

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440052

研究課題名(和文) 神経内分泌細胞の高コレステロール組成分泌顆粒膜に結合するタンパク質を探索する

研究課題名(英文) Study for protein binding to the cholesterol-rich secretory granule membrane in neuroendocrine cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は内分泌細胞の“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。本研究では、高コレステロール組成の顆粒膜に結合して顆粒の形成・維持に係るタンパク質群を、顆粒の外側(細胞質側)からは「生体膜変形活性」をもつタンパク質に着目して、顆粒の内側からはセクレトグラニンとプロセッシング酵素(プロホルモン修飾酵素)に焦点を当て、分泌顆粒が形成・維持される機構の解明を目指した。

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). In this study, we evaluated the role of cholesterol binding protein, especially on SgIII, in SG sorting. In the SgIII-knockout mice, plasma ACTH was considerably impaired under highly stress condition. Similarly, plasma glucose level in the SgIII-knockout mice under highly stress condition were highly elevated at glucose tolerance test. These data indicated SgIII works as sorting receptor in living animals. Biochemical protein screening for binding to cholesterol at the SGM indicated that several candidate proteins, including granins and processing enzyme, bound directly to the SGM in a cholesterol-dependent manner.

研究分野：生化学

キーワード：分泌顆粒 コレステロール グラニンタンパク質

1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモンや神経ペプチドは、神経内分泌細胞の粗面小胞体で合成された後、ゴルジ装置を経て、その出口に位置するトランスゴルジネットワーク (TGN) で分泌顆粒に選別輸送され、細胞外刺激に応じて分泌される (調節性分泌経路)。一方、外部刺激による調節を受けない分泌様式を構成性分泌と呼び、成長因子、膜蛋白質、アルブミン等の血清蛋白質はこの経路によって分泌される。神経内分泌細胞の分泌顆粒 (直径 200-300 nm) にはペプチドホルモン、グラニタンパク質群、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。我々は、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., MBC 13: 3388-99, 2002; Hosaka et al., JBC 279, 3627-3634, 2004; Hosaka et al., JCS 118, 4785-4795, 2005; Hosaka & Watanabe, Endocrine J. 57, 275-286, 2010; Hotta et al., J Endocrinol. 202, 111-121, 2009; Han et al., Mol. Endocrinol. 22, 1935-1949, 2008; Takeuchi & Hosaka; Curr. Diabetes Rev. 4, 31-38, 2008; 発表論文 7)。

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, 1997; JBC 275, 29887-29893, 2000; Biochemistry 42, 10445-10455, 2003; Biochemistry 43, 7798-7807, 2004)、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, 2000)、などが報告されている。また申請者は、マウス膵 β 細胞由来 MIN6 でコレステロール合成経路中間体が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 (直径 400-700 nm)、インスリンの調節性分泌を破壊することを報告した (Tsuchiya et al., Endocrinology. 151, 4705-4716, 2010)。

細胞オルガネラ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、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 (図 2: 申請者業績 Wang et al., BBA 1761, 1169-1181, 2006)。

これまで真核生物における細胞内オルガネラの膜形成機構については多くの研究が行われてきているが、その形成機構は非常に複雑であり未解明の部分が多く残されている。最近、生体膜変形活性を持つ

BAR (Bin-amphiphysin-RSV167) ドメインを持つタンパク質群が見出され、オルガネラの形状制御機構が注目されている (BBA 1761, 897-912, 2006)。 α -helix 構造を持つ BAR ドメインの束はバナナ型の立体構造を持ち脂質膜結合面のカーブに結合し、オルガネラの形態を保っている。現在、BAR ドメインを持つファミリータンパク質は 74 種類知られ、細胞内オルガネラの形態維持に係り、また細胞質タンパク質と結合して細胞内物質輸送を始めとする代謝機能に係っていることが報告され始めている。分泌顆粒でも BAR ドメインファミリータンパク質 arfaptin が TGN から出芽する顆粒の fission (分断) に係っていると報告されたが (Developmental Cell 23, 1-13, 2012)、顆粒形態を保つ BAR ドメインタンパク質については未だその実体が不明である。

