

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460263

研究課題名(和文)分泌細胞における細胞極性の再定義：ゴルジ装置の大局的構造を新たな指標として

研究課題名(英文) Diversity in the global organization of the Golgi apparatus in differentiated secretory 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫組織化学および電子顕微鏡観察により、甲状腺濾胞上皮細胞を中心として様々な分泌細胞におけるゴルジ装置と微小管の大局的構築を組織・細胞横断的に解析し、その特徴から分泌細胞の類型化に関する新たな仮説を確立した。すなわち、分泌細胞の細胞極性や分泌動線とゴルジ装置の大局的構造との間には明確な関係性が存在し、その特徴を決定付ける主要因は細胞内で微小管の起点となる中心小体と細胞核との位置関係にあることが、本研究の観察で示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells of the thyroid follicle are well polarized and could transport membrane carriers bidirectionally toward both the apical and basal cell surfaces. The present study immunocytochemically examined the overall shape of the Golgi apparatus and the intracellular organization of the microtubule network in a variety of secretory cells including thyroid epithelial cells. Observation in the present study clearly demonstrated that the spherical Golgi seen in the poorly polarized endocrine cells is the most fundamental pattern of the Golgi organization, and multiple openings on the surface of the spherical Golgi possibly converge into two or one major openings in highly polarized epithelial cells, depending on the cell surface polarity and direction of the intracellular trafficking lines. Thus the overall shape of the Golgi apparatus could be a good indicator reflecting the intracellular organization and dynamics of the membranous organelles that constitute the secretory pathways.

研究分野：解剖学、細胞生物学

 キーワード：ゴルジ装置 甲状腺濾胞上皮細胞 細胞極性 微小管構築 中心小体 分泌細胞 免疫組織化学 実験
内分泌学

1. 研究開始当初の背景

一般に細胞極性という概念は細胞表面の機能や分子の偏在性を元に規定され (Simons & Fuller (1985) *Annu Rev Cell Biol* 1:243-88; Apodaca et al. (2012) *Nat Cell Biol*. 14:1235-43)、隣接細胞間で接着複合体が発達し細胞膜が腺腔側(頂端側:apical domain)と基底側 (basolateral domain)とに区分される外分泌腺の腺房細胞は、極性が明瞭な細胞の典型例とされている。腺房細胞では、また、分泌経路を構成する粗面小胞体、ゴルジ装置、分泌顆粒も基底側から腺腔側に順に並び、細胞表面の極性と対応して細胞内小器官配置にも一定の秩序が存在する。一方、ペプチド性の内分泌細胞では、外分泌腺の腺房細胞と同様に分泌経路を構成する細胞内小器官が発達しているが、細胞表面の極性は乏しいと見なされてきた。

これまで研究代表者は下垂体前葉などの内分泌細胞における分泌顆粒形成機構を細胞微細構造と分子局在・機能の両面から解析してきた。この過程で、研究代表者は、細胞表面の極性に乏しい性腺刺激ホルモン産生細胞 (LH/FSH 産生細胞) のゴルジ装置が大局的には球状の配置をとることに気づいた。平成22年度からは、この内分泌細胞におけるゴルジ装置構築の意義の解明を主題として科研費補助金を受け、同細胞で見られる空間対称性の高い球状のゴルジ装置の構築が、細胞中心に位置する中心小体から等方性に細胞周辺部に伸びる微小管構築を強く反映していることを明らかにした。

ゴルジ装置は分泌経路の中央に位置し、その細胞内配置や大局的構造は上流の粗面小胞体や下流の細胞膜、リソソーム/エンドソーム、分泌顆粒との間で不断に行われる微小管依存性の小胞輸送のバランスで決定され (Lippincott-Schwartz (1998) *Curr Opin Cell Biol* 10:52; Allan et al. (2002) *Nat Cell Biol* 4:E236)、動物個体で分化した細胞内では、細胞種や機能状態に応じて多様な形態をとる (Rambourg & Clermont (1990) *Eur JCB* 51:189; Tanaka & Fukudome (1991) *J Electron Microscop Tech* 17:15; Koga & Ushiki (2006) *Arch Histo Cytol* 69:357)。この微小管依存性の小胞輸送はまた、細胞表面の極性形成にも関与する (Drubin & Nelson (1996) *Cell* 84:335-44)ことから、細胞極性とゴルジ装置の大局的構造との間には、微小管構築を介して、何らかの関係性が存在することが示唆されてきた (Thyberg & Moskalewski (1999) *Exp Cell Res* 246:263; Sütterlin & Colanzi (2010) *JCB* 188:621)。

