

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

基礎老化研究

特集企画 「レドックスシグナル」

名誉会員
寄稿文

特集企画

総説

総説

総説

総説

シンポジウム
報告

「老化研究とともに」

石井 直明

「レドックスシグナル」

活性イオウ分子によるエネルギー代謝制御

西村 明、本橋 ほづみ、赤池 孝章

酸化脂質の構造と生体への影響

加藤 俊治、伊藤 隼哉、竹腰 進、仲川 清隆

脂質酸化依存的新規細胞死フェロトーシスとリボキシトーシス

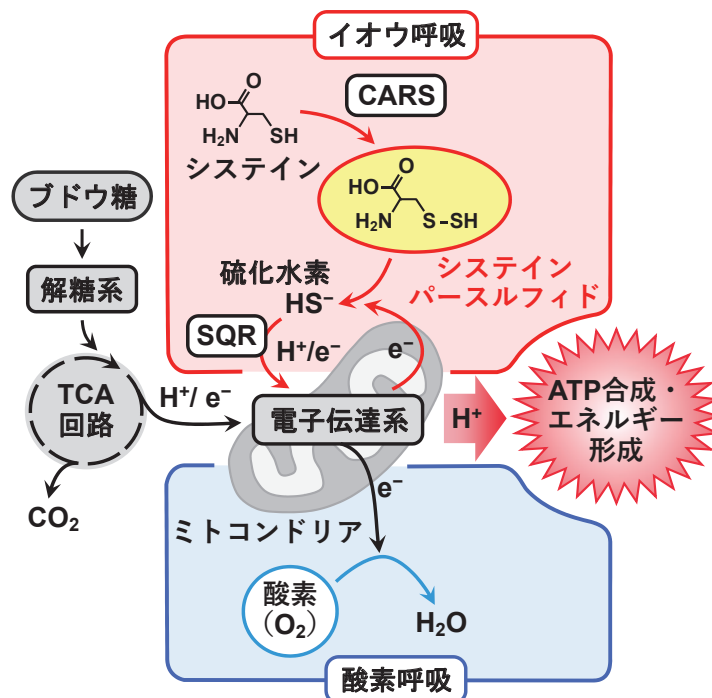
今井 浩孝

鉄代謝とその制御

宮沢 正樹

第39回日本基礎老化学会シンポジウム報告記

清水 孝彦



【重要】 日本基礎老化学会 理事選挙について 【重要】

本会理事（定員8名；2019年4月から任期2年間）の選挙を以下の通り実施します。

有権者

日本基礎老化学会正会員（2018年11月末までに会員となった者）

投票期間

2019年2月13日－20日午後5時まで

投票方法

無記名連記方式

投票方法

学会に e-mail address を登録している方

2月初旬に、投票方法を e-mail でお知らせします。

インターネットを通じて投票を行ってください。

e-mail address をお持ちでない方

2月初旬に、学会に登録した住所へ、投票用紙を郵送いたします。

記入して返送ください。

投票方法についての e-mail が届かない、あるいは、投票用紙が届かない方は、e-mail あるいは電話で下記の選挙管理委員会へお知らせください。

日本基礎老化学会 理事選挙に関する問い合わせ先は以下の通りです；

〒173-0015

板橋区栄町 35 - 2

東京都健康長寿医療センター内 日本基礎老化学会

選挙管理委員会

election@jsbmg.jp

03 - 3964 - 3241 内線 4346

(交換手に“基礎老化学会”と伝えてください)

- 編集委員会委員長： 清水 孝彦 千葉大学大学院医学研究院 内分泌代謝・血液・老年内科学
〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1
- 編集委員会委員： 赤木 一考 国立長寿医療研究センター 組織恒常性研究プロジェクトチーム
〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430
- 石井 恭正 東海大学 医学部 分子生命科学
〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143
- 柿澤 昌 京都大学大学院薬学研究科 生体分子認識学分野
〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29
- 木村 展之 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター
アルツハイマー病研究部 病因遺伝子研究室
〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430
- 多田 敬典 国立長寿医療研究センター
統合加齢神経科学研究部 神経内分泌学研究室
〒474-8511 愛知県大府市森岡町7-430
- 福井 浩二 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科
分子細胞生物学研究室
〒337-8570 さいたま市見沼区深作307
- 渡辺 信博 東京都健康長寿医療センター研究所 老化脳神経科学研究チーム
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
-

- Editor-in Chief: Takahiko Shimizu, Department of Endocrinology, Hematology and Gerontology,
Chiba University Graduate School of Medicine,
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, JAPAN
- Editors: Kazutaka Akagi, Aging Homeostasis Research Project Team,
National Center for Geriatrics and Gerontology,
7-430, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, JAPAN
- Takamasa Ishii, Department of Molecular Life Science
Tokai University School of Medicine,
143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, JAPAN
- Sho Kakizawa, Department of Biological Chemistry,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
46-29 Yoshida-Shimo-Adachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, JAPAN
- Nobuyuki Kimura, Section of Cell Biology and Pathology
Department of Alzheimer's Disease Research, Center for Development

of Advanced Medicine for Dementia,
National Center for Geriatrics and Gerontology,
7-430, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, JAPAN

Hirobumi Tada, Section of Neuroendocrinology
Department of Integrative Aging Neuroscience,
National Center for Geriatrics and Gerontology,
7-430, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, JAPAN

Koji Fukui, Molecular Cell Biology Laboratory, Division of Bioscience and
Engineering, Shibaura Institute of Technology,
Fukasaku 307, Minuma-ku, Saitama, 337-8570, JAPAN

Nobuhiro Watanabe, Aging Neuroscience Research Team
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, JAPAN

【日本基礎老化学会賛助会員一覧】

下記の諸団体が賛助会員として本学会を支えています。

賛助会員は随時募集しております。事務局にお問い合わせください。

あなたの会社も老化研究を支えてみませんか？入会をお待ちしています。

賛助会員

合同会社 オータニ

ココロ力株式会社

小林製薬 中央研究所 研究部

重岡胃腸科外科医院

日本水産株式会社

(株) ファンケル総合研究所

(株) 明治 研究本部

Medical information network

医療法人 裕和会

(50 音順)

高電位の威力

電圧のみをかける「交流高圧電界」で、身体全体を包み込むようにして治療を。

1/fゆらぎの可能性

1/fゆらぎの原理を電位治療に応用(特許取得:特許番号4179625号)。

カラダだけでなく、ココロにもやすらぎと癒しを。

「レガシス プラス」は、厚生労働省により登録された認証機関から管理医療機器クラスIIの医療機器として認証を得ています。
医療機器認証番号:218AGBZX00077000



LEGACIS

LEGACIS 低周波・電位・温熱組合せ家庭用医療機器

ココロカ株式会社はアスリートの健康管理をサポートします。



COCOROCA

ココロカ株式会社 <http://www.cocoroca.co.jp/>

〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー11F

お客様センター: 03-6711-9305 FAX: 03-6711-9325 受付時間: 月~金 9:30~18:00 (土・日・祝日・弊社特別休業日を除く)

この雑誌について（投稿される方へ）

「基礎老化研究」(Biomedical Gerontology) は、日本基礎老化学会の会誌で、年3回:1月(1号)、5月(2号)、9月(3号)に発行される。大会号は、大会時に別冊号として発刊する。内容は、本学会員より投稿された、または、本学会員及び編集委員会より依頼を受けた者からの巻頭言、総説(老化理論を含む)、トピックス、原著論文、随筆、書評、その他で構成される。但し、3号には基礎老化学会シンポジウムの抄録も掲載される。会員は簡易冊子体の配布を受け、かつ無料でオンライン版が学会HPで閲覧できる。

投稿規定

1. 全ての原稿の採用については、編集委員会で決定する。総説、トピックス、及び原著論文については、編集委員または編集委員会で依頼した審査委員による査読を行う。
2. 著者による校正は、初校時に1回行う。その際に投稿内容の大幅な追加や変更は認めないものとする。
3. 本誌に掲載された記事の著作権は、日本基礎老化学会に帰属する。但し、自身の著作を使用する場合には、本学会に断り無く自由に使用できる。
4. 目次、総説の要旨、およびトピックスの題目は日本基礎老化学会のホームページに掲載される。発行後2年経過した総説、トピックス等はインターネット上に無料で公開される。
5. 総説、トピックス、および原著論文の著者には、該当PDFファイルを無料で進呈する。別刷り希望の場合は有料(実費)となるので、投稿・原稿提出時にその旨連絡すること。
6. 原稿の執筆に際しては、本誌の執筆要領に従うこと。

執筆要領

原稿は全てワードプロセッサを使用し、横書きで作成する(原稿はデジタルファイルで提出する)。1) 第1頁には、原稿の表題、著者名、所属機関、所在地を和文と英文で、また、電話番号、FAX番号、E-mailアドレスを記載する。著者が複数の場合は、連絡先の著者を明記する。2) 第2頁にも初めに、表題、氏名を書き、その後に本文を書く。3) 本文に節を設ける場合、1.、2.、3.、・・・を付けて節を示す。以下の項目は1)、2)、3)・・・、a)、b)、c)・・・とする。また、イタリック体、ギリシャ文字、記号が正しく出力されていることに注意する。原稿はテキストファイルまたはMSワードファイル等で作成したデジタルファイルで提出する(欧語・数字は半角を用いる)。同時に提出する図・表および写真は、PDF、PPT、TIFF、JPEG形式等のデジタルファイルで提出する。オンライン版はカラー図も受け付ける。冊子体への印刷は原則、白黒またはグレースケールで行うが、カラー希望の場合は著者の負担とする。図表の挿入部位は本文中に示す。尚、本誌1ページは約1,600字に相当する。図の大きさを考慮して、全体の長さを調節すること。原稿(デジタルファイル)はE-mailに添付して送付するか、USB記憶媒体等で送ることができる。コンピュータファイルについては、印刷所あるいは編集委員会で対応できない場合は、著者に協力を求めることがある。

1. 巻頭言(展望) 刷り上がり1頁に収まるようにする。本文の長さは1,500字以内(タイトルと氏名を除く)。
2. 総説 一つのテーマについて、専門的知識に基づき、関連する多くの研究論文を総括、解説、評価した、所謂ミニレビュー。和文。
 - 1) 本文の長さ: 図、表も含めて刷り上がりで6ページ(9,600字)程度を基本とする。
 - 2) 題名: 40字以内とし、内容を的確に表したもので、且つ、読者の興味を引くよう工夫する。
 - 3) 要約およびキーワード: 要約およびキーワード(5個以内の英語)を必ず付す。要約は日本語(400字以内)、およびその英訳(200 words以内)とする。
 - 4) 用語: 本文中の用語はなるべく日本語にする。但し、欧語の方が一般的なもの、解りやすい場合は欧語でよい。外国の人名は原語、地名はカタカナで表記する。
専門術語: それぞれの専門分野の用語集に従う。動植物の学名、遺伝子名などでイタリック体で印刷されるべきものについては、原稿に下線をつけるなどして区別する。
略語: 初出箇所にフルタームの後に括弧で括った略語を記入する。可能なら日本語を入れる。文体: 「である」調とする。
数字・単位: 数字はアラビア数字とし、単位は国際単位系を用いる。
- 5) 引用・参考文献: 引用文献は論文中に引用した順に番号をつけて表示する。本文中では該当する位置に [] で括って表示する。1つの事柄に複数の論文を引用する場合には [1,5,7] または [2-6] のように記述する。著者名を引用する場合で3名以上の連名の時は、それ以下を“ら”を用いて省略する。末尾文献リストは引用した順とし、記載は以下の通りとする。未発表論文、私信は末尾文献リストには加えず、本文中の該当す

る位置に [] で括って表示する。

1. Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, *et al.* The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell* 14: 707-709, 2015.
2. Roth GS, Ingram DK and Cutler RG. Primate models for dietary restriction research. In: *Biological Effects of Dietary Restriction*, edited by Fishbein L. Berlin: Wiley, 1991, p. 193-204.
3. 仲村賢一, 下村一泉山七生貴, 田久保海誉 ヒト組織の加齢に伴うテロメア短縮. *基礎老化研究* 24:72-76, 2000.

6) 図、表、写真：そのまま印刷できるものに限る（手書きのものは受け付けない）。文献から引用する場合は、引用を明記すると共に、引用の許可が必要な場合には、著者の責任で許可を取っておくこと（許可証のコピーを原稿と共に提出すること）。白黒またはグレースケールが原則だが、オンライン版はカラー図も受け付ける。

7) 図、写真にはタイトルと説明文を付ける。

3. トピックス 最近の話題性のある研究（または雑誌記事）の紹介。長さは刷り上がり4頁以内（1,600 - 6,400字）。その他は総説に準じる。但し、要旨は不要である。
4. 原著論文 基礎老化研究に関連するオリジナル性の高い研究論文。他誌で公表された内容は受け付けない。内容は、要約、目的、方法、結果、考察、引用文献、図表、およびその説明文からなる。その他は総説に準じる。
5. 学会報告、海外便り 国内外の学術集会の紹介記事。長さは1,600字以内。留学などで滞在しているまたは過去に滞在していた研究室、訪問した研究施設の見聞の紹介記事。
6. 書評 最近出版された書籍の紹介。1,600字以内。
7. 原稿の送付およびその他の問い合わせ、下記宛てに e-mail で。

編集委員会：editor@jsbmg.jp

目 次

名誉会員寄稿文

「老化研究とともに」

石井 直明 1-4

特集企画「レドックスシグナル」 5

総説

活性イオウ分子によるエネルギー代謝制御

西村 明、本橋 ほづみ、赤池 孝章 7-12

総説

酸化脂質の構造と生体への影響

加藤 俊治、伊藤 隼哉、竹腰 進、仲川 清隆 13-20

総説

脂質酸化依存的新規細胞死フェロトーシスとリポキシトーシス

今井 浩孝 21-29

総説

鉄代謝とその制御

宮沢 正樹 31-37

シンポジウム報告

第 39 回日本基礎老化学会シンポジウム報告記

清水 孝彦 39

表紙図の説明：イオウ呼吸のモデル図（仮説）（7-12 ページの総説を参照）

【名誉会員寄稿文】

「老化研究とともに」

石井 直明

東海大学 健康学部 健康マネジメント学科

(事始め)

1975年に東海大学医学部にて鈴木曄之教授の元で研究を開始しました。鈴木先生は放射線医学総合研究所で大腸菌を使った紫外線の生物への影響の研究をされていましたが、新設された東海大学医学部では個体の老化の研究をおこないたいとのことで、まずは実験にふさわしい動物探しから始めました。その条件としては(1)飼いやすいこと、(2)寿命が適当なこと、(3)遺伝学が確立していることでした。特に今後の分子生物学の発展を見据え、分子遺伝学ができることが必須で、最初に候補に挙がったのがマウスとショウジョウバエでした。しかし、飼育の大変さやランニングコストの面で断念しました。さらに動物探しを続けているうちに浮上したのが線虫の一種、*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) でした(写真①、②)。*C. elegans*を分子生物学の実験動物として最初に選んだのがイギリスMRCのSydney Brennerで、彼が実験動物探しを始めた頃はウイルスや大腸菌などの単細胞を使った研究が全盛の時代でした。しかし、彼は将来、生命科学の研究が多細胞生物に移行することを予想し、卵も虫も体が透明で生きたまま内部を観察できる線虫に着目し、たくさんの種類の線虫の中からイギリスのBristolという町の橋の下から見つけた*C. elegans*を実験動物として選びました。彼は数多くの突然変異体を分離して遺伝学を確立し、私が医学部に就任する1年前の1974年に“Genetics”に論文を掲載していました。そのような良い機会に「我々も*C. elegans*で!」と思っていたのですが、鈴木先生の「欧米に頼らず、日本独自の線虫を使おう」という指示で、毎日のように医学部の裏の田んぼから泥水をすくっては線虫を探しました。その中でたまたま増えてきた線虫の同定を、線虫の分類学者である石橋信義(当時佐賀大学)に依頼しました。その結果、*Rhabditis*属までは判明しましたが、種までは不明とのことでした。線虫は正式に認められている種だけでも2万種類と全生物種の1%にも達し、実際には1,500万種類以上生息し、地球は線虫で覆われている

というくらい種類が多いので、新規の線虫として自由に名前をつけても大丈夫ということで、*Rhabditidae tokai*と名付けました。しかし、この虫は育ちが悪く、突然変異体がなかなか現れなかったために、結局、*C. elegans*を使うことになりました。当時、東京都老人総合研究所(現在の東京都健康長寿医療センター研究所)で*C. elegans*を使っていた細野隆次先生(その後、金沢大学)から飼育方法を学び株を譲り受け、ハーバード大学において研究を開始し、ちょうど日本に戻ってきた三輪錠司先生(中部大学)から遺伝学的手法を教わりました。この石橋、細野、三輪の3先生が日本における*C. elegans*研究の元祖だと思います。1985年にMITのHoward R. Horvitz、コロラド大学のWilliam B. Wood、カルフォルニア大学サンタクルス校のRobert S. Edgerを招き、京都大学で線虫の遺伝学講習会が開かれ、ここの参加者たちが日本の線虫研究の発展に寄与していくこととなります。

医学部開設時の鈴木研究室では、まずは老化の表現形を見てみようということで、鈴木先生も私も放射線生物学が得意分野だったので、放射線を照射しその寿命を調べる研究から開始しました。わかったのは、線虫は放射線にめっぽう強いことでした。しかし、その分子メカニズムを解くことはできませんでした。当時、分子生物学的研究といっても制限酵素は発見されていたものの、まだ研究者が使えるような時代でなかったため、DNAの研究といえば、DNAの熱変性による2本鎖から1本鎖への解離と再結合の速度が塩基のATとGCで違うことを利用し、ATとGCの含有率の違いを推測する実験くらいしかありませんでしたので、やむを得ないことでした。

現在は遺伝子と環境の両方が老化に影響していることが明らかになり、分子メカニズムも明らかになりつつありますが、当時は、分子レベルの研究手法が発展しておらず、老化の原因については仮説止まりでした。その中で、当時若手の後藤佐多良先生や三井洋司先生、近藤昊先生らが持論を展開しては激論を交わし、学会が熱気に溢れていて、毎回参加するのが楽しみでした。

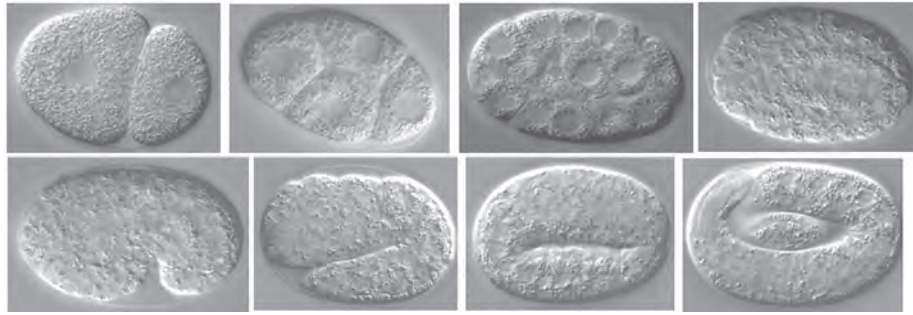
連絡先：石井直明 〒259-1292

神奈川県平塚市北金目4-1-1

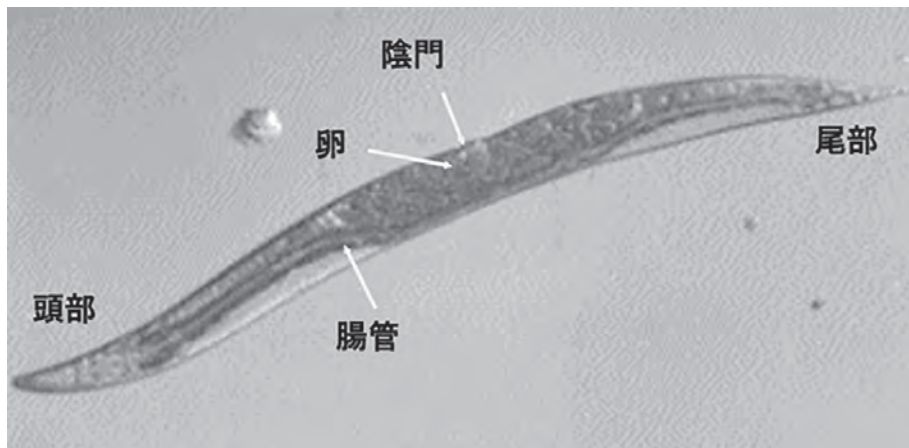
TEL：0463-58-1211 内線5729

FAX：0463-50-2259

E-mail：nao-joynet@tsc.u-tokai.ac.jp



写真① 胚発生 受精から孵化まで約 12 時間



写真② 成虫 体長約 1 mm で表皮、筋肉、消化器官、神経器官、生殖器官と、個体としての体制を持ち、体が透明なことから生きたまま内部を観察できる利点を持つ。最長寿命は約 30 日。

(次のステップへ)

ある日、鈴木先生から「老化の原因は酸素ではないか」という話がありました。それならば「酸素に高感受性の突然変異体を分離し、それが短寿命であれば実証できる」と考えました。酸素を扱ったことがなかったので、適当な酸化剤探しから始めました。私は若手のときから放射線影響学会に所属しているのですが、当時、放射線の分野は DNA 損傷修復や紫外線障害で生じる色素性乾皮症の研究が全盛期でした。その中でただ一人、京都大学の米井修治先生が酸化ストレスの発表をされていたのを奇異に感じていました。自分が酸化ストレスの研究を始めることになって、初めてその重要性に気づき、米井先生から酸化ストレスに関する教えを受け、酸化剤としてパラコートを紹介していただきました。しかし、肝心の酸化ストレス感受性の突然変異体を分離する方法をどうするかで頭を抱えました。パラコートに耐性の突然変異体の分離であれば、高い負荷をかけて生き残ったものを分離するという簡単な方法があるのですが、感受性の突然変異体の分離は、*C. elegans* が雌雄同体で自家受精することから突然変異体を得やすいという利点があるものの、非常に時間のかかる作業になります。そこで思いついたのが、卵の中には化学物質が入らないことを利用することでした。突然変異剤で変異を起こした親(P)から、卵(F3)を抱えた虫(F2)を増やし、高濃度のパラコートで暴露。早期に弱っていく虫を別のプレートに次々と

