

リボフラビントランスポータ RFVT3 (*SLC52A3*) の  
生理的役割に関する研究  
【要約論文】

2013

吉松 宏樹



# 総論の部

## 緒言

リボフラビンは、ビタミン B<sub>2</sub> として知られる生理活性物質である。細胞内においてフラビンモノヌクレオチド (FMN) およびフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) に変換され、TCA サイクル、電子伝達系、脂肪酸β酸化、アミノ酸代謝等に関与する酵素の補酵素として機能する。すなわち、リボフラビンは生体の正常な機能維持に必須の栄養素である。ヒトをはじめとする哺乳類はリボフラビン合成能を有さず、食物からの摂取が不可欠である。その欠乏は口内炎や貧血のみならず、循環器疾患や癌、神経障害の危険因子となる<sup>1,2</sup>。

薬物や栄養素の生体膜透過は、それらの体内動態を支配する重要な過程である。細胞膜は脂質二重層で構成されており、脂溶性の高い物質は単純拡散により膜透過が可能である。一方で水溶性化合物の移行は困難であり、このような物質は一般的にトランスポータにより膜輸送が媒介される。水溶性低分子であるリボフラビンに関しても、小腸における吸収、腎臓における尿細管分泌および再吸収にトランスポータが関与することを示唆する知見が古くから報告されている<sup>3-8</sup>。また、肝臓や胎盤、網膜等の各臓器由来の培養細胞を用いた検討においても飽和性のリボフラビン取り込みが認められ<sup>9-16</sup>、リボフラビンの体内動態にトランスポータが重要な役割を果たすことは多様な実験手法により示されてきた。特に、腸管吸収は生体のリボフラビン恒常性を維持するために重要な生理機能として捉えられ、その機構を解明するために精力的に検討がなされてきた<sup>17,18</sup>。

哺乳類で初めてのリボフラビントランスポータ RFVT1 (*SLC52A1*; 旧名 RFT1) は 2008 年に同定され<sup>19</sup>、その後 RFVT2 (*SLC52A2*; 同 RFT3)<sup>20</sup> および RFVT3 (*SLC52A3*; 同 RFT2)<sup>21</sup> が報告された。中でも RFVT3 は、小腸における発現が他の RFVT と比較して強く<sup>20</sup>、リボフラビン腸管吸収に重要な役割を担う可能性が推察されている。RFVT3 は、バクテリアのリボフラビントランスポータ *impX*<sup>22</sup> の遺伝子配列を基とした BLAST 検索により抽出、同定された 11 回膜貫通型のトランスポータである<sup>21</sup>。ヒトにおいては、小腸、腎臓、精巣、胎盤等の組織で高発現が認められる<sup>20</sup>。RFVT1 と RFVT2 は 86.7% のアミノ酸相同性を有し、共に細胞外 Na<sup>+</sup> 非依存的、pH 非依存的にリボフラビンを輸送するなど酷似した特性を有する一方、RFVT3 は RFVT1 とのアミノ酸相同性が 42.9% と低く、細胞外 pH 依存性を示すなど 2 つのトランスポータと異なる特徴を示す<sup>23</sup>。この様に、先行研究により RFVT3 の組織分布や機能特性等の基礎的知見は集積されつつあるものの、その生理的役割に関する

る情報は皆無に等しい。

最近、発症機序不明の神経疾患 Brown-Vialetto-Van Laere (BVVL) 症候群患者において相次いで RFVT3 の遺伝子変異が報告され、RFVT3 の機能欠損あるいは機能低下が疾患と関連することが示唆されている<sup>24-29</sup>。BVVL 症候群は、難聴、球麻痺、顔面脱力、著しい筋力低下、呼吸困難等の症状を呈する予後不良の疾患である<sup>30</sup>。RFVT3 の遺伝子に変異を有する BVVL 症候群患者では、リボフラビン血中濃度の低下や脂肪酸代謝異常が認められることも報告されている<sup>25</sup>。これら一連の神経症状や代謝異常は、リボフラビンを投与することにより改善が認められる<sup>24-26</sup>。また、2010 年に報告されたゲノムワイド関連解析において、RFVT3 が食道扁平上皮癌の感受性座位として抽出された<sup>31</sup>。リボフラビン欠乏は、食道扁平上皮癌のリスク因子であることが報告されている<sup>32,33</sup>。従って、RFVT3 の機能低下に伴って生体のリボフラビン恒常性が破綻し、疾患の発症へと繋がることが推察され、本トランスポータの生理的役割の解明は病態生理学的にも重要である。

以上の背景の下、著者は RFVT3 が生体内において担う役割を明らかとすることを目的とし、検討を行った。第 I 章では、リボフラビン腸管吸収における RFVT3 の機能的関与を評価し、腸上皮細胞の頂側膜においてリボフラビン輸送を担うことを明らかとした。第 II 章では、ノックアウトマウスを用いた解析を通じて RFVT3 の *in vivo* における役割を精査した結果、生存に必須のトランスポータであることを見出した。また RFVT3 が胎盤においてリボフラビンの胎児移行に関与することを明らかとし、機能欠損に伴う移行性の低下が新生児のリボフラビン欠乏を引き起こすことが示された。

以下、本研究によって得られた結果を論述する。

## 第 I 章

### リボフラビン腸管吸収における RFVT3 の役割

リボフラビンは生体の正常な機能維持に必須の水溶性低分子であり、体内に合成経路を有さない哺乳類は食物からの摂取が不可欠である。腸管吸収はリボフラビンの恒常性を維持するために重要な過程であり、その機構の解明を目的とした検討が精力的になされてきた<sup>17, 18</sup>。小腸における物質の吸収は、腸上皮細胞の管腔側刷子縁膜および血管側側底膜の二段階の膜透過過程によって制御されており、一般的に水溶性化合物の膜透過はトランスポータにより営まれている<sup>34</sup>。例えば、水溶性栄養物質であるグルコースは、刷子縁膜に局在する Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter 1 (SGLT1) により管腔内から腸上皮細胞内へと取り込まれた後、側底膜に発現する facilitated glucose transporter 2 (GLUT2) によって血管内への移行が媒介される<sup>35, 36</sup>。リボフラビンに関しても、腸上皮細胞の両膜における輸送過程をトランスポータが担うことが、単離膜小胞を用いた検討により実証されてきた<sup>37-40</sup>。

2008 年以降に RFVT ファミリーが同定され、いずれの分子種も小腸において発現が認められることから、これらがリボフラビンの吸収に関与するトランスポータであることが期待された<sup>19-21</sup>。中でも RFVT3 は他の RFVT に比して発現が高く<sup>20</sup>、またリボフラビン欠乏により小腸における発現が亢進する<sup>41</sup> ことなどから、腸管吸収に重要な役割を果たしている可能性が推察されている。しかし、RFVT3 が吸収過程に寄与するか否かの実証には至っていない。

本章では、培養細胞並びにマウスを用いた検討を行い、リボフラビン腸管吸収における RFVT3 の機能的関与を検証した。

## 第1節 T84細胞におけるリボフラビン輸送機能の解析

ヒト結腸癌由来上皮細胞である T84 細胞における human (h) RFVT の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。T84 細胞において、hRFVT2 および hRFVT3 の mRNA 発現が認められた。一方、hRFVT1 に関しては検出限界以下であった。

次に、T84 細胞におけるリボフラビン輸送の方向選択性を検討した。多孔性フィルター上に播種した T84 細胞の頂側膜側または側底膜側に<sup>3</sup>H]リボフラビンを添加し、経時的に経細胞輸送量を評価した。その結果、頂側膜側から側底膜側方向へのリボフラビン経細胞輸送量は、逆方向の輸送量に比べて顕著に高い値を示した。すなわち、T84 細胞においてリボフラビンは腸管吸収と対応する方向に選択的に輸送されることが示された。

T84 細胞の頂側膜および側底膜を介したリボフラビン取り込みの濃度依存性について検討したところ、共に基質濃度の上昇に伴って飽和性を示した。また、Eadie-Hofstee プロットは共に一相性を示した。以上のことから、T84 細胞の両膜におけるリボフラビン輸送にトランスポーターが関与することが示された。

頂側膜におけるリボフラビン取り込みは顕著な細胞外 pH 依存性を示し、酸性条件下において輸送活性の亢進が認められた。この輸送は、生理的条件を考慮した細胞外酸性条件下 (pH 6.0) において細胞外 Na<sup>+</sup>非依存的であった。従って、T84 細胞の頂側膜において RFVT3 の機能的特徴<sup>20</sup>が観察されることが判明し、RFVT3 がこの輸送を担っている可能性が推察された。興味深いことに、酸性条件下とは対照的に、中性条件下 (pH 7.4) では Na<sup>+</sup>除去によりリボフラビン輸送活性が有意に低下した。側底膜を介したリボフラビン輸送は、細胞外 pH に非依存的であった。また細胞外 Na<sup>+</sup>除去の影響を検討したところ、わずかなリボフラビン輸送活性の低下が認められた。

## 第2節 RFVT3 阻害薬の探索

RFVT3 の機能的関与の評価に先立ち、阻害薬の同定を試みた。各 hRFVT 分子種をそれぞれ一過性に発現させたヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞を用い、リボフラビン輸送に対する種々化合物の阻害効果を評価した。その結果、1 mM のメチレンブルー共存下において、hRFVT1、hRFVT2 は、それぞれ非共存時の  $68.5 \pm 0.9\%$ 、 $81.7 \pm 3.0\%$  (mean  $\pm$  SEM) のリボフラビン輸送能を保持していたが、hRFVT3 では  $2.7 \pm 0.3\%$  と輸送活性がほとんど確認さ

