

Yeast two hybrid 法による 分泌顆粒への蛋白選別輸送機構の解析

(課題番号11670011)

平成11年度～平成13年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

平成14年 3 月

研究代表者 渡部 剛

(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

分泌小胞・分泌顆粒を経て細胞外へ放出される分泌蛋白群および細胞のリソゾーム内で不要物の分解にあたる水解酵素群は、ともにシグナルペプチドを持ち、粗面小胞体からゴルジ複合体まで細胞内小胞輸送によって運ばれる。現在までの知見では、ゴルジ複合体の出口であるtrans-Golgi Network(TGN)まで、これらの蛋白は一緒に輸送され、TGNでそれぞれの目的地ごとに仕分けされ、最終的な局在部位へと運ばれる。しかしながら、このTGNで蛋白を目的地ごとに選別する機構については不明の点が多く、特に内分泌細胞において特定のホルモン・生理活性物質だけがなぜ分泌顆粒に蓄積され、分泌刺激が到来するまで細胞内に保持されるのかについては、解明されていない。

本研究では内分泌細胞の分泌顆粒に特異的に局在することで知られている一群の酸性分泌蛋白、グラニン蛋白群に注目し、その分泌顆粒への選別輸送機構に関わる分子の同定を試みた。

研究組織

研究代表者：渡部 剛 (旭川医科大学医学部・教授)
(研究者番号80220903)

研究経費

平成11年度	1,500 千円
平成12年度	1,100 千円
平成13年度	1,000 千円
計	3,600 千円

研究発表

1. 原著論文

Chromogranin A requires specific binding to secretogranin III for the targeting to secretory granules. M. Hosaka, T. Watanabe, Y. Sakai, Y. Uchiyama, and T. Takeuchi (投稿中)

2. 口頭発表

- (1) 第106回日本解剖学会総会 (平成13年4月、高知)
「下垂体前葉におけるセクレトグラニンIII (SgIII) の局在」
渡部 剛、平 義樹、阪井裕子、春見達郎
- (2) 第54回日本細胞生物学会大会 (平成13年5月、岐阜)
ワークショップ「内分泌制御の新展開」
「分泌顆粒形成におけるグラニン蛋白の役割」
渡部 剛、穂坂正博
- (3) 第74回日本生化学会大会シンポジウム (平成13年10月、京都)
シンポジウム「神経内分泌の機能発達」
「分泌顆粒形成におけるグラニン蛋白の役割」
渡部 剛、穂坂正博
- (4) 第3回環太平洋解剖学会会議 (The 3rd APICA) (平成14年3月、浜松)
「Roles of Granins in the secretory granule formation in endocrine cells.」
渡部 剛、穂坂正博

研究成果

研究の背景と目的

内分泌細胞において、ペプチドホルモンや生理活性物質は分泌刺激を受けて細胞外に放出されるまでの間、分泌顆粒に蓄えられている。しかしながら、特定のホルモン・生理活性物質だけがなぜゴルジ複合体から分泌顆粒に輸送され、分泌刺激が到来するまで保持されるのかについては未だ解明されていない。

研究代表者は、これまで、内分泌細胞に特異的に発現している機能未知の分泌蛋白、クロモグラニン・セクレトグラニン蛋白群（以下グラニン蛋白群と呼ぶ）に注目して、内分泌顆粒への蛋白選別輸送に関して解析を進めてきた。その過程で、代表的なグラニン蛋白であるクロモグラニンA(CgA)とセクレトグラニンII(SgII)が、雄ラット性腺刺激ホルモン産生細胞で2種類の分泌顆粒に別々に振り分けられて局在することを見出した。さらに分泌刺激条件下や性ステロイド持続投与時の同細胞内でのCgAとSgIIの局在・発現量の変化を検討し、これらの蛋白が分泌顆粒の基質としての役割を果たしている可能性を示してきた。

このようなグラニン蛋白群は、原則的に一カ所の内分泌細胞から分泌されるペプチドホルモンや生理活性物質とは異なり、さまざまな内分泌細胞で広く発現し、しかも内分泌細胞内では必ず選択的に分泌顆粒に輸送される。このためグラニン蛋白群はホルモン・生理活性物質の分泌顆粒への選択的輸送を仲介する重要な役割を果たしているのではないかと考えられてきた。しかしながら、グラニン蛋白自身も可溶性の分泌蛋白であり、これらがまず分泌顆粒に選択的に輸送されるためには、TGNから分泌顆粒の間の経路にグラニン蛋白に特異的に結合する選別輸送レセプター分子が必要である。このようなグラニン蛋白群に結合し分泌顆粒へと選択的に輸送するレセプター分子の探索はこれまでも精力的に行われてきたが、未だにグラニン蛋白群の分泌顆粒への選別輸送を担う特定の機能分子は同定されていない。

