

# 高コレステロールドメインを基盤にした 内分泌顆粒形成メカニズム

竹内 利行

内分泌顆粒は、トランスゴルジネットワークからペプチドホルモン前駆体とグラニンタンパク質を含みながら凸型出芽し、前駆体ホルモンを活性型に転換して成熟顆粒となる。分泌顆粒の形成やホルモンの分泌顆粒集積メカニズムにはいくつかの仮説があり、この総説では代表的な“グラニン凝集説”と“カルボキシペプチダーゼ E/ホルモン受容体説”，それに我々の「セクレトグラニン III/高コレステロールドメイン発端説」を述べる。セクレトグラニン III はホルモンを内含するクロモグラニン A 凝集体や、ホルモンのキャリアーとなるカルボキシペプチダーゼ E と結合し、更に顆粒膜の高コレステロールドメインと結合する特性をもつ。我々は、セクレトグラニン III がもつコレステロール結合能が分泌顆粒形成の起因機能と考えている。

## 1. はじめに

膵β細胞は、血管壁に向いて広がる細胞質に分泌顆粒がぎっしり詰まり、刺激を受ければ即座に顆粒内容のインスリンを血管腔に放出するのように見える(図 1A: ラット膵島 電子顕微鏡像)。個々の分泌顆粒は 25~350 nm のサイズで、中心にある内容物がオスミウム酸で黒く染まり、その周りに白く抜けたハローをもつので dense-core

granules あるいは dense-core vesicles と表現される。この黒い内容物はインスリンなどホルモンを密に保持するグラニンファミリータンパク質、クロモグラニン A (CgA), B (CgB), セクレトグラニン II (SgII) などからなり、顆粒膜直下のハロー部分にはホルモン前駆体を活性型に転換する限定切断酵素 (prohormone convertase = PC), 限定切断を受けた活性型ホルモン C 端の塩基性アミノ酸対を除去するカルボキシペプチダーゼ E (CPE), 本稿でその重要性を詳述するセクレトグラニン III (SgIII) などが存在する。その他、図 1A ではやや黒ずんだミトコンドリア、層板状のゴルジ装置が見える。分泌顆粒形成過程を模式化すると細胞生物学の教科書でよく見る図 1C が描ける。この模式図では核の周辺に粗面小胞体 (endoplasmic reticulum = ER), それに続いてゴルジ装置があり、その細胞膜側 (= トランス側) に伸びるトランスゴルジネットワーク (TGN) から分泌顆粒, リソソーム, 細胞膜への輸送小胞などが形成されるように描かれている。しかしこれはあくまで模式図で、実際の細胞小器官の分布様式とはかなり異なる。例えば、図 1A では ER がはっきりしない。しかし、ラット頸静脈にカテーテルを留置して 48 時間 50% グルコース液を点滴しつつづけてから膵臓を固定して電子顕微鏡標本を作る<sup>1,2)</sup>と、グルコース刺激によるインスリン放出のために分泌顆粒が細胞膜に融合して細胞質から減少・消失

群馬大学 副学長室 (生体調節研究所 前所長) (〒371-8510 前橋市荒牧町四丁目 2 番 事務局)

The formation mechanisms of endocrine secretory granules based on a high cholesterol membrane domain  
Toshiyuki Takeuchi (Gunma University Administration Office, Aramaki 4-2, Maebashi 371-8510, Japan)

Abbreviations:

$\alpha$ 1-AT =  $\alpha$ <sub>1</sub>-アンチトリプシン

CgA : クロモグラニン A

CgB : クロモグラニン B

CPE = カルボキシペプチダーゼ E

ER = Endoplasmic reticulum = 粗面小胞体

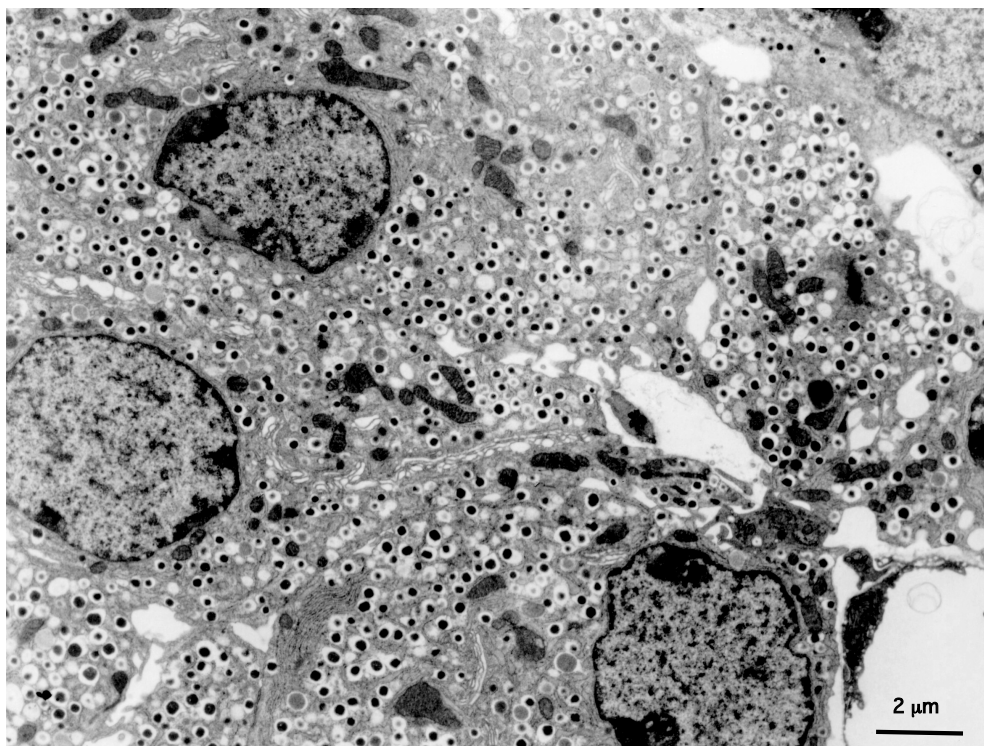
$\alpha$ -MSH =  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone)

POMC = proopiomelanocortin

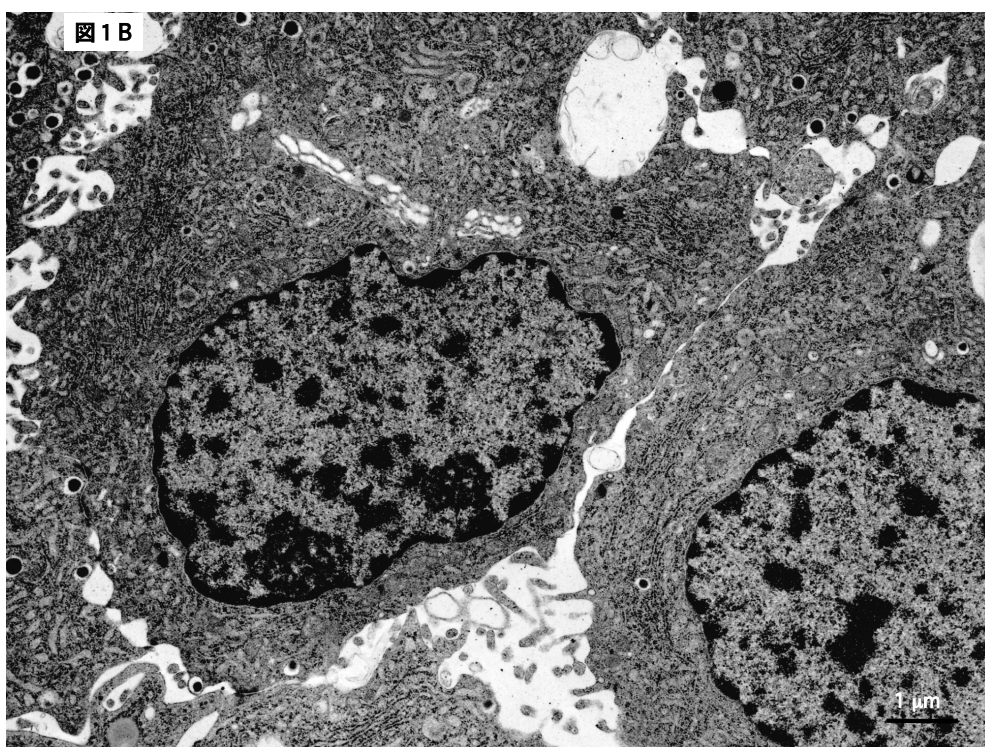
SgII : セクレトグラニン II

SgIII : セクレトグラニン III

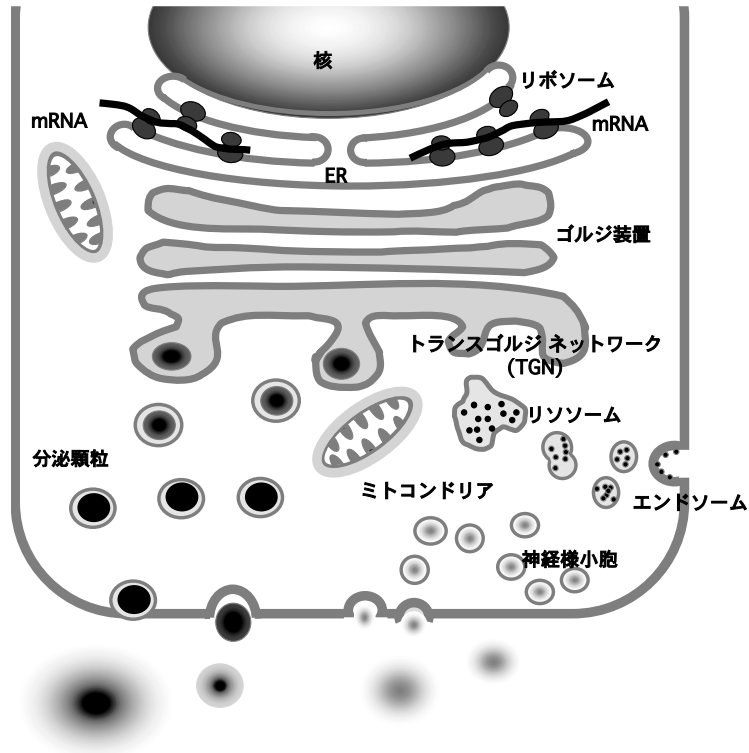
TGN = トランスゴルジ ネットワーク



(A) ラット膵島電子顕微鏡写真



(B) 50% グルコース溶液 2日間灌流後のラット膵島電子顕微鏡写真



(C) 内分泌細胞の模式図

図1 ラット膵島の微細構造

し、リボソームが付着したERがはっきりと現れる(図1B)。つまり、実際の細胞ではERは核の周囲にあるのではなく細胞質一杯に詰まっている。この図1Aと1Cの間で起こるプロセス、即ち分泌顆粒が外部刺激に反応して細胞膜と融合して内容物のホルモンを放出するプロセスを調節性分泌(regulated secretion)と呼ぶ。これに対して外部刺激とは関係なくTGNからコンスタントに細胞膜の構成タンパク質を輸送する、あるいは血清タンパク質、増殖因子等を細胞外に放出するプロセスを構成性分泌(constitutive

secretion)と呼ぶ<sup>3)</sup>。

1960年代、Gorge Paladeらは膵外分泌腺細胞を材料にしてアイソトープ標識アミノ酸でラベルした分泌タンパク質をオートラジオグラフィーで追跡し、分泌タンパク質がER→ゴルジ装置→分泌顆粒の順に移動するプロセスを示し、分泌タンパク質の合成から分泌に至る細胞内経路を明らかにした<sup>4)</sup>。その後この基盤に立って分泌メカニズムの研究が広く複雑に展開されるが、その対象は大きく三つに分けることができる(図2)。

