

## 内分泌細胞における分泌顆粒形成機構

渡部 剛<sup>a\*</sup>, 阪井 裕子<sup>a</sup>, 平 義樹<sup>a</sup>, 暮地本宙己<sup>a</sup>, 穂坂 正博<sup>b</sup>

<sup>a</sup>旭川医科大学解剖学講座顕微解剖学分野, <sup>b</sup>群馬大学生体調節研究所分泌制御分野

キーワード：分泌顆粒, グラニン蛋白, 選別輸送, 脂質ラフト, 性腺刺激ホルモン産生細胞

### 1. はじめに

生体における恒常性維持を担う内分泌細胞のうち、ペプチド性の内分泌細胞は分泌顆粒という特別な細胞内小器官を形成して大量のホルモンを貯留している。この分泌顆粒からは、循環血液中で希釈されても大丈夫のように、分泌刺激の到来に呼応した適切なタイミングで一気に大量のホルモンが細胞外に放出される。

この分泌顆粒は、電子顕微鏡が生命科学研究に用いられるようになった当初から、内分泌細胞などの分泌細胞に特有の細胞内小器官として観察されていたが、この小器官がどのような機構で形成されるかに関しては今でも様々な議論があり解明すべき点が多く残されている。

本稿では、このペプチド産生性内分泌細胞に特徴的な分泌顆粒の形成機構、特にペプチドホルモンなどの分泌蛋白が分泌顆粒へ選択的に輸送されるしくみの分子細胞生物学的基盤について、我々が得てきた所見を紹介しながら概説する。なお、生化学的な立場からみた分泌顆粒形成機構に関しては、著者のひとりである穂坂が最近別稿で解説している<sup>1)</sup>、本稿ではできるだけ形態学的な側面に重点を置き、この問題に関する最近の知見や議論を整理してみたい。

### 2. 内分泌細胞における蛋白分泌経路の概略

細胞内で合成される蛋白のうち、アミノ末端側（N末端側）にシグナルペプチドを持つものは、リボソームで翻訳されるのとほぼ同時に粗面小胞体の内腔に移行し、以後単位膜に包まれた状態で細胞内を輸送される（細胞内小胞輸送）。粗面小胞体内腔に移行した可溶性蛋白の大部分は、その後、細胞内小胞輸送によってゴルジ装置へと運ばれるが、Lys(K)-Asp(D)-Glu(E)-Leu(L)の4つのアミノ酸からなる小胞

体残留シグナル（KDEL 配列）を持つ蛋白は、このシグナルと特異的に結合するレセプター分子（ERD2 など）に捕捉され粗面小胞体へと戻される。一方、小胞体残留シグナルを持たない蛋白は、順次、ゴルジ装置の入口である cis 側から出口である trans 側に向かって輸送される。この間に、蛋白はゴルジ装置内腔で糖鎖の付加・改変など様々な修飾を受け、最終的にはゴルジ装置の出口である trans-Golgi network (TGN) で、それぞれの目的地に向けて仕分けされる。

内分泌細胞など分泌に特化した細胞では、TGN に到達した蛋白は、原則として、図 1 に模式的に示した 3 種類の輸送経路に仕分けされる。まず、特別な選別輸送シグナルを含まない蛋白分子は、TGN に到達すると小型の空胞状構造物である分泌小胞 (secretory vesicles) を経由して直ちに細胞外に開口放出される。この輸送経路は構成的分泌経路

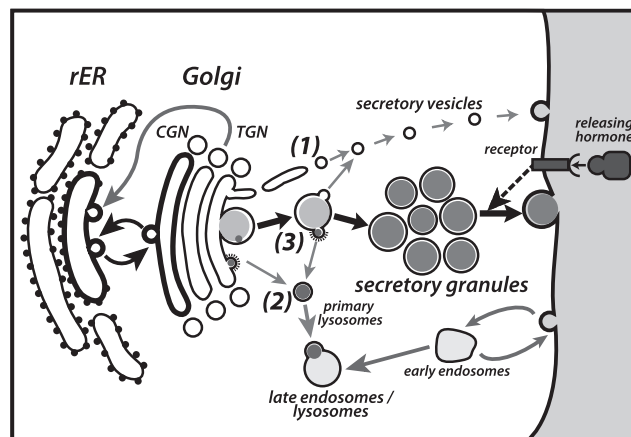


図 1 内分泌細胞における蛋白輸送経路の概観。N末端側にシグナルペプチドを含む蛋白は、リボソームで合成されるのと同時に粗面小胞体 (rER) の内腔に移行し、その後は細胞内小胞輸送機構によって順次顆粒の小器官に運ばれていく。このような蛋白は、ゴルジ装置 (Golgi apparatus) の出口であるトランスゴルジネットワーク (TGN) で、(1) 分泌小胞 (secretory vesicles) を経由して直ちに細胞膜に開口する構成的分泌経路 (constitutive secretory pathway), (2) エンドソーム (endosomes) やリソソーム (lysosomes) へ加水分解酵素などを運ぶ経路、および(3) 分泌顆粒 (secretory granules) に一時的に貯留した後、特異的な外部刺激に応答して細胞膜に開口する調節性分泌経路 (regulated secretory pathway) のいずれかに仕分けされる。

