

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 28 年 4 月 25 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 教授  
研究代表者 五味 浩司

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:15012)

1. 共同研究課題名	ペプチドホルモン生成と分泌顆粒形成機構の連関を探る			
2. 共同研究目的	内分泌細胞内において、ペプチドホルモンの生成と分泌顆粒の形成は密接に関連していると考えられる。本研究では、両者に関わる分泌顆粒タンパク質 IA2 ファミリー、並びにグラニン蛋白質の解析を行い、その連関機構を探究する。			
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 五味 浩司	生物資源科学部	教授	研究全体の遂行と総括	
(分担研究者)				
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

神経内分泌系におけるホルモン分泌機能の異常や破綻は、糖尿病をはじめとする多くの生活習慣病に関与している。糖尿病・肥満モデルマウス fat/fat の責任遺伝子カルボキシペプチダーゼ E(CPE)は、ペプチドホルモン前駆体の変換酵素であり、またホルモンの輸送や分泌顆粒の形成にも関わる。申請者は、共同研究者の鳥居氏らとともに、分泌顆粒特異的な蛋白質である IA2 ファミリーおよびグラニン蛋白質 Sg3 が、CPE と相互作用してホルモンの選別輸送過程を制御することを示してきた。本研究では、当該研究所で作製された IA2b および Sg3 のノックアウトマウスを組織化学的に解析し、ホルモン分泌細胞において、これらの蛋白質が分泌顆粒の形成・成熟に機能することを明らかにする。また欠損マウス由来内分泌細胞を使用し、ペプチドホルモンのプロセッシングや動態を詳しく解析する。

CPE を欠損する fat/fat マウス、Sg3 ノックアウトマウス、そして IA2b ノックアウトマウスを使用し、下垂体や膵島の組織サンプルを作製して、電子顕微鏡による分泌顆粒形態の観察を行う。とくに膵島においては、顆粒形成・成熟関連蛋白質やインスリン前駆体(プロインスリン)の特異抗体を用いて免疫電顕観察を行う。ノックアウトマウスから単離・培養した内分泌細胞(膵島β細胞など)、あるいはゲノム編集技術で IA2 や Sg3 をノックアウトした MIN6、AtT20 細胞の安定株を作製し、ホルモンや分泌顆粒の動態解析に用いる。

#### 4. 共同研究の成果

Sg3 ノックアウトマウスと IA2β ノックアウトマウスを使用し、様々な条件においたこれらのマウスから下垂体や膵島の組織解析用サンプルを調整した。まず、IA2β KO マウスの膵組織の形態生化学的解析を実施した。IA2β の膵β細胞におけるインスリンの顆粒への選別輸送や糖刺激時の細胞増殖への関与を in vivo 系で調べる目的で、ホルモン含有、顆粒輸送、ホルモン分解および細胞増殖性などの指標となる分子群(インスリン、IA-2、Rab27a、細胞増殖マーカーPCNA、カテプシン)の発現解析を免疫組織化学法とイムノプロット法により行った。PCNA の発現解析から、糖負荷などのインスリン分泌の誘導をかけない定常時では、膵β細胞の増殖性変化は細胞系と比べ顕著なものではなかった。また、ファミリー分子 IA2、Rab27a、カテプシンの発現が認められたが、特にカテプシン D の発現量の増加が認められた。これらの結果から、これまでに判明している IA2β の膵β細胞の増殖性への関与は、インスリン分泌あるいはインスリンシグナルに関連した現象であることが強く示唆された。また、カテプシン D の発現変化は、分泌顆粒の代謝において IA2β が何らかの関与を有するものと考えられる。そこで、膵島の一般観察用およびインスリン顆粒膜の膜修飾解析用の電子顕微鏡標本を作成した。形態解析は、ブライントレストにより行い、分泌顆粒数やリソソーム様構造の蓄積など、IA2β KO マウスに特有の変化を追究しつつある。

また、in vitro 系では、新たに IA2β や Sg3 遺伝子をノックアウトした細胞株を樹立する目的で、ゲノム編集技術の1つである、TALEN 法を検討した。これまでに Collectis 社のサーチでヒットした特異的配列を含むターゲットベクター(右鎖および左鎖)の構築を完了した。

#### 5. 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を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出して下さい。)

Gomi H, Morikawa S, Shinmura N, Moki H, Yasui T, Tsukise A, Torii S, Watanabe M, Maeda Y, Hosaka M. Expression of secretogranin III in chicken endocrine cells: Its relevance to the secretory granule properties of peptide prohormone processing and bioactive amine content.

J. Histochem. Cytochem. 63(5): 350-366, 2015.