単離しました。翌日、F2の虫が死に、F3の卵が孵化して幼虫がいるプレートから虫を再度増やして、パラコートの感受性試験をしました。その中でパラコートに高い感受性を示した虫を *mev-1* と名付けました(パラコートの別名が Methyl Viologen のため)。その後、東京都健康長寿医療センター研究所の本田修二先生から酸素ガスの扱いを教わり、*mev-1* が酸素濃度依存性の短寿命突然変異体であることを突き止めました。*mev-1* の原因遺伝子がミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系複合体 II のサブユニットである *cyt-1* (マウスやヒトでは SDHC) であることを突き止めたのは、実験を始めてから 15 年も経っていました。線虫 *mev-1* の詳細や、その後作成した変異 SDHC 遺伝子を導入した培養細胞やマウスについては私や石井恭正講師がさまざまところで述べてきましたので省きますが、1956 年に Denham Harman 先生が提唱された「老化の活性酸素原因説」を分子遺伝学的に証明したことで、基礎老化学会創設者の一人であり、この説を再び世の中に出した鈴木先生への恩返しを含めて、老化研究に少し貢献できたかなと思っています。

(老化研究がもたらしてくれたもの)

私の研究のキーワードは、「線虫」、「老化」、「活性酸素」ですが、研究を始めた当初はすべてマイナーな分野でした。「線虫」は医学部の研究材料としては相応しくないと外科の教授から怒られたことがあります。当時は

C. elegans は国際会議でも参加者は 100 名にも満たない小さな分野でしたが、今では千名以上の参加者があり、6 名のノーベル医学生理学賞受賞者を輩出し、線虫はショウジョウバエやマウスに並んで生命科学のモデル実験動物として確立されました。「活性酸素」が体に有害であることを今は一般の人にも知られていますが、当時は酸素が生体に毒性を示すという考えは専門家以外にはありませんでした。「老化」は自然崩壊の現象であり遺伝子は関与しないというのが当時の一般的な考えでしたので、ある偉い先生から「線虫を使った活性酸素の研究は面白いが、老化に結び付けると結果があやふやになるので、老化というキーワードは外したほうが良い」と言われたことがあります。現在の老化研究の発展を考えると、「外さなくて良かった!」と思っています。

研究生活の中で老化の研究を中断した時期が一度だけあります。それは 1986 年から 2 年間のアメリカ留学の期間です。老化の研究は 2 年間では難しいと判断したこと、分子レベルの研究をしたいと思い、留学先をニュージャージー州にあるロッシュ分子生物学研究所に決め、そこで神経発生の研究をしました。与えられた課題は「神経の軸索の伸展をガイドする遺伝子の同定」でした。神経が発生する過程で最初にできるのがパイオニアニューロンです。この神経が体内を走れば、あとから発生する神経はこの神経をたどって伸展していきます。UNC-6 という突然変異体はパイオニアニューロンの伸展をガイドする物質が欠損しているために、神経が迷走してしまうというもので、この遺伝子の同定は R. H. Horvitz と熾烈な競争になりました。結局、私が同定に成功し、ラミニン様物質(後に鳥類の脳の研究者がネトリンと発表)であることを突き止めました。帰国直前にハーバード大学で発表し、演壇を降りたときに Horvitz から「2 年間頑張った!」と褒められたときは、アメリカに来て良かったと思いました。

アメリカ留学から帰国後、神経の研究を続けるか、老

化の研究に戻るか、ずいぶん迷いました。当時はインターネットも電子メールもなく、国際電話は 3 分間で 3,600 円、手紙を出しても半月以上待たないと返事が返ってこない時代でした。しかし、アメリカ国内ではほぼ毎日、ボス同士が電話でライバルの研究の進み具合を探るなど、最新の情報が溢れていました。日本に帰国してみると、ファクシミリが医学部の図書館と情報センターにあるだけで、アメリカからの情報がぱったりと止まってしまいました。その時、小原雄治先生(国立遺伝学研究所)が線虫研究でイギリスに留学していたので、つい愚痴の手紙を書いたら、彼からの返事は「情報は受け取るものではなく、発信するもの」。この言葉に目覚め、外部に向けて発信を始めたら、ライバルの研究者からも返事が来るなど、海外の研究情報が入ってくるようになりました。この言葉は研究者としての、私の座右の銘になっています。神経の研究は日本で一人頑張っても、直接会って頻繁に議論をしている海外のライバルたちには勝てないと考え、また待っていていた鈴木先生への恩返しと思い老化研究に専念することにし、気が付くと老化研究を始めてから 40 年を越してしまいました。

自分が分離した突然変異体の遺伝子の染色体上の位置を知るには違う突然変異体との交配実験が必要なことから、突然変異体の個人的な譲渡が頻繁に行われ、*C. elegans* 研究は自然と仲の良い分野になっていました。アメリカに *C. elegans* Genetic Center (CGC) が設置され、そこに保存されている数千の突然変異体が無料(現在は有料)で配布され、実験方法などの線虫の情報を公開しています。イギリスのサンガーセンターから線虫の cosmid DNA を送ってもらうことができますので、手間をかけずに実験に集中できます。*C. elegans* の生みの親である S. Brenner が研究を始めたとき、彼の元に世界中からポストドクが集まり、帰国後、多くの弟子たちが育ちました。それがまるで線虫の細胞系統樹(図 1)のように見えたので、*C. elegans* の国際会議で仲間の系統樹

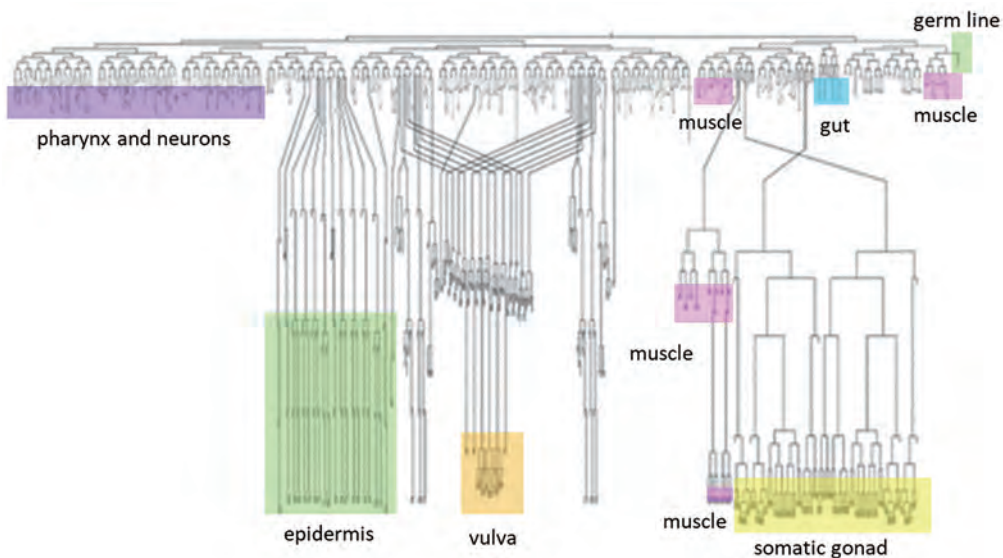


図 1 *C. elegans* の全体細胞の系統樹 (DEVELOPMENTAL BIOLOGY 3235 より改変)
成虫は 959 個の体細胞から成り立っている。

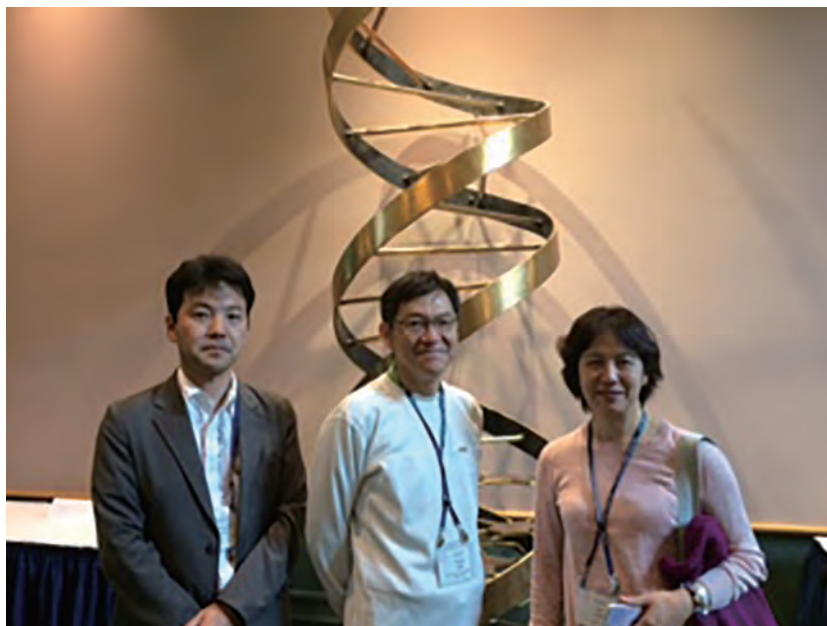
を作ろうということになり、ポスター会場に設置されたボードに弟子、孫弟子、ひ孫弟子と名前を入れていきました。これに感激した Brenner が新築した自宅に飾ると言っていたそうです。ちなみに私は Brenner の孫弟子、石井恭正講師と健康学部の安田佳代講師はひ孫弟子になります (写真③)。

線虫仲間も初めは仲の良い同士の集まりでしたが、遺伝子クローニングの競争が始まるとそこそこで軋轢が生じるようになりました。この頃になると線虫の突然変異体を分離するために突然変異剤はほとんど使われなくなり、線虫に存在するトランスポゾンによる分離方法が主になっていました。トランスポゾンは染色体のどこに飛ぶかわからないので、目的の突然変異体を探している最中に目的とは違う突然変異体が見つかることが多々あります。そのためまったく分野の違う研究者が突然学会で発表したり、論文を投稿したりするので、大きな混乱が起きました。私もその真ただ中にいたので焦りましたが、留学先のボスである Edward Hedgecock が「全遺伝子のクローニングはすぐに終わるが、それぞれの遺伝子の機能解析には時間がかかる。だから今は焦る必要はない」と冷静にしていたのが印象的でした。確かに遺伝子の機能性を調べる段階になった今は落ち着きを取り戻しています。全体細胞の細胞系統樹が完成し、全塩基配列が決定された時点で線虫の研究はやることが

なくなったと言う人もいましたが、いまだに Nature や Science に論文が頻繁に出ており、まだまだ線虫でやることはたくさんあると思います。

ライバルであり、理解者である R. H. Horvitz と立ち話をしたときに、「我々が研究を始めた頃は Nature や Science など一流雑誌からことごとく拒否されたけど、今は毎週のように紙面を飾っているね」と言われたことがあります。彼はその2年後の2002年に細胞死のメカニズムの研究でノーベル医学生理学賞を受賞しています。C. elegans の国際会議での彼の受賞記念講演の最後の言葉が、“Pioneer is not Popular, Popular is not Pioneer” でした。今の若い人たちにも今流行りのものではなく、新しいことにチャレンジして欲しいと思います。

最後に、研究の分野でも情報が溢れ、解析技術の発展とともに、研究が細分化されてきた現在では、後藤先生や三井先生、近藤先生のような熱い議論はしにくくなってきたと思います。しかし、この時代だからこそ、他の研究にも関心を持ち、自分の研究がヒトという個体の老化にどのようにかかわってくるかという大きな視野に立って、学会で活発な議論をして欲しいと思います。私がこれまで老化研究への情熱を保ち続けられたのは仲間のおかげ。みなさんも基礎老化学会で知り合った縁を大切にして、切磋琢磨できる良い仲間作りをして欲しいと思います。



写真③ Cold Spring Harbor Meeting: Mechanisms of Aging 2016にて
医学部 石井恭正講師 (左) と健康学部 安田佳代講師 (右) と共に参加

【特集企画】

「レドックスシグナル」

生体を取り巻く環境（外部環境）は常に変化するが、我々の体内環境（内部環境）は、その影響を受けながらも常に一定に保たれ、細胞は安定した生命活動を維持している。この生体内恒常性（ホメオスタシス）の維持を脅かす原因は、外部環境のみならず、生活習慣や加齢に依存して内部環境にも現れる。1968年にデンハム・ハーマン博士が提唱した「老化のフリーラジカル説」にあるように、今日では老化研究分野において環境ストレスといえは酸化ストレス（レドックスシグナル）が容易にイメージできるほど定着している（1972年には老化のミトコンドリア説が提唱されている）。その後、半世紀が経過し、レドックスシグナルあるいはミトコンドリア機能不全は、さまざまな老化関連疾患の原因になることが明らかにされてきた。これまで生体内環境ストレスとして漠然と捉えられてきたレドックスシグナルを対象とした研究は、現在ではその影響をより詳細に生体分子レベルの変化としてクローズアップするようになった。

そこで本特集号では、レドックスシグナルの生体への影響を分子レベルで解明しようと、精力的に研究活動を展開されている4人の先生方に執筆をお願いした。東北大学の赤池孝章先生に硫黄の酸化反応による活性硫黄シグナルについて、同じく東北大学の仲川清隆先生に脂質過酸化と細胞老化について、北里大学の今井浩孝先生に脂質過酸化と細胞死について、そして東海大学の宮沢正樹先生に鉄代謝制御について、それぞれご執筆いただいた。最先端の研究成果をご紹介いただくことで、我々学会員がレドックスシグナルと老化についてご高察下さる一助となれば幸いである。

基礎老化研究誌 編集委員

石井 恭正

福井 浩二

【総説】

活性イオウ分子によるエネルギー代謝制御

西村 明¹、本橋 ほづみ²、赤池 孝章¹

¹ 東北大学 大学院医学系研究科 環境医学分野

² 東北大学 加齢医学研究所 遺伝子発現制御分野

要約

システインパースルフィド (CysSSH) を代表とする活性イオウ分子は通常チオール基に複数のイオウ原子が付加したポリスルフィド構造を有している化合物であり、通常チオール化合物に比較すると多彩なレドックス活性を有している。最近、システニル tRNA 合成酵素 (cysteinyI-tRNA synthetase: CARS) が、生体内の主要な CysSSH 合成系であることが判明した。また、ミトコンドリア局在型 CARS から産生された CysSSH は、電子受容体およびプロトン供与体としてミトコンドリア膜電位形成に寄与し、新規エネルギー代謝経路「イオウ呼吸」を営み生命活動をコントロールしていることが明らかとなった。本稿では、活性イオウ分子の主要な生合成経路および新規エネルギー代謝経路「イオウ呼吸」に関して我々が得た最新の知見を紹介する。

キーワード : reactive sulfide species, cysteine persulfide, cysteinyI-tRNA synthetase, sulfur respiration, mitochondrial bioenergetics

1. はじめに

「イオウ (硫黄、元素記号:S)」は酸素と同じ第 16 原子族に属し、生体にとって必須元素である。アメリカ食品医薬品局に承認されている医薬品のうち約 25% の品目にイオウが含まれていることから、イオウ含有化合物の重要性が垣間見える。

最近まで、イオウ代謝物の研究は硫化水素の生理機能に関することが中心であり、硫化水素は一酸化窒素や一酸化炭素に続く第 3 のガス状メディエーターとして注目されてきた。しかし、硫化水素の pKa は約 7 であり、生体内ではほとんど (>80%) が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在すること、そもそも硫化水素自体の化学的反応性 (特にその求核性) が極めて低いこと、また、イオウは酸化還元状態によって様々な多量体構造をとることから、ガス状の硫化水素そのものが本当に生理活性を

有しているかについては疑問視されていた [1]。また、最近、各種培養細胞やマウス個体レベルで、これまで硫化水素合成系として報告されてきたシスタチオン-β-シクターゼ (CBS) やシスタチオン-γ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルビン酸イオウ転移酵素の発現が低下・欠損しても、硫化水素産生量に有意な変動はないことが分かってきた。このことは、硫化水素の生理作用として報告されていた様々な現象が硫化水素以外のイオウ代謝物によるものであることを強く示唆している。実際、我々はこれまで、CBS や CSE の主要酵素産物は硫化水素ではなく、活性イオウ分子の一種であるシステインパースルフィド (CysSSH; 図 1 A) であることを報告している [2]。現在では、硫化水素に関するこれまでの報告は解析方法の稚拙さ、低い精度 (低特異性・低感度など) と、残念なことであるが、科学的に不完全で不適切な検証により、CysSSH や関連ポリスルフィド代謝物の分解産物もしくはアーチファクトを見ていただけであり、真の活性分子は CysSSH を含む活性イオウ分子であると考えられる。パースルフィドやポリスルフィドに代表される活性イオウ分子は、通常チオール (-SH) 基に複数のイオウ原子が付加したポリサルファー構造 [-S]_n-SH を有している。その中でも、還元型のヒドロスルフィド化合物は、イオウ原子が過剰に付加していることにより、通常チ

連絡先: 赤池孝章 〒 980-0872

宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1 5 号館 8 階

TEL : 022-717-8101

FAX : 022-717-8219

E-mail : takaike@med.tohoku.ac.jp

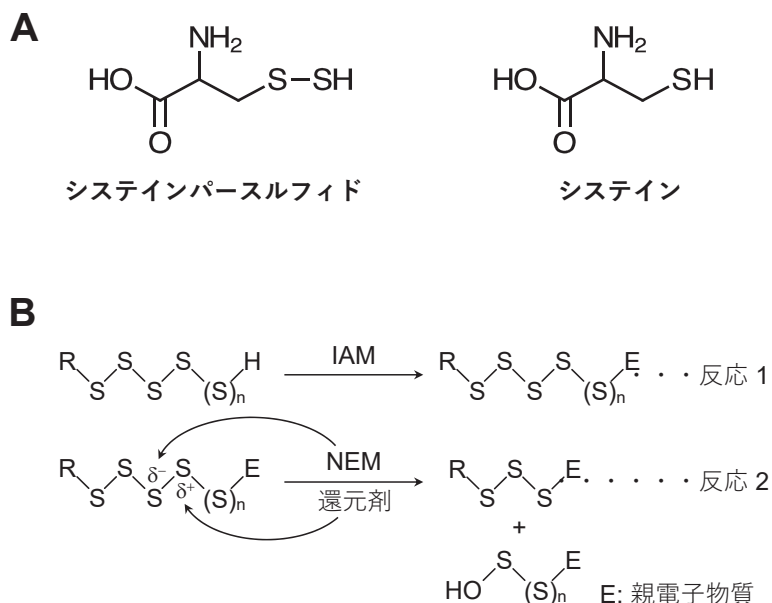


図1. システインパーサルフィドとシステインの構造、および、ポリスルフィドの化学的特性（文献5より改変）

- A. システインパーサルフィドは、システインのチオール基にさらに過剰な硫黄が結合した構造を持っている。この僅かな違いにより、システインパーサルフィドは生体内でシステインには無い生理機能を発揮する。
- B. ヨードアセトアミド (IAM) などの親電子性が比較的弱い試薬はポリスルフィド末端のヒドロチオール部分と反応する (反応1)。一方、エチルマレイミド (NEM) などの比較的強い親電子性を有する試薬ではポリスルフィドの構造内部に存在するイオウ側鎖と繰り返し反応が起こり、ポリスルフィド構造が壊れる (反応2)。また、還元剤によってもポリスルフィド構造は分解される (反応2)。

オール化合物に比べヒドロチオール自身の求核性・抗酸化能は顕著に高まる一方で、ポリスルフィドの構造内部に存在するイオウ側鎖も求核性を有しており (図1 B)、通常チオール化合物に比較すると実に多彩なレドックス活性を持っている。一方、酸化型のポリスルフィドは、通常のジスルフィドと同様に親電子的な反応性を発揮するので、ポリスルフィドは自身が求核性と親電子性の二面性を備えている。このようなユニークな物性と生物化学的反応性を持つこととで、文字通り、活性イオウ分子として生体内で多彩な生理機能を発現している [3, 4]。そこで、本稿では、近年ようやくその実体が見えてきた活性イオウ分子、特に CysSSH の主要な生合成経路およびその興味深い代謝・生理機能に焦点をあて最新の知見を紹介する。

2. CysSSH 生合成経路の発見

これまで我々は、生体内の CysSSH 産生系として、CBS および CSE が関与することを報告してきたが [2]、一方で CBS や CSE とは異なる CysSSH 産生機構の存在も予想していた。その理由として、心筋細胞のように CBS や CSE がほとんど発現していない細胞においても CysSSH 産生が観察されていたことが挙げられる。我々は CysSSH が低分子だけでなく、タンパク質中にもタンパク質ポリスルフィドとして豊富に存在していることを見出し [5]、翻訳に関連した酵素が活性イオウ分子の産生系であると推測した。そこで、翻訳時にシステインを tRNA に結合 (アミノアシル化) させるシステイニ

ル tRNA 合成酵素 (CARS) に着目し解析した結果、大腸菌 CARS が効率よく CysSSH を産生することを見出した。また、哺乳類の場合、細胞質に局在する CARS1 およびミトコンドリアに局在する CARS2 が存在するが、両酵素においても CysSSH 合成活性を検出している。次に、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒト胎児腎細胞 (HEK293T 細胞) の CARS2 遺伝子欠損株 (以下、CARS2 破壊株) を構築したところ、CysSSH および全ての関連硫黄代謝物 (システインおよびグルタチオンなどの各種パーサルフィド/ポリスルフィド、さらに硫化水素やチオ硫酸など) の有意な減少が認められた。さらに、アミノアシル化活性の発現に必要なシステインがセリンに変異した CARS2 変異体を作製し (「3. CPERS の酵素学的特徴」を参照)、プラスミドを介して CARS2 破壊株に導入・発現させたところ、ミトコンドリア固有のタンパク質合成は回復しないが、CysSSH および関連硫黄代謝物の産生は野生株のレベルまで回復した。続いて、CRISPR-Cas9 システムによって CARS2 遺伝子欠損マウスの作製を試みた。CARS2 完全 (ホモ) 欠損マウスは胎生致死であったが、CARS2 ヘテロ欠損マウスでは成体が得られた。CARS2 ヘテロ欠損マウスの肝臓および肺における CysSSH 量を測定した結果、野生型に比べて CysSSH および関連硫黄代謝物が半分減少していることが判明した。なお、CARS2 ヘテロ欠損マウスにおけるミトコンドリアのタンパク質合成は正常であった。よって、CysSSH をはじめとする全ての硫黄代謝物の生体内生成が CARS2 に依

