

岩井 一宏

大阪大学大学院生命機能研究科/医学系研究科・教授

鉄および鉄補欠分子族の動態調節とその破綻による病態の解明

1. 研究実施の概要

鉄は容易に電子を授受できるため、種々の酸化還元酵素の活性中心として利用されているのみならず、ガス結合、エネルギー産生においても重要な役割を担っている。一方で鉄はフリーラジカルの産生源となり細胞障害性を有するため、生物は鉄代謝を厳密に調節している。本年度は鉄代謝調節機構の理解に必須である、鉄および鉄補欠分子族の動態を分子レベルで解析するとともに、鉄代謝異常が関連する疾患の病態生理学的解析を進め、以下の成果を得た。1) ミトコンドリアは細胞の鉄感知に多彩な様式で関与し、重要な役割を果たしていること、2) 破骨細胞分化・活性化に鉄イオンが必須であること、3) 肝臓のヘム代謝異常の関与が示唆される疲労モデルラットのメタボローム解析で、疲労ラットで特異的に変動する分子が存在すること。加えて、神経変性疾患における鉄代謝異常の関与に関しても新たな知見を見出している。

2. 研究実施内容

鉄は容易に電子を授受できるため、種々の酸化還元酵素の活性中心として利用されているのみならず、ガス結合、エネルギー産生においても重要な役割を担っている。鉄は鉄イオンとし直接タンパク質と結合する場合もあるが、ヘム、鉄-硫黄 (Fe-S) クラスター (鉄と硫黄によって構成される構造体で 4Fe-4S、2Fe-2S 型がある) の 2 種の鉄補欠分子族の形でタンパク質と結合して機能することが多いことが知られている。一方で鉄はフリーラジカルの産生源となり細胞障害性を有するため、生物は鉄代謝を厳密に調節する巧妙なシステムを備えている。哺乳類細胞では IRP (iron regulatory protein) と呼ばれる細胞質に存在する RNA 結合タンパク質によって鉄代謝が制御されている。研究代表者らの研究により、IRP2 が鉄自体ではなくヘムの濃度変化を介して (Ishikawa et al. Molecular Cell 2005)、また、IRP1 は鉄-硫黄クラスターを介して鉄濃度変化を感知して鉄代謝を制御していることが明らかとなった。ヘム・鉄-硫黄クラスターともにミトコンドリアで生成されることから、本研究では鉄および鉄補欠分子族の細胞内動態の解明を通して、細胞の鉄代謝調節系の理解を目指す。加えて、鉄代謝調節機構の破綻が種々の疾患の病態形成に係わることが示唆さ

れていることを踏まえ、研究代表者らが進めてきた鉄代謝異常の神経変性疾患、疲労への関与について検索を進めている。

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析

ア). ヘム運搬メカニズムの解析

遺伝学的手法が確立している真核生物である出芽酵母を用いて細胞内ヘム輸送系を解明を進めている。出芽酵母のヘム依存性転写因子である Hap1 のヘム依存的な活性化を利用した遺伝学的スクリーニング法を用いて、現在までに9クローンの変異体を単離した。そのうちの4つ株の変異を相補するゲノム遺伝子断片(いくつかの遺伝子とその断片上に存在する)を同定した。しかし、現時点では同定遺伝子の細胞内ヘム動態への関与は明確ではない。それらの遺伝子の機能解析を進めるとともに、新たな変異株の同定のために、遺伝学的スクリーニングをより効率的に進めることを目指し、レポーター系の改良を進めている。

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

細胞株の培養条件など鉄輸送担体同定のための基礎的検討を終了し、岩井チームで作成したサンプルを合田グループに送付して、質量分析系を用いた低分子鉄担体の同定を開始した。現在、合田グループで質量分析計の最適化を進めている。

2. 細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアの役割の解析

鉄-硫黄クラスター、ヘムともに最終的にはミトコンドリアで生成されるが、鉄、および鉄補欠分子族の細胞内動態、中でもヘムに関してはほとんど未解明である。そこで、近年、その生合成・輸送系が明らかになりつつある、鉄-硫黄クラスターに着目して、細胞レベルで容易にノックアウト細胞を作成できるトリ DT40 細胞を用いて細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアの関与を検索した。IRP1、IRP2 は鉄欠乏時にのみ RNA 結合活性を有するが、ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスター生成に関与する scaffold タンパク質 IscU を KO した DT40 細胞ではヘム産生も障害され、その結果鉄過剰時でも IRP1、IRP2 ともに RNA 結合タンパク質結合活性を有することを観察した。一方、細胞質の Fe-S クラスター輸送に関与する Nubp1 KO 細胞では、IRP1 には鉄-硫黄クラスターは結合しないが、IRP2 と同様にヘム依存的分解によって活性が制御されることを見出した。以上から、ミトコンドリアは細胞の鉄感知において重要な役割を果たしていることのみならず、ミトコンドリアで生成される鉄補欠分子族による鉄代謝調節系のバックアップ機構が存在することが明らかとなった。

