



Nagoya City University Academic Repository

| | |
|---------|---|
| 学位の種類 | 博士（薬科学） |
| 報告番号 | 甲第1645号 |
| 学位記番号 | 第328号 |
| 氏名 | 山城 貴弘 |
| 授与年月日 | 平成30年3月26日 |
| 学位論文の題名 | ヒト PCFT の葉酸輸送機能に対する myricetin の持続性阻害作用の分子機構 |
| 論文審査担当者 | 主査： 林 秀敏 副査： 湯浅 博昭，頭金 正博，岩尾 岳洋 |

| | |
|---------|--|
| 氏名 | やましろ たかひろ 山城 貴弘 |
| 学位の種類 | 博士（薬科学） |
| 学位の番号 | 薬博第 328 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 30 年 3 月 26 日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 学位論文題目 | ヒト PCFT の葉酸輸送機能に対する myricetin の持続性阻害作用の分子機構 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 林 秀敏 (副査) 教授 湯浅 博昭・教授 頭金 正博・准教授 岩尾 岳洋 |

論文内容の要旨

【序論】

葉酸 (folate, vitamin B9) は水溶性ビタミンの一種であり、核酸合成やアミノ酸代謝において 1 炭素転移反応の補酵素として働き、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。また、folate は哺乳類の生体内では合成されないため、その供給は食物中の folate に依存している。他の水溶性ビタミンと同様に、その効率的な摂取のため、腸管吸収にはトランスポーターが関与すると考えられてきたが、近年、H⁺ 依存的に folate を輸送するトランスポーターである proton-coupled folate transporter (PCFT/SLC46A1) が同定され、PCFT が腸管での folate 吸収を担うことやその機能特性などが明らかとなってきた。

一方で、アルコール飲料の連用摂取が葉酸欠乏につながる危険因子として知られており、巨赤芽球性貧血や神経障害などの疾患を惹起するとされている。また、近年、フラボノイドや植物由来成分がトランスポーターや代謝酵素に対して影響を及ぼす例が、関心を集めてきている。アルコール飲料中に含まれているフラボノイド類の葉酸吸収不良への関与も疑われるところであり、また、folate と同様に PCFT を介して吸収される葉酸拮抗薬の腸管吸収へのフラボノイド類の影響も予想される。しかし、情報は依然として乏しく、その詳細なメカニズムも明らかとなっていない。葉酸欠乏への対処や葉酸拮抗薬の使用における最適化調節のために、その分子機構の解明が望まれるところである。

このような状況のもと、その種の問題を引き起こし得るフラボノイドの一つとみられる myricetin について、ヒト PCFT (hPCFT) に対する即時性及び持続性の阻害作用が見出された。当研究室での最近の研究において、folate を含む試験液中に添加された myricetin (100 μM) が作用することによる即時性の阻害効果は、非競合阻害の様式を示し、hPCFT による folate の輸送を約 50% 低下させた。一方、細胞を myricetin で前処理することにより惹起され、その除去後も持続する持続性の阻害効果については、100 μM の myricetin での 60 min 間の前処理により、hPCFT による folate 輸送の最大輸送速度 (V_{max}) が約 90% 低下した。また、この時、ミカエリス定数 (K_m) の低下も生じていることが見出された。さらに、この阻害作用は hPCFT の発現量及び細胞膜局在の低下によるものではないこと、myricetin 類縁の一部のフラボノイド類も同様の作用を示すこと等が明らかとなってきたが、その阻害機構等に関して、依然として不明な点が多いままである。

hPCFT に対する myricetin 類の持続性阻害効果は、作用が強く、また持続性である点から、folate 類の腸管吸収への影響が特に大きいとみられる。そこで、本研究では、その特性の把握を進展させ、また阻害機構の解明を図るため、阻害フラ

ポノイドとして myricetin を用い、阻害の惹起及び持続の過程の評価を含めた輸送機構論的解析に取り組んだ。さらに、その中で、分子的及び機能的に hPCFT と極めて類似しているラット PCFT (rPCFT) が myricetin による阻害を受けないことが見出されたことを受け、両者の差異を利用した比較解析により、hPCFT の myricetin 感受性に関わるアミノ酸残基の同定に取り組んだ。

