

腸上皮の2価金属トランスポーターと その解析法

軍神宏美*

SUMMARY

鉄の吸収に関する情報は、ここ10年間に、飛躍的に分子レベルで解明されてきた。なかでも小腸上皮細胞刷子縁膜に存在するDMT1は、2つのグループから独自の方法論に則してクローニングされ、1997年、ほぼ同時に報告された。DMT1は、2価の金属と H^+ とが共役し、細胞内に金属を取り込むトランスポーターである。DMT1は、小腸上部に著しく発現し、鉄が欠乏すると、DMT1のメッセージは激増する。また、DMT1は、小腸以外に、赤血球からの鉄の取り込みに深くかかわっている。DMT1以外にも、鉄トランスポーターとして、Fpnが重要な役割を果たしている。ただし、FpnはDMT1と異なり、鉄の移出をつかさどる。すなわち、Fpnは小腸上皮細胞側底膜にあって、DMT1によって刷子縁膜側から取り込まれた鉄を生体側に受け渡す。ジーンターゲットング法を用いて作製したノックアウトマウスから、DMT1は小腸上皮細胞刷子縁膜での主要な鉄のトランスポーターであるが、副次的な分子も存在しうることが示唆された。一方、Fpnは小腸上皮細胞側底膜固有のトランスポーターであることが示された。

はじめに

鉄は必須栄養素の一つでさまざまな生体内でのプロセスに必須のコファクターであるが、逆に過剰に体内に存在すると有毒である。そのため、体内の鉄量は綿密に調整されている。発症頻度の高い貧血あるいはヘモクロマトーシスに代表される鉄過剰症は、このバランスが崩れた結果と考えられる。鉄が関与するこれら頻度の高い疾病の原因を探り治療するうえで鍵となるのは、鉄の吸収について理解することである。小腸からの鉄の吸収についてのさらに詳細なメカニズム、鉄還元酵素の本体、エンドソームから細胞質への鉄の受け渡し、さらには、近年話題の鉄のホルモン「ヘプサイディン」も含め、哺乳類での鉄代謝の解析は分子レベルで盛んに研究されている。とりわけ、鉄の吸収に関する分子生物学的な情報は、ここ10年間に飛躍的に解明されてきた。

本稿では、この鉄吸収に関与するいくつかの遺伝子を

Key Words

divalent metal transporter (DMT)1
ferroportin (Fpn)
duodenal cytochrome b (Dcytb)
ジーンターゲットング (標的遺伝子破壊) 法
ノックアウトマウス

*GUNSHIN Hiromi/マサチューセッツ大学アマースト校

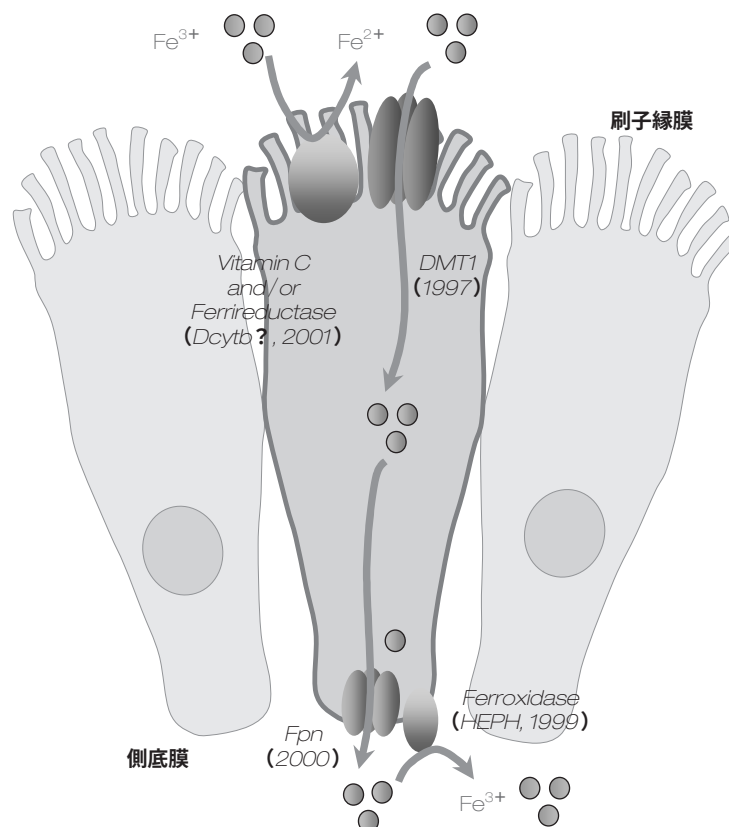


図1 小腸での鉄の吸収に関与する遺伝子群

含め、筆者の携わった divalent metal transporter (DMT) 1/divalent cation transporter (DCT) 1/natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) 2 (以下 DMT1 と記載) を中心に、その発見の経過および分子生物学的、生化学的、電気生理学的解析法を解説する。さらにマウスジーンターゲティング法も含めた機能解析について述べ、マウス個体レベルでの DMT1, ferroportin (Fpn), duodenal cytochrome b (Dcytb) の分子機能とそれらの表現型を簡単に紹介する。

