



Inhibition of the Binding of SNAP-23 to Syntaxin 4 by Munc18c

荒木, 悟

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-05-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2245

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002245>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	あら き さとし 荒 木 悟 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1640号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成10年5月13日
学位論文題目	Inhibition of the Binding of SNAP-23 to Syntaxin 4 by Munc18c (Munc18cによるSNAP-23のSyntaxin 4への結合の阻害)

審査委員 主査 教授 春日 雅 人
教授 千原 和 夫 教授 久野 高 義

論文内容の要旨

【序 文】

近年、神経細胞や内分泌細胞における神経伝達物質やホルモンの開口放出機構について、その分子構造が徐々に明らかにされつつある。SNARE仮説といわれるもので、これには、NSF, SNAP, VAMP, Syntaxin, SNAP-25を初め、様々なタンパク質の関与が示唆されている。一方、インスリン感受性細胞である筋肉、及び脂肪細胞におけるインスリン反応性の糖輸送の増加は、主にインスリン感受性糖輸送担体であるGLUT 4の、細胞内から細胞膜へのトランスロケーションによると考えられている。GLUT 4小胞にVAMP 2が存在することから、GLUT 4小胞の細胞膜への結合や融合にも、神経細胞類似の分子機構の存在が想定されている。SNAP-25は、主に細胞膜に存在し、小胞の結合や融合に関与していると考えられているタンパクであり、1996年、その類似タンパクとしてSNAP-23がヒトリンパ球よりクローニングされた。

本研究では、マウス脂肪細胞のcDNAライブラリーより、ヒトSNAP-23とアミノ酸レベルで87%の相同性を示すタンパクを単離し、その機能解析を行った。

【実験方法】

ラットSNAP-25、及びヒトSNAP-23のcDNAをプローブとして、マウス脂肪細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたクローンの塩基配列、ならびにそれより類推されるアミノ酸配列を決定し、既報のタンパクとの相同性や、コイルドコイル構造の有無を検討した。また、大腸菌を用いてGSTとの融合タンパクを合成し、これを家兎の免疫に使用しポリクローナル抗体を作成、この抗体で3T3-L1脂肪細胞におけるタンパクの分布を調べた。

また、得られたタンパクについてyeast two-hybrid systemを用いて、SNAP-25、及びヒトSNAP-23が相互作用することが知られている各種Syntaxinとの相互作用の強さを定量的に評価した。

最後に、COS細胞にMunc18c, Syntaxin 4, SNAP-23のそれぞれの発現ベクターをMunc18cの量を変えてトランスフェクションし、Syntaxin 4で免疫沈降したものをそれぞれの抗体でウエスタ

ンブロットングすることで、SNAP-23とSyntaxin 4との結合に対するMunc18cの影響を調べた。

【結 果】

マウスSNAP-23cDNAのクローニング

約30万プラークをスクリーニングし、2個の陽性クローンが得られた。それらはいずれも同一のタンパクをコードしており、得られたcDNAのDNAシーケンスの結果、このタンパクは、210個のアミノ酸よりなり、ヒトSNAP-23と最も高い相同性を示した。アミノ酸レベルで、87%の相同性と、99%の類似性を有していた。

COILSprogramによる解析の結果、SNAP-25には3ヶ所所有のコイルドコイル構造が、SNAP-23では2ヶ所存在することが予測された。

SNAP-23の細胞内分布

3T3-L1脂肪細胞の各細胞画分に対するウェスタンブロットング、及び免疫蛍光染色法における検討から、このタンパクは細胞内においてSNAP-25と同様に、主に細胞膜に存在することを確認した。

SNAP-23と各種Syntaxinとの相互作用

yeast two-hybrid systemを用いた各種Syntaxinとの相互作用の検討では、SNAP-25にはやや劣るものの、Syntaxin 1～4のそれぞれと相互作用を認めた。中でも、Syntaxin 1、及びSyntaxin 4と強い相互作用を認め、次いでSyntaxin 2、Syntaxin 3の順であったが、Syntaxin 5とはほとんど反応を示さなかった。

SNAP-23とSyntaxin 4との結合に対するMunc18cの影響

COS細胞においてMunc18cを多くトランスフェクションするにしたがってSyntaxin 4と共沈するSNAP-23の量が減少した。

【考 察】

近年、シナプス小胞の開口放出機構におけるSNAREタンパクの重要性が明かとなってきたが、これらのタンパクが広い組織分布を示すことから、神経細胞以外の細胞においても小胞輸送に関与していると考えられている。実際、脂肪細胞におけるインスリン依存症のGLUT 4小胞の細胞膜へのトランスロケーションに、v-SNAREであるVAMP-2やcellubrevin、t-SNAREであるSyntaxin 4の関与が報告されている。しかし、シナプス小胞のドッキングやフュージョンに重要な働きを有するSNAP-25は、神経細胞や内分泌細胞以外ではほとんど認められていない。従って我々は、脂肪細胞におけるGLUT 4のトランスロケーションにおける、SNAP-25か、またはその相同タンパクの関与を明らかにするために、マウス脂肪細胞のc-DNAライブラリーのスクリーニングを行った。得られたc-DNAは、その相同性よりマウスのSNAP-23であると考えられた。SNAP-25については、脂肪細胞に存在するとするものと、確認できないとするものとの両者の報告が存在するが、存在するとしてもその量がわずかであるという点では一致しており、t-SNAREとして主に機能しているのは、SNAP-23ではないかと考えられる。

