

核共鳴散乱による鉄貯蔵蛋白質フェリチン内部の
鉄貯蔵プロセスの初期段階の研究

**Study of the First Stage in the Iron Storage Process in Ferritin
by Nuclear Resonant Scattering**

春木 理恵^a, 瀬戸 誠^b, 北尾 真司^b, 小林 康浩^b, 三井 隆也^c, 依田芳 卓^d, 富永 昌人^e,
前田 豊^f
Rie Haruki^a, Makoto Seto^b, Shinji Kitao^b, Yasuhiro Kobayashi^b, Takaya Mitsui^c, Yoshitaka Yoda^d,
Masato Tominaga^e and Yutaka Maeda^f

^a 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所, ^b 京都大学 原子炉実験所,
^c 日本原子力研究所, ^d 高輝度光科学研究センター, ^e 熊本大学 工学部, ^f 関西外国語大学
^aInstitute of Materials Structure Science, KEK, ^bResearch Reactor Institute, Kyoto University,
^cJAERI,
^dJASRI, ^eFaculty of Engineering, Kumamoto University, ^fKansai Gaidai University

鉄貯蔵蛋白質フェリチンの核共鳴非弾性散乱を大型放射光施設 SPring-8 の BL11XU 実験ステーションで測定した。サンプルには、フェリチン内部の鉄原子の数を平均で約 30 個のものを用意した。

The measurements of nuclear resonant inelastic scattering from an iron-storage protein, ferritin, were performed at BL11XU in SPring-8. We prepared the ferritin with 30 iron atoms in each molecule.

背景と研究目的

鉄貯蔵蛋白質フェリチンは、脊椎動物、無脊椎動物、植物、菌類など生物に広く分布しており、生体中の鉄の代謝に深く関わっている金属含有蛋白質である。非ヘム蛋白質で、24 個のサブユニットから成る直径 12nm の蛋白質で、内径約 6nm の空洞の中に、溶液中から 2 価の鉄イオンを取り込み、大抵は 3 価に酸化して、1 分子辺り最高 4500 個程度まで貯蔵することができる。この性質を利用して、タンパク構造の制御を施し、サイズや

組成を変えることで、異なる大きさの鉄の微粒子を作成したり、鉄だけでなく他の元素も取り込むことができることも報告されている。鉄の微粒子を半導体素子へ応用する研究も活発に行われていて、バイオテクノロジーを駆使したナノサイズ of 材料開発技術としても期待されている。そのため、フェリチンにおける鉄の貯蔵プロセスを解明することは、生体内での鉄の調整機構を解明するだけでなく、今後の半導体の超高密度化の技術における基礎知識としても意義があると考えられる。これま

でフェリチン内部の鉄クラスターの形状や、分子の組成などが調べられており、鉄がリン酸や水酸基と結合し、核を形成して成長していく様子などが報告されている¹⁾。

フェリチンにおける鉄の蓄積過程はこれまでいろいろと研究が重ねられてきたが、未解明部分が多い。フェリチンは異なる生物ではアミノ酸配列が異なっており、これらの違いが内部の鉄のコアの組成や結晶性を変える場合もある。馬脾臓由来のフェリチンのサブユニットには、H と L の二種類があり、H のサブユニットには鉄を酸化させる部分があることも知られているが、実際にコアを構築する初期過程については、蛋白質のどの部分で始まるのか、蛋白質に保持されているのかもまだ分かっていない。

メスバウアー分光法を用いたコア生成の初期段階の鉄の研究も報告されている²⁾。これは鉄の価数やダイマーかコアかなどを知ることには出来るが、結合状態やダイナミクスについては知ることが出来ない。ここで用いる放射光を用いた核共鳴準弾性・非弾性散乱は、フェリチンのように複数の元素が混在する中から、微量に含まれる元素を特定して、動的な情報を得ることができるという特色がある。

ここではフェリチン内部におけるナノ粒子生成過程の初期段階について明らかにするために、鉄の吸蔵量を少数に制御した試料を用いて、鉄クラスター生成における他分子との結合状態、振動モード、フェリチン内部での拡散運動を知る手立てとして核共鳴散乱を測定した。

実験

フェリチンは馬脾臓由来のものをシグマ

社から購入した。還元剤（ダイチオナイト）およびキレート剤（EDTA）の添加によって、フェリチンコア内の鉄イオン（ Fe^{3+} ）を Fe^{2+} に還元しキレート化することで、コア内の鉄イオンの量を減少させ、フェリチン 1 分子当たり鉄原子が 1 個にした^{3,4)}。その後、 ^{57}Fe を 95%に富化した鉄を用いて、フェリチン内部に導入を行なった。フェリチンから溶出した Fe-EDTA および過剰の EDTA を、透析法により除去することでフェリチンを精製した。精製したフェリチンの濃度は、BCA タンパク質測定キットを用いて決定した⁵⁾。フェリチン分子に含まれる鉄イオンの量は、原子吸光法を用いて算出した。