【本論】

1. ヒト PCFT に対する myricetin の持続性阻害作用の解析

ヒト PCFT 安定発現 MDCKII 細胞において、PCFT による folate 取り込みに対する myricetin (50 μM) の持続性阻害作用は、5 μM の folate 濃度において、前処理開始後 10 min の時点から認められた。阻害は前処理時間依存的に増強され、60 min の時点で、ほぼ最大レベルの阻害率 (約 80%) に達した (Fig. 1)。前処理の終了後には、この阻害作用は、徐々に減弱しつつも 30 min まで持続したが、90 min 後には、輸送活性はほぼ完全に回復した。このことから、可逆的な機構により阻害を生じている可能性が示唆された。さらに、この阻害作用は、myricetin 濃度依存적であり、アルコール飲料 (ワイン) 中に含まれる濃度の範囲 (10-100 μM 程度) で生じ得ることも示唆された。

速度論的解析では、myricetin の濃度上昇に伴い最大輸送速度 (V_{max}) が低下し、阻害作用の要因となっていることが明らかとなった。しかし一方で、ミカエリス定数 (K_m) の低下もみられ、folate に対する PCFT の親和性が上昇していることが示唆された。このため、 K_m を大きく下回る低基質濃度での輸送活性を表す V_{max}/K_m に大きな変化はみられなかった (Fig. 2, Table 1)。この速度論的特性は、GFP 付加体 PCFT を用いた先の研究での結果と一致するものであった。先に行われた GFP 付加体を用いた検討では、PCFT の発現量及び細胞膜局在に変化は無いことが確認されていることに加え、今回、比較的短時間で回復するという特徴が見出されたことから、この阻害作用は可逆的な PCFT 分子の修飾等のメカニズムによるものである可能性が考えられる。

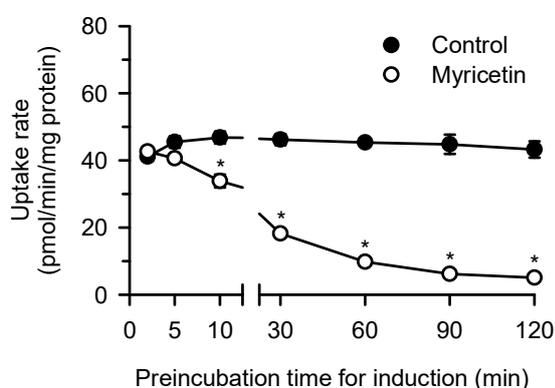


Fig. 1. Time Course of the Induction of PCFT Inhibition by Myricetin

The specific uptake rate of folate (5 μM) was evaluated in MDCKII cells stably expressing PCFT for the initial 2-min period at pH 5.5 and 37°C after preincubation for varied lengths of time in the presence of myricetin (50 μM), or in its absence for control, and subsequently for 5 min in its absence. Data are presented as means \pm SE ($n = 4$). * $p < 0.05$ compared with control at each time point and also compared with the value for 2-min preincubation in the presence of myricetin.

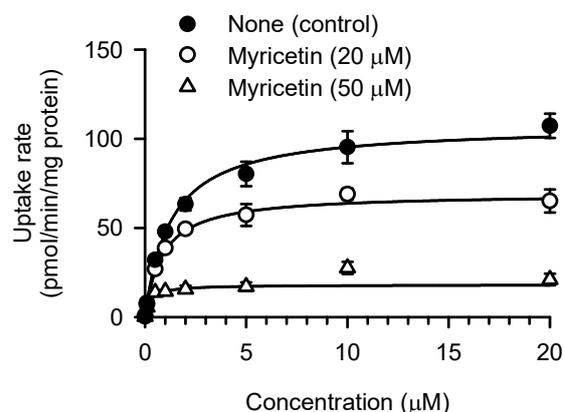


Fig. 2. Effect of Myricetin Concentration for Pretreatment on the Concentration-Dependent Uptake of Folate by PCFT

The specific uptake rate of folate was evaluated in MDCKII cells stably expressing PCFT for the initial 2-min period at pH 5.5 and 37°C after preincubation for 60 min in the presence of myricetin at 20 μM or 50 μM , or in its absence for control, and subsequently for 5 min in its absence. Lines represent simulation profiles based on the kinetic parameters summarized in Table 1. Data are presented as means \pm SE ($n = 3$).

Table 1. Effect of Myricetin Concentration for Pretreatment on the Kinetic Parameters of Folate Transport by PCFT

| Myricetin concentration (μM) | V_{max} (pmol/min/mg protein) | K_m (μM) | V_{max}/K_m ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$) |
|---|--|-------------------------|---|
| 0 | 107.4 \pm 14.8 | 1.27 \pm 0.16 | 84.4 \pm 3.4 |
| 20 | 69.2 \pm 8.3* | 0.86 \pm 0.13 | 81.5 \pm 3.9 |
| 50 | 18.1 \pm 2.4* | 0.25 \pm 0.04* | 71.9 \pm 4.8 |

Data are presented as means \pm SE ($n = 3$). * $p < 0.05$ compared with control.

