

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19433

研究課題名（和文）鉄代謝システムの包括的理解をめざした鉄代謝関連分子の網羅的同定

研究課題名（英文）Towards an understanding of iron metabolism: comprehensive identification of iron-related molecules

研究代表者

諸石 寿朗（Moroishi, Toshiro）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：30647722

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、細胞内の鉄量を鋭敏にモニタリングするレポーター細胞を作出し、このシステムを用いて全ゲノムを対象としたCRISPR遺伝学的スクリーニングを実施し、細胞内の鉄量を増減させる作用のある分子の網羅的探索を行った。細胞内の鉄量に変化を与えた候補分子のインフォマティクス解析を行った結果、細胞内の鉄量を増減する分子は成長因子やサイトカインシグナルなどの細胞内シグナル伝達経路に関連するものが多く含まれることを見出した。本研究の遂行により、細胞内シグナル伝達経路と鉄代謝制御の深い関連性が浮き彫りになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄は生命活動に必須の微量元素で、生命はその起源から鉄を利用して代謝活動を行ってきたと考えられている。また、ヒトにおける鉄代謝異常症は貧血や発がん、神経変性疾患などの様々な病態に関与することが注目されているが、その疾患発症の分子メカニズムはあまり明らかになっていない。本研究により得られた成果は、鉄代謝ネットワークを形成するひとつひとつの構成分子を明らかにすることで鉄代謝制御機構に関する学術的理解を深めるだけでなく、今回同定された個々の分子を基盤に将来的な研究を進展させることによって、鉄代謝異常によるヒト疾患発症メカニズム解明への一助となることも期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed a reporter system that monitors intracellular iron concentration. By taking advantage of this system, we have conducted a CRISPR-based whole genome knockout screen to identify molecules that regulate the amount of intracellular iron dynamics. Those candidates include molecules involved in intracellular signal transduction, such as growth factor and cytokine signaling. Our study has revealed a reciprocal interaction between intracellular signaling pathway and iron metabolism.

研究分野：基礎医学

キーワード：鉄代謝 ゲノム編集 ライブラリースクリーニング シグナル伝達経路

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は生体に必須の微量元素であり、生命はその期限から鉄を利用して代謝活動を行ない生命を維持していたとされる。一方、鉄の過剰はフリーラジカルの産生源となるため、細胞内鉄代謝は厳密に調節される必要がある。鉄代謝制御異常による鉄の欠乏や過剰は、ヒトにおいて貧血や発がん、および神経変性疾患などの様々な病態に関与することが注目されているが、その疾患発症の分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。この一因として、細胞における鉄代謝動態の全体像把握に未だ多くの謎が残っていることが挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では「鉄代謝制御システムの包括的理解」をめざし、細胞内の鉄量の変化に影響を与える分子を全ゲノムを対象とした遺伝学的スクリーニングにより網羅的に抽出することを目的とした。本研究の遂行によって鉄代謝ネットワークを形成するひとつひとつのパズルピースが浮き彫りになり、現状の鉄代謝においてブラックボックスになっている多くの謎への手がかりが得られることを期待し、以下の到達目標を設定した。

1. 細胞内鉄量を可視化するレポーターシステムを構築する
2. 遺伝学的スクリーニングにより鉄代謝関連分子群を同定する
3. 同定された新規の鉄代謝関連分子の機能を明らかにする

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内鉄量を可視化するレポーターシステムを構築する

ユビキチンリガー FBXL5 は細胞内の鉄量に応じてその存在量に変化することが知られており、この制御機構には FBXL5 に存在するヘムエリスリンドメインへの鉄の結合が重要である [Science 326, 722-726, 2012]。そこで、ヘムエリスリンドメインと蛍光タンパク質を結合させた融合遺伝子を作成し細胞に導入することで、細胞内の鉄量に応じて蛍光タンパク質の発現量を変化させるレポーター細胞を作成し、その特性を評価した。また、CRISPR ライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングを行うために、レポーター細胞に tet レプレッサーとテトラサイクリン誘導性の Cas9 発現コンストラクトを導入した。

### (2) 遺伝学的スクリーニングにより鉄代謝関連分子群を同定する

作出した鉄レポーター細胞に、176,500 種類の sgRNA を含むヒト CRISPR ライブラリーを使用し、全ゲノムを対象とした遺伝子変異を導入した。その後、蛍光強度が増加した上位 5% と、逆に減少した下位 5% の細胞集団をセルソーターでそれぞれ分離・培養し、ソーティング前の細胞集団とソーティング後の細胞集団からそれぞれゲノム DNA を抽出した。CRISPR 法による遺伝子変異の導入に使用された sgRNA 配列を次世代シーケンサーで比較解析することにより、鉄量が増加・減少したそれぞれの細胞集団に導入された遺伝子変異を調べ、鉄代謝関連分子のリストを作成した。

