

博士論文審査報告書

論文題目

微小環境ストレスに応答する
細胞代謝制御に関する研究

Studies on the cellular metabolism
controlled by microenvironmental stress

申請者

吉岡	祐亮
Yusuke	Yoshioka

生命理工学専攻 分子生理学研究

2013年 7月

生物の個体を構成する個々の細胞内では、あるいは細胞と細胞の間では、膨大な数の調節系が稼働して生体恒常性が維持されている。生体調節系を担う蛋白質、脂質、糖質や、これらの複合体の生合成は、遺伝情報にしたがって発現する蛋白質が主に担う。調節系を担う蛋白質の量や活性は、転写、翻訳、翻訳後のそれぞれの段階で制御されている。生物が進化するに連れて、個体が備える生体調節系はより複雑になる。2003年のヒトゲノム解読以後、ヒトの蛋白質をコードする遺伝子数は2万個程度であると予想された。ヒトの全構成細胞数は約60兆個であるが、一個体が約千個の細胞から成る線虫の遺伝子数はおよそ1万9千個である。したがってヒトと線虫とでは構成細胞数に大きな差がありながら、遺伝子数はほぼ同じである。このことから、生物の仕組みの複雑さは単純に遺伝子数で決まるのではなく、調節系を担う分子群の発現制御に大きく依存すると考えられるようになった。21世紀になって、ヒトゲノムに大量に含まれる非翻訳領域の生物機能が注目されるようになった。なぜならば蛋白質に翻訳されない非翻訳RNA (non-coding RNA) の数は、生物の複雑さと相関するからである。非翻訳RNAの一種、マイクロRNA (miRNA) は、標的となる遺伝子 (mRNA) のごく短い相補的塩基配列を認識し、その発現に干渉する。標的配列が短いため、理論上、一つのmiRNAは、数百以上の分子を標的としうる。このことから、miRNAは様々な調節系を複雑に微調整する新たなクラスの生体調節分子である、と想定できる。miRNAの研究によって、様々な生体恒常性の維持や異常や、がんを含む疾患の発症や病態の理解が進む期待があるが、世界的にも実験的検討は着手されたばかりである。本研究は腫瘍細胞を対象にして、miRNAが関与する低酸素環境と鉄代謝に関与する生体恒常性の未知の調節様式を解析した。さらに、miRNAの細胞間移動を担う細胞外小胞エクソソーム (exosome) の特性をも明らかにした。

第1章では、miRNAの研究の歴史、発現制御、機能について概説している。さらに鉄代謝や低酸素環境への細胞応答に関する知見をまとめ、miRNA、低酸素環境と鉄代謝の調節連鎖を論じ、本研究の意義を位置づけている。

第2章では、数あるmiRNAのうち、miR-210を研究対象に選択した経緯と期待を述べている。赤血球造血では多くの鉄が赤血球前駆細胞内に取り込まれ、寿命の尽きた赤血球は破壊、貪食された後、ヘモグロビンの鉄は代謝系で再び回収される。赤血球造血と鉄代謝制御は、それぞれ独立したネットワークで調節されつつ緊密に連鎖する。一方miR-210は、赤血球系細胞系譜に特異的に発現し、赤血球造血亢進時に発現上昇するmiRNAとして同定された (小坂ら, 2008)。そこで鉄代謝系におけるmiR-210の役割の解明に着手した。相前後して、miR-210は低酸素環境下の細胞で発現が誘導されることや、miR-210の発現上昇が乳がんや膵臓がんの予後不良と相関することも報告された。したがってがん細胞の悪性化機序においてmiR-210の機能解明が重要と考えられた。

第 3 章では、miR-210 の発現制御機構を明らかにしたことを述べている。盛んに増殖するがん細胞は組織の低酸化を起こし、鉄の取り込みとその利用が促進する。一方、細胞内の鉄が不足すると、本来、低酸素環境になると作動する転写因子、低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor 1 α : HIF-1 α) の蛋白質安定性が増すことが知られている。そこで、低酸素環境下および鉄欠乏時におけるヒトがん細胞の miR-210 の発現を調べた。乳がん細胞株、前立腺がん細胞株を、酸素濃度 1% の低酸素環境下で培養後、あるいは鉄キレート剤デスフェロキサミン (Desferrioxamine: DFO) を添加して鉄欠乏状態にして培養後、miR-210 を定量した。その結果、通常の 20% 酸素培養時に比べて miR-210 の発現が亢進した。HIF-1 α の発現を siRNA によって抑制すると、miR-210 の発現は減少した。このことから酸素および鉄の欠乏時に miR-210 の発現を誘導する転写因子として、HIF-1 α が候補として浮上した。そこでルシフェラーゼをレポーター遺伝子にして、miR-210 の発現プロモーター領域を解析した。その結果、酸素および鉄の欠乏時に、miR-210 の転写開始地点から一番近傍に存在する HIF-1 α 結合コンセンサス配列 ACGTG に HIF-1 α が結合し、miR-210 の転写が制御されることを明らかにした。

