

Rat Brain cDNA Library로부터 SNAP-25 유전자의 클로닝

충남대학교 자연과학대학 생물학과, 충남대학교 약학대학 약학과[†], 계명대학교 생물학과*
조애리 · 지영미 · 유 민* · 이순철[†] · 유관희¹

국문초록: SNAP-25는 presynaptic plasma membrane에 위치하는 단백질로서 synaptic vesicle의 docking과 fusion에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 생쥐 SNAP-25²⁾ 유전자와 99%의 높은 homology를 갖고 있는 Z2 cDNA를 probe로 사용하여 쥐의 뇌 cDNA library에서 SNAP-25 유전자를 screening 하였다. 그 결과 6개의 양성 클론을 분리해 냈으며, 이들 각각을 S1, S2, S3, S4, S5, S6으로 명명하였다. 이 중에서 생쥐 SNAP-25와 가장 높은 homology를 보여주고 있는 S5 클론을 선택하여 염기서열을 분석하였다. 2,100 bp의 염기서열로 구성된 쥐 SNAP-25 cDNA는 206개의 아미노산을 coding 하는 618 bp의 open reading frame을 가지고 있으며, ORF는 209~211 bp에 위치하는 AUG codon에서 시작하여 827~829 bp에 위치하는 stop codon TAA에서 끝난다. 3' untranslated region에서는 28과 19개의 CA 반복 염기서열을 보여주고 있었으며, SNAP-25 peptide sequence에서 4개의 cystein residues는 84~91에 위치하고 있었으며, amino terminus 부분에서 amphipathic α -helix를 형성하고 있는 것을 볼 수 있었다. 사람과 쥐의 SNAP-25 유전자는 88%, 생쥐와 쥐의 경우는 97%의 homology를 보여주고 있었다. 그리고 사람과 쥐의 ORF에서 염기서열은 94%, 생쥐와 쥐의 ORF에서 염기서열은 100%의 homology를 보여주고 있었으며 사람, 생쥐, 그리고 쥐의 ORF에서 아미노산 서열은 100%의 homology를 보여주고 있었다.

서 론

신경세포 사이 또는 신경과 근육세포 사이에서 자극 전달과정은 대부분의 시냅스에서는 신경전달 물질을 이용해서 presynaptic neuron에서 postsynaptic neuron으로 신호를 전달한다. Presynaptic neuron의 synaptic vesicle 내에 신경전달물질이 포함되어 20 nm 정도의 격리된 synaptic cleft를 통해 postsynaptic neuron으로 이동된다. 이 과정에서 presynaptic neuron의 신경전달물질 방출은 synaptic vesicle의 exocytosis를 통해 이루어지며 이 과정에 관여하는 synaptic protein은 다음과 같이 4가지로 분류할 수 있다. 첫째, synaptic vesicle protein으로서 synaptotagmins, synaptobrevins, synaptophysins, 그리고

synapsins이 있으며 둘째, synaptic vesicle과 연관된 단백질로서 amphiphysin, dynamin, CaM kinases가 있고 셋째, synaptic plasma membrane protein으로서 syntaxins, neuexins, SNAP-25가 알려져 있으며, 그리고 네째 세포막과 관련된 단백질로서 complexins, NSF, 그리고 $\alpha/\beta/\gamma$ -SNAP이 존재한다¹⁾.

Synaptic vesicle은 exocytosis를 하기 전에 docking 후 부분적인 fusion reaction을 수행하는데 이때 세포막 단백질인 syntaxin과 SNAP-25, 그리고 synaptic vesicle 단백질인 synaptobrevin/VAMP은 core complex를 형성한다. 이 단백질 중 SNAP-25는 생쥐²⁾, 사람³⁾, 닭⁴⁾, gold fish⁵⁾, *Torpedo*, 그리고 초파리⁶⁾에서 이 유전자의 염기서열이 보존되어 있다는 사실이 보고된 바, 즉 초파리와 *Torpedo*의 SNAP-25는 생쥐 SNAP-25와 각각 61%와 81%의 homology를 보여주고 있으며⁶⁾, 사람과 생쥐의 SNAP-25는 80%의 homology를 보여주고 있다⁷⁾.

