

連についても今後の研究が期待される。

メタボリックシンドロームへの社会的関心から、関連する基礎研究は日々発展している。脂肪滴研究も例外ではなく、関係する論文の急激な増加がそれを物語っている。しかし、脂肪滴についてはその形成機構やメンブレントラフィック経路など、解明すべき課題が多く残されている。Rabの存在など、他のオルガネラとの相同性が予想される一方、脂質一重層という決定的な違いが、単純な比較を困難にしている。脂肪滴の全容解明のためには、PATファミリーを含めた局在タンパク質の解析の集積に加えて、脂肪滴の独自性に即したユニークな解析手法を探る必要があるだろう。

本文中 CGI-58 と MLDP の研究は、兵庫県立大学 大隅隆教授のもとで進めたものであり、深く感謝いたします。また、紙面の都合上引用できなかった文献があることをお詫び申し上げます。

- 1) Murphy, D.J. (2001) *Prog. Lipid Res.*, 40, 325–438.
- 2) Miura, S., Gan, J.W., Brzostowski, J., Parisi, M.J., Schultz, C. J., Londos, C., Oliver, B., & Kimmel, A.R. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 32253–32257.
- 3) Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F., & Osumi, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 14232–14240.
- 4) Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J.T., Contreras, J. A., Kimmel, A.R., & Londos, C. (2003) *J. Cell Biol.*, 161, 1093–1103.
- 5) Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyū, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F.B., Tsutsumi, O., & Yamada, N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 787–792.
- 6) Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T.M., Wagner, E.F., & Zechner, R. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 4806–4815.
- 7) Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S., & Osumi, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 30490–30497.
- 8) Lefèvre, C., Jobard, F., Caux, F., Bouadjar, B., Karaduman, A., Heilig, R., Lakhdar, H., Wollenberg, A., Verret, J.L., Weissenbach, J., Özgüç, M., Lathrop, M., Prud'homme, J.F., & Fischer, J. (2001) *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 1002–1012.
- 9) Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., & Zechner, R. (2004) *Science*, 306, 1383–1386.
- 10) Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E.F., Klingenspor, M., Hoefler, G., & Zechner, R. (2006) *Science*, 312, 734–737.
- 11) Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., & Zechner, R. (2006) *Cell Metab.*, 3, 309–

319.

- 12) Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A.W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M.P., & Brasaemle, D.L. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 42062–42071.
- 13) Chang, B.H., Li, L., Paul, A., Taniguchi, S., Nannegari, V., Heird, W.C., & Chan, L. (2006) *Mol. Cell Biol.*, 26, 1063–1076.
- 14) Diaz, E. & Pfeffer, S.R. (1998) *Cell*, 93, 433–443.
- 15) Sztalryd, C., Bell, M., Lu, X., Mertz, P., Hickenbottom, S., Chang, B.H., Chan, L., Kimmel, A.R., & Londos, C. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 34341–34348.
- 16) Wolins, N.E., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A., Bensch, K.G., & Bickel, P.E. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 37713–37721.

山口 智広

(兵庫県立大学大学院生命理学研究科細胞機能学分野)

PAT family: lipid droplet-associated proteins that regulate the fat storage and lipolysis
Tomohiro Yamaguchi (Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Hyogo, 678-1297, Japan)

ホルモンが神経内分泌細胞内で分泌顆粒へと選別輸送される機構

はじめに

生体内で遠隔臓器へシグナルを伝達するシステムとして、神経系と内分泌系がある。神経系の細胞は、神経伝達物質として生理活性アミン、アミノ酸誘導体に加えて、エンケファリン、ダイノルフィン、ボンベシンなどの神経ペプチドも神経終末からシナプス間隙に向けて開口放出する。内分泌系の細胞は、インスリン、成長ホルモンなどのペプチドホルモンに加えて、甲状腺ホルモン、GABA、グルタミン酸などの生理活性アミンを血流中に開口放出し、標的器官の細胞にシグナルを伝達する。多くの場合、神経細胞はシナプス小胞のみならず分泌顆粒を持ち、内分泌細胞も分泌顆粒のみならずシナプス様小胞を持つので、本稿では両者をまとめて神経内分泌細胞と呼ぶ。このような神経内分泌細胞におけるタンパク質分泌経路を図1に示す。神経内分泌細胞では、ペプチドホルモンや神経ペプチドは粗面小胞体で合成された後、ゴルジ装置を経てトランスゴ

