

金属元素含有タンパク質に対する X 線異常散乱およびコントラストバリエーション法の応用

Application of Anomalous Small-angle X-ray Scattering and Contrast Variation methods to Iron Storage Protein Ferritin Molecule

猪子洋二^{1*}、遠藤秀之¹、片岡義嗣¹、渡邊康²
Yoji INOKO^{1*}, Hideyuki ENDOU¹, Yasushi WATANABE²

¹Graduated School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-8531, Japan

²National Food Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

*e-mail: Inoko@bpe.es.osaka-u.ac.jp

多成分系生体高分子の構造解析

生体高分子溶液の X 線小角散乱測定においてその情報量を増やすため、コントラストバリエーション法、異常分散法や重原子修飾法などが組み合わされることがある。リポ蛋白質やヌクレオソームなどの相互に異なった電子密度を持つ多成分系の複合体分子の場合には、コントラストバリエーション法は極めて有効に働く。また、成分として重金属元素を局在してあるいは周期的に含む場合は異常分散効果の利用が現実的となってくる。何れの方法も特定成分からなる領域あるいは構造の抽出が可能となる。

鉄貯蔵タンパク質・フェリチン

フェリチンは動植物からバクテリア

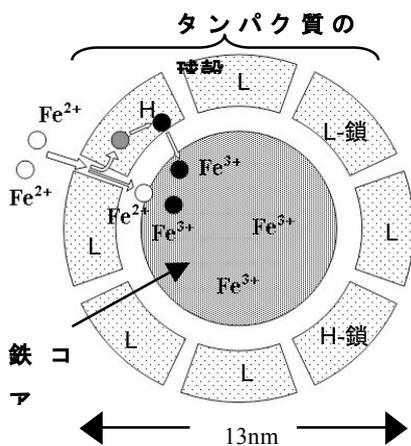


図 1. フェリチンの鉄イオン取り込みの概念図。2 種類のサブユニット (H-鎖と L-鎖) 24 個からなるヘテロポリマー。

まで広く普遍的に存在し、鉄元素の代謝に関わるタンパク質の一つで、鉄元素の貯蔵と無毒化に寄与している。構造は、24 個のサブユニットから成る球殻状をしており、外形は約 13nm、内径は約 8nm で分子量は約 470kDalton である。この球殻の内空に細胞内の反応性の高い Fe^{2+} イオンを取り込み不活性な Fe^{3+} イオンに酸化して最大 4500 個の鉄元素を貯蔵する能力を持つ。フェリチンのタンパク質部分においては様々な種のアポフェチンでその結晶構造が明らかにされているが、球殻内に蓄積されるオキシ水酸化鉄 ($FeOOH$) 凝集体 (いわゆる鉄コア) 部分の様態については不明のままである。このようにフェリチンが著しく電子密度の異なるタンパク質球殻と鉄コアからなる 2 成分系の超分子であるためコントラストバリエーション法と異常 X 線散乱法が効果的に応用できると期待される。以下では、フェリチンの鉄イオン取り込みに伴う鉄コアの生成と成長過程を見るため、種々の鉄含有量の再構成フェリチンに対してコントラストバリエーションおよび異常 X 線小角散乱実験で鉄コアの構造抽出を試みた。

コントラストバリエーション実験

X 線によるコントラストバリエーション実験では得られる構造情報として

分子の平均電子密度と内部の電子密度の不均一性（ゆらぎ）構造が挙げられる。

フェリチンの場合を考えると、アポフェリチンと様々な鉄含有量のフェリチンについて夫々の平均電子密度、 ρ_{apo} 、 ρ_{ftn} 、が得られ、溶媒の電子密度が ρ_{apo} に等しいマッチングポイントでは鉄コアの慣性半径 R_{core} が得られる。また、各コントラストでのアポフェリチンとフェリチンの慣性半径、 R_{apo} 、 R_{ftn} が求まる。これらの値から式 1 に基づいて鉄コアの平均電子密度、 ρ_{Fe} 、を直接に算出できる。

$$\rho_{Fe} = \alpha \rho_{apo} \rho_{ftn} / ((1-\alpha)\rho_{apo} - \rho_{ftn}) \quad (1)$$

$$[\alpha = (R_{apo}^2 - R_{ftn}^2) / (R_{ftn}^2 - R_{Fe}^2)]$$

含有鉄元素量に対するフェリチンと鉄コアの慣性半径 R_{ftn} 、 R_{Fe} の変化を図 2 に示す。 R_{Fe} は取り込んだ鉄量に比例して雪だるまのように径が大きくなる、いわゆる、‘crystal growth’ モデルの変

