

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 24 年 4 月 3 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 秋田県立大学  
職名 教授  
申請代表者 穂坂正博  
勤務先所在地 〒010-0195  
秋田市下新城中野字街道端西 241-438  
電話番号 018-872-1500  
ファックス番号 018-872-1670  
Eメール mhosaka@showa.gunma-u.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:11019)

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	内分泌細胞の分泌顆粒形成機構の解明			
2. 共同研究目的	セクレトグラニン III(SgIII)が内分泌細胞の分泌顆粒形成に果たしている役割の解明をめざし、群馬大学生体調節研究所で確立された SgIII に関するノックダウン実験系(培養細胞)および SgIII ノックアウトマウスを材料として、生化学的解析と形態学的解析を行なう。			
3. 共同研究期間	平成 23 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担
(申請代表者) 穂坂正博	45 歳	秋田県立大学	教授	免疫組織化学を中心とした形態学的解析
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分泌制御分野	氏名	鳥居 征司

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

群馬大学 生体調節研究所 分泌制御分野(鳥居征司准教授)と秋田県立大学 応用生物科学科(穂坂正博)の研究グループは、内分泌細胞においてペプチドホルモンが分泌顆粒へと選別輸送される機構を解析しており、その過程でセクレトグラニンIII(SgIII)が重要な役割を果たすことを見出した。すなわち、SgIIIの発現を細胞レベルで抑制すると分泌顆粒へのホルモン輸送が大きく障害され、さらにゴルジ装置や分泌顆粒の微細構造や分子局在にも異常が生じる。

そこで本研究では、siRNA で SgIII の発現を抑制した細胞と SgIII 欠損マウスを用いて、生化学的解析と形態学的解析の両面から SgIII が内分泌顆粒形成に果たす役割の解明を進める。具体的には、内分泌細胞株(AtT20 細胞、MIN6 細胞など)および SgIII 欠損マウス内分泌組織(下垂体、胰島、副腎など)を材料として、ペプチドホルモンの細胞内での保持、分泌刺激に対する応答、およびホルモン分泌に関わる細胞内小器官の微細構造と機能分子局在の変化・異常を生化学的解析(細胞分画、ホルモン分泌アッセイなど)と形態学的解析(共焦点レーザー顕微鏡による免疫染色組織など)の両面から詳細に検討する。

## 7. 共同研究の成果上記

研究計画に基づいて、マウス脳下垂体由来の培養細胞株 AtT20 細胞における SgIII の発現を siRNA によりノックダウンし、ホルモン(ACTH)の細胞内局在、マーカータンパク質の局在、グラニンファミリータンパク質の局在を調べたところ、1) SgIII の発現抑制でゴルジ装置 trans 側の膜が過剰になり顕著に空胞化すること、2) 分泌顆粒数が減少すること、3) ホルモンの調節性経路による分泌が減少すること、を見出した。一方、このような状態でもセクレトグラニンII(SgII)陽性で ACTH を蓄積した分泌顆粒は正常に形成されることから、内分泌細胞には少なくとも 2 系統以上の分泌顆粒形成システムが存在することが示唆された。そこで SgII がホルモンを分泌顆粒へ輸送するか検証した。まず SgII の顆粒内局在を調べたところ、SgII は高コレステロール組成の分泌顆粒膜に局在することを確認した。またホルモンの凝集能実験によると SgII が POMC を凝集することを明らかにした。以上のことから、SgII は SgIII と同様に分泌顆粒にホルモンを運ぶことが明らかとなった。

この所見に基づいて、さらにより生体に即した条件で SgIII の発現抑制の影響を解析するため、この共同研究期間中に 2 回(2011 年 5 月、11 月、2011 年 3 月)生体調節調節研究所・分泌制御分野に滞在し、SgIII 欠損マウスを分与していただき、現在秋田県立大学でマウスを繁殖させてホルモン分泌実験を進めている。また、上記共同研究で得られた知見は、論文として投稿し、現在リバイス中である。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを 1 部提出してください。)

(学会発表)

神経内分泌細胞の分泌顆粒形成機序; 穂坂正博; 第 18 回秋田応用生命科学研究会; 2012 年 5 月 27 日

(論文)

Multiple sorting systems for the secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones in endocrine cells; Meng Sun, Tsuyoshi Watanabe, Hiroki Bochimoto, Yuko Sakai, Seiji Torii, Toshiyuki Takeuchi, and Masahiro Hosaka; リバイス中 J. Cell. Sci.