酵母と動物細胞の発現系を用いた CPT1 アイソザイムの特性の理解に向けて

2014 年 秦 拓也 目次

第1章 序論

1-1	1 長鎖脂肪酸のミトコンドリアにおけるβ酸化	1
1-2	2 カルニチンシャトルシステム	2
1-3	3 CPT1	3
1-4	4 CPT1アイソザイム	4
1-8	5 酵母や動物細胞の発現系を用いた CPT1 の機能解析	6
1-6	6 研究の目的	7
1-1	7 参考文献	8

第2章 ラットの筋型 CPT1の COS7 細胞発現系と酵母発現系の比較

2-	1 諸言		14
2-	2 結果		
	2-2-1	COS7 細胞発現系と酵母発現系で得られる	
		ミトコンドリアタンパク質の収量と収率	15
	2-2-2	CPT1bを発現させた COS7 細胞と酵母から調製したミトコンドリア画分の	
		CPT1 活性とマロニル CoA 感受性の比較	16
	2-2-3	大腸菌発現系を用いた CPT1b の標準タンパク質の調製	17
	2-2-4	酵母及び COS7 細胞に存在する CPT1b のタンパク質量の比較	18
2-	3 考察.		20
2-	4 実験な	5法	22
2-	5 参考3	く献	26

第3章 発現させた CPT1 アイソザイムの特異活性の比較

3-1	諸言		29
3-2	結果		
	3-2-1	CPT1 アイソザイムの標準タンパク質の調製	30
	3-2-2	3 種類の CPT1 アイソザイムを認識する特異抗体の調製	31
	3-2-3	COS7 細胞に発現させた CPT1 アイソザイムの	
		タンパク質量の定量的な評価	33
	3-2-4	COS7 細胞に発現させた CPT1 アイソザイムの特異活性の比較	35
	3-2-5	CPT1cとCPT1aのキメラタンパク質や	
		CPT1c の C 末端欠損体の CPT1 活性	36
3-3	考察		38
3-4	実験力	方法	41

3-5	参考文献	44	ŀ
-----	------	----	---

第4章 総括

4-1	ラットの筋型 CPT1 の COS7 細胞発現系と酵母発現系の比較(第2章)	17
4-2	発現させた CPT1 アイソザイムの特異活性の比較(第3章)	8
4-3	参考文献	51

本論文で用いた省略形

ATP: adenosine 5'-triphosphate

CAC: carnitine acylcarnitine carrier

CBB: coomassie brilliant blue

CoA: coenzyme A

CPT1: carnitine palmitoyltransferase 1

CPT2: carnitine palmiotyltransferase 2

DTT: dithiothreitol

ECL: enhanced chemiluminescence

FABP: fatty acid binding protein

 $F_1\beta$: β subunit of $F_1ATPase$

G3PDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IC₅₀: concentration causing 50% inhibition

IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

KLH: keyhole limpet hemocyanin

PCR: polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

VDAC: voltage-dependent anion channel

第1章 序論

1-1 ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸のβ酸化

ヒトを始めとする哺乳類は、糖や長鎖脂肪酸を分解して得られるエネルギーを生体内のエネル ギー通貨である ATP に変換することにより、その生命活動を維持している。糖と長鎖脂肪酸の内、 エネルギー産生効率が高い長鎖脂肪酸は、通常、グリセロールと長鎖脂肪酸のエステルであるト リアシルグリセロールの形でエネルギー源として細胞内に貯蓄されており、生体内のエネルギー 需要に応じて加水分解されて長鎖脂肪酸を遊離する。遊離した長鎖脂肪酸はアシル CoA へと変 換された後、アセチル CoA まで分解される。この分解反応はアシル CoA のβ位において段階的に 行われることから、長鎖脂肪酸のβ酸化と呼ばれている。この長鎖脂肪酸のβ酸化は細胞内小器 官の1つであるミトコンドリアで行われる。ミトコンドリアは外膜と内膜からなる2重膜構造を有して おり、内膜の内側はマトリクスと呼ばれている。このマトリクスにおいて、長鎖脂肪酸のβ酸化は行 われているため、その反応の基質であるアシル CoA はマトリクスへと流入する必要がある。しかし ながら、ミトコンドリアの内膜はほとんど物質に対して低い透過性を示し、アシル CoA はそのまま の形ではミトコンドリアの内膜を通過することができない。従って、ミトコンドリアの外膜に存在する アシル CoA 合成酵素によってアシル CoA へと変換された後、カルニチンシャトルシステム[1-3]と 呼ばれる経路を通じてマトリクスへと輸送される(Fig.1-1)。



Fig. 1-1 ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸のβ酸化

1-2 カルニチンシャトルシステム

長鎖脂肪酸のβ酸化の基質であるアシル CoA はミトコンドリア内膜をそのまま透過するのでは なく、カルニチンシャトルシステムを介してミトコンドリア内へと輸送される(Fig. 1-2)。カルニチンシ ャトルシステムは、ミトコンドリアの外膜に存在する carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1, EC 2.3.1.21)[4-7]、ミトコンドリアの内膜に存在する carnitine acylcarnitine carrier (CAC)および carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2)の 3 種類のタンパク質から構成されている。まず、 CPT1 によりアシル CoA のアシル基がカルニチンへと転移され、アシルカルニチンが生成する。 続いて、生じたアシルカルニチンは、内膜に存在する CAC によってカルニチンと交換輸送されて マトリクスへと流入する。マトリクスに流入したアシルカルニチンは、CPT1 の逆反応を行う CPT2 によってアシル CoA へと変換される。その後、生じたアシル CoA はβ酸化反応を受け、アセチル CoA へと分解される。カルニチンシャトルシステムを構成する 3 種類のタンパク質の中でも、 CPT1は長鎖脂肪酸合成の最初の反応中間体であるマロニル CoAによって阻害されることから、 長鎖脂肪酸の合成と分解のどちらを優位にするかの切り替えを調節している重要な酵素として考 えられており、その機能解析が精力的に行われている。



Fig. 1-2 カルニチンシャトルシステムの概略図

1-3 CPT1

CPT1は、アシルトランスフェラーゼファミリーの一員であり、アシル CoA とカルニチンからアシル カルニチンを生じる反応を触媒する酵素である。CPT1 はβ酸化反応の基質であるアシル CoA の ミトコンドリア内への流入を制御しており、ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸のβ酸化の律速酵素 として考えられている[4-7]。CPT1 の脂肪酸代謝における重要性は、「CPT1 欠損症」と呼ばれる CPT1 の遺伝子変異により CPT1 の酵素活性や安定性が低下することで引き起こされる代謝疾 患障害[8, 9]や CPT1 のホモノックアウトマウスが胎生致死であることからも支持される[10, 11]。 また、糖尿病などのエネルギー調節に異常が生じている場合において、その酵素活性が変化す ることが知られている[12]。

CPT1 の結晶構造解析は未だ行われていないが、過去に行われたトポロジー解析から、ミトコ ンドリアの外膜に局在する2回膜貫通型のタンパク質であり、N末端とC末端の両方が細胞質側 に露出した構造を有していると考えられている[13-15]。また、CPT1 と同様にアシルトランスフェラ ーゼ活性を有しており、かつ結晶構造が解かれている CPT2 やカルニチンオクタノイルトランスフ ェラーゼの構造を基にした CPT1 の立体構造のモデルが構築されている[16]。CPT1 の細胞質側 に露出している領域の内、CPT1 のマロニル CoA 感受性には N 末端領域、CPT1 活性には C 末 端領域が重要であると考えられている[17]。これらの知見に加えて、近年の解析から、CPT1 のマ ロニル CoA 感受性や CPT1 活性は、細胞質に露出した N 末端領域とC 末端領域との相互作用 [18]、ループ領域[19]や第2 膜貫通領域[20]、細胞質に露出した N 末端領域とSトコンドリア外膜 のリン脂質[21, 22]、ミトコンドリアの外膜の流動性[23]といった多様な因子と相互作用することに より複雑に制御されていると考えられている。

また、CPT1 は単量体では存在せず、CPT1 同士のホモ多量体[24, 25]、あるいは、ミトコンドリ ア外膜に存在している他のタンパク質とヘテロ複合体[26]を形成していると考えられている。 CPT1 がホモ多量体を形成するという説では、多量体が形成されることによりミトコンドリ外膜上に 孔を形成し、CPT1 によって生じたアシルカルニチンはこの孔を通過して外膜の内側に流入すると 考えられている。一方、CPT1 がヘテロ複合体を形成しているという説では、以下の 2 種類のタン パク質と相互作用としていると考えられている。1 つは、CPT1 の基質となるアシル CoA を合成す るアシル CoA 合成酵素であり、もう 1 つは、ミトコンドリア外膜に存在するチャネルタンパク質とし て知られる voltage-dependent anion channel (VDAC)である。VDAC は、分子量 6000 以下の 分子を非選択的に透過させる性質を有しているため、CPT1 によって生じたアシルカルニチンが VDAC を介して外膜の内側へ流入すると考えられている[27]。このように、CPT1 はアシル CoA 合 成酵素やVDAC と複合体を形成することにより、効率良くアシルカルニチンのミトコンドリア内への 流入を行っていると考えられている。

3

1-4 CPT1 アイソザイム

CPT1 は、3 種類のアイソザイムが存在し、各アイソザイムはその発現している組織分布に応じ て、肝型 CPT1 (liver type CPT1: CPT1a)、筋型 CPT1 (muscle type CPT1: CPT1b)、脳型 CPT1 (brain type CPT1: CPT1c)と呼ばれている(Table 1-1)[1, 28-30]。CPT1a は、ほぼ全ての 組織に発現が認められるが、中でも肝臓や腎臓において顕著に発現している。また、CPT1b は、 骨格筋、心臓、褐色脂肪組織などの長鎖脂肪酸を主なエネルギー源として利用している組織に選 択的に発現している。また、CPT1c は、脳や精巣に選択的に発現していることが知られている。こ のように、CPT1 アイソザイムは組織選択的に発現していることから、これらのアイソザイムの特 性について理解することは、各組織における脂肪酸代謝の特性を理解することに繋がると考えら れており、各アイソザイムの特性について精力的に解析されている。

CPT1 アイソザイムの内、CPT1a と CPT1b については、その酵素活性やマロニル CoA 感受性 に重要なアミノ酸が数多く同定されており、これらのアミノ酸はアイソザイム間やアシルトランスフ ェラーゼファミリー間で保存されている[31, 32]。しかしながら、基質であるカルニチンや阻害物質 であるマロニル CoA に対する親和性は互いに異なっており、カルニチンに対する親和性は CPT1a の方が CPT1b よりも高く(CPT1a: Km=30 μM、CPT1b: Km=500 μM)、マロニル CoA に 対する感受性は CPT1b の方が CPT1a よりも高い(CPT1a: IC₅₀=2.5 μM、CPT1b: IC₅₀=0.03 μM)ことが知られている[1]。これらの性質の違いは、CPT1a と CPT1b のキメラタンパク質を用い た解析から、細胞質側に突出した N 末端領域とC 末端領域が関与していると考えられている[33, 34]。

一方、CPT1c の性質については、ノックアウトマウスやノックインマウスを用いた解析が中心に 行われている。これまでの解析から、CPT1c は摂食をコントロールするホルモンであるレプチンの シグナル伝達を介した摂食の調節を行うことにより、生体のエネルギー代謝の調節に寄与してい ると考えられている[35, 36]。また、他の CPT1 アイソザイムとは異なり、脂肪酸代謝以外にセラミ ドの合成にも関わることで、脳の海馬における神経細胞の形態や機能を保つ上で重要な役割を 果たしているという報告がなされている[37]。しかしながら、CPT1c の特性に重要な領域やアミノ 酸について詳細な解析はあまり行われておらず、未だ不明な点が数多く存在する。

Table 1-1 CPT1 アイソザイムの特徴

アイソザイム	CPT1a	CPT1b	CPT1c
アミノ酸残基	773aa	772aa	801aa
分子サイズ	88 kDa	88 kDa	91 kDa
主な発現組織	肝臓、腎臓	骨格筋、心臓	脳、精巣
カルニチンとの	20	500M	no data
親和性(Km)	30 µW	500 µM	no uala
マロニル CoA との	25M	0.02M	no data
親和性(IC ₅₀)	2.5 μινι	0.05 μινι	no uala

1-4 酵母や動物細胞の発現系を用いた CPT1 の機能解析

CPT1 は、界面活性剤により膜から可溶化すると失活するため、一般的な CPT1 の機能解析で は、組織や細胞から単離したミトコンドリアが用いられる。遺伝子工学技術が十分に発展していな かった時代においては、動物の組織から単離したミトコンドリアを用いた機能解析が主に行われ ていた[38, 39]。しかしながら、遺伝子工学技術の発達に伴い、1993 年に Esser らがラットの CPT1a をクローニングしたことを契機に、酵母や動物細胞の発現系を用いた CPT1 アイソザイム の機能解析が普及し、CPT1 アイソザイムの特性についての解析が急速に進展した[40]。

酵母発現系を用いた CPT1 アイソザイムの機能解析は、出芽酵母を用いた発現系が Brown ら によって初めて確立された[41]。その後、de Vries らによってメタノール資化性酵母を用いた発現 系も報告され[42]、現在では、これら2つの酵母発現系が汎用されている[43, 44]。動物細胞と異 なり、酵母のミトコンドリアは内在性のカルニチンシャトルを有していないため、発現させた CPT1 アイソザイムやそのアミノ酸変異体の性質についてのみ解析を行うことできるという大きな利点が 存在する。そのため、現在明らかにされている CPT1 アイソザイムの性質に重要なアミノ酸の多く は、酵母発現系を用いた解析により同定されている。

一方、動物細胞を用いた CPT1 の機能解析は、Esser らによって初めて報告された[40]。この 解析法の特徴は、発現させた CPT1 アイソザイムの性質について解析することができるだけでなく、 発現させた CPT1 アイソザイムが細胞内の脂肪酸代謝に及ぼす影響や脂肪酸代謝の変化が細 胞に及ぼす影響についても解析することができることである[45-47]。この解析法を用いることによ り、CPT1 アイソザイムによる長鎖脂肪酸のβ酸化の亢進した結果、遊離の長鎖脂肪酸による炎 症のシグナル伝達、インスリン抵抗性の上昇、アポトーシスなどが抑制されることが示された。

CPT1 アイソザイムの一部の領域を欠損させた変異体や特定のアミノ酸置換した変異体の性 質について、酵母や動物細胞の発現系を用いて解析することにより、CPT1 活性やマロニル CoA 感受性に重要な領域や重要なアミノ酸が数多く明らかにされた[48-54]。しかしながら、同じ CPT1 アイソザイムの変異体であっても、酵母に発現させた場合と動物細胞に発現させた場合において 異なる挙動を示す報告もなされている[55, 56]。このことから、酵母に発現させた CPT1 と動物細 胞に発現させた CPT1 は性質が異なっている可能性が考えられる。しかしながら、この可能性に ついて詳細な解析は未だ行われていない。

