

研究ノート

鉄の腸管吸収の担体としてのトランスフェリンレセプター およびレセプターの集合体形成について

吉 野 芳 夫

Transferrin Receptor as a Carrier of Intestinal Iron Absorption and the Assembly of the Receptors on Placental Cell Membrane

Yoshio Yoshino

Although iron is an essential element in animal kingdom, the poor solubility of Fe^{+++} in neutral solution have brought difficulties in assimilation of iron into organisms. Transferrin (iron binding protein) in blood plasma and transferrin receptor on cell membrane are the two main tools equipped by evolution of animals absorbing iron from external environment to blood and finally to cells.

My colleagues Mugitani and Hisayasu found out 1/10 concentration of transferrin in rat pancreatic juice referring to that in blood plasma. Specific binding of diferric transferrin to brush border membrane vesicles was calculated by Scatchard analysis ($K_a: 1.08 \times 10^8 \text{M}^{-1}$). Iron absorption of ^{59}Fe -diferric transferrin was 27.4% in upper small intestine and that was inhibited either by 20 fold unlabeled diferric transferrin or monodansylcadaverine (MDC), an inhibitor of endocytosis. These results suggest that the receptor mediated endocytosis of diferric transferrin may participate iron absorption in rat intestine. Another colleague Taguchi isolated transferrin receptor from human placenta obtained immediately after delivery. The receptor showed 90K molecular weight by subunit analysis using SDS PAGE. However the molecular weights measured by gel filtration HPLC were 180K (dimers) and its integral numbers, which were made up mainly by 370K component. The assembly of the receptors may indicate the concentration of iron in an endocytotic vesicle and the efficient iron transport into cells.

寿命の尽きた赤血球からのヘモグロビン崩壊または小腸粘膜細胞を経由する食物鉄の取り込みにあたり、鉄は血漿中を鉄輸送タンパク質トランスフェリンに特異的に結合し運搬される。しかし鉄を要求する標的細胞の細胞膜において鉄結合トランスフェリンはどんな機構によって、鉄を細胞に供給するのか。トランスフェリンレセプターの存在を暗示する研究結果が1960年代に網赤血球の細胞膜で発見された。その後におけるトランスフェリンレセプターに関する研究は実に急速な進歩を遂げた。著者の経験を含め、その一端を述べる。

1) 鉄輸送担体としての血漿トランスフェリン：多くの動物にとって鉄は必須元素である。しかし鉄は中性か

らアルカリ性水溶液において、溶解度 $10^{-17} \sim 10^{-16} \text{M}$ ときわめて難溶性の Fe^{+++} 塩を形成する(1)。血漿中の鉄は Fe^{+++} であるため、鉄輸送タンパク質の介助なしには臓器間を移動して、骨髄の造血に役立つことは困難である。脊椎動物にはヒトを含めて血漿中の鉄輸送のためにトランスフェリンと言う血漿タンパク質が具備されている。このタンパク質は主として肝臓で合成される分子量80Kの糖タンパク質で、1分子あたり2個の鉄結合基をもつ。鉄に対する結合定数は 10^{24}M^{-1} ときわめて高い(2)。貪食細胞による老化赤血球の処理、また小腸粘膜細胞からの鉄吸収の場合に、鉄イオンが血漿に出現するや否や直ちにトランスフェリンと結合し、鉄タンパク質として行動するように運命づけられる。即ち鉄イオンは分子量80Kのタ

ンパク質の一部となるので、普通の状態では尿や汗から排泄され難く、鉄は細胞と血液との間を往復する閉鎖循環型の代謝過程をたどる。トランスフェリンの血漿濃度は健康人では2.44mg/mlであるが、鉄欠乏性貧血患者では生理学的反騰現象によって3.24mg/mlと増大する(2)。血漿の鉄結合能で表現すると、正常人では約340 μ g/dl、鉄欠乏性貧血患者では約450 μ g/dlの鉄と結合可能である。しかし、血漿鉄濃度の正常値は男子122 μ g/dl、女子109 μ g/dlであるので(3)、血漿鉄のほとんど全てがトランスフェリン結合鉄であることは容易に理解される。なお血漿鉄の半寿命は正常人では87.5分である(3)。これらの結果はトランスフェリン鉄が巨大分子であるにもかかわらず、普通には通過困難な毛細管壁および組織細胞の細胞膜を通り抜けて鉄を血漿から細胞内へ輸送する機構を持つことを暗示している。事実、遺伝疾患である無トランスフェリン血症の患者の血漿鉄濃度は極めて低く、重症な鉄欠乏性貧血を起こし、かつ大量の貯蔵鉄を肝臓に蓄積することが認められる(4)。

