

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293035

研究課題名(和文) クレアチン欠乏症治療を目指した変異クレアチントランスポーターの細胞局在機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of cellular localization of mutated creatine transporter toward therapy for creatine deficiency syndromes

研究代表者

大槻 純男(Ohtsuki, Sumio)

熊本大学・その他の研究科・教授

研究者番号：60323036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、疾患原因となる変異型ヒトクレアチントランスポーター(hCRT)の細胞内局在異常の分子機構を解明することを目的とした。本邦で見いだされたhCRT変異であるG561RはhCRTの細胞膜から細胞内膜へ細胞内の局在を変化させることを明らかにした。さらに、hCRT(G561R)は付加糖鎖が変化していることを明らかにした。本研究の結果から、hCRT変異(G561R)はhCRTの糖鎖付加の変化を伴う細胞内局在の変化を起こさせることでクレアチン輸送能の低下を引き起こしていることが示唆された。細胞内局在を正常化する化合物が先天性クレアチン欠乏症の治療薬候補化合物となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present research project was to clarify molecular mechanisms of abnormal intracellular localization of mutated human creatine transporter (CRT) for developing new therapeutic method for creatine deficiency syndromes. We analyzed G561R mutant of CRT, which we have been identified in Japanese patients. The mutation of G561R have been revealed to induce translocation of CRT from plasma membrane to intracellular membrane of the cultured cells. We have also identified that hCRT(G561R) had abnormal glycosylation. These results suggest that the functional impairment of hCRT(G561R) was caused by incomplete glycosylation due to misfolding during protein maturation, leading to changes of cellular localization.

研究分野：分子生物薬剤学

キーワード：クレアチン トランスポーター 輸送 クレアチン欠乏症 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

クレアチンは、ATP からリン酸を受け取りクレアチンリン酸となりエネルギーを貯蓄する。そして、急激なエネルギー消費が起こる際にリン酸を ADP に戻すことによって ATP を産生する。このようにクレアチンは高いエネルギー消費を行う組織（筋肉、脳）において生体エネルギーのバッテリーの役割を果たしている。クレアチンは肉類の摂取による供給に加えて生体内で 2 種類の酵素 (AGAT, GAMT) によってアルギニンとリジンから合成される。また、細胞膜上に発現するクレアチントランスポーター (CRT) によって細胞に供給される。これらいずれかの遺伝子の変異によって生体内のクレアチン量が低下する先天性クレアチン欠乏症が生じる。先天性クレアチン欠乏症の主な症状は重度知的障害へと発展する小児精神遅滞、てんかん等の中枢症状である。研究代表者である大槻は、2002 年に血液脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞に CRT が発現し、血中のクレアチンを脳内に供給していること、そして、脳内のクレアチンの大部分は血中から脳関門の CRT を介して供給されることを世界に先駆けて報告した (図 1) (1)。この報告が先天性クレアチン欠乏症の中枢病態を説明し、治療戦略のための分子レベルの基盤知見となっている。

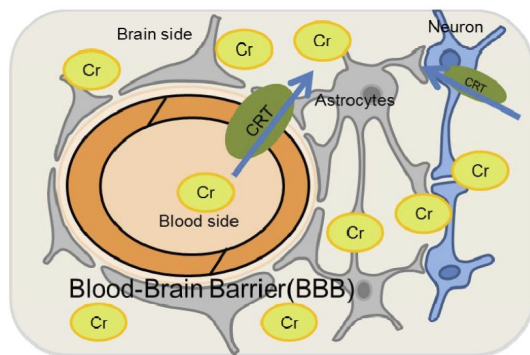


図1 脳関門 CRT による中枢クレアチン供給機構

上記の報告当時は全世界で CRT 変異による先天性クレアチン欠乏症患者は数家系のみ報告されていた。しかし、診断法の向上によって最近 5 年の間に急激に確認患者数が増加している。X 染色体に存在する CRT の変異による先天性クレアチン欠乏症は、X 染色体性精神遅滞において Fragile X に次ぐ多い患者が存在すると予想されている (アメリカで約 4 万人と予想(2))。国内においても研究分担者である和田博士らが初めて CRT 変異患者を 2 家系みだした(3, 4)。我が国でも潜在的患者も多数存在すると考えられており、小児精神疾患として重大性が急激に増している。

