

氏 名	う え た りょう 植 田 亮
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 61 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	鉄応答性転写因子 Aft1 の活性調節メカニズムに関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 永 尾 雅 哉 教 授 垣 塚 彰 教 授 米 原 伸

論 文 内 容 の 要 旨

鉄は生体にとって必須な元素であると同時に、フリーラジカルの発生源として細胞障害性も有する。このため生体は細胞内鉄濃度を厳密に制御する必要がある、ヒトにおける鉄代謝機構の異常は様々な重篤な疾患を引き起こすことが知られている。しかし細胞内鉄濃度の制御に密接に関わる細胞内鉄代謝機構や濃度感知のメカニズムは鉄の生化学的な性質による解析の困難さが原因で解明が進んでいない。そこで本研究は遺伝学的アプローチを中心とした手法により、出芽酵母における鉄濃度を感知すると考えられている鉄代謝恒常性維持を担う転写活性化因子 Aft1 の鉄応答機構の解明を行い、細胞内の鉄濃度感知メカニズムに関する下記の知見を得た。

Aft1 は鉄が欠乏したときのみ核に局在して鉄取り込みに関わる遺伝子群の転写を活性化することで細胞内鉄濃度を一定に保っている。このため Aft1 の鉄濃度への応答においては核・細胞質局在の調節が重要な役割を果たしていると考えられた。

そこで、第一章においては Aft1 の核内輸送メカニズムの解析を行った。核内輸送担体 Pse1 が Aft1 の核局在には必要であり、かつ *in vitro* において Aft1 と結合し、この結合が GTP 結合型 Ran により解離したため、Pse1 が Aft1 の核内輸送を担うことが明らかになった。しかし、Aft1 NLS の核内輸送は鉄濃度の影響を受けないことが観察され、また他の核内輸送担体により核内に輸送される変異 Aft1 は野生型 Aft1 と同様に鉄による細胞内局在制御を示した。これらの結果より、Aft1 と Pse1 との結合は鉄濃度による影響を受けないことが示唆された。

一方、第二章においては Aft1 の核外輸送メカニズムの解析を行った。まず、*pse1* 温度感受性変異株 (*pse1-1*) を用いた核外移行のみを観察できる系により、Aft1 の核外移行が鉄の存在で促進されることを示した。次に、Msn5 が Aft1 の核外移行に必要であり、両者の核内での結合が観察されたため、Msn5 が Aft1 の核外輸送を司ることが明らかとなった。また、Aft1 と Msn5 とが鉄依存的に結合することを示し、Aft1 の鉄濃度への応答において核外輸送段階が重要な役割を有することを明らかにした。さらに Aft1 と Msn5 との結合にはリン酸化されているセリン・スレオニン残基が必要であることが示唆されたため、Aft1 の鉄濃度への応答に Aft1 のリン酸化状態の変化が関与する可能性が示唆された。

続いて第三章においては Aft1 の鉄濃度感知に関与する可能性のあるタンパク質を Yeast Two-hybrid スクリーニングにより探索した。同定した Aft1 結合タンパク質 Grx3 および Grx4 は機能重複しており、Aft1 の鉄濃度応答に必須な役割を果たしていることが明らかになった。Grx3 の活性中心と予想された部位は Aft1 制御に必須であった。また相同タンパク質の機能から Grx3 が鉄硫黄クラスターを Aft1 に配位し、これが Aft1 の鉄濃度感知メカニズムである可能性が示唆された。

以上の結果より、Aft1 の鉄濃度応答には Aft1 への鉄硫黄クラスターの結合と Aft1 のリン酸化が関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

鉄代謝機構は近年新たな展開を見せてきており、古くから知られていた哺乳動物細胞におけるトランスフェリン受容体による鉄吸収以外の新たな吸収機構に関与する遺伝子が数多く同定されてきている。これらの鉄吸収機構の制御は、従来から研究されてきた RNA 結合蛋白質 Iron Regulatory Protein (IRP), IRP1 と IRP2 による翻訳後制御による鉄代謝関連遺伝子の発現調節とは異なり、転写レベルでの制御を受ける可能性が強く示唆されてきているが、その実体は不明である。また、IRP による制御に関しても、IRP1 が鉄硫黄クラスター配位を、IRP2 がヘム結合による酸化修飾を介して活性が制御されていることは明らかとなっているが、鉄硫黄クラスターやヘムがそれぞれ IRP1 と IRP2 にどのようなメカニズムで輸送され、配位するのかというような制御に密接に関わる細胞内鉄代謝機構や濃度感知の分子メカニズムに関してはほとんど解明されていない。

申請者の研究は、出芽酵母において転写レベルでの鉄代謝恒常性制御の中心的役割を担い、鉄濃度を感知すると考えられている転写活性化因子 Aft1 の鉄応答機構の解析を行ったものである。

Aft1 の鉄濃度への応答においては核・細胞質局在の調節が重要な役割を果たしている。そこでまず、Aft1 の核内輸送メカニズムの解析を行うことにより、Aft1 の核内輸送担体が Pse1 であることを明らかにした。しかし核内移行過程は、Aft1 の鉄応答性にあまり寄与していないことが明らかになった。そこで、核外輸送のみを観察できる系を確立し、Aft1 の核外移行が鉄の存在で促進されることを示し、Aft1 の鉄応答における核外輸送の重要性を明らかにした。また、Msn5 が Aft1 の核外輸送担体であること、さらに Msn5 と Aft1 との相互作用が細胞内鉄濃度に応答して変化することを示した。これにより、鉄に応答した Aft1 の核・細胞質局在の制御が細胞内鉄濃度による Msn5 と Aft1 との相互作用の変化に起因することが明らかとなった。

さらに、Aft1 の鉄濃度感知に関与する可能性のあるタンパク質を Yeast Two-hybrid スクリーニングにより探索し、Aft1 の鉄濃度応答に必須な役割を果たす Aft1 結合タンパク質 Grx3 および Grx4 を見出した。これらの相同タンパク質の機能から Grx3 および Grx4 を介して鉄硫黄クラスターが Aft1 に配位し、これが Aft1 の鉄濃度感知メカニズムである可能性を示した。

以上の結果は、鉄補欠分子属の核内への輸送とそれに続く鉄代謝制御転写因子への鉄補欠分子属の配位を介して細胞内の鉄感知が起こる可能性を示したものであり、未解明な点の多い細胞内鉄代謝機構解明に先駆的な糸口を見出したとともに鉄代謝恒常性維持機構の解明に大きく寄与するものであると考えられる。

よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成18年1月25日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。