

時間分解 X 線小角散乱による  
フェリチン・アセンブリメカニズムの研究

2016 年 3 月

佐藤 大輔

## 目次

## 凡例

1	序論.....	5
1.1	タンパク質の4次構造.....	5
1.2	タンパク質のアセンブリ研究.....	8
1.3	フェリチン.....	10
1.4	フェリチンのアセンブリメカニズム.....	14
2	Ftnのアセンブリメカニズム.....	21
2.1	序.....	21
2.2	方法.....	22
2.2.1	Ftnの発現、精製.....	22
2.2.2	Ftnの解離と再集合.....	24
2.2.3	SAXS.....	24
2.2.4	全構造の探索.....	27
2.3	結果.....	31
2.3.1	会合体.....	31
2.3.2	X線損傷の評価.....	31
2.3.3	Ftnアセンブリ反応の追跡.....	32
2.3.4	初期反応次数.....	33
2.3.5	シンプルモデル.....	33
2.3.6	全構造モデル.....	36
2.4	考察.....	61
2.5	結論.....	67
3	Ftnアセンブリにおける正味電荷の重要性.....	68
3.1	序.....	68
3.2	方法.....	69
3.2.1	正味電荷変異体の発現、精製.....	69
3.2.2	SAXS.....	70
3.2.3	高イオン強度条件下での $I(0)$ 補正.....	70
3.2.4	CDスペクトル.....	71
3.2.5	SEC.....	71
3.3	結果.....	73

3.3.1	WT アセンブリの pH、イオン強度依存性.....	73
3.3.2	pH、イオン強度依存性の原因 .....	73
3.3.3	正味電荷変異体の解離、再集合 .....	73
3.3.4	Ftn アセンブリにおける正味電荷の重要性 .....	74
3.4	考察.....	85
3.5	結論.....	90
4	総論.....	91
4.1	球殻状超分子のアセンブリメカニズム.....	91
4.2	アセンブリにおける静電相互作用 .....	94
4.3	球殻状超分子のデザイン .....	96
5	付録.....	100
5.1	反応速度式 (全構造モデル) .....	100
6	参考文献.....	105
7	謝辞.....	113

## 凡例

本論文中に以下の略語を用いた。

ANS: 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid

CCD: charge-coupled device

CCMV: cowpea chlorotic mottle virus

CD: circular dichroism

CP: capsid protein

Dps: DNA-binding protein from starved cells

DMMA: 2,3-dimethylmaleic anhydride

DTE: dithioerythritol

DTT: dithiothreitol

*E.coli*: *Escherichia coli*

EDTA/2Na: disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate

ESI-MS: electrospray ionization mass spectrometry

ESRF: European Synchrotron Research Facility

FTH: human H ferritin

FTL: human L ferritin

Ftn: *E.coli* non-heme ferritin

Gdn-HCl: guanidine hydrochloride

HBV: hepatitis B virus

HIV-1: human immunodeficiency virus type 1

HPV: human papillomavirus

HSF: horse spleen ferritin

$I(0)$ : forward scattering intensity

KEK: 高エネルギー加速器研究機構

LC-MS: liquid chromatography mass spectrometry

MS: mass spectrometry

OLIGAMI: oligomer architecture and molecular interface

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PDB: protein data bank

$R_g$ : radius of gyration

RRV: ross river virus

SAXS: small-angle X-ray scattering

SCOP: structural classification of proteins

SDS: sodium dodecyl sulfate

SEC: size exclusion chromatography

S/N: signal – noise ratio

SP: scaffold protein

TR-SAXS: time-resolved SAXS

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

# 1 序論

## 1.1 タンパク質の4次構造

タンパク質は 20 種類のアミノ酸が数珠状に結合してできたポリペプチド鎖である。アミノ酸配列の並び方をタンパク質の 1 次構造という。タンパク質の 2 次構造は、ポリペプチド鎖の主鎖間が規則的に水素結合することで形成される。2 次構造の例としては、螺旋構造を持つ $\alpha$ ヘリックス、シート構造を持つ $\beta$ 構造などがある。 $\alpha$ ヘリックスは、 $i$  番目のアミノ酸残基のカルボニル酸素と  $i + 4$  番目のアミノ酸残基のアミド水素が水素結合を形成し、その水素結合が最低 4 つ連続することで形成される。 $\beta$ シート構造は、隣接するストランド間のカルボニル酸素とアミド水素が水素結合を形成することで形成される。2 次構造によって好まれるアミノ酸は異なり、特に $\alpha$ ヘリックスでは位置にも依存することが分かっている。また、 $\alpha$ ヘリックスはペプチド結合の双極子モーメントがヘリックスを軸にして一直線に並ぶため、大きな双極子モーメントを持つ。ポリペプチド鎖はさらに、空間的に折りたたまれて 3 次構造を形成する。3 次構造形成に関わる相互作用は、様々であり、共有結合であるジスルフィド結合、イオン間相互作用である塩橋、電荷 - 双極子間相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合、疎水性相互作用などがある。ポリペプチド鎖が 2 次構造、3 次構造を形成することをフォールディングという。タンパク質が固有の機能を発揮するためには、天然構造へフォールディングする必要がある。

フォールディングに関しては、2 つ重要な経験則が知られている。タンパク質の 3 次構造は 1 次構造によって決定されている、フォールディング反応は最小の自由エネルギー構造を探索する過程であるといった 2 つの事柄である。この反応が迅速に起こることは、大腸菌が 20 分という非常に短い倍加時間を持つことから明らかである (Watson et al., 1986)。しかしながら、100 残基のポリペプチド鎖が取りうる全てのコンフォメーションから、最小のエネルギー構造を見つけ出すために最低でも  $10^{30}$  年かかると計算されている。これにより、フォールディング反応には特定のパスウェイが存在しているのではないかと考えられた。これは、フォールディング反応が特定のパスウェイを通っていくことで、構造探索数を劇的に減少させているという考えであった。当初、パスウェイは変性状態 $\rightarrow$ 天然状態、変性状態 $\rightarrow$ 中間体 $\rightarrow$ 天然状態など非常にシンプルなモデルが考えられていた。現在では、パスウェイではなく、非常に複雑なエネルギー面を様々な方向から最小エネルギーを持った天然構造に滑り落ちていくとい

うファネルモデルが考えられている (Pain, 2000; Nolting, 2006)。タンパク質を *in vitro* で変性させてから、リフォールディングさせると天然構造を形成せずに凝集体を形成してしまう場合がある。これらの凝集体の多くはシャペロンを加えることで抑制できることが知られている (Niwa et al., 2009 and 2012)。これは、タンパク質の 3 次構造が 1 次構造によって決められているという考えに反する現象だと思われるかもしれない。しかしながら、凝集体形成は、もはや 1 本のポリペプチド鎖のエネルギー面ではなく、多分子反応のエネルギー面で考える必要がある。凝集体は多分子反応において、安定構造であり、シャペロンがポリペプチド鎖に結合することでエネルギー面を多分子反応から単分子反応に戻したと考えれば、経験則に矛盾しない。実際に、シャペロニン は、未成熟なポリペプチド鎖を外界から隔離することで、フォールディングを助けていると考えられている。

大きいタンパク質は長鎖のポリペプチド鎖から形成されるよりも、複数のポリペプチド鎖が集合して形成されることの方が多い。これは生合成におけるエラーの軽減や、経路外の凝集を防ぐためといわれている。OLIGAMI データベースは、タンパク質の立体構造データベース PDB とタンパク質の構造を階層的に分類した SCOP の情報を統合した、タンパク質の 4 次構造データベースである (Fujiwara and Ikeguchi, 2008)。2016/2/11 時点で、OLIGAMI データベースには、96748 のオリゴマー情報を含んだ、タンパク質のエントリーが登録されている。そのうち、50 %以上の 51898 エントリーが 2 量体以上のオリゴマーである。構造が解析されたデータに基づいてはいるが、生体にはオリゴマーが多く存在していることを示唆している。複数のポリペプチド鎖が集合してオリゴマーを形成するとき、ポリペプチド鎖の空間的配置をタンパク質の 4 次構造といい、タンパク質が 4 次構造を形成することをアセンブリという。タンパク質が 4 次構造を形成しているとき、1 本のポリペプチド鎖のことをサブユニットと呼ぶ。オリゴマータンパク質が特異的な機能を発現するためには、個々のサブユニットがフォールディングすることに加えて、サブユニットが正確にアセンブリする必要がある。オリゴマーは大きくわけて 2 種類あり、同一のサブユニットから形成されるホモオリゴマーと異種のサブユニットから形成されるヘテロオリゴマーである。ホモオリゴマーのサブユニットは同一の電荷を持っているため、サブユニットの正味電荷間には反発力が働いている。そのため、ホモオリゴマーのアセンブリの際には電荷の反発が障壁になると考えられる。OLIGAMI に登録されているオリゴマーは 6 量体以下の単純な

エントリーが大部分を占めているが、中には 10 量体以上の複雑な構造を形成するものもある。特に球殻状構造を形成するタンパク質は、その構造上、非常に多くのサブユニットから形成されている。生体内には、球殻状超分子が数多く存在しており、例としてフェリチン (Stillman et al., 2001)、エンキャプスリン (Sutter et al., 2008)、カルボキシソーム (Cannon et al., 2001; Tanaka et al., 2008)などがある。これらは生体内を区画化する働きを持っている。生体内において区画化を行うことは、非常に重要である。真核生物は細胞内をミトコンドリア、ペルオキシソームなどの細胞内小器官によって区画化している。これらの区画化は、酵素の局所的な高濃度化、連続する反応の促進、目的物質以外の締め出し、毒性物質の閉じ込めなどを行っている。しかしながら、原核生物は細胞内小器官を持っておらず、区画化の手段が乏しい。そこで原核生物はタンパク質による区画化を行っている。フェリチンは 24 量体の球殻状タンパク質である。生体に必須ではあるが、毒性を示す鉄をミネラル化することで球殻内に貯蔵する。エンキャプスリンは、細菌や古細菌が持つ 3 次構造、4 次構造ともにウイルスに似ている球殻状タンパク質である。エンキャプスリンはフェリチン様タンパク質や色素脱色型ペルオキシダーゼなどのタンパク質を球殻内に保持し、酸化ストレスに対応しているといわれている。カルボキシソームは、シアノバクテリアに含まれている 80 - 140 nm の構造体である。ルビスコ、炭酸脱水酵素を含み、光合成のための炭酸固定に関わっている。ルビスコの基質は二酸化炭素であるが、細胞内でガスを高濃度に保持することはできない。そこで、細胞内で高濃度に濃縮された重炭酸イオンをカルボキシソームの炭酸脱水酵素が二酸化炭素に変換し、近傍にいるルビスコに供給することによって、炭酸固定を行っている。このようなタンパク質による区画化は、原核生物のみならず真核生物でも見られる。そのため、これらの球殻状超分子は、全生物にとって非常に重要な役割を果たしている。生体内では絶えず様々な種類のタンパク質が合成されているため、ポリペプチド鎖間には望まれる相互作用と望まれない相互作用が競合しているはずである。それにも関わらず、球殻状超分子のような複雑な構造を正確に形成できる。それゆえ、これらのアセンブリメカニズムを研究することは、それ自体が物理化学的に興味のある対象であることに加え、動的で秩序だった生体システムを明らかにするために重要である。

## 1.2 タンパク質のアセンブリ研究

サブユニット間の相互作用は、タンパク質の4次構造における安定性に重要である。これらの相互作用は、タンパク質によって多様であるが、大きく分けて塩橋や双極子 - 双極子相互作用を含む静電相互作用と疎水性相互作用の2種類がある。前者は、安定性もさることながら、長距離まで相互作用が届くために、サブユニット間の接近や接触面の特異性に関わるとされている。後者は、水分子が疎水性物質と水素結合を形成できないために、その接触を最小限にするように、疎水性物質が集まり生じる効果である。それゆえ、疎水性相互作用は引力として働かず、特異性もないため、主にサブユニット間の安定性に寄与していると理解されている (Pain, 2000; Nolting, 2006)。これらの相互作用がアセンブリにとって重要であることは、塩橋、疎水性相互作用に関与しているアミノ酸残基を Ala に置換した場合、オリゴマーが解離することからも明らかである (Zhang et al., 2010 and 2011)。ただし、変異を導入した接触面ではない、別の接触面で解離が起こるなど、その安定性メカニズムは単純ではない (Khare et al., 2013; Zhang et al., 2015)。また、ホモダイマーの相互作用を破壊し、解離させたサブユニットに新たな相互作用を組み込むことでヘテロダイマーを形成した研究も存在している (Sakurai and Goto, 2002)。

サブユニット間の相互作用は、変異の導入だけでなく、pH、イオン強度などの外的要因によっても変更することができる。フェリチンは、酸性 pH で2量体に解離し、pHを上昇させることで24量体を再構成する (Crichton and Bryce, 1973; Ohtomo et al., 2015, 砂戸 2011)。いくつかのウイルスは、解離した CP を適切な温度、pH、イオン強度の緩衝液に置換することで、天然由来の構造と区別ができない、空のウイルス・キャプシドを形成することが可能である (Pfeiffer and Hirth, 1974; Fuller and King, 1982; Prevelige et al., 1988; Kenney et al., 1995, Chen et al., 2000)。CCMV は180量体のキャプシドを形成している。このキャプシドは高塩濃度、中性 pH で2量体へと解離し、この2量体は適切な pH、イオン強度条件下でキャプシドを再構成することが可能である (Vega-Acosta et al., 2014)。しかしながら、条件によっては、奇形オリゴマーを形成することが知られている。この奇形構造は、キャプシドのまわりを2つ以上の殻が覆った多層構造、2つのキャプシドが融合したようなダンベル型の構造、もはや球殻状ではなく、繊維状のチューブ構造など、様々である (Lavelle et al., 2009; Prinsen et al., 2010; Garmann et al., 2014)。適切な環境下における、自発的なサブユニットのアセンブリは、

タンパク質の4次構造がサブユニットの3次構造により、決定されていることを示唆している。前述したが、タンパク質の3次構造は、アミノ酸配列によって決まっていると考えられている。つまり、タンパク質の4次構造の決定には、間接的にサブユニットのアミノ酸配列が関与している。

タンパク質のアセンブリ研究における最終目的とは、アミノ酸配列を見ただけで4次構造が分かるようになること、望んだ通りの4次構造を持つ、機能的なタンパク質を形成するためのアミノ酸配列をデザインできるようになることである。タンパク質のアセンブリを自在に操作できるようになれば、人工的な機能を持たせた系を細胞内に導入することが可能になると考えられる。Bakerのグループは、3量体のタンパク質をビルディング・ブロックとして、3量体間に新たな相互作用を導入することで新規24量体タンパク質のデザインを行い、作製することに成功した (King et al., 2012)。これは驚くべき成功であったが、デザインの成功率は100%ではなく、数十種の変異体を作製し、その中で数種類が24量体へアセンブリしたというものである。そのため、アセンブリ研究における最終目的は、未だに達成されていない。アセンブリメカニズムを完全に明らかにするためには、平衡論的な実験だけでなく、速度論的な実験が必要になる。速度論的な実験、つまりアセンブリ反応を追跡するためには、解離したタンパク質をアセンブリさせる実験系が必要となる。前述した通りに、これはpH、イオン強度、変性剤濃度、温度を調整することで行われる。また、稀ではあるがタンパク質を希釈するだけで、解離させることが可能な例も存在する (Zondlo et al., 1995)。タンパク質のアセンブリは、3量体以下の単純なオリゴマーにおいて広く研究されている。これらの結合速度定数は、 $10^3$  から  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  程度の範囲になっている (Pain, 2000)。タンパク質のアセンブリの第1の駆動力は、モノマー同士のランダムな衝突、つまりブラウン運動に起因すると考えられている。2分子反応における速度定数は、約  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  が上限だとされている。ただし、オリゴマーを形成するためには特異的な接触面で結合する必要があるため、この値よりも小さい速度定数になると考えられる。これは、3量体以下のタンパク質のアセンブリで観測された速度定数と矛盾しない。タンパク質のアセンブリにおける駆動力がランダムな衝突であることを考えれば、一度にいくつものサブユニットが適切な接触面を持って会合する、高次反応は起こりにくいはずである。それゆえ、タンパク質のアセンブリは低い次数の結合反応が連続して達成されると考えられる。多くのサブユニットから形成されている超分子構造体のアセンブリ

研究は、主にウイルスで行われている。ウイルスでは、低オリゴマーでは見られない高次反応からアセンブリがスタートすることが知られている。例えば、HBV は CP の 3 量体が形成され、それを核として他の CP が次々に結合していくモデルが提唱されている (Zlotnick et al., 1999)。これは、高次反応である核形成段階と、連続する低次反応で構成される伸長段階の 2 つの段階で、アセンブリが進行していることを意味している。このようなメカニズムの場合、アセンブリの初期にラグ・フェイズが観測される。アセンブリの理論的な研究から、多くのサブユニットから形成される構造体は、核形成を導入したほうが、速度論的なトラップが形成されにくいことが分かっている (Zlotnick et al., 1999)。つまり、アセンブリ初期の核形成は大きい構造体で見られるものだと考えられる。もし、アセンブリのメカニズムがサブユニット数で決まるのであれば、いったい何量体から核形成になるのか、という疑問が生じる。そこで私は、ウイルスほどは大きくない 24 量体フェリチンのアセンブリメカニズムについて研究することにした。

### 1.3 フェリチン

鉄は、酸素の運搬、貯蔵を行うヘモグロビン、ミオグロビン、エネルギー産生に関わるシトクローム、活性酸素を分解するスーパーオキシドジムスターゼなどに含まれているため、生体にとって必須元素である (Lasocki 2014)。鉄は通常、二価と三価のイオン状態をとる。二価鉄は可溶性であるが、三価鉄は不溶性であるため、生体へは二価鉄の状態で取り込まれる。しかしながら、二価鉄はフェントン反応を介して、生体高分子を攻撃するヒドロキシラジカルを発生させる ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ )。フェリチンは原核生物、古細菌、植物、高等真核生物など、ほとんどの生物が所有する鉄貯蔵タンパク質である (Arosio et al., 2009)。このタンパク質は、4/3/2 回転対称を持った球殻状構造を構成している (図 1-1)。可溶性二価鉄を無害な三価鉄に変換し、それを球殻の内側に貯蔵することで、フェントン反応を介したヒドロキシラジカルの発生を防いでいる。球殻の体積を考えると約 4000 個の鉄原子を貯蔵できると考えられている。フェリチンのサブユニットは 4 ヘリックスバンドルを形成している A から D のヘリックス、B ヘリックスと C ヘリックスの間にある長いループ、C 末端に存在する E ヘリックスから構成されている (図 1-2)。E ヘリックスは 4 回転対称軸上

で、分子間ヘリックスバンドルを形成している (図 1-3)。フェリチンの熱安定性は非常に高く、生物種間で差はあるが、70 °C 程度の熱処理に耐えることができる。

原核生物のフェリチンはホモオリゴマーであり、大きくわけて 3 種類フェリチンをコードしている。ノンヘムフェリチン、バクテリオフェリチン、Dps の 3 種類である。ノンヘムフェリチンはサブユニットの内側に、鉄を二価から三価へ酸化するためのフェロキシダーゼ活性サイトを持っている (Stillman et al., 2001)。バクテリオフェリチンは、2 量体接触面にヘム鉄とサブユニットの内側にフェロキシダーゼ活性サイトを持っていて、2 量体と 24 量体の平衡状態にある (Dautant et al., 1998)。Dps の 3 次構造は 24 量体フェリチンと高い類似性を持っている。しかしながら、Dps と 24 量体フェリチンとはアセンブリの様式が異なり、Dps は 3/3/2 回転対称を持った 12 量体の球殻状タンパク質へアセンブリされる (Grant et al., 1998)。Dps は 24 量体フェリチンとフェロキシダーゼ活性サイトの位置が異なり、2 量体接触面に存在している。また、Dps はフェロキシダーゼ活性だけではなく、DNA 結合能を有しており、酸化ストレスから直接 DNA を守る機能を持っている。哺乳類のフェリチンは構造的に相同な H (heavy)サブユニットと L (light)サブユニットから構成されている。H サブユニットは、原核生物のフェリチンと似ていて、内側にフェロキシダーゼ活性サイトを持っているが、L サブユニットは活性を持たず、構造の安定性や鉄取り込みの促進を担っていると言われている。H サブユニットと L サブユニットの比は一定ではなく、組織によって混合比が異なる (Stefanini et al., 1982)。心臓や脳では、強い耐酸化活性が必要とされ、急速に鉄をフェリチン内に取り込まなければならないため、H サブユニットが豊富に含まれる。一方、脾臓や肝臓では、大量の鉄を安定して貯蔵することが望まれるため、L サブユニットの方が豊富である。H サブユニットと L サブユニットは単独でも 24 量体を構成することが可能である (Wang et al., 2006)。両生類は H、L サブユニットに加えて、M (middle)サブユニットを持っている (Dickey et al., 1987; Ha et al., 1999)。M サブユニットは H サブユニットと同様、フェロキシダーゼ活性サイトを持っている。M サブユニットは肝臓に、H サブユニットは赤血球により含まれている。昆虫である *Trichoplusia ni* のフェリチンは哺乳類と同じく、H と L サブユニットで構成されているが、必ず H と L サブユニットで 2 回転対称の 2 量体を形成し、混合比は 1:1 と決まっている。そのため、2016/2/12 現在、24 量体フェリチンで唯一、ヘテロ 24 量体として結晶構造解析が行われている (Hamburger et al., 2005)。植物のフェリチンは原核生物のようにホモオ

リゴマーである (Masuda et al., 2010)。構造は良く保存されているが、特徴的な N 末端の伸長がみられる。この伸長領域は球殻のまわりを覆い、ただでさえ高いフェリチンの安定性をさらに向上させているといわれている。

神経フェリチン症は、ヒトの中樞神経全体に鉄とフェリチンの蓄積が起これ、神経系の機能障害を引き起こす疾患である。FTL の異常が原因であり、これまでにいくつかの病原遺伝子変異が報告されている (Curtis et al., 2001; Vidal et al., 2004; Maciei et al., 2005; Mancuso et al., 2005; Ohta et al., 2008)。これらの変異は、Ala96 が Thr に置換された点突然変異 (A96T) 以外、全て D ヘリックスから E ヘリックスにかけて、一つ、もしくは複数の塩基が挿入され、C 末端が伸長するフレームシフト変異である。498–499 間にチミンとシトシンが挿入された L167fs は、C 末端の伸長により、E ヘリックスがフレキシブルになることが示されている (Luscieti et al., 2010)。この柔軟の領域に鉄が結合し、フェリチン同士が架橋されることで、神経組織に沈着するモデルが考えられている (Baraibar et al., 2010)。C 末端が伸長するタイプの変異に関しては、L167fs と同様のメカニズムで病気を引き起こしている可能性がある。しかしながら、A96T に関しては、フレームシフト変異ではなく、変異箇所も C ヘリックス上にあり、別のメカニズムで病気を引き起こしていると考えられる。本研究室の近藤薫は、A96T を大腸菌内で発現させた (近藤, 2015)。近藤薫は、精製している過程で A96T の 24 量体形成に異常があることを示した。A96T と FTH を大腸菌内で共発現させた場合、ヘテロ 24 量体を形成することが示されている (Luscieti et al., 2010)。このヘテロ 24 量体は、WT FTH と同等の鉄取り込み能を示した。そのため、FTH は、A96T に対するアセンブリ・シャペロンのようにアセンブリを手助けしていると考えられる。

フェリチンの鉄の取り込み、取り出し経路は未だに解明されていない。取り出し経路に関しては、フェリチンをプロテアソームやリソソームによる分解や還元剤を用いた経路などが考えられている (Arosio et al., 2009)。取り込み経路に関しては、3 回転対称軸上のポアから取り込まれると考えられている。実際に 3 回転対称軸上には鉄イオンを取り込みに関わると考えられている酸性残基が存在している。4 回転対称軸上は疎水的な環境下であり、鉄の取り込みには関与しないと考えられている。X 線結晶構造解析を用いて、鉄イオンが 3 回転対称軸上のポアから取り込まれた後、どのようにフェロキシダーゼ活性サイトまで運ばれていくのかが調べられた (Pozzi et al., 2015)。鉄の取り込み反応は非常に速いため、通常、結晶構造解析を用いて鉄イオンを追跡す

ることは難しい。彼らは、競合剤としてマグネシウムイオンを使い、鉄の取り込み反応を結晶構造解析で追跡できるまで遅くした。その結果、鉄は3回転対称のポアから取り込まれた後、活性サイトへ運ばれることを示した。また、活性サイト付近の残基を1つ置換しただけで、金属結合の様相が変わることが分かった。生理学的な条件下において、フェリチンは鉄を水和酸化鉄として貯蔵している。ミネラルコアの化学組成は、生物種や媒質の組成によって変化する。ほとんどの天然由来のフェリチンは、無機リン酸を含んでいるが、この量は生物種によって異なる(Harrison and Arosio, 1996)。

フェリチンは細胞内に存在するだけでなく、血液中にも存在していることが知られている。FTHは赤血球前駆細胞を含む様々な細胞に結合することが報告されている(Fargion et al., 1988; Meyron-Holtz et al., 1994; Liao et al., 2001; Leimberg et al., 2008)。これは、フェリチンは鉄の貯蔵だけでなく、運搬も行っていることを暗示している。赤血球前駆細胞は赤血球へと成熟するために、ヘモグロビンを合成するが、その過程で鉄を大量に必要とする。鉄の運搬を行う主なタンパク質はトランスフェリンであるが、トランスフェリン非存在下であってもフェリチンが赤血球前駆細胞へ十分な鉄を運搬することが示された(Leimberg et al., 2003 and 2008)。

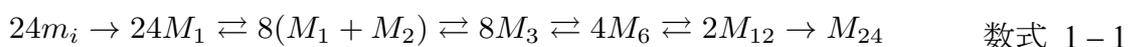
フェリチンは人工的に作製するには困難な均一なサイズの鉄コアを形成し、タンパク質であるため、遺伝子組み換え操作を用いることで容易に機能改変を行えることから、バイオナノテクノロジーの分野でも注目されている。フェリチンは鉄以外にもクロムやコバルトを酸化物として、ニッケルを水酸化物として球殻内に取り込むことが可能である(Okuda et al., 2003; Tsukamoto et al., 2005)。また、半導体である硫化カドミウム、硫化亜鉛、セレン化カドミウム、セレン化亜鉛、硫化銀をフェリチンの球殻内に合成した例が報告されている(Wong and Mann, 1996; Yamashita et al., 2004; Iwahori et al., 2008; Yamashita et al., 2010)。これらの特性からフェリチンは量子ドット、フローティングゲートメモリーへの応用が期待されている。フェリチンの高い熱安定性と球殻状構造から、フェリチンはドラッグデリバリーシステムの研究にも利用されている。近年、FTHは、トランスフェリン受容体1に結合して細胞内へ取り込まれることが示された(Li et al., 2014)。トランスフェリン受容体1は、ヒトの癌細胞に多く発現している、治療や診断のターゲットとして使われてきた。この機能を利用して、分子修飾することなしにFTHを癌細胞特異的に結合させることが可能である(Fan et al., 2012)。さらに、FTHに抗癌剤を積載し、マウスへ静脈注射することで癌細胞を特異的にアポ

トーシスへと導くことが報告されている (Liang et al., 2014)。マウスでの実験例であるが、既存の抗癌剤と比較した場合、効率良く癌細胞を排除し、副作用が少ないことが示されている。FTH はヒトがコードしているタンパク質であるため、生体親和性が高いナノキャリアーとして注目されている。

生物種間で差はあるものの、24 量体フェリチンの構造は高く保存されている。例えば、FTH と Ftn の 3 次構造と 4 次構造は非常に良く似ている (図 1-4)。しかしながら、アミノ酸配列の類似性は低く、CLUSTALW を用いて、アラインメントを行ったところ、そのスコアは 17.0 であった (図 1-5)。アミノ酸配列が大きく異なるにもかかわらず、同様の 4 次構造を形成するフェリチンのアセンブリメカニズムは非常に興味深い。