2. myricetin の持続性阻害作用のヒト PCFT 特異性

HEK293 細胞一過性発現系を用い、myricetin の持続性阻害作用のヒト PCFT (hPCFT) 特異性を探ることとした。比較対象としては、汎用の実験動物であるラットの PCFT (rPCFT) とヒトの riboflavin transporter 3 (hRFVT3/RFT2/SLC52A3) を取り上げた。hRFVT3 は、小腸での riboflavin (vitamin B2) の吸収に働くトランスポーターであり、hPCFT と同様に myricetin に曝露され得るトランスポーターの例として取り上げた。ここでは、持続性阻害作用との関連性の有無を探る目的で、即時性阻害作用についても検討した。

myricetin (100 μ M) による即時性阻害作用に関しては、hPCFT では、 V_{max}/K_m への影響を評価できる低 folate 濃度 (5 nM) 及び V_{max} への影響を評価できる高 folate 濃度 (5 μ M) において、folate 輸送は同程度に阻害され (40%程度の阻害率)、先に見出されているように非競合阻害を生じていることが確認された。しかし、rPCFT では、低 folate 濃度 (5 nM) 及び高 folate 濃度 (5 μ M) のいずれにおいても阻害がみられず、myricetin に対して非感受性であることが示唆された。一方、hRFVT3 でも、hPCFT の場合と同様に、低 riboflavin 濃度 (5 nM) 及び高 riboflavin 濃度 (1 μ M) において、riboflavin 輸送は同程度に阻害され (40%程度の阻害率)、非競合阻害を生じていることが示唆された。

myricetin (100 μ M) での 60 分間の前処理による持続性阻害作用に関しては、hPCFT では、低及び高 folate 濃度において有意な folate 輸送の阻害を生じた (Fig. 3A)。また、高 folate 濃度での阻害率 (80%程度) が低 folate 濃度での阻害率 (60%程度) よりも大きい点で、これまでに見出されている hPCFT 阻害の特徴が確認された。しかし、rPCFT 及び hRFVT3 では、阻害はみられず、両トランスポーターは myricetin に対して非感受性であることが示唆された (Figs. 3B and 3C)。

以上の結果から、myricetin による非競合型の即時性阻害作用は、hPCFT と hRFVT3 に共通する特異的な分子構造特性により生じているものと考えられる。即時性阻害作用を生じなかった rPCFT は、それに関わる部分の分子構造が異なるものとみられる。持続性阻害作用については、rPCFT と hRFVT3 では阻害を生じなかったことから、hPCFT に対する特異性が高い機構により惹起されているものと考えられる。hPCFT と同様の即時性阻害作用を生じた hRFVT3 が非感受性である点から、即時性阻害作用との関連性はないものと考えられる。極めて相同性が高く (87%, Fig. 4)、輸送機能もほぼ同様である hPCFT と rPCFT との間で myricetin 感受性が異なる点は、興味深い。わずかなアミノ酸残基の差異ないしそれに関連した分子構造の差異により、rPCFT は myricetin 非感受性となっているものと考えられる。なお、この種差のために、汎用実験動物であるラットを PCFT の myricetin 感受性の解析には利用できず、臓器ないし個体レベルでの解析に際しての課題となるとみられる。

