

## 筋型カルニチンパルミトイル転移酵素の発見とその遺伝子構造の解析

山崎 尚志

## Identification of Muscle-type Carnitine Palmitoyltransferase I and Characterization of Its Gene Structure

Naoshi YAMAZAKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, 1-78 Shomachi, Tokushima 770-8505, Japan

(Received August 2, 2004)

To characterize energy metabolism in brown adipose tissue (BAT), differential screening of a cDNA library of rat BAT with a cDNA probe of rat white adipose tissue was carried out. We isolated one novel cDNA clone encoding a protein of 88.2 kDa consisting of 772 amino acids. The deduced amino acid sequence showed the highest homology (62.6%) with that of rat liver carnitine palmitoyltransferase I (CPTI). The transcript corresponding to this cDNA was abundantly expressed not only in BAT but also in the heart and skeletal muscle. CPTI is a protein necessary for the  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids in mammalian mitochondria, and it has been suggested that at least two isoforms, the liver type and muscle (M-CPTI) type, exist. Based on these observations, we concluded that the novel cDNA clone isolated from rat BAT encodes M-CPTI. Isolation and characterization of a genomic DNA clone revealed that the gene for human M-CPTI consists of two 5'-noncoding exons, 18 coding exons, and one 3'-noncoding exon spanning approximately 10 kbp, and a gene encoding choline/ethanolamine kinase- $\beta$  (CK/EK- $\beta$ ) was located about 300 bp upstream from the M-CPTI gene with the same strand direction. Furthermore, we found atypical transcripts containing exons of both CK/EK- $\beta$  and M-CPTI genes in humans and rodents. The physiologic role(s) of these transcripts is still unknown. However, it is interesting that such transcripts are produced from two tightly arranged and functionally unrelated genes in mammalian tissues.

**Key words**—carnitine; gene structure; overlapping genes;  $\beta$ -oxidation; brown adipose tissue

## 1. はじめに

哺乳動物には白色脂肪組織 (white adipose tissue: WAT) と褐色脂肪組織 (brown adipose tissue: BAT) という 2 種類の脂肪組織が存在する。WAT は全身に幅広く存在する一般的な脂肪組織で、食事によって得られた余分なエネルギー燃料を中性脂肪の形で貯め込み、必要なときに脂肪酸とグリセロールの形で全身に再供給するために特殊化した組織である。一方、BAT は肩胛骨間や腋の下、腎周囲など限られた部位にごくわずかに存在する特殊な脂肪組織である。BAT を構成する褐色脂肪細胞はミトコンドリアを多く含んでおり、そこに存在するシトクロム酸化酵素群によって細胞は特有の茶褐色を呈している。このことが褐色脂肪細胞あるいは褐色脂肪組織

と呼ばれるゆえんである。

さらに BAT の生理的な役割は極めてユニークである。上述したように、WAT が余剰のエネルギー燃料をトリアシルグリセロールという中性脂肪の形で貯蔵する、いわばエネルギーの貯蔵庫として機能しているのに対し、BAT は取り込んだエネルギー燃料を「積極的に」酸化分解して熱を産生する働きをしている。<sup>1-5)</sup> この熱産生は体を動かすことなく行われるので非震え熱産生と呼ばれる。同じ脂肪組織でありながら WAT と BAT が全く正反対の役割を果たしている原因は、成熟した褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜にプロトン透過担体である脱共役タンパク質 (uncoupling protein: UCP) が存在しているからである。<sup>6-9)</sup> このタンパク質の働きにより褐色脂肪細胞において大量の熱が発生することから、UCP は熱産生タンパク質と呼ばれることもある。

UCP の機能について述べる前にミトコンドリア

徳島大学薬学部 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78)

e-mail: yamazaki@ph.tokushima-u.ac.jp

本総説は、平成 16 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

の電子伝達系と ATP 合成について説明する必要がある。ミトコンドリアは外膜と内膜という二重の膜構造を有する直径およそ  $1\ \mu\text{m}$  程度の細胞内小器官で、外膜と内膜の間には膜間領域、内膜の内側にはマトリックスと呼ばれる区画が存在する。外膜には低分子物質を非選択的に透過するポーリンと呼ばれる膜タンパク質が存在しているため、外膜を介した物質の輸送は比較的容易に行われる。一方、ほとんどすべての物質、例えばプロトンでさえも内膜そのものを自由に透過することはできない。<sup>10)</sup> ミトコンドリアにおいて営まれている多くの代謝活動は内膜の内側すなわちマトリックスで行われているので、代謝活動に必要な基質あるいは産生された物質や老廃物は何らかの機構を介して内膜を透過しなくてはならない。これを可能としているのがミトコンドリア内膜に存在する物質特異的な輸送担体タンパク質である。<sup>11)</sup> マトリックスにおいて ATP 合成酵素によって触媒される  $\text{ADP} + \text{P}_i$  (無機リン酸)  $\rightarrow$  ATP という反応の基質及び産物である ADP と ATP を交換輸送する ADP/ATP 透過担体や無機リン酸を輸送するリン酸透過担体、長鎖脂肪酸のアシル基の輸送に必須なカルニチン透過担体、そして UCP などがこの輸送担体タンパク質に含まれる。cDNA の単離などにより構造が明らかとなっている輸送担体はおよそ 300 アミノ酸からなる 30 kDa 程度のタンパク質で 6 ヶ所の膜貫通部分を有しているといった構造的な特徴を共通して持っていることから、一

次構造が明らかでないものも含めて、ミトコンドリア内膜に存在する輸送担体タンパク質は同じ先祖遺伝子を起源を持つと考えられており、ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーと呼ばれている。

白色脂肪細胞を含む通常の細胞のミトコンドリアにおいては、糖や脂肪酸などの呼吸基質(すなわちエネルギー燃料)の酸化によって最終的にマトリックスで発生したプロトンは、電子伝達系、いわゆる呼吸鎖によって内膜の外側に汲み出され、これが今度はその濃度勾配を利用して ATP 合成酵素を介して再びマトリックス側に移動する際に ATP が合成される (Fig. 1)。一方、褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜には UCP が存在する。UCP は濃度勾配に従ってプロトンを輸送するタンパク質なので、呼吸鎖によって膜間領域に汲み出されたプロトンは ATP 合成酵素ではなく UCP を介してマトリックス側に移行することになる。この結果、ATP の合成量は減少し、ATP 合成というしがらみから解放された呼吸基質の酸化的分解が極めて促進されるとともに他の細胞に比べて大量の熱が発生することになる。

UCP は BAT を構成する褐色脂肪細胞においてのみ特異的に存在し機能している。また動物が冬眠から覚醒するときやヒトを含めた哺乳動物の胎児が出生する直前、動物を寒冷に曝したときなど体温の維持が必要とされる状況では BAT が発達し同時に UCP の量が増加することが知られている。さら

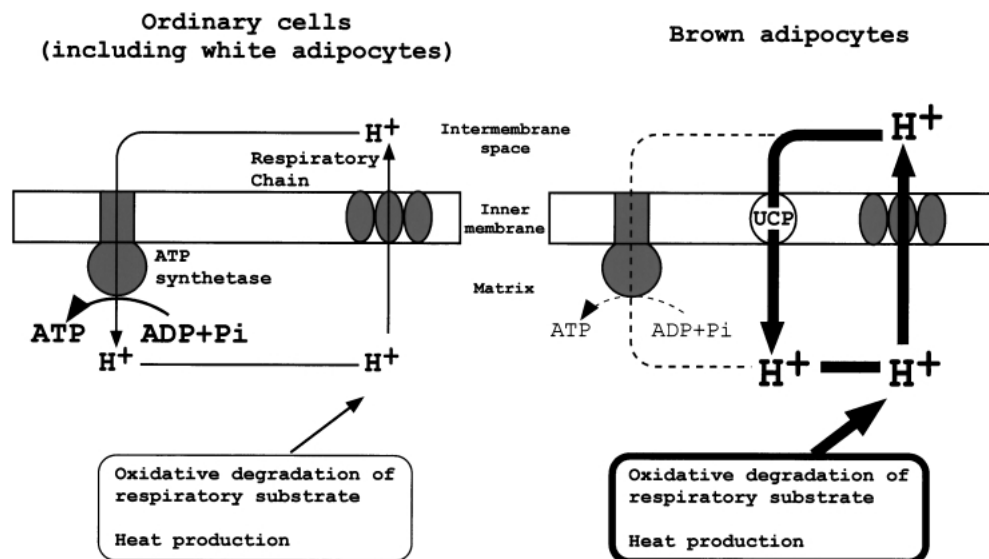


Fig. 1. Functional Overview of Mitochondrial UCP-1

に、何らかの原因により BAT の機能障害が生じるとエネルギー消費量が減少し肥満が進行することも報告されている。

このように、BAT におけるエネルギー燃料の積極的な酸化分解及びその結果として起こる熱産生というユニークな機能は、そのミトコンドリア内膜に UCP が特異的に存在し働いていることによって説明することが可能である。しかしながら筆者は「BAT のユニークな機能は UCP の働きによってのみ調節されているのではなく、この組織に特徴的な他の因子（タンパク質）の働きによっても調節されているのではないか。その因子を同定し解析を行えば BAT において営まれているエネルギー代謝機構をより詳細に明らかとすることができるのではないか」と考え、UCP と同様に BAT に特徴的なタンパク質を同定することを目的として 1993 年に本研究を開始した。

なお、この研究を開始したあとに、BAT 特異的な UCP との構造類似性が認められプロトン透過担体としての機能を有しているタンパク質（WAT に多く存在する UCP-2、骨格筋で多い UCP-3 など）が発見されたため、以前から知られていた UCP は UCP-1 と呼ばれるようになり、UCP は BAT だけでなく様々な組織においてエネルギー消費を調節しているタンパク質として注目を集めるようになってきた。<sup>8)</sup>しかし、本研究を開始した当時は褐色脂肪細胞に特異的な UCP、すなわち UCP-1 しかその存在が知られておらず、本総説においても褐色脂肪細胞で発現している UCP についてのみ述べるので単に「UCP」と表記する。