6

1-5 研究の目的

これまで述べてきたように、CPT1 はミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸のβ酸化の律速酵素とし て考えられており、各 CPT1 アイソザイムは組織選択的な発現を示す。そのため、個々の CPT1 アイソザイムの特性を理解することは、各組織の脂肪酸代謝を理解することに繋がると考えられ るため、その特性について酵母や動物細胞の発現系を用いた解析が精力的に行われてきた。し かしながら、CPT1 アイソザイムの特性を理解する上で、未だ明らかにされていない問題も数多く 存在する。これらの問題の内、本研究では、CPT1 アイソザイムの特性の理解を最終的な目的と して、未だ解答を得られていない以下の 2 つの問題に取り組んだ。1 点目は、CPT1 の機能解析 に大きく貢献してきた酵母および動物細胞の発現系に焦点を当て、それぞれの発現系を利用して 発現させた CPT1 の性質は異なっているかどうかについて解析した(第 2 章)。2 点目は、CPT1 ア イソザイムの中でも、最も CPT1 活性が低いと報告されている CPT1c に着目し、本当に CPT1c が不活性な分子かどうかを明らかにすることを試みた(第 3 章)。

1-6 参考文献

- McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, **244**, 1-14
- Kerner J, Hoppel C (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1486, 1-17
- Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR (2001) Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta*, **1546**, 21-43
- 4. McGarry JD (1995) Malonyl-CoA and carnitine palmitoyltransferase I: an expanding partnership. *Biochem Soc Trans*, **23**, 481-485.
- Ramírez S, Martins L, Jacas J, Carrasco P, Pozo M, Clotet J, Serra D, Hegardt FG, Diéguez C, López M, Casals N (2001) Carnitine palmitoyl transferase I and the control of myocardial beta-oxidation flux. *Biochem Soc Trans*, **29**, 245-250
- Ramírez S, Martins L, Jacas J, Carrasco P, Pozo M, Clotet J, Serra D, Hegardt FG, Diéguez C, López M, Casals N (2001) Carnitine palmitoyl transferase I and the control of myocardial beta-oxidation flux. *Biochem Soc Trans*, **29**, 245-250.
- Zammit VA (2008) Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life*, 60, 347-354
- Brown NF, Mullur RS, Subramanian I, Esser V, Bennett MJ, Saudubray JM, Feigenbaum AS, Kobari JA, Macleod PM, McGarry JD, Cohen JC (2001) Molecular characterization of L-CPT I deficiency in six patients: insights into function of the native enzyme. *J Lipid res*, **42**, 1134-1142
- Gobin S, Thuiller L, Jogl G, Faye A, Tong L, Chi M, Bonnefont JP, Girard J, Prip-Bnuus C (2003) Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency. *J Biol Chem*, **278**, 50428-50434
- Nyman LR, Cox KB, Hoppel CL, Kerner J, Barnoski BL, Hamm DA, Tian L, Schoeb TR, Wood PA (2005) Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab*, **86**, 179-187
- Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, Chick WS, Hamm DA, Sharer JD, Wood PA (2008) Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab*, **93**, 314-322
- Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1784-1789
- 13. Zammit VA, Fraser F, Orstorphine CG (1997) Regulation of mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase (CPT I): role of membrane-topology.

Adv Enzyme Regul, 37, 295-317

- 14. Fraser F, Corstorphine CG, Zammit VA (1997) Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J*, **323**, 711-718
- van der Leij FR, Kram AM, Bartelds B, Roelofsen H, Smid GB, Takens J, Zammit VA, Kuipers JR (1999) Cytological evidence that the C-terminus of carnitine palmitoyltransferase I is on the cytosolic face of the mitochondrial outer membrane. *Biochem J*, **341**, 777-784.
- López-Viñas E, Bentebibel A, Gurunathan C, Morillas M, de Arriaga D, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Gómez-Puertas P (2007) Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem*, **282**, 18212-18224
- Woldegiorgis G, Shi J, Zhu H, Arvidson DN (2000) Functional characterization of mammalian mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast Pichia pastoris. *J Nutr*, **130**, 310S-314S
- Faye A, Borthwick K, Esnous C, Price NT, Gobin S, Jackson VN, Zammit VA, Girard J, Prip-Buus C (2005) Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity. *Biochem J*, **387**, 67-76
- Borthwick K, Jackson VN, Price NT, Zammit VA (2006) The mitochondrial intermembrane loop region of rat carnitine palmitoyltransferase 1A is a major determinant of its malonyl-CoA sensitivity. *J Biol Chem*, **281**, 32946-32952
- Jenei ZA, Borthwick K, Zammit VA, Dixon AM (2009) Self-associatSelf-association of transmembrane domain 2 (TM2), but not TM1, in carnitine palmitoyltransferase 1A: role of GXXXG(A) motifs.ion of Transmembrane Domain 2 (TM2), but Not TM1, in Carnitine Palmitoyltransferase 1A ROLE OF GXXXG(A) MOTIFS *J Biol Chem*, **284**, 6988-6997
- Rao JN, Warren GZ, Estolt-Povedano S, Zammit VA, Ulmer TS (2011) An Environment-dependent Structural Switch Underlies the Regulation of Carnitine Palmitoyltransferase 1A. J Biol Chem, 286, 42545-42554
- Mynatt RL, Greenhaw JJ, Cook GA (1994) Cholate extracts of mitochondrial outer membranes increase inhibition by malonyl-CoA of carnitine palmitoyltransferase-I by a mechanism involving phospholipids. *Biochem J*, **299**, 761-767
- Kolodziej MP, Zammit VA (1990) Sensitivity of inhibition of rat liver mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA to chemical- and temperature-induced changes in membrane fluidity. *Biochem J*, 272, 421-425
- 24. Faye A, Esnous C, Price NT, Onfray MA, Girard J, Prip-Buus C (2007) Rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 forms an oligomeric complex within the outer

mitochondrial membrane. J Biol Chem, 282, 26908-26916

- Jenei ZA, Warren GZ, Hasan M, Zammit VA, Dixon AM (2011) Packing of transmembrane domain 2 of carnitine palmitoyltransferase-1A affects oligomerization and malonyl-CoA sensitivity of the mitochondrial outer membrane protein. *FASEB J*, 25, 4522-4530
- Lee K, Kerner J, Hoppel CL (2011) Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) Is Part of an Outer Membrane Fatty Acid Transfer Complex. *J Biol Chem*, 286, 25655-25662
- 27. Turkaly P, Kerner J, Hoppel C (1999) A 22 kDa polyanion inhibits carnitine-dependent fatty acid oxidation in rat liver mitochondria. *FEBS Lett*, **460**, 241-245.
- Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD (1996) Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem*, **271**, 6972-6977
- 29. Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H (1995) High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett*, **363**, 41-45
- Price N, van der Leiji F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 80, 433-442
- 31. Morillas M, Gómez-Puertas P, Roca R, Serra D, Asins G, Valencia A, Hegardt FG (2001) Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity. *J Biol Chem*, **276**, 45001-45008.
- Morillas M, Gómez-Puertas P, Rubí B, Clotet J, Ariño J, Valencia A, Hegardt FG, Serra D, Asins G (2002) Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem*, **277**, 11473-11480
- 33. Swanson ST, Foster DW, McGarry JD, Brown NF (1998) Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues. *Biochem J*, **335**, 513-519
- Jackson VN, Cameron JM, Fraser F, Zammit VA, Price NT (2000) Use of six chimeric proteins to investigate the role of intramolecular interactions in determining the kinetics of carnitine palmitoyltransferase I isoforms. *J Biol Chem*, **275**, 19560-19566

- Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asaumi M, Matsumoto S, Cha SH, Shimokawa T, Lane MD (2006) The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7282-7287
- Gao S, Zhu G, Gao X, Wu D, Carrasco P, Casals N, Hegardt FG, Moran TH, Lopaschuk GD (2011) Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 9691-9696
- Carrasco P, Sahún I, McDonald J, Ramírez S, Jacas J, Gratacós E, Sierra AY, Serra D, Herrero L, Acker-Palmer A, Hegardt FG, Dierssen M, Casals N (2012) Ceramide levels regulated by carnitine palmitoyltransferase 1C control dendritic spine maturation and cognition. *J Biol Chem*, **287**, 21224-21232
- McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW (1978) Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. J Biol Chem, 253, 4128-4136
- 39. McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW (1983) Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J*, **214**, 21-28
- 40. Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD (1993) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem*, **268**, 5817-5822
- Brown NF, Esser V, Foster DW, McGarry JD (1994) Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase I in yeast establishes that catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide. *J Biol Chem*, **269**, 26438-26442
- 42. de Vries Y, Arvidson DN, Waterham HR, Cregg JM, Woldegiorgis G (1997) Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, **36**, 5285-5292
- Prip-Buus C, Cohen I, Kohl C, Esser V, McGarry JD, Girard J (1998) Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett*, **429**, 173-178
- Zhu H, Shi J, de Vries Y, Arvidson DN, Cregg JM, Woldegiorgis G (1997) Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I. *Arch Biochem Biophys*, **347**, 53-61
- 45. Gao X, Li K, Hui X, Kong X, Sweeney G, Wang Y, Xu A, Teng M, Liu P, Wu D (2011) Carnitine palmitoyltransferase 1A prevents fatty acid-induced adipocyte dysfunction

through suppression of c-Jun N-terminal kinase. Biochem J, 435, 723-732

- Henique C, Mansouri A, Fumey G, Lenoir V, Giard J, Bouilaud F, Prip-Buus C, Cohen I (2010) Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **285**, 36818-36827
- Sebastián D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG (2007) CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. Am J Physiol Metab, 292, E677-E686
- Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Cregg JM, Woldegiorgis G (1998) Deletion of the conserved first 18 N-terminal amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA sensitivity and binding. *Biochemistry*, **37**, 11033-11038
- Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Woldegiorgis G (2000) The first 28 N-terminal amino acid residues of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I are essential for malonyl CoA sensitivity and high-affinity binding. *Biochemistry*, **39**, 712-717.
- 50. Dai J, Zhu H, Shi J, Woldegiorgis G (2000) Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity. *J Biol Chem*, **275**, 22020-22024
- Dai J, Zhu H, Woldegiorgis G (2003) Leucine-764 near the extreme C-terminal end of carnitine palmitoyltransferase I is important for activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 758-763
- 52. Napal L, Dai J, Treber M, Haro D, Marrero PF, Woldegiorgis G (2003) A single amino acid change (substitution of the conserved Glu-590 with alanine) in the C-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase I increases its malonyl-CoA sensitivity close to that observed with the muscle isoform of the enzyme. *J Biol Chem*, **278** 34084-34089
- 53. Zhu H, Shi J, Treber M, Dai J, Arvidson DN, Woldegiorgis G (2003) Substitution of glutamate-3, valine-19, leucine-23, and serine-24 with alanine in the N-terminal region of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl CoA inhibition and binding. *Arch Biochem Biophys*, **413**, 67-74
- Ogawa E, Kanazawa M, Yamamoto S, Ohtsuka S, Ogawa A, Ohtake A, Takayanagi M, Kohno Y (2002) Expression analysis of two mutations in carnitine palmitoyltransferase IA deficiency. *J Hum Genet*, **47**, 342-347
- 55. Matsuo T, Yamamoto A, Yamamoto T, Otsuki K, Yamazaki N, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y (2010) Replacement of C305 in heart/muscle-type isozyme of human carnitine palmitoyltransferase I with aspartic acid and other amino acids. *Biochem Genet*, **48**, 193-201
- 56. Liu H, Zheng G, Treber M, Dai J, Woldegiorgis G (2005) Cysteine-scanning

mutagenesis of muscle carnitine palmitoyltransferase I reveals a single cysteine residue (Cys-305) is important for catalysis. *J Biol Chem*, **280**, 4524-4531

第2章 ラットの筋型 CPT1 の COS7 細胞発現系と酵母発現系の比較

2-1 諸言

ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸のβ酸化の律速酵素である CPT1 は、CPT1a、CPT1b、 CPT1cの3種類のアイソザイムが存在する[1-4]。これらのアイソザイムは、それぞれ組織選択的 な発現を示すことから、各組織における脂肪酸代謝の特性の理解を目的として、個々のアイソザ イムの特性について盛んに解析が行われている。CPT1 アイソザイムは界面活性剤によりミトコン ドリア外膜から可溶化すると失活するため、CPT1 アイソザイムの機能解析では、組織や細胞か ら単離したミトコンドリアが汎用されている。中でも、酵母や動物細胞の発現系を用いた解析が汎 用されるようになり、CPT1 アイソザイムの機能解析に大きく貢献してきた。これらの発現系を用い て CPT1 アイソザイムのアミノ酸変異体を調製することにより、CPT1 アイソザイムの特性に重要 アミノ酸が数多く同定されてきた[5, 6]。

過去に解析された CPT1 アイソザイムの変異体の多くは、同じ変異体を酵母に発現させた場合 と動物細胞に発現させた場合とでは同じ挙動を示す。例えば、ラットの CPT1a の 5 番目のヒスチ ジンをアラニンに置換した変異体 H5A は、酵母と動物細胞のどちらに発現させた場合においても マロニル CoA 感受性の低下を示す[7, 8]。しかしながら、過去に、ヒト CPT1b の 305 番目のシス テインをアラニンに置換した変異体 C305 を酵母に発現させた場合と動物細胞に発現させた場合 では異なる挙動を示すことが報告された[9,10]。これらの報告において、動物細胞に発現させた C305 は、野生型と比較して CPT1 活性と発現レベルの低下がみられたのに対し、酵母に発現さ せた C305 は、野生型と比較して CPT1 活性の低下はみられたが、発現レベルはほとんど差がみ られなかった。これらのことから、酵母に発現させた CPT1と動物細胞に発現させた CPT1 は性質 が異なっていることが示唆された。しかしながら、酵母に発現させた CPT1 と動物細胞に発現させ た CPT1 の性質が異なっているのかどうかという問題については未だに解析されていない。この 問題について解答を得ることは、CPT1 の発現系を用いた機能解析において、過去の報告だけで なく、今後行われる解析結果を正確に理解するために極めて重要であると考えられる。そこで本 研究では、解析対象としてラットの CPT1bを選択し、動物細胞の1種である COS7 細胞と酵母の CPT1b 発現系を構築し、両発現系の特性を比較した。解析を行うに当たり、以下の 3 点を比較し た。まず、1 点目として、両発現系の有用性を比較するため、酵母発現系と COS7 細胞発現系で 得られるミトコンドリアタンパク質の収量と収率を比較した。次に、2 点目として、発現させた CPT1b の性質を比較するため、両発現系から調製したミトコンドリア画分の CPT1 活性とマロニ ル CoA 感受性を比較した。さらに、3 点目として、調製したミトコンドリア画分についてより詳細に 比較するため、発現させた CPT1b のタンパク質量を比較した。

2-2 結果

2-2-1 COS7 細胞発現系と酵母発現系で得られるミトコンドリアタンパク質の収量と収率

まず、CPT1b の COS7 細胞発現系と酵母発現系を構築した。本研究では、以下に示す条件に おいて、CPT1bを発現させた COS7 細胞および酵母からミトコンドリア画分を調製した。COS7 細 胞発現系では、100 mm ディッシュ 2 枚で 80%コンフルエントに達するまで培養した COS7 細胞に、 CPT1b をコードする pCXN2 ベクター[11]を導入し、導入してから 48 時間後の細胞からミトコンド リア画分を調製した。一方、酵母発現系では、CPT1b をコードする pYO326 ベクターで形質転換 した酵母を 500 ml の YPgal 培地において O.D.600 が約 1.0 に達するまで培養した酵母からミトコ ンドリア画分を調製した。続いて、両発現系から得られたミトコンドリアタンパク質の収量を比較し た(Table 2-1)。その結果、酵母は COS7 細胞よりも約7 倍のタンパク質量を有する細胞ライセート を用いてミトコンドリア画分を調製したにも拘らず、得られたミトコンドリアタンパク質の量に顕著な 違いはみられなかった。続いて、ミトコンドリアタンパク質の収率を比較したところ、COS7 細胞の 方が酵母よりも高いことが示された。

