

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19770158  
 研究課題名 (和文) 低酸素応答に関わる細胞内情報伝達の細胞外環境依存的な制御機構の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of extracellular environment-dependent regulatory mechanism for intracellular signaling regarding hypoxic response

## 研究代表者

鳥居 暁 (TORII SATORU)  
 東北大学・大学院生命科学研究科・助教  
 研究者番号：10444001

研究成果の概要：副腎由来の培養細胞を低マグネシウム下に曝すと、低酸素応答の阻害因子である IPAS の発現量が増加し、低酸素応答を抑制していることがわかった。さらに低マグネシウム時の IPAS の発現誘導機構も解明した。低マグネシウム血症のマウスでは副腎や頸動脈小体における低酸素応答が欠如することがわかった。酸素センサーとして働くこれらの組織の活性化が起きないことは循環機能に負担をかけ、心臓疾患の発病原因になる可能性が示唆される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：低酸素応答、マグネシウム、副腎、頸動脈小体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 低酸素応答機構は近年その研究が急速に進んでおり多くの知見が得られてきている。その中で特に HIF-1 とそのファミリー分子が低酸素応答において重要な基本因子であることが見出されてきた。HIF-1 は低酸素応答性の DNA 配列 (hypoxia response element (HRE) 配列) に結合し低酸素依存的に標的遺伝子の転写活性化を引き起こす転写因子である。HIF-1 はヘテロ二量体であり HIF-1 $\alpha$  と Arnt (HIF-1 $\beta$ ) によって構成される。通常酸素濃度 (Normoxia) において

HIF-1 $\alpha$  は自身の oxygen dependent degradation (ODD) ドメイン中の 402 番目と 564 番目のプロリン残基を HIF-プロリン水酸化酵素 (PHD) によって水酸化される。水酸化された HIF-1 $\alpha$  は von Hippel-Lindau 癌抑制遺伝子産物である pVHL と相互作用し、ポリユビキチン化され 26S プロテアソーム依存的にタンパク質分解される。それに対して低酸素状態 (Hypoxia) もしくはコバルトイオンの投与によって、PHD の酵素活性が阻害され、HIF-1 $\alpha$  のタンパク質分解が起こらなくなる。その結果、HIF-1 $\alpha$  は細胞内に蓄積

して核内へ移行しHREを介してエリスロポエチンや血管内皮細胞増殖因子、チロシン水酸化酵素 (TH)、解糖系酵素群などの転写を活性化する。HIF-1のファミリーとしてはHLF (HIF-2 $\alpha$ )、HIF-3 $\alpha$ 、IPASがあり、HLFはHIF-1 $\alpha$ と同様にArntと結合して遺伝子発現を正に制御するのに対して、HIF-3 $\alpha$ 、IPASは逆にこの低酸素シグナルの阻害因子として機能することが知られている。IPASはArntと競合してHIF-1 $\alpha$ とヘテロダイマーを形成し、HIF-1の転写活性化能を阻害していると考えられている。

(2)当研究室の予備実験において、ラットの副腎髄質クロム親和性細胞であるPC12細胞をダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で培養した場合はコバルトイオン処理によってHREを介した転写の活性化が起こるのに対して、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640培地で培養した場合はその転写活性化が起こらないという結果が得られていた。少なくともこの現象には培地に含まれるマグネシウムとヒスチジン、スレオニンが非常に重要であることがわかってきていた。またPC12細胞をRPMI培地で培養した際にコバルトイオン依存的に低酸素シグナルの阻害因子であるIPASの発現量が増加することがわかっていた。このことからこの細胞外環境によるHRE応答の違いはIPASによって引き起こされる可能性が考えられるものの、その詳しい機構に関しては未解明なままであった。

## 2. 研究の目的

(1)細胞外環境の違いによる低酸素応答の変化に対するIPASの関与の程度をより詳細に解析する。

(2)マグネシウムイオンやアミノ酸濃度依存的にどのような経路によってIPASの発現誘導が引き起こされるのかを調べる。

(3)予備実験では低酸素条件をコバルトイオンによって模倣していたが、細胞を実際に低酸素条件においてもこの現象が観察されるかの解析が重要であり行う。

(4)培養細胞において得られた現象が、実験動物のマウスの組織においても観察されるかを、解析する。コバルト投与、もしくは低酸素曝露をマウスに行う。特に副腎と頸動脈小体に注目して研究を行う。

