

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月30日現在

機関番号：14301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011年度  
 課題番号：22790154  
 研究課題名（和文） 臨床症例に基づく新規リボフラビントランスポータRFTの病態生理的役割の解明  
 研究課題名（英文） Pathophysiological role of riboflavin transporter RFT based on the clinical data.  
 研究代表者  
 米澤 淳（YONEZAWA ATSUSHI）  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：90452341

## 研究成果の概要（和文）：

リボフラビントランスポータ RFT が同定された。本研究では、RFT1 およびそのホモログの生理的役割の解明を目指すことを目的に検討を行った。その結果、脳などに発現する新規トランスポータ RFT3 を同定し、各トランスポータの機能特性を明らかにした。さらに、リボフラビン感受性の新生児 MADD 患者において RFT1 遺伝子の一部欠損を有することを報告した。また、RFT が HGNC データベースに登録された。以上より、RFT 生理的役割について新しい知見が得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

Riboflavin transporters had been identified. The purpose of this study is to clarify the physiological role of RFT1 and its homologues. RFT3, which is expressed in the brain, was identified. The functional characteristics of RFTs were elucidated. Heterozygous deletion in the RFT1 gene was found. In addition, RFT genes were registered in the HGNC database. In conclusion, we obtained novel findings in the physiological role of RFTs.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	940,000	4,030,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬学、薬物動態学、ビタミン B2、先天性疾患、膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

2008年に、研究代表者らは哺乳類で初のリボフラビン輸送体となるリボフラビントランスポータ RFT1 の分子実体の同定に成功した。RFT1 は胎盤に最も多く発現し、ついで小腸への発現が認められることから、胎児へのリボフラビン輸送や小腸からの吸収への関

与が示唆される。翌年に、RFT1 のホモログとして小腸に高発現する RFT2 が同定された。さらに、我々は RFT3 を同定し、現在論文発表準備中である。以上より、ヒトにおいて少なくとも3種のリボフラビントランスポータが発現していることが判明し、リボフラビンの体内恒常性維持機構の解明とリボフラビ

ン欠損症の診断法および治療法の開発へと繋がることを期待される。

MADD は脂肪酸β酸化異常によりエネルギー生成不全を引き起こす疾患である。低血糖、アシドーシス、高脂肪酸血漿を呈し、新生児期に発症する重症型では死亡するケースが多い。原因遺伝子として、FADH から電子伝達系へ電子を受け渡す ETF や ETFDH が同定されている。しかし、ETF や ETFDH に変異の認められない MADD 症例について報告しており、リポフラビントランスポータの機能異常が関与する可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

リポフラビントランスポータ RFT1 およびそのホモログの生理的役割の解明を目指すことを目的として、RFT1 ホモログの探索、RFT の分子機能解析、MADD 患者における RFT 遺伝子多型解析を行う。

## 3. 研究の方法

常法に従って RFT3 の機能解析を実施し、3 つめの RFT ファミリーであることを確認する。同定した RFT1-3 遺伝子の過剰発現細胞を用いて、*in vitro* 分子機能解析を重点的に行う。また、内因的 RFT 発現細胞を用いて細胞生理学的役割について機能的な面から検討を加える。さらに、リポフラビン反応性 MADD 患者より発見した遺伝子変異情報に基づいて変異体を作成し、*in vitro* 実験系を用いて機能解析を行う。また、RFT1 機能欠損と病態発症の関連を評価する。

## 4. 研究成果

リポフラビントランスポータ RFT1、RFT2 のホモログ分子として RFT3 を新たに同定した。RFT3 は脳に高発現し、その他のほとんどの臓器にも発現が認められた。さらに、機能解析の結果、RFT1 と RFT3 は類似した機能特性を示し、RFT2 のみが pH 感受性を有することが明らかとなった。これらトランスポータはリポフラビンおよびその類似体に高い特異性を示し、これまでに報告されているリポフラビン輸送体の機能特性と一致する。また、ゲノム上のホモログ検索では、他の RFT ホモログの存在は認められない。したがって、RFT1、RFT2、RFT3 がヒトにおけるリポフラビン恒常性維持に重要なトランスポータである可能性が示唆された。

これまでに同定した RFT の生理的役割について検討を行った。ヒト腸由来 T84 細胞におけるリポフラビン輸送の機能解析の結果、hRFT2 が頂側膜に局在すること、頂側膜側の輸送機能特性は hRFT2 に酷似すること、hRFT2

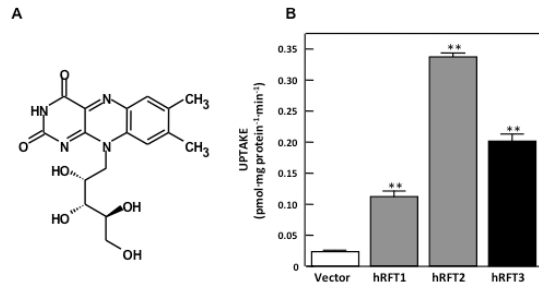


図 1 A: リポフラビン、B: RFT を介したリポフラビン取り込み

に対する siRNA によって輸送が抑制されることが明らかになった。以上より、hRFT2 が頂側膜におけるリポフラビン輸送に主要な役割を担っていることが示唆された。また、RFT の基質認識特性の解析から、リポフラビンの活性体 FMN や FAD の輸送能は小さく、活性前駆体であるリポフラビンを輸送することが示された。基質認識に一致し、細胞外のリポフラビン濃度を下げたとき、細胞内リポフラビン濃度は低下するものの FMN、FAD 濃度に変化は認められない。*In vivo* の解析においても同様の結果が得られた。したがって、RFT の基質認識特性によって活性体の細胞内濃度の恒常性が強く維持されることが明らかとなった。

