

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14953

研究課題名（和文）生体内における新規チアミンプル機構と癌細胞における増殖能との関連性

研究課題名（英文）Relationship between novel thiamine pool mechanism and proliferative capacity in cancer cells

研究代表者

保嶋 智也（Tomoya, Yasujima）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・講師

研究者番号：50753555

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者が同定した新規トランスポーターlysosomal multivitamin transporter 1（LMVT1）の詳細な機能解析を行った。その結果、LMVT1は酸性環境にあるリソソーム内から中性域pH環境にある細胞質へのpyridoxineを始めとした種々のビタミンの排出輸送に働いている可能性が考えられた。pyridoxineの細胞内蓄積機構として、リソソーム内への貯留が生じている可能性はあり、そのpyridoxineの細胞質への供給経路としての役割をLMVT1が有している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管から吸収された水溶性ビタミンは、循環血によって全身の細胞に供給されるが、一方で腎臓から尿中へ排泄される。日常的にビタミン摂取が必要なのは、排泄による体内からの消失を補うことが必要なためである。しかしながら、食生活の乱れなどにより、ビタミン摂取が不足しても、すぐには生体内のビタミンは枯渇しない。このことから、ビタミンを生体内にプールする機構が存在すると古くから考えられてきたがその分子実体は不明であった。本研究により、このプール機構にLMVT1が関与していることが示唆された。本研究成果は、ビタミンの効率的な摂取などを提案するのに役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, I performed a detailed functional analysis of the novel lysosomal multivitamin transporter 1 (LMVT1). As a result, it was considered that LMVT1 may be involved in efflux transport of various vitamins including pyridoxine from lysosome in acidic environment to cytoplasm in neutral pH environment. As a mechanism of intracellular accumulation of pyridoxine, it is suggested that the pyridoxine pool system in lysosomes is equipped, and LMVT1 may have a role as a pathway for supplying pyridoxine to the cytoplasm.

研究分野：薬物動態制御学

キーワード：トランスポーター lysosome ビタミン ピリドキシン チアミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミンは、生体内において補酵素としての機能を有し、三大栄養素である脂肪・糖質・タンパク質の代謝を助ける働きをしていることから、細胞の正常な機能維持、さらには生体恒常性の維持などに重要な役割を担っている。それゆえ、ビタミンが欠乏した状態が持続すると、代謝系の機能不全に起因した様々な疾患が惹起される。最も有名な例として、水溶性ビタミンの一つであるチアミンの欠乏症は、心不全と末梢神経障害をきたす脚気を引き起こし、重篤な場合、死に至ることが知られている。1900年代の初頭に脚気の原因がチアミン欠乏であると判明するまでは、年間1万人以上の死者が出る深刻な病気であったが、その後、食物からの積極的な摂取が呼び掛けられると、その数は激減した。このように、ビタミンは基本的に生体内において合成されず、生体内への供給は食物からの摂取に依存している。

食物から摂取されるビタミンは、生体内への吸収や分布過程において、生体膜(脂質二重膜)透過の過程を経ることが必要となる。しかし、ビタミンB群やC群などの水溶性の高いビタミンは、その物理化学的性質上、生体膜を受動的な単純拡散で効率的に透過することは不可能である。それゆえ、水溶性ビタミンの吸収・分布はトランスポーターを介して行われており、現在までに様々なビタミントランスポーターが同定されている。チアミンの例では、小腸からの吸収や体内への分布に働くトランスポーターとして thiamine transporter 1 (THTR-1)/SLC19A2 と THTR-2/SLC19A3 が同定されており (Dutta B et al, *J Biol Chem*, 274, 31925-31929, 1999; Eudy JD et al, *Mol Genet Metab*, 71, 581-590, 2000)、これらのトランスポーターの遺伝的機能不全は、糖尿病や巨赤芽球性貧血、難聴などの様々な疾患を誘発することが報告されている (Oishi K et al, 11, 2951-2960, 2002; Manimaran P et al, 452, 44-49, 2016; Ortigoza-Escobar JD et al, *Brain*, 139, 31-38, 2016)。以上のことから、水溶性ビタミンの体内動態に関するトランスポーターの分子実体の解明は、ビタミン欠乏症の回避や効率的なビタミン摂取のための対応を進めるうえで大きく役立つものと期待される。しかしながら、その全容解明には至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

腸管から吸収されたビタミンは、循環血によって全身の細胞に供給されるが、一方で腎臓から尿中へ排泄される。日常的にビタミン摂取が必要なのは、排泄による体内からの消失を補うことが必要なためである。しかしながら、食生活の乱れ等により、ビタミン摂取が不足しても、すぐには生体内のビタミンは枯渇しない。このことから、ビタミンを生体内にプールする機構が存在すると古くから考えられてきた。水溶性ビタミンである葉酸(ビタミンB₉)については、細胞内で代謝変換を受けながら、リソソーム内に蓄積されることで、葉酸プールが形成されているとの報告がある (Barrueco JR et al, *J Biol Chem*, 266, 11732-11737, 1991; Barrueco JR et al, *J Biol Chem*, 267, 15356-15361, 1992; Barrueco JR et al, *J Biol Chem*, 267, 19986-19991, 1992)。他の水溶性ビタミンでも、同様のプール機構がリソソームに存在する可能性が考えられるが、リソソーム膜で働くトランスポーターの分子実体はもちろんのこと、プール機構の存在すら明らかとなっていないのが現状である。

