

鉄貯蔵タンパク質フェリチンの液滴形成と 二つのオートファジー経路での分解

山本 林¹, 水島 昇²

1. はじめに

オートファジーは自己の細胞質成分をリソソームに輸送して分解する機構で、膜動態や輸送経路の違いから、マクロオートファジー（オートファゴソームによる隔離を介する）、ミクロオートファジー（リソソームやエンドソームの膜陥入による）、シャペロン介在性オートファジー（リソソームの膜透過による）の三つに分けられる。近年、フェリチンの分解経路としてマクロオートファジー（macroferritinophagy）とエンドソームでのミクロオートファジー（microferritinophagy）が注目されており、本稿では両経路に共通する分子メカニズムについて概説する。

フェリチンは鉄貯蔵タンパク質で、脊椎動物にはH鎖（FTH）とL鎖（FTL）がある。両者が会合して、合計24個のサブユニットからなる殻状の複合体を形成する（図1）。鉄過剰時には、フェリチン複合体の殻の内部に4500個もの鉄イオンが貯蔵されるといわれている。一方、鉄不足になるとフェリチンから鉄イオンが回収されるが、少なくともその一部はマクロオートファジーに依存していることが岩井らのグループなどによって明らかにされた^{1,2}。フェリチンからの鉄イオンの遊離には、フェリチンがリソソーム内の酸性環境にさらされることが重要であると考えられている²。どのようにしてフェリチンがマクロオートファジー経路によって認識されるかについても、この数年で大きな前進があった。2014年に、KimmelmannとHarperらの共同グループ³、およびMurphyらのグルー

プ⁴は独立にフェリチン結合タンパク質としてNCOA4を同定し、それがマクロオートファジーの受容体として機能していることを示唆した。NCOA4はオートファゴソーム膜に直接結合するわけではなく、オートファジーアダプターであるTAX1BP1を介してオートファゴソーム膜のATG8ファミリータンパク質に結合する⁵。さらに、2017年には、同じくMurphyらのグループによって、フェリチンはマクロオートファジーだけではなく、ESCRT（endosomal sorting complex required for transport）依存的な経路（エンドソームのミクロオートファジーであると考えられる）によっても分解されることが報告された⁵。興味深いことに、フェリチンのマクロオートファジーに必要なNCOA4とTAX1BP1は、いずれもがフェリチンのミクロオートファジーにも必要である。積み荷であるフェリチンは、マクロオートファジーではオートファゴソーム、ミクロオートファジーではエンドソームという異なるオルガネラによって取り囲まれるにもかかわらず、共通のメカニズムの存在が想定される。

一方で、筆者らは、マクロオートファジー不全細胞を電子顕微鏡で観察した際に、直径500nm程度（大きいものは1μm以上）の電子密度の高い巨大球状構造体が頻繁に蓄積していることに気づいていた⁶。実は、これは直径12nmのフェリチン複合体が数千個以上集合したものであった。つまり、本来はオートファジーによって選択的に分解されるべきフェリチンが過剰に蓄積した結果を示していた。奇妙なのは、それらがいつも“すばらしく美しい”球状構造体であったことである。そこで筆者らは、フェリチンは液-液相分離によって液滴のような構造を作り、そのことがオートファジー（マクロオートファジーおよびミクロオートファジー）による効率的な取り込みに関与しているのではないかの仮説を立てた。本稿ではこの仮説に基づいた筆者らの研究⁷およびフェリチン動態に関する最近の知見について紹介する。

2. 液-液相分離によるフェリチン液滴の形成

まず筆者らは、細胞内のフェリチン動態を観察するため、monomeric GFPを付加したFTH1（mGFP-FTH1）をHeLa細胞で安定発現させ、さらに過剰発現の影響を避けるため、

¹ 日本医科大学先端医学研究所遺伝子制御学分野（〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5）

² 東京大学大学院医学系研究科分子生物学分野（〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1）

Ferritin condensates: Formation by liquid-liquid phase separation and degradation via two autophagy pathways

