

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 4 月 30 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間 2010~2012

課題番号：22590185

研究課題名（和文）下垂体前葉の内分泌細胞の特性を活用したゴルジ装置の構築維持機構の解析

研究課題名（英文）Characteristics in the overall organization and dynamics of the Golgi apparatus in the anterior pituitary endocrine cells.

研究代表者

渡部 剛 (WATANABE TSUYOSHI)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：80220903

研究成果の概要（和文）：本研究では下垂体前葉の内分泌細胞におけるゴルジ装置と微小管の大局的構築を免疫組織化学および電子顕微鏡観察により解析し、典型的な内分泌細胞である性腺刺激ホルモン産生細胞では、ゴルジ装置が球状で微小管はその内側に位置する中心小体から等方性に細胞周辺部に伸びることを明らかにした。この空間対称性の高いゴルジ装置と微小管の構築は内分泌細胞の細胞極性の乏しさを反映しているものと思われた。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated highly symmetrical organization of the Golgi apparatus and microtubule network in the pituitary gonadotropes by immunocytochemistry and electron microscopy. These findings possibly reflect the poor polarity of the endocrine cells and are well consistent with the contextual usage of the microtubule-dependent motors that maintain the organization of the Golgi apparatus.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：顕微解剖学、細胞生物学

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：ゴルジ装置、下垂体前葉、性腺刺激ホルモン産生細胞、微小管、中心小体、細胞極性、免疫組織化学、電子顕微鏡観察

1. 研究開始当初の背景

細胞外へ分泌される蛋白は一般的に粗面小胞体上のリボソームで合成された後、すぐに小胞体内腔側に移行し、以降、細胞内小胞輸送でゴルジ装置を経て細胞表面で開口放出される。ペプチド性の内分泌細胞など多量の分泌蛋白を生合成・放出する細胞では、この粗面小胞体からゴルジ装置までの細胞内膜系小器官が良く発達し、さらに、ホルモンを選択的に貯留する分泌顆粒という小器官が形成され、必要量の生理活性物質を適切なタイミングで血中に供給する上で重要な役割を担っている。

この一連の細胞内膜系小器官のうち、その

中心に位置するゴルジ装置の構造の秩序は、ゴルジ槽の成熟と細胞内小胞輸送の両者によって動的に維持されており、細胞全体の極性や微小管構築と深く関係している (Allan et al. (2002). Nat Cell Biol 4: E236-42)。現在に至るまで広く受け入れられている仮説モデルでは、粗面小胞体由来する管状・小胞状の膜がゴルジ装置 cis 側で融合して槽を形成し、これが順次 trans 側に向かって移行する過程で内腔の分泌蛋白やリソソーム酵素が糖転移酵素などによる修飾を受ける (cisternal maturation/progression model)。一方、ゴルジ装置に留まるべき糖転移酵素などは逆行性の膜輸送系で槽の進行とは逆方

向に運ばれ、ゴルジ装置の構築及び機能上の秩序は保たれている (Storrie (2005) Int Rev Cytol 244: 69-94)。ただし、この仮説モデルは培養細胞実験系で得られた知見をもとに過度に単純化されている可能性があり、動物個体中で多様に分化した個々の細胞にどこまで適用できるかについては不明な点も多い。加えて、本研究開始時点まで当該分野で主たる研究材料とされてきた培養細胞では、細胞分裂の度にゴルジ装置の断片化~再構成が繰り返されるため、完全に分化・成熟し生理的機能を営むゴルジ装置での現象を反映していない可能性があった。

そこで、このような学術的背景を踏まえて、これまで主として培養細胞実験系の知見から導かれたゴルジ装置の構築原理やその秩序維持機構に関する仮説モデルの生理的妥当性を、動物個体中で機能的に良く分化・成熟した内分泌細胞の特性を活かし、実験内分泌学的アプローチによる解析で補完することによって検証してみようと本研究課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