#### 1.4 フェリチンのアセンブリメカニズム

フェリチンのアセンブリメカニズムは 1960 年代から 80 年代に HSF を用いて、いくつかのグループによって研究された。HSF は先述したとおりに、酸性 pH で 2 量体へ解離する。疎水性試薬である ANS を用いて誘導した HSF の部分的な再集合において、6 量体の形成が示された (Stefanini et al., 1979)。また、pH の上昇による部分的な再集合反応において、8 量体以下の分子種が迅速平衡にあることが示された (Stefanini et al., 1987)。低オリゴマーの混合であるピークと 24 量体のピークの間に無視できないベースラインの上昇があったことから、8 量体より大きい構造も中間体として存在することが示唆された。HSF は酸性で高濃度の Gdn-HCl 存在下で可逆的に変性する (Gerl and Jaenicke, 1987a)。Gerl と Jaenicke は変性剤を希釈し、pH を中性にすることで HSF のリフォールディングとリアセンブリを開始させ、その反応を分子架橋法と SDS - PAGE を用いて追跡した (Gerl and Jaenicke, 1987b)。分子架橋剤であるグルタルアルデヒドを使用して、反応溶液中に存在する分子種を共有結合でつなぎ、SDS を加え、熱することでアセンブリ反応を止め、SDS-PAGE により溶液中に存在するオリゴマーの解析を行った。その結果、中間体として 2 量体、3 量体、12 量体が蓄積することを示した (図 1-6)。この中間体の蓄積から、彼らは以下の反応スキームを考えた。



$m_1$  は変性した単量体を、 $M_i$  は  $i$  個のサブユニットで構成されている、構造を持ったオリゴマーを示している。また、彼らは DMMA を HSF に反応させることで可逆的な解離種として、2 量体、3 量体、4 量体を得た (Gerl and Jaenicke, 1988)。これらの解離種にリアセンブリを誘導した際、2 量体と 3 量体は 24 量体を形成できたが、4 量体は 24 量体を形成することができなかった。この結果は 2 量体と 3 量体は中間体として存在するが、4 量体は存在しないとしている、彼らのスキームに一致している。しかしながら、フェリチンのアセンブリメカニズムは、未だに明らかになっていない。また、Gerl と Jaenicke の試み以降、フェリチンのアセンブリメカニズムに焦点を当てた研究は行われていない。

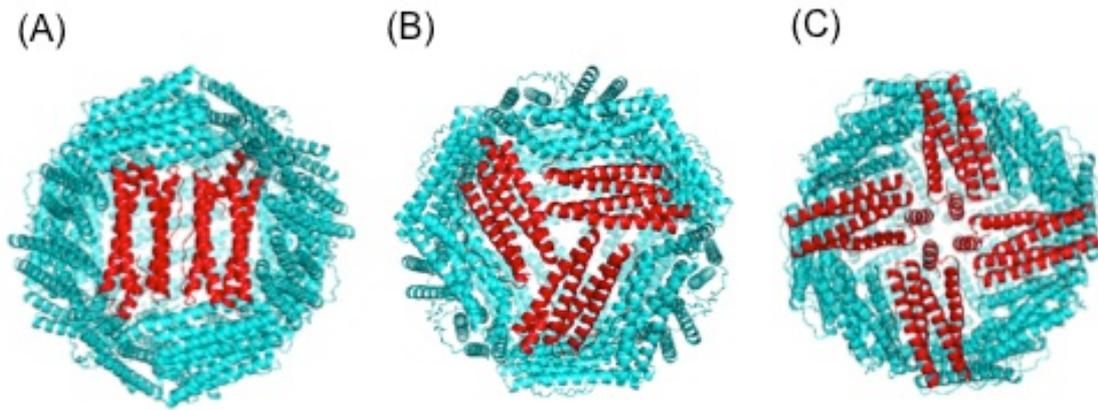


図 1-1 Ftn の結晶構造 (PDB ID: 1eum)

2 回転対称 (A)、3 回転対称 (B)、4 回転対称 (C)を示した。回転対称に関与するサブユニットを赤色で強調した。

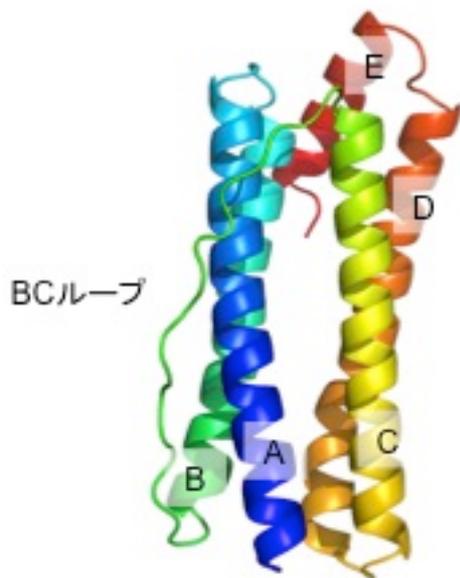


図 1-2 Ftn のサブユニット構造

N 末端から C 末端にかけて青色から赤色になるように色付けした。ヘリックスは N 末端から A-E ヘリックスと名付けられている。

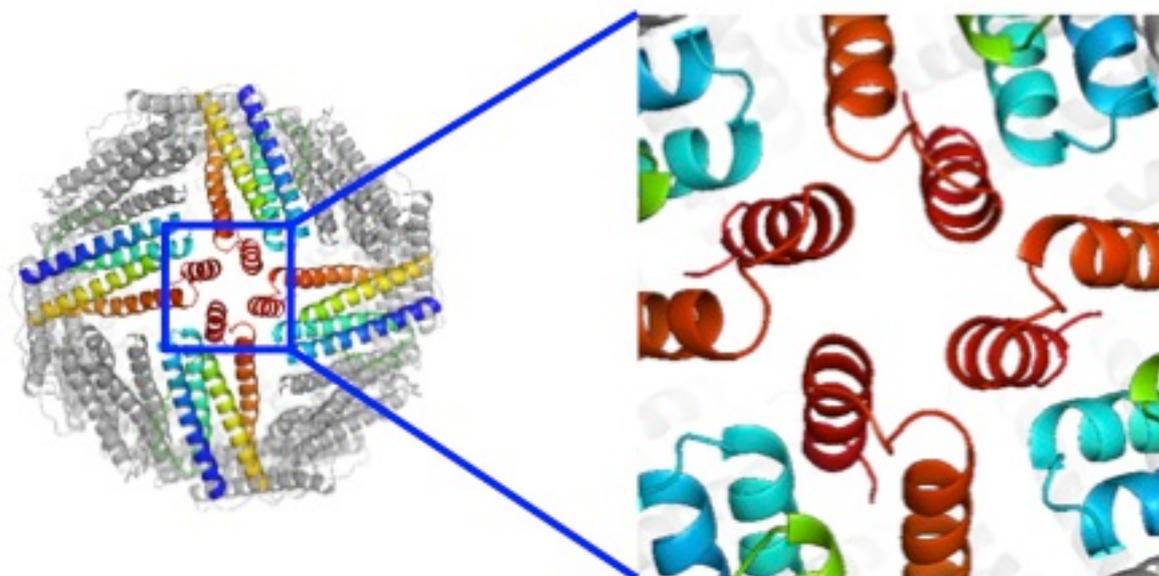


図 1-3 4本のEヘリックスで構成される4ヘリックスバンドル

4回対称に関わるヘリックスを図 1-2と同様に色付けをした。4回対称で4本のEヘリックスが分子間4ヘリックスバンドルを形成している。

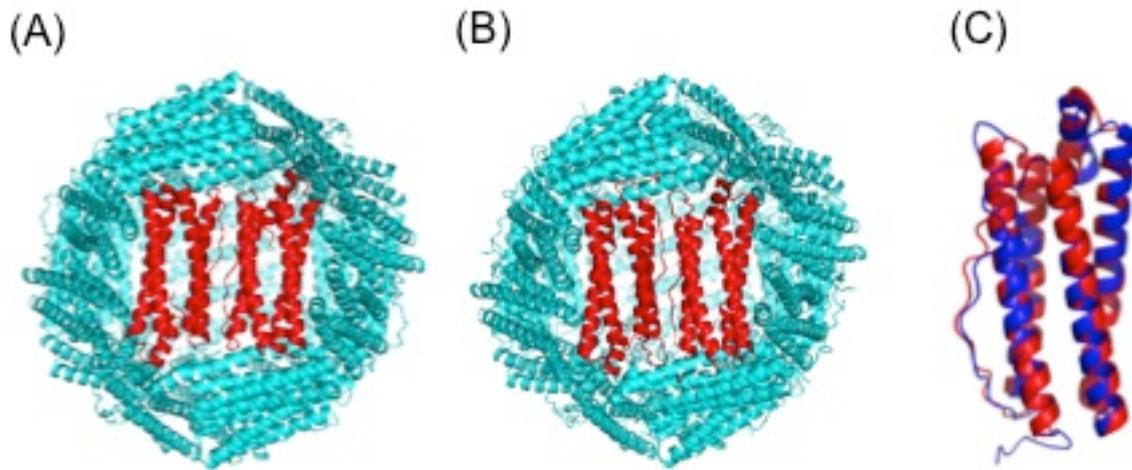


図 1-4 Ftn と FTH の構造比較

Ftn (A)と FTH (B)を 2 回転対称軸から見下ろした。2 回転対称に関わるサブユニットを赤色で強調した。Ftn (赤)と FTH (青)のサブユニットの  $C\alpha$  を重ねあわせた (C)。RMS は  $1.03 \text{ \AA}$  であった。

```

Ftn -----MLKPEMIEKLNEMNLELYSSLLYQQMSAWCS--YHTFEGAAFLRRHA
FTH MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQS
      : :      :*. * :*****:* :* . ** : .      : : : . * : : : :
Ftn QEEMTHMQRLFDYLTDGTLPRINTVESP-FAEYSSLDELQETKHEQLITQKINELAH
FTH HEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHK
      :** * : :*. . : * . : : : : * : : : * : : : : * : : . * : ** :
Ftn AAMTNQDYPTFNFLQ-WYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGK--SGEGLYFIDKELSTLDT
FTH LATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDS
      * : : * : * : : * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
Ftn QN-
FTH NES
      : :

```

図 1-5 Ftn と FTH の CLUSTALW を用いたアラインメント結果  
 \*は完全一致、:とは似ているアミノ酸残基を示している。

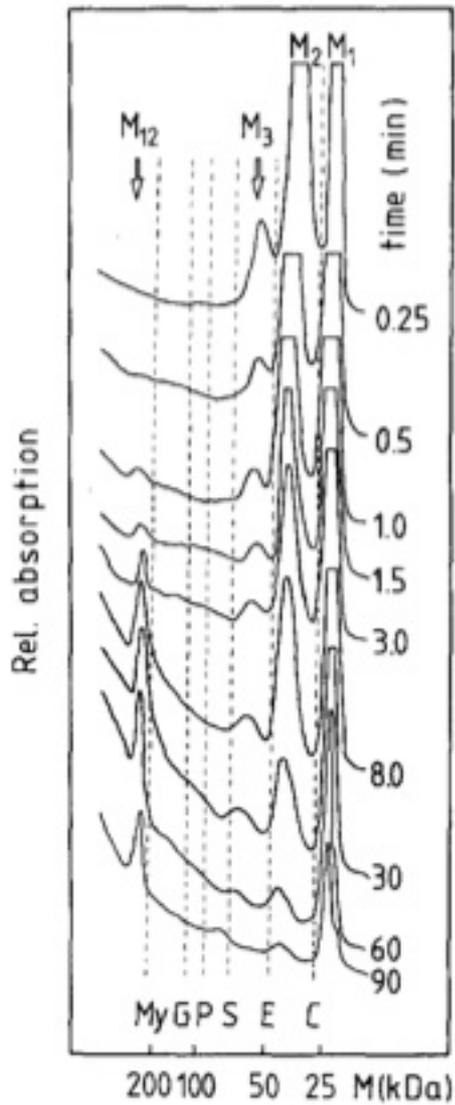


図 1-6 HSF (22.6  $\mu\text{g/mL}$ )、20°C でのアセンブリカインेटィクス  
 SDS-PAGE の結果がデンストメーターで解析された。 $M_i$  は  $i$  個のサブユニットを持つアセンブリ中間体を表している。破線は分子量マーカを表している。 $My$  (ミオシン)、 $G$  ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)、 $P$  (ホスホリラーゼ)、 $S$  (ウシ血清アルブミン)、 $E$  (卵アルブミン)、 $C$  (炭酸脱水酵素)。 Gerl and Jaenicke (1987b) Figure 2 から引用した。

## 2 Ftn のアセンブリメカニズム

### 2.1 序

フェリチンのアセンブリメカニズムの研究は 1980 年代の HSF の研究を最後に行われていない。当時のアセンブリ反応を追跡する手段としては、ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心、電気泳動、CD、蛍光などがあつた。前者 3 つは、オリゴマーを分けることができるという、中間体を明らかにするための強力な特徴を備えているが、時間分解能が低い。後者 2 つは、時間分解能は高く素早い反応を追跡することができるという利点はあるが、追跡できるものは、近紫外 CD、蛍光であれば芳香族アミノ酸残基まわりの環境の変化、遠紫外 CD であれば主に二次構造の変化であるため、大きさの変化を直接的に測定することは難しい。また、CD や蛍光の変化がアセンブリを反映しているのか、アセンブリ後の側鎖のリアレンジメントに由来するものなのか判断できない。ウイルス・キャプシドのアセンブリは光散乱や SAXS を測定して研究されていた。光散乱法は時間分解能が高く、大きい構造体ほど散乱が強くなる。そのため、CD や蛍光よりは、構造体の大きさが変化するアセンブリを追跡するために適した方法であると考えられる。しかしながら、構造体の大きさを直接、評価できるわけではない。SAXS は時間分解能が高く、散乱体の慣性半径が分かるため、構造体の大きさを直接評価できる。そのため、SAXS はタンパク質のアセンブリを研究する上で、非常に適している方法だと考えられる。しかしながら、これまでにフェリチンのアセンブリカイネティクスを SAXS 測定により研究した例は存在しない。当時の放射光や検出器では時間分解能が数百ミリ秒から数秒であること、アセンブリ反応がタンパク質濃度に依存して速くなることが、追跡を困難にしていた原因であると考えられる (Hiragi et al., 1990; Tuma et al., 2008)。実際に本研究室の砂戸は、KEK の放射光と CCD カメラを用いて 200 – 300 ミリ秒の時間分解能で、Ftn のアセンブリ反応を追跡したが、開始 1 点目の散乱関数が 24 量体のものと同様であり、反応を追跡することはできなかった (砂戸, 2011)。KEK のような第 2 世代の放射光施設では、主に偏光電磁石を用いて、光速近くまで加速された電子を曲げることで、X 線を発生させている。それに対して、第 3 世代放射光施設はアンジュレーターという N 極と S 極が交互に並んだ電磁石を挿入光源として多数設置できるように設計された施設であり、可干渉な X 線を発生させることが可能である。その X 線の輝度は、第 2 世代放射光施設に比べて 1000 倍とも言われている。また、PILATUS という数ミリ秒のデータ読み出し時間を持つ検出器が開

発された。PILATUS は CCD と異なり、全てのピクセルからデータを読みだすことが可能であるためデータ読み出し時間が短く、直接 X 線を観測できることから S/N 良くデータを取得できる検出器である。放射光施設、検出器の発展により、数十ミリ秒の時間分解能で SAXS を測定することが可能になってきた (Tresset et al., 2013)。そこで、私は、世界最高クラスの放射光施設である SPring-8 の高輝度 X 線と PILATUS 検出器を用いて、フェリチンのアセンブリ反応を SAXS の測定により、追跡することにした。このような時間分解能で、フェリチンのアセンブリ反応を追跡した例はなく、新たな知見を得ることができると期待した。

HSF はリアセンブリの際に 24 量体よりも大きい構造を形成するため、SAXS 測定には不向きである。Ftn は本研究室の以前の実験より、酸性で天然様の 2 次構造と 3 次構造を保ったまま、2 回転対称を構成する 2 量体に解離し、そこから中性 pH に戻すことで 24 量体を再構成することが分かっている (佐藤, 2013; Ohtomo et al., 2015)。天然状態と酸性解離した Ftn の遠紫外 CD スペクトルが、ほとんど変化しないことから、このアセンブリ反応には顕著なフォールディング反応は含まれず、アセンブリ反応だけを追跡できると考えられる。また、HSF とは異なり、リアセンブリの際に大きい会合体を形成しない。これらの理由から、ターゲットとして Ftn を採用した。Ftn の結晶構造は 2.05 Å の分解能で解かれており、結晶構造に存在する中間体であれば、容易に慣性半径を評価できる (Stillman et al, 2001)。

## 2.2 方法

### 2.2.1 Ftn の発現、精製

本研究室、砂戸歩美により Ftn 過剰発現菌体が作製された (砂戸, 2011)。Ftn 過剰発現菌体とは Ftn 遺伝子が組み込まれた pET3c ベクターを持った *E.coli* BL21 (DE3) である。この菌体を用いて、以前確立された方法を使用して発現を行った (佐藤, 2013)。精製に関しては、変更点がいくつかあるので改めてここで記載する。大腸菌破砕液の上清を 75 °C で 10 分間処理した。その後、氷水で 2–5 分間急冷した。4 °C、8000rpm、10 分間、7 番ローターを用いて遠心を行った。遠心には高速冷却遠心機 (Hitachi himac SCR 20B もしくは CR 22G)を用いて行った。上清を再度、75 °C で 15 分間処理した。その後、すぐに氷水で 2–5 分間急冷した。4 °C、8000rpm、10 分間、

7 番ローターを用いて遠心を行った。上清に対して 500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を加えて、pH を 5.5 に調整した。10 分間、室温で放置した後、核酸を取り除くために、0.1% (w/v) になるように 2.5% (w/v) ポリエチレンイミン溶液を加えた。この時、pH を 5.5 に調整していないと、Ftn も沈殿してしまうため注意が必要である。30 分間、室温で放置した後、4 °C、8000rpm、10 分間、45 番ローターを用いて遠心を行った。上清に対して、60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。室温で 30 分間放置した後、4°C、15000rpm、20 分間、7 番ローターを用いて遠心を行った。沈殿を最終体積ができるだけ少なくなるように、数 mL の 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 で懸濁した。懸濁液を 4 °C で 6 時間、2L の 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 に対して透析を行った。この時、透析時間が長すぎると不可逆な沈殿が増えるため、注意が必要である。透析後の溶液を 4 °C、15000rpm、20 分間、7 番ローターを用いて遠心した。上清を 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィー担体 (GE Healthcare, Sephacryl S-300, 2.6 φ×60 cm) にアプライした。254 nm の UV を用いて溶出曲線を作成し、ピーク付近のフラクションを SDS-PAGE、NATIVE-PAGE で分析し、Ftn を含むフラクションを同定した。この段階で、フラクションには 24 量体 Ftn よりも大きい構造体が含まれている。後述するが、この会合体は、24 量体 Ftn と同様に酸性で 2 量体に解離する性質を持っている。そのため、解離させた後の Ftn を用いて実験を行うのであれば、この会合体が含まれているフラクションを回収してもかまわない。しかしながら、天然状態の特徴付けなどを行う際は、注意が必要である。Ftn を含むフラクションを回収し、その溶液を 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0 で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィー担体 (GE Healthcare, Q Sepharose 16/10 High Performance) にアプライした。Ftn を 100 – 600 mM NaCl グラジエントで溶出させた。280 nm の UV を用いて溶出曲線を作成し、ピーク付近のフラクションを SDS-PAGE、NATIVE-PAGE で分析し、Ftn を含むフラクションを同定した。先ほどと同様に大きい構造体の扱いには注意が必要である。Ftn を含むフラクションを回収した後、Ftn に取り込まれている、もしくは結合している鉄を取り除くために、5 mM 亜ジチオン酸ナトリウム、10 mM EDTA/2Na を加えた。亜ジチオン酸ナトリウムは水に溶かすと酸性を示し、分解反応が起きてしまうため、100 mM 程度の濃度になるように、50 mM Tris-HCl, pH 8.0 に溶かして使用した。室温で 1 時間以上放置した後、20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0 で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィー担体 (GE

Healthcare, Sephadex G-25, 2.6  $\phi$   $\times$  30 cm) にアプライして、緩衝液交換を行い、精製を完了した。長期保管する際は蒸留水に対して透析した後に、凍結乾燥した。凍結乾燥すると、大きい構造体が形成されるため、注意が必要である。

### 2.2.2 Ftn の解離と再集合

Ftn は酸性で 2 量体に解離し、そこから中性 pH にジャンプさせることで 24 量体を再構成する。精製後の Ftn 溶液 (20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0) と 0.5 M リン酸を 15:1 の比で混合することで Ftn を 2 量体へ解離させた。この時の緩衝液は 50 mM リン酸ナトリウム, pH 2.5 である。この酸解離 Ftn 溶液と高 pH の緩衝液を 1:1 の比で混合することで 24 量体を再構成させた。高 pH の緩衝液には 50 mM Tris, 2 mM EDTA/2Na, 37.5 mM NaOH もしくは 50 mM Tris, 2 mM EDTA/2Na が用いられた。この時の緩衝液は 25 mM Tris, 25 mM リン酸ナトリウム, 1 mM EDTA/2Na となり、前者は pH 8.0、後者は pH 6.8 になる。解離後、少なくとも 30 分間、室温で放置してから再構成を行った。

### 2.2.3 SAXS

SAXS の測定は、大型放射光施設 SPring-8 (BL 45XU) にて行われた。散乱データは高速二次元検出器 (Dectris, PILATUS 300k-w もしくは PILATUS3X 2M) を用いて、測定された。PILATUS 300k-w、PILATUS3X 2M はそれぞれ 2.3、0.95 ミリ秒 (カタログスペック) という非常に短い時間で、データを読みだすことが可能である。サンプルは対称ストップト・フロー装置 (Unisoku) を用いて混合された。カイネティクス測定では、酸解離させた Ftn 溶液と高 pH の緩衝液をリザーバーに入れて混合し、反応を開始させた。スタティック測定では、両方のリザーバーに同一の溶液を入れて混合した。セルには直径 2 mm の石英キャピラリーセルを用いた。温度は循環式恒温槽を用いて 25°C に保ち、実験を行った。X 線の波長は 0.9 もしくは 1.0 Å、カメラ長は 1.5 m を使用した。タンパク質濃度の決定は以前の方法を用いた (砂戸, 2011)。正確なカメラ長、ビーム中心はベヘン酸銀の回折パターンを測定し、それを FIT2D で解析することで求めた。データの一次元化にも FIT2D を使用した。FIT2D はフラ

ンスの放射光施設 ESRF で開発された一次元、二次元の両方のデータを解析できるソフトウェアである (Hammersley et al., 1996)。アカデミックフリーであり、<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>から取得が可能である。

本実験で使用している X 線は非常に強度が高く、サンプルであるタンパク質にダメージを与える可能性が高い。そのため、Ftn に対する X 線損傷の見積もりを行った。中性条件 (24 量体) と酸性条件 (2 量体) における Ftn の散乱データ測定し、顕著な変化なしにデータを取得できる条件を探索した。カイネティック実験では、総露光時間は変更せずに、インターバルを変更して、X 線損傷の評価を行った。インターバル中は、高速シャッターを用いて、サンプルに X 線が照射されないようにした。データの変化が X 線損傷であることを明確にするために、アッテネーターを使用した。アッテネーターとは、サンプル上流に挿入可能なアルミ板のことであり、これにより X 線の強度を減少させることが可能である。

上記の実験結果を元に、以下の条件で散乱データを取得した。24 量体のスタティック測定に関しては、1 ショットの露光時間が 10 ミリ秒で 100 点まで測定した。2 量体のスタティック測定に関しては、1 ショットの露光時間が 10 ミリ秒で 10 点まで測定を行った。カイネティック実験に関しては、露光時間 10 ミリ秒で 10–30 点まで照射を行った。インターバルが 50 ミリ秒以上の測定に関しては、サンプルへの放射光ダメージを避けるために、高速シャッターを用いて、インターバルの間はサンプルに X 線を照射しないようにした。同条件でインターバルの異なるデータを取得し、それらをつなぎ合わせることでカイネティクスデータを作成した。ダメージのないデータ取得するために、ストップ・フロー装置を動作させてから、任意の時間が経過した後に初めて X 線を照射して、反応の途中から SAXS の測定をすることも行った。全てのデータを目で確認し、ダメージを受けているものは除外した。

散乱関数はビーム強度に比例するため、ビーム強度が異なる場合、補正する必要がある。ビーム強度の見積もりには、イオンチャンバーを用いた。イオンチャンバーには、アルゴンガスが封入されており、X 線が照射されるとプラズマ化し、ビーム強度に応じた電流が発生する。その電流値を用いて、補正を行った。また、ビーム強度の変化が大きい時は、完全に補正することができないことがある。このような場合に、散乱強度を補正するために、適宜、緩衝液や標準となるタンパク質の散乱を測定した。ビーム強度で補正した緩衝液や標準物質の散乱曲線を比較すること

で、どの程度補正できているかを見積もった。このような測定は、セルにタンパク質が吸着したかどうかを判断する際にも重要である。

得られた散乱関数を定量的に評価するために以下の Guinier 近似 (式 2-1)を用いて  $R_{app}$  と  $I(0)$ を算出した (Guinier and Fournet, 1955; Glatter and Kratky, 1982)。

$$I(Q) = I(0) \exp\left(-\frac{R_{app}^2 Q^2}{3}\right) \quad \text{式 2-1}$$

$$Q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda} \quad \text{式 2-2}$$

$I(Q)$ は散乱ベクトル  $Q$  における散乱強度、 $Q$ は散乱ベクトルの大きさ、 $I(0)$ は前方散乱強度、 $R_{app}$  は見かけの慣性半径を表している。溶液中に単一の粒子が存在するときは、 $R_{app}$ はその粒子の  $R_g$ を表し、 $I(0)$ はその粒子の体積の 2 乗、ビーム強度、粒子と溶液の電子密度差の 2 乗に比例する (Segel et al., 1999; Svergun and Koch, 2003)。また、体積が分子量に比例していると考えたと  $I(0)$ は散乱体の質量濃度、分子量に比例しているとも考えることができる (Jacob et al., 2004)。一方、2 種類以上の粒子が存在している場合、 $R_{app}$  と  $I(0)$ は複雑になる。 $I(0)$ は溶液中に存在している粒子の  $I(0)$ の算術平均値になるが、 $R_{app}$ はそうはならず、より大きい構造体の値にバイアスが掛かっている。全てのオリゴマーを球状として近似すると、 $R_{app}$  と  $I(0)$ は以下のようになる。

$$I(0) = \sum_i C_i I(0)_i \quad \text{数式 2-3}$$

$$R_{g,app} = \sqrt{\frac{\sum_i C_i I(0)_i R_{g,i}^2}{\sum_i C_i I(0)_i}} \quad \text{数式 2-4}$$

$C_i$ 、 $I(0)_i$ 、 $R_{g,i}$ は、 $i$  番目の中間体の質量濃度、単位質量濃度当たりの  $I(0)$ 、 $R_g$ を意味

している。また  $Q$  は式 2 - 2 の関係があり、 $2\theta$  は散乱角、 $\lambda$  は X 線の波長である。Guinier 近似はどの範囲でも使用できるわけではなく、 $QR_{app} \leq 1.3$  の範囲で使用できると言われている。短い露光時間を使用して高速反応を追跡しているため、この範囲で解析を行うと、 $R_{app}$  と  $I(0)$  は大きな誤差を含んでしまう。本研究では、正確な  $R_{app}$ 、 $I(0)$  を求める必要がなく時間とともにどのように増加するかを求めることを目的としている。そのため、 $QR_{app} \leq 1.8$  の範囲で解析を行っている。解析は igor (WaveMetrics, Inc.) を用いて、自動で行っている。取得したデータの  $R_{app}$ 、 $I(0)$  の増加をプロットし、ダメージを受けているデータを除外した。具体的には、 $I(0)$  に不自然な減少があった場合、それをダメージと判断した。また、ストップ・フロー実験では、同じ条件における測定でも正確に溶液が混合されていない時がある。その場合は、前後の時間域のデータと比較することで、正確に混合されていないと思われるデータを除外した。

#### 2.2.4 全構造の探索

Ftn の 2 量体から 24 量体までの偶数のサブユニットから構成されている全ての構造を探索した。まず、OLIGAMI ファイル (PDB ID: 1eum) に登録されている Chain ID (A - X) をそれぞれのサブユニットに割り振った。次に、それぞれの 2 量体がどの 2 量体に結合しているかをまとめた (表 2 - 1)。2 量体は 4 回転対称の E ヘリックスだけで接触しているものを除けば 4 つの 2 量体と接触している (図 2 - 1)。2 量体 AF を基準として、そこに 1 つずつ 2 量体を結合させていき、2 量体 AF を含む全ての構造を発生させた。当然、この構造群には同じ形の構造が含まれている。ユニークな構造のみを取り出すために、 $R_g$  を比較することにした。発生させた構造の原子座標を PDB ファイル (PDB ID: 1eum) から得た。原子座標から散乱関数を計算するソフトウェア、CRY SOL (Svergun et al., 1995) を用いて、発生させた構造の  $R_g$  を計算した。しかしながら、 $R_g$  が同様の値を示しても形の異なる構造が多数、存在していた。6 量体を例に説明する。6 量体には、3 回転対象を構成しているもの、V 字形、直線形が 2 種類、合計 4 種類のアイソマーが存在している。これらのアイソマーの内の  $R_g$  はそれぞれ、36.4、39.5、41.8、41.7 Å である。後者 2 つは形が似ているため  $R_g$  で区別することができないことが分かる (図 2 - 2A, B)。そこで接触面の種類で区別す