Tsuyoshi Watanabe, Yuko Sakai, Yoshiki Hira, Hiroki Bochimoto and Masahiro Hosaka: Molecular and cellular basis for the secretory granule biogenesis in endocrine cells

<sup>a</sup> 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1-1-1

TEL: 0166-68-2312; FAX: 0166-68-2319

\* E-mail: tyshwata@asahikawa-med.ac.jp

2007年11月5日受付

(constitutive secretory pathway) と呼ばれ、アルブミンなどの血清蛋白や成長因子の大部分はこの経路で分泌される。

これに対して、リソソームで細胞内の不要物の分解・再処理にあたる加水分解酵素群は、粗面小胞体から TGN に至るまでの輸送過程で選択的にマンノース 6 リン酸 (Mannose-6-Phosphate; M6P) 残基を含む糖鎖で修飾され、この M6P が選別輸送シグナルとして機能する。すなわち、この M6P 残基が付加された加水分解酵素群は TGN 膜上の特異的レセプター分子 (Mannose-6-Phosphate Receptors; MPRs) に捕捉され、TGN からエンドソーム (endosomes) を経てリソソーム (lysosomes) に輸送される。

以上の二つの輸送経路は、一般的な細胞にも普遍的に存在するが、内分泌細胞など特殊に分化した細胞では、さらに調節性分泌経路 (regulated secretory pathway) と呼ばれる第 3 の経路が存在する。この経路に輸送される蛋白は TGN で選択的に濃縮された後、分泌顆粒 (secretory granules) と呼ばれる小器官の内腔に保持される。そして、この細胞に適切な分泌刺激が到来すると、分泌顆粒に保持された蛋白が開口放出の機転で細胞外へと放出される。

ペプチドホルモン産生細胞のように特殊に分化した分泌細胞は、この分泌顆粒と分泌小胞の両方を有するが、様々な分泌蛋白がどちらの経路を經由して放出されるかは各蛋白ごとに決まっている。構成的経路で分泌される蛋白と調節性経路で分泌される蛋白の融合蛋白の動態の解析からは、分泌顆粒へと輸送される蛋白の方に何らかの積極的な選別輸送シグナルがあることが示唆されている<sup>2)</sup>。さらに興味深いことに、ある内分泌細胞で分泌顆粒に輸送されるペプチドホルモンは、本来この蛋白を発現していない他の内分泌細胞由来の培養細胞株で発現させられても、きちんと分泌顆粒に輸送される。また、逆に分泌小胞を介して構成的に分泌される蛋白は、内分泌細胞系の細胞で発現させても、分泌顆粒には保持されない。このような実験結果から、ペプチドホルモンが分泌顆粒に選択的に輸送される機構は、あるひとつの内分泌細胞の中で完結している個別の過程ではなく、内分泌細胞一般で成立するような普遍的なしくみによることが示唆された。

### 3. グラニン蛋白と分泌顆粒形成

分泌顆粒への選別輸送機構が内分泌細胞に普遍的であることが示唆されたことから、その機構を担う分子 (群) は広く内分泌細胞の分泌顆粒に局在するのではないかと推測され、1960 年代後半から副腎髄質・下垂体前葉・副甲状腺などの内分泌組織を材料として様々な蛋白が単離された。

そのような経緯で同定された一群の酸性可溶性蛋白に、クロモグラニン A (CgA)、クロモグラニン B (CgB)、およびセクレトグラニン II (SgII) があり、後にこれらの蛋白はグラニン蛋白と総称されるようになった。これらのグラニン蛋白は調節性分泌経路を有する分泌細胞のうち内分泌細胞と一部の神経細胞に局限して発現し、細胞内ではペプチドホルモンとともに分泌顆粒内に選択的に輸送される<sup>3~6)</sup>。ただし、

ペプチドホルモンが原則としてそれぞれ固有の一種類の内分泌細胞に局限して発現・局在しているのに対して、これらのグラニン蛋白は多種多様なペプチドホルモン産生細胞に広汎に分布しており、あるグラニン蛋白だけを単独で分泌させるような分泌制御機構は知られていない。

このグラニン蛋白が神経・内分泌細胞における分泌顆粒形成過程に関与することを示唆する重要な知見が、1990 年前後に複数の研究グループから報告された。Huttner らの実験結果によれば、グラニン蛋白は TGN や顆粒内の微小環境で推定されている弱酸性・高カルシウム条件下で自律的に凝集し、この凝集塊を形成する際にペプチドホルモンが巻き込まれ分泌顆粒への選別輸送に寄与するという<sup>7~9)</sup>。同様の所見はほぼ同時期に他の研究グループからも示されており<sup>10)</sup>、ある特定の下垂体前葉ホルモンがこの凝集塊に選択的に組み込まれることも実験的に示された<sup>11)</sup>。

しかしながら、この凝集塊に巻き込まれる蛋白がどのような基準で他の蛋白と区別されるのかという点に関しては、依然として不明な点が多い。さらに、TGN における特定の可溶性蛋白の凝集だけでは、なぜ分泌顆粒がゴルジ装置から独立した小器官となるのかは説明できず、分泌顆粒膜に凝集塊が選択的に繫留されるしくみが解明される必要がある。