小腸での鉄吸収に関与する遺伝子群

鉄の吸収は、十二指腸絨毛頂端部でおこなわれる。小腸上皮細胞は形態的にも機能的にも極性をもつユニークな細胞で、栄養素の吸収を刷子縁膜（小腸管腔）側から側底膜すなわち生体側へ方向に導く。図1は、この極性をもつ小腸上皮細胞での鉄の吸収にかかわるいくつかの重要な遺伝子を示す。食事性鉄は、刷子縁膜に存在するトランスポーター DMT1 により細胞内に運搬され

る¹⁾²⁾。食事の鉄は、おおむね 3 価の形態 (Fe^{3+}) で存在するが、DMT1 は鉄を含め 2 価金属のトランスポーターであるため（後述）¹⁾、この刷子縁膜での吸収の局面では、ビタミン C あるいは鉄還元酵素によって 2 価に還元されなければならない。小腸での鉄還元酵素として、これまで Dcytb が報告されている³⁾。Dcytb 欠損マウスを用いた実験では Dcytb の必須性が認められなかったが⁴⁾、これに関してはさらに検討が必要かも知れない（後述）。刷子縁膜から運搬された鉄は、体内の鉄の供給が十分な場合は、細胞質内でフェリチンとして貯蔵される。生体内での鉄の需要が増加した条件下では、鉄は Fe^{2+} の形態で、側底膜に介在する Fpn/iron regulated transporter (IREG) 1/metal transporter protein (MTP) 1 によって体内に輸送される^{5)~7)}。Fpn によって運搬された Fe^{2+} は、hephaestin (HEPH) によって酸化され、血液中のトランスフェリンに結合して体内を循環し、筋肉および赤血球など必要な組織で利用される。

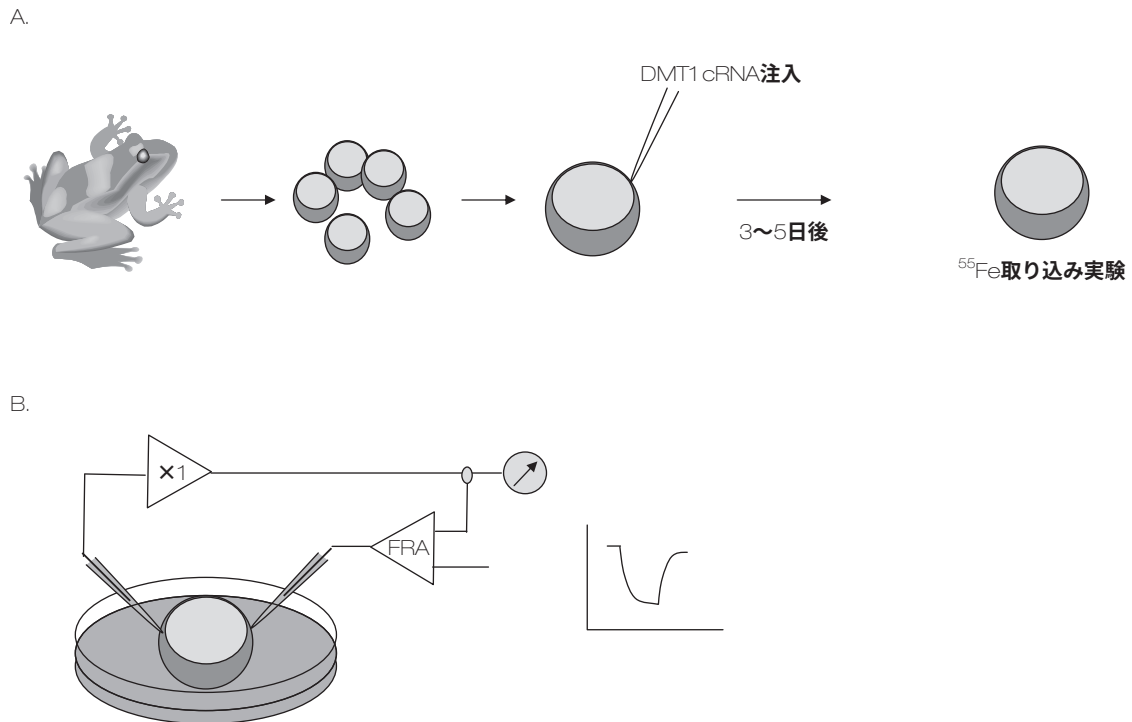


図2 DMT1 の機能解析法の例

A) ラジオアイソトープを用いた DMT1 の機能解析.