以前報告されている ETF や ETFDH 遺伝子非依存型リポフラビン反応性 MADD 患者（新生児）およびその母親について、RFT1、RFT2、RFT3 の遺伝子多型の探索を行った。いくつかのアミノ酸変異を伴う SNP が発見されたが、リポフラビン輸送能に影響は認められなかった。しかし、RFT1 遺伝子のエクソン 2 及びエクソン 3 の欠損がヘテロで認められた。この変異とリポフラビン感受性の新生児 MADD との関連が示唆され、症例報告を行った。

さらに、RFT1、RFT2、RFT3 に関する研究成果を海外において積極的に発表し、HUGO Gene Nomenclature Committee にも情報提供を行ってきた。その結果、これら遺伝子が SLC52A1/RFVT1 (RFT1)、SLC52A2/RFVT2 (RFT3)、SLC52A3/RFVT3 (RFT2) として、HGNC データベース等に登録された。

表 1 RFVT1 (RFT1)、RFVT2 (RFT3)、RFVT3 (RFT2) の命名

Name	Accession No.
RFVT1(RFT1)/ <i>SLC52A1</i>	NM_017986
RFVT2(RFT3)/ <i>SLC52A2</i>	NM_024531
RFVT3(RFT2)/ <i>SLC52A3</i>	NM_033409

以上、新規トランスポータ RFT3 を同定し、各トランスポータの機能特性を明らかにした。さらに、リボフラビン感受性の新生児 MADD 患者において RFT1 遺伝子の一部欠損を有することを報告した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Yonezawa A, Inui K. Importance of the Multidrug and Toxin Extrusion MATE/SLC47A Family to Pharmacokinetics, Pharmacodynamics/Toxicodynamics and Pharmacogenomics. *Br J Pharmacol*. 164(7): 1817-1825, 2011 査読有 Doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01394.x
- (2) Ho G, Yonezawa A, Masuda S, Inui K, Sim KG, Carpenter K, Olsen RK, Mitchell JJ, Rhead WJ, Peters G, Christodoulou J. Maternal riboflavin deficiency, resulting in transient neonatal-onset glutaric aciduria Type 2, is caused by a microdeletion in the riboflavin transporter gene GPR172B. *Hum Mutat*. 32(1): E1976-1984, 2011 査読有 Doi: 10.1002/humu.21399
- (3) Yao Y, Yonezawa A, Yoshimatsu H, Masuda S, Katsura T, Inui K. Identification and comparative functional characterization of a new human riboflavin transporter hRFT3 expressed in the brain. *J Nutr*. 40(7):1220-1226, 2010 査読有 Doi: 10.3945/jn.110.122911

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 米澤 淳、増田智先、桂 敏也；第 7 回若手が拓く新しい薬剤学 H<sup>+</sup>/有機カチオンアンチポータ MATE1 の機能低下による副作用発現の増強、日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 31 日 京都
- (2) Yoshiaki Yao, Atsushi Yonezawa, Hiroki Yoshimatsu, and Toshiya Katsura ; INVOLVEMENT OF HUMAN RIBOFLAVIN TRANSPORTERS (hRFTs) IN THE REGULATION OF INTRACELLULAR CONCENTRATION OF RIBOFLAVIN AND ITS ACTIVE FORMS、26th JSSX Annual Meeting, Nov 16, 2011 Hiroshima, Japan

- (3) Atsushi Yonezawa, Yoshiaki Yao, Hiroki Yoshimatsu, Satoshi Masuda, Toshiya Katsura and Ken-ichi Inui; Identification and functional characterization of novel riboflavin transporters RFTs. *Biomedical Transporters* 2011, Aug 10, 2011 Grindelwald, Switzerland

- (4) 米澤 淳、八尾 祉顕、吉松 宏樹、John Christodoulou、乾 賢一、桂 敏也；ヒトリボフラビントランスポータ hRFT の機能特性および病態生理学的役割の解明、第 6 回トランスポータ研究会年会 2011 年 6 月 11 日 仙台

- (5) 吉松 宏樹、米澤 淳、八尾 祉顕、乾 賢一、桂 敏也；腸由来 T84 細胞におけるヒトリボフラビントランスポータ hRFT の役割、日本薬剤学会第 26 年会 2011 年 5 月 29 日 東京

- (6) Atsushi Yonezawa, and Ken-ichi Inui; Renal Organic Cation Transporter, OCT & MATE: From Drug Discovery to Clinical Applications. International symposium "An Interated Approach to the Physiology of Organic Cation Transporters", Oct 15, 2010 Gottingen, Deutschland

- (7) Hiroki Yoshimatsu, Atsushi Yonezawa, Yoshiaki Yao, Satoshi Masuda, Toshiya Katsura and Ken-ichi Inui; INVOLVEMENT OF NOVEL HUMAN RIBOFLAVIN TRANSPORTERS hRFTs IN RIBOFLAVIN UPTAKE BY INTESTINAL T84 CELLS. 25th JSSX Annual Meeting, Oct 7, 2010 Omiya, Japan

- (8) Atsushi Yonezawa, Yoshiaki Yao, Hiroki Yoshimatsu, Satoshi Masuda, Toshiya Katsura and Ken-ichi Inui; MOLECULAR CLONING AND COMPARATIVE FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HUMAN RIBOFLAVIN TRANSPORTERS RFTs. 9th International Meeting of International Society for the Study of Xenobiotics, Sep 5, 2010 Istanbul, Turkey

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~yakuzai/practice.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 淳 (YONEZAWA ATSUSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90452341

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし