

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591052

研究課題名（和文） 赤血球分解と産生過程における鉄循環機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the iron recycling mechanism in the degradation and production process of red blood cell

研究代表者

岸 文雄 (KISHI FUMIO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40153077

研究成果の概要（和文）：本研究では、極性細胞でのヘム輸送体の詳細な局在を解析し、HCP1 が食餌中からの主なヘム輸送体であることを明らかにした。また、極性細胞で DMT1 が細胞膜に輸送されるために必要な領域を示し、N 末端細胞内ドメインに在る Leu16 が重要であること証明した。さらに、網膜色素変性症を伴う脊髄後索型運動失調症 (PCARP) で発見されたヘム輸送体 FLVCR1 の変異が、FLVCR1 の局在異常をおこすことで、FLVCR1 の機能的喪失につながることを証明した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the localizations of heme transporters in polarized cells, and found that HCP1 has a role in the uptake of dietary heme. We found that Leu16 at N-terminal cytosolic domain of DMT1A-I was crucial for its plasma membrane localization. Moreover, we analyzed the function of the FLVCR1 mutants identified in posterior column ataxia and retinitis pigmentosa (PACARP) patients and found that their loss of heme export activity is caused by their missorting in the cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学

1. 研究開始当初の背景

体内では鉄は主に骨髄系での赤血球合成に利用され、またミトコンドリア呼吸鎖の補酵素としても用いられる。ヒトは主に二つの経路から得られた鉄を利用している。一つ目に毎日食餌中から吸収される 1～2mg の鉄である。鉄イオンは十二指腸吸収上皮細胞頂端側に存在する鉄輸送体 DMT1 により上皮細胞に

取り込まれ、ヘムはヘム輸送体(未だ不確定)によって吸収される。二つ目は、マクロファージに貪食された老化赤血球が分解されて鉄として再利用される経路である。老化赤血球の分解により生じた鉄量は一日に必要な鉄量の 95%以上を占める。ヘムの細胞内取り込みに必要なヘム輸送体の候補としては、現在までに Heme carrier protein 1 (HCP1) と Heme

responsive gene-1 (HRG-1)の2種類の分子が報告されているもののヒトでの詳細な機能については未だ不明である。ヘム分解酵素 HO の細胞内局在について様々な報告がなされており、細胞内のどの領域でヘムの分解が行われているかについても不明である。また最近、新たに三つ目の鉄供給手段として血中フェリチンが注目されている。しかし、フェリチン受容体を介した鉄の取込み機構や受容体の発現調節機構の解明など多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では以下の3つの点に注目し、ヒトの赤血球産生に関わるメカニズムを鉄代謝の観点から統括的に分子レベルで明らかにすることを目的とする。そのために以下の3項目について明らかにするよう、研究を進めていく。

(1) マクロファージでの老化赤血球から鉄を回収する機構の解明

(2) 赤血球成熟過程における鉄取込み機構の解明

(3) フェリチン受容体を介した新たな鉄取込み機構の解明と血中フェリチン値の変動機構の解明

3. 研究の方法

(1) 鉄イオンおよびヘムの細胞内への取り込み機構を明らかにするため以下の2項目について研究を行う。

① ヘム輸送体 HCP1・HRG-1、ヘム分解酵素 HO の非極性・極性細胞での局在の解析：非極性細胞として HEP-2 細胞、極性細胞として MDCK 細胞を使用し、それぞれに HCP1、HRG-1、HO、DMT1 を発現させ、その局在解析を行う。

② DMT1 の細胞膜輸送機構の解析：DMT1 には4つのアイソフォームがあり、そのうち DMT1A-I は極性細胞で頂端膜に局在し、食餌中の鉄の取り込みを行っていると考えられている。そこで、DMT1A-I が細胞膜に局在する機構を、種々の DMT1A-I 変異体を作成して解析する。

(2) 網膜色素変性症を伴う脊髄後索型運動失調症 PCARP で発見されたヘム輸送体 feline leukemia virus subgroup C receptor 1 (FLVCR1) 変異体の機能解析について、以下の2項目について研究を行う。

① FLVCR1 変異体のヘム排出機能の解析：FLVCR1 変異体発現細胞を作成し、蛍光ヘム類似体を用いて、ヘムの排出能力について検討する。また過剰なヘムは細胞毒性を示すこと