そこで、生体の様々な分泌細胞におけるゴルジ装置構築の再検討を始めたところ、甲状腺濾胞上皮細胞のゴルジ装置が細胞の外形と相同な円筒状の配置をとることに気付いた。この濾胞上皮細胞は、まず外分泌腺として発生するが後に導出管が失われるために内分泌細胞に転化する興味深い細胞である。このため、同細胞内で合成され

たホルモン前駆体サイログロブリン (TG) はまず腺腔側である濾胞腔に分泌され(外分泌相)、その後、エンドサイトーシスで再び細胞内に回収されたヨード化 TG がリソソーム酵素により切断され甲状腺ホルモン (サイロキシン(T4)、トリヨードサイロニン(T3)) が生成し、基底側の毛細血管に分泌される(内分泌相)。このように、甲状腺濾胞上皮細胞は、極性の乏しい内分泌細胞とも、極性は明瞭だが分泌動線の単純な外分泌腺の腺房細胞とも異なる、双方向性の分泌動線を有し、その結果、ゴルジ装置が円筒状の特異な構築をとるのではないかと推測された。

このような学術的背景及び着想を元に、双方向性の蛋白輸送動線を持つ甲状腺濾胞細胞をひとつの「補助線」とすれば、ゴルジ装置の大局的構造を新たな指標として生体内の多様な分泌細胞をうまく類型化して整理できるのではないかと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

上述した研究の背景を踏まえて、本研究期間内には、具体的に以下の点について検討した。

- (1) まず、蛋白輸送動線が異なる様々な分泌細胞のゴルジ装置の構築・微細構造の特徴と多様性を把握する。特に、ゴルジ装置全体の形態(大局的構造)・極性(cis/transの方向性)と微小管の構築や中心小体の位置との関係性を明らかにする。
- (2) 次に、刺激と応答の因果関係が明瞭な内分泌細胞を材料として、分泌細胞の機能状態の変化がゴルジ装置の構築・微細構造にどのような影響を及ぼすか、明らかにする。
- (3) さらに、動物個体への微小管重合阻害剤の投与により、微小管の破壊が生体で多様な形態をとるゴルジ装置の構造にどのような影響を与えるか、明らかにする。

このような解析を通して、分泌細胞の蛋白輸送動線とゴルジ装置の大局的構造との関係性を明らかにし、動物個体内で機能分化した多様な分泌細胞の細胞内構造の秩序形成・維持機構に関して、細胞表面の領域化の有無だけにとらわれない、より生理的妥当性のある新たな分類理論を確立したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) 形態学的解析法

① 様々な分泌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 (ウィスター系雄ラット、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、甲状腺、下垂体、膵臓、唾液腺、肝臓の各組織の半分

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上記組織を 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% 燐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、中心小体の指標とした 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既に先行研究の論文 (J Histochem Cytochem 60:588-602 (2012) doi: 10.1369/0022155412448791) に詳細に記載)。

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、633 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方法については、上記先行研究の論文 (JHC 60:588-602 (2012)) に詳細に記載した。特に、本研究の主題である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) を元に顕微鏡附属のソフトウェアを用

いて細胞内のゴルジ装置全体の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、上記先行研究の論文 (JHC 60:588-602 (2012)) に詳細に記載した。具体的には、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、本研究期間中に本学に着任した甲賀大輔准教授が改良 (Arch. Histol. Cytol. 69: 357-374 (2006)) したオスミウム浸軟法に従って、固定した種々の組織を 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、細胞内におけるゴルジ装置の立体微細構造を走査電子顕微鏡を用いて解析した。

