

氏名	みずたに あつし 水谷昌志
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第484号
学位授与の日付	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	細胞の鉄イオンの変動に応答する分子の機能解析 (主査)
審査委員	教授 竹谷 茂 教授 山口政光 教授 伊倉宏司

論文内容の要旨

本研究は低酸素条件と細胞内の鉄代謝および利用との関連性を明らかにする目的で、以下に示す二種類の研究を行った。

- (1) 転写調節因子 Pleomorphic adenoma gene (PLAG) family のひとつである PLAG-like2 (PLAGL2) の動態と機能調節
- (2) シトクロム b₅₆₁family の膜タンパク質 101F6 の機能解明

第一に、Pleomorphic adenoma gene (PLAG) family のひとつである PLAG-like2 (PLAGL2)について調べた。PLAGL2 タンパク質は 7 つの C₂H₂ ジンクフィンガーモチーフを含み、DNA 結合性および転写促進活性を示す。また、PLAGL2 は低酸素および鉄欠乏に応答して発現する。そこで、PLAGL2 のターゲット遺伝子を同定するために、マウス PLAGL2 cDNA をマウス纖維芽細胞 Balb/c 3T3 およびマウス神経芽腫細胞 Neuro2a に導入した。その細胞を TUNEL 解析、DNA 断片解析および annexin V 染色によって調べた結果、両細胞ともアポトーシスが誘導されていた。また、鉄キレーターである desferrioxamine を用いて Balb/c 3T3 細胞および Neuro2a 細胞を処理したところ、PLAGL2 タンパク質の核局在およびアポトーシスの誘導がみられた。PLAGL2 を発現した Balb/c 3T3 細胞では、アポトーシス関連因子で Bcl-2 と 2 量体を形成することで知られる Nip3 の mRNA の発現が誘導された。Nip3 の mRNA の発現は、desferrioxamine を用いて処理した細胞においても誘導された。さらに、PLAGL2 は hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) とは独立して、低酸素応答領域 (hypoxia-responsive element) を含む Nip3 プロモーターを活性化した。PLAGL2 を発現させた細胞に同時にマウス Nip3 mRNA のアンチセンスオリゴヌクレオチド導入したところ、センスオリゴヌクレオチド導入細胞に比べてアポトーシス細胞が少なかった。低酸素下では DNA-HIF-1 結合活性がみられるが、PLAGL2 を発現させた細胞では HIF-1 の增加および HIF-1 の活性化はみられなかった。以上の結果により、PLAGL2 は細胞内の反応系において HIF-1 よりも下流に位置し、HIF-1 のアポトーシス作用の強化に関与することが示唆された。

第二に、101F6 は、2 個のヘム結合部位を有するシトクロム b₅₆₁ と高い相同意を示すヒスチジン残基が保存された 6 回膜貫通型の蛋白質として登録されている。101F6 の推定分子量は 25 kDa の蛋白質であって、微生物に発現させた 101F6 の性質を調べたところ、149 番目のヒスチジン残基の欠損によってヘム結合性が失われることが明らかになった。101F6 の mRNA はマウスの多くの

組織において発現しており、特に肝臓、腎臓および肺では顕著である。また 101F6 の mRNA は、種々の培養細胞においても発現していた。101F6 cDNA を Balb/3T3 細胞に導入すると、101F6 は核周囲のエンドソームや小胞体に発現した。もう 1 つのシトクロム b_{561} ホモログである SDR-2 も、同様に小胞に発現した。101F6 の発現場所を調べたところ、transferrin receptor-1 とは常に同じではなかったが、heme oxygenase-1 とは似ていた。101F6 あるいは SDR-2 を発現した細胞では、鉄イオンおよびアゾ化合物の還元活性の増加がみられた。すなわち、101F6 および SDR-2 はともに細胞内小胞に局在して三価鉄イオンの還元に関与して細胞への鉄輸送に関与することが分かった。