ることとした。2 量体を模式的に表したとき、赤い線で描かれた面を f 面、青い線で描かれた面を s 面と名付けた (図 2-2C)。(A)の 6 量体は、1 つの f 面で接触している 2 量体が 2 つ、2 つの s 面で接触している 2 量体が 1 つで構成されている。一方、(B)の 6 量体は 2 つの f 面で接触している 2 量体が 1 つ、1 つの s 面で接触している 2 量体が 2 つで構成されている。このように形が似ているオリゴマーも接触の仕方を考えれば、区別することが可能である。しかしながら、接触の仕方と  $R_g$  が同じでも、異なるアイソマーが存在した (図 2-2E, F)。そこで、最終的に目で全ての構造を確認して分類した。PyMOL を使用して、全ての構造を描画した。全ての構造を描画するためのコマンドを pml ファイルに書き込み、PyMOL の Run で読み込んだ。全構造の分類、描画には Perl 言語で書いたプログラムを使用した。全構造の  $R_g$  と  $I(0)$  を  $QR_g \leq 1.8$  の範囲で Guinier 近似により計算した。その際には、Igor プロシージャを使用した。

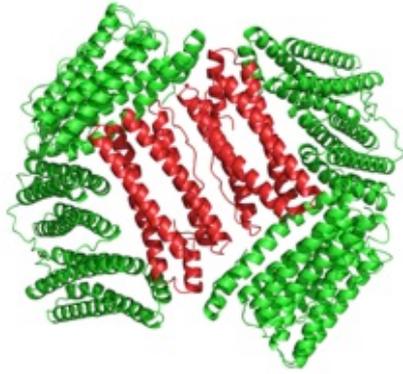


図 2-1 2 量体間の接触

中心の 2 量体を赤、その 2 量体に接触している 2 量体を緑で表している。Ftn のサブユニットは等方的であるため、全ての 2 量体が赤色の 2 量体と同じ環境にある。

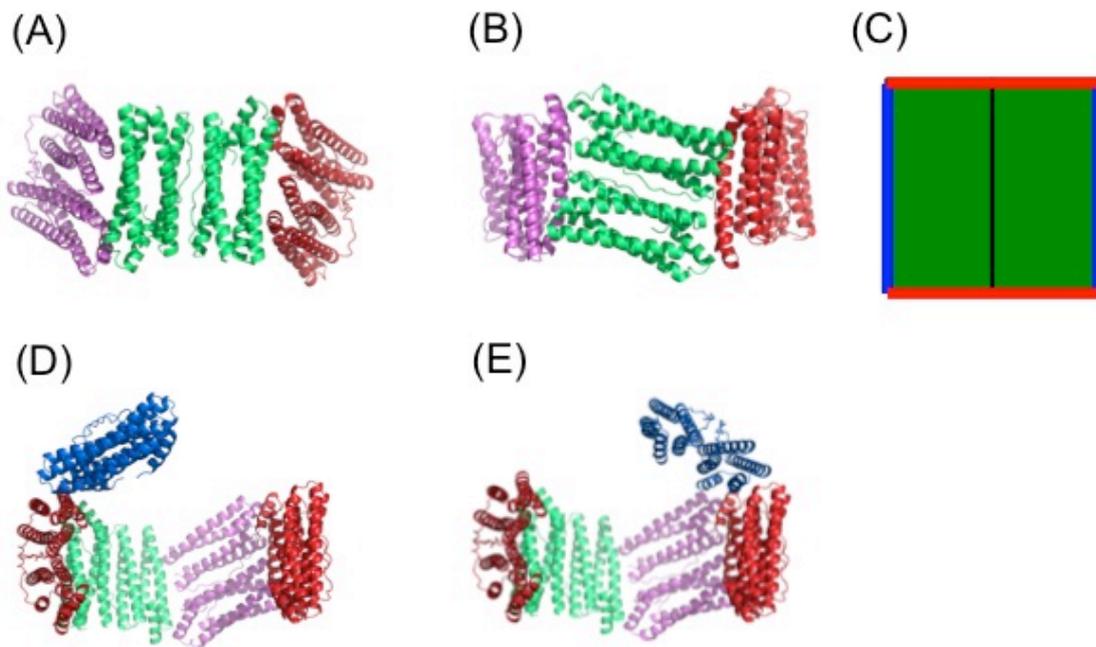


図 2-2 2 種類の直線形の 6 量体 (A, B)、2 量体の模式図 (C)、2 種類の 10 量体 2 量体模式図において赤を f 面、青を s 面とした。 $R_g$  と接触の仕方が同じであるが、構造が異なる例 (D, E)。

表 2-1 2 量体同士の接触情報

2 量体は他の 4 つの 2 量体と接触している。s と f は接触の仕方を表している。例えば、2 量体 AF の s 面に 2 量体 CD が接触している。

基準となる 2 量体	接触 1	接触 2	接触 3	接触 4
AF	CD s	MR s	SX f	OP f
BE	CD f	NQ f	OP s	TW s
CD	AF f	BE s	SX s	TW f
GL	JI s	MR f	SX s	UV f
HK	JI f	NQ s	TW f	UV s
JI	GL f	HK s	MR s	NQ f
MR	AF f	GL s	JI f	OP s
NQ	BE s	HK f	JI s	OP f
OP	AF s	BE f	MR f	NQ s
SX	AF s	CD f	GL f	UV s
TW	BE f	CD s	HK s	UV f
UV	GL s	HK f	SX f	TW s

## 2.3 結果

### 2.3.1 会合体

2.2にも記述したが、Sephacryl S-300による精製を行った後、Ftnを含むフラクションには、24量体より大きい分子量を示す構造体が存在している。ピーク付近のフラクション(図2-3A)をSDS-PAGE(図2-3B)、NATIVE-PAGE(図2-3C)で分析した。NATIVE-PAGEでは、24量体Ftnよりも大きい分子量を持つバンドが見られるが、SDS-PAGEでは単一バンドとして検出された。これは、大きい分子量を持つ構造体は、Ftnのサブユニットから形成されていることを示唆している。SDS-PAGEで単一バンドを示したサンプルの緩衝液を蒸留水に置き換え、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後のFtnをpH 7.0の緩衝液に溶解させたサンプル、一度解離させpH 6.8でリアセンブリさせたサンプルを、それぞれNATIVE-PAGEで分析した(図2-3D)。pH 7.0の緩衝液で溶解させたサンプルには、S-300による精製後と同様に、会合体を示すバンドが見られた、一方、リアセンブリさせたサンプルに会合体は含まれていなかった。そのため、この会合体は24量体Ftnと同様、酸性pHで2量体に解離し、pHを上昇させることで、24量体を再構成していると考えられる。

### 2.3.2 X線損傷の評価

Ftnの天然状態、酸解離状態のSAXSを露光時間10ミリ秒、インターバル100ミリ秒、総照射回数100回の条件で測定した。それぞれのデータに対してGuinier近似を用いて $I(0)$ を計算し、時間に対してプロットした(図2-4A, B)。天然状態は $I(0)$ に変化はなく、総露光時間1秒以内であれば、X線損傷は起こらないと考えられる。酸解離状態は測定1秒後から顕著に $I(0)$ が上昇し始めた。これは、会合体を形成していることを示している。1秒程度までは $I(0)$ に変化がないことから、酸解離状態は総露光時間100ミリ秒まではX線損傷が起こらないと考えられる。続いて、リアセンブリ反応中のX線損傷を調べた。露光時間は10ミリ秒、総照射回数は100回、インターバルを0、100、1000、10000ミリ秒とそれぞれ変更して測定し、 $I(0)$ の経時変化を時間の対数に対してプロットした(図2-4C)。この測定では、総露光時間は変わらずに、インターバルが長いデータほどプロットが右側へシフトする。もし、X線損傷が発生しなければ、異なるインターバルのデータであっても同じ時間軸上

の  $I(0)$  は同じ値を示すはずである。しかしながら、インターバルが短いデータほど、後半の測定点で、期待される値よりも小さい  $I(0)$  を示すことが分かった。X 線の強度を 46 % 減少させるアッテネーターを使用して、同様の測定を行ったところ、 $I(0)$  の減少が改善された (図 2-4D)。それゆえ、この  $I(0)$  の減少は X 線損傷が原因であると考えられる。これより、カイネティクス測定においては、様々なインターバルで測定を行い、 $I(0)$  の上昇カーブから X 線損傷が発生しているデータを除外する必要があることが分かった。アセンブリ反応を追跡する際は、露光時間 10 ミリ秒で照射回数 10-30 回で測定を行うことにした。X 線損傷を抑える方法として、アッテネーターを使用するという手段も考えられるが、X 線強度が減少することによる S/N の低下を招いてしまう。実際にアッテネーターを使用したデータは、 $I(0)$  のばらつきが大きい。

### 2.3.3 Ftn アセンブリ反応の追跡

Ftn のアセンブリ反応を 15 ミリ秒の時間分解能で追跡することができた。アセンブリ反応中の SAXS の変化を 3D プロットした (図 2-5A)。反応の進行とともに  $I(0)$  が上昇し、小角側にピークが現れてくることが分かる。これは大きい構造が形成されていることを示している。天然状態とリアセンブリ開始から 1 日が経過した Ftn の散乱曲線、反応開始 1 点目 (15 ミリ秒) と酸性解離した Ftn の散乱曲線を比較したところ、それぞれ良く似ていることが分かった (図 2-5B)。これは全アセンブリ反応を追跡できたことを意味している。このような時間分解能でフェリチンのアセンブリ反応を追跡した例はなく、ましてや全反応を追跡したのは本研究が世界で初めてである。 $I(0)$  は分子量に比例するため、2 量体と 24 量体の  $I(0)$  の比は 12 になるはずである。酸性解離した Ftn と天然状態の Ftn の SAXS から  $I(0)$  を算出したところ、11.3 となった。これは、以前の超遠心分析の結果と一致している (Ohtomo et al., 2015)。アセンブリの進行を定量的に評価するため、測定された SAXS から Guinier 近似 (式 2-1) を用いて、 $R_{app}$  と  $I(0)$  を算出した (図 2-5C)。反応開始とともに、 $I(0)$ 、 $R_{app}$  が上昇していることからウイルスのようなラグ・フェイズは存在しないことが分かった。アセンブリ反応中に 2 量体と 24 量体しか蓄積しない場合、数式 2-3 を使用して、各時間における 2 量体と 24 量体の  $C_i$  を計算することができる。これらの  $C_i$

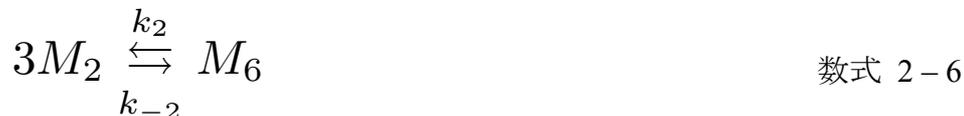
を使用して  $R_{app}$  を計算した (図 2-5C)。計算された  $R_{app}$  は観測値よりも大きかった。これは、アセンブリ反応中に、無視できないほどの中間体が蓄積することを示している。

### 2.3.4 初期反応次数

初期反応次数を見積もるために、 $I(0)$  の初速度を様々なタンパク質濃度で測定した。測定された  $I(0)$  の上昇から、直線的な部分だけを取り出した (図 2-6A)。この傾きを  $I(0)$  の初速度とした。算出した初速度の対数をタンパク質初濃度の対数に対してプロットした (図 2-6B)。この傾きは 2.44 となり、初期反応では 2 つの 2 量体が結合して 4 量体を形成する 2 次反応と、3 つの 2 量体が結合して 6 量体を形成する 3 次反応が起きていると示唆された。

### 2.3.5 シンプルモデル

TR-SAXS のデータから中間体を推定する方法として、特異値分解解析がある。これは、アセンブリ反応中に有意に蓄積する分子種の数と散乱関数を知ることができる。しかしながら、S/N の問題から、TR-SAXS のデータからは 1 種類程度の中間体しか決定することはできない (Doniach, 2001)。しかしながら、フェリチンやウイルス・キャプシドのアセンブリが 1 種類の中間体だけを持つとは考えられない。TR-SAXS を用いて P22 ファージのアセンブリを研究し、特異値分解解析で 1 種類の中間体を推定した実験例がある (Tuma et al., 2008)。その中間体は、全中間体の平均構造だと考えられ、TR-SAXS のデータから特異値分解解析を用いて、中間体を決定することの難しさを示している。そこで、Gerl と Jaenicke によって提案されたモデルを使用して、観測値の再現を試みた (数式 1-1)。しかしながら、本研究の実験系では初期構造は 2 量体であり、中間体として奇数のサブユニットを持つオリゴマーは考えにくい。これに対して、彼らの実験系では初期構造が変性した単量体であり、中間体として構造を持った単量体と 3 量体の蓄積が示されている (図 1-6)。そこで、彼らのモデルを修正した反応スキームを考えた。これをシンプルモデルとする。



$M_{2n}$  は  $2n$  のサブユニットで形成されたオリゴマーを、 $k_i$  は速度定数を表している。数式 2-5, 6 は初速度法の結果から仮定された。6 量体は 4 種類、12 量体は 24 種類のアイソマーが存在している (図 2-12)。このスキームでは 1 種類の 6 量体と 12 量体を考えた (図 2-7)。3 回転対称形の 6 量体は、相補的な接触面を持っているため、4 種類のアイソマーの中で一番安定であると考えられる。そのため、この 3 回転対称を構成している 6 量体を採用した。また、この 6 量体が 2 つ結合して形成される 12 量体は 1 種類だけである。これらのスキームから反応速度式を作成した。

$$\begin{aligned} \frac{d[M_2]}{dt} = & -k_1[M_2]^2 - k_2[M_2]^3 - k_3[M_2][M_4] \\ & + 2k_{-1}[M_4] + 3k_{-2}[M_6] + k_{-3}[M_6] \end{aligned} \quad \text{数式 2-10}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[M_4]}{dt} = & \frac{1}{2}k_1[M_2]^2 - k_3[M_2][M_4] \\ & - k_{-1}[M_4] + k_{-3}[M_6] \end{aligned} \quad \text{数式 2-11}$$

$$\frac{d[M_6]}{dt} = \frac{1}{3}k_2[M_2]^3 + k_3[M_2][M_4] - k_4[M_6]^2 - k_{-2}[M_6] - k_{-3}[M_6] + 2k_{-4}[M_{12}] \quad \text{数式 2-12}$$

$$\frac{d[M_{12}]}{dt} = \frac{1}{2}k_4[M_6]^2 - k_5[M_{12}]^2 - k_{-4}[M_{12}] + 2k_{-5}[M_{24}] \quad \text{数式 2-13}$$

$$\frac{d[M_{24}]}{dt} = \frac{1}{2}k_5[M_{12}]^2 - k_{-5}[M_{24}] \quad \text{数式 2-14}$$

これらの反応速度式は解析的に解くことができない。そのため、4 次のルンゲ・クッタ法を用いて近似解を得た。2 量体、4 量体、6 量体、12 量体、24 量体の単位質量濃度あたりの  $I(0)$ 、 $R_g$  (表 2-2) を CRY SOL (Svergun et al., 1995) を用いて算出した。反応速度式の近似解と、それぞれの  $I(0)$  と  $R_g$  を数式 2-3、2-4 に代入した。得られた  $I(0)$ 、 $R_{app}$  と常微分方程式を解くためのソフトウェア (Berkeley Madonna, バージョン 9.0) を使用して、様々なタンパク質濃度において観測された値の上昇に対して、フィッティングを行った。その結果、同じ速度定数 (表 2-3) を用いて、様々な濃度の  $R_{app}$  と  $I(0)$  の上昇を再現することができた。(図 2-8)。

モデルの正当性を確かめるために、初速度法の再現を行った。 $I(0)$  の初速度を算出した時間域で、実験値と再構成データから求められた  $I(0)$  の上昇を比較した (図 2-9A)。実験値に比べて、再現された  $I(0)$  の上昇は、直線性が低かった、しかしながら、再現値から初速度を算出し、初速度法を行ったところ初期反応の次数は 2.54 と実験値である 2.44 に近い値となった (図 2-9B)。アセンブリ反応中における各オリゴマーの濃度変化を、反応速度式の近似解と表 2-3 の速度定数を用いて算出した。初期反応種である 2 量体が涸渇することや中間体がトラップされていないことが分かる (図 2-10)。それゆえ、シンプルモデルは、第一次近似としては良いモデルであるといえる。

フィッティングの結果から得られた 2 から 24 量体の濃度と、CRY SOL で計算した散乱関数を用いて、カイネティックデータの再現を行った (図 2-11)。反応の前

半や後半での再現率は高いが、24 量体量が少なく、中間体の蓄積量が多くなるような時間帯では、散乱強度の極小付近での再現率が低くなった。これは、シンプルモデルが完全に正しくないことを示している。

### 2.3.6 全構造モデル

シンプルモデルでアセンブリ反応中の  $I(0)$  と  $R_{app}$  の上昇を同じ速度定数を使用して再現できた。そのため、シンプルモデルは良い近似であるといえる。しかしながら、実際のアセンブリメカニズムはより複雑であると考えられる。シンプルモデルでは中間体として、4 量体、6 量体、12 量体だけを考えたが、他の中間体の存在が示唆されている。初速度法の結果から、初期反応として 2 次反応と 3 次反応を考えたが、これは 4 量体が 2 つ結合して 8 量体を形成、3 つ結合して 12 量体を形成する可能性を暗に示している。また、安定性の観点から 3 回転対称を構成している 6 量体だけを考えたが、その他の 6 量体も 4 量体と同じ接触面を持っているため、これらが全く形成されないとは考えにくい。さらに、中間体の蓄積はその安定性だけでなく、他のオリゴマーへの変化速度にも依存するため、蓄積しないからといって形成されないとは限らない。そこで私は、考えられる全ての構造を経由する全構造モデルを考えた。初期構造が 2 量体であるため、中間体は偶数のサブユニットを持つものしか存在しないとした。全ての構造を図 2-12 に表した。14 量体の 32 種のアイソマーを最大とした 127 種類の構造が存在していることが分かった。それぞれの構造の単位質量濃度あたりの  $I(0)$  と  $R_g$  を表 2-4 にまとめた。 $I(0)$  は、同じサブユニット数から構成されているアイソマーでは、ほとんど同じ値を示したため平均値を用いることにした。全構造を経由する全ての反応を考えて、それぞれに別々の速度定数を割り当てることは、実質的に不可能である。そこで、反応速度式を簡略化するために、9 個の仮定を導入した。

- i) 4 次以上の反応は考慮しない。
- ii) 解離反応に関しては、2 つの分子に分離する反応しか考えない。
- iii) 最終構造である 24 量体は解離しない。
- iv) 2 次反応に関して、初期反応と最終反応以外の速度定数 ( $k$ ) は等価である。

- v) 4 量体形成と 24 量体形成に関しては個別の速度定数 ( $k_f$  と  $k_r$ ) を割り当てる。
- vi) 3 次反応に関して、初期反応以外の速度定数 ( $k_k$ ) は等価である。
- vii) 6 量体形成に関しては個別の速度定数 ( $k_{kf}$ ) を割り当てる。
- viii) 解離反応に関して、速度定数 ( $k_{-}$ ) は等価である。
- ix) 2 次反応、3 次反応、解離反応に関して、いくつかの段階を経由する必要がある反応において、経由しなければならない段階を考えない。例えば、 $M_{6a}$  に  $M_2$  が結合して、 $M_{8a}$  を形成する反応では、以下の 3 つの段階を経由する必要がある (図 2-12)。

1.  $M_{6a} \rightarrow M_2 + M_4$
2.  $M_2 + M_4 \rightarrow M_{6b}$
3.  $M_2 + M_{6b} \rightarrow M_{8a}$

上記の反応を以下のように近似する。



i) に関しては、初速度法の結果より推定された。初速度法から、初期反応は 2 次と 3 次反応であると考えられる。そのため、続く反応も 4 次以上の反応は起こらないとした。iii) に関しては、24 量体が安定であるため導入した。これは精製中、またリアセンブリ後に低オリゴマーのバンドが見えないことから、妥当である (図 2-3C, D)。ii)、iv)、vi)、viii)、ix) に関しては、反応速度式を簡略化するために導入した。v)、vii) に関しては、初期反応と最終反応には別の速度定数を割り当てないと、実験値を再現できないために導入した。これらの反応を図示すると図 2-13 のようになる。8 量体から 22 量体の中間体に関しては、代表例として 1 つの構造を載せてある。全構造モデルから 12 個の反応速度式を作成した (付録 5-1)。この反応速度式の作成には、perl 言語で作成したプログラムと文書処理システム (LaTeXiT) を用いた。具体的には、perl プログラムで数式を描画するためのソースコードを出力し、それを LaTeXiT でコンパイルして、数式の画像を得た。反応速度式中で、 $[M_{2n}]$  は  $2n$  のサブユニットで形成されたオリゴマー濃度の合計値、 $m_{2n}$  は  $2n$  のサブユニットで形

成されたオリゴマーの構造数を表している。統計ファクターを考慮するために、各速度定数は構造数で重み付けされている。当然、これらの反応速度式を解析的に解くことはできないので、シンプルモデルのときと同様に4次のルンゲ・クッタ法を用いて近似解を得た。各オリゴマーの単位質量濃度あたりの  $I(0)$  と  $R_g$ 、近似解を数式 2-3、4 に代入した。得られた  $I(0)$ 、 $R_{app}$  を Berkeley Madonna を用いて、様々なタンパク質濃度において観測された値の上昇に対して、フィッティングを行った。同じ速度定数 (表 2-5) を用いて、 $R_{app}$  と  $I(0)$  の上昇を再現することができた (図 2-14)。

モデルの正当性を確かめるために、初速度法の再現を行った。実験値から初速度を算出した時間域で、実験値とフィッティングで求められた  $I(0)$  の上昇を比較した (図 2-15A)。シンプルモデルよりも、再現値の直線性が高いことが分かる。再現値から初速度を算出し、初速度法を行ったところ初期反応の次数は 2.45 と実験値である 2.44 を完全に再現できた (図 2-15B)。また、フィッティングの精度を表す RMS もシンプルモデルの 14.20 に対して全構造モデルは 13.69 と向上した。そのため、全構造モデルはシンプルモデルよりも、Ftn のアセンブリをより良く説明することができた。アセンブリ反応中における各オリゴマーの濃度変化を、反応速度式の近似解と表 2-5 の速度定数を用いて算出した。シンプルモデルと同様に、初期反応種である 2 量体が涸渇することや中間体がトラップされることもないことが分かる (図 2-16)。中間体の蓄積は 4 量体が最も多く、他のオリゴマーはサブユニット数が増えていくほど蓄積量が減少していく傾向にあった。Stefanini とその共著者は、酸性解離した HSF 溶液の pH を上昇させることで、部分的にアセンブリを起こさせ、その反応を超遠心実験で追跡した (Stefanini et al., 1987)。超遠心分析の時間域では、ほとんど反応が終了していたが、解離種のピークが 2 量体から 8 量体のアンサンブルであることが明らかとなった。また、解離種と 24 量体のピークの間には有意なベースラインの上昇が確認されたため、10 量体以上のオリゴマーの存在も示唆されている。本実験と Stefanini の実験では、タンパク質濃度と初期構造は同等であるが、pH が異なる (表 2-6)。そのため、実験結果を直接比較することはできないかもしれないが、低分子量のオリゴマーが多く蓄積するという現象は共通している。また、Gerl と Jaenicke の実験では中間体蓄積の様相は異なるが、多くの中間体が存在することが示唆されている (図 1-6)。それゆえ、私は、全構造モデルをフェリチンの

アセンブリメカニズムとして提案する。

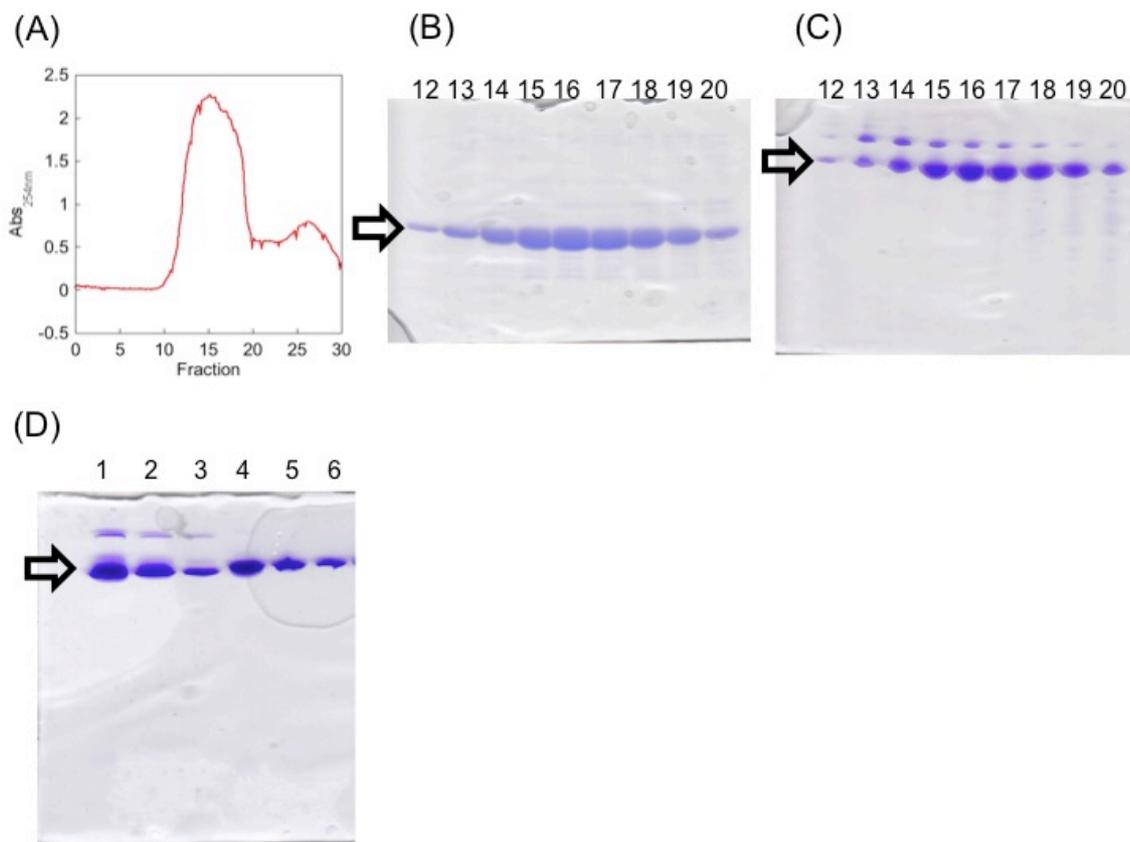


図 2-3 会合体の酸性 pH での解離

Sephacryl S-300 による精製は、流速 100 mL/hr、分画 5 min/本、4 °C で行った。チャート (A) のピーク付近のフラクションを SDS-PAGE (B)、NATIVE-PAGE (C) で分析した。電気泳動図上の数字はフラクション番号を表している。矢印は SDS-PAGE では、Ftn サブユニットの、NATIVE-PAGE では、24 量体 Ftn のバンド位置を示している。凍結乾燥後の Ftn を 20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0 に溶解させたサンプル (レーン 1-3)、一度、50 mM リン酸ナトリウム, pH 2.5 で 2 量体化させ、そこから pH を 6.8 に上昇させることでリアセンブリさせたサンプル (レーン 4-6) を NATIVE-PAGE で分析した (D)。それぞれ濃度の異なる 3 サンプルが用意され、左から順に 2、1.5、1 mg/mL である。

