

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：21401  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K06070  
研究課題名(和文) ホルモン前駆体と活性化酵素群が出会う仕組み：グラニンを介した共輸送機構の解明

研究課題名(英文) Sorting mechanism of processing enzymes to the secretory granules.

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌細胞の分泌顆粒でペプチドホルモン前駆体は、分泌顆粒膜上に集積する様々な活性化酵素によって切断・修飾され生理活性のあるホルモンに成熟する。しかし、ホルモン前駆体と活性化酵素群が共に分泌顆粒へ選別輸送される機構については未だ解明されていない。そこで本研究では、分泌顆粒にホルモンを運ぶセクレトグラニン II と III (Sg2, Sg3) に着目し、これらの分子がこのホルモン前駆体と活性化酵素群の共輸送過程で果たす役割を、Sg2-、Sg3-欠損 (KO) マウスを活用して検討した。さらに、Sg2/Sg3-二重欠損 (DKO) マウスを作出・解析して、複数種グラニンの機能的代償機構を検証した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究から、ペプチドホルモン前駆体が活性化されるためには活性化酵素群が集積する顆粒膜のドメインと出会うことが必須であり、グラニンはこの両者の近接に重要な役割を果たすことが示唆されたが、その分子機構に不明な点が多い。さらに申請者のSg3-KOマウスの解析から、単独のグラニン欠損では致命的なホルモン分泌不全が生じないことが明らかになったが、このホルモン分泌の代償機構についても解明されていない。本研究を通じて、ペプチドホルモン活性化過程におけるグラニンの役割を解明し、活性型ホルモンの不充足に起因する生活習慣病の病因解明や新規治療・予防法の提案に向けて、新しい観点からのアプローチを確立したい。

研究成果の概要(英文)：Peptide-hormone precursors in the secretory granules of endocrine cells are modified by various activating enzymes that accumulate on the secretory granule membrane to mature into biologically active hormones. However, the mechanism by which hormone precursors and activating enzymes selectively meet in the secretory granules has not yet been elucidated. In this study, we focused on secretogranin II and secretogranin III (Sg2 and Sg3), which transport hormones to secretory granules from trans-golgi network, and investigated the role of these molecules in the co-transport process of hormone precursors and activating enzymes using Sg2- and Sg3- knockout (KO) mice. Furthermore, Sg2/Sg3- double-knockout (DKO) mice were generated and analyzed to examine the functional compensatory mechanism of multiple species of granin-proteins.

研究分野：機能生物化学関連

キーワード：ペプチドホルモン 分泌顆粒 ホルモン修飾酵素 選別輸送

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性維持に重要な役割を果たすペプチドホルモンは、粗面小胞体でホルモン前駆体として生合成された後、ゴルジ装置を経て選択的に分泌顆粒に蓄積され、外部からの分泌刺激にตอบสนองして細胞外へ放出される。この調節性分泌経路の各オルガネラでホルモン前駆体は糖鎖付加や塩基性アミノ酸対で限定切断(プロセッシング)などの修飾を受け生理活性のあるホルモンに成熟する。この成熟ホルモンの生成に寄与する酵素群のうち、プロホルモン転換酵素 PC1/3 や PC2、カルボキシペプチダーゼ E (CPE)、ペプチド C 末端アミド化酵素 PAM などは、やはり TGN から分泌顆粒に選択的に輸送され、この過程で両者が近接して活性型ホルモンが生成すると考えられている (Methods Mol. Biol. 2011, 768:3-11)。

ホルモン前駆体が分泌顆粒へ選択的に運ばれる機構に関しては、多数の先行研究から分泌顆粒基質のグラニンの関与が示唆されてきた。代表的なグラニンには、クロモグラニン A と B (CgA, CgB)、およびセクレトグラニン II (Sg2) の 3 種があり、これらは低い pH (5.5 前後) と高い  $Ca^{2+}$  濃度 (10 mM 前後) といった TGN から分泌顆粒内腔の環境でホルモン前駆体を巻き込んで自律的に凝集し、分泌顆粒内にホルモン前駆体を選択的に保持する役割を果たしている (Current Biology 1995, 5:242-245; Biochim. Biophys. Acta. 1998, 1404:231-244)。

一方、ホルモン前駆体の活性化に寄与する酵素群は、共通してコレステロールに富む脂質ラフト様の膜ドメインに結合する性質があり、この特性が分泌顆粒への輸送に関与することが示唆されてきた (J. Cell Biol. 2007, 177:191-196)。しかし、このホルモン活性化酵素群を乗せた膜ドメインがどのような機構で分泌顆粒に選択的に集積し、ホルモン前駆体と近接して活性型ホルモンを生成するのかについては近年まで不明であった。