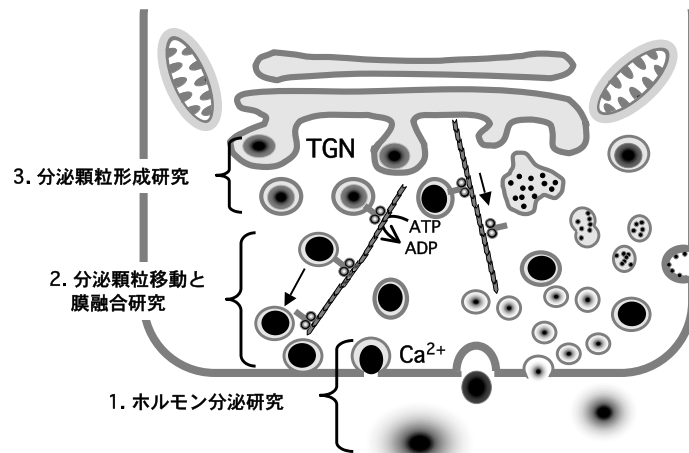


図2 分泌顆粒研究で対象となる三つの部位

- 1) ホルモン分泌を制御するメカニズム。換言すれば、外部刺激による細胞内カルシウム上昇メカニズム。

1960年代, Douglasらは stimulus-secretion coupling 仮説で  $\text{Ca}^{2+}$  が外部刺激と分泌の coupling 役であるとし, この  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内上昇メカニズムを中心にして分泌制御の研究が大きく進展した。その進展を支えた技術の一つは, 70年代後半から急速に発展した組換えDNA技術で, ホルモン前駆体, 受容体などの cDNA クローニングに続き, それらの発現実験が盛んに行われた。この組換えDNA技術に加えて, 70年代後半から80年代前半にかけて Erwin Neher, Bert Sakmannらが確立したパッチクランプ法, Roger Tsienらが開発した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定ケミカル Fura-2 技術などにより  $\text{Ca}^{2+}$  上昇メカニズムは更に解明された。

膵β細胞では, グルコースがどのようなメカニズムでインスリン分泌を引き起こすか長い間議論的となっていた<sup>5)</sup>が, 1995年, Inagaki, Seinoらは上述の技術を駆使して, グルコース代謝から産生される ATP が ATP 感受性  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの開閉を制御し, それに応じて  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが開閉する分子メカニズムを明らかにした<sup>6)</sup>。

- 2) 分泌顆粒の細胞内輸送メカニズム。換言すれば SNARE 説に基づく細胞膜ドッキング・融合メカニズム。

分泌関連タンパク質の機能研究では, 1970年代後半から80年代にかけて Randy Schekman, Peter Novickらが駆使した出芽酵母の分子遺伝学が大きな役割を果たした。酵母はショ糖分解酵素を分泌するが, その細胞内輸送に関わる遺伝子群 *sec* の温度感受性変異株が動物細胞の ER・ゴルジ間小胞輸送メカニズム解明に大きく貢献した<sup>4)</sup>。近年, ホルモン分泌の最終段階, 分泌顆粒と細胞膜のドッキングメカニズムは Jim Rothman の SNARE 説を中心に展開されてきた<sup>7-9)</sup>。しかし, SNARE 説による膜融合の主な研究対象は神経小胞であり, サイズの大きな内分泌顆粒の膜融合メカニズムは神経小胞のアナロジーを基本にした後追い研究となっている。それでも最近では SNARE タンパク質による膜融合に分泌顆粒特異的な低分子量 GTP 結合タンパク質 *rab*, 例えば *rab27*, とそのエフェクタータンパク質が関わるメカニズムが研究対象となり, 共焦点レーザー顕微鏡, 全反射顕微鏡, 多光子顕微鏡など新しいビジュアル技術を駆使して GFP, YFP, RFP との融合タンパク質をリアルタイムで観察する手法が主流となっている<sup>10,11)</sup>。

- 3) 分泌顆粒形成メカニズム。換言すれば, ホルモンの顆粒内選別輸送メカニズム。

1980年代に, Lelio Orci が免疫電子顕微鏡を用い

て, プロインスリンが TGN から出芽・形成された幼若顆粒の膜直下に集積する像とインスリンが顆粒の dense-core 部に集積する像を発表し, 分泌顆粒の成熟に伴ってホルモン前駆体が活性型に転換されて顆粒中心部に集積するスキームができあがった<sup>12,13)</sup>。しかし, 分泌顆粒形成メカニズムの研究は, 手間のかかる免疫電子顕微鏡技術を駆使しなければならず, また, 分泌顆粒を集めるのに用いる内分泌組織は, 下垂体, 膵島を含めて複数の異なる内分泌細胞の集合体なので特定のホルモン顆粒だけを集めるのは難しい。また, 構成性経路研究で確立された *in vitro* 再構成実験系<sup>14)</sup>もなく依然として古典的な手法に頼らざるをえない状況である。

このように 3) 分泌顆粒形成メカニズムの研究は 1), 2) の研究に比べて技術面で大きく立ち遅れているが, それでも 1), 2) の研究で使われている手法を応用しながらゆっくりとした進展が見られている。本稿ではその進展について概説する。

## 2. 調節性ホルモン分泌メカニズムの系統発生

ホルモンという名称は膵液分泌刺激ホルモン セクレチンの発見者 Ernest Henry Starling が 1905 年に行った講義 “The chemical correlation of the functions of the body” で用いたのが最初で, ギリシャ語の *hormao* (=excite, arouse) に由来する<sup>15)</sup>。ホルモンは生体をその内部環境, 外部環境に適応させるように分泌され, 適応状態に達するとその分泌は元に戻る。このような分泌様式が前述の調節性分泌である。調節性分泌は構成性分泌に比べてはるかに複雑で, ヒトではホルモンと神経伝達物質がこの様式で分泌される。

ところで, 調節性分泌は系統発生ではどの段階から見る事ができるだろうか。線虫では, インスリン シグナル経路 [*daf-2* (インスリン/IGF 受容体) → *age-1* (PI3 キナーゼ) → *akt-1* (AKT/PKB) → *daf-16* (FoxO 型転写因子)] が寿命を制御し, インスリン様ペプチドの存在をうかがわせる。事実, 線虫はインスリン様ペプチド *ins* として 37 の候補遺伝子を持ち, 大部分が神経系細胞で発現しているが, *ins-7* のように消化管の細胞で発現するペプチドもあり<sup>16)</sup>。消化管ホルモンの原型ともいえる。この 37 の *ins* 候補遺伝子産物のうち三つがほ乳類のインスリンと同じように前駆体から C ペプチドが切断されて三次構造をつくる。無脊椎動物では, 線虫の他, カイコも 30 以上のインスリン様遺伝子 (*bombyxin*) をもつ<sup>17,18)</sup>。しかし, カイコと同じ節足動物でもショウジョウバエはインスリン様遺伝子が七つに減少する<sup>19)</sup>。インスリン様遺伝子はやはり主に脳神経で発現しており, 消化管でも弱い発現を示す。インスリ

ン様ペプチドも分泌顆粒に局在するが、その電子顕微鏡像は dense-core というよりは周囲が黒いドーナツ型を示す<sup>20</sup>。インスリン様ペプチドの生理作用に関する研究では、ショウジョウバエからインスリン産生細胞を除去するとハエ幼虫の成長と分化が遅れ、さなぎのリンパ液中のグルコース+トレハロース（グルコース2分子からなる二糖類）濃度が上昇し、ヒトの糖尿病状態に類似した表現系になるという<sup>21</sup>。その産生細胞は脳上部の ring gland の両側に突き出るように位置し、インスリン様ペプチドは産生細胞から神経軸索を下行し、脈管上皮細胞との間に形成されるシナプス部位に集積して神経刺激で脈管リンパ液中に放出される。

このように無脊椎動物のホルモン分泌細胞は腔腸動物から高等な節足動物、軟体動物、棘皮動物まで認められ、脳神経組織に混在して神経刺激で分泌されるが、脊椎動物に見られるような内分泌腺からホルモンを分泌する動物は例外である。その例外はタコの視柄腺でこの内分泌腺は脊椎動物の下垂体前葉に相当し、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 活性をもつペプチドを分泌して生殖機能を制御する<sup>22</sup>。従って、無脊椎動物の中でも高等な頭足類になると内分泌腺として機能する器官をもつようになる。

### 3. 神経小胞と内分泌顆粒の比較

神経小胞と分泌顆粒は共に外部刺激に応答して内容物を放出する。神経小胞はその一部分がシナプス膜と融合して小孔から神経伝達物質をシナプス間隙に放出した後、融合部分が離れて再利用、つまりリサイクリングされる (kiss and run)、あるいは完全融合後、シナプス周囲の膜からエンドサイトーシスで再形成される<sup>23</sup>。一方、分泌顆粒は TGN から凸型出芽してホルモンを内含しながら形成される<sup>3</sup>。神経小胞と分泌顆粒の内容物集積メカニズムも異なり、神経小胞内には細胞質で合成されたカテコールアミン、セロトニン、GABA などの伝達物質が神経小胞膜の

トランスポーターによって ATP 依存的に取り込まれるが、分泌顆粒は TGN でグラニタンパク質と共にホルモンを内含する。神経小胞は神経伝達物質だけを含み、ペプチドホルモンを含まないが、分泌顆粒はペプチドホルモンに加えて神経伝達物質を含む。例えば、インスリン顆粒のセロトニン、副腎髄質アドレノメデュリン顆粒のノルエピネフリンなどである。神経小胞と分泌顆粒は軸索末端のシナプス膜部分、いわゆるアクティブゾーンに混在して集積する。この混在状態は内分泌細胞でも同じで、膵β細胞ではインスリン顆粒に加えて GABA を含むシナプス様小胞 (synaptic-like microvesicle = SLMV)、膵α細胞ではグルカゴン顆粒に加えてグルタミン酸を含む SLMV が混在する。

神経小胞のサイズは 40–50 nm で大小の差は小さいが、分泌顆粒のサイズは内含するホルモンによって大小様々で、例えば、インスリン顆粒 250–350 nm、成長ホルモン (GH) 顆粒 350–500 nm、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 顆粒 100–200 nm、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 顆粒 150–200 nm、さらに腫瘍で見られる GH 顆粒、プロラクチン (PRL) 顆粒は 800 nm に達する<sup>24,25</sup>。つまり、神経小胞をピンポン玉 (直径 4 cm) とすると、インスリン顆粒はバスケットボール (直径 24.5 cm) やサッカーボール (直径 22 cm) のサイズで、GH や PRL 顆粒のあるものはバランスボール (約 60 cm) に匹敵する。従って、神経小胞はサイズが小さいので分泌顆粒に比べてその構成が単純と思われるが、それでも Takamori らはプロテオミクス解析で神経小胞に 80 以上の構成タンパク質を同定している<sup>26</sup>。一つの神経小胞は、プロトンポンプ V-ATPase 平均 1 個、synaptobrevin 70 個、synaptophysin 32 個、neurotransmitter transporter 9–14 個、Rab3A 10 個、シナプシン 8 個、synaptotagmin1 15 個の分子をもつという。このプロテオミクス解析は内分泌顆粒でも行われ、ラット膵β細胞由来 INS-1E の顆粒には 130 種類のタンパク質があり、プロホルモンを活性型にするプロセシング酵素、ホルモンをコンパクト

表 1 神経小胞と内分泌顆粒の比較

	神 経 小 胞	内 分 泌 顆 粒
大きさ (直径)	40–50 nm	150–800 nm
内容物	活性アミンなどの グラニタンパク質	ペプチドホルモン 活性アミン
構成タンパク質	約 80	約 150
特徴的な構成 タンパク質	rab ファミリータンパク質 SNARE 関連タンパク質	グラニタンパク質 プロセシング酵素 フォグリン
開口放出時の Ca <sup>2+</sup>	200 μmol/L	3–30 μmol/L
刺激から分泌迄の時間	60 μsec	5 msec
生成	シナプス膜	TGN
膜コレステロール組成	25–35 mol% 形質膜と同程度	40–50 mol% 神経小胞よりも高い

表2 分泌顆粒局在タンパク質

局在場所	タンパク質
内 部	ペプチドホルモン
	グラニタンパク質
	クロモグラニン A
	クロモグラニン B
	セクレトグラニン II
	セクレトグラニン III (1B1075)
	セクレトグラニン IV (HISL-19)
	セクレトグラニン V (7B2)
	セクレトグラニン VI (NESP55)
	プロセシング酵素
プロホルモン転換酵素 PC1/3, PC2	
カルボキシペプチダーゼ E	
アミド化酵素 (PAM)	
膜貫通型	V-ATPase Fo
	調節性分泌 Ca <sup>2+</sup> -ATPase (SPCA1/2)
	VAMP-2
	シナプトタグミン III
	フォグリン
	IA2 (1CA512)
	IP3 受容体
	SV2
	Eph A
	外 部
Rab27	
グラニューフィリン	
CaM キナーゼ II	
グルコキナーゼ	
ミオシン Va	
Noc2	

トに内包するグラニタンパク質, カテプシンなどの水解酵素等が多く含まれる. これは神経小胞が SNARE タンパク質や Rab タンパク質など外周局在タンパク質を多く含むのと対照的である<sup>27)</sup>. この傾向はウシ副腎クロマフィン細胞の顆粒でも同様で, 分泌タンパク質 20, 顆粒膜局在タンパク質 39, 両方の性質をもつもの 43 が同定された<sup>28)</sup>. 神経小胞と分泌顆粒の比較を表 1 に, 代表的な分泌顆粒局在タンパク質を表 2 に示す. 表 1 から, 神経小胞は刺激に応答して非常に速いスピードで神経伝達物質を放出し, それに対して分泌顆粒は緩やかにホルモンを分泌するのがわかるだろう.