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

イ) 疲労のバイオマーカーの検索

研究代表者らは疲労とヘム代謝異常の相関を見出した。そこで、疲労のバイオマーカーの開発を目指し、本研究では水浸ケージで飼育した劇症疲労モデルラットの肝臓、血漿のメタボローム解析を進めている。岩井・片岡のグループで作成したモデルから採取した肝臓を合田グループで解析し、いくつかの興味ある分子の変動を観察した。特に肝臓において、疲労負荷がエネルギー代謝・核酸代謝・アミノ酸代謝に大きく影響することがわかりつつある。また、感染疲労モデルラットを用いた疲労バイオマーカー探索研究では、末梢のみならず中枢神経系でのサイトカイン産生やエネルギー代謝変化が確認された。

ウ) 破骨細胞分化における鉄の役割

国立長寿医療センター研究所の池田恭治部長と共同で、鉄取り込みタンパク質であるトランスフェリン受容体1 (TfR1) を介する鉄取り込みの亢進が破骨細胞分化・活性化に必須であること、TfR1 の発現亢進は IRP2 の選択的な活性化によることを示した (Nature Medicine、2009)。

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

ア) 神経変性疾患における鉄代謝異常の関与の解析

研究代表者らが作製した NSE-IRP2 Tg マウスは顕著な鉄蓄積は認めないが、反応性に富んだ Fe^{2+} の蓄積と酸化ストレスの亢進、加齢(15 ヶ月齢以上)による神経変性症状を呈するとともに、パーキンソン病を誘発する薬剤(MPTP)に高感受性であった。順天堂大学・脳神経内科・服部信孝教授らが樹立したパーキンソン病のモデルマウスである Parkin (家族性パーキンソン病の原因遺伝子) KO マウスなどのパーキンソン病などの疾患モデルマウスのほとんどはヒト疾患と比べ非常に弱い表現型しか示さない。それら疾患では鉄の蓄積と酸化ストレスの亢進が報告されており、疾患モデルマウスと NSE-IRP2 Tg マウスとの交配によって強い表現型を示す可能性が想定される。そこで、Parkin KO マウスを NSE-IRP2 Tg と交配したところ、4-6 ヶ月齢から神経変性疾患様の症状が見られること、同症状はパーキンソン病治療薬である L-DOPA の投与で改善傾向を示すことを見出した。それゆえ、本マウスはパーキンソン病の有益な動物モデルとなる可能性があるため、現在特許出願中である。

3. 研究実施体制

(1)「岩井一宏」グループ

①研究分担グループ長： 岩井 一宏 (大阪大学、教授)

②研究項目

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析

ア) ヘム運搬メカニズムの解析

- a. 遺伝学的手法を用いた解析
- b. 質量分析計を用いた解析

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

基礎的検討を開始

2. 細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアの役割の解析

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

ア) 神経変性疾患における鉄代謝異常の関与の解析

- b. 種々の神経変性疾患モデルマウスと NSE-IRP2 Tg マウスとの交配による反応性に富んだ鉄の関与の検索

イ) 疲労のバイオマーカーの検索

- a. 疲労モデル動物肝臓ヘム代謝異常の解析およびメタボローム解析

(2)「合田」グループ

①研究分担グループ長： 合田 亘人(早稲田大学、教授)

②研究項目

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

基礎的検討を開始

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

イ) 疲労のバイオマーカーの検索

a. 疲労モデル動物肝臓へム代謝異常の解析およびメタボローム解析

(3)「片岡」グループ

①研究分担グループ長： 片岡 洋祐(大阪市立大学、講師)

②研究項目

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

イ) 疲労のバイオマーカーの検索

a. 疲労モデル動物肝臓へム代謝異常の解析およびメタボローム解析

(3)「徳永」グループ

①研究分担グループ長： 徳永 文穂(大阪市立大学、准教授)

②研究項目

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析

ア) ヘム運搬メカニズムの解析

a. 遺伝学的手法を用いた解析の継続と、同定された候補遺伝子の機能解析

b. 質量分析計で同定した分子の機能解析

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

質量分析計での同定

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

ア) 神経変性疾患における鉄代謝異常の関与の解析

b. Parkin KO マウスと NSE-IRP2 Tg マウスとの交配マウスの表現系解析。

イ) 疲労のバイオマーカーの検索

a. 疲労モデル動物の肝臓・血漿のメタボローム解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表（原著論文）

1. Ishii, K., Fumoto, T., Iwai, K., Takeshita, S., Ito, M., Shimohata, N., Hiroyuki Aburatani,

H., Taketani, S., J. Lelliott, C. J., Vidal-Puig, A., and Ikeda, K. Coordination of PGC-1 β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. **Nature Medicine** 15(3):259-66, 2009.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：1 件）