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 23 年　4 月 18 日

群馬大学生体調節研究所長　殿

所属機関名　国立大学法人　旭川医科大学
職名　教授
研究代表者　渡部　剛
勤務先所在地　〒078－8510
北海道旭川市緑が丘東 2 条 1-1-1
電話番号　0166-68-2310
ファックス番号　0166-68-2319
E-メール　tyshwata@asahikawa-med.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	**siRNA によるノックダウン実験とノックアウトマウスを用いたセクレトグラニン III（SgIII）の機能解析**
2. 共同研究目的	SgIII が内分泌機能制御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において穂坂正博博士が確立した 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の両面から、旭川医科大学解剖学講座の渡部剛と暮地本宙己が加わった共同研究グループで検討する。
3. 共同研究期間	平成 22 年 4 月 1 日　～　平成 23 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） 渡部　剛	50 歳	旭川医科大学	教授	免疫組織化学を中心とした形態学的解析
（分担研究者） 暮地本宙己	29 歳	旭川医科大学	大学院生	電顕観察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	穂坂正博

※　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

我々（旭川医科大学解剖学講座顕微解剖学分野（渡部剛、暮地本宙己）と群馬大学生体調節研究所分泌制御分野（穂坂正博））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 を含むグラニン蛋白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 が内分泌顆粒形成および内分泌機能制御に果たす役割の解明を進める。具体的には、培養内分泌細胞（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、膵島、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、ホルモンアッセイ、ウエスタンブロット、免疫沈降など）と形態学的解析（電顕観察、免疫組織化学など）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、まずマウス ACTH 細胞由来の培養細胞株 AtT20 細胞における SgIII の発現を siRNA によりノックダウンし、分泌経路を構成する細胞内膜系小器官の微細構造と分子局在の変化を免疫組織化学法と電子顕微鏡観察で解析した。その結果、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を見出した。この空胞内には SgIII と特異的に結合するクロモグラニン A(CgA)が単独で凝集していたが、trans 側ゴルジ膜との結合を仲介する SgIII を欠くため、分泌顆粒膜となる膜領域をまとめて独立したコンパートメントを形成することができず、その結果、ゴルジ装置 trans 側が空胞化したものと考えられた。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し、生体の液性調節に重要な役割を果たしているホルモン分泌が損なわれないよう、ある一系統の分泌顆粒形成が障害されても他の系統の分泌顆粒がその機能を補うことができる冗長性のあるシステムが構成されていることが示唆された。

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（2010 年 10 月、2011 年 2 月）生体調節調節研究所・分泌制御分野に滞在し、SgIII 欠損マウスの内分泌組織（下垂体、膵臓、副腎）を採取して形態学的解析用の樹脂包埋組織標本を作成した。現在、透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いて総合的に SgIII の欠損によってこれらの内分泌組織の細胞に生じた変化の解析を進めているところである。また、上記共同研究で得られた知見の一部は、この共同研究期間中に下記の学会発表および研究論文で報告した。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

（学会発表）

(1)渡部剛、暮地本宙己、穂坂正博:「**内分泌細胞におけるグラニン蛋白の役割**」、第 88 回日本生理学会大会/116 回日本解剖学会全国学術集会・合同大会　シンポジウム「内分泌細胞における新たな分泌制御機構と分泌現象」、2011 年 3 月 28 日、横浜（東日本大震災のため J Physiological Sciences 誌（Vol.61, supplement1）での紙上開催に変更）

（研究論文）

(1) Hosaka M and Watanabe T.: “**Secretogranin III: a bridge between core hormone aggregates and the secretory granule membrane.**”, Endocrine J. 57:275-286, 2010