

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23722

研究課題名(和文)鉄イオンは如何にして安全かつ正確に細胞内輸送されるのか？

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism how iron is transported safely in cytoplasm

研究代表者

築取 いずみ (Yanatori, Izumi)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40454847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：鉄は水溶性の二価鉄イオンでなければ、輸送体を通過することも細胞内で利用することもできない。しかし、二価鉄はその反応性の高さゆえに活性酸素産生の主たる原因となるため、安全に細胞内を輸送する必要がある。鉄シャペロン分子は鉄の取り込み・鉄の排出両方に関与し、直接輸送体との間で鉄の授受を行うことで、フリーの二価鉄イオンとして存在することを防ぐ。小胞体は蛋白質の正常な合成のために鉄を必要とする小器官である。本研究にて、ヒト細胞にて小胞体内腔へと鉄を輸送する分子を見出すことができた。また、この輸送体には鉄シャペロン分子が結合することから、鉄シャペロン分子と輸送体間で鉄の授受が行われていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、細胞の内外での鉄の動態については多くの研究がなされてきたが、細胞内でどのように鉄が輸送されているかについてはほとんど不明のままであった。近年、鉄による細胞・組織障害は広く知られるようになり、鉄を介した新たな細胞死・フェロトーシスに関する報告は急激に増加している。鉄が細胞障害を起こすメカニズムの詳細を明らかにする上で細胞内で鉄がどのように輸送され、各小器官へと輸送されているかを知ることは非常に重要な意味を持つ。また、本研究で注目した輸送体(A)の変異はヒトでも報告があり、今後の疾患の原因究明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential but potentially hazardous bio-metal. Because of its ability to readily accept or donate electrons, iron is a valuable cofactor. However, iron is potentially toxic because it catalyzes the generation of reactive oxygen species. Despite its high abundance in nature, ferric iron is poorly bioavailable due to its exceedingly low solubility at physiological pH. Thus, the acquisition and usage of iron presents a considerable challenge to cells and organisms, which have evolved sophisticated mechanisms to satisfy their metabolic needs and concomitantly minimize the risk of toxicity. The endoplasmic reticulum (ER) has a central role in lipid and protein biosynthesis, where some enzymes need iron as a cofactor. Previous study demonstrated that the metal transporter had an iron transport activity in fly but not in human. Thus, I investigated whether this transporter possessed an iron transport activity at ER membrane.

研究分野：代謝、分子生物学

キーワード：鉄 鉄代謝 鉄シャペロン

### 1. 研究開始当初の背景

鉄は全ての細胞にとって必須元素である。生体が利用可能な水溶性鉄である二価鉄イオンは、反応性に富み、多くの分子のコファクターとして重要である。こうした高い生体内活性のために、二価鉄は活性酸素(ROS)産生の主要原因となり、非常に強い生体毒性を示す。そのため鉄イオンの安全な細胞質内輸送機構が必須である。申請者は、二価鉄取込みの膜輸送体 DMT1 に結合し、DMT1 から二価鉄を直接受け取る分子として PCBP2 を同定することに成功した。その後、細胞外への二価鉄排出を行う膜輸送体 FPN1 にも PCBP2 が直接結合して細胞質の鉄を受け渡すことを明らかにした。さらに、ヘム分解酵素 HO1・HO2 に PCBP2 が結合し、電子供与に必須である NADPH cytochrome P450 reductase(CPR)とともに“メタボロン(HO-CPR-PCBP2 複合体)”を形成して、ヘム分解によって生じた鉄イオンを速やかにタンパク質結合型の安全な状態で保持するメカニズムを明らかにした。PCBP2 欠損マウスは胎生致死であり、本分子が赤芽球産生を含め胎生期の発生段階に非常に重要であることが示されている。しかし、細胞内に取込まれ、鉄シャペロン分子に捕捉された鉄イオンがミトコンドリア等の細胞内小器官に運ばれる機序、ミトコンドリア膜や小胞体膜上での鉄の取込み機構については全く不明であった。

