

内分泌顆粒膜上の脂質ラフト様構造は
分泌蛋白の選別輸送にどのように寄与しているか

(課題番号 17590144)

平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
基盤研究 (C) 研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 阪井 裕子
(旭川医科大学医学部助教)

はしがき

「脂質ラフト (lipid rafts)」と総称されるコレステロールや糖スフィンゴ脂質に富む生体膜上の微小領域 (マイクロドメイン) は、細胞膜や細胞内膜系で代謝や情報伝達に関わる様々な分子の足場として重要な役割を果たしている。この脂質ラフトに関するこれまでの研究では、主として培養細胞や単離細胞が材料として用いられ、上皮細胞の細胞極性の形成・維持やエンドサイトーシス、あるいは免疫細胞におけるシグナル伝達過程などにおける役割が強調されてきた。しかし、生体を構成する他のさまざまな組織・細胞における脂質ラフトの多様性や生理的役割に関しては、未だ解明されていない点が多い。

本研究では、電顕免疫組織化学法など形態学的手法を中心に関連する生化学的解析を織り込みながら、内分泌組織・細胞における脂質ラフト様構造の分布・局在と生理的役割を明らかにすることを試みた。

研究組織

研究代表者： 阪井 裕子 (旭川医科大学医学部・助教、研究者番号 40041826)

研究分担者： 渡部 剛 (旭川医科大学医学部・教授、研究者番号 80220903)

研究経費 (交付決定額)

年度	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	1,300 千円	0 千円	1,300 千円
平成 18 年度	1,100 千円	0 千円	1,100 千円
平成 19 年度	1,100 千円	330 千円	1,430 千円
総計	3,500 千円	330 千円	3,830 千円

研究発表

1. 原著論文

- (1) Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T: Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. J Cell Sci 118: 4785-4795 (2005)
- (2) Sakai Y, Hosaka M, Hira Y, Watanabe T: Addition of phosphotungstic acid to ethanol for dehydration improves both the ultrastructure and antigenicity of pituitary tissue embedded in LR White acrylic resin. Arch Histol Cytol 68:337-347 (2005)
- (3) Hosaka M, Watanabe T, Yamauchi Y, Sakai Y, Suda M, Mizutani S, Takeuchi T, Isobe T, Izumi T: A subset of p23 localized on secretory granules in pancreatic β -cells. J Histochem Cytochem 55:235-245 (2007)
- (4) Kitahara K, Sakai Y, Hosaka M, Hira Y, Kakizaki H, Watanabe T: Effects of a depot formulation of the GnRH agonist leuprorelin on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes. Arch Histol Cytol 70:79-93 (2007)

2. 和文総説

- (1) 渡部 剛、阪井裕子、平 義樹、暮地本宙己、穂坂正博「内分泌細胞における分泌顆粒形成機構」顕微鏡 43:29-34 (2008)

3. 学会発表(ポスターおよび口演)

- (1) 第 20 回日本下垂体研究会 (Brain-Pituitary 2005)(平成 17 年 7 月、名護)
「内分泌顆粒形成におけるグラニン蛋白と脂質ラフトの役割」
シンポジウム「視床下部一下垂体系の形態学研究の最近のトピックス」、渡部 剛、阪井裕子、穂坂正博
- (2) 第 111 回解剖学会総会(平成 18 年 3 月、相模原)
「隣内分泌細胞における輸送小胞関連蛋白 p23 の局在」
一般発表(ポスター)、阪井裕子、穂坂正博、泉哲郎、渡部 剛
- (3) NPO 法人総合画像研究支援・第 3 回可視化技術ワークショップ(平成 18 年 11 月 11 日、東京)
「神経・内分泌細胞における分泌蛋白の動線の再考 - ゴルジ装置の極性が示すもの -」
渡部 剛、穂坂正博、阪井裕子、平義樹
ワークショップ「ゴルジ装置と物質輸送のイメージング」
- (4) 第 112 回解剖学会総会(平成 19 年 3 月、大阪)
「ラット下垂体前葉における分泌蛋白の品質管理過程の多様性について」
一般発表(ポスター)、阪井裕子、平義樹、渡部 剛
- (5) 第 113 回解剖学会総会(平成 20 年 3 月、大分・由布市)
「ラット下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞におけるゴルジ装置の形態と微小管の走行」
一般発表(ポスター)、阪井裕子、平義樹、河野 透、渡部 剛