2) トランスフェリンレセプターの発見：網赤血球の細胞膜に鉄結合トランスフェリンに対する特異的結合作用のあることが1963年に発見された(5)。この結合は鉄を持たないアポトランスフェリンよりも鉄トランスフェリ

ンに選択的に強力であり、さらに網赤血球の細胞表面をトリプシン処理することによって、細胞のトランスフェリン結合能および細胞への鉄取り込み作用の両方が消滅した。この反応を詳しく観察して鉄輸送には次の2段階があるのを認めた。すなわち、第一段階は細胞膜と鉄トランスフェリンとの結合で、これは急速に行なわれ、4°Cのような低温でも、また酵素阻害剤の存在下でも実現し、その結合定数は $2\sim 7 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ と高値である。しかし続いて起こる第二段階の鉄の細胞内取り込みは緩徐な反応で温度条件および酵素阻害剤の影響を受けた。従って、網赤血球の表面には鉄トランスフェリンと特異的に結合し、鉄を細胞内に取り込むトランスフェリンレセプターが存在すると暗示された。トランスフェリンレセプターの研究は急速に発展し、肝臓、胎盤、その他、鉄を必要とする発育過程の細胞からは常に検出されたが、成熟赤血球には認められない(4,6)。現在、レセプターは1個のSS結合で連結された等モルの2量体であって、分子量180Kの膜タンパク質であることが明かとなった。分子は疎水性のペプチド鎖によって細胞膜を貫通して膜に投錨し、細胞外に分子量約140Kの大きなペプチド鎖を伸展させ、細胞質に分子量約10Kの尾部を残している(図1)(4)。