Hayashi Yamamoto¹ and Noboru Mizushima² (¹Department of Molecular Oncology, Institute for Advanced Medical Sciences, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950802

© 2023 公益社団法人日本生化学会

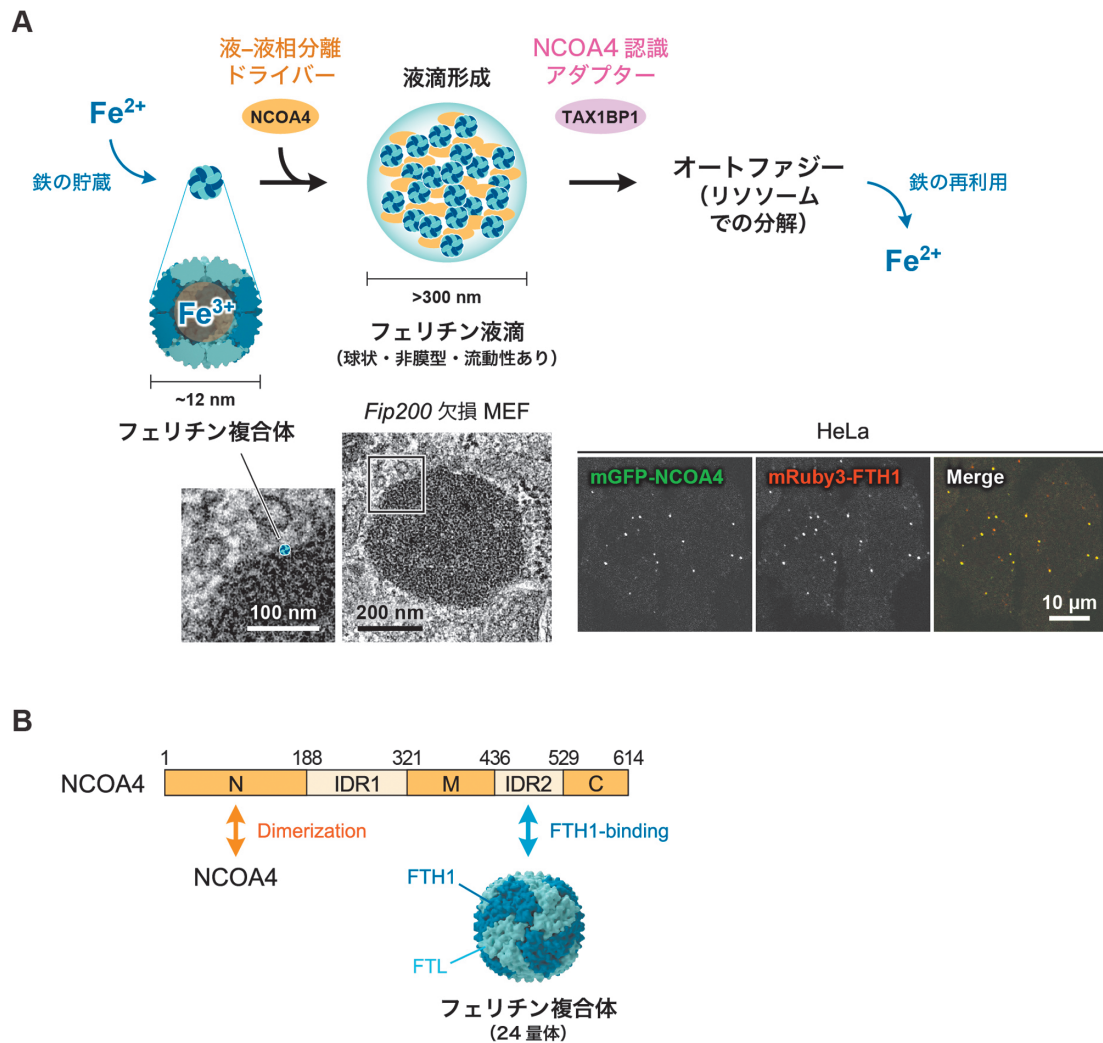


図1 フェリチンはNCOA4依存的に液-液相分離して液滴を形成する

(A)鉄貯蔵タンパク質フェリチンは、FTH1とFTLの24量体からなるフェリチン複合体を形成して内部に鉄イオンを貯蔵する。フェリチン複合体は、NCOA4を介した多価相互作用により液-液相分離してフェリチン液滴を形成し、このフェリチン液滴がオートファジー（マクロオートファジーとミクロオートファジー）によってリソソームに運ばれることで貯蔵した鉄イオンを放出する。mGFP-NCOA4とmRuby3-FTH1を共発現させたHeLa細胞では、フェリチン液滴が細胞質の小さな点状構造として観察される（蛍光顕微鏡像）。マクロオートファジー不全細胞[Fip200欠損マウス胎仔由来線維芽細胞（MEF）]ではフェリチン複合体の分解が阻害されるため、細胞質に非常に大きなフェリチン液滴が蓄積する（電子顕微鏡像、文献6より一部改変）。（B）NCOA4は、N末端の二量体化ドメイン、天然変性領域1（IDR1）、中央ドメイン（M）、C末端ドメイン、天然変性領域2（IDR2）からなる。NCOA4は、N末端ドメインでの自己二量体化とIDR2でのFTH1相互作用により、フェリチン複合体と多価相互作用してフェリチン液滴形成を促す。

