

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) (研究代表者)

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) (主たる共同研究者)

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) (主たる共同研究者)

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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合には(3-1)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を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、細胞内ヘム動態に変異を持つ可能性のある2種類の変異株を選択し、全ゲノムのシーケンス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。同定した変異遺伝子産物のヘム輸送における役割の解析を進めている。

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、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検索を進めている。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6つ(既知物質が4つと未知物質が2つ)まで絞り込むことができた。現在、既知物質について鉄との結合性について、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。その結果、ミトコンドリアにおけるヘム、合成系

に必須な分子のノックアウト細胞では IRP2 が、鉄-硫黄クラスター合成系に必須な分子のノックアウト細胞では IRP1、IRP2 ともに鉄過剰状態においてもRNA結合活性を有しており、細胞の鉄感知機構が破綻していた。さらに鉄-硫黄クラスターを持たない IRP1 と IRP2 はともにヘム依存的に分解されることを見出した。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かが異常な場合にはヘム不足を介して、細胞の鉄代謝制御系にその不全を伝達して鉄取り込みを亢進させることが明らかとなった。(投稿中)。また、鉄-硫黄クラスターを持たない IRP1 と IRP2 を選択的にユビキチン化して分解に導く FBXL5 のノックアウト(KO)マウスは胎生致死になること、肝臓特異的 FBXL5 KO マウスは全身の鉄代謝調節不全を引き起こすことが明らかにした(文献 3)。

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 Fe³⁺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ではなかった。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った(文献 1)。また結核菌のヒストンがフェリチン様の活性を持ち、DNA を酸化ダメージから保護していることを見出した(文献2)。

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

国民の4割が慢性疲労を訴えているものの、その病態についてはこれまで十分な研究がなされていない。また、原因不明の強い疲労感を引き起こす慢性疲労症候群と診断される患者も全人口の0.3%にみられるが、有効な治療法がなく、問題となっている。そこで、疲労バイオマーカーの開発を目指し、実際の慢性疲労症候群患者血液を対象としたメタボローム解析研究を実施した。その結果、エネルギー産生に関わる一連の代謝物質に異常が見出され、そうした変化のパターンから客観的な慢性疲労症候群診断に資するバイオマーカーを見出し、昨年、特許申請を終えた。一方、疲労のメカニズムを解明し、新たな疲労バイオマーカーを見出すために、疲労モデル動物を作成して、ヒトで見出された代謝変化以外にもいくつかの疲労に特徴的な代謝物濃度の変化を見出した。現在、それらが新たな疲労バイオマーカーとなりうるかどうか、検討中である。また、感染・炎症性疲労モデル動物において、中枢神経系幹・前駆細胞が神経活動の影響を受けて分裂後の分化方向を変え、中枢神経疲労を緩和する役割を担っている可能性を見出した(論文投稿中, in revision)。

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、反応性に富んだ Fe²⁺の蓄積と酸化ストレスの亢進を呈するとともに、パーキンソン病を誘発する薬剤(MPTP)に高感受性であった。そこで、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 マウスとNSE-IRP2 Tgを交配したところ、5ヶ月齢から神経変性疾患様の症状が見られ、L-DOPA 含量の低下も観察された。さらに、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。Parkin は膜電位が低下したミトコンドリアに集積してミトコンドリアのオートファジーによる除去(マイトファジー)に関与することが報告されている。神経細胞株を用いた実験の結果、IRP2 の発現亢進による反応性に富んだ鉄の増加がラジカル産生の亢進を介してミトコンドリアの膜電位を低下させることで Parkin の集積を生じることを示した。本研究は反応性に富んだ鉄は始めて同定された Parkin の集積をきたす生理的な刺激であること、鉄とミトコンドリア異常、神経変性疾患との関係を明確にした研究であり現在投稿中である。また、鉄によってタンパク質量の制御を受ける HIF-1 の免疫、神経における役割等を解析した(文献 4-8)。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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.** 31:2040-2052, 2011. (DOI: 10.1128/MCB.01437-10)
2. Takatsuka, M., Osada-Oka, M., Satoh, E.F., Kitadokoro, K., Nishiuchi, Y., Niki, M., Inoue, M., Iwai, K., Arakawa, T., Shimoji, Y., Ogura, H., Kobayashi, K., Rambukkana, A., and Matsumoto, S. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by fenton reaction. **PLoS One.** 6:e20985, 2011. (DOI: 10.1371/journal.pone.0020985)
3. Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K., and Nakayama, K. I. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. **Cell Metabolism** 14: 339–351, 2011. (DOI:10.1016/j.cmet.2011.07.011)
4. Ochiai D, Goda N, Hishiki T, Kanai M, Senoo-Matsuda N, Soga T, Johnson RS, Yoshimura Y, Suematsu M. Disruption of HIF-1alpha in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. **Biochem Biophys Res Commun**, 415(3), 445-9, 2011. (DOI:10.1016/j.bbrc.2011.10.089)
5. Nishiyama Y, Goda N, Kanai M, Niwa D, Osanai K, Yamamoto Y, Senoo-Matsuda N, Johnson RS, Miura S, Kabe Y, Suematsu M. HIF-1alpha induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice. **J Hepatol**, 56(2), 441-447, 2012. (DOI:10.1016/j.jhep.2011.07.024)

6. Ikejiri A, Nagai S, Goda N, Kurebayashi Y, Osada-Oka M, Takubo K, Suda T, Koyasu S. Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations. **Int Immunol**, 24(3), 137-146, 2012. (DOI:10.1093/intimm/dxr111)
7. Nakamura-Ishizu A, Kurihara T, Okuno Y, Ozawa Y, Kishi K, Goda N, Tsubota K, Okano H, Suda T, Kubota Y. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1-dependent manner. **Dev Biol**, 363(1), 106-114, 2012. (DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.12.027)
8. Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Goda N, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. **Development**, 139(7), 1327-1335, DOI:10.1242/dev.0723302012.

(3-2) 知財出願

① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)