鉄トランスフェリンと結合したレセプターを中心として細胞膜は凹みはじめ、膜表面から括れ切れて小胞体(エ

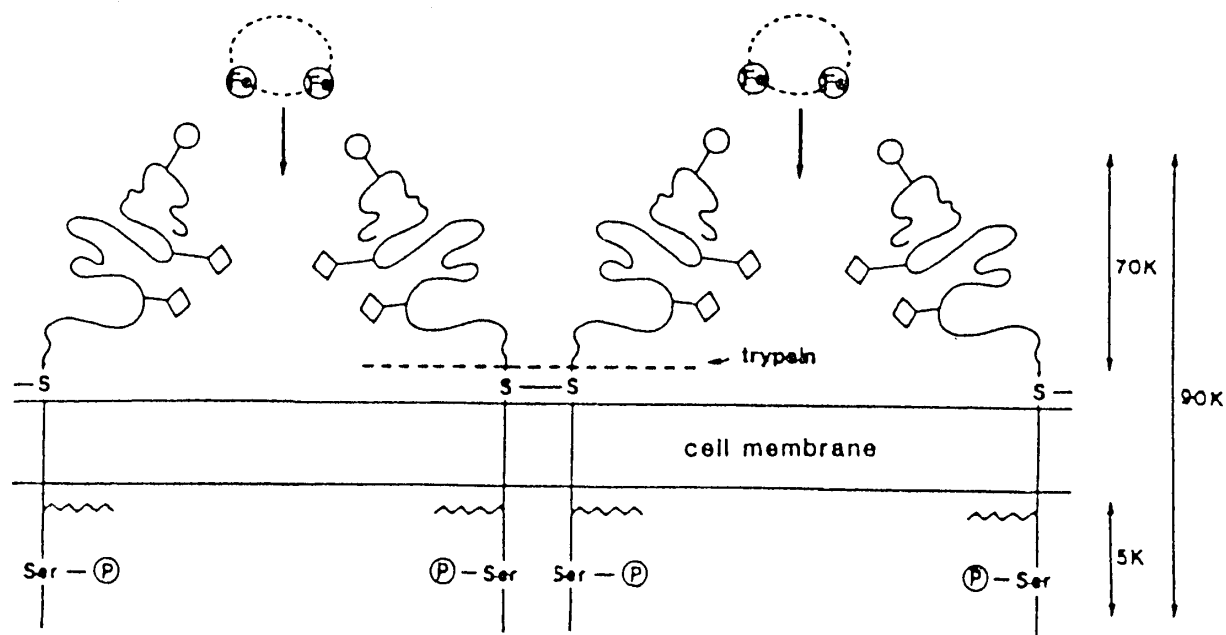


Fig. 1 Schematic representation of cell surface and transferrin receptor. This transmembrane protein consists of 2 disulfide-bridged monomers with covalently bound fatty acid and complex carbohydrate chains. 出典 (4)