#### 4. ペプチドホルモン前駆体から活性型ホルモンができるメカニズム

ペプチドホルモンは前駆体プロホルモンから限定切断されて活性型ホルモンとなる. ホルモンがプロホルモンとして生合成される事実は, まだ組換え DNA 技術が出現する前, 60 年代に Donald Steiner 博士によってインスリンで明らかにされた<sup>29)</sup>. Steiner はヒトのインスリノーマ片を [<sup>3</sup>H]ロイシンでラベルしてカラムでサイズを調べたところ, インスリン B 鎖-S-S-A 鎖と同じサイズのピークの他にそれよりも大きなサイズのピークを見つけ, そのアミノ酸配列が B 鎖-ArgArg-C ペプチド-LysArg-A 鎖の一次構造をとる前駆体プロインスリンであることを明らかにした. 80 年代に入り, 組換え DNA 技術が広まるとホルモン前駆体が

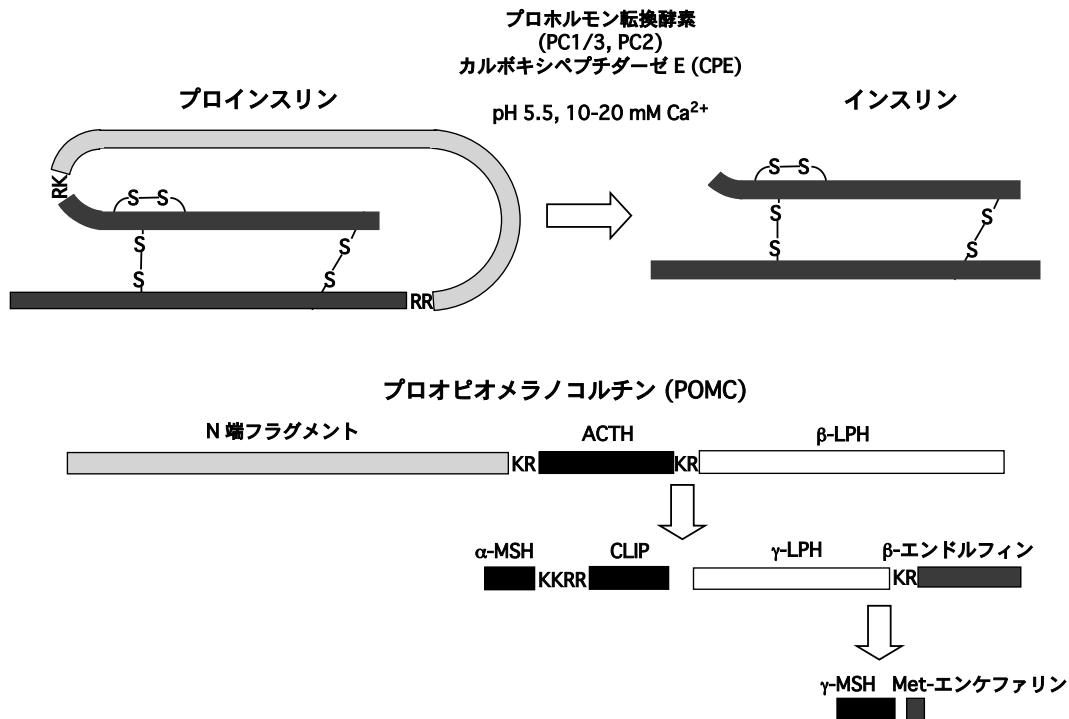


図3 ホルモン前駆体のプロセシング  
(上) インスリン, (下) POMC.

次から次へとクローニングされ、成長ホルモン、プロラクチンなど少数例を除いて大部分のホルモンは塩基性アミノ酸対に隣接して前駆体中に含まれることが明らかになった<sup>30,31)</sup>(図3)。

それでは活性型ホルモンはプロホルモンからどのようにして生成されるのだろうか。ペプチドホルモンはERに付着したリボソーム上でシグナルペプチドをもつ前駆体プロホルモンとして形成され、ER内腔へ導かれる。このシグナルペプチド部分はERにドッキングして切断を受けるが、その分子プロセスはロックフェラー大学の Blobel 博士らによって明らかにされた。そのメカニズムは現在科学エッセイストとして活躍しておられる福岡伸一博士の総説「調節性エキソサイトーシス経路の分子解剖」に詳しい<sup>32)</sup>。シグナルペプチドが除かれたプロホルモンはER内腔で三次構造をとり、TGNに運ばれる。ここ迄のプロセスはホルモンを顆粒内 dense-core に凝縮するグラニタンパク質も同様である。TGNはプロトンポンプV-ATPaseによって弱酸性となり、またCa<sup>2+</sup>ポンプによってCa<sup>2+</sup>濃度も高くなっているためグラニタンパク質はホルモンを巻き込みながら凝集するという<sup>3)</sup>。プロホルモンは顆粒周辺部に局在するプロホルモン転換酵素(PC1/3, PC2)によってその塩基性アミノ酸対部位で切断され、C端に残った塩基性アミノ酸はカルボキシペプチダーゼE(CPE)で除去される(図3)。さらにいくつかのホルモンはそのN端がパイログルタミル化(GnRH, TRH)、アセチル化(ACTH)され、グレリンの場合は3番目のSerがオクタノイル脂肪酸でアシル化される。C端も多くのホルモンでは塩基性アミノ酸除去後GlyとなるのでGlyがアミド化酵素で開裂してカルボキシアミドとなる。このような修飾を受けた活性型ホルモンはグラニン凝集体に巻き込まれて顆粒中央 dense-core 部に集積する。

### 5. 内分泌顆粒形成とホルモン集積メカニズム説の変遷

1980年代、マックスプランク研究所のWieland Huttnerとロンドンインペリアルがん研究ファンドのSharon Toozeは、ホルモンがグラニタンパク質の凝集に巻き込まれてホルモン顆粒に導入される“グラニン凝集説”を提唱し、この説が90年代後半迄主流となっていた<sup>3,33~36)</sup>。この説の基盤となるグラニタンパク質は7種類が知られ、そのうちCgA(431-445アミノ酸)、CgB(626-651アミノ酸)、SgII(559-586アミノ酸)がよく研究されてきた<sup>37,38)</sup>。これらのタンパク質は弱塩基性環境で凝集しやすく、カルシウムを結合する性質をもつ。Huttner, ToozeらはCgA, CgBのN端側二つのCysで構成されるCys間ループ(図4)に注目し、副腎褐色細胞腫由来PC12細胞培養にジチオスレイトール(DTT)を加えてこのループを還元するとCgBは分泌顆粒に行かず、構成性経路から細胞外に放出

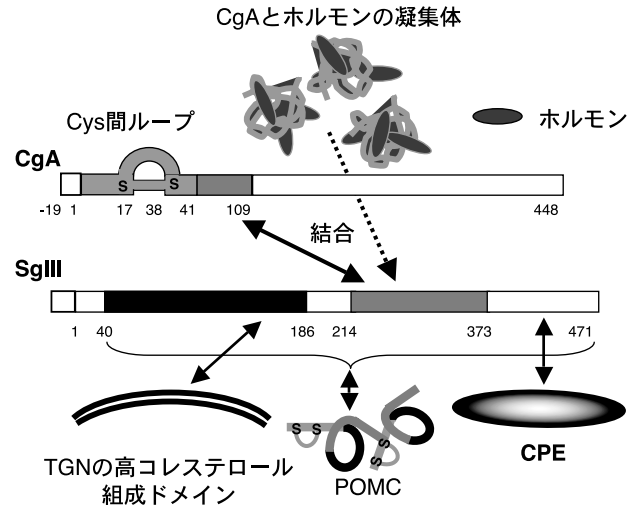


図4 CgA, SgIII, CPE, ホルモン, 高コレステロール組成膜の複合体形成様式

されること、Cys間ループをもたないSgIIはDTTの影響を受けずに分泌顆粒に導入されることを観察した<sup>39)</sup>。従ってCys間ループを除去した変異CgBをPC12で発現させると、変異CgBは調節性分泌経路に入らずに構成性経路から放出されると考えたいところだが、実際には変異CgBは内因性CgBと凝集を起こして幼若顆粒に運ばれるので変異CgBだけの分泌様式を観察することができない。そこでHuttnerグループのKromerらはワクシニアウイルスを用いてCgBの発現実験を行った。というのは、このウイルスは宿主細胞のタンパク質合成をストップさせてウイルス遺伝子がコードするタンパク質だけを発現させるからである。この発現実験で、変異のないCgBは幼若顆粒に運ばれたが、変異CgBは顆粒に導かれることなく、構成性経路から細胞外に放出された<sup>40)</sup>。その結果、彼らはCys間ループがCgBを顆粒に導くシグナルであると考え、この仮説を次の研究で詳しく検証した。PC12細胞で $\alpha_1$ -アンチトリプシン( $\alpha_1$ -AT)を発現させると $\alpha_1$ -ATは血清タンパク質なので構成性経路から分泌される。 $\alpha_1$ -ATにCgBのCys間ループを結合させたcDNAコンストラクトを発現させると、融合タンパク質が幼若顆粒に入る割合が増え、外部刺激を受けるまで細胞内に留まるようになり、更にループ数を増やすと融合 $\alpha_1$ -ATが細胞内に留まる割合が増加した<sup>41)</sup>。この事実はCys間ループがCgBを分泌顆粒に導くシグナルとして機能していることを意味する。しかし、彼らはどのような機序でCys間ループが顆粒膜に結合するかについては何も触れていない。更に、Cys間ループを顆粒内輸送シグナルとする仮説はグラニン凝集が顆粒内輸送の原因とする考えから離れてきている。

それでは、顆粒内輸送にグラニン凝集が重要とする考えはどうなってしまったのだろうか。グラニタンパク質は先述のように弱塩基性、高カルシウム濃度の顆粒内環境で

凝集体をつくる。HuttnerグループはAtT-20細胞でCgBを発現させると23 kDaのPOMCフラグメントが分泌顆粒に貯留するようになることを示した。これはCgB凝集体に23 kDaフラグメントが巻き込まれて顆粒内へ運ばれると解釈できる<sup>42)</sup>。しかし、グラニン凝集体に巻き込まれる23 kDa POMC量は少なく、ホルモン輸送体として*in vivo*内分泌細胞で機能できるのかどうかは検討されなかった。私は、グラニン凝集はホルモンを分泌顆粒に導くシグナルではなく、補助プロセスと考えている<sup>43)</sup>。