そこで、分泌顆粒 (膜) と特異的に結合する選別輸送シグナルの同定を目的として、グラニン蛋白の部分欠失体や他の蛋白との融合蛋白などを培養細胞で発現させ、その細胞内動態や局在を解析する研究が盛んに行われた。その結果、CgA 分子に関してはその前半の領域に分泌顆粒への選別輸送シグナルがあることが示唆され<sup>12)</sup>、さらに CgA と CgB には相同性の高いジスルフィド結合で結ばれたループ状構造が N 末端側近傍に存在することから、この部分が分泌顆粒への選別輸送シグナルとして機能しているのではないかという仮説が提唱された<sup>13,14)</sup>。しかし、その後、この CgA と CgB に特徴的なループ構造に特異的に結合する分泌顆粒膜上の分子は同定されず、この構造が選別輸送シグナルとして機能するという仮説を証明する決定的な研究は未だない。

このような未解決の点も含めて、1990 年代後半には、分泌顆粒の形成過程に関する知見や議論が整理され、分泌顆粒への蛋白選別輸送機構は、(1) 入口での選別説 (“Sorting for entry” model) と (2) 貯留による選別説 (“Sorting by retention” model) の 2 つのモデルに還元された<sup>15,16)</sup>。このうち、「入口での選別説」とは、TGN に到達した可溶性分泌蛋白と TGN 膜上の分子の間の特異的な相互作用によって、TGN を出る時点で (あるいは未熟な分泌顆粒に入る時点までに) 各蛋白の行き先が決定されるというモデルである。これに対して、「貯留による選別説」では、分泌顆粒、分泌小胞、エンドソーム (及びリソソーム) のいずれを目的地とする可溶性蛋白であっても、まず一緒に TGN を離れて未熟な分泌顆粒に移行する。その後、この未熟顆粒内で MPRs に認識・捕捉される加水分解酵素がクラスリン被覆小胞に選択的にリクルートされてエンドソーム (そしてリソソーム) へ

と輸送され未熟な分泌顆粒を離れる。また、可溶性分泌蛋白であっても顆粒内腔の他の蛋白との相互作用を欠く蛋白は、順次ここから芽出する分泌小胞を經由して構成的に細胞外に放出される。その結果、自律的に凝集する性質を持った特定の蛋白だけがこのコンパートメント内に残留し、これが最終的には成熟分泌顆粒となるというモデルである。

もちろんこの2つのモデルは排他的なものではなく、むしろ実際には、この2つの機構が連携して大量の蛋白を効率よく分泌顆粒へ輸送・蓄積すると考えられている。

#### 4. 性腺刺激ホルモン産生細胞における分泌顆粒形成の特殊性

このような研究動向の中、著者のひとりである渡部は、電顕免疫組織化学法による観察で、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択的に輸送されるという興味深い所見を得た<sup>17)</sup>。この下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞は、他の一般的な内分泌細胞とは異なり、黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH)という2種類のペプチドホルモンを生合成・分泌する。一方で、同細胞には、大型で電子密度がやや低い顆粒と

小型で電子密度の高い顆粒の2種類の分泌顆粒が認められ、この機能と微細構造上の特徴を総合して、この細胞では2種類の分泌顆粒が2種類のホルモンを別々に蓄積しているのではないかと推測されていた。しかし、アミノ酸配列上高い相同性を有するLHとFSHを完璧に識別できる抗体が得難いという技術上の問題もあり、同細胞におけるLHとFSHの局在の差異に関しては、未だに完全な決着はついていない。ただ、多くの研究で大型の分泌顆粒にFSHが、小型分泌顆粒にLHが集積する傾向が示されている<sup>18)</sup>。

これに対して、同細胞におけるグラニン蛋白であるCgAとSgIIの分泌顆粒への輸送に関しては明瞭な選択性があり、生理的な条件下の雄ラットの同細胞では、CgAは大型分泌顆粒に、SgIIは小型分泌顆粒にそれぞれ分かれて局在する(図2)。この細胞が性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の作用を強く受けると、CgAとSgIIが同じ分泌顆粒へ輸送される現象が生じるが、その場合でもCgAとSgIIは分泌顆粒内で分離して局在することから、この2種類のグラニン蛋白は同細胞の分泌顆粒の基質の量や局在の変化を追跡するうえで良い指標となることがわかった<sup>19)</sup>。

