

mRNA-binding protein tristetraprolin is essential for cardiac response to iron deficiency by regulating mitochondrial function.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jul 3; 115(27): E6291-E6300. doi:10.1073/pnas.1804701115.

Sato T, Chang HC, Bayeva M, Shapiro JS, Ramos-Alonso L, Kouzu H, Jiang X, Liu T, Yar S, Sawicki KT, Chen C, Martínez-Pastor MT, Stumpo DJ, Schumacker PT, Blackshear PJ, Ben-Sahra I, Puig S, Ardehali H.

要旨 細胞質における鉄の出納はiron regulatory protein 1および2 (IRP1/2) を介する鉄輸送の制御によって維持されるが、鉄が重要な役割を果たすミトコンドリアにおける鉄欠乏への適応機構は不明であった。本研究では、mRNA 結合蛋白 tristetraprolin (TTP) が鉄欠乏により発現誘導され、ミトコンドリア電子伝達系における鉄含有蛋白の発現量を鉄利用に合わせて適切に制御することによりミトコンドリア機能を維持することを明らかにした。

1. 背景

鉄は細胞にとって必須微量元素であり、様々な反応系に鉄が利用されている。鉄欠乏に対する応答機構として、鉄のセンサー蛋白 iron regulatory protein 1 および 2 (IRP1/2) が活性化し、mRNA の非翻訳領域に iron responsive element (IRE) を有する鉄輸送蛋白を発現制御することにより鉄の出納を制御する。しかし、ミトコンドリアでは鉄がその機能に重要であるにも関わらず、鉄含有蛋白分子の多くはその mRNA に IRE を有さず、ミトコンドリアの鉄欠乏に対する応答性には不明な点が多い。

最近、酵母において、鉄欠乏時に鉄含有蛋白質を負に制御し、発現を最適化することで鉄欠乏に適応する新規機構が報告された¹⁾。その機構の鍵となる蛋白の哺乳類ホモログが tristetraprolin (TTP) である。TTP は mRNA の 3' 非翻訳領域にアデニンとウリジンに富む領域 (AU rich element: ARE) を有する mRNA に結合し分解を促進する。

そこで本研究では、哺乳類では鉄欠乏時に TTP が活性化し、鉄が重要な機能を果たすミトコンドリア TCA 回路/電子伝達系において、活性化された TTP がいくつかの鉄含有蛋白の発現を負に制御し、鉄利用と鉄蛋白の発現を最適化することでミトコンドリア機能を維持していると仮説を立て、その検証を試みた。

2. TTP は鉄欠乏により発現亢進し、ミトコンドリアの鉄含有蛋白質 (Aco2, Ndufs1, Uqcrcfs1) の遺伝子発現を負に制御する。

まず *In silico* スクリーニングにより、TCA 回路と電子伝達系に関わる分子の中で、mRNA の 3' 非翻訳領域に ARE を有する分子を TTP の標的候補として抽出した。次に、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) に

鉄キレート剤 (2,2'-bipyridyl: BPD) を添加することにより鉄欠乏を誘導し、qRT-PCR により TTP の標的候補の mRNA 発現量を評価し、RNA 免疫沈降により TTP との結合を評価した (図 1)。TTP の蛋白発現量は BPD の添加により増加し、TTP の標的候補の分子のうち、Aco2 (TCA 回路)、Ndufs1 (複合体 I の一部)、Uqcrcfs1 (複合体 III の一部) の mRNA が、BPD の添加で発現量が低下し、TTP のノックアウト細胞では BPD により発現量が低下しなかった。また、RNA 免疫沈降の実験より、Aco2、Ndufs1、Uqcrcfs1 は TTP との結合が有意に増加していた。以上より、これら 3 分子の mRNA は鉄欠乏時に TTP により負に制御されること示唆された。興味深いことに、これらはいずれも鉄含有蛋白をコードする遺伝子であり、TTP が鉄含有蛋白を制御する仮説を支持するものであった。また、この TTP による制御は、IRP1/2 を欠損させた細胞においても観察され、IRP1/2 とは独立した機構であることが示唆された。TTP の標的である Aco2、Ndufs1、Uqcrcfs1 の蛋白発現を評価したところ、mRNA 発現変化と同様、BPD により蛋白発現低下を認めたが、TTP のノックアウト細胞では BPD による発現低下が抑制された。特に、Uqcrcfs1 でその傾向が最も強く、Uqcrcfs1 は主要な TTP の標的であることが示唆された。

3. 鉄欠乏下で不適切に発現した Uqcrcfs1 は、鉄を含まず非機能蛋白として複合体 III に組み込まれ、電子伝達系の機能障害を招く。

次に、鉄欠乏で不適切に発現した Uqcrcfs1 が複合体 III に組み込まれるかを検討した。複合体構造を保持したまま蛋白質を泳動する Blue-Native PAGE により、TTP ノックアウトマウスの心筋では、鉄欠乏時に不適切に発現した Uqcrcfs1 は複合体 III に組み込

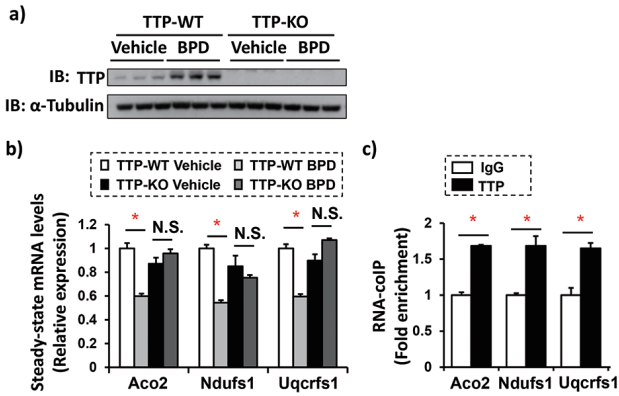


図1 TTP 標的分子の同定

a) MEFにおけるTTPの免疫プロット. b) Aco2, Ndufs1, Uqcrcfs1のmRNA発現量. c) RNA免疫沈降によるTTPとの結合.