B) 電気生理学的手法を用いた DMT1 の機能解析.

DMT1 のクローニングおよびその機能解析

われわれ¹⁾は、アフリカツメガエルの卵母細胞に mRNA 画分を注射し、蛋白質を発現させるクローニング技術を用いるエクспRESSIONクローニング法によって *DMT1* を単離した。この際、 ^{55}Fe ラジオアイソトープを鉄の取り込みの指標とする生化学的手法を用いた (図2A)。まず、鉄欠乏食で3~4週間飼育したラットの十二指腸から mRNA を調製し、それを微量注入した卵を3~4日培養した。 ^{55}Fe を用いた取り込み実験により、3.8~4.5 kb にサイズ分画された mRNA が最大活性を示した (図3A)。この mRNA 画分から cDNA ライブラリーを作製し、カエル卵母細胞を用いた $^{55}\text{Fe}^{2+}$ 取り込みによるスクリーニングを重ね、コントロールにくらべ約 200 倍の鉄の取り込みを示す *DMT1* のクローンの単離に成功した (図3A)。ハイドロパシー指標から、DMT1 は 12 貫通膜をもつ典型的なトランスポーターの構造をもち、561 個のアミノ酸をコードすることが明らかとなった (図3B)。

ノーザンブロット法 (図4) と *in situ* 分析から、

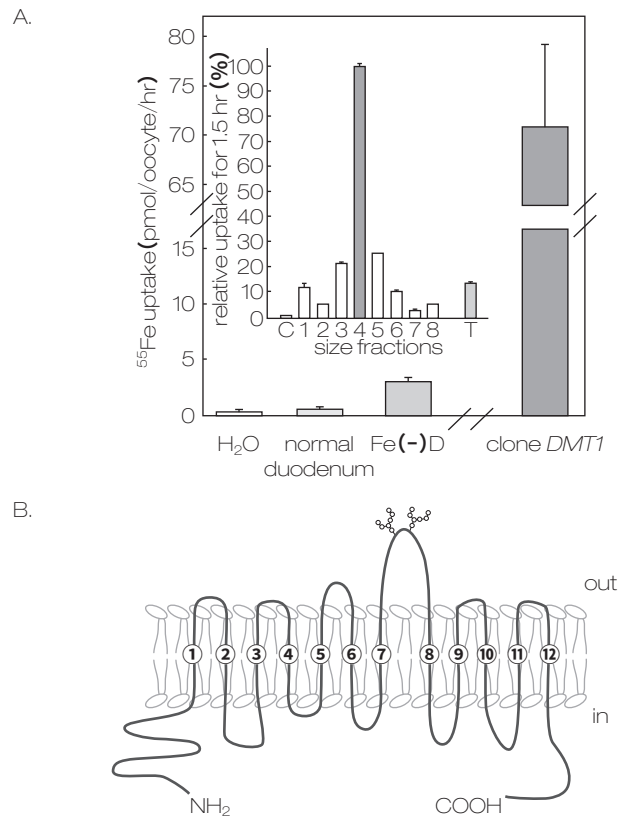


図3 DMT1 のクローニング

(Gunshin H *et al*, 1997¹⁾より引用)

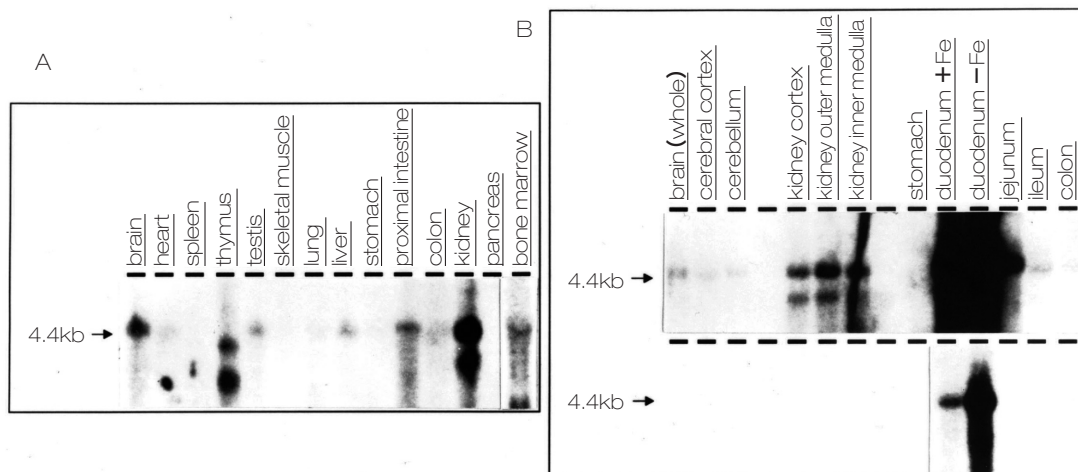


図4 DMT1 のノーザンブロット法によるデータ

(Gunshin H *et al*, 1997¹⁾より引用)

