

京都大学	博士 (医 科 学)	氏 名	八 尾 祉 顕
論文題目	Identification and comparative functional characterization of a new human riboflavin transporter hRFT3 expressed in the brain (脳に発現する新規ヒトリボフラビントランスポータ hRFT3 の同定と比較機能解析)		
(論文内容の要旨)			
リボフラビンは、水溶性ビタミンB₂として知られる生理活性物質である。体内で活性体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) に変換され、酸化還元酵素の補酵素として働き、糖質、脂質、たんぱく質の代謝に関与する。リボフラビンは水溶性の低分子であるため、体外からの吸収および各組織への分布にはトランスポータが必要であると考えられてきた。近年、ヒトの新規リボフラビントランスポータhRFT1 およびhRFT2 が相次いで単離された。hRFT1 は胎盤、小腸に、hRFT2 は精巣、小腸にそれぞれ強い発現がみられた。しかしながら、リボフラビンは全ての細胞の機能維持に必須であるにも関わらず、hRFT1 およびhRFT2 の組織分布は限局的であるため、これらの発現がほとんど見られない組織におけるリボフラビン輸送には他のリボフラビントランスポータの関与が示唆された。本研究では、新規RFT分子の同定およびその分子のリボフラビン輸送特性を明らかにすることを目的に、hRFT1 ホモログ分子の探索、およびhRFT1、hRFT2 との比較機能解析を行った。 BLASTNアルゴリズムを用いてGenBankデータベース上でhRFT1 ホモログ検索を行い、機能未同定のGPR172Aを抽出した。小腸由来のRNAサンプルからRT-PCR法によりcDNAを単離した。GPR172Aは 445 個のアミノ酸より構成されると推定され、hRFT1、hRFT2 とそれぞれ 87%、44%の相同性を示す。リアルタイムPCR法によりGPR172Aの組織分布を検討した結果、脳に強い発現が認められ、また広範な組織においても発現が観察された。GPR172Aを一過性に発現させたHEK293 細胞におけるリボフラビン取り込み活性は、コントロール細胞と比較して有意に高い値を示した。またリボフラビンの濃度上昇に伴い取り込みに飽和が観察された。したがって、GPR172Aはリボフラビントランスポータであることが明らかとなり、hRFT3 と命名した。次に、hRFT1 およびhRFT2 との比較解析を行い、hRFT3 の機能特性を評価した。hRFTを一過性に発現させたHEK293 細胞におけるリボフラビン輸送は、細胞外Na⁺およびCl⁻に非依存적であった。細胞外pHの上昇に伴いhRFT2 によるリボフラビン輸送活性は漸減するのに対し、hRFT3 およびhRFT1 は、pHに非依存的にリボフラビンを輸送することが判明した。全てのhRFTによるリボフラビン輸送に対する種々の化合物共存の影響を検討した結果、リボフラビン類似体であるルミフラビン共存下で輸送活性が有意に低下した。一方、D-リボース、シメチジン、プロベネシド、チアミンおよび葉酸による阻害効果は観察されなかった。 以上、脳に強く発現する新規ヒトリボフラビントランスポータ hRFT3 の同定に成功した。hRFT3 のアミノ酸配列や機能特性は hRFT1 と類似しているが、hRFT2 とは一部異なることが明らかとなった。最近、hRFT3 をコードする			

SLC52A2 の遺伝子多型と、先天性の神経疾患である Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS) との関連を見いだした (参考論文, J Inherit Metab Dis. 35, 943-8, 2012)。したがって、本研究成果は、リボフラビン恒常性維持におけるhRFT3 の重要性を示唆するとともに、BVVLS といった遺伝性疾患の発症および進行機序の解明に有用な情報を提供するものと考える。
(論文審査の結果の要旨) 水溶性ビタミンであるリボフラビンの体内恒常性維持にはトランスポータが重要であり、その破綻が先天性稀少疾患 Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS) 発症の原因となる可能性が示唆される。しかし、その原因遺伝子の同定には至っていない。申請者は、新規リボフラビントランスポータ探索とその分子機能解析を行い、以下の新知見を得た。 既知のリボフラビントランスポータhRFT1 のアミノ酸配列を元に、機能未同定のGPR172Aを抽出した。In vitro発現系を用いて、GPR172Aがリボフラビントランスポータであることを明示し、hRFT3 と命名した。 hRFT3 mRNA発現量は脳で最も高かった。また、hRFT3 によるリボフラビン輸送は、Na ⁺ 、Cl ⁻ 、pH非感受性であり、既知のhRFT1 と酷似した機能特性を有することが示された。さらに、BVVLS患者において発見されたhRFT3 変異体発現細胞におけるリボフラビンの取り込みは、野生型hRFT3 発現細胞と比較して顕著に低下することを見いだした。 以上の研究はリボフラビンの生体恒常性維持機構の解明に貢献し、BVVLS などの先天性稀少疾患の診断・治療に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 1 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日 以降