

- 1 . 慢性疲労症候群等の病的疲労の研究
- 1 . 2 . 慢性疲労症候群に関わる代謝動態の研究
- 1 . 2 . 2 . アセチルカルニチントランスポーターの研究

北海道大学大学院医学研究科
情報薬理学講座細胞薬理学分野
三輪聡一、滝川 修、長井和彦、深尾充宏

(1) 要約

慢性疲労症候群の患者では、脳におけるアセチルカルニチン (AC) の代謝異常が認められるが、その分子病態は不明である。今回、ラット脳の cDNA ライブラリーから、AC 輸送活性を有すると報告のある有機性カチオン輸送体 (OCTN1 および OCTN2) に共通の部分塩基配列をプローブとするプライクハイブリダイゼーション法により、AC 輸送体およびその類似分子をコードする cDNA を単離した。その結果、OCTN1 および OCTN2 cDNA 以外に新しい 2 種類の cDNA (2b-1 および 11) が発見された。これらの cDNA は OCTN1 および OCTN2 と部分的な相同性を有しているものの、約 1/3 の小分子で、1 回膜貫通型蛋白をコードしていた。新しく見出された 2b-1 および 11 は、培養細胞株の発現系において、それ単独では AC 輸送活性を示さなかったが、OCTN2 の輸送活性を数倍増強した。OCTN1 の AC 輸送活性は検出限界以下であった。これらの事実は、OCTN2、2b-1 および 11 が脳における AC 輸送に深く関与していることを示唆している。

(2) 研究目的

慢性疲労症候群 (CFS) は、長期間続く原因不明の強い全身疲労・倦怠感を主たる症状とする症候群である。CFS 患者では、血清アセチルカルニチンレベルが低下しており、これらの患者に AC を投与すると症状の改善がみられ、また、PET による解析から、脳への AC の取り込みの低下が観察されている [1]。これらのデータは、CFS 患者の脳において、AC の代謝異常が生じていることを示している。本研究では、CFS の病態の解明および治療法の開発のための第一段階として、脳における AC トランスポーターの cDNA クローニングを試みた。

(3) 研究方法

1) ラット脳 cDNA ライブラリーの作製とスクリーニング

ラット脳より mRNA を精製し、これを ZAP Express Phage Vector (Stratagene 社) に EcoR1 と Not1 制限酵素サイトで組み込みこむことより cDNA ライブラリーを作製した。プローブにはアセチルカルニチン輸送(ACT)活性を有する有機性カチオン輸送体(OCTN1 および OCTN2)に共通の部分塩基配列 (OCTN2 の第 25 番から第 375 番に相当する 351bp) を用い、プラークハイブリダイゼーション法により、ラット脳の cDNA ライブラリー(2×10^6 pfu) をスクリーニングした。得られた陽性プラークとヘルパーファージを反応させ cDNA を組み込んだ pBK ファージミドベクターを切り出した。cDNA の塩基配列は、LI-COR 社製ゲル板シーケンサーと ABI 社製 PRISM310 キャピラリーシーケンサーを使用して決定した。

2) カルニチンおよびアセチルカルニチン輸送活性の測定

cDNA がコードする蛋白の輸送活性は、当該プラスミドを COS-7 や HEK293 などの培養細胞に遺伝子導入して一過性に発現させて測定した。具体的には、COS-7、CHO、L-cell の付着性細胞の場合、24well プレートに 1 ウェル当り、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ 個の細胞密度で 24 時間培養した後、 $0.3 \mu\text{g}$ のプラスミドを $8 \mu\text{l}$ の PolyFect (QIAGEN 社) と混合して添加し、さらに 36 時間培養した。細胞を 1ml の Na 含有輸送活性測定緩衝液(TB) [1] で洗浄した後、 0.2ml の TB を加えて、10 分間 37 度 C でプレインキュベーションした後、 20nM (最終濃度 10nM) の ^3H -カルニチンまたは $10 \mu\text{M}$ (最終濃度 $5 \mu\text{M}$) の ^{14}C -アセチルカルニチンを含む 0.2ml の TB を加えて取り込み反応を開始した。37 度 C で 1 時間反応後、氷冷した 1ml の TB で細胞を 2 回洗浄して反応を停止させ、 0.5ml の $0.2\text{NaOH}/1\%\text{SDS}$ で細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれた ^3H -カルニチンまたは ^{14}C -アセチルカルニチン量を液体シンチレーションカウンターで測定した。付着性の低い HEK293 細胞の場合、細胞をピペッティングにより回収し、氷冷した TB で 2 回洗浄した後、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ 個/ 0.2ml TB になるように調整した後、 20nM (最終濃度 10nM) の ^3H -カルニチンを含む 0.2ml の TB を加えて取り込み反応を開始した。10 分後、細胞を含む反応液を 0.5ml のシリコンオイルと流動パラフィ