CRT 変異による先天性クレアチン欠乏症の最大の問題点は、治療法が存在しないこと

である。クレアチン合成酵素の変異による先天性クレアチン欠乏症はクレアチンの摂取によって脳内クレアチンレベルの上昇と精神遅滞の緩和が認められている。しかし、CRT の変異は脳内へのクレアチンの供給経路が機能低下、欠損してしまうため、クレアチンの摂取によって血中クレアチン濃度が上昇しても脳内レベルは上昇せず治療効果がない。現在、脳関門透過性のクレアチン代替化合物の開発が行われている。しかし、機能代替の評価として精神遅滞の緩和を指標としなければいけないため治療の実現には困難と長期間を要する。そこで、我々は「脳関門の CRT の活性を回復させる」という異なる治療へのアプローチを着想した。本邦で見いだした変異は CRT のクレアチン認識部位から立体構造的に離れていること (図 2)、さらにこれまでの変異型 CRT 発現報告の詳細な検討によって「変異 CRT の細胞内局在異常によって細胞膜上の CRT 量が低下すること」「細胞膜上の CRT 量の上昇によってクレアチン輸送活性が回復する」仮説を構築した。

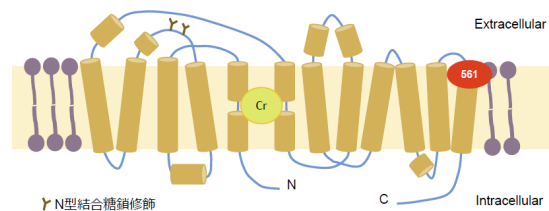


図2 CRT の高次構造と G561R 変異部位

2. 研究の目的

本研究は、先天性クレアチン欠乏症の治療を目指し、疾患原因となる変異型クレアチントランスポーター (CRT) の細胞内局在異常の分子機構を解明し、その分子機構の知見を基盤としてクレアチン輸送活性を回復する化合物のスクリーニング系を構築することを目的とする。CRT は脳関門に発現し血中から脳へクレアチンを供給している。その変異によって脳内のクレアチンが欠乏し、精神遅滞やてんかんの中枢症状を呈するクレアチン欠乏症を生じる。CRT 変異によるクレアチン欠乏症は、潜在的小児患者数が多いと考えられているが、その治療法、治療薬は未だ開発されていない。本研究は、独自の分子機構に基づき、従来のクレアチン欠乏症治療法開発とは異なる CRT 細胞内局在制御という視点から基礎研究を新たな治療薬開発へ発展させる社会的にも重要な課題である。

3. 研究の方法

1. 皮膚由来繊維芽細胞

患者及び健常人皮膚から樹立した繊維芽細胞を用いて解析を行った。なお、本解析は熊本大学大学院生命科学研究部の倫理委員会承認のもと実施している。

2. 変異ヒト CRT(G561R)発現細胞

N 末端に Flag-tag をつけた hCRT(G561R)発現 HEK293 細胞及び野生型ヒト CRT(hCRT)発現 HEK293 細胞を構築した。細胞内局在は免疫染色及び細胞分画した試料を western blot を行うことによって解析した。

4. 研究成果

1. 皮膚由来繊維芽細胞におけるヒト CRT (hCRT)遺伝子発現

患者及び健康人皮膚由来繊維芽細胞を用いて hCRT の mRNA の発現量を比較した。その結果、変異ヒト CRT(hCRT(G561R))を有する患者皮膚由来繊維芽細胞における hCRT mRNA 発現量は、野生型 hCRT を有する皮膚由来繊維芽細胞の hCRT mRNA 発現量と有意な差はなかった。患者由来繊維芽細胞のクレアチン取り込み活性は健康人由来繊維芽細胞と比較して大きく低下している事を共同研究先の東北大学・立川画家世羅が彰にしている。したがって、本結果は、G561R 変異はクレアチン時込み活性は低下させるが、mRNA 発現量に大きな変化は及ぼさないことを示唆している。

