

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05443

研究課題名(和文) 内分泌細胞の酸素応答とホルモン生合成・分泌制御のクロストークを解明する

研究課題名(英文) Oxygen response in neuro-endocrine 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体は肺で大気(21%酸素濃度 = 160 mmHg 酸素分圧)を吸い、血中に酸素を取り込む。取り込まれた酸素は血流で全身の細胞に分配され、全身の細胞は酸素を使ってATPを作り生命現象を維持している。生体内の酸素濃度は動脈血で13%程度、静脈血で5%程度、組織中の酸素濃度では 3.6-12.8%と報告されている。

本研究では生理的酸素濃度下でのホルモン分泌能を調べるために、マウス脳下垂体と膵島組織およびその細胞株を種々の酸素濃度で培養したところ、10%酸素濃度下でPC1/3, PC2, CPEの発現が亢進し、成熟型ホルモンの細胞内貯蔵量と分泌が最大値となることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体組織における酸素濃度では大気中と比較して低く 3.6-12.8%である。本研究で生理的酸素濃度下でのホルモン分泌能を調べたところ、ペプチドホルモンを分泌顆粒で修飾するプロセッシング酵素群の発現が亢進し、成熟型ホルモンの細胞内貯蔵量と分泌が最大値となることを見出した。我々は本研究での発見が内分泌機能調節系固有の酸素応答の分子機構について、細胞から個体レベルまで広範囲にわたる新たな知見を加えることができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Although in vivo oxygen concentrations in tissues are often much lower than ambient 21% oxygen (ranging from 3.6 to 12.8% oxygen), most cell cultures are maintained at 21% oxygen. We examined the changes in the storage and release of peptide hormones in endocrine cell lines and tissues cultured at relatively lower oxygen. In both AtT-20 cells derived from the mouse anterior pituitary and freshly prepared mouse pituitaries cultured at 10% oxygen for 24 h, storage and regulated secretion of the mature peptide hormone adrenocorticotrophic hormone were significantly increased compared with those cultured at ambient 21% oxygen, whereas its precursor proopiomelanocortin was not increased in the cells and tissues after 10% oxygen culture. Simultaneously, the prohormone processing enzymes PC1/3 and carboxypeptidase E were up-regulated in cells cultured at 10% oxygen, thus facilitating conversion of prohormones to their active form. Similar effects were also observed in insulin secretion.

研究分野：生化学

キーワード：内分泌細胞 酸素応答 プロセッシング酵素 ペプチドホルモン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

弱低酸素環境(10%酸素濃度)がホルモン分泌動態や細胞内分泌機構にもたらす影響に関しては、これまであまり検討されてこなかった。わずかに、分娩時の低酸素ストレスを模した高地飼育(酸素濃度10%)の羊胎児で POMC のプロセッシングが、低地飼育(酸素濃度21%)の羊胎児と比較して亢進することを示した研究や(Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 288, 1178-1184, 05) 高地トレーニングでヒトの血中成長ホルモン分泌が亢進することを示した研究(Int. J. Sports Physiol. Perform 4, 497-508, 10) など、個体レベルでの古典的な内分泌学的研究に加えて、最近、マウス膵細胞由来 MIN6 細胞を 1-5% (大気酸素濃度は 20%) で 48 時間培養すると調節性分泌が破壊されると云った研究が報告された(PLoS One. 9, e114868, 2014)。しかしながら組織・細胞レベルで『弱低酸素環境』がホルモン分泌に与える影響を分子細胞生物学的な観点から詳しく検討した研究は見当たらなかった。

### 2. 研究の目的

生体は肺で大気(21%酸素濃度 = 160 mmHg 酸素分圧)を吸い、肺胞でヘモグロビンを介して血中に酸素を取り込む。取り込まれた酸素は血流で全身の細胞に分配され、全身の細胞は酸素を使って ATP を作り生命現象を維持している。生体内の酸素濃度は動脈血で 13% (100 mmHg) 程度、静脈血で 5% 程度、組織中の酸素濃度では 3.6-12.8% と報告されている(J. Cell Physiol. 220, 562-8, 2009)。近年、「がん」研究で低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factor: HIF) が生体中の低酸素(0-5%酸素濃度)環境で代謝、細胞死、血管新生、細胞移動などに関与する多様な遺伝子の発現を制御していることが明らかとなったことをきっかけとして(Science 318, 62-4, 2007)、腫瘍学、さらに発生学分野で生体内の酸素環境に注目が集まっている。一方、内分泌組織のホルモン分泌細胞を取り囲む酸素環境については下垂体や膵島といった組織自体が高深度にあるため不明なことが多い。これまで生体組織の酸素分圧は古典的な電極型酸素分圧測定装置で電極プローブを対象とする組織に刺し、酸素分圧を測定されてきた。膵島でも、麻酔下のラットで同様の測定装置によりその内部と表面の酸素分圧が測定され、その酸素分圧は 36-45 mmHg (4.7-6.0% 酸素濃度) と報告されている(Diabetes 47, 1586-93, 1998)。しかし電極型酸素分圧測定装置は直接酸素分圧を測定できる一方で、組織にニードルタイプの電極を刺すため血液、間質液の流出、また血流量の多い内分泌組織の酸素分圧測定には不向きといえる。

