



# インスリン感受性糖輸送担体GLUT4の細胞膜移行におけるsyntaxin4結合蛋白Munc18cの機能解析

篠田, 弘昭

---

**(Citation)**

神戸大学医学部紀要, 63(1/2):49-54

**(Issue Date)**

2002-12

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317265>



# インスリン感受性糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜移行における syntaxin4 結合蛋白 Munc18c の機能解析

篠田 弘 昭

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座 糖尿病代謝・消化器・腎臓内科

連絡先 〒651-1302 神戸市北区藤原台中町 5 丁目 1 - 1

済生会兵庫県病院 内科

TEL 078-987-2222 (代)

篠田 弘昭

E-mail: hshinoda@k3.dion.ne.jp

(平成14年 9月26日受付)

## 要 約

脂肪細胞におけるインスリン感受性糖輸送担体 GLUT4 がインスリン刺激により細胞膜へ移行し、これと結合、融合する際に、syntaxin4, SNAP23, VAMP2 といった SNARE 蛋白が重要な機能を果たすことが知られている。しかし syntaxin4 結合蛋白である Munc18c の機能は未だ解明されていない。我々は Munc18c の機能を直接検討するため、Munc18c 蛋白を発現していない遺伝子欠損マウスを作製した。Munc18c ホモノックアウトマウスは胎生致死で、この胎児は中枢神経系に発達異常を呈した。またホモノックアウトマウスより調製した脂肪細胞において syntaxin4 の発現低下が認められ、Munc18c は細胞内で syntaxin4 の安定化に寄与していることが示唆された。しかし、Munc18c を発現しない脂肪細胞においても、インスリン依存性の GLUT4 の細胞膜への移行やインスリン依存性のブドウ糖の取り込みは野生型から調製した脂肪細胞と有意差を認めず、Munc18c は脂肪細胞における GLUT4 の細胞膜移行には必須の機能をはたしていないことが示された。

## 緒 言

生体における食後の高血糖を是正し、正常な血糖を維持する主な機構の1つとして脂肪細胞や骨格筋といった臓器でのインスリン刺激による活発なブドウ糖取り込みがあげられる。このブドウ糖取り込みはインスリンに反応し細胞内プールから細胞膜へ移行するインスリン感受性糖輸送担体 GLUT4 により達成される<sup>(1, 2)</sup>。

この過程で、GLUT4 を含む細胞内小胞 (GLUT4 小胞) が細胞膜に結合および融合する際、神経分泌と同様に SNARE (the soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) 蛋白が機能すると考えられる。この過程に関与する SNARE アイソフォームとして、3T3-L1 脂肪細胞においては GLUT4 小胞上の VAMP2<sup>(3, 4)</sup>、細胞膜上の syntaxin4<sup>(5)</sup> および SNAP23<sup>(6, 7)</sup> が重要な役割を果たしていることが示されている。さらに、これら SNARE 蛋白が複合体を形成する過程で、syntaxin4 結合蛋白である Munc18c が制御的役割を演じている可能性が示唆されてきた<sup>(8, 9)</sup>。そこで我々はインスリン依存性の GLUT4 の細胞膜への移行過程における Munc18c の機能を直接検討するため、Munc18c ノックアウトマウスを作製した。

## 方 法

Munc18c ノックアウトマウスの作成

129SVJ 系マウスゲノムライブラリーより、開始コドン ATG の存在するエクソンを含んだ約 16 キロ塩基対の Munc18c ゲノムをクローニングした。ターゲティングベクターは開始コドンを含むエクソンを、NEO 耐性遺伝子で置換する方式で構築した。作成したターゲティングベクターを ES 細胞 (129/Ola 由来) にエレクトロポレーション法により導入し、ネオマイシン (200  $\mu$ g/ml) 下に選別培養した。相同組み替えを起こしているクローンをゲノムサザンプロット法でスクリーニングし、4 クローンの相同組換えをおこした ES 細胞を得た。この 4 クローンをブラストシストイ