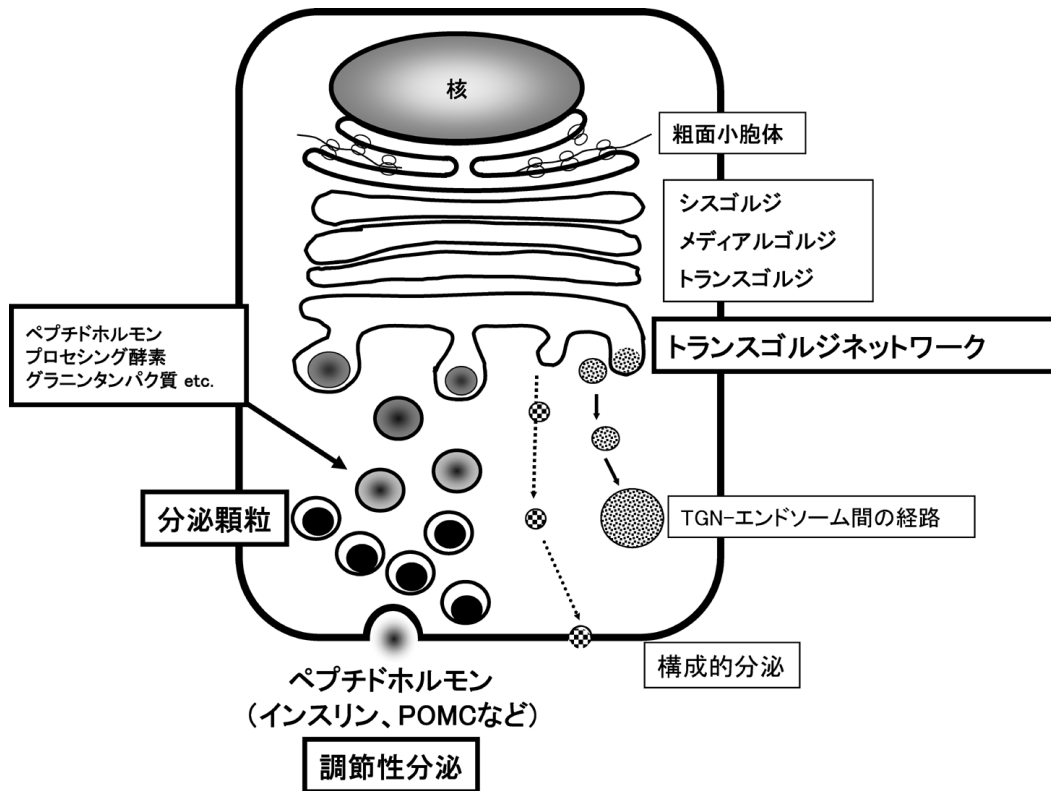


図1 神経内分泌細胞におけるタンパク質分泌経路

ペプチドホルモンはTGNで選別され、分泌顆粒に貯留され、細胞外刺激に応答して分泌される(調節性分泌経路)。分泌顆粒にはプロセッシング酵素(PC1/3, PC2, CPE, アミド化酵素)も運ばれ、プロホルモンを活性型ホルモンに変換する。膜タンパク質やリソソーム酵素はTGNで選別され、それぞれ細胞膜、エンドソームに輸送される(構成的分泌経路, TGN-エンドソーム間の輸送)。(本文参照)

ルジネットワーク(TGN)から分泌顆粒に選別輸送され、顆粒内に貯留され、細胞外からの刺激に応答して分泌される(調節性分泌経路)。一方、成長因子、アルブミン等の血清タンパク質は、外部刺激による分泌調節を受けずにTGNから直ちに細胞外に放出される(構成的分泌経路)。またリソソームで働く加水分解酵素などは、エンドソームへ向かう経路へと選別輸送される(TGN-エンドソーム間の経路)。本稿では、筆者らが分泌顆粒形成機構の解明を目指して行ってきた研究を中心に、ペプチドホルモンが調節性分泌経路へと選別されるメカニズムについて概説する。

