

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15318

研究課題名（和文）SLC19A3の基質依存的輸送機能の分子機構と病態との関連性の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of substrate-dependent transport function of SLC19A3 and its relevance to pathology

研究代表者

山城 貴弘（Yamashiro, Takahiro）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・助教

研究者番号：20826614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：チアミントランスポーターとして知られるSLC19A3のピリドキシンの輸送機能の動物種差に着目した比較解析により、ヒトSLC19A3のピリドキシンの輸送機能に関与するアミノ酸残基を同定した。さらに、BTBGDやLeigh脳症の原因となるSLC19A3の遺伝子変異が、ピリドキシンの輸送機能を低下させることも明らかとなった。これより、SLC19A3の遺伝子変異に起因する病態に、チアミンだけでなくピリドキシンの関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、チアミントランスポーターとして知られるSLC19A3が、ピリドキシンの輸送機能も有することが明らかとなった。しかしながら、SLC19A3の基質依存的な輸送機能の分子機構や、SLC19A3の遺伝子変異に起因する疾患とピリドキシンの関連性は不明であった。本研究では、SLC19A3のピリドキシンの輸送機能に特異的に関わるアミノ酸残基が明らかとなり、さらに、その遺伝子変異に起因する疾患にピリドキシンの関与している可能性も示唆された。本研究成果は、SLC19A3の基質認識機構の解明や、SLC19A3関連疾患の治療戦略の立案に役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Comparative analyses focused on animal species differences in the pyridoxine transport function of SLC19A3, known as a thiamine transporter, have revealed the amino acid residues involved in the pyridoxine transport function of human SLC19A3. In addition, genetic mutations in SLC19A3, which cause BTBGD and Leigh syndrome, were found to reduce pyridoxine transport function. Therefore, it was suggested that pyridoxine as well as thiamine may be involved in the pathology caused by genetic mutations in SLC19A3.

研究分野：薬物動態学

キーワード：ピリドキシン チアミン トランスポーター SLC19A3 動物種差 BTBGD Leigh脳症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピリドキシンは、ピリドキサル、ピリドキサミンと共にビタミン B6 に属する水溶性ビタミンの一つであり、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。他の水溶性ビタミンと同様に、ビタミン B6 (ピリドキシン) の吸収にはトランスポーターが関与すると古くから考えられてきたが、水溶性ビタミンに分類されるビタミン B 群及びビタミン C の中で、唯一、ビタミン B6 のトランスポーターのみが未同定のままであった。

申請者は、この問題への取り組みに着手し、チアミン (ビタミン B1) の腸管吸収等に働く SLC19A2/3 が、ピリドキシンに対しても輸送活性を有することを見出した (Yamashiro T *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 295, 16998-17008, 2020)。その中で、ピリドキシンとチアミンの間で輸送特性が異なること、ピリドキシンによるチアミン輸送阻害が非競合型であることから、両ビタミンの基質認識部位が異なる可能性が示唆された。また驚くべきことに、汎用実験動物であるラット及びマウスの Slc19a3 については、ピリドキシン輸送機能のみが欠損していることが予備検討から明らかとなった。これも認識部位 (関与するアミノ酸残基) が異なることと関係し、ピリドキシン輸送のみに関わるアミノ酸残基に動物種差がある可能性が考えられる。この動物種差は、ピリドキシン体内動態関連の研究における実験動物の利用の適否に関わる問題であり、明確化が望まれるところである。また、SLC19A3 の動物種間比較により、ピリドキシン輸送を担うアミノ酸残基を特定するなどして、分子機構の解明に役立てられる可能性もある。