### (3) 同定された新規の鉄代謝関連分子の機能を明らかにする

スクリーニングによって得られた細胞内鉄量を増減する候補因子を用いてインフォマティクス解析を行い、候補分子の機能的な分類や、既存の鉄代謝関連分子との関係性を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内鉄量を可視化するレポーターシステムを構築する

ヘムエリスリン GFP 融合タンパク質を Hygromycin 薬剤選択を利用して HEK293A 細胞に導入し、その後単一細胞のクローニングを行った。40 以上のクローンに関して鉄濃度の変化に対する蛍光強度の変化を比較したが、クローンによってその応答性は様々であったため、鉄過剰と鉄欠乏状態で蛍光強度の重複がほとんどないクローンを選定し以下の実験に使用した (図 A)。次に、選定した細胞に tet レプレッサータンパク質 (Neomycin 選択)、テトラサイクリン誘導性の Cas9 発現コンストラクト (Blasticidin 選択) を導入し、再度単一細胞のクローニングを行った。得られた 100 種以上のレポーター候補細胞の中から、Cas9 の発現誘導性を指標に、5 個程度の候補を絞りこんだ (図 B)。そして、それぞれの細胞に既知の sgRNA 配列を導入し、CRISPR による遺伝子欠損の効率を指標に最終的なレポーター細胞を選定した。このようにレポーター細胞を単一のクローンに統一することにより細胞の質を均一にし、遺伝子変異の導入によるレポーター細胞の蛍光強度の変化を鋭敏に検出することが可能になった。

### (2) 遺伝学的スクリーニングにより鉄代謝関連分子群を同定する

作出した鉄レポーター細胞に、176,500 種類の sgRNA を含むヒト CRISPR レンチウイルスライブラリー (Puromycin 選択) を導入した。次に、培養上清へのドキシサイクリンの添加により Cas9 発現を誘導させ、全ゲノムを対象とした遺伝子変異を導入し、その結果レポーター細胞の蛍光強度が増加した上位 5% と、逆に減少した下位 5% の細胞集団をセルソーターでそれぞれ分離・培養した (図 C)。その後、ソーティング前の細胞集団とソーティング後の細胞集団からそれぞれゲノム DNA を抽出・増幅し (図 D)、CRISPR 法による遺伝子変異の導入に使用された sgRNA 配列を次世代シーケンサーで比較解析した。その結果、遺伝子欠損により細胞内の鉄量を増加させた因子として 68 個、鉄量を減少させた因子として 34 個の候補因子をそれぞれ有意差をもって同定した。これらの候補分子の中には既知の鉄代謝関連タンパク質に加えて、これまで鉄代謝制御との関連があまり明らかになっていない分子も多く含まれていた。

### (3) 同定された新規の鉄代謝関連分子の機能を明らかにする

遺伝子欠損により細胞内鉄量を増加させる候補因子のインフォマティクス解析を行った結果、PI3K-Akt 経路に関連する分子が多く含まれていることを見出した。また、遺伝子欠損により細胞内鉄量を減少させる候補因子も同様に、成長因子やサイトカインシグナルに関わるもの、およびインスリンシグナルに応じた細胞内への糖の取り込みに関わるものが多く含まれていた。さらに肝臓において FBXL5 を欠損するマウスは鉄の過剰な蓄積から肝臓がんの進行が促進されるが [J. Exp. Med. 216, 950-965, 2019]、このマウスの肝臓では種々のシグナル応答が変化していることを見出している。また、同様に FBXL5 を脳で欠損し鉄が蓄積したマウスは生直後に死亡するが、このマウスでは PI3K-Akt-mTOR シグナルの変化を認めている [Mol. Cell. Biol. 37, e00470-16, 2017]。これら一連の研究結果は、種々の細胞内シグナル伝達経路と細胞内鉄動態に双方向性の積極的なクロストークが存在する可能性を示唆しており、シグナル伝達

経路と鉄代謝制御の深い連関が浮き彫りになった。今後、本研究により同定された個々の分子を基盤に確認実験を発展させることにより、鉄代謝制御の複雑なネットワーク解明への一助となることが期待される。