DMT1 は広く体に分布することを確認した¹⁾。とくに十二指腸での発現が著しく、鉄欠乏食を与えられた動物ではさらに DMT1 のメッセージは激増した (図4B)。これは、減少した鉄を補うために、鉄のトランスポーター DMT1 が upregulate されたと考えられた。

つぎに DMT1 cRNA を注入したアフリカツメガエル卵母細胞を用い、電気生理学的手法を用いて DMT1 の特質を検討した結果 (図2B), DMT1 を発現した卵母細胞では 50 μ M の鉄をアプライするとエレクトロジェニックに反応し大きなインワードカレントを生じた (図5A)。この方法を用いて、他の2価金属の輸送を検討した結果、DMT1 は鉄以外に、亜鉛、マンガン、カドミウム、銅、コバルト、ニッケル、鉛もトランスポートすることが示された (図5B)。さらに興味深いことに、DMT1 を介したトランスポートは、プロトン (H^+) と共役しており (図5A)、鉄が吸収される際、十二指腸管腔内が酸性であることが有利な条件となっていることが示された¹⁾。

一方、Fleming ら²⁾は、われわれの報告とほぼ同時に、ジェネティックアプローチにより、マウス *Nramp2* が鉄のトランスポーターであることを報告した。小赤血球、低色素貧血をもつミュータントマウス (遺伝子シンボル: *mk*) は、食餌中の鉄の増加に無関係に鉄欠乏性貧血を呈し、しかも鉄注射をおこなっても赤血球細胞への鉄の導入がブロックされている。彼らはこの *mk* マウスを

用い、ポジショナルクローニングによって、*mk* のローカスが、*Nramp2* のゲノム領域にリンクしていること、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法による野生株と *mk* の *Nramp2* cDNA の比較から、*mk* ではポイントミューテーションにより 185 番グリシンがアルギニンに置き換わっている (G185R) ことを見出した。この変異は、図2B に示す第4番目の貫通膜に存在する。

mk マウスと同様、バオグラードラット (遺伝子シンボル: *b*) も赤血球での鉄利用と小腸からの鉄吸収に欠陥をもつミュータントであり、トランスフェリンレセプターを介したエンドサイトーシスによって取り込まれた鉄が、エンドソームから細胞質に出られないことが知られていた。Fleming ら⁸⁾は、この *b* ラットにも *mk* マウスと同様 G185R 変異があることを報告した。これにより、トランスフェリン-トランスフェリンレセプター複合体を経由してエンドサイトーシスにより、赤芽球細胞質に入り込んだエンドソーム内で遊離した鉄が、細胞質に出てゆくときに、DMT1 を必要とすることが示唆された。これら *mk* マウスおよび *b* ラットの表現型の特性と、われわれのカエル卵母細胞を用いた DMT1 のクローニングおよびその生化学的なデータにより、DMT1 が哺乳類において主要な鉄のトランスポーターであることが強く裏づけられることとなった。