研究成果の概要

研究の背景と目的

「脂質ラフト (lipid rafts)」と総称されるコレステロールや糖スフィンゴ脂質に富む生体膜上の微小領域 (マイクロドメイン) は、細胞膜や細胞内膜系で代謝や情報伝達に関わる様々な分子の足場として重要な役割を果たしている。しかし、生体を構成する他のさまざまな組織・細胞における脂質ラフトの多様性や生理的役割に関しては、未だ解明されていない点が多い。

私たちは、これまで、内分泌細胞に特異的に発現し分泌顆粒に選択的に輸送されるグラニン蛋白群に着目し、その選別輸送機構を解析してきた。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) の分泌顆粒への選択的輸送には、同じグラニン蛋白群に属するセクレトグラニン III (SgIII) との結合が必要であることを明らかにした。さらに、私たちは最近、SgIII が分泌顆粒膜の近傍に特異的に局在することを電顕免疫組織化学法で明らかにするとともに、生化学的にも SgIII が分泌顆粒膜にコレステロール依存性に結合することを証明した。私たちが得たこれらの所見は、SgIII (および SgIII と複合体を形成する CgA などの分泌蛋白) を分泌顆粒内に選択的に輸送・保持する際に、コレステロールに富むラフト様構造が重要な役割を果たしている可能性を示している。しかしながら、広く内分泌細胞一般で脂質ラフトの細胞内局在、動態、生理的役割を明らかにした研究は、これまでほとんどなされていない。

そこで、本研究では、代表的な内分泌組織である下垂体前葉における脂質ラフト様構造の分布・局在と、内分泌細胞における脂質ラフト様構造の生理的役割について検討した。

下垂体前葉における脂質ラフト様構造の分布と細胞内局在

Filipin によるコレステロールの細胞内局在の可視化

コレステロールの細胞内局在の可視化は Thyberg (2002) の方法に従った。その手順を簡単にまとめると、まず、成熟雄ラット (n = 8) を 2% glutaraldehyde-2% p-formaldehyde - 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) で灌流固定した後、切り出した下垂体をビプラトームで薄切し、得られた切片 (厚さ 100 μ m) を 0.2mg/ml の filipin および 1% の DMSO を含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) 中で 15 時間震盪した (20° C)。この標識反応後、切片を 7.5% の sucrose を含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) で良く洗浄し、さらに 1% OsO₄ で後固定した後、エタノール脱水を経て Epon812 に包埋した。この Epon812 包埋組織標本から超薄切片を作製し、下垂体前葉の各ホルモンに対する抗体を用いて金コロイド法で免疫組織化学標識した後、透過型電子顕微鏡で観察した。

その結果、下垂体前葉の内分泌細胞の分泌顆粒膜にはコレステロール-filipin 複合体の形成を示す小球状の変形が多数観察された (Fig.1)。一方、粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、細胞膜など他の膜系には明らかな変形は認められなかった。また、下垂体前葉のどの内分泌細胞の分泌顆粒膜でもコレステロール-filipin 複合体の形成が観察されたことから、分泌顆粒膜は他の細胞内膜系と比較してコレステロールに富んでいることが示唆された。

コレラトキシン B サブユニットをプローブとした GM1 ガングリオシドの細胞内局在の可視化

次にコレステロールとともに脂質ラフトの代表的な構成脂質と考えられている糖スフィンゴ脂質のうち、コレラトキシン B サブユニット (CTxB) と特異的な親和性を有する GM1 ガングリオシドの下垂体前葉における分布と細胞内局在をビオチン化 CTxB をプローブとして検討した。