れなかった。そこで、メチレンブルーの RFVT3 阻害薬としての有用性を精査した。0.1  $\mu\text{M}$  から 10 mM の濃度範囲で、メチレンブルーの各 RFVT 分子種に及ぼす阻害効果の濃度依存性を評価した。なお、mouse (m) Rfvt2 は hRFVT1 並びに hRFVT2 のマウスオルソログであり、mRfvt1 は存在しない。ヒト、マウスオルソログ共に RFVT3 のリボフラビン輸送に対するメチレンブルーの  $\text{IC}_{50}$  値は、RFVT1 および RFVT2 に対する値の 1/1000 程度であった。以上より、メチレンブルーが RFVT ファミリーの中で、RFVT3 を選択的に阻害し得ることを見出した。以降の検討では、RFVT3 に与える阻害効果の強度並びに他の RFVT に及ぼす影響を考慮し、メチレンブルーの濃度を 100  $\mu\text{M}$  に設定し、RFVT3 阻害薬として用いた。

### 第 3 節 T84 細胞頂側膜におけるリボフラビン輸送への RFVT3 の関与

第 1 節において、T84 細胞の頂側膜を介したリボフラビン輸送に RFVT3 の機能的特徴が観察され、RFVT3 が頂側膜における輸送を担っている可能性が示唆された。そこで、第 2 節において RFVT3 阻害薬として見出したメチレンブルーを用いて検証した。T84 細胞の頂側膜におけるリボフラビン輸送活性は、100  $\mu\text{M}$  メチレンブルーの添加により顕著な減少を示した。さらに、hRFVT3 に対する siRNA (hRFVT3-siRNA) を用いて評価した。hRFVT3-siRNA の導入により、T84 細胞における hRFVT3 の mRNA 発現が有意に抑制されていることを確認した。この条件下において、頂側膜を介したリボフラビン輸送活性は、コントロールと比して有意に低下した。従って、RFVT3 は T84 細胞の頂側膜においてリボフラビン輸送を担う主要なトランスポーターであることが示された。

なお、上皮細胞における RFVT3 の膜局在を検証するため、GFP を融合させた hRFVT3 (GFP-hRFVT3) を極性上皮細胞であるイヌ腎由来 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に導入したところ、頂側膜に局在した場合に認められる典型的な蛍光像を示した。この結果は、hRFVT3 の頂側膜における発現を裏付けるものである。

以上より、RFVT3 が腸上皮細胞の頂側膜に発現し、リボフラビン輸送を担っていることが明らかとなった。

## 第4節 T84細胞における基質認識特性

T84細胞において、リボフラビンの補酵素型であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) およびフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) もリボフラビンと同様に輸送されるか検討した。頂側膜側から側底膜側方向への FMN および FAD の経時的な経上皮輸送量は、リボフラビンと比して顕著に低い値を示した。なお、hRFVT3 の基質認識特性を hRFVT3 過剰発現 HEK293 細胞を用いて評価したところ、FMN の輸送は観察されたものの、その値はリボフラビンの輸送活性の約 1/10 程度であった。また FAD に関しては、輸送が認められなかった。

## 第5節 マウスにおけるリボフラビン腸管吸収への Rfvt3 の関与

第3節の検討により、RFVT3 のリボフラビン腸管吸収における役割を *in vitro* において明らかとした。そこで、生体内において RFVT3 が機能発現しているかマウスを用いて検証した。

C57BL/6 雄性マウスの消化管における Rfvt3 の mRNA 発現分布を *in situ* hybridization により検討した。Rfvt3 に特異的なアンチセンスプローブを用いて検出したところ、空腸および回腸においてシグナルが認められ、またその強度は空腸に比して回腸において強いことが判明した。陰性対照としてセンスプローブを用いた場合、空腸および回腸において染色は認められず、シグナルが特異的であることが確認された。一方、前胃、腺胃、十二指腸、盲腸、結腸、直腸に関しては、Rfvt3 の発現は殆ど検出されなかった。

*In situ* hybridization の結果を踏まえて空腸および回腸に着目し、リボフラビン腸管吸収における Rfvt3 の機能的関与を *in situ* closed loop 法により評価した。その結果、空腸および回腸におけるリボフラビン膜透過性は、共に RFVT3 阻害薬メチレンブルーの添加により有意に低下した。また、loop 内腸粘膜中の [<sup>3</sup>H]リボフラビン蓄積量も同様、空腸、回腸共にメチレンブルー共存下において有意に低下した。陰性対照として評価した  $\alpha$ -メチル-D-グルコピラノシドの膜透過性並びに腸粘膜中蓄積量は、メチレンブルーによる影響は受けず、メチレンブルーがリボフラビン膜透過性および腸粘膜中蓄積量に与えた影響は、非特異的な効果に起因するものではないことが確認された。



以上より、RFVT3 が空腸および回腸においてリボフラビンの腸管吸収に関与していることが示唆された。

## 第 I 章 考 察

食事摂取されたリボフラビンは、小腸において腸上皮細胞の管腔側刷子縁膜および血管側側底膜の 2 段階の膜透過過程を経て血中へと取り込まれ、この両過程はトランスポーターにより媒介されることが明らかとされてきた<sup>3,6,38,39,42</sup>。しかし、その分子実体は長らく不明であった。本章では、RFVT3 のリボフラビン腸管吸収への機能的関与を培養細胞並びにマウスを用いて精査した。ヒト結腸癌由来上皮細胞である T84 細胞<sup>43</sup>では、ヒトの小腸と同程度の RFVT3 の mRNA 発現<sup>20</sup>が認められ、さらに腸管吸収と対応するリボフラビン輸送の方向選択性を保持していた。従って T84 細胞は、リボフラビン腸管吸収における RFVT3 の役割を *in vitro* において評価する上で、妥当なモデル細胞であると考えられた。T84 細胞の頂側膜を介したリボフラビン輸送は、RFVT3 阻害薬であるメチレンブルーの添加および RFVT3 に特異的な siRNA の導入により有意に低下した。また、マウス小腸内に放射標識したリボフラビンを投与した場合、小腸粘膜中蓄積量はメチレンブルーの添加により有意に低下した。以上のことから、RFVT3 が腸上皮細胞の刷子縁膜におけるリボフラビン輸送に寄与していることが示された。事実、RFVT3 の輸送特性<sup>20,21</sup>は、小腸刷子縁膜より調製された膜小胞において認められた特性<sup>37,39,44</sup>と酷似している。本章において、免疫組織化学的な解析により RFVT3 の腸上皮細胞における膜局在を検証するため、抗 RFVT3 抗体の作製を幾度にわたって試みたが、特異抗体の産生には至らなかった。RFVT3 は 11 回膜貫通型のトランスポーターであり<sup>23</sup>、このような多数回膜貫通型タンパク質に対する特異抗体の作製は困難であると言われている<sup>45-47</sup>。実際、免疫染色等の手法を用いて RFVT ファミリーのタンパク質局在を実証した報告はなされていない。そこで、RFVT3 の GFP 融合コンストラクトを極性上皮細胞である MDCK 細胞に発現させたところ、頂側膜における局在が観察された。ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に発現させた場合においても同様の結果が報告されており<sup>48</sup>、これらのことは RFVT3 の頂側膜における発現を裏付けるものである。以上より、RFVT3 は小腸上皮細胞の刷子縁膜においてリボフラビン輸送を担うトランスポーターの分子実体であることが示された。

腸上皮細胞におけるリボフラビン輸送の  $\text{Na}^+$ 依存性に関しては、これまでに異なった知見が報告されている。即ちリボフラビン腸管吸収に  $\text{Na}^+$ 依存性が観察されている一方<sup>3, 37, 38, 49, 50</sup>、小腸刷子縁膜小胞を用いた検討において  $\text{Na}^+$ 非依存的なリボフラビン輸送が報告されている<sup>40, 44</sup>。T84 細胞の頂側膜におけるリボフラビン輸送は、細胞外酸性条件下において  $\text{Na}^+$ 非依存性を示す一方、中性条件下では  $\text{Na}^+$ 除去により輸送活性の低下が観察された。頂側膜を介したリボフラビン輸送が酸性条件下において亢進することを考慮すると、 $\text{Na}^+$ の除去は RFVT3 を介したリボフラビン輸送に対して直接影響を及ぼしたのではなく、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE) を介したプロトン勾配の形成に作用した可能性が推察される。プロトン共役型のペプチドトランスポータ PEPT1 やアミノ酸トランスポータ proton-coupled amino acid transporter 1 (PAT1) は、NHE が形成したプロトン勾配を駆動力として利用することが知られている<sup>51-53</sup>。RFVT3 はこれらのトランスポータと同様、酸性条件下において輸送能が亢進する<sup>20</sup>。従って、腸上皮細胞における RFVT3 を介したリボフラビン輸送も一部 NHE を介して形成されたプロトン勾配により活性化される可能性が考えられ、その結果  $\text{Na}^+$ 依存的な輸送が認められたものと推察される。

RFVT3 は空腸および回腸において発現し、いずれの部位におけるリボフラビン吸収もメチレンブルーにより阻害された。従って RFVT3 は小腸の広範囲に分布し、腸管吸収に寄与していることが示唆された。また、小腸における RFVT3 の mRNA 発現量並びにリボフラビン吸収能は、共に下部において高い傾向を示した。1960 年代に行われた検討において、リボフラビン吸収能は小腸上部に局限することが示唆されている<sup>6, 54</sup>。しかしながらこの見解は、リボフラビンの腸管吸収が空腹時と比較して食後に経口投与した場合に亢進することや、リボフラビンの徐放性製剤を服用した場合に吸収率が低下することから推察されたものである。加えて、リボフラビン腸管吸収の程度は尿中リボフラビン排泄量から推定されている。従って、これらの検討は小腸における吸収部位を直接示し得るものではないと考えられる。事実、ラットを用いた検討においても本章と同様に空腸および回腸において飽和性のリボフラビン輸送が認められ、その活性は下部において高いことが報告されている<sup>49</sup>。さらに、ヒトにおいても空腸より調製した刷子縁膜小胞におけるリボフラビン輸送に飽和が認められており、空腸においてトランスポータが輸送を媒介することが実証されている<sup>38</sup>。以上を考え合わせると、リボフラビンの吸収能は小腸の広範囲にわたって備わっていること、また腸管吸収に RFVT3 が重要な役割を果たしていることが示唆される。