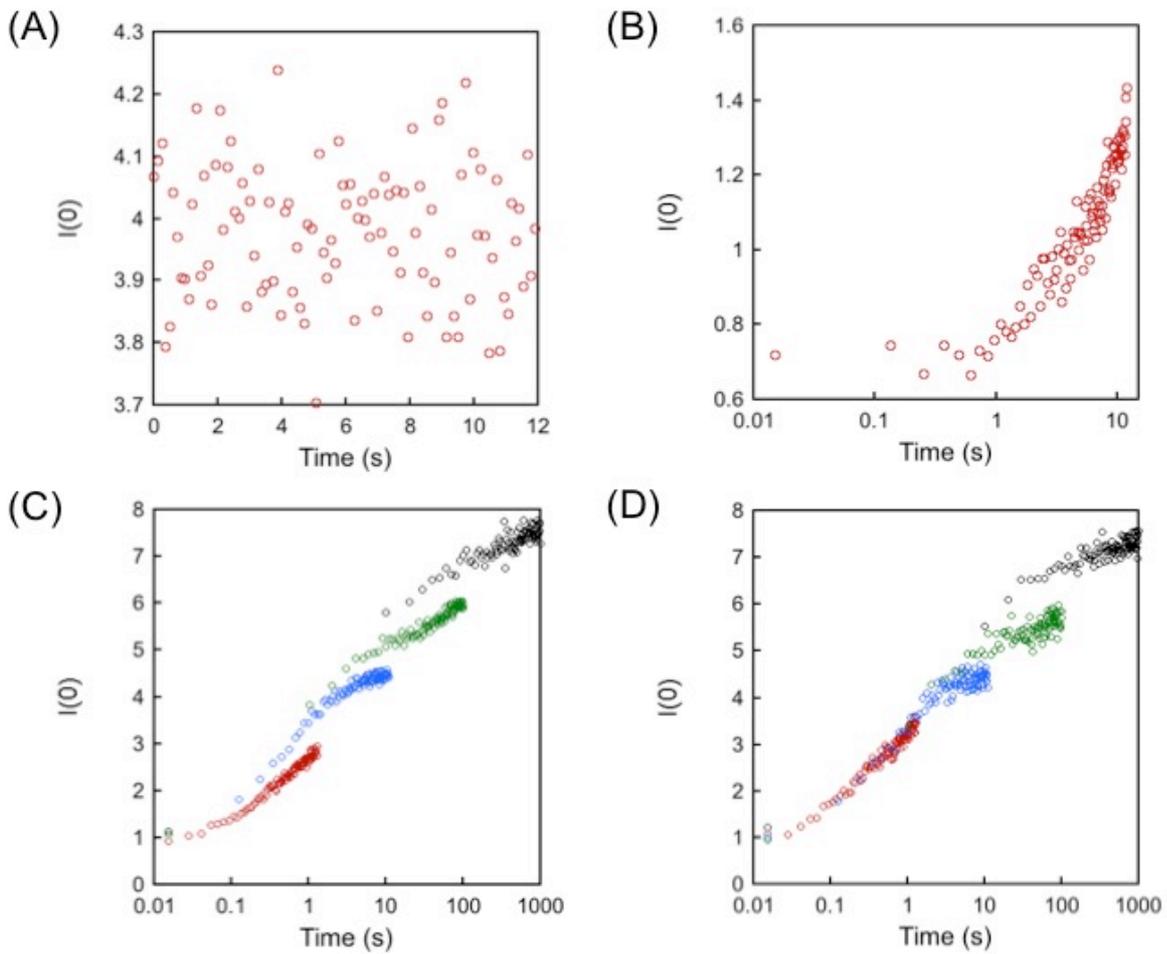


図 2-4 Ftn の X 線ダメージ評価

Ftn の天然状態 (A) と酸解離状態 (B) を露光時間 10 ミリ秒、照射回数 100 回で SAXS 測定した。天然状態では、この条件では、ダメージはあらわれなかったが、酸解離状態は 10 回ほどの照射が限界であった。Ftn の再集合反応を露光時間 10 ミリ秒、照射回数 100 回、様々なインターバルで測定した (C)。アッテネーターを使用して、(C) と同様の測定を行った (D)。

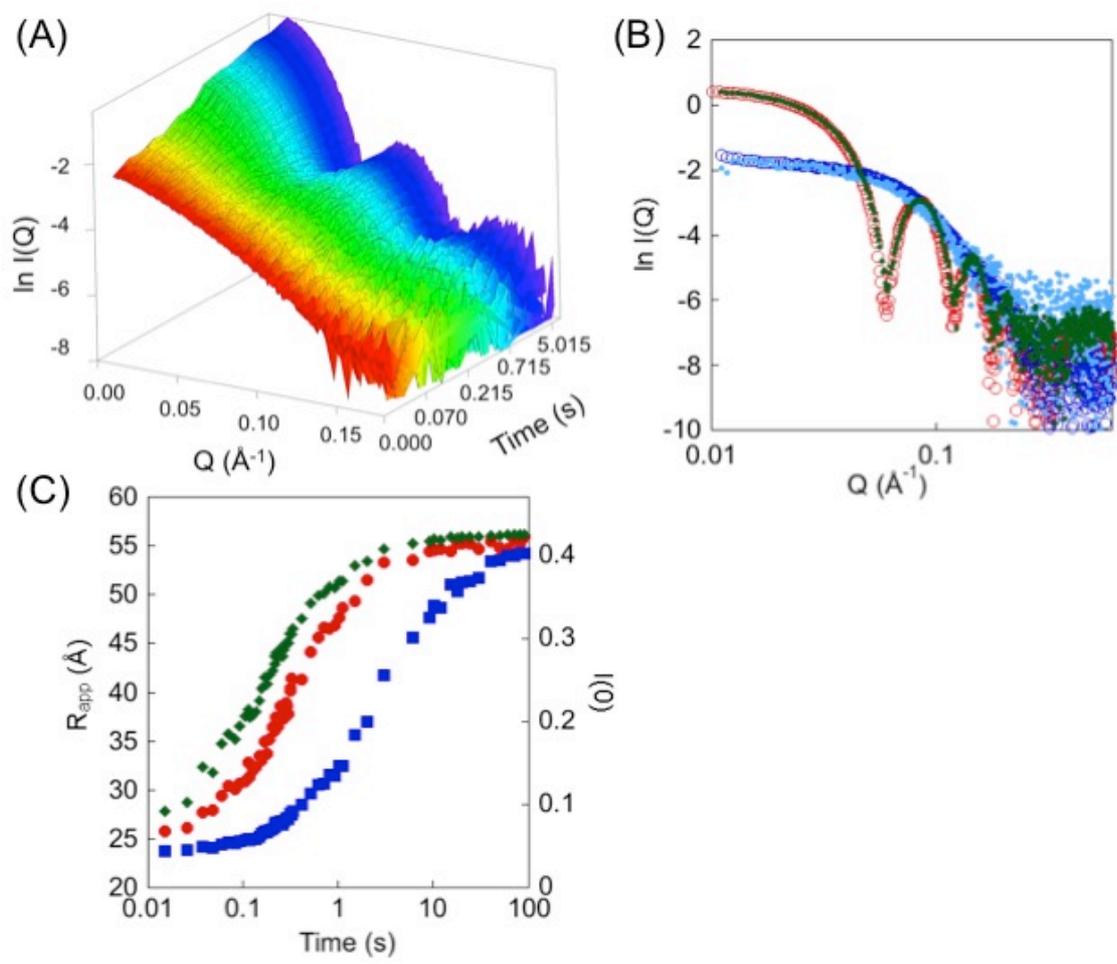


図 2-5 アセンブリ反応中の SAXS の変化

アセンブリ反応中の SAXS の経時変化を 3D プロットした (A)。測定は pH 8.0、25 °C、タンパク質濃度 5.0 mg/mL で行われた。天然状態 (○)と再集合状態 (●)の SAXS、酸解離状態 (○)とアセンブリ開始初点 (●)の SAXS をそれぞれ比較した (B)。アセンブリ反応中の  $R_{app}$  (●)と  $I(0)$  (■)の上昇カーブをプロットした (C)。2 量体と 24 量体しか蓄積しないと仮定して  $R_{app}$ (◆)を再構成した。

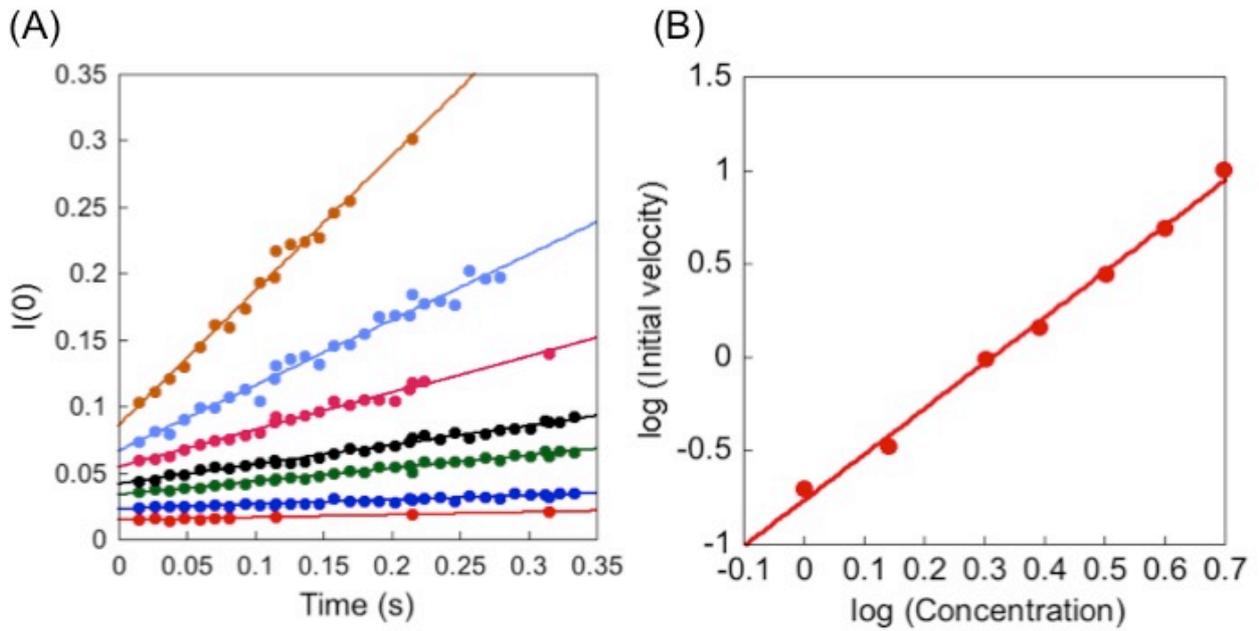


図 2-6 初速度法

$I(0)$ が直線的に増加する初期領域をプロットした (A)。測定は 1.0 (●)、1.4 (●)、2.0 (●)、2.5 (●)、3.2 (●)、4.0 (●)、5.0 mg/mL (●) のタンパク質濃度で行った。初速度の対数をタンパク質初濃度の対数に対してプロットした (B)。傾きは 2.44 となった。

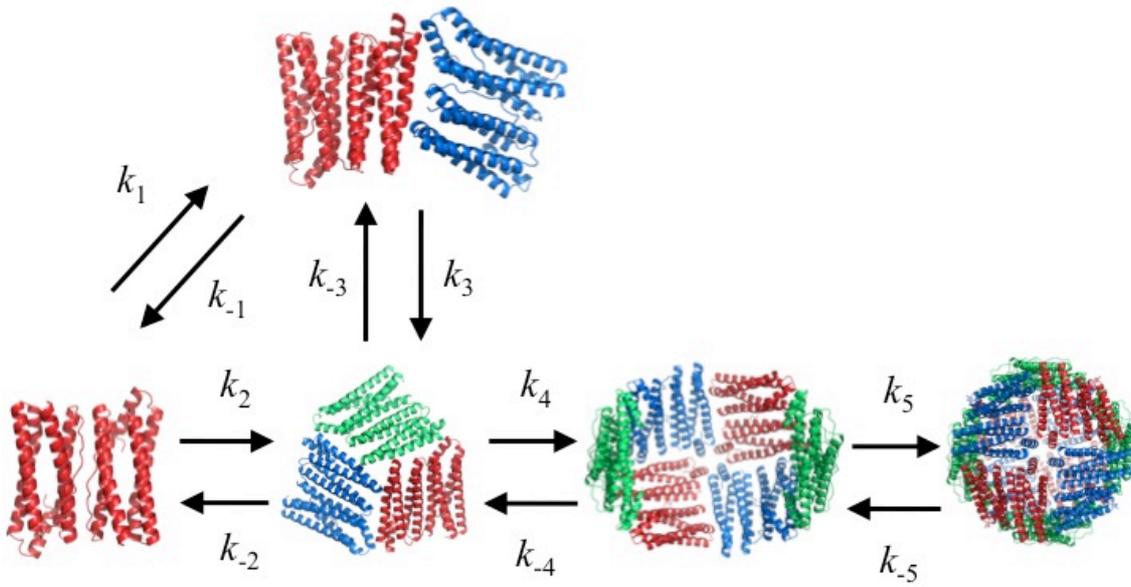


図 2-7 シンプルモデルの反応スキーム

Gerl と Jaenicke の提案したモデルを修正することで作成した。3 回転対称形の 6 量体を構成する 2 量体を赤、青、緑で色付けした。

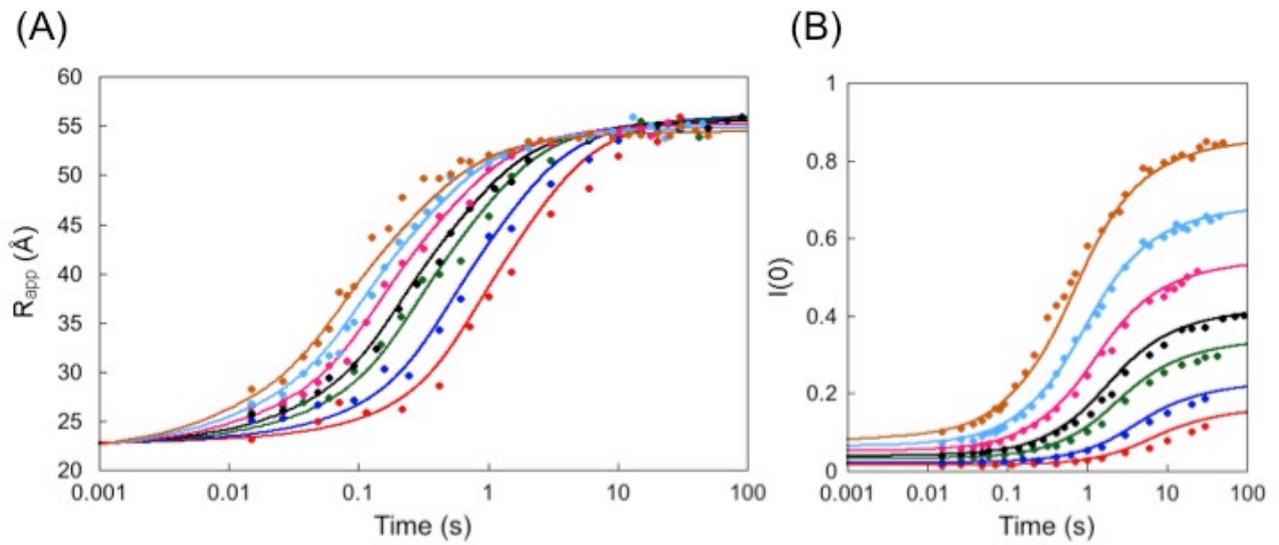


図 2-8 シンプルモデルを用いた  $I(0)$ 、 $R_{app}$  の再構成

シンボルは観測された値を示している。1.0 mg/mL (●)、1.4 mg/mL (●)、2.0 mg/mL (●)、2.5 mg/mL (●)、3.2 mg/mL (●)、4.0 mg/mL (●)、5.0 mg/mL (●)。実線は再構成したデータを示していて、色は観測値に対応している。

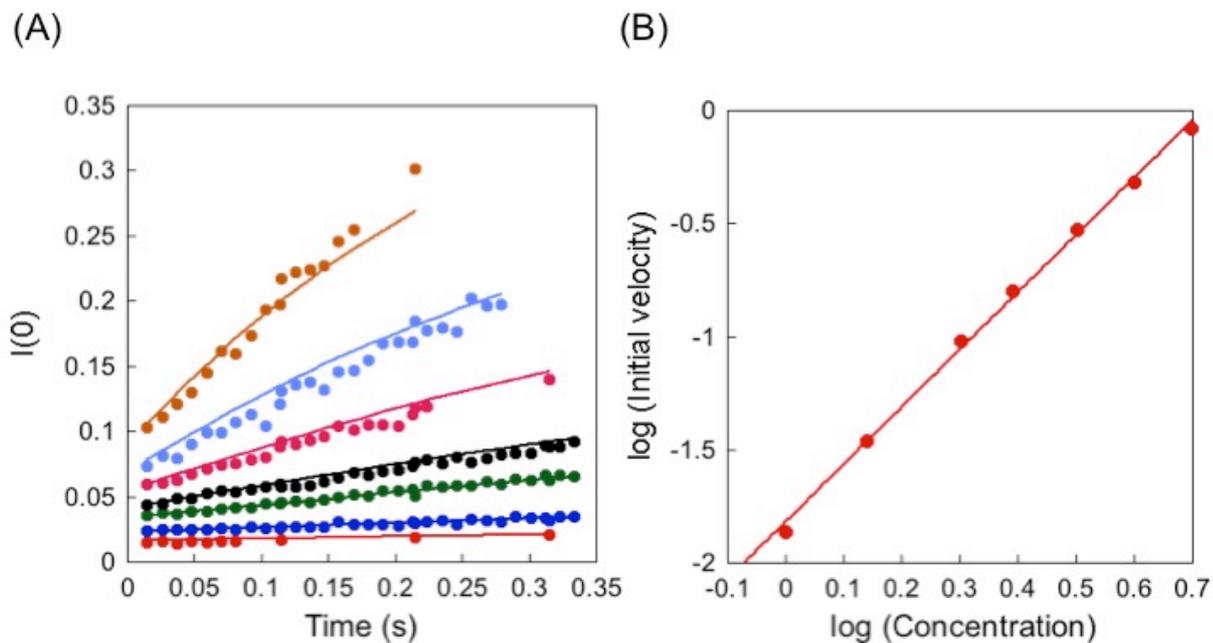


図 2-9 シンプルモデルで再現された初速度

実験値から初速度を算出した時間域の  $I(0)$  の上昇を示している (A)。シンボルは観測された値を示している。1.0 mg/mL (●)、1.4 mg/mL(●)、2.0 mg/mL(●)、2.5 mg/mL(●)、3.2 mg/mL(●)、4.0mg/mL(●)、5.0 mg/mL (●)。実線は再構成されたデータを示していて、色は観測値に対応している。実験値と同じ時間域で、再現値から初速度を算出し、初期反応次数を見積もった (B)。傾きは 2.54 となった。

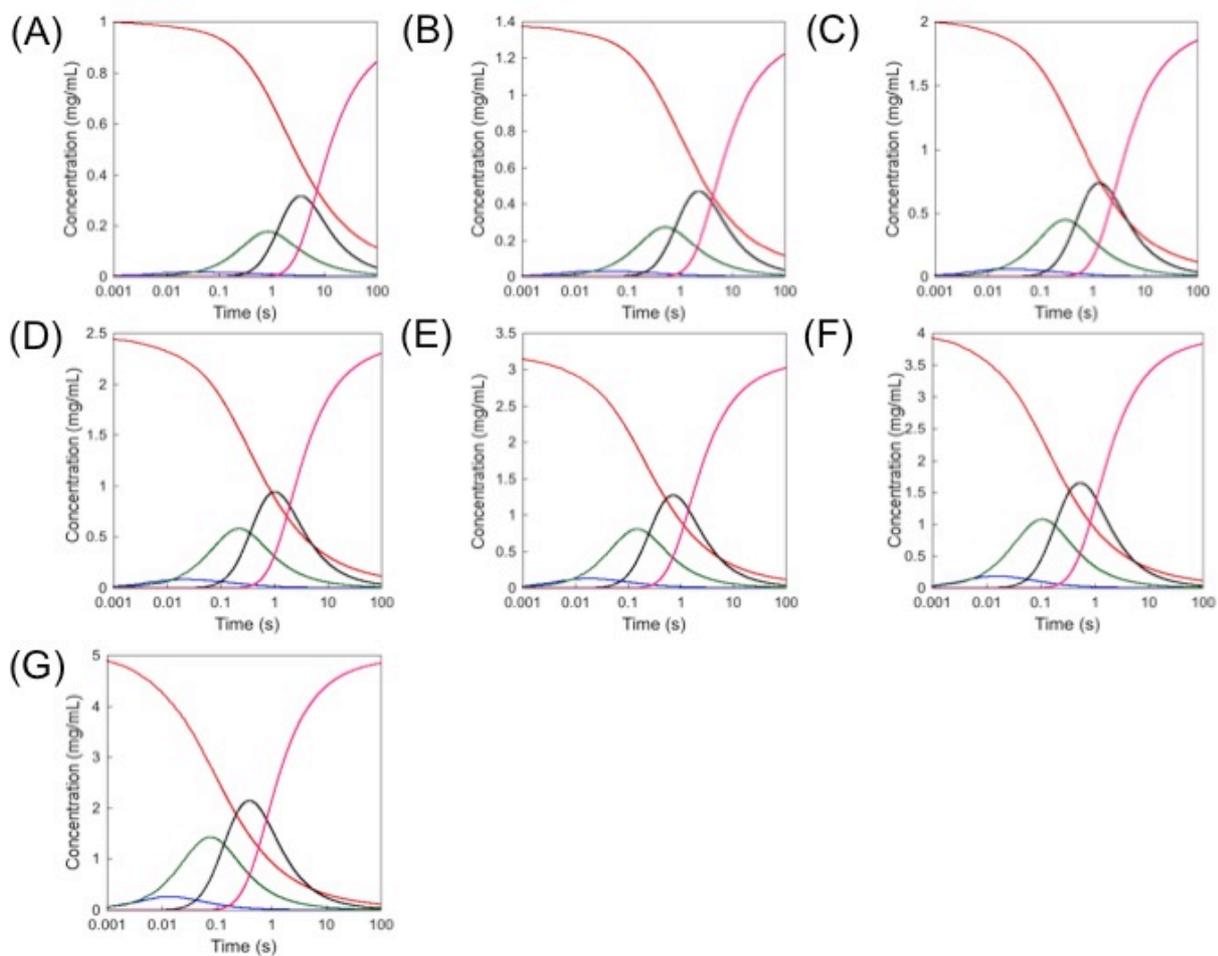


図 2-10 シンプルモデルにおける中間体の蓄積

2 量体 (赤)、4 量体 (青)、6 量体 (緑)、12 量体 (黒)、24 量体 (マゼンタ)。(A)1.0 mg/mL、(B)1.4 mg/mL、(C)2.0 mg/mL、(D)2.5 mg/mL、(E)3.2 mg/mL、(F)4.0 mg/mL、(G)5.0 mg/mL。

