

主論文の要旨

Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1, a novel interactor of rabphilin-3A, deubiquitylates rabphilin-3A and regulates arginine vasopressin secretion in PC12 cells

ラブフィリン 3A の新規相互作用物質である CAND1 はラブフィリン 3A を脱ユビキチン化し、PC12 細胞においてバソプレシン分泌を調整する

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

中島 孝太郎

【緒言】

バソプレシン(AVP)は下垂体後葉から開口放出にて分泌されるホルモンで、その過程には多数のステップが含まれる。ラブフィリン 3A は AVP 分泌不全による中枢性尿崩症を引き起こすリンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)における新規自己抗原として同定され、LINH の診断マーカーとして有用である可能性がある。ラブフィリン 3A は分泌顆粒において GTP-Rab3A 結合蛋白で神経伝達物質放出を調整し、synaptosomal-associated protein 25(SNAP25)、Rab27A、syntaxin 1 と協同して作用する。AVP 分泌におけるラブフィリン 3A の関与はこれまで明らかになっていないが、先行実験においてラブフィリン 3A が AVP 小胞のドッキングや融合に関与し、AVP 放出や水代謝の恒常性を制御している可能性がある。しかしながら、下垂体後葉においてラブフィリン 3A を介する AVP 分泌のメカニズムは大部分が不明のままである。

本研究でラブフィリン 3A との新たな相互作用物質を探索し、下垂体後葉においてラブフィリン 3A の新しい相互作用分子である cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1(CAND1)を同定し、CAND1 がラブフィリン 3A の脱ユビキチン化によって AVP 分泌調整に関わる可能性を見出した。

【対象および方法】

下垂体後葉におけるラブフィリン 3A 結合蛋白を同定するために、GST-ラブフィリン 3A とラット下垂体後葉ライセートを用いた GST プルダウン法を行った。溶出したサンプルを SDS-PAGE 後に銀染色を行った。特異的なバンドを切り出し、In-gel digestion、LC/MS/MS にて質量分析を行った。

抗 CAND1 抗体を用いたウエスタンブロット法(WB)にて下垂体後葉およびプルダウンサンプルにおける CAND1 の存在を確認し、共免疫沈降法にてラブフィリン 3A、CAND1、SNAP25 の内因性相互作用を評価した。免疫組織染色にて下垂体後葉、視床下部 SON におけるラブフィリン 3A、CAND1 の免疫活性を評価し、RT-PCR 法にてラット視床下部、大脳皮質、肝臓における mRNA レベルを評価した。

PC12 細胞において CAND1 過剰発現、MG132 処理を用い、ラブフィリン 3A のユビキチン化および蛋白発現に対する影響を評価した。さらに CAND1 と AVP との共導入において、CAND1 の過剰発現が AVP の基礎分泌および KCl 刺激後の分泌に与える影響を評価した。

【結果】

下垂体後葉におけるラブフィリン 3A 結合蛋白を同定するため GST プルダウン法を行った。SDS-PAGE 後の銀染色にて、おおよそ 120kDa にコントロールである GST-cdc42-GTP γ S には無いバンドを認めた(Fig.1a 矢印)。バンドを切り出し、In-gel digestion、LC/MS/MS にて解析したところ CAND1 を検出した。抗 CAND1 抗体を用いた WB にて、プルダウンサンプルおよび下垂体後葉における CAND1 の発現を確認した(Fig.1b)。下垂体後葉ライセートを用いた共免疫沈降法を用いて CAND1、ラブフィ

リン 3A の内因性相互作用を評価し、ラブフィリン 3A は CAND1 と共沈降を認めた (Fig.1c)。加えて、SNAP25 とラブフィリン 3A の共沈降を認めたが、SNAP25 と CAND1 の共沈降は認めなかった (Fig.1d)。

次に、下垂体、視床下部における CAND1 の発現を評価した。免疫組織化学検査にて CAND1 は主に下垂体後葉と中葉に局在し (Fig.2a, 2b)、視床下部 SON でも確認された (Fig.2c, 2d)。CAND1 は下垂体後葉、SON において部分的にラブフィリン 3A と共局在した (Fig.2a-2d)。RT-PCR 法にて mRNA レベルを評価し、視床下部における CAND1 の mRNA レベルはラット大脳皮質、肝臓と同程度だった (Fig.2e)。

