

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750367

研究課題名(和文) 老化と鉄：活性酸素シグナルによる鉄代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in cellular iron metabolism

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、鉄代謝調節機構における活性酸素シグナルの役割を明らかにし、加齢に伴う鉄代謝異常の病態メカニズムを解明することである。本研究によって、鉄代謝調節タンパク質IRP1が、活性酸素種の刺激によりリン酸化などの翻訳後修飾を受けて機能変化することを明らかにした。さらに、脂質過酸化産物である4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal)が、IRP1の機能を強力に阻害すること、鉄取り込みの輸送体を減少させることが分かった。これらの結果から、酸化ストレスが鉄代謝調節タンパク質IRP1の機能変化を通して鉄代謝に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the relationship between reactive oxygen species (ROS) and iron metabolism in age-related disturbance of iron metabolism. It was shown that the 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ), a superoxide generator, and ammonium tetrathiomolybdate (TTMo), an inhibitor of superoxide dismutase, induced the phosphorylation of iron regulatory protein 1 (IRP1) via protein kinase C (PKC) activation. In addition, treatment with 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), an end product of lipid peroxidation, inhibited IRP1 activity and caused a decrease in expression of iron transporters. These results suggest that ROS control iron metabolism through IRP1 regulation.

研究分野：複合領域

キーワード：酸化ストレス 鉄代謝

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (ROS) は、生体分子にダメージを与えて、酸化ストレスを亢進させる悪玉因子として考えられていた。しかし、近年、ROS が多彩な生理機能を担うシグナル伝達分子 (ROS シグナル) として働いていることが分かってきたことから、その発生と消去のバランスの制御機構の重要性が注目されている。生理的なシグナル伝達の制御のためには、シグナル伝達分子の産生と消去のバランスが重要である。また、ROS がシグナル伝達分子として機能するためには、ROS に可逆的に応答して特異的な作用を示す ROS シグナル受容分子の存在が必要である。

これまでに研究代表者は、ROS 消去系を構成する抗酸化酵素である Cu/Zn-Superoxide dismutase (SOD1) のノックアウトマウス (SOD1KO マウス) を用いて、組織における酸化ストレスと SOD1 を代償するような抗酸化酵素の誘導メカニズムの解析を行ってきた。この研究の中で研究代表者は、SOD1KO マウスの腎臓には比較的若齢 (8~12 週齢) のうちから鉄が沈着していることを発見し (Yoshihara et. al., Free Radic Biol Med., 2009) その原因が鉄代謝調節タンパク質 IRP1 (Iron regulatory protein 1) の機能変化である可能性があることを報告してきた (Yoshihara et. al., Free Radic Res., 2012)。

ヒトを含む多くの動物種において、加齢に伴って組織への鉄蓄積や鉄欠乏などの鉄代謝異常が起こる。鉄は生命維持に必須の栄養素である一方で、過剰な鉄は生体内において ROS の発生源となるため、その代謝は厳密に制御されていなければならない。加齢に伴う鉄代謝異常は、加齢による生体機能の低下 (= 老化) を促進する。しかしながら、加齢に伴って起こる鉄代謝異常の病態メカニズムは未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鉄代謝調節機構における活性酸素種 (ROS) と抗酸化酵素の役割を明らかにし、様々な疾患や加齢に伴う鉄代謝異常の病態メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレスが鉄代謝にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、ヒト腎由来 HEK293 細胞を種々の ROS に暴露して、鉄代謝関連分子の発現がどのように変化するのかを解析した。(RT-PCR および Western blot 法)

培養細胞を過酸化水素、DMNQ (スーパー

オキシド発生剤) を添加した培地で培養 (0.5~24h) して、経時的にサンプル採取を行い、IRP1 の IRE への結合能 (Gel Shift assay による IRP1 タンパク質の RNA への結合量の評価)、細胞内鉄量、脂質過酸化物の生成量および鉄代謝関連分子の発現を解析した。

培養細胞を 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal)、MDA (malondialdehyde) などの脂質過酸化物を添加した培地で培養 (0.5~24h) して、経時的にサンプル採取を行い、IRP1 の IRE への結合能 (Gel Shift assay による IRP1 タンパク質の RNA への結合量の評価)、細胞内鉄量、脂質過酸化物の生成量および鉄代謝関連分子の発現を解析した。

(2) 蛍光標識タンパク質 (GFP-IRP1) 蛍光標識 IRE (Cy3-RNA プロブ) を使って、ROS 刺激による IRP1 の機能の変化をタイムラプスシステムにより断続的に解析した。また、脂質過酸化物の生成もリアルタイムで蛍光検出して、脂質過酸化物の生成が IRP1 の機能にどのように影響していくのかを測定した。本実験では、蛍光標識分子同士が結合したときの FRET (Fluorescence resonance energy transfer: 蛍光エネルギー移動) を測定することにより、IRP1 の IRE への結合をリアルタイムにモニタリングした。

(3) 酸化ストレス亢進状態が、鉄代謝をどのように変化させていくのかを明らかにするために、鉄と反応するプロブを取り込ませた細胞に、種々の酸化ストレスに暴露して細胞内への鉄の取り込みを継続的に観察した。(共焦点レーザー顕微鏡などを使用)

(4) ROS や脂質過酸化物などによって、IRP1 がどのような翻訳後修飾を受けるのかを解析した。まず、培養細胞にタグ付き IRP1 タンパク質 (FLAG タグ、GST タグ、HIS タグなど) を発現させて、ROS や脂質過酸化物を添加した培地で培養した。次に細胞溶解液を調整し、そこから IRP1 を精製して質量分析計などを用いて翻訳後修飾の解析を行った。