食品中のビタミン  $\text{B}_2$  は主に FAD および FMN として存在している<sup>55</sup>。これら補酵素型がリボフラビンと同様に吸収を受けるか T84 細胞を用いて検証したところ、頂側膜側から

側底膜側方向への FMN および FAD の輸送活性は、リボフラビンと比して顕著に低いことが判明した。RFVT3 の基質認識特性においても同様の傾向が認められたことから、T84 細胞におけるこの輸送特性は、頂側膜において輸送を担う RFVT3 の基質認識に起因するものと推察される。小腸刷子縁膜近傍では FAD ピロホスファターゼおよび FMN ホスファターゼが機能しており、これらが補酵素型をリボフラビンに加水分解することが報告されている<sup>56</sup>。以上を考え合わせると、食事摂取された FAD および FMN は腸管内においてリボフラビンに加水分解され、その後に吸収を受けるものと考えられる。

腸上皮細胞の刷子縁膜におけるリボフラビン輸送は精力的に解析されてきた一方で、側底膜を介した輸送に着目した検討はほとんどなされていない。T84 細胞の側底膜におけるリボフラビン輸送は、細胞外 pH 非依存的であり、また細胞外 Na<sup>+</sup>除去の影響はわずかであった。同様の輸送特性は、小腸側底膜より調製された膜小胞を用いた検討においても報告されている<sup>39</sup>。これらのリボフラビン輸送特性は、RFVT3 のホモログである RFVT2 の特性と酷似している<sup>20</sup>。また RFVT2 を Caco-2 細胞に強制発現させた場合、側底膜に局在することが明らかとされている<sup>48</sup>。従って、側底膜におけるリボフラビン輸送は RFVT2 によって媒介されている可能性が推察される。

以上、本章において、RFVT3 は腸上皮細胞の頂側膜において機能し、リボフラビン腸管吸収に重要な役割を果たすトランスポーターであることを見出した。

## 第 II 章

### 新生児生存における RFVT3 の重要性

2010 年、Green らは神経疾患である Brown-Vialetto-Van Laere (BVVL) 症候群患者において、RFVT3 遺伝子に変異が認められたことを報告した<sup>27</sup>。その直後、Bosch らにより RFVT3 遺伝子に変異を有する BVVL 症候群患者において、血中リボフラビン濃度の低下に加え、グルタル酸尿症や血中アシルカルニチン値の上昇等の脂肪酸代謝異常が観察されることが報告された<sup>25</sup>。以降、本疾患において RFVT3 の変異を有する症例が相次いで報告されている<sup>24, 26, 28, 57-59</sup>。BVVL 症候群は小児において発症する例が多く、難聴、球麻痺、顔面脱力、著しい筋力低下、呼吸困難等の重篤な症状をきたし、予後は極めて悪い<sup>30</sup>。これら一連の神経症状および代謝異常は、リボフラビンを投与することにより著効が認められる<sup>24-26, 28, 59</sup>。従って、RFVT3 の機能欠損あるいは機能低下により生体内のリボフラビンが欠乏し、代謝異常や疾患の発症に繋がる可能性が推察されている。この様に、生体の正常な機能維持における RFVT3 の重要性が臨床報告により示唆される一方、その役割を *in vivo* において検証した報告は皆無である。

第 I 章において、RFVT3 がリボフラビンの腸管吸収に寄与することを明らかとした。RFVT3 は、小腸以外にも精巣、腎臓、胎盤等に発現しており<sup>20,21</sup>、これらの組織においても役割を果たしている可能性が考えられる。第 II 章では RFVT3 の *in vivo* における役割を明らかとすることを目的とし、*Rfvt3* ノックアウトマウスを用いた検討を行った。

## 第1節 *Rfv3* ノックアウトマウスの生存および発達の評価

マウスにおける *Rfv3* の組織分布をリアルタイム PCR により検討したところ、胎盤、小腸、精巣、腎臓において高発現が認められた。本章において用いた *Rfv3* ノックアウトマウスでは、相同組み換えにより 1 番目と 2 番目のエクソン間のイントロンにジーントラップ配列が挿入されており、*Rfv3* の転写が阻害される。入手した *Rfv3* ノックアウトマウスの凍結精子を C57BL/6 雌性野生型マウスに受精させ出生した F1 世代において、相同組み換え部位の外側に組んだプライマーを用いてゲノム PCR を行ったところ、5'側、3'側共に想定された大きさのバンドを検出した。これより、正確に相同組み換えが行われていることを確認した。さらに、*Rfv3* ヘテロノックアウトマウス同士を交配し、ゲノム PCR 法により野生型、ヘテロ欠損型 (*Rfv3*<sup>+/-</sup>)、ホモ欠損型 (*Rfv3*<sup>-/-</sup>) の出生を確認した。これらマウスの腎臓における *Rfv3* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量したところ、*Rfv3*<sup>+/-</sup>では野生型と比較して発現量が有意に低下し、また *Rfv3*<sup>-/-</sup>では発現がほぼ完全に消失していた。以上より、本マウスにおける *Rfv3* の欠損を確認した。

次に、*Rfv3*<sup>-/-</sup>の生存および発達を評価した。*Rfv3*<sup>+/-</sup>間交配により出生した新生児は、メンデル則に従った遺伝子型分布を示した。しかし、*Rfv3*<sup>-/-</sup>の大部分が出生後 48 時間以内に死亡した。また、出生当日の *Rfv3*<sup>-/-</sup>の体重は野生型と比して有意に低値を示した。一方、*Rfv3*<sup>+/-</sup>に関しては出生当日の体重は野生型と同程度であり、また追跡した生後 20 週間の期間内においても野生型との間に有意な差は認められなかった。以上より、*Rfv3* が出生後の生存に必須のトランスポータであることが判明した。

RFVT3 の遺伝子変異を有する BVVL 症候群患者において、グルタル酸尿症を呈することが報告されている<sup>25</sup>。そこで出生当日のマウスより膀胱尿を回収し、グルタル酸濃度を測定した。その結果、*Rfv3*<sup>-/-</sup>における尿中グルタル酸濃度は、野生型と比して有意に上昇していた。

## 第2節 *Rfv3* ノックアウトマウスにおける血中および組織中リボフラビン濃度の評価

出生当日の野生型、*Rfv3*<sup>+/-</sup>、*Rfv3*<sup>-/-</sup>における血中並びに組織中（脳、腎臓、肝臓、心臓、肺）のリボフラビン濃度を評価した。*Rfv3*<sup>-/-</sup>におけるリボフラビン血中濃度は、野生型と

比して著しく低下していた。また *Rfvt3*<sup>-/-</sup> では、検討した全ての組織において著明なリボフラビン濃度の低下が観察された。即ち、*Rfvt3* の欠損により重度のリボフラビン欠乏が生じることが明らかとなった。さらに、*Rfvt3*<sup>-/-</sup> において血中 FAD 濃度の低下も認められ、組織中 FMN および FAD の濃度も野生型と比して有意に低値を示した。従って *Rfvt3* の欠損は、リボフラビンのみならず補酵素型の欠乏も引き起こすことが示された。

### 第 3 節 胎盤におけるリボフラビン胎児移行への *Rfvt3* の関与

第 2 節において、出生当日の *Rfvt3*<sup>-/-</sup> では顕著なリボフラビン欠乏が認められた。このことから、*Rfvt3* は胎盤におけるリボフラビンの胎児移行に関与している可能性が推察された。そこで、マウス胎盤における *Rfvt3* の mRNA 発現分布を *in situ* hybridization 法により評価した。その結果、*Rfvt3* は母体胎児間の栄養および老廃物の交換を行う部位である迷路部において発現することが明らかとなった。また、連結帯においても発現が認められた。

次に、リボフラビン胎児移行に *Rfvt3* が関与しているか検証した。*Rfvt3*<sup>+/-</sup> 間交配させた妊娠 16 日目の母体マウスの左大腿静脈から [<sup>3</sup>H]リボフラビンを瞬時投与し、5 分後の胎児中の放射活性を測定した。その結果、*Rfvt3*<sup>-/-</sup> 胎児中の単位重量当たりの [<sup>3</sup>H]リボフラビン蓄積量は、野生型と比して有意に低下していた。また、胎児中の [<sup>3</sup>H]リボフラビン濃度を胎盤重量で除すことで胎盤の単位重量あたりのリボフラビン輸送能を算出したところ、*Rfvt3*<sup>-/-</sup> 胎児に対する胎盤リボフラビン輸送能は、野生型胎児に対する輸送能に比して有意に低下していた。以上より、*Rfvt3* が胎盤においてリボフラビンの胎児移行に関与していることが示された。

## 第 II 章 考 察

RFVT3 が同定されて以来、組織分布や機能特性等の基礎的知見は集積しつつあるものの、その生理的役割を *in vivo* において検証した報告は皆無であった。第 II 章ではノックアウトマウスを用いた検討により、RFVT3 が生体内において担う役割を精査した。出生当日の *Rfvt3* ノックアウトマウスにおいて、血中および組織中リボフラビン濃度は野生型と比して顕著に低い値を示し、著明なリボフラビン欠乏が認められた。*Rfvt3* は胎盤において高発