まず光顕免疫組織化学法による解析のために、成熟雄ラット (n = 8) を 0.1% glutaraldehyde-4%

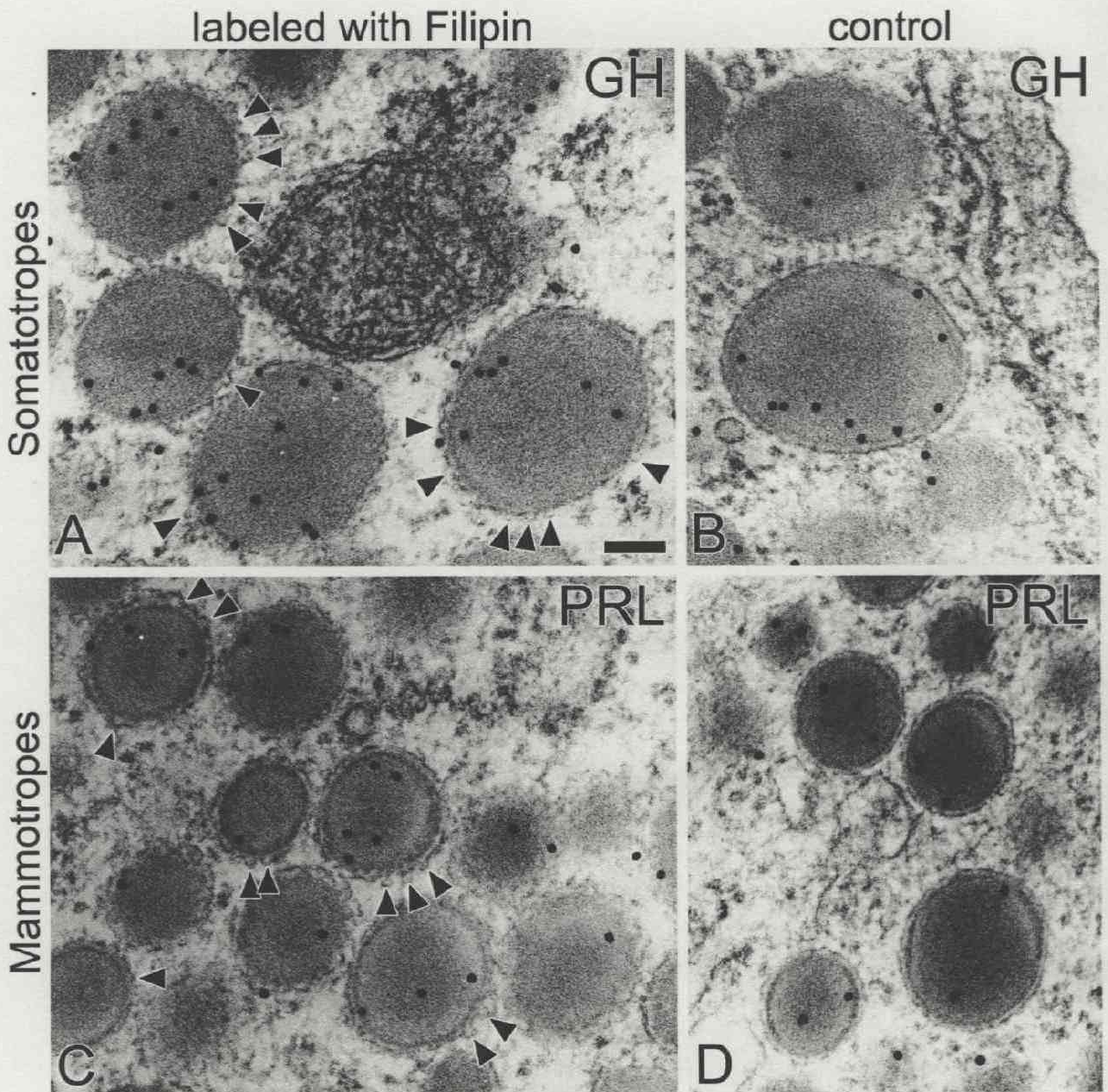


Fig. 1 Filipin-staining of pituitary somatotropes and mammotropes.
 The secretory granule membranes of pituitary endocrine cells show typical deformation with a large amount of small round appearance of filipin-sterol complexes (A and C, arrowheads) when these cells are labeled with filipin. In contrast, secretory granule membranes of non-labeled pituitary tissues show smooth contours without filipin-sterol complexes (B and D). Immunocytochemical localizations of GH (A and B) and prolactin (C and D) are visualized with immunogold particles (15 nm in diameter). Bar = 100 nm