発現量が内在性FTH1と同程度の低発現細胞をセルソーターで選別して用いた⁷⁾。野生型細胞でmGFP-FTH1は細胞質に一様の局在を示すとともに、一部が点状（細胞内に数個から10数個）の局在を示した（図1A）。既報告⁶⁾と同様に、マクロオートファジー不全細胞（FIP200欠損）ではこれらの構造体が大きくなった（数は減少して細胞内に数個）。電子顕微鏡観察してみると、フェリチン複合体どうしが会合した巨大な球状構造体が観察され、これらが膜に囲まれていない非膜型構造体であることがわかった（図1A）。

光退色後蛍光回復法では蛍光強度が20%程度まで速やかに回復する様子が、タイムラプス観察では二つのフェリチン高次会合体が融合する様子が観察された。以上のことから、フェリチンは流動性を備えた液滴を形成すると結論し、「フェリチン液滴」とした⁷⁾（図1A）。フェリチン液滴は光退色後蛍光回復法での蛍光回復が20%程度と流動性がやや低い、出芽酵母で選択的マクロオートファジーの標的となるprApe1液滴はその流動性の低さが分解に重要とされていることから⁸⁾、適度に流動性が低いことがマクロオートファ

ジ-の標的となる液滴に共通する特徴なのかもしれない。

3. NCOA4依存的なフェリチン液滴形成とオートファジーでの分解

フェリチンの分解には、マクロオートファジー経路でもマイクロオートファジー経路でもNCOA4とTAX1BP1が必要で、特にNCOA4はフェリチンを認識する受容体とされている^{3,4)}。蛍光顕微鏡観察では、NCOA4とTAX1BP1もフェリチン液滴と共局在するため、それらも液滴の構成因子であることが示唆された。また、NCOA4欠損細胞ではフェリチン液滴が形成されなかったことから、NCOA4は単純な受容体ではなく、液-滴相分離を促すドライバーとしての機能を持つと考えられる(図1A)。一方、TAX1BP1欠損細胞ではフェリチン液滴が蓄積して大きくなり、これはTAX1BP1がフェリチン分解に必要なオートファジーアダプターという従来の説明と一致する⁵⁾(図1A)。

NCOA4はN末端ドメイン、中央ドメイン、C末端ドメイン、これらをつなぐ二つの天然変性領域(IDR1, IDR2)からなり(図1B)、IDR2でFTH1と相互作用する⁹⁾。一般に、液滴形成は多価相互作用によって促される。NCOA4もFTH1

と相互作用するIDR2を欠失すると液滴形成能を失った。また、N末端ドメインはAlphaFold-Multimerを用いた構造予測で二量体形成することが示唆された。そこで構造予測をもとに変異導入したところ、二量体形成不全に伴って液滴形成能も失われた。したがって、FTH1とFTLの24量体化、NCOA4の二量体化、NCOA4-FTH1相互作用といった多価相互作用を介してフェリチン液滴が形成されるものと考えられる。出芽酵母はフェリチンを持たない珍しい生物であるので、これを利用してヒトのNCOA4とFTH1を共発現させてみると細胞あたり一つの巨大なフェリチン液滴が形成されたことから、NCOA4とFTH1が液滴形成の最小因子であることがわかる。FTH1:FTHLの量比は心臓では20:4、肝臓では4:20と大きく異なることから、フェリチン液滴形成の状況(数、大きさ、流動性など)は臓器や組織ごとに異なると考えられ、個体レベルでの解析が今後の課題となる。

4. フェリチン液滴のマクロオートファジーとマイクロオートファジー

NCOA4への変異導入によってフェリチンとの結合を保ったまま液滴形成のみを阻害すると、鉄欠乏で誘導され

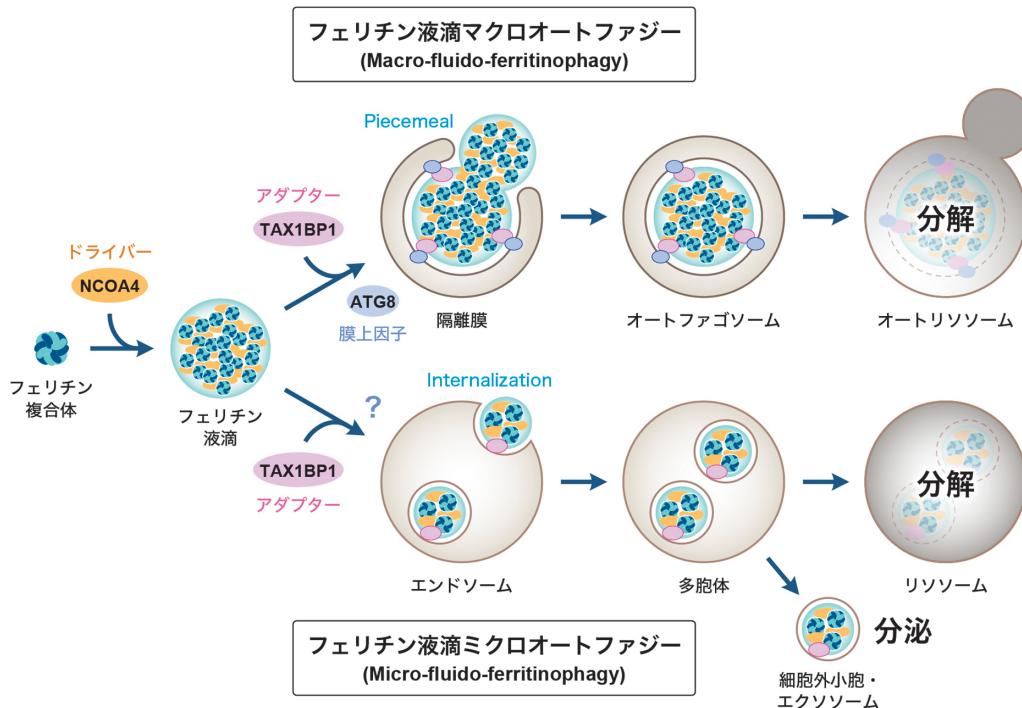


図2 フェリチン液滴はマクロオートファジーとマイクロオートファジーの二つの経路でリソソームに運ばれて分解される。マクロオートファジー経路では、フェリチン液滴のNCOA4をアダプタータンパク質TAX1BP1が認識し、TAX1BP1をオートファゴソーム膜上のATG8ファミリータンパク質(LC3など)が認識することで、フェリチン液滴がオートファゴソーム膜に取り込まれて、最終的にオートリソソームで分解される。オートファゴソーム膜はフェリチン液滴に密着するように伸展し、これは「液滴マクロオートファジー (macrofluidophagy)」の特徴とよく一致する。マイクロオートファジー経路(エンドソームの多胞体様経路)では、フェリチン液滴がエンドソームの膜陥入によって取り込まれて腔内小胞を形成し、最終的にリソソームで分解される。一部は、エクソソーム様の細胞外小胞として細胞外分泌される。