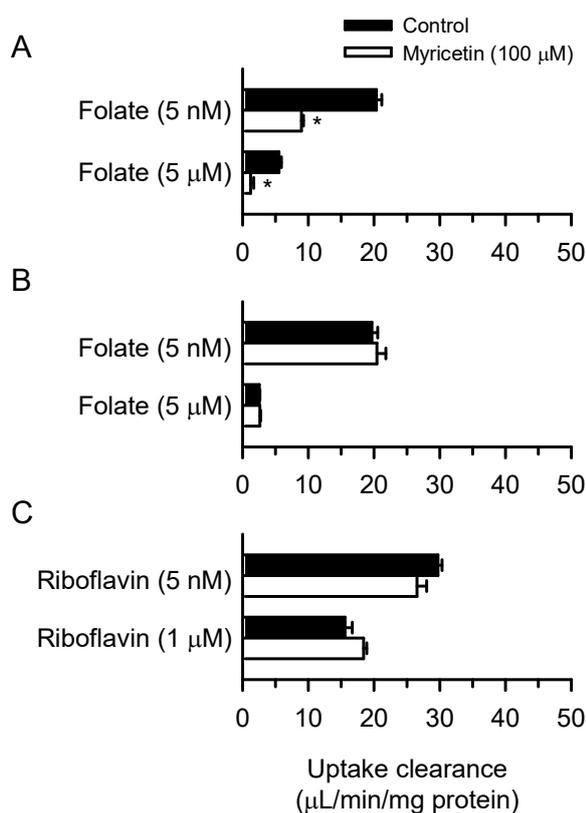


Fig. 3. Sustained Effect of Myricetin on the Transport Function of hPCFT (A), rPCFT (B), and hRFVT3 (C) in HEK293 Cells Transiently Expressing the Designated Transporter.

(A) The specific uptake of folate by hPCFT was evaluated in hPCFT-expressing cells for the initial 2-min period at pH 5.5 and 37°C in the absence of myricetin after preincubation for 60 min in the presence of myricetin (100 μ M), or in its absence for control, and subsequently for 5 min in its absence for washout. (B) The specific uptake of folate by rPCFT was similarly evaluated in rPCFT-expressing cells. (C) The specific uptake of riboflavin by hRFVT3 was evaluated in hRFVT3-expressing cells for the initial 1-min period at pH 6.0 and 37°C in the absence of myricetin after preincubation for 60 min in the presence of myricetin (100 μ M), or in its absence for control, and subsequently for 5 min in its absence for washout. Data are presented as the means \pm SE ($n = 4$). * $p < 0.05$ compared with control, as assessed by Student's t -test.

```

human 1  MEGSASPPEKPRARPAAAVLCRGPVEPLVFLANFALVLQGLPTTQYLWHRFSADLGYNGTRQRGGCSNRSADPTMQEVET
rat 1  MEGRVSPVGGSSRLRLTAAVLEFRGPVEPLVFLANFALVLQGLPTTQYLWHRFSTELGYNGTRREHENCNQSDAPVLEKVVET

human 81  L TSHWTL Y MNVGGFLVGLF S STLLGAWSDS V GRRPLLVLASLGLLQAVSV FVVQLQLH VGYFVLGR I L CALLGDF S GGL
rat 81  L TSHWTL Y MNVGGFLVGLF W STLLGAWSDR V GRRPLLVLASLGLLQAVS I FVVQLQLH I G F FVLGRAL CALLGDF NGL

human 161  L AASFASVADVSSSR SRTRFMALLEAS IGVAGMLASLLGGHWLRAQGYANPFWLALAL I I AMTLYAAF CFGET I K E PKST
rat 161  L AASFASVADVSSN H SRTRFMALLEAC IGVAGT L ASLLGGHWLRAQGYANPFWLALAVL I I MTLYAAF CFGET V K E PKST

human 241  R LFTFRHHR S IVQLYV V APEKSR R KHLALYSLA I FVVI TVHFGAQD I L TLYELSTPLCWD S K L IGYGSA A QHLPYL T SLL
rat 241  R LFTLRHHR S IVQLYV V APEKSR M KHLALYSLA I FVVI TVHFGAQD I L TLYELSTPLCWD S K L IGYGSA A QHLPYL T SLL

human 321  A LKLLQY CLAD A WVAE IGLAFN I LGMVVF AFAT I TPLMFTGYGLLFLSLV I TTPVIRAKLSKLVRETEQ G ALFSAVACVNS
rat 321  A LKLLQF CLAD T WVAE IGLAFN I LGMVVF AFAT I TPLMFTGYGLLFLSLV I TTPVIRAKLSKLVSESEQ G ALFSAVACVNS

human 401  L AMLTASGI FNSLYPATL NFMKGF PFLGAGL L L I PAVL I G MLEKAD P H L E F Q Q F P Q S P
rat 401  L AMLMASGI FNSLYPATL NFMKGF PFLGAGL L F I PAIL I G VLEK V N P H E F Q Q F P Q N S

```

Fig. 4. Alignment of Amino Acid Sequence of hPCFT with That of rPCFT

The amino acid sequence of hPCFT was aligned with that of rPCFT, using the program of ClustalW, and processed to visualize using the program BOXSHADE.

