

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15810

研究課題名（和文）鉄代謝制御による細胞増殖制御機構とその生理機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cell proliferation control mechanism and its physiological function by iron metabolism

研究代表者

山内 隆好（Yamauchi, Takayoshi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：60747624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内鉄濃度の変動が細胞増殖を制御する分子機構の手がかりを得ることを目的として、(1)細胞内鉄濃度の増減を蛍光強度に反映する、「FBXL5鉄レポーター細胞株」を樹立し、(2)それを利用してCRISPRライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングを行った。スクリーニングの解析結果から得られた遺伝子のリストを検討すると、上位および下位5%にそれぞれ入っている事が想定される既知の鉄代謝関連因子の多くが得られなかった事から、各種条件検討の必要性が示唆された。しかしながら、得られた候補遺伝子は、新規の鉄代謝関連増殖制御因子として今後細胞レベルで検討する価値のあるものである事が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、これまでに明らかとなっていなかった細胞増殖能の変化に関与する鉄代謝関連因子の候補が得られた。今後、これらの候補因子の妥当性が確かめられれば、細胞内鉄の非可逆的な増減からくる細胞増殖制御機構を既存の因子との関連性を含めて解析することが可能となる。また、同分子機構が関与する癌や神経疾患、鉄欠乏性貧血などの病態との関連性についての手がかりが得られることが期待される。また、FBXL5鉄レポーター細胞株や作成過程で使用された分子生物学的知見を別の種類のスクリーニングやライブラリーに適用していくことで、鉄代謝制御機構の更なる解析の展開も想定される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project is to obtain clues to the molecular mechanism by which fluctuations in intracellular iron concentration control cell proliferation. At first, (1) "An FBXL5 iron reporter cell line" was established to reflect the increase/decrease in intracellular iron concentration in the fluorescence intensity, and (2) it was subjected to genetic screening using a CRISPR library. From the list of novel genes obtained from the screening analysis results, there were no known iron metabolism-related factors that are expected to be in the top and bottom 5%, respectively, suggesting various other conditions need to be examined. However, it is considered that the candidate gene obtained in this experiment is worth investigating at the cellular level in the future as a novel iron metabolism-related growth regulator.

研究分野：応用分子細胞生物学関連

キーワード：細胞増殖 鉄代謝 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

鉄は生体内に最も多く含まれる必須微量元素で、その増減は細胞増殖と密接な関わりがあることが古くから知られている。われわれは過去の研究で、細胞内の鉄代謝がユビキチンリガーゼ **FBXL5** によって厳密に制御されていることを発見し、**FBXL5** を欠損したマウスの脳では細胞内鉄量の増加により神経幹細胞の異常な増殖が認められることを見出した[Yamauchi et al., *Mol. Cell. Biol.* 37, e00470-16 (2017)]。しかしながら、細胞内の鉄動態が細胞増殖を制御する際の分子機構はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、鉄代謝が細胞増殖を制御する際の分子機構の理解を目指している。具体的には、①遺伝学的手法による細胞内鉄量に応じた蛍光タンパク質の強弱を示す細胞株の樹立、並びに②その細胞株の性質と **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。解析結果からは、鉄による細胞増殖の制御に関わる分子群が同定されることが想定される。

3. 研究の方法

本研究では、鉄動態に応じた細胞増殖能の制御に関わる分子群を同定するため、鉄代謝経路の下流で細胞の増殖を制御する新たな分子を **CRISPR** ライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングで網羅的に探索している。まず、細胞内鉄濃度依存的に細胞内蛍光強度が変化する鉄センサータンパク質 (**FBXL5** タンパク質内のヘムエリスリンドメイン) および **Cas9** を恒常的に発現する細胞を作成した (図1)。