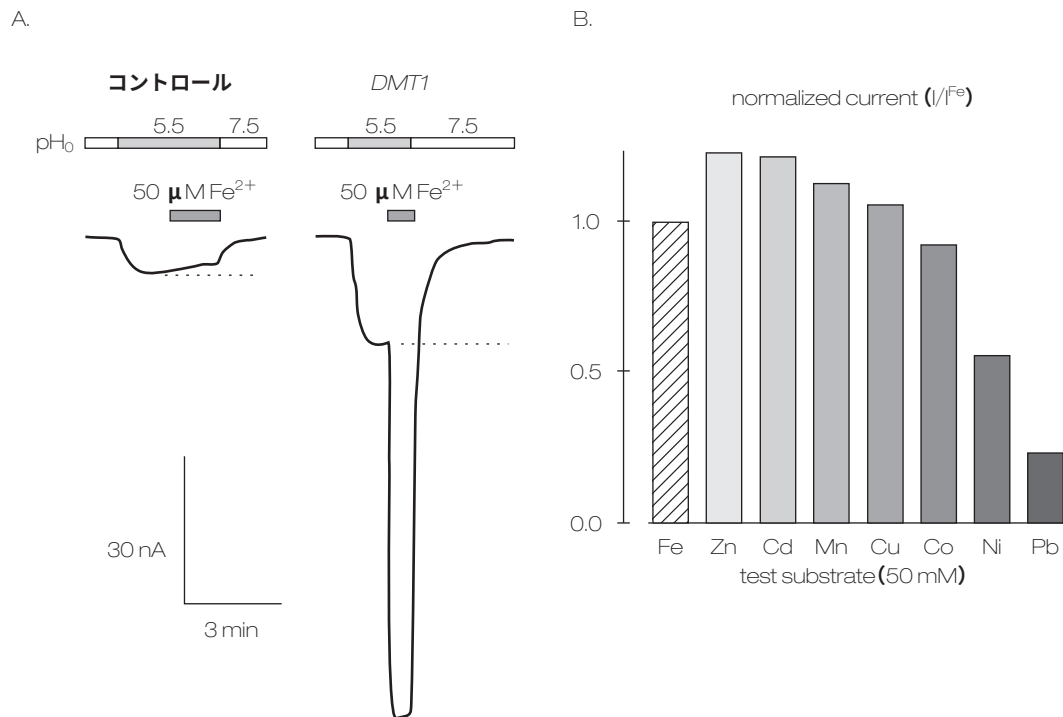


図6 電気生理学的手法を用いた DMT1 の特性解析

(Gunshin H *et al*, 1997¹⁾より引用)

2 価金属トランスポーターとその関連分子のノックアウトマウスを用いた解析

われわれは、ヒトの鉄代謝を研究するうえで、おもにつぎのような理由からマウスを用い検討することにした。まず、マウスとヒトの鉄代謝は非常に似ていること、つぎに、鉄代謝は腸、肝臓、脾臓、骨髄、筋肉など、異なる組織間でダイナミックに相互作用するため、体全体を一つのシステムとして研究することが要求されること、さらに、鉄代謝に関連する多くの人工（ノックアウトおよびトランスジェニック）および自然発症ミュータントマウスがこれまで多く存在し幅広い研究がなされていること、また、懐胎期間が短く比較的短期間に成長発育するので時機を得て結果が得られること、そして、遺伝学的に同一のバックグラウンドをもつマウスの系統を用いることにより偏差の少ないデータが得られること、最後に、上述のような利点を提供する種はほかに存在しないこと、である。

2 価金属のトランスポーター DMT1 に関連する自然発症ミュータントマウスとして、前述の *mk* マウスが

げられる。このモデルマウスから、DMT1 は小腸からの鉄の吸収および赤芽細胞での鉄の取り込みに重要であることが示唆された。ただし、*mk* ミューテーションはトランスポーター機能がゼロであるのかどうかは不確定であった。小腸、赤芽細胞あるいは他の組織における細胞型において、DMT1 以外に鉄（および他の 2 価金属）の取り込みに関与するトランスポーターがほかに存在する可能性を検討するため、われわれはジーンターゲティング法を用い、DMT1 をすべての細胞でグローバルにノックアウトする方法（図6）をとることにより、個体全体で解析する手法を用いた。

マウスジーンターゲティング法は、染色体の遺伝子配列を人工的に変換させたマウスを作製し、個体レベルでの分子機能を明らかにする手法である。このジーンターゲティング法が可能となった背景には、マウスにおける発生工学的手法の発展によるマウス胚幹（embryonic stem: ES）細胞株からのマウス個体作製技術の開発と安定化がある。現在、この手法は広く用いられており、形態形成、免疫、器官形成、脳神経機能の分子メカニズムの解析で一般的な技術となってきた。このジーンターゲ

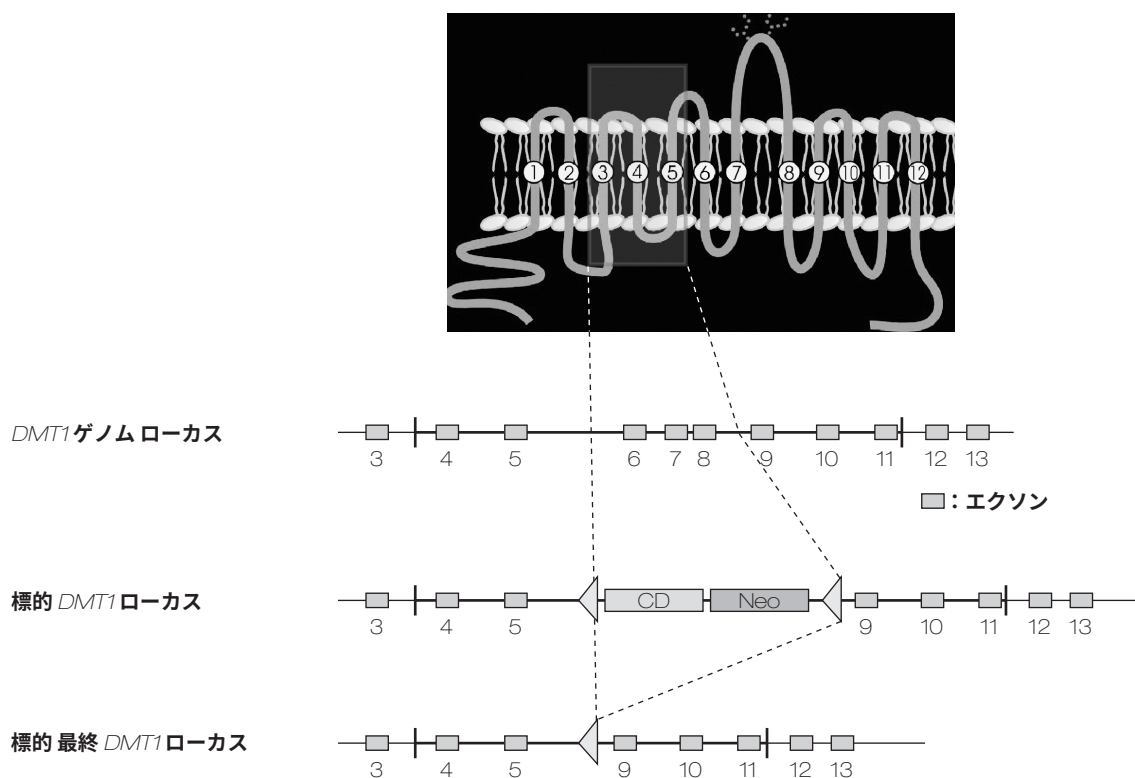


図6 DMT1 のグローバルノックアウトマウス作成の方策

(Gunshin H *et al*, 2005⁹⁾ より引用)

ティング法を用いノックアウトマウスの作製に貢献した3人の研究者には、2007年ノーベル医学生理学賞が送られている。ノックアウトマウスは、ヒト疾患モデルマウスとして、遺伝病を含めたさまざまな疾病の原因解明、新薬開発や治療方法開発などの医学研究においても必須な技術となっている。われわれ⁹⁾は、グローバルノックアウト(図6)以外にも、Cre/loxP システムを用い特定の部位もしくは特定の時期に機能消失させるシステム(コンディショナルノックアウト)も用いた(図7)。

DMT1 グローバルノックアウト ($DMT1^{-/-}$) マウスは、生まれはするものの、強度の貧血かつ矮小を呈し(図8A, B)、生後1週間以内に確実に死亡する。しかし、同じ129バックグラウンドの *mk* マウスは、大人になるまで成長することから、*mk* ミューテーションはトランスポート機能がゼロではなく、残余の鉄運搬機能を有することが示唆された⁹⁾。

生体内総鉄量は、 $DMT1^{-/-}$ 群および対照群で有意差は認められないが(図8C)、興味深いことに、 $DMT1^{-/-}$ 群の肝臓鉄量は野生型に比較して約3倍高い値を示した

(図8D)⁹⁾。この理由として、①生後まもなくの $DMT1^{-/-}$ マウスから判断して、胎児も極度に貧血であることは容易に推察され、そのため貧血のシグナルが母体から鉄の供給を大きく促しているであろうこと、②その結果、多量の鉄が胎児体内に流入するが、 $DMT1^{-/-}$ マウスは *DMT1* を欠損しているため、赤血球内には鉄は取り込まれないこと、③それゆえ、大量の鉄が胎盤を経由して胎児体内に入り赤血球をバイパスした過剰の鉄は、生体にとってはむしろ有毒なので、解毒組織である肝臓で積極的に取り込まれ貯蔵されることが推測された。さらにこれらの現象は、つぎのことを示唆する。すなわち、DMT1は胎盤からの鉄の輸送に大きくは関与していないこと、また肝臓における鉄の取り込みはDMT1以外の輸送システムによっていることである。

また、villin-Creを用いて作製した小腸特異的ノックアウトマウスは、経口で栄養を摂取しはじめる離乳直後から急速に貯蔵鉄が低下し、経時的に極度の貧血症状を呈していくことから(図7B)、DMT1は主要な鉄のトランスポーターであることが示された⁹⁾。