また、SLC19A3 の遺伝子変異は重度の脳神経変性疾患である BTBGD (biotin-thiamine-responsive basal ganglia disease) や Leigh 脳症の原因となることが知られている (Kono S *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 360, 1792-1794, 2009; Gerards M *et al.*, *Brain*, 136, 882-890, 2013)。これらの疾患の治療のために行われているチアミン補給において、その補給が効果を示さない症例が知られているが、ピリドキシン輸送能 (供給能力) への遺伝子変異の影響の差異が関わっている可能性が考えられる。しかしながら、SLC19A3 のピリドキシン輸送機能とこれらの病態との因果関係は、現時点では不明である。ピリドキシン輸送とチアミン輸送とで、遺伝子変異の影響が異なる可能性が考えられ、分子機構の解明が望まれるところである。

2. 研究の目的

水溶性ビタミンの中で、唯一、輸送に働くトランスポーターが未同定であったため、ピリドキシンの体内動態の解明は遅れている。そのため、生体レベルでの SLC19A3 のピリドキシン輸送機能の解明が望まれるところであるが、SLC19A3 のピリドキシン輸送機能については、動物種差が見出されている。そこで本研究では、ヒト SLC19A3 (hSLC19A3) とマウス Slc19a3 (mSlc19a3) との比較解析により、ピリドキシン輸送機能に重要なアミノ酸残基の同定を行い、分子基盤の解明を試みた。

SLC19A3 はチアミントランスポーターとして知られているため、その遺伝子変異に起因する様々な疾患は、チアミン欠乏によるものと考えられ、治療には主にチアミン補給が行われている。その一方で、SLC19A3 にピリドキシン輸送機能が見出されたことから、それらの病態にピリドキシンが関与していることも十分に考えられる。そこで本研究では、報告されている SLC19A3 の遺伝子変異について、ピリドキシン輸送機能の有無を明らかにし、SLC19A3 のピリドキシン輸送機能と病態との因果関係を探った。

3. 研究の方法

(1) キメラ体 (ヒト-マウス) 及び変異導入体を用いた解析

hSLC19A3 と mSlc19a3 (アミノ酸相同性: 69%) の部分アミノ酸配列を組み合わせたキメラ体を作製し、一過性発現系 HEK293 細胞での放射ラベル体のピリドキシン及びチアミン輸送の評価を行い、ピリドキシン輸送機能に関わるアミノ酸配列領域を絞り込んだ。続いて、絞り込んだ領域内において、hSLC19A3-mSlc19a3 間で異なるアミノ酸残基を対象とした部位特異的変異導入体を作製し、同様の評価を行うことで、ピリドキシン輸送機能を担うアミノ酸残基の同定を行った。

(2) SLC19A3 遺伝子変異による疾患とピリドキシン輸送機能との関連性の解析

報告されている hSLC19A3 の遺伝子変異体を作製し、一過性発現系 HEK293 細胞での放射ラベル体のピリドキシン及びチアミン輸送の評価を行った。

4. 研究成果

(1) hSLC19A3 のピリドキシン輸送機能に関与する膜貫通領域 (TMD) の同定

hSLC19A3 のピリドキシン輸送機能に関与するアミノ酸残基の同定に取り組むにあたり、はじめに、トランスポーターの基質認識において重要な役割を果たす TMD に焦点を当て、対象となるアミノ酸残基を絞り込むこととした。その方法として、hSLC19A3 の各 TMD (hTMD) を対応する mSlc19a3 の各 TMD (mTMD) で置換した変異体を作製し、ピリドキシン及びチアミンの輸

送機能を評価した。その結果、mTMD 3, 4, 6, 9, 12 を導入した変異体において、ピロドキシンの取込が有意に低下した (Figure 1A)。一方、チアミンの取込は、mTMD10 の導入においてのみ低下した (Figure 1B)。そこで、チアミン取込の変動を補正するために、チアミン取込に対するピロドキシン取込の比を算出し、その取込比をピロドキシン輸送活性の評価の指標として用いた。その比は、mTMD 3, 4, 6 の導入により有意に低下した (Figure 1C)。この結果より、hTMD 3, 4, 6 内のアミノ酸残基が、ピロドキシン輸送機能に関与していることが示唆された。