核共鳴非弾性散乱測定は BL11XU 実験ステーションで行った。蓄積リングは 11 トレイン×29 バンチモードで運転された。 ^{57}Fe の核の第一励起準位の半減期は 98.3 ns なので、この崩壊シグナルを測定するために適したバンチ間隔が選ばれている。X線は Si(111) で単色化されたあと、Si(975)と Si(511)を組み合わせた高分解能モノクロメータで、 ^{57}Fe の第一励起準位の 14.41keV の周辺を 1.7meV の分散を持った幅まで単色化して、サンプルに照射される。サンプルからのシグナルは、受光領域 $3\times 5\text{mm}^2$ 素子が 2×4 個並んだアバランシェ型フォトダイオード(APD)検出器を用いて測定した。測定は 277K で行なった。

結果および考察

今回の実験に当たり、フェリチン 1 分子当たりの鉄原子を約 28 個にしたサンプルを用意した。図 1 に核共鳴非弾性散乱の実験結果を表わす。サンプル A が今回測定を行なったもので、サンプル B は前回の実験で得られた

フェリチン 1 分子当たり約 2600 個の鉄原子を含むものから得られたデータである。どちらも中心のピークの幅は元の装置関数のエネルギー幅と変わらないことから、この幅が顕著に変わるような拡散運動のないある程度固定された成分があることが分かる。が、これらの結果の間には大きな違いが見られる。サンプル B のスペクトルには、拡散運動を表わす準弾性散乱成分はほとんど見られないと考えられるが、サンプル A のスペクトルは低エネルギーから高エネルギーに向かって緩やかな傾きが見られることから、準弾性散乱成分が含まれていると推測される。これはサンプル B 中の鉄原子の大部分は、互いに結合してクラスターを作っており、溶液中のイオンのような相対的に自由には運動が出来る状態がないのに対して、サンプル A の内部では、自由な拡散運動といった動きが出来ている可能性が否定できないといえる。フォノン状態密度についてのさらなる解析を現在進めている。

今後の課題

フェリチンの鉄のコアの生成過程の初期の段階について知るために、フェリチン 1 分子当たりの鉄原子数を 30 個程度にしたものを用いた。これは前回に測定した鉄原子 2600 個程度のフェリチンからのデータと大きな違いが見られており、コア生成の重要な一面を示していると考えられる。今後は、鉄のコア生成における鉄原子と蛋白質との相互作用についてさらに詳しく調べるために、鉄原子数を厳密に調整したサンプルや、他のシンプルな物質をモデルとして用いて、研究を進める計画である。

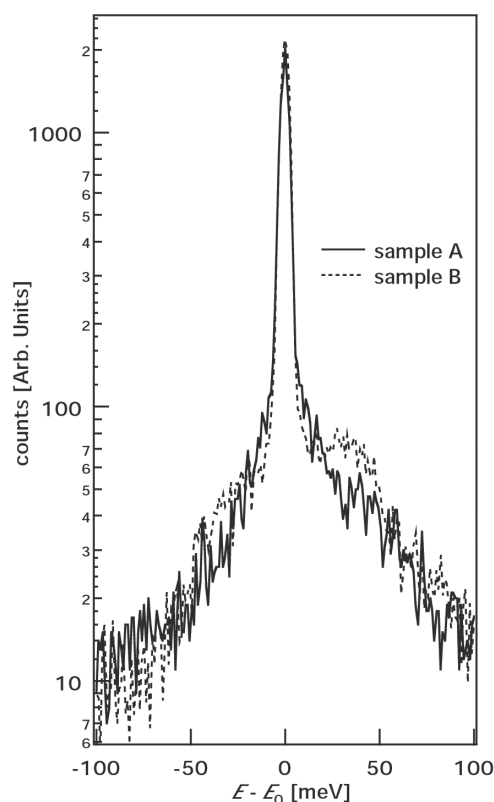


Fig. 1. The solid line shows the nuclear resonant scattering data from sample A and the broken line shows those from sample B. Both data are taken at a temperature of 277 K.

参考文献

- 1) N. D. Chasteen and P. M. Harrison, *J. Struct. Biol.* **126**(1999) 182.
- 2) G. N. L. Jameson, W. Jin, C. Krebs, A. S. Perrera, P. Tavares, X. Liu, E. C. Theil and B. H. Huynh, *Biochemistry* **41** (2002) 13435.
- 3) T. G. St. Pierre, P. Chan, K. R. Bauchspies, J. Webb, S. Betteridge, S. Walton and D. P. E. Dickson, *Coord. Chem. Rev.* **151** (1996) 125.
- 4) H. Heqing, R. K. Watt, R. B. Frankel and G. D. Watt, *Biochemistry* **32** (1993) 1681.
- 5) P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **150** (1985) 76.

キーワード

- ・核共鳴散乱

核種に固有の励起エネルギーに単色化した X 線を照射し、特定の元素のダイナミカルな情報を得る手法。

今研究においては、 ^{57}Fe の 14.41keV の第一励起準位が用いられた。