Table 2-1

CPT1bの COS7 細胞発現系と酵母発現系から得られるミトコンドリアタンパク質の収量と収率

	発	現系
_	COS7 細胞	酵母
細胞数の目安	8.0×10^{6}	O.D. ₆₀₀ が約 1.0
細胞ライセート(mg)	3.40±0.54	23.4±4.7
ミトコンドリア画分(mg)	0.57±0.02	0.86±0.12
収率(%)	16.8	3.68

独立した実験を3回行った結果の平均値±標準偏差で示す。

2-2-2 CPT1b を発現させた COS7 細胞と酵母から調製したミトコンドリア画分の CPT1 活性とマロニル CoA 感受性の比較

続いて、CPT1b を発現させた COS7 細胞のミトコンドリア画分と CPT1b を発現させた酵母のミ トコンドリア画分の CPT1 活性とマロニル CoA 感受性を比較した。まず、両発現系から調製したミ トコンドリア画分の CPT1 活性を測定した(Fig. 2-1A)。その結果、COS7 細胞から調製したミトコン ドリア画分よりも酵母から調製したミトコンドリア画分の方がわずかに高い CPT1 活性を示した。ま た、ベクターのみを導入した COS7 細胞や酵母から単離したミトコンドリア画分における CPT1 活 性は、ほぼバックグラウンドレベルであった(データは示さない)。これらのことから、COS7 細胞に 発現させた CPT1b よりも酵母に発現させた CPT1b の方が高い酵素活性を有することが示唆さ れた。次に、CPT1b を発現させた COS7 細胞と酵母から調製したミトコンドリア画分のマロニル CoA 感受性を測定した(Fig. 2-1B)。その結果、比較的低濃度である 1 μM のマロニル CoA に対 する感受性は、COS7 細胞発現系から調製したミトコンドリア画分の方が高かったが、どちらのミト コンドリア画分の CPT1 活性もマロニル CoA の濃度依存的に阻害されることが示された。



Fig. 2-1 CPT1bを発現させたCOS7細胞および酵母から調製したミトコンドリア画分の CPT1活性

(A) CPT1bを発現させたCOS7細胞または酵母から調製したミトコンドリア画分30 μgを用いてCPT1活性を測定した。各ミトコンドリア画分のCPT1活性は、バックグラウンドとしてベクターを導入したCOS7細胞または酵母から調製したミトコンドリア画分のCPT1活性を差し引いて算出した。独立した実験を3回行った結果の平均値±標準偏差で示す。

(B) CPT1bを発現させたCOS7細胞または酵母から調製したミトコンドリア画分30 μgを用 いてマロニルCoA感受性を測定した。縦軸は、マロニルCoA非存在下における各ミトコンドリ ア画分のCPT1活性を100%として示す。独立した実験を3回行った結果の平均値±標準偏差 で示す。

2-2-3 大腸菌発現系を用いた CPT1b の標準タンパク質の調製

さらに、CPT1b を発現させた COS7 細胞および酵母から調製したミトコンドリア画分の特性をよ り詳細に評価するため、発現させた CPT1b の発現レベルを定量的に比較することを試みた。そこ でまず、発現させた CPT1b のタンパク質量を定量的に評価するため、大腸菌発現系を用いて CPT1b の標準タンパク質の調製を行った。まず、CPT1b をコードする pCold IIIベクターを大腸菌 株 OrigamiB(DE3)pLysS に導入した。続いて、プラスミドを導入した大腸菌を15℃、IPTG 存在下 で培養することにより、CPT1b の発現を誘導した後、CPT1b を発現させた大腸菌から不溶性画 分を粗精製した。続いて、CPT1b の発現を確認するため、調製した不溶性画分を SDS-PAGE に 供した後、抗 CPT1b 抗体を用いたウェスタンブロッティングと CBB 染色を行った(Fig. 2-2)。その 結果、ウェスタンブロッティングと CBB 染色のどちらの場合においても、CPT1b の推定分子量で ある約 88 kDa 付近に明瞭なバンドが検出された。このことから、CPT1b の良好な標準タンパク質 が調製できていることが確認された。



Fig.2-2 大腸菌発現系を用いて調製したリコンビナントCPT1b

大腸菌発現系を用いて調製したリコンビナントCPT1bをSDS-PAGEに供した後、抗CPT1b 抗体を用いたウェスタンブロッティングとCBB染色を行った。VのレーンにはpColdⅢベクター のみを導入した大腸菌から同様の実験を行い調製した不溶性画分を泳動した。リコンビナント CPT1bを、ウェスタンブロッティングには60 ng/レーン、CBB染色には1.2 µg/レーンそれぞれ 泳動した。 続いて、調製した CPT1b の標準タンパク質を用いて COS7 細胞に発現させた CPT1b と酵母に 発現させた CPT1b の発現レベルを定量的に評価することを試みた。CPT1b の標準タンパク質と CPT1bを発現させた COS7 細胞および酵母から調製したミトコンドリア画分を SDS-PAGE に供し た後、抗 CPT1b 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った(Fig. 2-3)。その結果、まず、CBB 染色により調製したミトコンドリア画分を等量ずつ解析に使用できていることが確認された。また、 ミトコンドリアのマーカータンパク質であるβ-subunit of F1ATPase (F1β)の結果から、各発現系に おいて、解析に供したミトコンドリア画分の量は CPT1b を発現させた場合と発現させていない場 合でほとんど違いはないことが確認された。そこで続いて、抗 CPT1b 抗体を用いてウェスタンブロ ッティングを行った。その結果、ベクターのみを導入した COS7 細胞や酵母からはシグナルが検出 されなかったのに対し、CPT1b を発現させた COS7 細胞および酵母から明瞭なシグナルが検出 された。このことから、両発現系において CPT1b が発現していることが確認された。

2-2-4 COS7 細胞に発現させた CPT1b と酵母に発現させた CPT1b のタンパク質濃度の比較



Fig.2-3 COS7細胞に発現させたCPT1bと酵母に発現させたCPT1bのタンパク質量の解析 大腸菌発現系を用いて調製したCPT1bの標準タンパク質30 ngとCPT1bを発現させた COS7細胞および酵母から単離したミトコンドリアをSDS-PAGEに供した後、CPT1bに対する 特異抗体とF₁βに対する特異抗体を用いたウェスタンブロッティングおよびCBB染色を行った。 Vのレーンには、ベクターを導入したCOS7細胞や酵母から調製したミトコンドリア画分を泳動 した。CPT1bの検出にはミトコンドリアタンパク質5 μg/レーン、F₁βの検出とCBB染色にはミト コンドリアタンパク質10 μg/レーンそれぞれ泳動した。 そこで続いて、CPT1b の標準タンパク質のシグナル強度と COS7 細胞および酵母に発現させた CPT1b のシグナル強度から、COS7 細胞や酵母に発現させた CPT1b のタンパク質量を算出した。その結果、発現させた CPT1b は、COS7 細胞のミトコンドリアにおいては 9.84±0.94 ng/µg of mitochondrial protein、酵母のミトコンドリアにおいて 2.7±0.66 ng/µg of mitochondrial protein 存在していることが示された。このことから、発現させた CPT1b の全ミトコンドリアタンパク質における割合は、COS7 細胞において約 1.0%、酵母において約 0.3%であることが判明した。

ここまでの解析から、CPT1b の COS7 細胞発現系と酵母発現系から調製したミトコンドリア画 分について、それらのCPT1活性と存在するCPT1bのタンパク質濃度が明らかとなった。そこで、 発現させた CPT1b の酵素活性をより詳細に比較するため、得られたこれらの結果を基に、酵母 に発現させた CPT1bと COS7 細胞に発現させた CPT1bの特異活性を算出した(Table 2-2)。そ の結果、COS7 細胞に発現させた CPT1bの特異活性は 0.62 µmol/mg protein/min、酵母に発 現させた CPT1bの特異活性は 3.00 µmol/mg protein/min であることが示された。このことから、 COS7 細胞に発現させた CPT1bよりも酵母に発現させた CPT1bの方が約5倍高い特異活性を 有することが判明した。

Table 2-2

CPT1b を発現させた COS7 細胞および酵母から調製したミトコンドリア画分の CPT1 活性と 発現させた CPT1b のタンパク質濃度と特異活性

	発現系	
	COS7 細胞	酵母
ミトコンドリア画分の CPT1 活性	6 02 2 02	9 70 10 90
(nmol/mg mitochondrial protein/min)	nol/mg mitochondrial protein/min)	8.70±0.80
ミトコンドリア画分における CPT1b のタンパク質濃度	0.84+0.04	2 70 10 66
(ng/µg mitochondrial protein)	9.64±0.94	2.70±0.66
発現させた CPT1b の特異活性	0.62	2.00
(µmol/mg protein/min)	0.02	3.00

2-3 考察

CPT1アイソザイムの機能解析において、CPT1アイソザイムやそのアミノ酸変異体を酵母や動物細胞に発現させるという手法が汎用される。しかしながら、同じ CPT1 アイソザイムの変異体であっても、動物細胞に発現させた場合と酵母に発現させた場合では異なる挙動を示すことがあるにも拘らず、それぞれの発現系を用いて発現させた CPT1 の性質が異なっているかどうかについては未だ解析されていない。従って、動物細胞や酵母における CPT1の発現系を用いて行われた解析結果を正確に理解するためにも、動物細胞に発現させた CPT1 と酵母に発現させた CPT1 の性質が異なっているかどうかを明らかにすることは極めて重要であると考えられる。そこで本研究では、動物細胞の1種である COS7 細胞と酵母にラットの CPT1b を発現させ、両発現系の特性を比較した。

まず、COS7 細胞発現系と酵母発現系の有用性を比較するため、両発現系から得られるミトコ ンドリアタンパク質の収量と収率を比較した(Table 2-1)。その結果、得られる総タンパク質量は COS7 細胞よりも酵母の方が顕著に多かったのに対し、得られるミトコンドリア画分の収率は酵母 の方が低かった。このことから、得られたミトコンドリア画分の純度は COS7 細胞よりも酵母の方 が高いことが示唆された。得られるミトコンドリア画分の純度を高めるためには、ミトコンドリア画分 の調製に用いる細胞数を増加させることが有用であると考えられる。そのため、COS7 細胞発現 系においても、実験に使用するディッシュの枚数を増加すれば、より純度の高いミトコンドリア画分

続いて、発現させた CPT1b の性質を比較するため、COS7 細胞発現系と酵母発現系から調製 したミトコンドリア画分の CPT1 活性を比較した(Fig. 2-1)。その結果、CPT1 活性については、 CPT1b を発現させた COS7 細胞よりも酵母の方がやや高く(Fig. 2-2)、COS7 細胞で発現させた CPT1b と酵母で発現させた CPT1b の酵素活性は異なっていることが示唆された。さらに、COS7 細胞に発現させた CPT1b と酵母に発現させた CPT1b の発現レベルを比較したところ(Fig. 2-3)、 COS7 細胞の方が酵母よりも発現レベルが約 3 倍高かった。このことから、両発現系から調製し たミトコンドリア画分の CPT1 活性の違いは、発現させた CPT1b の発現レベルによるものではなく、 発現させた CPT1b の性質の違いによるものであることが示された。本研究において、何故、 CPT1b が酵母よりも COS7 細胞において高かったのかついては不明である。しかしながら、過去 に、Swanson らは、ラットの CPT1a を酵母や動物細胞に発現させたところ、動物細胞の方が CPT1aの発現レベルが高かったことを報告している[12, 13]。このことから、CPT1アイソザイムは、 動物細胞の方が酵母よりも発現しやすいことが示唆される。また、この原因として、酵母には内在 性の CPT1 が存在しないため、本来存在しないタンパク質を酵母に発現させるために、動物細胞 よりも酵母において CPT1 が発現しにくい可能性が考えられる。

本研究から、COS7 細胞に発現させた CPT1b と酵母に発現させた CPT1b は特異活性が異なることが判明した。また、マロニル CoA 感受性についても、比較的低濃度において酵母発現系と動物細胞発現系で違いがみられた。では何故、COS7 細胞に発現させた CPT1b と酵母に発現さ

せた CPT1b とでは特異活性やマロニル CoA 感受性が異なっているのであろうか。この原因とし て、以下の3点が考えられる。1点目として、発現させた CPT1b が受ける翻訳後修飾が異なって いるためである可能性が考えられる。過去に、CPT1a や CPT1b はリン酸化やアセチル化といっ た翻訳後修飾を受けること、およびこれらの翻訳後修飾が CPT1 活性やマロニル CoA 感受性に 影響を与えることが報告されている[14-18]。これらの翻訳後修飾の内、ラットの CPT1a の CPT1 活性に影響を与えるものとして 741 番目のセリンのリン酸化が知られており、このセリンがリン酸 化されることにより CPT1a の酵素活性が上昇することが知られている。この 741 番目のセリンは ラットのCPT1bにおいても保存されていることから、このセリン残基のリン酸化の有無の違いが発 現させた CPT1b の特異活性に影響を与えた可能性が考えられる。また、本研究において、両発 現系に発現させた CPT1b の SDS-PAGE による移動度を比較したところ(Fig. 2-3)、COS7 細胞 に発現させた CPT1bの方が酵母に発現させた CPT1bよりもわずかに速い移動度を示した。この ことからも、発現させた CPT1b が受ける翻訳後修飾が異なっている可能性が支持される。2 点目 は、酵母のミトコンドリアと動物細胞のミトコンドリアとの間でミトコンドリア外膜のリン脂質の組成 が異なっているためである可能性が考えられる。ラットの肝臓ミトコンドリアを用いた解析から、 CPT1aの酵素活性はミトコンドリア膜を構成するリン脂質や脂質膜の流動性に影響を受けると考 えられている[19-22]。従って、酵母と動物細胞においてミトコンドリア膜を構成する脂質組成が異 なっているために、発現させた CPT1b の特異活性やマロニル CoA が異なっていた可能性が考え られる。3 点目は、カルニチンシャトルシステムの影響による可能性である。酵母のミトコンドリア はカルニチンシャトルが存在しないのに対し、動物細胞のミトコンドリアはカルニチンシャトルが存 在する[6]。そのため、動物細胞のミトコンドリアにおいて、CPT1 によって生じたパルミトイルカル ニチンは、内膜に存在する CAC によりマトリクスに輸送された後、CPT2 によりパルミトイル CoA とカルニチンに分解される。このため、動物細胞に発現させた CPT1 の酵素活性が酵母に発現さ せた場合と比較して低くなった可能性が考えられる。

本研究は、CPT1の酵母や動物細胞の発現系を用いた CPT1の機能解析における基盤の構築 を目的として、ラットの CPT1 アイソザイムの 1 つである CPT1b を COS7 細胞発現系と酵母発現 系の特性を比較した。その結果 COS7 細胞に発現させた CPT1b と酵母に発現させた CPT1b の 特異活性は異なることが示された。本研究は、酵母や動物細胞の CPT1 の発現系を用いて行わ れた過去の解析結果だけでなく、今後これらの発現系を用いて行われる CPT1 の機能解析の結 果を正確に理解する上で極めて重要であると考えられる。今後は、COS7 細胞に発現させた CPT1b と酵母に発現させた CPT1b の特異活性が異なっている原因を明らかにすることにより、 CPT1 の特性に影響を及ぼす因子を同定するしたいと考えている。具体的には、質量分析による 発現させた CPT1b の翻訳後修飾の同定や酵母に CAC や CPT2を発現させることによる酵母に 発現させた CPT1b の酵素活性への影響について解析したい。

21

2-4 実験方法

2-4-1 試薬および器具

制限酵素、修飾酵素:宝酒造(株)、TOYOBO、ニッポンジーン COS7 細胞: Health Science Research Resources Bank (Osaka) Dulbecco's MEM (DMEM):日水 fetal calf serum (FCS): Equitech-Bio Opti-MEM reduced Serum Medium: Gibco LipofectAmine 2000 transfection reagent: Invitrogen Corporation fatty free bovine serum albumin (BSA): SIGMA reduced glutathione: Wako palmitoyl-CoA: SIGMA L-carnitine: SIGMA L-[methyl-³H]carnitine hydrocholride (specific radioactivity: mCi/ml): 2,5'-diphenyloxazole: nacalai tesque 2,2'-phenylenebis: nacalai tesque toluene: nacalai tesque Triton X-100: nacalai tesque Nitrocellulose filtet: Schleicher and Schuel X 線フィルム: FUJI FILM

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

2-4-2 CPT1b をコードする cDNA 断片の調製

ラットの CPT1b の全アミノ酸配列をコードする cDNA は、過去に当研究室がクローニングしたラ ットの CPT1b の cDNA 全長(DS112-36 [3])が組み込まれたベクターを鋳型として用い、Table 2-3 に示すプライマーを用いて PCR を行った。その後、得られた cDNA 断片を pCold皿ベクター、 pCXN2 ベクター、pYO326-yA2P ベクター[23]にそれぞれサブクローニングした。

Table 2-3 ラット CPT1b の構築に用いた合成オリゴの塩基配列

Primer name	Nucleotide sequence	Directions ¹⁾
GE2321	ACTAAACCCCCATATGGCGGAAGCACAC	D
GE2324	TGTGGATCCTGGTCTCAGCTGTCAGTC	U

¹⁾D と U はそれぞれ下流(downstream)と上流(upstream)方向のプライマーとして用いたことを示 す。

2-4-3 特異抗体の調製

CPT1b および F₁βに特異的な配列 TGSHKKQDLQDLFRKASEC (アミノ酸配列 621-638 に相 当、Accession No. BAA07733)および VPADDLTDPAPATTFAHLDATTC(アミノ酸配列 362-383 に相当、Accession No. AAA40778)のペプチドを自動合成装置 PSSM-8 (Shimadzu)により合成 した。合成したペプチドに KLH (pierce, code 77606)を結合させ免疫原性を高めた後、Freund' adjuvand と乳化させ、ウサギ背面部に皮下注射した。さらに追加免疫を施した後、ウサギの頸動 脈から全採血を行い、抗血清を得た。得られた血清をウェスタンブロッティングの一次抗体として 用いた。

2-4-4 リコンビナント CPT1b の調製

まず、ラットの CPT1bをコードする pCold Ⅲベクターを大腸菌株 Origami B(DE3)pLysS に導入 した。続いて、プラスミドを導入した大腸菌を LB 培地において O.D.600 が 0.4 に達するまで培養し た。その後、大腸菌を 15℃で 30 分間インキュベートした後、IPTGを 0.4 mM となるように添加し、 さらに 15℃で 15 時間インキュベートすることにより、リコンビナント CPT1b の発現を誘導した。発 現を誘導した大腸菌を 17400 xg、4℃、5min の遠心分離により集菌し、TE 溶液(10 mM Tris-HCI、 1 mM EDTA、pH7.5)に懸濁した後、凍結融解と超音波処理により大腸菌を破砕した。この大腸 菌の破砕液を 17400 xg、4℃、5 min の遠心分離に供し、得られた沈殿画分を TE に再懸濁してリ コンビナントタンパク質とした。

2-4-5 発現プラスミドの COS7 細胞への導入

COS7 細胞は、10% FCS、0.22%炭酸ナトリウム、4 mM グルタミンを含む DMEM 培地にて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。COS7 細胞への CPT1b の発現ベクターの導入は LipofectAmine 2000 transfection reagentの標準プロトコールに従い、4×10⁶ 個の細胞に対して 20 μ g の発現ベクターを導入した。

2-4-6 COS7 細胞からのミトコンドリア画分の調製

ミトコンドリアは、発現ベクターを導入してから48時間培養した COS7 細胞から単離した。まず、 COS7 細胞を氷冷した 5 mM Tris-HCl、150 mM KCl buffer (pH7.2)に懸濁した。次に、この懸濁 液を 1150 rpm で 10 ストロークホモジナイズすることにより細胞を破砕した後、破砕液を 800 xg、 4°C、10 min の遠心分離に供した。続いて、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに回収し、 沈殿はミトコンドリアの収量を増加させるため、5 mM Tris-HCl、150 mM KCl buffer (pH7.2)に懸 濁後、再びホモジナイズにより破砕し、破砕液を 800 xg、4°C、10 min の遠心分離に供した。この 操作を 3 回繰り返した後、10,000 xg、4°C、10 min の遠心分離に供し、得られた沈殿を 5 mM Tris-HCl、150 mM KCl buffer (pH7.2)に再懸濁し、これをミトコンドリア懸濁液とした。

2-4-7 酵母の形質転換

出芽酵母株は W303-1B (MATa ade2-1 leu2-3, 112 his3-22, 15 trp1-1, ura3-1 can1-100)を 使用した。この酵母株を、YP 培地(1%乾燥酵母エキス、2%ポリペプトン)および炭素源として 2% グルコースを用いて培養した後、酢酸リチウム法[24]を用いて、pYO326-yA2P/CPT1b を酵母株 に導入して形質転換した。

2-4-8 酵母からのミトコンドリア画分の調製

pYO326-yA2P/CPT1b により形質転換した酵母株を YP 培地および炭素源として 2%ガラクト ースを含む培地を用いて O.D.600 が 0.8~1.2 に達するまで培養した酵母細胞からミトコンドリアを 単離した。まず、酵母細胞を DTT で処理した後、Zymolyase 20T で処理することによりスフェロプ ラスト化した。次に、これを 1150 rpm で 10 ストロークホモジナイズすることにより酵母を破砕した。 続いて、この破砕液を 800 xg、4℃、5 min で遠心分離して上清を回収した。回収した上清を 6800 xg、4℃、10 min で遠心分離して得られた沈殿を酵母ミトコンドリア懸濁液(0.6 M マンニトール、 10 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA)に懸濁し、これを酵母ミトコンドリア懸濁液とした。

2-4-9 タンパク質溶液の定量

COS7 細胞のミトコンドリア懸濁液および酵母のミトコンドリア懸濁液について、タンパク質濃度は BSA を標準物質として BCA 法を用いて定量した。

2-4-10 SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング

SDS-PAGE は Laemmli らの方法に従って行った[25]。また、ウェスタンブロッティングは常法に 準じて行った[24]。まず、SDS-PAGE 後のゲル中のタンパク質を、セミドライ式ブロッティング装置 を用いて Nitrocellulose filter (NCF)に転写した。次に、転写後の NCF を 0.3%スキムミルク(雪印 乳業)が含まれる TS 溶液 (20 mM NaPi (pH7.4)、150 mM NaCl、0.05% Tween20)中で、室温、 1時間インキュベーションした。続いて、CPT1b および F₁βに対する特異抗体を 0.3%スキムミルク 入り PBST 溶液中にてそれぞれ 2000 倍、10000 倍希釈し、この溶液中で 1 時間インキュベーシ ョンした後、TS 溶液で 3 回洗浄した。さらに、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ 抗体を 0.3%スキムミルク入り TS 溶液中でそれぞれ 2000 倍、10000 倍希釈し、この溶液中で 1 時間インキュベーションした。NCF を TS 溶液で 5 回洗浄した後、Enhanced chemiluminescence (ECL) kit にて、抗体のペルオキシダーゼ活性により生じた化学発光を X 線フィルムに感光させる ことで、目的のタンパク質を検出した。

また、SDS-PAGE 分離後のゲルを 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)を用いて染色 し、タンパク質を可視化した。

2-4-10 CPT1 の活性測定

CPT1の酵素活性は Demaugre ら[26]および ljulst ら[27]の方法に準じて行った。まず、30℃に

温めた 450 µl の reaction buffer (50 mM Hepes、150 mM KCl、1 mM EDTA、 o.25 mM reduced glutathion、1.3 mg/ml fatty free BSA、 0.5 mM L-carnitine、 0.05 mM palmitoyl CoA、 2 mM KCN、 0.5 µCi L-[methyl-³H] carnitine)にミトコンドリア懸濁液を 50 µl 加えた後、20 min インキュベーションした。その後、1.2 M HCl を 500 µl 加え、反応を停止した。続いて、 n-butanol を 500 µl 加えて混和した後、 15,000 xg、 5 min の遠心分離に供し、上清の butanol 層を回収した。 回収した上清を、あらかじめ DDW 40 µl と DDW 飽和 n-butanol 200 µl が混和してある溶液に加え、混和した後、 15000 xg、 5 min の遠心分離に供した。その後、上清を 200 µl 回収した後、液体 シンチレーションカクテル 3 ml に加えた後、³H の放射活性を液体シンチレーションカウンタにより 測定した。

2-5 参考文献

- 1. McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, **244**, 1-14
- Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD (1996) Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem*, **271**, 6972-6977
- Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H (1995) High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett*, **363**, 41-45
- Price N, van der Leiji F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 80, 433-442
- Brown NF, Mullur RS, Subramanian I, Esser V, Bennett MJ, Saudubray JM, Feigenbaum AS, Kobari JA, Macleod PM, McGarry JD, Cohen JC (2001) Molecular characterization of L-CPT I deficiency in six patients: insights into function of the native enzyme. *J Lipid res*, **42**, 1134-1142
- Woldegiorgis G, Shi J, Zhu H, Arvidson DN (2000) Functional characterization of mammalian mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast Pichia pastoris. *J Nutr*, **130**, 310S-314S
- Swanson ST, Foster DW, McGarry JD, Brown NF (1998) Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues. *Biochem J*, 335, 513-519
- Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Woldegiorgis G (1999) A single amino acid change (substitution of glutamate 3 with alanine) in the N-terminal region of rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA inhibition and high affinity binding. *J Biol Chem*, **274**, 9421-9426
- Matsuo T, Yamamoto A, Yamamoto T, Otsuki K, Yamazaki N, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y (2010) Replacement of C305 in heart/muscle-type isozyme of human carnitine palmitoyltransferase I with aspartic acid and other amino acids. *Biochem Genet*, 48, 193-201
- Liu H, Zheng G, Treber M, Dai J, Woldegiorgis G (2005) Cysteine-scanning mutagenesis of muscle carnitine palmitoyltransferase I reveals a single cysteine residue (Cys-305) is important for catalysis. *J Biol Chem*, **280**, 4524-4531

- 11. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, **108**, 193-199
- Brown NF, Esser V, Foster DW, McGarry JD (1994) Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase I in yeast establishes that catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide. *J Biol Chem*, **269**, 26438-26442
- Swanson ST, Foster DW, McGarry JD, Brown NF (1998) Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues. *Biochem J*, **335**, 513-519
- Kemer J, Distler JM, Minkler P, Parland W, Peterman SM, Hoppel CL (2004) Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme. *J Biol Chem*, **279**, 41104-41113
- Distler AM, Kerner J, Hoppel CI (2007) Post-translational modifications of rat liver mitochondrial outer membrane proteins identified by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, **1774**, 628-636
- Distler JM, Kerner J, Hoppel CL (2008) Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes. *Proteomics*, 8, 4066-4082
- Shama V, Abraham T, So A, Allard MF, McNeill JH (2010) Functional effects of protein kinases and peroxynitrite on cardiac carnitine palmitoyltransferase-1 in isolated mitochondria. *Mol Cell Biochem*, **337**, 223-237
- Kerner J, Lee K, Hoppel CL (2011) Post-translational modifications of mitochondrial outer membrane proteins. *Free Radic, Res*, **45**, 16-28
- Kashfi K, Mynatt RL, Park EA, Cook GA (2011) Membrane microenvironment regulation of carnitine palmitoyltranferases I and II. *Biochem Soc Trans*, **39**, 833-837
- Rao JN, Warren GZ, Estolt-Povedano S, Zammit VA, Ulmer TS (2011) An Environment-dependent Structural Switch Underlies the Regulation of Carnitine Palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem*, **286**, 42545-42554
- Mynatt RL, Greenhaw JJ, Cook GA (1994) Cholate extracts of mitochondrial outer membranes increase inhibition by malonyl-CoA of carnitine palmitoyltransferase-I by a mechanism involving phospholipids. *Biochem J*, **299**, 761-767
- Kolodziej MP, Zammit VA (1990) Sensitivity of inhibition of rat liver mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA to chemical- and temperature-induced changes in membrane fluidity. *Biochem J*, 272, 421-425
- 23. Hashimoto M, Shinohara Y, Majima E, Hatanaka T, Yamazaki N, Terada H (1999) Expression of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria: significantly enhanced expression by replacement of the N-terminal region of the bovine

carrier by the corresponding regions of the yeast carriers. *Biochim Biophys Acta*, **1409**, 113-124

- 24. Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol, **153**, 163-168
- 25. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- 26. Demaugre F, Bonnefont JP, Colonna M, Cepanec C, Leroux JP, Saudubray JM (1991) Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatomuscular symptoms and sudden death. Physiopathological approach to carnitine palmitoyltransferase II deficiencies. *J Clin Invest*, **87** 859-864
- 27. IJIst L, Mandel H, Oostheim W, Ruiter JP, Gutman A, Wanders RJ (1998) Molecular Basis of Hepatic Carnitine Palmitoyltransferase I Deficiency. *J Clin Invest*, **102**, 527-531

第3章 発現させた CPT1 アイソザイムの特異活性の比較

3-1 諸言

CPT1 は、CPT1a、CPT1b、CPT1c の 3 種類のアイソザイムが存在し(Fig.3-1)、いずれのアイ ソザイムについてもその機能解析が盛んに行われている[1-4]。中でも、CPT1a と CPT1b につい ては、これまでに数多くの解析がなされており、CPT1 活性やマロニル CoA 感受性に重要な領域 やアミノ酸が数多く同定されている[5-8]。このように、CPT1a や CPT1b の特性に関する知見は集 積しつつあるのに対し、CPT1c の特性については、未だに明確な知見が得られていない。