キーワード：GLUT4, SNARE, syntaxin4, Munc18c

ンジェクションし、1系統のキメラマウスを獲得、C57/BL6 マウスとの交配により Munc18c ヘテロノックアウトマウスを得た。

#### マウス胎児線維芽細胞の調製と脂肪細胞への分化誘導

Munc18c ヘテロノックアウトマウス同士の交配をおこない、妊娠 13.5-15 日の雌マウスの子宮より胎児を取り出し、摘出した胎児の胸腹部組織を眼科剪刀で細片化した。コラゲナーゼメディウム(高グルコース DMEM, 20%BSA, 0.5%コラゲナーゼ type1)を添加し、30 分間振盪後、遠心分離し、組織片やコラゲナーゼを取り除いた。高グルコース DMEM(10% FCS, PC-SM 50  $\mu$ g/ml, 200nM アスコルビン酸)にて培養用ディッシュに播きこみ、翌日メディウム交換を行った。同時に胎児の組織片を用いて遺伝子型を決定した。

一次培養した線維芽細胞は 8-9 割コンフルエントの段階で、1 回だけ継代培養した。適当な培養皿に播き込みコンフルエントになってから 1-2 日後に分化誘導を開始した。一次分化メディウム(1nM insulin, 1nM T3)で 2 日間、二次分化メディウム(1nM insulin, 1nM T3, 250nM dexamethasone, 0.5mM isobutylmethylxanthine, 0.3  $\mu$ M BRL49653, 125nM indomethacine)で 2 日間培養し、その後は高グルコース DMEM 培養メディウムで培養をつづけた。分化開始後 7-12 日で実験に供した。

#### 2-deoxy-D-glucose の取り込みアッセイ

6 ウェル培養プレートに細胞を播き込み、上記の方法で脂肪細胞に分化させ、脂肪分化誘導後 7-9 日目にアッセイをおこなった。アッセイは 2 時間血清スターブした後、KRH バッファ溶液(25mM HEPES(pH7.4), 120mM NaCl, 1.2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM KCl)にて 100nM のインスリンで 20 分間刺激し、5 分間のパルス(0.05mM 2-deoxy-D-[ $^3\text{H}$ ]glucose(0.25  $\mu$  Ci/well))をおこなった。氷冷 KRH バッファで洗浄後、細胞を 0.5%SDS で可溶化し、液体シンチレーションカウンターで細胞内に取り込まれたラジオアイソトープ活性を測定した。

#### 脂肪細胞の膜分画とウェスタンブロット

10cm 培養皿に調整したマウス胎児線維芽細胞から分化させた脂肪細胞は、分化誘導後 7-12 日目に実験に供し、以前示した方法で細胞膜と細胞内膜画分に分画した<sup>(4)</sup>。それぞれの画分を 10%の SDS-PAGE ゲルで展開し、ニトロセルロース膜に転写したのち、GLUT4, Munc18c, syntaxin4 に対する抗体イムノ

ブロットを行い、HRP を付加した 2 次抗体を用い可視化は ECL にて行った。

## 結 果

### 1) Munc18c ホモノックアウト胎児マウスの解析

Munc18c ヘテロノックアウトマウス同士の交配でホモノックアウトマウスが生まれてこないことから、Munc18c ホモノックアウトマウスは胎生致死ではないかと考え、胎児の検討を行った。その結果、Munc18c ホモノックアウトマウスは胎生 12.5 日から 15 日の期間に致死性となっていた。またホモノックアウト胎児マウスは野生型胎児マウスに比し体のサイズが小さかった。さらにホモノックアウトマウスの胎生致死の原因を探るため、胎児の解剖学的検討を行ったところ、ホモ接合体マウスは神経管の閉鎖不全による外脳症奇形、脊髄白質の増大とそれに伴う髄腔の狭小化、眼球の形態異常など主に中枢神経系に形態異常を認めた(図 1)。

### 2) Munc18c 発現を認めない脂肪細胞における syntaxin4 蛋白の発現検討

次いで Munc18c が、その結合パートナーである syntaxin4 の蛋白発現量に影響を与えるかどうかを検討した。胎生 13.5-15 日目のマウス胎児より得た線維芽細胞を脂肪細胞に分化させたところ、分化 7-12 日目における脂肪細胞の形態には遺伝子型間の違いによる変化は認められなかった。しかし Munc18c 発現のないホモノックアウトマウス由来の脂肪細胞においては syntaxin4 蛋白の発現低下が認められ、Munc18c は脂肪細胞内において syntaxin4 蛋白の安定化に寄与している可能性が示唆された(図 2)。