1. 顆粒内タンパク質とグラニンファミリータンパク質

表1に示すように、分泌顆粒内にはペプチドホルモンの他に様々なタンパク質が存在する。顆粒内タンパク質には、ペプチドホルモンを前駆体から成熟型ホルモンへと活

性化するプロホルモン変換酵素(PC1/3, PC2)、限定切断されたペプチドのC末端の塩基性アミノ酸残基を除去するカルボキシペプチダーゼE(CPE)、C末端のGly残基をアミドに変換するアミド化酵素や、グラニンファミリータンパク質が含まれる。

グラニンファミリータンパク質(表1)は、セクレトグラニン、クロモグラニンと名付けられた一群の酸性可溶性タンパク質の総称であり、膵島、下垂体、副腎髄質などの神経内分泌細胞に広く存在している。グラニンファミリータンパク質は、どの内分泌細胞にも存在することから、ホルモンのように特定の標的器官にシグナルを伝えているとは考えにくい。しかし、その切断フラグメントには、隣接する細胞やその細胞自らに作用する局所的な生理活性物質として知られるものや、内分泌細胞を酸化ストレスから保護すると報告されているものもある。

Huttnerらは、グラニンファミリータンパク質のセクレ

表1 神経内分泌顆粒に存在するペプチドとタンパク質

ペプチドホルモン	分泌調節タンパク質
グラニンファミリータンパク質	VAMP-2
クロモグラニン A (CgA)	シナプトタグミン
クロモグラニン B (CgB)	グラニューフィリン
セクレトグラニン II (SgII)	Rab27
*セクレトグラニン III (SgIII)	CAM キナーゼ II
セクレトグラニン V (7B2)	アダプター AP-1 複合体
	クラスリン
	フォグリン
プロセシング酵素	CAPS-1
*PC1/3	イオンチャネル, ポンプ
*PC2	V-ATPase
*カルボキシペプチダーゼ E (CPE)	Ca ²⁺ -ATPase
アミド化酵素	IP ₃ 受容体

*で表示されているタンパク質は高コレステロール顆粒膜に結合する。

トグラニン II とクロモグラニン B が、顆粒内の弱酸性・高 Ca²⁺ 環境下で凝集する性質を発見した。そして、ペプチドホルモンはグラニタンパク質が凝集する際に凝集体に巻き込まれて分泌顆粒へと選別されるという“グラニン凝集説”を提唱した¹⁾。しかし、非凝集顆粒内のタンパク質も分泌顆粒へ選別輸送されること²⁾、フィブロネクチンなどの凝集タンパク質でも構成的分泌経路に輸送されること³⁾から、顆粒内タンパク質の凝集は分泌顆粒へ選別されるための必要十分条件ではない。タンパク質が分泌顆粒へと選別輸送されるためには、グラニタンパク質の凝集に加えて、ホルモンを顆粒内に導く一種の“受容体”の存在が必須であると考えられる。

2. 選別輸送受容体としてのカルボキシペプチダーゼ E

1995年に Leiter らは、糖尿病・肥満モデルとして知られる *fat/fat* マウスの原因遺伝子が CPE であるという不可思議な論文を発表した⁴⁾。なぜ不可思議かという点、CPE は神経内分泌細胞に発現し、ペプチドホルモン C 末端の塩基性アミノ酸を切除する酵素として知られ、塩基性アミノ酸が除去されないだけで肥満・糖尿病になるとは考えにくかったからである。

ところが、思わぬ発見が Loh らによってなされた。Loh らは、*fat/fat* マウスの下垂体と CPE を欠損した神経芽細胞腫 Neuro2a で、ACTH 前駆体の POMC が分泌顆粒に選別輸送されずに構成的分泌経路で細胞外に放出されること、および CPE が POMC の N 末端に存在するジスルフィド・ループに結合し、POMC を分泌顆粒へと選別輸送することを Cell 誌に発表した⁵⁾。しかしその後間髪を入れず、Halban らや Steiner らは、*fat/fat* マウスの睪島でプロ