CPT1c は 2000 年に Price らによって、CPT1a および CPT1b と塩基配列とアミノ酸配列の一 致率が高い遺伝子をデータベースから探索することにより同定された[9]。これまでに CPT1c につ いて得られている知見の多くは、ノックアウトマウスやノックインマウスを用いた解析により得られ たものである。これらの解析から、CPT1c は摂食をコントロールするホルモンであるレプチンのシ グナル伝達を介した摂食の調節を行うことで、生体内のエネルギー代謝に重要な役割を果たして いると考えられている[10. 11]。また、CPT1c の酵素としての特性を明らかにするため、酵母や動 物細胞の発現系を用いた解析も行われている[9, 10-13]。これらの解析ではいずれも、発現させ た CPT1c の CPT1 活性は発現させた CPT1a よりも顕著に CPT1 活性が低いという結果が得ら れている。しかしながら、これまでに行われた解析において、発現させた CPT1cや CPT1aの発現 レベルを定量的に比較した報告は未だなされていない。そのため、発現させた CPT1c の酵素活 性が低い原因が、CPT1c の特異活性が顕著に低いことによるものであるのか、あるいは、発現さ せた CPT1c の発現レベルが顕著に低いことによるものであるのかという問題について未だ結論 は得られていなかった。この問題について解答を得るため、本研究では、ラットの 3 種類の CPT1 アイソザイムの発現系を構築した後、発現させた CPT1 アイソザイムのタンパク質量とCPT1 活性 を測定することにより、CPT1 アイソザイム間での特異活性を比較することを試みた。解析を行う にあたり、まず、発現させた各 CPT1 アイソザイムを定量的に評価するため、大腸菌発現系を用 いて各 CPT1 アイソザイムの標準タンパク質の調製を行った。続いて、3 種類の CPT1 アイソザイ ムを認識する特異抗体の調製を行った後、得られた特異抗体の各アイソザイムに対する反応性 について標準タンパク質を用いて評価した。このようにして得られた特異抗体と標準タンパク質を 用いて、酵母や動物細胞に発現させた CPT1 アイソザイムの発現レベルを定量的に評価した後、 各アイソザイムの特異活性を比較することを試みた。

1a	$1: {\tt MAEAHQAVAFQFTVTPDGIDLRLSHEALKQICLSGLHSWKKKFIRFKNGIITGVFPANPSSWLIVVVGVI}$
1b	1: MAEAHQAVAFQFTVTPDGVDFRLSREALRHIYLSGINSWKKRLIRIKNGILRGVYPGSPTSWLVVVMATV
lc	1:MAEAHQASSLLSSLSSDGAEVELSSSVWQEIYLSALRSWKRNLWRVWNDFLAGVVPATPLSWLFLFSTIQ
	************ *.***.*.*.**.
1a	71: SSMHAKVDPSLGMIAKISRTLDTT-GRMSSQTKNI-VSG-VLFGTGLWVAVIMTMRYSLKVLLSYHGWMF
1b	$71: {\tt GSNYCKVDISMGLVHCIQRCLPTRYGSYGTPQTETLL-SMVIFSTGVWATGIFLFRQTLKLLLSYHGWMF}$
1c	71:LACLLQLDPSLGLMEKIKELLPDWGGQHHQLQGLLAAAVFASCLWGTLIFTLHVALRLLLSHHGWLL
	.
1a	138: AEHGKMSRSTKTWMAMVKVI.SGRKPMI.YSFOTSI.PRI.PVPAVKDTVSRYI.ESVRPI.MKEEDFORMTAI.AO
1b	140: EMHSKTSHATKIWAICVRLLSSRRPMLYSFOTSLPKLPVPSVPATIHRYLDSVRPLLDDEAYFRMESLAK
1c	138: EPHGTMSSPTKTWLALVRIFSGRHPRLFSFQRALPRQPVPGAQETVRKYLESMRPVLRDDAFDSVVALAN
	. ** **.* . **.* *.*.******. *.
1a	208:DFAVNLGPKLQWYLKLKSWWATNYVSDWWEEYIYLRGRGPLMVNSNYYAMEMLYITPTHIQAARAGNTIH
1b	210: EFQDKIAPRLQKYLVLKSWWATNYVSDWWEEYVYLRGRSPIMVNSNYYAMDFVLIKNTSQQAARLGNTVH
1c	208: DFLRLQAPRLQLYLQLKSWCASNYVSDWWEEFVYLRSRGSLVN-STYYMMDFLYVTPTPLQAARAGNAVH
	.* .*.** ** ****.*.***********.*****.****.*
1a	278: AILLYRRTLDREELKPIRLLGSTIPLCSAQWERLFNTSRIPGEETDTIQHIKDSRHIVVYHRGRYFKVWL
1b	280: AMIMYRRKLDREEIKPVMALGMV-PMCSYQMERMFNTTRIPGKETDLLQHLSESRHVAVYHKGRFFKVWL
1c	$277: {\tt tlllyrhllnrqeipptllmgmrpl-csaqyermfnttripgvekdylchlqdsqhvavfhqgrffrvgt}$
	. *.*. * **.* **.*******
1a	$348: {\tt yhdgrllrpreleqqmqqilddpsepqpgeaklaaltaadrvpwakcrqtyfargknkqsldavekaaff}$
1b	349: YEGSCLLKPRDLEMQFQRILDDTSPPQPGEEKLAALTAGGRVEWAEARQKFFSSGKNKMSLDTIERAAFF
1c	$346: \texttt{HSSNGLLSPRALEQQFQYILDDPSPACPLEEHLAALTAAPRSMWAQVRESVKTHAAT} \\ \textbf{ALETVEGAAFF}$
	. ** ** **.*.* ****.**.*************
1a	418:vtldeseqgyreedpeasidsyaksllhgrcfdrwfdksitfvvfknskiginaehswadapvvghlwey
1b	419:VALDEDSHCYNPDDEA-SLSLYGKSLLHGNCYNRWFDKSFTLISCKNGQLGLNTEHSWADAPIIGHLWEF
1c	414:VSLDSEPAGLTRENPAASLDTYAHTLLTGQGHDRWFDKSFTLIVFSNGKLGLSVEHSWADCPVAGHLWEF
	* *** ***.******.**.
1a	488: VMATDVFQLGYSEDGHCKGDTNPNIPKPTRLQWDIPGECQEVIDASLSSASLLANDVDLHSFPFDSFGKG
1b	488:VLATDTFHLGYTETGHCVGEPNTKLPPPQRMQWDIPEQCQTAIENSYQVAKALADDVELYCFQFLPFGKG
lc	484:TLATECFQLGYATDGHCKGHPDPALPKPQRLQWDLPKQIQPSISLALRGAKTLSGNIDCHVFPFFHFGKS
1a	$558: \verb"Likkcrtspdafiqlalqlahykdmgkfcltyeasmtrlfregrtetvrsctmescnfvqammdpkstae"$
1b	$558: \verb"Likkcrtspdafvqialqlahfrdkgkfcltyeasmtrmfregrtetvrsctsestafvrammtgshkkq"$
1c	554: FIKGCHVSSDSFIQLVLQLAHFRDRGQFCLTYESAMTRLFLEGRTETVRSCTREACQFVRAMENKERTDQ
	.**.**.*.*.******* *.********
1a	628: QRL-KLFKIACEKHQHLYRLAMTGAGIDRHLFCLYVVSKYLAVDSPFLKEVLSEPWRLSTSQTPQQQVEL
1b	628: D-LQDLFRKASEKHQNMYRLAMTGAGIDRHLFCLYIVSKYLGVRSPFLDEVLSEPWSLSTSQIPQFQICM
1c	624: QCLAL-FREAVDKHQALLKAAMSGQGIDRHLFALYIMSRLLHMQSPFLTQVQSQQWLLSTSQIPVQQTHL
	. * .*. * .*****.*.*********** .*** . **** .** .******
1a	$697: {\tt FDFEKNPD} {\tt VSCGGGFGPVADDGYGVSYIIVGENFIHFHISSKFSSPETDSHRFGKHLRQAMMDIITLFG}$
1b	697: FDPKQYPNHLGAGGGFGPVADHGYGVSYMIAGENTMFFHVSSKLSSSETNALRFGNHIRQALLDIADLFK
1c	693: FDVHNYPDYVSSGGGFGPAHDHGYGVSYIFMGENAISFHISSKQSSTETDSHRLGQHIEDALLDVASLFQ
	<u> </u>
1a	767:LTINSKK
1b	767: ISKTDS
1c	763: AGQQFKRQFTGLGESSGWKYSNLSCKTVDPNIPKSSTNL

Fig.3-1 ラットCPT1アイソザイムの一次構造の比較

ラットCPT1アイソザイムの一次構造(AAA40876.1 (CPT1a)、BAA07733.1 (CPT1b)、 NP_001030097.2 (CPT1c))を比較した。3種類のアイソザイム間で保存された領域を*、2種類のアイソザイム間で保存された領域を・でそれぞれ示す。

3-2 結果

3-2-1 CPT1 アイソザイムの標準タンパク質の調製

まず、発現させた CPT1a、CPT1b、CPT1cのタンパク質量を定量的に評価するため、CPT1b の標準タンパク質の調製と同様にして[14]、大腸菌発現系を用いて各 CPT1 アイソザイムの標準 タンパク質の調製を行った。まず、CPT1 アイソザイムをコードする pColdⅢベクターを大腸菌株 OrigamiB(DE3)pLysS に導入した。続いて、プラスミドを導入した大腸菌を 15℃、IPTG 存在下で 培養することにより CPT1 アイソザイムの発現を誘導した。その後、CPT1 アイソザイムの発現を 確認するため、大腸菌から粗精製した不溶性画分を SDS-PAGE に供した後、CBB 染色を行った (Fig. 3-2)。その結果、いずれの CPT1 アイソザイムを発現させた場合においても明瞭なバンドが 検出された。本解析において、CPT1aとCPT1bの推定分子量がどちらも約88000であるにも拘 らず、CPT1b の方がより速い移動度を示していた。このことは、過去の報告とも一致するものであ った[15]。また、CPT1cの推定分子量は約 91000 であり、CPT1a や CPT1b よりも遅い移動度を 示すことが推測されたが、予想に反し、CPT1c は CPT1a よりも速く、CPT1b よりも遅い移動度を 示した。このことから、CPT1c の標準タンパク質が正しく調製できていない可能性が示唆されたた め、発現ベクターに組み込んだ CPT1c をコードする cDNA の塩基配列を確認した。その結果、調 製した CPT1c の cDNA においてアミノ酸が変化する変異は生じていないことが示された(データ は示さない)。このことから、CPT1c が SDS-PAGE において推定分子量から予測される移動度を 示さなかった原因は、CPT1c のアミノ酸配列に変異が生じたためではないことが確認された。こ れらのことから、3 種類の CPT1 アイソザイムの良好な標準タンパク質が調製できたことが確認さ れた。



Fig.3-2 大腸菌発現系を用いて調製したリコンビナントCPT1アイソザイム 大腸菌発現系を用いて調製したリコンビナントCPT1アイソザイムをSDS-PAGEに供した後、 CBB染色によりタンパク質を可視化した。リコンビナントCPT1aは0.59 µg/レーン、リコンビナ ントCPT1bは0.44 µg/レーン、CPT1cは0.28 µg/レーン、それぞれ泳動した。

3-2-2 3 種類の CPT1 アイソザイムを認識する特異抗体の調製

続いて、3種類の CPT1 アイソザイムを認識する特異抗体の調製を行った。各 CPT1 アイソザイ ムとの反応性が等しい特異抗体は、CPT1 アイソザイムの発現レベルを定量的に比較する上で極 めて有用であると考えられる。このような特異抗体の調製において、過去に当研究室において、ミ トコンドリアの外膜に存在する VDAC の3種類のアイソフォーム間で高く保存された領域に対する 配列を有するペプチドを抗原とすることにより、3種類の VDAC アイソフォームを同レベルで認識 する抗体の調製に成功している[16]。そこでまず、CPT1a、CPT1b、CPT1c のアミノ酸配列を比 較することにより、アイソザイム間で保存性の高い領域を探索した。その結果、3種類の CPT1 ア イソザイムで 20 アミノ酸程度完全に保存された領域は存在しなかった。しかしながら、比較的保 存性の高い領域が存在したため、その領域に相当するペプチドを調製した(Fig. 3-3)。調製したペ プチドのアミノ酸配列は CPT1b の 588T から 608C に対応する配列に一致するものであった。ま た、CPT1aにおいては9番目の M が異なっており、CPT1cにおいては4番目のA、5番目の S、 9番目の M、11番目の R がそれぞれ異なっていた。このことから、調製したペプチドと CPT1a、 CPT1b、CPT1c とのアミノ酸配列の一致率は、順に 95%、100%、81%であり、このペプチドを抗 原として調製した特異抗体の各 CPT1 アイソザイムに対する反応性は、CPT1b、CPT1a、CPT1c の順で高くなることが予測された。

ペプチド	TYEASMTRMFREGRTETVRSC

- 1a ⁵⁸⁸TYEASMTR<u>L</u>FREGRTETVRSC
- 1b ⁵⁸⁸TYEASMTRMFREGRTETVRSC
- 1c ⁵⁸⁴TYE<u>SA</u>MTR<u>L</u>F<u>L</u>EGRTETVRSC

Fig.3-3 特異抗体の調製に用いた抗原ペプチドとCPT1アイソザイムのアミノ酸配列

CPT1アイソザイムに対する特異抗体の調製の抗原として用いたペプチドのアミノ酸配列とこの配列と一致性の高いCPT1アイソザイムのアミノ酸配列をそれぞれ示す。各CPT1アイソザイムのアミノ酸配列において、下線が引かれているアミノ酸は抗原ペプチドの配列と一致しないアミノ酸を示す。

続いて、調製したペプチドを抗原として調製した抗血清が各 CPT1 アイソザイムを認識するかど うか解析した。既知量の各 CPT1 アイソザイムの標準タンパク質と調製した抗血清を用いてウェス タンブロッティングを行った(Fig. 3-4)。その結果、いずれの標準タンパク質からも明瞭なシグナル が得られたことから、調製した抗血清は、いずれの CPT1 アイソザイムも認識することが示された。 そこで続いて、調製した抗血清の各 CPT1 アイソザイムに対する反応性を比較するため、ウェスタ ンブロッティングより得られた各 CPT1 アイソザイムのシグナル強度をウェスタンブロッティングに 供した標準タンパク質の量で割り込むことにより標準タンパク質 1 ng 当たりのシグナル強度を算 出し、その値を比較した。その結果、調製した抗血清の CPT1b 1ng に対する反応性を 1 とした場 合、各 CPT1 アイソザイムに対する反応性は、CPT1a: CPT1b: CPT1c= 0.51: 1: 0.39 であること が示された。



Fig.3-4 調製した3種類のCPT1アイソザイムを認識する特異抗体の反応性の評価 大腸菌発現系を用いて調製したリコンビナントCPT1アイソザイムをSDS-PAGEに供した後、 CPT1アイソザイムを認識する特異抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。リコンビ ナントCPT1aとリコンビナントCPT1cは40 ng/レーン、リコンビナントCPT1bは20 ng/レーン、 それぞれ泳動した。

3-2-3 COS7 細胞に発現させた CPT1 アイソザイムのタンパク質量の定量的な評価

ここまでの解析から、3 種類の CPT1 アイソザイムの標準タンパク質とそれらに対する反応性を 評価した特異抗体を調製することに成功した。そこで続いて、3 種類の CPT1 アイソザイムについ て、酵母や COS7 細胞の発現系を構築し、発現させた各 CPT1アイソザイムの発現レベルを定量 的に評価することを試みた。

まず、第2章と同様にして[14]、CPT1aとCPT1cについて新たに酵母発現系とCOS7細胞発 現系の構築を試みた。その結果、酵母発現系において、CPT1aの発現は確認することができた のに対し、CPT1cの発現を確認することができなかった(データは示さない)。一方、COS7細胞発 現系において、CPT1a および CPT1cの発現が確認されたため、COS7細胞発現系を用いて解 析を行うこととした。過去の解析から、CPT1aおよび CPT1bはミトコンドリアの外膜に局在するこ とが確認されている[17, 18]。しかしながら、CPT1cはミトコンドリアに局在するという報告と小胞 体に局在するという報告がなされており、未だにその細胞内局在について結論が得られていない [9, 12, 13]。そこで本研究では、発現させたCPT1アイソザイムのタンパク質量やそれらの酵素活 性を測定する上で、細胞ライセートを用いることとした。まず、3種類のCPT1アイソザイムをそれ ぞれ COS7 細胞に発現させた後、細胞ライセートを調製した。続いて、調製した細胞ライセートと CPT1bの標準タンパク質をウェスタンブロッティングに供した(Fig. 3-5)。その結果、いずれの CPT1アイソザイムを COS7 細胞に発現させた場合もバンドが検出された。このことから、COS7 細胞において各 CPT1アイソザイムが発現していることが確認された。