### 3) Munc18c 発現を認めない脂肪細胞におけるインスリン依存性の GLUT4 の細胞膜移行の検討

さらに Munc18c が、脂肪細胞におけるインスリン依存性の GLUT4 の細胞膜への移行に関与しているか否かを検討した。胎児マウスより調製した分化誘導後 7-12 日目の脂肪細胞において、インスリン刺激にブドウ糖取り込み能を検討したところ、野生型、ヘテロノックアウト、ホモノックアウトマウスの各遺伝子型間での有意な差を認めなかった(図 3)。さらに細胞内膜分画法により脂肪細胞でのインスリン刺激による GLUT4 の細胞内から細胞膜への移行を検討したが、各遺伝子型間で GLUT4 の細胞膜への移行には有意差を認めなかった(図 4)。

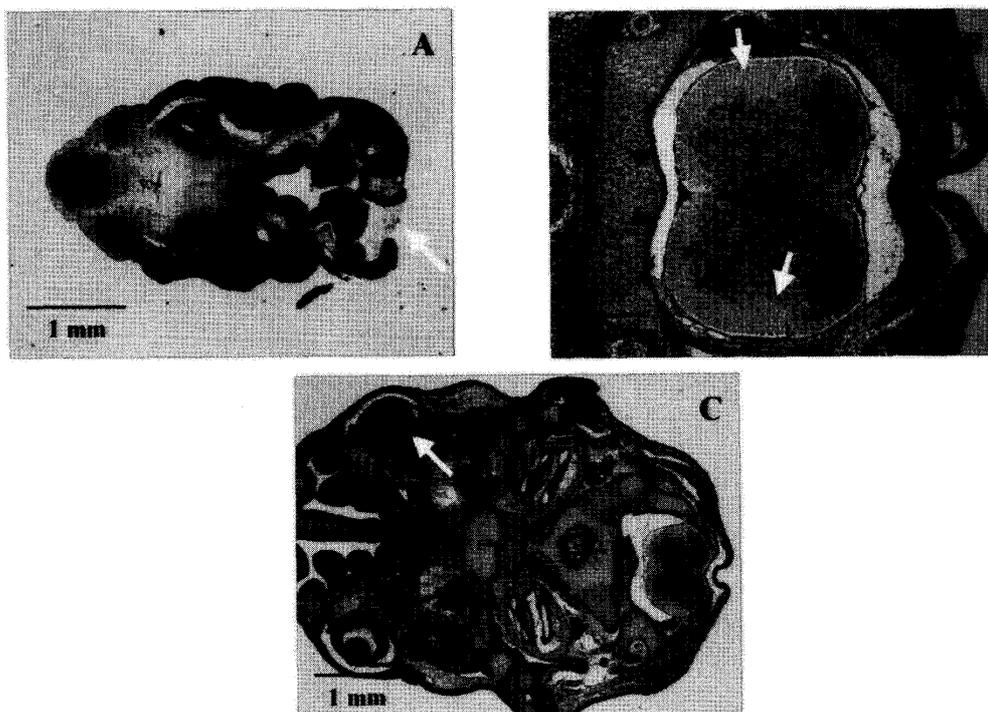


図1 Munc18c ホモノックアウト胎児マウスの解剖学的検討

妊娠 15 日目の雌マウスより胎児を取り出し、ホルマリンで固定後、切片を切り、HE 染色を行った。A. Munc18c ホモノックアウト胎児マウスに見られた神経管閉鎖不全。眼を通る水平断。矢印の部に閉鎖不全を認める。B. Munc18c ホモノックアウト胎児マウスに見られた脊髄白質の増大(矢印)とそれに伴う髄腔の狭小化(矢尻)。下部頸椎を通る水平断。C. Munc18c ホモノックアウト胎児マウスに認められた片側の眼球の異常(矢印)。眼球および環椎を通る水平断。