또한 SNAP-25는 exon 5에서 선택적인 splicing에 의해서 SNAP-25a와 SNAP-25b의 두 isoform이 존재함이 밝혀졌으며^{3),8)}, 이러한 현상은 포유동물³⁾, 닭⁸⁾, 그리고 zebrafish⁵⁾에서도 보고되었다.

* 논문 접수 : 2000년 2월 11일
수정재접수 : 2000년 3월 15일

¹ 별책 요청 저자: 유관희, 305-764, 대전광역시 유성구 궁동 220, 충남대학교 자연과학대학 생물학과
Tel: (042) 821-5498, Fax: (042) 822-9690
E-mail: khyou@cuvic.cnu.ac.kr

위에서 취급한 synaptic communication은 신경계에서 정보를 전달하는 기본이기 때문에 이의 조절은 neural circuit에서부터 행동의 조절, 그리고 학습과 기억 같은 뇌기능에 이르기까지 수많은 과정에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 또한 시냅스의 기능장애로, epilepsy와 Parkinson's disease, Alzheimer's disease 등의 질병이 초래될 수 있으며, 이중에서 Alzheimer's disease는 가장 일반적으로 발생하는 신경 퇴행성 질환으로 기억력 손실과 인지능력, 언어 구사능력, 판단력, 행동에 대한 장애를 유발시킨다. 최근의 연구 결과 대뇌 피질에서 synapse의 손실이 Alzheimer's disease에서 기억력 감퇴의 양상과 밀접한 관계가 있으며, 시냅스 말단의 손상이 Alzheimer's disease의 원인이 된다는 사실이 밝혀졌다⁹⁾.

본 연구는 생쥐, 사람, 닭, 초파리, 그리고 *Torpedo*에서 진화적으로 높은 보존을 보여주고 있는 SNAP-25 유전자의 염기서열이 쥐 뇌에서 아직 보고된 바 없고, 또한 현재 SNAP-25 유전자의 isoform에 대한 연구가 활발히 진행중이므로 쥐 뇌에서 SNAP-25 cDNA를 클로닝하여 완전한 SNAP-25의 염기서열을 규명하고 이를 이미 발표된 생쥐, 사람과의 염기서열과 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 벡터

Library screening과 형질전환을 위해 *E. coli* XL1-Blue 숙주균을 사용하였고, 염기서열 분석을 위한 유전자 클로닝 벡터로 pBluescript II KS(+)를 사용하였다.

2. Rat brain cDNA library의 조사

쥐 뇌에서 SNAP-25 유전자를 클로닝 하기 위해 먼저 본 실험실에서 보관중이던 (P450 유전자들을 random 하게 screen한 결과 분리된 novel 유전자) 생쥐 SNAP-25 유전자와 192 bp 중 191 bp와 99%의 높은 homology를 갖고 있는 Z2 cDNA를 방사성 동위원소 (³²P-dATP)를 이용한 random primed DNA labelling 방법으로 표지하였다. 이 표지된 probe를 이용하여 쥐의 뇌 cDNA library (Stratagene®, U.S.A)를 plaque hybridization 방법에 따라 1차, 2차, 3차 screening을 실시하여 최종 양성 클론을 확보하였다.