るフェリチン分解が顕著に抑制された。これは、フェリチン液滴そのものがオートファジーの分解標的になっていることを示唆している。そこで、マクロオートファジー経路（オートファゴソームへの取り込み）について調べてみると、鉄欠乏条件下で、フェリチン液滴の一部がオートファゴソーム膜によってくびり切られる piecemeal 型のマクロオートファジーが観察された。三次元光・電子相関電子顕微鏡法によって HeLa 細胞全体を連続切片で微細構造解析すると、オートファゴソーム膜がフェリチン液滴に密着するように伸張している様子が観察された（図2）。これは液滴と膜の相互作用（ウェットティング）によって、オートファゴソーム膜が液滴方向に変形する「液滴マクロオートファジー（macrofluidophagy）」¹⁰⁾の特徴とよく一致する。

次にマイクロオートファジー経路（エンドソームへの取り込み）について観察を行った。一般にエンドソームは小さいために、光学顕微鏡でエンドソームのマイクロオートファジーを観察するのは難しい。そこで、RAB5の恒常活性変異体（RAB5^{Q79L}）を発現させてエンドソームを肥大化させて観察したところ、エンドソーム内腔でフェリチン液滴が動き回っている様子が観察された（腔内小胞がブラウン運動している）。その蛍光強度は細胞質のフェリチン液滴と同程度で、フェリチン液滴が形成されない NCOA4 欠損細胞ではエンドソームへの取り込みが観察されなかったことから、この現象は、細胞質で形成されたフェリチン液滴がエンドソームの膜陥入で取り込まれた「フェリチン液滴マイクロオートファジー」と考えられる（図2）。フェリチン液滴を取り込んだエンドソーム腔内小胞は直径 100nm 程度であるが、フェリチン液滴マイクロオートファジーがマクロオートファジーと同様の piecemeal 型なのか、あるいは小さなフェリチン液滴がそのまま取り込まれているのかわかっていない。TAX1BP1 欠損細胞では細胞質にフェリチン液滴が蓄積するものの、エンドソームへの取り込みは観察されなかったことから、マクロオートファジーのアダプターである TAX1BP1 がマイクロオートファジーでもアダプターとして機能していると考えられる。

筆者らの結果は、フェリチン液滴がマクロオートファジーとマイクロオートファジーの共通基質になることを示しており、二つの経路を分子レベルで関連づける新たな液滴オートファジーの発見となった（図2）。同時に多くの課題も見つかり、特にマイクロオートファジーについては解明すべき点が多く残されている。マクロオートファジーではオートファゴソーム膜の ATG8 ファミリータンパク質によって TAX1BP1 が認識されるが⁵⁾、マイクロオートファジーではどのようにして TAX1BP1 依存的にフェリチン液滴がエンドソームに取り込まれるか。また、筆者らは、通常の栄養条件下でフェリチン液滴マイクロオートファジーを、鉄欠乏条件下でマクロオートファジーを観察している