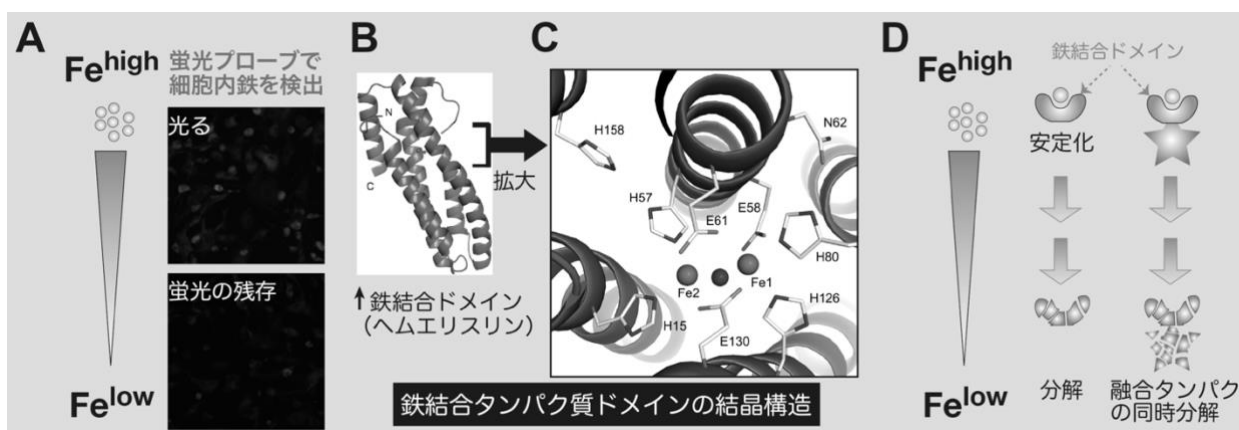


図1：FBXL5による細胞内鉄濃度の感知 | (A) 現行の細胞内鉄検出プローブでは鉄濃度の違い(写真の上下)による蛍光強度の識別可能範囲が狭い。(B) 他の研究グループにより明らかにされた鉄結合タンパク質ドメインの結晶構造。(C) (B)で示された結晶構造中の鉄イオン結合部位の拡大図。ヒスチジンとグルタミン酸を中心としたアミノ酸の側鎖が形成するポケットに2つの鉄イオンが取り込まれる。(D) 細胞内鉄濃度が高くなると **FBXL5** の鉄結合タンパク質ドメインに鉄が結合し安定化し、逆に細胞内鉄濃度が低くなると融合タンパク質ごと細胞内で分解を受けることが明らかとなっている。

その後、作成した一連の細胞株群へそれぞれ **FBXL5** 遺伝子のノックアウトを行い、実際に **FBXL5** 欠損による鉄代謝制御の破綻で蛍光強度の変化が効率良く認められるものを比較検討しに選定した。その後、選定した細胞へ実際に **CRISPR** ライブラリー [*Cell* ;163(6):1515-26 (2015)] を導入し、1つ1つの細胞で各々1つの遺伝子をランダムに不活性化させた細胞を作成した (図2 A)。引き続き7日間細胞培養を行い細胞増殖を誘導した後に、ライブラリー中の特定の遺伝子の欠損により細胞蛍光強度が著しく増減した細胞をフローサイトメトリーにより分取した。分取した細胞よりゲノム DNA を抽出後、**CRISPR** ライブラリー特異的なプライマーにより **PCR** 増幅し次世代シーケンスによる解析を行うことで候補分子のリストを得た。