3. Southern blot analysis

λZAPII 벡터의 *EcoRI* 위치에 삽입되어진 cDNA

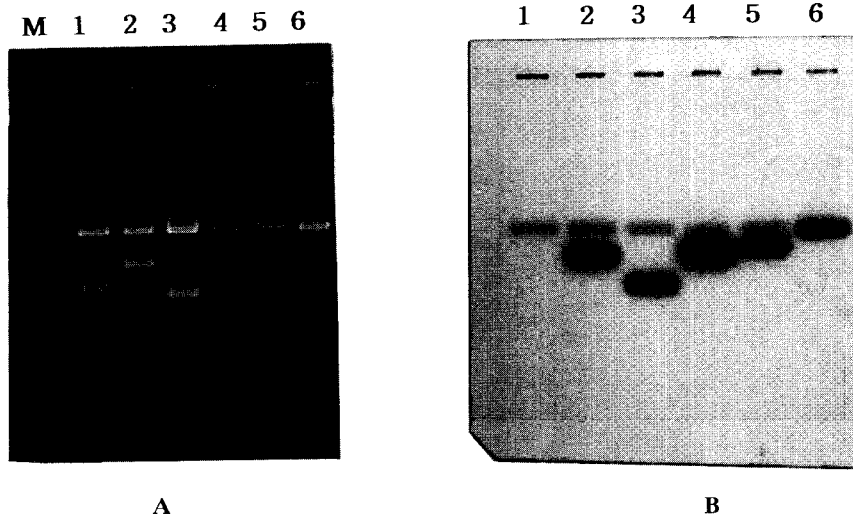


Fig. 1. (A) Restriction digestion of isolated cDNA clone of SNAP-25 cDNA. M: size marker (1 Kb DNA ladder), Lane 1: S1, Lane 2: S2, Lane 3: S3, Lane 4: S4, Lane 5: S5, Lane 6: S6. (B) Southern blot analysis. The DNAs were digested with *EcoRI* and *EcoRV/BamHI*. Lane 1: S1, Lane 2: S2, Lane 3: S3, Lane 4: S4, Lane 5: S5, Lane 6: S6.

를 분리하기 위해 *in vivo* excision 방법 (Stratagene®, U.S.A)에 따라 얻어진 plasmid DNA를 제한효소인 *EcoRI* 및 *EcoRV/BamHI*으로 자른 다음 1% agarose gel에 전기영동한 후 Southern blot analysis를 다음과 같이 실시하였다. 먼저 gel을 denaturation 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH)에 45분, neutralization 용액 (0.5 M Tris-Cl [pH 7.4], 3 M NaCl)에 45분간 처리하였으며, 15시간 동안 DNA를 nitrocellulose membrane에 옮긴 후, membrane을 5분간 6X SSC에 담가 세척하여 건조시켜 80℃에서 2시간 동안 baking 하였다. Hybridization을 실행한 후 membrane은 6시간 동안 X-ray film에 노출시켜 autoradiography를 시행하였다.

4. 염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 분석은 Sequenase version 2.0 (USB)를 이용한 Sanger dideoxy 방법에 따라 실시하였으며, 결정된 염기서열은 인터넷상의 BLAST Search program을 이용하여 분석 및 기준에 알려진 다른 염기서열과 비교하였다.

GeneBank accession number is AF 245227 for SNAP-25 gene of rat.