このように“グラニン凝集説”が顆粒形成仮説の主流になっていた97年、NIHのPen Lohらが、CPEが受容体となってホルモンを顆粒内に導く“ホルモン受容体説”を提唱し<sup>44)</sup>、“グラニン凝集説”との間で激しい論争が始まった(図5)。ところで、ここでいう“受容体”とはいわゆる7回膜貫通型“受容体”などとは違ってホルモンの輸送体という意味である。また90年代には、顆粒内輸送に関して顆粒局在タンパク質が選別される部位をTGNとする“sorting for entry”説と、TGNから少し進んで幼若顆粒とする“sorting by retention”説の二つの間で論争が行われていたが、グラニンによる内分泌ホルモン集積メカニズムを変更するようなものではなかった<sup>35,45)</sup>。Lohらの説で主役となるCPEはジャクソンラボのEd Leiterのグループが肥満*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスの原因遺伝子として同定し、このCPE遺伝子にはSer202Pro変異があると報告した<sup>46)</sup>。先述のようにCPEはPC1/3、PC2で限定切断された前駆体のC端塩基性アミノ酸対を除去する酵素で、この酵素変異がなぜ肥満を惹起するのか大きな論争に発展した。Lloyd Fricker(アルバートアインシュタイン大学)とLeiterグループは、ホルモン前駆体に塩基性アミノ酸が残っているとそれが結果的に肥満につながると考えた<sup>47,48)</sup>。*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスの内

分泌細胞ではPC1/3活性を抑えるグラニン様ペプチドproSAASがCPE活性がないために不活化されず、proSAASがPC1/3活性を抑えてしまう。すると、満腹感を与える活性型 $\alpha$ -MSHやCARTが前駆体から切り出される量が激減し、摂食行動が抑制されないで肥満となるとする<sup>49,50)</sup>。これに対してLohらは、CPEはPOMCを分泌顆粒に運ぶ輸送体で、POMCのN端ペプチド [<sup>125</sup>I] N-POMC<sub>1-26</sub>はそのAsp10とGlu14、Leu11とLeu18でCPEのArg255とLys260に直接結合するとした<sup>44,51)</sup>。CPEは前駆体として産生され、N端近くにある塩基性アミノ酸群で切断を受けて活性型に転換されるが、*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスではCPEはSer202Pro変異のために前駆体のまま速やかに分解されてしまう<sup>52)</sup>。つまり、CPEをノックダウンした神経芽腫由来Neuro-2a細胞ではPOMCが幼若顆粒に入らずに構成性経路から培養液中に放出されるのと同じプロセスが*in vivo*で起こっているとした。その証拠として、正常マウスでは下垂体のPOMC分泌がドーパミン刺激で抑制されるが、*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスの下垂体ではこの抑制がなくなること示した。それではどうして*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスが肥満になるのか。2000年に入るとPOMC経路の異常で肥満となる症例が報告され出した。それは $\alpha$ -MSH(melanocyte-stimulating hormone)の受容体melanocortin 4 receptor(MC4R)の遺伝子異常による肥満である<sup>53,54)</sup>。 $\alpha$ -MSHはPOMCを前駆体とするのでPOMCが前駆体のまま留まる、あるいは減少する病態では $\alpha$ -MSHが不足し、MC4R遺伝子異常で見られるような肥満になると考えられ、事実、POMC欠損による肥満も報告されている<sup>55,56)</sup>。しかし、*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスの肥満原因はLohグループもFrickerグループも $\alpha$ -MSHの不足とは結論しておらず、LohグループはCPE遺伝子KOマウスで、Frickerグループは*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスのマススペクトル解析で多くのホルモン異常を観察しており、肥満の成因は複数のホルモン異常が絡み合った結果だと考えている<sup>57,58)</sup>。

このCPEの“ホルモン受容体説”が発表されるや否や、“グラニン凝集説”派を中心とする研究者達はこの仮説に厳しい批判を浴びせた(図5)。ジュネーブのHalbanのグループは*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスの膵島でプロインスリンが正しく顆粒内に輸送されること、インスリンもグルコース刺激に応じて分泌されることを示した<sup>59)</sup>。FrickerとSteinerのグループは*CPE<sup>fat/fat</sup>*マウスの膵 $\beta$ 細胞をSV40で株細胞化(NIT-2、-3)し、正常膵 $\beta$ 細胞由来のNIT-1とグルコース刺激インスリン分泌能を比較したところ、基礎分泌に対してグルコース刺激ではNIT-1で4倍、NIT-2、-3では低下はしているものの2倍の分泌増加を示した<sup>60)</sup>。LohらもこのNITシリーズ細胞を用いてSer202Pro変異CPEの分泌実験を行い、変異CPE前駆体は細胞内で分解されやすいものの、一部は分泌顆粒に運ばれることを認めた<sup>52)</sup>。我々

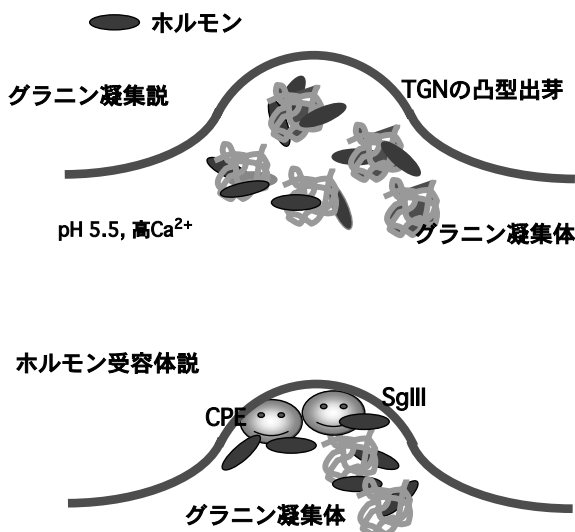


図5 内分泌顆粒形成仮説  
(上) グラニン凝集説、(下) ホルモン受容体説。



も  $CPE^{fat/fat}$  マウスの下垂体灌流実験で POMC は CRH (corticotropin-releasing hormone) に反応して調節分泌されるが、正常マウスの下垂体に比べると CRH 刺激による POMC 分泌量が減っていること、POMC の基礎分泌 (構成性分泌による) が増えていることを示し、 $CPE^{fat/fat}$  マウスでは POMC に軽い分泌異常があると報告した<sup>61)</sup>。従って CPE 欠損による分泌障害は Loh らが 97 年に Cell に発表したような調節性分泌経路がなくなる変化ではない。ところで我々は 2002 年に、セクレトグラニン III (SgIII) が同じグラニンファミリーの CgA と結合して顆粒内に移行することを示した<sup>62)</sup>。この“SgIII ホルモン受容体説”は“CPE 受容体説”の修飾版と見なされ (図 5)、論文を投稿する度に“グラニン凝集説”派から厳しいコメントを受けることになり、それは現在でも続いている。

## 6. SgIII は新しいホルモン受容体

98 年、私の研究室にテキサス大学ダラス校の Tom Sudhof 研究室から穂坂正博君が加わり、翌年にはサンディエゴの Burnham Institute から鳥居征司君が加わった。2 人とも、筑波大学、中山和久先生 (現在 京都大学 薬学研究科教授) の研究室で学位を取得して米国に留学し、私の研究室でまた一緒になった。二人は共に中山先生の下ではホルモン前駆体から活性ペプチドを限定切断するプロセッシング酵素のクローニングと切断メカニズムの研究を行っていた<sup>63,64)</sup>。私の研究室では二人とも分泌顆粒を研究対象にし、穂坂君は SgIII を中心にした顆粒形成メカニズムを、鳥居君は顆粒局在タンパク質フォグリンの機能と膵  $\beta$  細胞の増殖機構について研究を始めた。穂坂君はホルモンのキャリアーである CgA が顆粒内に運ばれるには CPE のような受容体タンパク質が必要と仮定し、酵母ツーハイブリッド法で CgA の結合タンパク質をスクリーニングした。その結果、CgA と同じグラニンファミリーに属する SgIII を同定した。この両者の結合には Huttner, Tooze 等が重要とする CgA の N 端側 Cys ループは関与せず、その下流の部分が SgIII の結合サイトであった<sup>62)</sup> (図 4)。ところで、分泌関連タンパク質が分泌顆粒に運ばれるかどうかを簡便に見るのに AtT-20 や PC12 のように突起を出す内分泌系培養細胞を使って、調べたいタンパク質が突起先端部に局在するかどうかを免疫染色で判別する。これは分泌顆粒が突起部分に集中して局在するからである<sup>65)</sup>。CgA は SgIII と共にこの突起先端部で強く染色されるが、CgA から SgIII 結合部位を欠落させたコンストラクト CgA  $\Delta$  (41-109) を AtT-20 細胞で発現させると CgA  $\Delta$  (41-109) はゴルジで染色されるだけで突起部分には移行しなくなる。つまり、CgA が分泌顆粒に運ばれるためには SgIII との結合が必要ということになる。それでは SgIII はどのようなメカニズムで分泌顆粒に運ばれるのだろうか。SgIII はシグナルペ

プチドを含めて 431 個のアミノ酸からなるが、シグナルペプチドを除いて SgIII23-186, SgIII187-372, SgIII373-471 の 3 部分にマーカーペプチド FLAG をつけて発現ベクター pcDNA3 に組み入れ、AtT-20 細胞に発現させた<sup>66)</sup>。すると、SgIII23-186 だけが突起部分に到達できなかった。更に、SgIII 全長から (40-186) を除いた SgIII  $\Delta$  (40-186) を AtT-20 に発現させて cAMP で刺激しても SgIII 分泌増加は見られず、構成性経路から分泌される。つまり、この部位が SgIII 分子を顆粒へ運ぶシグナルをもつと推測された。ところで、SgIII が脂質二重膜に直接結合する可能性を調べるために、SgIII タンパク質をアフィニティーゲルに固定し、 $[^3\text{H}]$ リン脂質で作ったリポソームにコレステロールを順次増加させてゲルに流すと、コレステロール組成が高いリポソームほど SgIII に結合する。興味深いことにこのコレステロール結合には SgIII23-186 部分が関与している (図 4)。現在、この SgIII のコレステロール結合部位は更に狭まって SgIII170-186 となっている。我々はこの部位がコレステロール結合能をもつメカニズムを解析している。

我々は、SgIII が TGA 凸型出芽膜のコレステロールドメインに結合して CgA を分泌顆粒に集積させると考えている (図 4) が、ホルモンを顆粒に運搬する機能は CgA に限定されるのだろうか。Loh らは CPE は POMC, プロインスリン, プロエンケファリンと結合するという。そうすると SgIII, CgA, CPE の相互関係、更にそれぞれの分子とホルモンの結合はどうなっているのだろうか。SgIII と CPE は分泌顆粒の免疫電子顕微鏡像で顆粒膜直下に局在し、CgA とホルモンは顆粒全体に点在する<sup>37,67)</sup>。事実、SgIII と CPE は相互に結合し、その結合は SgIII の C 端側で起こる<sup>61)</sup> (図 4)。従って、SgIII はそのやや前半部分でコレステロールに結合し、中間部で CgA と、C 端部で CPE に結合することになる<sup>68)</sup>。しかし、CgA と CPE は結合しない。これは、Loh らが Neuro-2a 細胞で CPE をノックダウンすると、POMC, プロインスリン, プロエンケファリンは構成性経路から培養液中に分泌されるが、CgA は CPE がなくても幼若顆粒に輸送されることを示す実験結果を裏付けた<sup>69)</sup>。ところで、SgIII, CgA, CPE はいずれも POMC と結合し、その強さは  $CPE > SgIII > CgA$  の順であった。また、CgA と CPE は凝集体を作りやすく、とくに CgA は *in vitro* 実験でホルモンを巻き込んで凝集体を作って沈殿する。一方、SgIII の凝集能は非常に弱い<sup>43)</sup>。従って、SgIII は顆粒膜直下でコレステロールに結合しながら CPE を引き寄せ、リピッドラフトに局在する PC1/3, PC2 とホルモン前駆体のプロセッシング複合体を形成するというシエマを描くことができる (図 6)。