インスリンが分泌顆粒へと選別輸送されることを示し、「CPE がペプチドホルモンの選別受容体である」という Loh らの仮説を否定した⁶⁾。この“CPE=ホルモンの選別受容体”説については、2006年現在でもなお、両研究グループ間で論争が続いている。

3. セクレトグラニン III の役割

筆者らは、ペプチドホルモンが分泌顆粒へ選別される機構を明らかにするために、クロモグラニン A (CgA) が結合するホルモンとタンパク質を同定しようと試みた。具体的には、CgA をベイトと

して酵母ツー・ハイブリッドスクリーニングを行い、ラット脳 cDNA ライブラリーからグラニタンパク質の一つのセクレトグラニン III (SgIII) を単離した。そこで CgA と SgIII の結合を生化学的に解析してみると、顆粒内環境を反映する Ca²⁺ 濃度 (10–20 mM) と弱酸性 (pH5.5) の条件下で両者は強い結合を示した。さらには、CgA の SgIII との結合部位が CgA の顆粒内輸送に必須であった⁷⁾。

SgIII は可溶性タンパク質であり、膜貫通領域を持たない。それでは、SgIII はどのようなメカニズムで分泌顆粒へ運ばれるのであろうか？ 筆者らは、SgIII が精製した顆粒膜画分に集積し、電子顕微鏡下では顆粒膜直下に局在すること^{8,9)}を見出した。そこで SgIII が顆粒膜に直接結合する可能性を想定し、コレステロール組成を変化させた顆粒膜への SgIII の結合を調べたところ、SgIII はコレステロール組成が 45–65 mol% の顆粒膜に直接結合できることが判明した¹⁰⁾。さらに、SgIII と CPE の一部が顆粒膜上で共局在する電子顕微鏡観察結果を得た。次に、SgIII と CPE の直接結合の可能性をマウス下垂体前葉由来 AtT-20 細胞において調べたところ、SgIII が POMC に結合すること、SgIII は CPE から POMC を受け取って CgA に渡してホルモンを顆粒内全体に分布させることが明らかになった¹⁰⁾。最近筆者らは、SgIII は CgA と 1:1 のストイキオメトリーで結合するのみならず、凝集した多量の CgA と結合できること、内分泌細胞で SgIII 発現を抑制すると CgA が構成的分泌経路を介して放出されることを明らかにした (論文投稿中)。

SgIII は、下垂体、膵臓、副腎の内分泌細胞のみならず神経細胞の分泌顆粒にも存在する。従ってもし SgIII が欠損してホルモン輸送機能がなくなれば、ホルモン分泌に何

らかの異常が生ずると予測される。しかし、自然発生 SgIII 欠損マウスでは、顕著なホルモン分泌異常が見つからないため、SgIII の機能解析は進んでいない¹¹⁾。

一方 Martens らは、アフリカツメガエルの環境条件に伴う体色変化を利用して、下垂体中葉の遺伝子発現プロファイルを解析した。アフリカツメガエルを明所で飼育すると、POMC と SgIII の mRNA 量は暗所で飼育した場合に比べて約 30 倍も増大した¹²⁾。この結果は、POMC 分子内に存在するメラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) を多量に顆粒へ輸送する際には、SgIII の発現も同時に亢進することを示唆している。これらの研究をふまえて、筆者は SgIII と CPE のダブルノックアウトマウスを作製し、ペプチドホルモンが調節性分泌経路へと選別される機構を解析する必要があると考えている。

4. 分泌顆粒膜とコレステロール

近年、分泌顆粒形成に顆粒膜のコレステロールが重要な役割を果たすことが報告されている。前述した Loh らは、ウシ脳下垂体後葉から分泌顆粒膜を精製してコレステロール含量を測定したところ、約 65 mol% という高い値を得た¹³⁾。このことは、リン脂質 1 分子から出る 2 本の脂肪酸アシル基にコレステロールが 1 分子ずつ結合している状態 (理論値 67mol%) に近いことを意味する。一方 Huttner らは、AtT-20 細胞をコレステロール合成阻害剤のロバスタチン存在下で培養すると、顆粒形成が十分にできなくなることを報告した¹⁴⁾。前項で述べたように、SgIII は高コレステロール組成の顆粒膜に直接結合することができる⁹⁾。さらに、Loh らがホルモン受容体として最初に報告した CPE もリピッドラフトに局在すると報告されている。興