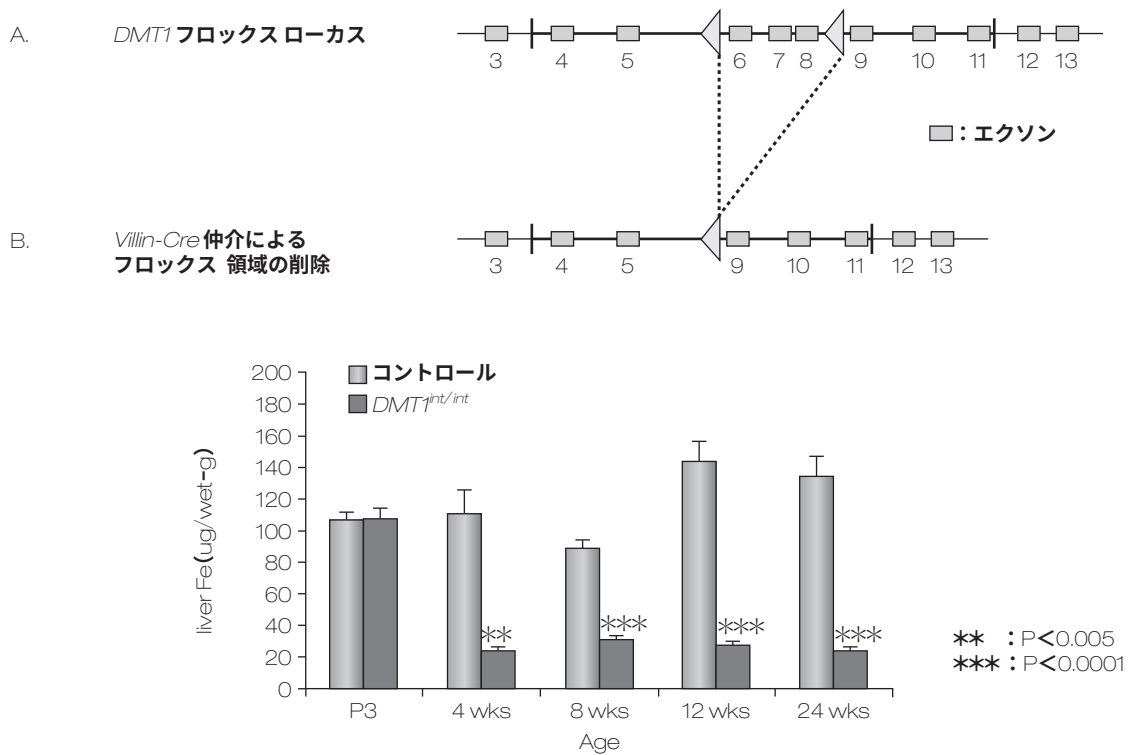


図7 *DMT1* の組織特異的ノックアウトマウス作成の方策と小腸特異的 *DMT1* ノックアウトマウスの表現型の例

(Gunshin H *et al*, 2005⁹⁾ より引用)

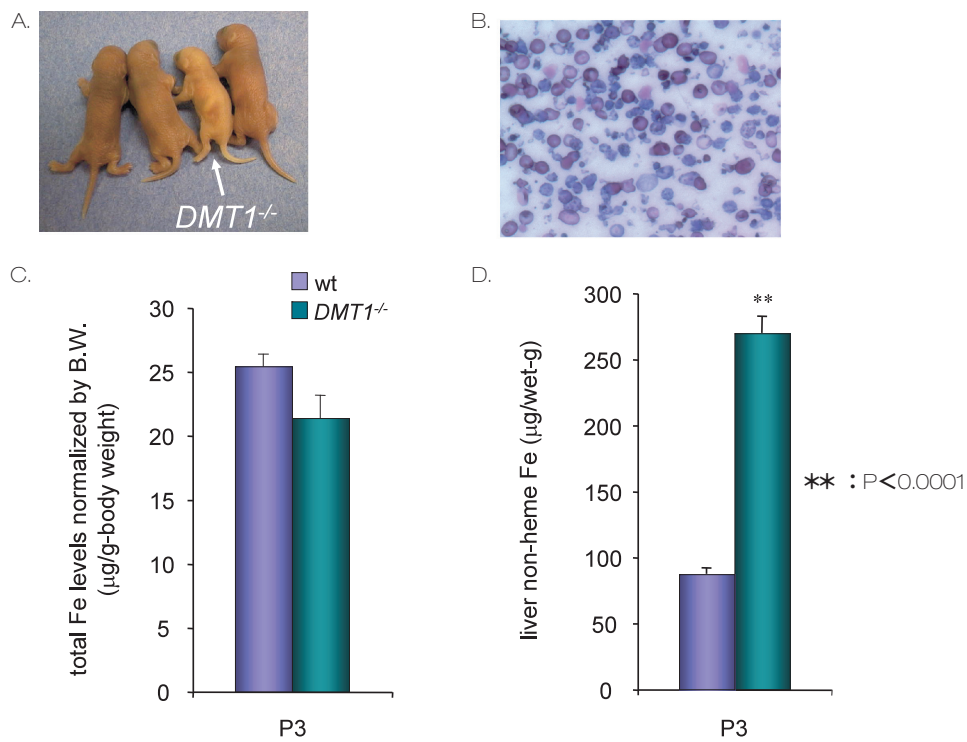


図8 *DMT1^{-/-}* マウスの表現型解析結果

(Gunshin H *et al*, 2005⁹⁾ より引用)

DMT1 以外にも、小腸鉄吸収に関与する分子のノックアウトマウス例が報告されている。ここでは、Fpn と Dcytb の例をあげてそれらの表現型について簡単に触れたい。Fpn は、前述のように小腸上皮細胞側底膜から生体側への鉄の受け渡しに関与する分子である (図1)。Donovan ら¹⁰⁾ は、特定の時期に機能消失させる Cre/loxP システムを用い、マウスが野生型同様成長してから *Fpn* を欠損させる解析を用いた。この *Fpn* ノックアウトマウスでは、小腸側底膜からの鉄の受け渡しに大きく支障をきたし非常に短期間のうちに極度の貧血によって死亡することから、Fpn は唯一の鉄移出トランスポーターであることが示された。また、彼ら¹⁰⁾ は、この遺伝子が欠損すると胎児は生まれないことから、Fpn は、胎盤からの鉄の取り込みに大きくかかわっていること、さらに、マクロファージからの鉄の放出にも関係していることも示した。