## 3. 研究の方法

本研究においてはPC12細胞を用いた培養細胞での解析とモデル生物としてマウスを用いた解析という二種類の解析手法を用いた。

(1) IPASはRPMI培地における培養条件でコバルトイオン依存的に発現量が増加してきていることがわかっていたので、HRE応答抑制に対するIPASの関与を解析する。培養細胞を用いた遺伝子導入及びRNAi (RNA interference) を活用して解析を行う。

(2) マグネシウムイオンやアミノ酸濃度依存的にどのような経路でIPASが誘導されるか解析するために、既に候補として決めているシグナル経路の阻害薬剤を用いてIPASの発現誘導に変化が起きないかを解析する。またゲノム上のIPASの遺伝子の上流もしくは下流配列をクローニングしてその制御下でルシフェラーゼ等のレポーターが発現するようなトランスジーンを作って解析を行っていく。

(3) 培養細胞もしくはマウスを1%や6%の低酸素環境において、その際の低酸素応答への低マグネシウムの影響を調べる。

(4) マウスの臓器を摘出し、RT-PCR、in situ hybridization、免疫染色法等の手法で調べる。コバルトイオンそして低酸素の両方で解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) IPASの低酸素応答の変化への寄与の程度を調べるため培養細胞を用いた実験を行った。PC12細胞にIPASを過剰発現させたところ、コバルト依存的な低酸素誘導が抑制された。さらに内在性のIPASをsiRNAによって減少させた場合、栄養状態依存的な低酸素応答の差が部分的に見られなくなった(図1)。このことから上記の現象にはIPASが重要な因子であることがわかった。また、他の細胞種を用いた研究から上記のような現象は内分泌系の細胞種に特有の現象である可能性が示唆された。

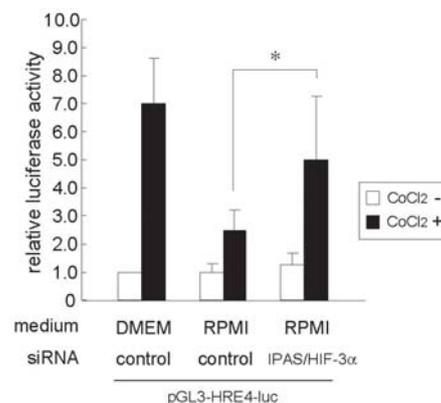


図1 IPAS siRNAの低酸素応答に対する効果

(2) 活性酸素種(ROS)スカベンジャーである N-アセチル-L-システインや PI3 キナーゼ特異的阻害剤によって RPMI 培地におけるコバルトによる IPAS の誘導が消失することがわかった。このことからコバルト処理によって引き起こされる ROS-PI3 キナーゼ経路の活性化が IPAS の誘導に関わっていることが示唆された。またカルシウムチャンネルは細胞外マグネシウムイオンによって普段は閉ざされているが、繰り返しの入力でマグネシウムイオンがはずれることでカルシウムを流入させることが知られている。そのため、この経路の関与を推測して、カルシウムチャンネルの阻害剤を細胞に投与したところ、特に T-type カルシウムチャンネルの阻害剤によって IPAS の誘導が消失することがわかった。また逆にカルシウムイオノフォアのような強制的に細胞内カルシウム濃度を上昇させる薬剤によって DMEM 培地でも IPAS 発現が誘導されることがわかった。さらに PI3 キナーゼ経路とカルシウムシグナルの下流で NF- $\kappa$ B が活性化しており、NF- $\kappa$ B を阻害することで IPAS の誘導が阻害されることも突き止めた (図 2)。

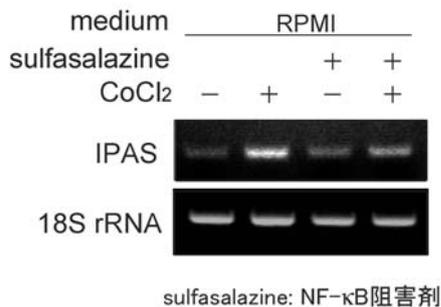


図2 IPASの発現誘導に対するNF- $\kappa$ Bの関与

ゲノム上の IPAS の遺伝子の配列の制御下で発現するルシフェラーゼを用いた解析は現在進行中である。

(3) 培養細胞を低酸素濃度(1%酸素濃度)下に曝したが、マグネシウム依存的な低酸素応答の欠如は見られなかった。その後、コバルトによる HIF-1 の活性化が ROS 依存的であることを示す結果が得られたので、活性酸素を引き起こすことが知られている間欠的低酸素下に細胞を曝したところ、マグネシウム依存的な低酸素応答の欠如が起こった。IPAS の誘導には ROS-PI3K シグナル経路の活性化が必要なこととも一致する結果である。

