

氏名	稲野 彰 洋
生年月日	
本籍	静岡県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第596号
学位授与の日付	平成15年9月30日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	カルニチン/有機カチオントランスポーター(OCTN2)の pharmacophore に関する研究
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授) 米田 幸雄(自然科学研究科・教授) 横川 弘一(医学部附属病院・助教授) 加藤 将夫(薬学部・助教授)

## 学位論文要旨

Membrane transporters have significant roles in homeostasis of cells by either pumping out the xenobiotics into extracellular space, or facilitating the uptake of physiological substances. Carnitine/organic cation transporter OCTN2 uptakes both carnitine and organic cations as substrates, and is distributed throughout the body. The purpose of this study is to detect functional alternation of OCTN2 in in vivo situation and to clarify the molecular recognition mechanism of OCTN2. In brain microdialysis study, slower uptake of acetyl-L-carnitine was detected in jvs mice, which defect OCTN2 in comparison with wild mice, indicating that OCTN2 is involved in acetyl-L-carnitine permeation across the blood-brain barrier. Then the pharmacological and pharmacokinetic insights of acetyl-L-carnitine were also provided. Next, using Ser467Cys mutant and wild human OCTN2, I conducted detailed kinetic and functional analyses of substrate recognition sites. Then, I found that Ser467Cys located in transmembrane domain (TMD) 11, was involved in anionic moiety recognition of carnitine. In addition, I constructed chimera proteins from human OCTN2 (Na<sup>+</sup> dependent type) and mouse OCTN3 (Na<sup>+</sup> independent type), and elucidated that the region TMD1~7 is responsible for organic cation recognitions and sodium binding. In conclusion, the present study will facilitate the understanding of the pharmacophore of carnitine and organic cations transport by OCTN2.

トランスポーターは細胞膜に存在して細胞の恒常性に関わり、生体異物を細胞外へくみ出すタイプと栄養分などの生理的必須物質の取込むタイプで大別できる。前者のタイプでは基質認識が多様性に富んでおり、幅広い薬物を基質としていることが

わかっている。後者では特定の成分に限定した基質特異性を示すため、生体にとって必須な機能タンパク質であるが、薬物を誤認識することで薬物輸送に関わる場合がある。このような薬物トランスポーターが薬物動態特性の決定要素になっていることが明らかになりつつある。したがって、受容体における構造活性相関が確立されたように、トランスポーターが関与する動態特性が予測できるようになることが、高確率の創薬成功に結びつくことと思われる。そのためには薬物トランスポーターの基質認識、輸送機構を理解することが重要である。OCTN2 は内因性基質で両性イオンであるカルニチンの生体内濃度の維持に不可欠であることが明らかにされている。さらに、その機能欠損が全身性カルニチン欠乏症を招くことが判明し、多数の遺伝子多型の報告がある。本研究では OCTN2 トランスポーターの遺伝子多型に伴う機能変動に焦点をあて、その生体内での寄与および機能変動の検出と、OCTN2 の分子的な輸送メカニズムの解明を目的とした。

## I. アセチルカルニチンの血液脳関門透過性と OCTN2 の関わり

OCTN2 は脳を含めて体内すべてに広く分布している。血液脳関門では水溶性の栄養物質の脳内移行には何らかの輸送系の関与が必要になる。当研究室では血液脳関門を形成している脳毛細血管内皮細胞におけるカルニチンやアセチルカルニチン取込みには OCTN2 が関与していることを報告してきた。アセチルカルニチンは最近、中枢での薬理作用が期待されてきていることから、OCTN2 がアセチルカルニチンの脳移行にどのような関わっているのかを検討した。

しかし、*in vivo* 実験系では単一のトランスポーターの寄与について、検出感度の問題で、輸送機能が低い場合や輸送機構を解析することが困難な場合がある。そこで、マウスにマイクロダイアリシスを適用することで、短時間間隔の経時的サンプリングを行った。さらに OCTN2 の一塩基置換により、その輸送機能を失った *jvs* マウスと野生型マウスを用いることで、脳移行における OCTN2 の機能を評価した。

