

## 11. クレアチン欠損症の輸送蛋白質局在異常機構の解明

大槻 純男

Key words: クレアチン, トランスポーター,  
クレアチン欠損症, 細胞内局在

熊本大学 大学院生命科学研究部  
微生物薬学分野

### 緒言

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 (図 1)。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損症が生じる。先天性クレアチン欠損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、てんかんであり、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。特に 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損症は、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)<sup>1)</sup>。国内においても共同研究者である和田博士 (京都大, 神奈川県立こども医療センター) らが初めて CRT 変異患者を 2 家系みだし、潜在的患者が国内でも多数存在すると考えられている<sup>2,3)</sup>。

我々は、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 2)<sup>4,5)</sup>。この報告が現在の CRT 変異による先天性クレアチン欠損症の中枢病態を説明する基盤知見となっている。CRT 変異による先天性クレアチン欠損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損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。そこで、本研究は治療への分子基盤を確立するため本邦で発見された変異 CRT 発現細胞におけるクレアチン輸送能低下のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 方法および結果

#### 1. 皮膚由来線維芽細胞におけるヒト CRT (hCRT) 遺伝子発現

患者及び健常人皮膚由来線維芽細胞を用いて 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線維芽細胞における hCRT mRNA 発現量は、野生型 hCRT を有する皮膚由来線維芽細胞の hCRT mRNA 発現量と有意な差はなかった ( $p > 0.05$ )。本結果は、G561R 変異は発現量に大きな変化は及ぼさないことを示唆している。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の承認のもと実施した。

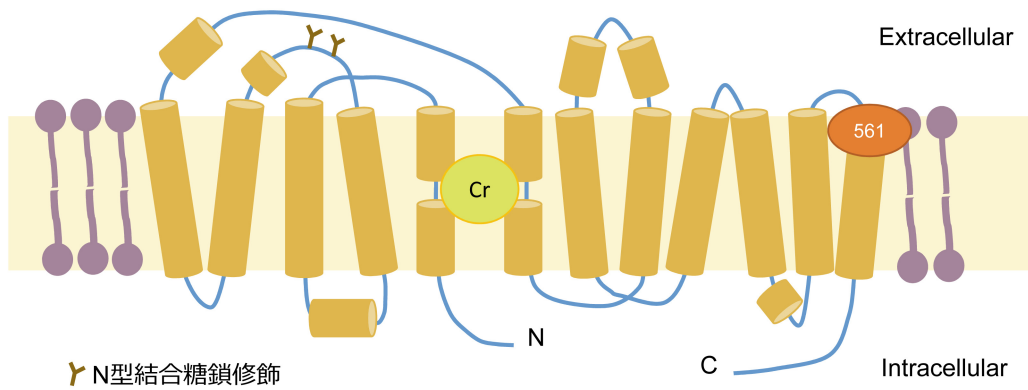


図1. クレアチントランスポーター (CRT) の立体構造.

CRT は12回膜貫通型であり  $\text{Na}^+$  を駆動力としてクレアチンを能動的輸送するトランスポーターである. 本邦で見いだされた G561R の変異は C 末側の膜貫通部位付近に存在する.

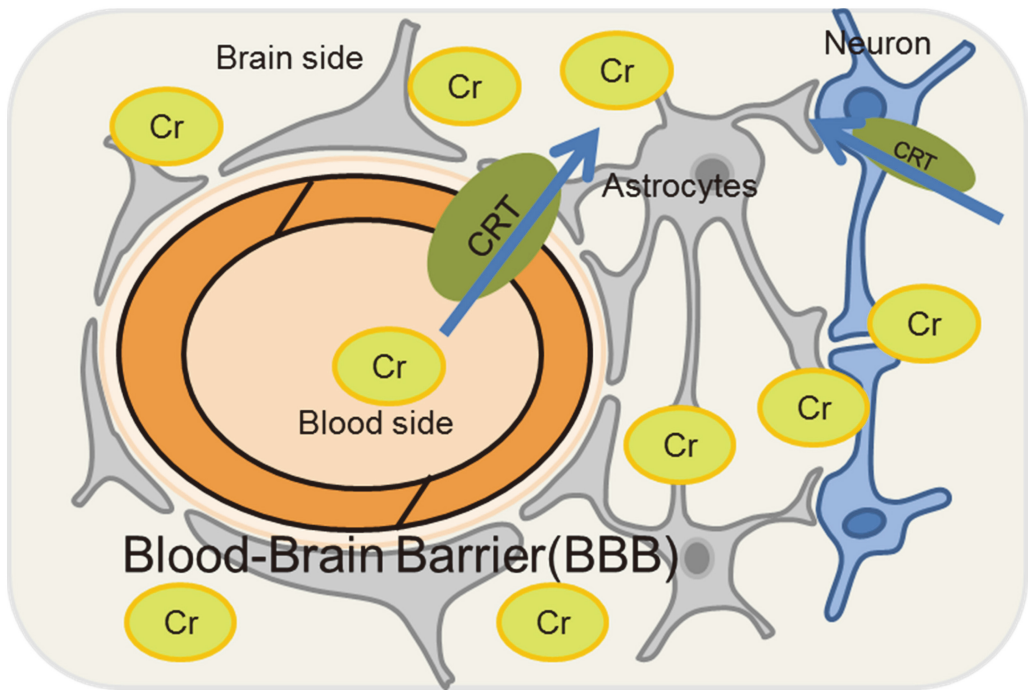


図2. 脳へのクレアチン供給に関わるクレアチントランスポーター (CRT).