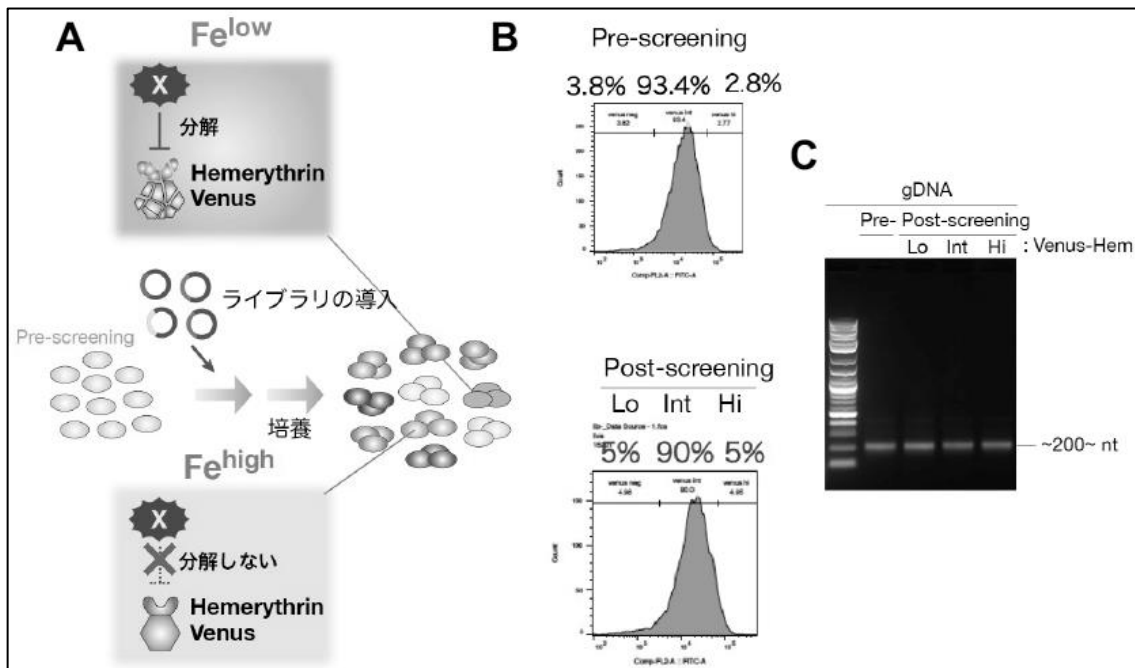


図2：FBXL5 鉄レポーター細胞株と CRISPR ライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニング | (A) Cas9 タンパク質の発現誘導や鉄濃度依存的な蛍光強度の変化が確かめられた FBXL5 鉄レポーターのクローン細胞株へ CRISPR ライブラリーを導入し、ゲノム中の個々の遺伝子を各々の細胞でランダムに欠損した。その後、ライブラリー中の各遺伝子のノックアウトとそれに伴う細胞増殖の変化、蛍光強度の変化を誘導した後、(B) フローサイトメトリーによる解析を行った。解析対象の基準としては、上位および下位 5% に含まれる各蛍光強度を基準とし、更に比較対照としてスクリーニング前の細胞集団も同じ基準で同時に分取した。(C) 分取した各細胞集団から抽出したゲノム DNA には理論上一細胞につき一種類の CRISPR ライブラリーがウイルスベクターにより組み込まれているため、組み込まれた CRISPR ライブラリーの両端に設計した特異的なプライマーセットを用いてノックアウトされた遺伝子に対する配列の領域 (200 塩基長) を PCR 反応により伸長し、得られた増幅産物を精製した。精製 DNA はその後、次世代シーケンサーにより配列解析にかけ、データベースとの照合で上位および下位 5% に含まれる細胞ではどの遺伝子がノックアウトされていたかについてのリストを得た

4. 研究成果

まず、①鉄代謝の上流制御因子である FBXL5 鉄レポーター細胞の作成・改良を行い、それらが CRISPR スクリーニングに問題なく使用できるかどうかの評価を行った。問題ないことが確かめられた FBXL5 鉄レポーター細胞へ幾つかの遺伝子発現ベクターを用い、薬剤 (ドキシサイクリン) 特異的に Cas9 を誘導可能な FBXL5 鉄レポーター細胞株を作成した。作成した細胞株クローンの中から最も有用な細胞株クローンを選定した後、今度はスクリーニング前のポジティブコントロールとして FBXL5 特異的なガイド RNA を導入し、FBXL5 を細胞内で欠損させた際の鉄濃度の変化を実際に蛍光強度に反映するかどうかその有用性を試験した。実際にドキシサイクリン依存的な FBXL5 の欠損とその下流因子 (IRP2 および Tfr1) の変化が想定通り認められた細胞株を選別して本番のスクリーニング用として保存した。

その後、それら最終的に選定した鉄依存的レポーター細胞株へガイド RNA ライブラリーをウイルスベクターを用いて導入し個々の細胞で 1 つ 1 つランダムに異なる遺伝子を欠損させた後、蛍光強度の高いものと低いもの、それぞれ 5% をフローサイトメトリーにて選択的に採取した (図 2)。採取した細胞から得たゲノム DNA の精製と組み込まれたライブラリー遺伝子の情報を高速シーケンサーにより同定・解析した。解析の結果、上位および下位 5% にそれぞれ入っている事が想定される既知の鉄代謝関連因子群の多くが認められなかった事から、各種条件検討の必要性が示唆された。しかしながら、本実験にて得られた候補遺伝子は、新規の鉄代謝関連増殖制御因子として今後細胞レベルにおいて検討する価値のあるものである事が考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamauchi Takayoshi、Moroishi Toshiro	4. 巻 169
2. 論文標題 The Yin and Yang of tumour-derived extracellular vesicles in tumour immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 155 ~ 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa132	査読の有無 無
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 Yamauchi Takayoshi、Moroishi Toshiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 398 ~ 398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8050398	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------