存していることを示している。すなわち、システインル tRNA 合成酵素 CARS が翻訳のマスター酵素であると同時に CysSSH の主要な産生酵素 (cysteine persulfide synthase : CPERS と命名) であり、両者の活性は独立したものである [5,6]。一方、本稿では詳しく述べないが、低分子やタンパク質のポリスルフィドの制御システムとしてチオレドキシシ・チオレドキシシレダクターゼが分解代謝経路として機能していることが明らかになりつつある [7]。

3. CPERS の酵素学的特徴

CARS の CPERS 活性はシステインを基質とし、アミノアシル tRNA 合成に必要な ATP は要求しない。CPERS 活性の特徴として、アミノ基転移や脱炭酸に必要な補酵素であるピリドキサル -5'-リン酸 (PLP) を要求する。PLP の結合部位を解析した結果、生物間で高度に保存された KIIK や KMSK モチーフに存在するリジンに結合していることが質量分析解析および、立体構造モデリングから判明した (図 2) [5]。これらのリジンをアラニンに置換した CARS 変異体は PLP の結合量が減少し、CPERS 活性が優位に減少する。また、無細胞タンパク質合成系を用いてアミノアシル化活性を翻訳活性として検討した結果、これらの変異体は野生体と同レベルのアミノアシル化活性を維持していることがわかった。一方、アミノアシル化活性に必須であるシステイン (亜鉛の結合部位) を置換した変異体は報告通りアミノアシル化活性が完全に消失するが、興味深いことに CPERS 活性に関しては野生株と同等である。これらの

ことから、CPERS 活性とアミノアシル化活性は完全に独立したものであると示されている。

我々は、これまでに CSE や CBS も CysSSH 合成活性を有していることを報告しているが、両酵素と CARS は基質特異性に大きな違いがある。CARS はシステイン (CysSH) を基質とする一方で、CSE や CBS はシステインの酸化型であるシスチンを基質とする。酵素パラメータを求めたところ、大腸菌 CARS の K_m 値 (基質: システイン) は約 $10 \mu\text{M}$ であり、CSE の K_m 値 (基質: シスチン) は約 $300 \mu\text{M}$ であった [5]。従って、通常の細胞内システイン濃度 ($100\text{-}1000 \mu\text{M}$) やシスチン濃度 (数 μM) を考慮すると、生理的条件下では、CSE がシスチンを基質に CysSSH を産生するのではなく、CARS がシステインを基質に CysSSH を産生するものと思われる。むしろ、CSE や CBS は元来のシステイン合成系として働き、CSE と CBS により生成されたシステインから CARS が CysSSH を産生していることがわかっている (図 3)。実際、CSE や CBS をノックダウンすると、細胞内のシステイン量の減少が起こり、それに伴い CARS 依存的な CysSSH 産生が低下する。しかしながら、酸化ストレス条件下では細胞内のシステインが酸化されシスチン量が増加することが想定されるので、そのような環境では、CBS や CSE も CysSSH 産生系として機能するであろう。ちなみに、 V_{max} 値に関しては CSE (約 $50 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) の方が大腸菌 CARS (約 $1.5 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) より約 30 倍高いが、 k_{cat}/K_m は両酵素とも約 $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ であるため、大腸菌 CARS と CSE の触媒効率は同程度である。

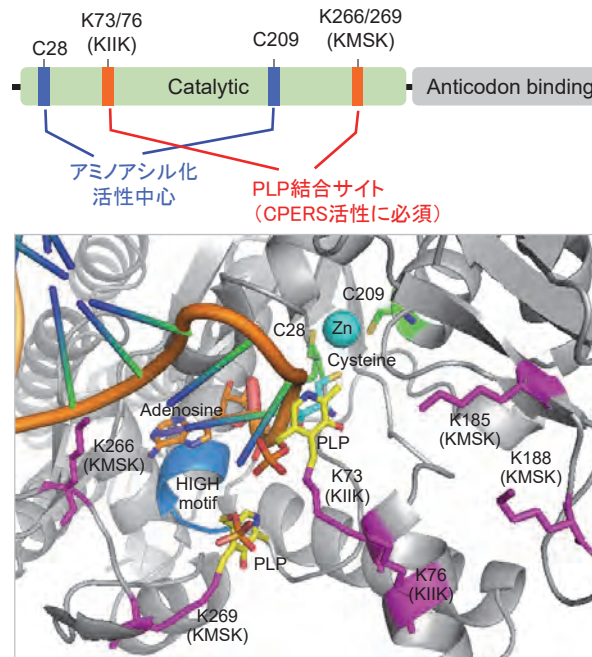


図 2. 大腸菌 CARS のドメイン構造と 3次元構造のコンピュータモデリング (文献 5 より改変)

SwissDock プログラムを利用して、大腸菌 CARS と PLP のドッキングシュミレーションを行った。KIIK や KMSK モチーフのリジンに PLP が結合している。

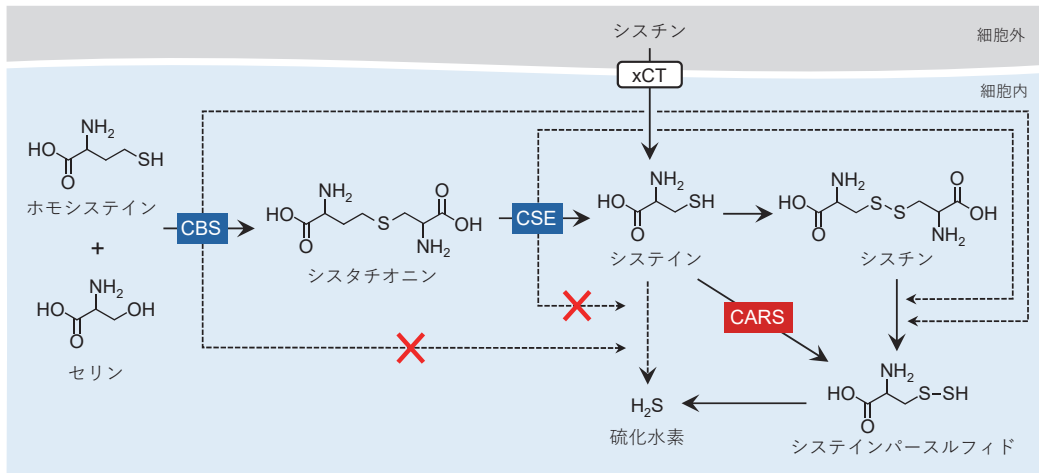


図3. CARS と CBS・CSE の代謝連関

生理的な細胞内環境において CBS や CSE が硫化水素を直接産生することはなく、通常は細胞内システインの供給経路となっている。CARS はシステインを基質に CysSSH を産生しており、硫化水素はその2次代謝物である。細胞内システイン量が増加するような環境(酸化ストレス条件下)では、CBS や CSE から CysSSH が産生される可能性がある。
xCT: シスチン/グルタミン酸トランスポーターシステム

4. イオウ呼吸の発見

CARS2 の PLP 結合部位の変異体 (翻訳活性: 正常、CPERS 活性: 欠損) を発現させた HEK293T 細胞や HEK293T 細胞の CARS2 破壊株において、ミトコンドリアの膜電位形成が野生株に比べて大きく減少していた [5]。これは、CysSSH が膜電位形成を介してミトコンドリアのエネルギー代謝に貢献していることを示唆している。ミトコンドリアにおいては、電子伝達系では電子供与体である NADH から最終的な電子受容体である酸素分子に電子が移動する際にミトコンドリア内膜にプロトン勾配が生じることで膜電位が形成され、その膜電位に依存して ATP 合成が行われている。電子伝達系を構成

するタンパク質の一部はミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされているため、エチジウムブロマイドにより mtDNA を複製阻害することで電子伝達系の機能が低下する。HEK293T 細胞の電子伝達系抑制細胞のイオウ関連化合物の定量的メタボローム解析を行ったところ、電子伝達系の低下により細胞内 CysSSH 量が増加し、硫化水素量が減少することを見出した。また、CysSSH と硫化水素の物質収支がほぼ一致しており、正常細胞では電子伝達系に依存して CysSSH が 2 電子還元され硫化水素に変換されていることが示された。つまり、CysSSH が電子受容体として機能していることが分かった。このことから、我々は哺乳類における「イオウ呼吸」(図4)

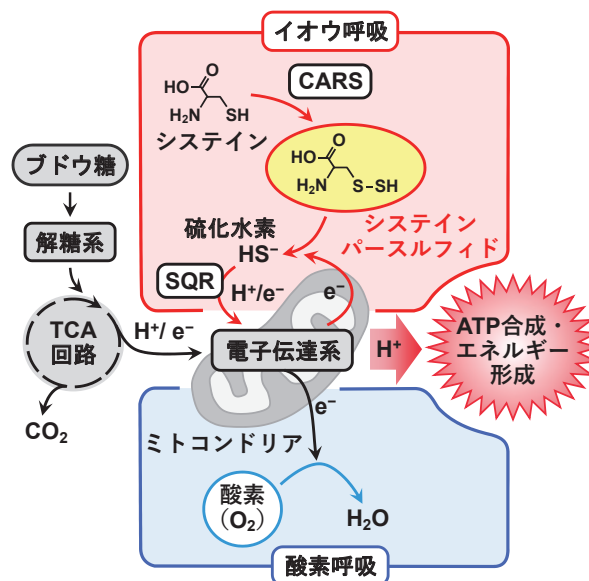


図4. イオウ呼吸のモデル図 (仮説)

CARS2 由来の CysSSH から電子伝達系と共役して二次的に発生する硫化水素が SQR の働きによって、Q サイクルを介してプロトン勾配を形成している。この際、酸素呼吸とは異なり、電子はサイクリックな電子伝達の側副路のなかで再利用される。

を提唱している [5,6,8]。すなわち、イオウ呼吸では、電子伝達系の最終的な電子受容体が、通常の酸素呼吸の酸素分子 (O_2) ではなくパースルフィド (S_2 , CysSSH) であり、酸素呼吸の場合、電子伝達系の電子は、酸素分子の最終的な還元代謝産物である水分子として排出されるが、イオウ呼吸の場合、CysSSH に電子が受け渡され硫化水素が発生する。ミトコンドリア内には硫化水素のプロトンキノン (Q) サイクルに供与する酵素である sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) が存在する。つまり、CysSSH が電子伝達系と共役して二次的に発生する硫化水素が SQR の働きによって、Q サイクルを介してプロトン勾配を形成しているものと推察される。これまで、硫黄酸化細菌 (*Thiobacillus* 等) は、SQR によって無機イオウ化合物を酸化し、エネルギー生産を行っていることが知られている。また、光合成細菌において、SQR が効率的な光合成に重要であることが示唆されている。このような代謝システムが哺乳類におけるイオウ呼吸の起源なのかもしれない。

5. 活性イオウ分子による寿命制御

これまで、栄養飢餓により寿命が延長することが示唆されているが、その分子メカニズムは不明であった。近年、硫化水素代謝と寿命の関連が示唆されている [9]。すなわち、線虫において CBS 過剰発現株の寿命が延長すること、また CBS ノックダウン株の寿命が減少することも示されている。CBS の主酵素産物が硫化水素でなく CysSSH であることを考慮すると [2]、CysSSH が寿命制御因子である可能性が高い。実際、我々は寿命研究のモデル生物である出芽酵母において、CARS から産生される CysSSH が寿命調整に関わっていることを示唆する知見を得ている (未発表データ)。さらに、活性イオウ分子を添加することで、出芽酵母の寿命が延長する結果も得ている (未発表データ)。今後、CysSSH や活性イオウ分子代謝系、すなわち、イオウ呼吸による新たな寿命制御メカニズムの解明が大きな課題であろう。また、活性イオウ分子・イオウ呼吸によってサポートされる老化防止・長寿効果は、幹細胞生物学などの代謝維持・活性化メカニズムの理解への一筋の光となるであろう。

6. おわりに

好気呼吸によるエネルギー産生では活性酸素の産生は避けることが出来ない。システインパースルフィドあるいはその代謝物であるグルタチオンパースルフィドは、活性酸素を強力に消去する新しい内因性の抗酸化物質として、その生物機能が再発見された「活性イオウ分子」である。その生成酵素を探索する中で、ミトコンドリアに局在する CARS2 から生成したシステインパースルフィドが「イオウ呼吸」を維持する極めて驚くべき発見へと展開した。シアノバクテリアが繁栄する以前の環境では、地球上に酸素がほとんど存在せず、生体はイオウ

ウを利用したエネルギー代謝をしていたと考えられている。今回の発見は、大酸化イベント後に大きな進化を遂げた哺乳細胞において、システインパースルフィドを利用した「イオウ呼吸」が重要であることを示している。今後、「イオウ呼吸」を自在に調節し、生体内のエネルギー産生量を増加させることで、老化防止・長寿や慢性難治性の呼吸器や心疾患の予防・治療法の開発へと繋がることを期待される。一方、悪性腫瘍 (がん) では酸素に依存しないエネルギー代謝が知られているが、これらがんでは「イオウ呼吸」を積極的に利用していることが予想される。今後、イオウ代謝物をがんのバイオマーカーにした診断法や「イオウ呼吸」を制御することによる新しいがん予防や治療法の開発が期待される。

参考文献

1. Nishida M, Sawa T, Kitajima N, *et al.* Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem Biol* 8 : 714-724, 2012.
2. Ida T, Sawa T, Ihara H, *et al.* Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 7606-7611, 2014.
3. Takahashi N, Wei FY, Watanabe S, *et al.* Reactive sulfur species regulate tRNA methylation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res* 45 : 435-445, 2017.
4. Heppner DE, Hristova M, Ida T, *et al.* Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol- based redox signaling? *Redox Biol* 14 : 379-385, 2018.
5. Akaike T, Ida T, Wei FY, *et al.* Cysteinylation of tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8 : 1177, 2017.
6. Fukuto JM, Ignarro LJ, Nagy P, *et al.* Biological hydropersulfides and related polysulfides - a new concept and perspective in redox biology. *FEBS Lett* 592 : 2140-2152, 2018
7. Dóka É, Pader I, Bíró A, *et al.* A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci Adv* 2 : e1500968, 2016
8. Fujii S, Sawa T, Motohashi H, *et al.* Persulfide synthases that are functionally coupled with translation mediate sulfur respiration in mammalian cells. *Br J Pharmacol* doi: 10.1111/bph.14356., 2018
9. Hine, C. *et al.* Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 160 : 132-144, 2015

Energy metabolism regulated by reactive sulfur species

Akira Nishimura¹, Hozumi Motohashi², Takaaki Akaike¹

¹Department of Environmental Medicine and Molecular Toxicology, Tohoku University
Graduate School of Medicine

²Department of Gene Expression Regulation, Institute of Development, Aging and Cancer,
Tohoku University

Abstract

Reactive sulfide species (RSS) including cysteine persulfide (CysSSH) are produced in prokaryotic/eukaryotic cells and play critical roles in the regulation of redox and electrophilic signaling. However, little is known about these biosynthesis and physiological functions. We recently demonstrated that cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) is a novel CysSSH synthase. Most importantly, mitochondrial function in bioenergetics is supported by CysSSH derived from mitochondrial CARS. Here, we provide an overview of recent advances in RSS research and our understanding of the mechanisms underlying the formation and the physiological roles of RSS, with a primary focus on the formation of CysSSH by CARS and the most fundamental mitochondrial bioenergetics mediated by RSS, that is, sulfur respiration.

Keywords : reactive sulfide species, cysteine persulfide, cysteinyl-tRNA synthetase, sulfur respiration, mitochondrial bioenergetics

【総説】

酸化脂質の構造と生体への影響

加藤 俊治^{1,2}、伊藤 隼哉¹、竹腰 進²、仲川 清隆¹

¹ 東北大学大学院農学研究科・機能分子解析学分野

² 東海大学医学部・基礎医学系・生体防御学分野

要約

酸化脂質の構造は極めて多岐にわたり、近年の目覚ましい質量分析の発展にともない、生体内の微量かつ複雑な酸化脂質の構造が次々に解明されてきている。酸化脂質の構造は生体内での生成経路（炎症反応や光照射など）に依存しており、構造によって生理機能が大きく異なることがわかってきた。ネガティブなイメージが強かった酸化脂質であるが、興味深いことに生体の恒常性維持に必須な酸化脂質も報告されてきている。また、脂質の酸化は分子の高極性化をもたらし、例えば膜リン脂質の分子動態にも大きく影響を与える。近年のコンピューターやNMRを用いた解析によれば、酸化による分子動態変化も恒常性維持に必須のようである。本総説では、特に酸化脂質の構造に着目し、脂質が酸化されることによって生ずる機能や性質の変化について概説する。

キーワード：Oxidized lipid, Mass spectrometry, Signal mediator, Molecular dynamics

1. はじめに

酸化ストレスが様々な疾患に関与することが数多くの実験によって証明されているが、その実態はいまだ不明な点が多い。酸化ストレスとは「過剰な酸化の亢進が生体抗酸化能を上回った状態」と定義されており [1]、多くの生体分子の酸化を引き起こすと考えられている。生体成分の中でも脂質は最も酸化されやすい成分の一つであり、酸化脂質が動脈硬化症や多くの老化性疾患の病変組織に蓄積していることが報告されている [2]。しかしながら、“過剰な酸化の亢進”とは漠然とした定義であり、そこには後述するような生体分子の酸化を引き起こす様々な要因が含まれる。それ故、こうした酸化脂質の蓄積が病態の原因となるのか、単なる結果に過ぎないのかについてはまだ議論が続いている。こうした中で、近年は酸化ストレスが「レドックスシグナル」とも呼ばれ、酸化脂質についても様々な機能が報告されている。先

端分析機器、とくに質量分析-液体クロマトグラフィー (LC-MS/MS) の発展には目覚ましいものがあり、従来困難であった微量な酸化脂質の精密構造解析が可能になってきている。こうした技術により、生体にごく微量にしか存在しない酸化脂質の存在量・構造が明らかとなり、さらに酸化脂質特有の機能が解明されつつある。中には老化細胞のクリアランスのために特定の構造を持つ酸化脂質が必須という結果も出ており [3]、生体恒常性維持のために必須な酸化脂質も数多く報告されている。有名なものとしてはエイコサノイドやドコサノイドがあるが、これらについては多くの総説が出版されているので [4, 5]、本稿では割愛する。ここでは、リン脂質などのエステル脂質について、特に構造に着目し、酸化されることによってもたらされる生理機能や細胞膜構造の変化について述べる。そして最後に、最近筆者らが進めている酸化脂質の構造解析法を紹介させていただきたい。

2. 酸化脂質の生成機構と構造

生体において脂質の酸化を引き起こすのは大きく分けてラジカル、酵素、一重項酸素の3つである (表1)。主なラジカル源はスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) やその代謝 (分解) 物と考えられており、特にミトコンドリアでは電子伝達系から漏れた電子によって、 O_2 の一部が $O_2^{\cdot-}$ へと還元されていると考えられている ($O_2^{\cdot-}$ は

連絡先：仲川清隆 〒980-8572

宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 468-1

TEL : 022-757-4416

FAX : 022-757-4417

E-mail : nkgw@m.tohoku.ac.jp

表1 リノール酸ヒドロペルオキシド異性体の構造。リノール酸などの脂質は酸化要因によって異なる異性体を生成する。

							備考
ラジカル酸化 (ミトコンドリア電子伝達系 各種オキシゲナーゼ)	○	○			○	○	9(or 13)-EZ-HpODEに対する 9(or 13)-EE-HpODEの比は 種々の要因に依る
酵素酸化 (各種リポキシゲナーゼ)	○				○	○	ヒドロペルオキシ基の 結合炭素は不斉中心であり、 原則、S体が生成
一重項酸素酸化 (光エネルギー ミエロペルオキシゲナーゼ)	○		○	○	○		理論上、4種類が等量生成

他にも NADPH オキシゲナーゼやキサンチンオキシゲナーゼなどの種々のオキシゲナーゼによって生成される)。こうして生成された $O_2^{\cdot -}$ は酵素的 (スーパーオキシドディスムターゼ) もしくは自発的に H_2O_2 に還元され、最後にカタラーゼやグルタチオンペルオキシゲナーゼ (GPx) によって H_2O に還元される。しかし、一部の過酸化水素 (H_2O_2) は Fenton 反応に代表される反応によってヒドロキシラジカル (HO^{\cdot}) となる。そして HO^{\cdot} が H_2O へと還元される際に脂質などの生体分子から H^{\cdot} を奪う。これが脂質ラジカル酸化の初期反応であり、ここからラジカル連鎖反応が開始されていく。一方、生体内において一重項酸素 (1O_2) は光依存性および非依存性な経路によって生成すると言われている。光依存経路では種々の光増感剤の存在下で、光エネルギーの三重項酸素 (3O_2) へのエネルギー遷移によって 1O_2 が生成する。例えば、Yamazaki らは光増感剤である Pheophorbide を投与したラットに可視光を照射したときに、皮膚にコレステロールの 1O_2 特異的な酸化物である 3β - 5α -cholest-6-ene-5-hydroperoxide が検出されたことを報告している [6]。生体内には他にも多くの光増感剤が存在しており [7]、我々の身体は常に何らかの形で光酸化が関与しているのであろう。また、光非依存性な反応として、好中球ミエロペルオキシゲナーゼによって産生される次亜塩素酸と過酸化水素の反応が良く知られている ($H_2O_2 + OCl^- \rightarrow ^1O_2 + H_2O + Cl^-$)。この反応によって生成される 1O_2 はファゴサイトーシスのような生体防御系において極めて重要な役割を果たしていると考えられるが、慢性的な炎症は過度な脂質酸化を亢進するだろう。最後に酵素による酸化であるが、代表的なものとして、リポキシゲナーゼ (5-LOX、15-LOX など) やシクロオキシゲナーゼなどがある。これらの酵素による脂質酸化物が機能を果たす系としてはアラキドン酸カスケードが有名であり [4]、近年ではエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) の酵素酸化物の機能についても多くの知見が蓄積しつつある [5]。