p-formaldehyde - 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で灌流固定した後、切り出した下垂体をビブラトームで薄切し、得られた切片 (厚さ 100 μ m) を 10 μ g/ml のビオチン化 CTxB を含む 7.5% sucrose 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 中で 72 時間震盪した (4 $^{\circ}$ C)。この標識反応後、切片を 7.5% の sucrose を含む 7.5% sucrose 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で良く洗浄し、エタノール脱水を経て Epon812 に包埋した。この Epon812 包埋組織標本から連続切片 (厚さ 0.5 μ m) を作製し、脱樹脂後、各切片を下垂体前葉の各ホルモンに対する抗体と抗ビオチン抗体を用いて蛍光抗体法で 2 重染色した後、落射蛍光顕微鏡で観察した。

また、電顕レベルの免疫組織化学標識のためには、上記と同様に灌流固定しビオチン化 CTxB で標識したビブラトーム切片 (厚さ 100 μ m) を 70% エタノールによる脱水を経て親水性の L.R.white 樹脂に包埋した。この樹脂包埋組織標本から超薄切片 (厚さ 80-100nm) を作製し、下垂体前葉の各

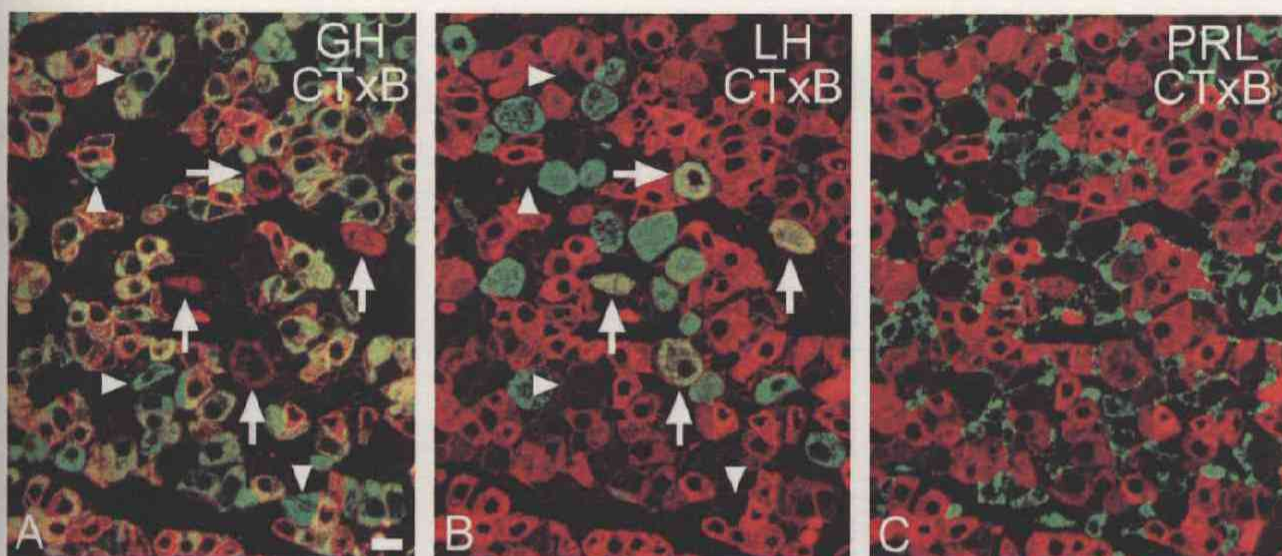


Fig. 2 Identification of CTxB-labeled cells in the pituitary endocrine cells.
 Three serial semithin sections (0.5 μm thick) of the biotinylated CTxB-labeled pituitary tissue (embedded in epoxy resin) are immunostained with a goat anti-biotin antiserum (visualized with Alexa Fluor 594-conjugated anti-goat IgG) after removal of the resin. Each section is simultaneously immunostained with rabbit anti-GH (A), anti-LH (B), and anti-prolactin (C) antisera (visualized with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies), respectively. Merged images of Alexa Fluor 488 (green) and 594 (red) staining are demonstrated. Note that there are somatotropes lacking the CTxB binding (arrowheads), although most somatotropes are labeled with biotinylated CTxB. Only a limited subpopulation of gonadotropes is also labeled with biotinylated CTxB (arrows). Bar = 10 μm

