

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」  
平成19年度採択研究代表者

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) 反応性に富んだ鉄を増加させる IRP2 トランスジェニックマウスをパーキンソン病モデルマウスである Parkin ノックアウトマウスと交配することでパーキンソン病様症状を呈するようになること、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、鉄貯蔵タンパク質、フェリチンに貯蔵された鉄の利用メカニズムに関しても新たな知見を見出している。

## § 2. 研究実施体制

(1) 「岩井」グループ

① 研究分担グループ長: 岩井 一宏 (大阪大学大学院、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に着手

## 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

細胞レベルにおける鉄代謝調節機構におけるミトコンドリアの関与の分子メカニズムの解明

## 3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

### ア) 疲労のバイオマーカーの検索

疲労モデル動物の肝臓・血漿のメタボローム解析

## (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

##### ア) 細胞内鉄輸送担体の解析

基礎的検討を開始

#### 2. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

##### ア) 疲労のバイオマーカーの検索

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 ((独)理化学研究所、チームリーダー)

### ② 研究項目

#### 1. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

##### ア) 疲労のバイオマーカーの検索

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. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

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、へム、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が鉄自体ではなくへ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。へム・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の解明を進めている。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に改良を加え、新たに 18 クローンの変異株を単離した。さらに、細胞内ヘム含量、ポルフィリン含量の測定系を樹立し、それら変異株でのヘムおよびポルフィリン含量を検討し、ヘムトランスポータ、ヘムキャリアに変異を持つ可能性のある変異株を選択した。ゲノムライブラリーの導入では残念なことにそれらの変異株の変異遺伝子は同定できなかったため、ミトコンドリアのヘムトランスポータ候補に関しては、ミトコンドリアのトランスポータ遺伝子をクローニングして導入することで遺伝子の同定を進めている。また、ヘムキャリアに関しては変異体のさらなる絞り込みを行い、全ゲノムのシーケンスでの遺伝子の同定を計画している。

### 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、合田グループとともに慶應義塾大学先端生命科学研究所の協力を得て鉄のキャリアー低分子捜しについては、CE-TOF-MSを用いて鉄欠乏状態と鉄過剰状態の細胞のメタボロームを行い、鉄の分子量だけ変化が認められる低分子の解析を進めている。

## 2. 細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアおよびリソソームの役割の解析

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。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。IscUKO 細胞ではヘム産生も低下しているが、細胞質に存在するヘム、鉄-硫黄クラスターとは異なる様式で鉄と配位する含鉄蛋白質の活性には影響がなかったことから、IscU の欠損により、ミトコンドリアで産生される鉄補欠分子族の産生阻害が細胞の鉄代謝調節系の破綻の原因となると考えられた(投稿準備中)。

フェリチンは細胞質に存在する鉄貯蔵タンパク質である。細胞は鉄過剰時にはフェリチンの発現を増加して毒性を持たないように、余剰な鉄を濃縮して  $Fe^{3+}$  として貯蔵して毒性を回避しており、鉄過剰状態にあった細胞が鉄欠乏に陥った場合、フェリチンに貯蔵されている鉄を安全に取り出

して利用すると考えられている。しかしながらそのメカニズムは明確にはなっていない。そこでまず、マウス胎児線維芽細胞を用いてフェリチンの寿命を検討したところ、フェリチンはリソソームに輸送されて分解されること、その輸送にはオートファジーが関与していた。さらに、オートファジー欠損細胞は正常細胞に比べ、IRP2 蛋白質量の増加、言い換えれば鉄欠乏状態になっていることを観察している。プロトンポンプ阻害剤処理でリソソームの pH を上昇させたところ、細胞は鉄欠乏状態に陥った。それゆえ、過剰な鉄はフェリチンに安定に貯蔵されているのではなく、鉄はフェリチンに貯蔵された状態で恒常的にリソソームにソーティングされてリソソームの酸性環境下でフェリチンから遊離して細胞質に輸送されると考えられる。鉄欠乏時には IRE/IRP 系でフェリチンの産生を抑制することで、遊離された鉄がフェリチンに再貯蔵されることなく利用されると考えられた(投稿準備中)。

また、メタボローム解析の結果ヘムタンパク質である Cystathionine  $\beta$ -synthase はヘムで一酸化炭素(CO)を感知して、胆汁産生を促すことが明らかとなった(文献1)。

### 3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

#### ア) 疲労のバイオマーカーの検索

疲労のバイオマーカーの探索を目指し、まずは水浸ケージで飼育した劇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た。岩井・片岡のグループで作成した劇疲労モデルから採取した肝臓、血漿を慶應義塾大学先端生命科学研究所で解析し、いくつかの興味ある分子の変動を見出した。疲労負荷によって、肝臓・血漿ともに分岐鎖アミノ酸が増加し、疲労の指標の一つとなる可能性を見出した。また、疲労負荷がエネルギー代謝系へも影響することがわかったため、メタボローム解析の特徴を活かし、複数分子の変動を数理解析し、疲労に特徴的な代謝変化を見出した。

一方、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を中心とした脳内免疫応答が疲労感の惹起にきわめて重要であることを証明し(投稿準備中)、分子イメージングを見据えたバイオマーカー探索に着手した。また、中枢神経において、免疫応答を抑制する系も存在することを見出し、抑制系は疲労の慢性化予防に重要であること、さらに抑制系バイオマーカーを見出すことによって、慢性疲労の治療指針を見出すことが可能になるものと考えられた。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. Shintani T, Iwabuchi T, Soga T, Kato Y, Yamamoto T, Takano N, Hishiki T, Ueno Y, Ikeda S, Sakuragawa T, Ishikawa K, Goda N, Kitagawa Y, Kajimura M, Matsumoto K, Suematsu M. Cystathionine  $\beta$ -synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion. **Hepatology**, 49(1), 140-150, 2009. DOI:10.1002/hep.22604

### (4-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)