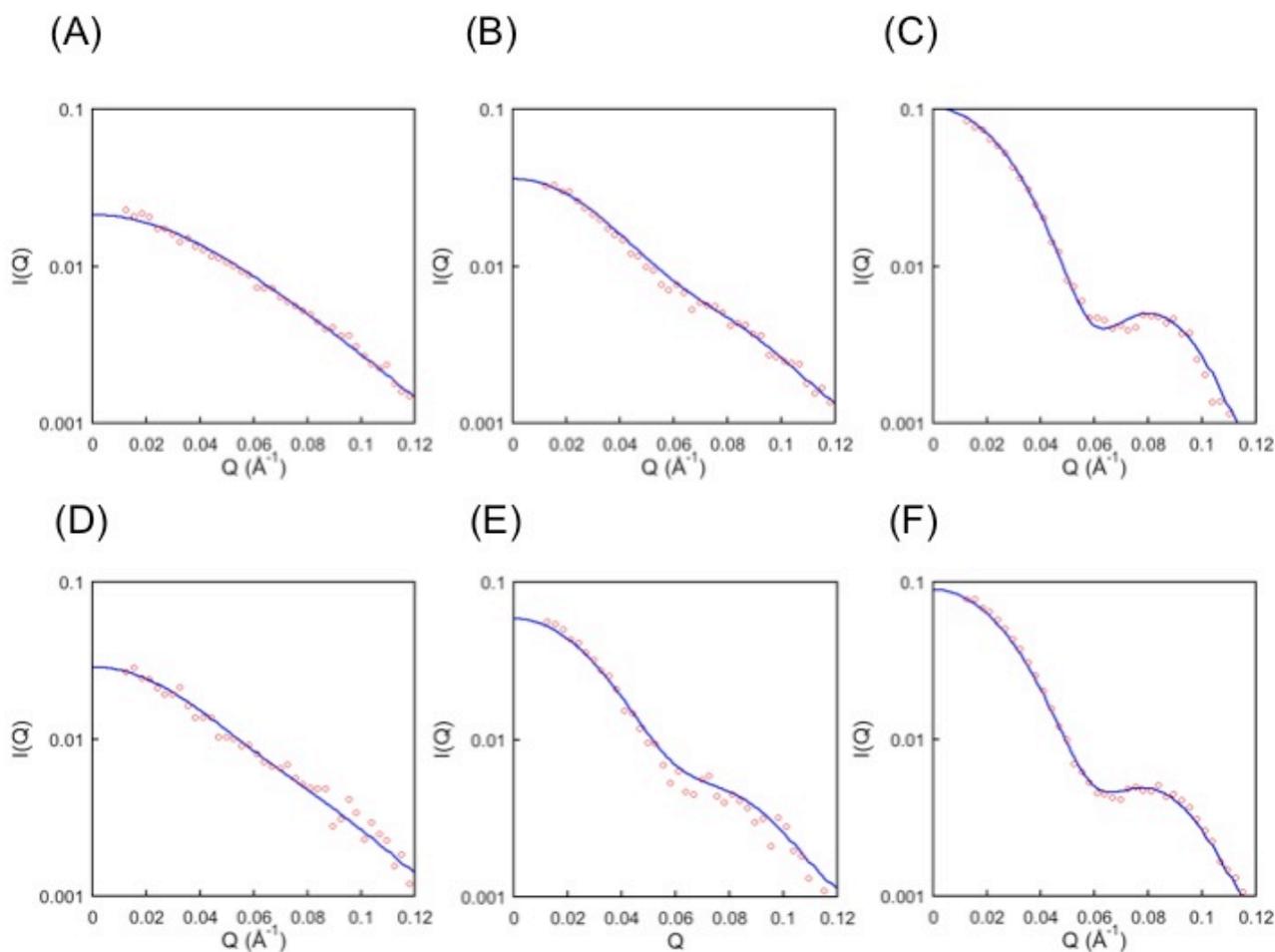
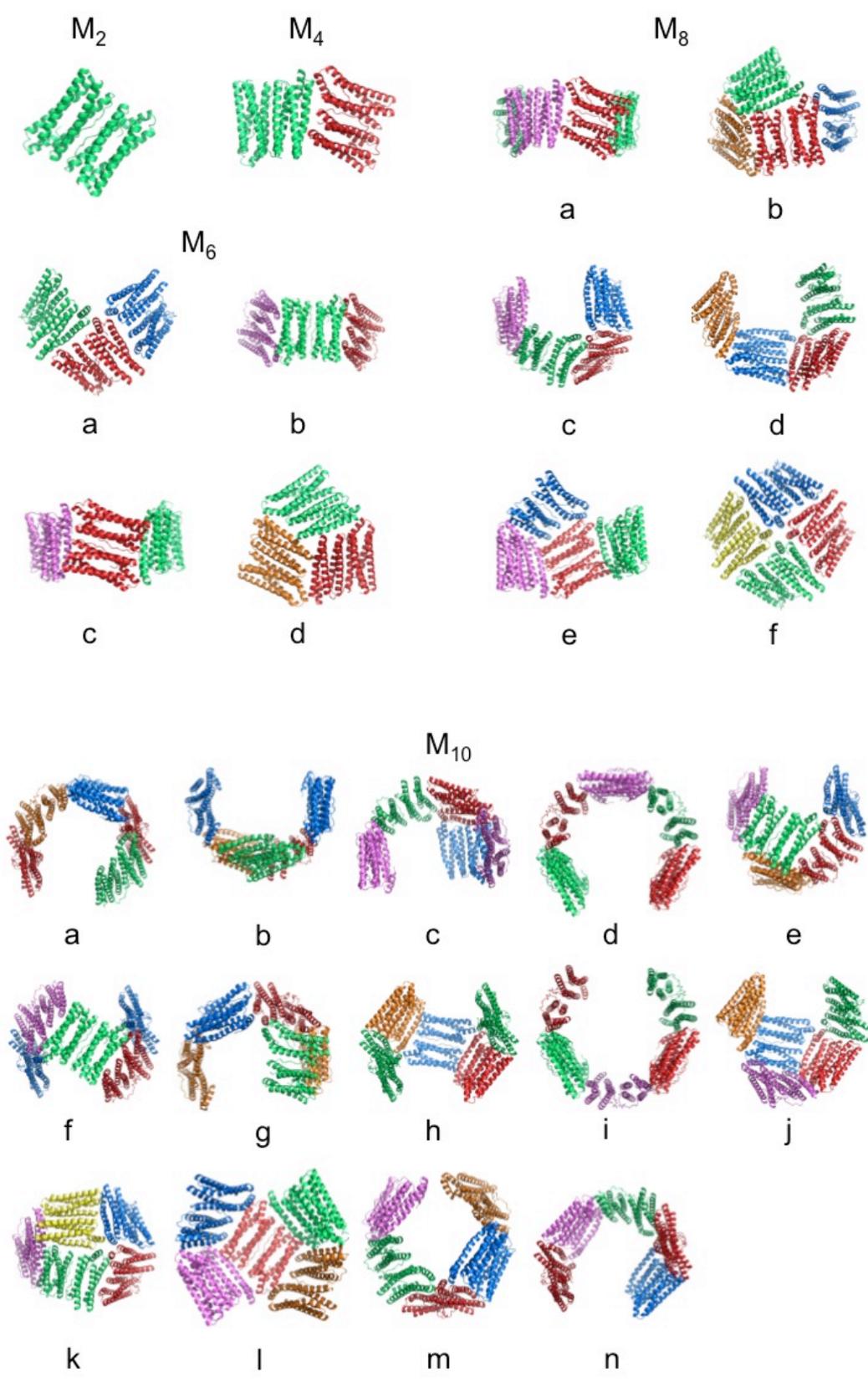
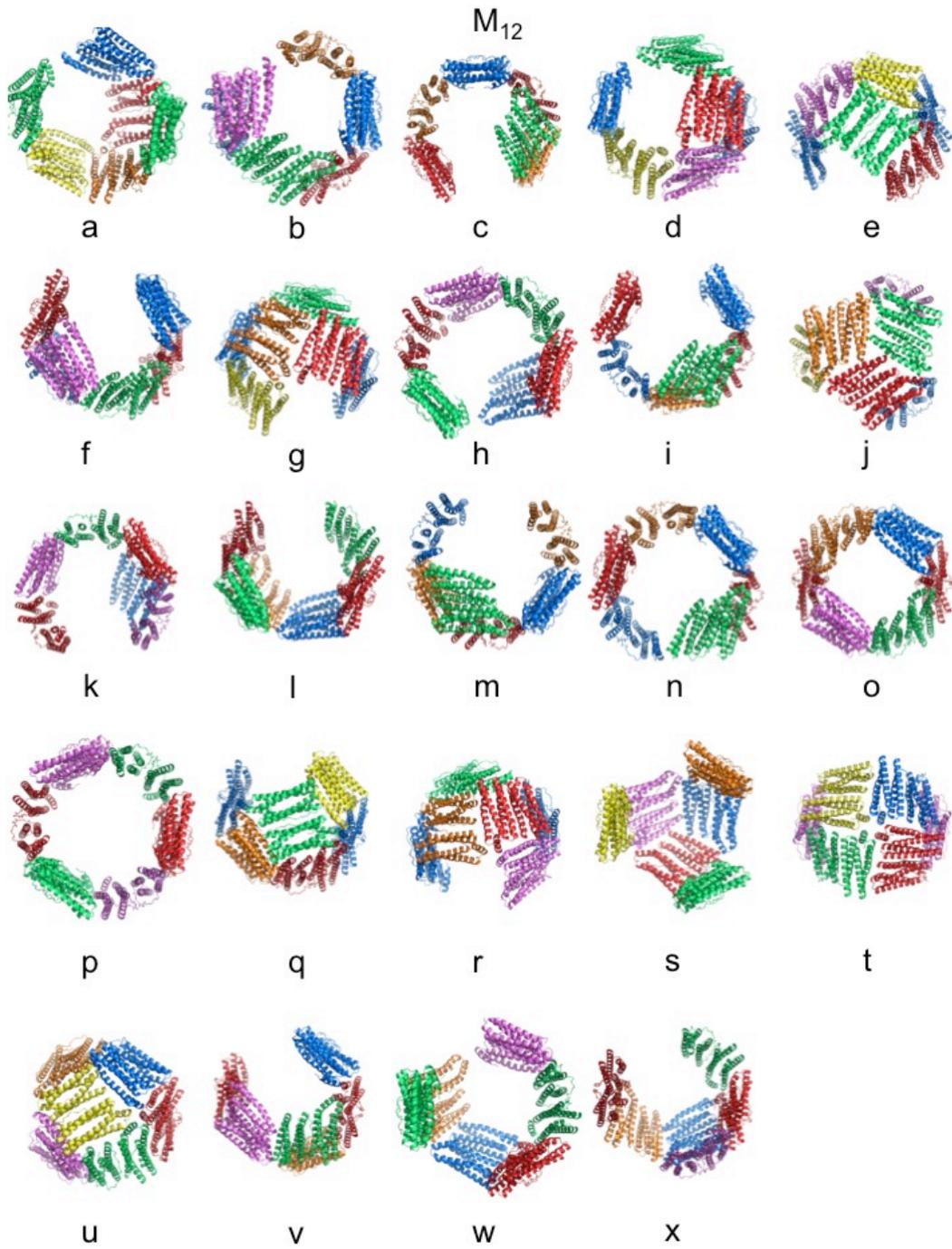
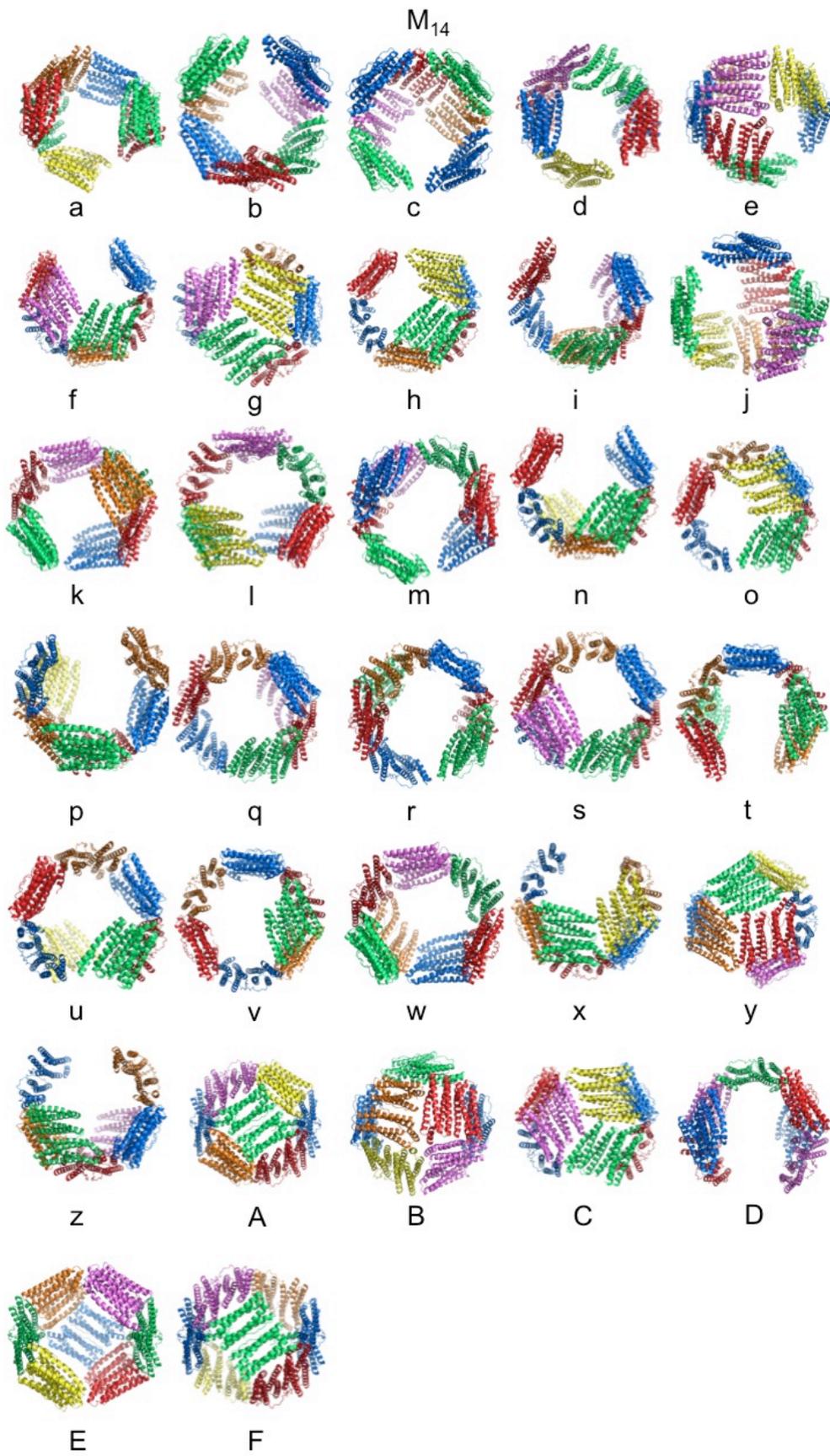


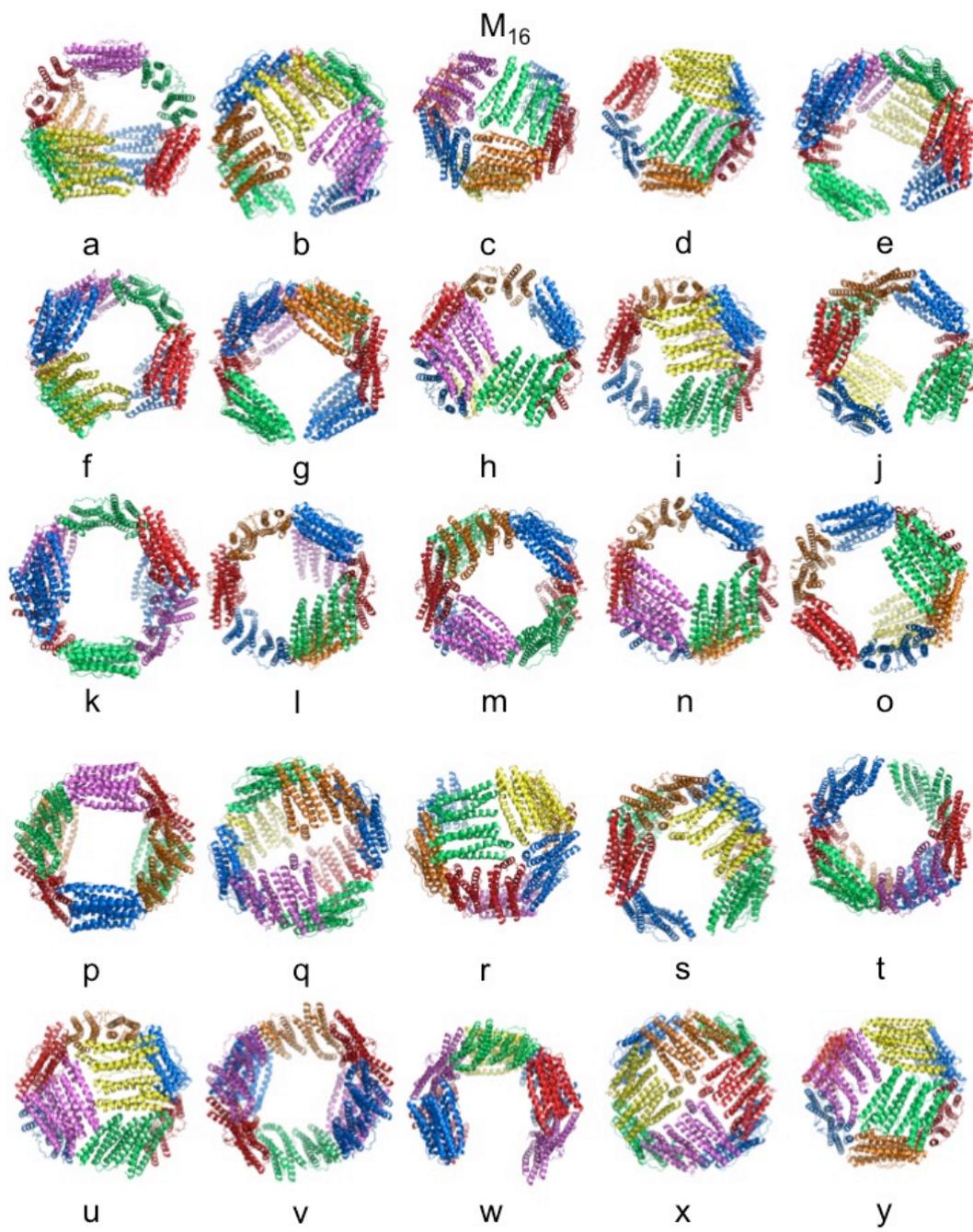
図 2-11 シンプルモデルでのカイネティックデータの再現

観測された散乱関数は赤い丸、再現された散乱関数は青い実線で示した。反応の前半 (A, D)、後半 (C, F)の再現率は高いが、2 $\theta$  量体量が少なく、中間体の蓄積量が多くなるような時間域 (B, E)では、再現率が低くなる。(A): 0.048 s、(B): 0.215 s、(C): 2.015 s、(D): 0.092 s、(E): 0.415 s、(F): 1.015 s。(A - C): 3.2 mg/mL、(D - F): 4.0 mg/mL。









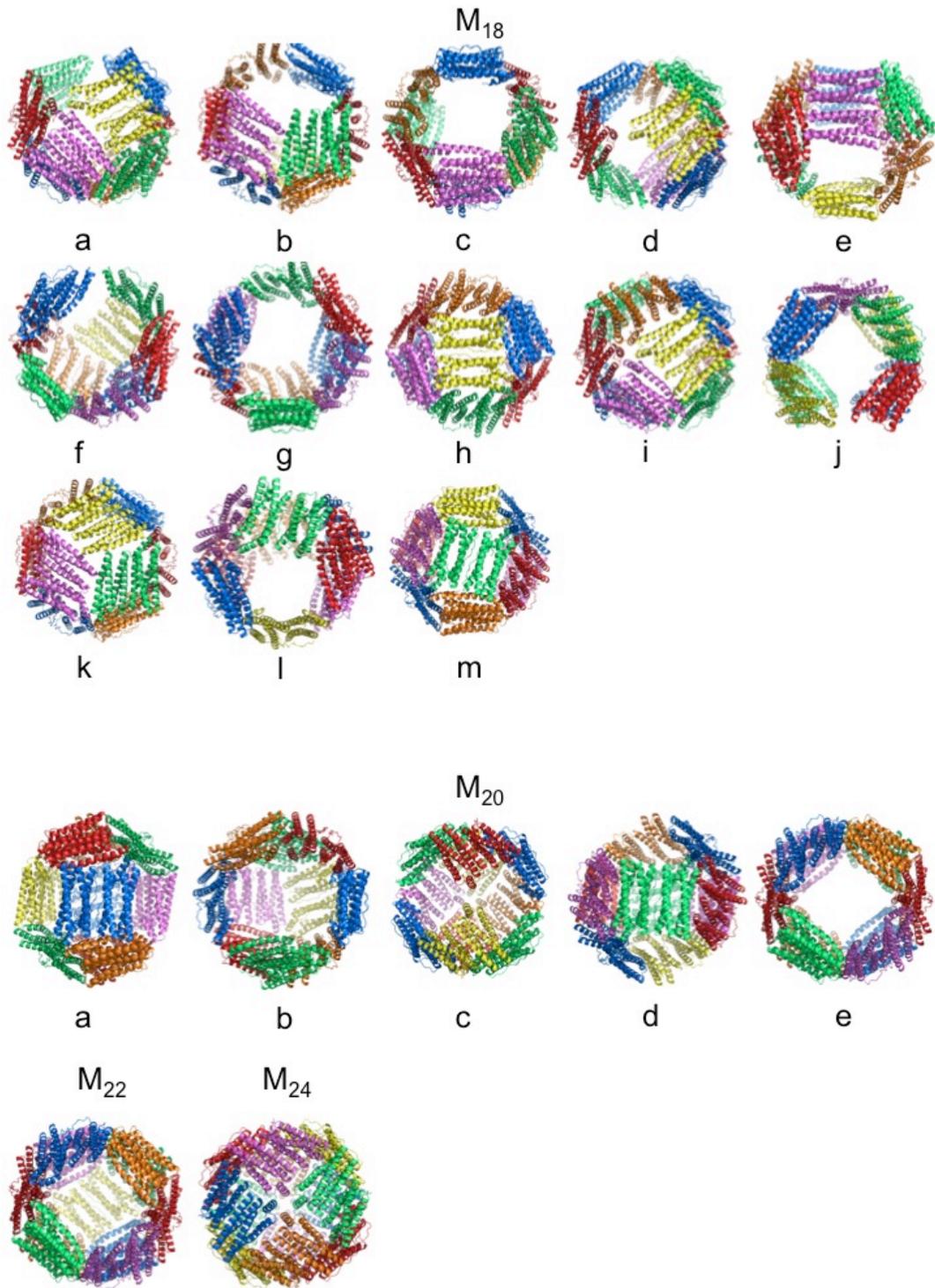


図 2-12 Ftn の考えられる全構造

向かい合う 2 量体が同じ色になるように、赤、青、緑、黄、マゼンタ、オレンジを使用して色付けした。

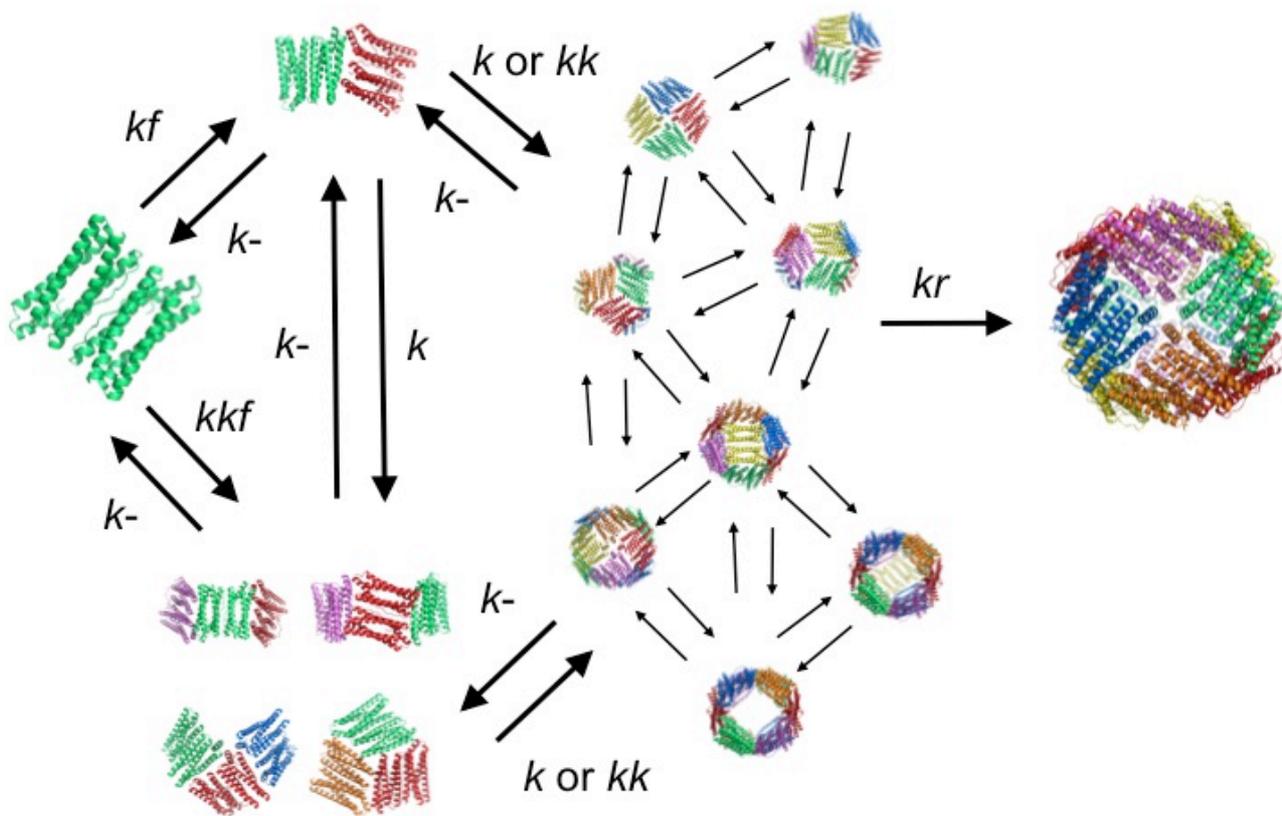


図 2-13 全構造モデルのスキーム

8 量体から 22 量体は代表例として 1 つの構造を載せてある。

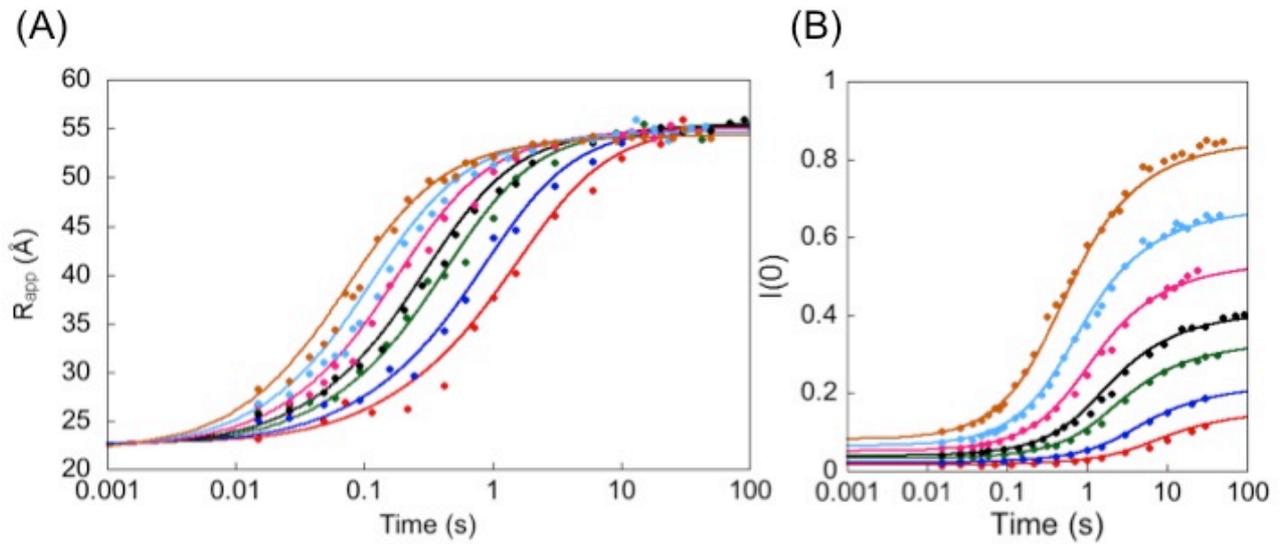


図 2-14 全構造モデルを用いた  $I(0)$ 、 $R_{app}$  の再構成

シンボルは観測された値を示している。1.0 mg/mL (●)、1.4 mg/mL (●)、2.0 mg/mL (●)、2.5 mg/mL (●)、3.2 mg/mL (●)、4.0 mg/mL (●)、5.0 mg/mL (●)。実線は再構成データを示していて、色は観測値に対応している。

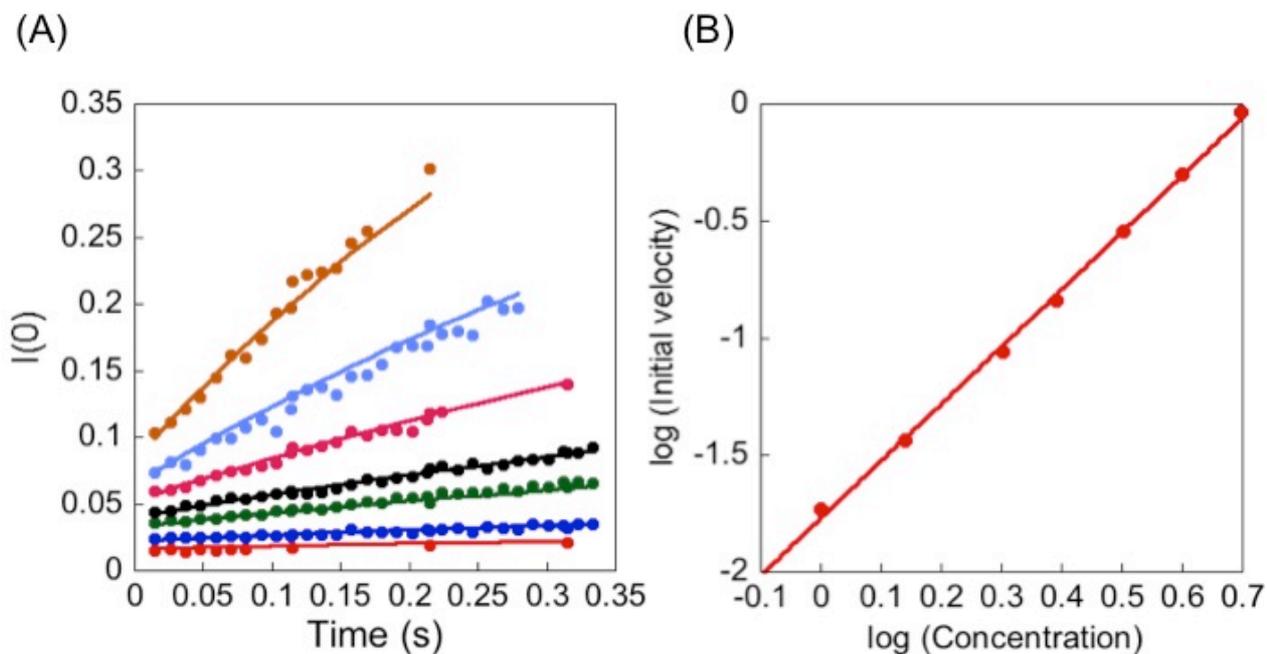


図 2-15 全構造モデルで再現された初速度

実験値から初速度を算出した時間域の  $I(0)$  の上昇を示している (A)。シンボルは観測された値を示している。1.0 mg/mL (●)、1.4 mg/mL (●)、2.0 mg/mL (●)、2.5 mg/mL (●)、3.2 mg/mL (●)、4.0 mg/mL (●)、5.0 mg/mL (●)。実線は再構成データを示していて、色は観測値に対応している。実験値と同じ時間域で、再現値から初速度を算出し、初期反応次数を見積もった (B)。傾きは 2.45 となった。

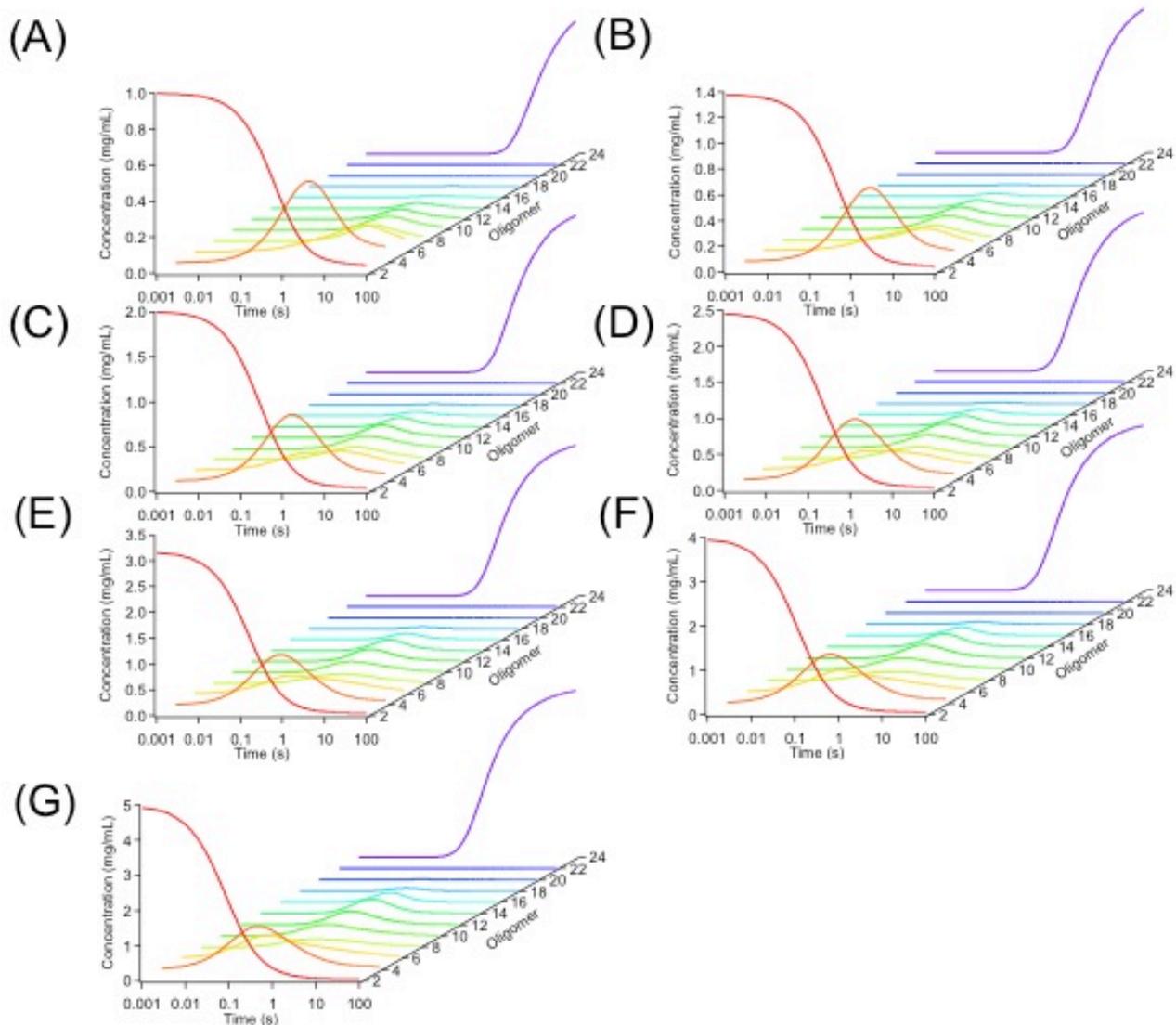


図 2-16 全構造モデルにおける中間体の蓄積

2量体から24量体へ向かって赤から紫色になるように色付けをした。各オリゴマーの蓄積量は、アイソマーの合計値となっている。(A)1.0 mg/mL、(B)1.4 mg/mL、(C)2.0 mg/mL、(D)2.5 mg/mL、(E)3.2 mg/mL、(F)4.0 mg/mL、(G)5.0 mg/mL。