現が認められることから、機能欠損により母体から胎児へのリボフラビン供給に影響をきたしている可能性が推察された。胎盤におけるリボフラビンの胎児移行は、トランスポータにより媒介されることがヒト胎盤灌流法や培養細胞等を用いた検討により示唆されてきた<sup>9, 60-63</sup>が、その分子実体の同定には至っていなかった。加えて、ヒト胎盤合胞体性栄養膜細胞より調製された膜小胞を用いた検討において、リボフラビン取り込みに飽和性が認められるものの、温度依存性を示さなかった（37°C と 22°C 間の比較）ことからトランスポータの関与自体に懐疑的な報告もなされる<sup>64</sup>など、胎盤におけるリボフラビン輸送の詳細な機構も不明であった。胎盤における *Rfvt3* の発現分布を検証したところ、迷路部において発現が認められた。胎盤迷路部は母体-胎児間で栄養物および老廃物の交換が行われる部位であり、血液-胎盤関門の役割を果たす合胞体性栄養膜細胞が母体血と接している。合胞体性栄養膜細胞には種々栄養物を輸送するトランスポータが発現しており、胎児への栄養物の供給を媒介している<sup>60, 65, 66</sup>。本章において *Rfvt3* +/- 間交配させた妊娠マウスを用いて母体-胎児間のリボフラビン移行性を胎児のジェノタイプ別に評価したところ、*Rfvt3* ノックアウト胎児へのリボフラビンの移行性は野生型への移行性と比較して有意に低下していた。従って、*Rfvt3* がリボフラビンの胎児移行に関与していることが明らかとなった。合胞体性栄養膜細胞における *Rfvt3* の膜局在は今後検証される必要があるが、第 I 章において述べた通り、RFVT3 を上皮細胞に強制発現させた場合、頂側膜に局在することが複数の臓器由来の細胞において再現されている<sup>41, 48, 67</sup>。従って、*Rfvt3* は合胞体性栄養膜細胞においても頂側膜において発現し、母体血から細胞内へのリボフラビン取り込みを媒介している可能性が想定される。以上、*Rfvt3* が胎盤におけるリボフラビンの胎児移行を媒介することを *in vivo* において初めて実証し、機能欠損に伴う移行性の低下が、新生児のリボフラビン欠乏を引き起こす一因であることが強く示唆された。

機能欠損型の RFVT3 をホモで有する BVVL 症候群患者において、多種アシル CoA 脱水素酵素欠損症 (Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency; MADD) と同様の代謝異常が認められることが報告されている<sup>25</sup>。MADD はグルタル酸尿症 II 型とも表現され、脂肪酸等の代謝異常に伴い、尿中におけるグルタル酸をはじめとする脂肪酸値および血中アシルカルニチン値の上昇が認められる<sup>68</sup>。低血糖、代謝性アシドーシス、肝腫大、ミオパチーなど多様な症状を呈し、新生児において発症した場合は重篤であり予後が悪い。MADD の発症要因として、脂肪酸β酸化等の代謝反応に関与する electron transfer flavoprotein (ETF) および electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) をコードする遺伝子の変異が報告されており、これらの機能欠損により脂肪酸代謝異常が惹起されることが知られている

<sup>69-71</sup>。本章において、*Rfvt3* ノックアウトマウスは尿中グルタル酸濃度の上昇を呈し、*Rfvt3* の機能欠損により脂肪酸代謝異常が引き起こされることが *in vivo* において示された。 $\beta$  酸化は4段階の酵素反応により成っており、その第1段階はFADを補酵素とするアシル CoA デヒドロゲナーゼにより媒介される。*Rfvt3* ノックアウトマウスでは検討した全ての組織において、FAD濃度は野生型に比して低値を示していた。従って補酵素の欠乏により脂肪酸 $\beta$ 酸化の進行に影響が及び、蓄積した脂肪酸が尿中に漏出したものと推察される。以前に、長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化に関与する mitochondrial trifunctional protein (MTP) のノックアウトマウスが脂肪酸代謝異常や低血糖をきたし、出生後36時間以内に死亡することが報告されている<sup>72</sup>。この結果は、生後の生存における脂肪酸代謝の重要性を示唆するものである。MTP ノックアウトマウスの心臓および横隔膜では重度のネクロシスや空胞化が認められ、心機能の低下または呼吸不全により死亡した可能性が推察されている<sup>72</sup>。*Rfvt3* ノックアウトマウスの死亡時期は MTP ノックアウトマウスと酷似しており、同様の機序で死亡している可能性が考えられる。以上より、*Rfvt3* の機能欠損に伴うリボフラビン欠乏は、脂肪酸代謝に影響をきたすことが *in vivo* において強く示唆され、致死的な要因となる可能性が推察された。

RFVT3 の遺伝子変異との関連が示唆されている BVVL 症候群は、小児や乳幼児において発症する症例が多い<sup>30,73</sup>。RFVT3 遺伝子に変異を有する BVVL 症候群患者では、血中リボフラビン濃度の低下が認められることが報告されている<sup>25</sup>。これらの患者における神経症状はリボフラビンの投与によって著しく改善する<sup>25,26,28,59</sup>。従って、リボフラビンの欠乏が BVVL 症候群の発症要因となっている可能性が推察されている<sup>73</sup>。本研究により、RFVT3 の遺伝子欠損により胎盤を介した胎児へのリボフラビン供給が低下し、新生児に顕著なりボフラビン欠乏を引き起こすことが判明した。また、第I章において実証した通り RFVT3 はリボフラビンの腸管吸収においても重要な役割を果たしており、体外からの摂取が必要となる出生後には、リボフラビン欠乏がさらに増強される可能性が強く示唆される。リボフラビン欠乏により神経症状を発症する機序は今後の検討が必要であるが、RFVT3 の遺伝子欠損に伴う胎児期のリボフラビン供給並びに出生後の腸管吸収能の低下によりリボフラビン欠乏が引き起こされ、BVVL 症候群発症の要因となる可能性が推察される。

以上、本章において RFVT3 が生後の生存に必須のトランスポーターであることが判明した。また、RFVT3 は胎盤において胎児へのリボフラビンの移行に関与することが *in vivo* において示され、機能欠損に伴う移行性の低下は新生児のリボフラビン欠乏を引き起こすことが示された。



## 結 論

以上二章にわたり、著者はリボフラビントランスポータ RFVT3 の生理的役割の解明を目的とした検討を行い、以下の結論を得た。

### 第I章 リボフラビン腸管吸収における RFVT3 の役割

リボフラビンは生体の正常な機能維持に必須の水溶性ビタミンである。ヒトをはじめとする哺乳類はリボフラビン生合成経路を有さないため、食物からの摂取が不可欠である。食事摂取されたリボフラビンは小腸において、腸上皮細胞の管腔側刷子縁膜と血管側側底膜の2つの膜透過過程を経て血中へと取り込まれ、この両過程をトランスポータが媒介することが明らかとされている。しかし、その分子実体は長年不明であった。本章では、小腸において高発現が認められる RFVT3 のリボフラビン腸管吸収への機能的関与を評価した。ヒト腸由来上皮細胞である T84 細胞における RFVT3 の mRNA 発現量は、ヒトの小腸と同程度であった。また、T84 細胞においてリボフラビンは頂側膜側から側底膜側への方角、即ち腸管吸収に対応する方向に選択的に輸送された。従って、リボフラビン腸管吸収における RFVT3 の役割を *in vitro* において検討する上で、T84 細胞はモデル細胞として妥当であると考えられた。T84 細胞の頂側膜を介したリボフラビン取り込みは細胞外 pH 依存性かつ Na<sup>+</sup>非依存性を示し、RFVT3 の機能的特徴が認められた。さらに、このリボフラビン輸送は RFVT3 阻害薬であるメチレンブルーの添加、および RFVT3 に特異的な siRNA の導入により有意に低下した。*In situ hybridization* 法によりマウス消化管における Rfv3 の mRNA 発現を検討したところ、空腸および回腸において発現が認められた。一方、胃、十二指腸、盲腸、結腸、直腸での発現はほとんど認められなかった。マウス空腸および回腸におけるリボフラビン膜透過性は、メチレンブルーの添加により有意に低下した。以上より、RFVT3 は腸上皮細胞の頂側膜において機能し、リボフラビンの腸管吸収に寄与することが示された。

## 第 II 章 新生児生存における RFVT3 の重要性

RFVT3 は小腸の他に腎臓、精巣、胎盤等にも分布しているが、*in vivo* において担う役割は明らかとされていない。そこで *Rfvt3* ノックアウトマウス (*Rfvt3*<sup>-/-</sup>) を用いて検証した。*Rfvt3*<sup>+/-</sup> 間交配により出生した新生児は、メンデル則に従った遺伝子型分布を示した。しかし、*Rfvt3*<sup>-/-</sup> の大部分が生後 48 時間以内に死亡した。出生時の *Rfvt3*<sup>-/-</sup> の体重は、野生型に比して有意に低値を示した。一方、*Rfvt3*<sup>+/-</sup> の体重に関しては、追跡した 20 週間の期間内において、野生型との間に有意な差は認められなかった。RFVT3 の遺伝子変異を有する BVVL 症候群患者では、グルタル酸尿症を呈することが報告されている。*Rfvt3*<sup>-/-</sup> の尿中グルタル酸濃度は野生型と比して有意に上昇しており、*Rfvt3* の欠損により脂肪酸代謝異常が引き起こされることが *in vivo* において示された。*Rfvt3*<sup>-/-</sup> の血中および組織中 (脳、腎臓、肝臓、心臓、肺) のリボフラビン濃度は、野生型に比して著明に低下していた。これより、*Rfvt3* が胎盤においてリボフラビンの胎児移行に関与する可能性が推察された。*In situ* hybridization 法によりマウス胎盤における *Rfvt3* の mRNA 発現を検討した結果、迷路部において発現が認められた。*Rfvt3*<sup>+/-</sup> 間交配させた妊娠 16 日目の雌性マウスに [<sup>3</sup>H] リボフラビンを瞬時投与し、胎児へのリボフラビン移行性を評価したところ、*Rfvt3*<sup>-/-</sup> 胎児中の放射活性は野生型胎児に比して有意に低値を示した。以上より、RFVT3 が新生児の生存に必須のトランスポータであることが判明した。RFVT3 は胎盤において胎児へのリボフラビンの移行に関与することが明らかとなり、機能欠損に伴う移行性の低下は新生児のリボフラビン欠乏を引き起こすことが示された。

以上、著者は RFVT3 がリボフラビンの腸管吸収および胎児移行に寄与することを明らかとした。また、RFVT3 は生存に必須のトランスポータであることを見出した。本研究成果は、生体のリボフラビン恒常性維持機構を理解するための重要な基礎的知見であると共に、BVVL 症候群等の RFVT3 の機能欠損が関与する疾患の発症メカニズムの解明にも有用な情報となるものと考えられる。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院 松原 和夫 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、種々の有益な御助言と御指導を戴きました京都大学 乾 賢一 名誉教授、京都大学大学院薬学研究科 矢野 育子 准教授、立命館大学薬学部 桂 敏也 教授、九州大学病院 増田 智先 教授、京都大学医学部附属病院 米澤 淳 講師に深謝致します。