このような背景から、葉酸以外の水溶性ビタミンについても、リソソーム膜での特異的トランスポーターによる輸送制御に関わるプール機構が存在するとの仮説を立て、検討を行った。その結果、リソソーム膜に局在し、チアミンの輸送活性を有するトランスポーターの遺伝子を見出すことに成功した。このトランスポーターを lysosomal thiamine transporter 1 (LTT1) と仮称する(同定までの詳しい方法は、「2.本研究の着想に至った経緯」に記述)。本研究では、LTT1の詳細な輸送機能解析を行うことで、機能に関する基礎的な情報収集を行うとともに、LTT1のチアミンプール機構への関与を明らかにすることを目的とする。

葉酸の生体内プール機構の存在が報告されてから約 25 年間、ビタミンの生体内プール機構に関する研究は進展していない。独自の試みにより、機能未知のトランスポーター様タンパク質群から LTT1 を同定し、その機能解析からチアミンプル機構を解明するという一連の取り組みは、学術的独自性・創造性の非常に高いものと考えられる。

3. 研究の方法

1. リソソーム局在化シグナル除去による LTT1 の細胞膜局在化 ~ 簡易機能評価法の確立 ~

LTT1 はリソソーム膜に局在するため、現状では、輸送機能評価に際しては、界面活性剤であるジキトニンでの処理により細胞膜透過性を上昇させ、チアミンを細胞質内へ移行させてリソソーム内取り込みを評価している。しかし、ジキトニン処理の条件設定が難しく、再現性に問題がある。そこで、タンパク質をリソソーム膜に局在させる移行シグナルに着目した。膜貫通タンパク質の N 末端もしくは C 末端の細胞内ドメインに D/Exxxφφ (x: 任意のアミノ酸、φ: 疎水性アミノ酸) 配列を有すると、リソソーム膜に局在することが知られている (Guarnieri FG, *J Biol Chem*, 268, 1941-1946, 1993)。LTT1 のアミノ酸配列を解析すると、N 末端側が細胞内にあり、さらにその細胞内領域に ExxxLL 配列を有していることが確認された。そこで、この配列を ExxxAA に変換することでリソソーム膜移行シグナルを除去し、LTT1 を強制的に細胞膜へ移行させる。これにより LTT1 を細胞膜輸送に働かせることで、チアミンの細胞内取り込み評価に基づく、より簡便で安定した機能評価系を構築する。

2. 細胞膜局在化 LTT1 発現細胞におけるチアミン輸送の特性評価

上述のリソソーム膜局在化シグナルを除去した LTT1 を、トランスポーターの機能解析に汎用されるイヌ腎由来 MDCKII 細胞に安定発現させた細胞株を樹立する。この細胞株を用いて、LTT1 によるチアミンの細胞内取り込みを評価・解析する。輸送機能評価にはトリチウムラベル体のチアミンを用い、その放射線量を測定することによって、定量を行う。

LTT1 のチアミン輸送活性を既に見出しているが、詳細な機能の解析には至っていない。そこで、LTT1 のチアミンに対する親和性や、輸送駆動力等の基本的な特性を速度論的手法により解析する。それによって、細胞内のチアミンプル機構における LTT1 の機能的役割を探る。

4. 研究成果

生体におけるビタミンのプール機構が lysosome に存在するとの観点から、申請者らが同定した新規トランスポーター-lysosomal thiamine transporter 1 (LTT1) の詳細な機能解析を行った。まず基質認識性について検討したところ、ビタミン B6 として知られる pyridoxine についても LTT1 により輸送されることを見出した。このことから、LTT1 を lysosomal multivitamin transporter 1 (LMVT1) を改称した。LMVT1 の pyridoxine 輸送能は thiamine より大きかったため、まず LMVT1 による pyridoxine 輸送の詳細な検討を行った。

LMVT1 は lysosome 膜に局在するため、その輸送機能評価に際しては、界面活性剤での処理により細胞膜透過性を高め、輸送基質を細胞質内へ移行させる必要がある (Fig. 1 左図)。しかし、界面活性剤処理の条件設定が難しく、再現性に問題がある。そこで、lysosome 膜局在シグナルである D/Exxxφφ (x: 任意のアミノ酸、φ: 疎水性アミノ酸) モチーフ (Guarnieri FG, *J Biol Chem*, 268, 1941-1946, 1993) を除去し、細胞膜に局在させることで、細胞内取り込み評価に基づく、より簡便で安定した機能評価系を構築した (Fig. 1 右図、2)。また、LMVT1 の駆動力についてプロトノフォア (FCCP) を用いて検討したところ、その輸送駆動力は H⁺ との共輸送であった (Fig. 3)。LMVT1 による pyridoxine 輸送の親和性 (K_m) は 0.511 mM であり、その基質認識について