以上が生体内で起こりうる 3 つの脂質酸化 (ラジカル、酵素、一重項酸素) の代表例である。これらの酸

化機構がどのような脂質酸化物を生成するかについては Frankel の総説で詳細に述べられている [8] (表 1)。例えばリノール酸の場合、先ほどの H^{\cdot} の引き抜きが 11 位のメチレン水素に生じ (易く)、次いでペンタジエン共鳴と酸素付加により 9-hydroperxyoctadeca-10E,12Z-dienoic acid (9-EZ-HpODE)、9-hydroperxyoctadeca-10E,12E-dienoic acid (9-EE-HpODE)、13-hydroperxyoctadeca-9Z,11E-dienoic acid (13-ZE-HpODE)、13-hydroperxyoctadeca-9E,11E-dienoic acid (13-EE-HpODE) の 4 種類が生じる。一方で 1O_2 では ene- 反応により、 1O_2 が二重結合に親電子付加するため、9-EZ-HpODE、10-hydroperxyoctadeca-8E,12Z-dienoic acid (10-HpODE)、12-hydroperxyoctadeca-13E,9Z-dienoic acid (12-HpODE)、13-ZE-HpODE の 4 種が生じる。そして酵素酸化では作用する酵素に依存して立体位置選択的に酸化物が生成する (5-LOX:9(S)-EZ-HpODE、15-LOX:13(S)-ZE-HpODE)。すなわち後述するが、ヒドロペルオキシ基の挿入位置や cis-trans 構造、立体構造を解析できれば、脂質の酸化機構を推測することができる。

こうして生成したヒドロペルオキシドは GPx などによってアルコール体へと還元される他、一部は分解されカルボニル等の二次生成物となる (図 1)。ヒドロペルオキシ基は O-OH 間の結合が弱く、金属イオンの存在などによって容易にアルコキシラジカル (O^{\cdot}) となる。そして β 開裂に代表される分解によって種々のカルボニルとなるが、その分解経路は様々な生理的条件 (酸素分圧、抗酸化物質の種類、脂質濃度など) の影響を受けるため [9]、実際に生体内でどのような経路で分解が進んでいるのかを評価することは難しい。いずれにせよ、酸化脂質の構造は脂質クラス、脂肪酸の種類、そしてどのように酸化されたか (ヒドロペルオキシ基の位置とそこからの分解経路) に依存している。このような複雑な組成を持つ酸化脂質の解析には質量分析が必須であり、酸化脂質の機能解析はまさに質量分析の発展とともに進んでいると言える。

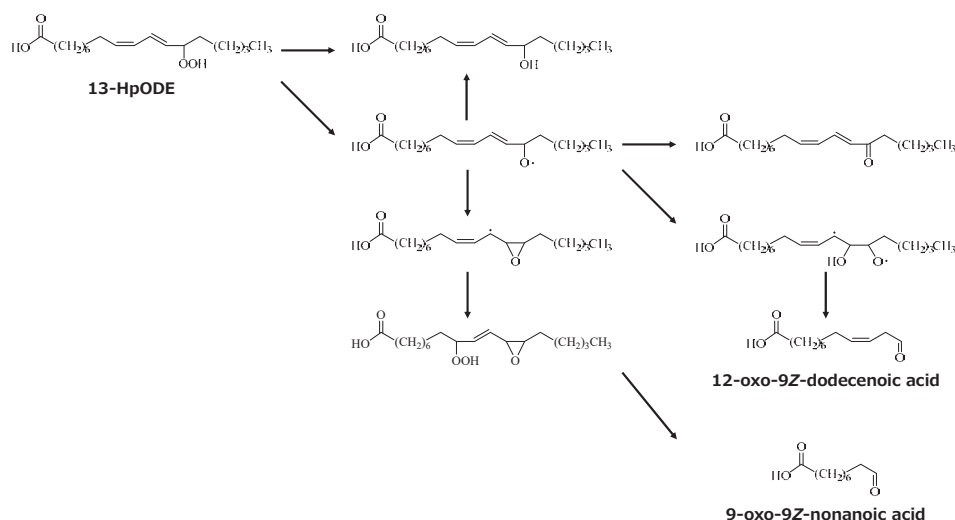


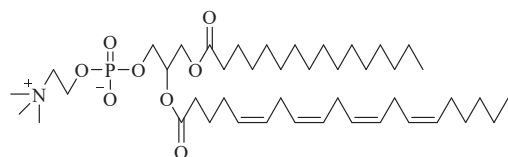
図1 13-ZE-HpODEの分解経路。LOOHの分解はヒドロペルオキシ基の分解から始まる場合が多い(図は一例)。

3. シグナルメディエーターとしての酸化脂質

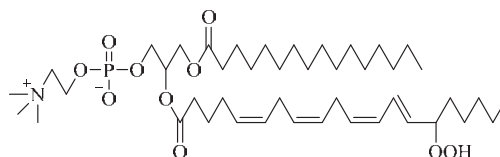
シグナルメディエーターとしての酸化脂質にはプロスタグランジンやロイコトリエン、リポキシン、レゾルビンなどがある [4, 5]。これらはアラキドン酸やDHAなど脂肪酸の酸化物であるが、近年は脂肪酸以外の脂質(リン脂質やコレステロールエステルなど)の酸化物にも多くの機能性が見出されてきている。我々はリポタンパクの主要構成リン脂質(ホスファチジルコリン(PC))の酸化一次生成物(図2、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド:PCOOH)がTHP-1のICAM-1への接着を亢進することを明らかにした [10]。この現象はコレステロールエステルヒドロペルオキシドやtert-ブチルヒドロペルオキシド、さらに、アルデヒドを有する酸化リン脂質(1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine(POVPC)や1-palmitoyl-2-(5-glutaryl)-sn-glycero-3-phosphocholine(PGPC)、図2)には見られず、PCOOHの構造特異的な現象であることがわかった。さらに、酸化二次生成物を含む酸化リン脂質群が種々のサイトカイン・ケモカイン(IL-8、MCP-1など)を増加させることも報告されている [11]。Norbertらは、極めて似た構造を持つ酸化二次生成物POVPCとPGPC(図2)は、ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)と単球、好中球との接着に与える影響が異なると報告している [12]。すなわち、POVPCはCS-1 fibronectinを発現させ、HAECと単球の接着を亢進させる一方で、PGPCはVCAM-1とE-selectinの発現を介して、好中球と単球の両方の接着を亢進させた。多くの研究結果を見ても [13]、酸化リン脂質が構造特異的に炎症反応に関与していることは間違いないと考えられるが、一方で

酸化リン脂質の抗炎症作用も報告されている。Valeryらのグループはヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対する酸化脂質の炎症惹起作用について、高濃度(〜120 μM)の酸化リン脂質はIL-8の産生を促すが、その約1/10濃度の酸化リン脂質はLPS刺激によるE-selectin発現やIL-8の産生を抑制させることを報告した [14]。同グループはさらにそのメカニズムとして、酸化リン脂質のLPS binding protein(LBP)とCD14への結合を介したTLR4阻害を明らかにしている [15]。著者らは、定常時の血中の酸化リン脂質濃度は炎症を惹起させるには不十分であり、普段は抗LPS活性を示しているであろう、と述べている。筆者らの化学発光検出液体クロマトグラフィー(CL-HPLC) [16]や質量分析 [17]を用いた酸化リン脂質の測定でも、一定量の酸化脂質は常に血中・組織に存在しており、上記の知見も踏まえると一定量の酸化脂質の存在が“正常な状態”なのかもしれない。

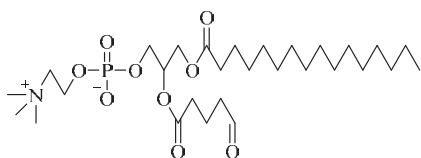
脂質の酸化物は上述したように酵素の他、ラジカルや¹O₂で生成する。また、POVPCやPGPCといった酸化二次生成物は、化学的分解(金属イオンとの接触や熱力学的不安定性)で生成する。興味深いのは、酵素酸化物のみならず、このような“アクシデント”で生じる可能性が高い酸化脂質(非酵素的酸化物)にも特有の機能が多数見出されていることである。脂質酸化物は酵素酸化物よりも非酵素的酸化物の方が圧倒的に種類は多い。今後、質量分析等の発展とともに、新たな酸化脂質の発見とそれらの生理機能の解析が期待される。酸化脂質の生理機能をまとめた優れた総説は多く出版されているので [13, 18]、そちらも参考にしていきたい。



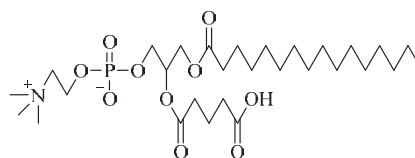
1-Pamitoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAPC)



1-Pamitoyl-2-hydroperoxyeicosatetraenyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAPCOOH)

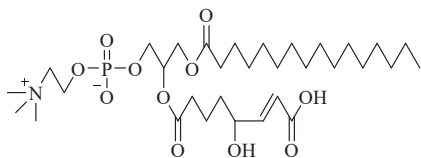


1-Palmitoyl-2-(5-glutaroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PGPC)

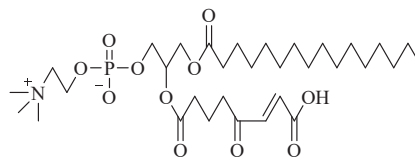


1-Palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POVPC)

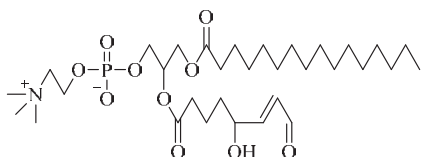
γ -hydroxy (or oxo)- α,β -unsaturated carbonylを有する酸化脂質



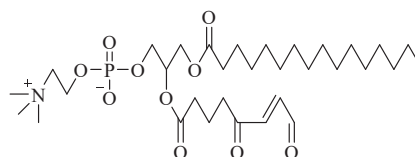
1-palmitoyl-2-(5-hydroxy-8-oxo-6-octendiyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (HODiAPC)



1-palmitoyl-2-(5-keto-6-octendiyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (KODiAPC)



1-palmitoyl-2-(5-hydroxy-8-oxo-6-octenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (HOOA-PC)



1-palmitoyl-2-(5-keto-8-oxo-6-octenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (KOOA-PC)

図2 1-Pamitoyl-2-arachidonyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine の酸化物。遊離脂肪酸の酸化物だけでなく、リン脂質などのエステル脂質にも多くの機能が報告されている。図はこれまでに機能が報告されているリン脂質酸化物の一例。

4. 脂質酸化による極性変化

脂質が持つ大きな役割の1つとしてリン脂質などの構造脂質としての役割がある。そこで、ここでは脂質が酸化することによってもたらされる物的性質の変化について述べる。すなわち、脂質の酸化は酸素付加や、続く開裂によって脂肪酸鎖が短くなり（末端はアルデヒドやカルボン酸となる）、脂質の高極性化をもたらす。そして膜リン脂質の高極性化は、膜の流動性、透過性、厚さなどに影響を与えると考えられている。近年のコンピュータシミュレーション解析やNMR解析は、膜脂質に酸化脂質が含まれた場合、どのような変化が生じ

るのかを明らかにしつつある。Jirasakらは1-pamitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholineを用いて、そのリノール酸鎖が9-*EZ*-HpODEや13-*ZE*-HpODE、または12-oxo-9*Z*-dodecenoylや9-oxo-nonanoylへと酸化された(図1)ときの膜の性質変化を解析した[19]。その結果、特にヒドロペルオキシ基は極性頭部やカルボニル酸素と水素結合を形成し易く(図3)[20]、酸化されたアシル基は細胞膜の外側に配向し易くなることが示された。では、このような膜構造の変化は生理的のどのような変化をもたらすのであろうか？

従来から、ある種の酸化リン脂質が動脈硬化巣に蓄

積していることが明らかになっており [21]、これには CD36 のようなマクロファージスカベンジャー受容体による酸化 LDL の認識が関与すると考えられている [22]。Eugene らは CD36 と酸化リン脂質、特にアシル基に γ -hydroxy (or oxo)- α, β -unsaturated carbonyl を有する酸化リン脂質 (図 2、 $\text{oxPC}_{\text{CD36}}$) が強い親和性を示すことを報告した [23]。Michael らはこの $\text{oxPC}_{\text{CD36}}$ の膜上での分子動態について、リン脂質膜モデルと Nuclear Overhauser Enhancement (NOE: 分子の立体構造を決める解析手法。空間的に近い位置に存在するプロトン間にシグナルの変化が観測される。) を用いた解析を行っている [3]。それによれば、 $\text{oxPC}_{\text{CD36}}$ の酸化アシル基末端と極性頭部間には NOE 相関が観測されており、 $\text{oxPC}_{\text{CD36}}$ の酸化アシル基は膜外に突出していると推察している (論文中では “grow whiskers” と標記) (図 3)。おそらくはこうした膜外に突出した酸化アシル基が CD36 による認識に必須なのであろう。また、必然的に膜脂質の酸化が進んでいると考えられる老化細胞や炎症細胞において、酸化アシル基を使った細胞の標識は細胞クリアランスのために重要な役割を果たしているのかもしれない [3]。そして、このような現象は CD36 だけでなく、前項で述べた酸化リン脂質と LBP や CD14 の結合にも関わっていると考えられる。他にも、膜脂質の酸化は脂質 1 分子が占める膜面積や脂質膜の厚さに大きく影響を与えることがわかってきている [19]。特に、脂肪酸炭素のうち、酸化された場所は膜面積に、鎖長 (何番目の炭素が酸化開裂を起こすか) は膜の厚さに、それ

ぞれ影響を与える。そして、こうした膜構造の変化と同時に水分子やイオンの膜透過性の増加も観測されており、これは脂質の酸化と膜障害の関係性を示唆しているのかもしれない。

以上の現象は膜リン脂質だけに見られるものではなく、他にもコレステロール [20] やトリアシルグリセロール (TAG) [24] の酸化についてもいくつか面白い現象が報告されている。Dariush らは脂肪滴中の TAG が酸化されたときの酸化トリアシルグリセロール (oxTAG) の分子動態を解析している [24]。その結果、脂溶性コア中での oxTAG の存在は熱力学的に不安定であり、 oxTAG はリン脂質一重膜に移行し界面に留まりやすいことがわかった。このような界面に移動した oxTAG はリパーゼの基質になりやすいと考えられ、その結果、炎症などに関与する種々の酸化脂肪酸が産生されると推測される。実際、脂肪滴と炎症の関わりも多数報告されている [25]。しかし、TAG は膨大な数の脂肪酸の組み合わせを持つ上に、酸化されることでさらに多種類の異性体を生成する。そのため、 oxTAG の構造は酸化脂質の中でもほとんど解析が進んでいない。そんな中、ごく最近我々は、アルカリ金属イオンを用いた脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) の解析法と MS^2 、 MS^3 を組み合わせた方法により、TAG ヒドロペルオキシド (TAGOOH) の構造を詳細に解析することに成功した [26]。今後より幅広い oxTAG の構造解析と、シグナルメディエーターとしての oxTAG の役割の解明が期待される。

脂質の酸化は、疎水性の脂質が水の性質に近づいてい

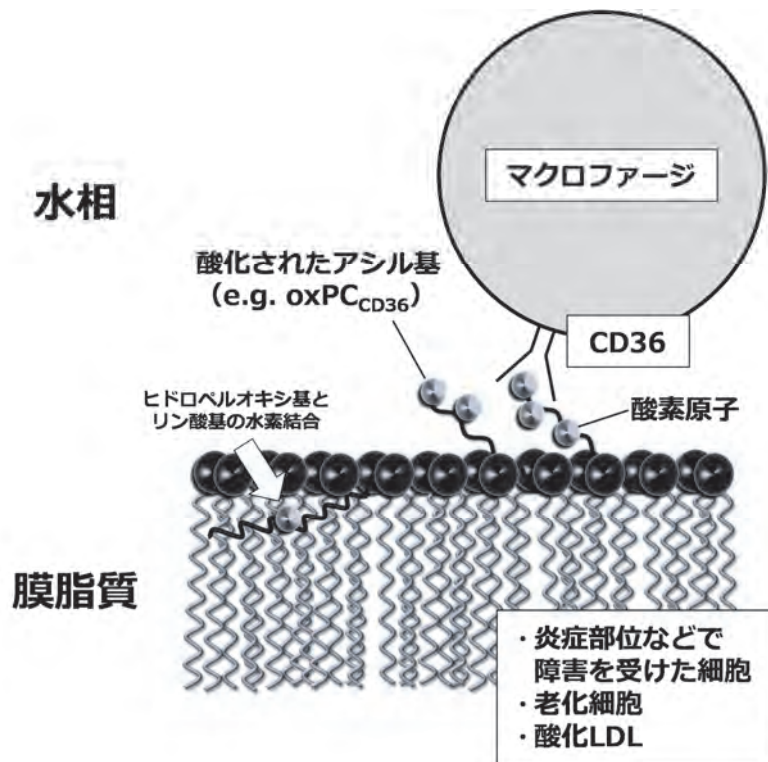


図3 膜リン脂質の酸化と膜構造の変化。酸化されたアシル基は極性が上がるため、分子配向に変化が生じる。この変化は細胞傷害の“標識”として重要な役割を果たしているのかもしれない。

く現象とも捉えられる。そのため、分子動態は大きく変化し、その結果、本来作用しないはずの分子との接触・反応が進む。現在のところ、こうしたシミュレーション試験は1分子種か2、3分子種を用いた試験が多く、またその試験方法によって結果にばらつきが見られる。今後は様々な分子種・酸化物を含んだ、より生理的な条件での解析が楽しみである。

5. 酸化一次生成物（脂質ヒドロペルオキシド）の構造解析

以上のように、脂質の酸化は、酸化アシル基の構造に依存した様々な機能・性質を与える。そして、図1や表1に示したように、酸化アシル基の構造を決める最初の大きな要因はヒドロペルオキシ基の位置、すなわち「脂質の酸化原因」である（酸素が挿入された炭素は不斉中心になるため、さらに光学異性体が存在する）。こうした背景から、筆者らの研究室では、特に脂質の酸化原因を明らかにすることを目的として、ヒドロペルオキシ基の位置異性体の解析を行ってきた。

しかしながら、異性体間の構造の違いはごくわずかであり（表1）、当時最新の質量分析計でも選択性や感度が担保された方法の構築は困難であった。例えば、PCOOHの異性体（1-pamitoyl-2-(13-hydroperoxy-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine（図4A、16:0/13-HpODE

PC）、1-pamitoyl-2-(9-hydroperoxy-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine（図4B、16:0/9-HpODE PC）のH⁺付加体はMS²分析に供しても専らホスホコリンのフラグメントイオン（*m/z* 184）のみを与え、ヒドロペルオキシ基の位置情報は得られない。ところで酸化脂質はその構造上、Na⁺と高い親和性を持つ性質がある。そして面白いことに、PCOOHのNa⁺付加体のプロダクトイオンはH⁺付加体のプロダクトイオンからは得られない情報を与えることがわかった（図4C、D）[17]。我々はそれらのプロダクトイオンがヒドロペルオキシ基の位置を反映したイオンであることを明らかにし、様々なサンプルに含まれるLOOH異性体の構造解析を可能とした。例えば、健康人の血中PCOOH異性体は主に16:0/13-HpODE PCと16:0/9-HpODE PCであり、一重項酸素酸化物に相当する16:0/12-HpODE PCと16:0/10-HpODE PCの存在は認められなかった。これは脂質異常症患者の血中でも同様であった。このことから、血中において少なくともリポタンパクには一重項酸素酸化が生じていないと考えられた（表1）。さらにPCOOHのヒドロペルオキシ基結合炭素の不斉中心を直接解析できるキラルクロマトグラフィー条件を確立し[27]、血中のPCOOHが主にラジカル酸化で生じていることを証明した。現在はリノール酸のみならず、アラキドン酸[28]やDHAなどのヒドロペルオキシドや

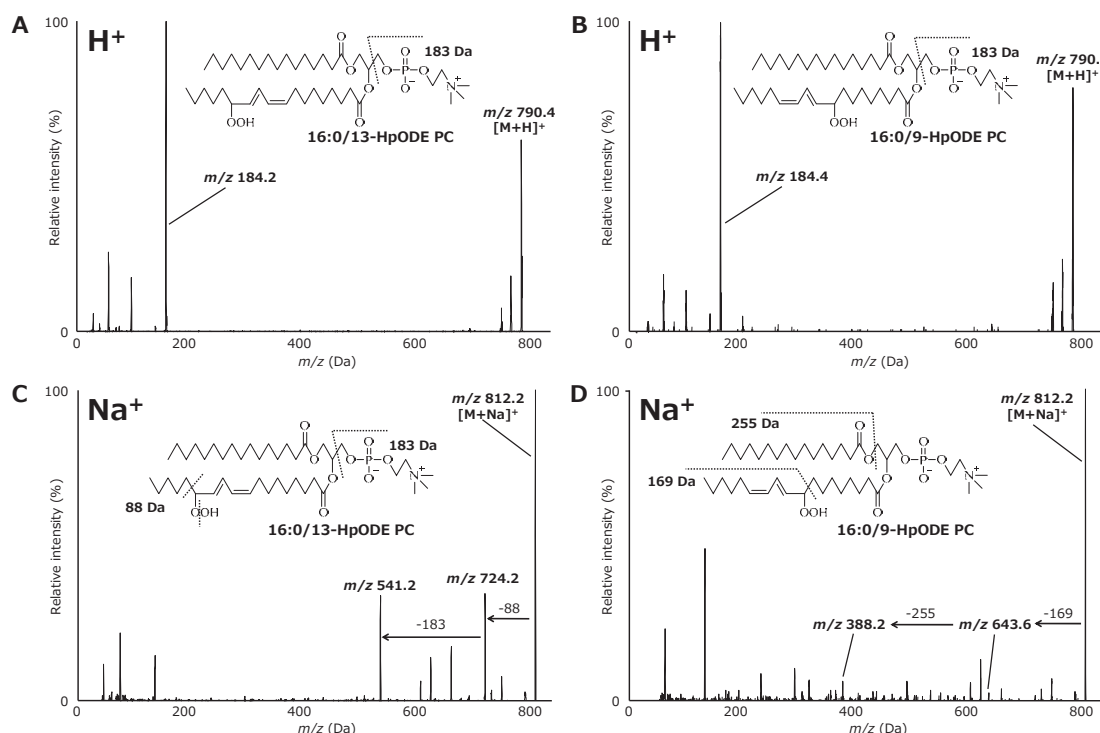


図4 PCOOH異性体（16:0/13-HpODE PC（A、C）、16:0/9-HpODE PC（B、D））のプロダクトイオンMSスペクトル。脂質ヒドロペルオキシドはH⁺付加体をプレカーサーイオンとした場合と（A、B）、Na⁺付加体をプレカーサーイオンとした場合では（C、D）、得られる情報が大きく異なる。例えばPCOOHの場合、H⁺付加体からはホスホコリン（*m/z* 184）が主に検出され、脂肪酸の構造情報は得られない。一方でNa⁺付加体からはヒドロペルオキシ基周辺炭素の開裂に由来するイオン（16:0/13-HpODE PC：*m/z* 724、*m/z* 541、16:0/9-HpODE PC：*m/z* 643、*m/z* 388）が検出され、これらのデータから脂質の酸化要因が推察できる。