さらに、多くの御指導・御助言を戴きました京都大学医学部附属病院薬剤部諸氏、並びに実験の一部に御協力戴きました八尾 祉頭 博士、菅野 久美子さん、山西 香里さんに心より感謝致します。

## 実験の部

### 試薬

#### Moravek Biochemicals

D-[1-<sup>14</sup>C]mannitol (1.961 GBq/mmol), [<sup>3</sup>H]riboflavin (0.903 TBq/mmol)

#### GE Healthcare

[<sup>14</sup>C]α-methyl-D-glucopyranoside (11.7 GBq/mmol)

#### Sigma-Aldrich

Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate, Lumichrome, Lumiflavine, Probenecid, Riboflavin, Riboflavin 5'-monophosphate sodium salt hydrate

#### Nacalai Tesque

Amiloride, Choline chloride, Furosemide, Imipramine hydrochloride, p-Aminohippuric acid, D-(-)-Mannitol

#### Wako Pure Chemical Industries

Chlorpromazine hydrochloride, Desipramine hydrochloride, Methylene blue, N-methyl-D-glucamine

その他の試薬は、市販特級品を用いた。

## 第 I 章 実験の部

### 【I-1】細胞培養

#### (1) T84 細胞の培養

ヒト結腸癌由来上皮細胞株 T84 細胞 (CCL-248; American Type Culture Collection) は、10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium-Ham's F-12 with L-Gln, sodium pyruvate, and HEPES (Nacalai Tesque) で、5% CO<sub>2</sub>-95% air、37°C の環境下において培養した。実験用には、6-well Transwell<sup>®</sup> (3.0 μm pores, 4.67 cm<sup>2</sup>; Costar) または 24-well plate にそれぞれ 150×10<sup>4</sup> cells/well、20×10<sup>4</sup> cells/well で播種した。2 日ごとに培地を交換し、5 日後に実験に用いた。RNA 干渉を行う場合は、duplexed Stealth RNAi small-interfering RNA (siRNA) (Life Technologies) を用いた。T84 細胞播種時に、LipofectAMINE RNAiMAX (Life Technologies) を用いたリバーストランスフェクション法により 1 well あたり 30 pmol の siRNA を細胞内に導入した。トランスフェクション 24 時間後に培地を交換し、その後は 2 日ごとに培地交換を行い、5 日目に実験に用いた。コントロール細胞には Stealth RNAi Negative Control Duplexes (Life Technologies) を導入した。使用した hRFVT3 を特異的に抑制する siRNA (hRFVT3-siRNA) の標的配列は、以下に示す通りである。

hRFVT3-siRNA I : 5'-TCCTGCCTAACAGGTCTCTGCTGTT-3'

hRFVT3-siRNA II : 5'-ACCTGCGTCAATGTCACCTGAGATAT-3'

hRFVT3-siRNA III : 5'-CCGGCGCACCTGGCCTTCATCTATA-3'

#### (2) HEK293 細胞の培養

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞 (CRL-1573; American Type Culture Collection) は、10% FBS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium で、5% CO<sub>2</sub>-95% air、37°C の環境下において培養した。実験用には、HEK293 細胞をポリリジンコートが施された 24-well もしくは 12-well plate に 7.5×10<sup>4</sup> cells/well、15×10<sup>4</sup> cells/well の濃度でそれぞれ播種した。24 時間培養後に 24-well plate に播種した細胞には 0.2 μg、12-well plate に播種した細胞には 0.4 μg のプラスミド DNA を LipofectAMINE 2000 (Life Technologies) を用いてトランスフェクションした。24 時間後に培地を交換し、48 時間後に輸送実験に用いた。なお、用いたプラスミド DNA は、hRFVT1、hRFVT2、hRFVT3、mRfvt2 または mRfvt3 の遺伝子配列が挿入された

pcDNA3.1/Hygro(+)ベクターであり、著者の所属する研究室において既に構築されたものである<sup>20</sup>。

### (3) MDCK 細胞の培養

イヌ腎由来 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞 (CCL-34; American Type Culture Collection) は、【I-1】(2) に準じて培養した。実験用には、MDCK 細胞をポリリジンコートが施された 4-well culture slides (Becton, Dickinson and Company) に  $4 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種した。24 時間培養後に 0.8  $\mu\text{g}$  のプラスミド DNA を LipofectAMINE 2000 を用いてトランスフェクションした。24 時間後に培地を交換し、48 時間後に蛍光観察に用いた。なお、用いたプラスミド DNA は、hRFVT3 の遺伝子配列が挿入された pEGFP-C1 ベクターであり、著者の所属する研究室において既に構築されたものである<sup>20</sup>。

### 【I-2】 mRNA 発現の定量

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、T84 細胞より total RNA を抽出した。得られた total RNA を鋳型として Random Primer 並びに Superscript<sup>TM</sup> II 逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて 20  $\mu\text{L}$  の系で逆転写反応を行い、その後 RNase H (Life Technologies) 処理を行った。得られた single strand DNA をリアルタイム PCR 法による mRNA 発現定量に用いた。リアルタイム PCR は、ABI PRISM7700<sup>TM</sup> Sequence Detector (Life Technologies) を用いて Motohashi<sup>74</sup> らの方法に準じて行った。以下に使用した TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays を示す。  
hRFVT1, Hs01079030\_g1; hRFVT2, Hs01859203\_s1; hRFVT3, Hs00364295\_m1.

### 【I-3】 T84 細胞を用いた輸送実験

#### (1) 経上皮輸送および経細胞輸送の評価

【I-1】(1) に示す条件にて Transwell<sup>®</sup> に播種した T84 細胞を用いた。頂側膜側、側底膜側の順に培養液を除去し、両側に 2 mL の Incubation Medium (I.M.) (pH 7.4) を添加し、37°C で 10 分間インキュベーションした。両側から I.M. を除去後、<sup>3</sup>H]リボフラビン、非標識リボフラビン、FMN または FAD を含む I.M. を頂側膜側もしくは側底膜側に、I.M. を反対側に添加した。生理的条件を考慮し、頂側膜側に添加する溶液は pH 6.0、側底膜側は pH 7.4 に調製した。所定の時間に反対側の I.M. を 100  $\mu\text{L}$  回収した。放射活性は液体シンチレーションカウンターにより、非標識リボフラビン、FMN および FAD の濃度は【I-5】に準じて HPLC 法により測定した。リボフラビン経細胞輸送量を算出する場合

には、D-[1-<sup>14</sup>C]マンニトールを同時添加することにより細胞間隙透過量を評価し、補正を行った。実験に用いた I.M. の組成は、145 mM NaCl、3 mM KCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM D-glucose および 5 mM HEPES (pH 7.0-8.0 に調製する場合) または 5 mM MES (pH 5.5-6.5 に調製する場合) である。

## (2) 頂側膜におけるリボフラビン輸送の評価

**【I-1】** (1) に示す条件にて plate に播種した T84 細胞を実験に用いた。培養液を除去後、0.5 mL の I.M. (pH 7.4) で 37°C にて 10 分間インキュベーションした。I.M. を除去した後に [<sup>3</sup>H]リボフラビン含有 I.M. (pH 6.0) を添加し、5 分間インキュベーションした。薬液を除去後、氷冷した 1 mL の I.M. (pH 7.4) で細胞を 2 回洗浄することで反応を停止させた。細胞を 0.5 mL の 0.5 N NaOH で溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。Na<sup>+</sup>-free の I.M. は NaCl を Choline chloride、N-methyl-D-glucamine または Mannitol に置換して調製した。

## (3) 側底膜におけるリボフラビン輸送の評価

**【I-3】** (1) と同様に、Transwell<sup>®</sup> に播種した T84 細胞の両側に 2 mL の I.M. (pH 7.4) を添加し、37°C で 10 分間インキュベーションした。I.M. を除去後、[<sup>3</sup>H]リボフラビン含有 I.M. (pH 7.4) を側底膜側に、I.M. (pH 6.0) を頂側膜側に添加し、5 分間インキュベーションした。薬液を除去後、氷冷した 2 mL の I.M. (pH 7.4) で細胞の両側を 2 回洗浄した。細胞を 1 mL の 0.5 N NaOH 中に溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

## (4) タンパク定量

細胞溶解液中のタンパク質濃度は、Bradford の方法に準じ、 $\gamma$ -globulin をスタンダードとして Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて定量した。

## **【I-4】 RFVT 一過性発現 HEK293 細胞を用いた輸送実験**

### (1) [<sup>3</sup>H]リボフラビン輸送実験

**【I-1】** (2) に示す条件にて RFVT を一過性発現させた HEK293 細胞を実験に用いた。輸送実験は、**【I-3】** (2) に準じて行った。但し、[<sup>3</sup>H]リボフラビン含有 I.M. の pH は 7.4 に調製し、またインキュベーション時間を 1 分とした。HEK293 細胞における内因的なリボフ

ラビン輸送能を考慮し、各 RFVT によるリボフラビン輸送活性 (Specific Uptake) を、RFVT 発現 HEK293 細胞におけるリボフラビン輸送活性から空ベクター導入細胞における輸送活性を減算することで算出した。

## (2) 非標識リボフラビン、FMN および FAD の輸送実験

**【I-4】** (1) に準じて行った。薬液添加前のインキュベーションは 20 分間とした。薬物含有 I.M. のインキュベーションを 10 分間行い、氷冷 I.M. で洗浄後に 0.2 mL の 10 mM リン酸バッファー (pH 5.5) 中に細胞を回収した。メタノールを加えることで除タンパクを行い、遠心後の上清をコスモナイスフィルター (0.45  $\mu$ m; Merck Millipore) を通した後に **【I-5】** に準じた HPLC 法に用いた。