は、pyridoxine 類縁物質に対する特異性が高く、認識要件はかなり厳格であることが示唆された。

Fig. 1 lysosome局在化シグナル除去による LMVT1の細胞膜局在化

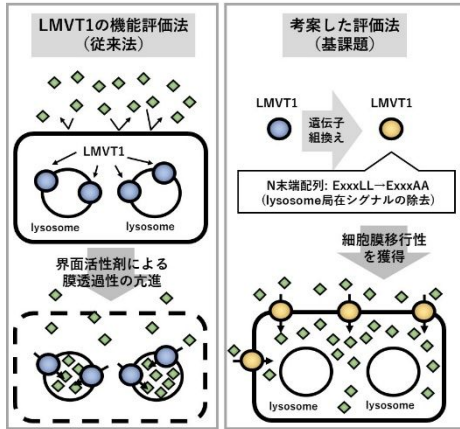


Fig. 2 lysosome局在化シグナル除去による LMVT1のpyridoxin輸送活性

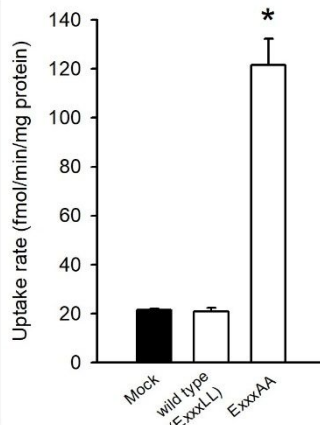
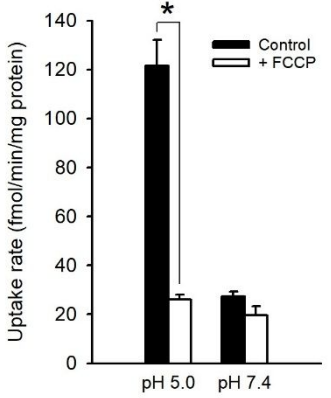


Fig. 3 lysosome局在化シグナル除去による LMVT1のpyridoxin輸送のH⁺要求性



この機能特性から、LMVT1 は酸性環境にあるリソソーム内から中性域 pH 環境にある細胞質への pyridoxine を始めとした種々のビタミンの排出輸送に働いている可能性が考えられる。pyridoxine の細胞内蓄積機構として、リソソーム内への貯留が生じている可能性はあり、その pyridoxine の細胞質への供給経路としての役割を LMVT1 が有している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashiro Takahiro, Yasujima Tomoya, Ohta Kinya, Inoue Katsuhisa, Yuasa Hiroaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of the amino acid residue responsible for the myricetin sensitivity of human proton-coupled folate transporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54367-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 難波莉子、三村佳久、保嶋智也、山城貴弘、湯浅博昭
2. 発表標題 Caco-2細胞における担体介在性nicotinamide取込の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会，33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 難波莉子、保嶋智也、山城貴弘、湯浅博昭
2. 発表標題 Functional characterization of the carrier-mediated nicotinamide transport system in Caco-2 cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会，33回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田嶋柊也、保嶋智也、山城貴弘、太田欣哉、湯浅博昭
2. 発表標題 Functional characteristics of human renal organic cation transporters for histamine transport
3. 学会等名 第8回南京/名古屋/瀋陽薬学学術シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三宅浩平、高橋駿介、石川千尋、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 pyridoxineの小腸上皮取込の解析：ヒトとラットとの種差
3. 学会等名 日本薬学会，139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅浩平、小川有沙、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3の脳神経変性疾患関連遺伝子変異と輸送機能との関係
3. 学会等名 薬学会，140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下紗瑛奈、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3によるpyridoxine及びthiamineの輸送に対するフラボノイド類の阻害作用の解析
3. 学会等名 薬学会，140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難波莉子、保嶋智也、山城貴弘、湯浅博昭
2. 発表標題 Functional characterization of the carrier-mediated nicotinamide transport system in HepG2 cells
3. 学会等名 薬物動態学会，34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅浩平、高橋駿介、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 Species differences in SLC19A3 for pyridoxine transport function
3. 学会等名 薬物動態学会，34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 Functional identification of SLC19A2/3 as pyridoxine transporters
3. 学会等名 薬物動態学会，34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下紗瑛奈、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3に対するフラボノイド類の阻害作用
3. 学会等名 病院薬剤師会東海ブロック/薬学会東海支部合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城貴弘、保嶋智也、太田欣哉、井上勝央、湯浅博昭
2. 発表標題 PCFTの葉酸輸送機能におけるmyricetin感受性に関するアミノ酸残基の同定
3. 学会等名 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム，41回
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----