

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16534

研究課題名(和文) 老化と鉄：脂質過酸化物質4-HNEが引き起こす鉄代謝異常の分子機構の解明

研究課題名(英文) Alterations in cellular iron metabolism caused by oxidative stress

研究代表者

吉原 大作 (Yoshihara, Daisaku)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00567266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、酸化ストレスが鉄代謝調節機構に与える影響を明らかにし、加齢に伴って引き起こされる鉄代謝異常の病態メカニズムを解明することである。本研究では、活性酸素種や脂質過酸化物質が、細胞内の鉄代謝に与える影響を解析した。その結果、細胞内の酸化ストレス亢進状態は、細胞内の二価鉄イオンを増加させること、鉄代謝調節タンパク質であるIRP1を顕著に減少させることを明らかにした。また、酸化ストレス亢進状態のモデルマウスにおいて、脳内の金属代謝異常や行動学的異常が起こっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the relationship between oxidative stress and age-related disturbance of iron metabolism. It was shown that the 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ), a superoxide generator, and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a lipid peroxidation product, increased ferrous ion and inhibited IRP1 (Iron regulatory protein 1) activity in mProx24 cell (mouse proximal tubular cell) and HEK293 cell (human embryonic kidney cells). In addition, SOD1 KO (animal model of oxidative stress) mice showed abnormalities of brain iron metabolism and exhibited impaired motivational behavior in three-chamber social interaction tests. These results suggest that age-related oxidative stress may induce disturbance of iron metabolism.

研究分野：生化学

キーワード：酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

ヒトでは体内の総鉄量(3~5 g)に対して、体内への吸収と体外への排出は極めて少なく(それぞれ1~3 mg/day)、鉄は体内で循環と再利用とが繰り返されている。そのため局所での鉄過剰状態は、他の組織での鉄欠乏の原因となる。加齢に伴って起こる鉄代謝異常の原因には、酸化ストレスの関与などが示唆されているが、その発症や病態悪化のメカニズムは分かっていない。

生体内における鉄代謝は、IRP (Iron regulatory protein) という RNA 結合タンパク質によって調節されている。IRP は、鉄不足を感知して活性化して、鉄代謝に関連する分子の mRNA 上に存在する鉄応答配列 (Iron responsive element: IRE) に結合し、翻訳レベルでの発現調節を行う(鉄濃度依存的な IRP 活性化)。ヒトの細胞には、IRP1 と IRP2 の2つの IRP が存在するが、IRP1 は ROS (reactive oxygen species) によっても活性化が引き起こされることが知られている。ROS による IRP1 活性化は、細胞内で鉄が不足していなくても起こることから、鉄過剰の原因となる(鉄濃度非依存的な IRP1 活性化)。研究代表者は、加齢に伴う ROS 産生亢進や抗酸化能の低下 (=酸化ストレス) が、鉄濃度非依存的な IRP1 を引き起こして、組織での鉄過剰の原因となる可能性があるのではないかと考えた。

これまでに研究代表者は、ヒト腎由来培養細胞を使った実験で、ROS (スーパーオキシドや過酸化水素) は IRP1 を活性化するが、脂質過酸化物である 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) は、IRP1 を強力に不活化して、TfR1 (Transferrin receptor 1、細胞内への鉄取り込み輸送体) を減少させるということを見出した。IRP1 が ROS により活性化することは報告されているが、4-HNE が IRP1 を不活化するということは予想外の結果であった。脂質過酸化物である 4-HNE は、加齢とともに増加することが分かっており、加齢臭の原因物質として知られている。4-HNE が IRP1 を不活化するメカニズムは不明であるが、4-HNE は IRP1 と付加体を形成している可能性がある。4-HNE などの脂質過酸化物は、タンパク質のシステイン残基などに付加して、そのタンパク質を不活化したり分解を促進したりすることが知られている。

2. 研究の目的

研究代表者は、加齢に伴う酸化ストレスの亢進状態が鉄代謝異常の原因となっている可能性があると考えている。本研究の目的は、加齢に伴って起こる鉄代謝異常のメカニズム解明し、老化における鉄の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞、実験動物および試薬

培養細胞：本研究では、マウス近位尿細管由来 mProx24 細胞およびヒト胎児腎由来 HEK293 細胞を使用した。mProx24 細胞は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/F12 培地に 10%ウシ胎児血清を添加して培養した。HEK293 細胞は、DMEM に 10%ウシ胎児血清を添加して培養した。

実験動物：酸化ストレスの亢進のモデルマウスとして、SOD1 (Superoxide dismutase 1) をノックアウトしたマウス (SOD1KO マウス) を用いた。実験には、12~16 週齢の雄マウスを使用し、対照には同週齢の野生型マウス (C57BL/6J、雄) を使用した。研究代表者らは、SOD1KO マウスでは、酸化ストレスに起因した鉄代謝異常が起こっていることを報告している [*Free Radical Biology & Medicine* (2009), *Free Radical Research*(2012)]。