(4) 低マグネシウム血症のマウスにコバルトを注射するか、慢性間欠的低酸素環境に曝した後に、解剖し、副腎と頸動脈小体を解析し

た。両方の臓器で低酸素応答の欠如が観測された (図 3-5)。

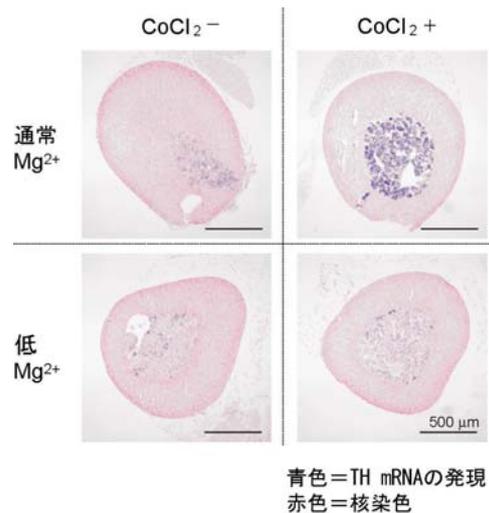


図3 マウスの副腎での低酸素応答の欠如

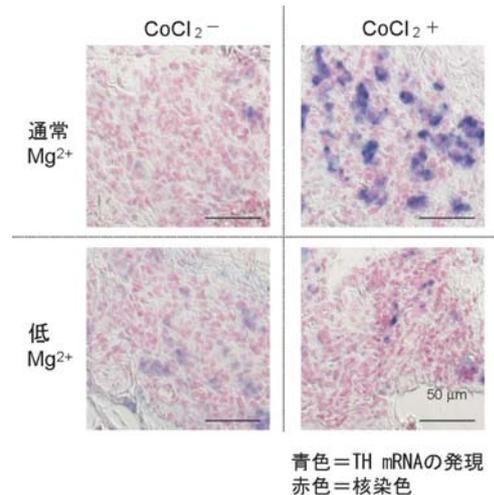


図4 マウスの頸動脈小体での低酸素応答の欠如

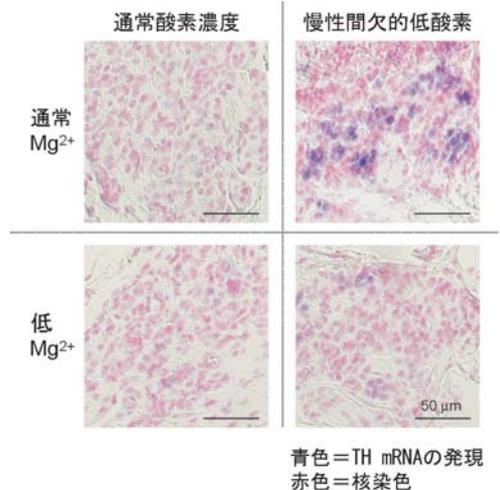


図5 マウスの頸動脈小体での慢性間欠的低酸素応答の欠如

この結果はマグネシウムと低酸素応答との繋がりを報告した初めての研究であり、つい最近に学術雑誌において発表された。今後は低マグネシウム状態が細胞、固体に及ぼす影響をさらに解析することで、疾患研究への貢献に繋がることが期待される。

#### 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)

①鳥居暁、小林健太郎、高橋正之、片平香澄美、御領憲治、松下夏樹、安元研一、藤井義明、十川和博、Magnesium Deficiency Causes Loss of Response to Intermittent Hypoxia in Paraganglion Cells、Journal of Biological Chemistry、in Press、doi/10.1074/jbc.M109.004424、査読有り

②安元研一、木幡勇介、吉田敦、鳥居暁、十川和博、Role of the intracellular localization of HIF-prolyl hydroxylases、Biochimica et Biophysica Acta、1793、792-797、2009、査読有り

[学会発表] (計1件)

①鳥居暁、慢性間欠的低酸素応答性チロシン水酸化酵素誘導に対するマグネシウム要求性に関する解析、BMB2008、2008年12月12日、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/molbiol/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鳥居 暁 (TORII SATORU)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：10444001