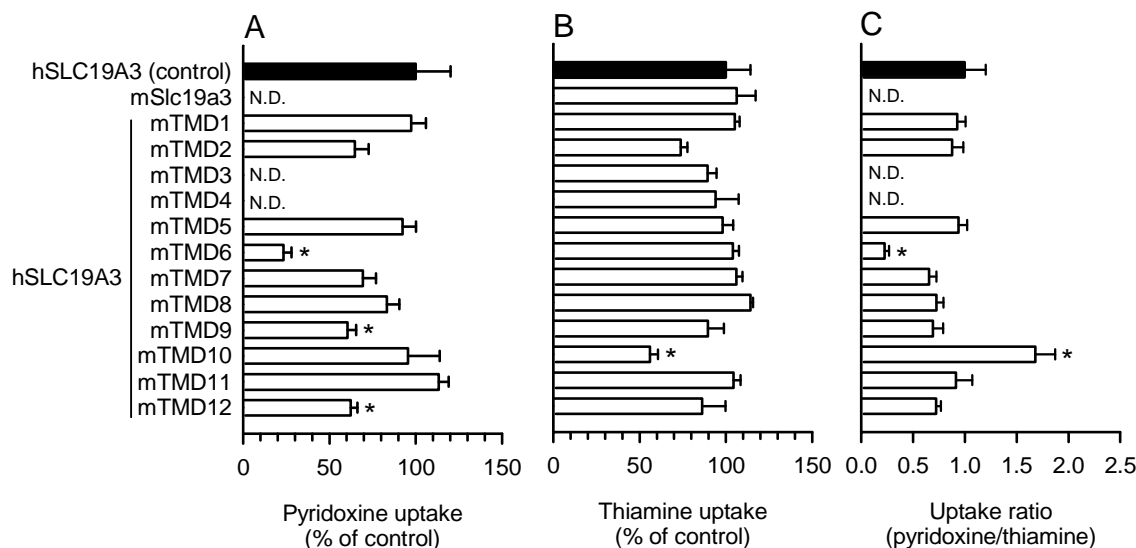


Figure 1. Uptake of Pyridoxine and Thiamine by hSLC19A3 Mutants in Transiently Transfected HEK293 Cells

Mean \pm S.E. ($n = 3$); specific uptake of [3 H]pyridoxine (5 nM) and [3 H]thiamine (5 nM) for 2 min at 37°C and pH 5.5 (pyridoxine) or 7.4 (thiamine); control, 47.5 and 40.8 fmol/min/mg protein, respectively, for pyridoxine and thiamine; ND, not detected; * $p < 0.05$ compared with control.

(2) hSLC19A3 のピロドキシン輸送機能に関与するアミノ酸残基の同定

hSLC19A3 の TMD 3, 4, 6 内で mSlc19a3 と異なる 27 個のアミノ酸残基について、対応する mSlc19a3 のアミノ酸残基に置換した変異体をそれぞれ作製し、ピロドキシン及びチアミンの輸送機能を評価した。その結果、G87V、T93S、W94Y、Y113F、N173F の変異体において、ピロドキシン/チアミンの取込比が有意に低下した。したがって、5 つのアミノ酸残基 (Gly⁸⁷、Thr⁹³、Trp⁹⁴、Tyr¹¹³、Asn¹⁷³) が、ピロドキシン輸送機能に関与する hSLC19A3 のアミノ酸残基であると考えられる。

さらに、この 5 つのアミノ酸残基全てを置換導入した mSlc19a3 変異体を作製し、輸送機能を評価したが、チアミンの輸送活性はみられた一方で、ピロドキシンの輸送活性は認められなかった。この結果より、ピロドキシン輸送機能に補助的に関与しているアミノ酸残基が他にも存在することが示唆された。