## **【I-5】** HPLC によるリボフラビン、FMN および FAD 濃度の測定

HPLC には、LC-10ADVP (Shimadzu)、検出器には蛍光検出器 RF-10ASL (Shimadzu)、積分器にはクロマトパック C-R8A (Shimadzu) を用いた。分析カラムは CHEMCOSORB 5-ODS-H (4.6 $\times$ 150 mm; Chemco Scientific Co., Ltd.)、移動相は 10 mM リン酸バッファー (pH 5.5) : メタノール = 65 : 35 とし、流速 1.0 mL/min、励起波長 445 nm、蛍光波長 530 nm、インジェクション量 20  $\mu$ L、カラム温度 40 $^{\circ}$ C にて測定を行った。

## **【I-6】** GFP-hRFVT3 発現 MDCK 細胞の蛍光観察

**【I-1】** (3) に示す条件にて 4-well culture slide に播種し、GFP-hRFVT3 を一過性発現させた MDCK 細胞を用いた。培養液を除去後に PBS で細胞を洗浄し、2%パラホルムアルデヒドを添加し 10 分間静置することで細胞を固定した。核および F-アクチンを検出するため、4',6-diamidino-2-phenylindole (2000 倍希釈) および Alexa-546-Phalloidin (1000 倍希釈) による染色を行い、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE) を用いて観察した。

## **【I-7】** *In situ* hybridization

マウス組織のパラフィン包埋、薄切切片の作成および染色は株式会社ジェノスタッフに委託し、以下の要領で実施された。

### (1) 組織切片の作製

8 週齢の C57BL/6 雄性マウスを用いた。ホルムアルデヒド系固定液 (Genostaff) を用い



て組織の灌流、浸漬固定を行った。パラフィン包埋後、5~6  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製した。

## (2) プローブ配列

マウス *Rfv3* を特異的に検出する配列を検索した。

用いたプローブ配列を以下に示す。

*Rfv3*/Slc52a3 (NM\_027172.3)

Position : 1045-1645 in the open reading frame

```
AGGTCGCTGTTATTCCTGGGGGTGCTCACAGTGTTGGGGACCGGCTTTGGGGCCT
ACAATATGGCCATGGCTGCTATGAGCCCCTGCCCTGTCCTGCAGGGTCACTGGG
GTGGAGAAGTCCTTATCGTGCTCTCCTGGGTGCTGTTTGCAGCCTGTCTCAGCTA
TGCAAGGTGATGCTGGGTGTGATCTTGCGTGACCGGAGTCGCAGTGCCCTCTTG
TGGTGTGGGGCAGCGGTGCAGCTGGGCTCTCTGATTGGTGCCCTGCTCATGTTCC
CACTGGTTAATGTACTGAAACTCTTCTCATCTGCCGACTACTGCAGCCTGGACTG
CTCCGTGTAGGCTCACTTGGCCACCTCAGGACACCAGGTACCCCCATCGGTGAA
GGTAAAAGCCAGAAGAGCCCAGCGACACTAAGGATAACAACCCTTTGCTCCATT
TTTCATCCCCATCCTCCACACCCCCACTCCAACCTTGCATGGTCATAGATCGGGG
TCTGGGGAGCTGTTAGGCCAGGCCTGAGCTTTTTAACACAAAGGCCTCCTTCCA
ACCTGGAGTTGCACTGTGCAGCCCCTCCTCCAGCACAGTGCCCGTTGCTTATGAG
```

## (3) *In situ* hybridization

薄切切片に脱パラフィン処置を施した後、Proteinase K (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 37°C で 30 分間反応させた。4% PFA で再度固定した後、0.2 N HCl で 10 分間処理した。0.1 M triethanolamine-HCl, 0.25% acetic anhydride で 10 分間インキュベーションすることによりアセチル化を行った。脱水操作を行った後、300 ng/mL に調製したジゴキシゲニン標識プローブを 60°C で 16 時間ハイブリダイゼーションさせた。切片を洗浄後、RNase A (50 mg/mL in 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl and 1 mM EDTA) 処理を行った。0.5%ブロッキング試薬 (Roche) を用いて 30 分間ブロッキングを施した後、1000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche) と室温で 2 時間反応させた。発色反応は、NBT/BCIP 溶液 (Sigma) と一晩反応させることにより行った。Kernechtrot 染色により対比染色を行い、CC/Mount (Diagnostic Biosystem) により封入した。

## 【I-8】 リボフラビン腸管吸収能の評価

### (1) 実験動物

10-15 週齢の C57BL/6 雄性マウス (Japan SLC) を使用した。マウスは実験に用いるまで恒温 (22-24°C)、12 時間の明暗サイクル、水と固形試料を自由に摂取可能な条件下において飼育した。

動物実験は、京都大学動物実験に関する指針を遵守して行った。

### (2) *In situ* closed loop 法

Shirasaka らの方法<sup>75</sup>を基に、以下の要領で行った。マウスは、実験前夜より絶食させた。Pentobarbital (50 mg/kg) 麻酔下で開腹し、空腸においては treiz 靱帯より 2 cm 遠位側を起点とする 5 cm、回腸においては盲腸より 2 cm 近位側を終点とする 5 cm の両端にシリコンチューブを用いてカニューレ手術を施し、閉鎖系の腸管 Loop を作成した。Loop 内を 50 nM の [<sup>3</sup>H] リボフラビンおよび 50 μM の α-メチル-[<sup>14</sup>C] グルコピラノシドを含む 200 μL の PBS で満たした。3 分後に近位側のカニューレより非標識 PBS を Loop 内に流入させ、遠位側のカニューレより回収した。得られた溶液を 10 mL にメスアップし、放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定することで、Loop 内に残存する [<sup>3</sup>H] リボフラビン並びに α-メチル-[<sup>14</sup>C] グルコピラノシド量を評価した。また、Loop を単離後切開し、Loop の長さおよび円周長を測定した。

[<sup>3</sup>H] リボフラビン並びに α-メチル-[<sup>14</sup>C] グルコピラノシドの小腸膜透過性 (Permeability) は、次の式により算出した。

$$\text{Permeability (cm/s)} = V(\ln X_0 - \ln X) / CLT$$

V; Loop 内投与薬液量 (200 μL), X<sub>0</sub>; 投与薬液中放射活性, X; 腸内残存薬液中放射活性, C; Loop 円周長, L; Loop 長, T; インキュベート時間 (180 秒)

さらに、粘膜中 [<sup>3</sup>H] リボフラビン並びに α-メチル-[<sup>14</sup>C] グルコピラノシド蓄積量を評価するため、単離した Loop 部位を氷冷した生理食塩水で洗浄した後、粘膜を掻き取った。秤量後に 19 倍量の生理食塩水中でポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートを作製した。遠心後の上清 100 μL を SOLVABLE (PerkinElmer) 中に完全に溶解させ、放射活性

を液体シンチレーションカウンターにより測定した。また、上清 5  $\mu\text{L}$  を【I-3】(4) に準じたタンパク定量に用いた。

## 第 II 章 実験の部

### 【II-1】 *Rfv3* (*Slc52a3*) ノックアウトマウス

*Rfv3* ノックアウトマウス (*Slc52a3*<sup>tm1a(KOMP)Wtsi</sup>) の凍結精子を Knockout Mouse Project (KOMP) repository<sup>76</sup> より入手した。C57BL/6 野生型雌性マウスに受精させ、F1 世代マウスを得た。出生した F1 世代について、尾より抽出したゲノム DNA をサンプルとして【II-2】

(2) に準じて long-range PCR を行い、正確に相同組み換えが認められたマウス同士を交配させ、F2 世代マウスを得た。【II-2】(3) に準じたゲノム PCR 法により、野生型、ヘテロ欠損型 (*Rfv3*<sup>+/-</sup>)、ホモ欠損型 (*Rfv3*<sup>-/-</sup>) の判定を行った。

### 【II-2】 ゲノム PCR

#### (1) ゲノム DNA の抽出

マウスの尾より DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出し、得られたサンプルを以下の PCR 反応に用いた。

#### (2) Long-range PCR

Long-range PCR は、TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (TAKARA BIO) を用いて、94°C で 30 秒 (変性)、55°C で 30 秒 (アニーリング)、72°C で 9 分 (伸長) のサイクルを 32 回繰り返し、最後に 72°C で 20 分伸長を行った。得られた PCR 産物を 0.6%アガロースゲルで分離後、エチジウムブロマイド染色により検出した。使用したプライマーを以下に示す。

For 5' homology arm

Forward primer (F1) : 5'-GAGTGGCACTTGACATTCGAGGATAAGC-3'

Reverse primer (R1) : 5'-CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC-3'

For 3' homology arm

Forward primer (F2) : 5'-TCTATAGTCGCAGTAGGCGG-3'

Reverse primer (R2) : 5'-GCGGCTTTTACCAAGAATATCAAG-3'

### (3) ジェノタイピング

野生型アレルおよび変異型アレルを検出するため、それぞれ TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version、TaKaRa Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (TAKARA BIO) を用いた PCR 反応を行った。94°C で 30 秒 (変性)、55°C で 30 秒 (アニーリング)、72°C で 3 分 (伸長) のサイクルを 32 回繰り返し、最後に 72°C で 10 分伸長を行った。得られた PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで分離後、エチジウムブロマイド染色により検出した。使用したプライマーを以下に示す。

#### Forward primer

for wild type allele (F3) : 5'-TCCTGAGGCAAAAGTGGAAA-3'

for mutant allele (F4) : 5'-GAGATGGCGCAACGCAATTAAT-3'

Reverse primer (R3) : 5'-GGCTGAAATAGCCACCTTT-3'

### 【II-3】リアルタイム PCR

マウス腎臓からの total RNA の抽出、逆転写、および RNase 処理は 【I-2】 に準じて行った。リアルタイム PCR は、StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR system (Life Technologies) により行った。使用した mRfvt3 の TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays は Mm00510189\_m1 である。