(2) 実験内分泌学的動物モデルの作成と標本採取

本研究課題では、さらに甲状腺濾胞上皮細胞の機能状態を人為的に変化させ、同細胞の特徴的なゴルジ装置の立体構築が、どのように変化するか検討した。具体的には、視床下部-下垂体-甲状腺-液性調節系の様々なレベルに作用する以下の薬剤を雄ラットに持続投与し、甲状腺濾胞上皮細胞における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 **サイロキシン(T4):** 甲状腺濾胞上皮細胞で産生・分泌される T4 は、末梢組織の標的細胞に対して固有のホルモン作用をもたらすと同時に、視床下部ニューロンや下垂体前葉 TSH 分泌細胞に対してはネガティブフィードバック性の抑制作用を発揮する。その結果、甲状腺濾胞上皮細胞の機能は強く抑制され、ホルモン中間生成物であるサイログロブリン (TG) の生合成や甲状腺ホルモンの生成・分泌が著しく阻害される。そこで脂溶性のホルモンである T4 結晶をシリコンチューブに封入したものを雄ラット背部皮下に埋め込み、1日から7日まで T4 を持続的に作用させ甲状腺濾胞上皮細胞の機能を抑制した場合に生じるゴルジ装置の構造変化を、上述した実験方法で検討した。

② **プロピルチオウラシル(PTU):** 甲状腺濾胞

上皮細胞における TG のヨード化を阻害する抗甲状腺剤 PTU は、活性のある甲状腺ホルモンの生成を強く阻害するため、視床下部ニューロンや下垂体前葉 TSH 分泌細胞に対するネガティブフィードバック制御がかからなくなる。その結果、甲状腺濾胞上皮細胞の機能は強く促進され、ホルモン中間生成物である TG の生合成が著しく更新する。そこで PTU を雄ラットの飲水に 0.1% の濃度で混入し飼育することで、1 日から 7 日まで持続的に甲状腺濾胞上皮細胞の機能を促進した場合に生じるゴルジ装置の構造変化を、上述した実験方法で検討した。

③ 甲状腺刺激ホルモン放出刺激ホルモン (TRH) : より直接的に視床下部-下垂体前葉-甲状腺-液性調節系を刺激するために、下垂体前葉 TSH 産生細胞のホルモン産生・分泌を強く刺激する TRH を充填した浸透圧ポンプ (ALZET 社製) を雄ラット背部皮下に埋め込み、1 日から 7 日まで TRH を持続的に作用させた。この処置で甲状腺濾胞上皮細胞の機能を促進した場合に生じるゴルジ装置の構造変化を、上述した実験方法で検討した。

(3) 微小管重合阻害剤の影響の解析 : ゴルジ装置の構造維持に深く関与する微小管に対して破壊効果のあるコルヒチンを腹腔投与 (5mg/kg BW) した雄ラットを投与から 30 分~8 時間後に灌流固定し、甲状腺濾胞上皮細胞と下垂体前葉の LH/FSH 産生細胞でゴルジ装置の微細構造や分子局在の経時的変化を比較・解析した。

4. 研究成果

(1) 様々な分泌細胞におけるゴルジ装置の大局的構造の比較

まず、対照群雄ラットの下垂体、膵臓、唾液腺、甲状腺を材料とし、オスミウム浸軟標本の SEM 観察や光顕・電顕レベルの免疫組織化学法などの技法を用いて、各器官の構成細胞のゴルジ装置の形態や中心小体の位置、微小管構築などの特徴を比較・検討した。

その結果、全方向性にホルモンを分泌する細胞極性の乏しい下垂体前葉の内分泌細胞では、ゴルジ装置は基本的に球状の構築をとっていた。ゴルジ層板のシス-トランスの向きは、外側がシス側、内側がトランス側で、微小管の起点となる中心小体 (MTOC ; microtubule organizing center) は、ゴルジ装置の内部のトランス側に位置していた。ただ細胞種ごとに詳細に立体構造を観察すると、LH/FSH 産生細胞や TSH 産生細胞ではゴルジ装置の形態は球に近く大型であったのに対して、PRL 産生細胞や GH 産生細胞ではゴルジ装置の一部は近接する細胞核に圧排され帽状に変形していた。このようなゴルジ装置の形態の特徴は、細胞種ごとに異なる中心小体と細胞核との位置関係に依存して決定されるように思われた。