결 과

1. Rat brain cDNA library의 screening

Z2 cDNA를 probe를 사용하여 쥐 뇌의 cDNA li-

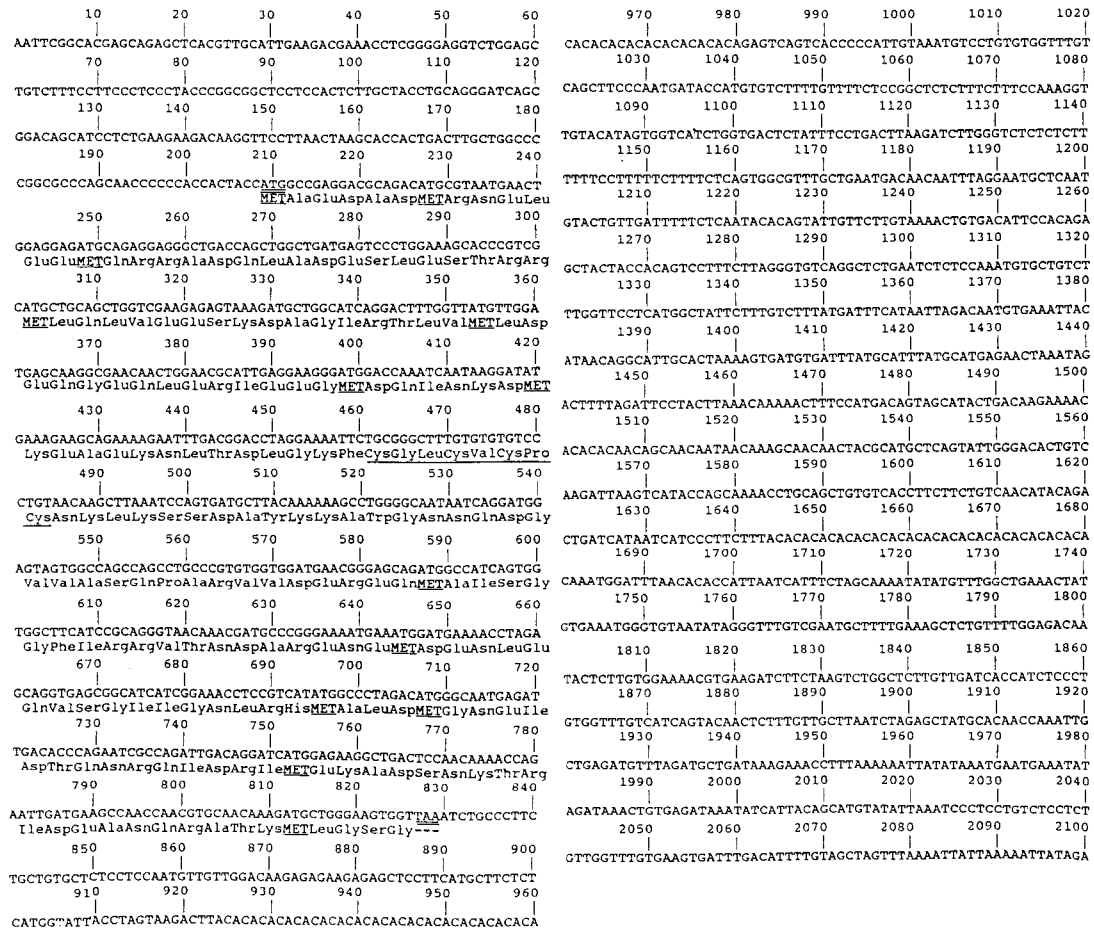


Fig. 2. Nucleotide sequence of the rat SNAP-25 gene. Derived amino acid sequences were indicated below the nucleotide sequence. The double-underlined letters show the start codons (AUG) and the termination codon (TAA). Underline shows the cysteine residues.