## 2. ラット BAT に特徴的な cDNA の単離と構造解析

BAT において特徴的に発現しているタンパク質を同定する目的で、BAT に存在する mRNA と、同じ脂肪組織でありながら正反対の働きをしている WAT に存在する mRNA を differential screening 法<sup>12)</sup>により比較し、BAT に多く存在する mRNA（実際には cDNA）を単離することを試みた。まず、ラットの肩胛骨間 BAT と副睾丸 WAT から mRNA を抽出し、得られた mRNA を用いてファージをベクターとしたラット BAT の cDNA ライブラリーを作製した。続いて WAT の mRNA を放射標識ヌクレオチド存在下で逆転写反応を行って WAT

の cDNA プローブを調製し、このプローブを用いて常法に従い BAT cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、およそ 40000 個のライブラリークローンから WAT の cDNA プローブとはほとんどハイブリダイズしないクローンをランダムに 200 個選択した。続いてこれらのクローンに含まれる cDNA をアガロースゲル電気泳動に供し、WAT プローブ及び同様の手順で調製した BAT プローブを用いてザン・プロットングを行った。その結果、WAT プローブとはほとんどハイブリダイズせず、BAT プローブと強くハイブリダイズする cDNA クローン (DS112) を得ることに成功した。<sup>13)</sup>

DS112 の cDNA を放射標識してプローブを作製し、これを用いて今度は WAT と BAT の mRNA のノザン・プロットングを行ったところ、DS112 に相当する mRNA は確かに WAT にはほとんど存在せず BAT に多く存在することが確認された。なお DS112 はおよそ 1.5 kbp の cDNA であったが、ノザン・プロットングにより検出された mRNA のサイズは 3 kbase 程度だったので、DS112 をプローブとしてラット BAT cDNA ライブラリーのスクリーニングを再度行い、アミノ酸コード領域を完全に含んでいると予想されるおよそ 3 kbp の cDNA クローン DS112-36 を単離した。塩基配列の解析により、DS112-36 は 772 アミノ酸からなる 88.2 kDa のタンパク質をコードしていることが示された。

## 3. BAT に特徴的な cDNA クローン DS112-36 の解析

単離した DS112-36 の塩基配列を、相同性検索プログラム BLAST<sup>14)</sup>を用いて Gene Bank や EMBL などの DNA バンクに既に登録されている塩基配列と比較したものの、ラットにおいて DS112-36 と同一の塩基配列は見い出されず、またヒトやマウスなど他の哺乳動物においても類似した配列の存在は認められなかった。このことから、ラット BAT から単離された cDNA クローン DS112-36 はこれまでに報告されていない全く新規の塩基配列を有した cDNA であることが明らかになった。しかしながら、この cDNA とおよそ 60% の類似性を示す塩基配列として、ラットの肝臓に由来するカルニチンパルミトイル転移酵素 I (carnitine palmitoyltransferase I: CPTI) というタンパク質をコードする cDNA が見い出された。<sup>15)</sup> cDNA の塩基配列からラ

ットの肝臓 CPTI は 773 アミノ酸からなるおよそ 88 kDa のタンパク質と推定されていたが、DS112-36 がコードするタンパク質の大きさも非常に類似しており、また両者のアミノ酸配列にはほぼ全領域に渡って高い類似性 (62.6%) が認められた (Fig. 2(A)). さらに2つのタンパク質のハイドロパシー解析<sup>16)</sup>を行った結果、両者の親水性・疎水性領域の分布も非常に類似していることが示された (Fig. 2 (B)). 特に、肝臓 CPTI のアミノ末端側には疎水性の高い領域が2ヵ所存在しこの領域でミトコンドリア膜と結合していると推測されていたが、DS112-36 がコードするタンパク質のアミノ末端側にも同様に疎水性の高い領域が存在することが予想され

た、これらの結果から、ラット BAT から単離された新規 cDNA クローン DS112-36 は、ラット肝臓 CPTI と構造的に非常に類似した新しいタンパク質をコードしている可能性が強く示唆された。

4. ミトコンドリア カルニチン系

ミトコンドリアは糖や脂肪酸などのエネルギー燃料を酸化的に分解し、生体反応に共通のエネルギー通貨である ATP を産生する細胞内小器官である。生体内に多く存在するパルミチン酸やステアリン酸などの長鎖脂肪酸は血液中から細胞内に取り込まれ、ミトコンドリアの外膜に存在するアシル CoA 合成酵素によって活性化された状態 (長鎖アシル CoA) となる。長鎖アシル CoA はミトコンドリア

A)

```

DS112-36: 1 MAEAHQAVAFQFTVTPDGVDFRLSREALRHIYLSGINSWKKRLIRIKNGILRGVYPGSPTSWLIVVVMATVGSNYCKVDISMGLVHCIQRCPLTRYGSYGT
rat CPTI: 1 MAEAHQAVAFQFTVTPDGIDLRLSHEALKQICLSGLHSWKKKFRFRKNGIITGVFPANPSSWLIIVVGVISSMHAKVDPISLGLIAKISRITLDT--TGRMS
*****
DS112-36: 101 PQTETLLSMVIFSTGVWATGIFLFRQTLKLLSYHCWMMFEMHSKTSHTAKIWAICVRLLSRRRPMLYSFQTSLPKLPVPSVFPATIHRYLDSVRPLDDEA
rat CPTI: 99 SQTKNIVSGVLFGTGLWVAVIMTRYSLKVLSSYHCWMMFAEHGKMSRSTKIWMAMVKVLSGRKPMLYSFQTSLPRLFPVPAVKDITVSRYLESVRPLMKEED
**
DS112-36: 201 YFRMESLAKEFQDKIAPRLQKYLVLKSWWATNYVSDWWEYVYLRGRSPIMVNSNYAMDFVLIKNTSQQAARLGNVHAMIMYRRKLDREEIKPVMALG
rat CPTI: 199 FQRTALAQDFAVNLGPKLQWYLKLSWWTNYVSDWWEYIYLRGRGLPMVNSNYAMEMLYITPTHIQAARAGNTIHAILLYRRLDREELKPIRLLG
**
DS112-36: 301 -MVPMSYQMERMFNTTRIPKQETDILLQHLSESRFVAVYHGRFFKRWLYEGSCLLKPRDLEMQFQRIIDDTSPQPGEELKLAALTAGCRVEWEAERQKF
rat CPTI: 299 STIPLCSAQWERLFTNSRIPEGEDTITQHIKDSRHIVVYHGRYFKWLYHDGRLLRPRELEQQMQLIDDPSEPQPEAKLAALTAADRVFWAKCRQTY
**
DS112-36: 400 FSSGKNKMSLDTIERAAFFVALDEDSHCYNPDD-EASLSLYGKSLHGCYNRWFDKSFSTLISCKNQQLGNTLHESWADAPIIGHLWFLVATDIFHLGY
rat CPTI: 399 FARGKNKQSLDAVEKAAFFVLDSEQGYREEDPEASIDSYAKSLHGRCFDRWFDKSITFVVKNSKIGINAESWADAPIVGHLEWYVMAVDVFLQGY
**
DS112-36: 499 TETGHCVGEPTKLPFPQRMQWDIPEQCQTAIENSQVAKALADDVELYCFQFLPFGKGLIKKCRTPDAFVQIALQLAHFRDKGKFCFLTYEASMTRMFR
rat CPTI: 499 SEDGHCKGDTNPNIPKTRLQWDIPGECQEVIDASLSSASLLANDVDLHSPFPDSFGKGLIKKCRTPDAFIQALQLAHYKDMGKFCFLTYEASMTRLFR
**
DS112-36: 599 EGRTEVRSCTSESTAFVRAMTGSCHKQDLQDLFRKASEKHQNMRYRLAMTGAIDRHLFCFLYIVSKYLGVRSFPLDEVLSEPWLSLTSQIPQFQICMFD
rat CPTI: 599 EGRTEVRSCTMESCNFVQAMDPKSTAEQRLKLFKIAACEKHQHLRYRLAMTGAIDRHLFCFLYVSKYLAVDSFPLDEVLSEPWLSLTSQTPQQQVLEFD
*****
DS112-36: 699 PKQYVNHLAGGGFGFVADHGYGVSYMIAGENTMFFHVSSKLSSESNALRFGNHRQALLDIADLFKISKTDS
rat CPTI: 699 FEKPNFDYVSCGGGFGFVADDGYGVSYIIVGENFIHFHISSKFSSPETDSHRFGKHLRQAMMDIITFLGLTINSKK
*****
    
```

B)

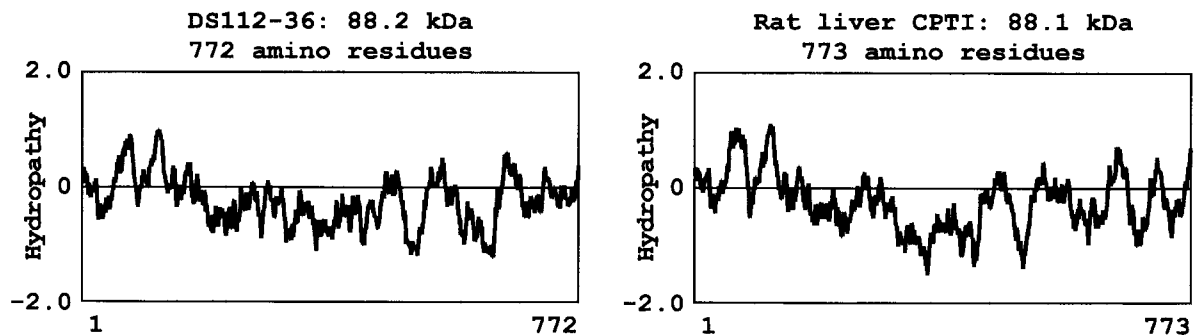


Fig. 2. Comparison of a Protein Encoded by a Novel cDNA Clone DS112-36 with Rat Liver CPTI  
 A) Alignment of the predicted amino acid sequence of DS112-36 with that of rat liver CPTI. Asterisks indicate identical residues. Four gaps shown by (-) are inserted to obtain maximum alignment. B) Hydropathy profiles of DS112-36 and rat liver CPTI. Amino acid sequences were analyzed by the method of Kyte and Doolittle with an interval of 30 amino acids.