近年、2種類の蛋白分子間の結合および相互作用の程度を解析する方法として、酵母細胞を利用するYeast two hybrid 法が開発され、細胞内での蛋白間の相互作用に関して強力な解析方法となってきた。そこで本研究では、上述の研究の背景および研究成果を踏まえて、このYeast two hybrid 法を用いグラニン蛋白群に結合する蛋白の探索を行い、内分泌細胞における蛋白選別輸送の分子機構の解明を試みた。

研究方法と実験結果の概要

Yeast two-hybrid法によるCgA結合蛋白の同定

グラニン蛋白に結合し分泌顆粒への選択的蛋白輸送に関係する新規蛋白をYeast two hybrid system を用いた遺伝子クローニングによって探索した。

具体的には、代表的なグラニン蛋白であるrat CgA のORFをコードするcDNA断片を酵母LexA 遺伝子を利用したtwo hybrid system のbait vector (pLexN) にインフレームでサブクローニングし、同システムのprey vector (pVP16-3) 上に構築されたラット脳組織由来のcDNAライブラリーをレポーター酵母株のヒスチジン要求性の相補と β -Galactosidase遺伝子の発現を指標にしてスクリーニングした。その結果、別のグラニン蛋白であるセクレトグラニンIII (SgIII) がCgAと結合する蛋白として同定された。

なお、やはりグラニン蛋白に属するCgBとSgIIに関しても同様のスクリーニングを試みたが、全長のCgBやSgIIをbaitとして用いると、特異的なpreyが存在しない条件でもレポーター遺伝子が発現してしまうため、これらに結合する蛋白の同定にはこのアッセイ系は利用できないことがわかった。そこで、この後は、CgAとSgIIIの間の相互作用の解析に焦点を絞り研究を進めた。

CgAとSgIII間の相互作用の特異性の検討

部分欠失体の作成と Yeast two-hybrid法による結合活性の評価

CgAとSgIIIとの間の相互作用に関わる分子内ドメインを同定するために、CgAとSgIIIの様々な部分を欠失させた変異体をYeast two hybrid systemのbait vectorとprey vector上に構築し、両者の相互作用の強度をレポーター酵母株のプロモーター下流に置かれた β -Galactosidase活性の高さで評価した。その結果、CgAのアミノ酸残基48-111位とSgIIIのアミノ酸残基214-373位の領域がCgA-SgIII間の相互作用に参与していることが明らかになった。

GST融合蛋白を用いた結合条件の検討

上記の解析で同定されたSgIIIのCgA結合領域を含む部分アミノ酸配列(SgIII 187-373)をグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)融合蛋白発現用のベクター(pGEX-KG)にサブクローニングし、大腸菌で発現させ融合蛋白を大量調製した。この精製された融合蛋白を用いてCgA-SgIII間の結合条件を検討したところ、弱酸性(pH 5.5)・カルシウムイオン(10 mM)存在下の条件で両者の結合が増強されることが明らかになった。この条件は、トランスゴルジネットワーク(TGN)内の微小環境に相当すると考えられており、CgA-SgIII間の結合が細胞内の分泌顆粒形成部位で生理的にも起きる可能性が示唆された。

SgIIIの組織発現および細胞内局在部位の検討

特異抗体の作成

様々な生化学および形態学的解析をすすめるためにSgIIIに対する特異抗体が不可欠であると考えられたため、rat SgIIIのアミノ末端側の遺伝子断片(SgIII 23-186)をpGEX-KGにサブクローニングし、大腸菌で発現させ融合蛋白を大量調製した。これを抗原として、ウサギ背部皮下にアジュバントとともに接種し、SgIIIに対するポリクローナル抗体を作成した。

Northern BlotとImmunoblotによる解析

上記の抗SgIII抗体を用いたImmunoblot法およびSgIIIのcDNA断片をプローブとしたNorthern Blot法によって、種々の内分泌組織・細胞内におけるSgIIIの発現を検討した。その結果、SgIIIは内分泌組織や内分泌組織由来の培養細胞で広く発現していることが明らかになった。ただし、他のグラニン蛋白とは異なり、副腎髄質および褐色細胞腫由来のPC12細胞では、SgIIIの発現が認められなかった。

免疫組織化学法による解析

金コロイド法による電顕免疫組織化学でSgIIIの細胞内局在を検討したところ、発現が認められた組織・細胞では、SgIIIが内分泌細胞の分泌顆粒に特異的に局在することが観察された。特にラット下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞では、CgAとSgIIが異なる分泌顆粒に選別されて局在するが、SgIIIはCgA陽性の分泌顆粒にのみ特異的に局在し、CgA-SgIII間の複合体形成が生体のTGNから分泌顆粒の間の内腔側で実際に起こっていることが示唆された。