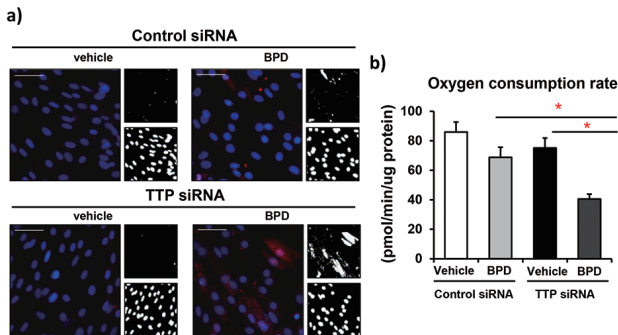


図3 酸化ストレスと電子伝達系の評価

a) H9c2細胞におけるmitoxon Redによる活性酸素種の検出. b) 細胞外フラックスアナライザーによる酸素消費速度の定量.

まれて存在することが判明した (図2a). また, BPD存在下で培養したHEK293細胞において, 鉄放射性同位体を用いてUqcrcfs1のへの鉄取り込みを評価したところ, TTPをノックダウンした細胞では, 免疫沈降されたUqcrcfs1中の鉄含有量が少なかった (図2b). 以上より, TTP欠損細胞において鉄欠乏下で不適切に発現したUqcrcfs1は, 鉄を含まない非機能蛋白として複合体IIIに組み込まれることが示唆された. また, TTPをノックダウンしたH9c2細胞では, BPD存在下で活性酸素種の産生が増加し (図3a), 酸素消費速度が低下していた (図3b). 以上より, TTP欠損細胞では鉄欠乏下でUqcrcfs1が鉄を含まない形で不適切に発現することによりミトコンドリア電子伝達系の機能障害を招くことが示唆された.

4. TTPのノックアウトマウスは鉄欠乏により心筋症を発症する

TTPのノックアウトマウスは, 通常食 (RD) で飼育された条件では心機能に変化を認めなかったが, 3週齢から鉄欠乏食 (ID) で6週間飼育された条件では, 脂質過酸化の増加を伴い, 心筋壁肥厚と心機能低下を呈する心筋症が誘導された (図4). 以上より, TTPは鉄欠乏に対して心臓保護的に作用することが判明した.

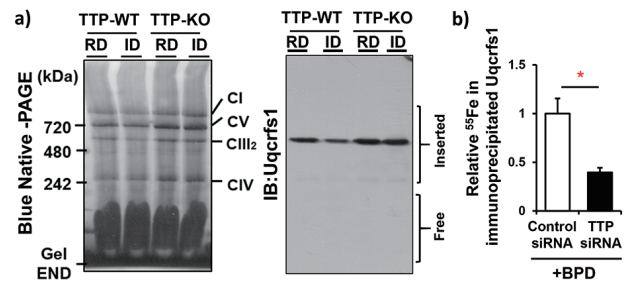


図2 鉄欠乏下で不適切に発現したUqcrcfs1の複合体IIIへの取り込み
a) Blue-Native PageとUqcrcfs1による免疫プロット. b) BPD存在下で培養したHEK293細胞における免疫沈降されたUqcrcfs1中に含まれる鉄の含有量.

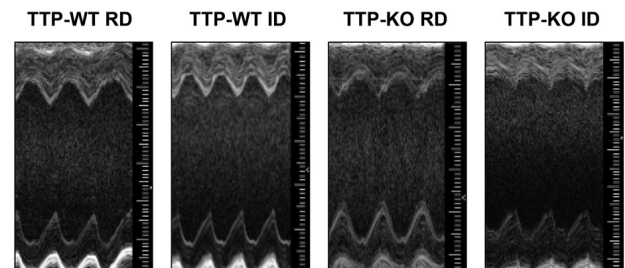


図4 心機能評価

マウスの心エコー図 (Mモード). TTPのノックアウトマウスは鉄欠乏により心筋症を発症した.

5. 結語

以上より, TTPは鉄欠乏において活性化し, 鉄含有蛋白質を適切に減少させることでミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たすことが示唆され, TTPによる新規鉄応答機構を明らかとした.

6. 参考文献

- 1) Puig S, Vergara SV, Thiele DJ. Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metab* 2008; 7: 555-564. doi: 10.1016/j.cmet.2008.04.010.

SATO Tatsuya

略歴

平成17年3月 札幌医科大学医学部卒業

平成19年4月 札幌医科大学医学部 第二内科研究生

平成25年10月 米国ノースウエスタン大学医学部 フェロー

平成29年4月 札幌医科大学医学部 助教 (細胞生理学/循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座 兼務)

平成30年10月 第21回日本心不全学会学術集会

YIA 優秀賞 (基礎の部) 受賞

平成30年12月 第34回ISHR (国際心臓研究学会日本部会)

YIA 優秀賞 受賞