2. 研究の目的

前述した研究成果に加えて、申請者は、SgIII ノックアウト細胞で TGN が直径 700-1200 nm の液胞様に変形すること (発表論文 7)、グラニタンパク質のセクレトグラニン II (SgII) が、高コレステロール組成の顆粒膜に結合すること (発表論文 7)、SgIII が、 α -helix 構造を持つ SgIII 172-186 ドメインでコレステロールと結合すること (未発表データ)、から分泌顆粒内の膜結合タンパク質が小胞体近傍からコレステロールを TGN に輸送して、将来、顆粒膜になるドメインが形成されると考えている。更に細胞質側でも顆粒膜の高コレステロール組成を目印に膜へ結合して顆粒形成・維持と細胞外からの刺激に反応するタンパク質群が集積すると推測している。そこで本研究では、高コレステロール組成の顆粒膜に結合するタンパク質群を顆粒内側と外側から網羅的に解析して顆粒形成に関与するタンパク質群を見出し、顆粒形成のメカニズムを明らかにすることを目的としている。特に本申請では研究期間内に、顆粒外タンパク質として BAR ドメインタンパク質、顆粒内タンパク質としてセクレトグラニンとプロセシング酵素に焦点を当て、(1) 分泌顆粒形成・維持に係る BAR ドメインタンパク質の発見と、(2) セクレトグラニンとプロセシング酵素が顆粒へコレステロール運搬する機能を解明する、を行う。これらの研究で高コレステロール組成の顆粒膜を介した顆粒内側と外側タンパク質の実体を明ら

かにする。

3. 研究の方法

本研究では、高コレステロール組成の分泌顆粒膜を基盤とした顆粒形成のメカニズムを明らかにするために、生体膜変形活性を持つBAR タンパク質の遺伝子探索とタンパク質精製の両面からその実体を明らかにする(1)分泌顆粒形成・維持に係るBARドメインタンパク質の発見と、コレステロール結合ドメインの構造解析を中心とした(2)セクレトグラニンとプロセシング酵素が顆粒へコレステロール運搬する機能を解明する、を遂行した。

4. 研究成果

(1)分泌顆粒形成・維持に係るBARドメインタンパク質の発見；

内分泌細胞 (AtT-20 細胞、MIN6 細胞)、もしくは内分泌組織から細胞抽出液および分泌顆粒膜画分) を作製し、分泌顆粒膜タイプの高コレステロール組成リポソームと結合するタンパク質の解析を行った。結果として既存のBARタンパク質群を含む候補を得た。次に上記の候補タンパク質群に対して膜変性活性を調べ、特に高コレステロール膜に結合能が高くまた膜変性能を持つタンパク質に対して抗体を作製し顆粒局在などの解析を顕微鏡レベルで続けている。

(2)セクレトグラニンとプロセシング酵素が顆粒へコレステロール運搬する機能を解明する；

発表論文7の結果からSgIIIは細胞レベルでホルモンを分泌顆粒に輸送し、また高コレステロール組成を持つ顆粒膜形態維持に関与していた。そこで欠損細胞の顆粒膜コレステロール含量を調べたところ、顆粒膜のコレステロール含量が野生株に比較し10mol%程度減少していた。さらにSgIIIを欠損するマウスを作製し、SgIIIが顆粒形成に果たす役割を動物レベルで解析している。SgIII欠損マウスは、定常飼育では野生型マウスと比較して大きな違いを示さないが、ストレス条件下でACTHの血中濃度が低い(図1)、高脂肪食負荷で血糖値に異常を呈すること(図2)、などを明らかにした(論文投稿中)。またストレス飼育下のSgIIIマウスで、電子顕微鏡下での顆粒形態、と精製顆粒膜のコレステロール含量を測定している。SgIIIのコレステロール結合領域のNMR解析は終了している。

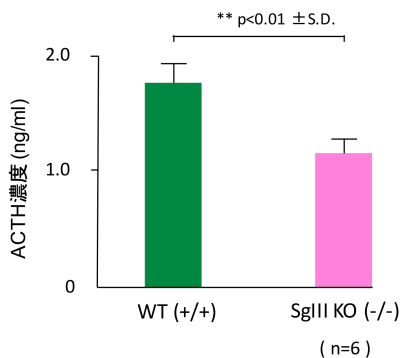
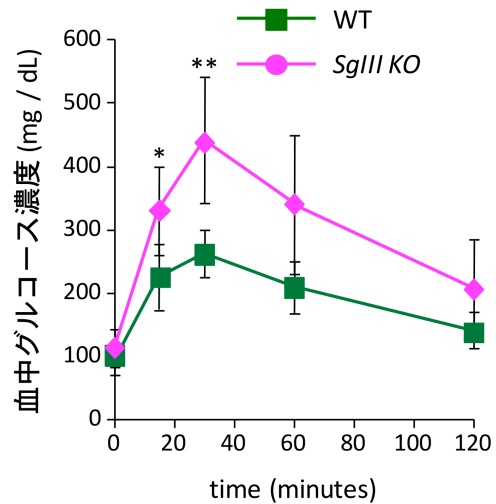