上述した研究の背景を踏まえ、本研究計画では、具体的に次の3点を明らかにすることを目標とした。

- (1) まず、これまで、あまり注目されていなかったペプチド性内分泌細胞のゴルジ装置の構築や微細構造を免疫組織化学や電顕観察を駆使して詳細に検討し、その特徴と多様性を明らかにする。
- (2) 次に、外科的手技や薬剤投与によって下垂体前葉の特定の内分泌細胞におけるペプチドホルモン合成を人為的に促進（あるいは抑制）し、その結果生じるゴルジ装置の構築・微細構造や分子局在の経時的变化を細胞間で比較・検討することで、内分泌学的な機能状態に応じてゴルジ装置の構築・微細構造にどのような変化が生じるか、明らかにする。
- (3) さらに、分泌顆粒形成や細胞内小胞輸送を阻害した場合にゴルジ装置の構築・微細構造がどのような影響を受けるか、内分泌細胞由来の培養細胞で siRNA を用いてグラニン蛋白をノックダウンしたり、ラットへ微小管重合阻害剤を投与して起こるゴルジ装置の構築・微細構造変化を解析することで、明らかにする。

以上の解析で得られる所見を総合して、これまで不明であった動物個体中の内分泌細胞のゴルジ装置の構築の特徴と多様性を明らかにし、内分泌顆粒形成という特殊な役割を担うゴルジ装置の機能・構造の秩序維持機構に関して、より生理的意義のある仮説モデルを構築したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) 形態学的解析法

① 下垂体前葉組織の包埋標本の作成

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と4%スクロースを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で無処置対照群ラット(ウイスター系雄ラット、8-12週齢)および次項で記述する実験内分泌学的処置を施したラット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組織の半分は、常法に従い氷晶防止処理を施した後、OCTコンパウンド中で凍結させ包埋した(凍結切片作成用標本)。また、固定した下垂体組織の残りの半分は、常法に従い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、樹脂を重合(24時間、60°C)させ包埋した(連続準超薄切片による解析用標本)。

微細構造の解析を目的とした電顕観察用組織標本は、2% グルタルアルデヒドと2% パラフォルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で上記ラットを灌流固定して作製した。灌流固定した動物から切り出した下垂体組織は、1%OsO₄溶液で後固定(2時間、4°C)した後、常法に従い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、樹脂を重合(24時間、60°C)させ包埋した。

また、電顕免疫組織化学用の組織標本は、0.5%グルタルアルデヒド、0.5%パラフォルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で上記ラットを灌流固定して作製した。灌流固定した動物から切り出した下垂体組織は速やかに細切し、さらに0.5%OsO₄を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で浸漬固定(1時間、4°C)した。固定された下垂体組織は、1%隣タングステン酸を含む70%エタノールで脱水(20分 x 3回、4°C)した後、L.R.white樹脂を浸透・重合(24時間、60°C)させ包埋した。

② 免疫組織化学標識

抗体:ゴルジ装置のcis側、trans側の指標としたGM130およびTGN38に対する抗体、粗面小胞体の指標であるBiPに対する抗体、クラスリン/API被覆小胞の指標であるγ-アダプチンに対する抗体、中心小胞の指標としたγ-チューブリンに対する抗体、およびα-チューブリンやアセチル化α-チューブリンに対する抗体は市販のものを用いた(各抗体のメーカー名や製品番号は「主な発表論文等」の項の雑誌論文②に詳細に記載)。また、下垂体前葉組織中の各内分泌細胞の同定は、群馬大学生体調節研究所から供与された各下垂体ホルモンに対する特異抗体、あるいは市販されている同様の抗体を用いて行った。

抗原局在部位の可視化は、光顕レベルの蛍光抗体法ではAlexaFluor 405、488、594標

識ロバ抗ウサギ-, マウス-, ヤギ-, およびヒツジ-IgG 抗体 (Molecular Probes) を、電顕レベルの金コロイド標識法では 5nm、10nm、15nm の金コロイド粒子で標識されたヤギ抗ウサギ-, マウス-IgG 抗体 (British Biocell International) を用いて行った。