さらに興味深いことに、この性腺刺激ホルモン産生細胞に

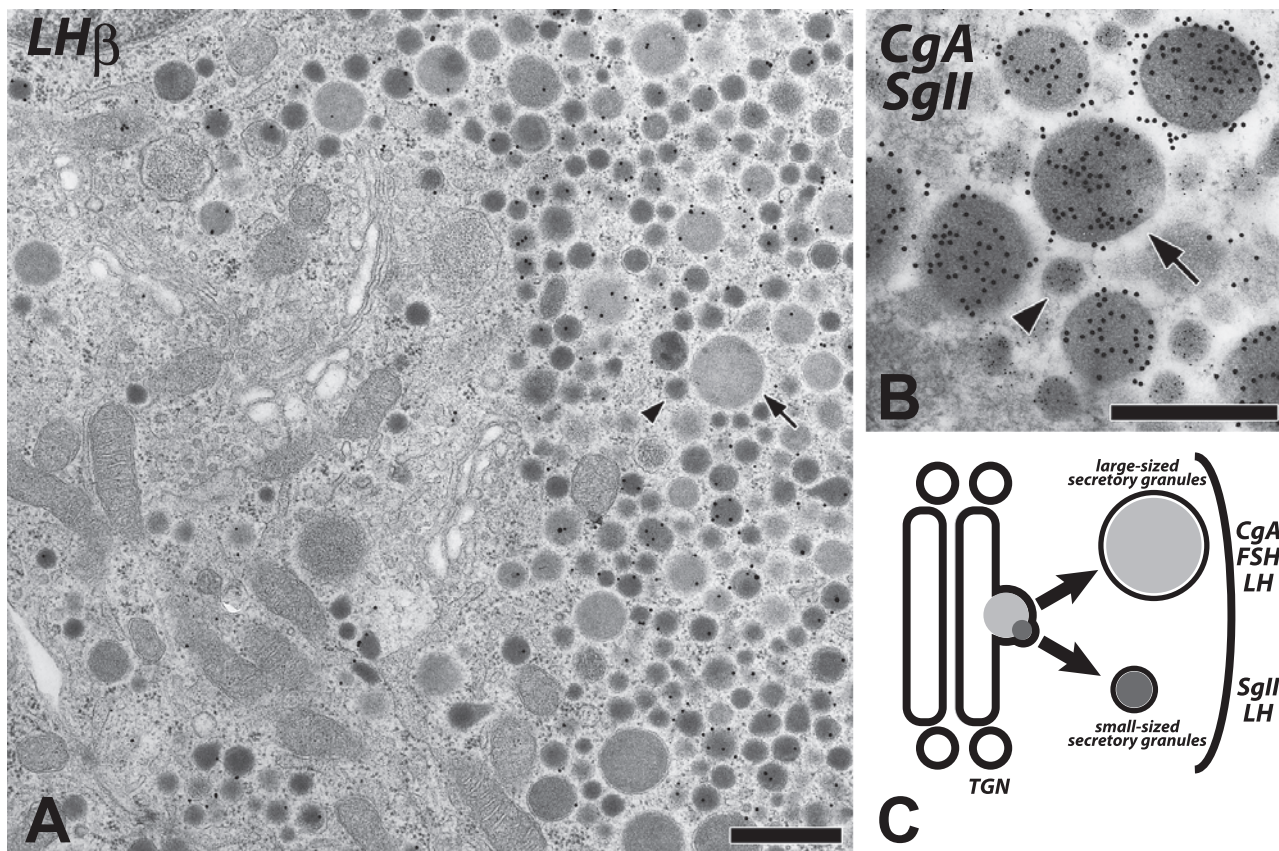


図2 性腺刺激ホルモン産生細胞におけるCgAとSgIIのすみ分け。透過電顕像から明らかなように、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞は、大型で電子密度がやや低い分泌顆粒(arrow)と小型で電子密度が高い分泌顆粒(arrowhead)の2種類の顆粒を有する(A)。この細胞では、クロモグラニンA(CgA;15nm径の金コロイド粒子で標識)とセクレトグラニンII(SgII;5nm径の金コロイド粒子で標識)の2種類のグラニン蛋白が、それぞれ大型分泌顆粒(arrow)と小型分泌顆粒(arrowhead)に分かれて局在している(B)。以上の所見を整理して模式図に示す(C)。Scale bars=500nm

おける CgA の発現は雌雄の性ステロイドにより対照的な制御を受けており、この発現調節の結果、同細胞における分泌顆粒構成には顕著な雌雄差が認められる<sup>20)</sup>。すなわち、エストロゲンが優位な雌ラットの同細胞では、CgA の発現が強く抑制されて、その結果 CgA 陽性の大型分泌顆粒が消失する (図 3)。一方、アンドロゲンが優位に作用している雄ラットの同細胞では CgA の発現が維持されており、図 2 に示したような CgA 陽性の大型分泌顆粒と SgII 陽性の小型分泌顆粒の 2 種類の顆粒が明瞭に区別できる。

以上の性腺刺激ホルモン産生細胞におけるグラニン蛋白の細胞内局在と発現調節に関する知見から、(1) 分泌顆粒への選別輸送機構は少なくとも 2 系統以上存在すること、および、(2) グラニン蛋白群のうち少なくとも CgA はある種の分泌顆粒の基質そのものであり、分泌顆粒形成において決定