図1. 血漿中のACTH濃度：SgIII KOマウスの血中ACTH量は、野生型マウスと比較して低い。



* $p < 0.01$, ** $p < 0.001 \pm S.D.$ (n=9)

図2. 耐糖能の比較して低い；SgIIIノックアウトマウスは、グルコース投与後の血糖値が高く、耐糖能に異常がみられた。SgIIIノックアウトマウスで、インスリン合成が減弱している可能性が示唆された。

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9件)

- ① Nakazawa N., Sato A., Hosaka M.; TORC1 activity is partially reduced under nitrogen starvation conditions in sake yeast *Kyokai no. 7, Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci. Bioeng. 査読有, 121, 247-252, 2016 doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.07.002.
- ② Gomi, H., Morikawa, S., Shinmura, N., Moki, H., Yasui, T., Tsukise, A., Torii, S., Watanabe, T., Maeda, Y., Hosaka, M.; Expression of secretogranin III in chicken endocrine cells: its relevance to the secretory granule properties of peptide prohormone processing and bioactive amine content. J. Histochem. Cytochem., 査読有, 63, 350-3566, 2015 doi: 10.1369/0022155415575032.
- ③ Yoshihara, T., Hosaka, M., Terata, M., Ichikawa, K., Murayama, S., Tanaka, A., Mori, M., Itabashi, H., Takeuchi, K., Tobita, S.; Intracellular and in vivo oxygen sensing using phosphorescent Ir(III) complexes with a modified acetylacetonato ligand. Anal.Chem., 査読有, 87, 2710-2717, 2015 doi: 10.1021/ac5040067
- ④ Yoshihara, T., Murayama, S., Masuda, T., Kikuchi, T., Yoshida, K., Hosaka,