蛍光抗体法 (光顕レベルの解析) : 光顕レベルの蛍光抗体法による標識の詳細は「主な発表論文等」の項の雑誌論文②に詳細に記載した。手順を簡単にまとめると、下垂体組織中の各ホルモン産生細胞の識別を必要とする場合には、Epon812 樹脂包埋した下垂体組織標本から 0.5 μ 厚の連続切片を作成し、Grube ら (1986) の方法に基づいて Sodium Methoxide 処理で脱樹脂後、2% 正常ウマ血清による非特異的吸着のブロッキングを経て、異なる動物種 (ウサギ、マウス、ヒツジ/ヤギ) で作成した一次抗体の混合液で反応し、目的の分子が局在する場所に抗体を結合させた (12 時間、4°C)。一次抗体の結合反応後、緩衝液 (0.5 M NaCl - 0.01M リン酸緩衝液、pH 7.4) で良く洗浄し、さらに異なる Alexa Fluor 蛍光色素で標識された各免疫動物種特異的な抗 IgG 抗体 (ロバで作製されたもの) を結合 (1 時間、20°C) させることで、複数の抗原の局在部位を同時に可視化した。蛍光標識された切片は封入後、落射蛍光顕微鏡 (オリンパス) あるいは共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス) で観察・記録した。

また、ゴルジ装置の立体再構築のためには、15 μ 厚の凍結切片を上記の方法で免疫組織化学染色し、得られた切片を封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス) で観察・記録した。得られた連続する光学断層像 (各 0.5 μ 厚) を顕微鏡付属のソフトウェアで処理し、立体像を再構築した。

電顕免疫組織化学 : 電顕レベルの金コロイド法による標識方法についても、「主な発表論文等」の項の雑誌論文②に詳細に記載した。手順を簡単にまとめると、L.R.white 樹脂包埋した下垂体組織標本から超薄切片を作成し、5% 正常ヤギ血清による非特異的吸着のブロッキングを経て、一次抗体を結合させた (12 時間、4°C)。一次抗体の結合反応後、0.1% BSA 含有 0.5 M NaCl - 0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2) で良く洗浄し、さらに金コロイド標識抗ウサギあるいはマウス IgG 抗体 (金コロイド径 : 5、10、15nm) を結合 (1 時間、20°C) させることで抗原の局在部位を可視化した。なお、2重標識が必要な場合には、Bendayan (1982) の方法に基づいて行った。金コロイド標識した切片は、電子染色を施した後、H-7650 透過型電子顕微鏡 (日立ハイテクノロジー) を用いて観察した。

③ オスミウム浸軟標本を用いたゴルジ装置の大局的構築の解析

鳥取大学名誉教授の田中敬一博士が開発(J

Microsc, 133: 213-222 (1984))し、新潟大学の牛木辰男教授と甲賀大輔助教が改良(Arch. Histol. Cytol. 69: 357-374 (2006))したオスミウム浸軟法に従って、固定した下垂体組織を 0.1% 希釈 OsO₄ 溶液に 48~72 時間浸漬して細胞質の可溶性蛋白だけを選択的に除去し、走査電子顕微鏡を用いた観察で次項の動物モデルの下垂体前葉内分泌細胞のゴルジ装置の立体構築・微細構造の経時的变化を解析した。

(2) 実験内分泌学的動物モデルの作成と標本採取

下垂体前葉の各内分泌細胞におけるペプチドホルモン生成・分泌は、視床下部由来の特異的な上位ホルモンの作用を受けて各調節系ごとに独立して促進 (あるいは抑制) される。この調節系の一部を人為的に操作することで、動物個体レベルで再現性良く各内分泌細胞の機能状態を変化させることができる。本研究期間には特に性腺刺激ホルモン産生細胞 (LH/FSH 細胞) を対象として以下の実験群を設定し、ゴルジ装置を含めた細胞内膜系小器官の構築・微細構造の変化を比較・検討した。