従来、食事の鉄が鉄還元酵素あるいはビタミン C によって 2 価の形態 (Fe^{2+}) で吸収されるであろうことはすでに知られていたが、DMT1 をクローニングし解析することにより確認証明されることとなった¹⁾。前述のように、食物中の鉄はおもに 3 価で存在するので、何らかの形で 2 価に還元されなければ吸収されない。McKie ら³⁾ は 2001 年、小腸上皮細胞粘膜に存在する鉄還元酵素の候補として、Dcytb を報告した。その後、Dcytb の個体レベルでの機能を解析するため、われわれ⁴⁾ はこの分子をノックアウトしたが、マウスでは Dcytb は必須でないことが観察された。

おわりに

鉄は小腸上部から吸収され、それにかかわる重要な分子群が、この 10 年のあいだに急速に明らかにされてきた。DMT1 はそのうちのひとつで、十二指腸絨毛頂端部の刷子縁膜に存在するトランスポーターである。鉄は 2 価の形態でプロトンと共役して輸送され、鉄以外にも他の 2 価金属、たとえば亜鉛、マンガン、カドミウムなども輸送することをわれわれ¹⁾ はインビトロの系で報告している。

鉄代謝は異なる組織間で相互作用するため、個体レベルでの研究が要求される。そこで、われわれは、

DMT1^{-/-}マウスを作製し、その表現型を解析した結果、生後 1 週間以内の *DMT1*^{-/-}群の肝臓鉄量は野生型に比較して有為に高いことを示した。このことは、鉄の取り込みのメカニズムを解明するにあたり、胎盤と肝臓からの鉄の取り込みには DMT1 以外のシステムが関与しているという重要な知見を提供している。とくに、頻度の高い鉄過剰症での肝臓の鉄の取り込みに、DMT1 以外のトランスポーターが大きく関与している可能性が高いことから、このトランスポーターの本体を明らかにすることが早急に望まれる。

DMT1 以外に、Dcytb と Fpn が小腸からの鉄の吸収に関与することが報告され、マウスジーンターゲット法によるこれらの遺伝子の機能が解析されている。Dcytb については、マウスでは必須でないことが観察されたことを前述した。ただ、げっ歯類はビタミン C を生合成できるが、ヒトではできないことが知られている。したがって、マウスでは生合成されたビタミン C が小腸管腔内に分泌され、これが鉄の還元に貢献している可能性を否定できない。この点について、更なる研究が望まれる。Fpn については、唯一の鉄移出トランスポーターであることが示されが、これが他の 2 価金属トランスポーターである可能性については現段階では検討されておらず、今後の研究が待たれる。

最後に、本稿では無機 (非ヘム) 鉄の小腸吸収について述べた。ヘム鉄は、無機鉄より効率的に吸収され、一般に、ヒトでは、約 3 分の 2 の鉄はヘム鉄 (動物性の肉に含まれる鉄) として吸収されることが知られている。2005 年、McKie ら¹¹⁾ により heme carrier protein (HCP) 1 がヘム鉄のトランスポーターとして報告されたが、その後、HCP1 は葉酸のトランスポーターであるという、抗しがたい報告が出された¹²⁾。HCP1 がヘム鉄トランスポーターである可能性がまったく断たれたわけではないが、トランスポーターも含めたヘム鉄吸収にかかわる新たな分子およびメカニズムの解明が急がれる。



文 献

- 1) Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV *et al* : Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal ion

- transporter. *Nature* **388** : 482-488, 1997
- 2) Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA *et al* : Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* **16** : 383-386, 1997
 - 3) McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO *et al* : An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291** : 1755-1759, 2001
 - 4) Gunshin H, Starr CN, Drenth C *et al* : Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood* **106** : 2879-2883, 2005
 - 5) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y *et al* : Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403** : 776-781, 2000
 - 6) McKie AT, Marciani P, Rolfs A *et al* : A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* **5** : 299-309, 2000
 - 7) Abboud S, Haile DJ : A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* **275** : 19906-19912, 2000
 - 8) Fleming MD, Romano MA, Su MA *et al* : 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* **95** : 1148-1153, 1998
 - 9) Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO *et al* : Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest* **115** : 1258-1266, 2005
 - 10) Donovan A, Lima CA, Pinkus JL *et al* : The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* **1** : 191-200, 2005
 - 11) Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS *et al* : Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **122** : 789-801, 2005
 - 12) Qiu A, Jansen M, Sakaris A *et al* : Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* **127** : 917-928, 2006

