

京都大学	博士（薬科学）	氏名	金 叢 芸
論文題目	リボフラビントランスポータRFVT (<i>SLC52A</i>) 欠損による病態発生機構に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>リボフラビンは水溶性ビタミンに分類される生理活性物質である。生体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、フラビン酵素の補酵素として酸化還元反応を触媒し、物質代謝やエネルギー産生に寄与する。これまでに、胎盤、小腸で高発現するRFVT1 (<i>SLC52A1</i>)、脳を初め多くの組織で発現するRFVT2 (<i>SLC52A2</i>)、精巣、小腸、腎臓、胎盤等の組織で高発現するRFVT3 (<i>SLC52A3</i>) の3種のリボフラビントランスポータが同定され、リボフラビンの生体内恒常性維持への重要性が示唆されてきた。また、<i>SLC52A2</i>と<i>SLC52A3</i>遺伝子変異は希少神経疾患であるBrown-Vialletto-Van Laere (BVVL) 症候群の原因となる可能性も示されている。リボフラビンの投与によって一部症状が改善する症例も報告されたが、病態発症に関わる分子機序は未解明である。これらの背景の下、申請者はRFVT欠損による病態発症機構の解明を目的とした検討を行い、以下の新知見を得た。</p> <p>第I章 RFVTにおけるリボフラビン、FMNまたはFAD輸送活性の評価</p> <p>水溶性化合物であるリボフラビンは脂溶性の高い細胞膜を透過することが困難であるため、トランスポータを介して膜輸送される。これまでに、RFVT1-3はリボフラビンの細胞内取り込みに寄与することが示されている。本章では、RFVTのリボフラビン、FMN、FAD輸送への関与を評価し、細胞内リボフラビンおよびその補酵素型の恒常性維持機構を検討した。RFVT1-3をHEK293細胞に発現させると、細胞内リボフラビンの蓄積量の顕著な増加、およびリボフラビンの取り込み活性の上昇が確認された。一方、FMNやFADの細胞内蓄積の変化や細胞内輸送は、ほとんど認められなかった。次に、RFVT1-3によるリボフラビン、FMN、FADの排出を評価した結果、RFVT1を介したリボフラビン排出のみ亢進が認められた。以上より、RFVTは、FMN、FADではなくリボフラビンを特異的に輸送し、細胞内リボフラビンの恒常性維持に寄与することが判明した。</p> <p>第II章 Rfvt3欠損によるマウス大脳皮質の発達への影響</p> <p>所属研究室の過去の検討で、<i>Slc52a3</i>ノックアウト (KO)マウスでは、胎仔のリボフラビン欠乏を引き起こし、出生直後に死亡することを報告している。本章では、Rfvt3欠損と神経病態生理との関連を検証することを目的とし、<i>Slc52a3</i> KOマウスを用いて脳の発達を精査した。KO新生仔の脳において、リボフラビン濃度低下とともに大脳皮質、海馬などの領域に形成不全が観察された。また、胎生期の脳皮質には、神経細胞、中間前駆細胞の数が有意に減少していた。一方、放射状グリア細胞の数に差は認められなかった。そこで神経細胞数減少の原因を探究するため、BrdU投与、多重免疫染色により細胞の増殖・分化を評価した。KO胎仔脳において、細胞の増殖率に変化は認められなかったが、放射状グリア細胞が中間前駆細胞へ分化した細胞の比率が有意に低下した。一方、中間前駆細胞から神経細胞への分化率に変化は認められなかった。したがって、リボフラビン欠乏により放射状グリア細胞から中間前駆細胞への分化が低下したことが明らかとなった。また、母体へのリボフラビンの過剰投与により、KO新生仔脳の形成、胎児中間前駆細胞の減少が有意に回復した。以上より、Rfvt3欠損は放射状グリア細胞から中間</p>			

前駆細胞への分化を低下させ、大脳皮質の形成不全を引き起こすことが示された。

第三章 胎仔生存におけるRfvt2の重要性

Rfvt2の発生や発達における役割を明らかにするため、*Slc52a2*ヘテロ欠損型マウスを用いて検討を行った。ヘテロ欠損型同士交配により出生した新生仔および妊娠10日目の胎仔には、ホモ欠損型マウスが確認されず、早期の胎生致死と考えられた。ヘテロ欠損型マウスの*Slc52a2*の発現量を定量した結果、野生型と比較して発現量が顕著に低下していた。一方、ヘテロ欠損型マウスの外観は成長過程を通して野生型と変わらず、体重も野生型との間に有意な差は認められなかった。また、ヘテロ欠損型マウスの血中および組織中のリボフラビン濃度は、野生型と差は認められず、ヘテロ欠損型マウスは十分な輸送活性を持っていると推察された。以上より、Rfvt2が胎仔の発生と発達に必須のトランスポーターであることが判明した。

以上、申請者はRFVTがリボフラビンの恒常性維持に働くこと、Rfvt3は胎仔の脳の形成や大脳皮質の発生に、Rfvt2は胎仔の発生・発達に重要な役割を果たしていることを見出した。本研究成果は、RFVT介したリボフラビンの生体内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ともに、BVVL症候群の発症メカニズムの解明に繋がる有用な情報になるものとする。