① **去勢手術 :** この実験モデルでは、去勢手術 (精巣除去) により性腺からの性ステロイドホルモン (テストステロン等) による負のフィードバック機構が失われるため、下垂体前葉の LH/FSH 細胞は持続的に刺激される。本研究では、去勢手術から、1 日後、7 日後、14 日後、28 日後に上述した方法で下垂体組織を採取し、解析に供した。

② **GnRH アゴニスト持続投与による LH/FSH 産生細胞の一過性刺激および長期抑制 :** この実験モデルは、8 週齢のウィスター系雄ラットの背部皮下に、3mg/kg 体重の leuprorelin 徐放性製剤 (武田薬品工業) を注射することで作成した。同剤は強力な GnRH アゴニストである leuprorelin がマイクロカプセル化された製剤で、1 ヶ月間にわたって有効量の leuprorelin が放出される。本研究では、同剤の投与開始から、1 日後、7 日後、14 日後、28 日後に上述した方法で下垂体組織を採取し、解析に供した。

③ **去勢手術後、長期経過したラットへの GnRH アゴニスト追加投与 :** 去勢手術から 8 週間経過し長期間強く刺激された LH/FSH 細胞に GnRH アゴニストが作用した場合の微細構造変化を解析した。上記実験群同様、8 週齢で去勢し 8 週間が経過したウィスター系雄ラット (16 週齢) の背部皮下に、3mg/kg 体重の leuprorelin 徐放性製剤を注射し、1 日後、7 日後、14 日後、28 日後に下垂体組織を採取し、解析に供した。

(3) 細胞内小胞輸送や分泌顆粒形成を阻害した実験系の構築

微小管重合阻害剤の影響の解析：微小管破壊効果のあるコルヒチンを腹腔投与(5mg/kg BW)したラットを 30分~8時間後に灌流固定し、下垂体前葉の内分泌細胞のゴルジ装置の微細構造や分子局在の変化を解析した。

siRNA を用いたノックダウン実験：これまでの研究でペプチドホルモンの分泌顆粒への選別輸送に重要な役割を果たしていると推測されるセクレトグラニン III (SgIII:「主な発表論文等」の項の雑誌論文①参照)の遺伝子配列から設計された siRNA(Ambion)を、Lipofectamin 2000(Invitrogen)とともにマウス下垂体前葉 ACTH 細胞由来の培養細胞 AtT20 細胞の培地に添加することによって、同細胞における SgIII の発現を抑制し、ゴルジ装置の微細構造やマーカー分子局在の変化を対照群と比較しながら解析した。

4. 研究成果

(1) 典型的な内分泌細胞である性腺刺激ホルモン産生細胞におけるゴルジ装置と微小管の構築

① 下垂体前葉において球形のゴルジ装置を持つ内分泌細胞の同定：オスミウム浸軟法で作成した対照群ラットの下垂体前葉組織標本を走査電子顕微鏡で観察したところ、球形のゴルジ装置を有する内分泌細胞が散在性に認められた。そこで、下垂体前葉組織連続切片を各下垂体前葉ホルモンに対する抗体とゴルジ装置マーカー (GM130 および TGN38) に対する抗体で 2重染色し検討したところ、この球形のゴルジ装置を有する細胞は性腺刺激ホルモン産生細胞 (LH/FSH 産生細胞) であると同定された。

② LH/FSH 産生細胞のゴルジ装置の微細構造の特徴：透過電子顕微鏡観察では、同細胞の 4-5 層からなるゴルジ層板は、全体として環状に配列していた。ゴルジ層板が途切れた部位では、粗面小胞体や分泌顆粒が観察され、このような部位は内外両側の細胞質領域間の交通路となっていることが示唆された。この環状のゴルジ装置内側の領域には、凝集過程にある未熟な分泌顆粒が多数観察されるとともに高頻度に中心小体が認められ、この中心小体から細胞周辺部に向かって放射状に微小管が伸展する像が観察された。