これに対して、基底側から腺腔側へ向かう

単方向性の分泌動線を持つ膵外分泌部や唾液腺の腺房細胞では、ゴルジ装置のトランス側が細胞の腺腔側に向かって大きく開口し、杯状の構築をとっていた。ゴルジ層板は内分泌細胞で見られた板状のものとは比べて空隙が多く網状の構造を呈していた。細胞内の微小管の起点となる中心小体は、腺腔側細胞膜直下に局在し、中心小体とゴルジ装置トランス側とが対向するという位置関係については、内分泌細胞でも外分泌細胞でも変わらない普遍的な所見であることが明らかになった。

これら典型的な内分泌細胞や外分泌細胞と異なり、腺腔側-基底側間で双方向性の分泌動線を有する甲状腺濾胞上皮細胞のゴルジ装置は、円筒状/環状の形態をとっていた。そこで、この甲状腺濾胞上皮細胞におけるゴルジ装置の微細構造・極性、および微小管構築について、さらに詳細に検討した。

(2) 甲状腺濾胞上皮細胞におけるゴルジ装置と微小管の構築

① ゴルジ装置の微細構造 : 通常の透過電子顕微鏡観察では、甲状腺濾胞上皮細胞の断面の方向性が一定ではないため、細胞内でのゴルジ全体の立体的な構築がどのようなものであるかについて、有用な情報は得られなかった。そこで、まず、ゴルジ装置のシス側およびトランス側のマーカー蛋白である抗 GM130 抗体と抗 TGN 抗体で 15 μ 厚の凍結切片を免疫組織化学標識し、共焦点レーザー顕微鏡で連続的な光学断層像を撮影し立体再構築することで、甲状腺濾胞上皮細胞内のゴルジ装置の全体像を観察した。その結果、同細胞のゴルジ装置は核上部 (濾胞腔側) に円筒状の構築を形成しているのが明らかになった。さらに、連続切片 SEM 観察法でゴルジ装置全体をカバーする領域を撮影し立体再構築したところ、やはり共焦点レーザー顕微鏡観察で観察した所見と同様に、ゴルジ装置が連続的に円筒状の構築を形成して核上部に位置することを確認できた。このゴルジ装置を構成するゴルジ層板は空隙が乏しい板状のものであり、同細胞の細胞質を空間的に区分しているような印象を受けた。

② ゴルジ装置の極性 : 甲状腺濾胞上皮細胞のゴルジ装置が立体的には円筒状であることから、そのシス側とトランス側を免疫組織化学法で同定したところ、ゴルジ装置の環状の断面で細胞側壁に面している外側が抗 GM130 抗体で標識されるシス側、細胞核に面している内側が抗 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、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から細胞の濾胞腔側の細胞膜直下に限局・集積しており、核上部の円筒状のゴルジ装置の内側がゴルジ装置トランス側であることが確認された。

③ 微小管ネットワークの構築 : さらに、甲

甲状腺濾胞上皮細胞でゴルジ装置の形態形成や構築維持に深く関与すると考えられる微小管ネットワークの構築を免疫組織化学法と共焦点レーザー顕微鏡観察で解析した。その結果、 γ -チユブリンで標識される中心小体は、膵臓や唾液腺の腺房細胞など外分泌細胞と同様に、濾胞腔側細胞膜直下に位置していた。 α -チユブリンはこの中心小体の近傍の濾胞腔側細胞膜直下に強く集積して水平な網工を形成した後、隣接細胞との境界部付近で基底側へ方向を変え、細胞側壁と円筒状のゴルジ装置のシス面との間を下方に走行しながら放散した。