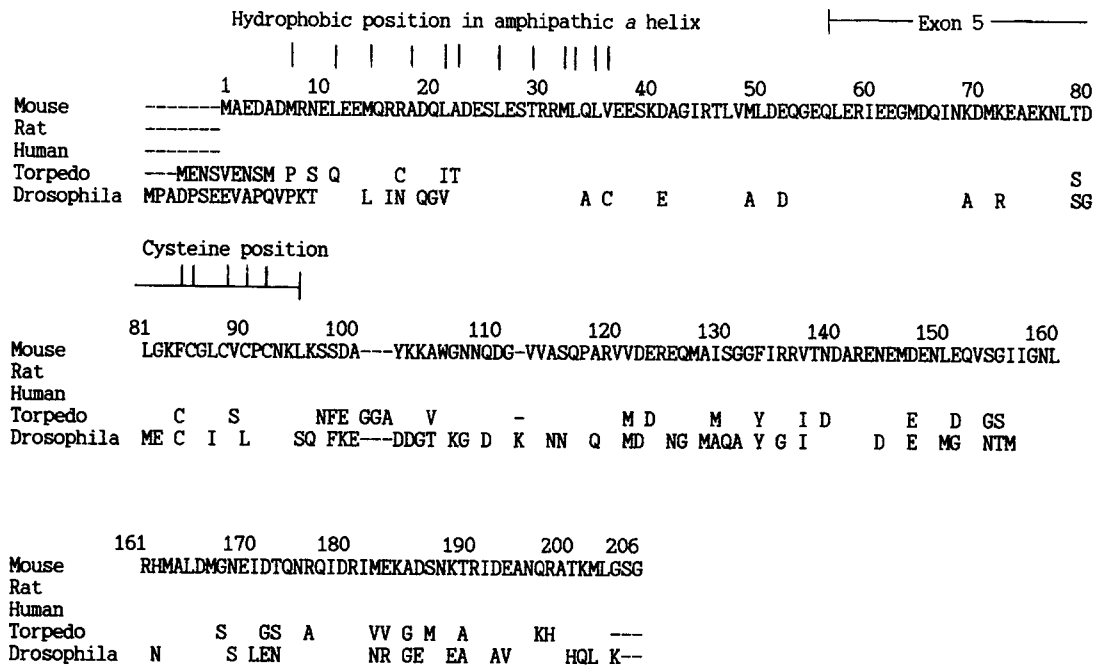


Fig. 3. Alignment of SNAP-25 protein sequences. Numbering refers to the mouse sequence (Oyer *et al.*, 1989). Dashes correspond to gaps introduced to optimize alignment. Vertical bars mark the hydrophobic positions of the amphipathic α helix and cysteine residues of the cysteine cluster (Risinger *et al.*, 1993).

brary (Stratagene[®], U.S.A)를 screening한 결과 최종적으로 6개의 양성 클론을 얻었으며, 각각 S1, S2, S3, S4, S5, S6이라 명명하였다.

2. Southern blot analysis

In vivo excision 방법에 의해 얻어진 pBluescript SK(+) DNA로부터 cDNA를 분리하여 확인하고자 제한효소인 *EcoRI* 및 *BamHI/EcoRV*로 자른 후 Southern blot analysis를 수행한 결과 S1에서는 signal이 보이지 않았고 S2에서는 2.0 kb와 0.9 kb 절편 중 2.0 kb에서 signal이 보였다. 그리고 S3은 1.4 kb, S4는 2.0 kb, S5는 2.1 kb, S6은 3.0 kb에서 각각 signal이 나타났다 (Fig. 1).

3. 염기서열 분석

각 클론들을 대상으로 양쪽 끝 부분에 대한 부분적인 염기서열을 분석한 결과 약 2.1 kb의 S5 클론이 생쥐 SNAP-25 전체 유전자를 포함하고 있음을 BLAST analysis 결과 확인할 수 있었으므로 이 S5 클론을 대상으로 전체 쥐 SNAP-25 유전자 염기서열을 결정하였다 (Fig. 2). 그 결과 전체 2,100 bp로 구성되어 있었으며 consensus initiation sequ-

ence인 CTACCATGG에 근접해 있는 (Kozak, 1984) 209~211 bp 위치의 첫번째 AUG codon을 시작으로 하여 827~829 bp에 위치하는 TAA stop codon에서 종료되는 open reading frame (ORF)은 618 bp 염기와 206개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 또한 5' untranslated region에서는 208개의 염기서열과 3' untranslated region에서는 1,275개의 염기서열로 구성되어 있었으며 특히 3' untranslated region에서는 925~980 bp와 1,645~1,682 bp의 위치에서 (CA)₂₈, (CA)₁₉의 반복 염기서열을 보여주고 있었다.

SNAP-25 peptide sequence에서 cysteine residues는 84~91에 위치하고 있었으며 (Cys-Gly-Leu-Cys-Val-Cys-Pro-Cys), amino terminus 부분에서 amphipathic helix를 형성하고 있는 것을 볼 수 있었다.

고 찰

뇌에서 특이하게 발현된다고 알려진 SNAP-25는²⁾ synaptic core complex를 형성하는 구성원으로, SNAP과 NSF에 대한 수용체로서 작용하며 생쥐, 사람, 닭, 초파리, 그리고 *Torpedo*에서 진화적으로

높은 보존을 보여주고 있다. 그러나 쥐에서는 아직 염기서열이 밝혀지지 않았으며, isoform에 대한 연구가 활발히 진행중이기 때문에 SNAP-25 유전자를 쥐의 뇌 cDNA library에서 검색하여 염기서열을 분석한 후 이미 밝혀진 생쥐, 사람, 닭, 초파리, 그리고 *Torpedo*의 염기서열과 비교하였다.