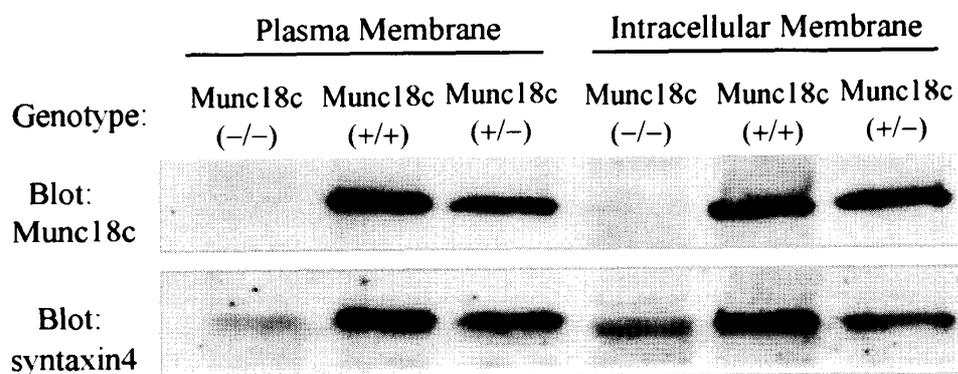


図2 脂肪細胞における Munc18c の syntaxin4 蛋白発現におよぼす影響

妊娠 13.5-15 日目の雌マウスより胎児を取り出し、方法に記載した要領で脂肪細胞を獲得し、分化誘導後 7-12 日目に実験に供した。ウェスタンブロットには各画分とも 18 μg の蛋白を泳動し、抗 Munc18c 抗体および抗 syntaxin4 抗体でイムノブロットを行った。

## 考 察

我々の検討では、Munc18c は胎生期における中枢神経系の正常な発達に重要な機能を果たしているが、脂肪細胞におけるインスリン依存性の GLUT4 の細胞膜移行とそれに続くブドウ糖の取り込みには必須では

ないと結論付けられた。

これまでの知見では、Munc18 の 3 種のアイソフォームのうち、神経系での主たるアイソフォームは Munc18a であると考えられている。しかし、Munc18a ノックアウトマウスが中枢神経系には発達異常を呈さないのに対し<sup>(10)</sup>、広範囲な組織分布を示す Munc18c

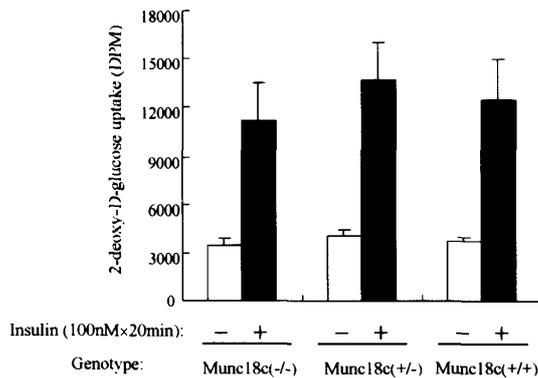


図3 脂肪細胞における Munc18c のブドウ糖取り込み能におよぼす影響

妊娠 13.5-15 日目の雌マウスより胎児を取り出し、方法に記載した要領で脂肪細胞を獲得した。分化誘導後 7-12 日目の脂肪細胞を用い、2 時間の血清スタンプ後 100nM のインスリンで 20 分間刺激し、ブドウ糖取り込み能を測定した。6 回の実験結果から平均+標準誤差を示す。

が中枢神経系の正常な発達に関与することは予想外な結果であった。syntaxin4 遺伝子欠損マウスもホモ接合体は胎生致死となることを考えると<sup>(11)</sup>, syntaxin4 とその結合パートナーである Munc18c の複合体は胎生期の正常な発達に深く関わっていることが推測される。

脂肪細胞における GLUT4 小胞の細胞膜移行には syntaxin4, SNAP23, VAMP2 といった SNARE 蛋白が必須の機能を担っていることが示されているが<sup>(3-7)</sup>, syntaxin4 結合蛋白である Munc18c が GLUT4 の細胞膜移行にいかに関与するかについては未だ明確な解答が得られていなかった<sup>(8, 9, 12, 13)</sup>。しか