③ LH/FSH 産生細胞におけるゴルジ装置の極性：LH/FSH 産生細胞のゴルジ装置が立体的には球形であることから、そのシス側とトランス側を免疫組織化学法で同定した。その結果、環状のゴルジ装置の断面の外側が抗 GM130 抗体で標識されるシス側、内側が抗 TGN 抗体で標識されるトランス側であることが明らかになった。また、抗 BiP 抗体で標識される粗面小胞体は環状のゴルジ装置断

面の外側の領域に主として分布し、一方、ゴルジ装置からのリソゾーム、分泌小胞・顆粒などの形成に関与する γ -アダプチンは環状のゴルジ装置断面の内側に集積していた。

④ 性腺刺激ホルモン産生細胞における微小管ネットワークの構築：ゴルジ装置の形態形成や構築維持には微小管依存性モーター蛋白による細胞内小胞輸送が深く関与する。そこで、LH/FSH 産生細胞内で微小管ネットワークがどのような構築をとっているのか、免疫組織化学法で解析したところ、 α -チューブリンは環状のゴルジ装置断面の内側領域とゴルジ装置の外側表面に強く集積していた。さらにゴルジ装置の外側の領域には、細胞周辺部に向かって抗アセチル化 α -チューブリン抗体で標識される比較的安定した微小管が放射状に伸びる像が観察された。一方、 γ -チューブリンが局在する微小管の起点 (MTOC; microtubule organizing center) である中心小体は、環状のゴルジ装置断面内側領域に位置していた。

以上の所見をまとめると、LH/FSH 産生細胞では、球形のゴルジ装置の内部に微小管ネットワークの起点となる中心小体が存在し、ここから放射状に微小管が伸展し、一部はゴルジ層板で形成される壁の隙間を抜けて、細胞周辺部まで到達することが示された。加えて、ゴルジ装置のシス側に相当する外側の層板の近傍にも微小管が集積することから、粗面小胞体とゴルジ装置シス側が直接的に相対する領域でも、短い微小管ネットワークが発達していることが示唆された。

以上の研究成果は、第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会全国学術集会・合同大会 (東日本大震災のため、誌上開催) で報告するとともに、「主な発表論文等」の項の雑誌論文②にまとめた。

(2) LH/FSH 産生細胞への実験内分泌学的処置により生じるゴルジ装置構築の変化

対照群ラット下垂体前葉の LH/FSH 産生細胞で観察された球状のゴルジ装置の高い空間対称性に着目して、去勢手術や GnRH 誘導体持続投与で同細胞の機能状態を変化させた場合にこの特異なゴルジ装置の構築や極性がどのように変化するか、検討した。その結果、同細胞の GnRH 受容体に去勢手術や GnRH アゴニスト投与で強い刺激が加わった直後には、球状だったゴルジ装置の構築が一過性に乱れることが明らかになった。この所見は、同受容体下流の情報伝達経路の活性化が誘因となって GRASP55/65 などゴルジ装置の構築維持に関わる分子のリン酸化修飾が生じる可能性を示唆するものと考えられ、現在引き続き解析を進めている。

一方、この急性期の変化の 1 週間後には、ゴルジ装置は再び球状の配置をとり、この時期を境にして、去勢されたラットの同細胞で

は時間経過とともにゴルジ装置が球状に拡大したのに対し、GnRH アゴニスト持続投与ではゴルジ装置の内側の細胞質領域が虚脱し著明に扁平化した。この所見は、GnRH アゴニストの強力な刺激が GnRH 受容体に加わると受容体以降のシグナル伝達が逆説的に強く抑制されるという受容体不応化現象を形態学的に裏付ける所見と考えられた。

そこで、さらに、去勢手術で持続的に刺激された同細胞に対しても GnRH アゴニストによる受容体不応化現象が起こるのか検討するために、去勢後 8 週経過したラットに GnRH アゴニストを持続投与したところ、上述した急性期の一過性のゴルジ装置の構築の乱れは生じるものの、その後は肥大していたゴルジ装置は縮小し、最終的には扁平化して同細胞のホルモン生合成過程が顕著に抑制されることを示唆する所見を得た。

