



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1964号
学位記番号	第395号
氏名	秋野 翔伍
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	リソソーム膜局在性排出トランスポーターとしてのDIRC2/SLC49A4の機能的同定
論文審査担当者	主査： 山村 壽男 副査： 湯浅 博昭, 伊藤 佐生智, 岩尾 岳洋

【序論】

リソソームは酸性条件下で機能する多数の加水分解酵素を内包する膜結合型の酸性小器官である。エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、オートファゴサイトーシス等の経路により、様々な生体分子がリソソーム内へと輸送され、酵素の働きにより加水分解される。これにより生成したアミノ酸、脂質、糖、ビタミン、核酸等の生理活性物質は、細胞質へと排出され、再利用される。このようなリソソームの機能は細胞の恒常性の維持等に寄与していると考えられているが、リソソーム膜は他の生体膜と同様に脂質膜であることにより、水溶性物質に対する高い障壁性を示す。そのため、水溶性の高い生理活性物質のリソソーム膜透過を効率化する仕組みとして、トランスポーターの関与が示唆されている。実際に、リソソーム内に貯蔵された一部のアミノ酸 (Lys, Arg) やビタミン B9 (folate) の膜透過におけるトランスポーターの関与が報告されている。また、その他のリソソーム膜トランスポーターに関する研究も広く行われている。しかし、それらの分子機構に関する情報は乏しく、多くのリソソーム膜局在性トランスポーター様分子の生理的役割は未解明のままである。

一方、当研究室では、トランスポーター分子の同定をはじめとして、体内動態に関わる分子機構の解明が遅れているビタミン B6 (pyridoxine 類) について、その解明への取り組みを進めてきているが、その中で最近、細胞膜で働く thiamine トランスポーターとして知られる thiamine transporter 1 (THTR1/SLC19A2) 及び THTR2/SLC19A3 が pyridoxine 輸送機能を有することを見出したところである。そのような一連の取り組みのひとつとして、本研究では、folate について知られているリソソーム内貯留機構と同様の機構が pyridoxine についても存在する可能性を考え、その機構に関わるリソソーム膜トランスポーターの探索に取り組んだ。その結果、disrupted in renal carcinoma 2 (DIRC2/SLC49A4) が pyridoxine 輸送機能を有することを見出し、その機能解析及びリソソーム膜トランスポーターとしての役割の検証を進めた (Fig. 1, 2)。さらに、pyridoxine がカチオン性物質である点に着目し、リソソーム内蓄積性を示すことが知られるカチオン性両親媒性薬物群 (cationic amphiphilic drugs/CADs) の輸送にも関与する可能性を考えて検討を行った結果、pyrilamine (第一世代抗ヒスタミン薬) に対する輸送活性を見出した。なお、DIRC2 については、その遺伝子破壊が遺伝性腎細胞癌発症の要因となっている可能性が知られているが、その機能は未解明であった。

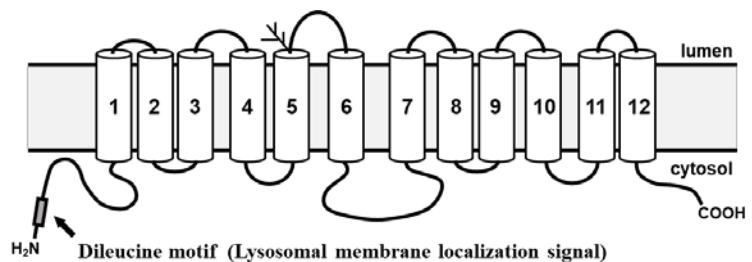
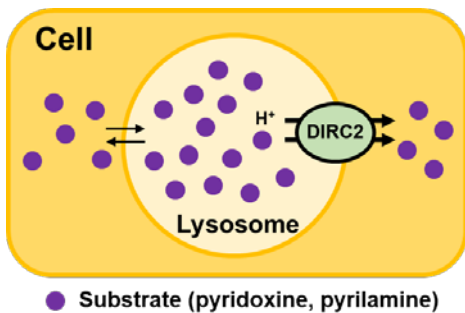


