

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870335

研究課題名(和文) 脳の組織形成および膵内分泌における細胞内膜融合の分子機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanisms of intracellular membrane fusion on pancreatic endocrine and brain development

研究代表者

國井 政孝 (KUNII, MASATAKA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80614768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞内において膜蛋白質や分泌蛋白質を輸送する小胞と細胞膜との融合に働くSNARE分子であるSNAP23の個体における機能を解明することを目的とし、組織特異的遺伝子欠損マウス(KOマウス)の解析を行った。

神経特異的SNAP23 KOマウスでは大脳皮質や小脳の形成不全が観察され、SNAP23が胎生期の脳の組織形成に必須の分子であることが示唆された。一方、膵内分泌腺特異的SNAP23 KOマウスではグルコース刺激後の膵細胞からのインスリン分泌が増加することが明らかとなり、SNAP23がインスリン分泌に抑制的に働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the in vivo function of SNAP23, a soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) molecule, we generated central nervous system (CNS)- or pancreatic endocrine-specific SNAP23 knockout (KO) mice.

The CNS-specific KO mice showed severe hypoplasia of cerebral cortex and cerebellum. These results suggest that SNAP23 is essential for brain development.

In the pancreatic endocrine-specific KO mice, pancreatic islets were morphologically normal, but the KO mice showed increased fusion of insulin granules and improved glucose tolerance. These results suggest that SNAP23 has inhibitory role in secretion in the endocrine pancreas.

研究分野：細胞生物学

キーワード：SNARE蛋白質 SNAP23 開口放出 インスリン分泌 神経発生

1. 研究開始当初の背景

細胞内において新規に合成された膜蛋白質や分泌蛋白質は、脂質膜で包まれた小胞によって輸送されている。小胞輸送では、小胞が供与側の膜から出芽して、受容側の膜と融合することが必須である。この膜同士の融合に働く分子として soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) 分子が知られている。SNARE 分子は小胞側の v-SNARE と受容膜側の t-SNARE に分類され、これらが合計 4 本の α -helix をよじり合わせることで膜同士を近接させ、膜融合を促すと考えられている。哺乳類ではこれまでに 38 種の SNARE 分子が同定されているが、個々の SNARE 分子の機能に関しては未知の部分が多い。そこで、我々は t-SNARE 分子の一つである Synaptosomal-associated protein 23 (SNAP23) に着目した。SNAP23 は広範な組織に発現し主に細胞膜に局在する。そのため、SNAP23 は様々な組織における細胞膜への小胞融合に重要と考えられるが、その細胞、組織、個体における機能はよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

組織、個体における SNAP23 の機能を解明するため、組織特異的な遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) を作製し、その神経発生、上皮形成、内分泌における役割を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

SNAP23 は全身の様々な組織で発現しているため、全身での欠損マウスは胎生致死となった。そのため、Cre-loxP システムによる組織特異的なノックアウトマウスを作製した。本研究では Nestin-Cre マウスによる神経特異的なノックアウトマウスと Pdx1-Cre および Rip-Cre マウスによる膵内分泌腺特異的なノックアウトマウスを作製し、得られたマウスについて形態学的、細胞生物学的、生化学的解析を行った。更に、SNAP23 に結合し、その機能を阻害する低分子化合物の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 神経特異的な SNAP23 ノックアウトマウスの解析

神経特異的なノックアウトマウスは出生するものの、大脳、小脳の高度の低形成を示し、生後 3 週までに死亡するという結果を得た (図 1)。この結果から、SNAP23 は発生中の大脳皮質や小脳において神経前駆細胞や神経細胞の生存に重要な役割を持っていると考えられた。

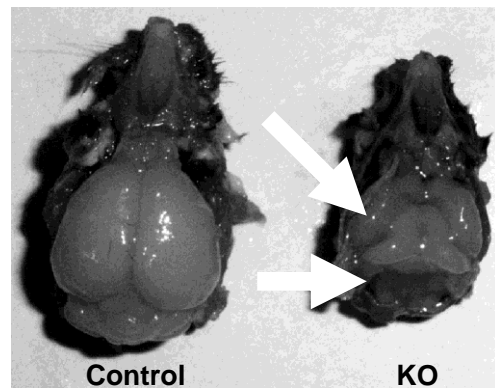


図 1: 神経特異的な KO マウスでは大脳皮質と小脳の形成不全を示す (矢印)

そこで、胎生期の脳皮質を更に詳しく解析したところ、SNAP23 ノックアウトマウスでは神経前駆細胞の形態異常が見られ、それに伴って新生ニューロンの遊走異常や細胞死が生じていた。この神経前駆細胞の形態異常は、細胞膜に局在する N-cadherin や ZO-1 といった分子が減少し、細胞間接着が失われていることが原因の一つであると考えられた (図 2)。これらの結果から、SNAP23 は発生中の神経前駆細胞における細胞間接着分子の細胞膜への局在化に関わっていることが示唆された。