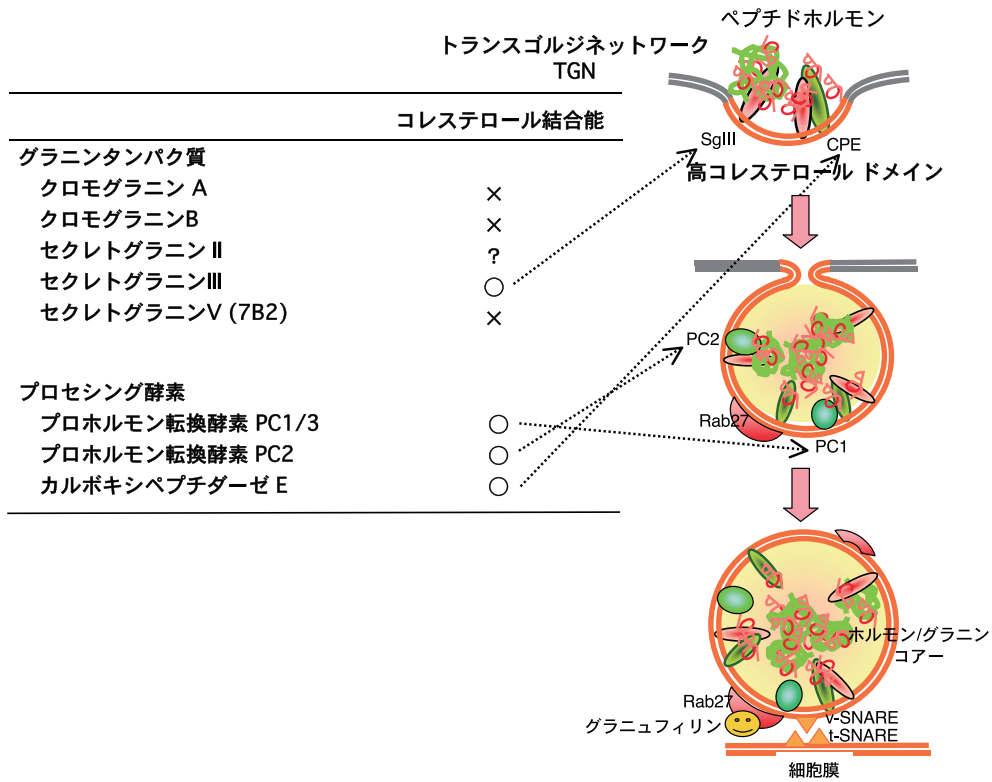


図6 高コレステロールドメインを基盤とする分泌顆粒形成  
TGNからの出芽(上), 成熟(中), 形質膜へのドッキング(下)の模式図

7. 分泌顆粒膜は高コレステロール組成

分泌顆粒の膜は40-50 mol%という非常に高いコレステロール組成をもつ<sup>65)</sup>(図7)。細胞内のコレステロールは, ERでアセチル-CoAから合成される内因性由来と, 小腸から吸収され, 肝でLDLの構成成分となり血流で運ばれて末梢組織の細胞膜LDL受容体に結合して細胞内に取り込

まれる外因性由来からなる。その比率は細胞, 組織によって異なるが, 一般的に内因性の方(700 mg/day)が外因性のもよりやや高いという<sup>70)</sup>。コレステロールの細胞内オルガネラ分布は意外なことに内因性コレステロール合成が行われるERで一番低く, 5 mol%前後, それからゴルジ(10-15 mol%)を経て細胞膜に向かって高くなり, 細胞膜では20-30 mol%に達する<sup>71,72)</sup>(図8)。コレステロールはリ

シヨ糖密度勾配超遠心法  
113,000 xg 19 時間

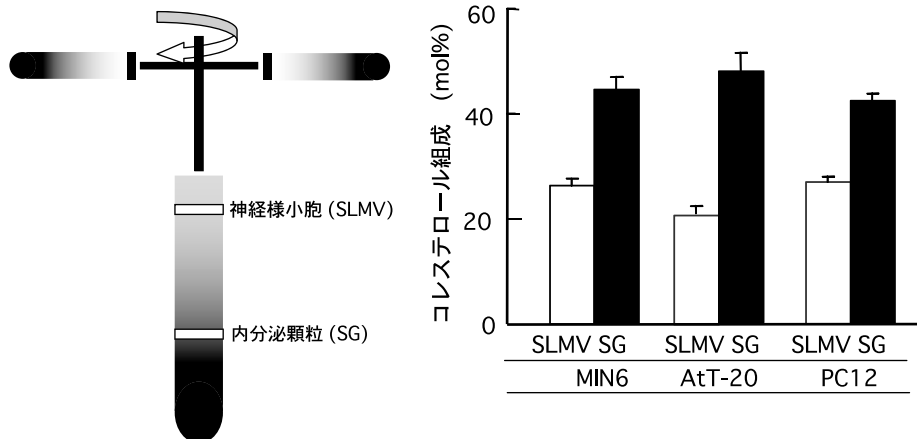


図7 神経様小胞膜 (SLMV) と内分泌顆粒膜 (SV) のコレステロール組成

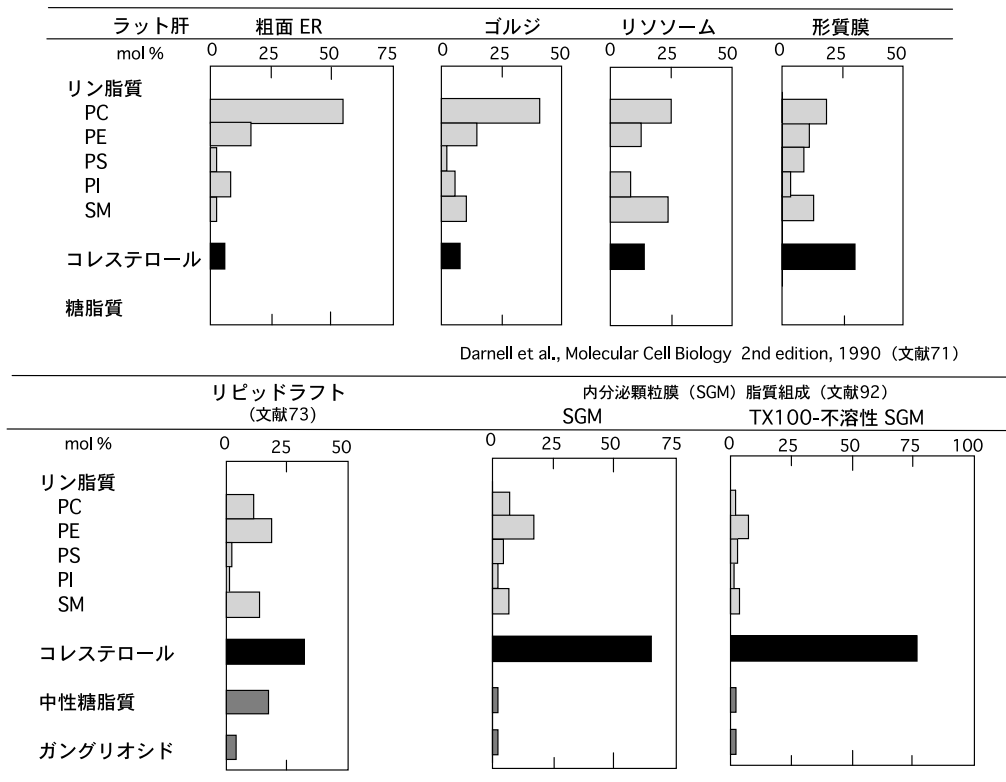


図8 細胞内オルガネラの脂質組成  
内分泌顆粒膜のコレステロール組成はリピッドラフトのそれよりも高い。

ピッドラフトで高いというが MDCK 細胞のデータでは 30 mol% を超える程度であり<sup>73)</sup>、分泌顆粒膜のコレステロール組成が異常に高いことに気づく。では、分泌顆粒膜のコレステロールは内因性、外因性のどちらを利用しているだろうか。MIN6 細胞をリポタンパク質除去血清で培養すると分泌顆粒膜のコレステロール組成は 10-20% 低下する。次にスタチン (ロバスタチン) を加えて培養すると顆粒膜コレステロール組成は 40-50% 低下し、しかも分泌顆粒の形がバルーン状に膨らんで dense-core の部分が激減し、更には消失する (論文改稿中)。つまり、顆粒膜コレステロールは内因性に由来する割合が高いが、外因性コレステロールも確実に構成成分となっている。それは後述の蛍光コレステロールプローブが外因性コレステロールとして分泌顆粒膜に取り込まれる実験から示される。MIN6 細胞の顆粒をショ糖密度勾配超遠心法で分画するとこのコレステロールプローブが顆粒分画に高いピークを作る (図 9)。

コレステロールの顆粒膜集積機構を研究するためには ER→ゴルジ→分泌顆粒膜移行を可視化するコレステロールプローブが強力な武器になる。モレキュラープローブ社は、細胞内コレステロール輸送を観察するために蛍光団を付加した NBD-cholesterol と BODIPY-cholesterol (図 10A) を販売している。しかし、これらは蛍光団中に電荷をもつので酸化コレステロールのように膜に留まりにくい、ある

いはコレステロールエステルと同様に細胞中の脂肪滴に集積してしまうという欠点をもつ。一方で、植物由来コレステロール dehydroergosterol (DHE) は細胞内コレステロール動態を反映するとされるが、蛍光強度が弱く、観察が難しい (図 11, 左上)。ところで、モレキュラープローブ社から販売されているコレステロールプローブは 4 種類だけ (図 10A) なのに、脂肪酸・脂質プローブは 100 種類以上も販売され、脂肪細胞やマクロファージの脂肪滴形成研究で頻用されている。従って、本来ならば脂質プローブと併用して細胞膜のリピッドラフトなどでコレステロール、脂肪酸、リン脂質とのエキシマー効果 (例えばピレンの場合、発光波長が 400⇒470 nm へ長波長化する) の観察が期待されるが、そのコレステロールプローブも前述のような欠点をもち、しかもエキシマー効果の観察に適したピレン基付加プローブが販売されていない。そこで我々は群馬大学工学部 応用化学科の協力を得て、酸化コレステロールを含む複数のコレステロールプローブを作成した (図 10B)。これによって、モレキュラープローブ社から販売されている短鎖から長鎖まで種々の脂肪酸プローブや蛍光団付加アシル基を含むリン脂質プローブと対応させて使うことが可能になった。このうちの一つ、ピレン付加コレステロールプローブは図 9 に示すように MIN6 細胞で顆粒分画に取り込まれ、更にピレンにケイ素を導入すると蛍光は非常に