ンの等量混合液上に重層し、10000g で 1 分間遠心して細胞を集め、COS-7 細胞と同様に 0.5ml の 0.2NaOH/1%SDS で可溶化し細胞内に取り込まれた ^3H -カルニチン量を測定した。

(4) 研究成果

a) cDNA クローニング

「方法」の第 1 項で述べたようにラットの OCTN1 と OCTN2 の両者に共通なプローブを用いて、ラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、全体で 15 個の陽性ブランクが得られた。インサートは 15 クローン全て、2kbp 以上の長さを有していた。

全クローンについて、塩基配列を決定したところ、9 クローンは OCTN2 と、4 クローンは OCTN1 と全く同一の配列を有していることが判明した。残りの 2 クローン、2b-1 および 11、は OCTN1 および OCTN2 と部分的に相同性を有する新しい cDNA であった。2b-1 と 11 は全長がそれぞれ 2.9kb と 7.2kb であり、146 個と 179 個のアミノ酸からなる新しい蛋白をコードしていた。両蛋白は N 末端から 131 番目のアミノ酸までは全く同一の配列を共有していたが、132 番目から C 末端まで、2b-1 が 15 個の、そして、11 が 38 個のアミノ酸からなるユニークな配列を有していた (図 1)。

OCTN1 と OCTN2 は保存された 12 個の疎水性領域を有し、12 回膜貫通型構造を成していると推定されている。2b-1 と 11 はこの OCTN1 と OCTN2 とに共通に保存された N 末端側に一番近い第 1 膜貫通領域(LIFFLLSASII)を有していることから、1 回膜貫通型の膜蛋白として細胞膜に存在していると予想された (図 2)。