以上の去勢手術や LHRH 誘導体持続投与によるゴルジ装置の構築の変化に関しては、第 117 回日本解剖学会全国学術集会で報告するとともに、「主な発表論文等」の項の雑誌論文④にまとめた。

(3) コルヒチン処理による微小管破壊の影響

次に、コルヒチン投与によって微小管ネットワークを破壊した場合に、LH/FSH 産生細胞のゴルジ装置を中心とした細胞内膜系小器官にどのような変化が生じるか、検討した。コルヒチン腹腔投与後 60 分以内の早期には、まず、細胞周辺部において多数の空胞の形成が認められた。この時期には、ゴルジ装置の層板は、やや薄くなる傾向が認められるものの連続性は保たれており、対照群と同様にゴルジ装置全体は環状の配置を取っていた。また、対照群でゴルジ装置シス側に主として局在していた p23 分子と GM130 分子のうち、粗面小胞体-ゴルジ装置間の小胞輸送に関与すると考えられている p23 分子は、この時点で既に細胞周辺部に観察された多数の空胞に移行・集積していたが、ゴルジ装置のマトリクス蛋白である GM130 分子は、本来の局在部位であるゴルジ装置シス側にとどまっていた。これらの所見から、微小管破壊の影響はまず粗面小胞体からゴルジ装置への輸送障害の形で現れ、粗面小胞体からゴルジ装置へ輸送されるべき分子が粗面小胞体の出口に相当する特定の場所 (ER exit site) で貯留することが示唆された。さらに、コルヒチン投与から 4~8 時間が経過すると、ゴルジ腔は著明に虚脱し、さらにゴルジ層板の側方連続性が損なわれ断片化するのが観察された。ただし、ゴルジ装置が断片化した後も、GM130 が局在するシス側層板と TGN38 が局在するトランス側層板に数層の層板が挟まれた層序構造は保たれており、微小管の破壊はゴルジ層板のシス-トランス方向の基本構造には影響が及ばないことが示唆された。

この時間差を伴うゴルジ装置構築の崩壊過程から、微小管および微小管依存性モーター蛋白が、少なくとも二つの異なる機構でゴルジ装置の大局的な構築の維持に関わることが示唆された。

以上の研究成果は、第 58 回日本解剖学会東北北海道連合支部学術集会で報告した。

(4) セクレトグラニン III (SgIII) の発現抑制により生じるゴルジ装置の微細構造変化

このような実験内分泌学的動物モデルの解析と並行して、内分泌細胞由来の培養細胞株 AtT-20 細胞で分泌顆粒形成に重要な役割を果たす SgIII の発現を siRNA 法で抑制した際に生じるゴルジ装置の微細構造変化を解析した。その結果、SgIII の発現を抑制すると細胞内からクロモグラニン A (CgA) を含む成熟分泌顆粒が消失し、CgA は少量の ACTH とともに小さな凝集塊として著明に空胞化した TGN の内部に局在することが観察された。そこで、ショ糖密度勾配法で細胞内小器官を分画し分泌蛋白の局在を検討したところ、SgIII の発現が抑制された状態では、CgA が密度の高い分泌顆粒分画から密度の低い軽い分画に移行しゴルジ装置トランス側のマーカー蛋白である TGN46 と共存していた。以上の所見から、SgIII が CgA と共同して AtT-20 細胞のゴルジ装置トランス側における分泌顆粒形成に重要な役割を果たすとともに、ゴルジ装置トランス側の構造の維持にも重要な役割を果たしていることが示唆された。この所見を踏まえて、現在さらに同分子による TGN へのコレステロール集積機能を視野に入れて、その分子細胞生物学的背景を解析しているところである。

この AtT20 細胞でグラニン蛋白をノックダウンした時のゴルジ装置の変化に関しては、第 57 回日本解剖学会東北北海道連合支部学術集会で報告するとともに、「主な発表論文等」の項の雑誌論文③にまとめた。