酸化ストレスの負荷は、スーパーオキシド発生剤として、DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) を使用した。DMNQ は 50 mM の DMSO (Dimethyl sulfoxide) 溶液を作製し、5~50 μ M の濃度になるように培地に添加した(培地中の DMSO 濃度は 0.1%になるように調節した)。4-HNE は、64 μ M のエタノール溶液を準備し、4~64 μ M の濃度で培地中に添加した(培地中のエタノール濃度は 0.1%になるように調節した)。過酸化水素は、1 M の水溶液を作製し、10 μ M ~ 1 mM の濃度で使用した。

(2) 酸化ストレスが細胞内鉄動態に与える影響の解析

酸化ストレスの亢進状態が、細胞内の鉄イオン動態にどのような影響を与えるのかを培養細胞を用いて解析した。二価鉄イオンの検出には二価鉄特異的な蛍光プローブである RhoNox-1 (岐阜薬科大学 平山祐博士より供与) を使用した。

酸化ストレスの負荷は、培養細胞をガラスボトムデッシュに播種してから 48 時間後に行った。DMNQ、過酸化水素および 4-HNE を添加した培地に交換してから、1~24 時間後に、培地を除去し、5 μ M の RhoNox-1 で細胞中の二価鉄イオンの染色 (37 °C で 30 分間) を行った。細胞の洗浄および RhoNox-1 (10 mM, DMF:N,N-dimethylformamide 溶液) の溶解には HBSS (Hanks' balanced salt solution, with Ca/Mg) を使用した。染色終了後、レーザー共焦点顕微鏡で、RhoNox-1 の蛍光 (励起波長: 540 nm/蛍光波長: 570 nm) を検出した。

前項と同様の実験を、24 ウエルプレートまたは 96 ウエルプレート上で行い、RhoNox-1

の蛍光強度の増減を蛍光プレートリーダーで検出した。

細胞中の総鉄（二価鉄 + 三価鉄）濃度は、メタロジェニクス社のメタロアッセイ鉄 (Fe) 測定キットを用いて測定した。また、細胞内への鉄の取り込み量の評価は、蛍光 (Cy3) 標識したトランスフェリン (Tf) を用いて行った。

活性酸素種の検出には、活性酸素種検出蛍光プローブである DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)、DHE (Dihydroethidium) および HPF (Hydroxyphenyl Fluorescein) を使用した。

(3) 酸化ストレスによる鉄代謝関連分子の発現解析

酸化ストレスを負荷した細胞から、タンパク質および RNA を抽出し、ウエスタンブロット法および RT-PCR 法で鉄代謝関連分子の発現の変化を解析した。

(4) 酸化ストレスによる IRP1 の翻訳後修飾および機能への影響の解析

あらかじめ Flag タグ付き IRP1 タンパク質を発現させておいた細胞に、酸化ストレスの負荷を与えた後に細胞を回収し、Flag-IRP1 を精製した。精製した Flag-IRP1 を使用して、酸化ストレスの負荷による翻訳後修飾の変化を質量分析計で分析した。

RNA 結合能の評価

酸化ストレスを負荷した細胞のタンパク質を抽出物と、³²P 標識またはビオチン標識した IRE (RNA) プローブとを用いてゲルシフトアッセイを行った (IRP1-IRE 複合体の検出)。

(5) 酸化ストレスモデルマウスにおける遷移金属代謝の解析と行動学試験

行動学試験は、12 週齢のマウスを用いて行った。実施した行動学試験は、オープンフィールド試験、シャトルボックス試験、社交性試験 (接触試験) および性行動試験である。

行動学試験の終わったマウスから、臓器 (脳など) を取り出し、タンパク質および RNA を抽出した。これらのサンプルを用いて、ウエスタンブロット法および RT-PCR 法でマウスの行動や鉄代謝に関わる分子の発現量の解析を行った。また、組織抽出液を用いて、遷移金属 (鉄および銅)、抗酸化物質 (グルタチオンなど) の測定も行った。

4. 研究成果

酸化ストレスは、ROS や脂質過酸化物の増加、抗酸化酵素の減少によって引き起こされる。細胞内では、酸化ストレスに伴って鉄代謝がどの様に変化するのか？細胞内の鉄は

増加するのか、減少するのか？ということをも明らかにするために、培養細胞 (mProx24 および HEK293 細胞) に酸化ストレスを負荷した細胞内の二価鉄イオンを鉄イオンプローブ RhoNox-1 で検出した。その結果、酸化ストレスの亢進状態が、細胞内の二価鉄イオンの増加の原因になる可能性があることが分かった。一方で、細胞内への鉄 (Tf-Fe) の取り込み量の大きな変化はなかった。

次に、鉄代謝関連分子の発現および IRP1 の IRE への結合能が酸化ストレスの亢進によってどのように変化するのかを解析した。その結果、DMNQ を添加した培地で培養した細胞では、IRP1 は減少していたが、IRP1 の IRE への結合能は増大していた。一方で、4-HNE を添加した培地で培養した細胞では、IRP1 が減少し、IRP1 の IRE への結合能が顕著に低下していた。また、鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンは、DMNQ および 4-HNE の刺激によって減少していたが、鉄取り込みの輸送体である Tf 受容体 1 (TfR1) は、4-HNE の刺激によってのみ顕著な減少が見られた。その他の鉄代謝関連分子の発現量や局在の変化などについては引き続き検討を行っている。

