

コントラスト・マッチング条件下でのフェリチン鉄コアの観察 Observation of Ferritin Iron Cores under Contrast-Matching Conditions

桑田巧, 池口雅道*

創価大学大学院理工学研究科生命理学専攻

〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

Takumi KUWATA and Masamichi IKEGUCHI*

Department of Biosciences, Soka University, 1-236, Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

1 はじめに

鉄は生命活動の維持に必要不可欠であるが、遊離した Fe^{2+} は高い反応を持つため過酸化水素と反応し、ヒドロキシラジカルを生成することで細胞障害を引き起こす^[1]。この為、細胞内で鉄を安定的に保持する為に、多くの生物種は鉄貯蔵蛋白質フェリチンによって Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化し、フェリチン内腔に酸化した Fe^{3+} を不溶性の鉄ミネラル（鉄コア）として保存する^[2]。フェリチンは 24 量体から構成され、内径 8 nm、外径 12 nm の球殻構造を有する蛋白質である。フェリチン内腔に形成される鉄コアには、鉄の他に無機リン酸が含まれることが報告されている^[3,4]。無機リン酸の含有率は生物種によって異なっており、哺乳類では $\text{Fe} : \text{PO}_4 = 10 : 1$ である一方で、細菌、植物では $\text{Fe} : \text{PO}_4 = 1 : 1$ である。本研究は大腸菌由来ヘム非結合型フェリチン (EcFtnA) の内腔に形成される鉄コアの形態に及ぼす無機リン酸の影響を、コントラスト変化法を用いた X 線小角散乱 (SAXS) 測定によって評価した。

2 実験

コントラストマッチング条件の決定は、アポ状態の EcFtnA を 0-45 % (w/w) スクロース溶液中で測定し、前方散乱強度がゼロになるスクロース濃度を求めた。

鉄コアを形成したホロ EcFtnA は、1 μM の精製したアポ EcFtnA と 500 mM 硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を 1000 : 1 で混合し、混合後、室温で静置することで調製した。1 回の混合で、24 量体のフェリチン 1 分子あたり 500 個の鉄を添加し、それ以上の鉄量の鉄コアを調製する場合には、目的の鉄量に達するまで、上記の操作を繰り返し行った。混合溶液を Superose 6 increase カラム (Cytiva 社) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーに供し、ホロ EcFtnA の精製を行った。

ホロ EcFtnA 溶液と 60% (w/w) スクロース溶液を質量比 9:1 混合し、コントラストマッチング条件下でのホロ EcFtnA サンプルの調製を行った。このサンプルについて、フローセルを用いた SAXS 測定によって、鉄コアに由来する散乱データの収集を行った。

3 結果および考察

0-45 % (w/w) スクロース溶液中でアポ EcFtnA の SAXS 測定を行った結果、スクロース濃度の上昇に伴って散乱強度が低下したことが確認された。各散乱曲線から得られる前方散乱強度 $I(0)$ を溶媒の電子密度に対してプロットした (図 1)。このデータに対してフィッティングを行い、EcFtnA と溶媒の電子密度が一致するコントラストマッチング条件となるスクロース濃度が 53.55 % (w/w) であることが明らかとなった。

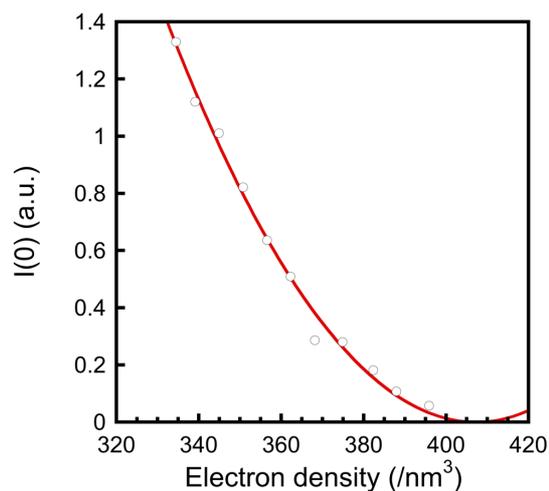


図 1 : スクロース濃度から計算した溶液電子密度に伴う前方散乱強度の減少

20 mM リン酸緩衝液と 25 mM HEPES 緩衝液中で調製したホロ EcFtnA の上記で決定したコントラストマッチング条件下で SAXS 測定を行った (図 2A, B)。

リン酸緩衝液中で作製された鉄コアの散乱曲線は、鉄量の増加に伴って、フリッジが生じた。一方で、HEPES 緩衝液中で作製された鉄コアについては、鉄量の増加した場合でも、明確なフリッジを確認することができなかった。得られた各散乱曲線を基に、慣性半径 R_g を計算し、鉄コアを形成する鉄量に対してプロットした (図 3)。