が、両経路への仕分けメカニズムなど不明な点が多い。

5. 多様なエンドソームマイクロオートファジー

近年、さまざまなタイプのエンドソームマイクロオートファジーが相次いで報告されている。栄養飢餓1時間程度の短時間では、マクロオートファジーアダプターのファミリータンパク質（p62/SQSTM1, TAX1BP1, NDP52 など）および基質認識に関わる ATG8 ファミリータンパク質（LC3 など）が、マクロオートファジー非依存的かつ ESCRT 依存的にエンドソームに取り込まれる¹¹⁾。また、RNA 結合タンパク質（HNRNPK, SAFB）が LC3 依存的にエンドソームに取り込まれ、最終的に細胞外に分泌される LDELS（LC3-dependent extracellular vesicle loading and secretion）が報告されており¹²⁾、LDELS もエンドソームマイクロオートファジー様の膜動態からなるものと考えられる。これらは誘導条件や標的タンパク質が異なり、今後、筆者らが報告したフェリチン液滴マイクロオートファジーとの共通点・相違点を明らかにしていくなかで、多様なエンドソームマイクロオートファジーの全体像を理解する必要がある。また、フェリチンはエクソソーム経路で細胞外分泌されることから、フェリチン液滴マイクロオートファジーの一部はエンドソームにおいて細胞外分泌経路に移行している¹³⁾と考えられ、その分岐メカニズムの解明も今後の課題となる。

6. 鉄イオン濃度に依存したフェリチンの分解と分泌の制御

最近、築取らは、鉄イオン濃度に依存したフェリチン分泌の新しい制御機構について報告している¹³⁾。細胞外小胞の分泌に関わる CD63 の発現が遺伝子上流の IRE（iron responsive element）によって制御されており、鉄添加にตอบสนองして CD63 の発現量が増えることで細胞外小胞の分泌が亢進する。この CD63 陽性小胞にフェリチンが内包されて細胞外に分泌される¹³⁾。また、九野らは、NCOA4 についても鉄イオン濃度に依存した機能制御メカニズムがあることを報告している¹⁴⁾。NCOA4 は IDR1 に鉄イオン結合領域（239~334 残基）を持ち、鉄過剰条件下では鉄イオンの結合により NCOA4 のみで会合体を形成する¹⁴⁾。これにより、フェリチンが NCOA4 から解離するため、NCOA4 依存的なフェリチン分解（つまり、フェリチンの液滴形成と分解⁷⁾）が抑制される。さらに、NCOA4 は別の鉄感知機構および酸素感知機構も備えている。NCOA4 は四つのシステイン残基からなる鉄-硫黄クラスター結合領域（404~422 残基）を持ち、鉄イオン濃度が高く酸素濃度が低い場合には、鉄-硫黄クラスターが結合して E3 ユビキチンリガーゼ HERC2 による認識を受ける。これにより、NCOA4 がポリ

ユビキチン化されてプロテアソームで分解されることにより、NCOA4 依存的なフェリチン分解が抑制される¹⁵⁾。このように鉄イオン濃度に依存して、フェリチンとNCOA4 は異なる細胞内動態を示すことで、細胞内の鉄ホメオスタシスをたくみに制御しているものと考えられる。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、東京大学大学院医学系研究科の大島知子氏、齊藤知恵子氏、東京医科歯科大学リサーチコアセンター組織解析ユニットの酒巻有里子氏との共同研究となります。