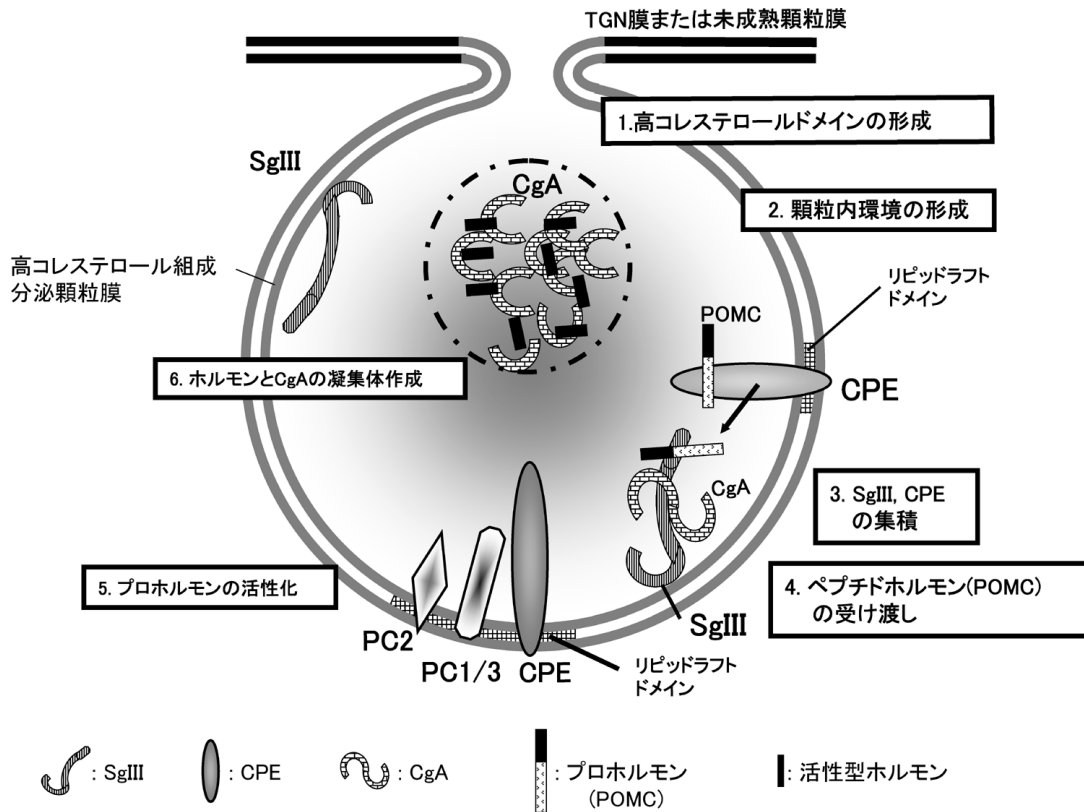


図 2 分泌顆粒形成のステップ

筆者は、TGN もしくは未成熟顆粒から分泌顆粒が形成される機序を次のように考えている。1) TGN 膜もしくは未成熟顆粒膜での高コレステロールドメインの形成、2) 顆粒内環境を形成する V-ATPase、カルシウムポンプの集積、3) 高コレステロールドメインに親和性を持つ SgIII、CPE がプロホルモンと結合し、顆粒膜へ集積、4) SgIII へのプロホルモンの受け渡し、5) リピッドラフトに局在する PC1/3、PC2、CPE によるプロホルモンの活性化、6) 活性化された成熟ホルモンとクロモグラニン A は凝集体を作り、顆粒内腔に拡散する。

味深いことに、ペプチドホルモン前駆体を活性型に変換するプロホルモン変換酵素 (PC1/3, PC2) も、分泌顆粒膜の高コレステロール組成のリピッドラフトに結合すると報告されている。最近、筆者らは三つの神経内分泌細胞株、AtT-20, PC12 (ラット副腎髄質由来), MIN6 (マウス膵β細胞由来) からシナプス様小胞と分泌顆粒を精製し、コレステロール組成を調べた。その結果、シナプス様小胞膜にはコレステロールは 20–25 mol% 含まれるのに対して、分泌顆粒膜は 40–50 mol% という高いコレステロール組成を示すことが判明した¹⁵⁾。