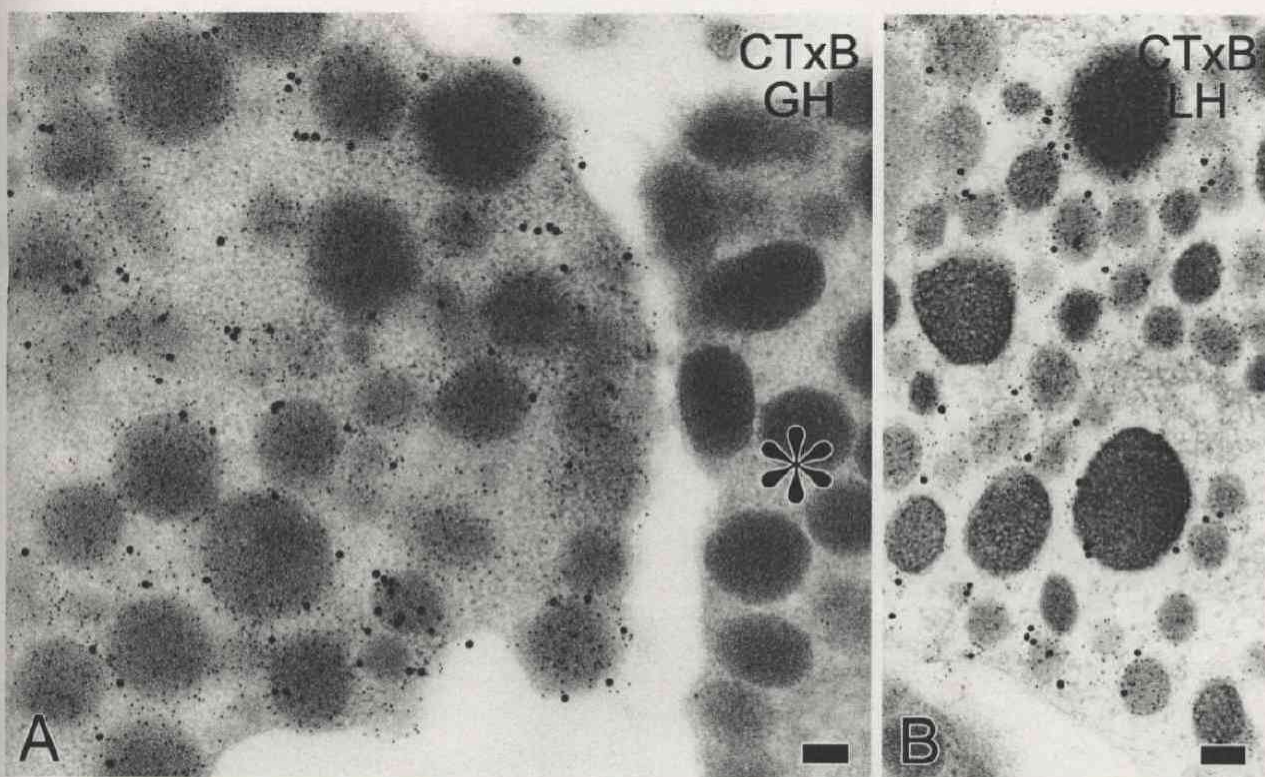


Fig. 3 Subcellular localizations of CTxB-binding sites in the pituitary somatotropes (A) and gonadotropes (B) in the physiological state.
 Immunocytochemical localizations of biotinylated probes are visualized with large-sized colloidal gold particles (15 nm in diameter), while those of GH (A) or LH (B) are visualized with small-sized gold particles (5 nm). Secretory granule membranes of a somatotrope are densely labeled with immunogold particles indicative of CTxB-binding sites, whereas no significant labeling with the gold particles is observed in an adjacent mammatrope (A, asterisk). Bars = 100 nm