表 2-2 原子座標から CRY SOL を用いて計算された単位質量濃度あたりの  $I(0)$  と  $R_g$

オリゴマー	$I(0)$	$R_g$
$M_2$	0.0163	22.7
$M_4$	0.0300	32.5
$M_6$	0.0433	36.4
$M_{12}$	0.0879	49.5
$M_{24}$	0.174	56.3

表 2-3 シンプルモデルで  $R_{app}$ ,  $I(0)$  の再現を行った際の速度定数

速度定数		
$k_1$	$1.06 \times 10^5$	/M s
$k_2$	$6.22 \times 10^8$	/M <sup>2</sup> s
$k_3$	$2.51 \times 10^5$	/M s
$k_4$	$7.39 \times 10^5$	/M s
$k_5$	$1.54 \times 10^5$	/M s
$k_{-1}$	$1.50 \times 10^2$	/s
$k_{-2}$	$4.82 \times 10^{-2}$	/s
$k_{-3}$	$1.87 \times 10^{-6}$	/s
$k_{-4}$	$1.36 \times 10^{-7}$	/s
$k_{-5}$	$6.75 \times 10^{-6}$	/s

表 2-4 全構造の単位質量濃度あたりの  $I(0)$  と  $R_g$

	Num.	$I(0)$	$R_g$ (Å)								
$M_2$	1	0.0163	22.7								
$M_4$	1	0.0300	32.5								
$M_6$	4	0.0443	39.5	41.8	41.7	36.4					
$M_8$	6	0.0587	49.3	43.2	46.6	46.6	43.1	41.9			
$M_{10}$	14	0.0733	52.1	48.7	49.7	54.0	48.0	51.1	49.7	51.1	
			54.0	48.0	45.8	45.8	50.3	52.1			
$M_{12}$	24	0.0879	52.1	53.6	54.0	52.0	50.5	53.3	50.5	55.0	
			53.3	51.5	54.0	53.3	53.3	54.9	52.8	55.4	
			50.5	50.4	51.5	49.5	48.4	52.8	53.6	52.8	
$M_{14}$	32	0.103	55.0	55.6	53.2	55.0	54.5	53.1	52.1	53.7	
			54.2	54.5	55.5	56.0	55.3	53.7	53.7	54.2	
			55.5	55.3	54.2	55.2	56.0	55.2	54.2	53.1	
			52.2	53.6	51.0	51.0	52.6	55.2	55.5	55.5	
$M_{16}$	25	0.117	55.7	54.5	54.0	54.9	54.8	55.6	55.2	55.7	
			54.9	55.6	55.8	55.7	55.2	54.7	55.5	55.7	
			56.2	54.0	54.8	55.2	53.2	55.7	54.7	52.7	
$M_{18}$	13	0.131	53.2								
			55.3	55.6	55.6	55.8	56.2	55.3	55.6	54.8	
$M_{20}$	5	0.146	54.5	55.8	54.1	56.2	54.8				
			55.9	55.5	55.6	55.9	56.1				
$M_{22}$	1	0.160	56.0								
$M_{24}$	1	0.174	56.3								

表 2-5 全構造モデルでフィッティングを行った際の速度定数

速度定数		
$k_f$	$5.20 \times 10^4$	/M s
$k$	$1.14 \times 10^3$	/M s
$kk_f$	$3.59 \times 10^8$	/M <sup>2</sup> s
$kk$	$6.76 \times 10^7$	/M <sup>2</sup> s
$k_{-}$	$1.90 \times 10^{-2}$	/s
$kr$	$1.21 \times 10^6$	/M s

表 2-6 本研究と HSF の研究との比較 (Stefanini et al., 1987; Gerl and Jaenicke, 1987b)

	本実験	Stefanini et al.	Gerl and Jaenicke
タンパク質濃度 (mg/mL)	1.0 – 5.0	1.5 – 3.0	0.0056 – 0.045
pH	8.0	3.5 – 4.0	8.0
初期構造	2 量体	2 量体	ランダムコイル

## 2.4 考察

Ftn は大腸菌内、もしくは精製中に 24 量体よりも大きい構造体を形成する (図 2-3C)。この構造体は、24 量体 Ftn と同様に酸性で解離し、pH を上昇させることで 24 量体へとリアセンブリすることが確認された (図 2-3D)。本研究室、大友秀明により、この会合体は鉄を取り込むことが示されている (Ohtomo et al., 2015)。そのため、この会合体はランダムコイル状になったサブユニットが非特異的に会合しているのではなく、24 量体同士が結合して形成されていると考えられる。この構造を保ったままの会合体はウマフェリチンやヒトフェリチンでも観測されている。HSF は 5-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の低濃度でさえも、リアセンブリ後に 24 量体よりも大きい構造体を形成する (Gerl and Jaenicke, 1987a)。この会合体は還元剤である DTE 存在下でも形成されるが、50%エチレングリコール存在下で 24 量体へ解離することが示唆されている。エチレングリコールは、タンパク質の疎水性相互作用を弱める働きがあるといわれているため、HSF における会合体形成の主たる原因はジスルフィド結合ではなく、疎水性相互作用であると考えられる。FTL を大腸菌内で発現させた場合、His-tag 精製を行った後にも関わらず、大きい会合体が存在していることが示されている (Baraibar et al., 2008)。本研究室、山本知輝 (山本 私信)により、FTL の会合体は還元剤である DTT 存在下でも解離しないことが示されている。これらの結果により、24 量体同士が結合したフェリチン会合体は、広い生物種で形成され、その原因は主に疎水性相互作用であると考えられる。

本研究で、Ftn のアセンブリメカニズムは TR-SAXS を用いて研究された。酸性解離した Ftn 溶液と高 pH の緩衝液を混合することでアセンブリ反応を開始させ、その反応を SAXS の変化により追跡した。Ftn は精製過程で 24 量体よりも大きい会合体を形成していることが示されているが、HSF とは異なり、リアセンブリの過程では会合体を形成しない (図 2-3D)。SAXS 測定は、会合体に対して非常に敏感であり、微量でもターゲットよりも大きい会合体を含むと、結果の解釈が複雑になってしまう。それゆえ、TR-SAXS でアセンブリ反応を追跡するという手法において、Ftn は非常に良いターゲットであるといえる。

Ftn に発生する X 線損傷を評価したところ、天然状態では総露光時間が 1 秒、酸解離状態では 100 ミリ秒以内であれば、顕著な X 線の損傷は起こらないことが示された (図 2-4A, B)。アセンブリ反応中の X 線損傷は、天然状態よりも激しく、総露光時間

は 100 ミリ秒から 300 ミリ秒が限界である (図 2-4C)。緩衝液の組成は、天然状態とアセンブリ反応中で同一であるため、24 量体よりもアセンブリ中間体の方が X 線損傷の影響を受けやすいと考えられる。酸解離状態では、測定 1 秒後から  $I(0)$  が上昇し始めたため、X 線損傷後、Ftn は会合体を形成していることを示唆している。一方、アセンブリ反応中では、 $I(0)$  が期待される値よりも小さくなるという、会合体形成以外の X 線損傷が発生していることを示唆する結果となった。これは、アセンブリ中間体が解離しているか、結合できなくなっているかのどちらか、または両方が原因であると考えられる。24 量体を形成しているときは、全サブユニットが他のサブユニットに囲まれているという末端が存在しない構造を持っている。そのため、何らかの X 線損傷が発生しても、それが  $I(0)$  に影響が出るまでラグが存在していると考えられる。しかしながら、アセンブリ中間体においては、末端構造が存在するため、X 線損傷が発生すると 24 量体よりも早く解離が起こってしまうと考えられる。

Ftn のアセンブリ反応中の  $I(0)$ 、 $R_{app}$  の上昇はシンプルモデルで良く説明することができた (図 2-8)。そのため、このモデルは Ftn アセンブリメカニズムについての良い近似であるといえる。しかしながら、結果 2-3 でも記述したように、実際のメカニズムは、より複雑であると考えられる。そこで、可能な構造を全て経由する全構造モデルを考えた。全構造モデルはシンプルモデルよりも、高精度で Ftn のアセンブリを説明することができた (図 2-14, 15)。様々な中間体が存在するという点は、Stefanini (Stefanini et al., 1987) や Gerl と Jaenicke (Gerl and Jaenicke, 1987b) の実験に共通している。中間体蓄積量における差は初期構造や実験の条件が異なるからかもしれない。また、そもそもタンパク質が異なるため、速度定数には差が生じると考えられる。

本研究で考えた全構造モデルは、多くの仮定を導入している。本来であれば、6 量体の中では、3 回転対称を構成するアイソマーが一番安定であると考えられる。しかしながら、個別の速度定数を全ての反応に割り当てることは難しく、ほとんどの反応で速度定数を同じにしている。中間体を限定したシンプルモデル、多くの仮定を導入した全構造モデルを用いて、Ftn アセンブリ反応中の  $R_{app}$ 、 $I(0)$  の上昇を説明できた。これは、これらの近似が妥当であることを示しているとともに、TR-SAXS の結果のみで Ftn のアセンブリメカニズムを完全に明らかにすることの難しさを表している。この問題に対して、変異体の作製が有効であると考えられる。極端な例を挙げれば、4 量体までしかアセンブリできない変異体を作製することができれば、4 量体形

成における速度定数を求めることができる。そのような変異体が作製できなかつたとしても、いくつかの相互作用面を破壊した変異体を作製し、アセンブリ速度を比較することで、速度定数を見積もることができる。また、SAXS では、溶液中に存在する分子種の平均値を測定してしまっている。中間体の存在や蓄積量を、完全に明らかにするのであれば、アセンブリ反応中に存在する分子種を分けて解析する必要がある。分子種を分けて分析できる手法として、ゲルろ過クロマトグラフィー、電気泳動、超遠心分析などがあるが、いずれも時間分解能が低く、アセンブリ反応を追跡することは難しい。分子種を分けることが可能であり、かつ時間分解能も高い手法としていくつか紹介する。急速凍結ディープエッチング法を用いた電子顕微鏡撮影は、アクチンの裂け目を観測可能である (Katayama, 1998)。ストップ・フロー混合によるアセンブリ反応開始後、急速凍結を行うことで、任意の反応時間のサンプルを電子顕微鏡で撮影可能であると考えられる。この方法を用いることで、中間体を大きさである程度区別することが可能であると考えられる。限外濾過法は、均一なポアサイズを持つ多孔質の膜を用いて、サンプルの濃縮や脱塩を行う手法である。限外濾過を遠心操作で実施可能にした遠心式限外濾過ユニットは迅速に操作を完了することができる。ポアサイズを吟味すれば、アセンブリ反応中に存在する 2 量体だけ、もしくはそれに近い分子量を示す低オリゴマーの分子種のみを分取することが可能だと考えた。2 量体と 24 量体の吸収スペクトルは、ほとんど差がないため、アセンブリが進行しても、分けた時点での低オリゴマーの濃度を測定することができる (図 2 - 17A)。限外濾過法で 2 量体を分取できるかどうかを確かめる実験を行った。2 量体の分子量は約 39000 Da であるため、40000 Da 以上のものを通す遠心式限外濾過ユニットを使用することにした。酸解離させた Ftn 溶液をスピнкаラム (Merck millipore, amicon ultra 50 kDa) で限外濾過を行い、膜を通った溶液と通らなかった溶液の吸収スペクトルを測定した。分画範囲は 50 kDa であるため、2 量体のみを分取できると期待した。遠心は 2000 g、1 分、4 °C で行った。この条件では、ほとんど 2 量体が膜を通らなかった (図 2 - 17B)。これは、分画サイズが 2 量体の分子量に近く、膜を通るのに時間がかかることを示唆している。次に、100 kDa の分画サイズを持つスピнкаラム (GE healthcare, vivaspin 20-100K) を用いて同様の実験を行った。分画範囲が 100 kDa であるため、2 量体だけではなく、4 量体も混ざってしまう可能性がある。ただし、50 kDa の分画範囲を持つ遠心式限外濾過ユニットを用いた場合、ほとんど 2 量体が膜を通らなかったことを考えると、主とし

て 2 量体を分取できると期待した。膜を通った溶液と通らなかった溶液の吸収スペクトルを測定した。同じ濃度にはならなかったが、多くの 2 量体 (もしくは 2 量体と 4 量体)が膜を通ったことが分かった (図 2 - 17C)。2 量体を均一にさせるためには、温度や回転数を調整する必要がある。温度は遠心中にアセンブリ反応が遅くなるように 4 °C としたが、低温では溶液の粘度が上昇し、濾過に必要な時間が増えてしまうため、常温で行うべきかもしれない。この方法では 2 量体しか分取することはできない。ESI-MS は、非共有結合を切断することなく、サンプルをイオン化し、質量分析を行うことができる手法である。アセンブリ反応中の溶液を測定すれば、蓄積している中間体の分子量を測定できることになる。ESI-MS 測定では、揮発性緩衝液の使用が望まれるので、4 %酢酸で解離、酢酸アンモニウム緩衝液でアセンブリを開始という実験系を採用した。ESI-MS の測定は、大阪大学の内山 進先生、岡崎総合バイオサイエンスセンターの石井 健太郎さんに行っていた。アセンブリ反応を追跡する前に、予備実験として天然状態と酸解離した Ftn の ESI-MS 測定を行ったところ、天然状態では 24 量体の分子量が測定できたが、酸解離した Ftn の分子量は単量体として観測された。ESI-MS 測定の際に真空中で脱水和によるイオン化を行う。その際、疎水性相互作用で形成されている複合体は解離する可能性がある。Ftn の 2 量体は主に疎水性相互作用で結合している。そのため、単量体に解離したと考えられ、ESI-MS 測定でアセンブリ反応を追跡したとしても、中間体は単量体に解離してしまう可能性がある。これを解決するためには、2 量体間で水素結合を形成する変異体を作製し、イオン化する際に、2 量体を保たせる必要がある。Ftn の中間体は複数のアイソマーを持っている。そのため、ESI-MS により中間体の分子量が測定可能になったとしても、アイソマーを区別することはできない。アイソマーを区別するための手法として、クエンチフローを用いた NMR 測定を考えた。溶媒に露出しているアミノ酸残基の水素は容易に溶媒の水素と交換される。逆に言うと、接触面のアミノ酸残基の水素は交換されにくい。酸性解離した Ftn 溶液の pH を上昇させ、ごく短い時間、Ftn をアセンブリさせ、すぐに pH を下げる。その際、アセンブリ緩衝液は重水素を含む重溶媒にしておく。そうすると溶媒に露出している残基の水素は重水素に交換されるが、接触している残基の水素は軽水素のままである。水素交換速度は酸性条件下で著しく減少するため、NMR を測定すれば、接触面を形成していた残基を特定することが可能になる。この情報を用いれば、ある程度アイソマーを区別できるのではないかと考えられる。この実験をするために

は、Ftn を 2 量体の状態で NMR を測定し、全残基のアサインメントを終了させる必要がある。本研究室の館により、主鎖のアサインメントは 8 割程度、完了している (館, 2015)。アサインメントが終了していなくても、LC-MS 測定を行えば同様の解析が行えると考えられる。水素交換後のサンプルを、水素交換速度が減少する酸性条件下でペプシン処理を行い、LC-MS を行う。得られたペプチド断片をアミノ酸配列にアサインメントする。これにより、接触面を形成しているアミノ酸残基を特定できる。また、タンパク質のアセンブリを低濃度 (0.1 mg/mL 以下) で、SAXS を用いて追跡することは、S/N の問題から難しい。蛍光を応用した実験は、サンプルや蛍光物質が高濃度の条件では、分子同士の衝突や励起光が内部に届かないなどの理由により、蛍光が濃度に依存しなくなる。しかしながら、蛍光が濃度に依存する範囲では、非常に S/N が良い実験が可能である。蛍光偏光解消法は、励起光として偏光を用いることで、サンプルのサイズを求めることができる。これを時間分解測定することでアセンブリ反応中の分子サイズの変化を追跡することが可能になる。神経フェリチン症の FTL 変異タンパク質である A96T は単独では、24 量体形成に異常を示すが、FTH と共発現された場合、24 量体を形成することができる。これは、FTH が A96T のアセンブリを手助けするアセンブリ・シャペロンになっているといえる。アセンブリを手助けすることができるのであれば、アセンブリの阻害も可能であると考えられる。アセンブリが正常な分子と障害のある分子を共アセンブリさせ、平衡を低オリゴマー側へと移すことで、中間体の観測が可能になるのではないかと考えた。本研究室、大友秀明は Ftn の F117A 変異体を作製した。F117A は WT よりも不安定であり、2 量体と 24 量体の平衡にあることが示された (Ohtomo et al., 2015)。WT と F117A を酸性で解離させ、共アセンブリさせることで WT のアセンブリを阻害させることで中間体を同定することが可能かもしれない。

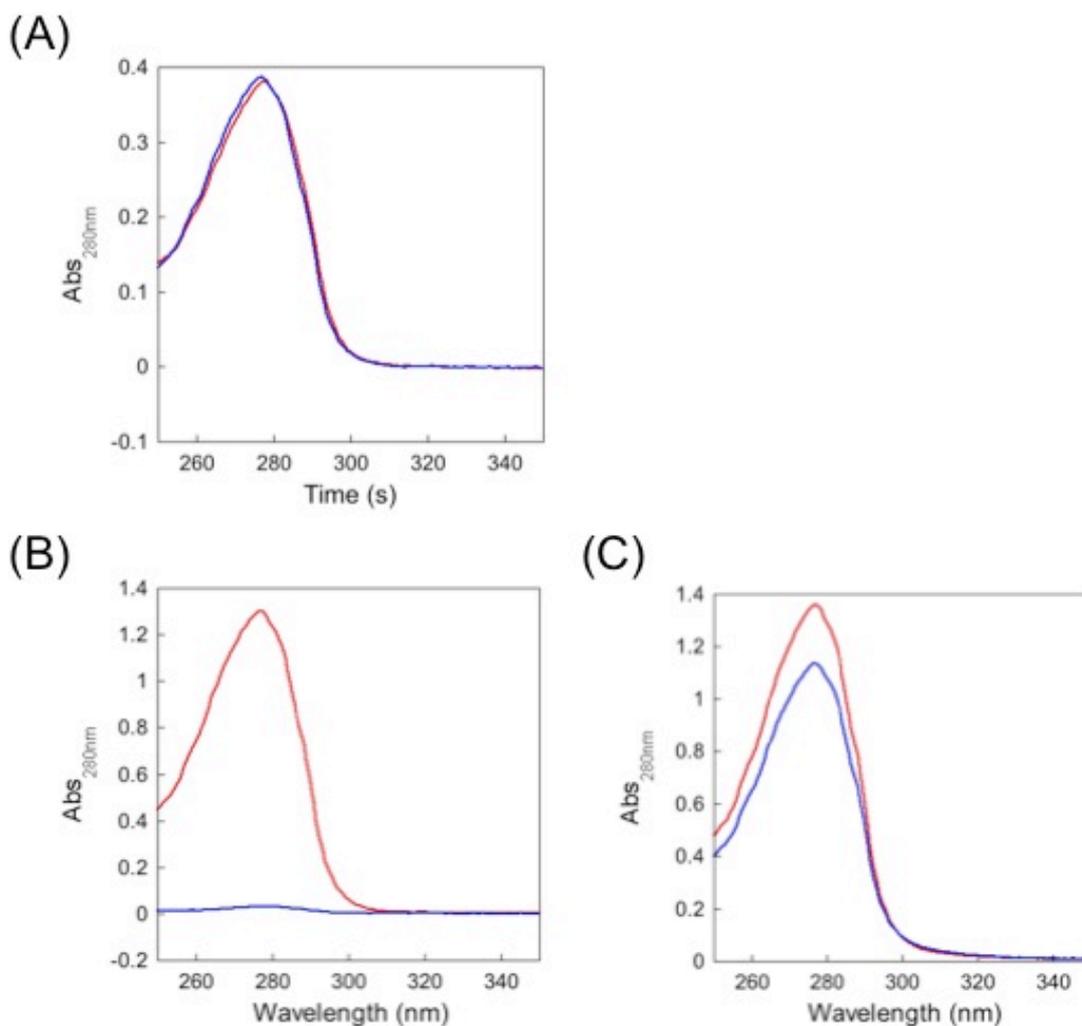


図 2-17 Ftn の UV スペクトル

Ftn の 2 量体 (青)、24 量体 (赤) の UV スペクトルを示した (A)。濃度は 0.3 mg/mL である。2 量体 Ftn 溶液を 50kDa のポアサイズを持つスピカラムで分析した (B)。膜を通らなかった溶液 (赤)、膜を通った溶液 (青) のスペクトルに大きな違いがある。2 量体 Ftn 溶液を 100kDa のポアサイズを持つスピカラムで分析した (C)。(B) よりも 2 つのスペクトルに差がなかった。

## 2.5 結論

本研究では、Ftnのアセンブリメカニズムを明らかにすることを目的とした。追跡手段として TR-SAXS 実験を採用し、15 ミリ秒の時間分解能で Ftn のアセンブリ反応を追跡した。その結果、Ftn の全アセンブリ反応を観測することに成功した (図 2 - 5)。フェリチンのアセンブリにおいて、このような時間分解能での測定は世界でも例がなく、初期反応についての議論が可能となった。Ftn のアセンブリ反応は、開始とともに  $R_{app}$ 、 $I(0)$  の上昇を伴った。これにより、Ftn のアセンブリは核形成型ではないことが示された。初速度法から、初期反応は 4 量体形成と 6 量体形成の混合であることが分かった (図 2 - 6)。全構造モデルを使用して Ftn のアセンブリ反応中の  $R_{app}$ 、 $I(0)$  の上昇を再構成することに成功した (図 2 - 14)。様々な中間体を經由することは、HSF の研究やウイルスの伸長段階でも示唆されているため、このモデルは他のタンパク質にも適用できる可能性がある。本研究で全構造モデルがタンパク質のアセンブリに一般的に適用できる可能性を示せたことは、アセンブリ研究の最終目的を達成する上で重要であると考えられる。

### 3 Ftn アセンブリにおける正味電荷の重要性

#### 3.1 序

タンパク質の 4 次構造形成に静電相互作用が重要であることは、塩橋などの相互作用を破壊した実験からも明らかである。Orner のグループは大腸菌のバクテリオフェリチンと Dps の結晶構造を基にして、オリゴマー形成に重要であると考えられる残基を選択し、Ala に置換した実験を行った (Zhang et al., 2010 and 2011)。作製した変異体の中には、塩橋のネットワーク (複数の荷電残基が関与する塩橋) を破壊したものがあつた。バクテリオフェリチンは WT で既に、2 量体 - 24 量体平衡にある。塩橋ネットワークを破壊した変異体は、この平衡を完全に 2 量体へとシフトさせた。Dps はバクテリオフェリチンとは異なり、WT は 100%、12 量体を形成している。Dps の塩橋ネットワークを部分的に破壊した 2 つの変異体 (共に 1 残基変異体) は、約 50% が 2 量体へと解離した。その 2 残基を共に置換した変異体は完全に 12 量体形成能を失い、100% が 2 量体へと解離した。ただし、バクテリオフェリチンの変異体には、2 回転対称軸上の塩橋を破壊しているにも関わらず、単量体ではなく、完全に 2 量体に解離しているものが存在している。同様の結果は、*Mycobacterium tuberculosis* のフェリチンを用いた実験からも得られている (Khare et al., 2013)。2 回転対称軸上の塩橋が破壊されることで、フェリチンの 2 量体 - 24 量体平衡を完全に 2 量体へとシフトされることが示された。これらの結果は、2 回転対称軸上の静電相互作用の操作が他の接触面への影響を与えることを示唆している。

タンパク質オリゴマー状態は、残基の置換だけではなく、タンパク質のおかれている環境を変化させることで、制御することも可能である。大腸菌やウマのフェリチンは酸性 pH で 2 量体に解離する。*Listeria innocua* Dps も pH 2.0 以下の酸性条件下で 2 量体へと解離することが分かっている (Chiaraluce et al., 2000)。上記の 3 例は pH によるオリゴマー状態の制御であるが、イオン強度によっても制御可能な例が知られている。*Archaeon Fulgidus* のフェリチンや *Deinococcus radiodurans* の Dps は、低イオン強度で 2 量体へ解離することが報告されている (Sana et al., 2013; Grove and Wilkinson, 2005)。一方、CCMV は高イオン強度で 2 量体へ解離する (Vega-Acosta et al., 2014)。pH やイオン強度によるオリゴマー状態の制御も、タンパク質の 4 次構造形成に静電相互作用が重要であることの証拠である。

前述したように、残基を置換することなしに、pH やイオン強度の外的要因を変化さ

せることで、オリゴマータンパク質は低オリゴマー状態へ解離する。これらのオリゴマータンパク質は多くの場合、適切な pH、イオン強度環境に移してやることで、天然のオリゴマー状態へとリアセンブリすることが可能である。リアセンブリ条件の pH やイオン強度に依存して、アセンブリ速度が変化する例が報告されている。CCMV は pH 5.75 から 5.00 にかけてアセンブリ速度が増加することが知られている (Zlotnick et al., 2000)。HBV に関しては、NaCl 濃度が 0.50 から 1.25 M に増加するにつれてアセンブリ速度が大きくなることが分かっている。

前述したように、私は Ftn のアセンブリ反応を 15 ミリ秒の高い時間分解能で追跡することに成功した。そこで、Ftn のアセンブリ速度に静電相互作用がどのように関与しているかを調べることにした。サブユニット同士が十分に離れていて、サブユニットを質点として近似可能な場合、荷電残基の位置は重要ではなくなり、サブユニット間に働く静電相互作用は正味電荷間の相互作用が支配的になる。一方、サブユニット同士が近くに存在し、サブユニットを質点としてみるができない場合、荷電残基間の静電相互作用、つまりローカルな相互作用を考える必要がある。本研究では、前者の正味電荷間の相互作用を中心に研究する。

以前の研究から Ftn のアセンブリ速度は pH に依存することが分かっていた (佐藤, 2013)。しかしながら、この時の実験では pH だけでなく、イオン強度も変わってしまった。そのため、pH とイオン強度の効果が両方、同時にアセンブリ速度に影響していると考えられる。そこで、本実験では、pH 依存性を調べる実験ではイオン強度を一定になるように緩衝液をデザインした。また、アセンブリ速度はイオン強度にも依存すると考えられるため、pH を一定に保ちながらイオン強度依存も測定した。Ftn はホモオリゴマーであるため、サブユニットの正味電荷間には反発力が働いている。この反発力がアセンブリ速度の pH、イオン強度依存性の原因であると考えられる。そこで、正味電荷が異なる変異体のアセンブリ反応を追跡し、正味電荷の差がどの程度アセンブリ速度に影響を与えるかを調べた。