以上の観察成果は、第120回日本解剖学会全国学術集会(2015年3月、神戸)と第61回日本解剖学会東北北海道連合支部学術集会(2015年8月、盛岡)で報告した。

(3) 実験内分泌学的処置により甲状腺濾胞上皮細胞を刺激あるいは抑制した場合に生じるゴルジ装置構築の変化

対照群ラット甲状腺濾胞上皮細胞で観察された円筒状のゴルジ装置の特徴的な形態に着目して、同細胞の機能状態を人為的に変化させた場合に、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、TRHや抗甲状腺剤PTUの持続投与で同細胞におけるTG生合成を亢進させると、円筒状のゴルジ装置は細胞の長軸に沿って網状に増生したが、大局的には円筒状の構築は維持されていた。一方、T4持続投与で同細胞におけるTG生合成を抑制すると、ゴルジ装置は円筒状から環状に平坦化した。

以上の所見から、分泌細胞における分泌蛋白産生量とゴルジ装置量には一定の相関性が認められるが、細胞固有の位相幾何学的な大局的構造は基本的に維持されることが示唆された。

この視床下部-下垂体-甲状腺調節系に対する実験内分泌学的な処置で生じるゴルジ装置の構築の変化に関しては、第120回日本解剖学会全国学術集会(2015年3月、神戸)で報告した。

(4) 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、甲状腺濾胞上皮細胞と下垂体前葉LH/FSH産生細胞のゴルジ装置の形態や分子局在にどのような変化が生じるか、検討した。

比較対象とする典型的な内分泌細胞のLH/FSH産生細胞では、先行研究でも明らかにしたように、コルヒチン腹腔投与後60分以内の早期に細胞周辺部を中心に多数の空胞の形成が認められた。この空胞膜上には、コルヒチン投与前にはゴルジ装置シス側に局在していたp23分子が局在し、微小管破壊の影響がまず粗面小胞体からゴルジ装置への輸送小胞の空胞化として現れることが明らかにになった。同様の空胞形成・貯留は、甲

状腺濾胞上皮細胞内でも認められ、この変化は組織・細胞の違いによらず普遍的な現象であることが示唆された。

一方、コルヒチン投与から4~8時間が経過すると、LH/FSH産生細胞では、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ゴルジ層板が挟まれた局所的な層序構造は保たれているものの、ゴルジ装置の側方連続性は著しく損なわれ断片化した。これに対して、甲状腺濾胞上皮細胞のゴルジ装置はコルヒチン投与後4~8時間が経過しても断片化することはなかった。その代わりに、円筒状の構築をとっていたゴルジ装置から細胞の基底側に向かって垂直軸方向に多数の突起状構造が伸展し、ゴルジ装置の大局的構造が経時的に乱れていくのが観察された。この場合でも、シス-トランス層板の挙動は一致しており、微小管の破壊はゴルジ装置全体の構造変化を誘起するものの、局所的なゴルジ装置の基本構造には影響を及ぼさないことが示唆された。

以上の研究成果は、第61回日本解剖学会東北北海道連合支部学術集会(2015年8月、盛岡)で報告した。

(5) 本研究の総括と今後の展望

本研究によって、甲状腺濾胞上皮細胞におけるゴルジ装置の大局的構造が明らかになり、内分泌細胞で見られる球状のゴルジ装置と外分泌細胞で見られる杯状のゴルジ装置との間の形態学的ギャップを連続的に補完することができた。また、これらの分泌細胞におけるゴルジ装置の大局的構造と中心小体の細胞内位置の間には一定の関係性が認められ、細胞固有のゴルジ装置の大局的構造を決定する主要因は分化した細胞内における中心小体の局在・定位機構である可能性が示唆された。これらの知見から、本研究で当初目的としていた「ゴルジ装置の大局的構造を新たな指標として生体内の多様な分泌細胞をうまく類型化する新たな仮説を構築する」については、一定の成果が得られたと思われる。この「ゴルジ装置の大局的構造と多様な分泌細胞の類型化に関する仮説」に関しては、Gordon Research Conference on Protein Processing, Trafficking & Secretion(2014年7月、New London, NH, USA)、および第121回日本解剖学会全国学術集会・解剖学会/生理学会合同シンポジウム「分泌現象の解剖と生理」(2016年3月、郡山)で報告した。