的な役割を担っていることの 2 点が示唆された。このことをもとに、次に我々は神経・内分泌細胞でグラニン蛋白と特異的に結合する新規蛋白の探索に着手した。

### 5. SgIII の再発見と分泌顆粒形成における役割の解明

CgA と結合する蛋白を探索する目的で、CgA 全長を bait とした Yeast-Two-Hybrid 法でラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、既にグラニン蛋白として同定されていたセクレトグラニン III (SgIII) が同定された<sup>21)</sup>。当初この分子は神経組織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、内分泌組織にも広く発現する酸性分泌蛋白であることが判明し、グラニン蛋白の一員と見なされ現在の名称を得た<sup>22)</sup>。しかし、1990 年代中盤以降、SgIII の生理的役割に関して研究の進展はなく、この 2002 年の我々の報告まで「忘れられていた」グラニン蛋白であった。我々によって再発見された SgIII は、TGN から顆粒内の環境を模したカルシウム存在下・弱酸性 (pH5.5) の条件下で強く CgA と結合し、CgA を分泌顆粒へ選択的に輸送するのに必須の分子であることが生化学的解析から示唆された。

そこで、SgIII に対する特異抗体を作製して内分泌細胞における局在を検討したところ、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞では、SgIII が 2 種類の分泌顆粒のうち CgA 陽性の大型分泌顆粒に局限して輸送されることが確認され (図 4A)、生体でも CgA と SgIII が特異的に結合することが示唆された。ただし、下垂体前葉では、性腺刺激ホルモン産生細胞よりもプロラクチン産生細胞や甲状腺刺激ホルモン産生細胞の方が SgIII の発現が高く、特に分泌顆粒が比較的大きいプロラクチン産生細胞では SgIII が分泌顆粒膜直下に集積する傾向が顕著であった<sup>23)</sup> (図 4B)。同様に膵臓ランゲルハンス島の各内分泌細胞でも SgIII が分泌顆粒膜近傍に集積する傾向が認められたが<sup>24)</sup>、SgIII は可溶性蛋白であり明らかな膜貫通領域は持たない。そこで、Yeast-Two-Hybrid 法でさらに SgIII と結合する膜結合蛋白の探索を試みたが、SgIII を分泌顆粒膜につなぎ止める膜蛋白は同定できなかった。

一方、SgIII と顆粒膜の脂質との結合を解析したところ、SgIII が高コレステロール組成の分泌顆粒膜と直接結合して顆粒へ選別輸送されることが明らかとなった<sup>25)</sup>。以上の所見から、現在我々は、SgIII が CgA とコレステロールに富む膜微小領域の両方に特異的に結合し CgA を含む分泌蛋白の凝集塊を分泌顆粒内に繫留するモデルを提唱している (図 5)。

### 6. 分泌顆粒形成の分子細胞生物学的基盤：現時点での理解

SgIII を中心とした分泌顆粒への蛋白選別輸送機構は、今まで謎であった分泌顆粒膜と内腔の可溶性蛋白との間の選択的な結合を説明する一つの答えとなったが、一方で、この SgIII 依存的な過程だけが唯一の分泌顆粒形成機構ではないことも多数の研究から示唆されている。例えば、SgIII あるいは CgA を欠失したミュータント/ノックアウトマウスでも分泌顆粒は形成され、死に至る重大な障害は生じな

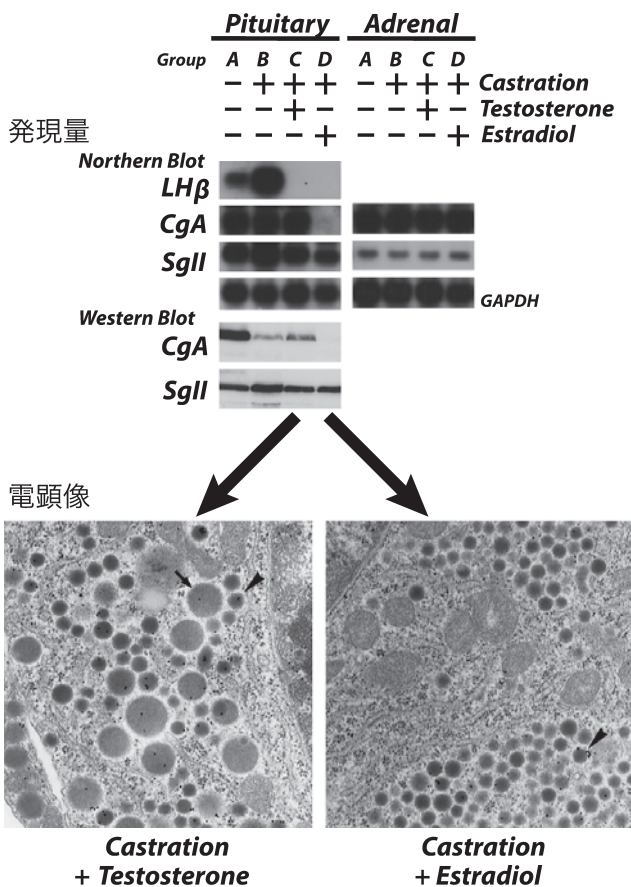


図 3 性腺刺激ホルモンの分泌顆粒構成に対する性ステロイドの影響。下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞における CgA の発現は、雌雄の性ステロイドによって対照的な調節を受けている。アンドロゲンが優位な状態 (図中の実験群 C) では同細胞における CgA の発現は維持され細胞内に大型分泌顆粒が観察されるが、エストロゲンが優位な状態 (図中の実験群 D) になると同細胞における CgA の発現は強く抑制されて細胞内から CgA 陽性の大型分泌顆粒が消失する。興味深いことに、CgA の発現に対するこのような雌雄の性ステロイドの影響は同じ個体から採取した副腎では認められないことから、下垂体 (の性腺刺激ホルモン産生細胞) 特異的な CgA 発現調節機構が存在することが示唆される。