文 献

- 1) Kidane, T.Z., Sauble, E., & Linder, M.C. (2006) Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C445–C455.
- 2) Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., & Iwai, K. (2011) Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol. Cell Biol.*, **31**, 2040–2052.
- 3) Mancias, J.D., Wang, X., Gygi, S.P., Harper, J.W., & Kimmelman, A.C. (2014) Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, **509**, 105–109.
- 4) Dowdle, W.E., Nyfeler, B., Nagel, J., Elling, R.A., Liu, S., Triantafellow, E., Menon, S., Wang, Z., Honda, A., Pardee, G., et al. (2014) Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat. Cell Biol.*, **16**, 1069–1079.
- 5) Goodwin, J.M., Dowdle, W.E., DeJesus, R., Wang, Z., Bergman, P., Kobylarz, M., Lindeman, A., Xavier, R.J., McAllister, G., Nyfeler, B., et al. (2017) Autophagy-independent lysosomal targeting regulated by ULK1/2-FIP200 and ATG9. *Cell Rep.*, **20**, 2341–2356.
- 6) Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E., & Mizushima, N. (2014) Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J. Cell Sci.*, **127**, 4089–4102.
- 7) Ohshima, T., Yamamoto, H., Sakamaki, Y., Saito, C., & Mizushima, N. (2022) NCOA4 drives ferritin phase separation to facilitate macroferritinophagy and microferritinophagy. *J. Cell Biol.*, **221**, e202203102.
- 8) Yamasaki, A., Alam, J.M., Noshiro, D., Hirata, E., Fujioka, Y., Suzuki, K., Ohsumi, Y., & Noda, N.N. (2020) Liquidity is a critical determinant for selective autophagy of protein condensates. *Mol. Cell*, **77**, 1163–1175.e9.
- 9) Gryzik, M., Srivastava, A., Longhi, G., Bertuzzi, M., Gianoncelli, A., Carmona, F., Poli, M., & Arosio, P. (2017) Expression and characterization of the ferritin binding domain of Nuclear Receptor Coactivator-4 (NCOA4). *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1861**(11 Pt A), 2710–2716.
- 10) Agudo-Canalejo, J., Schultz, S.W., Chino, H., Migliano, S.M., Saito, C., Koyama-Honda, I., Stenmark, H., Brech, A., May, A.I., Mizushima, N., et al. (2021) Wetting regulates autophagy of phase-separated compartments and the cytosol. *Nature*, **591**, 142–146.
- 11) Mejlvang, J., Olsvik, H., Svenning, S., Bruun, J.-A., Abudu, Y.P., Larsen, K.B., Brech, A., Hansen, T.E., Brenne, H., Hansen, T., et al. (2018) Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy. *J. Cell Biol.*, **217**, 3640–3655.
- 12) Leidal, A.M., Huang, H.H., Marsh, T., Solvik, T., Zhang, D., Ye, J., Kai, F., Goldsmith, J., Liu, J.Y., Huang, Y.-H., et al. (2020) The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nat. Cell Biol.*, **22**, 187–199.
- 13) Yanatori, I., Richardson, D.R., Dhekne, H.S., Toyokuni, S., & Kishi, F. (2021) CD63 is regulated by iron via the IRE-IRP system and is important for ferritin secretion by extracellular vesicles. *Blood*, **138**, 1490–1503.
- 14) Kuno, S., Fujita, H., Tanaka, Y.-K., Ogra, Y., & Iwai, K. (2022) Iron-induced NCOA4 condensation regulates ferritin fate and iron homeostasis. *EMBO Rep.*, **23**, e54278.
- 15) Kuno, S. & Iwai, K. (2023) Oxygen modulates iron homeostasis by switching iron sensing of NCOA4. *J. Biol. Chem.*, **299**, 104701.

著者寸描

●山本 林 (やまもと はやし)



日本医科大学先端医学研究所遺伝子制御学分野 大学院教授。博士 (理学)。

■略歴 1999年名古屋大学理学部卒業、2004年同大学院理学研究科博士課程修了、04年名古屋大学大学院博士研究員、06～15年自然科学研究機構基礎生物学研究所および東京工業大学 (大隅良典研) でポスドク・特任助教など、15年東京大学大学院医学系研究科講師、22年より現職。

■研究テーマと抱負 液滴やユビキチン陽性凝集体を分解標的とする選択的オートファジー、特にミクロオートファジー経路での細胞内分解と細胞外分泌の分子メカニズムを明らかにし、関連疾患の発症メカニズムの理解に繋げたい。

■ウェブサイト <https://www.nms.ac.jp/ig/bumon/identshi.html>

●水島 昇 (みずしま のぼる)



東京大学大学院医学系研究科分子生物学分野 教授。博士 (医学)。

■略歴 1991年東京医科歯科大学医学部医学科卒業、96年同大学院医学研究科博士課程修了、97～2004年岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 (大隅良典研) でポスドク・助手など、2004年 (財) 東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所室長、06年東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授、12年より現職。

■研究テーマと抱負 オートファジーを中心とした細胞内分解系の研究。

■ウェブサイト <https://molbiol.ut.jp/>