し今回のわれわれの検討で、Munc18c が発現していない脂肪細胞においてもインスリン依存性の GLUT4 の細胞膜への移行およびブドウ糖の取り込みが野生型の細胞と同程度起こることから、少なくとも脂肪細胞では Munc18c はこの一連の過程に必須の機能を果たしていないものと推測される。

いっぽう Munc18c が発現していない脂肪細胞では、syntaxin4 の蛋白発現に低下が認められ、Munc18c は syntaxin4 蛋白の細胞内における安定化に寄与している可能性が示唆された。これは酵母の検討において、Munc18 の酵母でのホモログである Vps45p が syntaxin のホモログである Tlg2p の細胞内での安定化に重要であるという報告と同じ意味をもつものである<sup>(14)</sup>。

以上、syntaxin4 結合蛋白である Munc18c は細胞内において syntaxin4 の安定化に寄与するとともに、胎生期の中枢神経系の正常な発達に重要な機能を果たしていること、さらには脂肪細胞における GLUT4 小胞のインスリン依存性細胞膜移行には必須ではないことが証明された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、Munc18c ノックアウトマウス作製にご協力いただいた宮崎純一先生および胎児マウスの解析にご協力いただいた宇田川潤先生、大谷浩先生にこころより感謝申し上げます。最後に本研究全般にわたりご指導頂いた春日雅人教授に深謝いたします。

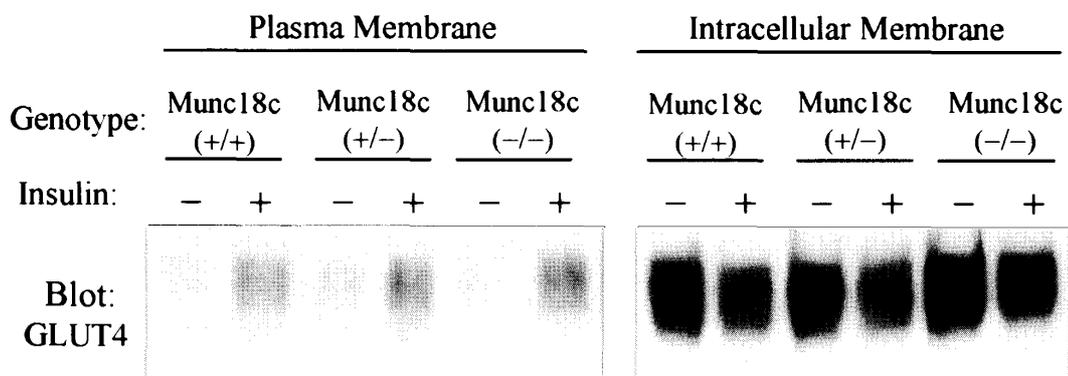


図4 脂肪細胞における Munc18c のインスリン依存性 GLUT4 細胞膜移行におよぼす影響

妊娠 13.5-15 日目の雌マウスより胎児を取り出し、方法に記載した要領で脂肪細胞を獲得し、分化誘導後 7-12 日目に実験に供した。ウェスタンブロットには各画分とも 18 μg の蛋白を泳動し、抗 GLUT4 抗体でイムノブロットを行った。