Fig. 1. Function of DIRC2 at the Lysosomal Membrane

Fig. 2. Topology of DIRC2

## 【本論】

### 1. DIRC2 の pyridoxine 輸送機能

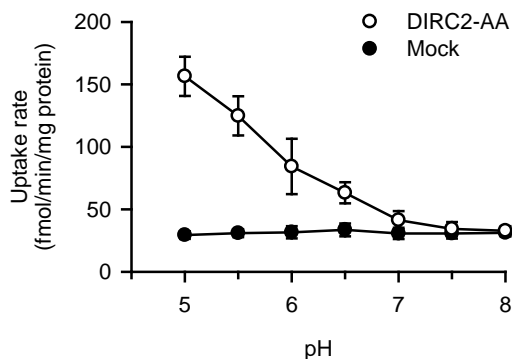
#### 1) DIRC2-AA を用いた機能解析

バイオインフォマティク解析によりリソソーム膜局在性トランスポーター様タンパク質を探索した。これにより、選別されたもののひとつが DIRC2 であるが、細胞内部のリソソーム膜で働くトランスポーターの機能解析を行うことは容易ではない。そこで、DIRC2 のリソソーム膜局在化に関与する dileucine motif (E<sup>10</sup>RQPLL<sup>15</sup>) の 2 つの Leu 残基を部位特異的変異法を用いて Ala 残基に置換することによって細胞膜局在化した改変体 (DIRC2-AA) を用い、遺伝子導入発現細胞での pyridoxine の細胞内取込評価により、機能の探索及び解析を行うことにした。

まず、pyridoxine 取込活性が低いという特徴を持つ COS-7 細胞を遺伝子導入用試験細胞として用い、一過性導入した DIRC2 と DIRC2-AA についての比較解析を行った。この検討では、それぞれのタンパク質発現及び細胞内局在についても確認するため、FLAG 標識体 (FLAG-DIRC2 及び FLAG-DIRC2-AA) 用い、pH 5 の酸性条件下において pyridoxine (10 nM) の細胞内取込 (1 分間) を評価した。その結果、FLAG-DIRC2-AA 導入細胞では、pyridoxine 取込は mock 細胞での取込の 5 倍程度へと大きく上昇し、FLAG-DIRC2-AA 特異的な取込がみられたが、FLAG-DIRC2 導入細胞では、mock 細胞と比べての取込の変化はなく、FLAG-DIRC2 特異的な取込はみられなかった。また、western blot 解析によるタンパク質発現量の評価、免疫染色法による細胞内局在性の評価の結果では、細胞全体での FLAG-DIRC2 と FLAG-DIRC2-AA の発現量は同等である一方で、FLAG-DIRC2-AA はほぼ細胞膜のみへの局在性を示すのに対し、FLAG-DIRC2 はほぼ細胞内部のみへの局在性を示すことが確認された。これらの結果は、DIRC2 が pyridoxine 輸送機能を持つことを示唆するものである。リソソーム膜に局在する FLAG-DIRC2 は細胞内取込に働くことができなかったが、リソソーム膜移行シグナルの除去により細胞膜局在性となった改変体 (FLAG-DIRC2-AA) は pyridoxine の細胞内取込に働くことができたものと考えられる。

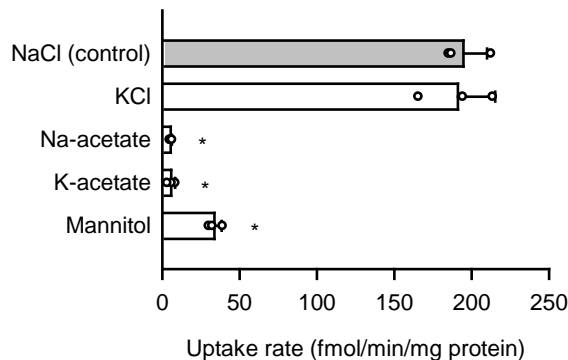
引き続き、DIRC2-AA の COS-7 細胞一過性発現系を用いて pyridoxine 輸送機能の解析を行った。pH 5 の酸性条件下において、DIRC2-AA 発現細胞での pyridoxine (10 nM) の取込は mock 細胞での取込を大きく上回り、また 1 分まで時間に比例して増大したことに基づき、以降の機能解析の実験では、取込時間を 1 分と設定し、初期の取込段階での DIRC2-AA による pyridoxine 輸送を評価することとした。