Fig.3-5 COS7細胞に発現させたCPT1アイソザイムのタンパク質量の解析

大腸菌発現系を用いて調製したリコンビナントCPT1b 20 ngとCPT1bを発現させたCOS7 細胞の細胞ライセートをSDS-PAGEに供した後、CPT1アイソザイムに対する抗体とG3PDH に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングおよびCBB染色を行った。VはpCXN2ベク ターのみを導入したCOS7細胞の細胞ライセートを泳動した。CPT1アイソザイムの検出には 細胞ライセートを17 µg/レーン、G3PDHの検出とCBB染色には細胞ライセート10 µg/レーン それぞれ泳動した。 そこで続いて、CPT1b の標準タンパク質のシグナル強度、細胞ライセートから検出された各 CPT1 アイソザイムのシグナル強度、および 3-2-2 で求めた特異抗体の各アイソザイムに対する 反応性を基に、COS7 細胞に発現している各 CPT1アイソザイムのタンパク質量を算出した。その 結果、CPT1a は 0.36 ng/µg protein of total cellular lysate、CPT1b は 0.88 ng/µg protein of total cellular lysate、CPT1c は 0.78 ng/µg protein of total cellular lysate 存在していることが示 された。

3-2-4 COS7 細胞に発現させた CPT1 アイソザイムの特異活性の比較

続いて、各 CPT1 アイソザイムを発現させた COS7 細胞のライセートを用いて CPT1 活性を測定した(Fig. 3-6A)。その結果、CPT1a を発現させた細胞ライセートは 4.01 nmol/mg protein of total cellular lysate/min、CPT1b を発現させた細胞ライセートは 3.89 nmol/mg protein of total cellular lysate/min、CPT1c を発現させた細胞ライセートは 0.19 nmol/mg protein of total cellular lysate/min であった。そこで続いて、得られた各細胞ライセートの CPT1 活性を 3-2-3 で得られた発現させた CPT1アイソザイムのタンパク質量で割り込み、各 CPT1アイソザイムの特異 活性を算出した(Fig.3-6B)。その結果、CPT1a は 11.1 µmol/mg protein of CPT1a isozyme/min、CPT1b は 4.44 µmol/mg protein of CPT1b isozyme/min、CPT1c は 0.24 µmol/mg protein of CPT1c isozyme/min であった。このことから、CPT1a や CPT1b と比較して CPT1c の特異活性 は顕著に低いことが明確に示された。また、CPT1アイソザイムの中で CPT1a の特異活性が最も高いことが新たに示された。



Fig. 3-6

CPT1アイソザイムを発現させたCOS7細胞の細胞ライセートのCPT1活性と 発現させたCPT1アイソザイムの特異活性

(A) CPTアイソザイムを発現させたCOS7細胞の細胞ライセート50 μgを用いてCPT1活性 を測定した。独立した実験を3回行った結果の平均値±標準偏差で示す。

(B) COS7細胞に発現させたCPT1アイソザイムの特異活性を示す。

3-2-5 CPT1c と CPT1a のキメラタンパク質や CPT1c の C 末端欠損体の CPT1 活性

ここまでの解析から、CPT1 アイソザイムの中で CPT1c は顕著に特異活性が低いことが明確に 示された。そこで続いて、筆者は CPT1c の特異活性が顕著に低い原因を明らかにすることを試 みた。過去の報告から、CPT1a や CPT1b はその酵素活性に C 末端領域が重要であると考えら れていることから[19]、CPT1c の C 末端領域に焦点を当て解析を行った。まず、CPT1c の特異活 性が顕著に低い原因となる領域の同定を目的として、CPT1c の C 末端領域を特異活性が最も高 かった CPT1a の C 末端領域と入れ替えたキメラタンパク質について解析した(Fig. 3-7A)。また、 CPT1a や CPT1b と比較して CPT1c はその C 末端が約 30 アミノ酸程長いという特徴的な構造 を有している。そこで、この領域が CPT1c の酵素活性に及ぼす影響を明らかにするため、CPT1 アイソザイムの中で最も短い CPT1b の全長と一致するように CPT1c の C 末端領域を欠損させ た変異体についても解析を行った(Fig. 3-7B)。



Fig. 3-7CPT1cとCPT1aのキメラタンパク質およびCPT1cのC末端欠損体の模式図 CPT1cの特異活性が顕著に低い原因を明らかにするために構築した(A) CPT1cと CPT1aのキメラタンパク質と(B) CPT1cのC末端欠損体の模式図を示す。 CPT1cのキメラタンパク質および C 末端欠損体を発現させた COS7 細胞の細胞ライセートの CPT1活性を測定し、CPT1aやCPT1cを発現させた細胞ライセートの CPT1活性と比較した(Fig. 3-8)。その結果、CPT1aを発現させた細胞ライセートと比較してキメラタンパク質や C 末端欠損体 を発現させた細胞ライセートの CPT1 活性は顕著に低く、CPT1c を発現させた細胞ライセートの CPT1 活性とほぼ同程度であった。これらのことから、CPT1c の特異活性が低い原因は、本解析 において CPT1a と入れ換えた CPT1c の C 末端領域によるものや、CPT1a や CPT1b よりも約 30 アミノ酸残基ほど長い CPT1c の C 末端領域によるものではないことが示された。



Fig. 3-8 CPT1cとCPT1aのキメラタンパク質やCPT1cのC末端欠損体を発現させた COS7細胞の細胞ライセートのCPT1活性

CPT1cとCPT1aのキメラタンパク質やCPT1cのC末端欠損体を発現させたCOS7細胞の 細胞ライセート50 µgを用いてCPT1活性を測定した。キメラはCPT1aとCPT1cのキメラタン パク質を発現させたCOS7細胞、欠損体はCPT1cのC末端欠損体をそれぞれ示す。

3-3 考察

CPT1c は脳および精巣に選択的に発現している CPT1 アイソザイムであり、トランスジェニッ クマウスを用いた解析からエネルギー代謝の調節に重要な役割を担っていると考えられている。 また、これまでに行われた酵母や動物細胞の発現系を用いた解析において、CPT1cはCPT1aよ りも顕著に CPT1 活性が低いという報告がなされている。しかしながら、過去に行われた CPT1c の酵素活性について行われた解析は、いずれも存在する CPT1c の発現レベルを CPT1a と比較 しておらず、CPT1c の酵素活性が低い原因として、発現させた CPT1c の発現量が CPT1a と比 較して顕著に低い可能性が考えられた。CPT1c が発現している脳や精巣においては、CPT1a や CPT1b の発現していることが知られている[1]。そのため、これらのアイソザイムが各組織の脂肪 酸代謝にどの程度寄与しているかを明らかにするためにも、CPT1c の特異活性が顕著に低いか どうかを明らかにすることは極めて重要であると考えられる。そこで本研究では、3 種類の CPT1 アイソザイムを COS7 細胞に発現させた後、発現させた各アイソザイムのタンパク質量を定量的 に評価することにより、各 CPT1 アイソザイムの特異活性を比較した。

まず、発現させた各 CPT1 アイソザイムのタンパク質量を定量的に評価するために、大腸菌発 現系を用いて標準タンパク質を調製した。調製した標準タンパク質を SDS-PAGE に供した後、 CBB 染色により可視化したところ、いずれのアイソザイムについても良好な標準タンパク質が調 製できていることが確認された(Fig. 3-2)。また、各アイソザイムの SDS-PAGE における移動度に 着目したところ、CPT1b と CPT1c は推定分子量から予測される移動度とは異なる移動度を示し た。この内、CPT1b が推定分子量よりも速い移動度を示す原因は、CPT1b のアミノ酸配列による ものであると考えられている[15]。本解析から、CPT1c も推定分子量よりも速い移動度を示すこと が明らかとなった。この原因は不明であるが、COS7細胞に発現させた CPT1cも同様の挙動を示 したことから(Fig. 3-5)、CPT1c を大腸菌に発現させたことによるアーティファクトではなく、CPT1c のアミノ酸配列に起因するものであることが示唆された。

良好な標準タンパク質が得られたため、続いて、3 種類の CPT1 アイソザイムをいずれも認識 する特異抗体の調製を試みた。CPT1 アイソザイムのアミノ酸配列の一致率は約 50~60%と比 較的高く、このようなタンパク質間の発現レベルを比較するためには、①異なるタンパク質をそれ ぞれ特異的に認識する抗体、②いずれもタンパク質も同程度認識する抗体のいずれかが必要に なると考えられる。過去に、当研究室ではこれらのような特異抗体を調製し、異なるタンパク質の 発現レベルの定量的評価に成功している。まず、①については、脂肪酸の輸送を行っていると考 えられている fatty acid binding protein (FABP)のアイソフォームの内、FABP3、FABP4、FABP5 に対する特異抗体をそれぞれ調製し、寒冷刺激を与えたラットの褐色脂肪組織における FABP ア イソフォームのタンパク質量の算出に成功した[20]。また、②について山本らは、ミトコンドリアの 外膜に存在する VDAC の3種類のアイソフォームについて、アイソフォーム間で高く保存された配 列を抗原ペプチドとして特異抗体を調製し、アイソフォーム間の発現レベルの定量的な比較に成 功した。本研究では、20 アミノ酸程度からなる特異的なアミノ酸配列を各アイソザイムに見いだせ なかったこと、および、1 種類の抗体によりすべてアイソザイムを検出できるために煩雑な実験が 不要になることから、②のような特異抗体の調製に取り組んだ。そこでまず、3 種類の CPT1 アイ ソザイムで高く保存された領域の配列を有するペプチドを合成し、いずれのアイソザイムも認識す る特異抗体の調製を行った。本研究で特異抗体の調製に用いた抗原ペプチドのアミノ酸配列と各 CPT1 アイソザイムのアミノ酸配列の一致率は、CPT1b、CPT1a、CPT1c の順で高かった。この ことから、調製した特異抗体の各 CPT1 アイソザイムに対する反応性は CPT1b、CPT1a、CPT1c の順番で高くなることが予想され、実際に得られた抗体は、CPT1b、CPT1a、CPT1c の順番で高 い反応性を示した。アイソザイム間の発現レベルの比較においては、山本らが調製したようなアイ ソフォーム間での反応性が同程度の抗体が理想的であると考えられる。しかしながら、本解析の ように、既知量の良好な標準タンパク質を用いて各アイソザイムとの抗体の反応性を比較するこ とにより、アイソザイム間での発現レベルを定量的に比較することが可能となると考えられる。

CPT1 アイソザイムの発現レベルを定量的に評価するために必要な標準タンパク質と特異抗体 が調製できたため、続いて、各 CPT1 アイソザイムを COS7 細胞に発現させ、発現レベルと CPT1 活性を測定し、CPT1アイソザイム間の特異活性を比較した。その結果、CPT1aやCPT1bと比較 して CPT1c の特異活性は顕著に低いことが示された。また、CPT1a の特異活性は CPT1b より も高いことが示された。この原因は、CPT1a の方が CPT1b よりも基質に対する親和性が高いた めであると考えられる。さらに、筆者らは、CPT1c の特異活性が顕著に低い原因を明らかにする ため、CPT1の酵素活性に重要な C 末端領域に焦点を当て更なる解析を行った。CPT1c と CPT1aやCPT1bとのアミノ酸配列の一致率は約50%であり、CPT1cと他のアイソザイム間で保 存されていないアミノ酸をすべて置換することは非常に煩雑な実験を伴うと考えられる。そこでま ず、CPT1c の酵素活性に影響を及ぼす領域を明らかにするため、特異活性が最も高かった CPT1aのC末端領域とCPT1cのC末端領域を入れ替えたキメラタンパク質について解析した。 その結果、本研究で入れ替えた領域は CPT1c の特異活性が低い原因となるものではなかった。 CPT1aとCPT1bのキメラタンパク質を用いた解析から、CPT1の酵素活性はC末端領域だけで はなく、N 末端と C 末端の相互作用による影響も受けることが示唆されている[21]。従って、 CPT1c の特異活性が低い原因を明らかとするためには、今回解析した以外の領域についてもキ メラタンパク質を用いて解析する必要があると考えられる。また、CPT1c は CPT1a や CPT1b と 比較して長い約 30 アミノ酸程長い領域を有していることから、この領域が CPT1c の酵素活性に 及ぼす影響をについて、CPT1c の C 末端領域を欠損させた変異体を用いて解析した。本解析で は、CPT1bが最も短いアイソザイムであることから、CPT1bと同じ長さになるように欠損体を調製 し、解析したところ、調製した変異体は CPT1 活性をほとんど示さなかった。過去に、CPT1a の 773 番目のリジンを欠損させることにより CPT1b と同じ長さに揃えた CPT1a の変異体は、CPT1 活性が変化しなかったことから[22]、今回解析した欠損体が CPT1 活性を示さなかった原因は、 CPT1bの長さに揃えたためではないと考えられる。また、ヒトの CPT1bのC 末端にマルトース結 合タンパク質をタグとして付加した融合タンパク質は CPT1 活性を有することから[23]、CPT1 アイ ソザイムの C 末端に新たに別のアミノ酸配列を付加しても CPT1 活性には影響を及ぼす可能性

は低いと考えられる。

本研究から、CPT1cの酵素活性がCPT1aやCPT1bよりも顕著に低いことが明確に示された。 このことから、CPT1cのミトコンドリアへの長鎖脂肪酸の取り込みに対する影響は極めて低いと考 えられる。このことは、CPT1aやCPT1bのノックアウトマウスが胎生致死であるのに対し、CPT1c のノックアウトマウスが胎生致死ではないことからも支持される[24, 25]。また、CPT1cが発現して いる組織の内、脳においてはCPT1aが、精巣においてはCPT1bが発現していることが知られて いるため、これらの組織におけるミトコンドリアへの長鎖脂肪酸の取り込みの大部分はCPT1aや CPT1bに依存していると考えられる。しかしながら、Sierraらの解析により、CPT1cを発現させた 細胞においてパルミトイルカルニチンの量が増加することが明らかにされている[13]。このことから、 CPT1c は微弱ながらミトコンドリアへの長鎖脂肪酸の取り込みに関与している可能性も考えられ る。CPT1cのエネルギー代謝への関与については更なる解析が必要であると考えられる。

3-4 実験方法

3-4-1 試薬

主な試薬は 2-4-1 試薬に準じる。

3-4-2 CPT1 アイソフォームをコードする cDNA 断片の調製

ラットの CPT1aをコードする cDNA 断片は過去に当研究室で行ったスクリーニングで調製したものを使用した[3]。 ラットの CPT1b をコードする cDNA 断片は第 2 章で調製したものを使用した。 ラットの CPT1c をコードする cDNA 断片は、塩基配列は NM_001034925 を用い、ラットの脳 cDNAを鋳型として Table 3-1 に示すプライマーを用いた PCR により増幅した。得られた各 cDNA 断片は、pCold III および pCXN2 にサブクローニングした。