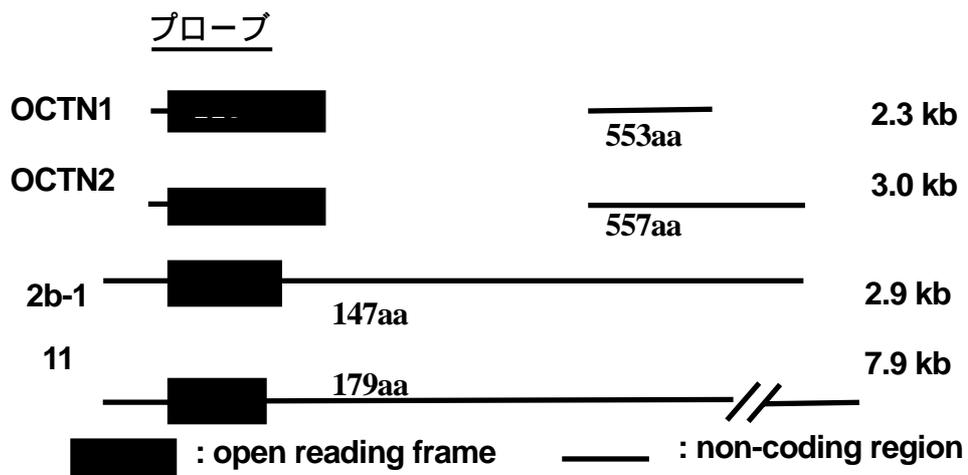


図1. OCTN1、OCTN2、2b-1 および 11cDNA の構造

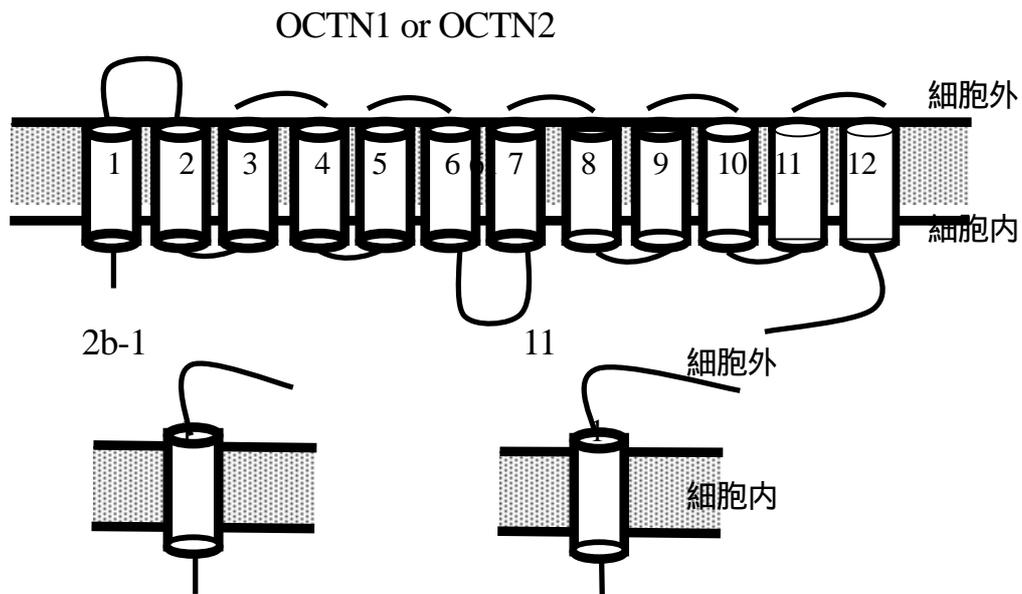
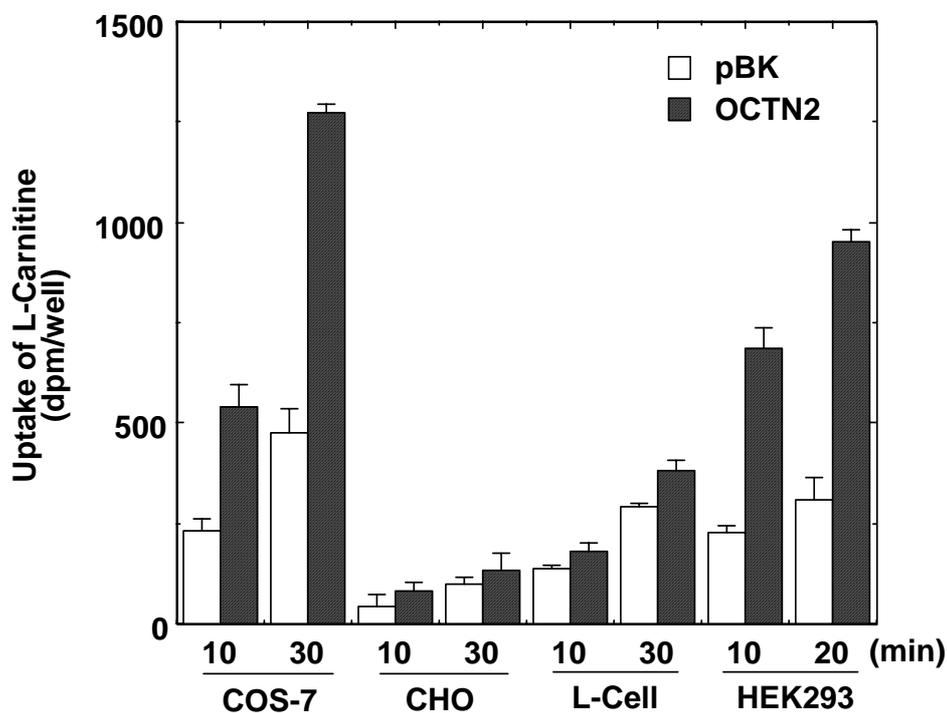


図2. OCTN1、OCTN2、2b-1 および 11 蛋白分子の推定構造

b) カルニチンおよびアセチルカルニチン輸送活性

新しく見出された OCTN 関連蛋白である 2b-1 と 11 のカルニチンあるいはアセチルカルニチン輸送活性を「方法」の第 2 項で詳述したように培養細胞に一過性に発現させて検討した。まず、輸送活性を測定するに最も適当な培養細胞株を選択するために、COS-7、CHO、L-Cell、HEK293 の 4 種類の細胞に OCTN2 を遺伝子導入してカルニチン輸送活性を検討したところ、COS-7 と HEK293 細胞に高い輸送活性が認められたのに対し、CHO 細胞や L-Cell では低い輸送活性しか得られなかった (図 3)。以上の結果より、COS-7 または HEK293 細胞をカルニチンあるいはアセチルカルニチン輸送活性の測定に使用した。

図 3. 一過性に発現させた OCTN2 によるカルニチンの輸送活性 (pBK は空のベクターのみを遺伝子導入した結果を示す)



c) 2b-1 および 11 による OCTN2 のアセチルカルニチン輸送活性増強

HEK293 細胞に 2b-1 および 11 を遺伝子導入してカルニチンおよびアセチルカルニチ

ン輸送活性の測定を行ったが、まったく有意の活性は検出されなかった(図4)。OCTN1も同様に不活性であった。HEK293をCOS-7細胞の代わり用いても全く同様の結果が得られた。しかし、OCTN2を2b-1あるいは11と同時に共発現させると、OCTN2のカルニチンの輸送活性は2-3倍に増強された(図5)。アセチルカルニチンの輸送についても同程度の増強が観察された。この増強はOCTN1では観察されず、2b-1と11に特異的であった。

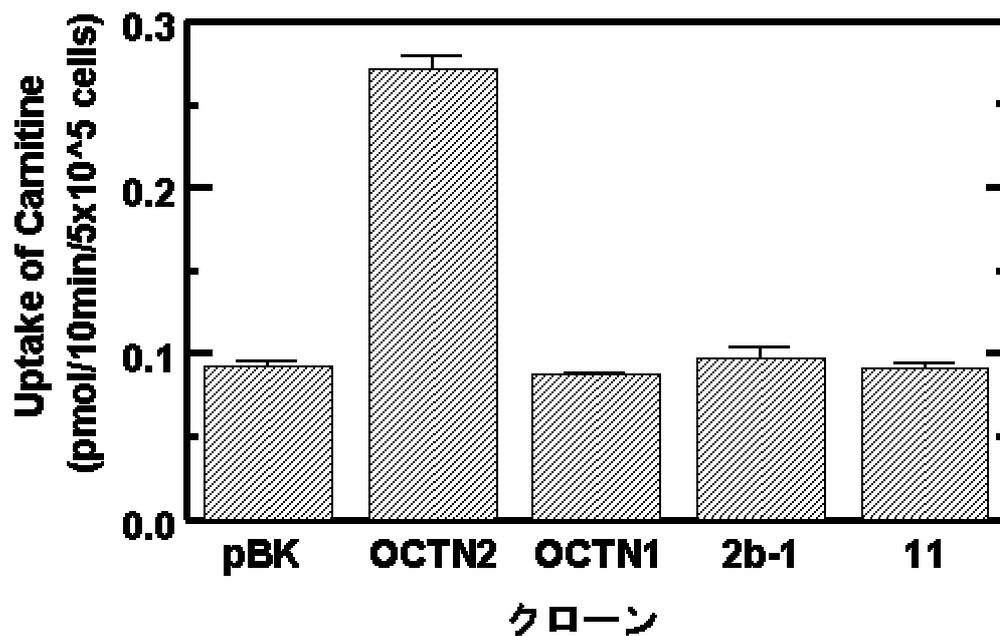


図4. OCTN1、OCTN2、2b-1および11クローンをHEK293細胞に遺伝子導入した場合のカルニチン輸送活性

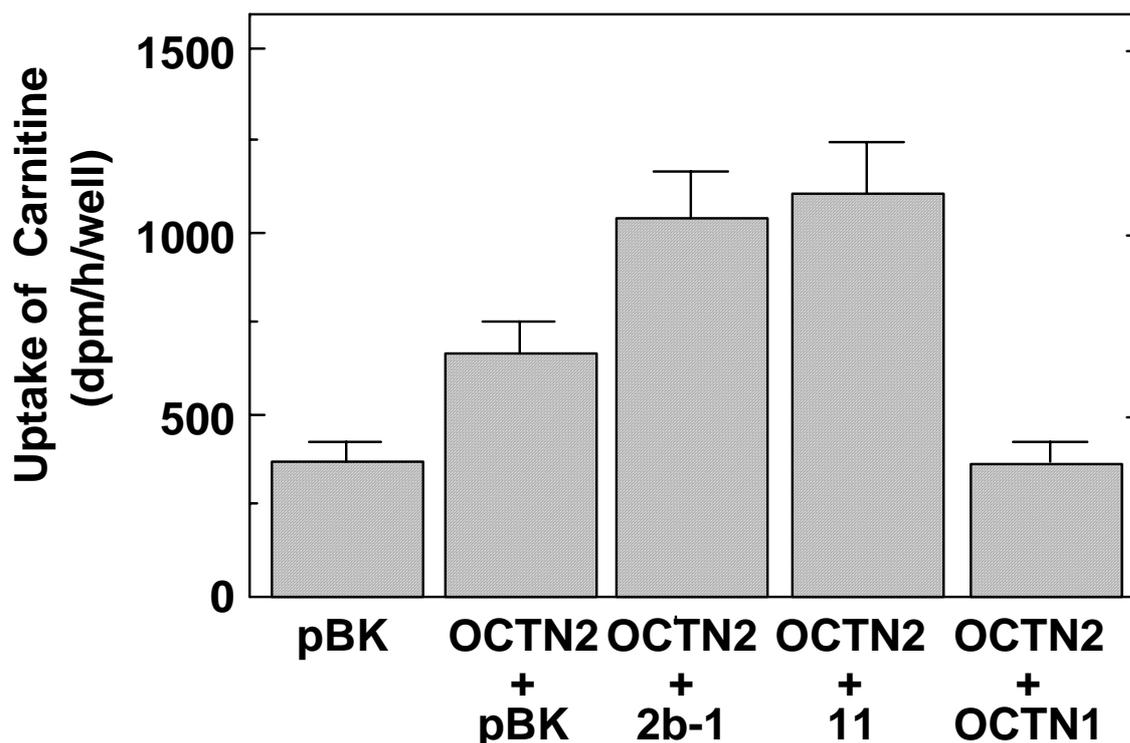


図5. COS-7細胞に発現させたOCTN2のカルニチン輸送活性に対する2b-1および11の効果(添加したプラスミド量は合計でwell当たり0.3 μ gとし、OCTN2は半量の0.15 μ gを加えた)

(5) 考察

上述したように、脳のcDNAライブラリーからOCTN1およびOCTN2がクローニングされたことから、脳にこれらの蛋白分子が発現していることは明らかである。しかし、OCTN1のアセチルカルニチン輸送活性は低くほとんど検出限界以下であった。したがって、脳において主としてアセチルカルニチン輸送を担っているのはOCTN2であると考えられる。また、OCTN2のアセチルカルニチン輸送活性は、今回新しく発見された2b-1あるいは11分子で調節されている可能性が高い。

今後の研究方向として、(1)OCTN2、2b-1および11の脳内分布の解明、(2)2b-1および11分子によるOCTN2活性化の分子機構の解明、(3)OCTN2、2b-1あるいは11の遺伝子操作による欠損あるいは過剰発現によるCFS病態または疲労抵抗性モデル動物の作製が試みられるべきであろう。一方、CFS患者におけるOCTN2、2b-1および11のSNP(単

一塩基多型)の存在と病態の関係を調べることも CFS 病態の理解に役立つと考えられる。これらの知見は、将来、アセチルカルニチンの取り込みを促進する薬剤の開発など慢性疲労の治療戦略を立てる上で重要である。

(6) 引用文献

- [1] 倉恒弘彦.:「慢性疲労症候群の病因と治療」,111-118 頁,疲労の科学(井上正康,倉恒弘彦,渡辺恭良編),講談社サイエンティフィク,(2001)
- [2] Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A.:「Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity carnitine transporter OCTN2」, J. Biol. Chem., 273, 20378-20382, (1998)

(7) 成果の発表

1) 原著論文による発表

ア) Kawanabe Y., Hashimoto N., Masaki T., and Miwa S.: 「Ca(2+) influx through nonselective cation channels plays an essential role in noradrenaline-induced arachidonic acid release in chinese hamster ovary cells expressing alpha(1A)-, alpha(1B)-, or alpha(1D)-adrenergic receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 299, 901-907 (2001)

イ) Frutani H., Zhang XF., Iwamuro Y, Lee K., Okamoto Y., Takikawa O., Fukao M., Masaki T., and Miwa S.: 「Comparison of Ca²⁺ entry involved in contractions of rat aorta induced by endothelin-1, noradrenaline and vasopression」 J. Cardiovasc. Pharmacol. in press (2002)

ウ) Kawanabe Y., Okamoto Y., Hashimoto N., Masaki T., and Miwa S.: Molecular mechanism for endothelin-1-induced stress fiber formation: Analysis of G proteins using mutants of endothelin type A receptor. Mol. Pharmacol. in press (2002)

4) 特許等出願等

ア) 特許出願手続中

名称:「アセチルカルニチントランスポーター活性化因子」

発明者:北海道大学大学院医学研究科

情報薬理学講座細胞薬理学分野	教授	三輪 聡 一
中央研究部	助教授	滝川 修
情報薬理学講座細胞薬理学分野	大学院生	長井 和彦