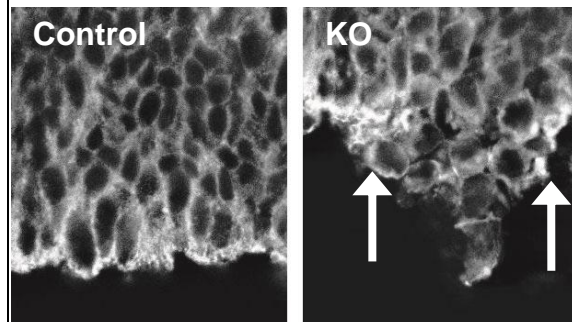


図 2: 神経前駆細胞の N-cadherin 染色。ノックアウトマウスでは矢印の間で染色が弱く、細胞間接着が失われている。

このことを確かめるため、初代培養神経前駆細胞を用いて SNAP23 のノックダウンを行い、細胞間接着に関する解析を行った。まず、細胞同士の接着能を aggregation アッセイで解析したところ、SNAP23 ノックダウン細胞では細胞塊の有意な減少が見られた。更に、細胞膜表面の膜蛋白質をビオチン化することで細胞膜に局在する N-cadherin の量を検討したところ、SNAP23 ノックダウン細胞でビオチン化 N-cadherin の有意な減少が認められた (図 3)。

以上の結果から、SNAP23 が神経前駆細胞において N-cadherin の細胞膜への局在化に働いていることが明らかとなった。現在は N-cadherin の細胞膜局在化に関わる他の SNARE 蛋白質を同定するため、SNAP23 抗体を用いた免疫沈降法によってパートナー分子

の探索を行っている。

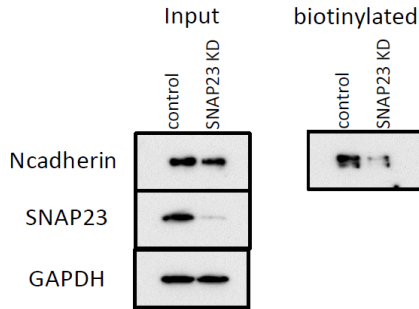


図 3 : SNAP23 をノックダウンした神経前駆細胞では細胞膜に局在する N-cadherin の量が減少する。

(2) 膵内分泌腺特異的 SNAP23 ノックアウトマウスの解析

膵内分泌腺特異的ノックアウトマウスは外見上、野生型と変わりなく、膵ランゲルハンス島の組織学的解析でも異常は認められなかった。そこで、糖代謝に関する解析を行ったところ、ノックアウトマウスでは空腹時の血糖値は正常であるにも関わらず、グルコース刺激後のインスリン分泌が亢進し、血糖上昇が抑制されることが判明した (図 4)。これは SNAP23 が膜融合に必須という過去の知見と矛盾する非常に驚くべき結果であった。

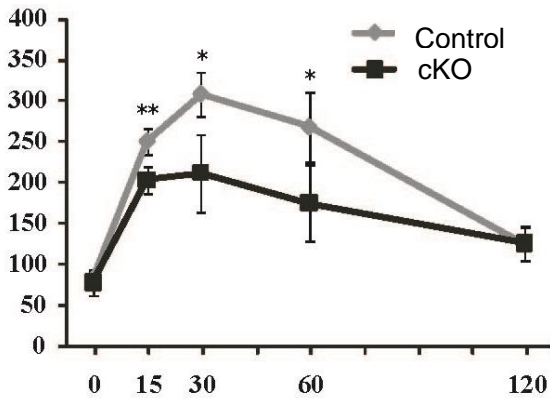


図 4 : グルコース投与後 (横軸 : 分) のマウスの血糖値 (縦軸 : mg/dl)

電子顕微鏡を用いた観察では、膵β細胞内のインスリン顆粒の数や大きさに異常は見られなかった。そこで、2光子励起顕微鏡や全反射顕微鏡を用いてインスリン顆粒の開口放出過程の観察を行った。その結果、ノックアウトマウスではインスリン顆粒の開口放出頻度が増加していることが明らかとなった (図 5)。

これらの結果から、膵内分泌において SNAP23 はインスリン顆粒の開口放出に抑制的に働いていることが示唆された。

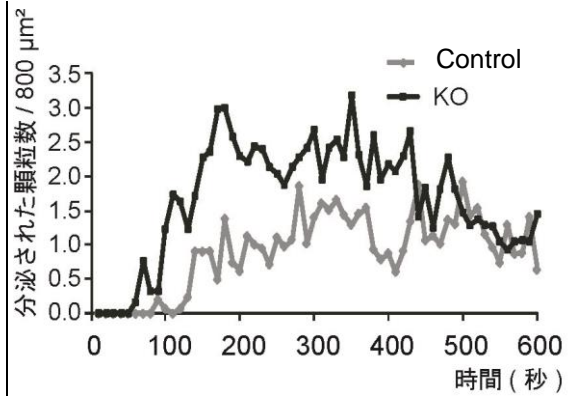


図 5 : 膵β細胞特異的 KO ではインスリン顆粒の細胞膜への融合頻度が亢進する

これまで、インスリン顆粒の開口放出に関わる SNARE 蛋白質として、syntaxin1A、VAMP2、SNAP25 が報告されていたため、この 3 分子による SNARE 複合体形成の量的変化を免疫沈降法によって解析したところ、SNAP23 ノックアウトマウスの膵ランゲルハンス島ではグルコース刺激後の syntaxin1A-VAMP2-SNAP25 複合体がコントロールに比べ増加していることがわかった (図 6)。