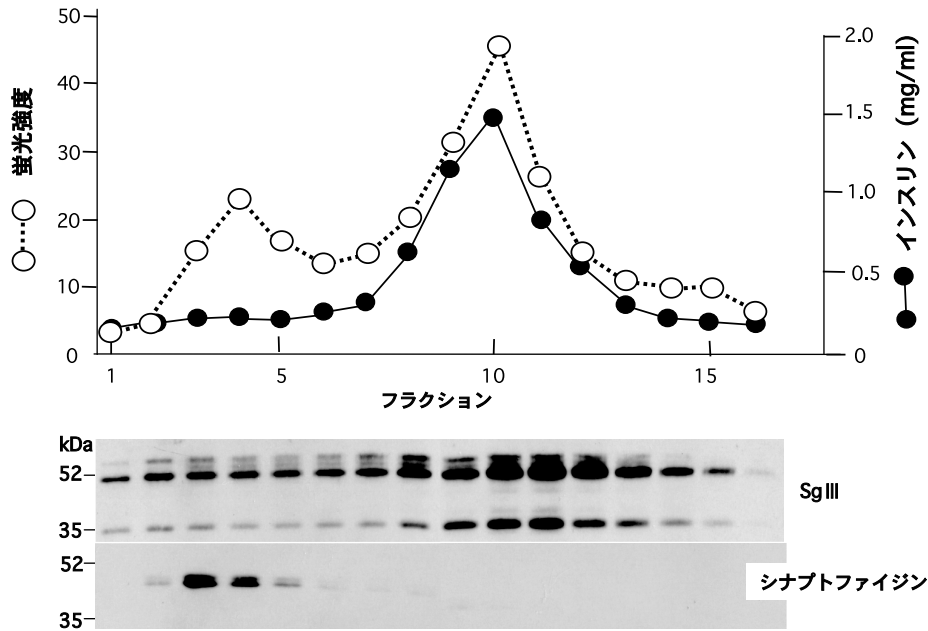
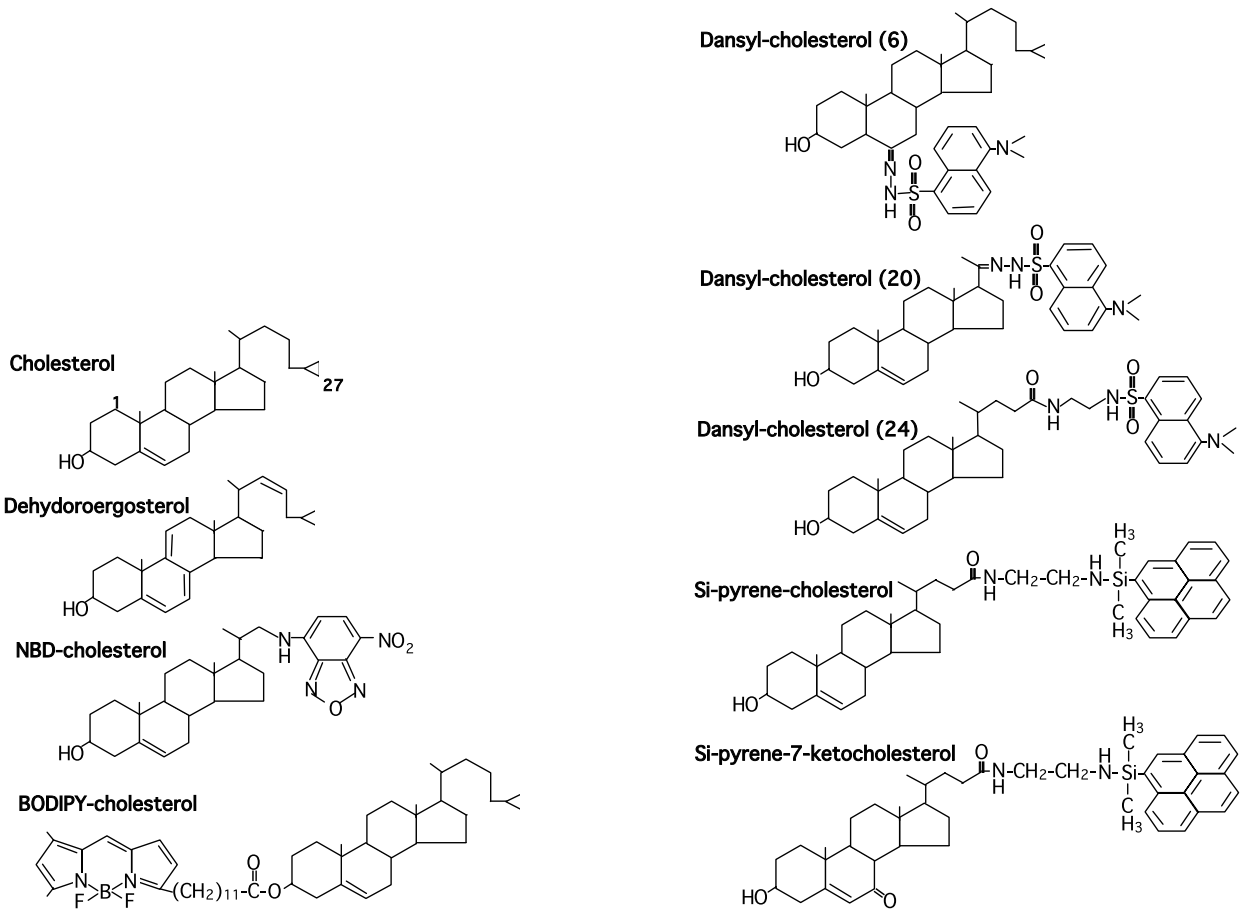


図9 蛍光コレステロールプローブのインスリン顆粒集積  
シヨ糖密度超遠心分画でインスリンピークとピレンの蛍光ピークが一致する。最初の蛍光ピークは神経様小胞膜のコレステロール集積を反映する。



(A) 市販のコレステロールプローブ

(B) 我々が作成したコレステロールプローブ

図10 発光コレステロールプローブ

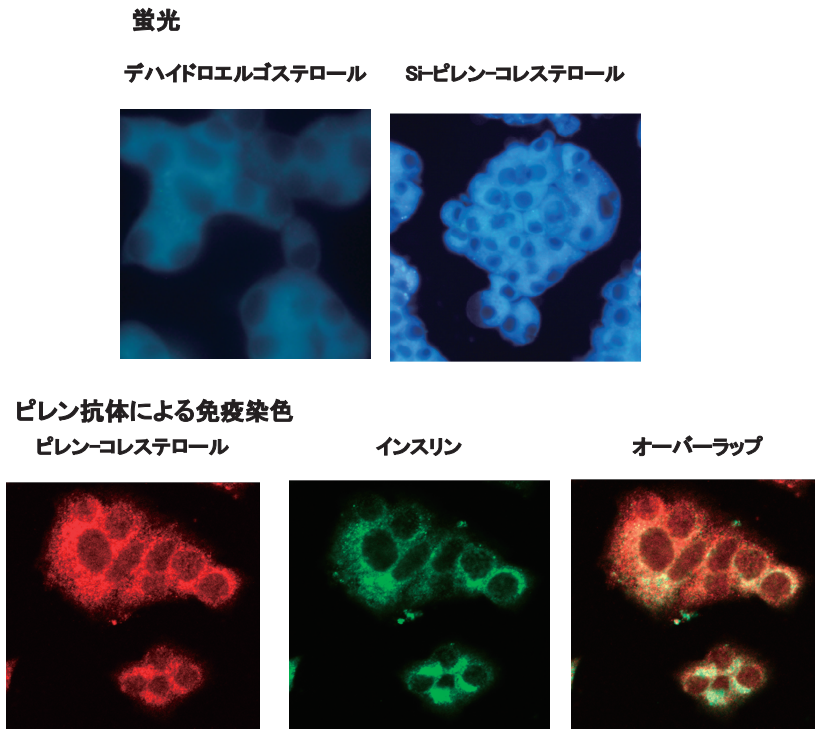


図 11 ピレン蛍光コレステロールプローブを用いた膵β細胞株 MIN6 の染色  
(上) 蛍光発光, (下) ピレン抗体による免疫染色。

はっきりと顆粒を描出する (図 11, 右上)。このプローブにはもう一つ便利な点があり、それはピレンに対する抗体が使えることで、細胞を固定した後にインスリンと二重染色ができる (図 11, 下段)。つまり、このプローブは生細胞、固定細胞の両方に適用できる。我々は分泌顆粒膜のコレステロール集積メカニズム解明にこのプローブが役立つことを期待している。

#### 8. クロモグラニン A は分泌顆粒形成の発端因子か？

Loh 博士らは、“CPE ホルモン受容体説”を提唱してから 4 年後、「CgA が分泌顆粒形成の on/off 因子である」という仮説を発表した<sup>74)</sup>。分泌顆粒形成は CgA 発現によって on となり、消失と共に off となるというもので、内分泌研究者に大きな衝撃を与えた。その根拠となる実験は、POMC を発現させた PC12 細胞で、CgA 発現をアンチセンス RNA でノックダウンすると POMC の調節性分泌が障害されること、さらに調節性分泌能を失った AtT-20 細胞や、単なる線維芽細胞に CgA を過剰発現させると分泌顆粒が形成されるとするもので、CgA と CPE が共同して内分泌顆粒の形成から成熟過程を制御しているとした。この仮説は“CPE ホルモン受容体説”以上に大きな論争を巻き起こした<sup>75,76)</sup>。反対派のミラノの Meldolesi らは種々の PC12 細胞株とありふれた線維芽細胞を用いて CgA を過剰発現させたが、分泌顆粒は形成されなかったと反論した<sup>77)</sup>。

Huttner 一派の Day と Gorr は、分泌顆粒には CgA が無いものも存在する、CgA は分泌顆粒がない細胞でも合成されると反駁し、CgA はホルモンなど顆粒局在タンパク質と結合し、巻き込みながら顆粒内に輸送するという Huttner らの仮説を繰り返した<sup>75)</sup>。しかし、「CgA 分泌顆粒形成キープクター説」に賛同する研究者も現れた。UCSD の Mahapatra らは、CgA ノックアウトは分泌顆粒数とサイズを減少させ、マウスは高血圧を呈するデータを報告した<sup>78,79)</sup>。Loh グループの Kim らは、副腎で CgA をノックダウンすると顆粒数が減少し、副腎髄質が膨化するというデータを示した<sup>80)</sup>。更に、CgA 以外のグラニタンパク質でも、CgB と SgII が NIH3T3 や COS のような非内分泌系細胞で分泌顆粒を形成するという報告も相次いだ<sup>81,82)</sup>。逆に、Day グループの Hendy らは、CgA 遺伝子欠損マウスで内分泌系に目につくような変化は見られず、分泌顆粒の数とサイズも正常内分泌細胞と同じであることを示し<sup>83)</sup>、論争はピークに達した。このように CgA の顆粒形成能は研究者によって賛否両論の結果が出され、未だに決着がついていない。

#### 9. セクレトグラニン III が分泌顆粒形成の発端因子

CgA は臨床診断に使われ、血中 CgA 高値は、副甲状腺、膵十二指腸、下垂体前葉に多発性に腫瘍ができる多発性内分泌腫瘍症 I 型 (MEN1)、甲状腺、副腎髄質、副甲

状腺に多発的に腫瘍ができる MEN2, 小腸カルシノイド, 神経内分泌腺様分化した前立腺がんで見られ, 内分泌腺腫瘍の腫瘍マーカーになっている<sup>84-87</sup>). CgA の臨床診断応用は, CgA が内分泌腺組織で高発現していることを基盤にしているが, CgA はどの内分泌組織にも発現しているかというところではなく, 視床下部では傍室核で発現を見るものの弓状核や視索上核では発現がほとんど見られない. これに対して SgIII は視床下部で弱いながらも広く発現し, 更に SgII は強く広汎に発現している<sup>88</sup>). 胃粘膜では CgA は前庭部のガストリン産生細胞で強く発現し, ガストリノーマの腫瘍マーカーとして用いられるが, SgIII は胃粘膜上部の粘液細胞, 下部のペプシノゲン産生主細胞で広汎に発現し (論文準備中), 外分泌顆粒の形成にも関与していることをうかがわせる. 従って, SgIII は内分泌, 外分泌を問わず広く顆粒形成に関わっていると推測される. SgIII が顆粒形成で果たす役割の重要性はそのコレステロール結合能にあり, 副腎クロマフィン細胞や PC12 細胞が以下のようにそれを裏付ける格好の材料となった.

