

論文の内容の要旨

論文題目：尿酸・アスコルビン酸の新規輸送体の同定とその生理的役割の解析

氏 名 宮田 大資

【序論】

酸化ストレスの除去に重要な役割を果たす抗酸化物質は、研究者のみならず、一般からも大きな関心を集めている。生体内で水溶性抗酸化物質として機能する尿酸およびアスコルビン酸（ビタミン C）は、その体内動態変動が神経変性疾患や生活習慣病に代表される様々な疾患と関連することが報告されている。そのため、両物質の体内動態制御は臨床的にも重要であり、その背景にある関連分子機構の解明が求められている。生理的条件下でアニオンとして存在する尿酸およびアスコルビン酸が細胞膜を通過するためには、各物質の輸送を担う膜輸送体の関与が必須であると考えられる。これまでのところ、生理的に重要な尿酸輸送体として ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2)、glucose transporter 9 (GLUT9) /solute carrier (SLC) 2A9、urate transporter 1 (URAT1) /SLC22A12 が、アスコルビン酸輸送体として sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) /SLC23A1、SVCT2/SLC23A2 が、それぞれ知られている。ところが、SLC ファミリーに属する輸送体は駆動力の勾配に応じて双方向的に基質を輸送しうることが知られるものの、各遺伝子の発現分布や細胞内局在を踏まえると、上述した既知の輸送体のみでは尿酸およびアスコルビン酸の体内動態を十分に説明することはできない。このことから、それぞれの物質を基質とする生理的に重要な未知の輸送体が存在する可能性が示唆された。その分子実体の同定と機能解析を目的とした本研究では、*in vitro* 輸送実験により尿酸およびアスコルビン酸の新規輸送体を同定し、新たに見出された新規輸送体の遺伝子欠損 (KO) マウスを作出・解析することで *in vivo* における重要性を検討した。

【方法・結果】

1. 新規尿酸輸送体の探索・同定・機能解析

まず、手掛かりとなる情報が多い尿酸輸送体に着目し、その新規輸送体を探索した。候補遺伝子を選定するため、先行文献情報を精査し、①大腸菌における尿酸輸送体のヒトにおけるホモログ遺伝子（3 遺伝子）、②ゲノムワイド関連解析により血清尿酸値との関連が報告された遺伝子（6 遺伝子）、③カイコにおける尿酸動態異常原因遺伝子のヒトにおけるホモログ遺伝子（4 遺伝子）、の合計 13 候補遺伝子に着目した。各候補遺伝子の EGFP 融合タンパク質を哺乳類培養細胞に一過的に発現させ、形質膜局在が認められたものについて、¹⁴C 標識尿酸の取り込み活性を指標として尿酸輸送能を評価した。一連の *in vitro* 実験の結果、候補遺伝子のひとつである SLC-X の過剰発現群において、対照群と比べて有意な尿酸取り込み活性の上昇が認められた。SLC-X による尿酸輸送活性は pH 依存的であり、培養液中の pH を低下させることで輸送活性が増大した。さらに、pH 5.4 の条件下において、SLC-X の尿酸輸送における基質濃度依存性を検討したところ、正常なヒトの血漿中尿酸濃度（119 μ M-416 μ M）を含む実験上到達可能な尿酸濃度範囲においては、SLC-X による尿酸輸送の飽和は確認されなかった。

2. 新規尿酸輸送体 SLC-X によるアスコルビン酸輸送能の検討

小分子の水溶性抗酸化物質である尿酸とアスコルビン酸には、生理的条件下でアニオンとなるという共通点がある。そこで、尿酸輸送体にはアスコルビン酸も基質とするものがあるとの仮説のもと、本研究で新たに尿酸輸送活性を見出した SLC-X のアスコルビン酸輸送能を調べた。¹⁴C 標識アスコルビン酸の取り込み活性を *in vitro* において測定した結果、SLC-X の過剰発現群において対照群と比べて有意なアスコルビン酸輸送活性の上昇が認められた。SLC-X によるアスコルビン酸輸送活性は、尿酸の輸送の場合と同様に pH 依存的であり、培養液中の pH を低下させることで輸送活性が増大した。さらに、pH 5.4 の条件下において、SLC-X のアスコルビン酸輸送における基質濃度依存性を検討したところ、その輸送には飽和性が認められた。一方、尿酸輸送体として生理的に重要であることが既に知られている ABCG2、URAT1、および GLUT9 についてはアスコルビン酸輸送活性が認められなかった。尿酸およびアスコルビン酸は、生理的に比較的高濃度で存在する水溶性抗酸化物質であるという類似性を有する一方、それらの体

内動態制御における共通因子の存在は知られていなかった。今回見出した SLC-X は尿酸とアスコルビン酸の双方を基質とするという点においても新規の輸送体であり、水溶性抗酸化物質の制御において重要な役割を果たしていることが期待された。