脳血管の内皮細胞は密着結合で結合しているため細胞間隙を介した物質輸送が制限され、血液脳関門を構成している. 脳毛細血管内皮細胞には CRT が発現し、脳内にクレアチンを選択的かつ積極的に供給している. 変異により CRT のクレアチン輸送能が低下し、脳内クレアチン濃度の低下によってクレアチン欠損症が発症する.

## 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。

### 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 付近に単一バンドとして検出された。変異型 hCRT (G561R) は粗膜 (CM) 画分において 60 kDa 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 70 kDa から 60 kDa 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 50 kDa の同一分子量にシフトした。

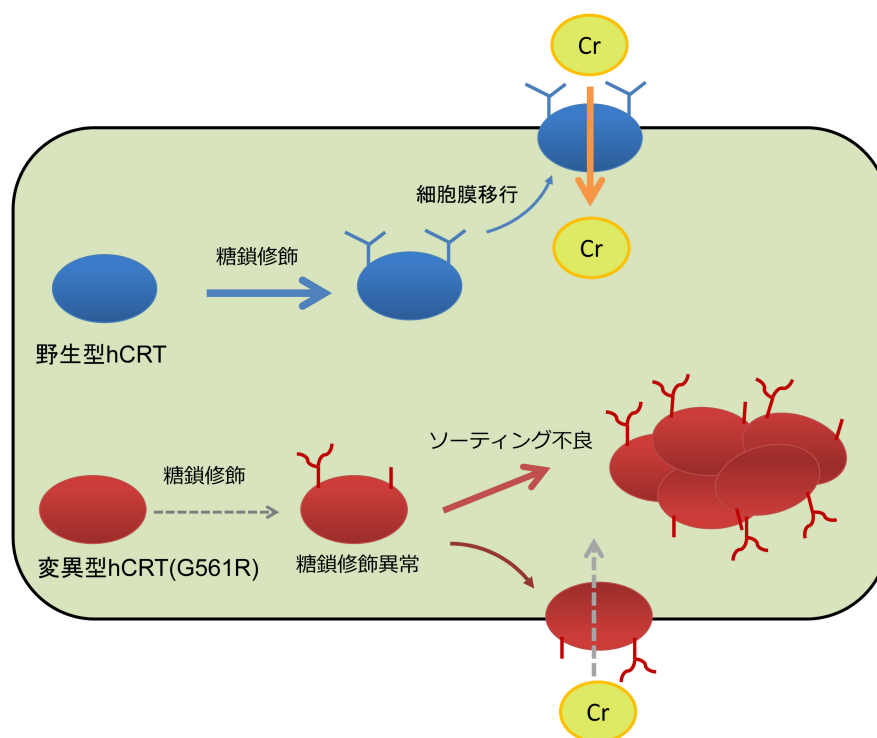


図3. 変異型 hCRT (G561R) の付加糖鎖の変化によるクレアチン輸送能の低下。

変異型 hCRT (G561R) は野生型 CRT とは異なる糖鎖が付加され、細胞内局在変化が生じることによって細胞あたりのクレアチン輸送能が低下することが示唆された。

## 考 察

本研究の目的である新規 CRT 変異によるクレアチン輸送機能低下に関与する機構を明らかにするにあたって、新規遺伝子変異部位 (G561R) がクレアチンとの活性中心から離れた配列部位であることから CRT の局在の変化を予想し検証を行った。免疫染色の検討から変異型 hCRT (G561R) は細胞内に局在すること、Western blot の検討から変異型

hCRT (G561R) は粗膜画分により多く存在することが明らかとなった。変異型 hCRT (G561R) をもつ患者皮膚由来線維芽細胞においては遺伝子発現の低下は認められなかったことから、変異型 hCRT (G561R) におけるクレアチン輸送能の低下には、一部、細胞膜から細胞内膜への局在の変化が関わっていることが示唆された。

また、Western blot によって検出された変異型 hCRT (G561R) の分子量の低下は糖鎖の変化によることが明らかとなった。N 型結合糖鎖修飾が付かないアミノ酸配列に変異させた hCRT はクレアチン取り込み量が低下することが報告されている<sup>6)</sup>。また、変異型 hCRT (G561R) は発現細胞において一部細胞膜への局在が認められたことから、クレアチン輸送能低下には前述の細胞内局在変化に加えて、CRT 一分子あたりの活性が低下していることも予想される。現在、質量分析を用いた CRT の絶対定量法を用い、発現量の絶対値とクレアチン輸送活性から 1 分子あたりの活性の変化を検討している。

以上、本解析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 (図 3)。さらに、分子機構を明らかにしていくことによって hCRT 変異によるクレアチン欠損症の治療法へ発展することが期待される。

### 共同研究者

本研究に用いた皮膚由来線維芽細胞は、京都大学医学部の和田敬仁博士、自治医科大学の小坂 仁博士から提供を受けた。また、本研究の免疫染色は東北大学大学院薬学研究科の立川正憲博士との共同研究である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

### 文 献

- 1) 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.
- 2) 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., Saitsu, 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.
- 4) 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.
- 5) Tachikawa, M., Fukaya, M., Terasaki, T., Ohtsuki, S. & Watanabe, M. : Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glial relationship for brain energy homeostasis. *Eur. J. Neurosci.*, **20** : 144-160, 2004.
- 6) Straumann, N., Wind, A., Leuenberger, T. & Wallimann, T. : Effects of N-linked glycosylation on the creatine transporter. *Biochem. J.*, **393** : 459-469, 2006.