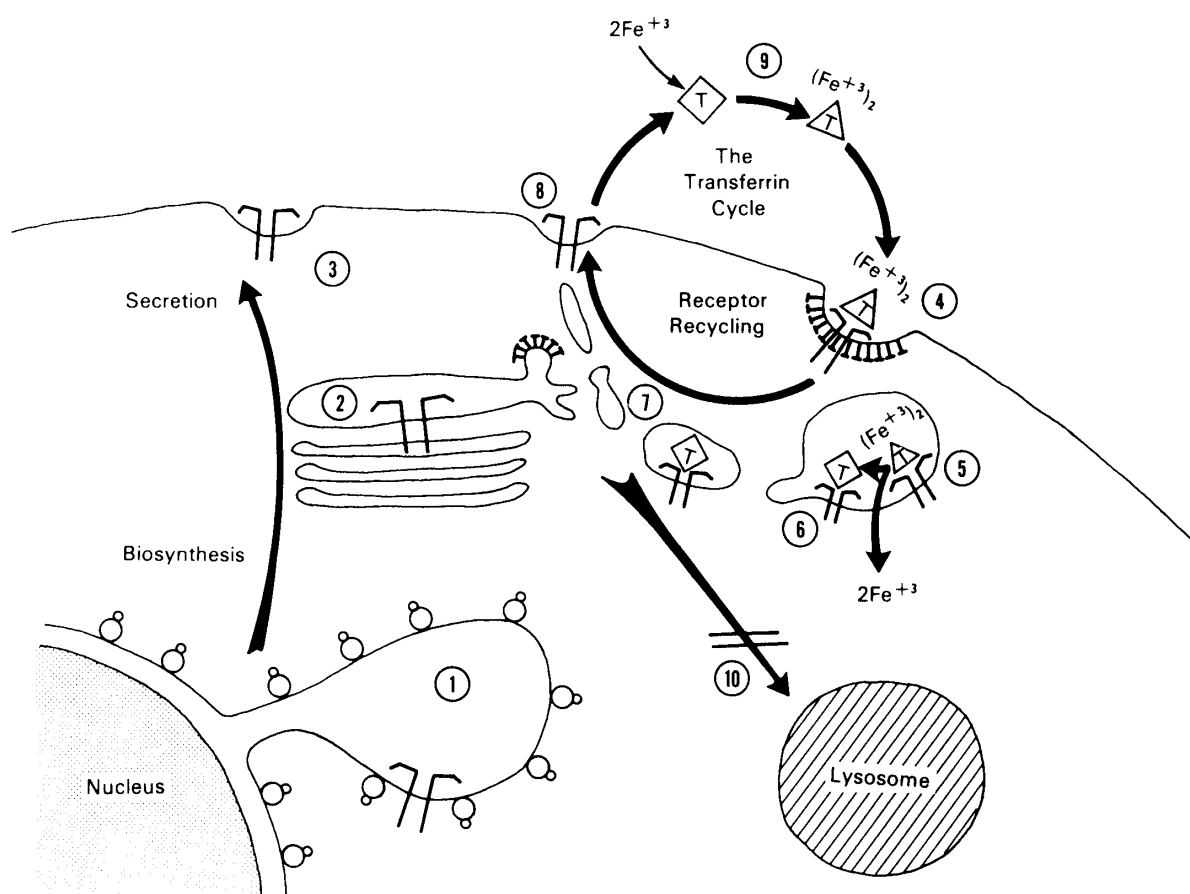


Fig. 2 Transferrin-receptor interactions. 1-3: Transferrin receptor biosynthesis and secretion. 4-8: Receptor recycling. 4-9: The transferrin cycle. 4-6, 10: Lysosomal pathway of receptor-mediated endocytosis. 1: Biosynthesis of the transferrin receptor in rough endoplasmic reticulum. 2: Processing of the transferrin receptor in the Golgi. 3: Insertion of the transferrin receptor into the plasma membrane. 4: Transferrin binding to its receptor in coated regions of the plasma membrane. 5: Transfer to receptosomes or endosomes. 6: Acid-facilitated dissociation of Fe^{+3} , generating apotransferrin. 7: Transfer of transferrin and its receptor to tubular elements of the trans Golgi. 8: Reinsertion of receptor into the plasma membrane and dissociation of apotransferrin. 9: Iron loading of transferrin. 10: Transferrin does not proceed to lysosomes during internalization. Symbols: Υ , transferrin receptor; \diamond , apotransferrin; \triangle , diferric transferrin. 出典 (1)

ンドゾームと言う)を作り、細胞質を回遊する(この現象をエンドサイトーシスと言う)。その間に小胞体内のpHが酸性に移行して鉄はトランスフェリンから遊離し、小胞体の外、すなわち細胞質に拡散して、鉄輸送の目的を達する。鉄を失ったアポトランスフェリンは小胞体が細胞の内側から細胞膜と融合するときに、レセプターとの親和性が低いためにレセプターから解離して、血漿に戻る(この現象をエクソサイトーシスと言う)(図2)(1)。このエンドサイトーシスとエクソサイトーシスとは反復する現象で連続的鉄取り込みが可能となる。

3) 腸管鉄吸収へのトランスフェリンレセプター機構

の関与について：著者の協同研究者麦谷と久安はラットの脾液にトランスフェリンが分泌されるのを発見し、トランスフェリンの鉄吸収への関与を研究した(7,8)。すなわち脾管カテーテル挿入によって脾液を採取し、ラット血漿トランスフェリン抗血清を使う免疫電気泳動法によって血漿および脾液トランスフェリン濃度を定量した。血漿濃度は正常ラットでは3.28mg/ml、鉄欠乏ラットでは4.50mg/mlとなり($p < 0.01$)、上記のヒト血漿濃度の文献値よりもやや高値であるが、鉄欠乏における濃度上昇は同様に認められた。脾液トランスフェリン濃度は正常、鉄欠乏性貧血の順で0.28mg/ml、1.19mg/mlと言う数値を得た($p < 0.01$)。血漿および脾液トランスフェリン

ン濃度は正常ラットと鉄欠乏ラットの間でそれぞれ有意差を認めた(表1)(8)。膵液には血漿濃度の約1/10と言うかなり大量なトランスフェリンが分泌され、しかも血漿と同様に膵液トランスフェリンも鉄欠乏によって濃度が増加した。鉄欠乏による増加は血漿137%であるのに対して膵液では425%であるため、膵液トランスフェリンの増加は血漿トランスフェリン増加にともなう2次的現象とは考えられない。むしろ膵液トランスフェリンは食物鉄の腸管吸収にあたり、トランスフェリンレセプターを介する鉄吸収を積極的に進めようのではないかと想像された。リガンド(この場合は鉄トランスフェリン)とレセプターとの結合を解析する方法として、スカッチャード解析が使われる。要約すると、レセプター結合は特異的、選択的であるため、一定量の細胞膜に含まれるレセプター数は有限である。そこで、放射性同位元素(^{125}I)で標識した一定量のリガンドに非標識リガンドを整数倍となるよう加えて標識と非標識リガンドの間でリガンド・レセプター結合を競合させて細胞膜に特定のレセプターが存在するか否かを検討し、かつレセプター数を定量する方法である。もし或る物質が細胞膜と高い親和性を持つとしても、競合現象のない場合には非特異的結合であって、リガンド・レセプター結合とは認められない。

そこでラットの小腸粘膜細胞の刷子縁膜分画を採取して、鉄トランスフェリンに対するスカッチャード解析

Table 1

Transferrin concentrations in pancreatic juice, bile, blood serum, and milk of rats

