

## 2) ペプチドホルモン産生細胞における分泌蛋白質品質管理過程の特徴と多様性の解明

研究代表者 阪井 裕子

### [研究の背景と目的]

下垂体前葉や膵島などに局在する内分泌細胞では、粗面小胞体で大量のペプチドホルモンが生合成されている。このホルモンが細胞内で生理活性を獲得するためには、まず粗面小胞体内で様々なシャペロン分子の働きを受けて前駆体が正しい3次構造をとる必要がある。

そこで、本研究では、免疫組織化学法を用いて多種多様なペプチドホルモン産生細胞の集合体である下垂体前葉における小胞体シャペロン分子の発現・蓄積、細胞内分布について検討し、合わせて、去勢手術と副腎摘出術で性腺刺激ホルモン産生細胞と副腎皮質刺激ホルモン産生細胞におけるホルモン生合成を選択的に促進した際に生じる粗面小胞体の微細構造や小胞体シャペロンの発現・細胞内局在の経時的変化を、周囲の他の細胞と比較しながら解析した。

### [研究方法]

実験モデルの作成：Wistar系雄ラットを、対照群、去勢手術1週群、去勢手術4週群、去勢手術8週群、副腎摘除1週群、副腎摘除4週群、副腎摘除8週群の計7群に分け、去勢手術群については麻酔下で両側精巣を外科的に切除、副腎摘除群については同様に両側副腎を外科的に切除した後、1週、4週、8週の各時点

で組織標本を作製した。

免疫組織化学法による解析：光顕レベルでの解析は、Epon812樹脂包埋した下垂体組織標本を用いて蛍光抗体法により行った。多重染色は、異なる動物種で作成した一次抗体を混合して行い、異なる蛍光色素で標識した特異2次抗体を用いて可視化した。電顕レベルでの解析では、既発表の方法 (Sakai et al., Arch Histol Cytol. 68:337-347 (2005)) に基づき、金コロイド標識2次抗体を結合させることで抗原の局在部位を可視化した。2重標識が必要な場合には、粒子径の異なる金コロイド (径：5、10、15nm) で標識された特異2次抗体を用いて行った。

### [研究結果]

対照群ラット下垂体前葉における小胞体シャペロンの発現・貯留の特徴：正常雄ラット下垂体前葉においては、代表的な小胞体シャペロンであるBiP、PDI、CRT、CNXが一部の細胞で強く発現・蓄積していたため、各下垂体前葉ホルモンに対する抗体と2重染色し細胞を同定したところ、LH産生細胞とTSH産生細胞で小胞体シャペロンが強く発現・蓄積していることが明らかになった。これらの細胞では粗面小胞体 (rER) は拡張しており、抗BiP抗体で免疫組織化学標識を施すと、拡張したrER内腔にBiPが貯留しているのが観察された。一方、PRL産生細胞、ACTH産生細胞、およびGH産生細胞のrERの内腔は狭く、明らかなBiPの貯留は認められなかった。

分泌刺激を受けた下垂体前葉における小胞体シャペロンの発現・貯留の経時的変化：去勢手術によって下垂体前葉ではLH陽性の性腺刺激ホルモン産生細胞が増加・肥大し、同時に同細胞内におけるBiPの貯留は経時的に亢進した。さらに、去勢手術から8週後には、LH産生細胞のrERが融合・拡張し典型的な去勢細胞となるのが観察されたが、この巨大なrER内腔にはBiP、PDIやCRTなどの小胞体シャペロンが大量に貯留していた。一方、副腎摘除後にも、ACTH産生細胞が増加・肥大するが、この刺激されたACTH産生細胞においてはBiPの発現・貯留の変化は認められなかった。この分泌刺激が持続した副腎摘出後8週のACTH産生細胞でも、rERの層板数が増加する傾向は見られたが、その内腔は拡張せず、去勢手術後のLH産生細胞とは異なり、副腎摘出後のACTH産生細胞

ではホルモンの生合成・分泌が刺激されている状態でも rER への BiP の貯留は認められなかった。

[まとめ]

以上の結果から、ペプチドホルモンを産生する下垂体前葉の内分泌細胞は、一様に小胞体シャペロンを発現・蓄積しているわけではなく、LH 産生細胞や TSH 産生細胞のようにホルモンのサブユニット間でジスルフィド結合が形成される必要のある細胞で、rER 内に分子シャペロンが貯留して内腔が拡張しやすい傾向があることが示唆された。この小胞体シャペロン発現・貯留の細胞種間での差は、持続的な分泌刺激を受けた際の応答についても同様の傾向を示すことから、ペプチドホルモンの品質管理にあたる小胞体シャペロン分子の発現や品質管理の場である粗面小胞体の量や微細構造の制御に関しては、細胞種ごとに固有の機構で調節されることが示唆された。