3. 新規尿酸・アスコルビン酸輸送体 Slc-X による尿酸・アスコルビン酸の体内動態制御

SLC-X の生理的重要性を検討するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Slc-X* 遺伝子の KO マウスを作出し、異なる変異を持つ 2 系統 (#1, #2) を得た。また、尿酸動態がよりヒトに近い動物モデルを得るために、ヒトには存在しない尿酸代謝酵素であるウリカーゼ (*Uox*) の KO マウスとの掛け合わせも進め、両遺伝子を欠損する (*Slc-X_Uox* DKO) マウスも作出した。なお、マウス *Slc-X* が尿酸・アスコルビン酸を輸送することは *in vitro* 輸送実験で確認した。尿酸およびアスコルビン酸の体内動態制御における *Slc-X* の役割を検討するため、*Slc-X_Uox* DKO マウスにおける血漿中、尿中、主要臓器中の尿酸レベルおよび *Slc-X* KO マウスにおける血漿中、尿中、主要臓器中のアスコルビン酸レベルを半導体素子検出器に接続した液体クロマトグラフィー (UPLC-PDA 法) を用いて測定した。その結果、特に興味深い結果として、*Slc-X* KO マウスの脳内アスコルビン酸レベルの顕著な低下が認められた。このとき、*Slc-X* KO マウスの血漿中アスコルビン酸濃度には有意な差は認められず、*Slc-X* KO マウスにおける内在性アスコルビン酸レベルの脳対血漿比は、野生型マウスの半分以下にまで低下していた。以上の結果は、*Slc-X* が脳と血液間のアスコルビン酸輸送を制御する因子であることを示唆していると考えられた。

4. Slc-X による脳内アスコルビン酸レベル制御機構の解析

Slc-X 遺伝子の欠損による影響が最も大きく認められた脳は、他臓器と比較してアスコルビン酸レベルが高い臓器であり、その制御機構の解明は生理的に重要であると考えられた。そこで、脳内アスコルビン酸レベルに着目した解析を進めた。血液から脳内への物質移行は血液脳関門と血液脳脊髄液関門によって厳密に制御されている。アスコルビン酸の脳内移行については、その実態が完全に明らかではないものの、後者が主要な経路であることが古くから指摘されてきた。そこで、血液脳脊髄液関門の実体である脈絡叢における *Slc-X* の役割を検討した。まず、側脳室から単離した脈絡叢中における *Slc-X* の発現をリアルタイム定量 PCR により確認した。次に、脈絡叢におけるアスコルビン酸レベルに与える影響を調べるために、マウス脈絡叢内のアスコルビン酸レベルを測定した。その結果、*Slc-X* KO マウスにおける脈絡叢内アスコルビン

酸レベルが、野生型マウスと比べて5倍以上高いことが見出された。さらに、血液から脈絡叢上皮細胞に取り込まれたアスコルビン酸が、脳脊髄液中に分泌された後に脳実質に移行すると考えられていることを踏まえ、マウス脳脊髄液中のアスコルビン酸濃度を測定した。その結果、脈絡叢の場合とは逆に、*Slc-X* KO マウスにおける脳脊髄液中のアスコルビン酸濃度は、野生型マウスと比べて、5分の1以下に低下していた。*Slc-X* の機能欠損に伴う脈絡叢内アスコルビン酸レベルの増加、ならびに脳脊髄液中のアスコルビン酸濃度の低下は、脈絡叢内から脳脊髄液中へのアスコルビン酸輸送が損なわれた結果を反映するものであると考えられた。なお、この物質輸送は脈絡叢上皮細胞の頂端側膜を介する現象であるが、極性を有する哺乳類培養細胞株 (MDCK-II 細胞) において、EGFP タグ付き *Slc-X* が頂端側膜に局在していることを確認している。*Slc-X* KO マウスにおける脳内アスコルビン酸レベルが野生型マウスの半分程度であったことを踏まえると、*Slc-X* は、脈絡叢上皮細胞の頂端側膜でアスコルビン酸の脳脊髄液中への分泌を担うことにより、血液から脳へのアスコルビン酸の移行を制御する、生理的に重要な新規輸送体であると考えられた。

【まとめ・考察】

本研究において、私は、尿酸およびアスコルビン酸の新規輸送体として *SLC-X* を同定した。*Slc-X* はアスコルビン酸の脳内移行に大きく寄与しており、脈絡叢上皮細胞から脳脊髄液中へのアスコルビン酸分泌を担う生理的に重要な輸送体であると考えられる。脈絡叢を介した脳内へのアスコルビン酸輸送経路については、脈絡叢上皮細胞の血管側膜においてアスコルビン酸の取り込みを担う *Svct2* が知られるのみであり、その逆側の頂端側膜において脳脊髄液中へのアスコルビン酸分泌を担う輸送実体は長らく不明であった。その分子実体が *Slc-X* であることを示唆した本研究は、脳内のアスコルビン酸制御に関わる分子機構の理解に大きく貢献する。脳は酸化ストレスを受けやすい臓器であり、抗酸化物質であるアスコルビン酸を豊富に含むことを踏まえると、*SLC-X* を介したアスコルビン酸の血液からの供給が脳の機能や恒常性の維持に重要であることが考えられる。本研究が礎となり、*SLC-X* の病態生理学的重要性が明らかとなることが期待される。