Zero-net-flux 法はマイクロダイアリシスプローブの透析表面からのアセチルカルニチンの消失率や回収率を測定する方法であり、合わせて脳内のアセチルカルニチン濃度の推測も可能とする方法である。この結果、プローブを埋め込んだ視床でのアセチルカルニチンの回収率は、*jvs* マウスでは野生型よりも大きく、また脳細胞外液でのアセチルカルニチン濃度は *jvs* マウスでは低くなっていることが明らかになった。回収率の変化は、OCTN2 がアセチルカルニチンの脳細胞外濃度を増大させるような方向に働いていることを示唆しており、血液脳関門では OCTN2 が血液側からのカルニチンやアセチルカルニチンの取込みに関わっている可能性を示した。

アセチルカルニチンを尾静脈より投与して、その脳移行を評価すると、*jvs* マウスでは初期の血液脳関門を透過しての取込みが遅くなることが示され、アセチルカルニチンの血液側からの脳関門透過には OCTN2 が関与していることが認められた。

しかし、その後の脳細胞外液から得られる放射活性濃度が野生型、jvs 型マウス共に定常的になった。アセチルカルニチンの血液脳関門透過には OCTN2 の関与が認められるものの、OCTN2 以外の輸送機構で細胞外のカルニチン濃度を一定に調整するような仕組みがあることが示唆された。

以上の結果から、アセチルカルニチンの血液脳関門を介した血液側からの取込みには少なくとも OCTN2 が関与しており、その他に脳内カルニチン濃度を調整するような輸送機構が存在することを示すことができた。これは *in vivo* 実験系における高感度な輸送機能の評価方法としてのマイクロダイアリシスの有用性を示したばかりでなく、アセチルカルニチンの適正使用や薬物療法のための情報にもなった。

## II. 全身性カルニチン欠乏症患者の OCTN2 遺伝子変異体を用いた輸送機能部位の解析

OCTN2 は有機カチオンをナトリウム非依存的に輸送し、カルニチンをナトリウム依存的に輸送する多機能性を示している。ひとつのトランスポーターが性質の異なる基質を認識できる分子的な機構は今だ解明されていない。

当研究室では、日本人の血清カルニチン濃度をスクリーニングし、標準より低いカルニチン濃度を示した被験者から OCTN2 遺伝子多型の存在を報告した。そのうち、Ser467Cys 変異体 (S467C) はカルニチン輸送能を大きく失っていることを確認した。しかし、S467C の有機カチオン輸送能については、野生型と同程度にその機能を保持していた。

そこで、野生型と S467C のそれぞれがどのような基質認識部位を持っているのかを明らかにするために、カルニチンや有機カチオンの代表的基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) を輸送基質として速度論的な解析を行った。S467C によるカルニチン輸送のミカエリス定数  $K_m$  は、野生型の  $K_m$  よりも約 15 倍増加した。S467C によって引き起こされるカルニチン輸送の消失は、カルニチンへの親和性低下に起因するものと考えられた。

さらに、野生型を用いてカルニチン輸送と TEA 輸送の相互阻害を行うと、その阻害様式は完全な競合的拮抗型とはならなかった。この結果は、OCTN2 上での両基質の結合部位は近接していると思われるが、一致はしていないことを示唆している。

バルプロ酸などの幾つかの有機アニオン性化合物は、有機カチオン性化合物と同様に、OCTN2 野生型によるカルニチンや TEA 輸送を阻害できることがわかっている。野生型 OCTN2 による TEA 輸送はバルプロ酸によってナトリウム依存的に阻害された。ナトリウム濃度に対する S467C のカルニチン輸送の活性化は、野生型のものと同じであるにも関わらず、S467C の TEA 輸送に対するバルプロ酸の阻害能は野生型のものよりも低下していた。これらの結果から、S467C の変異がカルニチンに対する親和性を低下させたのは、アニオン認識部分が影響を受けたためと示唆さ