まず、細胞外 pH の影響について検討したところ、DIRC2-AA 発現細胞での pyridoxine 取込は pH 5 – pH 7 の範囲で pH 上昇に伴って低下し、pH 7 以上では mock 細胞での取込と同等の低レベルとなった (Fig. 3)。



**Fig. 3. Effect of Extracellular pH on Pyridoxine Uptake in COS-7 Cells Transiently Expressing DIRC2-AA**

The uptake of [<sup>3</sup>H]pyridoxine (10 nM) was evaluated for 1 min at 37°C in COS-7 cells transiently expressing DIRC2-AA and mock cells. Data are presented as the means ± S.D. (n = 3).



**Fig. 4. Effect of Extracellular Ions on Pyridoxine Uptake Transiently Expressed in COS-7 cells by DIRC2-AA**

The specific uptake of [<sup>3</sup>H]pyridoxine (10 nM) was evaluated for 1 min at pH 5.0 and 37°C in COS-7 cells transiently expressing DIRC2-AA. Data are presented as the means ± S.D. (n = 3). \*, *p* < 0.05 compared with control.

一方、mock 細胞での pyridoxine 取込は pH に依らず低レベルで推移したことから、DIRC2-AA 導入細胞での pH 依存的な pyridoxine 取込は、DIRC2-AA の酸性指向の機能特性を示唆するものと考えられた。さらに、H<sup>+</sup>イオノフォア (CCCP、FCCP) を用いて細胞内外の H<sup>+</sup>濃度勾配を消失させることにより、pyridoxine 取込は大きく低下したことから、DIRC2 は H<sup>+</sup>濃度勾配を駆動力とする H<sup>+</sup>共輸送機構により機能することが示唆された。

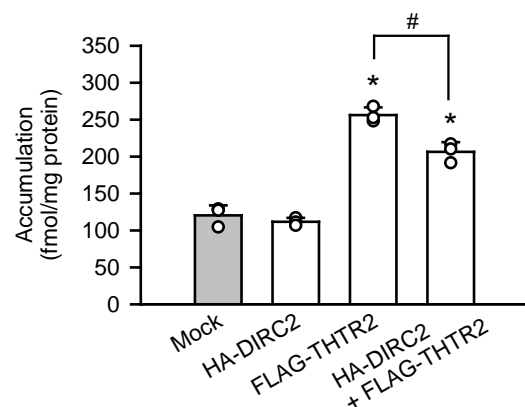
次に、細胞外の各種イオン類の影響を検討したところ、DIRC2-AA による pyridoxine 取込は、Na<sup>+</sup>を K<sup>+</sup>で置換除去しても変化しなかったが、Cl<sup>-</sup>を acetate で置換除去することにより大きく低下した。また、NaCl を mannitol で置換除去した場合にも、同様の大きな取込低下が見られた (Fig. 4)。これらの結果は、DIRC2-AA による pyridoxine 輸送は、Na<sup>+</sup>非依存性であるが、Cl<sup>-</sup>依存性であることを示唆するものである。リソソーム内が pH 5 前後の酸性かつ、細胞質よりも高い Cl<sup>-</sup>濃度の環境にあることを考慮すると、DIRC2-AA でみられた pyridoxine 輸送特性 (酸性指向性、Cl<sup>-</sup>依存性) は、リソソーム内から細胞質への排出輸送に適している。このことから、DIRC2 はリソソーム膜において pyridoxine の排出トランスポーターとして働いている可能性が考えられる。

速度論的特性の面では、DIRC2-AA による pyridoxine 輸送は Michaelis-Menten 型の担体輸送モデルに適合し、Michaelis 定数 ( $K_m$ ) は 521  $\mu$ M、最大輸送速度 ( $V_{max}$ ) は 6.16 nmol/min/mg protein と得られた。この  $K_m$  は体内で想定される pyridoxine 濃度水準 (血漿中で 60 nM 等) を大きく上回っていることから、比較的広い範囲の濃度変動に対しても、飽和性を示すことなく効率的に機能できるものと考えられる。