(3) hSLC19A3 のピロドキシン輸送機能に必要とされる TMD の同定

前項の検討より、補助的に関与するアミノ酸残基が他にも存在することが示唆されたことから、ピロドキシン輸送機能に必要とされるアミノ酸残基を明らかにするために、はじめに TMD 単位で検討した。その方法として、ピロドキシン輸送機能への関与が示唆された hTMD 3, 4, 6 を mSlc19a3 に置換導入した変異体を作製し、ピロドキシン及びチアミンの輸送機能を評価した。その結果、hTMD 3, 6 を同時に置換導入した mSlc19a3 変異体において、ピロドキシン輸送活性が認められた (Figure 2C)。また、hTMD 3, 4, 6 を同時に置換導入した mSlc19a3 変異体においてもピロドキシン輸送活性が認められたが、両者に差はみられなかった。このことから、hTMD4 はピロドキシン輸送機能の付与には関与しておらず、hTMD 3, 6 がピロドキシン輸送機能に必要とされる TMD であることが示唆された。なお、チアミンの輸送活性はいずれの変異体においても維持されていた (Figure 2B)。

(4) hSLC19A3 のピロドキシン輸送機能に必要とされるアミノ酸残基の同定

mSlc19a3 に hTMD 3, 6 を置換導入した変異体において、TMD 3, 6 内で異なる 18 個のアミノ酸残基に着目し、対応する mSlc19a3 のアミノ酸残基に置換した変異体をそれぞれ作製し、ピロドキシン及びチアミンの輸送機能を評価した。その結果、Q87H、G88V、I92A、T94S、W95Y、S169P、N174F の変異体において、ピロドキシン輸送活性が有意に低下した (Figure 3C)。一方で、チアミンの輸送活性はいずれの変異体においても維持されていた (Figure 3B)。したがって、

(2)での結果とあわせて Gln⁸⁶、Gly⁸⁷、Ile⁹¹、Thr⁹³、Trp⁹⁴、Ser¹⁶⁸、Asn¹⁷³ の7つのアミノ酸残基が、hSLC19A3のピリドキシン輸送機能に關する hSLC19A3 特異的アミノ酸残基であることが示唆された。

さらに、これらの7つのアミノ酸残基のピリドキシン輸送機能における役割を確認するために、7つのアミノ酸残基全てを置換導入した mSlc19a3 変異体を作製し、ピリドキシン及びチアミンの輸送機能を評価した。その結果、この変異体は hSLC19A3 と同等のピリドキシン輸送活性を有し、チアミン輸送活性も維持されていた。この結果より、それらの7つのアミノ酸残基が hSLC19A3 のピリドキシン輸送機能に必要とされるアミノ酸残基であることが確認された。