(論文審査の結果の要旨)

リボフラビンは水溶性ビタミンに分類される生理活性物質である。生体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、フラビン酵素の補酵素として酸化還元反応を触媒し、物質代謝やエネルギー産生に寄与する。これまでに、胎盤、小腸で高発現する RFVT1 (SLC52A1)、脳を初め多くの組織で発現する RFVT2 (SLC52A2)、精巣、小腸、腎臓、胎盤等の組織で高発現する RFVT3 (SLC52A3) の3種のリボフラビントランスポータが同定され、リボフラビンの生体内恒常性維持への重要性が示唆されてきた。また、SLC52A2 と SLC52A3 遺伝子変異は希少神経疾患である Brown-Vialetto-Van Laere (BVVL) 症候群の原因となる可能性も示されている。リボフラビンの投与によって一部症状が改善する症例も報告されたが、病態発症に関わる分子機序は未解明である。これらの背景の下、本研究では RFVT 欠損による病態発症機構の解明を目的とした検討が行われ、以下の新知見が得られた。

第 I 章 RFVT におけるリボフラビン、FMN または FAD 輸送活性の評価

水溶性化合物であるリボフラビンは脂溶性の高い細胞膜を透過することが困難であるため、トランスポータを介して膜輸送される。これまでに、RFVT1-3 はリボフラビンの細胞内取り込みに寄与することが示されている。そこでまず RFVT のリボフラビン、FMN、FAD 輸送への関与を評価し、細胞内リボフラビンおよびその補酵素型の恒常性維持機構を検討した。RFVT1-3 を HEK293 細胞に発現させると、細胞内リボフラビンの蓄積量の顕著な増加、およびリボフラビンの取り込み活性の上昇が確認された。一方、FMN や FAD の細胞内蓄積の変化や細胞内輸送は、ほとんど認められなかった。次に、RFVT1-3 によるリボフラビン、FMN、FAD の排出を評価した結果、RFVT1 を介したリボフラビン排出のみ亢進が認められた。以上より、RFVT は、FMN、FAD ではなくリボフラビンを特異的に輸送し、細胞内リボフラビンの恒常性維持に寄与することが明らかになった。

第 II 章 Rfvt3 欠損によるマウス大脳皮質の発達への影響

過去の検討で Slc52a3 ノックアウト (KO) マウスでは、胎仔がリボフラビン欠乏を引き起こし、出生直後に死亡することを報告している。そこで Rfvt3 欠損と神経病態生理との関連を検証することを目的とし、Slc52a3 KO マウスを用いて脳の発達を精査した。KO 新生仔の脳において、リボフラビン濃度低下とともに大脳皮質、海馬などの領域に形成不全が観察された。また、胎生期の脳皮質には、神経細胞、中間前駆細胞の数が有意に減少していた。一方、放射状グリア細胞の数に差は認められなかった。そこで神経細胞数減少の原因を探究するため、BrdU 投与、多重免疫染色により細胞の増殖・分化を評価した。KO 胎仔脳において、細胞の増殖率に変化は認められなかったが、放射状グリア細胞が中間前駆細胞へ分化した細胞の比率が有意に低下した。一方、中間前駆細胞から神経細胞への分化率に変化は認められなかった。したがって、リボフラビン欠乏により放射状グリア細胞から中間前駆

細胞への分化が低下したことが明らかとなった。また、母体へのリボフラビンの過剰投与により、KO 新生仔脳形成、胎児中間前駆細胞の減少が有意に回復した。以上より、Rfvt3 欠損は放射状グリア細胞から中間前駆細胞への分化を低下させ、大脳皮質の形成不全を引き起こすことが示された。

第三章 胎仔生存における Rfvt2 の重要性

Rfvt2 の発生や発達における役割を明らかにするため、Slc52a2 ヘテロ欠損型マウスを用いて検討が行われた。ヘテロ欠損型同士交配により出生した新生仔および妊娠 10 日目の胎仔にはホモ欠損型マウスが確認されず、早期の胎生致死と考えられた。ヘテロ欠損型マウスの Slc52a2 の発現量を定量した結果、野生型と比較して発現量が顕著に低下していた。一方、ヘテロ欠損型マウスの外観は成長過程を通して野生型と変わらず、体重も野生型との間に有意な差は認められなかった。また、ヘテロ欠損型マウスの血中および組織中のリボフラビン濃度は、野生型と差は認められず、ヘテロ欠損型マウスは十分な輸送活性を持っていると推察された。以上より、Rfvt2 が胎仔の発生と発達に必須のトランスポーターであることが明らかとなった。

以上、本研究では RFVT がリボフラビンの恒常性維持に働くこと、Rfvt3 は胎仔の脳形成や大脳皮質の発生に、Rfvt2 は胎仔の発生・発達に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究成果は、RFVT 介したリボフラビンの生体内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ともに、BVVL 症候群の発症メカニズムの解明に繋がる有用な情報になるものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 3 年 2 月 9 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降