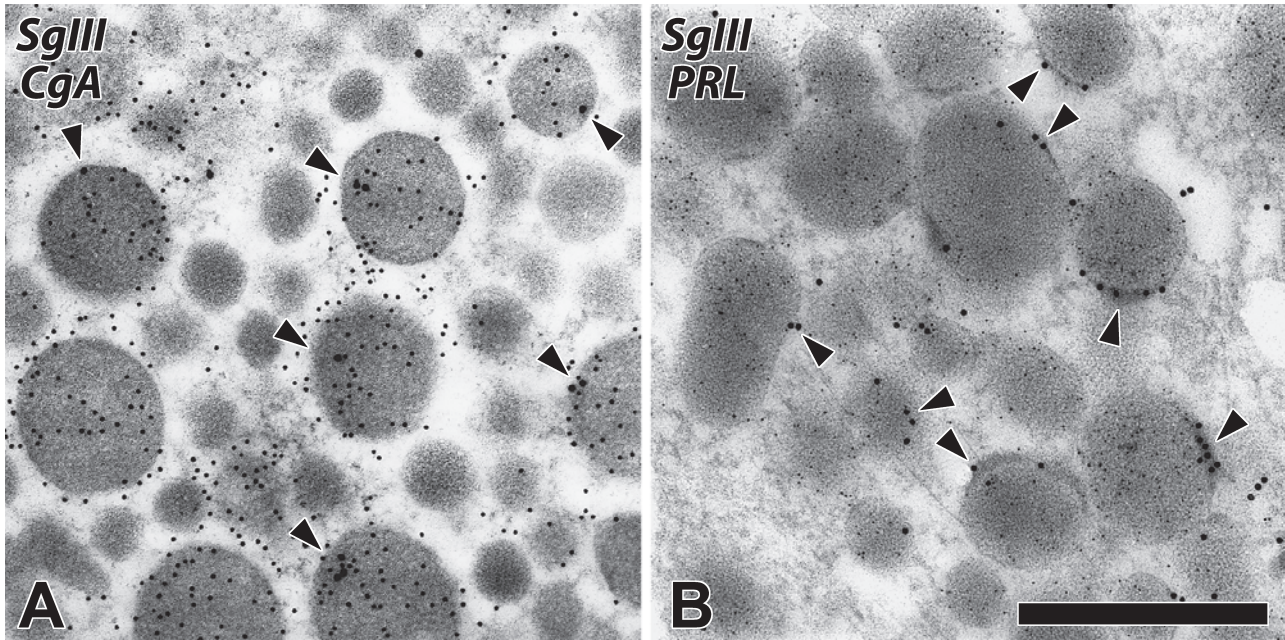


図4 下垂体前葉細胞の分泌顆粒におけるSgIIIの局在. 図2で示したように, 下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞では2種類のグラニン蛋白(CgAとSgII)が異なる分泌顆粒に輸送されるが, セクレトグラニンIII(SgIII; 15nm径の金粒子)はCgA(10nm径の金粒子)とともに大型分泌顆粒だけに選択的に輸送されることから, 生体においてSgIIIはCgAと特異的に結合することが示唆される(A). ただし, 下垂体前葉では, 性腺刺激ホルモン産生細胞よりもプロラクチン産生細胞や甲状腺刺激ホルモン産生細胞でSgIIIの発現が高く, これらの細胞では, より顕著にSgIIIが分泌顆粒膜直下に集積していることがわかる(B; SgIIIを15nm径, プロラクチンを5nm径の金粒子で標識). Scale bar=500nm

い<sup>26,27</sup>). このような動物では, 他の選別輸送機構, 例えばLohらが提唱しているカルボキシペプチターゼE(CPE)依存性の選別輸送機構などがSgIIIとCgAの役割を補完している可能性が高い. CPEは, 当初ペプチドホルモンのC末端側塩基性アミノ酸を切断・除去する酵素として同定されたが, 糖尿病・肥満モデルマウスとして知られるfat/fatマウスではこのCPEに原因となる遺伝子変異があり, CPE蛋白の安定性が著しく損なわれて分泌顆粒内のCPE量が痕跡程度に激減している. Lohらは, このCPE<sup>fat/fat</sup>マウスの下垂体やCPE