### 2. 研究の目的

鉄代謝関連分子の研究はこの20年間に大きく発展した。それにより、過剰鉄がROS産生の原因となり、ひいては、肝臓・腎臓・心臓・神経組織と全身組織傷害を引き起こしていることが明らかとなった。2012年、鉄依存的に引き起こされる新しい細胞死『Ferroptosis』が提唱された。また、2014年には鉄貯蔵タンパク質フェリチンに標的を絞ったオートファジーの一種である『Ferritinophagy』が見出された。しかし、細胞が如何にして鉄濃度を感知するのか、また鉄はどのようにしてセンサータンパク質に出会うのか？などの機構は不明である。本研究では、二価鉄が細胞質ゾル内を安全な形で目的のタンパク質・細胞内小器官へと輸送される仕組みを解き明かし、酸化還元・呼吸をはじめとする細胞の生命活動の根源的テーマに取り組むものである。これまで鉄の『取込み』・『排出』に関わる鉄輸送機構を明らかにした知見・技術を元に、鉄の『利用』・『分配』機構の解明を目指す。如何にして細胞が適切かつ安全に鉄を利用場所へ輸送するのか？細胞は鉄濃度の変化にどのように応答することで、機能維持を図るのか？という細胞レベルにおける代謝・生死決定の解明へとつながることを期待し研究を行う。

### 3. 研究の方法

細胞内小胞体への鉄輸送機構の解明について：これまでの報告から鉄の輸送に関与することが予測される小胞体膜上の分子の発現を制御し、小胞体内の鉄量の変化を解析した。さらに、これまでの研究により、二価鉄輸送体(インポーター)は鉄シャペロンに鉄を受け渡し、二価鉄輸送体(エクスポーター)は鉄シャペロンから細胞質鉄を供給されていることを明らかにしてきた。そこで、この小胞体鉄輸送体が小胞体内腔に運ぶ鉄を鉄シャペロン分子によって供給されるかを解析するため、鉄シャペロンと小胞体鉄輸送体間の結合について免疫沈降法にて解析を行なった。

ミトコンドリアへの鉄輸送機構の解明について：ミトコンドリアはヘム合成を行う細胞内小器官であり、最も多くの鉄を利用する。そこで、ヘモグロビン合成を恒常的に行うヒト慢性骨髄性白血病細胞を用い、鉄利用が活発な状態において、鉄シャペロン分子が結合するミトコンドリア分子の探索を行なった。

### 4. 研究成果

小胞体には多くの二価鉄が存在することが知られており、水酸化酵素の補酵素として重要な役割を担う。しかしながら、細胞質から小胞体内への鉄輸送機構は不明である。これまで、ショウジョウバエを用いた研究により、小胞体膜上の金属輸送体(A)が鉄を輸送する能力があることが示唆されてきたが、ヒトやマウスなどの哺乳類ではその機能は確認されていなかった。本研究では、この輸送体(A)に注目し、小胞体内への鉄輸送能を有するかについて解析を行なった。

#### (1) 輸送体(A)発現制御に伴うコラーゲン産生の

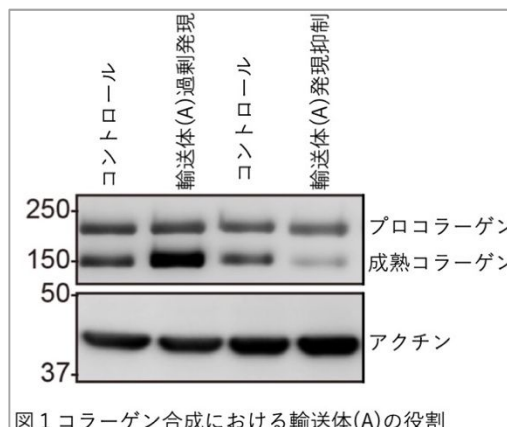


図1 コラーゲン合成における輸送体(A)の役割

## 変化

小胞体内において、鉄はプロリン水酸化酵素の機能に必須であることが知られる。プロリン水酸化酵素は、アスコルビン酸・鉄を利用しプロコラーゲンの水酸化を起こすことで、コラーゲンの成熟化に必須の酵素である。そこで、小胞体内の鉄量の指標として成熟コラーゲンの産生量を解析したところ、輸送体(A)発現抑制細胞では成熟コラーゲンの抑制が低下し、また過剰発現細胞では増殖することがわかった(図1)。さらに、輸送体(A)の機能を喪失した変異体を過剰発現すると成熟コラーゲンの産生が抑制された。以上のことから輸送体(A)が小胞体内への鉄の輸送に重要であり、ひいてはコラーゲン産生に重要な役割をもつことが示唆された。