DMNQ や 4-HNE による IRP1 機能変化には、IRP1 の化学修飾が原因となっている可能性がある。そこで、ヒト IRP1 (N 末に Flag タグ付加) を過剰発現させた細胞を、DMNQ や 4-HNE を添加した培地で培養して、IRP1 を精製した。精製した IRP1 を LC-MS/MS および NMR で解析して、IRP1 の翻訳後修飾の解析を行った。しかしながら、今回の検討では、翻訳後修飾の変化を検出することはできなかった。今後、IRP1 の精製方法や質量分析の条件等を再検討し、酸化ストレス亢進状態における IRP1 の翻訳後修飾の変化を明らかにしていく予定である。

これまでに研究代表者は、酸化ストレス亢進状態のモデルマウスである SOD1KO マウスの腎臓や肝臓において鉄代謝異常が起こっていることを報告してきた [Free Radical Biology & Medicine (2009), Free Radical Research (2012, 2016)]。この SOD1KO マウスについて、さらに検討を進めたところ、脳においても鉄代謝異常が起こっていることが分かった (未発表データ)。そこで、SOD1KO マウスの脳における鉄代謝異常が、脳機能に及ぼす影響を調べるために行動学試験を行った。その結果、SOD1KO マウスでは、特定の学習試験において野生型マウスとは異なった方法で学習の獲得を行うこと、社交性が低下していることを明らかにした。SOD1KO マウスに見出された行動学的異常の分子メカニズムについて検討を行ったところ、神経伝達物質ドーパミンの輸送体であるドーパミントランスポーターが SOD1KO マウスで顕著に増加していることが分かった。これらの研究成果は、

海外学術誌 (*Free Radical Research*, 2016) に発表した。現在、鉄代謝異常とドパミントランスポーターの増加との関連についての検討を進めている。

本研究によって、酸化ストレスが細胞内の鉄イオン動態へ影響を与えていることが示唆された。特に、加齢とともに増加する脂質過酸化物質 (4-HNE) が IRP1 による鉄代謝調節機構に大きな影響を与えている可能性も見出された。また、生体を使用した実験では、酸化ストレスによる鉄代謝異常と加齢に關与する様な病態との関係を解き明かす基礎となる結果が得られた。本研究の成果は、加齢に伴って起こる鉄代謝異常のメカニズム解明や、老化における鉄の役割の解明につながるのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Yoshihara D, Fujiwara N, Kitanaka N, Kitanaka J, Sakiyama H, Eguchi H, Takemura M, Suzuki K. The absence of the SOD1 gene causes abnormal monoaminergic neurotransmission and motivational impairment-like behavior in mice. *Free Radic Res.* 査読有、2016;50(11):1245-1256.
DOI: 10.1080/10715762.2016.1234048

Sakiyama H, Fujiwara N, Yoneoka Y, Yoshihara D, Eguchi H, Suzuki K. Cu,Zn-SOD deficiency induces the accumulation of hepatic collagen. *Free Radic Res.* 査読有、2016 Jun;50(6):666-677.
DOI: 10.3109/10715762.2016.1164856.

[学会発表](計6件)

吉原大作、藤原範子、平山祐、丹羽正人、江口裕伸、崎山晴彦、永澤秀子、鈴木敬一郎、フェロトーチス誘導時における鉄イオン動態の解析、第40回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、2016年9月10日~9月11日、名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)

吉原大作、藤原範子、北中順恵、北中純一、崎山晴彦、江口裕伸、竹村基彦、鈴木敬一郎、SOD1欠損はモチベーションの低下を引き起こす、第69回日本酸化ストレス学会学術集会、2016年8月30日~8月31日、仙台国際センター会議場(宮城県仙台市)

Noriko Fujiwara, Daisaku Yoshihara, Nobue Kitanaka, Junichi Kitanaka, Haruhiko Sakiyama, Hironobu Eguchi, Motohiko Takemura and Keiichiro Suzuki, Lacking SOD1 gene causes motivational impairment-like behaviors, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, May 20-22, 2016, Sendai International Center (Sendai-shi, Miyagi)

吉原大作、藤原範子、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎、SOD1欠損マウスにおける行動学的異常、第68回日本生化学会大会、2015年12月1日~12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

吉原大作、藤原範子、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎、NOおよびROSが鉄代謝調節機構に及ぼす影響、第15回日本NO学会学術集会、2015年6月26日~6月27日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

吉原大作、藤原範子、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎、SOD1欠損は脳内モノアミン代謝異常と行動異常を引き起こす、第68回日本酸化ストレス学会学術集会、2015年6月11日~6月12日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

吉原 大作 (Yoshihara, Daisaku)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00567266

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()