## 3.2 方法

### 3.2.1 正味電荷変異体の発現、精製

Glu8, Glu12, Glu85, Glu89 の 1 から 4 つを Gln に置換した正味電荷変異体 (EEEEQ,

EQQEE, EQQEQ, EQQQQ)は、本研究室、竹部皐月によってデザイン、作製された (竹部, 2014)。EEEEQ、EQQEE、EQQEQ、EQQQQ は 2.2.1 に示された方法で、WT と同様に発現、精製された。タンパク質濃度の決定は WT と同じ方法で行った。

### 3.2.2 SAXS

SAXS の測定と解析は 2.2.3 と同様の方法で行った。アセンブリ速度が大きい条件や塩濃度が高い条件では、サンプルへのダメージが少ないため、露光時間は 10 ミリ秒のままで、データ取得点数を 50 点まで増やした。カイネティクス測定において、緩衝液は 25 mM Tris, 25 mM リン酸ナトリウム, 1 mM EDTA/2Na が基本緩衝液として使用された。緩衝液の pH、イオン強度は基本的な構成要素を変更することなく、HCl、NaOH、NaCl を用いて調整された。緩衝液は pH 依存性について調べる場合はイオン強度を、イオン強度依存性を調べる場合は pH を一定に保つようにデザインされ、作製された。pH については 6.0 – 8.0 まで、イオン強度については 0.08 から 2.1 まで測定された。詳細については、表 3-1 を参照されたい。イオン強度の計算はヘンダーソン・ハッセルバルヒの式と各構成要素の熱力学的 pKa を用いて算出した (Perrin and Dempsey, 1974)。各イオン種の質量モル濃度 (mol/kg)は、モル濃度 (mol/L)と近似した。

### 3.2.3 高イオン強度条件下での $I(0)$ 補正

散乱強度はサンプルとベースの電子密度差の 2 乗に比例する。高イオン強度条件下と低イオン強度条件下では、粒子間相互作用を無視すれば、 $R_{app}$  は同じ値を示すが、 $I(0)$ の値は大きく変化してしまう。実際にイオン強度 0.08 と 2.1 の条件でアセンブリ反応を SAXS 測定により追跡した際、 $R_{app}$  は同様の値を示すのに対して、 $I(0)$  は大きく変化することが分かった (図 3-1)。そこで  $I(0)$ を補正するために両イオン強度条件下における天然状態の SAXS を測定した (図 3-1)。この  $I(0)$ の値を用いてアセンブリ反応中の  $I(0)$ の上昇カーブを補正した。図 3-2 には補正した  $I(0)$ の上昇カーブを使用している。

### 3.2.4 CD スペクトル

CD スペクトルは CD スペクトロメーター (Applied Photophysics, Chirascan) を用いて測定された。遠紫外部では 1 mm、近紫外部は 10 mm の光路長を持つ石英セルを使用した。タンパク質濃度は、遠紫外測定で 0.1 mg/mL、近紫外測定で 0.3 mg/mL が用いられた。測定は全て 25 °C で行った。

### 3.2.5 SEC

SEC 実験は、50 mM リン酸ナトリウム, pH 2.5 で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィー担体 (GE Healthcare, Superdex 75 10/300 GL) にサンプルをアプライして行われた。サンプルの緩衝液は平衡化緩衝液と同じものに置き換えられた。実験は室温で行われた。流速は 1.0 mL/min を使用した。酸性の条件で分子量マーカを使用したキャリブレーションは難しいため、WT と溶出位置を比較してオリゴマー状態を決定した。

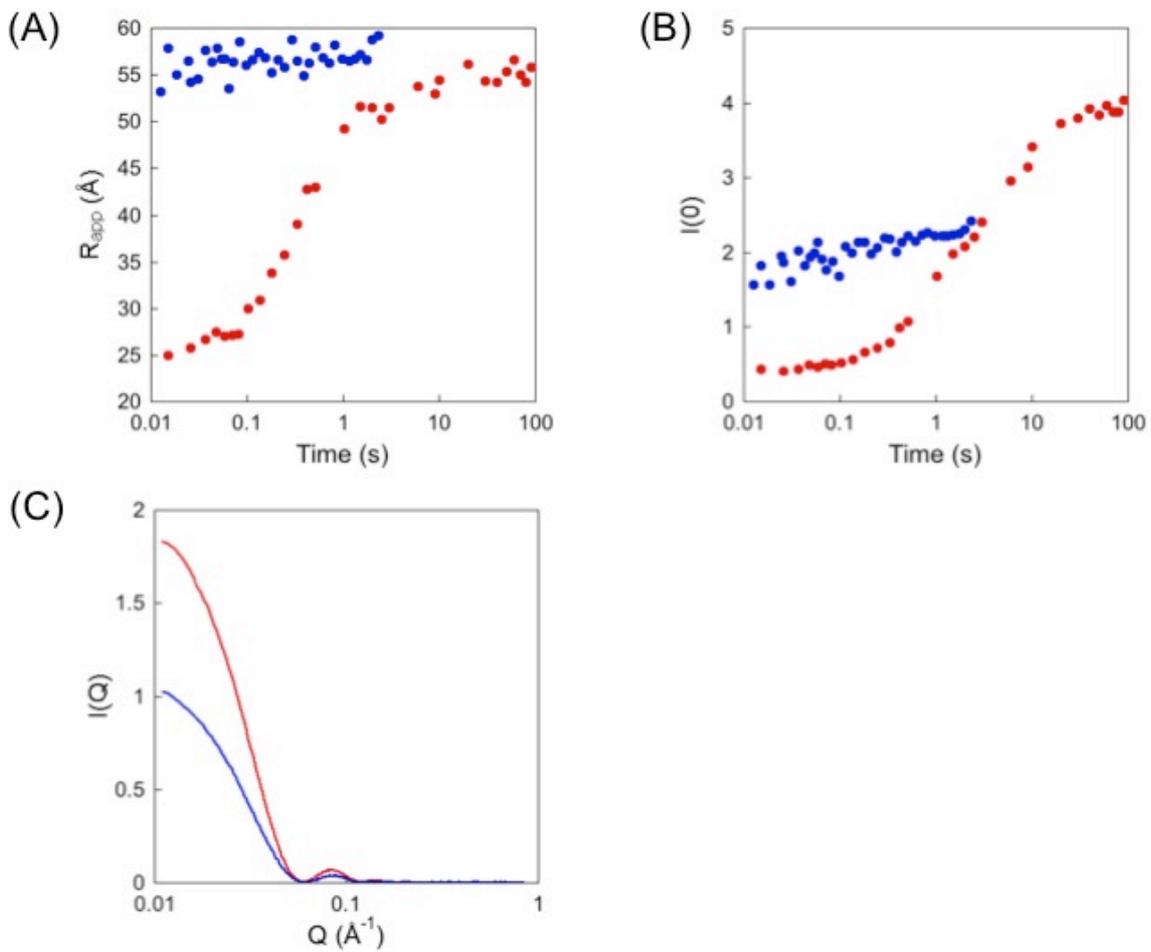


図 3-1 イオン強度 0.08 と 2.1 条件下で測定された Ftn の SAXS

$R_{app}$  (A)と  $I(0)$  (B)の経時変化を比較した。イオン強度 0.08 (●)、2.1 (●)。各イオン強度における天然状態の散乱関数を比較した (C)。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 WT アセンブリの pH、イオン強度依存性

WT のアセンブリ反応は、様々な pH、イオン強度条件下で SAXS の変化を追跡することで測定された。散乱関数から Guinier 近似 (数式 2 - 1) を用いて、 $R_{app}$  と  $I(0)$  を算出した。アセンブリ反応中の  $R_{app}$  と  $I(0)$  の上昇を用いて、アセンブリ速度を比較した。その結果、WT のアセンブリ速度は pH、イオン強度に依存した (図 3 - 2)。pH は 6.0 から 8.0 まで測定され、この範囲では pH が低いほどアセンブリ速度は大きくなった。イオン強度は 2.1 まで測定され、この範囲ではイオン強度が高いほどアセンブリ速度は大きくなった。

#### 3.3.2 pH、イオン強度依存性の原因

Ftn はホモオリゴマーであるため、緩衝液の pH が等電点ある時を除いて、そのサブユニットは同じ電荷をもっている。本研究室、黒部淳史 (黒部 私信) は、アセンブリした WT の等電点を等電点電気泳動によって決定した。WT の等電点は 5.44 であったため、アセンブリ速度を追跡した条件下で、Ftn は負に帯電していることが分かった。また、WT はその等電点から pH 6.0 よりも pH 8.0 でより強く負に帯電していると予想される。pH 依存性の実験では、イオン強度が一定であるため、サブユニットの電荷数のみが異なると考えられる。WT のアセンブリ速度は pH 8.0 よりも pH 6.0 で大きいため、pH 依存性の原因として、サブユニットの正味電荷間の反発を考えた (図 3 - 3A)。イオン強度が上昇するとアセンブリ速度が大きくなることは、遮蔽効果によって正味電荷間の反発が弱められると考えることができる (図 3 - 3B)。

#### 3.3.3 正味電荷変異体の解離、再集合

アセンブリ速度にどの程度、正味電荷が関わっているかを調べるためには、同じ溶液条件で電荷の異なる変異体と WT のアセンブリ速度を比較する必要がある。本研究室、竹部皐月は、電荷の異方性を持ったヘテロフェリチンを作製するために、電荷の異なる変異体を 10 種類デザインした (竹部, 2014)。この 10 種類の変異体は、

24 量体形成に影響を与えないように、塩橋を形成せず、溶媒に露出している残基が変異のターゲットとされている (図 3 - 4)。つまり、ローカルな相互作用への影響を与えずに正味電荷だけが変わるようにデザインされている。この 10 種類の変異体のうち、24 量体を形成し、TR-SAXS を測定するために十分な溶解度を持っていた 4 つの変異体を実験で使用することにした。この変異体は 1 から 4 つの酸性残基である Glu を中性残基である Gln に置換している。置換の少ない順に EEEEEQ、EQQEE、EQQEQ、EQQQQ と名付けられている。この 4 種類の変異体は竹部皐月によって、CD スペクトル、ゲルろ過クロマトグラフィーによる、特徴付けが行われ、WT と同様の構造を持っていることが示されている。しかしながら、SAXS 測定による特徴付けは行われていない。また、これらの変異体は WT と同様に酸性で 2 量体に解離し、pH を上昇させることで 24 量体に再集合することが示唆されているが、それらの特徴付けは不十分である。そこで、まず変異体の SAXS による特徴付けと酸解離状態と再集合状態の特徴付けを行うことにした。

変異体の天然状態、酸解離状態、再集合状態の SAXS を測定したところ、それらの散乱関数は WT のものと区別することができなかった (図 3 - 5)。これは 4 種類の変異体は WT と同様に酸性で 2 量体に解離し、pH を上昇させることで 24 量体を再構成することを示している。変異体の酸解離状態、再集合状態のさらなる特徴付けのために、CD スペクトルを測定した。変異体は、遠紫外、近紫外 CD とともに WT と同様のスペクトルを示した (図 3 - 6)。変異体の酸解離状態はゲルろ過クロマトグラフィーでも特徴付けを行った。変異体の溶出ピークは WT と一致した (図 3 - 7)。これらの結果は、変異体が WT と同様の特徴を持っているという SAXS の結果を支持する。

### 3.3.4 Ftn アセンブリにおける正味電荷の重要性

これまでの実験で EEEEEQ、EQQEE、EQQEQ、EQQQQ は WT と同様に中性で 24 量体を形成し、酸性で 2 量体に解離し、pH を上昇させることで 24 量体へ再集合することが分かった。次に、変異体のアセンブリ反応を追跡するための条件を検討した。本研究室、黒部淳史 (黒部 私信) は、アセンブリした変異体の等電点を等電点電気泳動実験により決定した。EEEEQ、EQQEE、EQQEQ、EQQQQ の等電点は、

それぞれ 5.47、5.73、6.27、7.31 となった。TR-SAXS を行う緩衝液として、pH 8.0、イオン強度 0.08 の条件を選択した。これには 2 つ理由がある。1 つ目は、WT と変異体がすべて負に帯電している条件で実験を行うためである。pH 6.8 で実験した場合、EQQQQ は正に、その他の Ftn は負に帯電することになり、実験の解釈が複雑になる。そのため、pH 8.0 の条件を選択した。2 つ目は、アセンブリ速度の差を見積もるためには、アセンブリ速度が遅い必要がある。pH 8.0、イオン強度 2.1 の条件でアセンブリ反応追跡した場合、反応が速すぎて、ほとんど追跡することができなかった (図 3-2)。そのため、アセンブリが速い条件では、WT と変異体のアセンブリ速度の差を正確に見積もることが難しい。そこで、本研究で一番アセンブリ速度が遅い条件である pH 8.0、イオン強度 0.08 を選択した。

上記の条件で WT と変異体のアセンブリ反応を開始させ、SAXS の変化を測定することで反応を追跡した。EEEEQ、EQQEE、EQQEQ、EQQQQ は酸性残基である Glu を中性残基である Gln に置換しているため、pH 8.0 の条件では、置換の数が多いほど正味電荷の反発は弱くなっている。もし、アセンブリ速度の pH、イオン強度依存性の原因が正味電荷の反発であるならば、反発を減少させた変異体ほどアセンブリ速度は大きくなるはずである。WT と変異体のアセンブリ速度を比較したところ、予想通りに正味電荷を減少させた変異体ほど、アセンブリ速度は大きくなった (図 3-8)。したがって、正味電荷は Ftn のアセンブリ速度を決定するための重要な因子であるといえる。

正味電荷の反発が Ftn のアセンブリにおいて重要な役割を果たしていることが示された。もし、この反発が細胞内で、重要な障壁になった場合、それを乗り越えるための駆動力が必要となる。生理学的な条件下で、正味電荷の反発がアセンブリ速度にどの程度、影響を与えるかを調べるために、より高いイオン強度でアセンブリ反応を追跡した。WT と変異体のアセンブリ速度の差は、イオン強度 0.11 の条件で減少し、イオン強度 0.17 の条件でほとんど打ち消された (図 3-9)。細胞内には、140 mM 程度のカリウムイオンが含まれている (Bruce et al., 2002)。そのため、Ftn のアセンブリにおいて、生理学的な条件下では、正味電荷の反発は重要な問題にならない。

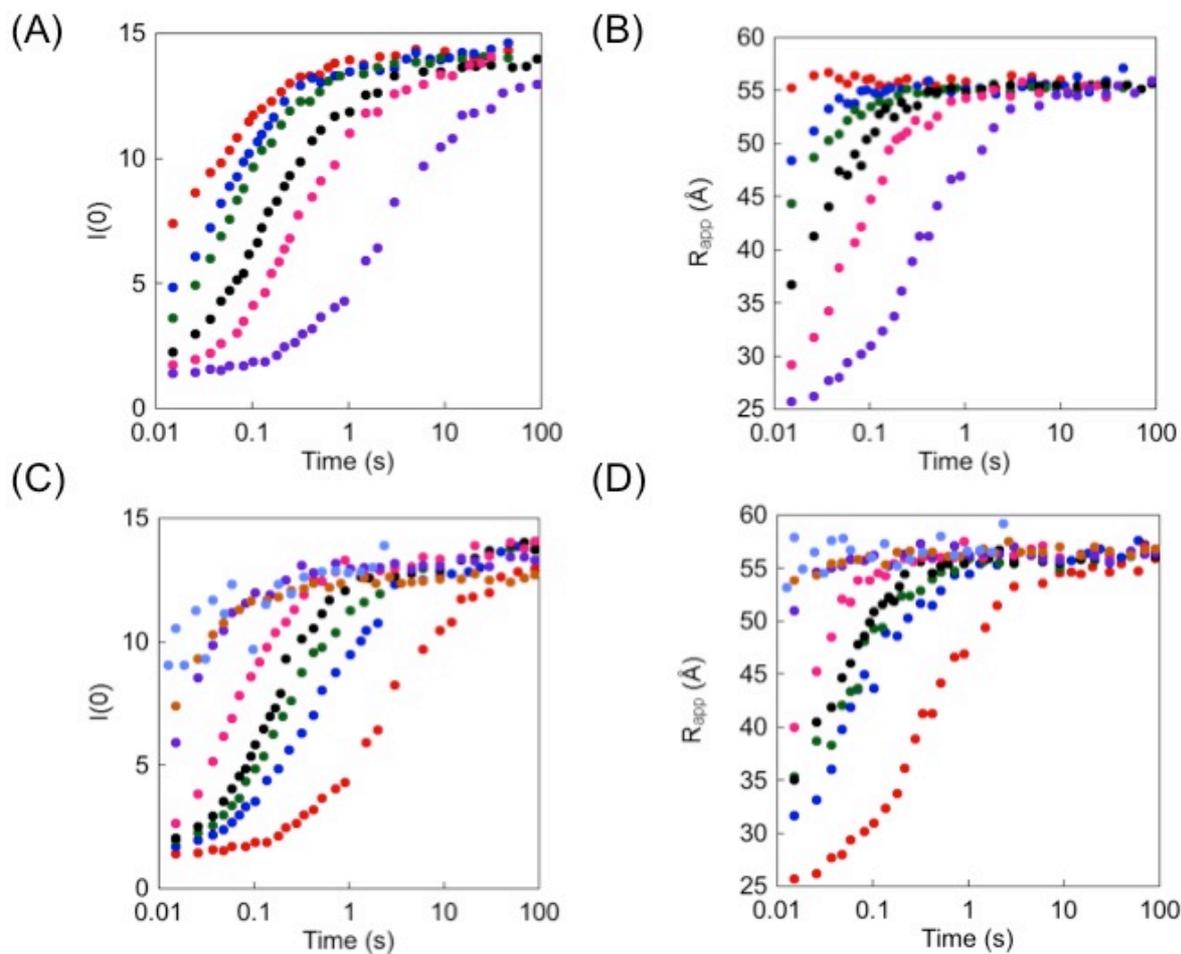


図 3-2 WT アセンブリ速度の pH、イオン強度依存

pH は 6.0 から 8.0 まで測定された (A, B)。pH 6.0 (●)、pH 6.4 (●)、pH 6.8 (●)、pH 7.4 (●)、pH 7.6 (●)、pH 8.0 (●)。イオン強度は 0.08 から 2.1 まで測定された (C, D)。0.08 (●)、0.1 (●)、0.11 (●)、0.13 (●)、0.17 (●)、0.35 (●)、0.58 (●)、2.1 (●)。

等電点: 5.44

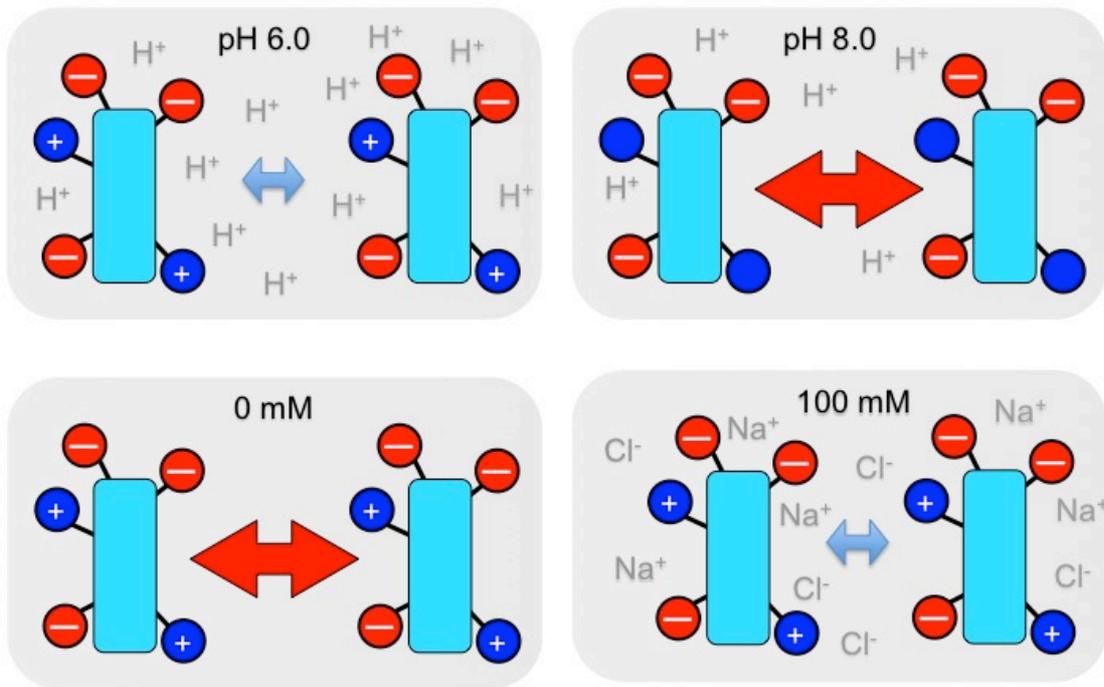


図 3-3 アセンブリ速度の pH、イオン強度依存性の原因

WT の等電点は 5.44 であるため、pH 6.0 よりも pH 8.0 で、より負に帯電していると考えられる。そのため、pH 6.0 よりも pH 8.0 で、サブユニット間の反発力は大きくなる。塩濃度が高いと遮蔽効果により、正味電荷間の反発力が抑えられると考えられる。

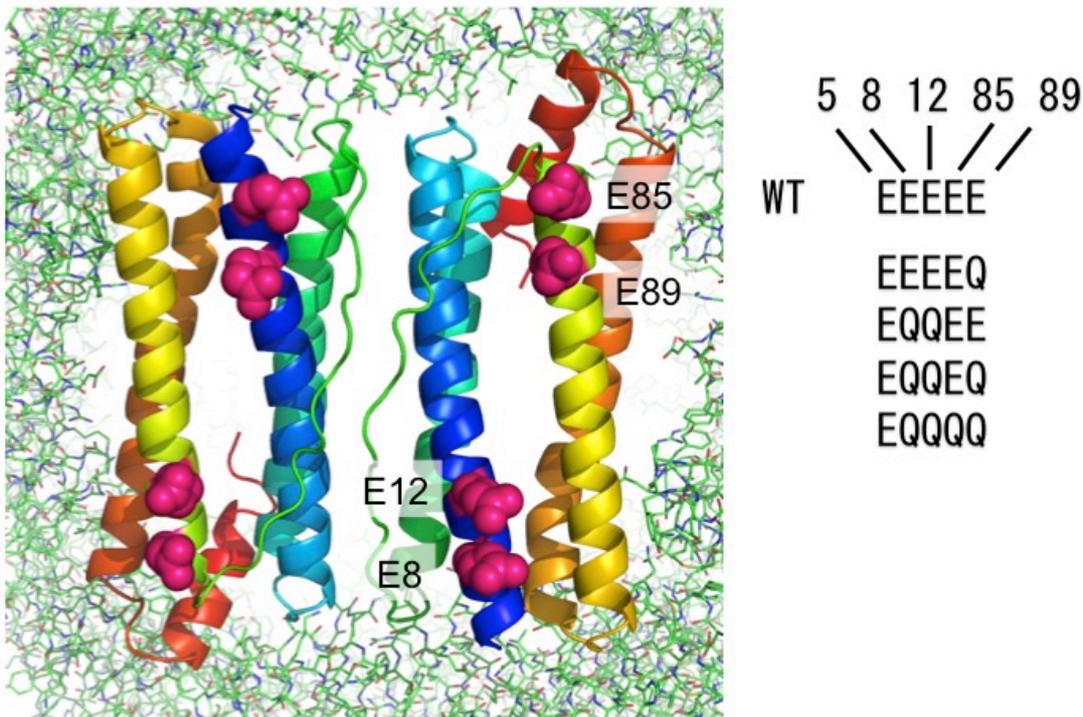


図 3-4 正味電荷変異体について変異を導入した残基

2 回転対称を構成するサブユニットをリボン表示にし、N 末端から C 末端に向かって青から赤になるように色をつけた。変異を導入された残基は球表示にし、マゼンダで強調した。変異体は、5, 8, 12, 85, 89 番目の残基の 1 文字記号を使って名付けられた。(竹部 2014 年 修士論文から改変)。

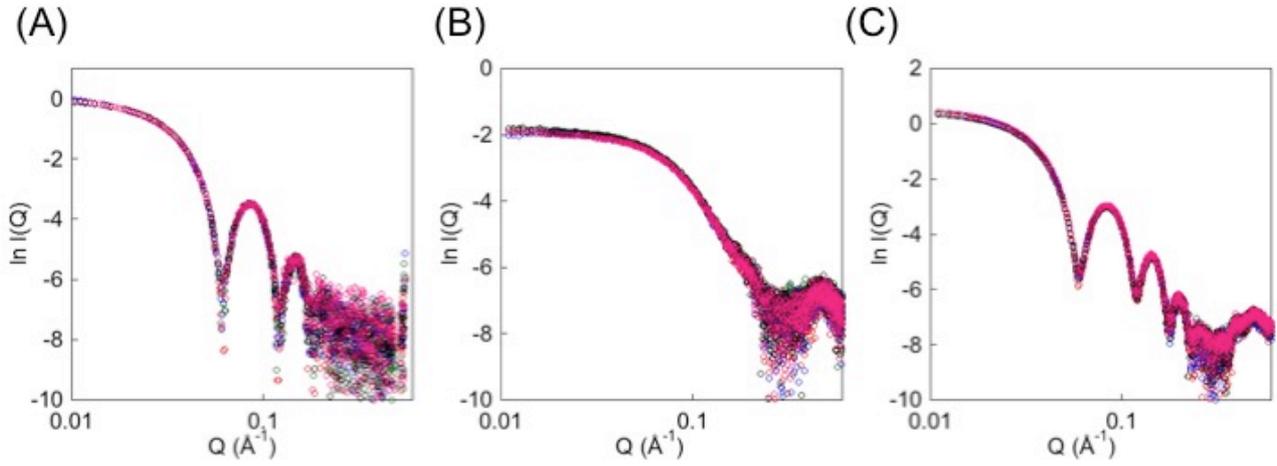


図 3-5 正味電荷変異体の SAXS による特徴付け

変異体の天然状態 (A)、酸解離状態 (B)、再集合状態 (C)の散乱関数が WT と比較された。

WT (○)、EEEEQ (○)、EQQEE (○)、EQQEQ (○)、EQQQQ (○)。緩衝液は天然状態の測定では、42.9 mM Tris、28.6 mM リン酸ナトリウム、11.4 mM NaCl、1 mM EDTA/2Na、pH 7.6、酸解離状態の測定では、50 mM リン酸ナトリウム、pH 2.6、再集合状態の測定では、25 mM Tris、25 mM リン酸ナトリウム、1 mM EDTA/2Na、pH 8.0 が使われた。

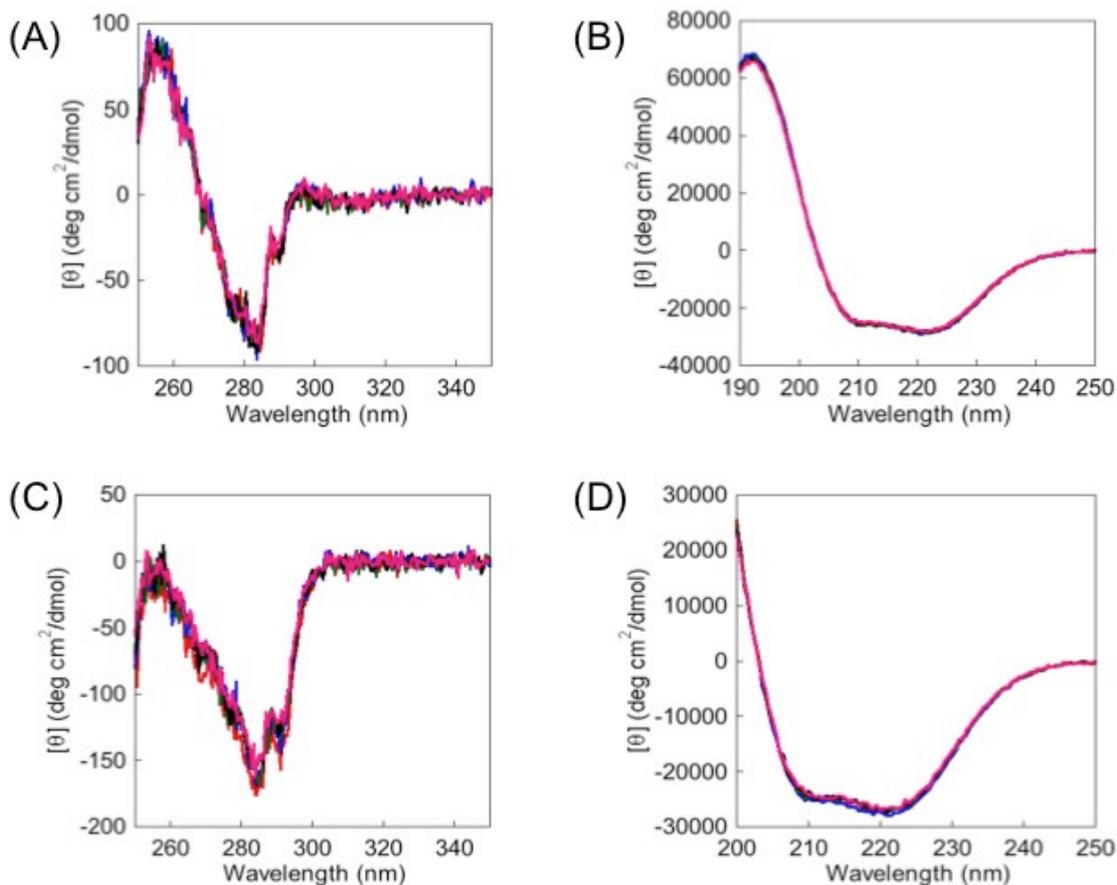


図 3-6 正味電荷変異体の CD スペクトルによる特徴付け

変異体の酸解離状態 (A, B)と再集合状態 (C, D)の CD スペクトルを WT と比較した。WT (red)、EEEEQ (blue)、EQQEE (green)、EQQEQ (black)、EQQQQ (magenta)。緩衝液は天然状態の測定では、20 mM リン酸ナトリウム、pH 8.0、酸解離状態の測定では、50 mM リン酸ナトリウム、pH 2.6、再集合状態の測定では、42.9 mM Tris、28.6 mM リン酸ナトリウム、11.4 mM NaCl、1 mM EDTA/2Na、pH 7.6 が使われた。