DIRC2-AA による pyridoxine 輸送に対する pyridoxine 関連物質 (500  $\mu$ M) の影響の検討では、4-deoxypyridoxine が弱い阻害効果を示したのみであった。先に SLC19A2/3 による pyridoxine 輸送に対する阻害活性が見出されている pyridoxal 及び pyridoxamine (共にビタミン B6 に属する物質) による阻害は見られず、関連物質に対する親和性の面で、DIRC2 は細胞膜で働く SLC19A2/3 と異なる特徴を持つことが示唆された。なお、これらとは別に、塩基性薬物である diphenhydramine 及び imipramine が有意な阻害効果を示し、DIRC2 の基質として認識される可能性が示唆された。

## 2) リソソーム膜における DIRC2 の機能の評価

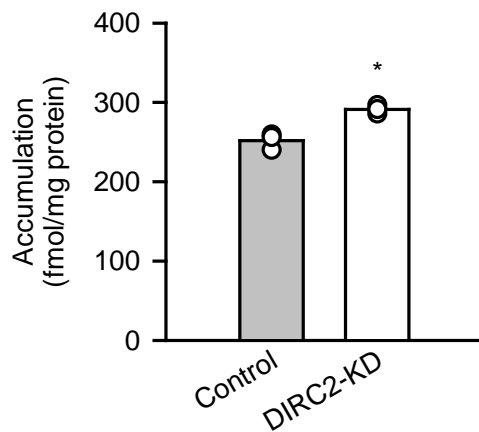
DIRC2 がリソソーム膜での pyridoxine 排出輸送機能を有している可能性が示唆されたことから、リソソーム膜における DIRC2 の機能の評価を試みた。ここでは、十分な DIRC2 の発現がみられ、リソソームで想定される pyridoxine 貯留機構への関与の可能性があり得ると考えられる HEK293 細胞を用いた。機能評価においては、発現・局在の評価のために標識付加した DIRC2 (HA-DIRC2) 及び THTR2 (FLAG-THTR2) を単独導入または共導入した一過性発現系を用い、pH 5 の酸性条件下において pyridoxine (10 nM) の存在下で 30 分間のインキュベーションを行い、その細胞内蓄積量を評価した。HA-DIRC2 の単独導入では、mock 細胞の場合と比較して pyridoxine の細胞内蓄積量の変化はなく、DIRC2 の影響を検出す



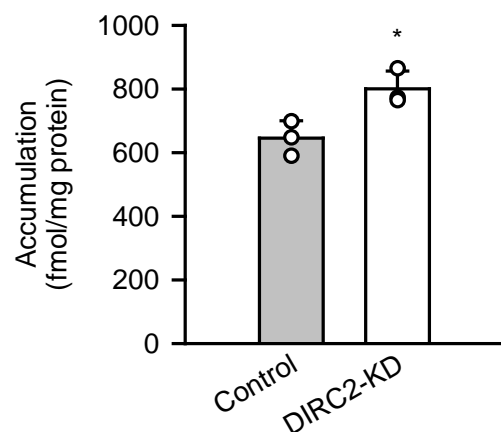
**Fig. 5. Effect of the Expression of HA-DIRC2 on FLAG-THTR2-Induced Pyridoxine Accumulation in Transiently Transfected HEK293 Cells**

The accumulation of [<sup>3</sup>H]pyridoxine (10 nM) was evaluated after 30 min of incubation at pH 5.0 and 37°C in HEK293 cells, in which the plasmid for HA-DIRC2 (500 ng) was transfected with that for FLAG-THTR2 (500 ng). For expression of HA-DIRC2 or FLAG-THTR2 alone, cells were transfected with the plasmid for the designated transporter (500 ng) and empty vector (500 ng). Data are presented as the means  $\pm$  S.D. (n = 3). \*,  $p < 0.05$  compared with mock cells. #,  $p < 0.05$  compared with FLAG-THTR2 transfected cells.

(A) whole cell



(B) lysosomal fraction



**Fig. 6. Effect of the Knockdown of Endogenous DIRC2 on Pyridoxine Accumulation in Caco-2 Cells**

Caco-2 cells were cultured for 5 days after transfection with the siRNA for DIRC2 (DIRC2-KD cells). The accumulation of [<sup>3</sup>H]pyridoxine (10 nM) in the whole cell (A) and isolated lysosomal fraction (B) was evaluated after 30 min of incubation at pH 5.0 and 37°C. Data are presented as the means ± S.D. (n = 3). \*, *p* < 0.05 compared with control.