- M., Tobita, S.; Mitochondria-targeted oxygen probes based on cationic iridium complexes with a 5-amino-1, 10-phenanthroline ligand. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 査読有, 299, 172-182, 2015 doi:10.1016/j.jphotochem.2014.11.004
- ⑤ Horiuchi, H., Hosaka, M., Mashio, H., Terata, M., Ishida, S., Kyusin, S., Okutsu, T., Takeuchi, T., Hiratsuka, H.; Silylation Improves the Photodynamic Activity of Tetraphenylporphyrin Derivatives In Vitro and In Vivo. *Chemistry*, 査読有, 20, 6054-6060, 2014 doi: 10.1002/chem.201303120.
- ⑥ Watanabe, T., Bochimoto, H., Koga, D., Hosaka, M., Ushiki, T.; Functional Implications of the Golgi and Microtubular Network in Gonadotropes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 査読有, 385, 88-96, 2014 doi: 10.1016/j.mce.2013.10.003.
- ⑦ 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*, 査読有, 14, 205-218, 2013 doi: 10.1111/tra.12029.
- ⑧ 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*, 査読有, 430, 676-682, 2013 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.092.
- ⑨ Sato, S., Morita, S., Iha, M., Mori, Y., Sugawara, S., Kasuga, K., Kojima, I., Ozaki, N., Muraguchi, H., Okano, K., Iwashita, J., Murata, J., Hosaka, M., Kobayashi, M.; Intact structure of EGAM1 homeoproteins and basic amino acid residues in the common homeodomain of EGAM1 and EGAM1C contribute to their nuclear localization in mouse embryonic stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 116, 141-146, 2013 doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.007.
- [学会発表] (計 1 1 件)
- ① 前田佳紀、工藤咲希、暮地本宙己、村田知里、鳥居征司、渡部剛、穂坂正博; セクレトグラニン III が膵島インスリン生合成と分泌で果たす役割について; 第 88 回生化学会; 2015 年 12 月 2 日; 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ② 佐藤瑛理、前田佳紀、暮地本宙己、渡部剛、穂坂正博; 脳下垂体内分泌細胞の低酸素環境における ACTH 分泌について; 第 88 回生化学会; 2015 年 12 月 2 日; 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ③ 前田佳紀、工藤咲希、暮地本宙己、村田知里、鳥居征司、渡部剛、穂坂正博; セクレトグラニン III が生体のインスリン生合成と分泌で果たす役割; 第 81 回生化学会東北支部例会; 2015 年 5 月 9 日; 東北大学片平 さくらホール (宮城県仙台市)
- ④ 佐藤瑛理、前田佳紀、暮地本宙己、渡部剛、穂坂正博; 脳下垂体内分泌細胞の低酸素環境におけるホルモン分泌の解析; 第 81 回生化学会東北支部例会; 2015 年 5 月 9 日; 東北大学片平 さくらホール (宮城県仙台市)
- ⑤ 前田佳紀、暮地本宙己、村田知里、鳥居征司、渡部剛、穂坂正博; 神経内分泌細胞の分泌顆粒に局在するセクレトグラニン III の生体で果たす役割; 第 87 回生化学会; 2014 年 10 月 16 日; 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- 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; GnRH アゴニスト持続投与によりラット LH/FSH 産生細胞で生じる LH 分泌・産生機能の変化; 日本解剖学会第 60 回東北・北海道連合支部学術集会; 2014 年 9 月 6 日; 福島学院大学福島駅前キャンパス (福島県福島市)
- ⑦ Masahiro Hosaka; Golgi Apparatus Structures and Function: Sorting Mechanisms of Prohormones from the Trans-Golgi Network to Secretory Granules: Concepts with Granin-Family Protein. *Gordon Research Conferences*, July 23, 2014, New London, U.S.A. (海外招待講演)
- ⑧ 前田佳紀、暮地本宙己、渡部剛、穂坂正博; 内分泌細胞の分泌顆粒に局在するセクレトグラニン III の役割; 第 80 回生化学会東北支部例会; 2014 年 5 月 10 日; アキタパークホテル (秋田県秋田市)
- ⑨ 穂坂正博、暮地本宙己、渡部剛; 分泌顆粒形成でセクレトグラニン III が果たす役割; 第 28 回日本下垂体研究会; 2013 年 8 月 8 日; ホテル千秋閣; (岩手県花巻市)
- ⑩ Hosaka M., Bochimoto H., Watanabe T.; Multiple sorting systems for the secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones in endocrine cells: 第 65 回日本細胞生物学会; 2013 年 6 月 20 日; ウィンクあいち (愛知県産業労働センター: 愛知県名古屋市)
- ⑪ 穂坂正博、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ン

タンパク質の役割：第 79 回日本生化学会東北支部例会；2013 年 5 月 11 日；東北大学片平 さくらホール（宮城県仙台市）

〔図書〕（計 0 件）
該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）
名称：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）
診断薬
発明者：穂坂正博，畠恵司，樋渡一之，佐々木玲，高橋純一郎
権利者：公立大学法人 秋田県立大学
種類：特許
番号：特願 2016-003717
出願年月日：2016 年 1 月 12 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 5 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：特許
番号：特許第 5500594 号
取得年月日：2014 年 3 月 20 日
国内外の別：国内

名称：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：米国登録
番号：US8623239
取得年月日：2014 年 1 月 7 日
国内外の別：国外

名称：新規水溶性イリジウム錯体化合物およびそれをを用いた酸素濃度測定試薬
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：特許
番号：特許第 5392746 号
取得年月日：2013 年 10 月 25 日
国内外の別：国内

名称：新規錯体化合物、並びにそれをを用いた酸素濃度測定試薬および癌の診断薬
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：特許
番号：特許第 5229700 号
取得年月日：2013 年 9 月 6 日

国内外の別：国内

名称：新規蛍光化合物、およびそれをを用いた細胞内コレステロールの検出法
発明者：山田圭一、穂坂正博、吉原利忠、飛田成史、片貝良一、竹内利行
権利者：国立大学法人 群馬大学
種類：特許
番号：第 5240704 号
取得年月日：2013 年 4 月 12 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
穂坂 正博 (Masahiro Hosaka)
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
該当なし

(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

暮地本 宙己 (Bochimoto, Hiroki)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：60632841

山田 圭一 (YAMADA, Keiichi)
群馬大学・工学研究院・助教
研究者番号：70323334