CAND1 は SCF(SKP1、CUL1、F-box proteins)ユビキチンリガーゼ複合体の形成を調整し、複合体に結合すると基質のユビキチン化を減少させる。PC12 細胞においてラブフィリン 3A のユビキチン化に対する CAND1 の影響を評価するため、プラスミドを用いた CAND1 過剰発現実験を行った。ラブフィリン 3A を免疫沈降し、抗ユビキチン抗体を用いてプロテアソーム阻害薬である MG132 の有無においてユビキチン化を検出した (Fig.3a, 3b)。ユビキチン化されたラブフィリン 3A レベルはコントロール群と比較して CAND1 過剰発現群にて減少し、MG132 処理群にて増加した (Fig.3b, 3c)。ラブフィリン 3A の発現はコントロール細胞と比較して CAND1 過剰発現細胞において 96 時間後に増加した (Fig.3d, 3e)。これらのデータは PC12 細胞において CAND1 がラブフィリン 3A を脱ユビキチン化し、その分解を防いでいることを示唆している。

最後に、AVP 分泌における CAND1 の役割を調査するため、PC12 細胞において AVP との共導入実験を行った。CAND1 の過剰発現は免疫プロットにて確認した (Fig.4a)。PC12 細胞培養での培養液、ライセートにおける AVP 測定を行ったところ、CAND1 の過剰発現は AVP の基礎分泌および KCl 刺激後の分泌を増強した ($P < 0.05$) (Fig.4b)。

【考察】

本研究において、GST プルダウン法とプロテオーム解析を用いて、CAND1 を下垂体後葉におけるラブフィリン 3A の相互作用物質として同定した。CAND1 は下垂体と視床下部 SON にて発現した。CAND1 がラブフィリン 3A を脱ユビキチン化し、PC12 細胞において AVP 分泌を制御することが示された。

免疫蛍光法にて CAND1 は主に下垂体後葉、中葉および視床下部 SON に存在し、そこには AVP 神経細胞が存在する。既報においてラブフィリン 3A は下垂体後葉と視床下部の AVP 神経細胞に発現すると報告されているが、本実験において CAND1 とラブフィリン 3A は共局在した。これらの結果は、CAND1 がラブフィリン 3A と関連し、AVP 分泌に役割を果たすことを示唆している。ラブフィリン 3A は神経細胞、神経内分泌細胞に発現し、分泌小胞膜において Rab3 ないし Rab27A と共局在する。ラブフィリン 3A は活動型 Rab3A と結合する蛋白であり、Ca²⁺が誘発する開口放出を制御する。ラブフィリン 3A の過剰発現はクロマフィンや PC12 細胞において制御された分泌を増強するが、開口放出における正確な役割については議論の余地がある。

PC12 細胞を用いた AVP との共導入実験において、CAND1 過剰発現は AVP の基礎

分泌および KCl 刺激後の分泌を有意に増加させた。PC12 細胞において CAND1 は基礎分泌および脱分極誘発性 AVP 分泌の両方を制御することを示唆している。これは CAND1 がホルモンや神経伝達物質の分泌への関与を示す最初の報告である。

CAND1 は cullin-1 結合蛋白として同定された。CUL1 は SCF ユビキチン E3 リガーゼ複合体の重要な構成要素である。CAND1 は非 NEDD 化された CUL1 と結合し、SCF ユビキチン E3 リガーゼ複合体の形成を制御し、多くの調節タンパク質のユビキチン依存性タンパク質分解を制御する。CAND1 は SCF 複合体を修飾することも知られている。本データは CAND1 がラブフィリン 3A を脱ユビキチン化することを示唆する。ユビキチン化はプロテアソームを介した分解、タンパク局在、活性化の制御など多くの生物学的な過程に影響する。CAND1 がラブフィリン 3A の分解を阻害することによって、ホルモン分泌に影響を与えている可能性がある。CAND1 の AVP 分泌について詳細な役割を決定するには更なる研究が必要である。塩分負荷や水制限試験などで、理想的にはノックアウトマウスを用いて、CAND1 とラブフィリン 3A の発現や相互作用が変化するかどうかを調べる必要がある。中枢性尿崩症の約 50% が病因不明である。将来そのような特発性中枢性尿崩症の患者のラブフィリン 3A や CAND1 遺伝子変異の有無を調べる検討も必要である。

【結語】

GST プルダウン法とプロテオーム解析を用いて、下垂体後葉におけるラブフィリン 3A の相互作用物質として CAND1 を同定した。CAND1 がラブフィリン 3A を脱ユビキチン化し、PC12 細胞において AVP 分泌を制御することが示された。AVP 分泌におけるラブフィリン 3A を含めた新規メカニズムの可能性を示し、CAND1 のホルモンまたは神経伝達物質分泌の制御因子としての新しい役割を示唆した。