ることはできなかった。細胞膜での pyridoxine 取込輸送活性が低いため、細胞内蓄積量が低く、リソソーム内蓄積量の変化の影響が検出し難くなっている可能性を考え、酸性条件下において細胞膜での pyridoxine 取込輸送に働く FLAG-THTR2 を導入し、HA-DIRC2 の共導入の影響の評価を試みた。その結果、FLAG-THTR2 の導入によって上昇した細胞内蓄積量は、HA-DIRC2 の共導入によって有意に低下した (Fig. 5)。それぞれについて、共導入によるタンパク質の発現量及び特異的細胞内局在性の変化はなかったことから、この細胞内蓄積量の低下は、リソソーム膜での HA-DIRC2 の pyridoxine 排出輸送活性を示唆するものである。その活性により、リソソーム内蓄積量が低下したことによると考えられる。

DIRC2 の生理的役割をさらに探るため、DIRC2 の発現が高く、THTR1 及び THTR2 が細胞膜での pyridoxine 取込輸送に働いていることが知られている Caco-2 細胞を用い、RNA 干渉による DIRC2 の発現抑制の影響を検討した。pH 5 の酸性条件下において pyridoxine (10 nM) の存在下で 30 分間のインキュベーションを行い、その細胞内蓄積量を評価した結果、control 細胞に比べ、DIRC2 発現抑制細胞 (DIRC2-KD 細胞) において、細胞内蓄積量が有意に上昇した (Fig. 6A)。また、細胞から単離したリソソーム内の pyridoxine 蓄積量も同様に有意に上昇していた (Fig. 6B)。このリソソーム内蓄積量の上昇は、DIRC2 の発現抑制が pyridoxine のリソソームからの排出低下につながったことを示唆し、リソソーム膜での DIRC2 の pyridoxine 排出トランスポーターとしての機能を裏付けるものである。pyridoxine の細胞内レベルの制御に関わるリソソーム内貯留機構が存在し、その貯留機構における排出経路としての役割を DIRC2 が担っている可能性が考えられる。

## 2. DIRC2 の pyrilamine 輸送機能

### 1) DIRC2-AA を用いた機能解析

DIRC2 が CADs の輸送にも働く可能性を考え、DIRC2-AA を用いて基質探索を行った結果、リソソーム内に蓄積性を示す CADs のひとつである pyrilamine に対する輸送活性が見出された。この探索では、COS-7 細胞一過性発現系を用いた評価において (pH 5.5 の酸性条件下)、DIRC2-AA 発現細胞での pyrilamine (10 nM) 取込が mock 細胞での取込の 4 倍程度の高い値を示したことにより、DIRC2-AA の pyrilamine 取込活性が認められた。また、pyrilamine 取込は 10 秒まで時間に比例して増大したことに基づき、以降の機能解析の実験では、取込時間を 10 秒と設定し、初期の取込段階での DIRC2-AA による pyrilamine 輸送を評価

することとした。

まず、細胞外 pH の影響について検討したところ、DIRC2-AA による pyrilamine (10 nM) の取込は pH 5 - pH 6 の範囲において最大となり、pH 6 以上では、pH の上昇に伴って低下した。また、H<sup>+</sup>イオノフォア (CCCP、FCCP) 及び H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>アンチポーター (nigericin) を用いて細胞内外の H<sup>+</sup>濃度勾配を消失させることにより、pyrilamine 取込は大きく低下した。このような DIRC2-AA が示した酸性指向性かつ H<sup>+</sup>濃度勾配依存性の輸送特性から、DIRC2 による pyrilamine 輸送は、pyridoxine 輸送と同様に H<sup>+</sup>共輸送機構によるものであることが示唆された。