Table 3-1 ラット CPT1c の構築に用いた合成オリゴの塩基配列

Primer name	Nucleotide sequence	Directions ¹⁾
GE2465	TGGGTCCCAGGGCATATGGCTGAG	D
GE2466	TAGATCTGGGAGCGGCAGTCAAAGCAGC	U
GE2467	AGATCTATGTGGGCCCAGGTACGTGAGTC	D
GE2468	TGCGGGATCCAAGTCCTGGGAGCAATG	U

¹⁾DとUはそれぞれ下流(downstream)と上流(upstream)方向のプライマーとして用いたことを示す。

3-4-3 CPT1 アイソフォームの標準タンパク質の調製

発現ベクターを導入した大腸菌の発現誘導は第2章の方法に準じて行った。大腸菌の不溶性画 分の調製については、Clark らの方法[26]を参考にして不溶性画分の純度を高めたるため、第2 章の方法により得られた沈殿を 0.5% Triton X-100、0.5 M NaCl、20 mM EDTA、0.1 M Tris-HCl (pH7.5)を含む溶液により懸濁した後、17400 xg、4°C、5 min の遠心分離に供し、沈殿を回収す した。その後、得られた沈殿を Triton X-100 を含まない上記の溶液で 2 回洗浄した。

3-4-4 特異抗体の調製

CPT1b に特異的な配列 TYEASMTRMFREGRTETVRSC(アミノ酸配列 588-608 に相当、 Accession No. BAA07733.1)のペプチドを自動合成装置 PSSM-8 (Shimadzu)により合成した。 合成したペプチドに KLH (pierce, code 77606)を結合させ免疫原性を高めた後、Freund' adjuvand と乳化させ、ウサギ背面部に皮下注射した。さらに追加免疫を施した後、ウサギの頸動 脈から全採血を行い、抗血清を得た。得られた抗血清をウェスタンブロッティングの一次抗体とし て用いた。

3-4-5 COS7 細胞のトランスフェクションおよび COS7 細胞の細胞ライセートの調製

トランスフェクションは、第2章の方法に準じて行った。COS7細胞のホールライセートの調製は トランスフェクション2日後のCOS7細胞について行った。まず、回収した細胞を氷冷した5 mM Tris-HCI、150 mM KCI buffer (pH7.2)に懸濁した。次に、この懸濁液をホモジナイズすることにより細胞を破砕した後、破砕液を800 xg、4℃、10 minの遠心分離に供した。遠心分離後、得られ た上清を回収し、これを細胞ライセートとした。

3-4-6 ウェスタンブロッティング

手法は第2章の方法に準じて行った。CPT1アイソザイムの検出は、一次抗体として1.0%のス キムミルクを含む TS 溶液により 1000 倍希釈した特異抗体で一晩反応させ、二次抗体として 1.0%スキムミルク入りTS 溶液により2000 倍希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ロバ 抗ウサギ抗体を1時間反応させることにより行った。G3PDH の検出は、一次抗体として1.0%の スキムミルクを含む TS 溶液により 10000 倍希釈した特異抗体で一晩反応させ、二次抗体として 1.0%スキムミルク入りTS 溶液により 10000 倍希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ロ バ抗ウサギ抗体を1時間反応させることにより行った。

3-4-6 CPT1 活性の測定

手法は第2章の方法に準じて行った。ただし、reaction buffer に含まれるパルミトイル CoA の濃 度を 50 μM から 100 μM に変更した。

3-4-7 CPT1c の C 末端欠損体および CPT1c と CPT1a のキメラタンパク質の発現系構築

CPT1a と CPT1c のキメラタンパク質をコードする cDNA の調製は、まず、3-4-2 で調製した CPT1c をコードする cDNA を鋳型として Table 3-2 に示すプライマーを用いて PCR を行い、 CPT1c のアミノ酸配列が変化しないように制限酵素サイト Nhe I を挿入した cDNA 断片を調製し た。続いて、CPT1a の塩基配列として L07736 を用い、3-4-2 で調製した CPT1a をコードする cDNA を鋳型として Table 3-2 に示すプライマーを用いて PCR を行い、CPT1a のアミノ酸配列が 変化しないように制限酵素サイト Nhe I を挿入した cDNA 断片を調製した。このようにして Nhe I サイトを挿入した CPT1a と CPT1c の cDNA 断片を Nhe I により消化した後、得られたそれぞれ の cDNA 断片を用いてキメラタンパク質をコードする cDNA を調製した(Fig. 3-9)。得られた cDNA 断片を pCXN2 に組み込み、発現ベクターを構築した。

CPT1cのC末端欠損体をコードする cDNA は Table 3-3 に示すプライマーを用いた PCR により増幅した。得られた cDNA 断片を pCXN2 に組み込み、発現ベクターを構築した。

Primer	Nucleotide sequence	Used for	Directions ¹⁾
name	Nucleolide sequence	preparation of	
GE491	GTTTTCCCAGTCACGAC	CDT10	D
GE2677	TAGATCTGGGAGCGGCAGTCAAAGCAGC	CFTIC	U
GE2480	AGATCTATGTGGGCCCAGGTACGTGAGTC		D
GE492	AACAAGCTATGACCATG	GPTTa	U
A)			

Table 3-2 ラット CPT1c のキメラタンパク質構築に用いた合成オリゴの塩基配列

¹⁾D と U はそれぞれ下流(downstream)と上流(upstream)方向のプライマーとして用いたことを示 す。

Fig. 3-9

CPT1cとCPT1aのキメラタンパク質をコードするcDNA断片の調製の模式図

CPT1cの特異活性が顕著に低い原因を明らかにするために構築したCPT1cとCPT1aのキメラタンパク質をコードするcDNA断片の調製の模式図を示す。

Table 3-3 ラット CPT1cのC末端欠損体の構築に用いた合成オリゴの塩基配列

Primer name	Nucleotide sequence	Directions ¹⁾
GE491	TGGGTCCCAGGGCATATGGCTGAG	D
GE2980	CCCTGTAAGTTTCACTTGAATTGCTGTCG	U

3-5 参考文献

- 1. McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, **244**, 1-14
- Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD (1996) Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem*, **271**, 6972-6977
- Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H (1995) High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett*, **363**, 41-45
- Price N, van der Leiji F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 80, 433-442
- Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Cregg JM, Woldegiorgis G (1998) Deletion of the conserved first 18 N-terminal amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA sensitivity and binding. *Biochemistry*, **37**, 11033-11038
- Dai J, Zhu H, Shi J, Woldegiorgis G (2000) Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity. *J Biol Chem*, **275**, 22020-22024
- Dai J, Zhu H, Woldegiorgis G (2003) Leucine-764 near the extreme C-terminal end of carnitine palmitoyltransferase I is important for activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 758-763
- Ogawa E, Kanazawa M, Yamamoto S, Ohtsuka S, Ogawa A, Ohtake A, Takayanagi M, Kohno Y (2002) Expression analysis of two mutations in carnitine palmitoyltransferase IA deficiency. *J Hum Genet*, **47**, 342-347
- Price N, van der Leiji F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 80, 433-442
- Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asaumi M, Matsumoto S, Cha SH, Shimokawa T, Lane MD (2006) The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7282-7287
- Gao S, Zhu G, Gao X, Wu D, Carrasco P, Casals N, Hegardt FG, Moran TH, Lopaschuk GD (2011) Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 9691-9696

- Dai Y, Wolfgang MJ, Cha SH, Lane MD (2007) Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers. *Biochem Biophys Res Commun*, 359, 469-474
- Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Urena J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N (2008) CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem*, **283**, 6875-6885
- Hada T, Kato Y, Obana E, Yamamoto A, Yamazaki N, Hashimoto M, Yamamoto T, Shinohara Y (2012) Comparison of two expression systems using COS7 cells and yeast cells for expression of heart/muscle-type carnitine palmitoyltransferase 1. *Protein Expr Purif*, 82, 192-196
- Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, Mcgarry JD, (1996) Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem*, **271**, 6972-6977
- 16. Yamamoto T, Yamada A, Watanabe M, Yoshimura Y, Yamazaki N, Yoshimura Y, Yamauchi T, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y (2006) VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *J Proteome Res*, **5**, 3336-3344.
- de Vries Y, Arvidson DN, Waterham HR, Cregg JM, Woldegiorgis G (1997) Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast Pichia pastoris. *Biochemistry*, **36**, 5285-5292
- Zhu H, Shi J, de Vries Y, Arvidson DN, Cregg JM, Woldegiorgis G (1997) Functional studies of yeast-expressed human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I. *Arch Biochem Biophys*, **347**, 53-61
- Woldegiorgis G, Shi J, Zhu H, Arvidson DN (2000) Functional characterization of mammalian mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast Pichia pastoris. *J Nutr*, **130**, 310S-314S.
- Yamamoto T, Yamamoto A, Watanabe M, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y (2011) Quantitative evaluation of the effects of cold exposure of rats on the expression levels of ten FABP isoforms in brown adipose tissue. *Biotechnol Lett*, **33**, 237-242
- Jackson VN, Cameron JM, Fraser F, Zammit VA, Price NT (2000) Use of six chimeric proteins to investigate the role of intramolecular interactions in determining the kinetics of carnitine palmitoyltransferase I isoforms. *J Biol Chem*, **275**, 19560-19566
- 22. Pan Y, Cohen I, Guillerault F, Fève B, Girard J, Prip-Buus C (2002) The extreme C

terminus of rat liver carnitine palmitoyltransferase I is not involved in malonyl-CoA sensitivity but in initial protein folding. *J Biol Chem*, **277**, 47184-47189

- Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Woldegiorgis G (2000) The first 28 N-terminal amino acid residues of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I are essential for malonyl CoA sensitivity and high-affinity binding. *Biochemistry*, **39**, 712-717.
- Nyman LR, Cox KB, Hoppel CL, Kerner J, Barnoski BL, Hamm DA, Tian L, Schoeb TR, Wood PA (2005) Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab*, **86**, 179-187
- Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, Chick WS, Hamm DA, Sharer JD, Wood PA (2008) Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab*, **93**, 314-322
- 26. De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R (1999) Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol*, **309**, 217-236.

第4章 総括

生体の主要なエネルギー産生経路である長鎖脂肪酸のβ酸化はミトコンドリアのマトリクスで行われる。β酸化反応の基質であるアシル CoA はそのままの形ではマトリクスへと流入できず、カル ニチンシャトルシステム[1-3]を介してマトリクスへと流入する。カルニチンシャトルシステムを構成 するタンパク質の中でも、最初の反応を触媒する酵素であるCPT1は、脂肪酸の合成の反応中間 体であるマロニル CoA により阻害されることから、脂肪酸の合成と分解を調節する重要な酵素と して考えられ、古くから研究がなされてき[4, 5]。CPT1 はそれぞれが組織選択的に発現する3種 類のアイソザイムが存在し[1, 6-8]、個々のアイソザイムの特性について、酵母や動物細胞の発 現系を用いた解析が行われており、CPT1 の機能の全貌が明らかにされつつある[9, 10]。しかし ながら、CPT1 アイソザイムの特性について未だ解答を得られていない問題も数多く存在する。こ れらの問題について解答を得ることにより、CPT1 アイソザイムの特性をより深く理解することを目 的として、筆者は 2 つの研究課題に取り組んだ。以下に、本研究から得られた結果を要約し、発 現させた CPT1 アイソザイムの特性やその解析に用いた実験系について考察する。

4-1 ラットの筋型 CPT1 の COS7 細胞発現系と酵母発現系の比較(第2章)

動物細胞や酵母の発現系を用いた CPT1 の機能解析は、CPT1 の欠損体やアミノ酸変異体に ついて解析を行うことが可能であるため、CPT1 アイソザイムの特性に重要な領域やアミノ酸の同 定に大きく貢献してきた。しかしながら、CPT1 アイソザイムの変異体について、同じ変異体であっ ても、酵母に発現させた場合と動物細胞に発現させた場合では異なる挙動を示す場合があること が報告され[11, 12]、酵母に発現させた CPT1 アイソザイムと動物細胞に発現させた CPT1 アイソ ザイムの性質が異なっている可能性が考えられた。そのため、過去に動物細胞や酵母の発現系 を用いて行われた CPT1 の機能解析の結果だけでなく、今後これらの発現系を用いて行われる 研究結果をより正確に理解するための基盤の構築を目的として、本研究に着手した。具体的な解 析として、動物細胞の1種である COS7 細胞と酵母について、ラットの CPT1b の発現系を構築し、 発現させた CPT1b の性質を比較した。

本研究において、発現させた CPT1b の発現レベルは COS7 細胞の方が酵母よりも3 倍以上 高かった。このような発現レベルの違いがみられた原因は不明であるが、第3章においてラットの CPT1cの酵母発現系を試みたが CPT1cの発現が確認されなかったことや、ラットの CPT1aにつ いても酵母よりも動物細胞の方がその発現レベルが高かったという過去の報告[13]と併せて考え ると、本来 CPT1 アイソザイムが存在しない酵母のミトコンドリアにおいて、CPT1 アイソザイムは 発現しにくいという特性を有している可能性が考えられる。CPT1 アイソザイムがこのような特性を 有しているかどうかを検証することは、CPT1 アイソザイムの安定性に重要な因子を同定すること に繋がると考えられる。

本研究により、COS7細胞に発現させた CPT1bと酵母に発現させた CPT1bの特異活性は異

なることが示された。このことは、これまで得られた酵母発現系を用いた解析結果と動物細胞発 現系を用いた解析結果が必ずしも相関しない可能性があることを示唆している。では、今後、 CPT1 アイソザイムの機能解析を行っていく上では、酵母発現系と動物細胞発現系のどちらを用 いるのが良いのであろうか。酵母発現系と動物細胞発現系は、それぞれ互いにしかない利点が 存在する。酵母発現系は、内在性の CPT1 が存在しないため、発現させた CPT1 アイソザイムや そのアミノ酸変異体の性質について詳細に解析することができる。しかしながら、内在性の CPT1 だけでなく、CAC や CPT2 を始めとした長鎖脂肪酸のB酸化に必要なタンパク質が存在しないた め、発現させた CPT1 アイソザイムや変異体が脂肪酸代謝に及ぼす影響について解析すること ができない。また、CPT1 アイソザイムはミトコンドリア外膜に存在するタンパク質と相互作用して 複合体を形成しているという報告もなされている[14]。そのため、CPT1 アイソザイムが本当に外 膜上において複合体を形成しているのであれば、その複合体の構成因子となるタンパク質が酵母 において保存されていない場合や、保存されていてもアミノ酸配列があまり保存されていない場合 は、実際の生体内のミトコンドリアを反映した結果を得ることは難しいと考えられる。一方、動物細 胞発現系は、その細胞のミトコンドリアに内在性の CPT1 を始めとする長鎖脂肪酸のβ酸化に関 連するタンパク質が存在するため、発現させた CPT1 アイソザイムやその変異体が脂肪酸代謝に 及ぼす影響について解析することが可能である[15-17]。しかしながら、B酸化に関与するタンパク 質が存在するために、発現させた CPT1 アイソザイムやその変異体の性質について詳細な解析 を行うことは困難であると考えられる。このように、酵母発現系と動物細胞発現系は、一方の欠点 を解決できる利点を互いに有している関係にある。また、発現させた CPT1 アイソザイムや変異体 の全てが異なる挙動を示すのではなく、酵母発現系と動物細胞発現系の両方において同じ挙動 を示す変異体も確認されている。このことから、酵母に発現させた CPT1と動物細胞に発現させた CPT1 は、いくつか互いに異なる性質を有しているが、性質が顕著に異なっているわけではないと 考えられる。従って、前述した「CPT1 アイソザイムの機能解析において酵母発現系と動物細胞発 現系のどちらを用いるのが良いか」という問題については、各発現系を用いて発現させた CPT1 の性質について詳細に解析し、発現させた CPT1 や発現系の特性について詳細に理解した上で 解析に使用する発現系を選択すべきであると考えられる。また、各発現系を用いて発現させた CPT1 の性質について詳細に解析することは、CPT1 の特性に影響を与える因子を同定すること に繋がることからも極めて重要であると考えられる。