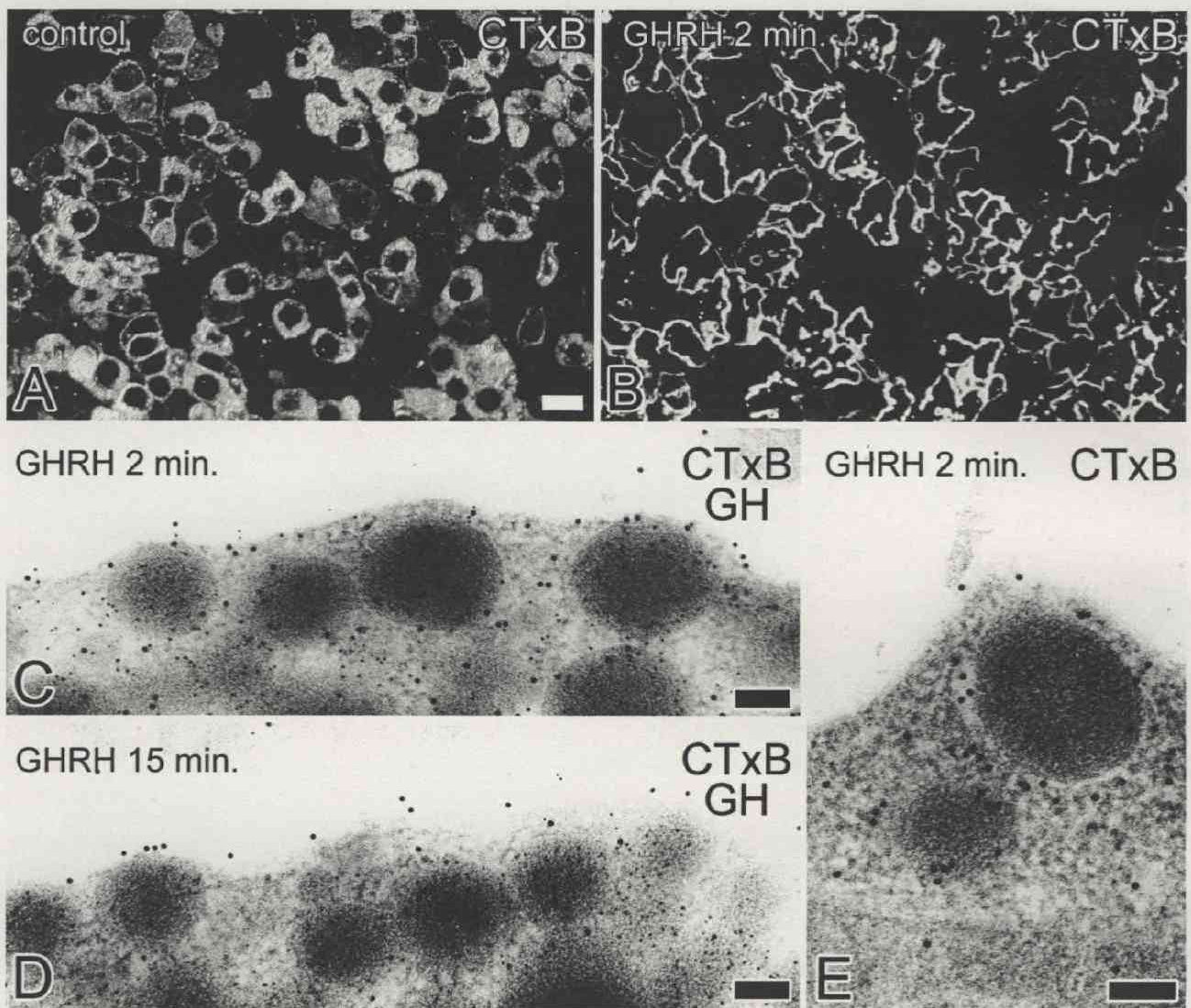


Fig. 4 Subcellular localizations of CTxB-binding sites in the pituitary somatotropes after GHRH administration. Fluorescence indicating CTxB-binding sites (labeled with an anti-biotin antiserum and an Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody) in the anterior pituitary of non-treated control rats (A) and that of rats 2 min after GHRH injection (B). Note that the fluorescence are drastically translocated from the cytoplasm to the cell surface in response to GHRH. CTxB-binding sites in somatotropes 2 min (C and E) and 15 min (D) after GHRH injections are also visualized at the electron microscopic level; large-sized immunogold particles (10 nm in diameter) indicate the immunocytochemical localization of biotinylated CTxB (C-E), while small-sized ones (5 nm) indicate that of GH (C, D). Note that immunogold particles indicating CTxB-binding sites are occasionally observed along the omega-shaped membrane structure with a remaining core of the secretory granule 2 min after injection (E). Bars = 10 μ m (A) and 100 nm (C-E), respectively.

ホルモンに対する抗体と抗ビオチン抗体を用いて金コロイド法で2重標識した後、透過型電子顕微鏡で観察した。