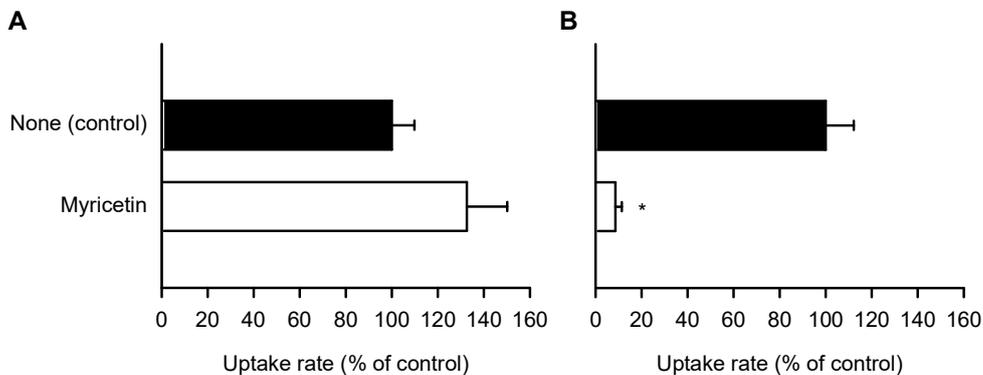


Fig. 5. Effect of Pretreatment with Myricetin on the Uptake of Folate by hPCFT/G158N (A) and rPCFT/N158G (B)

The specific uptake rate of folate (5 μ M) was evaluated in HEK293 cells transiently expressing PCFT mutant for the initial 2-min period at pH 5.5 and 37°C after preincubation for 60 min in the presence of myricetin (100 μ M) or in its absence for control, and subsequently for 5 min in its absence. The values for control were 7.22 and 25.2 pmol/min/mg protein, respectively, for hPCFT/G158N and rPCFT/N158G. Data are presented as the means \pm SE ($n = 4$). * $p < 0.05$ compared with the value for control.

3. PCFT の myricetin 感受性に関わるアミノ酸残基の同定

ヒトとラットとの間で、PCFT の myricetin 感受性に種差が見出されたことから、両 PCFT の比較解析により、ヒト PCFT (hPCFT) の myricetin 感受性に関わるアミノ酸残基の同定に取り組むことにした。なお、ここでは、持続性阻害作用を対象とすることにした。はじめに hPCFT とラット PCFT (rPCFT) の間でキメラ体を作製し、myricetin (100 μ M) での前処理 (60 min) が folate 輸送に及ぼす影響を評価することで、hPCFT の myricetin 感受性に関わる領域を絞り込むこととした。その結果、hPCFT の 83-186 番目のアミノ酸配列中に、myricetin 感受性に関わるアミノ酸残基が存在することが示唆された。

83-186 番目の領域内で hPCFT と rPCFT のアミノ酸配列を比較すると、10 箇所アミノ酸残基が異なっていた。そこで、該当する hPCFT のアミノ酸残基を rPCFT の対応アミノ酸残基に置換した変異体を作製し、各変異体を一過性発現させた HEK293 細胞において folate 輸送の myricetin 感受性を評価した。その結果、10 種の変異体のうち、hPCFT の 158 番目のグリシン残基 (G158) を rPCFT の対応アミノ酸残基であるアスパラギン残基 (N) に置換した G158N の変異体でのみ、myricetin での前処理による持続性阻害作用は認められず、myricetin 感受性が失われていた (Fig. 5A)。逆に、rPCFT は myricetin 感受性を示さないが、rPCFT の 158 番目の N を hPCFT の対応アミノ酸残基である G に置換した N158G の変異体では、持続性阻害作用がみられるようになり、hPCFT と同様の顕著な myricetin 感受性を獲得していた (Fig. 5B)。したがって、G158 が hPCFT の myricetin 感受性に関わっており、ヒトとラットの間での PCFT の myricetin 感受性の種差は、

この 158 番目の 1 アミノ酸の差異により生じていることが明らかとなった。

さらに、hPCFT の G158 を N 以外の 18 種のアミノ酸に置換した変異体についても検討したところ、全ての変異体が myricetin 感受性を示した。このように、hPCFT は G158 を N に置換した場合にのみ myricetin 感受性を失うことから、G への特異的な作用等ではなく、何らかの間接的な機構により myricetin が持続性阻害作用を惹起している可能性が考えられる。