れた。S467C は推定膜構造の 11 番目の膜貫通領域に位置しており、この領域がカルニチンのアニオン構造の認識に関わっていると推察された。さらにアニオン認識はナトリウムの存在によってその認識力が増加することが示され、ナトリウムの結合部位は、空間的／機能的に 11 番目膜貫通領域に関連があることが示された。

以上の結果から OCTN2 はカルニチンとナトリウムのための結合部位が存在し、カルニチン認識部分の一部が有機カチオンの認識と重なっていることを示すことができた。

### III. OCTN2 の機能領域とカルニチン認識における役割

OCTN2 のサブタイプとして、OCTN1 と OCTN3 がクローニングされている。OCTN が属する有機イオントランスポーターファミリー (SLC22) には、他に有機アニオントランスポーター (OAT) と有機カチオントランスポーター (OCT) が分類されている。いずれも共通で 12 回膜貫通型構造を有しており、基質選択の特徴として、OCTN は両イオンであるカルニチンを輸送し、OAT と OCT はそれぞれ有機アニオン性化合物と有機カチオン性化合物を主に輸送することがわかっている。

各ファミリーを構成するサブタイプのアミノ酸配列の保存性は OCTN で 60%、OCT で 30%、OAT で 15%、と OCTN の配列の保存性は高いことがわかる。しかし、カルニチン輸送、有機カチオン輸送について OCTN の 3 つサブタイプの特徴は大きく異なる。カルニチン輸送については、OCTN1 の輸送活性は OCTN2 と OCTN3 よりも小さく、OCTN3 の輸送活性はナトリウム非依存的であることを当研究室は明らかにしている。また有機カチオン輸送については、OCTN3 のみが輸送できないことが明らかにされている。

このような OCTN ファミリー内の相同性の高さと同様の機能の相違を利用して OCTN2 の機能領域の解析を行った。ヒト OCTN2 とマウス OCTN3 のキメラタンパクを作成した。キメラタンパクの構造は、OCTN2 の 378 番目と 379 番目を境界線にして N 末端側が OCTN2、C 末端側が OCTN3 のキメラタンパクを N23、その逆のものを N32 とした。

TEA の輸送能を評価すると、OCTN2 同様に N23 にも有機カチオン輸送能が確認され、OCTN2 の膜貫通ドメイン (TMD) 1 番目から 7 番目に有機カチオン輸送に必須な部位が存在することが示唆された。

カルニチン輸送については、N23 と N32 の両キメラで OCTN3 と同程度の輸送活性を示した。カルニチン輸送には TMD1~7、TMD8~12 の両領域による協調的な機能が必要であることが示唆された。カルニチンに対する親和性を示すミカエリス定数  $K_m$  をナトリウム存在下と非存在下で比較すると、OCTN2 と N23 では  $K_m$  の変化が観察されたのに対し、OCTN3 と N32 では変化が認められなかった。このことより、TMD1~7 にナトリウム結合に基づくカルニチンの親和性変動を起こす責任

部位が存在することが推察された。

TMD1~7 の OCTN2 アミノ酸配列の中で、ナトリウムとの結合に関わりそうなアミノ酸 Q180 と Q207 を選び、OCTN3 に対応するアミノ酸ヒスチジンへの変異を行い、Q180H、Q207H 及びその両方に変異を入れた Q180H/Q207H を作成した。それぞれの変異体ではカルニチン輸送のナトリウム依存率の低下が観察され、これらのアミノ酸がナトリウム認識、もしくはそれに関わるカルニチン認識の活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。

以上の結果より、OCTN2 の TMD1~7 の領域に有機カチオン認識と、カルニチン輸送のナトリウム依存性に関わる機能部位が存在し、TMD8~12 の分子内の連携が輸送機能に必要であることが示された。