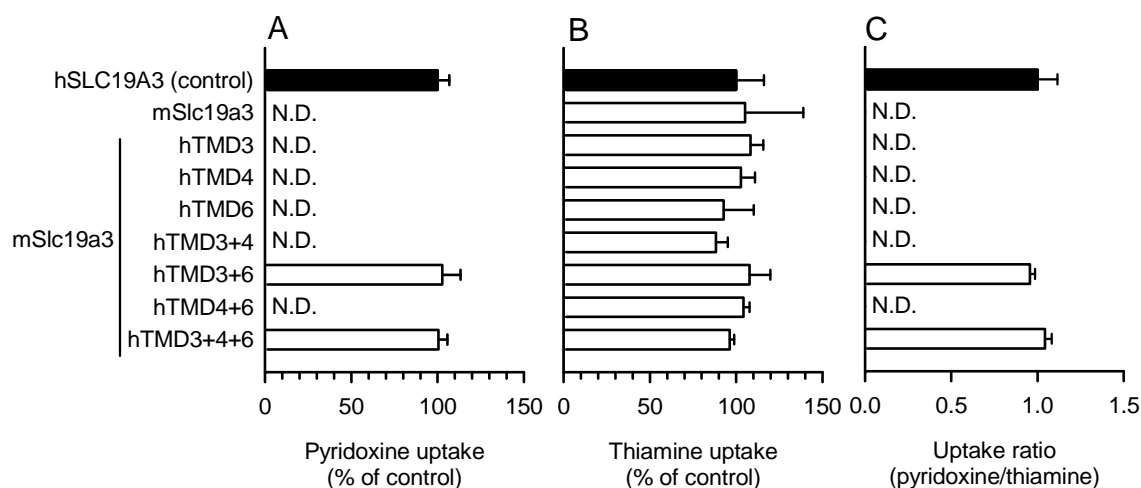


Figure 2. Uptake of Pyridoxine and Thiamine by mSlc19a3 Mutants in Transiently Transfected HEK293 Cells

Mean \pm S.E. ($n = 3$); specific uptake of [³H]pyridoxine (5 nM) and [³H]thiamine (5 nM) for 2 min at 37°C and pH 5.5 (pyridoxine) or 7.4 (thiamine); control, 58.5 and 50.2 fmol/min/mg protein, respectively, for pyridoxine and thiamine; ND, not detected.

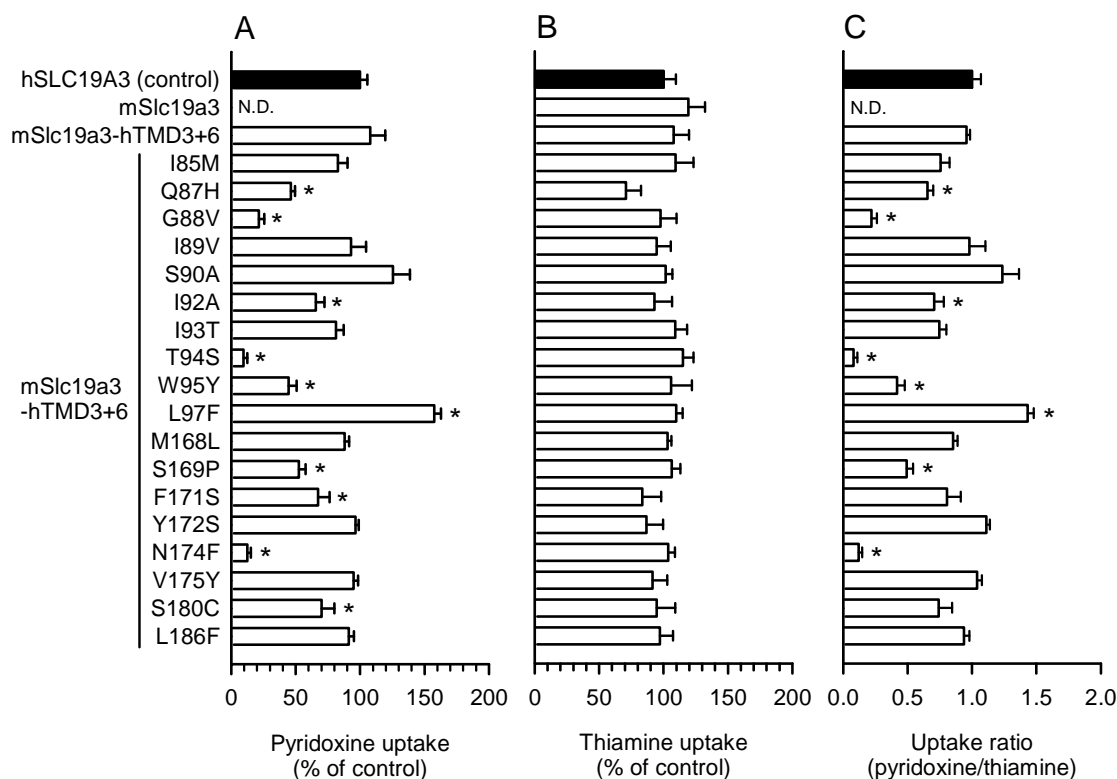


Figure 3. Uptake of Pyridoxine and Thiamine by Various Mutants Derived from mSlc19a3-hTMD3+6 in Transiently Transfected HEK293 Cells

Mean \pm S.E. ($n = 3$); specific uptake of [³H]pyridoxine (5 nM) and [³H]thiamine (5 nM) for 2 min at 37°C and pH 5.5 (pyridoxine) or 7.4 (thiamine); control, 46.3 and 62.6 fmol/min/mg protein, respectively, for pyridoxine and thiamine; ND, not detected; * $p < 0.05$ compared with control.