を欠損した神経芽細胞腫Neuro2aで, POMC, プロインスリン, プロエンケファリンが構成的分泌経路で分泌されてしまうこと, および, CPEがPOMCのN末端側のジスルフィド結合ループ構造と結合し分泌顆粒へと選択的に輸送することを実験的に示し, CPEが分泌顆粒への選別輸送レセプターとして働くという仮説を提唱した<sup>28</sup>. Lohらの一連の研究によれば, CPEはさまざまなペプチドホルモン前駆体と結合するとともに, そのC末端側で分泌顆粒膜上の脂質ラフト様構造とも強く結合し, 分泌顆粒内腔にペプチドホルモンを繋ぎ止める役割を果たしているという<sup>29</sup>. このCPE依存性の選別輸送機構の妥当性に関しては未だに議論があるが, CPEが内分泌細胞で特に高く発現し, さらに分泌顆粒膜とコレステロール依存性に強く結合していることは我々も確認している. さらに, 我々の解析ではSgIIIとCPEの間にも結合活性が認められ, 両者はコレステロールに富む分泌顆粒膜上の脂質ラフト様領域を足場として, 共同して分泌顆粒への選択的な蛋白輸送に寄与している可能性が高い<sup>30</sup>. さらにPC1/3, PC2などのプロセッシング酵素も脂質ラフト様構造と結合するという報告もあり<sup>31~34</sup>, これらの酵素に結合した状態で基質であるペプチドホルモン前駆体も一緒に分泌顆粒に到達する可能性が示唆されている<sup>35</sup>.

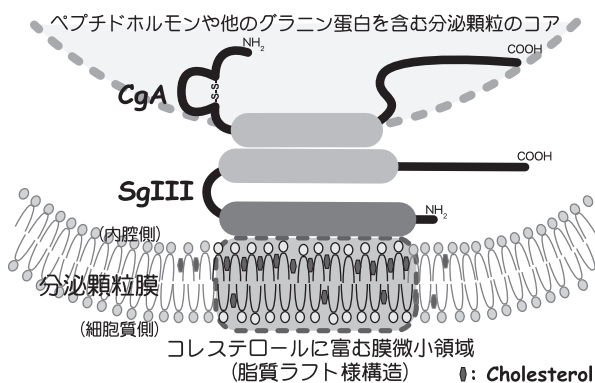


図5 SgIIIとコレステロールの相互作用を基盤とする選別輸送システム. SgIII分子は, コレステロールと親和性を持つ領域とCgAと特異的に結合する領域を併せ持っており, CgAを含むペプチドホルモンなどの凝集塊をコレステロールに富む分泌顆粒膜に繋留する役割を担っている.

また, CgAやSgIIIの欠損マウスでも分泌顆粒が形成されるように, CPEが欠損したCPE<sup>fat/fat</sup>マウスでも分泌顆粒は形成されSgIIIやCgAも正しく分泌顆粒に輸送される<sup>30</sup>. この所見から, CPE依存性の輸送機構とSgIII依存性の輸送機構

の間には優位性はなく、どちらかが欠損すると他方が補完するという関係にあるようである。

このような一連の知見を踏まえて、Reudelhuberらは分泌顆粒への選別輸送機構が複数並列して存在し、ある種の冗長性を持って分泌顆粒形成に寄与する可能性を示唆している<sup>35)</sup>。この仮説に従えば、何か一つの選別輸送系が欠損・破綻しても、分泌顆粒という小器官の形成自体には決定的なダメージは及ばない。また一方で、各システム間には、我々が明らかにしたCPEとSgIIIの間の結合活性のようなクロストークも存在すると思われる、併存する複数の選別輸送システムが特定の膜微小領域上で近接することで相乗的に分泌顆粒への蛋白輸送効率を上げている可能性も高い。このような複数の選別輸送機構の存在による冗長性と協調のおかげで、液性調節を支える内分泌顆粒という重要な細胞内小器官の安定した形成が保障されているのかもしれない。

## 7. おわりに

以上、内分泌細胞における分泌蛋白の選別輸送機構及び分泌顆粒形成機構に関して、最近の知見も含めて概説した。

この10年間で、少なくともSgIII依存性輸送機構とCPE依存性輸送機構の2つのシステムがそれまで謎であった内腔の可溶性蛋白と分泌顆粒膜の間のギャップを埋めた。

しかし、未だなおSgIII、CPE、プロセッシング酵素が足場としている高コレステロール組成の脂質微小領域が、なぜ分泌顆粒膜に選択的に集積するのかという問題については解明されていない。また、性腺刺激ホルモン産生細胞で見られるような、一つの細胞内に複数の調節性分泌経路が分かれて形成される場合の分子機構や生理的意義に関しても依然不明である。さらには、分泌顆粒が細胞膜直下まで正しく輸送されて細胞膜と融合するためには、モーター蛋白やSNARE蛋白など細胞質に局在する機能分子が分泌顆粒膜の細胞質側に選択的に集積する必要があるが、その機構についても解明すべき点が多い。

このような分泌顆粒形成に関する未解決の問題を解明するには、さらに分泌顆粒膜の内腔側と細胞質側の機能分子構築、特に両者を機能的に連携させている分子を明らかにする必要がある。そのためには、電子顕微鏡レベルの免疫組織化学標識法を改良して、微細構造を良好に保ちながら目的分子の検出感度を向上させていく努力が不可欠であろう。さらには、細胞内の小器官の立体構築を保持した状態で膜上の分子局在を把握できるような新たな標本作製技術・電子顕微鏡観察技法の開発にも取り組む必要があると思われる。