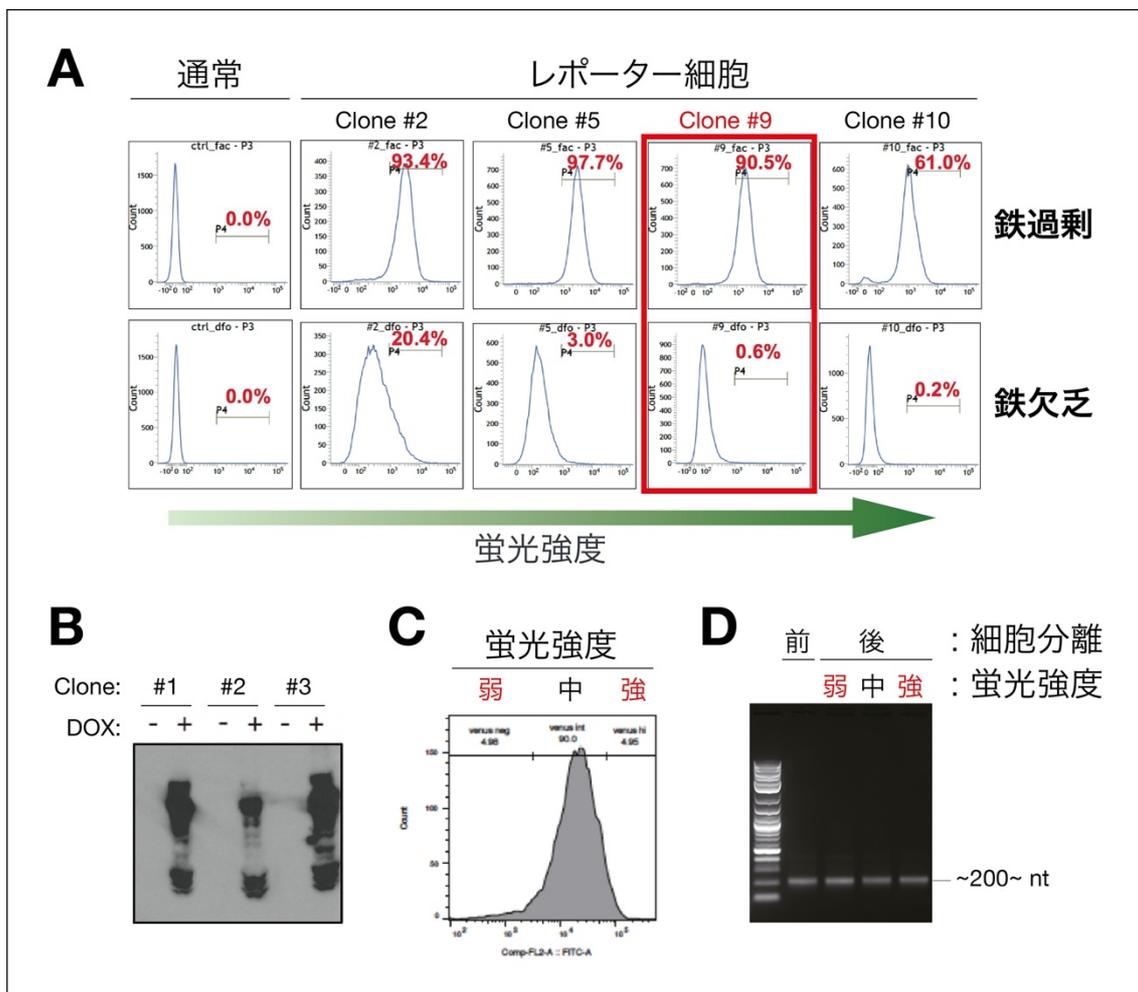


図 | **A.** 鉄濃度をモニタリングするレポーター細胞のフローサイトメーター解析、**B.** 薬剤誘導性 Cas9 発現細胞のウエスタンブロッティング法による選定、**C.** 全ゲノムを対象とする遺伝子変異導入後の鉄蛍光レポーター強度のフローサイトメーター解析、**D.** レポーター細胞に導入された sgRNA 配列の増幅

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Muto Yoshiharu*, Moroishi Toshiro*, Ichihara Kazuya, Nishiyama Masaaki, Shimizu Hideyuki, Eguchi Hidetoshi, Moriya Kyoji, Koike Kazuhiko, Mimori Koshi, Mori Masaki, Katayama Yuta, Nakayama Keiichi I. (*Equal contribution)	4. 巻 216
2. 論文標題 Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 950 ~ 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20180900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mon Ei Ei, Wei Fan-Yan, Ahmad Raja Norazireen Raja, Yamamoto Takahiro, Moroishi Toshiro, Tomizawa Kazuhito	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulation of mitochondrial iron homeostasis by sideroflexin 2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 359 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0652-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学 大学院生命科学研究部 シグナル・代謝医学講座 <a href="https://www.moroishi-lab.com">https://www.moroishi-lab.com</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----