のマトリックスに移行したのち、 $\beta$ 酸化を受けてアセチル CoA となり、これがさらに代謝される過程で ATP が合成される。しかしながら長鎖アシル CoA はそのまま単独ではミトコンドリアの内膜を透過することができない。この段階は CPTI、カルニチン透過担体及びカルニチンパルミトイル転移酵素 II (carnitine palmitoyltransferase II: CPTII) という3つのタンパク質によって構成されるカルニチン系の働きにより調節されている (Fig. 3)。<sup>17-21)</sup> まず最初に、外膜に存在する CPTI により長鎖アシル CoA のアシル基がカルニチンに転移されアシルカルニチンが生成する。生じたアシルカルニチンは、ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリーの一種であるカルニチン透過担体を介して内膜を通過し、最後に CPTI の逆反応を行う CPTII (633 アミノ酸からなる 71 kDa のタンパク質) により再び長鎖アシル CoA となって  $\beta$ 酸化の基質となる。この一連の過程の中でも最初の段階を担っている CPTI の活性はマロニル CoA によって厳格に調節 (抑制) される。マロニル CoA はアセチル CoA に由来する物質で、脂肪酸合成の基質となる物質である。すなわち、摂食後など糖質に由来するアセチル CoA が過剰に存在し、アセチル CoA からマロニル CoA、さ

らに脂肪酸の生合成が活発に行われているような状況では、貯蔵型エネルギー燃料である脂肪酸が不必要に分解されないように CPTI の活性はマロニル CoA によって抑制されているという訳である。なお、マロニル CoA によって活性阻害を受けるのは CPTI だけで、CPTII は阻害を受けないことが知られている。したがって、CPTI はミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸の酸化的分解において最初の調節段階を担っている重要な酵素であると考えられている。

ミトコンドリア CPT に関する研究は古く 1960 年代から行われてきたものの、活性を保持した状態で CPTI を単離精製することが極めて困難なことから、CPTI の存在部位やその構造に関して 1990 年代前半まで不明な点が多く残されていた。最近明らかとなったことも含めてそれらを以下にまとめる。

1) CPTI の存在部位：CPTI は内膜の「外側」の区画に存在すると考えられていたが、それが内膜の外側表面であるのか外膜であるのか永らく不明であった。比較的最近になって CPTI はそのアミノ末端側に位置する 2 つの疎水性の高い領域 (肝臓 CPTI においてはアミノ酸 53-75 及び 103-122) で外膜を 2 回貫通した構造を取っていること、CPTI

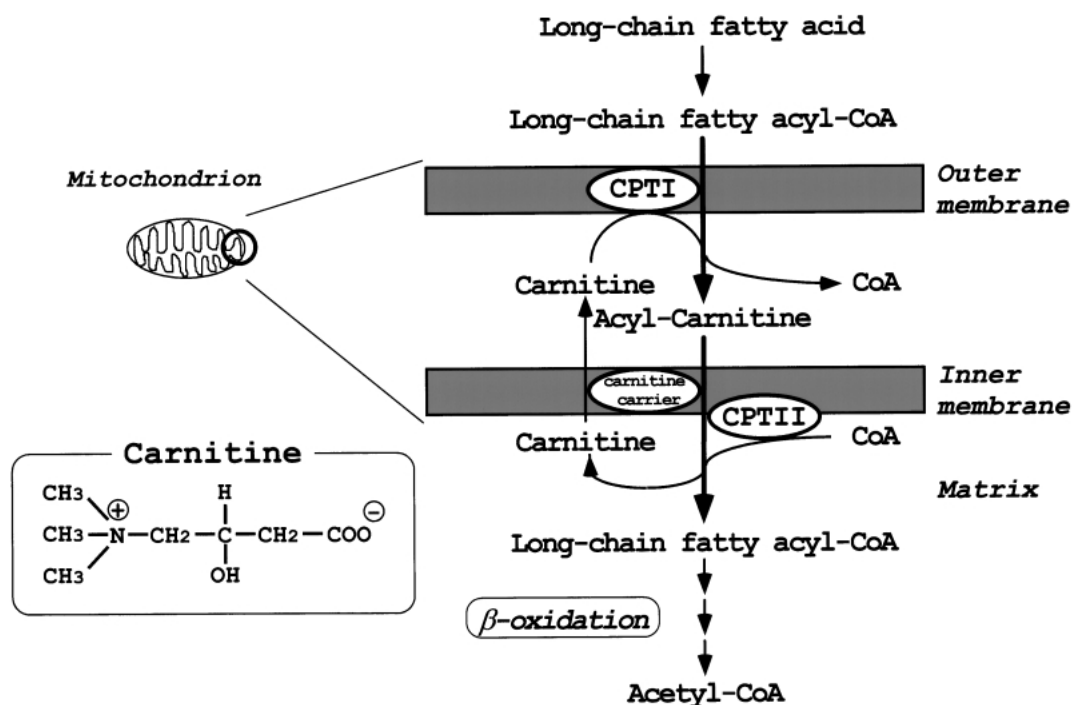


Fig. 3. Mitochondrial Carnitine System

のアミノ末端とカルボキシル末端はともに細胞質側に突出していることが明らかとなった。<sup>22,23)</sup>したがって CPTI のほとんどの部分はミトコンドリアの外側 (細胞質) に位置していることになる。

2) CPTI と CPTII は異なるタンパク質なのか: 内膜の内側に存在する CPT, すなわち CPTII は比較的弱い界面活性剤によってミトコンドリア膜から抽出することが可能で, 抽出後もその酵素活性を保持している。一方 CPTI は高塩濃度下で比較的強い界面活性剤を用いることによってミトコンドリア膜から抽出できるものの, 膜から遊離した CPTI はその酵素活性をほとんど失ってしまう。活性を保持した状態でマロニル CoA 感受性の CPT (すなわち CPTI) を単離精製することができなかったため, 内膜の「内側」区画と「外側」区画に存在する CPT は同一のタンパク質で, 「外側」CPT にはマロニル CoA による活性阻害を調節するタンパク質が結合しており, 弱い界面活性剤によってこの調節タンパク質が「外側」CPT から外れてしまうために膜から抽出された CPT (実際には CPTII) はマロニル CoA 感受性を示さないというモデルも提唱されていた。そのため内膜の「外側」に存在する CPT (CPTI) を CPT<sub>o</sub>, 「内側」に存在する CPT (CPTII) を CPT<sub>i</sub> と表記することもある (o は outer あるいは overt, i は inner を意味する)。筆者が DS112-36 を単離したのとほぼ同じ頃に, 肝臓から単離された CPTI cDNA の発現実験が行われ, 合成された 1 本鎖ポリペプチド中に CPT 活性部位とマロニル CoA 感受性部位が含まれていることが報告された。<sup>24)</sup> こうして内膜の「外側」CPT と「内側」CPT が異なる分子であることが示された。

3) 組織によって発現している CPTI は異なっている: 単離ミトコンドリアを用いた実験の結果から, CPTI のカルニチンに対する親和性及びマロニル CoA 阻害に対する感受性が肝臓と骨格筋で大きく異なっていることが知られており (肝臓 CPTI ではそれぞれ  $K_m = 30 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} = 2.5 \mu\text{M}$ , 骨格筋 CPTI ではそれぞれ  $K_m = 500 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} = 0.03 \mu\text{M}$ ), また心臓ミトコンドリア CPTI は肝臓 CPTI と骨格筋 CPTI の中間の性質を示すことから両タイプの CPTI が発現していると考えられていた。<sup>25)</sup> さらに, 共有結合する基質アナログや特異抗体を用いた実験により, 肝臓 CPTI は 88 kDa, 心臓や骨格筋

CPTI は 82 kDa 程度の大きさであることが SDS-PAGE における電気泳動移動度から推測されていた。<sup>26,27)</sup> 肝臓で発現している CPTI (肝型 CPTI: L-CPTI) に関しては既に cDNA が単離されその一次構造が決定されていたものの, 筋肉で発現しているタイプの CPTI (筋型 CPTI: M-CPTI) についての詳細は明らかとされていなかった。なお CPTII に関しては, 組織によって酵素的な性質やその分子サイズに違いが見られないことから全身で同一のタンパク質が発現していると考えられている。

#### 5. 新規 cDNA クローン DS112-36 の組織分布

上述したように, CPTI には既に cDNA が単離され一次構造が明らかな「肝型」に加えて, 心臓や骨格筋で発現している「筋型」の存在が示唆されていた。そこで, 続いて BAT と WAT 以外の組織における DS112-36 の mRNA 分布を解析した。ノザン・ブロッティングの結果, DS112-36 の mRNA は BAT 以外にも心臓や骨格筋で大量に存在することが示された (Fig. 4)。一方, 肝型 CPTI の mRNA は肝臓や腎臓で多く存在しており, 脳や心臓, WAT においても検出された。また CPTII の mRNA 量は脳を除いたすべての組織においてほぼ同程度であることが示された。なお検出された肝型 CPTI の mRNA サイズが DS112-36 や CPTII と比べて極端に大きいのは, この mRNA が長い 3' 非翻訳領域 (およそ 2 kbase) を有しているためである。

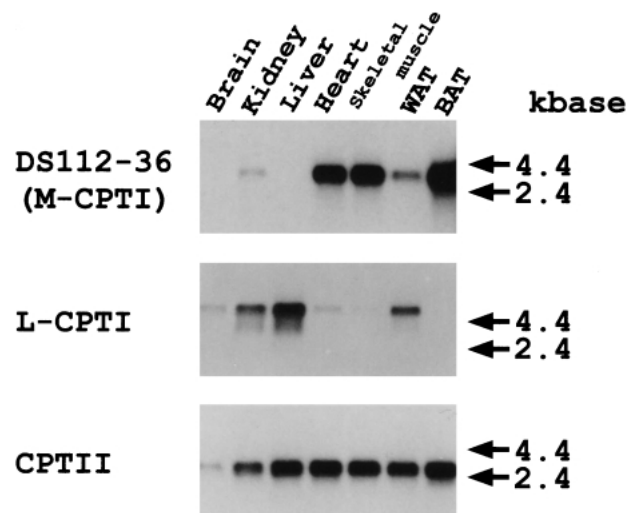


Fig. 4. Tissue Distributions of Transcripts of DS112-36 (M-CPTI), Liver CPTI (L-CPTI), and CPTII

Samples of 1  $\mu\text{g}$  of poly(A)<sup>+</sup> RNAs obtained from rat tissues were analyzed. The arrows indicate the positions of the 4.4-kbase and 2.4-kbase RNA ladder.