論文審査の結果の要旨

鉄は生命の維持や増殖に必須な元素であり、種々の酵素反応や物質代謝などに作用することが知られている。鉄イオンの酸素を始めとするガスに対する親和性や電子伝達に関与する研究が多くなされている。しかしながら、鉄欠乏に対する細胞応答や遺伝子発現については不明な点が多い。本研究では、第一に、低酸素条件と細胞内の鉄代謝の変動に伴う遺伝子発現の調節機構を調べるために鉄欠乏誘導調節因子 Pleomorphic adenoma gene (PLAG) -1 like2 (PLAGL2) の動態を検討した。PLAGL2 をマウス繊維芽細胞やマウス神経芽腫細胞に発現させた所、両細胞ともアポトーシスが誘導されることを見い出した。これは、鉄キレーター処理によるアポトーシスの誘導と一致した。この時、アポトーシス促進因子 Nip3 の mRNA の発現が誘導された。また、PLAGL2 作用は低酸素応答因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) とは独立してを見い出した。以上の結果は、PLAGL2 は細胞内の反応系において HIF-1 よりも下流に位置し、HIF-1 によって腫瘍抑制に関与することが示唆された。

第二にシトクロム b_{561} family の一つの膜タンパク質である 101F6 の鉄輸送機能の解明を試みた。101F6 はヒスチジン残基が保存された 6 回膜貫通型の蛋白質として登録されているが、149 番目のヒスチジン残基の欠損によってヘム結合性が失われた。101F6 cDNA を Balb/3T3 細胞に導入すると、101F6 は核周囲のエンドソームや小胞体に発現し、 b_{561} ホモログの一つである SDR-2 と一致した。また 101F6 あるいは SDR-2 を発現した細胞では、鉄イオンおよびアゾ化合物の還元活性の増加がみられた。従って、101F6 や SDR-2 はともに細胞内小胞に局在して三価鉄イオンの還元に関与して細胞への鉄の取り込みに関与することを明らかにした。

これらの研究の成果は、下記の国際生命科学雑誌 2 編に公表されている。

「公表論文」

1. A Zinc-finger Protein, PLAGL2, Induces the Expression of a Proapoptotic Protein Nip3, Leading to Cellular Apoptosis. A. Mizutani, T. Furukawa, Y. Adachi, S. Ikehara, and S. Taketani (2002) J. Biol. Chem. 277, 15851-15858.
2. Involvement of 101F6, a Homologue of Cytochrome b_{561} , in the Reduction of Ferric Ions. A. Mizutani, R. Sanuki, K. Kakimoto, S. Kojo, and S. Taketani, (2007) J. Biochem. 142, 699-705.

「参考論文」

1. Rapid Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein with Heme and Hemoproteins: Formation of the Fluorescein is Independent of the Generation of Reactive Oxygen Species. T. Ohashi, A. Mizutani, A. Murakami, S. Kojo, T.

- Ishii and S. Taketani (2002) FEBS lett. 511, 21-27.
2. Galectin-1 Induces the Cell Adhesion to the Extracellular Matrix and Apoptosis of Non-adherent Human Colon Cancer Colo201 Cells. N. Horiguchi, K. Arimoto, A. Mizutani, Y. Endo, H. Nakada and S. Taketani (2003) J. Biochem. 134, 869 - 874.
3. Low- and High-levels Expressions of Heme Oxygenase-1 in Cultured Cells under Uninduced Conditions. Y. Andoh, H. Suzuki, M. Araki, A. Mizutani, T. Ohashi, T. Okumura, Y. Adachi, S. Ikehara and S. Taketani (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 722-729.
4. An Antioxidant Role of a Reagent, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescin Diacetate Detecting Reactive-oxygen Species, Blocking the Induction of Heme Oxygenase-1 and Protecting Cytotoxicity. Y. Andoh, A. Mizutani, T. Ohashi, S. Kojo, T. Ishii, Y. Adachi, S. Ikehara and S. Taketani (2006) J. Biochem. 40, 483-489.
5. Heme Synthase (Ferrochelatase) Catalyzes the Removal of Iron from Heme and Demetallation of Metalloporphyrins. S. Taketani' M. Ishigaki' A. Mizutani" M. Uebayashi, M. Numata, Y. Ohgari and S. Kitajima (2007) Biochemistry 46, 15054-15061.