2. 変異ヒト CRT(G561R)の細胞内局在

変異ヒト CRT(hCRT(G561R))の細胞内局在及びクレアチン輸送活性を検討するために、N 末端に Flag-tag をつけた hCRT(G561R)発現 HEK293 細胞及び野生型ヒト CRT(hCRT)発現 HEK293 細胞を構築した。免疫染色によって細胞内局在を観察した結果、野生型 hCRT は HEK293 細胞の細胞膜に局在していた。一方、hCRT(G561R)は、細胞内部に顆粒状の傾向が認められた。また、一部蛍光は細胞膜上にも認められた。

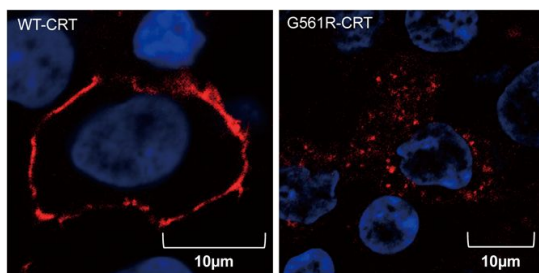


図3 変異型 hCRT(G561R) (赤)の細胞内局在変化 (Uemra et al. Biol Pharm Bull. 40:49-55 (2017)から引用)

3. 安定発現細胞の細胞分画を用いた細胞内局在の検証

前項で確認された局在の変化をより定量的に解析するために安定発現株を細胞質画分、粗膜画分、細胞膜画分に分画し、それぞれの分画における hCRT の存在量を Western blot 法によって解析した。野生型 hCRT は細胞膜(PM)画分において 70 kDa 付近に検出された。変異型 hCRT(G561R)は粗膜(CM)画分において 60kDa に強いシグナルを与えた。また、

120 kDa, 180 kDa にも強いシグナルが検出された。さらに、粗膜画分よりはシグナルが弱い膜画分においてもシグナルが検出された。以上の結果から、変異型 hCRT(G561R)は粗膜画分に多く存在するように局在が変化するとともに、Western blot 上の分子量も 70kDa から 60kDa に変化することも明らかとなった。

4. 変異による hCRT 付加糖鎖の変化

Western blot における変異型 hCRT(G561R)の分子量の変化は糖鎖の変化であると予想し、脱糖鎖処理を行った。N 型結合糖鎖の脱糖鎖処理によって、野生型 hCRT 及び変異型 hCRT(G561R)はともに 50kDa の同一分子量にシフトした。以上の結果から、本邦で見いだされた hCRT 変異である G561R は hCRT の細胞膜から細胞内膜への局在を変化させるとともに、付加糖鎖を変化させることによってクレアチン輸送能の低下を引き起こしている可能性が示された。さらに、本研究で構築した hCRT(G561R)発現 HEK293 細胞は蛍光検出による細胞内局在によって hCRT(G561R)を細胞膜に誘導させる化合物のスクリーニングに利用可能である。これまでに誘導させる化合物は同定できていないが、今後検出システムを改良し、スクリーニング速度を速めることによってより大規模なスクリーニングによる治療候補化合物の探索が期待できる。

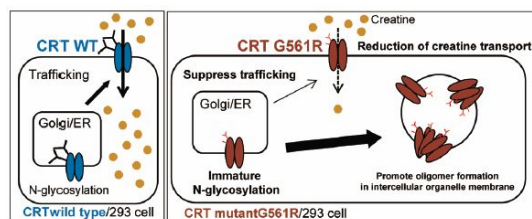


図4 変異型 hCRT(G561R)の細胞内局在変化によるクレアチン輸送活性低下機構 (Uemra et al. Biol Pharm Bull. 40:49-55 (2017)から引用)

<引用文献>

- Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Takanaga, H., Shimizu, H., Watanabe, M., Hosoya, K. & Terasaki, T.: The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22: 1327-1335, 2002.
- van de Kamp, J. M., Mancini, G. M. & Salomons, G. S.: X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *J Inherit Metab Dis.* 37: 715-733, 2014.
- Kato, H., Miyake, F., Shimbo, H., Ohya, M., Sugawara, H., Aida, N., Anzai, R., Takagi, M., Okuda, M., Takano, K., Wada, T., Iai,

M., Yamashita, S. & Osaka, H.: Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. *Brain Dev.* 36: 630-633, 2014.