생쥐 SNAP-25 유전자와 192 bp 중 191 bp와 99%의 높은 homology를 갖고 있는 Z2 cDNA (P450 유전자들을 random 하게 screen한 결과 분리된 novel 유전자)를 probe로 사용하여 쥐의 뇌 cDNA library에서 SNAP-25를 screening한 결과 6개의 양성 클론을 분리하였고 이들 각각을 S1, S2, S3, S4, S5, S6으로 명명하였다 (Fig. 1). 각각의 염기서열을 부분적으로 분석한 결과 그 중에서 생쥐 SNAP-25와 가장 높은 homology를 보여주고 있는 S5 클론을 선택하여 염기서열을 분석하였다.

쥐의 뇌 cDNA library에서 클론한 S5의 염기서열을 분석한 결과, 쥐 SNAP-25 유전자는 2,100 bp의 염기로 구성되어 있었으며, 총 아미노산 수는 206개로 구성되어 있었다 (Fig. 2).

기존에 발표된 사람, 생쥐의 SNAP-25 cDNA와 비교하였을 때 사람과 쥐는 88%의 homology를 보여주고 있었으며, 생쥐와 쥐의 경우는 97%의 homology를 보여주고 있었다. 또한 사람과 쥐의 ORF에서 염기서열은 94%의 homology를 보여준 반면, 생쥐와 쥐의 ORF는 100%의 homology를 보여주고 있었다. 그리고 5' 부분에서 쥐의 SNAP-25가 생쥐 SNAP-25 cDNA 염기서열보다 45 bp 더 길었으며, 사람 SNAP-25도 5' 부분에서 생쥐 SNAP-25 cDNA 염기서열보다 40 bp 더 길었다⁷⁾. 반면 이 부분에서 쥐와 사람은 5 bp만 다르고 완전히 동일함을 보여줬다. 따라서 클론된 쥐의 SNAP-25 cDNA가 완전한 full-length의 염기서열임을 확인할 수 있었다. 또한 생쥐와 염기서열을 비교해 보았을 때 3' untranslated region에서 많은 차이를 보여주고 있었다. 생쥐에서는 1,258 bp로 구성된 3' untranslated region에서 CA의 반복 염기서열이 879~933 bp와 1578~1619 bp에서 (CA)₂₆, (CA)₁₉를 보여주고 있는데²⁾, 클론된 쥐 SNAP-25는 925~980 bp와 1645~1682 bp에서 (CA)₂₈, (CA)₁₉의 반복 염기서열을 나타내고 있었다. 이러한 pyrimidine/purine repeat의 sequence 길이는 같은 종이라 할지라도 strain 사이에서 polymorphic 하기 때문에 transcription regulatory sequence로는 생각되어지지 않는다¹⁰⁾.

초파리, *Torpedo*, 사람, 생쥐, 그리고 쥐의 SNAP-25 protein sequence를 비교, 분석한⁶⁾ 결과 (Fig. 3), 초파리 SNAP-25 단백질은 212개, *Torpedo* SNAP-25 단백질은 210개, 사람, 생쥐, 그리고 쥐의 SNAP-25 단백질은 206개의 아미노산으로 각각 구성되어 있다. 초파리와 생쥐, 쥐의 단백질은 61%, *Torpedo*와 생쥐, 쥐는 81%, 그리고 사람과 생쥐, 쥐는 100%의 homology를 각각 보여주고 있었다^{6,7)}. 또한 특이하게도 23~78 부분의 56개 아미노산은 매우 잘 보존되어 있어서 *Torpedo*, 생쥐, 쥐의 아미노산은 완전히 동일하며 초파리, 생쥐, 쥐의 아미노산은 86%의 homology를 보여주고 있다⁶⁾. SNAP-25 단백질은 hydrophobic stretch가 결여되어 있으나 세포막과의 association을 수월하게 하도록 amino terminus에서 amphipathic α -helix를 형성하는데, Fig. 3에서 보여지듯이 amphipathic α -helix에 해당하는 아미노산은 *Torpedo*, 초파리, 생쥐, 그리고 쥐에서 매우 많은 부분에서 차이를 보여주고 있다.

또한 모든 종들은 SNAP-25 단백질의 중앙 부분에 막과의 association에 관여하는 4~5개의 cystein residues를 함유하고 있었으며, 단지 차이점은 생쥐, 쥐에서의 Cys-90이 초파리에서는 없으나 대신 84번 위치에서 cysteine이 존재한다. 반면 *Torpedo*는 84와 90위치 모두에서 cysteine을 갖고 있다.