申請者は、種々の酸素濃度条件下(1-21%酸素濃度; 24 時間培養)で副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を分泌するマウス脳下垂体由来 AtT-20 細胞とインスリンを分泌するマウス膵由来 MIN6 細胞を培養し、ホルモンの分泌を比較したところ 10%酸素濃度培養で成熟型ホルモンの分泌量がもっとも亢進し、細胞のホルモン貯蔵量も約 2 倍に増えることを見出した。そこで本申請では、この発見を発展させ酸素環境をセンシングしてプロセッシング酵素の発現を調節することで応答する内分泌細胞固有の機構を解明して、酸素応答とホルモン生合成・分泌制御のクロストークの検証を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 10%酸素濃度培養下におけるタンパク質の翻訳・翻訳後修飾の変化: 21%, 10%酸素濃度で AtT-20, MIN6 細胞およびマウス脳下垂体と単離膵島を培養し、タンパク質発現量(特にプロセッシング酵素群)と顆粒内タンパク質のプロセッシング(グラニタンパク質、ホルモン)をウエスタンブロットティングで、また活性型ホルモン量や分泌動態について ELISA キットを用いた分泌実験で解析し、酸素濃度によって誘起される内分泌細胞の機能変化を明らかにする。
- (2) 10%酸素濃度培養下における分泌顆粒形成過程のイメージング: フォグリン(膜貫通領域で分泌顆粒膜に局在; 原著論文 26) グラニタンパク質(分泌顆粒内に局在)の C 端に GFP を結合し、内分泌細胞株に発現させ分泌顆粒を可視化する。この細胞を酸素濃度可変条件下で培養しながら蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡でタイムラプス観察し、環境の酸素濃度変化が顆粒形成過程に与える影響を解析する。また 10%酸素環境下の顆粒数、顆粒関連タンパク質とホルモン局在変化を電顕免疫組織化学により解析する。
- (3) 3. 10%酸素環境下で増減する遺伝子発現プロファイルを獲得し、その機能を解明する: 21%, 10%酸素濃度で培養した内分泌細胞から RNA を抽出し、10%酸素培養において有意に発現が増強あるいは減弱する遺伝子を DNA マイクロアレイなどで網羅的に同定する。これらの解析から、10%酸素濃度下で起こるホルモン生合成や分泌顆粒形成など内分泌機能に関わる分子の遺伝子発現プロファイルの変化を明らかにし、RT-PCR、ノーザンブロット、ウエスタンブロットで検証したのち、その機能を解析する。さらに、そのマスターレギュレーターとして働く因子の同定も試みる。

### 4. 研究成果

- 種々の培養時間(12, 24, 48 時間)および酸素濃度(1, 5, 7.5, 10, 15, 21%酸素濃度)の組み合わせ

わせで細胞および組織培養を行なったところ、24 時間の 10%酸素濃度培養で成熟型ホルモンの分泌量がもっとも亢進し、細胞のホルモン貯蔵量も約 2 倍に増える。

- このとき、ホルモン前駆体の発現量はタンパク質レベルで大きな違いが見られないが、プロセッシング酵素群 (PC1/3, PC2: ホルモン前駆体を塩基性アミノ酸対で切断する; カルボキシペプチターゼ E: ホルモンの末端アミノ酸修飾酵素) の発現が増強する
- ホルモン前駆体と顆粒内タンパク質 (セクレトグラニン III とクロモグラニン A) のプロセッシングが亢進する。
- 10%, 21%酸素濃度培養で顆粒形態と顆粒数に優位の違いは見当たらなかった。
- アレイ解析で得られた候補タンパク質の生化学的解析は継続中である。内分泌細胞での発現、局在、およびその機能を中心に解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gomi H, Hinata A, Yasui T, Torii S, Hosaka M.	4. 巻 69
2. 論文標題 Expression Pattern of the LacZ Reporter in Secretogranin III Gene-trapped Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Histochem. Cytochem.	6. 最初と最後の頁 229-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155421996845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato E., Maeda Y., Sato Y., Hinata A., Gomi H., Koga D., Torii S., Watanabe T., Hosaka M.	4. 巻 476
2. 論文標題 Culture in 10% O2 enhances the production of active hormones in neuro-endocrine cells by up-regulating the expression of processing enzyme.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 827-842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20180832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安達美喜、渡辺剛、穂坂正博
2. 発表標題 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群を探索する
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 穂坂正博
2. 発表標題 ストレス負荷で顕在化するホルモン輸送不全の謎：生活習慣病の危険因子としてのグラニントンパク質欠損
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hinata A., Yasui T., Gomi H., Hosaka M.
2. 発表標題 Expression of secretogranin III in a living animal Expression of secretogranin III in a living animal
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuchiya A., Tsushima K., Hosaka M.
2. 発表標題 Research for maturation of the secretory granule in endocrine cells
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穂坂正博
2. 発表標題 内分泌細胞でペプチドホルモンがゴルジ体から分泌顆粒へ輸送される機構について
3. 学会等名 研究セミナー（鳥取大学 医学部）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穂坂正博
2. 発表標題 分泌顆粒形成におけるグラニンタンパク質の役割（セクレトグラニンIIIが糖代謝に与える影響）
3. 学会等名 宮崎大学医学部（中里クレスト班）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日當愛梨、穂坂正博
2. 発表標題 Effect of PROX1 on ACTH secretion in AtT-20 cells
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日當愛梨、穂坂正博
2. 発表標題 転写因子PROX1で惹起する内分泌細胞の分泌顆粒形成をAtT-20細胞で検証する
3. 学会等名 第83回生化学東北支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物科学科 動物機能グループ 分子生命科学分野  <a href="http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/index.html">http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/index.html</a>          秋田県立大学 分子生命科学分野 (穂坂研究室)  <a href="http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/index.html">http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/index.html</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	渡部 剛  (Tsuyoshi Watanabe)  (80220903)	旭川医科大学・医学部・教授    (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	甲賀 大輔  (Daisuke Koga)  (30467071)	旭川医科大学・医学部・准教授    (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関