	Transferrin, mg/ml	
	normal (male)	iron deficient (male)
Pancreatic juice	(10) 0.28 ± 0.10^a	(6) $1.19 \pm 0.97^{c**}$
Bile	(11) 0.03 ± 0.01^a	(6) 0.03 ± 0.01^d
Blood serum	(10) 3.28 ± 0.78^b	(6) $4.50 \pm 0.77^{e**}$
ANOVA	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
Normal lactating (female)		
Milk	(3) 1.70 ± 0.30	

Values: means \pm S.D. The numbers in parentheses represent the number of animals. Hemoglobin values of normal and iron deficient male rats were 16.2 ± 1.1 and 10.0 ± 1.2 g/100ml, respectively. Statistical differences within the same column were calculated by ANOVA. Different alphabetic superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$) within the same column by Scheffe's test, and statistical differences between the comparable values in both groups were also shown by ANOVA ($**P < 0.01$) 出典 (8)

を実施した。結合定数は $1.03 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 結合数は 5.10×10^{12} 個/mgタンパク質となった。さらに正常ラットの結紮腸管に試料として ^{59}Fe 鉄トランスフェリンを注入して鉄の腸管吸収率を実験したところ、正常ラットでは27.4%となった。しかし試料にエンドサイトーシス阻害剤であるMDC(モノダンスールカダベリン)を1 μ モル添加したとき、鉄吸収率は11.8%と抑制され、また試料に20倍量の非標識鉄トランスフェリンを混合したとき、5.0%に低下した。条件負荷によって正常値に対して何れも統計的に有意な低下を示した($p < 0.05$)(表2)。以上の結果によって、小腸粘膜細胞の刷子縁膜にはトランスフェリンレセプターが存在し、エンドサイトーシス機構によって、鉄トランスフェリンの腸管吸収が起こる可能性のあると示された。

鉄吸収は硫酸鉄、クエン酸鉄、アスコルビン酸鉄などを試料として、in vitroの恐らくトランスフェリンの介助をあまり期待できない環境においても、理論的に正当な鉄吸収結果が得られてきた。小腸粘膜細胞での Fe^{++} イオンの膜透過作用として、それらの結果は尊重されなくてはならない。しかし、in vivoで腸管腔に膵液トランスフェリンが流入する環境では胃液によって可溶化された食物鉄の1部が鉄トランスフェリン結合体を作り、レセプター結合およびエンドサイトーシス機構を介して、鉄吸収を行なう可能性も数ある鉄吸収経路の1つとして認め

Table 2

Iron absorption from ^{59}Fe -diferric transferrin through ligated segments of intestine in normal rats, and effect of monodansylcadaverine and large amounts of unlabeled diferric transferrin on absorption

		^{59}Fe absorption, % dose (cpm)		
		mucosal uptake	transferred	total
Control	(14)	9.0 ± 4.3^a (3617)	18.4 ± 9.7^c (7395)	27.4 ± 12.4^e (11012)
MDC	(7)	5.1 ± 1.0^{ab} (2050)	6.8 ± 5.1^d (2733)	11.8 ± 4.8^f (4783)
Unlabeled transferrin	(4)	3.3 ± 0.3^b (1326)	1.7 ± 3.5^d (683)	5.0 ± 3.6^f (2009)
ANOVA		$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.001$

Values of % dose: mean \pm S.D. Values of cpm: means of repeated experiments. The numbers in parentheses represent the number of animals. One μ mol of monodansylcadaverine (MDC) or 20-times excess of unlabeled diferric transferrin was added to a control material containing ^{59}Fe -diferric transferrin. Refer to Table 1 for statistical evaluation. 出典 (8)

られて良いと思われる。ただし、哺乳動物のうちには乳汁など外分泌液にトランスフェリン類似の鉄タンパク質ラクトフェリンを分泌する動物（例えばヒト、ウシ、サル、マウスなど）がいる。サル(9)、マウス(10)の腸管では鉄ラクトフェリンに対するレセプターの存在が同様に議論されている。ラットは外分泌液にラクトフェリン分泌量がきわめて少ない動物であり、そのため鉄トランスフェリンが鉄吸収に関与した可能性はある。