以上の結果, すなわち DS112-36 によってコードされるタンパク質とラット肝型 CPTI の一次構造が非常に類似していること, その mRNA が心臓や骨格筋に多く存在することから, ラット BAT から単離された新規 cDNA クローン DS112-36 は, その存在が予想されながらもタンパク質の単離精製が極めて困難なために分子レベルでの解析が行われていなかった筋型 CPTI をコードする cDNA であると結論した. のちに, この cDNA によってコードされるタンパク質が CPT 活性を有しており, 骨格筋のミトコンドリアで観察されるものと同程度のカルニチンに対する親和性及びマロニル CoA 感受性を示すことが他のグループが行った発現実験によって確認された.<sup>28)</sup> なお, SDS-PAGE における電気泳動移動度から筋型 CPTI の分子サイズは肝型 CPTI (88 kDa) よりも小さい 82 kDa 程度であるとされていたにも関わらず, cDNA (DS112-36) の塩基配列から予想される筋型 CPTI の分子サイズは 88 kDa であった. 試験管内で cDNA から筋型 CPTI を合成し SDS-PAGE に供した場合でも, その電気泳動移動度から推定される分子サイズはやはり 82 kDa 程度であったことから, タンパク質への翻訳後に何らかの修飾を受けるためではなく, タンパク質を構成するアミノ酸そのものの性質によって筋型 CPTI は異常な電気泳動移動度を示すことが明らかになった.<sup>28)</sup> また, 筆者は WAT には肝型と筋型両方の CPTI mRNA が存在しているという結果を示したが (Fig. 4), この結果は実験に用いたラットが若齢 (4 週齢) であったため WAT に未成熟白色脂肪細胞や幹細胞が多く含まれており, そこで発現している肝型 CPTI の mRNA が検出されたことによるものであり, BAT と比較するとその量は少ないものの成熟したラット白色脂肪細胞において発現している CPTI は筋型アイソフォームのみであるということも報告された.<sup>28)</sup> したがって筋型 CPTI は WAT においても脂肪酸代謝に関わる重要な酵素であると考えられる.

#### 6. ヒト筋型 CPTI をコードする cDNA 及び遺伝子の単離と構造解析

ラット BAT cDNA ライブラリーから単離された新規 cDNA クローン DS112-36 は筋型 CPTI をコードしており, その mRNA は, より多くの脂肪酸をエネルギー燃料として利用している心臓や骨格

筋, 脂肪酸を燃焼して効率よく熱を産生している BAT など「脂肪酸分解の盛んな組織」において大量に存在することが示された. 筋型 CPTI は脂肪酸代謝に極めて重要な役割を担っていると予想されるので, 続いてヒト筋型 CPTI をコードする cDNA とゲノム DNA の単離を行った.

ラット筋型 CPTI をコードする cDNA (DS112-36) をプローブとしてヒト心臓 cDNA ライブラリー及びヒトゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングを行い, 陽性の cDNA 及びゲノム DNA クローンを単離した.<sup>29)</sup> cDNA の塩基配列から, ヒト筋型 CPTI はラットと同様に 772 個のアミノ酸からなるおよそ 88 kDa のタンパク質であると推定された. またそのアミノ酸配列はラット筋型 CPTI と高い類似性 (85.7%) を示し, ラット<sup>15)</sup> 及びヒト<sup>30)</sup> 肝型 CPTI とは 63.1%, 62.3% の類似性であった. ノザン・ブロッティングの結果, ヒトにおいても筋型 CPTI の mRNA は心臓や骨格筋に多く存在しており, その分布は肝型 CPTI とは全く異なっていることが示された.<sup>29)</sup>

続いて単離したゲノム DNA の塩基配列を解析し, cDNA の配列と比較することによって遺伝子のエクソンとイントロンの構造を Fig. 5 に模式的に示すように決定した.<sup>31)</sup> なお遺伝子上流の構造は, mRNA の 5' 領域に相当する cDNA を単離する手法である 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を行うことにより決定した. ヒト筋型 CPTI 遺伝子は全長およそ 10 kbp で, タンパク質を構成する 772 個のアミノ酸は 18 個のエクソン (エクソン 2—エクソン 19) に分断されてコードされていた. 5' RACE 法によって単離された cDNA の解析の結果, 翻訳開始コドンを含むエクソン (エクソン 2) の上流にアミノ酸に翻訳されないエクソン (エクソン 1A と 1B) が存在し, これらは択一的に mRNA に含まれることが明らかとなった. また, 3' 領域にもアミノ酸に翻訳されないエクソン (エクソン 20) が存在していることが示された.

エクソン 1A よりも上流領域の塩基配列をさらに解析したところ, コリン/エタノールアミンキナーゼ  $\beta$  (choline/ethanolamine kinase- $\beta$ : CK/EK- $\beta$ ) と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子が同じ転写の方向で存在することが示された. CK/EK- $\beta$  は動物細胞における主要な膜リン脂質であるホスファチ

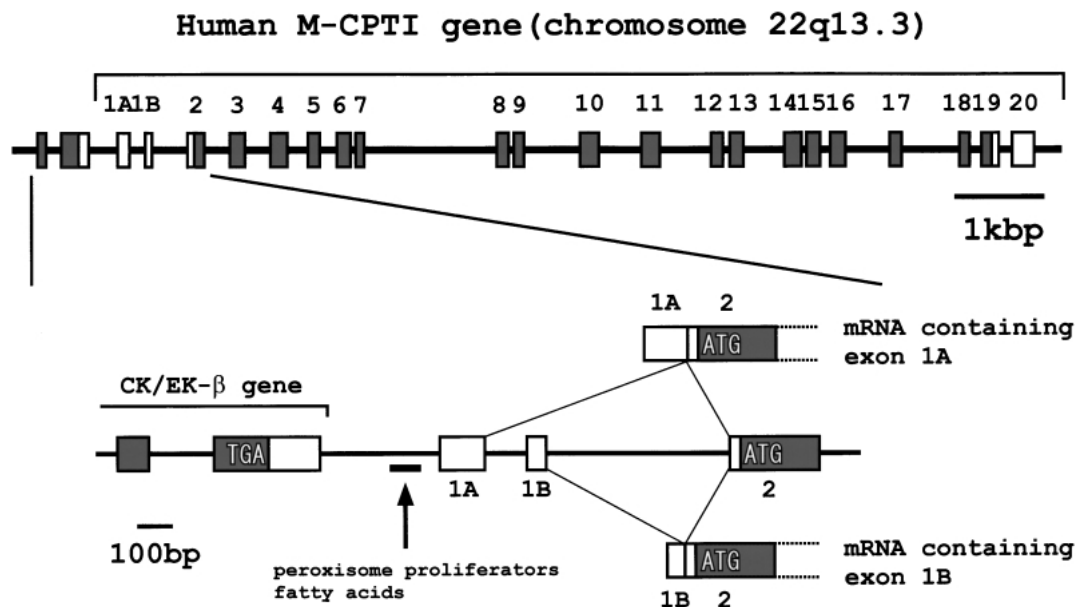


Fig. 5. Structural Features of the Human M-CPTI Gene and Its Flanking Region

Boxes represent exons, and open and closed parts represent amino acid noncoding and coding regions, respectively. TGA represents the translation termination codon for CK/EK- $\beta$  and ATG represents the translation initiation codon for M-CPTI.

ジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンの生合成初段階反応を触媒する酵素である。<sup>32)</sup> 筋型 CPTI と同様に脂質代謝に関与するタンパク質ではあるが 2 つのタンパク質の機能に関連はないと思われる。また、筋型 CPTI 遺伝子上流領域の DNA 断片をプローブとしてノザン・ブロッティングを行った結果、少なくとも心臓と骨格筋においてはエクソン 1A と 1B は使い分けられていないことが示された。加えて、CK/EK- $\beta$  遺伝子の 3'末端から筋型 CPTI 遺伝子エクソン 1A の 5'末端の間の領域を含んでいる mRNA は検出できなかったことから、エクソン 1A と 1B それぞれの 5'末端からさほど離れていない上流領域に遺伝子のプロモーターが存在し、それぞれの転写開始部位から合成された RNA (一次転写産物) はエクソン 1A あるいは 1B の 3'末端とエクソン 2 の 5'末端でスプライスされてイントロンが除去されていると予想された。

さらに、筆者が上述したヒト筋型 CPTI の遺伝子構造を決定したのとほぼ同時期に、本遺伝子がヒトの第 22 番染色体に位置することが報告された。<sup>33,34)</sup> ヒト肝型 CPTI 遺伝子は第 11 番染色体に、<sup>30,33)</sup> ヒト CPTII 遺伝子は第 1 番染色体に<sup>35)</sup> 位置することから、ミトコンドリア CPT は CPTI と CPTII だけでなく肝型 CPTI と筋型 CPTI も異なる遺伝子にコードされた全く別のタンパク質であることがその

染色体位置からも明らかとなった。また、エクソン 1A のすぐ上流に、脂肪酸やペルオキシソーム増殖剤に応答する配列が存在し、これらの因子が実際に本遺伝子の転写を亢進することも報告された。<sup>36-38)</sup>

#### 7. CK/EK- $\beta$ と筋型 CPTI の 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA

上述したように、ヒト筋型 CPTI 遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソン (エクソン 2) の上流にはアミノ酸に翻訳されない択一的な 2 つのエクソン (エクソン 1A と 1B) が存在し、さらにその 300 bp ほど上流に CK/EK- $\beta$  遺伝子が筋型 CPTI と同じ転写の方向で存在することが明らかとなった。その他のグループが、ヒト筋型 CPTI 遺伝子の 2 つの転写開始部位をプライマー伸長法によって決定した。<sup>38)</sup> そのうちの 1 つは筆者が 5'RACE 法によって決定したエクソン 1B の 5'末端と同一の部位であったが (Fig. 6(A) で TSS M と表記)、もう 1 つはエクソン 1A の 5'末端より 40 bp も下流に位置していた (Fig. 6(A) で TSS U と表記)。これらの転写開始部位が正しければ、5'RACE 法によって単離されたエクソン 1A を含む cDNA は、報告された転写開始部位 (TSS U) よりも上流に存在する未同定の転写開始部位から合成が開始された mRNA に由来することになる。筋型 CPTI 遺伝子のすぐ上流には他のタンパク質をコードする遺伝子が存在するの