その結果、ビオチン化 CTxB で標識された GM1 ガングリオシドに富む膜は、下垂体前葉の成長ホルモン産生細胞の大部分と性腺刺激ホルモン産生細胞の一部に局限して分布しているのが明らかになった (Fig.2)。電子顕微鏡レベルの免疫組織化学法でその細胞内局在を検討したところ、CTxB 結合部位を示す金コロイド粒子は分泌顆粒膜に集積し、他の細胞内膜系はほとんど標識されなかった (Fig.3)。

以上の結果から、脂質ラフトの主要な構成成分である糖スフィンゴ脂質に関してもコレステロールと同様に分泌顆粒膜に集積していることが示唆されたが、例えば GM1 ガングリオシドについては成長ホルモン産生細胞と一部の性腺刺激ホルモン産生細胞に局限していたように、その構成脂質の種類に関しては細胞種ごとに多様性があることが示唆された。

成長ホルモン産生細胞が特異的な分泌刺激を受けた後の脂質ラフト様構造の動態

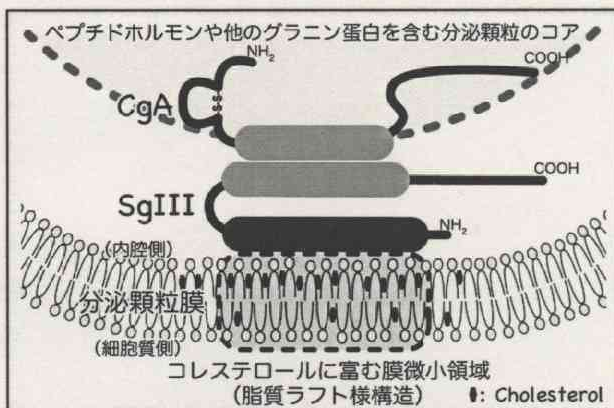
上記の結果より、下垂体前葉の内分泌細胞では脂質ラフト様構造が分泌顆粒膜に集積していることが強く示唆されたので、成長ホルモン産生細胞の CTxB 結合部位を脂質ラフト様構造の指標として、同細胞に特異的な分泌刺激である GHRH を投与した後の CTxB 結合部位の局在の変化を観察した。

その結果、蛍光抗体法による観察では、生理的条件下では成長ホルモン産生細胞の細胞質に分布していた CTxB 結合部位が GHRH を静脈投与して 2 分後の時点で細胞膜に移行するのが観察された (Fig.4 A,B)。この所見は、電顕免疫組織化学法による解析でも確認でき、生理的な状態で分泌顆粒膜に局在していた CTxB 結合部位を示す金コロイド粒子が GHRH 投与後 2 分あるいは 15 分の時点で有意に細胞膜上に移行しているのが認められた (Fig.4 C-E)。

以上の実験結果をまとめると、脂質ラフトの主たる構成成分であるコレステロールは内分泌細胞の分泌顆粒膜に普遍的に集積していることが明らかになった。一方、やはり脂質ラフトの代表的な構成成分と考えられている糖スフィンゴ脂質に関しては、下垂体前葉の内分泌細胞種によって発現・分布が異なり、コレラトキシン B サブユニット (CTxB) が特異的に結合する GM1 ガングリオシドは、大部分の GH 産生細胞と少数の LH 産生細胞に局限して集積していた。細胞内では、CTxB 結合部位もやはり分泌顆粒膜に局限しており特異的な分泌刺激にตอบสนองして細胞膜に移行した。これらの所見から、内分泌細胞における脂質ラフト様構造は、細胞種によって組成の差異は認められるものの分泌顆粒膜に集積しており、分泌刺激に正しくตอบสนองして細胞膜に移行し得ることが形態学的に示された。