### (2) 細胞内鉄シャペロン分子と輸送体(A)の相互作用

細胞内に鉄シャペロン分子 PCBP は 0.5 $\mu$ M 以上と非常に多く存在し、細胞質ゾル内の鉄の多くは鉄シャペロン分子 PCBP に捕捉され、細胞質内を輸送すると思われる。そこで、PCBP が小胞体膜に存在する輸送体(A)に細胞質内鉄を供給しているという仮説のもと、これら分子の結合を共免疫沈降法にて解析した(図2)。その結果、細胞内の鉄濃度の増加に伴い、輸送体(A)と鉄シャペロン PCBP 間での結合が増加することがわかった。また逆に、鉄をキレートするとこれら分子間での結合が減弱した。以上のことより、細胞質ゾル中の鉄を鉄シャペロン分子が輸送体(A)に受け渡していることが示唆された。

### (3) ヘム合成時における鉄シャペロン分子に結合するミトコンドリア外膜分子の探索

ヘム合成時にはミトコンドリアへの鉄輸送が活発に行われていることが予測される。ミトコンドリアへの鉄の輸送方法にはいくつかの仮説が考えられているが、申請者はこれまでの研究から鉄シャペロン分子が細胞質鉄をミトコンドリア外膜のタンパク質へと受け渡すという経路が最も有力な方法だと考えた。そこで、ヘモグロビン合成細胞を用いて PCBP に結合する分子を pull down 法により探し、質量分析法によりそれらの候補分子の同定を行なった。その結果、複数の候補分子を見出すことに成功し、現在引き続きこれらの分子の鉄輸送能の有無、ヘム合成への関与等の解析を進めている。

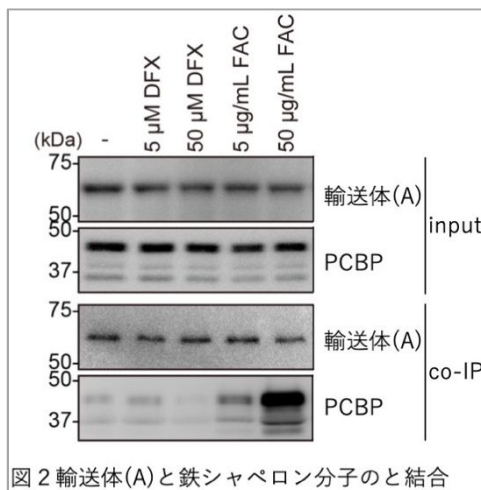


図2 輸送体(A)と鉄シャペロン分子との結合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Fumiya, Yanatori Izumi, Maeda Yuki, Nimura Kenta, Ito Satoki, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko, Kohyama Norihiko, Okazaki Yasumasa, Akatsuka Shinya, Toyokuni Shinya	4. 巻 36
2. 論文標題 Asbestos conceives Fe(II)-dependent mutagenic stromal milieu through ceaseless macrophage ferroptosis and -catenin induction in mesothelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 101616 ~ 101616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2020.101616	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Yanatori, Des R Richardson, Shinya Toyokuni, Fumio Kishi	4. 巻 672
2. 論文標題 How iron is handled in the course of heme catabolism: Integration of heme oxygenase with intracellular iron transport mechanisms mediated by poly (rC)-binding protein-2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of biochemistry and biophysics	6. 最初と最後の頁 108071-108078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2019.108071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Izumi Yanatori
2. 発表標題 Intracellular iron transport: specific iron delivering system in cytosol
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shinya Toyokuni, Izumi Yanatori	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer, Cham	5. 総ページ数 324
3. 書名 Ferroptosis in Health and Disease	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------