コイルドコイル構造は、タンパクの相互作用にも重要な働きを有すると考えられている α ヘリカルドメインであるが、SNAP-25には3ヶ所存在しSyntaxin 1との結合に関与しているという報告がなされている。SNAP-23は2ヶ所のみで、このためSNAP-25の方が各Syntaxinとより強い相互作用を示すのかもしれない。

SNAP-23はSyntaxin 1 から 5 の中でSyntaxin 1 と 4 に最も強く結合したが、Syntaxin 1 は脂肪細胞で確認されておらず、脂肪細胞に存在するSyntaxinでは、Syntaxin 4 との関連性が示唆された。実際我々は、3T3-L1脂肪細胞においてSNAP-23とSyntaxin 4 が共沈することを確認している。

Munc18aはSyntaxin結合タンパクとして同定された*C.elegans* unc-18やYeast Sec 1 の相同タンパクであるが、Syntaxin 1 とSNAP-25との結合を阻害することが知られている。このタンパクには、a, b, c のサブタイプがあるが、脂肪細胞に存在するのはMunc18bとcで、Munc18bはSyntaxin 1, 2, 3 と結合し 4 と結合しないため、SNAP-23とSyntaxin 4 との結合に対するMunc18cの効果を検討した。その結果、COS細胞内では、Munc18cの量を増やすに従いSyntaxin 4 に結合するSNAP-23の減少が確認された。このことから、脂肪細胞においても同様に、SNAP-23-Syntaxin 4 SNAREコンプレックスの形成をMunc18cが制御している可能性が示唆された。

Syntaxin 4 やMunc18cについては、GLUT 4 小胞のトランスロケーションへの関与がいくつかの施設より報告されているが、SNAP-23も脂肪細胞内においてSNAP-25に比し多量に細胞膜分画に存在し、各種Syntaxinとの相互作用もあることから、GLUT 4 小胞の細胞膜へのトランスロケーションに関与している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

神経伝達物質やホルモンの開口放出の分子機構は、SNARE仮説として説明されており、NSF, SNAP, VAMP, Syntaxin, など様々なタンパク質の関与が報告されている。一方、筋肉や脂肪細胞におけるインスリン反応性の糖輸送の増加は、主にGLUT 4 の細胞内から細胞膜へのトランスロケーションによるが、GLUT 4 小胞にVAMP 2 が存在することから、GLUT 4 小胞の細胞膜への結合や融合にも同様の機構の存在が想定されている。

SNAREタンパクのうちSNAP-25は、主に細胞膜に存在し、t-SNAREとして小胞の結合や融合に関与していると考えられているが、神経細胞や内分泌細胞以外ではほとんど認められていない。1996年、その類似タンパクとしてSNAP-23がヒトリンパ球よりクローニングされ、これは広い組織分布を示した。

本研究では、マウス脂肪細胞のcDNAライブラリーより、ヒトSNAP-23と高い相同性を示すcDNAを単離し、その機能解析を行った。すなわち、ラットSNAP-25、及びヒトSNAP-23のcDNAをプローブとして、マウス脂肪細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングして得られたクローンは、210個のアミノ酸よりなり、アミノ酸レベルでヒトSNAP-23と99%の類似性を有していたためマウスにおけるSNAP-23と考えられた。

GSTとの融合タンパクを家兎に免疫し作成したポリクローナル抗体を用いて、3T3-L1脂肪細胞におけるSNAP-23の分布を調べたところ、このタンパクは主に細胞膜に存在することがわかった。yeast two-hybrid systemを用いた各種Syntaxinとの結合実験では、SNAP-25にはやや劣るものの、Syntaxin 1～4 のそれぞれと相互作用を有し、中でもSyntaxin 1、及びSyntaxin 4 と強い結合を認めた。しかしながら、Syntaxin 1 は脂肪細胞で確認されておらず、脂肪細胞に存在するSyntaxinでは、Syntaxin 4 との関連性が示唆された。実際、3T3-L1脂肪細胞においてSNAP-23はSyntaxin 4 と結合することが確認された。

Munc18cはSyntaxin 1 とSNAP-25との結合を阻害することが知られているが、このタンパクにはa, b, c のサブタイプがあり、脂肪細胞に存在するのはMunc18bとcである。Munc18bはSyntaxin1

1, 2, 3 と結合し 4 と結合しないため, SNAP-23 と Syntaxin 4 との結合に対する Munc18c の効果を検討したところ, COS 細胞内では, Munc18c の発現量を増やすに従い Syntaxin 4 に結合する SNAP-23 の量の減少が確認された。このことから, 脂肪細胞においても, SNAP-23-Syntaxin 4 SNARE コンプレックスの形成を Munc18c が制御している可能性が示唆された。

以上より, SNAP-23 も Syntaxin 4 や Munc18c とともに, GLUT 4 小胞の細胞膜へのトランスロケーションへ関与している可能性が考えられた。

本研究は, SNARE タンパクである SNAP-23 について, そのクローニングを行い構造と機能を研究したものであるが, 脂肪細胞におけるインスリン反応性糖輸送の最終段階の分子機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって, 本研究者は, 博士(医学)の学位を得る資格があると認める。