を利用し、ヘム毒性に対する抵抗性の違いを比較検討する。

② FLVCR1 変異体の局在およびタンパク質の安定性の解析：

FLVCR1 変異体を培養細胞に発現し、その局在解析を行う。また、FLVCR1 変異体の分子安定性をウェスタンブロット法により解析する。

4. 研究成果

本研究課題より、(1) 極性細胞でのヘム輸送体の局在、(2) DMT1A-I の頂端膜への輸送に必要な領域、(3) PCARP 患者で発見された FLVCR1 変異体の機能および局在、について明らかにすることができた。

(1) 極性細胞でのヘム輸送体の局在

現在までに知られているヘム輸送体には HCP1 と HRG-1 がある。食餌中からヘムとして取り込まれる鉄量は、取り込まれる全鉄量の60%にのぼり、非常に重要な鉄の取り込み戸口である。しかし、どのような分子が食餌中のヘムの取り込みを担っているかは明らかではなかった。そこで、HCP1、HRG-1 を発現する MDCK 細胞を作成し、極性化させたのち、その局在解析を行った。その結果、HCP1 は頂端膜に HRG-1 は側底膜に局在することが明らかになった (図1)。

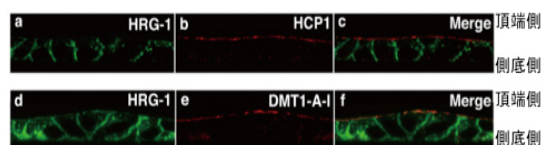


図1 極性化MDCK細胞におけるヘム輸送体の局在

また、ヘム分解酵素 HO についても局在解析を行ったところ、HO は主に滑面小胞体に局在していることが判明した。これにより、食餌中からのヘムの取り込みは HCP1 が行っており、細胞質内に取り込まれた後、HO によって分解されていることが示唆された。

(2) DMT1A-I の頂端膜への輸送に必要な領域

DMT1 には4つアイソフォームがあり、N 末端、C 末端の数十アミノ酸の違いにより、異なる局在を示す。その中で、DMT1A-I は十二指腸などの吸収上皮細胞の頂端膜に局在し、食餌中の鉄イオンの取り込みを行う分子と考えられている。そこで DMT1A-I の N 末端細胞質領域に注目し、種々の欠損株を培養細胞に発現させ、局在解析を行った。その結果、16 番目のアミノ酸を Leu から Ala に置換するだけで、DMT1A-I が細胞膜へ局在しなくなることが判明した。また、極性細胞においても Leu16Ala 変異体は頂端膜に局在しなくなり、このアミノ酸は DMT1A-I が細胞膜に局在するために非常に重要であることがわかった (図2)。

sequence	localization
WT MRKKQLKTEAAPHCCELKSYKNSATQVST	plasma membrane
Δ2-6 M _____KTEAAPHCCELKSYKNSATQVST	plasma membrane
Δ2-12 M _____HCELKSYKNSATQVST	plasma membrane
Δ2-18 M _____YSKNSATQVST	late endosome/lysosome
Δ2-24 M _____TQVST	late endosome/lysosome
Δ25-29 MRKKQLKTEAAPHCCELKSYKNSA _____	plasma membrane
Δ19-29 MRKKQLKTEAAPHCCELKS _____	plasma membrane
Δ13-29 MRKKQLKTEAAP _____	late endosome/lysosome
H13A MRKKQLKTEAAPHCCELKSYKNSATQVST	plasma membrane
C14A MRKKQLKTEAAPHAELKSYKNSATQVST	plasma membrane
E15A MRKKQLKTEAAPHCALKSYKNSATQVST	plasma membrane
L16A MRKKQLKTEAAPHCALKSYKNSATQVST	late endosome/lysosome
K17A MRKKQLKTEAAPHCALSYKNSATQVST	plasma membrane
S18A MRKKQLKTEAAPHCALKSYKNSATQVST	plasma membrane

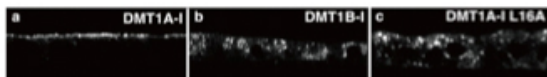
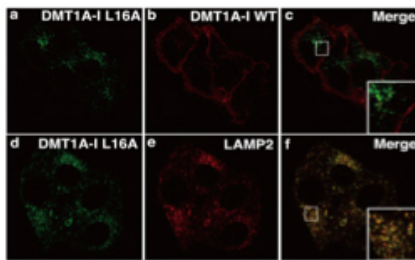