(5) 鉄代謝異常を呈するモデルマウスを複製し、IRP1 の機能変化と鉄代謝異常の病態進展との関連を調べた。

4. 研究成果

ヒト腎由来 HEK293 細胞を、スーパーオキシド発生剤である DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone) を添加し

た培地で培養したところ、IRP1 が活性化した。IRP1 の活性化は培地への DMNQ の添加から 1 時間程度で最大になり、その後は低下した。DMNQ の添加によって IRP1 がどのように変化したのかを調べたところ、IRP1 の 711 番目のセリン残基がリン酸化されていることを見出した。IRP1 の 711 番目のセリン残基 (Ser711) は、PKC (Protein kinase C) によるリン酸化修飾を受ける部位であることが予測されている。そこで、PKC 刺激剤である PMA を添加した培地で HEK293 細胞を培養したところ、DMNQ の時と同様に IRP1 がリン酸化されることが確認できた。また、PKC 阻害剤であるスタウロスポリンやロツテルリン添加は、DMNQ による IRP1 のリン酸化を抑制すること、IRP1 の活性化状態を持続させることを見出された。これらのことから、IRP1 の Ser711 のリン酸化は、酸化ストレスによる IRP1 の活性化を抑制するような役割を果たすことが示唆された。

次に、慢性的な酸化ストレス亢進状態が鉄代謝に与える影響を明らかにするために、脂質過酸化物質である 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) を添加した培地で、HEK293 細胞を培養し、IRP1 の機能や鉄代謝がどのように変化するのかを解析した。その結果、4-HNE が IRP1 の活性を強力に抑制することを発見した。さらに 4-HNE が、細胞内への鉄の取り込み分子の発現を低下させることを見出した。現在、4-HNE がどのようなメカニズムで IRP1 を不活化するのかを解析している。

酸化ストレスの亢進状態が鉄代謝にどのように影響するのかを経時的に観察するために、鉄に反応する蛍光プローブを取り込ませた HEK293 細胞に酸化ストレスを負荷して細胞内の鉄動態を観察した。その結果、細胞内の酸化ストレス亢進によって、細胞内へ鉄の取り込みが促進されている可能性があることが分かった。また、ROS 刺激による IRP1 の機能 (IRP1 の RNA への結合能) の変化をタイムラプスシステムにより断続的に解析することを試みたが、FRET 現象を検出することはできなかった。

生体内において IRP1 がどのような翻訳後修飾を受けているのかは分かっていない。そこで、酸化ストレスを負荷した細胞や SOD1KO マウス、鉄代謝異常のモデルマウスなどから IRP1 を精製し、質量分析計を用いて翻訳後修飾の解析を試みた。しかしながら、今回の検討では、有用なデータを得ることはできなかったため、酸化ストレス負荷の条件や IRP1 の発現および精製条件の再検討を行っている。また、酸化ストレスの亢進によって Ser711 以外のリン酸化修飾が起こるのかどうかを Phos-tag システムを用いて検討した。その結果、酸化ストレスにより Ser711 以外の

リン酸化修飾が引き起こされる可能性があることが分かったため、引き続きリン酸化部位の同定と反応に關与するキナーゼ分子の同定を進めている。

本研究によって、酸化ストレスが鉄代謝調節タンパク質 IRP1 の機能変化を通して鉄代謝に影響を与えていることが示唆された。IRP1 は ROS シグナルの受容分子として酸化ストレスと鉄代謝異常とを結びつけている可能性があり、本研究の成果は加齢に伴う鉄代謝異常のメカニズム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)

[学会発表](計 6 件)

吉原大作、藤原範子、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎、SOD1 欠損が脳内モノアミン代謝に与える影響、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日～10 月 18 日、京都府京都市 (国立京都国際会館)

吉原大作、藤原範子、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎、酸化ストレスが細胞内鉄イオン動態に与える影響、第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会、2014 年 9 月 4 日～9 月 5 日、京都府京都市 (同志社大学 今出川キャンパス 良心館)

Daisaku Yoshihara、Noriko Fujiwara、Haruhiko Sakiyama、Hironobu Eguchi、Keiichiro Suzuki、Alterations in renal iron metabolism caused by SOD1 deficiency、SFRR12014、2014 年 3 月 23 日～3 月 26 日、京都府京都市 (国立京都国際会館)

吉原大作、藤原範子、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎、SOD1 欠損が脳機能に与える影響、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～9 月 13 日、神奈川県横浜市 (パシフィコ横浜)

Daisaku Yoshihara、Noriko Fujiwara、Hiroyuki Iso、Nobue Kitanaka、Junichi Kitanaka、Hironobu Eguchi、Haruhiko Sakiyama、Motohiko Takemura、Keiichiro Suzuki、Neurobiological and behavioral changes in SOD1 knockout mice、Neuro2013、2013 年 6 月 20 日～6 月 23 日、京都府京都市 (国立京都国際会館)

吉原大作、藤原範子、加藤信介、崎山晴彦、江口裕伸、鈴木敬一郎、酸化ストレス亢進が鉄代謝調節機構に与える影響、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、2013 年

6月13日～6月14日、愛知県名古屋市(ウ
ィンクあいち)

〔図書〕(計1件)

吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎、酸
化ストレスの医学(吉川敏一監修、改訂
第2版)、診断と治療社、2014、456(21-29)

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