筆者は、分泌顆粒が TGN から形成される機序を図 2 のように考えている。まずコレステロールが TGN 膜に集積し、高コレステロール組成のドメインを形成する。次にこの高コレステロールドメインに SgIII, CPE などのコレステロール結合能を持つタンパク質がホルモンを結合しながら集まってくる。同時に顆粒内を高 Ca^{2+} にするカルシウムポンプ、弱酸性にするプロトンポンプも集積する。高 Ca^{2+} , 弱酸性の条件下でプロホルモンとグラニタンパク質はプロセシング (塩基性アミノ酸対の切断, 末端アミノ酸の修飾など) を受ける。グラニタンパク質が成熟ホルモンを巻き込みながら凝集して顆粒のコアを形成する。

現在筆者らは、顆粒膜にコレステロールを運ぶと考えられる輸送タンパク質について解析している。

おわりに

構成的分泌経路は、酵母から高等動物細胞に至るまで、広く見られるタンパク質輸送システムである。一方、神経内分泌細胞のペプチドホルモン分泌では、細胞外からの刺激による調節性分泌経路が使われる。調節性分泌の研究のなかでも、開口放出機構に関する研究は SNARE 学説を中心にして大きく進展しているが、分泌顆粒形成の研究は、顆粒形成が細胞内部の TGN で行われるためアプローチが難しいことや、TGN や分泌顆粒を集めにくいという理由などのために不明な点が多かった。しかし、分泌顆粒へホルモンを選別して輸送する受容体として CPE と SgIII が同定されたり、分泌顆粒膜が高コレステロール組成を持つ特殊な膜であることが明らかになったりしたことにより、分泌顆粒形成とホルモンの選別輸送の機構は急速に解明されようとしている。

本稿で紹介した筆者らの研究は、群馬大学生体調節研究所内分泌分野 竹内利行教授のもと、旭川医科大学解剖学講座顕微解剖学分野 渡部剛教授との共同研究で行われたものである。

- 1) Tooze, S., Martens, G.J.M., & Huttner, W.B. (2001) *Trends Cell Biol.*, **11**, 116–122.
- 2) Dannies, P.S. (1999) *Endocr. Rev.*, **20**, 3–21.
- 3) Day, R. & Gorr, S-U. (2003) *Trends Endocrinol.*, **14**, 10–13.
- 4) 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.
- 5) Cool, D.R., Normant, E., Shen, F., Chen, H.C., Pannell, L., Zhang, Y., & Loh, Y.P. (1997) *Cell*, **88**, 73–83.
- 6) Irminger, J.C., Verchere, C.B., Meyer, K., & Halban, P.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 27532–27534.
- 7) Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y., & Takeuchi, T. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3388–3399.
- 8) Sakai, Y., Hosaka, M., Hira, Y., Harumi, T., Ohsawa, Y., Wang, H., Takeuchi, T., Uchiyama, Y., & Watanabe, T. (2003) *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 227–238.
- 9) Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T., & Takeuchi, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **30**, 3627–3634.
- 10) Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Kato, T., & Takeuchi, T. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 4785–4795.
- 11) 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.
- 12) Holthuis, J.C. & Martens, G.J. (1996) *J. Neurochem.*, **66**, 2248–2256.
- 13) Dhanvantari, S. & Loh, Y.P. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 29887–29893.
- 14) Wang, Y., Thiele, C., & Huttner, W.B. (2000) *Traffic*, **1**, 952–962.
- 15) Wang, R., Hosaka, M., Han, L., Yokota-Hashimoto, H., Suda, M., Mitsushima, D., Torii, S., Takeuchi, T. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 1169–1181.

穂坂 正博

(群馬大学生体調節研究所内分泌分野)

The sorting mechanism to secretory granules: Emerging concepts with secretogranin III
Masahiro Hosaka (Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3–39–15 Showa-machi, Maebashi 371–8512, Japan)