

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 25 年 4 月 22 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 日本大学生物資源科学部  
 職名 准教授  
 研究代表者 五味 浩司  
 勤務先所在地 〒252-0880  
 神奈川県藤沢市亀井野 1866  
 電話番号 0466(84)3530  
 ファックス番号 0466(84)3530  
 E-メール gomi.hiroshi@nihon-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 12026 )

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	プロジェクト名: (1)「代謝疾患ゲノム研究プロジェクト」、 (○で表示) ○ (2)「代謝シグナル機能研究プロジェクト」 (3) その他、((1)と(2)のいずれにも関連し区分できない場合等) 共同研究課題名: 分泌顆粒膜蛋白質フォグリンの消化管における役割の解明				
2. 共同研究目的	フォグリンは神経内分泌細胞に限定発現し、ホルモン分泌顆粒に局在し機能する膜蛋白質である。本研究ではインクレチンを発現する消化管内分泌細胞に着目し、フォグリンの発現解析などを通じてその役割の解明を目指す。				
3. 共同研究期間	平成 24 年 4 月 1 日 ~ 平成 25 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
(研究代表者) 五味 浩司  (分担研究者)		48	生物資源科学部 獣医学科	准教授	研究全体の遂行と総括
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

フォグリンは神経内分泌組織に限定発現する膜蛋白質であるが、1型糖尿病の自己抗原として認知されることから、膵臓β細胞においてその解析が進められてきた。共同研究者である生体調節研究所の鳥居准教授によって作成されたフォグリンおよびその相同蛋白質 IA2 に対する特異的なウサギ抗体を利用し、申請者は膵β細胞のみならず、発生が共通している腸管内分泌細胞に注目し、これらの蛋白質がラットの胃および小腸粘膜においても発現していることを見出した。そこで本研究ではまず、種々のホルモン抗体を用いて、フォグリンとIA2を発現する内分泌細胞を同定する。また、フォグリン細胞表面抗体を使用して腸管内分泌細胞を分離し、特異的培養細胞の樹立を目指す。種々のホルモン抗体を利用して細胞の特定を行うため、マウスおよびラットモノクローナル抗体を作製する。この際、フォグリン・IA2間で相同性が低いMatN領域を抗原とする。MatN領域は糖鎖が付加しているため、His タグを付けた MatN 領域を大量発現用哺乳動物細胞 293F に発現させ、回収した培地から His-MatN を精製する。MatN 領域は細胞膜に出現したフォグリンの細胞外部に位置する。作製した抗体に磁気や担体を標識し、これ利用し FACS やカラムによる内分泌細胞の分離を試みる。

#### 7. 共同研究の成果

平成24年度に実施した共同研究は、鳥居氏が作製したフォグリンと IA2 に対する特異的なウサギ抗体と消化管組織で発現している多種のホルモン抗体を用いて、フォグリンと IA2 が発現している腸管内分泌細胞の種類を免疫組織化学的に解析した。これらの抗体は、マウスのタンパク質のアミノ酸配列に基づいて作成されたものであるため、まず、これらの抗体がラット由来のそれぞれのタンパク質に特異的に反応するものであるかどうかの検定を行った。方法としては、ラット膵β細胞株 INS-1 にフォグリンおよび IA2 に対する shRNA 発現アデノウイルスを感染させ、内在性タンパク質の発現が特異的に抑制されることをイムノプロット法および蛍光抗体法によって確認した。続いて、イムノプロット法により、ラットの脳、下垂体、膵島といった代表的な発現組織に加え、胃および小腸において内在性タンパク質の発現を確認した。免疫組織化学的解析により、いくつかの知見が得られた。それらは次の4点に要約することができる。①解析に用いた抗体は、パラフィン包埋組織切片に適応する際、クエン酸緩衝液中での抗原賦活化処理を施すことによって十分なシグナルが検出できるようになること、②8種類の代表的な消化管ホルモン(セロトニン、グレリン、ソマトスタチン、インクレチン/GIP および GLP-1、セクレチン、グルカゴン、コレキストキニン/ガストリン-1)に対する抗体との二重染色によって、グレリンを除く各種ホルモンはフォグリンあるいはIA2と共発現していること、③フォグリンとIA2の発現様式は全体としてよく類似していること、④フォグリン・IA2間の発現様式の差異としては、ソマトスタチン、インクレチンおよびグルカゴン発現細胞の割合が、フォグリンに比べ IA2 においてやや低い傾向にあること、などが明らかとなった。以上の結果から、本研究成果は、これら遺伝子の全身性ノックアウトマウスの表現型解析において推察されている糖代謝あるいはインスリン分泌に関わる遺伝子作用において、膵島のみならず消化管組織を加えた膵-消化管連関を踏まえた解釈に一定のヒントを与えるものである。

#### 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。)

Gomi H, Kubota-Murata C, Yasui T, Tsukise A, Torii S.

Immunohistochemical analysis of IA-2 family of protein tyrosine phosphatases in rat gastrointestinal endocrine cells. *J. Histochem. Cytochem.* 61(2): 156-168, 2013.