본 연구에서 쥐 SNAP-25 유전자를 클로닝하여 분석, 비교한 결과 여러 종에서 높은 conservation을 보여주고 있었으며, 따라서 SNAP-25 단백질이 신경계에서 매우 중요한 역할을 수행하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 교육부 1998년도 과학기술기초 중점 연구 지원 연구비 (BSRI 98-4431)에 의해 이루어 졌음.

참 고 문 헌

- 1) Bark IC (1993): Structure of the chicken gene for SNAP-25 reveals duplicated exons encoding distinct isoforms of the protein. *J Mol Biol*, **233**: 67-76.
- 2) Bark IC and Wilson MC (1994): Human cDNA clones encoding two different isoform of the nerve terminal protein SNAP-25. *Gene*, **139**: 291-292.

- 3) Catsicas S, Larhammar D, Blomqvist A, Sanna PP, Milner RJ and Wilson MC (1991): Expression of conserved cell-type-specific protein in the nerve terminals coincides with synaptogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 785-789.
- 4) Kozak M (1984): Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **12**: 857-872.
- 5) Masliah E (1995): Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histol Histopathol*, **10**(2): 509-519.
- 6) Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE and Wilson MC (1989): The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol*, **109**: 3039-3052.
- 7) Risinger C, Blomqvist AG, Lundell I, Lambertsson A, Nässel D, Pieribone VA, Brodin L and Larhammar D (1993): Evolutionary conservation of synaptosome-associated protein 25 kDa (SNAP-25) shown by *Drosophila* and *Torpedo* cDNA clones. *J Biol Chem*, **268**: 24408-24414.
- 8) Risinger C and Larhammar D (1993): Multiple loci for synapse protein SNAP-25 in the tetraploid goldfish. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 10598-10602.
- 9) Ryabinin AE, Sato TN, Morris PJ, Latchman DS and Wilson MC (1995): Immediate upstream promoter regions required for neurospecific expression of SNAP-25. *J Mol Neurosci*, **23**: 201-210.
- 10) Sudhof TC (1995): The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**: 645-653.
- 11) Zhao N, Hashida H, Takahashi N and Sakaki Y (1994): Cloning and sequence analysis of the human SNAP25 cDNA. *Gene*, **145**: 313-314.

=Abstract=

Cloning of SNAP-25 Gene from Rat Brain cDNA Library

A-Li Cho, Young-Mi Ji, Min Yoo*, Soon-Chul Lee[†] and Kwan-Hee You¹

*Department of Biology, [†]Department of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, *Department of Biology, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea*

SNAP-25 was first investigated as a neuron-specific protein preferentially expressed in CA3 pyramidal neurons of mouse hippocampus. It is a presynaptic plasma membrane protein in the nerve cell and plays an important role in the synaptic vesicle membrane docking and fusion pathway. We have recently isolated SNAP-25 cDNA from a rat brain cDNA library using a probe of Z2 cDNA. It consisted of 2,101 bp and an open reading frame (ORF) was identified between nucleotides (nt) 209 and 827. The AUG codon (nt 209~211) was surrounded by CTACCATGG, which corresponded to the consensus sequence of ribosomal binding site. The ORF was terminated by TAA (nt 827~829) to encode a polypeptide of 206 amino acid residues. The 3'-untranslated region contained two extensive stretches of repeated (CA)₂₈ and (CA)₁₉ at positions 925~980 and 1645~1682. It is noteworthy that cysteine residues were clustered in the span of amino acid residues 84~91: Cys-Gly-Leu-Cys-Val-Cys-Pro-Cys. Rat SNAP-25 showed 88% and 97% identity in nucleotide sequences to that of human and mouse, respectively. Amino acid sequence of rat SNAP-25 showed 100% identity to that of mouse and human SNAP-25.

Key Words: SNAP-25, Brain, Cloning, Sequencing, Presynaptic plasma membrane protein

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(1): 11-17, March, 2000]

¹ Corresponding author