それらの分解物（酸化二次生成物）、スクアレン [29]、TAG [26] といった脂質の酸化物の異性体解析を可能にしつつある。これらの酸化脂質の構造情報を基に、生体内での脂質酸化メカニズムや酸化脂質がシグナル経路に与える影響を評価し、脂質酸化と老化・疾患の関係解明に役立てていきたい。

6. 終わりに

生体の酸化ストレスを評価するために、これまで比色法やELISAなど種々の方法が開発されてきた。簡便な方法であるが、原理的に酸化脂質の詳細な構造情報を得ることは難しい。本稿で述べてきたように、酸化脂質には構造特異的な機能が次々と見出されてきている。中には酸化脂質の功罪を改めて評価する必要がある分子もあり、今後はそれらを区別して解析することも必要であろう。質量分析の感度はatto (10^{18}) molレベルに達してきており、極めて高感度な分析が可能になってきている。さらにイオンモビリティといった新たな構造解析法も組み込まれており、こうした最新の分析機器も用いたこれからの解析にも期待したい。

参考文献

1. John Betteridge D. What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3–8, 2000.
2. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, *et al.* Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915–924, 1989.
3. Michael EG, Xin-Min L, Bogdan G, *et al.* The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J Biol Chem* 283: 2385–2396, 2008.
4. Alma MA, David B, María AB, *et al.* Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta* 1821: 249–256, 2012.
5. Charles NS and Nicos AP. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev* 111: 5922–5943, 2011.
6. Yamazaki S, Ozawa N, Hiratsuka A, *et al.* Photogeneration of 3β -hydroxy-5 α -cholest-6-ene-5-hydroperoxide in rat skin: Evidence for occurrence of singlet oxygen in vivo. *Free Radic Biol Med* 27: 301–308, 1999.
7. Barclay LRC, Basque MC, Stephenson VC, *et al.* Photooxidations initiated or sensitized by biological molecules: singlet oxygen versus radical peroxidation in micelles and human blood plasma. *Photochem Photobiol* 78: 248–255, 2003.
8. Frankel EN. Lipid oxidation. *Prog Lipid Res* 19: 1–22, 1980.
9. Onyango AN. Formation of aldehydic phosphatidylcholines during the anaerobic decomposition of a phosphatidylcholine bearing the 9-hydroperoxide of linoleic acid. *Biomed Res Int Article ID 8218439*, 2016.
10. Asai A, Okajima F, Nakagawa K, *et al.* Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *J Lipid Res* 50: 957–965, 2009.
11. Yeh M, Leitinger N, Martin R, *et al.* Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF- α and oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1585–1591, 2001.
12. Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, *et al.* Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. *PNAS* 96: 12010–12015, 1999.
13. Serbulea V, DeWeese D and Leitinger N. The effect of oxidized phospholipids on phenotypic polarization and function of macrophages. *Free Radic Biol Med* 111: 156–168, 2017.
14. Bochkov VN, Kadl A, Huber J, *et al.* Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature* 419: 77–81, 2002.
15. Oskolkova OV, Afonyushkin T, Preinerstorfer B, *et al.* Oxidized phospholipids are more potent antagonists of lipopolysaccharide than inducers of inflammation. *J Immunol* 185: 7706–7712, 2010.
16. Miyazawa T, Yasuda K, Fujimoto K, *et al.* Presence of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma. *J Biochem* 103: 744–746, 1988.
17. Kato S, Nakagawa K, Suzuki Y, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of human plasma 1-palmitoyl-2-hydroperoxyoctadecadienoyl-phosphatidylcholine isomers via promotion of sodium adduct formation. *Anal Biochem* 471: 51–60, 2015.
18. O’Donnell VB and Murphy RC. New families of bioactive oxidized phospholipids generated by immune cells: Identification and signaling actions. *Blood* 120: 1985–1992, 2012.
19. Wong-ekkabut J, Xu Z, Triampo W, *et al.* Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophys J* 93: 4225–4236, 2007.
20. Neto AJP and Cordeiro RM. Molecular stimulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. *Biochim Biophys Acta* 1858: 2191–2198, 2016.
21. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, *et al.* A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in

- atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 277: 38517–38523, 2002.
22. Silverstein RL and Febbraio M. CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11: 483–491, 2000.
 23. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, *et al.* Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 277: 38503–38516, 2002.
 24. Mohammadyani D, Tyurin VA, O'Brien M, *et al.* Molecular speciation and dynamics of oxidized triacylglycerols in lipid droplets: Mass spectrometry and coarse-grained simulations. *Free Radic Biol Med* 76: 53–60, 2014.
 25. Bozza PT and Viola JPB. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 243–250, 2010.
 26. Kato S, Shimizu N, Hanzawa Y, *et al.* Determination of triacylglycerol oxidation mechanisms in canola oil using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Sci Food* 2: Article number 1, 2018.
 27. Ito J, Nakagawa K, Kato S, *et al.* Direct separation of the diastereomers of phosphatidylcholine hydroperoxide bearing 13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid using chiral stationary phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1386: 53–61, 2015.
 28. Ito J, Mizuochi S, Nakagawa K, *et al.* Tandem mass spectrometry analysis of linoleic and arachidonic acid hydroperoxides via promotion of alkali metal adduct formation. *Anal Chem* 87: 4980–4987, 2015.
 29. Shimizu N, Ito J, Kato S, *et al.* Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers. *Sci Rep* 8: Article number 9116, 2018.

Lipid oxidation: their structure and biological implication

Shunji Kato^{1,2}, Junya Ito¹, Susumu Takekoshi², Kiyotaka Nakagawa¹

¹Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science,
Tohoku University

²Department of Cell Biology, Division of Host Defense Mechanism,
Tokai University School of Medicine

Abstract

Lipid oxidation generates numerous types of oxidized lipids. The advent of new generation mass spectrometers coupled with high performance liquid chromatography (LC-MS/MS) has enabled analysis of oxidized lipids at trace levels even in the complex samples. The structure of oxidized lipids depend on the biological reactions that takes place in vivo (i.e. inflammation or photo irradiation), and the resultant difference in oxidized structure provides specific characters such as biological functions or membrane dynamics. While oxidized lipids are generally considered negatively, advanced analysis using LC-MS/MS, NMR and computer simulation has suggested that some oxidized lipids are potentially necessary in homeostasis. Herein, with focus on the structure, the biological factors determining the structure and the structure-dependent functions of oxidized lipids are reviewed.

Keywords : Oxidized lipid, Mass spectrometry, Signal mediator, Molecular dynamics

【総説】

脂質酸化依存的新規細胞死フェロトーシスとリポキシトーシス

今井 浩孝

北里大学 薬学部 衛生化学

要約

近年、脂質酸化が起因となる新しい非アポトーシス経路による細胞死フェロトーシスが注目を集めている。フェロトーシス研究は現在、Ras 変異がん細胞を特異的に殺す抗がん剤のメカニズムの解析が進んでおり、シスチントランスポーター (xCT) を抑制するタイプ1 (エラスチンなど) と酸化リン脂質の一次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドを直接還元する酵素 GPx4 (リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ) を直接阻害するか、発現量を変化させるタイプ2 (RSL3 など) に大きく分けられる。タイプ1は細胞内グルタチオンの低下により、またタイプ2は直接 GPx4を阻害することで、リン脂質ヒドロペルオキシドの代謝を抑制し、遊離二価鉄を介した脂質酸化増幅反応によりカスパーゼ非依存的な新規細胞死を誘導する。フェロトーシスは鉄のキレーター DFO (deferrioxamine)、ビタミン E、フェロスタチン-1により抑制されることが特徴であり、カスパーゼの阻害剤では抑制できない。一方、我々はこれまでに、GPx4の様々な組織特異的ノックアウトマウスにおいて、GPx4が正常組織で欠損すると、カスパーゼ非依存的で脂質酸化依存性の細胞死が起きることを見出し、その分子メカニズムや初期に酸化されるリン脂質分子種がフェロトーシスとも異なることを見出してきている (筆者らはリポキシトーシスと呼んでいる)。またミトコンドリアを経由するアポトーシスにおいても、以前我々を含めた複数のグループが、ミトコンドリア内の特異的リン脂質カルジオリピンの酸化がミトコンドリアからのチトクローム C の放出に参与することを報告している。このことは細胞死におけるリン脂質の酸化シグナルが、何処のオルガネラでどのようなリン脂質分子種に対して起きるのかによって、脂質酸化依存性の細胞死は異なる細胞死経路をたどることを示している。本総説では我々の視点からみたフェロトーシスとリポキシトーシスについて中心に紹介したい。

キーワード : GPx4, lipid peroxidation, iron, vitamin E, ferroptosis

1. はじめに

細胞死研究は、約 20 年前からネクローシスとは異なるプログラムされた細胞死アポトーシスの概念が生まれ、DNA ラダーの形成、ミトコンドリアからのチトクローム C の放出を伴うカスパーゼ活性化機構や Fas リガンドや TNF α 受容体を介した細胞死シグナル経路な

どが次々に明らかにされた。その結果、アポトーシスとは異なるカスパーゼ非依存性のプログラム細胞死が存在することも明らかになってきた [1]。非アポトーシス細胞死として、オートファジー性細胞死、ネクロプトーシス、パイロトーシスなどが報告されてきたが [1]、近年、脂質の酸化を起因とする新たな細胞死としてフェロトーシスが注目を集めている [2]。図 1 に示すように脂質の酸化のメカニズムには、これまで、過酸化水素などのヒドロペルオキシドと遊離二価鉄 (Fe²⁺) を介したフェントン反応により起きる非酵素的な経路と 15-リポキシゲナーゼ (15-LOX) やチトクローム p450 などの酵素によるリン脂質の直接的な酸化経路が存在することが知られているが、リン脂質ヒドロペルオキシド (PL-OOH) を生成する酵素については、15-LOX やチトクローム C 以外

連絡先 : 今井浩孝 〒 108-8641

東京都港区白金 5-9-1

TEL : 03-5791-6235

FAX : 03-5791-6235

E-mail : imaih@pharm.kitasato-u.ac.jp

はまだ不明な点が多い。ビタミンEはラジカルをトラップすることにより、フェントン反応による脂質酸化の増幅を抑制する。酸化されて生成した1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドは、ホスホリパーゼA₂(PLA₂)による脂肪酸ヒドロペルオキシド(FFAOOH)の切り出しや、リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx4)によりグルタチオン依存的に還元される経路が知られているが、その他さらに酸化的分解を受け、リン脂質アルデヒド(PL-CHO)や、リン脂質カルボン酸(PL-COOH)となり、タンパク質と結合したりすることにより疾患の原因となったり、ある種の受容体を活性化することも明らかとなってきた[3,4]。PL-CHOやPL-COOHはPAFアセチルヒドロラーゼII(PAF-AHII)により切られ、リゾリン脂質(LysoPL)となる[5]。PLA₂により切られたリゾリン脂質は、リゾリン脂質アシル転移酵素(LPCATなど)によって、アシルCoA合成酵素(ACSLなど)によって合成された、アシルCoAの脂肪酸を転移して元のリン脂質あるいは脂肪酸の組成が異なるリン脂質に戻す[6]。この経路はリモデリング経路(ランズ経路)と呼ばれ、酸化リン脂質の修復やリン脂質の脂肪酸組成の変化に関与する(図1)。GPx4は、フェルトーシスの制御分子であることが報告され、一気に注目を集めることとなった。本稿では、フェルトーシス及び我々が見出したリポキトーシスといった脂質酸化依存的な新規細胞死の実行経路とその制

御因子について概説する。

2. GPx 4とは

グルタチオンペルオキシダーゼ4(GPx4)は、リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: PHGPx)とも呼ばれ、生体膜リン脂質の酸化1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に還元する抗酸化酵素の一つである[7-9]。通常の細胞には、グルタチオンペルオキシダーゼ1(細胞質型GPx1)も存在するが、GPx1は過酸化水素を主に水に還元するのに対して、GPx4は生体膜中のリン脂質ヒドロペルオキシド(PL-OOH)を還元してヒドロキシリン脂質(PL-OH)にする。両者は活性中心に、微量元素であるセレンを持つ特殊アミノ酸であるセレノシステインを活性中心に持つ(図2)。このセレノシステインを持つタンパク質をセレンタンパク質と呼び、ヒトでは25種類が知られている。ヒトではセレン欠乏になると、心筋症や肝臓疾患を伴う中国の風土病である克山病を発症することが知られている。GPx4ゲノムは7つのエクソンからなり、第1エクソンはIaとIbの2つある。異なる3つの転写開始点から、ミトコンドリア型GPx4、細胞質や核内に存在する非ミトコンドリア型GPx4(細胞質型GPx4と呼ぶ場合もある)と核小体型GPx4(核型GPx4と呼ばれる場合もある)の3つのタイプのmRNA

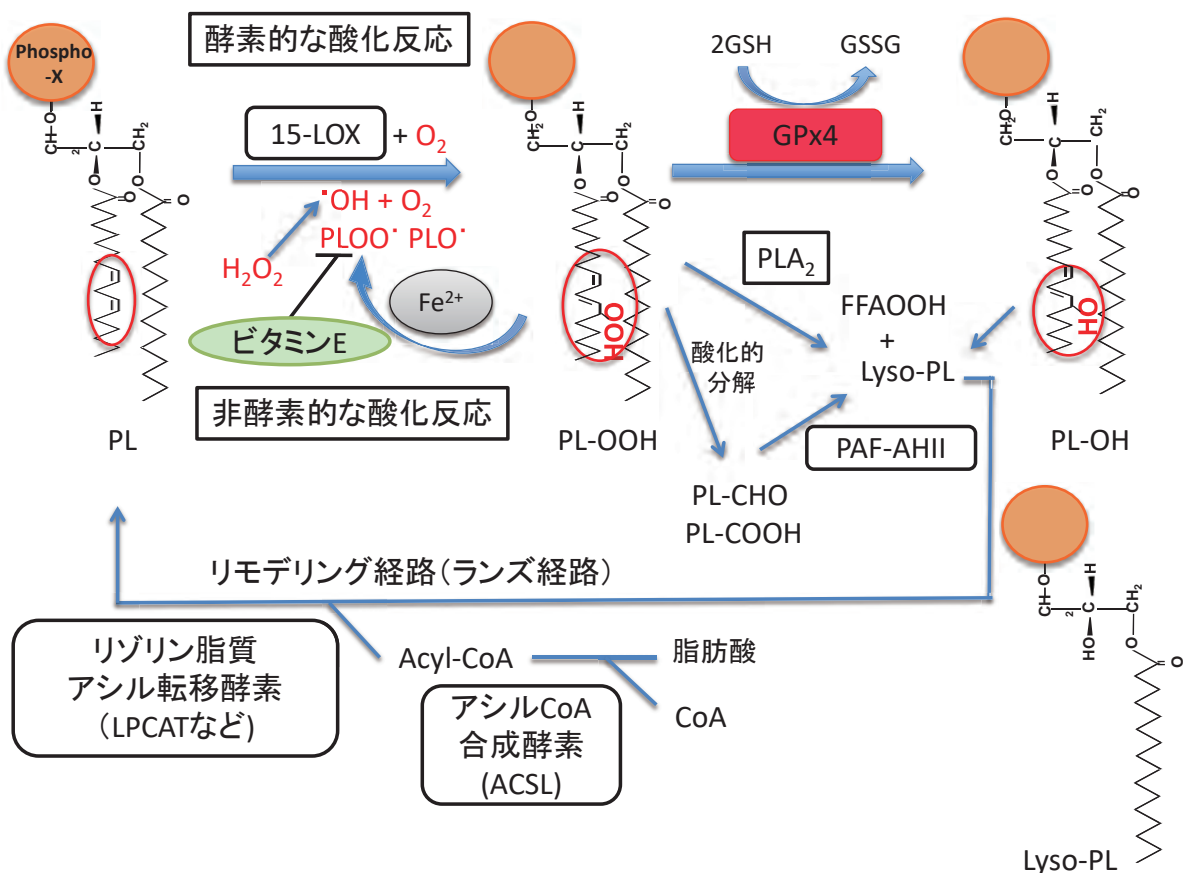


図1 生体膜リン脂質の酸化と修復経路

が転写され翻訳される。それぞれ第2エクソン以降は全く同じアミノ酸配列であり、第一エクソンIaの全てのアミノ酸配列がミトコンドリアへ移行するシグナルとなっている。一方、Ibエクソンは核小体移行シグナルとなる。Iaの最後の開始コドンのみを利用するタイプは、非ミトコンドリア型となり細胞質や核内に分布する(図2)[7]。GPx4は全ての臓器、細胞に発現するが体細胞では核小体型GPx4はほとんど発現していない。一方、精巣ではGPx4の3つのタイプの発現は非常に高く、後期精母細胞以降で著しく誘導がかかる。精子形成細胞の分化には、非ミトコンドリア型が必要であり、ミトコンドリア型は精子のミトコンドリア機能及び尻尾の正常な機能に關与する[10,11]。核小体型は先体に存在する。ヒトの重度の男性不妊症患者の精子では、GPx4の発現低下が見られる患者が多くおり[12]、精巣特異的GPx4ノックアウトマウスがオス不妊となったことから、精子でのGPx4の欠損は男性不妊症の原因となることが明らかになった[10]。またヒトにおいてGPx4欠損患者が報告されたが生後すぐ致死となり、骨の形成異常がおきていた[13]。マウスではGPx4欠損は胚発生過程の7.5日で致死となり生まれてこない[14]。

3. 抗がん剤による遊離鉄を介した脂質酸化依存的細胞死フェロトーシス

米国のStockwellらのグループは、変異Rasがん細胞

を特異的に殺し、正常細胞を殺さない抗がん剤をスクリーニングし、エラスチンやRSL3 (RAS-selective lethal 3) (図3) などを見出した[15]。それぞれの細胞死のメカニズムを明らかにしたところ、エラスチンは、シスチントランスポーターxCT (SLC7A11/SLC3A2)に結合し、シスチンの取り込みを抑制し、細胞内のシステイン及びグルタチオンを低下させ、グルタチオン依存的な酵素GPx4の活性低下を引き起こし、遊離2価鉄を介した脂質酸化依存的な細胞死が誘導されることを見出した[2]。この細胞死ではカパーゼは活性化されず、鉄のキレーターDFO (deferoxamine)、ビタミンEや抗酸化物質の一つであるフェロトーシスの特異的阻害剤フェロスタチン-1 (ferrostatin-1)により、細胞死が抑制されることを明らかにし、遊離2価鉄を介した脂質酸化依存的な細胞死をフェロトーシスと名付けた[2]。またRSL3はGPx4のセレノシステインに直接結合して、GPx4活性を抑制し、遊離2価鉄を介した脂質酸化依存的なフェロトーシスを起こすことを明らかにした[10]。このようにフェロトーシスを誘導する抗がん剤には、細胞内のグルタチオンを低下させる作用のあるもの(タイプ1)と、GPx4を阻害あるいは発現量を変化させるもの(タイプ2)の大きく分けて2つに分けられる(図3)。