(5) 本研究の総括と今後の展望

本研究によって、LH/FSH 産生細胞に代表される内分泌細胞ではゴルジ装置が球状の特異な構築をとることが明らかになったが、微小管の構築や細胞内小胞輸送におけるモーター蛋白の使い分け等に関するこれまでの知見を考慮すると、むしろこの空間対称性の高い形状がゴルジ装置構築の原型として妥当なものと考えられた。この空間対称性の高いゴルジ装置の構築はまた、様々な細胞機能状態の変化によってゴルジ装置構築が乱れた場合にその変化を鋭敏に察知できるという点でも有用である。加えて、内分泌細胞には刺激と応答の因果関係が明瞭であるという利点もあるので、今回の研究成果は、今後、ゴルジ装置の機能と構造の関係性を検討するための新たな動物実験モデルの可能性を呈示するものと思われた。

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4件)

- ① Hosaka M, Watanabe T: **Secretogranin III: a bridge between core hormone aggregates and the secretory granule membrane.** *Endocr J*. 57:275-286 (2010)
DOI:10.1507/endocrj.K10E-038、査読あり
- ② 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 the microtubule network.** *J Histochem Cytochem* 60:588-602 (2012)
DOI: 10.1369/0022155412448791、査読あり
- ③ Sun KM, 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)
DOI: 10.1111/tra.12029、査読あり
- ④ 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 membranous organelles in male rat pituitary gonadotropes.** *Arch Histol Cytol* (in press)
査読あり

〔学会発表〕(計10件)

- ① 渡部 剛、暮地本 宙己、穂坂 正博「**内分泌細胞の分泌顆粒形成におけるグラニン蛋白の役割**」第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会全国学術集会・合同大会、シンポジウム「内分泌細胞における新たな分泌制御機構と分泌現象」(2011年3月、横浜(東日本大震災のためJ Physiological Sciences誌(61巻 Supplement 1、2011年)上での誌上開催))
- ② 暮地本 宙己、甲賀 大輔、阪井 裕子、平義樹、牛木 辰男、渡部 剛「**GnRH アゴニストを持続投与した去勢術後ラットの下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞における細胞内膜系の変化**」第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会全国学術集会・合同大会(2011年3月、横浜(東日本大震災のため誌上開催))
- ③ 渡部 剛、暮地本 宙己、穂坂 正博「**AtT-20細胞におけるセクレトグラニン III (SgIII)の発現抑制はトランスゴルジネットワーク(TGN)の空胞化と調節性分泌の部分障害を誘起する**」第57回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会(2011年9月10日、盛岡)

- ④ 暮地本 宙己、甲賀 大輔、阪井 裕子、平義樹、牛木 辰男、渡部 剛「**去勢刺激を受けた下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞(LH/FSH産生細胞)の微細構造に対するGnRHアゴニスト持続投与の影響**」第57回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会(2011年9月10日、盛岡)
- ⑤ 渡部 剛、暮地本 宙己「**ゴルジ装置の構築から見た内分泌細胞と外分泌細胞・組織の比較**」第117回日本解剖学会全国学術集会(2012年3月27日、甲府)
- ⑥ 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回日本解剖学会全国学術集会・シンポジウム「細胞外シグナルと下垂体細胞の発達、機能発現への形態学的アプローチ」(2012年3月26日、甲府)
- ⑦ 渡部 剛、暮地本 宙己、穂坂 正博「**コルヒチン投与による性腺刺激ホルモン産生細胞(LH/FSH産生細胞)のゴルジ装置の微細構造変化**」第58回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会(2012年9月22日、山形)
- ⑧ 暮地本 宙己、赤木 康司、渡部 剛「**プロピルチオウラシル(PTU)投与後のラット下垂体前葉甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生細胞における細胞内膜系小器官の変化**」第58回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会(2012年9月22日、山形)
- ⑨ 渡部 剛、暮地本 宙己「**下垂体前葉におけるゴルジ装置構築の多様性：微小管構築との関連性に着目して**」第118回日本解剖学会全国学術集会(2013年3月28日、高松)
- ⑩ 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回日本解剖学会全国学術集会(2013年3月29日、高松)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡部 剛 (WATANABE TSUYOSHI)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：80220903

(3)連携研究者

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