(5) SLC19A3 遺伝子変異による疾患とピリドキシン輸送機能との関連性の解析

BTBGD 及び Leigh 脳症の原因となることが報告されている 16 種の SLC19A3 変異体 (S7*、G23V、K44E、I51M、N53D、W94R、Y113H、Y169*、N173D、S176Y、S181P、E320Q、L385R、N399I、T422A、S444R) を作製し、ピリドキシン及びチアミンの輸送機能を評価した。その結果、13 種の変異体 (S7*、G23V、K44E、N53D、W94R、Y113H、Y169*、N173D、S176Y、S181P、E320Q、L385R、S444R) において、ピリドキシン輸送機能の有意な低下が認められた。また、この 13 種の変異体においては、チアミン輸送機能の低下も認められた。これらのことから、BTBGD 及び Leigh 脳症にチアミンだけでなくピリドキシンも関与している可能性が示唆され、チアミンと共にピリドキシンも補給することが有効な治療法になる可能性が考えられる。

本研究成果は、SLC19A3 の基質認識機構の全容解明や、SLC19A3 関連研究におけるモデル動物利用に関わる基盤情報として役立つものと考えられる。さらに、BTBGD 及び Leigh 脳症に対する新たな薬物療法としてのピリドキシン補給の適用に繋がることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akino Shogo, Yasujima Tomoya, Yamashiro Takahiro, Yuasa Hiroaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Disrupted in renal carcinoma 2 (DIRC2/SLC49A4) is an H ⁺ -driven lysosomal pyridoxine exporter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202201629	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 -

1. 著者名 Miyake Kohei, Yasujima Tomoya, Takahashi Syunsuke, Yamashiro Takahiro, Yuasa Hiroaki	4. 巻 298
2. 論文標題 Identification of the amino acid residues involved in the species-dependent differences in the pyridoxine transport function of SLC19A3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102161	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 -

1. 著者名 Yamashiro Takahiro, Yasujima Tomoya, Yuasa Hiroaki	4. 巻 44
2. 論文標題 Animal species differences in the pyridoxine transport function of SLC19A3: absence of Slc19a3-mediated pyridoxine uptake in the rat small intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2022.100456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井快人、山本道弘、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 新規蛍光性SLC19A2/3プローブ基質としてのamilorideの輸送特性
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shogo Akino, Takahiro Yamashiro, Tomoya Yasujima, Hiroaki Yuasa
2. 発表標題 Functional characteristics and role of DIRC2/SLC49A4 as a novel lysosomal pyridoxine exporter
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本道弘、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A2/3のamiloride輸送機能
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3のpyridoxine輸送機能の動物種差：ラット小腸におけるSlc19a3のpyridoxine輸送機能欠損の検証
3. 学会等名 日本薬剤学会 第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅浩平、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3のpyridoxine輸送機能の動物種差に関わるヒト特異的アミノ酸残基
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Yamashiro, Tomoya Yasujima, Hiroaki Yuasa
2. 発表標題 Comparative assessment of the uptakes of pyridoxine and thiamine in the rat small intestine: absence of Slc19a3-dependent function of carrier-mediated pyridoxine uptake
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第37回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅浩平、高橋駿介、保嶋智也、山城貴弘、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3のpyridoxine輸送機能の動物種差に関わるアミノ酸残基
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山城貴弘, 保嶋智也, Hamid M. Said, 湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A2/3のpyridoxine/thiamine輸送機構：輸送特性の基質間比較解析
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California, Irvine			