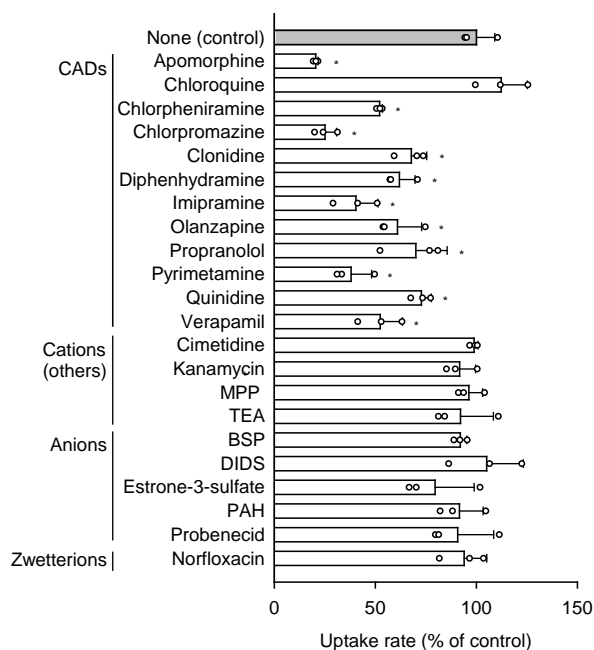
細胞外の各種イオン類の関与については、DIRC2-AA による pyrilamine 輸送は、Na<sup>+</sup>非依存性である点で pyridoxine 輸送と同様であった。しかし、Cl<sup>-</sup>の除去の影響は明確ではなく、Cl<sup>-</sup>の gluconate での置換除去が DIRC2-AA 介在取込の 40%程度の低下を生じさせた一方、NaCl の mannitol での置換除去は、その取込に影響を及ぼさなかった。したがって、DIRC2 による pyrilamine 輸送は明確な Cl<sup>-</sup>依存性を示さない点で、pyridoxine 輸送の特性とは異なっているとみられる。しかし、酸性指向性である点から、DIRC2 は pyrilamine に対してもリソソーム膜での排出トランスポーターとして働いているものと考えられる。

速度論的特性の面では、DIRC2-AA による pyrilamine 輸送は Michaelis-Menten 型の担体輸送モデルに適合し、Michaelis 定数 ( $K_m$ ) は 114  $\mu$ M、最大輸送速度 ( $V_{max}$ ) は 3.13 nmol/min/mg protein と得られた。この  $K_m$  は pyridoxine 輸送の  $K_m$  (521  $\mu$ M) よりもやや小さく、pyrilamine が pyridoxine と同等以上の親和性を持つ良好な DIRC2 基質であることが示唆された。

また、DIRC2-AA による pyrilamine 取込に対する様々な薬物等 (100  $\mu$ M) の影響を検討することにより、阻害剤 (競合基質を含む) の探索を試みたところ、apomorphine を始めとする 11 種類の CADs が有意な阻害活性を示し、DIRC2 の基質である可能性が示唆された (Fig. 7)。一方、CADs の中でも、chloroquine は、阻害活性を示さず、DIRC2 の基質でない可能性が示唆された。chloroquine はリソソーム内に高度に蓄積し、リソソーム機能障害を引き起こし得ることが報告されている。DIRC2 による排出を受けないことが、そのような chloroquine の特性の要因となっている可能性が考えられる。その他のカチオン性薬物及びアニオン性薬物等については、阻害活性を示すものではなく、これらの薬物等についても、DIRC2 の基質でない可能性が示唆された。

## 2) リソソーム膜における DIRC2 の機能の評価

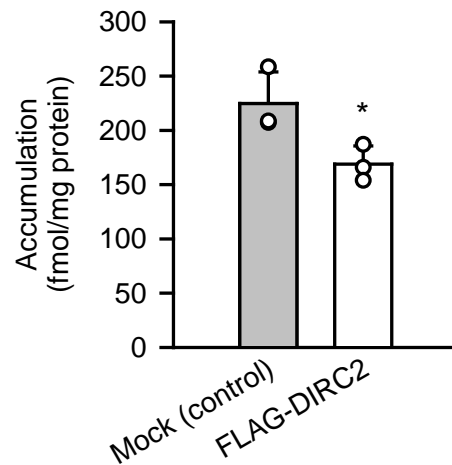
DIRC2 がリソソーム膜での pyrilamine 排出輸送機能も有している可能性が示唆されたことから、引き続きリソソーム膜における DIRC2 の機能の評価を試みた。この検討では、発現・局在の評価のために FLAG 標識付加した DIRC2 (FLAG-DIRC2) を一過性発現させた COS-7 細胞をモデル細胞として用いた。界面活性剤であるジギトニンでの処理 (50  $\mu$ M, 10 min, 37°C) により細胞膜透過性を亢進させた後、pH 7.4 の条件下において pyrilamine (10 nM) の存在下で 30 分間のインキ