我々はこれまでに、TGN 内腔のホルモン凝集塊に含まれる CgA とコレステロールに富む分泌顆粒膜を特異的に結びつける分子としてセクレトグラニン III (Sg3) を同定した (Endocrine J. 2010, 57:275-286; Mol. Endocrinol. 2008, 22:1935-1949; J. Biol. Chem. 2004, 30:3627-3634; Mol. Biol. Cell 2002, 13:3388-3399)。そこで、siRNA を用いてマウス脳下垂体由来内分泌細胞株の AtT-20 細胞で Sg3 の発現を抑制し、分泌顆粒形成に与える影響を解析したところ、TGN が空胞化し、内腔側に少量残存する CgA の凝集塊と TGN 膜は解離して CgA 陽性の分泌顆粒の形成が顕著に阻害された (Traffic 2013, 14:205-218)。さらにマウス個体で Sg3 遺伝子をノックアウトし Sg3 の発現を欠損させると (Sg3-KO マウス)、広く膵島や下垂体前葉の内分泌細胞で活性型ホルモン産生能の予備力が有意に低下し、例えば高脂肪/高糖質食での飼育で膵島細胞に負荷をかけるとプロインスリンからインスリンへのプロセッシングが足りず耐糖能低下と肥満が顕在化した (Endocrinology 2018, 159:1213-1227)。こうした知見は、分泌顆粒内腔でホルモン前駆体と膜上のプロセッシング酵素を近接させるのに Sg3 が寄与していることを示している。しかし一方で、Sg3 の発現を欠損させた内分泌細胞株でもマウス個体でも Sg2 の発現および Sg2 陽性顆粒の形成は認められることから、生存に不可欠な基礎レベルのホルモン分泌と分泌顆粒の形成は、Sg2 など他のグラニンが代償している可能性が示された。

以上の研究の背景および申請者の先行研究から、ペプチドホルモン前駆体が適切に活性化されるためには活性化酵素群が集積する膜ドメイン(ホルモン活性化プラットフォーム)と出会うことが必須であり、分泌顆粒の基質であるグラニンはこの両者の近接・集積に重要な役割を果たすことが示唆されたが、その分子機構の詳細については未だ不明の点が多い。さらに申請者による Sg3-KO マウスの解析から、単独のグラニン欠損では致命的なホルモン分泌不全が生じないこ

とが明らかになったが、この複数種のグラニンの機能的冗長性によるホルモン分泌の代償機構についても解明されていない。

## 2. 研究の目的

前述した研究の背景および未解決の課題を踏まえて、本研究課題では、内分泌細胞株および Sg2 や Sg3 の遺伝子欠損マウスを活用して、具体的に以下の3点を明らかにする。

- A. Sg3がホルモン活性化酵素を分泌顆粒に選択的に集積させる仕組みの解明:これまで申請者が進めてきたSg3の生化学的解析を発展・深化させ、Sg3と各ホルモン活性化酵素との直接的相互作用の検証や結合ドメインの同定、Sg3と結合する新規分子の網羅的探索を行い、ペプチドホルモン前駆体に活性化酵素群を集積・近接させる分子機構を明らかにする。
- B. Sg2がホルモン活性化酵素を分泌顆粒に選択的に集積させる仕組みの解明: Sg3/CgA系とは独立して分泌顆粒形成に寄与するSg2がどのようにホルモン活性化酵素群を分泌顆粒に集積させ機能させるかについて、生化学的手法で明らかにする。
- C. Sg2にもSg3にも依存しないホルモン活性化機構の有無の検証: 上記AとBの解析結果を踏まえて、ペプチドホルモン活性化過程でSg2とSg3の2つのグラニンが必須かどうかを、Sg2/Sg3-DK0マウスを作出・解析して明らかにする。

## 3. 研究の方法

研究期間の初年度(2021年度)には、まず、1. *in vitro*の結合アッセイ実験系を用いて、Sg3(上記研究目的 A)およびSg2(研究目的 B)がホルモン活性化酵素を分泌顆粒に選択的に集積させる分子機構について検討を進めた。並行して、2. 申請者が既に確立したSg2-K0およびSg3-K0マウスを活用して、ホルモン活性化酵素群が集積する分泌顆粒膜上の機能ドメインの実体とその機能的意義について *in vivo*で検証を行った。

また、2022年度以降には、初年度に着手した上記の解析を進めるとともに、3. Sg2-K0とSg3-K0マウスの交配でSg2/Sg3-DK0マウスを作出し、その表現型解析と生化学的解析からSg3にもSg2にも依存しないホルモン活性化機構の有無を検証した。