加えて、今回の研究成果から、視床下部-下垂体-甲状腺液性調節系を人為的に擾乱することにより甲状腺濾胞上皮細胞のゴルジ装置に特徴的な変化が生じることが明らかになったので、本研究の実験系は、今後、ゴルジ装置の機能と構造の関係性を検討していく上での有用な動物実験モデルとなり得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5件)

① Koga D, Ushiki T, Watanabe T: Novel scanning electron microscopy methods for analyzing the 3D structure of the Golgi apparatus. *Anat Sci Int* 92:37-49 (2017) doi: 10.1007/s12565-016-0380-8、査読あり

② Koga D, Bochimoto H, Kusumi S, Ushiki T, Watanabe T: Changes in the three-dimensional ultrastructure of membranous organelles in male rat pituitary gonadotropes after castration. *Biomed Res* 38:1-18 (2017) doi: 10.2220/biomedres.38.1、査読あり

③ Koga D, Bochimoto H, Watanabe T, Ushiki T: Backscattered electron image of osmium-impregnated/macerated tissues as a novel technique for identifying the cis-face of the Golgi apparatus by high-resolution scanning electron microscopy. *J Microsc* 263:87-96 (2016) doi:10.1111/jmi.12379、査読あり

④ Koga D, Kusumi S, Bochimoto H, Watanabe T, Ushiki T: Correlative Light and Scanning Electron Microscopy for Observing the Three-Dimensional Ultrastructure of Membranous Cell Organelles in Relation to their Molecular Components. *J Histochem Cytochem* 63:968-979 (2015) doi:10.1369/0022155415609099、査読あり

⑤ Watanabe T, Bochimoto H, Koga D, Hosaka M, Ushiki T: Functional Implications of the Golgi and Microtubular Network in Gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol* 385:88-96 (2014) doi:10.1016/j.mce.2013.10.003、査読あり

[学会発表] (計9件)

① 甲賀 大輔、久住 聡、柴田 昌宏、渡部 剛 「連続切片 SEM 法による内分泌細胞ゴルジ装置の 3D 構造解析」第 122 回日本解剖学会全国学術集会 (2017 年 3 月 29 日、長崎)

② 甲賀 大輔、久住 聡、暮地本 宙己、牛木辰男、渡部 剛 「SEM による準超薄切片の超薄像観察」第 62 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 (2016 年 9 月 3 日、帯広)

③ 堀 淳一、暮地本 宙己、甲賀 大輔、柿崎秀宏、渡部 剛 「GnRH antagonist 持続投与による下垂体前葉性腺刺激ホルモン産生細胞の微細構造変化」第 62 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 (2016 年 9 月 3 日、帯広)

④ 甲賀 大輔、久住 聡、暮地本 宙己、牛木

辰男、渡部 剛 「最先端の 3D イメージング技法によるゴルジ装置の形態的多様性の観察」第 121 回日本解剖学会全国学術集会・シンポジウム「変動するオルガネラ膜が生み出す生命現象の「場」」(2016 年 3 月 30 日、郡山)

⑤ 渡部 剛、暮地本 宙己、甲賀 大輔 「ゴルジ装置の大局的構造と分泌動線から見た分泌細胞の類型化の試み」第 121 回日本解剖学会全国学術集会・解剖学会/生理学会合同シンポジウム「分泌現象の解剖と生理」(2016 年 3 月 28 日、郡山)

⑥ 渡部 剛、暮地本 宙己、甲賀 大輔 「ラット甲状腺濾胞上皮細胞におけるゴルジ装置と微小管の構築」第 61 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会(2015 年 8 月 29 日、盛岡)

⑦ 渡部 剛、暮地本 宙己 「Ring-shaped Golgi apparatus observed in the epithelial cells of rat thyroid follicles.」第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2015 年 3 月 21 日、神戸)

⑧ 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」第 60 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 (2014 年 9 月 6 日、福島)

⑨ Watanabe T : Overall shape of the Golgi apparatus and intracellular organization of secretory cells: the significance of the spherical Golgi in the pituitary gonadotropes. Gordon Research Conference on Protein Processing, Trafficking & Secretion. (2014 年 7 月 24 日、New London, NH, USA)

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

暮地本宙己 (BOCHIMOTO HIROKI)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：60632841