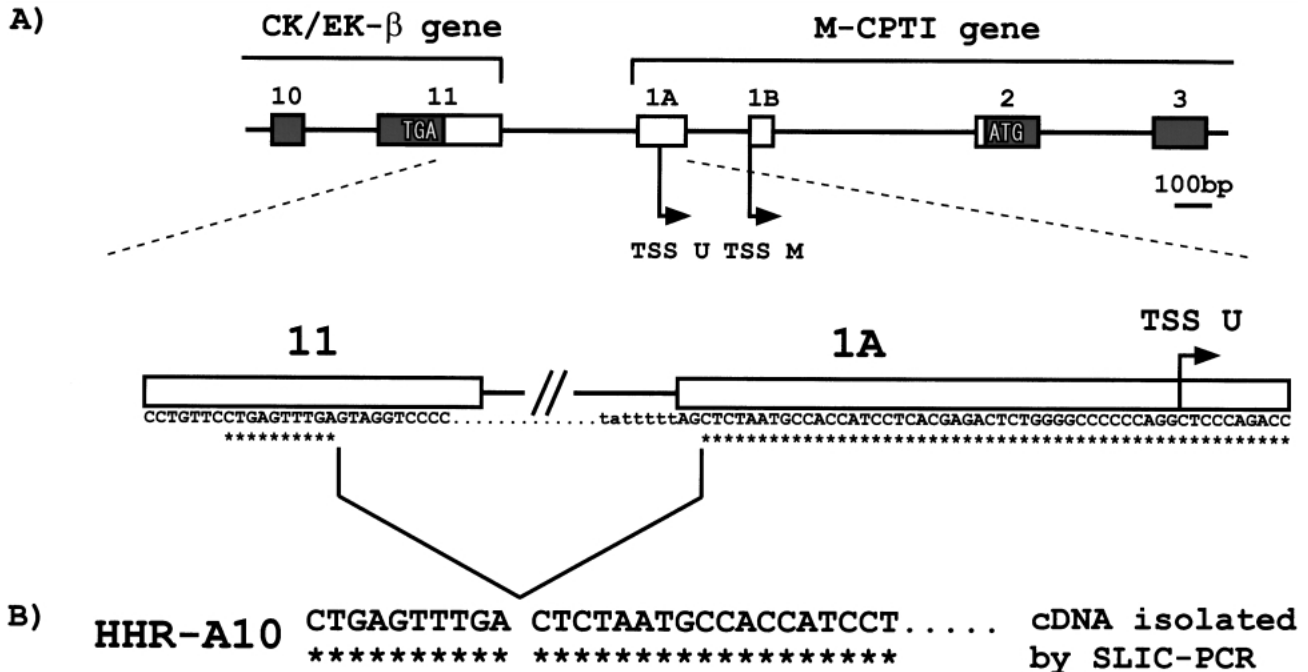


Fig. 6. Organization of the 3'-Region of the CK/EK- $\beta$  Gene and the 5'-Region of the M-CPTI Gene, and the Nucleotide Sequence of HHR-A10

A) The structure of the 3'-region of the CK/EK- $\beta$  gene and the 5'-region of the M-CPTI gene is schematically shown. TSS U and TSS M represent the transcription initiation site of exon U (corresponding to exon 1A) and exon M (corresponding to exon 1B), respectively, as reported by another group.<sup>38)</sup> Parts of nucleotides between exon 11 of the CK/EK- $\beta$  gene and exon 1A of the M-CPTI gene are shown by uppercase letters, and the nucleotides of the spacer region between the two genes are shown by lowercase letters. The nucleotides identical with those of HHR-A10 are marked with asterisks. B) The nucleotide sequence of the 5'-terminal region of HHR-A10 obtained by SLIC-PCR is shown.

で、本遺伝子の転写調節がこのように狭い領域でどのように行われているのかは興味深い問題であった。

そこで続いて、ヒト筋型 CPTI 遺伝子上流領域の構造をさらに詳細に明らかとする目的で、5'RACE 法の変法で mRNA の 5'領域に相当する cDNA を効率よく得ることができる SLIC (single-strand ligation to ss-cDNA) 法を行った。SLIC 法によって単離された cDNA の塩基配列を確認したところ、ヒト心臓 mRNA に由来する cDNA クローン HHR-A10 は筋型 CPTI 遺伝子のエクソン 1A の塩基配列を含んでいたが、その 5'末端側にゲノム DNA の配列とは全く一致しない配列が 10 塩基ほど付加されていた (Fig. 6(B))。この配列をさらに上流領域の配列と比較したところ、HHR-A10 の 5'末端側の 10 塩基は CK/EK- $\beta$  遺伝子の 3'非翻訳領域の塩基配列と完全に一致していることが示された (Fig. 6(A))。また、ゲノム DNA から gt で始まり ag で終わる配列が除去されれば HHR-A10 の塩基配列となること、すなわち SLIC 法によって単離された cDNA クローン HHR-A10 は CK/EK- $\beta$  遺伝子領域と筋型 CPTI 遺伝子領域を含んだ一次転写産物の

スプライシングによって生じた mRNA に由来するような配列であることが明らかとなった。

しかしながら、HHR-A10 は SLIC 法によって誤って合成された cDNA である可能性も考えられる。そこで、本当に HHR-A10 の鋳型となり得るような mRNA が存在するのか確かめるため、Fig. 7(A)に示すようなプライマーの組み合わせ (P1/EX3 及び P2/EX3) で CK/EK- $\beta$  遺伝子の 3'非翻訳領域 (エクソン 11) と筋型 CPTI 遺伝子のエクソン 3 との間で RT-PCR を行った。反応溶液をアガロースゲル電気泳動に供しエチジウムブロマイド染色を行った結果、心臓と骨格筋どちらの mRNA を鋳型にしても 2 種類の DNA が合成されることが示された (Fig. 7(B))。これら RT-PCR 産物の塩基配列を確認したところ、長い産物 (product 1) は CK/EK- $\beta$  遺伝子領域と筋型 CPTI 遺伝子エクソン 1A, 2 及び 3 を含んでいた。ここで CK/EK- $\beta$  遺伝子領域と筋型 CPTI のエクソン 1A は HHR-A10 と全く同じ位置で結合しており、またエクソン 1A の 3'末端、エクソン 2 の 5'及び 3'末端、エクソン 3 の 5'末端は通常筋型 CPTI mRNA と完全に同一

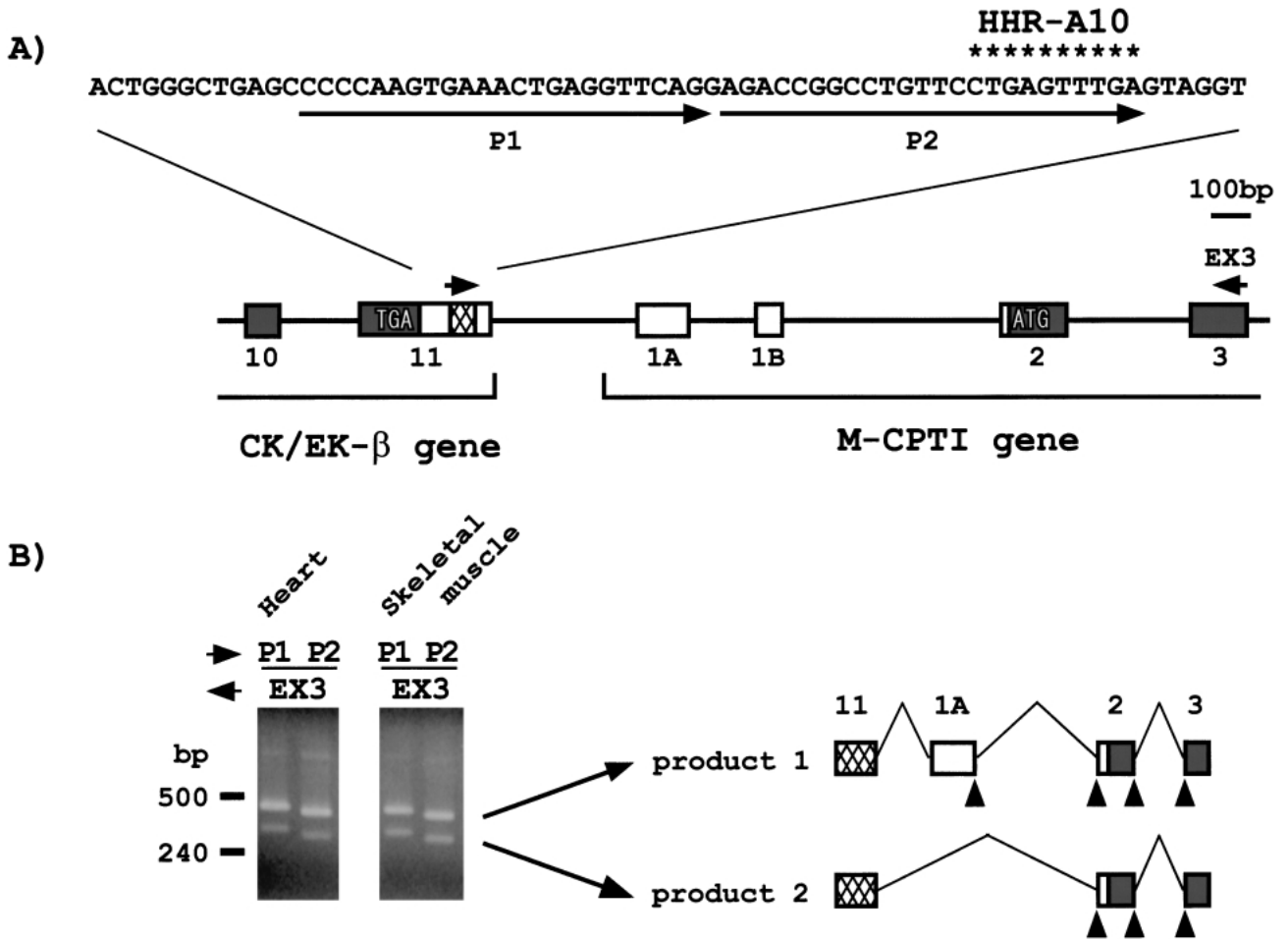


Fig. 7. RT-PCR of mRNA between the Regions of the CK/EK-β and M-CPTI Genes of Human Heart and Skeletal Muscle  
 A) The loci of primers P1, P2, and EX3 used for PCR. The region corresponding to P1 and P2 in the 3'-UTR of the CK/EK-β gene is shown by a hatched box. Asterisks indicate the nucleotides found at the 5'-region of HHR-A10. B) Results of agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products. ss-cDNAs of human heart and skeletal muscle obtained by reverse-transcription with either a random hexamer or oligo(dT) primer were mixed and used as templates for PCR. PCR was performed using the primer pairs of P1/EX3 or P2/EX3, and the reaction mixtures were loaded onto agarose gel and stained with ethidium bromide. The organizations of cDNAs obtained by RT-PCR are schematically shown. Upward arrowheads indicate the splice site coincident with those of ordinary transcripts of human M-CPTI and lines represent splicing determined from the nucleotide sequences of the products.