## 結論

本研究ではまず、OCTN2 がアセチルカルニチンの血液脳関門透過に関与していることを示した。また *in vivo* 実験系で機能の評価ができたことで、OCTN2 の関与の他にも脳内濃度を一定に保つ機構があることを発見した。これはアルツハイマー病や老人性うつ症などの、アセチルカルニチンの中枢神経系での薬理作用の説明や適正使用の有用な基礎情報となることが期待される。

さらに OCTN2 のカルニチン輸送における分子的な機構は、カルニチンのアニオン部分とカチオン部分の認識と、駆動力であるナトリウムが OCTN2 タンパク上で異なる結合部位に働いていることを見出した。OCTN2 のもう一つの機能である有機カチオン輸送は、カルニチンのカチオン部分認識と共通で行われていることを示すことができた。OCTN2 タンパク上では、有機カチオン、有機アニオン、ナトリウムの認識が、領域ごとに分担されており、その機能の連携が輸送機構を成立させている。

本研究で得られた知見は、OCTN2 の遺伝子多型の情報が得られれば、カルニチンおよび有機カチオン性化合物の輸送変化の原因について分子的な考察をすることが可能になるばかりでなく、SLC22A ファミリーの基質認識性や輸送機構の理解のための基礎情報となり、薬物トランスポーターを介した相互作用の回避や動態特性の改変を行うための有用な情報につながるものと考えられる。

## 学位論文審査結果の要旨

トランスポーター OCTN2 は両性イオンであるカルニチンの生体内濃度の維持に不可欠であること、その機能欠損が全身性カリニチン欠乏症を招くこと、カルニチンのみならずテトラエチルアンモニウム (TEA) などの有機カチオンを輸送すること、有機アニオンによっても輸送阻害があることが報告されているが、その基質構造認識 (pharmacophore) 機構に関しては十分に解明されていない。

本研究では、OCTN2 トランスポーターの遺伝子多型に伴う機能変動に焦点をあて、その血液脳関門での寄与および機能変動と、OCTN2 の分子認識の機構の解明を目的として、以下に示す結果を得た。

- 1) OCTN2 自然発症変異マウス *jvs* と野生型マウスを用いた *in vitro* 初代培養脳毛細血管内皮細胞への取り込み、および *in vivo* brain microdialysis による脳細胞間隙内濃度 / 血漿中濃度比の比較により、OCTN2 がアセチルカルニチンの血液脳関門透過に関与していること。
- 2) ヒト OCTN2 の遺伝子多型 Ser467Cys (S467C) 及び野生型 OCTN2 発現細胞を用いて、カルニチン、TEA 輸送能とカルニチン輸送に対する Na<sup>+</sup> 効果および有機アニオンであるバルプロ酸による阻害形式を速度論的に比較し、S467C が位置する 11 番目の膜貫通ドメイン (TMD) がカルニチンのアニオン認識に関わり、Na<sup>+</sup> の結合部位は、空間的 / 機能的にこの領域に関連があること。
- 3) OCTN2 にはカルニチン結合部位が存在し、カルニチン認識部分の一部が有機カチオンの認識と重なっていること。
- 4) カルニチン輸送に対して Na<sup>+</sup> 依存性を示すヒト OCTN2 と Na<sup>+</sup> 依存性の低いマウス OCTN3 のキメラタンパクの機能解析から、OCTN2 の TMD1 ~ 7 の領域に有機カチオン認識と、カルニチン輸送の Na<sup>+</sup> 依存性に関わる認識部位が存在し、TMD8 ~ 12 との分子内の連携が輸送機能に必要であること。

上記結果は、OCTN2 におけるカルニチン、有機カチオン、有機アニオン及び Na<sup>+</sup> の認識機構を解明する上で、新規な知見を提示したものである。本研究成果は、OCTN2 が属する SLC22A ファミリーの有機イオンに対する基質認識性並びに輸送機構の理解のための基礎情報を提供するものであり、本論文は博士 (薬学) 論文に値すると判定した。