## 文 献

- 1) 穂坂正博: 生化学, 79, 166-170 (2007)
- 2) Moore, H.P. and Kelly, R.B.: *Nature*, 321, 443-446 (1986)
- 3) Wiedenmann, B. and Huttner, W.B.: *Virchows Archiv B Cell Pathol.*, 58, 95-121 (1989)
- 4) Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.: *Neuroscience*, 49, 497-528 (1992)
- 5) Ozawa, H.: *Acta Anat. Nippon.*, 72, 13-24 (1997)
- 6) Taupenot, L., Harper, K.L. and O'Connor, D.T.: *N. Engl. J. Med.*, 348, 1134-1149 (2003)
- 7) Tooze, S.A. and Huttner, W.B.: *Cell*, 60, 837-847 (1990)
- 8) Tooze, S.A., Flatmark, T., Tooze, J. and Huttner, W.B.: *J. Cell Biol.*, 115, 1491-1503 (1991)
- 9) Chanat, E. and Huttner, W.B.: *J. Cell Biol.*, 115, 1505-1519 (1991)
- 10) Gorr, S.U., Shioi, J. and Cohn, D.V.: *Am. J. Physiol.*, 257, E247-E254 (1989)
- 11) Colomer, V., Kicska, G.A. and Rindler, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 271, 48-55 (1996)
- 12) Parmer, R.J., Xi, X.P., Wu, H.J., Helman, L.J. and Petz, L.N.: *J. Clin. Invest.*, 92, 1042-1054 (1993)
- 13) Krömer, A., Glombik, M.M., Huttner, W.B. and Gerdes, H.-H.: *J. Cell Biol.*, 140, 1331-1346 (1998)
- 14) Glombik, M.M., Krömer, A., Salm, T., Huttner, W.B. and Gerdes, H.-H.: *EMBO J.*, 18, 1059-1070 (1999)
- 15) Arvan, P. and Castle, D.: *Biochem. J.*, 332, 593-610 (1998)
- 16) Tooze, S.A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1404, 231-244 (1998)
- 17) Watanabe, T., Uchiyama, Y. and Grube, D.: *Histochemistry*, 96, 285-293 (1991)
- 18) Inoue, K. and Kurosumi, K.: *Cell Tissue Res.*, 235, 77-83 (1984)
- 19) Watanabe, T., Jeziorowski, T., Wuttke, W. and Grube, D.: *J. Histochem. Cytochem.*, 41, 1801-1812 (1993)
- 20) Watanabe, T., Banno, T., Jeziorowski, T., Ohsawa, Y., Waguri, S., Grube, D. and Uchiyama, Y.: *Endocrinology*, 139, 2765-2773 (1998)
- 21) Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y. and Takeuchi, T.: *Mol. Biol. Cell*, 13, 3388-3399 (2002)
- 22) Ottiger, H.P., Battenberg, E.F., Tsou, A.P., Bloom, F.E. and Sutcliffe, J.G.: *J. Neurosci.*, 10, 3135-3147 (1990)
- 23) Sakai, Y., Hosaka, M., Hira, Y., Harumi, T., Ohsawa, Y., Wang, H., Takeuchi, T., Uchiyama, Y. and Watanabe, T.: *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 227-238 (2003)
- 24) Sakai, Y., Hosaka, M., Yoshinaga, A., Hira, Y., Harumi, T. and Watanabe, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, 67, 57-64 (2004)
- 25) Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T. and Takeuchi, T.: *J. Biol. Chem.*, 279, 3627-3634 (2004)
- 26) Kingsley, D.M., Rinchik, E.M., Russell, L.B., Ottiger, H.P., Sutcliffe, J.G., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A.: *EMBO J.*, 9, 395-399 (1990)
- 27) Hendy, G.N., Li, T., Girard, M., Feldstein, R.C., Mulay, S., Desjardins, R., Day, R., Karaplis, A.C., Tremblay, M.L. and Canaff, L.: *Mol. Endocrinol.*, 20, 1935-1947 (2006)
- 28) Cool, D.R., Normant, E., Shen, F., Chen, H.C., Pannell, L., Zhang, Y. and Loh, Y.P.: *Cell*, 88, 73-83 (1997)
- 29) Dhanvantari, S. and Loh, Y.P.: *J. Biol. Chem.*, 275, 29887-29893 (2000)
- 30) Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Kato, T. and Takeuchi, T.: *J. Cell Sci.*, 118, 4785-4795 (2005)
- 31) Arnaoutova, I., Smith, A.M., Coates, L.C., Sharpe, J.C., Dhanvantari, S., Snell, C.R., Birch, N.P. and Loh, Y.P.: *Biochemistry*, 42, 10445-10455 (2003)
- 32) Blázquez, M., Docherty, K. and Shennan, K.I.: *J. Mol. Endocrinol.*, 27, 107-116 (2001)
- 33) Blázquez, M., Thiele, C., Huttner, W.B., Docherty, K. and Shennan, K.I.: *Biochem. J.*, 349, 843-852 (2000)
- 34) Dikeakos, J.D., Mercure, C., Lacombe, M.J., Seidah, N.G. and Reudelhuber, T.L.: *FEBS J.*, 274, 4094-4102 (2007)
- 35) Dikeakos, J.D. and Reudelhuber, T.L.: *J. Cell Biol.*, 177, 191-196 (2007)