生体膜のリン脂質の酸化は不飽和脂肪酸の量により感受性が変化する。リン脂質の脂肪酸は常に、ホスホリパーゼA1やA2により切り出され、アシル転移酵素により

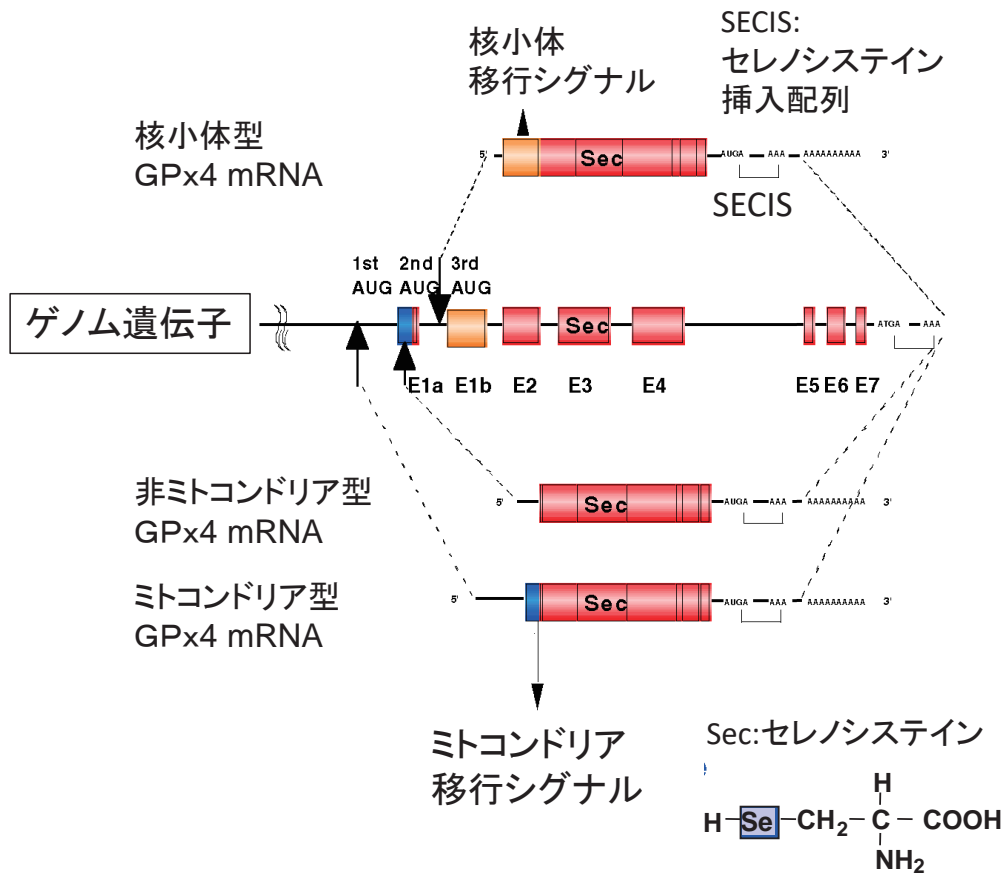


図2 3つのタイプのGPx4

別の脂肪酸がリゾリン脂質に結合することにより、組織などにおける生体膜リン脂質の不飽和脂肪酸の組成が調節されている（リモデリング経路）（図1）。Stockwellらと Conrad らのグループは別々に、フェルトーシスを抑制する分子のスクリーニングを行い、リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素3（LPCAT3）とアシルCoA合成酵素4（ACSL4）のノックダウンやノックアウトにより、フェルトーシスを抑制できることを示した[17,10]。さらにKaganらのグループは、ACSL4欠損細胞と Wild 細胞を比較してリビドミクス解析を行い、抗がん剤によるフェルトーシスでは15-LOXによる小胞体膜のホスファチジエタノールアミン（PE）に含まれるアラキドン酸の酸化が細胞死誘導シグナルの初反応であることを報告した[19,20]。現在のところ、エラスチンやRSL3によるフェルトーシスでは、この15-LOXによるPEの酸化が初反応で、その後生成したリン脂質ヒドロペルオキシドと遊離2価鉄によるフェント反応により、脂質酸化が増大しフェルトーシスが起きると考えられている。しかし、15-LOXノックアウトマウスにおいてもフェルトーシスが起きることから、必ずしも15-LOXは必要ではなく、脂質酸化の経路はいくつかの経路があると考えられる（図3）[21]。

その他のフェルトーシスの制御因子としては、シスチンの取り込みに関わるトランスポーターxCT（SLC7A11）の発現制御に関わる転写因子p53[22,23]

やBAP1[24]が関与していることや、遊離2価鉄の細胞内の量の制御に関わる分子、例えば、トランスフェリン受容体の減少やリソソーム機能の阻害による遊離2価鉄の生成の抑制もフェルトーシスを抑制できることが報告された[25]。また細胞内のフェリチンは鉄の貯蔵に関与するが、最近、フェリチンの特異的な分解にNCOA4（Cargo receptor for ferritinophagy）を介したオートファジー（フェリチノファジー）が関与していることが報告され、フェリチノファジーの抑制もフェルトーシスの感受性を下げることが明らかになっている[26,27]。またNrf2（NF-E2-related factor 2）などの抗酸化酵素の転写をあげる転写因子もフェルトーシスの感受性を下げる（図3）[28]。以上の結果は、脂質の不飽和度、脂質酸化に必要な遊離2価鉄、また活性酸素やラジカル消去に関与する分子がフェルトーシスの制御因子となるが、脂質酸化の下流で機能する分子の報告はなく、脂質酸化の後にどのようなメカニズムで致死となるのか、単純に生体膜の崩壊によるのかについては明らかになっていない。

4. GPx4欠損による遊離鉄非依存的な新規細胞死リポキシトーシス

我々はこれまでに、全身性[14]、精巣[10]、肝臓[29]、心臓[30]、脳や網膜[31]におけるGPx4欠損マウスを作成してきた。通常のGPx4ノックアウトマウスは発

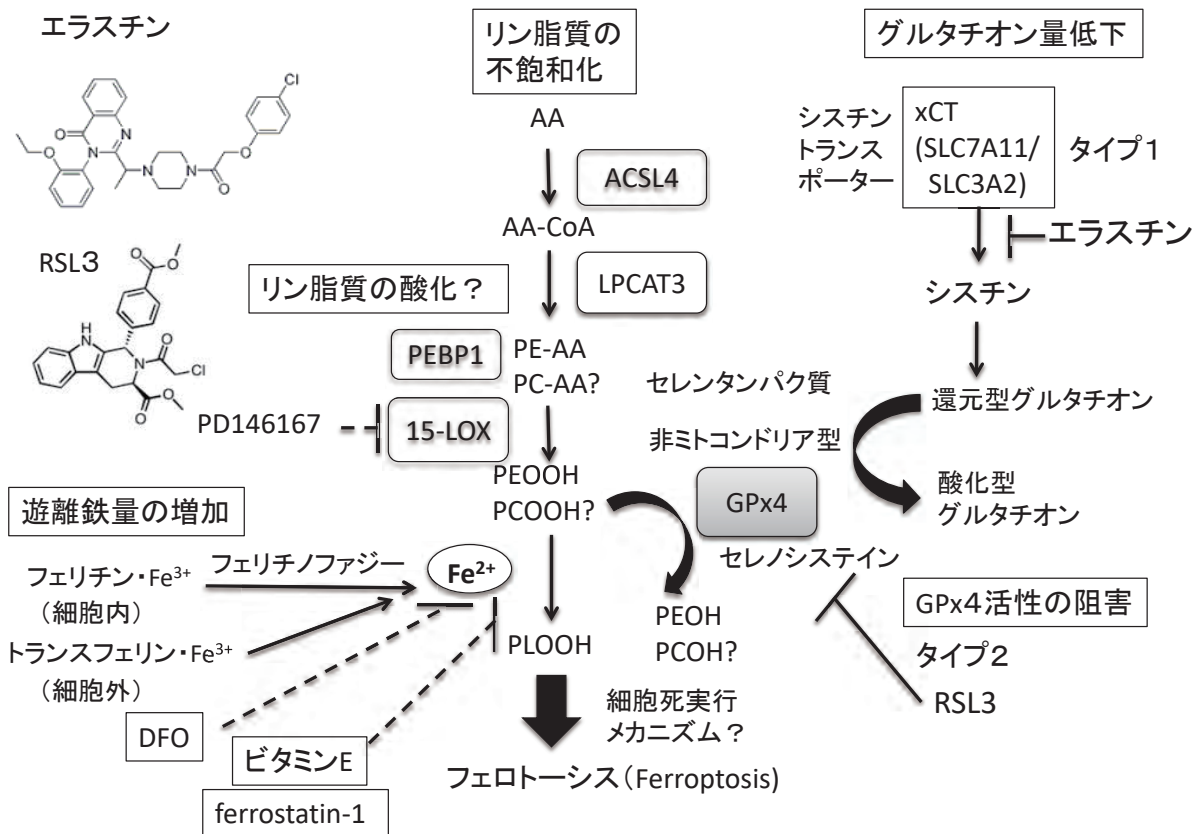


図3 フェルトーシスの分子メカニズムと調節因子と阻害剤

生過程の7.5日で致死となり、精巣特異的GPx4欠損マウスは精子形成過程において、精母細胞以降の細胞が欠損する。また肝臓特異的GPx4欠損マウスでは、肝実質細胞が致死となり、出生直後死となった。心臓特異的GPx4欠損マウスは、17.5日で心臓突然死を引き起こす。網膜特異的GPx4欠損マウスは、生後視細胞の脱落が起こり失明となる。このように、様々な正常細胞においてGPx4を欠損させると細胞死が誘導される。またビタミンE添加食を肝臓、心臓、精巣特異的GPx4欠損マウスに摂取させるとこれらの細胞死は抑制された。このことから少なくとも、心臓、肝臓、精巣ではGPx4とビタミンEにより内在性に生じるリン脂質ヒドロペルオキシドを抑制することが生存に必須である。このことは正常の細胞では常に内在性にリン脂質ヒドロペルオキシドが生成していることになるがそのメカニズムはわかっていない。またこの内在性に生じるリン脂質ヒドロペルオキシドの増大が疾患の直接の原因となることを示している[30-33]。

組織特異的GPx4欠損マウスでは、その組織においてCreタンパク質が発現誘導されてから致死が誘導されるのに3日ぐらいかかる。また我々が樹立した、タモキシフェン誘導型GPx4欠損MEF細胞では、タモキシフェンを培地に添加してから、細胞死が誘導されるまでに2~3日かかる。一方、同じMEF細胞に、フェロトキシスを引き起こす2つのタイプの化合物、エラスチン

とRSL3を添加すると12~24時間後には致死となる。RSL3はGPx4活性を阻害してフェロトキシスをRas変異がん細胞に誘導し、正常細胞は殺さないとされているが、上述したように正常細胞においてGPx4ゲノム遺伝子を破壊するだけで細胞死が誘導されるが、細胞死にかかる時間は全く異なっていた。このことはRSL3はGPx4阻害以外のターゲットを介して細胞死誘導機構を持っているのではないかと考えられる。また我々のMEF細胞は、タモキシフェン添加によるGPx4欠損細胞死では鉄のキレーターDFOでは抑制されないが、エラスチンやRSL3によるフェロトキシスは完全に抑制された。このことから、少なくとも我々のMEF細胞においては、フェロトキシスとGPx4欠損細胞死が異なるメカニズムで誘導されていると考えられた。タモキシフェンを添加すると24時間後にはGPx4欠損に伴ってホスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)が生成することがLC-ESI-MS/MS解析により明らかとなり、遊離2価鉄非依存的な脂質酸化経路により、フェロトキシスとは異なる細胞死が誘導されていると考えられた[34]。そこで我々はこのGPx4欠損細胞死をリポキシトキシスと名付け、細胞死の詳細なメカニズムを解析している(図4)。

リポキシトキシスでは24時間後に生成するリン脂質ヒドロペルオキシドの生成はビタミンEの添加により抑制できるが、鉄のキレーターDFOでは抑制できない。

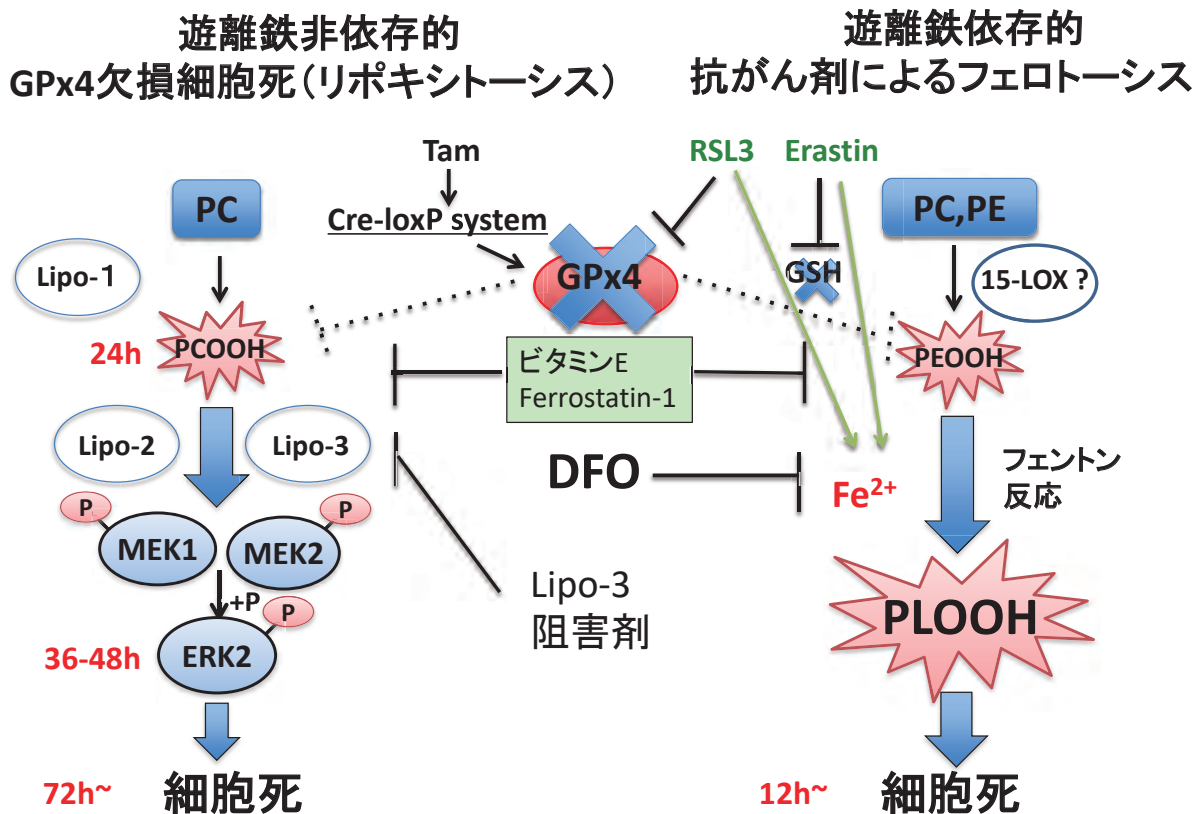


図4 リポキシトキシスとフェロトキシスの違い

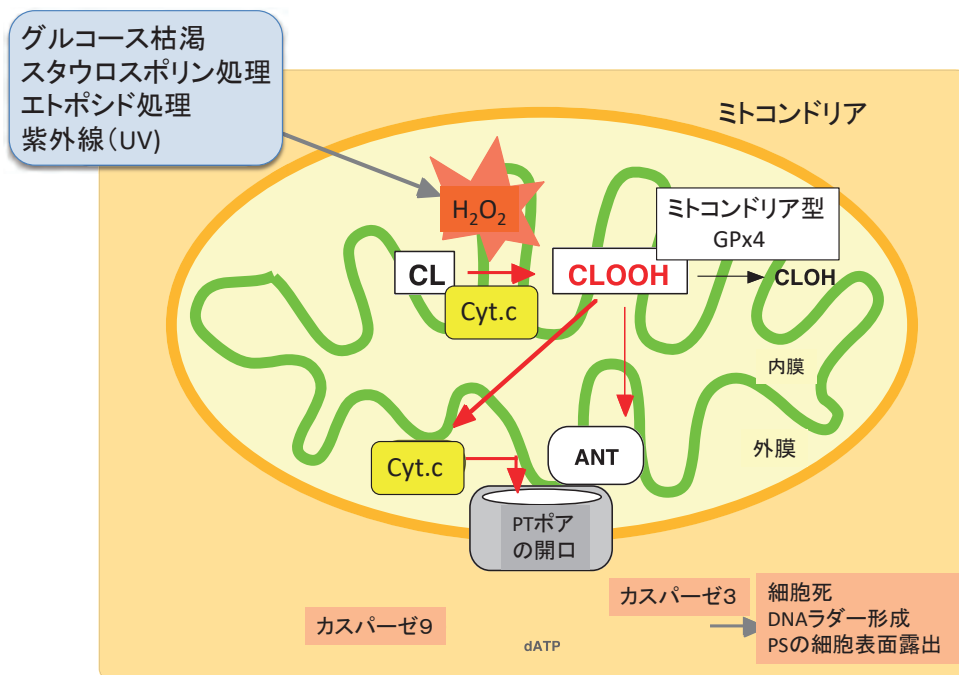
一方、エラスチンなどによるフェロトーシスによる脂質ヒドロペルオキシドの生成は鉄のキレーター DFO で抑制できる。また、リポキシトーシスでは 36 時間以降 48 時間後ぐらいまでに ERK のリン酸化が亢進する。また脂質ヒドロペルオキシド生成の下流で起きる ERK のリン酸化は、ビタミン E の添加により抑制された。また MEK の阻害剤や ERK、MEK のノックダウンはリポキシトーシスを抑制できる。このことから、リポキシトーシスでは 24 時間後に PCOOH が生成され、36 時間～48 時間後に ERK のリン酸化を介して細胞死が誘導されると考えられた (図 4)。最近我々は、この 24 時間後に生成する PCOOH を代謝できる脂質代謝酵素を見出し、この酵素を高発現するとリポキシトーシスを抑制できることを明らかにしたが、この酵素の高発現株は、エラスチンや RSL 3 によるフェロトーシスは全く抑制できなかった。フェロトーシスでは、その細胞死の誘導にホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) の生成が初反応とされているが [19]、この脂質代謝酵素は PE を基質としないことから抑制できないと考えられた。この結果もリポキシトーシスとフェロトーシスが異なる細胞死メカニズムであることを示すと共に、細胞内で初期に生じるリン脂質ヒドロペルオキシドの生成する分子種や部位が異なることが考えられる。

我々はリポキシトーシスの実行因子を明らかにするために網羅的 shRNA ライブラリーを導入した MEF 細胞において、タモキシフェン添加後 96 時間後に生存した細胞を回収し、導入された shRNA 配列を同定した。さらに単独の shRNA によるノックダウン細胞がリポキシトーシスを抑制できること、及びそのノックダウン細胞

に、shRNA 耐性の cDNA を導入するとリポキシトーシスが再現できるようになる遺伝子を絞り込み、6 遺伝子を同定し、Lipo 遺伝子と名付けた。この Lipo 遺伝子のノックダウンは、リポキシトーシスを抑制できたが、RSL 3 やエラスチンによるフェロトーシスは抑制できなかったことから、フェロトーシスとリポキシトーシスは異なる細胞死であることが明らかとなった。Lipo-1 及び Lipo-2 は機能未知の新規遺伝子で、Lipo-3 遺伝子は脂質代謝酵素であった。この 3 つの lipo 遺伝子の機能部位を明らかにしたところ、Lipo-1 は PCOOH の生成に関与し、Lipo-2 及び Lipo-3 は脂質酸化の下流および ERK のリン酸化の上流で機能することが明らかとなった。Lipo-2 及び Lipo-3 は脂質酸化の下流で機能する分子であり、フェロトーシスではこれまで明らかになっていない脂質酸化の下流のシグナル分子がリポキシトーシスには存在することを意味している (図 4)。

5. おわりに

我々は、フェロトーシスとは異なる脂質酸化依存的細胞死メカニズムであるリポキシトーシス経路が存在することを明らかにした。リポキシトーシスはミトコンドリア型 GPx 4 や核小体型 GPx 4 の高発現では抑制できず、非ミトコンドリア型 GPx 4 の高発現で抑制できることから、ミトコンドリア内の脂質酸化は関与しない。以前我々はグルコース枯渇などにより、アポトーシスを実行するカスパーゼの活性化因子であるチトクローム C (Cyt.c) がミトコンドリアから放出するのを、ミトコンドリア型 GPx 4 の高発現により抑制し、アポトーシスを抑制できることを明らかにした [7, 35]。その抑制メカニズム



CL:カルジオリピン、PS:ホスファチジルセリン、Cyt.C:チトクロームC、ANT:アデニンヌクレオチドトランスポーター

図5 カルジオリピンの酸化とアポトーシス

は、ミトコンドリアに特異的に存在するリン脂質カルジオリピン (CL) が酸化されカルジオリピンヒドロペルオキシド (CLOOH) が生成すると、カルジオリピンに特異的に結合していたチトクローム C がカルジオリピンの酸化により内膜から遊離すること [7, 36, 37]、またチトクローム C のミトコンドリア外膜からの放出口 PT ポア (permeability transition pore) の開閉を制御するアデニンヌクレオチドトランスポーター (ANT) がカルジオリピンヒドロペルオキシドにより構造変化を起こし、PT ポアを開口することをミトコンドリア型 GPx4 が抑制できることを報告している [38] (図5)。このことはカルジオリピンヒドロペルオキシド (CLOOH) がミトコンドリアを介するアポトーシスシグナルとなることを示している [7]。今回、リポキトーシスはホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) の生成が重要であり、フェロトーシスのホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) の生成が重要である。このように同じ脂質酸化依存的細胞死であっても、リン脂質の酸化される分子種、生成部位が異なると細胞死経路が異なることが予想される。

リポキトーシスは、タモキシフェン添加や shRNA による GPx4 欠損や組織特異的 GPx4 欠損マウスとその組織の初代培養細胞などで観察される。フェロトーシスのようにこの細胞死を誘導できる化合物を見出せば、フェロトーシスとの違いも、より鮮明になると考えられる。

フェロトーシス研究は、特にがん細胞の新たな治療戦略として研究が進んでいる。これまで利用されてきた抗がん剤に耐性を示したがん細胞は、GPx4 依存的に生存している間葉細胞系細胞に変化しており、フェロトーシスを誘導する化合物は、抗がん剤耐性細胞に効果を示すことが報告されている [39, 40]。私見ではあるが、がん細胞はシスチントランスポーター xCT を強く発現しており、また xCT のノックアウトマウスは正常に生育できることから、エラスチンのような xCT をターゲットとしたフェロトーシス誘導剤は有用であるように思われる。一方、RSL3 のような GPx4 をターゲットとするフェロトーシス誘導剤は、正常細胞においてはリポキトーシスを誘導する可能性を秘めており、副作用が出ることが予想される。

我々はリポキトーシスの詳細な分子メカニズムを明らかにすることにより、フェロトーシスとの違いを明らかにしていきたいと考えている。

参考文献

1. Martinez, J. Prix Fixe: *Efferocytosis as a Four-Course Meal. Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death* In: Current Topics in Microbiology and Immunology 403, edited by Nagata S. and Nakano H., Japan: Springer. 2017, p1-36.
2. Dixon, S.J., et al., *Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. Cell 149:1060-1072, 2012.