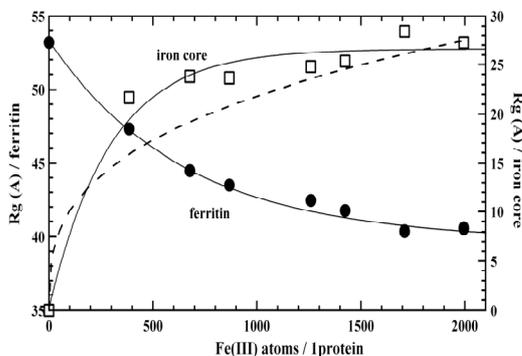


図 2. 鉄元素取り込みに伴うフェリチンと殻内鉄コアの慣性半径の変化。破線は ‘crystal growth’ モデルに従った場合の変化。

化とは異なる。 ρ_{Fe} も一定でなく、鉄量に依存して $0.8 \sim 1.4 e^{-3}$ の範囲で増加する結果となっている。

X線異常散乱実験

鉄元素の K-吸収端に近い波長の X 線を使ってフェリチンの散乱測定を行うと、鉄の原子散乱因子は通常の散乱因

子、 f_0 、と異常分散に起因する散乱因子、 $f_a'(\lambda)$ 、 $f_a''(\lambda)$ 、の和、 $f(\lambda) = f_0 + f_a'(\lambda) + i f_a''(\lambda)$ 、となり、このときの散乱強度は

$$I(S, \lambda) = I_0(S) + f'(\lambda) I_{0a}(S) + (f'(\lambda)^2 + f''(\lambda)^2) I_a(S) \quad (2)$$

で表される。ここで、第 1 項は吸収端遠方の波長での散乱強度、第 3 項は鉄原子の分布構造に由来する強度、第 2 項は f_0 と f_a' のクロスタームである。直接に鉄コアの構造のみを抽出する点では第三項を求めるのが望ましいが、第 1 項と比較してその寄与が小さいので実験的には難しい。第二項は寄与が比較的大きいので $I_{0a}(S)$ を求めることは可能である。鉄元素を約 1300 個含むネ

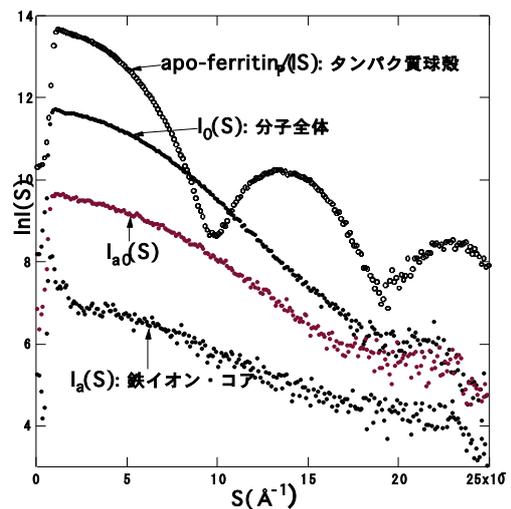


図 3. フェリチンの強度曲線のデコンポジションとアポフェリチンの強度曲線。

イティブフェリチンの分離された各強度曲線を図 3 に示す。また、鉄元素を 1300 個と 760 個取り込ませた再構成フェリチンの $I_{0a}(S)$ から鉄コアの R_{Fe} を算出すると、夫々に 23.0 Å と 25.7 Å でコントラストバリエーション実験の結果とほぼ一致している。

この結果は両手法が共に定量性を持って適用できたことを示すものと言えるが、これは多分にフェリチン特有の構造によるものとも言える。この点、異なった試料での実験が必要となろう。