

主論文の要旨

Tomosyn Negatively Regulates Arginine Vasopressin Secretion in Embryonic Stem Cell-Derived Neurons

〔 Tomosyn は胚性幹細胞由来ニューロンにおいて
バゾプレシン分泌を抑制的に制御する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

竹内 誠治

【緒言】

バズプレシン (AVP) 分泌顆粒の開口放出の過程は、神経伝達物質や多くのホルモンと同様いくつかの段階 (recruitment、docking、priming、fusion) を経ると考えられている。Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) 蛋白質は、開口放出において極めて重要な役割を担っている。fusion の段階で、小胞側の1つのSNARE蛋白質 (VAMP) と細胞膜側の2つのSNARE蛋白質 (SNAP25、syntaxin1) が結合しSNARE複合体が形成される。これらのSNARE蛋白質およびSNARE関連蛋白質 (synaptotagmin、CAPS-1、Munc-18、CSP、 α -SNAP、Rab3A等) は視床下部下垂体後葉における発現が報告されている。

最近、我々は Rab3A のエフェクター蛋白質である Rabphilin3A が、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎 (lymphocytic infundibulo-neurohypophysitis、LINH) の主要な自己抗原と考えられること、Rabphilin3A に対する自己抗体が LINH の診断マーカーになり得ることを報告した。しかしながら AVP の開口放出の分子機構の詳細は未解明である。この一つの理由が、遺伝子ノックダウンや過剰発現実験が可能な細胞培養系が確立されていないことに起因している。細胞外分子 (ATP、浸透圧物質 [NaCl、マンニトール]、高カリウム、GABA、他の神経ペプチド) の下垂体後葉の神経終末における AVP 分泌および電気生理学的効果への関与は多く報告されているが、SNARE 蛋白質などの細胞内分子の AVP 分泌への直接的な関与を遺伝子ノックダウンや過剰発現実験によって示した研究は、我々の知る限りこれまで報告されていない。

胚性幹細胞 (ES 細胞) は再生医療研究だけでなく生物学的研究にとって大きな可能性を持っている。近年綿谷らが、ES 細胞を無血清浮遊培養での培養法 (SFEB 法) に、成長因子を含まない化学合成培地 (gfCDM) での培養法を組み合わせることで、AVP 分泌細胞を含む吻側視床下部前駆細胞への分化誘導に成功した (SFEBq/gfCDM 法)。

今回、下垂体後葉において SNAP25 と結合する蛋白質をプロテオミクスの手法を用いて同定し、さらに mouse ES 細胞から分化誘導した AVP 細胞を含む培養系 (ES-AVP 培養系) を用いて同定蛋白質の機能解析を行うことを目的に下記の検討を行った。

【方法】

大腸菌を用いて GST-SNAP25 を大量に精製し、下垂体後葉ライセートとでプルダウンアッセイ法を行った。銀染色にて有意なバンドを見出し、質量分析法 (in gel digestion- LC/MS/MS 法) を行い分子の検索を行った。同定された分子の下垂体後葉における発現・相互作用を免疫染色法、Western blotting 法、RT-PCR 法、免疫沈降法にて検討した。ES-AVP 培養系を用い、遺伝子工学的手法によって同分子の機能解析を行った。

各数値は mean \pm SE で表し、統計学的処理については *t* 検定、分散分析および Fisher の PLSD 法を用いて解析した。また、P 値 5%未満をもって有意差ありとした。

【結果】

銀染色において 130kDa 付近に有意なバンドを認め、質量分析法にて tomosyn を同定した (Figure 1)。免疫組織学的検討により tomosyn の下垂体後葉における発現が示された (Figure 2)。さらに tomosyn の視床下部・下垂体後葉における発現を、蛋白・mRNA レベルで証明した (Figure 3)。免疫沈降実験にて tomosyn は SNAP25・syntaxin1 と SNARE 複合体を形成することが示された (Figure 4)。ES-AVP 培養系における tomosyn の発現を免疫組織染色法および RT-PCR 法にて証明した (Figure 5)。ES-AVP 培養系に tomosyn の siRNA による遺伝子ノックダウンおよび過剰発現を行うことに成功した (Figure 6)。KCL 分泌刺激による AVP 分泌は、遺伝子ノックダウンによってコントロールと比して上昇し、過剰発現によって低下した (Figure 6)。以上の結果から、tomosyn は AVP 分泌において抑制的な役割を示すことが示唆された。

【考察】

今回我々は、下垂体後葉における SNAP25 との相互作用分子の検索の為、GST プルダウンアッセイ法と質量分析法を組み合わせることで、下垂体後葉での tomosyn の初の同定に至った。AVP 分泌における tomosyn の役割を検討するために ES-AVP 培養系を利用したが、同培養系において tomosyn は AVP 分泌を抑制的に制御することが示された。

Tomosyn は藤田らによって大脳において syntaxin-1 結合蛋白として同定された。Tomosyn は、syntaxin-1 のほか SNAP-25 と結合することが知られている。Tomosyn は C 末端側の VAMP 様領域と N 末端側の WD40 repeat 領域の大きく 2 つの領域から構成される。VAMP 様領域が小胞側の SNARE 蛋白である VAMP-2 と競合し、非融合性の tomosyn-SNARE 複合体を形成することで開口放出を抑制していることが、ラット副腎褐色細胞腫由来細胞、またインスリン産生細胞などを用いた検討でこれまで明らかにされている。WD40 repeat 領域は、SNARE 複合体のオリゴマー化を促進することで Ca センサーである synaptotagmin の機能を抑制することなどにより、神経伝達物質の分泌を抑制的に制御すると報告されている。従って tomosyn が AVP 分泌を抑制する所見は、従来の分泌抑制作用と一致する。VAMP 様領域、WD40 repeat 領域の AVP 分泌への関与は今回の検討では未検索であり今後解明が必要である。

中枢性尿崩症 (central diabetes insipidus, CDI) は AVP の分泌障害によって特徴づけられ多尿を来す疾患であるが、CDI 患者の約半数は病因が不明であり、その究明が臨床上求められている。CDI 患者における tomosyn の遺伝子変異スクリーニングは次の重要な課題である。また、AVP 分泌機構の更なる解明に向け、CDI 特異的な iPS 細胞の樹立も含め ES-AVP 培養系を更に洗練すること、および生体での関与を検討するため tomosyn ノックアウトマウスを用いた *in vivo* での検討が重要である。

【結語】

下垂体後葉における SNAP25 の相互作用分子として tomosyn を同定した。Tomosyn は AVP 分泌において抑制的な役割を示すことが示唆された。