## 文 献

- 1) Suzuki, K., Kono, T.: Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:2542-2545, 1980.
- 2) Cushman, S.W., Wardzala, L.J.: Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255:4758-4762, 1980.
- 3) Cain, C.C., Trimble, W.S., Lienhard, G.E.: Members of the VAMP family of synaptic vesicle proteins are components of glucose transporter-containing vesicles from rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 267:11681-11684, 1992.
- 4) Tamori, Y., Hashiramoto, M., Araki, S., Kamata, Y., Takahashi, M., Kozaki, S., Kasuga, M.: Cleavage of vesicle-associated membrane protein (VAMP)-2 and cellubrevin on GLUT4-containing vesicles inhibits the translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:740-745, 1996.
- 5) Cheatham, B., Volchuk, A., Kahn, C.R., Wang, L., Rhodes, C.J., Klip, A.: Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:15169-15173, 1996.
- 6) Araki, S., Tamori, Y., Kawanishi, M., Shinoda, H., Masugi, J., Mori, H., Niki, T., Okazawa, H., Kubota, T., Kasuga, M.: Inhibition of the binding of SNAP-23 to syntaxin 4 by Munc18c. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234:257-262, 1997.
- 7) Kawanishi, M., Tamori, Y., Okazawa, H., Araki, S., Shinoda, H., Kasuga, M.: Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J. Biol. Chem.* 275:8240-8247, 2000.
- 8) Tamori, Y., Kawanishi, M., Niki, T., Shinoda, H., Araki, S., Okazawa, H., Kasuga, M.: Inhibition of insulin-induced GLUT4 translocation by Munc18c through interaction with syntaxin4 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273:19740-19746, 1998.
- 9) Thurmond, D.C., Ceresa, B.P., Okada, S., Elmendorf, J.S., Coker, K., Pessin, J.E.: Regulation of insulin-stimulated GLUT4 translocation by Munc18c in 3T3L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273:33876-33883, 1998.
- 10) Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J., Sudhof, T.C.: Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287:864-869, 2000.
- 11) Yang, C., Coker, K.J., Kim, J.K., Mora, S., Thurmond, D.C., Davis, A.C., Yang, B., Williamson, R.A., Shulman, G.I., Pessin, J.E.: Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 107:1311-1318, 2001.
- 12) Thurmond, D.C., Kanzaki, M., Khan, A.H., Pessin, J.E.: Munc18c function is required for insulin-stimulated plasma membrane fusion of GLUT4 and insulin-responsive amino peptidase storage vesicles. *Mol. Cell. Biol.* 20:379-88, 2000.
- 13) Thurmond, D.C., Pessin, J.E.: Discrimination of GLUT4 vesicle trafficking from fusion using a temperature-sensitive Munc18c mutant. *EMBO J.* 19:3565-3575, 2000.
- 14) Bryant, N.J., James, D.E.: Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation. *EMBO J.* 20:3380-3388, 2001.

# Investigation of the functions of syntaxin4 binding protein Munc18c in the insulin-stimulated GLUT4 translocation to plasma membrane.

Hiroaki Shinoda

Division of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases, Department of Clinical Molecular Medicine,  
Kobe University Graduate School of Medicine

## Abstract:

The SNARE proteins including synaptobrevin/VAMP2, syntaxin4 and SNAP23 are proposed to play important roles in the insulin-induced GLUT4 translocation in adipocytes or skeletal muscles. However, the functional roles of the syntaxin4 binding protein Munc18c are not fully understood in the GLUT4 translocation process in adipocytes. Therefore, we generated the Munc18c-deficient mice to directly investigate whether Munc18c plays critical functions in the insulin-stimulated GLUT4 translocation from the intracellular compartment to the plasma membrane in adipocytes. Homozygous Munc18c-deficient embryos (Munc18c<sup>-/-</sup>) die at embryonic day (E.D.) 12.5-15, displaying multiple abnormalities in neural tissues and eyes. Thus, we obtained the adipocyte expressing no Munc18c proteins by differentiating the fibroblasts derived from Munc18c<sup>-/-</sup> embryos at E.D. 13.5-15 into adipocytes. No morphological changes were detected between the adipocytes prepared from Munc18c<sup>-/-</sup> and from Munc18c<sup>+/+</sup> embryos. However, the protein expressions of syntaxin4 which is a binding partner of Munc18c were decreased in adipocytes expressing no Munc18c. Neither the insulin-stimulated glucose transport nor the insulin-stimulated GLUT4 translocation were significantly changed in the adipocytes derived from Munc18c<sup>-/-</sup> embryos compared with in the adipocytes from Munc18c<sup>+/+</sup> embryos. These findings suggest that Munc18c plays important roles in the normal development of the neural tissues in embryos and in stabilizing syntaxin4 in adipocyte but not in the insulin-stimulated GLUT4 translocation at least in adipocytes.