クロマフィン細胞と PC12 は, Huttner と Toozé グループ, Loh グループ, Yoo グループなどが彼らの仮説の違いを超えて顆粒形成研究に頻用してきた細胞で, CgA, CgB, SgII などのグラニタンパク質を多く含む. ところが, これらのグラニタンパク質に比べて SgIII の発現は非常に低い. そうすると, 「SgIII がその高コレステロール結合能をベースにしてホルモンと CgA の凝集体を内分泌顆粒に導く」という我々の仮説 (図 6) はクロマフィン細胞や PC12 細胞では成り立たなくなる可能性があり, Mel-dolesi らはその総説でこの事実を我々の仮説の矛盾点として指摘した<sup>89</sup>). これに対して我々は SgIII の shRNA を一つ一つの PC12 細胞にインジェクトしたノックダウン実験で, CgA はもちろん, クロマフィン細胞に多量に含まれるホルモン adrenomedullin も突起先端部に移行しなくなることを, SgIII が CgA と adrenomedullin を顆粒内に先導するためにはコレステロール結合ドメインが不可欠であること, adrenomedullin は CgA の凝集体に巻き込まれて複合体を作ることを示し, SgIII 発現が少なくとも多量の CgA と adrenomedullin を顆粒内に導けることを示すことができた<sup>43</sup>). 更に興味深いことには, AtT-20 細胞で SgIII をノックダウンすると顆粒がバルーン状を呈し始め, スタチンを加えて培養した時の顆粒像を示すようになる (論文改稿中). この事実は顆粒膜の高コレステロール組成が SgIII によって維持されていることを意味し, SgIII がどのような機序で高コレステロール組成を維持するのか, 今後の大きな研究課題である.

このように SgIII をノックダウンするとホルモンの顆粒内導入と顆粒形成が障害されるので, SgIII をノックアウトすれば内分泌細胞の分泌顆粒は消失するはずである.

我々は論文提出の度にレビュアーから SgIII のノックアウト実験を要求され, 遅ればせながら SgIII ノックアウトマウスを作成中である. ところで SgIII ノックアウトに関しては自然発生 SgIII 遺伝子欠損マウス 1B1075 が存在し, このマウスは生存, 繁殖, 行動などで特に異常を示さない<sup>90,91</sup>). 1B1075 マウスでは内分泌細胞の形態と機能について特に記述はないが, その表現型から推察して内分泌細胞の顆粒は維持されていると思われる. そうすると我々の「SgIII が分泌顆粒形成の発端因子説」はもろくも崩れてしまうことになる. だが, 我々は先述の AtT-20 細胞を用いた SgIII ノックダウン実験でバルーン状の分泌顆粒と共にやや小さめではあるが正常形態の分泌顆粒も観察しており, 高コレステロール組成を基盤とするホルモン集積機構には SgIII に加えて第二, 第三のコレステロール結合タンパク質が存在すると考えている. 確かに, 分泌顆粒形成という生命体の重要機能が SgIII 単独で担われていると考える方が無理であり, 今後, 第二, 第三のコレステロール結合タンパク質を同定して行くことが分泌顆粒形成機構の解明につながると信じている.

## 10. 分泌顆粒形成研究の展望

最後に, これからの分泌顆粒形成メカニズム研究でキーポイントとなるだろう 3 点について述べ, 今後を展望する. 1 点目は, 分泌顆粒形成で果たすコレステロールの役割である. 分泌顆粒には表 2 にリストアップするように多くのタンパク質が局在し, この中のいくつかはコレステロール結合能がある, あるいはリピッドラフトに局在すると報告されている (図 6)<sup>92-94</sup>). 我々は, 分泌顆粒は TGN の高コレステロールドメインを基盤にドミノ状にホルモンと顆粒局在タンパク質が集積して複合体を形成し, 凸型出芽すると考えている (図 6). しかし, そうだとすると次の大きな疑問に直面する. TGN の高コレステロールドメインはどのようなメカニズムでできるのか. そのドメインには, 顆粒内を弱酸性にするプロトンポンプ V-ATPase, 高カルシウム環境にするカルシウムポンプ, プロホルモンを活性化にするプロセッシング酵素, ホルモンのキャリアー グラニタンパク質などが集積するはずである. 我々はこのドメイン形成の起因タンパク質の一つに SgIII を仮定している. SgIII のコレステロール結合ドメインは, SCAP (sterol carrier protein), NPC (Niemann-Pick C)1, NPC2, SCAP (SREBP cleavage-activating protein), StAR (steroidogenic acute regulatory protein) で見られるコレステロール結合 START ドメインなどのようなコレステロール内ポケット構造<sup>95,96</sup>)ではなく, ドメイン周囲に多数のコレステロール分子を付着できる  $\alpha$ ヘリックス構造をとっている. 現在, 我々はこのドメインが何分子のコレステロールを付着できるのか, 先述した蛍光コレステロールプローブを使

いながら研究を進めている。

2点目は、分泌顆粒局在タンパク質と疾患の関係で、局在タンパク質の異常がどのような顆粒形成の変化を導くか検索することである。先述のように、CgAは腫瘍マーカーとして用いられているが、HottaらのグループはSgIIIのSNPが肥満発症と関係するデータを発表した<sup>97)</sup>。彼らは94名の肥満患者、658名の正常者についてSNPデータベースから62,663のSNPをセレクトし、二つのSNPがSgIII転写活性を制御するとした。一つのSNPは5'上流に位置し、もう一つは第1イントロンにあって、これらのSNPはSgIII転写活性を低下させる。興味深いことに、最近HottaらはSgIIIがSgIIと結合することを見出した<sup>88)</sup>。SgII, SgIIIともに先述のように視床下部の摂食関連ホルモン産生核で高発現しており、顆粒形成の起因となることからその発現低下が摂食抑制ホルモンの顆粒内含有レベルを下げて肥満を引き起こすのかも知れない。今後、更に詳細な研究が期待される。

3点目は、分泌顆粒形成を究明する技術のブレイクスルーである。私は、「1. はじめに」で、3) 分泌顆粒の形成メカニズムの研究は、1) ホルモン分泌を制御するメカニズムと、2) 分泌顆粒の細胞内輸送メカニズム、に比べてアプローチが難しいために立ち遅れていると記した。では、今後どのような技術的ブレイクスルーが出現すれば研究推進の駆動力となるだろうか。例えば、コレステロール輸送、その高組成維持、結合タンパク質の同定、顆粒局在タンパク質の集積機構、分泌顆粒の機能完備、などのメカニズムを分析する技術が必要だが、それにも増してまず第一にTGN凸型出芽膜や幼若顆粒という採取しにくいオルガネラを集めなくてはならない。更に顆粒観察には免疫電子顕微鏡をルーチンに用いなければならない。それでも最近の技術革新で、脂質とタンパク質両方の解析を同時に進められる顕微マスマLDIが使えるようになり、今後が期待できる。蛍光ラベル技術も進展し、我々もコレステロール動態観察用の蛍光プローブ作成を進めている。調節性分泌は脊椎動物で見られる高次機能であり、それだけに内分泌細胞の培養株も分泌顆粒の存否を電子顕微鏡でチェックしていないと顆粒が減少・消失してしまう<sup>98,99)</sup>。従って、内分泌細胞で顆粒数を維持するのみならず、顆粒数を増加させる条件、例えばPTHrP添加<sup>100)</sup>などを行いながら研究材料を増やすのも研究の前提条件である。しかし、決定的に必要なのはTGNを用いた顆粒出芽・形成の*in vitro*実験系を確立することだろう。

モントリオールのReudelhuberらは“Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out”と題する総説で重要な指摘をしている<sup>101)</sup>。「この20年間、分泌顆粒形成研究ではいろいろな仮説が提示されて大きく進展した。しかし、その結果、研究者は自説に固執するあまり、

他説に批判的になりすぎている」。私は本総説で、“グラニン凝集発端説”と“CPEホルモン受容体説”，それに我々の「SgIII/高コレステロールドメイン発端説」を述べてきた。これらは当然基本的に異なる仮説だが、顆粒形成の時間差として関連する部分も多く、お互いに相容れない仮説とは思っていない。Reudelhuber自身はPC1/3, PC2, CPE, CgA等の顆粒局在タンパク質がもっている $\alpha$ ヘリックス構造が顆粒膜集積に重要と考え、このシグナルでこれ迄の仮説を洗い直そうとしている。奇しくも、SgIIIのコレステロール結合ドメインも $\alpha$ ヘリックス構造をとり、1点目のキーポイントに通じる。私は、分泌顆粒形成の解明という遠いゴールには分泌顆粒膜の高コレステロールドメイン形成から進むのが近道と考えている。

## 謝辞

本稿で紹介した研究は、群馬大学 生体調節研究所 分泌制御分野 穂坂正博准教授が中心となって行ったもので、さらに鳥居征司助教の貢献も含まれる。それらの研究は科学研究費補助金、21世紀COEプログラム、グローバルCOEプログラム等の支援を受けて行われた。