第 4 章では、鉄代謝系における miR-210 の標的分子の同定と、鉄恒常性調節の新たな様式を明らかにしたことを述べている。米国ホワイトヘッド研究所の Bartel 博士らが公開するアルゴリズム (TargetScan) を利用し、miR-210 の標的遺伝子候補を *in silico* で検索した。複数の標的候補の中でも鉄代謝に関わる分子に的を絞り、鉄 - 硫黄クラスター形成足場蛋白質 (iron-sulfur cluster scaffold protein; ISCU) に着目した。そして miR-210 が ISCU の mRNA に直接結合してその発現を抑制することを実験的に証明した。鉄-硫黄クラスターは鉄制御蛋白質 1 (iron regulatory protein 1; IRP1) と結合し、トリカルボン酸回路のアコニターゼを構成する。鉄欠乏などで鉄-硫黄クラスターが不足すると、IRP1 は単分子となって鉄貯蔵分子フェリチンの mRNA に結合して発現を抑制する。同時に IRP1 は細胞内鉄輸送分子トランスフェリンレセプター 1 (TfR1) の mRNA に結合してその発現を上昇させることが知られている。このことから、miR-210 が ISCU の発現を抑制すれば、TfR1 の発現は上昇すると予測し、miR-210 過剰発現細胞で、IRP1 の活性化と TfR1 の発現を調べた。しかし予想に反して TfR1 の発現は減少した。実際に miR-210 を過剰発現させたがん細胞では、トランスフェリンの細胞内取り込みは低下した。そこで TfR1 mRNA の塩基配列を調べたところ、miR-210 の標的となる配列があることが判明した。つまり miR-210 は ISCU と TfR1 を共に標的にして発現を抑制する。その結果、miR-210 は鉄代謝系の中では TfR1 の発現に関して相反する二方向の調節を担い、過剰な鉄が細胞内に取り込まれないように微調節すると結論し、miRNA による新たな鉄代謝制御機構の存在を明らかにした。

第 5 章では、細胞外小胞であるエクソソーム “exosome” とエクソソーム

マーカーについて概説している。エクソソームは脂質二重層に包まれた細胞外顆粒であり，その生成・分泌機構に未だ不明瞭な点が多い。1980年代初期に発見された当初は細胞に由来する一種のごみと考えられていた。しかし内包される分子群は豊富であり，血液を循環するエクソソームの存在にも注目が集まりつつある。エクソソームには miRNA も内包されており，細胞・組織間で miRNA が運搬される。したがって生物において多数の標的分子の発現抑制をもって生体調節系へ関与する miRNA の機能を位置づけるためには，エクソソームに関する包括的理解が必要であると概説している。

第 6 章では，エクソソームに含まれる分子について述べている。エクソソームの共通性状を調べるために，全てのエクソソームに含まれる蛋白質（エクソソームマーカー）の同定を行った。乳がん細胞株 4 種類，乳腺上皮細胞株 1 種類，前立腺がん細胞株 3 種類，前立腺上皮細胞株 1 種類の培養上清から超遠心法により各種エクソソームを回収し，11 種類の蛋白質の発現をウェスタンブロッティング法で比較した。その結果，CD9 と CD81 は全細胞株由来のエクソソームに多量に含まれており，エクソソームマーカーとして有用であると結論した。

最終章では，環境に応答する細胞の調節系において，miRNA を新たな調節分子として位置づけ，エクソソームによる調節因子の運搬の仕組みとあわせて生体恒常性の新しい調節様式 of 概念をまとめ，本研究を総括している。そして本研究を端緒とする新たな研究展開の展望と期待を述べている。

以上をまとめると本研究は，細胞が受ける環境変化，特に低酸素環境や鉄欠乏状態に応答し，miRNA-210 が鉄代謝系の遺伝子発現を制御することを明らかにした。転写因子やサイトカインなどは調節系を一方向に動かすのに対し，個々の miRNA は同時に複数の遺伝子発現を多方向に制御しうる。実際に本研究は，miR-210 が 2 つの分子を標的にして鉄代謝系で相反する作用を発揮することにより，緻密な制御，すなわち微調節（Micromanaging）を担うことを示した。しかも miRNA はエクソソームに内包されて，細胞・組織間を移動する。本研究は，こうした新たなクラスの調節因子による新たな調節の様式を詳らかにし，生物が構築する複雑な調節系の仕組みを理解するための新知見を与えた。よって本論文は博士（理学）の学位論文として相応しいものであると認める。

2013 年 7 月

（主査） 早稲田大学教授	博士（理学）（早稲田大学）	加藤 尚志
早稲田大学教授	理学博士（早稲田大学）	並木 秀男
早稲田大学教授	理学博士（東京大学）	園池 公毅
早稲田大学客員教授	医学博士（大阪大学）	落谷 孝広