

核共鳴散乱を用いた鉄貯蔵蛋白質フェリチンにおける 鉄の貯蔵プロセスの研究

Study of 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 1000 個と約 2600 個のものを
用意した。実験スペクトルにはフェリチン内部の鉄のクラスターのフォノン状態密度が観測された。

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 2600 and 1000 iron atoms in each molecule.
Phonon density of states of the iron cluster in ferritin molecules were observed in the spectra.

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。ヘム蛋白質などの他の鉄を含む蛋白質と異なり、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、溶液中から鉄原子を取り込み、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。これまでは、他の鉄を含む蛋白質に鉄を供給する蛋白質の生理的な役割としての

興味から研究されてきたが、最近では、溶液中のイオンを蛋白質の内部に取り込んで均一な固まりにさせることが出来る特異性に着目して、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、鉄の微粒子を半導体素子へ応用する研究が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る。

これまでにフェリチン内部の鉄クラスターの形や、分子の組成などが調べられてきており、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⁾。またメスbauer分光法から、270K 付近より高い温度で鉄原子が拡散運動していることも指摘されている²⁾。しかしこれまでの分光法ではタンパク質に囲まれた鉄を特定したダイナミクスを見ることは不可能であった。ここで、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。

内包空間を持つアポフェリチンを、ナノ粒子の反応場として用いることで、単分散で直径が同一のナノ金属化合物粒子の生成を行うことが出来る。このようなフェリチン内部におけるナノ粒子生成過程について明らかにするために、鉄の吸蔵量を制御した試料を用いて、鉄クラスターの他分子との結合状態、振動モード、フェリチン内部における拡散状態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た^{3,4)}。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。⁵⁷Fe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。図1に実験配置を示す。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、鉄の第一励起準位の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3×5mm²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。

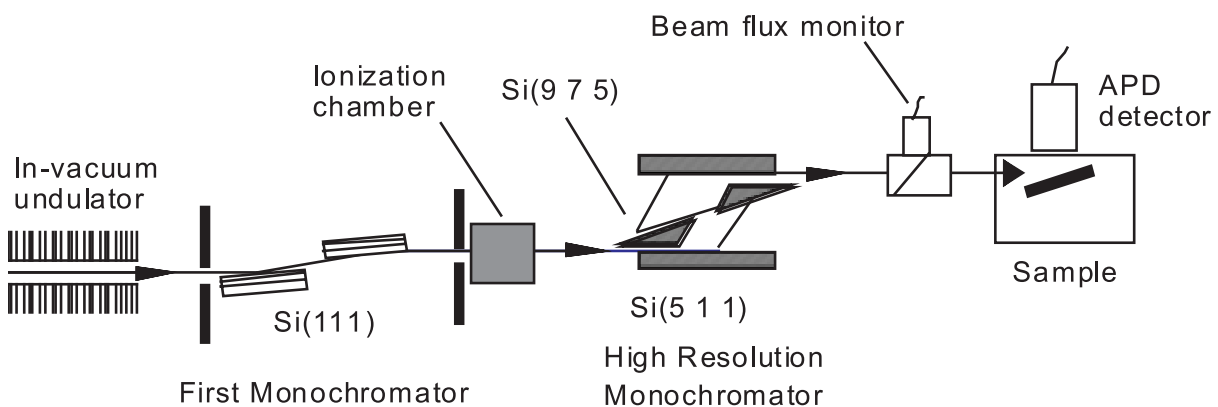


Fig. 1. Experimental setup of nuclear resonant inelastic scattering.

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の個数を変えたサンプルを 2 種類用意した。サンプル A にはフェリチン 1 分子当たり平均 2630 個の鉄原子が、サンプル B には平均 980 個の鉄原子が入っている。図 2 に核共鳴非弾性散乱の実験結果を表わす。サンプル A、B の結果の間には 10-30meV にわずかな違いが見られるものの、大きなスペクトルの差は見られなかった。これは、1000 個と 2600 個の鉄原子数の違いによるフォノンの状態密度分布の目立った違いはあまり見られないということになる。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ため、これらのサンプル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にないことが分かる。フォノン状態密度についてのさらなる

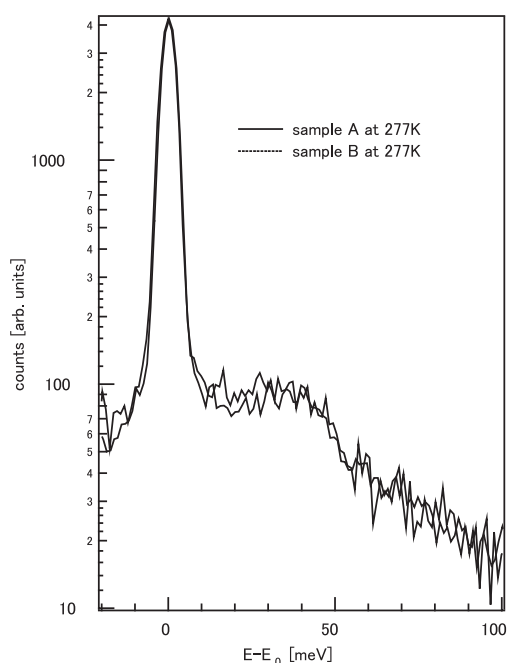


Fig. 2. The solid line shows the nuclear resonant scattering data from sample A and the broken line shows those from sample B. Both data are taken at a temperature of 277 K.

解析を現在進めている。

今後の課題

鉄の吸蔵量の異なるフェリチンの鉄の結合状態の違いを知るために、フェリチン 1 分子当たりの鉄原子数を 1000 個程度で比較したが、特に大きな違いは見られなかった。今後は、鉄貯蔵におけるより初期的な段階を調べるために、鉄原子数をもっと減らしたサンプルを用いて、蛋白質と鉄原子の間の相互作用について研究を進める計画である。

参考文献

- 1) N. D. Chasteen and P. M. Harrison, *J. Struct. Biol.* **126** (1999) 182.
- 2) S. G. Cohen, E. R. Bauminger, I. Nowik and S. Ofer, *Phys. Rev. Lett.* **46** (1981) 1244.
- 3) T. G. St. Pierre, P. Chan, K. R. Bauchspiess, 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。