内分泌細胞における脂質ラフト様構造の役割

この基盤研究に先駆けて、我々は群馬大学・生体調節研究所の穂坂正博博士と共同で、グラニン蛋白群の一つであるセクレトグラニン III (SgIII) がクロモグラニン A (CgA) の分泌顆粒への選択的輸送に必須であることを明らかにしている (Hosaka et al. (2002) Mol Biol Cell 13:3388-3399)。この SgIII は内分泌細胞内で分泌顆粒膜近傍に集積して局在し (Sakai et al. (2003) J Histochem Cytochem 51:227-238)、リポソームとの結合実験から N 末端側近傍に存在する特定の amino 酸配列領域を介して SgIII がコレステロールに富む脂質膜と結合することが示されている (Hosaka et al. (2004) J Biol Chem 279:3627-3634)。これらの研究から、我々は、CgA やペプチドホルモンを含む分泌蛋白の凝集塊を分泌顆粒膜に繋ぎ止めるために SgIII と脂質ラフト様膜領域が必須であるというモデルを提唱している (右図)。



一方で、我々が見いだした SgIII 依存的な輸送機構の他にも、他の研究グループからカルボキシペプチダーゼ E (CPE) がやはり脂質ラフトに結合しホルモンの選別輸送に関与しているとの報告がある。そこで、これら 2 系統の分泌顆粒への選別輸送機構の CPE 欠損 mutant マウスにおける SgIII の細胞内局在やホルモン輸送過程の変化について検討した。

その結果、電顕免疫組織化学による解析では、SgIII と CPE はともに生理的な条件下で様々な内分泌細胞の分泌顆粒の周辺領域で近接して局在しており、生化学的にも SgIII と CPE の間には特異的な蛋白質間相互作用が認められた。これらの所見は、この二つの分子が TGN から分泌顆粒に至る経路で脂質ラフト様膜微小領域を足場として協同的にホルモン選別輸送に関与している可能性を示唆している。一方、CPE 欠損 mutant マウスの電顕免疫組織化学観察では、CPE の有無に関わらず SgIII が分泌顆粒に正しく輸送されることが示され、SgIII の分泌顆粒への輸送には CPE は必須ではないこ

とが示唆された。また、野生型では主として CPE 依存的な選別輸送機構で分泌顆粒に運ばれるとされていた POMC (ACTH と MSH の前駆体) が、CPE 欠損ミュータントマウスの下垂体でも分泌刺激に適切に応答する分泌顆粒に輸送されていた。興味深いことに、この CPE 欠損ミュータントマウスの下垂体では、SgIII の発現が野生型マウスと比べ上昇していた。

以上の結果を総合すると、正常な個体では脂質ラフト様膜領域に集積した CPE と SgIII が共同して分泌蛋白の選別輸送過程に関与し、さらに、どちらか一方が欠損した場合には、他方がその機能を補う可能性が示唆された (Hosaka et al. (2005) J Cell Sci 118: 4785-4795)。

以上の研究成果のうち、下垂体前葉における脂質ラフト様構造の局在に関しては、現在原著論文として投稿準備中である。また、内分泌細胞における脂質ラフト様構造の役割について生化学的方法で検討した結果の詳細は、Journal of Cell Science 誌 (118: 4785-4795 (2005); 研究業績欄・原著論文 (1)) に報告した。この論文を含めて、本研究期間に発表した原著論文 4 本 (研究業績欄・原著論文 (1)-(4))、および最近の研究動向を踏まえて我々が本研究で得た所見を中心にこの分泌顆粒形成機構について概説した和文総説「内分泌細胞における分泌顆粒形成機構」(顕微鏡 43:29-34 (2008); 研究業績欄・和文総説 (1)) の別刷を本報告書の次頁以降に収録した。