3. Que, X., et al. *Oxidized phospholipids are prionflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice*. Nature 558: 301-306, 2018.
4. Ambrogini, E., et al., *Oxidation-specific epitopes restrain bone formation*. Nat. Commun. 9 : 2193 doi 10.1038/s41467-018-04047-5, 2018.
5. Shimanaka, Y., et al., *Omega-3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation*. Nat. Med. 23:1287-1297. 2017.
6. Shindou, H. and Shimizu, T. *Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases*. J Biol Chem. 284:1-5. 2009.
7. Imai, H., and Nakagawa, Y. *Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells*. Free Radic Biol Med. 34:145-169. 2003.
8. Imai, H. *New Strategy of Functional Analysis of PHGPx Knockout Mice Model Using Transgenic Rescue Method and Cre-LoxP System*. J Clin Biochem Nutr. 46:1-13, 2010.
9. Imai, H., et al., *Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis* In: Current Topics in Microbiology and Immunology 403, edited by Nagata S. and Nakano H., Japan: Springer. 2017, p143-70.
10. Imai, H., et al., *Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice*. J Biol Chem. 284:32522-32532. 2009.
11. 今井浩孝,リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) と男性不妊. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 19:59-70, 2012.
12. Imai, H., et al. *Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males*. Biol Reprod. 64:674-683, 2001.
13. Smith, A.C., et al., *Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia*. J Med Genet. 51:470-474, 2014.
14. Imai, H., et al., *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene*. Biochem Biophys Res Commun. 305:278-286, 2003.
15. Yagoda, N., et al., *RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels*. Nature 447:864-868, 2007.
16. Yang, W.S., et al., *Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4*. Cell. 156:317-331, 2014.
17. Dixon, S.J., et al., *Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death*. ACS Chem Biol. 10:1604-1609, 2015.
18. Doll, S., et al., *ACSL4 dictates ferroptosis*

- sensitivity by shaping cellular lipid composition.* Nat Cell Biol, 13 : 91-98, 2017.
19. Kagan, V.E., *et al.*, *Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis.* Nat Cell Biol, 13 : 81-90, 2017.
 20. Wenzel, S.E., *et al.*, *PEBPI wardens ferroptosis by enabling lipoxygenase generation of lipid death signals.* Cell 171 : 628-641, 2017.
 21. Friedmann Angeli, J.P. *et al.*, *Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice.* Nat Cell Biol. 16:1180-1191, 2014.
 22. Jiang, L., *et al.*, *Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression.* Nature. 520:57-62, 2015.
 23. Wang, S.J., *et al.*, *Acetylation Is Crucial for p53-Mediated Ferroptosis and Tumor Suppression.* Cell Rep. 17:366-373, 2016.
 24. Zhang, Y., *et al.*, *BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression.* Nature Cell Biol. 20:1181-1192. 2018.
 25. Gao, M., *et al.*, *An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells.* Biochem J. 473:769-777. 2016.
 26. Dowdle, W.E., *et al.*, *Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo.* Nat Cell Biol. 16:1069-1079, 2014.
 27. Hou, W., *et al.* *Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin.* Autophagy. 12:1425-1428. 2016.
 28. Shin, D., *et al.*, *Nrf2 inhibition reverses resistance to GPx4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer.* Free Radic Biol. Med. 129:454-462, 2018.
 29. 今井浩孝,松岡正城,中西広樹,田口良,石田規子,七里元督,吉田康一,二木鋭雄,清水孝彦,新井洋由,中川靖一 ビタミンEは肝臓特異的PHGPx欠損マウスの出生直後死をレスキューする. ビタミンE研究の進歩XV:68-72, 2012
 30. 今井浩孝 GPx4により制御される脂質酸化依存的細胞死とフェロトーシス: 実験医学, 34 : 37-46, 2016
 31. Ueta, T., *et al.* *Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells.* J Biol Chem. 287:7675-7682, 2012.
 32. 今井浩孝 生体膜リン脂質のレドックス制御によるフェロトーシス制御: 実験医学, 36 : 726-734, 2018
 33. 今井浩孝 酸化リン脂質クオリティ制御の破綻による疾患と抗がん剤治療戦略: 実験医学, 36 : 1701-1711, 2018
 34. Imai, H. *Disruption of homeostasis of suppression of phospholipid peroxidation in biomembrane case novel cell death in disease.* Oleoscience 11:15-23, 2011.
 35. Nomura, K., *et al.*, *Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway.* J Biol Chem. 274:29294-29302, 1999
 36. Kagan, V.E., *et al.*, *Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors.* Nat Chem Biol. 1:223-232, 2005.
 37. Nomura, K., *et al.*, *Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis.* Biochem J. 351:183-193, 2000.
 38. Imai, H., *et al.*, *Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.* Biochem J. 371:799-809, 2003.
 39. Viswanathan, V.S., *et al.*, *Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway.* Nature 547:453-457, 2017.
 40. Hangauer MJ, *et al.*, *Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPx4 inhibition.* Nature 551: 247-250, 2017.

Lipid peroxidation dependent cell death -Ferroptosis and lipoxytosis-

Hiroataka Imai

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University

Abstract

Recently an iron dependent lipid peroxidation cell death “ferroptosis” has attracted attention. Ferroptosis is a novel caspase independent cell death that can be elicited by pharmacological inhibiting the cysteine/glutamate antiporter, system Xc- (Type I) or directly binding and loss of activity of glutathione peroxidase 4 (GPx4) (Type II) in cancer cells with high level RAS-RAF-MEK pathway activity, but not in normal cells. Ferroptosis by Erastin (Type I) and RSL3 (RAS-selective lethal3, Type II) treatment was induced until 24hr and suppressed by an iron chelator DFO (deferroxamine) , vitamin E and ferrostatin-1, antioxidant compound. On the other hand, we reported that depletion of GPx4 in several tissues of mice could induce cell death in normal tissues of mice. In our established tamoxifen inducible GPx4 KO MEF cell line, cell death at 72hr and lipid peroxidation at 24hr after addition of tamoxifen were not suppressed by iron chelator DFO, but by vitamin E and ferrostatin-1, a ferroptosis specific antioxidant inhibitor. We identified six Lipo genes that could suppress non-mitochondrial GPx4 deficient cell death after addition of tamoxifen by genome-wide shRNA library screening, but not RSL3 or Erastin induced ferroptosis, indicating that GPx4 deficient cell death (lipoxytosis) by tamoxifen is different cell death from ferroptosis by erastin and RSL3. We previously reported that overexpression of mitochondrial GPx4 could suppress apoptosis by inhibition of peroxidation of cardiolipin for release of cytochrome c from inner membrane of mitochondria. These results demonstrated that lipid peroxidation at different species of phospholipid or at different organelle might induce several different cell death pathways. In this review, I would like to introduce about ferroptosis and lipoxytosis from my viewpoint.

Keywords : GPx4, lipid peroxidation, iron, vitamin E, ferroptosis

【総説】

鉄代謝とその制御

宮沢 正樹

東海大学 健康学部 健康マネジメント学科

要約

鉄は酸素の運搬をはじめ、エネルギー産生、DNA の複製など生体や細胞の恒常性維持に必要なミネラルであり、ヘム鉄や鉄硫黄クラスターを活性中心としたタンパク質の重要な機能性分子である。鉄の欠乏は鉄欠乏性貧血をはじめとする栄養障害の原因となる一方で、過剰な鉄は酸化障害を誘発する活性酸素種の産生要因となり、老化の促進、発がんや腫瘍の悪性を促すことが懸念されている。そのため、細胞内の鉄濃度は正常な生理機能を維持するために素早くかつ厳密に制御されなければならない。この鉄の代謝に関する研究はここ数年で多くの新たな発見があり、本稿では生体および細胞内の鉄調節機構の概説とマイクロRNAによる新たな鉄代謝制御を中心に紹介する。

キーワード：Iron metabolism, Ferritin, Transferrin receptor 1, Iron regulatory protein, miRNA

1. はじめに

成人男性の体内には約 4 g の鉄が存在する。生体には能動的な鉄の排出機構は備えられておらず、食事により消化管から吸収すべき鉄は 1 日にわずか 1 mg 程度である。これは、腸粘膜や皮膚の脱落、失血、汗などを介して 1 日に約 1 mg の体外へ排出される鉄を補う目的である [1]。

生体内の約 60% の鉄は赤血球内のヘモグロビンのヘム鉄として存在している。そして、約 5% は筋組織におけるミオグロビン中に存在する。また、鉄貯蔵の場である肝臓には、後述するフェリチンの内部に貯蔵鉄として約 30% の鉄が含有されている。1 日 1 mg 程度の鉄摂取にもかかわらず、生体は造血や鉄含有タンパク質の産生のために 1 日 20-25 mg の鉄を必要とする。そのため、利用される鉄の大半は約 120 日を経過して寿命となった赤血球をマクロファージが貪食し、取り出された鉄を再利用することで補われている [1, 2]。

鉄はポルフィリン環と二価鉄の錯体であるヘム鉄としてヘモグロビン内に存在し、酸素の輸送を担う。また、

鉄はヘム鉄、非ヘム鉄、鉄硫黄クラスターとして核酸合成に関わるリボヌクレオチドレダクターゼやエネルギー代謝における種々の酵素（アコニターゼ、クエン酸シキターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、NADH デヒドロゲナーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼなど）の活性中心となり、多くの生体反応プロセスに関与する [3]。そのため、生体は常に十分な鉄を保持する必要があるが、鉄はレドックス活性を有するために、過剰な鉄はフェントン反応を介したヒドロキシラジカルの発生原因となり、酸化ストレスを起因とする細胞障害を引き起こし、繊維化、アポトーシス、発がんにつながる [1, 4, 5]。常染色体劣性遺伝である原発性ヘマクロマトーシスでは生体内貯蔵鉄の異常な増加により肝臓、すい臓、心臓、皮膚などの実質細胞に鉄の沈着が生じ、それによる臓器障害の結果として、肝硬変、糖尿病、心不全が引き起こされる [6]。つまり、鉄欠乏と過剰鉄の各々が細胞障害を招き、臨床症状を呈する個体レベルの障害へとつながる諸刃の剣であるといえる。それゆえ、適切かつ安全な量の鉄を維持するために、細胞は「生体内」および「細胞内」の両方の鉄を制御する多彩な鉄制御システムを構築している。

2. 鉄の吸収と再利用に関わる因子

これまでに細胞内の鉄代謝ネットワークの全容が徐々に明らかになり、おおよそ 150 の因子が関与し、100 以上の反応が存在することが分かってきた [7]。ここでは、

連絡先：宮沢正樹 〒 259-1292

神奈川県平塚市北金目 4-1-1

TEL：0463-58-1211（代表）内線 5728, 5738

FAX：0463-50-2259

E-mail：m.miyazawa@tsc.u-tokai.ac.jp

その中でも鉄の制御で中心的な働きをする因子および経路について解説する。

a) 「生体内」への鉄の吸収およびその制御

食事により体内へ取り込まれた鉄は、腸上皮細胞の管腔側において divalent metal transporter 1 (DMT1) を介して細胞内へ吸収される。そして、唯一既知である細胞内から鉄を排出するポンプ、フェロポーチン (FPN) により鉄は基底膜側から血清中へ放出される [1]。哺乳類において生体内の鉄の量は肝細胞ペプチドホルモンであるヘプシジンにより制御されている [8]。ヘプシジンは血液中を循環し、鉄排出ポンプである FPN と直接結合することでその分解を促進し、細胞内から血清中への鉄の放出を制限することで鉄の細胞内保持を促進する。具体的には、血清ヘプシジンの上昇は食事による鉄の吸収を担う十二指腸上皮細胞、赤血球から鉄のリサイクルを行う脾臓マクロファージ、鉄の貯蔵を担う肝細胞に存在する FPN を下方制御して血清鉄を減少させる。(図 1)。

b) 「細胞内」への鉄の取り込みおよびその利用

トランスフェリン (Tf) は鉄 (Fe) のキャリアとして働く血清タンパク質であり、1 分子あたり 2 原子の三価鉄と結合し、Tf-Fe 結合体として血流に乗り全身の細胞に鉄を供給する [9]。トランスフェリン受容体 1 (TfR1) は、この Tf-Fe 結合体を効率的に細胞内に取り込むための二量体膜貫通型タンパク質であり、すべての脊椎動物および細胞種で発見されている [10]。TfR1-Tf-Fe 複合体はエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、続いてエンドソーム内で鉄が Tf から解離する (図 2)。エンドソーム内の鉄は DMT1 を介して細胞質へ放出され [11]、エンドソームは細胞膜と再融合すること

で TfR1 および Tf はリサイクルされる。TfR1 は赤芽球に多く発現し、ヘモグロビンの合成に必要な大量の鉄の供給に重要な働きをする。また、鉄は核酸合成に必須であるリボヌクレオチドレダクターゼの活性中心でもあるため、細胞増殖の著しい腸上皮細胞や腫瘍細胞で TfR1 の高い発現が確認されている。一方で、鉄排出タンパク質 FPN は多くの腫瘍細胞で抑制されていることが明らかとなっている。これは主に DNA のメチル化による発現レベルの抑制あるいはヘプシジンの発現上昇によるものであり、結果的に高い細胞内鉄濃度の維持につながる [12, 13]。

細胞内の鉄結合性タンパク質であるフェリチンは余剰な鉄を貯蔵する細胞内の鉄貯蔵庫として重要な役割を果たしている (図 2)。フェリチンは重鎖 (H サブユニット) および軽鎖 (L サブユニット) の 24 個のサブユニットが集まった中空構造の籠状タンパク質であり、この空間に最大でおおよそ 4500 個の鉄分子を格納することができる。フェリチン H は鉄を二価から三価に酸化させるフェロキシダーゼ活性を有し、鉄をレドックスネガティブな安全な状態で保存することで、フェントン反応によるヒドロキシラジカルの生成を抑制することができる。また、フェリチン L は構造全体を支持する役目を担いとされている [14]。細胞内の鉄が欠乏状態になった場合はフェリチンがリソソームで分解されることで鉄が取り出され利用される [15]。

細胞内に存在する鉄の多くは、poly-(rC)-binding protein (PCBP) ファミリーにより非ヘム鉄として直接タンパク質に組み込まれ利用されるか [16, 17]、ヘム合成経路および鉄硫黄クラスター合成経路の重要な段階が局在しているミトコンドリアへと集約される [18]。鉄のミトコンドリアへの輸送やヘム鉄および鉄硫黄クラスターの輸送については現在も不明な点が多く残されている。

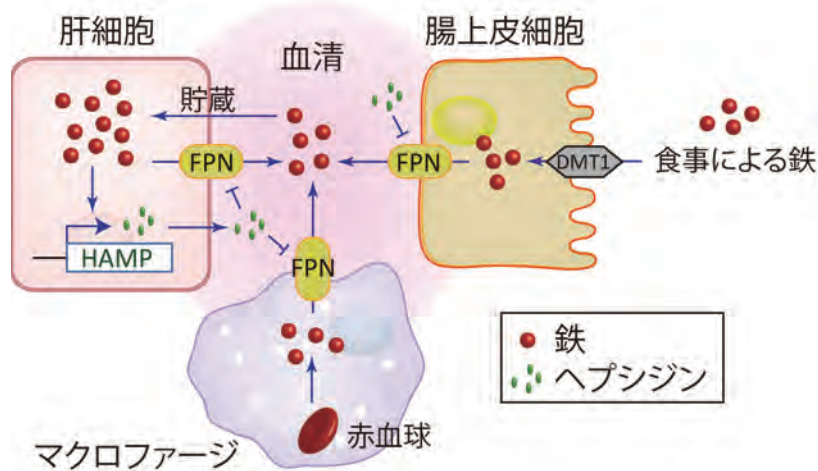


図 1 生体内の鉄代謝制御

食事による鉄は腸上皮細胞の DMT1 を介して細胞内へ取り込まれる。そして全身の鉄濃度は HAMP 遺伝子にコードされている肝細胞ペプチドホルモンであるヘプシジンと鉄排出ポンプである FPN により制御される。

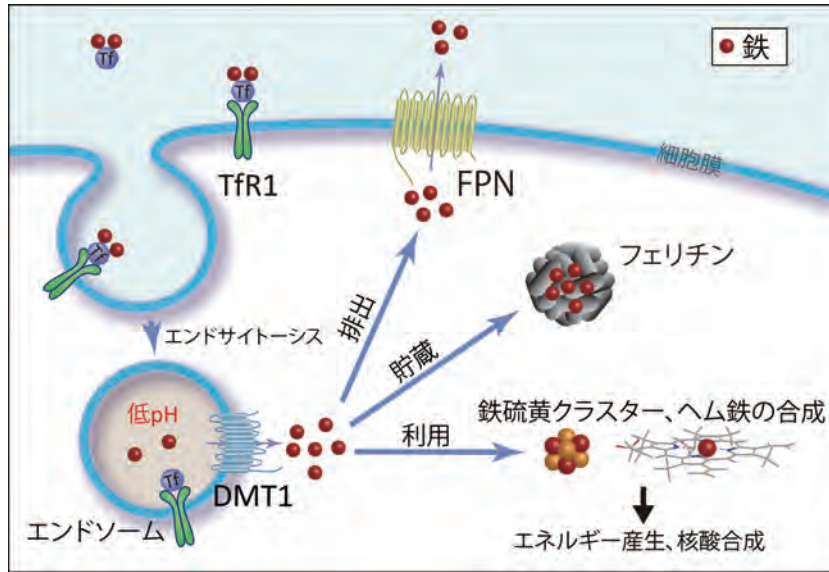


図2 細胞内の鉄代謝制御

血清中の鉄は Tf と結合し、TfR1 および DMT1 を介して細胞内へ取り込まれる。そしてヘム鉄および鉄硫黄クラスターの合成に利用される。余剰鉄は鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンにより安全に貯蔵されるか、FPN により細胞外へ排出される。

3. IRE-IRP 制御システム

細胞内の鉄代謝制御はそれに関わる遺伝子群の転写後調節により厳密に制御されている。上述した DMT1、FPN、TfR1、フェリチン H および L の mRNA は、コード配列(CDS)に隣接する 5'- または 3'-非翻訳領域(UTR) にステムループ構造 (C-A-G-U-G-U または C) を含む鉄応答性エレメント (iron-responsive element : IRE) を有している [19]。そして IRE は 2 つの機能的に類似する mRNA 結合型鉄調節タンパク質 iron regulatory

protein (IRP) 1 および 2 と相互作用することができる (図 3)。IRP1 と IRP2 は相補的に働くが、ノックアウトマウスを用いた研究により IRE-IRP 制御系は IRP2 が中心的な役割を果たしていることが明らかとなっている [20]。

特筆すべきは、IRE が 5'- または 3'-UTR のどちらかに位置するかにより IRE-IRP の相互作用による転写後調節が全く逆になる点にある。鉄欠乏状態において IRP は活性型となり IRE のステムループに結合することが

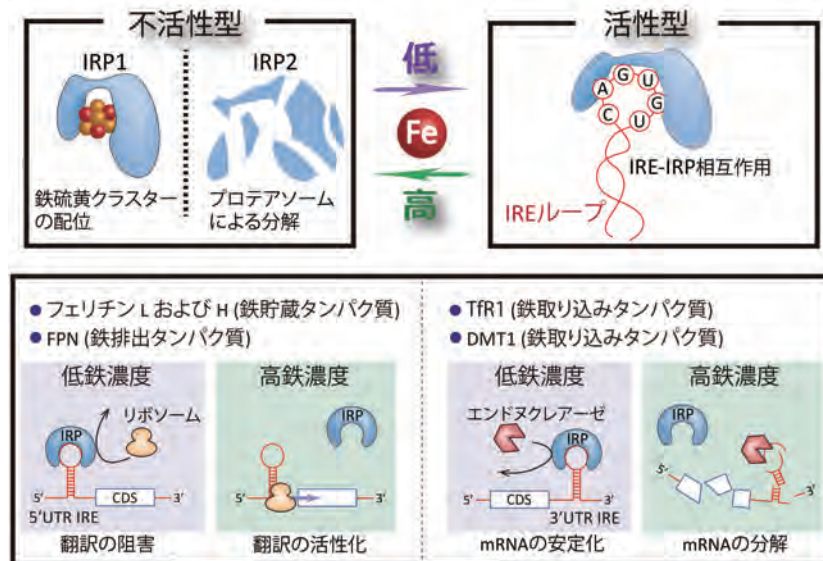


図3 IRE-IRP 制御系による細胞内の鉄代謝制御

細胞内の鉄が欠乏状態の場合、IRP1 および 2 は IRE のステムループと結合する。その一方で、鉄が過剰である場合、IRP1 は鉄硫黄クラスターと会合し、IRP2 はプロテアソームによる分解を受けることにより IRE から解離する。フェリチンおよび FPN の mRNA は 5'-UTR 側に IRE を有し、TfR1 および DMT1 mRNA は 3'-UTR 側に IRE を有する。

可能となるが、IRP 標的遺伝子の 5'-UTR に IRE が位置している場合、IRP の IRE への結合は標的 mRNA とリボソームの相互作用を阻害し、結果としてその遺伝子の翻訳阻害を引き起こす (図 3)。一方で、3'-UTR に IRE を有する場合、IRP の IRE への結合は、エンドヌクレアーゼによる mRNA の分解から保護する効果を発揮し、標的 mRNA を安定化させる。対照的に、鉄過剰状態において IRP1 および 2 は不活性型となり IRE から解離する。これは IRP1 が鉄硫黄クラスターと相互作用し、IRP2 がプロテアソームによる分解を受けるためである (図 3) [21]。この IRP の解離状態において、5'-UTR に IRE を有する mRNA は、翻訳の活性化が見られ、3'-UTR に IRE を有する mRNA は、エンドヌクレアーゼによる分解を受けることになる [22]。

5'-UTR に位置する IRE は鉄貯蔵タンパク質フェリチンや鉄排出タンパク質 FPN といった細胞内の鉄の量を低下させる作用を有する遺伝子において見いだされる。その一方で、3'-UTR に位置した IRE は鉄の細胞内取り込みを促進させる遺伝子、TfR1 や DMT1 で見いだされている (図 3)。そのため、鉄が欠乏した場合、IRP の活性化によりフェリチンおよび FPN の量は低下し、それと同時に TfR1 および DMT1 の発現の上昇が生じて、細胞内鉄濃度は増加する。鉄が過剰な場合は、IRP の不活性化を介して逆の反応が生じることで、細胞内鉄濃度は減少する (図 3)。