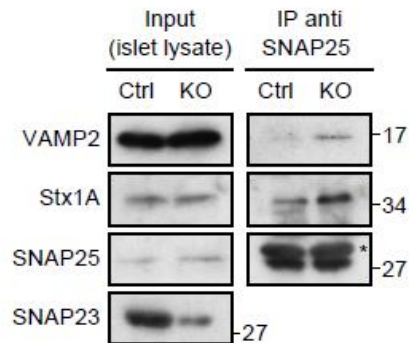


図 6 : SNAP23 ノックアウトマウスの膵ランゲルハンス島では SNAP25 と結合する syntaxin1A、VAMP2 が増加する。

SNAP23 も syntaxin1A、VAMP2 と複合体を形成するが、その結合は SNAP25 に比べて弱く、膜融合の効率が悪いことが知られている。そのため、膵β細胞においては SNAP23 が SNAP25 と競合し、syntaxin1A-VAMP2-SNAP25 複合体の形成を阻害することによってインスリン開口放出を抑制していると考えられる。

(3) SNAP23 阻害化合物の同定

膵内分泌腺特異的ノックアウトマウスの結果から、膵臓で SNAP23 の作用を抑制することによってインスリン分泌の亢進が可能であると考えられた。そのため、SNAP23 に特異的に結合する低分子量化合物の探索を理研ケミカルバイオロジー研究グループと共同で行い、数種の結合化合物を獲得した。膵

β 細胞株である MIN6 細胞やマウスから単離した膵ランゲルハンス島を用いてインスリン分泌に対する効果を解析したところ、これらの結合化合物の中の1つが、グルコース刺激後のインスリン分泌を増加させることが明らかとなった(図7)。更にこの化合物をマウス個体へ投与したところ、グルコース刺激後の血糖上昇がPBS投与個体に比べて抑えられ、血中のインスリン濃度は上昇していた。以上の結果から、この化合物が個体においてもインスリン分泌を促進する作用があることが示唆された。

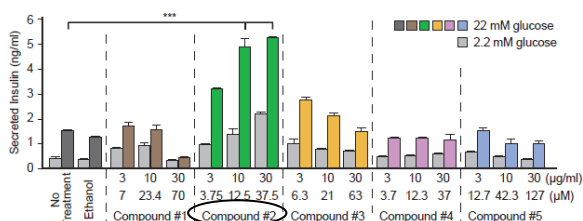


図7: SNAP23 結合化合物を添加した MIN6 細胞からのインスリン分泌量の解析

これらの結果から、SNAP23 阻害化合物が糖尿病の新規治療薬となる可能性が示唆されたが、化合物の特異性や安全性などを更に検討していくことが今後の課題であると考えられる。

以上のように、SNAP23 は組織ごとに異なる機能を持っており、組織形成や生理機能に非常に重要な役割を果たしている。また、SNAP23 阻害化合物がインスリン分泌を促進することから、新規薬剤の候補となる可能性も考えられる。今後は他の組織における SNAP23 の機能の解析を行うと同時に、阻害化合物の更なる解析を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Nakajo A, Yoshimura SI, Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto A, Sato T, Harada A. EHBPI1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* (2016) 212 (3), 297-306
DOI: 10.1083/jcb.201508086

(2) Avriyanti E, Atik N, Kunii M, Furumoto N, Iwano T, Yoshimura SI, Harada R, Harada A. Functional redundancy of protein kinase D1 and protein kinase D2 in neuronal polarity.

Neurosci. Res. (2015) 95, 12-20

DOI: 10.1016/j.neures.2015.01.007.

(3) Sobajima T, Yoshimura SI, Iwano T, Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiaki S, Morii E, Koyama Y, Miyoshi E, Harada A. Rab11a is required for apical protein localization in the intestine. *Biol. Open.* (2014) 4 (1), 86-94
DOI: 10.1242/bio.20148532.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 國井政孝
大脳皮質形成における SNARE 分子の機能の解析
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2016 年 3 月 29 日 ビッグパレットふくしま

(2) 國井政孝
膵外分泌・内分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解析
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、
第 92 回日本生理学会大会 合同大会
2015 年 3 月 21 日 神戸国際展示場

(3) 國井政孝
膵外分泌・内分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解明
第 66 回日本細胞生物学会大会
2014 年 6 月 13 日 奈良県新公会堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者
國井 政孝 (KUNII, Masataka)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80614768

(2) 連携研究者
原田 彰宏 (HARADA, Akihiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40251441