図2 DMT1A-Iの細胞膜局在化にはLeu16が重要である

(3) PCARP患者で発見されたFLVCR1変異体の機能および局在

2010年と2011年に網膜色素変性症を伴う脊髄後索型運動失調症(PCARP)家系の遺伝子解析が行われた結果、FLVCR1に4種類のアミノ酸置換を伴う変異が報告された。そこで、これらFLVCR1変異体のヘム排出能力を、蛍光ヘム類自体を用いて解析したところ、FLVCR1変異体ではヘム排出能力が著しく低下していた。またFLVCR1変異体発現細胞では、ヘム毒性に対する抵抗性が顕著に低下していた。以上のことから、FLVCR1変異体はヘム排出能力を喪失していることが明らかとなった。そこで、その原因を明らかにするために、FLVCR1変異体の局在解析を行った。その結果、野生型FLVCR1は細胞膜に局在するものの、FLVCR1変異体は、いずれも細胞内に線維状に存在し、一部はリソソームへの局在が観察された。さらに、FLVCR1変異体のタンパク質安定性を解析したところ、いずれも野生型と比較して有意に分子安定性の低下を認めた。以上のことから、FLVCR1変異体発現細胞では、細胞内のヘムを細胞外に排出できないために、細胞障害を引き起こしている可能性が示唆された(図3)。

(4) 本研究のインパクトおよび、今後の展望

ヘム輸送体の詳細な局在解析は、ヘム輸送体の存在が証明されて数年たったのちも、明らかにされていなかった。本研究での、HCP1およびHRG-1の局在解析の結果、吸収上皮細

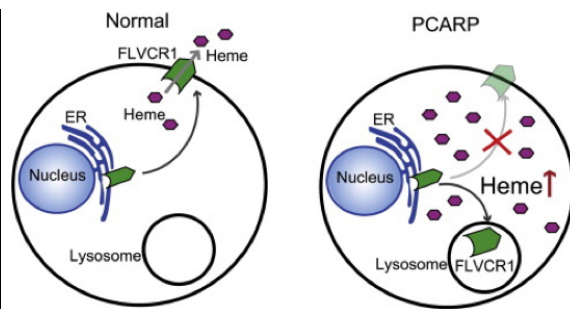


図3 PCARPにおけるFLVCR1変異体の動向

胞でのヘムの取り込み機構の解明がさらに進むものと考えられる。今後はHCP1やHRG-1の発現調節機構を含め、ヘム負荷時にどのような挙動をとるかについて解析をすすめる必要がある。

DMT1A-Iの細胞膜局在に重要な領域の解析は、この分子が十二指腸上皮細胞において頂端膜からの鉄イオンの取り込みに関わっていることを裏付ける重要な証明となった。今後は、このDMT1の領域に結合し、DMT1を細胞膜にとどめておく結合分子を明らかにすることで、さらに十二指腸上皮細胞での鉄の取り込み機構の解明をすすめていく。

PCARPで発見されたFLVCR1変異体の機能解析は世界に先駆けて行った研究であり、FLVCR1の変異が疾患を引き起こしている可能性を示すことができた。しかし、PCARP患者では、貧血や鉄過剰症などの鉄代謝異常を疑わせる症状は見られない。そのことから、FLVCR1変異によって喪失したヘム排出能を、代替的に補う機構が存在する可能性がある。そこで、今後は、PCARP患者由来の細胞や、FLVCR1変異体発現動物を用いて、FLVCR1とPCARPとの関連性を探索する必要がある。

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 Yanatori I, Yasui Y, Miura K, Kishi F. Mutations of FLVCR1 in posterior column ataxia and retinitis pigmentosa result in the loss of heme export activity. *Blood Cells Mol Dis*. 査読有, vol. 49, No. 1, 2012, pp60-66. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.03.004.
- ② Yanatori I, Tabuchi M, Kawai Y, Yasui Y, Akagi R, Kishi F. Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC Cell Biol*. 査読有, Vol. 11, 2010, pp39. doi: 10.1186/1471-2121-11-39.

[学会発表] (計4件)

- ① 築取 いくみ, 安井 ゆみこ, 三浦 公志郎,

岸 文雄 網膜色素変性症を伴う脊髄後索型運動失調症(PCARP)におけるヘム輸送体 FLVCR1 の役割 第36回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 9/1/2012 札幌市

② 築取 いずみ, 安井 ゆみこ, 三浦 公志郎, 河合 泰宏, 岸 文雄 ヘム輸送体 Feline leukemia virus, subgroup C, receptor 1 (FLVCR1)の機能解析 第34回日本分子生物学会年会、12/15/2011 横浜市

③ 築取 いずみ, 安井 ゆみこ, 三浦 公志郎, 河合 泰宏, 岸 文雄 十二指腸における鉄吸収機構 第35回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 9/11/2011 徳島市

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸 文雄 (KISHI FUMIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：40153077

(2)研究分担者

築取 いずみ (YANATORI IZUMI)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：40454847

(3)連携研究者

()

研究者番号：