さらに一次抗体の動物種に対応したAlexa Fluor 633, 594, 488標識IgG抗体を3時間、20°Cで結合させる事で抗原局在部位を可視化した。蛍光標識された切片は0.1% p-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Co.) を含む90% グリセロール溶液で封入後、レーザー共焦点顕微鏡 (FV-1000、オリンパス) で観察、記録した。

### ③電顕免疫組織化学

EponおよびL.R. White包埋下垂体標本から90-100nm厚の超薄切片を作製し、5% 正常ウマ血清による非特異的吸着のブロ

ッキング後に一次抗体を12時間、20°Cで結合させ、緩衝液(0.1% BSA含有0.5M NaCl - 0.02M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.2)で良く洗浄し、一次抗体の動物種に対応した金コロイド標識IgG抗体(金コロイド径5-15nm)を1時間、20°Cで結合させる事で抗原局在部位を可視化した。金コロイド標識した切片は電子染色後、透過型電子顕微鏡(H-7650、日立)を用いて観察、記録した。

#### ④走査電顕観察

オスミウム浸軟試料をアルミニウム台にマウントした後、イオンスパッター(E1010、日立)で白金パナジウムコーティングを施して、走査型電子顕微鏡(H-4100、日立)を用いて観察した。

#### (3) 血漿LH濃度測定

上記ラット実験群の腹大動脈からヘパリン処理した注射筒を用いて血液を採取し、遠心分離して血漿とした。血漿中のLH濃度を、市販のEIAキット(Endocrine Technologies)を用いて測定し、1元配置分散分析法およびT検定を用いて統計学的有意性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 酢酸リュープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞における小胞体の変化

酢酸リュープロレリン持続投与群の下垂体前葉LH/FSH産生細胞における、小胞体シャペロンのCalnexin(CNX、小胞体マーカーとして使用)の局在を光顕免疫組織化学で経時的に検討したところ、持続投与1日後に対照群では見られないCNXの集積が出現した。この時期のLH/FSH産生細胞を走査電子顕微鏡で観察すると、膜が高度に集積した細網構造をとる特殊な小胞体(ER patch)が細胞内に出現した。

#### (2) GnRHアゴニスト及びアンタゴニスト持続投与後初期の血中LH濃度およびLH/FSH産生細胞におけるER patchの形成

分子構造の異なるGnRHアゴニストである酢酸リュープロレリンあるいは酢酸ブセレリン、またはGnRHアンタゴニストであるアンチドを持続投与後に血中LH濃度を測定したところ、酢酸リュープロレリンおよび酢酸ブセレリン投与群では対照群と比較して有意なLH濃度の上昇が認められたが、アンチド投与群では見られなかった。各実験群で処置1日後のLH/FSH産生細胞におけるCNXの局在を光顕免疫組織化学で検討すると、酢酸リュープロレリンおよび酢酸ブセレリン投与群でCNXおよびBiPの集積が出現したのに対し、アンチド投与群では出現しなかった。さらに電顕観察により酢酸リュープロレリンおよび酢酸ブセレリン投与群でのみLH/FSH産生細胞にER patchの出現が確認され、LH/FSH産生細胞に出現するER patchはGnRHアゴニストの刺激に反応して生じることが示唆された。

#### (3) 酢酸リュープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞における小胞体シャペロンの局在

CNXの小胞体シャペロンとしての機能的側面に注目し、酢酸リュープロレリン持続投与1日後のLH/FSH産生細胞に出現するCNXの集積と、他の小胞体シャペロン分子の局在の相関性について光顕免疫組織化学を用いて検討した。対照群においてはCNXとKDEL、BiPおよびPDIは殆ど一致した局在を示さないが、実験群ではKDEL配列を持つ蛋白全体がCNXの集積部位に集積し、個別のシャペロンについても、BiPやPDIはCNXの集積部位に一致して集積する傾向を示した。上記から、GnRHアゴニストの刺激を受けてLH/FSH産生細胞内に出現するER patchには小胞体シャペロンが特異的に集積することが示唆された。

#### (4) 酢酸リュープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞における小胞体サブコンパートメント関連機能分子の局在

酢酸リユープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞に出現するCNXの集積に対する、各小胞体サブコンパートメント関連機能分子の局在の相関性について光顕免疫組織化学を用いて検討した。酢酸リユープロレリン投与1日後のLH/FSH産生細胞では、ERGIC53 (ERESマーカーとして使用) やRRBP1 (rERマーカーとして使用) はCNXの集積部とは異なる局在を示したのに対し、HRD1 (QCCマーカーとして使用) はCNXの集積部位に一致して非常に強く集積し、酢酸リユープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞にQCCに関わる機能分子が集積した特殊な小胞体構造が形成されていることが示唆された。

#### (5) 酢酸リユープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞におけるERAD関連機能分子の局在

HRD1は不良品蛋白質のユビキチン化を行うE3 ligaseであり小胞体関連分解(ERAD)に関わる機能分子である。ERADの機構はHRD1の他、Derlin1など不良品蛋白質を小胞体から細胞質へと逆輸送するためのレトロトランスロコンやBap31などの機能分子が関わっている。酢酸リユープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞内に出現するCNXの集積と一致してHRD1が集積したことから、ERADに関わる他の機能分子の局在を光顕及び電顕免疫組織化学を用いて検討したところ、酢酸リユープロレリン持続投与後初期のLH/FSH産生細胞では、Derlin1およびBap31はHRD1と同様にCNXの集積に一致して強く集積し、電顕レベルでもER patchに、BiPやCNXとともにHRD1が集積する局在傾向が確認された。

