

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 宮田 大資

抗酸化物質は、活性酸素種の除去に寄与することで、酸化ストレスに対する生体防御において重要な役割を果たす。尿酸およびアスコルビン酸は、ヒト血漿中に高濃度に存在する小分子の水溶性抗酸化物質である。両化合物の体内動態変動は、神経変性疾患や生活習慣病をはじめとして様々な疾患との関連が知られることから、これら物質の体内動態制御は臨床上也重要な課題である。尿酸およびアスコルビン酸は、生理的条件下ではアニオンとして存在するため、脂質二重層により構成される細胞膜の透過過程においては膜輸送体の関与が必須となる。従って、尿酸およびアスコルビン酸の体内動態制御の理解には、各物質を基質とする輸送体の理解が重要となる。しかしながら、これまでに生理的重要性が知られる尿酸輸送体およびアスコルビン酸輸送体の情報は限定的であり、既知の輸送体のみでは両化合物の体内動態制御を説明することはできない。従って、未知の輸送体が両物質の体内動態制御に関与することが想定されるものの、その分子実体は不明であった。そこで、申請者は、まず手掛かりの多い尿酸輸送体に着目し、従来とられてきたアプローチに加え、新たな視点からの情報を手掛かりとすることで、*in vitro* 実験により尿酸の新規輸送体を探索している。その後、尿酸とアスコルビン酸の類似性に着目することで、アスコルビン酸の新規輸送体に関する解析へと進めている。さらに、*in vitro* 実験により新たに見出された輸送体に関して、遺伝子欠損 (KO) マウスを作出・解析することにより生理的重要性を検討している。

第1章では、*in vitro* 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、その輸送特性を解析している。まず、尿酸の新規輸送体に関して、従来利用されてきたゲノムワイド関連解析の情報に加え、ヒト以外の他生物種における尿酸動態関連分子との配列類似性に着目した独自の視点からのアプローチにより、ヒトにおける尿酸の新規輸送体候補遺伝子を選定している。これら候補遺伝子に関して、哺乳類培養細胞における形質膜局在の確認を経て、¹⁴C 標識尿酸の取り込み活性を評価している。その結果、候補遺伝子の一つであった SLC-X が尿酸輸送活性を有することを見出し、SLC-X の尿酸輸送活性は pH により変動することを示している。続いて、尿酸およびアスコルビン酸は、いずれも生理的条件下ではアニオンとして存在する小分子の抗酸化物質であるという類似性から、尿酸輸送体の中にはアスコルビン酸も基質とする輸送体が存在するとの仮説の下、尿酸輸送体のアスコルビン酸輸送能を評価している。その結果、SLC-X が尿酸のみならずアスコルビン酸も基質とし、SLC-X のアスコルビン酸輸送活性は、尿酸輸送活性と同様、pH に応じて変動することを示している。

第 2 章では、SLC-X の生理的役割を明らかにするため、clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) /CRISPR-associated protein 9 (Cas9) システムを用いて、異なる変異を有する 2 系統の *Slc-XKO* マウスを作出し、尿酸およびアスコルビン酸の体内動態制御の観点から *Slc-X* の重要性を検討している。この際、マウスはヒトにおいて欠損している尿酸代謝酵素 (*Uox*) を有していることから、尿酸の体内動態解析においては *Slc-X* と *Uox* のダブル KO (*Slc-X_UoxDKO*) マウスを用いている。*Slc-X* の欠損が尿酸およびアスコルビン酸の体内動態に与える影響を明らかにするため、まず、*Slc-X_UoxDKO* マウスの内在性尿酸レベルおよび *Slc-XKO* マウスの内在性アスコルビン酸レベルを測定している。その結果、特に興味深い知見として、*Slc-XKO* マウスにおいて、血漿中アスコルビン酸濃度は野生型マウスと同程度である一方、脳中アスコルビン酸レベルは野生型マウスの半分程度であることを見出している。脳はアスコルビン酸を最も豊富に含む臓器の一つであることを踏まえ、次に、血中から脳中へのアスコルビン酸移行過程における *Slc-X* の役割を検討している。従来、この過程においては脈絡叢を介した経路の重要性が指摘されてきたことを念頭に、脈絡叢および脳脊髄液中の内在性アスコルビン酸レベルを測定したところ、*Slc-XKO* マウスにおいて脈絡叢中にアスコルビン酸が蓄積し、脳脊髄液中アスコルビン酸濃度が野生型マウスと比較して低値であることを明らかにしている。この知見と合わせて、*in vitro* 実験により *Slc-X* が極性を有する哺乳類培養細胞において主に頂端側膜に局在すること、*Slc-X* が細胞内からのアスコルビン酸の排出活性を有することを示すことで、*Slc-X* が脈絡叢上皮細胞の頂端側膜におけるアスコルビン酸の分泌を担うことを示唆している。

以上、申請者の研究は、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、尿酸およびアスコルビン酸の体内動態制御の理解に貢献する重要な知見を見出している。さらに、*Slc-XKO* マウスの解析により、*Slc-X* が脳中および脳脊髄液中アスコルビン酸レベルの制御因子であり、脈絡叢上皮細胞からのアスコルビン酸分泌に寄与することを示唆している。これまでに、脳へのアスコルビン酸移行においては脈絡叢を介した経路の重要性が指摘され、脈絡叢上皮細胞血管側基底膜におけるアスコルビン酸取り込みを担う輸送体は知られていた一方、逆側の頂端側膜においてアスコルビン酸の分泌を担う輸送体は長らく不明であった。その分子実体として *Slc-X* を見出した本研究は、脳中アスコルビン酸レベル制御機構の一端の解明につながり、非常に価値が大きいと言える。脳は他臓器と比較しても豊富にアスコルビン酸を含む一方、脳におけるアスコルビン酸の役割には不明な点が多い。本研究により見出された SLC-X の生理的役割を足掛かりとして、脳の生理機能におけるアスコルビン酸の重要性が解明されることが期待される。さらに、脳は酸化ストレスを受けやすい臓器であり、神経変性疾患においてもアスコルビン酸の重要性が指摘されつつあることも踏まえると、本研究は SLC-X の病態生理学的な重要性の解析につながりうる、臨床的にも意義深い研究であると言える。従って、申請者の業績は博士(薬科学)の授与に相応しいものと判断した。