の部位でスプライスされて結合していた。一方、短い産物 (product 2) は CK/EK-β 遺伝子領域と筋型 CPTI 遺伝子エクソン 2 が結合しており、product 1 からエクソン 1A が完全に除去されたような構造であった。この product 2 においても筋型 CPTI のエクソン 2 及び 3 は正しいスプライスを受けて結合していた。さらにヒトゲノムのサザン・ブロッティングの結果、筋型 CPTI 遺伝子の上流に存在する遺伝子がヒトゲノム中で唯一 CK/EK-β をコードする遺伝子であることが確認された。<sup>39)</sup> 以上の結果から、ヒトの心臓と骨格筋において、機能している 2 つの遺伝子の領域を含んだ奇妙な mRNA が確かに存在していることが示された。

**8. 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA の構造解析**

ヒトにおいて CK/EK-β と筋型 CPTI の両方の遺伝子領域を含んだ mRNA が存在することが明らかとなった。このような mRNA の構造及びその産生機構には以下の 4 つの可能性が考えられる (Fig. 8)。

- A) 完全な CK/EK-β 領域と不完全な筋型 CPTI 領域を含んでいる可能性。CK/EK-β 遺伝子の転写開始部位から合成された一次転写産物は、CK/EK-β 遺伝子の通常のポリ A 付加部位ではなく筋型 CPTI 遺伝子領域の途中でポリ A 鎖が付加される。この mRNA は長い 3' 非翻訳領域を有した CK/EK-β の mRNA であると思なすことができる。
- B) 不完全な CK/EK-β 領域と完全な筋型 CPTI

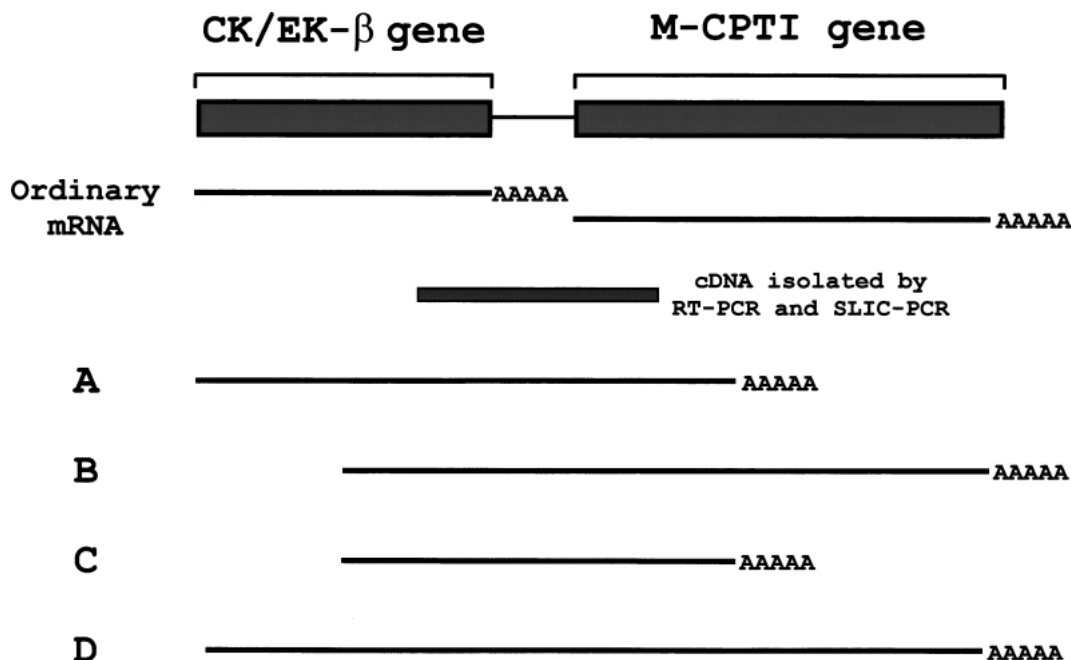


Fig. 8. Possible Organization of the Overlapping Transcripts between the CK/EK- $\beta$  and M-CPTI Genes

領域を含んでいる可能性. CK/EK- $\beta$  遺伝子領域内にプロモーターが存在し, そこから合成が開始された転写産物は筋型 CPTI 遺伝子の通常のポリ A 付加部位にてポリ A 鎖が付加される.

C) 不完全な CK/EK- $\beta$  領域と不完全な筋型 CPTI 領域を含んでいる可能性. 上記 B) のように CK/EK- $\beta$  遺伝子領域の途中から転写が開始され, A) のように筋型 CPTI 遺伝子領域の途中でポリ A 鎖が付加される.

D) 完全な CK/EK- $\beta$  領域と完全な筋型 CPTI 領域を含んでいる可能性. CK/EK- $\beta$  遺伝子の転写開始部位から合成が開始され, 筋型 CPTI 遺伝子のポリ A 付加部位でポリ A 鎖が付加される. この場合 1 本の長い mRNA 中に 2 つのタンパク質をコードする領域が含まれたポリシストロン様の構造をしていることになる.

SLIC 法や RT-PCR によって単離された cDNA は 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA の一部分に相当する配列しか含んでいない. そこで実際にどのような mRNA が存在しているのかを明らかにするため, 筋型 CPTI の mRNA に特異的な RT-PCR を行うことにした. まず, Fig. 9(A) に示すように, ヒト筋型 CPTI 遺伝子のエクソン 4, 15, 20 の配列に相補的な合成オリゴヌクレオチド (それぞれ EX4, EX15, EX20) を用いてヒト心臓 mRNA の逆

転写反応を行い, 得られた筋型 CPTI 特異的な 1 本鎖 cDNA を鋳型として CK/EK- $\beta$  遺伝子のエクソン配列と筋型 CPTI 遺伝子のエクソン配列との間で PCR を行った. Figure 9(B) に PCR 反応液をアガロースゲル電気泳動に供したのちエチジウムブロマイド染色を行った結果を示す.

筋型 CPTI 遺伝子エクソン 4 に相当する領域からプライマー EX4 にて逆転写反応を行って得られた 1 本鎖 cDNA (EX4 ss-cDNA) を鋳型として筋型 CPTI 遺伝子領域内で PCR を行った場合 (1A/EX3, 1B/EX3) では 1 種類, 両方の遺伝子領域をまたいで PCR を行った場合 (9/EX3, 10/EX3, 11/EX3) では 2 種類の DNA が合成された. また, エクソン 15 から逆転写反応を行って得られた 1 本鎖 cDNA (EX15 ss-cDNA) を鋳型として PCR を行った場合, その量は少ないものの EX4 ss-cDNA を鋳型とした場合と同じ長さの DNA が合成されていることが確認された. 一方, エクソン 20 から逆転写された cDNA (EX20 ss-cDNA) を鋳型として PCR を行った場合, 筋型 CPTI 領域内での PCR 産物は検出されたものの, 両方の遺伝子領域をまたいだ PCR 産物は検出できなかった. そこで増幅される領域に特異的なプローブを用いてサザン・ブロットィングを行ったところ, EX20 ss-cDNA を鋳型として 2 つの遺伝子領域をまたいで PCR を行った

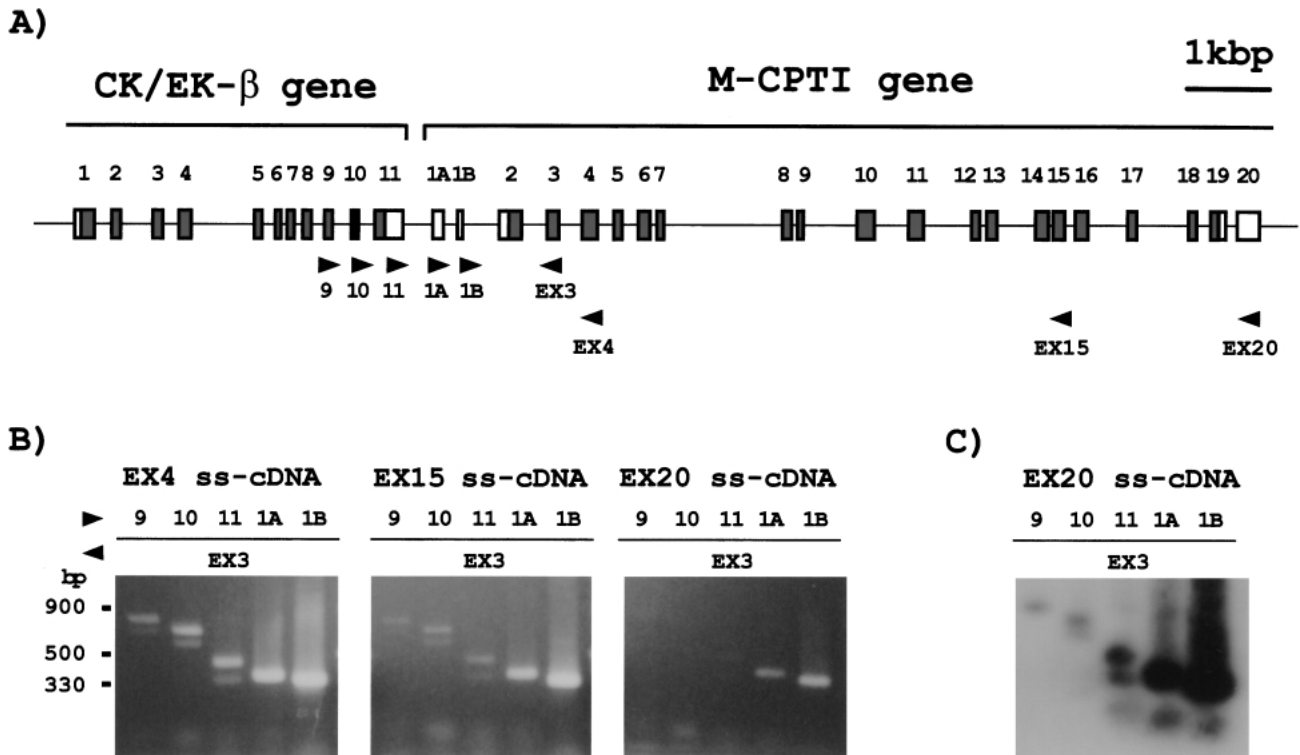


Fig. 9. RT-PCR between the Regions of the CK/EK- $\beta$  and M-CPTI Genes

A) RT-PCR specific to M-CPTI messages was performed with the primers shown by arrowheads. B) PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, and gels were stained with ethidium bromide. C) Reaction mixtures of RT-PCR using EX20 ss-cDNA in agarose gel were transferred to a nitrocellulose membrane, and Southern blot analysis was carried out.

場合でも EX4 あるいは EX15 ss-cDNA を鋳型とした場合と同じ長さの DNA が合成されていることが確認された (Fig. 9(C)). 3 種類の鋳型 (EX4, EX15 及び EX20 ss-cDNA) を用いてプライマー 9/EX3 で PCR を行って得られた PCR 産物の塩基配列をそれぞれ解析した結果, 長く主要な PCR 産物は, CK/EK- $\beta$  遺伝子エクソン 11 と筋型 CPTI 遺伝子エクソン 1A が SLIC 法で単離された HHR-A10 と同一の部位で結合しており, この部分以外はそれぞれの遺伝子のエクソン配列から構成されていることが示された. 一方, 短い PCR 産物は長い産物からエクソン 1A が完全に欠けた配列からなっていた.

EX20 を用いて逆転写反応を行って得られた cDNA (EX20 ss-cDNA) を鋳型として, プライマー 9 とプライマー EX3 で PCR を行って cDNA が合成されたということは, 少なくともプライマー 9 (CK/EK- $\beta$  遺伝子エクソン 9) からプライマー EX20 (筋型 CPTI 遺伝子エクソン 20) の領域を含んだ mRNA が存在しているということを意味している. 逆転写に用いたプライマー EX20 は筋型

CPTI 遺伝子の終始コドンよりも下流の配列に相当するので, この mRNA は筋型 CPTI 遺伝子領域全体を含んでいると考えることができる. したがって Fig. 8 で示した 4 つの可能性のうち, 少なくとも B) あるいは D) のような mRNA が存在していると結論した. なお 2 つの遺伝子領域をまたいだ PCR (プライマー 9/EX3, 10/EX3 及び 11/EX3) によって合成された DNA の量は, 筋型 CPTI 遺伝子領域内での PCR (プライマー 1A/EX3 及び 1B/EX3) によって合成された DNA の量よりもはるかに少なかったことから, 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA の量は通常の筋型 CPTI の mRNA と比べるとはるかに少ないと考えられる. しかしながら, 他のグループが行ったヒト第 22 番染色体の EST 解析においても CK/EK- $\beta$  と筋型 CPTI の遺伝子領域を含んだ mRNA の存在が認められたことから,<sup>40)</sup> その量は少ないもののこのような mRNA は確かに存在しており, 2 つの遺伝子は重複した遺伝子 (overlapping genes) であるように思われた.

なお, SLIC 法で単離された HHR-A10 や 2 つの遺伝子領域をまたいだ RT-PCR によって単離され

た cDNA には、5'RACE 法で決定したエクソン 1A の 5'末端の 2 塩基 (ag) は含まれていなかった。このことから、5'RACE 法で単離された cDNA は 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA の未同定のスプライズバリエーションに由来する可能性や報告された転写開始部位 (Fig. 6 の TSS U) よりもさらに上流に未同定の筋型 CPTI 遺伝子の転写開始部位が存在している可能性が考えられる。

### 9. 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA の産生機構

一般に、単純な生物のゲノムはそのサイズの割に比較的多くの遺伝子を含んでいるので、複雑な生物のゲノムと比べると遺伝子はより密集して存在していることになり、さらにゲノム上の特定の領域が 2 つ以上の遺伝子によって共有されていることもしばしばある。特にバクテリオファージ、細菌、ウイルスなどの単純なゲノムや高等動物ゲノムの中でも単純なミトコンドリアゲノムにおいて、異なった読み枠 (アンチセンス鎖の場合が多いがセンス鎖の場合もある) を利用することによりゲノムの共通した領域から複数のタンパク質が産生される例が多く知られている。このように部分的に重なり合った遺伝子は「重複遺伝子」と呼ばれている。<sup>41)</sup> 一方、高等動物の核ゲノムのように巨大で複雑なゲノムにおいては、遺伝子は比較的ゆとりを持ってゲノム上に配置され、遺伝子と遺伝子の間にはある程度の長さのスペーサー領域が存在するのが一般的であると考えられてきた。しかしながらその構造解析が進むにつれ、高等動物の巨大な核ゲノムにおける遺伝子密度には大きな偏りがあり、単純なゲノムで見られるような重複遺伝子が「一般的な」遺伝子と比べるとその数は圧倒的に少ないものの存在することが明らかとなってきた。<sup>42,43)</sup> なお、高等動物の遺伝子は大きなイントロンを含んでいることもあり、この中に他の遺伝子がすっきり含まれている例もわずかではあるが報告されている。<sup>44,45)</sup> こうした遺伝子は「遺伝子内遺伝子」と呼ばれ、「重複遺伝子」とは区別されている。

哺乳動物の核ゲノムにおける重複遺伝子の最初の報告はマウス *Surfeit* 領域に存在する 2 つの遺伝子に関してである。<sup>46)</sup> *Surfeit* とは「非常に込み合った」という意味で、その名の通りマウスではこの領域 (約 32 kbp) に少なくとも 6 個の遺伝子が存在し、

そのうちの *Surf-2* と *Surf-4* はゲノム DNA 上で逆向きに転写され、それぞれの 3'非翻訳領域の 133 bp は両方の遺伝子に共有されている。<sup>47)</sup> このような場合、転写された RNA の 3'領域の配列は互いに相補的であるので、アンチセンス RNA としてお互いの遺伝子発現を調節している可能性が考えられている。<sup>48)</sup>

一方、哺乳動物核ゲノムにおいて、特定の領域が同じ方向に転写される 2 つの遺伝子によって共有されている例として最初に報告されたウシ myosin I heavy chain-like protein (MIHC) 遺伝子と prepro-tachykinin B (PPT-B) 遺伝子の場合、CK/EK- $\beta$  と筋型 CPTI の場合と同様に 2 つの遺伝子は同じ転写の方向で近接して存在し、MIHC mRNA の 3'領域の配列は PPT-B mRNA の 5'領域の配列と一致していた。<sup>49)</sup> しかしながら、共有されている領域において MIHC 遺伝子の転写産物がスプライズされる部位と PPT-B 遺伝子の転写産物がスプライズされる部位が完全には一致していないので、この領域における 2 つの遺伝子のエクソン構造は異なっていた。

それに対して、CK/EK- $\beta$  と筋型 CPTI の両方の遺伝子領域を含む mRNA では、解析を行った領域 (CK/EK- $\beta$  遺伝子エクソン 9 から筋型 CPTI 遺伝子エクソン 3) においては、2 つの遺伝子領域の結合部分を除いてそれぞれの mRNA のスプライズ部位が完全に保存されていた。加えて、この mRNA は少なくとも CK/EK- $\beta$  遺伝子のエクソン 9 から筋型 CPTI 遺伝子のエクソン 20 までの領域を含んでいることが示された (Fig. 9(C))。これらのことから、この mRNA は CK/EK- $\beta$  遺伝子の通常の転写開始部位から合成が開始された一次転写産物に由来しているのではないかと考えられる (Fig. 8 の可能性 D)。すなわち、

1) 2 つの遺伝子が非常に近接して存在するため、CK/EK- $\beta$  遺伝子の転写開始部位からの転写によって CK/EK- $\beta$  領域に続いて 2 つの遺伝子間のスペーサー領域さらには筋型 CPTI 領域も転写されてしまう。

2) 生じた一次転写産物は CK/EK- $\beta$  領域において正しくスプライズされイントロンが除去される。続いて、CK/EK- $\beta$  領域のポリ A 付加部位にポリ A 鎖が付加されれば、スペーサー領域及び筋型 CPTI

領域が切り離されてしまうため通常の CK/EK- $\beta$  の mRNA となる。しかし、ポリ A 鎖が付加される前に CK/EK- $\beta$  領域と筋型 CPTI 領域の適当な部位でスプライスが起これると 2 つの遺伝子領域が結合してしまう。このスプライシングにより、CK/EK- $\beta$  領域のポリ A 付加シグナルはイントロンとして除去される。

3) 一次転写産物の伸長は筋型 CPTI 領域の下流側末端まで続けられる。筋型 CPTI 領域においても正しくスプライスされてイントロンが除去され、筋型 CPTI 領域のポリ A 付加シグナルの認識によりポリ A 鎖が付加される。

このような過程を経て、CK/EK- $\beta$  遺伝子の通常の転写によって 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA が合成されている可能性が考えられる。したがって、CK/EK- $\beta$  遺伝子と筋型 CPTI 遺伝子は「重複遺伝子」というよりも、同じ転写の方向で近接して存在する 2 つの遺伝子から特殊な mRNA が合成される例と考えた方がよいように思われる。さらに、データは示さないが、筆者は齧歯類（ラット、マウス）においても CK/EK- $\beta$  と筋型 CPTI の 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA が存在するものの、その量はヒトに比べると極めて少ないことを明らかとした。<sup>50)</sup> CK/EK- $\beta$  mRNA の量にそれほどの種差は認められないことから、ヒトの転写産物では CK/EK- $\beta$  領域でポリ A 鎖が付加される前に 2 つの遺伝子領域間でのスプライスがより起こり易いため両方の遺伝子領域を含んだ mRNA が多く存在しているのではないかと考えられる。ヒトと齧歯類の転写産物においてポリ A 鎖の付加とスプライスのされ易さに違いがある原因は現時点では明らかでないが、これを解明すれば高等動物の転写産物におけるポリ A 鎖の付加やスプライシングのタイミング、さらには転写終結に関して新たな知見が得られる可能性がある。