4-2 発現させた CPT1 アイソザイムの特異活性の比較(第3章)

CPT1cは脳と精巣に選択的に発現しているCPT1アイソザイムであるが、その機能や特性の詳細についてはほとんど解析されていない。過去に行われた動物細胞や酵母の発現系を用いた解析から、CPT1cはCPT1aよりもCPT1活性が顕著に低いということが報告されている。しかしながら、これまでに行われたCPT1cのCPT1活性について解析した研究は、発現させたCPT1アイソザイム間のタンパク質量が比較されていなかった[8, 18, 19]。そのため、CPT1cのCPT1活

性が低い原因は、発現させた CPT1c の特異活性が顕著に低いためであるのか、または、発現さ せた CPT1cのタンパク質量が極めて少ないためであるのか未だに解答を得られていなかった。こ の問題について解答を得るため、3 種類の CPT1 アイソザイムの発現レベルを定量的に比較する ことにより、CPT1 アイソザイム間の特異活性を比較した。

その結果、CPT1 アイソザイムの発現レベルを定量的に評価することにより、CPT1c の特異活 性が CPT1 アイソザイムの中で顕著に低いことを明らかにすることができた。さらに、CPT1 アイソ ザイムの中で、CPT1a の特異活性が最も高いことも明らかにすることができ、この結果は各アイ ソザイムの基質に対する親和性と相関する結果であった。これまでに、CPT1a と CPT1b につい て、カルニチンやパルミトイル CoA に対する親和性やマロニル CoA 感受性について解析されてき た[1, 13, 20]。しかしながら、これらの解析は CPT1 アイソザイムの発現レベルを定量的に評価し ていないため、得られた解析結果を直接比較することはできなかった。しかしながら、本研究で行 ったように CPT1 アイソザイムの発現レベルを定量的に評価することにより、CPT1 アイソザイム 間の基質やマロニル CoA に対する親和性についてより詳細な比較が行えると考えられる。また、 CPT1 アイソザイムのアミノ酸変異体についても同様の解析が行われているが、これらの解析に おいても発現させた変異体の発現レベルを定量的に評価されていないため、解析対象としたアミ ノ酸が CPT1 活性やマロニル CoA 感受性にどの程度重要であるのか、また、そのアミノ酸が CPT1 アイソザイムの性質に及ぼす影響はアイソザイムによって異なっているのか等の詳細な解 析は困難であった。これらの問題についても、発現させた変異体の発現量を算出し、野生型の CPT1 アイソザイムと変異体との間で 1 分子当たりの酵素活性やマロニル CoA 感受性を比較す ることにより、変異させたアミノ酸のこれらの性質に及ぼす影響を詳細に解析できると考えられ る。

本研究では、CPT1c の特異活性が顕著に低い原因はその発現レベルによるものではないこと を示すことに成功した。また、CPT1c のトポロジーについての解析から、CPT1c の C 末端領域は 細胞質側に露出していることから[21]、CPT1cの膜上でのトポロジーが原因でもないと考えられて いる。では何故、CPT1c の特異活性は顕著に低いのであろうか。この原因として、以下の 2 つの 可能性が考えられる。1つ目の可能性として、CPT1cと基質であるカルニチンやパルミトイル CoA との親和性が低いことによるものであるということが考えられる。この可能性について検証するた め、アミノ酸変異体を用いた解析により、CPT1a や CPT1b の CPT1 活性に重要なアミノ酸が CPT1c においても保存されているかどうか検証した。その結果、これまでに CPT1 活性に重要な アミノ酸として報告されているものは全て保存されていた[11-13, 22-32]。このことは、CPT1 活性 において未だに同定されていない重要なアミノ酸が存在すること、また、このアミノ酸を CPT1c は 保持していないことを示唆している。従って、CPT1c の特異活性が低い原因を明らかにするため には、各 CPT1 アイソザイムのアミノ酸配列を比較し、CPT1a と CPT1b においては保存されてい るが CPT1c においては保存されていないアミノ酸について焦点を当て解析することが重要である と考えられる。また、このようなアミノ酸の中でも、例えば、CPT1aとCPT1b では酸性アミノ酸であ るアスパラギン酸であるが、CPT1c では塩基性アミノ酸であるリジンであるというように、CPT1cと 他の2種類のアイソザイムとの間で性質が大きく異なるアミノ酸は、CPT1cと他の2種類のアイソ ザイムの特異活性の違いに関与している可能性が高いと考えられる。また、CPT1c はマロニル CoAとの結合能は有していること[8]、および、CPT1aのCoAとの親和性に重要なアミノ酸である 590 番目のグルタミン酸が CPT1c において保存されていることから[27]、CPT1c は CoA との結 合能は有していると考えられる。アシルトランスフェラーゼファミリーには、CPT1 以外にも多種多 様な酵素が存在し、それらの酵素とアシル CoA との親和性はアシル CoA のアシル基の長さによ って異なることが知られている[31, 32]。従って、Wolfgang らが行ったように、異なる長さのアシル CoA と CPT1c やその変異体との反応性も評価する必要があると考えられる[18]。2 つ目の可能 性として、CPT1aやCPT1bとCPT1cの立体構造が顕著に異なることによるものであるということ が考えられる。現在、CPT1 アイソザイムの結晶構造は未だに解かれていないため、CPT1 アイソ ザイムのミトコンドリア膜上における立体構造を正確に比較することは困難である。しかしながら、 CPT1 アイソザイムのミトコンドリア外膜上での構造について調べる比較的簡便な方法として、 CPT1 アイソザイムのプロテアーゼに対する抵抗性についての解析が挙げられる。ミトコンドリア 外膜上に存在する CPT1 にトリプシンのようなプロテアーゼを作用させてもほとんど消化されない ことが知られている[33, 34]。また、CPT1aとCPT1bについてはその立体構造を保つ上で重要で あると考えられているアミノ酸が同定されており、これらのアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異 体はプロテアーゼに対する抵抗性やCPT1活性が消失することが知られている[29]。従って、プロ テアーゼに対する抵抗性を CPT1 アイソザイム間で比較することにより、CPT1c と他の 2 種類の アイソザイムとの間で立体構造が大きく異なっているかどうかについて解析できると考えられる。 今後は、これら2つの可能性について検証することにより、CPT1cの特異活性が低い原因を明ら かにするだけでなく、CPT1a や CPT1b の特性について重要なアミノ酸を同定したいと考えてい る。

以上、本研究から、動物細胞に発現させた CPT1b と COS7 細胞に発現させた CPT1b の特異 活性は異なっていることが判明した。また、CPT1 アイソザイムの特異活性を比較した結果、 CPT1c は顕著に特異活性が低いことが判明した。今後は、今回明らかとなった用いた発現系の 間でみられた CPT1 の性質の違いやアイソザイム間にみられた特異活性の違いの原因を同定す ることにより、CPT1 アイソザイムの特性に影響を及ぼす因子を明らかにしていきたいと考えてい る。そうすることにより、脂肪酸代謝のメカニズム解明の基盤を構築し、脂肪酸代謝の全貌を明ら かにし、医療への応用に繋がることを期待する。

4-3 参考文献

- 1. McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, **244**, 1-14
- Kerner J, Hoppel C (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1486, 1-17
- 3. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR (2001) Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta*, **1546**, 21-43
- 4. Eaton S (2002) Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res*, **41** 197-239.
- Zammit VA (2008) Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life*, 60, 347-354
- Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD (1996) Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem*, **271**, 6972-6977
- Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H (1995) High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett*, **363**, 41-45
- Price N, van der Leiji F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 80, 433-442
- Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD (1993) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem*, **268**, 5817-5822
- Woldegiorgis G, Shi J, Zhu H, Arvidson DN (2000) Functional characterization of mammalian mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast Pichia pastoris. *J Nutr*, **130**, 310S-314S.
- Matsuo T, Yamamoto A, Yamamoto T, Otsuki K, Yamazaki N, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y (2010) Replacement of C305 in heart/muscle-type isozyme of human carnitine palmitoyltransferase I with aspartic acid and other amino acids. *Biochem Genet*, 48, 193-201
- Liu H, Zheng G, Treber M, Dai J, Woldegiorgis G (2005) Cysteine-scanning mutagenesis of muscle carnitine palmitoyltransferase I reveals a single cysteine residue (Cys-305) is important for catalysis. *J Biol Chem*, **280**, 4524-4531

- Swanson ST, Foster DW, McGarry JD, Brown NF (1998) Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues. *Biochem J*, **335**, 513-519
- Lee K, Kerner J, Hoppel CL (2011) Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) Is Part of an Outer Membrane Fatty Acid Transfer Complex. *J Biol Chem*, 286, 25655-25662
- Gao X, Li K, Hui X, Kong X, Sweeney G, Wang Y, Xu A, Teng M, Liu P, Wu D (2011) Carnitine palmitoyltransferase 1A prevents fatty acid-induced adipocyte dysfunction through suppression of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem J*, **435**, 723-732
- Henique C, Mansouri A, Fumey G, Lenoir V, Giard J, Bouilaud F, Prip-Buus C, Cohen I (2010) Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **285**, 36818-36827
- Sebastián D, Herrero L, Serra D, Asins G, Hegardt FG (2007) CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance. Am J Physiol Metab, 292, E677-E686
- Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asaumi M, Matsumoto S, Cha SH, Shimokawa T,Lane MD (2006) The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7282-7287
- Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Urena J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N (2008) CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem*, **283**, 6875-6885
- Jackson VN, Cameron JM, Fraser F, Zammit VA, Price NT (2000) Use of six chimeric proteins to investigate the role of intramolecular interactions in determining the kinetics of carnitine palmitoyltransferase I isoforms. *J Biol Chem*, **275**, 19560-19566
- Dai Y, Wolfgang MJ, Cha SH, Lane MD (2007) Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers. *Biochem Biophys Res Commun*, 359, 469-474
- 22. Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Woldegiorgis G (1999) A single amino acid change (substitution of glutamate 3 with alanine) in the N-terminal region of rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA inhibition and high affinity binding. *J Biol Chem*, **274**, 9421-9426
- Dai J, Zhu H, Shi J, Woldegiorgis G (2000) Identification by mutagenesis of conserved arginine and tryptophan residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I important for catalytic activity. *J Biol Chem*, **275**, 22020-22024
- 24. Ogawa E, Kanazawa M, Yamamoto S, Ohtsuka S, Ogawa A, Ohtake A, Takayanagi M,

Kohno Y (2002) Expression analysis of two mutations in carnitine palmitoyltransferase IA deficiency. *J Hum Genet*, **47**, 342-347

- Brown NF, Mullur RS, Subramanian I, Esser V, Bennett MJ, Saudubray JM, Feigenbaum AS, Kobari JA, Macleod PM, McGarry JD, Cohen JC (2001) Molecular characterization of L-CPT I deficiency in six patients: insights into function of the native enzyme. *J Lipid res*, **42**, 1134-1142
- Gobin S, Thuiller L, Jogl G, Faye A, Tong L, Chi M, Bonnefont JP, Girard J, Prip-Bnuus C (2003) Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency. *J Biol Chem*, **278**, 50428-50434
- 27. Napal L, Dai J, Treber M, Haro D, Marrero PF, Woldegiorgis G (2003) A single amino acid change (substitution of the conserved Glu-590 with alanine) in the C-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase I increases its malonyl-CoA sensitivity close to that observed with the muscle isoform of the enzyme. *J Biol Chem*, **278** 34084-34089
- 28. Zhu H, Shi J, Treber M, Dai J, Arvidson DN, Woldegiorgis G (2003) Substitution of glutamate-3, valine-19, leucine-23, and serine-24 with alanine in the N-terminal region of human heart muscle carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl CoA inhibition and binding. *Arch Biochem Biophys*, **413**, 67-74
- Pan Y, Cohen I, Guillerault F, Fève B, Girard J, Prip-Buus C (2002) The extreme C terminus of rat liver carnitine palmitoyltransferase I is not involved in malonyl-CoA sensitivity but in initial protein folding. *J Biol Chem*, **277**, 47184-47189
- Morillas M, López-Viñas E, Valencia A, Serra D, Gómez-Puertas P, Hegardt FG, Asins G (2004) Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal. *Biochem J*, **379**, 777-784.
- 31. Morillas M, Gómez-Puertas P, Roca R, Serra D, Asins G, Valencia A, Hegardt FG (2001) Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity. *J Biol Chem*, **276**, 45001-45008.
- Morillas M, Gómez-Puertas P, Rubí B, Clotet J, Ariño J, Valencia A, Hegardt FG, Serra D, Asins G (2002) Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem*, **277**, 11473-11480
- 33. Fraser F, Corstorphine CG, Zammit VA (1997) Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J*, **323**, 711-718
- Faye A, Borthwick K, Esnous C, Price NT, Gobin S, Jackson VN, Zammit VA, Girard J, Prip-Buus C (2005) Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular

interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity. *Biochem J*, **387**, 67-76

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を賜り、更に終始ご指導、ご鞭撻を頂きました、徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター 篠原 康雄 教授に心から感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり、ご指導、ご討論いただき、研究活動に深いご理解とご協力をいた だきました、徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター 山本 武範 講師に心から感謝の意を 表します。

また、本研究を行うにあたり、研究生活の基礎をご教示いただきました、徳島大学 薬科学教 育部 山﨑 尚志 准教授に感謝いたします。

また、本稿をまとめるにあたり、ご査読、ご討論していただきました、徳島大学 薬科学教育部 伊藤 孝司 教授、並びに山﨑 尚志 准教授に感謝いたします。

また、本研究を遂行するにあたり、深いご理解とご協力、ならびにご助言をいただきました、鈴 鹿医療科学大学 山本 篤司 助手、産業技術総合研究所 健康工学研究センター 尾華 絵里 子 博士に心から感謝いたしますとともに、今後のご活躍をお祈り申し上げます。

また、公私に渡り励まし支えて下さった、勝田 千恵 修士、川島 聡 修士、中西 千尋 修士、 森田 結貴 修士、堀内 優加 学士に感謝するとともに、皆様の益々のご活躍をお祈り申し上げ ます。

また、研究を通じてお世話になりました、井戸 佑介 修士、懸山 啓太 修士、榎本 麻里子 修士、加藤 弓子 学士、桑原 かな 学士、中野 裕美子 氏、伊藤 美香 氏、大和 永奈 氏 に感謝いたします。

また、研究に際し、常にご協力いただきました、徳島大学 薬科学教育部 生物薬品化学教室、 徳島大学 疾患プロテオゲノム研究センター 蛋白質発現分野の皆様に心から感謝いたします。

最後に、これまで深い愛情と理解をもって温かく見守り、励まし、心身ともに支え続けてくれた家 族に心から感謝いたします。

> 2013年3月 秦拓也