CgA-SgIII複合体の生理的意義の検討

エピトープタグを付加した CgAとSgIIIの部分欠失変異体の作成と発現実験

今回我々が見い出したCgAとSgIIIの相互作用が、これらグラニン蛋白の分泌顆粒への局在に関与しているかを調べる目的で、このCgAのSgIII結合領域を欠失させた変異体とSgIIIのCgA結合領域を欠失させた変異体を動物細胞用の発現ベクター上に構築し、そのカルボキシ末端側にFLAGエピトープをタグとして付加した後、内分泌細胞由来の培養細胞AtT-20細胞で発現させ、その細胞内局在・輸送動態を解析した。

免疫組織化学法による細胞内局在の解析

上述したCgAとSgIIIの様々な部分欠失変異体を発現させたAtT-20細胞を、抗FLAGエピトープ特異抗体を用いて蛍光抗体法で免疫染色し、各部分欠失変異体の細胞内局在をレーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、CgA結合領域を欠くSgIII変異体は正常のSgIIIと同様に細胞突起先端の分泌顆粒に輸送されるのに対し、SgIII結合領域を欠くCgA変異体はゴルジ複合体近傍にわずかな集積を認めるのみで、細胞突起先端の分泌顆粒には蓄積されないという所見を得た。

免疫沈降法による分泌動態の解析

さらに上記のAtT-20細胞を³⁵S-メチオニンで標識したのち、抗FLAGエピトープ特異抗体を用いて細胞と培養液中の部分欠失変異体の輸送および分泌動態を免疫沈降法で解析した。その結果、正常のCgA、SgIII、およびCgA結合領域を欠くSgIII変異体は細胞内に保持され、分泌刺激にも応答して培養液中に放出されるのに対し、SgIII結合領域を欠くCgA変異体は細胞内に保持されることなく構成的に培養液中に放出されることが明らかになった。

これら免疫組織化学法による解析と免疫沈降法による解析の結果から、CgAとSgIIIの複合体形成はSgIIIの分泌顆粒への輸送に関しては必ずしも必要ではないが、CgAが分泌顆粒に正しく輸送されるためには不可欠であることが示された。

考察および今後の展望

SgIIIはもともと神経細胞に特異的に発現する1B1075遺伝子の産物として同定されたが、その後の生化学的解析によって、神経や内分泌細胞の分泌顆粒に局在する酸性分泌蛋白であることが明らかにされ、グラニン蛋白群の一員であるとみなされるようになった。しかし、その生理的な役割に関しては、これまで長い間不明であった。

そのような中、本研究のYeast two hybrid法を用いた解析で、SgIIIがCgAと特異的に結合する蛋白として改めて同定された。このCgAとSgIIIとの間の結合の特異性は、様々な生化学的解析により検証され、TGNの内部環境を模した弱酸性・カルシウム存在下でこの両者の間の相互作用が増強することが示された。また、免疫組織化学法により、ラット下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞などの内分泌細胞の分泌顆粒で両者が共存することが示され、この複合体形成が生理的にも起こっていることが強く示唆された。さらに、CgAやSgIIIの様々な部分欠失変異体の細胞内局在や分泌動態の解析から、CgAが分泌顆粒に正しく輸送されるためには、このSgIIIとの複合体形成が必要不可欠であることも示された。

しかしながら、SgIIIはCgAと同様に可溶性の分泌蛋白であり、このSgIIIがどのような機序でCgAの分泌顆粒への選択的輸送に関与しているかについては、今回の研究期間では解明できなかった。

た。ただ、CgA結合領域を欠くSgIII変異体が正しく分泌顆粒に輸送されるという所見から考えると、SgIIIはCgA結合領域以外の部位に独立した分泌顆粒への選別輸送シグナルを持っていると推測され、今後の研究では、この選別輸送シグナルの同定を進めていく必要があると思われる。また、そのようなSgIII分子内の選別輸送シグナルが結合する相手としては、膜貫通型蛋白や膜脂質のマイクロドメインが考えられるが、これらはSgIIIのソーティングレセプターとして機能している可能性が高い。このSgIIIのソーティングレセプターは分泌顆粒への蛋白選別輸送機構を解明する上で重要な分子であると考えられ、今後の研究で同定していかなければならない。また一方で、CgA以外の他の可溶性分泌蛋白もSgIIIに結合して分泌顆粒に選択的に輸送される可能性があり、SgIIIやCgAと性腺刺激ホルモンの各サブユニットなどのペプチドホルモンとの相互作用の強さや特異性などに関して、今後解析を進めていく必要がある。

以上の研究成果は、研究発表の項で述べた学会およびシンポジウムで既に発表し、さらに現在、米国 *Molecular Biology of the Cell* 誌に原著論文として投稿中である。この原著論文の原稿および図版を、今回得られた研究成果の詳細に関する報告として次ページ以降に掲載した。