## 10. おわりに

筆者がラット BAT から単離した新規 cDNA クローン DS112-36 は筋型 CPTI をコードしていた。その mRNA 分布から、筋型 CPTI は心臓や骨格筋、BAT など多くの脂肪酸を利用する組織において優位に発現していることが示された。もう一方の CPTI である肝型アイソフォームと比べて、筋型 CPTI はその活性発現により多くのカルニチンを必

要とし、またわずかな量のマロニル CoA によって阻害されるタイプのアイソフォームである。したがって骨格筋や BAT では「反応しにくい」筋型 CPTI が選択的に発現していることによって貯蔵型エネルギー燃料である脂肪酸が容易には分解されないように調節されていると推測される。

筋型 CPTI をコードする遺伝子の転写調節に関する研究も行われており、本遺伝子上流には脂肪酸やペルオキシソーム増殖剤に応答するエンハンサー配列が存在することが既に報告されている。加えて、すぐ上流に位置する CK/EK- $\beta$  遺伝子領域内にも筋型 CPTI 遺伝子の転写を調節する配列が存在している可能性が考えられ、この場合 CK/EK- $\beta$  遺伝子の状態（転写されているかどうか）が筋型 CPTI 遺伝子の転写に影響を与えていることも考えられる。

また筆者は CK/EK- $\beta$  と筋型 CPTI の両方の遺伝子領域を含んだ mRNA が存在することを明らかとした。この mRNA が生体内でどのような役割を果たしているのかは全く不明であるが、高等動物の核ゲノムにおいて近接した遺伝子からこのような 2 つの遺伝子領域を含んだ mRNA が合成されているという事実は非常に興味深い。これまでに単離した cDNA の塩基配列から、この mRNA は CK/EK- $\beta$  遺伝子の 3' 非翻訳領域（エクソン 11）と筋型 CPTI 遺伝子の 5' 非翻訳領域（エクソン 1A あるいはエクソン 2）の間で一次転写産物がスプライスされて生じていたので、この mRNA が CK/EK- $\beta$  遺伝子の転写開始部位から筋型 CPTI 遺伝子の 3' 末端までの領域を含んでいる場合、2 つのタンパク質の完全なコード領域を独立して含んだポリシストロン様の構造をしていることになる。さらに、スプライスされる部位によっては、2 つのタンパク質の融合タンパク質が合成される可能性も考えられる。以上の結果は、今後ゲノムの配列情報を読み解く上で非常に重要な知見であると思われる。

**謝辞** 本総説で紹介した研究は、徳島大学薬学部生物薬品化学教室で行われたものであり、ご指導いただきました寺田 弘教授（現 東京理科大学薬学部教授）、篠原康雄助教授（現 徳島大学ゲノム機能研究センター教授）に厚く御礼申し上げます。また、一緒に実験を行った共同研究者をはじめ研究室に在籍した方々のご協力に心から感謝の意を表し

ます。最後に、本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金並びに徳島大学薬学部研究助成金の援助により行われました。あわせて感謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Nicholls D. G., Locke R. M., *Physiol. Rev.*, **64**, 1–64 (1984).
- 2) Ricquier D., Bouillaud F., “Brown Adipose Tissue,” eds. by Trayburn P., Nicholls D. G., Arnold Ltd., Great Britain, 1985, pp. 86–104.
- 3) Shinohara Y., Kajimoto K., Daikoku T., Shima A., Yamazaki N., Terada H., *Recent Res. Devel. Bioener.*, **2**, 1–14 (2002).
- 4) Kawada T., *Mebio*, **11**, 10–16 (1997).
- 5) Saito M., *Mebio*, **11**, 22–28 (1997).
- 6) Ricquier D., Casteilla L., Bouillaud F., *FASEB J.*, **5**, 2237–2242 (1991).
- 7) Klingenberg M., Huang S.-G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1415**, 271–296 (1999).
- 8) Ricquier D., Bouillaud F., *Biochem. J.*, **345**, 161–179 (2000).
- 9) Kajimoto K., Yamazaki N., Kataoka M., Terada H., Shinohara Y., *J. Med. Invest.*, **51**, 20–28 (2004).
- 10) Mitchell P., *Science*, **206**, 1148–1159 (1979).
- 11) Kunji E. R., *FEBS Lett.*, **564**, 239–244 (2004).
- 12) Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual,” 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, pp. 10.38–10.47.
- 13) Yamazaki N., Shinohara Y., Shima A., Terada H., *FEBS Lett.*, **363**, 41–45 (1995).
- 14) Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J., *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410 (1990).
- 15) Esser V., Britton C. H., Weis B. C., Foster D. W., McGarry J. D., *J. Biol. Chem.*, **268**, 5817–5822 (1993).
- 16) Kyte J., Doolittle R. F., *J. Mol. Biol.*, **157**, 105–132 (1982).
- 17) McGarry J. D., Foster D. W., *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 395–420 (1980).
- 18) Bremer J., *Physiol. Rev.*, **63**, 1420–1480 (1983).
- 19) McGarry J. D., Woeltje K. F., Kuwajima M., Foster D. W., *Diabetes/Metab. Rev.*, **5**, 271–284 (1989).
- 20) McGarry J. D., *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 321–324 (1995).
- 21) McGarry J. D., Brown N. F., *Eur. J. Biochem.*, **244**, 1–14 (1997).
- 22) Fraser F., Corstorphine C. G., Zammit V. A., *Biochem. J.*, **323**, 711–718 (1997).
- 23) van der Leij F. R., Kram A. M., Bartelds B., Roelofsen H., Smid G. B., Takens J., Zammit V. A., Kuipers J. R., *Biochem. J.*, **341**, 777–784 (1999).
- 24) Brown N. F., Esser V., Foster D. W., McGarry J. D., *J. Biol. Chem.*, **269**, 26438–26442 (1994).
- 25) McGarry J. D., Mills S. E., Long C. S., Foster D. W., *Biochem. J.*, **214**, 21–28 (1983).
- 26) Woeltje K. F., Esser V., Weis B. C., Cox W. F., Schroeder J. G., Liao S. T., Foster D. W., McGarry J. D., *J. Biol. Chem.*, **265**, 10714–10719 (1990).
- 27) Kolodziej M. P., Crilly P. J., Corstorphine C. G., Zammit V. A., *Biochem. J.*, **282**, 415–421 (1992).
- 28) Esser V., Brown N. F., Cowan A. T., Foster D. W., McGarry J. D., *J. Biol. Chem.*, **271**, 6972–6977 (1996).
- 29) Yamazaki N., Shinohara Y., Shima A., Yamanaka Y., Terada H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1307**, 157–161 (1996).
- 30) Britton C. H., Schultz R. A., Zhang B., Esser V., Foster D. W., McGarry J. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 1984–1988 (1995).
- 31) Yamazaki N., Yamanaka Y., Hashimoto Y., Shinohara Y., Shima A., Terada H., *FEBS Lett.*, **409**, 401–406 (1997).
- 32) Ishidate K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1348**, 70–78 (1997).
- 33) Britton C. H., Mackey D. W., Esser V., Foster D. W., Burns D. K., Yarnall D. P., Froguel P., McGarry J. D., *Genomics*, **40**, 209–211 (1997).
- 34) van der Leij F. R., Takens J., van der Veen A. Y., Terpstra P., Kuipers J. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1352**, 123–128 (1997).
- 35) Finocchiaro G., Taroni F., Rocchi M., Martin A. L., Colombo I., Tarelli G. T., DiDonato S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 661–665 (1991).
- 36) Mascaro C., Acosta E., Ortiz J. A., Marrero P. F., Hegardt F. G., Haro D., *J. Biol.*

- Chem.*, **273**, 8560–8563 (1998).
- 37) Brandt J. M., Djouadi F., Kelly D. P., *J. Biol. Chem.*, **273**, 23786–23792 (1998).
- 38) Yu G.-S., Lu Y. C., Gulick T., *J. Biol. Chem.*, **273**, 32901–32909 (1998).
- 39) Yamazaki N., Shinohara Y., Kajimoto K., Shindo M., Terada H., *J. Biol. Chem.*, **275**, 31739–31746 (2000).
- 40) Hirosawa M., Nagase T., Murahashi Y., Kikuno R., Ohara O., *DNA Res.*, **8**, 1–9 (2001).
- 41) Normark S., Bergstrom S., Edlund T., Grundstrom T., Jaurin B., Lindberg F. P., Olsson O., *Annu. Rev. Genet.*, **17**, 499–525 (1983).
- 42) Blumenthal T., *Bioessays*, **20**, 480–487 (1998).
- 43) Veeramachaneni V., Makalowski W., Galdzicki M., Sood R., Makalowska I., *Genome Res.*, **14**, 280–286 (2004).
- 44) Viskochil D., Cawthon R., O’Connell P., Xu G. F., Stevens J., Culver M., Carey J., White R., *Mol. Cell Biol.*, **11**, 906–912 (1991).
- 45) Levinson B., Kenwrick S., Gamel P., Fisher K., Gitschier J., *Genomics*, **14**, 585–589 (1992).
- 46) Williams T., Fried M., *Nature*, **322**, 275–279 (1986).
- 47) Huxley C., Fried M., *Mol. Cell Biol.*, **10**, 605–614 (1990).
- 48) Vanhee-Brossollet C., Vaquero C., *Gene*, **211**, 1–9 (1998).
- 49) Hoshimaru M., Nakanishi S., *J. Biol. Chem.*, **262**, 14625–14632 (1987).
- 50) Yamazaki N., Yamanaka Y., Hashimoto Y., Hiramatsu T., Shinohara Y., Terada H., *J. Biochem. (Tokyo)*, **133**, 523–532 (2003).