### 【II-4】血中および組織中リボフラビン、FMN および FAD 濃度の測定

出生当日のマウスより血液および組織 (脳、心臓、肺、腎臓、肝臓) を採取した。血液は遠心分離後の血漿をサンプルとした。組織に関しては、9 倍量の生理食塩水中で、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートを作製し、遠心後の分離上清をサンプルとして用いた。各サンプルに対して等量のメタノールを加えて静置した後に遠心することで、除タンパクを行った。遠心後の上清を、血漿に関しては 20 倍希釈、心臓、肺、腎臓、肝臓に関しては 5 倍希釈した。脳の上清は希釈せずに用いた。これらをコスモナイスフィルター W (0.45 μm、Nacalai Tesque) を通した後、20 μL を HPLC による定量に用いた。HPLC 測定は 【I-5】 に準じて行った。

### 【II-5】尿中グルタル酸濃度の測定

出生当日のマウスより膀胱尿を回収し、10 μL 中のグルタル酸濃度を GCMS 法により測定した。測定は、株式会社島津テクノリサーチに委託した。

## 【II-6】 *In situ* hybridization

妊娠 17.5 日齢の C57BL/6 雌性マウスを用いた。【I-7】(1) に準じた方法で固定並びに包埋を行い、胎盤の薄切切片を作製した。

プローブ配列および染色手順は【I-7】に記載した通りである。

## 【II-7】 リボフラビン胎児移行の評価

Wyrwoll らの方法<sup>77</sup>を基に、以下の要領で行った。*Rfv3*<sup>+/-</sup>マウス間で一晩交配させ、翌朝プラグチェックにより交尾の成立を確認した。妊娠 16 日目の母親マウスを Pentobarbital (50 mg/kg) 麻酔下で左大腿静脈にカニューレーション手術を行った。なお、カニューレ中には予め heparin (100 IU/mL) を満たした。左大腿静脈より [<sup>3</sup>H]リボフラビン (500 nM、10 mL/kg) を瞬時投与し、5 分後に腹部大動脈より全採血を行うことで屠殺し、速やかに胎盤および胎児を摘出した。胎児の尾より REDExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) を用いてゲノム DNA を抽出し、【II-2】(3) に準じて胎児のジェノタイプを判定した。胎児は 4 倍量の生理食塩水中で、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネートした。その後 SOLVABLE (PerkinElmer) 中に完全に溶解させ、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

## 論 文 目 録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Functional involvement of RFVT3/*SLC52A3* in intestinal riboflavin absorption

*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **306**: G102-G110, 2014

Riboflavin transporter RFVT3/*SLC52A3* is essential for neonatal survival

*Manuscript in preparation*

## 引用文献

1. Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* **77**: 1352-1360, 2003.
2. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, and O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem Biol Interact* **163**: 94-112, 2006.
3. Daniel H, Wille U, and Rehner G. In vitro kinetics of the intestinal transport of riboflavin in rats. *J Nutr* **113**: 636-643, 1983.
4. Jusko WJ, and Levy G. Pharmacokinetic evidence for saturable renal tubular reabsorption of riboflavin. *J Pharm Sci* **59**: 765-772, 1970.
5. Jusko WJ, Levy G, Yaffe SJ, and Gorodischer R. Effect of probenecid on renal clearance of riboflavin in man. *J Pharm Sci* **59**: 473-477, 1970.
6. Levy G, and Jusko WJ. Factors affecting the absorption of riboflavin in man. *J Pharm Sci* **55**: 285-289, 1966.
7. Spector R. Riboflavin transport by rabbit kidney slices: characterization and relation to cyclic organic acid transport. *J Pharmacol Exp Ther* **221**: 394-398, 1982.
8. Zempleni J, Galloway JR, and McCormick DB. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. *Am J Clin Nutr* **63**: 54-66, 1996.
9. Huang SN, and Swaan PW. Riboflavin uptake in human trophoblast-derived BeWo cell monolayers: cellular translocation and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 264-271, 2001.
10. Kansara V, Pal D, Jain R, and Mitra AK. Identification and functional characterization of riboflavin transporter in human-derived retinoblastoma cell line (Y-79): mechanisms of cellular uptake and translocation. *J Ocul Pharmacol Ther* **21**: 275-287, 2005.
11. Kumar CK, Yanagawa N, Ortiz A, and Said HM. Mechanism and regulation of riboflavin uptake by human renal proximal tubule epithelial cell line HK-2. *Am J Physiol* **274**: F104-110, 1998.
12. Lowy RJ, and Spring KR. Identification of riboflavin transport by MDCK cells using quantitative fluorescence video microscopy. *J Membr Biol* **117**: 91-99, 1990.
13. Said HM, and Ma TY. Mechanism of riboflavine uptake by Caco-2 human intestinal



- epithelial cells. *Am J Physiol* **266**: G15-21, 1994.
14. Said HM, Ma TY, and Grant K. Regulation of riboflavin intestinal uptake by protein kinase A: studies with Caco-2 cells. *Am J Physiol* **267**: G955-959, 1994.
  15. Said HM, Ortiz A, Ma TY, and McCloud E. Riboflavin uptake by the human-derived liver cells Hep G2: mechanism and regulation. *J Cell Physiol* **176**: 588-594, 1998.
  16. Said HM, Ortiz A, Moyer MP, and Yanagawa N. Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C270-276, 2000.
  17. Said HM. Recent advances in carrier-mediated intestinal absorption of water-soluble vitamins. *Annu Rev Physiol* **66**: 419-446, 2004.
  18. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J* **437**: 357-372, 2011.
  19. Yonezawa A, Masuda S, Katsura T, and Inui K. Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter, RFT1. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**: C632-641, 2008.
  20. Yao Y, Yonezawa A, Yoshimatsu H, Masuda S, Katsura T, and Inui K. Identification and comparative functional characterization of a new human riboflavin transporter hRFT3 expressed in the brain. *J Nutr* **140**: 1220-1226, 2010.
  21. Yamamoto S, Inoue K, Ohta KY, Fukatsu R, Maeda JY, Yoshida Y, and Yuasa H. Identification and functional characterization of rat riboflavin transporter 2. *J Biochem* **145**: 437-443, 2009.
  22. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, and Gelfand MS. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res* **30**: 3141-3151, 2002.
  23. Yonezawa A, and Inui K. Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. *Mol Aspects Med* **34**: 693-701, 2013.
  24. Anand G, Hasan N, Jayapal S, Huma Z, Ali T, Hull J, Blair E, McShane T, and Jayawant S. Early use of high-dose riboflavin in a case of Brown-Vialetto-Van Laere syndrome. *Dev Med Child Neurol* **54**: 187-189, 2012.
  25. Bosch AM, Abeling NG, Ijlst L, Knoester H, van der Pol WL, Stroomer AE, Wanders RJ, Visser G, Wijburg FA, Duran M, and Waterham HR. Brown-Vialetto-Van Laere and Fazio

- Londe syndrome is associated with a riboflavin transporter defect mimicking mild MADD: a new inborn error of metabolism with potential treatment. *J Inherit Metab Dis* **34**: 159-164, 2011.
26. Ciccolella M, Catteruccia M, Benedetti S, Moroni I, Uziel G, Pantaleoni C, Chiapparini L, Bizzi A, D'Amico A, Fattori F, Salsano ML, Pastore A, Tozzi G, Piemonte F, and Bertini E. Brown-Vialetto-van Laere and Fazio-Londe overlap syndromes: a clinical, biochemical and genetic study. *Neuromuscul Disord* **22**: 1075-1082, 2012.
  27. Green P, Wiseman M, Crow YJ, Houlden H, Riphagen S, Lin JP, Raymond FL, Childs AM, Sheridan E, Edwards S, and Josifova DJ. Brown-Vialetto-Van Laere syndrome, a ponto-bulbar palsy with deafness, is caused by mutations in c20orf54. *Am J Hum Genet* **86**: 485-489, 2010.
  28. Koy A, Pillekamp F, Hoehn T, Waterham H, Klee D, Mayatepek E, and Assmann B. Brown-Vialetto-Van Laere syndrome: a riboflavin-unresponsive patient with a novel mutation in the C20orf54 gene. *Pediatr Neurol* **46**: 407-409, 2012.
  29. Nabokina SM, Subramanian VS, and Said HM. Effect of clinical mutations on functionality of the human riboflavin transporter-2 (hRFT-2). *Mol Genet Metab* **105**: 652-657, 2012.
  30. Sathasivam S. Brown-Vialetto-Van Laere syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **3**: 9, 2008.
  31. Wang LD, Zhou FY, Li XM, Sun LD, Song X, Jin Y, Li JM, Kong GQ, Qi H, Cui J, Zhang LQ, Yang JZ, Li JL, Li XC, Ren JL, Liu ZC, Gao WJ, Yuan L, Wei W, Zhang YR, Wang WP, Sheyhidin I, Li F, Chen BP, Ren SW, Liu B, Li D, Ku JW, Fan ZM, Zhou SL, Guo ZG, Zhao XK, Liu N, Ai YH, Shen FF, Cui WY, Song S, Guo T, Huang J, Yuan C, Huang J, Wu Y, Yue WB, Feng CW, Li HL, Wang Y, Tian JY, Lu Y, Yuan Y, Zhu WL, Liu M, Fu WJ, Yang X, Wang HJ, Han SL, Chen J, Han M, Wang HY, Zhang P, Li XM, Dong JC, Xing GL, Wang R, Guo M, Chang ZW, Liu HL, Guo L, Yuan ZQ, Liu H, Lu Q, Yang LQ, Zhu FG, Yang XF, Feng XS, Wang Z, Li Y, Gao SG, Qige Q, Bai LT, Yang WJ, Lei GY, Shen ZY, Chen LQ, Li EM, Xu LY, Wu ZY, Cao WK, Wang JP, Bao ZQ, Chen JL, Ding GC, Zhuang X, Zhou YF, Zheng HF, Zhang Z, Zuo XB, Dong ZM, Fan DM, He X, Wang J, Zhou Q, Zhang QX, Jiao XY, Lian SY, Ji AF, Lu XM, Wang JS, Chang FB, Lu CD, Chen ZG, Miao JJ, Fan ZL, Lin RB, Liu TJ, Wei JC, Kong QP, Lan Y, Fan YJ, Gao FS, Wang TY, Xie D, Chen SQ, Yang WC, Hong JY, Wang L, Qiu SL, Cai ZM, and Zhang XJ. Genome-wide association study of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese subjects