## 文 献

- 1) Leahy, J.L., Cooper, H.E., Deal, D.A., & Weir, G.C. (1986) *J. Clin. Invest.*, 77, 908-915.
- 2) Leahy, J.L. & Weir, G.C. (1988) *Diabetes*, 37, 217-222.
- 3) Halban, P.A. & Irminger, J.-C. (1994) *Biochem J.*, 299, 1-18.
- 4) Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, C., Scott, M.P., Zipursky, S.A., & Darnell, J. (2004) *Molecular and Cell Biology*, pp. 701-742, W.H. Freeman and Company, New York.
- 5) Ashcroft, F.M. & Achcroft, S.J.H. (1992) *Insulin: Molecular Biology to Pathology*, pp. 93-150, IRL Press, Oxford.
- 6) Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P. 4th, Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., & Bryan, J. (1995) *Science*, 270, 1166-1170.
- 7) Sudhof, T.C. & Rothman, J.E. (2009) *Science*, 323, 474-477.
- 8) Wickner, W. & Schekman, R. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 658-664.
- 9) Jahn, R., Lang, T., & Sudhof, T.C. (2003) *Cell*, 112, 519-533.
- 10) Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S., & Izumi, T. (2005) *J. Cell Biol.*, 171, 99-109.
- 11) Izumi, T., Kasai, K., & Gomi, H. (2007) *Diabetes, Obesity and Metab.*, 9 (Suppl. 2), 109-117.
- 12) Orci, L., Ravazzola, M., Storch, M.J., Anderson, R.G.W., Vassalli, J.-D., & Perrelet, A. (1987) *Cell*, 49, 865-868.
- 13) Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Madsen, O., Perrelet, A., Vassalli, J.-D., & Anderson, R.G.W. (1986) *J. Cell Biol.*, 103, 2273-2281.
- 14) Tooze, S.A. & Huttner, W.B. (1990) *Cell*, 60, 837-847.
- 15) Crapo, L. (1985) *Hormones: The Messengers of Life*, pp. 1-18, W.H. Freeman and Company, New York.
- 16) Nurphy, C.T., Lee, S.-J., & Kenyon, C. (2007) *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA*, 104, 19046–19050.
- 17) Ishizaki, H. & Suzuki, A. (1994) *Int. J. Dev. Biol.*, 38, 301–310.
  - 18) Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., & Hafen, E. (2002) *Curr. Biol.*, 12, 1293–1300.
  - 19) Iwami, M. (2000) *Zoolog. Sci.*, 17, 1035–1044.
  - 20) Cai, T., Hirai, H., Fukushige, T., Yu, P., Zhang, G., Notkins, A.L., & Krause, M. (2009) *PLoS Genet.*, 5, 1–13.
  - 21) Rulifson, E.J., Kim, S.K., & Nusse, R. (2002) *Science*, 296, 1118–1120.
  - 22) Tsai, P-S. (2006) *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148, 48–53.
  - 23) Smith, S.M., Renden, R., & von Gersdorff, H. (2008) *Trends Neurosci.*, 31, 559–568.
  - 24) 黒住一昌, 中井康光 (1984) 人体組織学 内分泌器・生殖器, pp. 23–68, 朝倉書店.
  - 25) 森 浩志, 香川満夫 (1994) 病理と臨床, 12, 1323–1331.
  - 26) Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S.A., Rammner, B., Grater, F., Hub, J.S., DeGroot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmuller, H., Heuser, J., Wieland, F., & Jahn, R. (2006) *Cell*, 127, 831–846.
  - 27) Brunner, Y., Coute, Y., Iezzi, M., Foti, M., Fukuda, M., Hochstrasser, D.F., Wollheim, C.B., & Sanchez, J.C. (2007) *Mol. Cell. Proteomics*, 6, 1007–1017.
  - 28) Wegrzyn, J., Lee, J., Neveu, J.M., Lane, W.S. & Hook, V. J. (2007) *Prot. Res.*, 6, 1652–1665.
  - 29) Tepperman, J. (1988) in *Endocrinology: People and Ideas* (McCann, S.M. ed.), pp. 285–333, Am Physiol. Soc., Bethesda.
  - 30) Docherty, K. & Steiner, D.F. (1982) *Ann. Rev. Physiol.*, 44, 625–638.
  - 31) Seidah, N.G. & Chrétien, M. (1992) *Trends Endocrinol. Metab.*, 3, 133–140.
  - 32) 福岡伸一 (1993) 生化学, 65, 338–362.
  - 33) Tooze, S.A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1404, 231–244.
  - 34) Dannies, P.S. (1999) *Endocr. Rev.*, 20, 3–21.
  - 35) Glombik, M.M. & Gerdes, H-H. (2000) *Biochimie*, 82, 315–326.
  - 36) Tooze, S.A., Martens, G.J.M., & Huttner, W.B. (2001) *Trends Cell Biol.*, 11, 116–122.
  - 37) Huttner, W.B., Gerdes, H-H., & Rosa, P. (1991) *Trends Biol. Sci.*, 16, 27–30.
  - 38) Taupenot, L., Harper, K.L., & O'Connor, D.T. (2003) *N. Engl. J. Med.*, 348, 1134–1149.
  - 39) Chanat, E., Weiss, U., Huttner, W.B. & Tooze, S.A. (1993) *EMBO J.*, 12, 2159–2168.
  - 40) Kromer, A., Glombik, M.M., Huttner, W.B., & Gerdes, H-H. (1998) *J. Cell Biol.*, 140, 1331–1346.
  - 41) Glombik, M.M., Kromer, A., Salm, T., Huttner, W.B., & Gerdes, H-H. (1999) *EMBO J.*, 18, 1059–1070.
  - 42) Natori, S. & Huttner, W.B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4431–4436.
  - 43) Han, L. Suda, M., Tsuzuki, K., Wang, R., Ohe, Y., Hirai, H., Watanabe, T., Takeuchi, T., & Hosaka, M. (2008) *Mol. Endocrinol.*, 22, 1935–1949.
  - 44) Cool, D.R., Normant, E., Shen, F-S., Pannell, L., Zhang, Y., & Loh, Y.P. (1997) *Cell*, 88, 73–83.
  - 45) Kuliawat, R. & Arvan, P. (1992) *J. Cell Biol.*, 118, 521–529.
  - 46) Naggert, J.K., Fricker, L.D., Varlamov, O., Nishina, P.M., Rouille, Y., Steiner, D.F., Carroll, R.J., Paigen, B.J., & Leiter, E.H. (1995) *Nat. Genet.*, 10, 135–142.
  - 47) Leiter, E.H. (1997) *J. Endocrinol.*, 155, 211–214.
  - 48) Fricker, L.D. & Leiter, E.H. (1999) *Trends Biol. Sci.*, 24, 390–393.
  - 49) Fricker, L.D., McKinzie, A.A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, L., Patterson, S.D., Courchesne, P.L., Richards, B., Levin, N., Mzhavia, N., Devi, L.A., & Douglass, J. (2000) *J. Neurosci.*, 20, 639–648.
  - 50) Berman, Y., Mzhavia, N., Polonskaia, A., & Devi, L.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 1466–1473.
  - 51) Zhang, C-F., Snell, C.R., & Loh, Y.P. (1999) *Mol. Endocrinol.*, 13, 527–536.
  - 52) Cawley, N.X., Rodriguez, Y.M., Maldonado, A., & Loh, Y.P. (2003) *Endocrinology*, 144, 292–298.
  - 53) Falooqi, I.S., Keogh, J.M., Lank, E.J., Cheetham, T., & O'Rahilly, S. (2003) *N. Engl. J. Med.*, 348, 1085–1095.
  - 54) O'Rahilly, S., Yeo, G.S., & Falooqi, I.S. (2004) *Nat. Med.*, 10, 351–352.
  - 55) Coll, A.P. & Tung, L.Y.C. (2009) *Mol. Cell. Endocrinol.*, 300, 147–151.
  - 56) Falooqi, I.S., Drop, S., Clements, A., Keogh, J.M., Biernacka, J., Lowenbein, S., Chalis, B.J., & O'Rahilly, S. (2006) *Diabetes*, 55, 2549–2553.
  - 57) Cawley, N.X., Zhou, J., Hill, J.M., Abebe, D., Romboz, S., Yanik, T., Rodriguiz, R.M., Wetsel, W.C., & Loh, Y.P. (2004) *Endocrinology*, 145, 5807–5819.
  - 58) Che, F-A., Yuan, Q., Kalinina, E., & Fricker, L.D. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 4451–4461.
  - 59) Irminger, J-C., Verchere, C.B., Meyer, K., & Halban, P.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 27532–27534.
  - 60) Varlamov, O., Fricker, L.D., Furukawa, H., Steiner, D.F., Langley, S.H., & Leiter, E.H. (1997) *Endocrinology*, 138, 4833–4892.
  - 61) Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Kato, T., & Takeuchi, T. (2005) *J. Cell Sci.*, 118, 4785–4795.
  - 62) Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y., & Takeuchi, T. (2002) *Mol. Biol. Cell*, 13, 3388–3399.
  - 63) 中山和久 (1995) 生化学, 67, 995–1009.
  - 64) Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.*, 327, 625–635.
  - 65) Wang, R., Hosaka, M., Han, L., Yokota-Hashimoto, H., Suda, M., Mitsushima, D., Torii, S., & Takeuchi, T. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 1169–1181.
  - 66) Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T., & Takeuchi, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 3627–3634.
  - 67) Sakai, Y., Hosaka, M., Hira, Y., Harumi, T., Ohkawa, Y., Wang, H., Takeuchi, T., Uchiyama, Y., & Watanabe, T. (2003) *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 227–238.
  - 68) Takeuchi, T. & Hosaka, M. (2008) *Curr. Diabetes, Rev.*, 4, 31–38.
  - 69) Normant, E. & Loh, Y.P. (1998) *Endocrinology*, 139, 2137–2145.
  - 70) Mayes, P.A. & Botham, K.M. (2003) in *Harper's Illustrated Biochemistry* (Murray, K.M., Granner, D.K., Mayes, P.A., & Rodwell, V.W. eds.), 26th ed., pp. 219–230, McGraw-Hill Co., New York.
  - 71) Darnell, J., Lodish, H., & Baltimore, D. (1990) *Molecular and Cell Biology*, pp. 491–530, W.H. Freeman and Company, New York.
  - 72) Bretscher, M.S. & Munro, S. (1993) *Science*, 261, 1280–1281.
  - 73) Brown, D.A. & Rose, J.K. (1992) *Cell*, 68, 533–544.
  - 74) Kim, T., Tao-Cheng, J-H., Eiden, L.E., & Loh, Y.P. (2001) *Cell*, 106, 499–509.



- 75) Day, R. & Gorr, S-U. (2003) *Trends Endocrinol. Metab.*, **14**, 10-13.
- 76) Kim, T., Tao-Cheng, J-H., Eiden, L.E. & Loh, Y.P. (2003) *Trends Endocrinol. Metab.*, **14**, 56-57.
- 77) Malosio, M.L., Giordano, T., Laslop, A., & Meldolesi, J. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 743-749.
- 78) Mahapatra, N.R., O' Connor, D.T., Vaingankar, S.M., Hikim, A.P., Mahata, M., Ray, S., Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Ross, J., & Mahata, S.K. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 1942-1952.
- 79) Kim, T. & Loh, Y.P. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 1711-1713.
- 80) Kim, T., Zhang, C-f., Sun, Z., Wu, H., & Loh, Y.P. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 6958-6961.
- 81) Huh, Y.H., Jeon, S.H., & Yoo, S.H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 40581-40589.
- 82) Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J., & Spiess, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 20242-20249.
- 83) Hendy, G.N., Li, T., Girard, M., Feldstein, R.C., Mulay, S., Desjardins, R., Day, R., Karaplis, A.C., Tremblay, M.L., & Canaff, L. (2006) *Mol. Endocrinol.*, **20**, 1935-1947.
- 84) Feldman, S.A. & Eiden, L.E. (2003) *Endocrine Pathol.*, **14**, 3-23.
- 85) Glampaolo, B., Angelica, M., & Antonio, S. (2002) *Clin. Endocrinol.*, **57**, 41-50.
- 86) Gussi, I-L., Young, J., Baudin, E., Bidart, J.M., & Chanson, P. (2003) *Clin. Endocrinol.*, **59**, 644-648.
- 87) Abou-Saif, A., Gibrill, F., Ojeaburu, J.V., Bashir, S., Entsuah, L.K., Asgharian, B., & Jensen, R.T. (2003) *Cancer*, **98**, 249-261.
- 88) Hotta, K., Hosaka, M., Tanabe, A., & Takeuchi, T. (2009) *J. Endocrinol.*, **202**, 111-121.
- 89) Meldolesi, J., Chiaregatti, E., & Malosio, M.L. (2004) *Trends Cell. Biol.*, **14**, 13-19.
- 90) Ottiger, H-P., Battenberg, E.F., Tsou, A-P., & Bloom, F.E. (1990) *J. Neurosci.*, **10**, 3135-3147.
- 91) Kingsley, D.M., Rinchik, E.M., Russell, L.B., Ottiger, H-P., Sutcliffe, J.G., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (1990) *EMBO J.*, **9**, 395-399.
- 92) Dhanvantari, S. & Loh, Y.P. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 29887-29893.
- 93) Arnaoutova, I., Smith, A.M., Coates, L.C., Sharpe, J.C., Dhanvantari, S., Snell, C.R., Birch, N.P., & Loh, Y.P. (2003) *Biochemistry*, **42**, 10445-10455.
- 94) Assadi, M., Sharpe, J.C., Snell, C., & Loh, Y.P. (2004) *Biochemistry*, **43**, 7798-7807.
- 95) Chang, T-Y., Chang, C.C.Y., Ohgami, N., & Yamauchi, Y. (2006) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 129-157.
- 96) Tsujishita, Y. & Hurley, J.H. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 408-414.
- 97) Tanabe, A., Yanagiya, T., Iida, A., Saito, S., Sekine, A., Takahashi, A., Nakamura, T., Tsunoda, T., Kamohara, S., Nakata, Y., Kotani, K., Komatsu, R., Itoh, N., Mineo, I., Wada, J., Funahashi, T., Miyazaki, S., Tokunaga, K., Hamaguchi, K., Shimada, T., Tanaka, K., Yamada, K., Hanafusa, T., Oikawa, S., Yoshimatsu, H., Sakata, T., Matsuzawa, Y., Kamatani, N., Nakamura, Y., & Hotta, K. (2007) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **92**, 1145-1154.
- 98) Kayo, T., Sawada, Y., Suzuki, Y., Suda, M., Tanaka, S., Konda, Y., Miyazaki, J-i., & Takeuchi, T. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 10731-10737.
- 99) Kayo, T., Sawada, Y., Suda, M., Konda, Y., Izumi, T., & Takeuchi, T. (1997) *Diabetes*, **46**, 1296-1304.
- 100) Zhang, B., Hosaka, M., Sawada, Y., Torii, S., Mizutani, S., Ogata, M., Izumi, T., & Takeuchi, T., (2003) *Diabetes*, **52**, 2720-2730.
- 101) Dikeakos, J.D. & Reudelhuber, T.L. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 191-196.
-