(1) - (5) から、GnRHアゴニストによる受容体刺激の結果、LHが枯渇したLH/FSH産生細胞では、LHの生合成が過度に促進され、不適切な三次構造をとる不良品蛋白質の量が増加

した結果、その処理を担う小胞体シャペロンやERADに関係する機能分子が集積したER patchを形成する可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕 (計6件)

- ① Bochimoto H, Koga D, Sakai Y, Hira Y, Hosaka M, Ushiki T, Watanabe T. **Sustained treatment with a GnRH agonist (leuprorelin) affects the ultrastructural characteristics of endomembranous organelles in male rat pituitary gonadotropes.** Archives of Histology and Cytology. International Society of Histology and Cytology. 査読あり. in press.
- ② Watanabe T, Bochimoto H, Koga D, Hosaka M, Ushiki T. **Functional Implications of the Golgi and Microtubular Network in Gonadotropes.** Molecular and Cellular Endocrinology. 査読あり. vol. 385(1-2), 2014, pp88-96. doi: 10.1016/j.mce.2013.10.003.
- ③ Asanome A, Matsuki M, Kabara M, Hira Y, Aonuma T, Bochimoto H, Yamauchi A, Takehara N, Watanabe T, Hasebe N, Kawabe J. **Nerve growth factor stimulates regeneration of the perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読あり. vol. 443(1), 2014 pp150-155. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.070.
- ④ Ma, Y., Semba, S., Khan, MRI., Bochimoto, H., Watanabe, T., Fujiya, M., Kohgo, Y., Liu, Y., & Taniguchi, T. **Focal Adhesion Kinase Regulates Intestinal Epithelial Barrier Function via Redistribution of Tight Junction.**

BBA - Molecular Basis of Disease. 査読あり. vol.1832(1), 2013, pp151-159. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.10.006.

⑤Sun 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. 査読あり. vol.14(2), 2013, pp205-218. doi: 10.1111/tra.12029.

⑥Nomura T, Bando Y, Bochimoto H, Koga D, Watanabe T, Yoshida S. (First three authors equally contributed in this work.) **Three-dimensional ultra-structures of myelin and the axons in the spinal cord: application of SEM with the osmium maceration method to the central nervous system in two mouse models.** Neuroscience Research. 査読あり. vol.75(3), 2013, pp190-197. doi: 10.1016/j.neures.2013.01.009.

〔学会発表〕 (計7件)

①暮地本宙己、赤木康司、渡部 剛「プロピルチオウラシル投与後のラット下垂体前葉甲状腺刺激ホルモン産生細胞における細胞内膜系小器官の変化」、『第58回解剖学会東北・北海道連合支部学術集会』、No21、山形、2012年9月

②暮地本宙己、甲賀大輔、穂坂正博、牛木辰男、渡部 剛「GnRHレセプター刺激を受けたラット下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞に出現する粗面小胞体の変化」、『第118回日本解剖学会総会・全国学術集会』、2P-G059、高松、2013年3月

③暮地本宙己、穂坂正博、板東良雄、甲賀大輔、平義樹、牛木辰男、渡部 剛「GnRHレセプター下流のシグナル伝達がラット下垂体前葉LH/FSH産生細胞の粗面小胞体

に与える影響」、『日本下垂体研究会 第28回学術集会』、No. 18、花巻、2013年8月

④暮地本宙己、穂坂 正博、板東 良雄、甲賀 大輔、平 義樹、牛木 辰男、渡部 剛「GnRHアゴニスト持続投与開始直後に生じるラット下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞(LH/FSH細胞)の内膜系小器官の経時的変化」、『第59回解剖学会東北・北海道連合支部学術集会』、No33、札幌、2013年9月

⑤暮地本宙己、石原洋、平義樹、渡部剛「GnRHアゴニストを持続投与したラット下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞における小胞体の変化」、『平成25年度公益社団法人日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会』一般講演1-3、旭川、2013年12月

⑥暮地本宙己、穂坂正博、板東良雄、甲賀大輔、平義樹、牛木辰男、渡部 剛「ラット下垂体前葉LH/FSH産生細胞にGnRH受容体刺激が加わると蛋白質質管理に関連する機能分子が集積したER patchが出現する」、『第119回日本解剖学会総会・全国学術集会』、3P-090、栃木、2014年3月

⑦暮地本宙己、阪井 裕子、甲賀 大輔、平 義樹、渡部 剛「LR White樹脂を包埋に用いた免疫電顕法による細胞内小器官の研究」、『日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会シンポジウム・各種免疫電顕法のライフサイエンス研究への利用』、13pmG\_SB5-03、幕張、2014年5月

〔その他〕

研究代表者ホームページ

<http://researchmap.jp/bochimoto/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

暮地本 宙己 (BOCHIMOTO, Hiroki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60632841