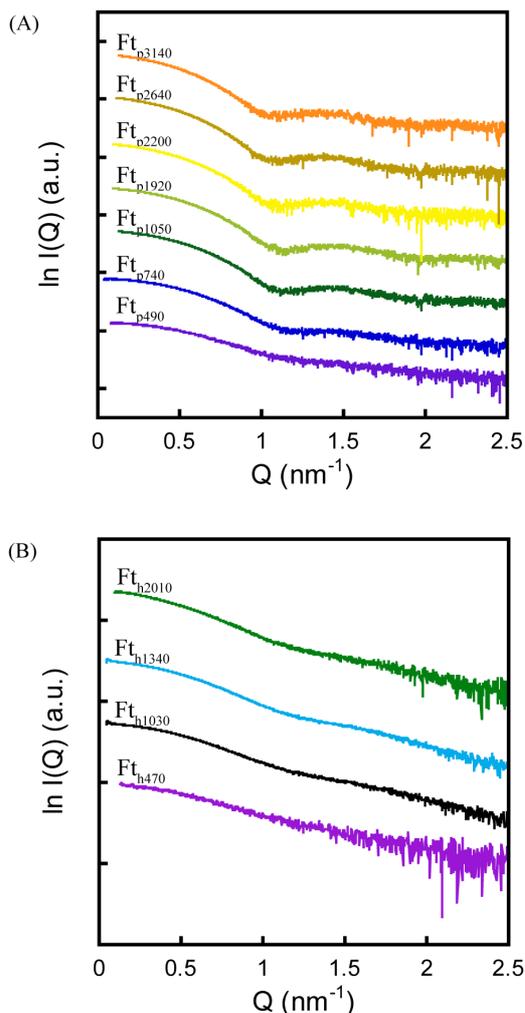


図2：コントラストマッチング条件下で得られた鉄コアに由来する散乱カーブ(A) 20mM リン酸緩衝液 (B) 25mM HEPES 緩衝液（下付きの数字は球殻あたりの鉄量）

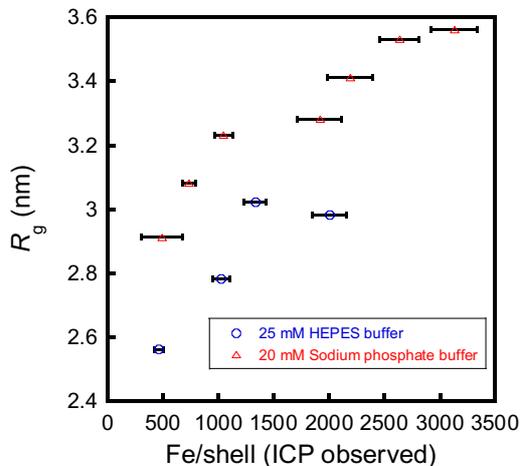


図3：鉄量に対する鉄コアの慣性半径の変化

鉄量の増加に伴い、得られた R_g は増加した。20 mM リン酸緩衝液中で作製された鉄コアについて、得られた R_g で最も高い値は 3.56 nm であった。EcFtnA の内径が約 8 nm であり、鉄コアの構造を半径 4 nm の均質な球として仮定した場合、計算される理論的な慣性半径は 3.1 nm となる。観測された R_g は理論的なものより大きな値を示す結果が得られた。この結果は、EcFtnA 内腔に形成される鉄コアが内腔に密に詰まった球状の構造ではなく、内部が空洞となった球殻状の構造を持つことを示唆している。一方で、25 mM HEPES 緩衝液中で作製された鉄コアの慣性半径は理論値よりも小さな値を示した。イオン誘導結合プラズマ発光分光測定によって測定された球殻 1 分子あたりの鉄量を調べた結果、3140 Fe/shell であり、観測された R_g の値から鉄コアの構造を球殻構造として仮定した場合、計算される鉄コアの内径は約 6 nm である。この仮定において、鉄コアの内部に存在する空間には 2200 個の鉄を収容可能である。この結果は、EcFtnA 内腔に最大で 5000 個の鉄を収容可能であることを支持する結果である。

4 まとめ

コントラスト変化法を用いた SAXS 測定によって、EcFtnA 内腔に形成される鉄コア構造を観察した。リン酸緩衝液中で再構成された鉄コアの構造は、内径 6 nm の球殻構造であることが示唆された。リン酸緩衝液と HEPES 緩衝液で再構成された鉄コアで、散乱曲線が異なることから、リン酸の存在によって鉄コア構造が変化したことが明らかとなった。

謝辞

本研究の SAXS 測定にご協力いただいた、ビームラインスタッフの皆様にご心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Koppenol, W. H.; Hider, R. H., *Free Radic Biol Med.*, 133 (2019), 3-10.
- [2] P.M. Harrison, P. Arosio, *Biochim. Biophys. Acta*, 1275 (1996) 161-203.
- [3] S. Mann, J.M. Williams, A. Treffry, P.M. Harrison, *J. Mol. Biol.*, 198 (1987) 405-416.
- [4] G.D. Watt, R.B. Frankel, D. Jacobs, H. Huang, G.C. Papaefthymiou, *Biochemistry*, 31 (1992) 5672-5679.

成果

発表論文：Takumi Kuwata, Daisuke Sato, Yuki Yanagida, Eriko Aoki, Kazuo Fujiwara, Hideyuki Yoshimura, Masamichi Ikeguchi. Morphological difference of Escherichia coli none-heme ferritin iron cores reconstituted in the presence and absence of inorganic phosphate. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 27, pp.583-594, 2022.

* ikeguchi@soka.ac.jp