【結論】

本研究では、ヒト PCFT (hPCFT) に対する myricetin の持続性阻害作用の解析に取り組み、以下の知見を得た。

1. hPCFT に対する myricetin の持続性阻害作用は、myricetin への曝露時間に依存して増強される性質を示したが、一方で、可逆的なものであることが示唆された。さらに、この阻害作用は myricetin 濃度に依存的であり、アルコール飲料（ワイン）中に含まれる濃度の範囲（10-100 μ M 程度）で生じ得ることも示唆された。
2. ラット PCFT (rPCFT) は、hPCFT との相同性が高いにも関わらず、myricetin による即時性及び持続性阻害を生じず、myricetin 感受性に種差があることが明らかとなった。また、hRFVT3 でも、myricetin による持続性阻害を生じず、持続性阻害作用は hPCFT に対する特異性の高い機構により惹起されていることが示唆された。一方、hRFVT3 は、即時性阻害作用については、hPCFT と同様に myricetin 感受性であった。このことから、即時性阻害作用と持続性阻害作用に関連性はないことが示唆された。
3. myricetin に対して感受性である hPCFT と非感受性である rPCFT との比較解析により、持続性阻害作用に関して、hPCFT の G158 が myricetin 感受性に関わるアミノ酸残基であることが明らかとなった。

本研究の成果は、folate 類の吸収阻害の原因となり得る、myricetin 類による持続性 PCFT 阻害作用の特性の把握及び機構の解明を大きく進展させるものである。また、folate 及び関連医薬品を用いた経口薬物療法の最適化のための基盤情報として役立つものと期待される。

【基礎となる報文】

1. Yamashiro, T., Ohta, K., Inoue, K., Furumiya, M., Hayashi, Y. and Yuasa, H.
Kinetic and time-dependent features of sustained inhibitory effect of myricetin on folate transport by proton-coupled folate transporter
Drug Metab. Pharmacokinet., **30**, 341-346 (2015).
2. Yamashiro, T., Yasujima, T., Ohta, K., Inoue, K. and Yuasa, H.
Specific inhibitory effects of myricetin on human proton-coupled folate transporter: comparison with its effects on rat proton-coupled folate transporter and human riboflavin transporter 3
Drug Metab. Pharmacokinet., **32**, 311-314 (2017).
3. Yamashiro, T., Yasujima, T., Ohta, K., Inoue, K. and Yuasa, H.
Identification of the amino acid residue responsible for flavonoid sensitivity of human proton-coupled folate transporter
Manuscript in preparation.

【参考論文】

1. Furumiya, M., Inoue, K., Nishijima, C., Yamashiro, T., Inaoka, E., Ohta, K., Hayashi, Y. and Yuasa, H.
Noncompetitive inhibition of proton-coupled folate transporter by myricetin
Drug Metab. Pharmacokinet., **29**, 312-316 (2014).
2. Furumiya, M., Yamashiro, T., Inoue, K., Nishijima, C., Ohta, K., Hayashi, Y. and Yuasa, H.
Sustained inhibition of proton-coupled folate transporter by myricetin
Drug Metab. Pharmacokinet., **30**, 154-159 (2015).

論文審査の結果の要旨

葉酸 (folate) 類の腸管吸収を担う PCFT に対する myricetin 及び類縁フラボノイドの持続性阻害効果が、最近の一連の研究により見出されている。その効果は、作用が強く、また持続性である点から、folate 類の腸管吸収への影響が大きいとみられる。本研究は、その特性の把握を進展させ、また阻害機構の解明を図るため、ヒト PCFT に対する myricetin の持続性阻害作用の輸送機構論的解析及び myricetin 感受性に関わるヒト PCFT のアミノ酸残基の同定に取り組んだものである。

まず、ヒト PCFT に対する myricetin の持続性阻害作用は、myricetin への曝露時間及び myricetin 濃度に依存して増強されることが明らかとなり、またアルコール飲料 (ワイン) 中に含まれる myricetin 濃度の範囲で生じ得ることが示唆された。一方で、可逆的な性質のものであることも示唆された。さらに、ラット PCFT は myricetin 非感受性であること等が見出され、PCFT の myricetin 感受性の特異性及び動物種差が明らかとなった。この動物種差を利用し、PCFT のヒト-ラット間比較解析を行うことにより、ヒト PCFT の G158 アミノ酸残基が myricetin 感受性に関わっていることが明らかとなった。

以上のように、ヒト PCFT に対する myricetin の持続性阻害作用の特性の把握を大きく進展させ、さらに myricetin 感受性に関わるアミノ酸残基 (G158) を明らかにすることができた。これらは、folate 及び関連医薬品を用いた経口薬物療法の最適化を図るうえでの基盤となる価値ある成果である。論文での表現も妥当であり、博士論文として合格であると判定する。