3. Osaka, H., Takagi, A., Tsuyusaki, Y., Wada, T., Iai, M., Yamashita, S., Shimbo, H., Saito, H., Salomons, G. S., Jakobs, C., Aida, N., Toshihiro, S., Kuhara, T. & Matsumoto, N.: Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab.* 106: 43-47, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Uemura, S. Ito, Y. Ohta, M. Tachikawa, T. Wada, T. Terasaki, S. Ohtsuki: Abnormal N-Glycosylation of a Novel Missense Creatine Transporter Mutant, G561R, Associated with Cerebral Creatine Deficiency Syndromes Alters Transporter Activity and Localization. *Biol Pharm Bull.* 40:49-55 (2017)
DOI: 10.1248/bpb.b16-00582

〔学会発表〕(計 10 件)

上村立記、伊藤慎悟：脳クレアチン欠乏症候群に関連する新規変異クレアチントランスポーターの輸送機能特性と発現・局在解析、平成 28 年度「脳クレアチン欠乏症候群」班会議及び研究会、2017 年 3 月 19 日、東京

上村立記、伊藤慎悟、太田悠介、立川正憲、黒木未央、和田敬仁、寺崎哲也、大槻純男：新規変異クレアチントランスポーターのクレアチン輸送活性低下とそのメカニズムの解明、第 9 回トランスポーター研究会九州部会、2016 年 10 月 1 日、宮崎

上村立記、伊藤慎悟、太田悠介、立川正憲、平山未央、和田敬仁、寺崎哲也、大槻純男：脳クレアチン欠乏症候群に関連する新規変異クレアチントランスポーターのクレアチン輸送活性低下とそのメカニズムの解明、第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2016 年 8 月 26-28 日、鹿児島

Tatsuki Uemura, Shingo Ito, Yusuke Ota, Masanori Tachikawa, Takahito Wada, Mio Hirayama, Tetsuya Terasaki, Sumio Ohtsuki: Changes in transport activity and cellular localization by a novel missense mutation in human creatine transporter found in Japanese cerebral creatine deficiency syndromes patients. *Barcelona*

BioMed Conference Blood Braine Barrier, Spain, Barcelona, 2-4 Nov, 2015

Tatsuki Uemura, Shingo Ito, Yusuke Ota, Masanori Tachikawa, Takahito Wada, Mio Hirayama, Tetsuya Terasaki, Sumio Ohtsuki: Changes of cellular localization and transport activity by a novel mutation in creatine transporter associated with chronic cerebral creatine depletion. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (ISCIDK2015), Kumamoto, Japan, 16-17 Oct, 2015

大槻純男：質量分析でタンパク質を測ると何が見えるか、第 40 回西日本薬剤学研究会、2015 年 8 月 21-22 日、九重

伊藤慎悟：脳クレアチン欠乏症候群に関連する新規変異クレアチントランスポーター特性の解明、第 36 回グアニジノ化合物研究会、2015 年 8 月 8 日、仙台

上村立記、伊藤慎悟、太田悠介、立川正憲、平山未央、和田敬仁、寺崎哲也、大槻純男：脳クレアチン欠乏症候群に関連する新規変異クレアチントランスポーターの発現・局在と輸送機能特性の解析、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25-28 日、神戸

大槻純男：質量分析を利用したタンパク質定量による定量的生命科学への展開、第 24 回 WS フォーラム「タンパク質・ペプチド研究の現状と展望」、2014 年 11 月 21 日、博多

上村立記、伊藤慎悟、落合祐介、立川正憲、平山未央、和田敬仁、大槻純男：新規変異クレアチントランスポーターの機能と発現解析、第 31 回日本薬学会九州支部大会、2014 年 12 月 5-6 日、福岡

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学大学院生命科学研究部微生物薬学分野

<http://ohtsuki-lab.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 純男 (OHTSUKI, Sumio)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：6 0 3 2 3 0 3 6

(2)研究分担者

伊藤 慎悟 (ITO, Shingo)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：2 0 4 6 6 5 3 5

(3)研究分担者

和田 敬仁 (WADA, Takahito)

京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70359727