

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15044

研究課題名（和文）希少修飾を介した革新的なトランスフェリンレセプター制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Innovative Transferrin Receptor Regulation Mechanisms via Rare Modifications

研究代表者

前本 佑樹（Maemoto, Yuki）

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：90742619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では当初の計画通り、細胞内の鉄の調節に重要な膜タンパク質であるトランスフェリンレセプター（以下、TfR）のリジンアシル化を安定して検出する方法を確立することができ、アシル化がTfRの機能を抑制することが明らかになった。TfRの既存の代謝メカニズムでは急激な細胞内の鉄含量調節に対して、即効性がないことが考えられたが、本研究による翻訳後修飾による制御機構がタンパク質自体の活性に影響を与えることにより、その即効性を補強することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスフェリンレセプターは細胞内外の鉄代謝以外にもドラッグデリバリーのレセプターとしての研究など、様々な応用研究が盛んに行われている。本研究により明らかになった制御メカニズムは広く応用できる可能性を秘めている。さらにがん細胞のフリーラジカルの発生を促しフェロトーシスを起こすアルテスネートによりTfRがS-パルミトイル化されることが報告されており、鉄誘導性の細胞死にTfRが影響を与えることも示唆されている。新たなメカニズムによるがん細胞の細胞死のコントロールできる可能性もある。また、膜貫通のタンパク質の長鎖リジンアシル化はこれまで報告がなく、世界初の発見である。

研究成果の概要（英文）：As originally planned, this study established a stable method to detect lysine acylation of transferrin receptor (TfR), a membrane protein important for intracellular iron regulation, and revealed that acylation suppresses TfR function. However, the present study suggests that the regulatory mechanism by post-translational modification of TfR may reinforce the immediate effect by affecting the activity of the protein itself.

研究分野：細胞生物学

キーワード：長鎖アシル化 細胞内膜輸送 翻訳後修飾 トランスフェリンレセプター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄 (特に鉄(II)イオン) は生体内で活性酸素を生み出すことから、過剰な鉄は細胞のがん化を促進する。鉄代謝の中心は鉄応答タンパク質の IRP (iron-regulatory proteins) であり、トランスでリンレセプター (以下、TfR) の mRNA の IRE (iron response elements) に結合することにより、TfR の mRNA レベルが調節され、鉄-フェリチン複合体を取り込む量と細胞内鉄が調節される。TfR は細胞膜-エンドソーム間をリサイクルするが、TfR は半減期が遅く、代謝に即効性がないことから、「TfR の mRNA レベルの調節では鉄代謝の全てを説明できず、翻訳後修飾により TfR の機能が何らかの制御を受ける」可能性があると考えに至った。従って、TfR の転写、翻訳調節以外の鉄取り込み活性の調節メカニズムの存在が考えられた。

2. 研究の目的

TfR の質量分析解析により TfR の細胞質ドメインのリジン残基が長鎖アシル化されることを発見した。リジンの長鎖アシル化は数件のみが報告されている希少な修飾であり、酵素により制御される修飾である。主な酵素としては NAD⁺ 依存的なリジン脱アセチル化酵素であるサーチュインや亜鉛依存的なリジン脱アセチル化酵素である HDAC などがある。TfR の翻訳後修飾については十分に研究が進んでおらず、どのように TfR による鉄取り込みが制御されているかは未知の部分が多い。本研究で TfR のリジンアシル化修飾は、鉄代謝の重要な制御機構であるかを検討する。

3. 研究の方法

リジン長鎖アシル化の検出はクリックケミストリーを利用した方法で検出する。FLAG タグのついた TfR を細胞に発現させ、アルキンを付加したパルミチン酸 (Alk-14) を細胞に処理した。細胞を破碎し FLAG 抗体で免疫沈降し、蛍光標識アジドと反応させることで修飾依存的なバンドの検出を行う。機能解析については修飾を受けるリジン残基をアルギニン残基に変異させた KR 変異体や TfR ノックアウト細胞に野生型及び、変異体を用いた入れ直し実験により行った。TfR の機能解析は蛍光標識トランスフェリンを用いた取り込み実験等により行った。

4. 研究成果

(1) リジン長鎖アシル化検出

質量分析により発見されたパルミトイルされた細胞質領域の K58 と K60 をアルギニンに置換した 2KR 変異体および、同定部位に加えてその近くに存在する K39 と K53 もアルギニンに置換した 4KR 変異体を作製した。クリックケミストリーを用いた手法で、アシルの検出を行った。その結果、野生型ではリジンアシル化修飾依存的なバンドを検出したが、2KR および 4KR 変異体ではバンドのシグナル強度が低下した。したがって、質量分析により同定した 2 つのリジン残基が主にアシル化修飾を受けることが明らかになった。

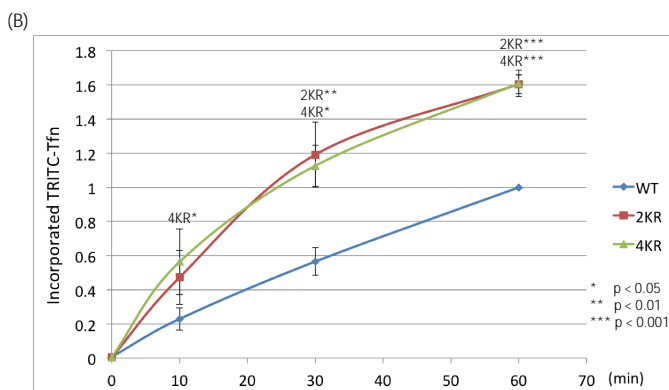
(2) 野生型と KR 変異体によるトランスフェリン輸送の経時観察

TfR のリジン残基パルミトイル化によるエンドサイトーシス機能の影響を調べるため、トランスフェリンの取り込み量を検討した。GFP タグを融合させた TfR の野生型、2KR および 4KR 変異体をそれぞれ安定的に発現させた HeLa 細胞を用いて、蛍光顕微鏡により観察した。その結果、野生型と比較して 2KR および 4KR 変異体では、トランスフェリン処理 30 分後と 60 分後に、細胞内に取り込まれたトランスフェリン量が多かった。したがって、TfR のリジン残基パルミトイル化は、エンドサイトーシスを抑制することが示唆された。

さらに、リサイクリング機能に対する影響を調べるため、トランスフェリン処理 60 分後以降の細胞内に残存しているトランスフェリン量を検討した。その結果、野生型と KR 変異体間で顕著な差が見られなかったことから、リジン残基パルミトイル化はリサイクリングには関与しないことが示唆された。

(3) リジンアシル化の制御メカニズムの解析

鉄キレート剤添加時の TfR の局在およびトランスフェリンの取り込みに関する解析を行った。細胞内外の鉄の状況により TfR が制御されているか確認するため、細胞内外の鉄をキレートする試薬の Deferoxamine (DFO) で処理を行った。すると野生型はトランスフェリンをほとんど取



り込まないのに対して 2KR および 4KR 変異体では、DF0 存在下でもトランスフェリンの取り込みが見られた。また、その際に、2KR および 4KR 変異体と比べて野生型 TfR は細胞膜への局在が増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------