- identifies susceptibility loci at PLCE1 and C20orf54. *Nat Genet* **42**: 759-763, 2010.
32. He Y, Ye L, Shan B, Song G, Meng F, and Wang S. Effect of riboflavin-fortified salt nutrition intervention on esophageal squamous cell carcinoma in a high incidence area, China. *Asian Pac J Cancer Prev* **10**: 619-622, 2009.
  33. Siassi F, and Ghadirian P. Riboflavin deficiency and esophageal cancer: a case control-household study in the Caspian Littoral of Iran. *Cancer Detect Prev* **29**: 464-469, 2005.
  34. Steffansen B, Nielsen CU, Brodin B, Eriksson AH, Andersen R, and Frokjaer S. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci* **21**: 3-16, 2004.
  35. Gould GW, and Holman GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* **295 ( Pt 2)**: 329-341, 1993.
  36. Hediger MA, and Rhoads DB. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev* **74**: 993-1026, 1994.
  37. Daniel H, and Rehner GI. Sodium-dependent transport of riboflavin in brush border membrane vesicles of rat small intestine is an electrogenic process. *J Nutr* **122**: 1454-1461, 1992.
  38. Said HM, and Arianas P. Transport of riboflavin in human intestinal brush border membrane vesicles. *Gastroenterology* **100**: 82-88, 1991.
  39. Said HM, Hollander D, and Mohammadkhani R. Uptake of riboflavin by intestinal basolateral membrane vesicles: a specialized carrier-mediated process. *Biochim Biophys Acta* **1148**: 263-268, 1993.
  40. Said HM, Mohammadkhani R, and McCloud E. Mechanism of transport of riboflavin in rabbit intestinal brush border membrane vesicles. *Proc Soc Exp Biol Med* **202**: 428-434, 1993.
  41. Fujimura M, Yamamoto S, Murata T, Yasujima T, Inoue K, Ohta KY, and Yuasa H. Functional characteristics of the human ortholog of riboflavin transporter 2 and riboflavin-responsive expression of its rat ortholog in the small intestine indicate its involvement in riboflavin absorption. *J Nutr* **140**: 1722-1727, 2010.
  42. Foraker AB, Khantwal CM, and Swaan PW. Current perspectives on the cellular uptake and trafficking of riboflavin. *Adv Drug Deliv Rev* **55**: 1467-1483, 2003.

43. Dharmsathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, and Masui H. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol* **246**: G204-208, 1984.
44. Casirola D, Gastaldi G, Ferrari G, Kasai S, and Rindi G. Riboflavin uptake by rat small intestinal brush border membrane vesicles: a dual mechanism involving specific membrane binding. *J Membr Biol* **135**: 217-223, 1993.
45. Grisshammer R, and Tate CG. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys* **28**: 315-422, 1995.
46. Kremer L, and Marquez G. Generation of monoclonal antibodies against chemokine receptors. *Methods Mol Biol* **239**: 243-260, 2004.
47. Saitoh R, Ohtomo T, Yamada Y, Kamada N, Nezu J, Kimura N, Funahashi S, Furugaki K, Yoshino T, Kawase Y, Kato A, Ueda O, Jishage K, Suzuki M, Fukuda R, Arai M, Iwanari H, Takahashi K, Sakihama T, Ohizumi I, Kodama T, Tsuchiya M, and Hamakubo T. Viral envelope protein gp64 transgenic mouse facilitates the generation of monoclonal antibodies against exogenous membrane proteins displayed on baculovirus. *J Immunol Methods* **322**: 104-117, 2007.
48. Subramanian VS, Subramanya SB, Rapp L, Marchant JS, Ma TY, and Said HM. Differential expression of human riboflavin transporters -1, -2, and -3 in polarized epithelia: a key role for hRFT-2 in intestinal riboflavin uptake. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 3016-3021, 2011.
49. Middleton HM, 3rd. Uptake of riboflavin by rat intestinal mucosa in vitro. *J Nutr* **120**: 588-593, 1990.
50. Said HM, and Mohammadkhani R. Uptake of riboflavin across the brush border membrane of rat intestine: regulation by dietary vitamin levels. *Gastroenterology* **105**: 1294-1298, 1993.
51. Anderson CM, Grenade DS, Boll M, Foltz M, Wake KA, Kennedy DJ, Munck LK, Miyauchi S, Taylor PM, Campbell FC, Munck BG, Daniel H, Ganapathy V, and Thwaites DT. H<sup>+</sup>/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology* **127**: 1410-1422, 2004.
52. Kennedy DJ, Leibach FH, Ganapathy V, and Thwaites DT. Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity. *Pflugers*

- Arch* **445**: 139-146, 2002.
53. Thwaites DT, Kennedy DJ, Raldua D, Anderson CM, Mendoza ME, Bladen CL, and Simmons NL. H/dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional Na/H exchanger. *Gastroenterology* **122**: 1322-1333, 2002.
  54. Campbell JA, and Morrison AB. Some factors affecting the absorption of vitamins. *Am J Clin Nutr* **12**: 162-169, 1963.
  55. Rivlin RS. Riboflavin metabolism. *N Engl J Med* **283**: 463-472, 1970.
  56. Akiyama T, Selhub J, and Rosenberg IH. FMN phosphatase and FAD pyrophosphatase in rat intestinal brush borders: role in intestinal absorption of dietary riboflavin. *J Nutr* **112**: 263-268, 1982.
  57. Bandettini di Poggio M, Gagliardi S, Pardini M, Marchioni E, Monti Bragadin M, Reni L, Doria-Lamba L, Roccatagliata L, Ceroni M, Schenone A, and Cereda C. A novel compound heterozygous mutation of C20orf54 gene associated with Brown-Vialetto-Van Laere syndrome in an Italian family. *Eur J Neurol* **20**: e94-95, 2013.
  58. Dezfouli MA, Yadegari S, Nafissi S, and Elahi E. Four novel C20orf54 mutations identified in Brown-Vialetto-Van Laere syndrome patients. *J Hum Genet* **57**: 613-617, 2012.
  59. Spagnoli C, Pitt MC, Rahman S, and de Sousa C. Brown-Vialetto-van Laere syndrome: A riboflavin responsive neuronopathy of infancy with singular features. *Eur J Paediatr Neurol* 2013.
  60. Dancis J, Lehanka J, and Levitz M. Transfer of riboflavin by the perfused human placenta. *Pediatr Res* **19**: 1143-1146, 1985.
  61. Dancis J, Lehanka J, and Levitz M. Placental transport of riboflavin: differential rates of uptake at the maternal and fetal surfaces of the perfused human placenta. *Am J Obstet Gynecol* **158**: 204-210, 1988.
  62. Zempleni J, Link G, and Bitsch I. Intrauterine vitamin B2 uptake of preterm and full-term infants. *Pediatr Res* **38**: 585-591, 1995.
  63. Zempleni J, Link G, and Kubler W. The transport of thiamine, riboflavin and pyridoxal 5'-phosphate by human placenta. *Int J Vitam Nutr Res* **62**: 165-172, 1992.
  64. Moe AJ, Plas DR, Powell KA, and Smith CH. Riboflavin uptake in microvillous and basal membrane vesicles isolated from full-term human placentas. *Placenta* **15**: 137-146, 1994.
  65. Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Dai G, Kamei T, and Orwig KE. Differentiation

- of trophoblast endocrine cells. *Placenta* **17**: 277-289, 1996.
66. Knipp GT, Audus KL, and Soares MJ. Nutrient transport across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev* **38**: 41-58, 1999.
  67. Subramanian VS, Rapp L, Marchant JS, and Said HM. Role of cysteine residues in cell surface expression of the human riboflavin transporter-2 (hRFT2) in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**: G100-109, 2011.
  68. Bruno C, and Dimauro S. Lipid storage myopathies. *Curr Opin Neurol* **21**: 601-606, 2008.
  69. Schiff M, Froissart R, Olsen RK, Acquaviva C, and Vianey-Saban C. Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects. *Mol Genet Metab* **88**: 153-158, 2006.
  70. Olsen RK, Andresen BS, Christensen E, Bross P, Skovby F, and Gregersen N. Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum Mutat* **22**: 12-23, 2003.
  71. Olsen RK, Olpin SE, Andresen BS, Miedzybrodzka ZH, Pourfarzam M, Merinero B, Frerman FE, Beresford MW, Dean JC, Cornelius N, Andersen O, Oldfors A, Holme E, Gregersen N, Turnbull DM, and Morris AA. ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Brain* **130**: 2045-2054, 2007.
  72. Ibdah JA, Paul H, Zhao Y, Binford S, Salleng K, Cline M, Matern D, Bennett MJ, Rinaldo P, and Strauss AW. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J Clin Invest* **107**: 1403-1409, 2001.
  73. Bosch AM, Stroek K, Abeling NG, Waterham HR, Ijlst L, and Wanders RJ. The Brown-Vialetto-Van Laere and Fazio Londe syndrome revisited: natural history, genetics, treatment and future perspectives. *Orphanet J Rare Dis* **7**: 83, 2012.
  74. Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O, and Inui K. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* **13**: 866-874, 2002.
  75. Shirasaka Y, Li Y, Shibue Y, Kuraoka E, Spahn-Langguth H, Kato Y, Langguth P, and Tamai I. Concentration-dependent effect of naringin on intestinal absorption of  $\beta_1$ -adrenoceptor antagonist talinolol mediated by p-glycoprotein and organic anion transporting polypeptide (Oatp). *Pharm Res* **26**: 560-567, 2009.

76. Collins FS, Rossant J, and Wurst W. A mouse for all reasons. *Cell* **128**: 9-13, 2007.
77. Wyrwoll CS, Seckl JR, and Holmes MC. Altered placental function of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 knockout mice. *Endocrinology* **150**: 1287-1293, 2009.