

岩井 一宏

大阪大学大学院医学系研究科・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。鉄は多くの場合、ヘム等の鉄補欠分子族に組み込まれてタンパク質と結合して作用するが、それらの細胞内動態はほとんど未解明である。本研究で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) 細胞は鉄欠乏時に鉄貯蔵蛋白質であるフェリチンをリソソームへ輸送し、酸性環境下で内部に貯蔵した鉄を放出して利用しているが、フェリチンは鉄過剰時にもリソソームに輸送され、内部に貯蔵された鉄は、細胞の鉄存在量にかかわらず、絶えず抽出されていること、
 - 4) 出芽酵母の遺伝学を用いて、ミトコンドリアから細胞質へのヘム輸送に関与する蛋白質、細胞質ヘム輸送蛋白質が存在することを明確にした。そのうち、現在1つの遺伝子を同定し、他の遺伝子の同定も進めていること、
 - 5) 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、特異的に変動する分子が存在すること、
 - 6) 慢性疲労症候群患者血漿のメタボローム解析研究から、慢性疲労病態のバイオマーカーを見出したこと、
- 3)は論文が受理されたが、他はいずれも現在、論文投稿中、投稿準備中、特許申請中である。

§ 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 (大阪大学大学院医学系研究科、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

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およびリソソームの役割の解析

ア) 細胞の鉄感知におけるミトコンドリアの役割の解析

イ) 細胞の鉄利用におけるリソソームの役割の解析

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. 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

(2)「合田」グループ

① 研究分担グループ長:合田 亘人 (早稲田大学先進理工学部、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

質量分析計での同定に着手

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ヘム代謝異常の解析およびメタボローム解析

b. 疲労患者の血液メタボローム解析

(3)「片岡」グループ

① 研究分担グループ長:片岡 洋祐 (理化学研究所分子イメージング科学研究センター、チームリーダー)

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ヘム代謝異常の解析およびメタボローム解析
- b. 疲労患者の血液メタボロームおよび分子イメージング解析

§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、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結合タンパク質が鉄欠乏時においてのみRNAと結合することで鉄代謝を制御している。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た遺伝学的スクリーニング法の改良等を行い、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3種類の変異株を選択した。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、出芽酵母の全ゲノムのシーケンシングを行いヘムキャリアと想定される分子の遺伝子を同定した。ヘムトランスポータと思われる分子の遺伝子は現在検索中である。

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

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候補を絞り込んだ。現在確認実験を進めている。

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、細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアの役割は明確ではない。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 細胞を用いて鉄-硫黄クラスター、ヘム合成系の分子のノックアウト細胞を作成し、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、ヘム合成の律速酵素である ALAS1、KO 細胞では IRP2 は鉄過剰時でも RNA 結合活性を有していた。また、ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスター生成の scaffold タンパク質 IscU KO40 細胞では IRP1、IRP2 とともに鉄過剰時でも RNA 結合活性を有すること、細胞質での鉄-硫黄クラスター輸送に関与する NuBP1 KO 細胞では IRP1 には鉄-硫黄クラスターが結合しないが、分解されることで制御されることが明らかとなった。NuBP1 KO とは異なり、IscU KO 細胞ではヘム合成も低下していた。それゆえ、ミトコンドリアでの2つの鉄補欠分子族合成系のいずれもが細胞の鉄代謝において必須の役割を果たしていること、言い換えれば、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が明らかとなった。(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 Fe^{3+} として貯蔵して毒性を回避している。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が、そのメカニズムは明確にはなっていない。そこでフェリチンの運命について検索した。フェリチンは鉄過剰、欠乏時いずれにおいてもリソソームに輸送されて分解されるが、欠乏時にはオートファジーで輸送されるが、過剰時には未知の経路で輸送され、後者の経路は癌細胞株では欠損していた。また、フェリチンからの鉄の遊離にはリソソームの酸性環境が必要であることがわかった(文献2)。

さらに、IRP2 と類似の様式でヘムによって活性が調節される、根粒菌のヘム応答性転写調節因子 Irr のヘム結合様式に関して、種々の分光学的手法を用いて詳細な解析を行った(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

イ) 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、慢性疲労症候群患者の血漿のメタボローム解析を進めた。採取した血漿を慶應義塾大学先端生命科学研究所で解析した。その結果、慢性疲労症候群患者では、解糖系から TCA サイクルにかけてのエネルギー産生に関わる代謝物質で、減少しているものも多く見受けられた。また、数理計算を用いた解析から、たった4種類の血液中の代謝物の測定で慢性疲労症候群を90%以上の特異性で判定できることがわかった。以上のメタボローム解析研究の成果は、昨年6月24日に特許基礎出願を行い、本年2月21日に追加出願を終えた。現在、論文投稿準備中である。

一方、ウイルス模擬感染実験系を利用した感染疲労動物モデル研究では、脳内の広い領域でミクログリアが活性化して特定の炎症性サイトカインの発現が増強すること、さらにサイトカイン受容体のアンタゴニスト投与で疲労行動が抑制されることがわかった。本結果は、現在、論文作成中である。こうした成果により、ウイルス感染が引き金となって、その後数年にわたって重篤な疲労感が

持続する慢性疲労症候群への移行に、脳内ミクログリアの持続活性化が関与するとの仮説を得るに至った。そこで、大阪市立大学と連携し、慢性疲労症候群患者を対象に陽電子放射断層撮影法(PET)を用いて脳内ミクログリアの持続活性化の検証試験を開始した。今後、こうした PET 検査も有望な慢性疲労症候群のバイオマーカーとなることが期待される。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

論文詳細情報

1. Ishikawa, H., Nakagaki, M., Bamba, A., Uchida, T., Hori, H., O'Brian, M.R., Iwai, K., and Ishimori K. Unusual heme binding in the bacterial iron response regulator protein (Irr): Spectral characterization of heme binding to heme regulatory motif. **Biochemistry**. 50: 1016-1022, 2011.
2. Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., and Iwai, K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. **Mol. Cell. Biol.** 2011 Mar 28. [Epub ahead of print]

(4-2) 知財出願

① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)

《発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号》

発明の名称 疲労のバイオマーカーおよびその利用

発明者 片岡洋祐、金光華、渡辺恭良、田島世貴、曾我朋義、倉恒弘彦、山野恵美

出願人 独立行政法人 理化学研究所、公立大学法人 大阪市立大学、倉恒弘彦

出願年月日 2011.2.21 (基礎出願)2010.6.24

出願番号 2011-34875 (基礎出願)2010-144128

② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)