その他の制御として、ヒ素、ロテノン、ヘミンといった酸化ストレス誘導因子、ならびに tert-ブチルヒドロキノンやレスベラトロールといった抗酸化物質は、ヒトあるいはマウスにおけるフェリチンの転写を活性化することが明らかとなっている。これは転写開始部位から約 4 kb 上流に位置する抗酸化剤応答エレメント (antioxidant response element: ARE) に NF-E2-related factor 2 (Nrf2) や JunD が結合するためであり [23]、

最終的なフェリチンの量は IRE-IRP および ARE-Nrf2-Keap1 制御系の両軸により決定される。また、FPN は 5'-UTR IRE を介した IRP による調節とヘプシジン-FPN 経路による調節の重複が存在する。そのため FPN は細胞内および生体内の鉄状態の両方に相関し、複数のシグナル伝達経路を介して制御される [8, 24]。

また、これまで鉄の調節は IRP に強く依存して調節されていると考えられてきたが、近年の研究により、二価鉄が直接 5'-UTR IRE へ結合し、ステムループの構造変化を引き起こすことで IRP への親和性の低下、リボソーム誘導因子 eIF4F の親和性の増加を介して転写後調節を制御する可能性も示唆された [25-27]。

4. 鉄代謝系における miRNA の新たな役割

a) miRNA 生合成における鉄の重要性

マイクロ RNA (miRNA) は 20 塩基前後の短い一本鎖の非コード RNA 分子であり遺伝子の転写後調節に関与することで様々な生命現象を調節する [28]。前駆体である primary miRNA (pri-miRNA) はリボヌクレアーゼ Drosha および Dicer によってプロセッシングを受ける。そして、遺伝子のサイレンシングに直接関与する Ago タンパク質を含む複合体 RNA-induced silencing complex (RISC) に組み込まれて成熟 miRNA となる。miRNA の機能に必須なシード配列 (5' 末端より 2-8 塩基) は、標的 mRNA の 3'-UTR 内の相補的な配列と相互作用することで RISC をその場へリクルートする (図 4)。その後、標的 mRNA と会合した RISC は、標的遺伝子の翻訳を妨げるか、あるいは分解を誘導することによりその遺伝子を抑制する。この miRNA の生合成の過程に関する近年の研究は、鉄の重要な役割を示している。例えば、リボヌクレアーゼ Drosha は核内において RNA 結合タンパク質 DiGeorge critical region 8 (DGCR8) と複合体を形成して pri-miRNA のプロセッシングを行う

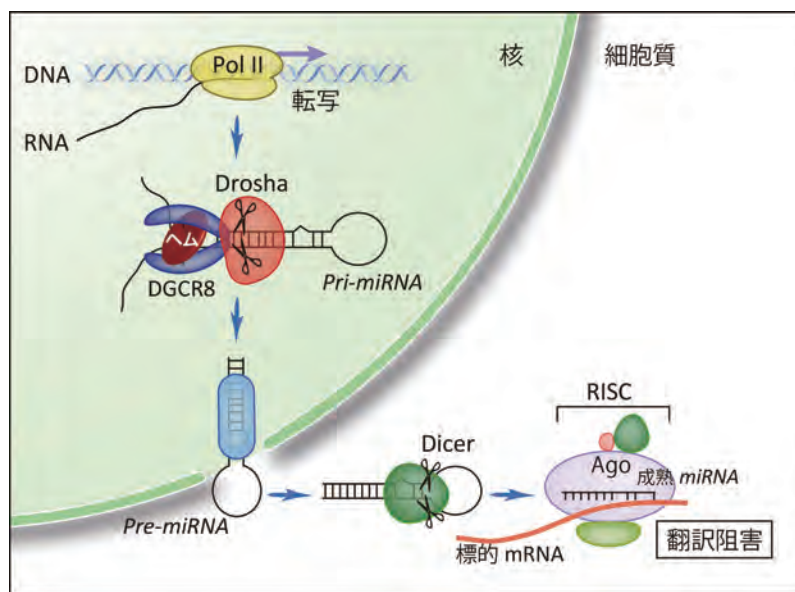


図 4 miRNA 生合成プロセスにおけるヘム鉄の関与

が、この DFRC8-Drosha 複合体の活性化にヘム鉄が必須であることが明らかにされた [29] (図4)。

b) miRNA による TfR1 mRNA の分解制御

細胞内への鉄の取り込みを担う TfR1 の mRNA 量は IRE-IRP 制御系により細胞内の鉄濃度と逆相関関係にある。TfR1 mRNA の 3'-UTR に位置している約 700 bp の領域には5つの IRE ステムループ (A-E) が含まれている [30]。これらの IRE ステムループからの IRP の解離は TfR1 mRNA の不安定化および分解を進行させるが、詳細な分解メカニズムは不明な点が多く残されている。TfR1 mRNA の分解に関する初期の研究は、IRE 領域内の特定の部位がエンドヌクレアーゼにより切断されることが分解の起因となると示唆した [31]。しかしながら、その発見から約 25 年経った近年の詳細な解析は、これまでの知見と一致せず、TfR1 不安定化に寄与するいくつかの IRE ステムループを含まない配列を提案した [32]。この結果は、鉄濃度依存性の IRE-IRP 制御系とは独立した TfR1 mRNA 分解メカニズムの可能性が高いと考えられた。そのため、鉄を介した特定のエフェクター分子やその分解経路はいまだに明らかにされていない。

そこで筆者らは TfR1 IRE における IRP 結合部位にその分解を制御する配列が含まれる可能性を考えた。そして TfR1 IRE 上にいくつかの保存された miRNA のターゲット配列が含まれることを TargetScan (<http://www.targetscan.org>) による解析で見出した。具体的には、miR-124、miR-7、miR-141/200a がそれぞれ TfR1 mRNA の IRE ステムループ B、C および E に結合する可能性がある miRNA の候補として挙げられた。また、miR-9 の標的配列が IRE ステムループ A の上流、miR-144 および miR-145 が IRE ステムループ B と C の間の領域に存在することを明らかにした。筆者らはこれらの miRNA に対して詳細な解析を行った結果、miR-7 および miR-141/200a が TfR1 の IRE ステムループを標的として TfR1 mRNA を分解することを見出した (図5) [33]。そして、この miRNA による mRNA の分解は鉄による IRP の解離を起因としていることを明らかに示唆した。また、miR-7 および miR-141/200a のアンタゴニストは鉄処理あるいは IRP のノックダウンにより誘導される TfR1 mRNA の分解を有意に抑制した。これらの結果は miRNA による mRNA 分解が IRP による miRNA 標的配列の保護の有無で制御されうること示し、IRE-IRP 制御系および miRNA 分解系の 2 つの独立

した機構が同調し、協調的に働くという新たな遺伝子制御機構を提案した。

5. 鉄代謝とがん

細胞分裂が活発ながん細胞は、エネルギー産生や DNA の生合成を活性化させるために常に多くの鉄を保持する必要があると考えられている。鉄の取り込みを担う TfR1 の高い発現は様々な腫瘍細胞で散見されるが、その高発現のメカニズムは不明な点が多い [34-36]。筆者の研究においても、すい臓がんの患者で TfR1 の高い発現と生存率の低下が相関することを示した [33]。さらに、そのサンプルにおいて miR-7 の発現量が高いグループは、TfR1 の発現量が有意に低下していたことから、miR-7 の発現制御機構もがん細胞内の鉄の調節に重要であることを示唆しており、現在解析を進めている。

細胞内鉄濃度の増加は、フェントン反応を介したヒドロキシラジカルの発生を促し、DNA への酸化障害を誘発する。そのため、過剰な鉄はヒトにおいて発がんのリスクファクターになり得ると提言されている [5, 37, 38]。また、NIH などが実施した大規模なコホート調査では、鉄分の摂取量と食道がん、結腸直腸がん、肝臓がん、肺がんなど、いくつかの悪性腫瘍の発生率が正の相関を示した [39, 40]。そのため、多くの研究者は鉄のキレート剤の投与による抗腫瘍効果について長年研究を行ってきた。しかし、現在までに FDA の認可を受けた抗がん剤としての鉄キレート剤は存在しない。これは IRE-IRP 制御系による鉄濃度調節機構が素早く (数十分~数時間以内) 機能し、鉄キレート剤投与による鉄の欠乏効果が一時的となることが要因であると考えられる。今後、鉄代謝の全容解明が進み、鉄の濃度をがん細胞特異的にそして不可逆的に減少させる方法が明らかとなれば鉄代謝を標的としたがん治療が実現するかもしれない。

引用文献

1. Andrews NC: Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 2000, 1:208-217.
2. Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV: A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2014, 844:201-225.
3. Torti SV, Manz DH, Paul BT, Blanchette-Farra N, Torti FM: Iron and Cancer. *Annu Rev Nutr* 2018, 38:97-125.
4. Dixon SJ, Stockwell BR: The role of iron and

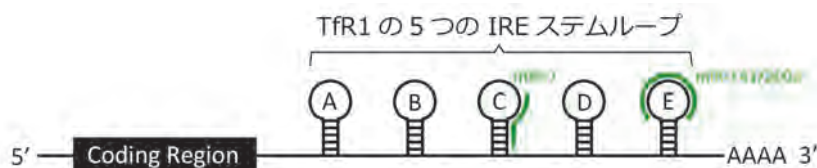


図5 TfR1 IRE の5つのステムループおよび miR-7 および miR-141/200a の標的配列

- reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* 2014, 10:9-17.
5. Toyokuni S: Iron and thiols as two major players in carcinogenesis: friends or foes? *Front Pharmacol* 2014, 5:200.
 6. Beutler E: Hemochromatosis: genetics and pathophysiology. *Annu Rev Med* 2006, 57:331-347.
 7. Hower V, Mendes P, Torti FM, Laubenbacher R, Akman S, Shulaev V, Torti SV: A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. *Mol Biosyst* 2009, 5:422-443.
 8. Ganz T, Nemeth E: Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1823:1434-1443.
 9. Aisen P, Leibman A, Zweier J: Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* 1978, 253:1930-1937.
 10. Lambert LA: Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1820:244-255.
 11. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC: Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:1148-1153.
 12. Zhang S, Chen Y, Guo W, Yuan L, Zhang D, Xu Y, Nemeth E, Ganz T, Liu S: Disordered hepcidin-ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cell Signal* 2014, 26:2539-2550.
 13. Pinnix ZK, Miller LD, Wang W, D'Agostino R, Jr., Kute T, Willingham MC, Hatcher H, Tesfay L, Sui G, Di X, et al: Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med* 2010, 2:43ra56.
 14. Theil EC, Tосha T, Behera RK: Solving Biology's Iron Chemistry Problem with Ferritin Protein Nanocages. *Acc Chem Res* 2016, 49:784-791.
 15. Kidane TZ, Sauble E, Linder MC: Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006, 291:C445-455.
 16. Leidgens S, Bullough KZ, Shi H, Li F, Shakoury-Elizeh M, Yabe T, Subramanian P, Hsu E, Natarajan N, Nandal A, et al: Each member of the poly-r (C) -binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *J Biol Chem* 2013, 288:17791-17802.
 17. Nandal A, Ruiz JC, Subramanian P, Ghimire-Rijal S, Sinnamon RA, Stemmler TL, Bruick RK, Philpott CC: Activation of the HIF prolyl hydroxylase by the iron chaperones PCBP1 and PCBP2. *Cell Metab* 2011, 14:647-657.
 18. Ponka P: Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 1997, 89:1-25.
 19. Kuhn LC: Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. *Metallomics* 2015, 7:232-243.
 20. Fleming RE, Feng Q, Britton RS: Knockout mouse models of iron homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2011, 31:117-137.
 21. Hentze MW, Kuhn LC: Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:8175-8182.
 22. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y: Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci* 2016, 41:274-286.
 23. Tsuji Y: JunD activates transcription of the human ferritin H gene through an antioxidant response element during oxidative stress. *Oncogene* 2005, 24:7567-7578.
 24. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C: Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010, 142:24-38.
 25. Ma J, Haldar S, Khan MA, Sharma SD, Merrick WC, Theil EC, Goss DJ: Fe²⁺ binds iron responsive element-RNA, selectively changing protein-binding affinities and regulating mRNA repression and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:8417-8422.
 26. Khan MA, Ma J, Walden WE, Merrick WC, Theil EC, Goss DJ: Rapid kinetics of iron responsive element (IRE) RNA/iron regulatory protein 1 and IRE-RNA/eIF4F complexes respond differently to metal ions. *Nucleic Acids Res* 2014, 42:6567-6577.
 27. Khan MA, Walden WE, Goss DJ, Theil EC: Direct Fe²⁺ sensing by iron-responsive messenger RNA:repressor complexes weakens binding. *J Biol Chem* 2009, 284:30122-30128.
 28. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, 136:215-233.
 29. Weitz SH, Gong M, Barr I, Weiss S, Guo F: Processing of microRNA primary transcripts requires heme in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111:1861-1866.
 30. Casey JL, Hentze MW, Koeller DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD, Harford JB: Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 1988, 240:924-928.
 31. Binder R, Horowitz JA, Basilion JP, Koeller DM, Klausner RD, Harford JB: Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage

- within the 3' UTR and does not involve poly (A) tail shortening. *Embo j* 1994, 13:1969-1980.
32. Rupani DN, Connell GJ: Transferrin receptor mRNA interactions contributing to iron homeostasis. *Rna* 2016, 22:1271-1282.
 33. Miyazawa M, Bogdan AR, Hashimoto K, Tsuji Y: Regulation of transferrin receptor-1 mRNA by the interplay between IRE-binding proteins and miR-7/miR-141 in the 3'-IRE stem-loops. *Rna* 2018, 24:468-479.
 34. Prutki M, Poljak-Blazi M, Jakopovic M, Tomas D, Stipancic I, Zarkovic N: Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett* 2006, 238:188-196.
 35. Jamnongkan W, Thanan R, Techasen A, Namwat N, Loilome W, Intarawichian P, Titapun A, Yongvanit P: Upregulation of transferrin receptor-1 induces cholangiocarcinoma progression via induction of labile iron pool. *Tumour Biol* 2017, 39:1010428317717655.
 36. Deng Z, Manz DH, Torti SV, Torti FM: Iron-responsive element-binding protein 2 plays an essential role in regulating prostate cancer cell growth. *Oncotarget* 2017, 8:82231-82243.
 37. Stevens RG, Jones DY, Micozzi MS, Taylor PR: Body iron stores and the risk of cancer. *N Engl J Med* 1988, 319:1047-1052.
 38. Toyokuni S, Mori T, Dizdaroglu M: DNA base modifications in renal chromatin of Wistar rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Int J Cancer* 1994, 57:123-128.
 39. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Sinha R: A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* 2010, 70:2406-2414.
 40. Cross AJ, Leitzmann MF, Gail MH, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Sinha R: A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Med* 2007, 4:e325.

Iron metabolism and its regulatory mechanisms

Masaki Miyazawa

Department of Health Management, School of Health Studies,
Tokai University

Abstract

Iron is indispensable for a wide variety of biological events including oxygen transport, energy production, DNA synthesis and numerous metabolic pathways by serving as a functional constituent of various key proteins. In contrast, excess iron is harmful by catalyzing generation of reactive oxygen species and causing oxidative cell damage leads to cell death and carcinogenesis. Therefore, iron metabolism must be finetuned to maintain normal cellular functions as well as to prevent iron-mediated oxidative stress. Recent study of iron metabolism continues to be a vibrantly field, with many breakthroughs and novel insights. Here we show overview of some key factors involved in iron metabolism, and new iron regulatory mechanisms by micro RNA.

Keywords : Iron metabolism, Ferritin, Transferrin receptor 1, Iron regulatory protein, miRNA

【シンポジウム報告記】

第 39 回日本基礎老化学会シンポジウム報告記

清水 孝彦

千葉大学

大学院医学研究院・内分泌代謝・血液・老年内科学

2018 年 10 月 13 日土曜日午後、千葉大学けやき会館大ホールにて、第 39 回日本基礎老化学会シンポジウムが開催された。今回は、初めての千葉開催でもあり、テーマ「栄養・代謝シグナルと老化制御機構の接点」のもとで、千葉大学や関東在籍の先生を中心に講演をいただいた。シンポジウム参加総数は演者を含め、70 名であった。

まずトップバッターは、殿城 亜矢子先生（千葉大学大学院薬学研究院・生化学）の「インスリンシグナルによる記憶システムの恒常性維持機構」の発表であった。インスリンシグナル経路が学習や記憶の形成にどのように関わっているのかを遺伝子改変ショウジョウバエを用いた研究データで紹介した。その中で、インスリンペプチドの一つである *dilp3* が加齢で特異的に発現が低下すること、またインスリン産生細胞に一過的な *dilp3* の過剰発現が、老齢個体における記憶低下を抑制することを報告した。インスリンシグナル経路は寿命制御だけでなく、学習や記憶の形成にも重要な役割を担うらしい。

次に、赤木 一考先生（国立長寿医療研究センター・組織恒常性研究 PT）が、「食餌制限による腸管バリア機能の制御機構」に関して、発表された。食餌制限は、種を超えて寿命延長と疾患予防効果が知られている。そのメカニズムの一端として、加齢による腸管バリア機能破綻を抑制することをショウジョウバエモデル系で紹介された。腸管において転写因子 *dMyc* が加齢依存的に減少し、かつ食餌制限でその減少が緩和することから、*dMyc* が腸管バリア機能に重要な役割を持つことを報告した。

齧歯類を用いた研究として、高橋 伸一郎先生（東京大学大学院農学生命科学研究科・動物細胞制御学）が、「アミノ酸シグナルとインスリン様シグナルによる物質代謝の調節」に関して、発表した。まず寿命制御シグナルとして著明なインスリンと IGF-1 作用を例えると、前者が短距離選手、後者は長距離選手と紹介され、なるほど納得したのが印象的であった。また、栄養失調の一つ「クワシオルコル」は脂肪肝を呈するが、アミノ酸欠乏のシグナルが、インスリンシグナルを増強させると同時に、直接肝臓の脂肪蓄積を引き起こすことを報告した。また血中の特定のアミノ酸濃度が脂肪蓄積の部位や程度を決めることや血中のアミノ酸濃度プロファイルが肝臓中の脂肪蓄積量が推定できることも紹介された。アミノ酸シグナルとインスリン様シグナルによる物質代謝の調節が動物の健康や寿命に大きく影響することを力説された。

清水 誠先生（東京大学大学院農学生命科学研究科・食品生化学）は、「エネルギー代謝を制御する内分泌型 FGF ファミリーの解析」について、講演した。内分泌型 FGF に分類される FGF19 ファミリー (FGF19, FGF21, FGF23) はホルモン様に作用するユニークな特

徴を持っている。FGF19 は肝臓に作用し胆汁酸代謝を負に制御し、FGF21 は主に白色脂肪組織に作用し、糖代謝や脂肪酸分解を活性化する。また FGF19 と FGF21 は共に抗肥満効果を有するため、創薬の標的になっている。さらに FGF21 過剰発現マウスの寿命延伸効果も報告されている。FGF19 と FGF21 の遺伝子発現は栄養シグナルに加え、転写因子 ATF4 を介したストレスシグナルによっても制御されることを見出した。ATF4 を標的とした抗肥満性食品成分の研究も合わせて報告した。

早野 元嗣先生（慶応義塾大学医学部・眼科学）は、「DNA 損傷によるエピゲノム自己同一性の破綻と個体老化の分子機構」に関して、発表された。Harvard Medical School の Sinclair 研究室において開発された ICE (Inducible Changes in Epigenome) マウスの老化促進表現型について紹介された。ICE マウスでは *I-PpoI* と呼ばれるエンドヌクレースがマウスの若い時期に 3 週間だけ誘導される。その結果、DNA 変異非依存的に記憶、筋肉、視力、骨密度の低下、白髪など老化関連する組織の機能低下が引き起こされ、老化の表現系が促進された。さらに筋肉や脳において代謝や炎症に関する遺伝子変化が観察され、H3K27ac や H3K56ac などのヒストン修飾や DNA メチル化において炎症細胞様エピゲノムとなり、DNA 損傷依存型エピゲノム変化による老化モデルとして ICE マウスの有用性を力説された。

最後に、横手 幸太郎先生（千葉大学大学院医学研究院・細胞治療内科学）が、「ヒトの老化促進病態としての早老症ウエルナー症候群：研究と臨床の進歩」を発表した。ウエルナー症候群 (WS) は、RecQ 型 DNA ヘリケース WRN の変異によって生じる常染色体劣性の遺伝性疾患であり、思春期以降に、白髪や脱毛、両側性白内障、皮膚の萎縮や硬化、糖尿病、動脈硬化、悪性腫瘍など、加齢に付随する疾患を好発することが知られ、ヒトの病的老化に最も近い遺伝子早老症に位置付けられている。近年のインスリン抵抗性改善薬や脂質異常症治療薬の進歩により、患者の寿命延長が認められ、臨床の進歩が紹介された。しかし、ノックアウトマウスが早老症候を示さないなど、老化機序は未解明であり、WS 由来疾患 iPS 細胞と遺伝子修復技術の応用など、ヒト患者に立脚した研究手法を通じて早老症と老化関連疾患に挑む基礎研究の現状も紹介された。

講演毎に活発な質疑応答があり、個々の発表はもとより会場は非常に盛り上がった。シンポジウム終了後、西千葉キャンパス内の生協食堂に場所を移して懇親会を開催した。懇親会参加数は約 30 名であった。演者の先生を中心に、和気あいあいとした雰囲気の中で、懇親会は進み、和やかに閉会した。

複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写されたい方は、日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の従業員以外は、著作権者から複写権等の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。
尚、著作物の転載・翻訳のような複写以外許諾は、直接本会へご連絡ください。

107-0052 東京都港区赤坂 9-6-41 乃木坂ビル 9F 学術著作権協会
TEL : 03-3475-5618 ; FAX : 03-3475-5619 ; E-mail : kammori@msh.biglobe.ne.jp

Notice about photocopying(In the USA)

In order to photocopying any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

Copyright Clearance Center, Inc.
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA
TEL : 978-750-8400 ; FAX : 978-750-4744 ; www.copyright.com

基礎老化研究 第43号 第1号

平成31年（2019）1月30日

発行者 日本基礎老化学会
〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2
東京都健康長寿医療センター研究所内
電話 03-3964-3241

編集 編集委員会

印刷所 コロニー印刷



日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology