

## 【13】

氏 名	花 田 健 治
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第673号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (薬理学)
学位論文題目	Identification of carnitine transporter CT1 binding protein Lin-7 in nervous system. (神経系におけるカルニチントランスポーターCT1結合タンパク質 Lin-7の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 杉 本 博 之 (副査) 教授 瀬 尾 芳 輝 教授 堀 雄 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

L-カルニチンは極性を持つ水溶性の物質で、両性イオンである。筋肉組織においてミトコンドリアの脂肪酸 $\beta$ 酸化の必須物質として、また脳内におけるアセチルコリン合成のためのアセチル基供与体として重要である。カルニチントランスポーターCT1（別名OCTN2）は、 $\text{Na}^+$ 依存的に高親和性にL-カルニチンを輸送するトランスポーターであり、SLC22ファミリーに分類される。腎臓、精巣、肝臓に加え、骨格筋や脳に発現し、同部位でのL-カルニチンの経細胞膜輸送に関与しており、ヒトOCTN2（SLC22A5）の変異により全身性カルニチン欠乏症（Systemic carnitine deficiency：SCD）を発症することが知られている。

#### 【目 的】

腎臓および消化管の上皮では、CT1はPDZ（PSD95/DLG/ZO-1）タンパク質の一つPDZK1と結合することが既に報告されており、PDZK1が同部位でのカルニチン輸送を制御する可能性が指摘されている。それに対し脳内での同様のCT1結合タンパク質の存在は明らかではない。そこで脳内でのL-カルニチンの細胞膜輸送を調節する機構を明らかにするため、機能制御に関与するCT1細胞内結合タンパク質同定を試みた。

#### 【対象と方法】

本研究のうち、動物を用いる実験は防衛医科大学、石川県立看護大学実験動物委員会の承認を得

て、指針に従って行われた。PDZモチーフを持つCT1のC末端アミノ酸配列をベイトとし、ラット大脳cDNAライブラリーに対し酵母Two-hybrid screeningを行った。PDZモチーフを構成する3アミノ酸の欠損および置換変異体の作成には部位指定突然変異導入法を用いた。CT1発現HEK293細胞へのRI標識L-カルニチン取込み量を指標に輸送活性を調べた。神経系におけるCT1およびその結合タンパク質の組織局在の観察のため、8週齢の雄性Wistarラットを麻酔後氷冷リン酸緩衝液で還流を行い、脳と脊髄を単離した。単離標本はドライアイスで凍結後マイクロトームを用いて切片作成を行った。

群間差の検定は対応のないt-testを用い、危険率5%以下を有意差ありとした。

## 【結 果】

$2.7 \times 10^7$ 個の酵母クローンのスクリーニングにより32個のポジティブクローンを得、その中からPDZタンパク質Lin-7を同定した。CT1とLin-7の結合は、CT1のC末端にあるPDZモチーフを介する事、およびLin-7のPDZドメインを介する事が、CT1遺伝子変異体を用いた酵母Two-hybrid法により確認された。Lin-7のCT1発現細胞への遺伝子共導入は、L-カルニチン輸送活性を1.2倍に増加させた。CT1とLin-7、そしてLin-7の結合タンパク質であるLin-2の共発現は腰髄腹側角の運動ニューロンに認められた。

## 【考 察】

カルニチントランスポーターCT1は個体のカルニチン血中レベルを制御すると考えられている。その機能調節機序として、腎尿細管や消化管と言った上皮細胞ではPDZタンパク質PDZK1が結合し、その機能制御を行う事が知られていたが、今回の検討により、神経系においてはPDZK1とは異なるPDZタンパク質Lin-7がCT1結合タンパク質として同定された事により、トランスポーターに結合する細胞内タンパク質は組織ごとに異なる可能性を見出した。

Lin-7はPDZタンパク質Lin-2と結合する事でマルチバレントPDZタンパク質複合体を作る事が知られており、自らはレセプターチロシinkinase LET 23や酸感受性イオンチャネルASIC3、内向き整流性K<sup>+</sup>チャネルKir2.3、コレステロールトランスポーターABCA1と結合し、Lin-2と結合する別なPDZモチーフを持つ膜タンパク質を近傍に置く事で機能制御に関与する事が推測された。

統計学的有意差はなかったものの、CT1発現細胞へのLin-7遺伝子共導入は、L-カルニチン輸送活性を1.2倍に増加させたことは、CT1と同じSLC22ファミリーに属するURAT1, OAT4と言った有機イオントランスポーターがPDZK1により細胞膜上での安定化による発現増加を介してそれらの輸送活性を増加させたことと同じ機序が神経系においては異なるPDZタンパク質を介して行われている可能性を示唆した。

特に腰髄腹側角の運動ニューロンでは、CT1とLin-7、そしてLin-7の結合タンパク質であるLin-2の共発現が認められたことは、酵母ツーハイブリッド法による実験の際にしばしば認められる非特異的なものではなく、生理的に重要なタンパク質間相互作用であることを示していると考えられる。

## 【結 論】

ラットカルニチントランスポーターCT1の結合タンパク質Lin-7は、タンパク質間相互作用を介し

てCT1によるL-カルニチン輸送を調節する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 【論文概要】

L-カルニチンは両性イオンであり、筋ミトコンドリアの脂肪酸 $\beta$ 酸化の必須物質として、また脳内におけるアセチルコリン合成に重要である。カルニチントランスポーターCT1（別名OCTN2）は、 $\text{Na}^+$ 依存的に高親和性にL-カルニチンを輸送するトランスポーターであり、腎臓、精巣、肝臓、骨格筋や脳に発現し、L-カルニチンの経細胞膜輸送に関与している。

腎臓および消化管の上皮では、CT1はPDZ（PSD95/DLG/ZO-1）タンパク質の一つPDZK1と結合し、同部位でのカルニチン輸送を制御する可能性が指摘されているのに対し、脳内での同様のCT1結合タンパク質の存在は明らかではない。そこで脳内でのCT1によるL-カルニチン輸送調節する機構の解明を目指し、CT1細胞内結合タンパク質同定を試みた。

PDZモチーフを持つCT1のC末端アミノ酸配列をベイトとし、ラット大脳cDNAライブラリーに対し酵母two-hybrid法を行った。その結果、 $2.7 \times 10^7$ 個の酵母クローンのスクリーニングにより32個の陽性クローンを得、その中からPDZタンパク質Lin-7を同定した。CT1とLin-7の結合は、CT1のC末端にあるPDZモチーフを介する事、およびLin-7のPDZドメインを介する事が、CT1遺伝子変異体を用いた酵母two-hybrid法により確認された。

Lin-7のCT1発現細胞への遺伝子共導入により、L-カルニチン輸送活性は増加傾向を（1.2倍）を示した。CT1とLin-7、そしてLin-7の結合タンパク質であるLin-2の共発現は腰髄腹側角の運動ニューロンに認められた。

### 【研究方法の妥当性】

本研究のうち、動物を用いる組織実験は防衛医科大学、石川県立看護大学実験動物委員会の承認を得て、指針に従って行われた。申請論文では、所属施設・研究グループの先行研究で確立されたプロテオミクス実験法の一つである酵母two-hybrid法を基本手技として用いている他、PDZモチーフを構成する3アミノ酸の欠損および置換変異体の作成を用いた部位指定突然変異導入法、CT1発現HEK293細胞へのRI標識L-カルニチン取込み量を指標にした輸送活性測定法、そして8週齢の雄性ラットの緩衝液灌流後の脳と脊髄単離標本作成など、適切な解析方法を用いており、本研究方法は妥当なものである。

### 【研究結果の新奇性・独創性】

腎臓および消化管の上皮では、カルニチントランスポーターCT1はPDZ（PSD95/DLG/ZO-1）タンパク質の一つであるPDZK1と結合することが既に報告されているが、脳でのCT1結合タンパク質の存在は明らかではなかったところ、異なるPDZタンパク質のLin-7の同定に成功した点で、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

### 【結論の妥当性】

申請論文では、ラット大脳cDNAライブラリーに対するスクリーニングの結果検出された新たなPDZ

タンパク質Lin-7とCT1の結合を、そのタンパク質間相互作用に寄与するPDZモチーフ及び細胞内ドメインの変異体及び短縮体を用いてPDZ相互作用であることを証明した他、輸送活性の変化と言う機能面からと腰髄腹側角の運動ニューロンという神経系における共発現という組織面からの解析を加え、PDZタンパク質Lin-7とトランスポーターCT1結合の生理的重要性を実証している。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、薬理学、生理学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### 【当該分野における位置付け】

申請論文では、神経系に発現するトランスポーターCT1の新たな細胞内結合タンパク質としてLin-7を同定した。Lin-7は他のPDZタンパク質Lin-2と結合する事でマルチバレントPDZタンパク質複合体を作る事が知られており、別に酸感受性イオンチャネルASIC3、内向き整流性K<sup>+</sup>チャネルKir2.3、コレステロールトランスポーターABCA1と結合し、Lin-2と結合する別なPDZモチーフを持つ膜タンパク質を近傍に置く事で機能制御に関与する事が推測されている。このCT1とLin-7の結合は今後PDZ相互作用を介するタンパク質のネットワーク解明を始めとした細胞生物学研究の進歩にも大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

#### 【申請者の研究能力】

申請者は、薬理学や生化学・分子生物学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は医学領域の学会誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

#### 【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Dokkyo Journal of Medical Sciences

43 : 31-38, 2016