**Fig. 7. Effect of Various Compounds on Pylamine Uptake by DIRC2-AA Transiently Expressed in COS-7 Cells**

The specific uptake of [<sup>3</sup>H]pyrilamine (10 nM) was evaluated for 10 s at pH 5.5 and 37°C in the presence of a test compound (100  $\mu$ M), or in its absence, in COS-7 cells transiently expressing DIRC2-AA. Data are presented as the means  $\pm$  S.D. (n = 3). \*,  $p < 0.05$  compared with control.

ユベーションを行い、その細胞内蓄積量を評価した。その結果、FLAG-DIRC2 導入細胞では、mock 細胞と比較して有意な細胞内蓄積量の低下がみられた (Fig. 8)。細胞膜透過性を亢進させた細胞での実験であるため、ここでみられた細胞内蓄積量変化は細胞内小器官内 (主にリソソーム内) の蓄積量変化を表しており、FLAG-DIRC2 がリソソーム膜での排出輸送に働いたことによると考えられる。なお、ジギトニン処理による DIRC2 のタンパク質発現量及び細胞内部での特異的局在性への影響はみられなかった。この結果は、リソソーム膜での pyrilamine 排出トランスポーターとしての DIRC2 の機能を強く示唆するものである。pyrilamine をはじめとする CADs のリソソーム内貯留において、DIRC2 が排出経路として関与し、貯留レベルの制御に関わっている可能性が考えられる。



**Fig. 8. Effect of Transiently Introduced FLAG-DIRC2 on Pylamine Accumulation in COS-7 cells**  
The uptake of [<sup>3</sup>H]pyrilamine (10 nM) was evaluated for 30 min at pH 7.4 and 37°C in COS-7 cells transiently expressing FLAG-DIRC2 and mock cells. Data are presented as the means ± S.D. (n = 3). \*,  $p < 0.05$  compared with control.

#### 【結論】

本研究では、リソソーム膜局在性排出トランスポーターとしての DIRC2 の機能を見出し、さらに一連の機能解析を行うことにより以下の知見を得た。

1. DIRC2 は H<sup>+</sup>依存性かつ Cl<sup>-</sup>依存性の pyridoxine 排出トランスポーターとしての機能を有していることが明らかとなった。この機能は、pyridoxine の細胞内レベル制御に関与するリソソーム内貯留機構に関わっている可能性が考えられる。
2. DIRC2 は H<sup>+</sup>依存性の pyrilamine 排出トランスポーターとしての機能も有していることが明らかとなった。この機能は pyrilamine のリソソーム内貯留において排出経路として関与し、貯留レベルの制御に関わっている可能性が考えられる。また、他の多くの CADs の排出輸送にも働き、それらのリソソーム内貯留にも関わっている可能性が考えられる。

今後、DIRC2 の機能と pyridoxine の細胞内局所等での動態及び関連の生理反応等との関係の解明が進み、pyridoxine 欠乏症及び関連の病態の理解、治療法・治療薬の開発等に役立つことを期待したい。また、CADs の細胞内局所等での動態特性及び薬効・毒性との関係の解明が進み、関連の薬物療法の最適化に役立つことも期待したい。

#### 【基礎となる報文】

1. [Shogo Akino, Tomoya Yasujima, Takahiro Yamashiro, Hiroaki Yuasa: Disrupted in renal carcinoma 2 \(DIRC2/SLC49A4\) is a H<sup>+</sup>-driven lysosomal pyridoxine exporter. \*Life Sci. Alliance\*, \*\*6\*\*, e202201629, 2023.](#)
2. [Shogo Akino, Tomoya Yasujima, Takahiro Yamashiro, Hiroaki Yuasa: H<sup>+</sup>-driven SLC49A4-mediated pyrilamine transport involved in lysosomal trapping. \*Drug Metab. Dispos.\*, in preparation.](#)