## 4. 研究成果

内分泌細胞でペプチドホルモンは分泌顆粒へ選択的に輸送・貯蔵され、外来刺激を受け細胞外に放出される。我々は、これまでペプチドホルモンが選択的に分泌顆粒へ運ばれる機構を解析し、グラニタンパク質のセクレトグラニン II, III (Sg2, Sg3) が、分泌顆粒へホルモンを輸送することを示した。近年、我々は個体レベルで Sg3 の解析を進め、マウスで Sg3 を欠損させると (Sg3-K0) 通常飼育条件で著しい表現型の変化を示さない一方で、Sg3-K0 に内分泌学的負荷をかけるとホルモンの分泌不全が顕在化することを明らかにした。さらに Sg3-K0 でホルモン輸送が Sg2 依存性の機構で代償されることが示唆され、Sg3 ノックダウン細胞の解析もこの仮説を支持した。こうした背景から我々は令和2年度に Sg2-K0 の作製を行い、さらに最近、Sg2 と Sg3 を二重に欠損した Sg2/3-ダブルノックアウトマウス (DK0) の作出に成功した。本研究課題では、さらに Sg2-K0, Sg3-K0, Sg2/3-DK0 を活用して、A. Sg3 がホルモン活性化酵素を分泌顆粒に選択的に集積させる仕組みの解明、B. Sg2 がホルモン活性化酵素を分泌顆粒に選択的に集積させる仕組みの解明、C. Sg2 にも Sg3 にも依存しないホルモン活性化機構の有無の検証、を行った。申請者は、一連の研究で、Sg2 がホルモンを顆粒に運ぶことを明らかにし、また Sg2 にも Sg3 にも依存しない他のグラニタンパク質に依存している(だろう)ホルモン活性化機構を新たに見

出した。さらに、ホルモン選別輸送体として働く Sg2, Sg3 がホルモン修飾酵素 PC1/3 と PC2 (ホルモン前駆体の塩基性アミノ酸対を切断する), CPE (カルボキシペプチターゼ E: ฮอร์โมน前駆体の末端塩基性アミノ酸の切断する) の結合を生化学的に調べたところ、Sg3 は PC1/3, PC2, CPE と結合することが明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gomi Hiroshi, Hinata Airi, Yasui Tadashi, Torii Seiji, Hosaka Masahiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Expression Pattern of the <i>LacZ</i> 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Gomi Hiroshi, Nagumo Takahiro, Asano Kazushi, Konosu Makoto, Yasui Tadashi, Torii Seiji, Hosaka Masahiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Differential Expression of Secretogranins II and III in Canine Adrenal Chromaffin Cells and Pheochromocytomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 335 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/00221554221091000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yasui Tadashi, Mashiko Mutsumi, Obi Akihiro, Mori Hiroyuki, Ito-Murata Moeko, Hayakawa Hiroki, Kikuchi Shota, Hosaka Masahiro, Kubota Chisato, Torii Seiji, Gomi Hiroshi	4. 巻 161
2. 論文標題 Insulin granule morphology and crinosome formation in mice lacking the pancreatic cell-specific phogrin (PTPRN2) gene	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 223 ~ 238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-023-02256-8	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 Kubota Chisato, Torii Ryoko, Hosaka Masahiro, Takeuchi Toshiyuki, Gomi Hiroshi, Torii Seiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Phogrin Regulates High-Fat Diet-Induced Compensatory Pancreatic $\beta$ -Cell Growth by Switching Binding Partners	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 169 ~ 169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu16010169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 穂坂正博、五味浩司、渡部剛
2. 発表標題 分泌顆粒へのホルモン輸送機構が冗長性を持つ意義：生活習慣病の危険因子としてのグラニタンパク質不全
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 河田秋音、平島優花、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 セクレトグラニンが制御する下垂体前葉ホルモンの分泌 / 産生
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平島優花、河田秋音、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 インスリン分泌でセクレトグラニンが果たす役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河田秋音、平島優花、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 グラニタンパク質が制御する下垂体前葉ホルモンの分泌 / 産生を明らかにする
3. 学会等名 第89回日本生化学会東北支部 例会・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平島優花、河田秋音、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 インスリン分泌でセクレトグラニンIIが果たす役割を個体レベルで明らかにする
3. 学会等名 第89回日本生化学会東北支部 例会・シンポジウム
4. 発表年 2023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 日本大学獣医学科（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎拓美、五味浩司、渡部剛、穂坂正博
2. 発表標題 The role of secretogranin III in the endocrine cells of the adrenal gland
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 第94回日本生化学会大会
2. 発表標題 副腎でセクレトグラニン3が果たす機能を調べる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達美喜、渡部剛、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の探索
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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（穂坂研究室）  
<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/>  
 Researchmap  
<https://researchmap.jp/read0060066>  
 ORCID  
<https://orcid.org/0000-0002-1422-1774>  
 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（穂坂研究室）  
<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/dbt/molb/mhosaka/>

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
研究協力者	渡部 剛  (Watanabe Tsuyoshi)		
研究協力者	五味 浩司  (Gomi Hiroshi)		
研究協力者	鳥居 征司  (Torii Seiji)		

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
---------	---------