4) 鉄トランスフェリン・レセプター集合体は細胞膜上で集合した状態で行動する：著者の協同研究者田口(11)は正常出産直後のヒト胎盤からトランスフェリンレセプターを大量に精製し、トランスフェリンレセプターの生化学的特性を研究した。精製法を要約すると、新鮮な胎盤に緩衝液を加えてホモジェナイズし、血液および可溶性タンパク質を不溶性の組織分画から分離する。レセプターは不溶性分画に含まれるため、不溶性分画をアセトン処理して脂質を取り除き、次いで界面活性剤(Emulgen 109P)を含む緩衝液に懸濁して膜成分を可溶化した。トランスフェリンレセプターはこの溶液に在るはずである。そこで前もって鉄トランスフェリンを共有結合させたセファロース4Bを満たしたアフィニティーカラム内に可溶化液を注入し、レセプターがカラム内でゲルに固定した鉄トランスフェリンと結合するように条件を設定した。それからカラムを緩衝液で十分に水洗してレセプター以外の挟雑物を除外し、最後にレセプターを脱着させて溶出した。精製法を繰り返し、SDS電気泳動法(SDS-PAGE)によって、分子量90Kの単量体のみを検出するようにした。このタンパク質をゲル濾過タイプの高速度液体クロマトグラフィーで分析すると、分子量370Kの4量体を主成分とし、それよりも分子量が大きい分画(6または8量体)、および2量体を認めた。この分画がトランスフェリンレセプターであることはこの分画に鉄トランスフェリンを添加し、インクベートした後に高速液クロ分析をすると、トランスフェリンとの結合に相当する分子量の増大を認めることから推定された。以上の結果から、*in vitro*実験ではあるが、鉄トランスフェリンと結合した後にレセプターは2量体から4、6または8量体に集合すると推定された。あるいは細胞膜上のトランスフェリンレセプターはそもそも4量体以上の集合体であるかも知れないが、著者は証拠を持っていない。

レセプターが細胞膜の表面と言う2次元の広がり、集合した状態で鉄トランスフェリンを結合した後に膜の凹みに落ち込むとすると、エンドサイトーシスによって作

られる小胞体にはリガンドが豊富に含まれ、鉄輸送の目的から考えると極めて合目的となる。自然の営みの巧妙さに改めて、感心する次第である。

文 献

- (1) Hanover, J.A. & Dickson, R.B. (1985) Transferrin: Receptor mediated endocytosis and iron delivery. In: Endocytosis (Pastan, I. & Willingham, M.C. eds.) pp.131-161. Plenum Press, New York & London.
- (2) Morgan, E.H. (1974) Transferrin and transferrin iron. In: Iron in Biochemistry and Medicine (Jacobs, A. & Worwood, M. eds.) pp.29-71. Academic Press, London & New York.
- (3) Wintrobe, M.M., Lee, G.R., Boggs, D.R., Bithell, T.C., Foerster, J., Athens, J.W. & Lukens, J.N. (1981) Clinical Hematology pp.1885-1903. Lea & Febiger, Philadelphia.
- (4) Huebers, H.A. & Finch, C.A. (1987) The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiol. Reviews* 67: 520-582.
- (5) Jandl, J.H. & Katz, J.H. (1963) The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J.Clin.Invest.* 42: 314-326.
- (6) Morgan, E.H. & Baker, E. (1988) Role of transferrin receptors and endocytosis in iron uptake by hepatic and erythroid cells. *Annals NY Academy Sci. "Hemochromatosis - Proceedings of the First International Conference"* 526: 65-82.
- (7) 麦谷圭一郎(1989) ラット消化液トランスフェリンの存在ならびに2Feトランスフェリンの腸管吸収について。日医大誌56: 144-152.
- (8) Hisayasu, S., Mugitani, K., Orimo, H., Ikeda, Y., Satoh, K., Hirai, Y. & Yoshino, Y. (1991) The role of diferric transferrin in iron absorption and transferrin concentration in rat pancreatic juice and milk. *International J. Hematol.* 54: 201-208.
- (9) Davidson, L.A. & Lönnerdal, B. (1988) Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *Am.J.Physiol.* 254: G580-G585.
- (10) Hu, W., Mazurier, J. & Spik, G. (1990) Iso-

lation and partial characterization of a lactoferrin receptor from mouse intestinal brush border. Biochemistry 29: 535-541.

(11) 田口正男 (1991) トランスフェリン・レセプターの新しい精製法とその生化学的性質. 日医大誌58: 187-197