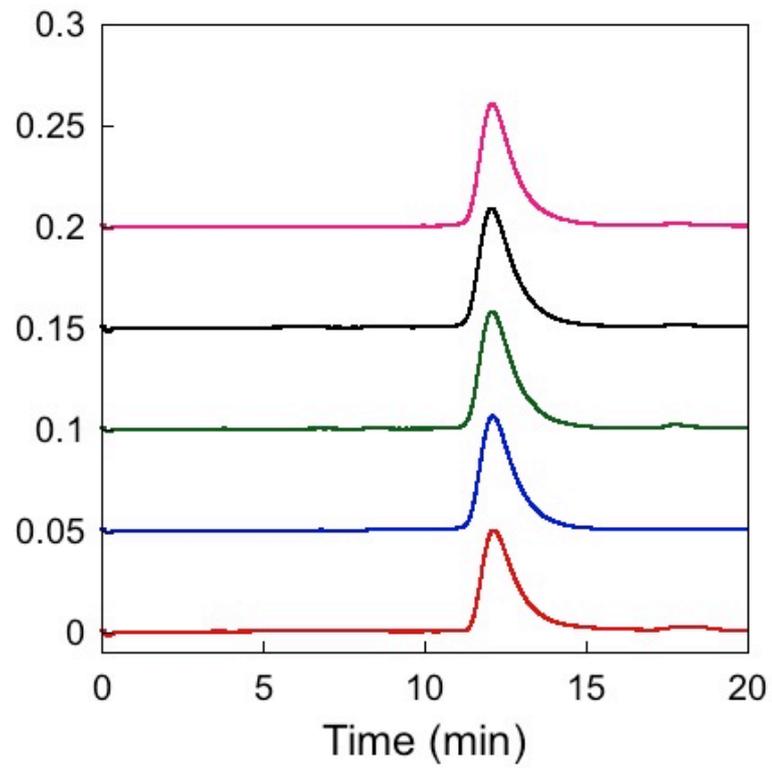


図 3-7 ゲルろ過クロマトグラフィーによる正味電荷変異体の特徴付け  
 酸解離状態における変異体の溶出位置を WT と比較した。WT (red)、E4EQ (blue)、E5QEE  
 (green)、E6QEQ (black)、E7QQQ (magenta)。

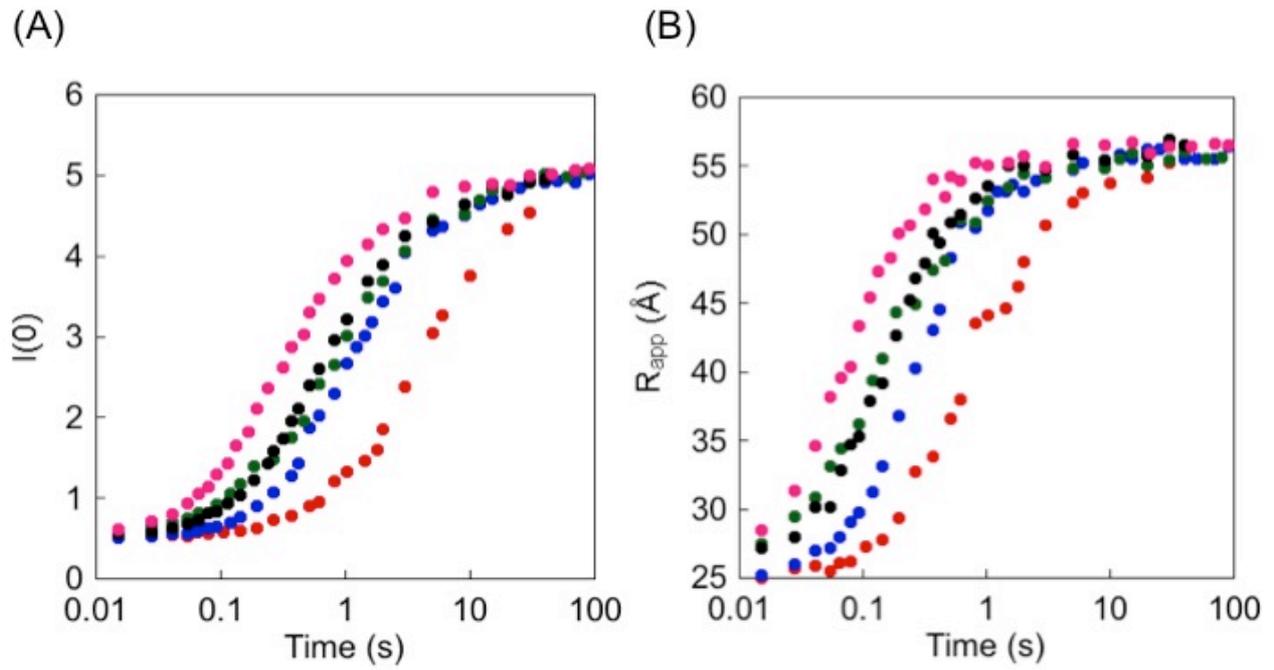


図 3-8 WT と正味電荷変異体のアセンブリ速度の比較

pH 8.0、イオン強度 0.08 の条件で測定された。WT (●)、EEEEQ (●)、EQQEE (●)、EQQEQ (●)、EQQQQ (●)。

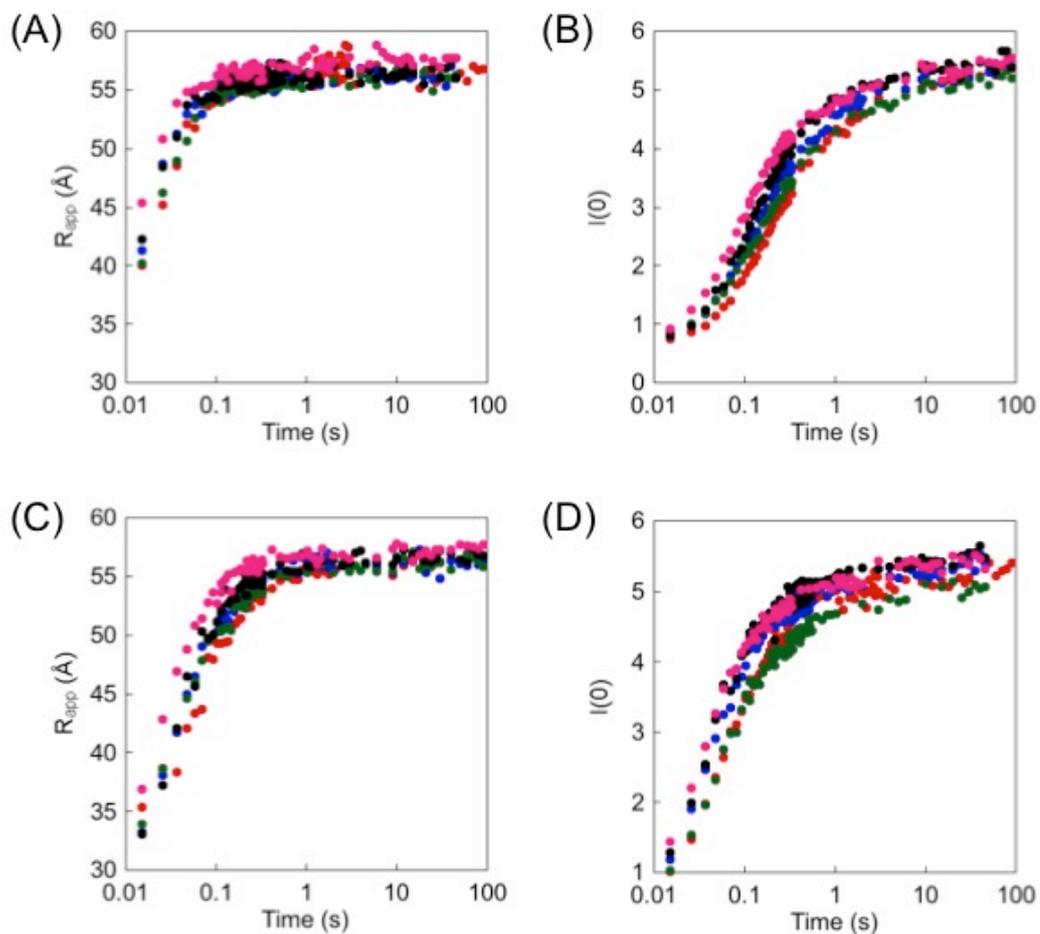


図 3-9 高いイオン強度条件でのアセンブリ速度の比較

pH 8.0、イオン強度 0.11 (A, B)、0.17 (C, D)で WT と正味電荷変異体のアセンブリ速度を比較した。WT (●)、EEEEQ (●)、EQQEE (●)、EQQEQ (●)、EQQQQ (●)。

表 3-1 アセンブリ速度の pH 依存性を調べるために用いられた緩衝液

25 mM Tris、25 mM リン酸ナトリウム、1 mM EDTA/2Na を基本緩衝液として、そこに NaCl、NaOH、HCl を加えて、pH、イオン強度を調整した。

NaCl (mM)	NaOH (mM)	HCl (mM)	pH	イオン強度
30		10	6.0	0.078
27.5		5	6.5	0.076
25			6.8	0.076
12.5	9.38		7.4	0.078
8.34	12.5		7.6	0.079
18.8			8.0	0.076

表 3-2 アセンブリ速度のイオン強度依存性を調べるために用いられた緩衝液

25 mM Tris、25 mM リン酸ナトリウム、1 mM EDTA/2Na を基本緩衝液として、そこに NaCl、NaOH を加えて、pH、イオン強度を調整した。

NaCl (mM)	NaOH (mM)	pH	イオン強度
	18.8	8.0	0.076
25	19.4	8.0	0.1
35	19.6	8.0	0.11
50	20	8.0	0.13
95	20	8.0	0.17
275	20	8.0	0.35
500	20	8.0	0.58
2000	22.5	8.0	2.1

### 3.4 考察

Ftnのアセンブリ反応はイオン強度と pH に依存することが分かった。イオン強度に関しては、0.08 から 2.1 の間では、イオン強度が増加するほどアセンブリ速度は増大した。正味電荷間の反発を減少させた変異体は、WT よりもアセンブリ速度が大きくなった。しかしながら、その効果は低イオン強度の条件下だけで有効であり、イオン強度が 0.11 を超えると WT と正味電荷変異体間のアセンブリ速度の差は、スクリーニング効果によってほとんど打ち消された (図 3-9)。しかしながら、WT のアセンブリ速度は、イオン強度が 0.11 を超えても上昇し、少なくとも 2.1 までは頭打ちが起こらなかった。これは、Ftn のアセンブリ速度のイオン強度依存性の原因は、正味電荷間の反発だけでは説明できないことを示している。正味電荷間の反発は、サブユニットを質点に近似することが可能な、サブユニット同士が大きく離れているときに支配的になる。サブユニット同士が近距離にある場合、もはやサブユニットを質点近似することは難しく、荷電残基間の相互作用を個別に考えなければならなくなる。この各荷電残基間のローカルな相互作用が、高いイオン強度で打ち消され、アセンブリ速度上昇につながっていると考えられる。正味電荷間の反発を打ち消すことが可能な 0.11 以上のイオン強度でも、Ftn のアセンブリ速度が上昇していくことから、Ftn のローカルな相互作用は平均して反発力として働いていると考えられる。

pH に関しては、pH が 6.0 から 8.0 の間では、pH が減少するほどアセンブリ速度は増大した。 $I(0)$ の上昇カーブから、pH 6.0 では、pH 8.0 から 6.4 の変化よりも、顕著に前半の反応が加速されていることが分かる (図 3-2A)。これには、pH 6.0 付近に pKa を持っている His の解離が関与していると考えられる。Ftn はサブユニット中に 6 つの His を持っている (図 3-10A)。His がプロトネートすることで、サブユニットの正味電荷の絶対値が減少し、アセンブリ速度が増加したと考えられる。また、Ftn は結晶構造中で His128 の  $N\epsilon$  は Asp63 の  $O\delta$  と 3.78 Å の距離にあるため、強く相互作用していると考えられる (図 3-10B)。そのため、His128 は他の His よりも、アセンブリ速度の pH 6.0 における加速に関与している可能性がある。これは、先述したローカルな相互作用の具体例である。また、pH 6.0 における加速は、前半に偏っているため、His のプロトネートによって、加速されるのは、相対的に小さいオリゴマー同士の結合であると考えられる。

アセンブリについての反応速度式を解析的に解いた場合、左辺は濃度になっていて、

右辺は速度定数と時間の関数になっている。速度定数は/s の次元を持っているため、時間がかけているか、速度定数同士が比になっているはずである。そのため、2 つの異なる速度定数のカイネティックデータは対数時間軸で平行移動させれば重なるはずである。複雑な反応で速度定数が複数個、定義されている反応の場合は、全ての速度定数が同じ倍率で変化すれば、対数時間軸に対する平行移動でカイネティックデータを重ねることができる。正味電荷が変更された場合、影響を受けるのはアセンブリ・プロトマーを質点として見た場合のクーロン力である。そのため、あらゆる接触面間の結合が同様に変化すると仮定した。WT と正味電荷変異体のカイネティックデータを、対数時間軸に対して平行移動させて、重なるかどうかを確認した。WT の  $I(0)$  と  $R_{app}$  の上昇は、時間に適切な倍率 (表 3-3) をかけることで、正味電荷変異体のデータと重なった (図 3-11)。しかしながら、これらの変異体は正味電荷の反発を減少させているため、 $k_{on}$  は大きくなり、 $k_{off}$  は変化しないか小さくなるはずである。そのため、 $k_{off}$  が表 3-3 の倍率で大きくなっているのではなく、 $k_{on}$  に比べて  $k_{off}$  が無視できるようになったと考えた。それゆえ、正味電荷を変更した場合、Ftn の全ての  $k_{on}$  は同様に変化するといえる。WT と EEEEEQ の結果から、1 つの酸性残基を中性残基に置換するだけで 3 倍程度、速度定数を変更することができる。

正味電荷の反発を減少させた変異体はアセンブリ速度が大きくなったが、その変化は規則的ではなかった (図 3-8、表 3-3)。WT と EEEEEQ、EEEEQ と EQQQQ のアセンブリ速度の差は大きい、EEEEQ、EQQEE、EQQEQ のアセンブリ速度の差は小さかった。これは、1 つの Glu を Gln に置換したとしても、サブユニットの電荷が 1 つ変わるとは限らないことを示している。アミノ酸残基の pKa は周辺の静電相互作用の影響を受け、摂動する。それゆえ、pH 8.0 において、WT と正味電荷変異体の電荷数は 1 つずつ変化しているとは限らない。それゆえ、WT と正味電荷変異体のアセンブリ速度は規則的に変化しなかったと考えられる。

もし、細胞内で正味電荷の反発が Ftn のアセンブリにおいて重要な障壁を作るのであれば、その障壁を乗り越える駆動力が必要となる。WT と正味電荷変異体のアセンブリ反応をイオン強度 0.11、0.17 の条件下で追跡した。WT と正味電荷変異体のアセンブリ速度の差は、ほとんど打ち消された。細胞内容液は 140 mM のカリウムイオンを含んでいるため、正味電荷の反発は重要な障壁にはならないことが分かった。

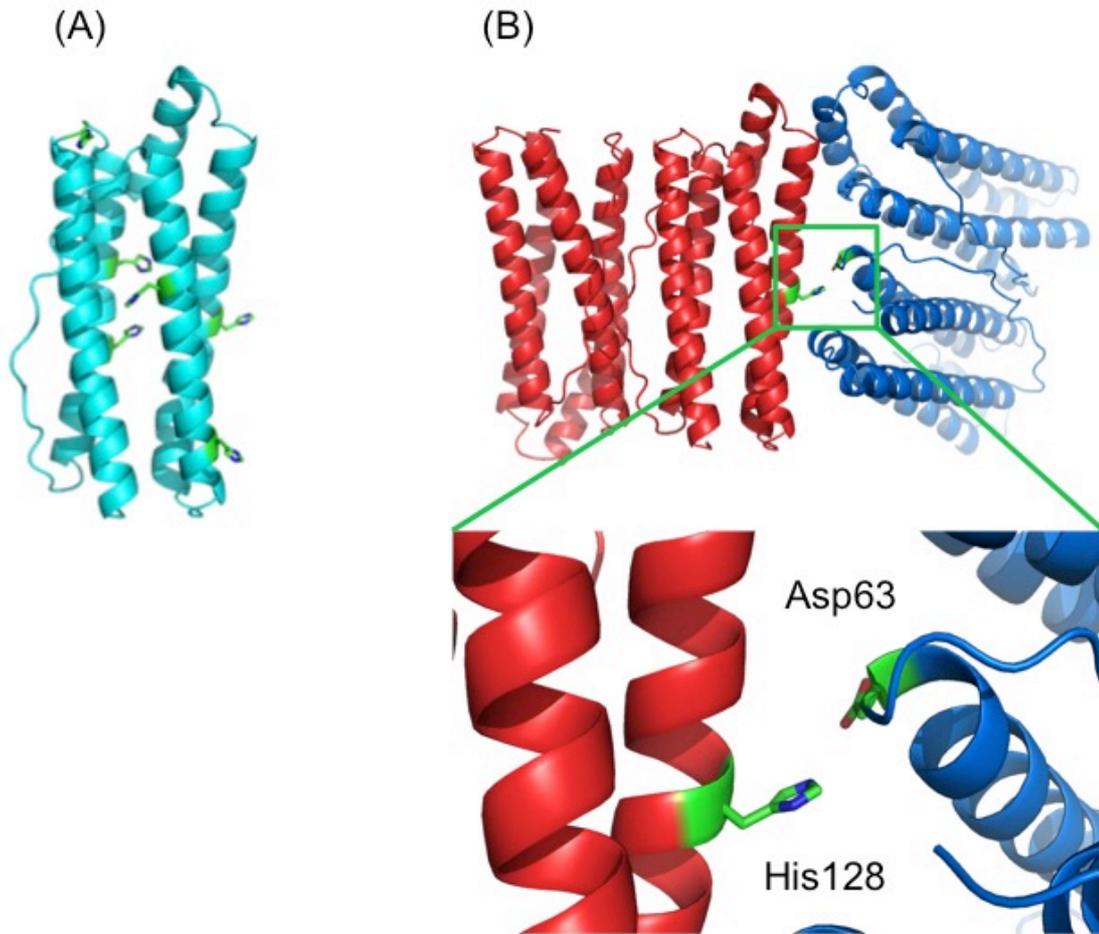


図 3-10 Ftn サブユニット中の His  
サブユニットに存在する 6 つの His をスティック表示した (A)。His128 と Asp63 は 2 量体  
接触面で塩橋を形成している (B)。

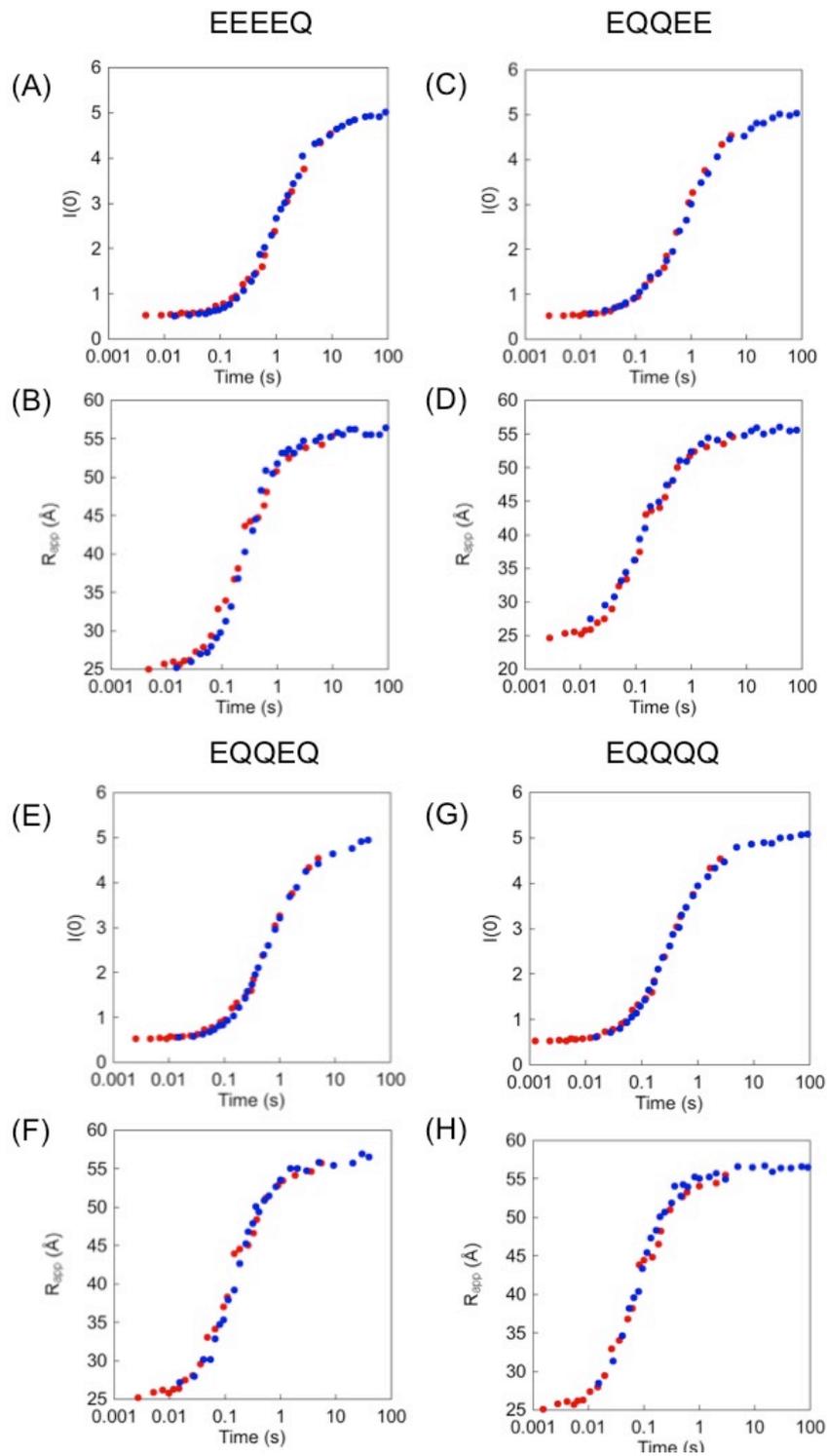


図 3-11 WT と正味電荷変異体のカイネティックデータの重ね合わせ  
 WT のデータを時間軸に対して平行移動させた。WT (●)、正味電荷変異体 (●)。

表 3-3

カイネティックデータを重ねるための倍率

変異体	倍率
EEEEQ	3.2
EQQEE	5.6
EQQEQ	6.0
EQQQQ	12

### 3.5 結論

FtnのアセンブリはpH、イオン強度に依存した(図3-2)。そして、その原因がサブユニットの正味電荷間における反発であることを示した(図3-8)。これは、緩衝液条件など外的要因を変化させずとも、正味電荷を変更した変異体を作製すれば、Ftnのアセンブリ速度を制御できることを示している。これは、Ftnに限らず全てのタンパク質に適用できると考えられる。本研究に用いられた変異体、EEEEQ、EQQEE、EQQEQ、EQQQQ変異体は、WTと同様の構造、特徴を持っていたため、変異箇所を十分に検討すれば、このような変異体を作製は容易である。また、WTに比べてEEEEQの速度定数は3.2倍になることが示唆された。これにより、1つの電荷残基を変更することである程度、アセンブリ速度に変化をもたらすことが可能である。今回の変異体は荷電残基を変異導入のターゲットにしているが、溶媒に露出していれば中性残基を荷電残基に置換することも可能である。また、Ftnの正味電荷間の反発は、細胞内のイオン強度程度で打ち消されることが分かった(図3-9)。これは、生体内では、正味電荷間の相互作用がほとんど重要にならないことを示している。もし、生体内で正味電荷を利用してアセンブリ速度を制御するのであれば、極端に電荷を変更する必要がある。

## 4 総論

### 4.1 球殻状超分子のアセンブリメカニズム

ウイルス・キャプシドのアセンブリカイネティクスは光散乱法や SAXS を用いて研究されてきた。多くのウイルス・キャプシドのアセンブリで、ラグ・フェイズが観測されることが分かっている。また、ラグ・フェイズの終了とともに、ウイルス・キャプシドが形成されることが示唆されている。これは、ウイルス・キャプシドのアセンブリが核形成反応であることを意味している。核形成反応とは、初期構造の形成確率が低く、なかなか形成されないが、一度形成されてしまうとそれを核にして、進行していくタイプの反応である。例えば、ランダムコイルから $\alpha$ ヘリックスの形成、つまりヘリックスコイル転移が核形成反応であることが知られている。 $\alpha$ ヘリックス形成には、 $i$  番目のアミノ酸が  $i+4$  番目のアミノ酸と水素結合を形成し、それが最低 4 残基連続することが必要とされる。 $i$  番目と  $i+4$  番目のアミノ酸が水素結合をするためには、特定の 2 面角 ( $\phi$ が $-60^\circ$ 、 $\psi$ が $-45^\circ$ であることが多い)をとらなければならない。4 残基が一度に、全てこの 2 面角をとる確率は低いため、最初の $\alpha$ ヘリックス 1 巻が核となる。しかし、1 巻 $\alpha$ ヘリックスが形成されてしまえば、続くヘリックスの伸長は次の 1 残基だけが特定の 2 面角をとればよく、核形成よりも速く反応が進行する。ウイルス・キャプシドのアセンブリでは、 $\alpha$ ヘリックスと同様に、初期の中間体の形成確率は低いが、一度形成されるとそれを核にして、フリーなモノマーが次々に結合していくと考えられている。ウイルス・キャプシドのような多くのサブユニットから形成されている超分子構造体 (ウイルス・キャプシドの場合、最低でも 60 量体)は、核形成を導入した方がカイネティック・トラップ形成されにくいことが、理論的な研究から分かっている (Zlotnick et al., 1999)。核形成を導入しない場合、溶液中のあらゆる場所でアセンブリが開始されてしまい、フリーなモノマーが涸渇してしまうことが、カイネティック・トラップを形成してしまう原因であると考えられる。アセンブリメカニズムに核形成を必要とする理由が、最終構造を形成するサブユニットの数で決まるのであれば、いったい何量体から、核形成になるのであろうか。

本研究では、時間分解 X 線小角散乱法を用いて、ウイルス・キャプシドほどは大きくない、24 量体である Ftn のアセンブリメカニズムについての研究を行った。手法としては、時間分解 X 線小角散乱法を用いた。その結果、Ftn アセンブリの全反応を追跡することに成功した (図 2-5B)。測定された散乱関数から、Guinier 近似を用いて

$R_{app}$  と  $I(0)$  がアセンブリの進行と共にどのように上昇していくかを調べた。 $R_{app}$  と  $I(0)$  は、反応開始とともに上昇し、ラグ・フェイズは観測されなかった (図 2-5C)。 $I(0)$  の上昇から初速度を算出し、その初速度のタンパク質濃度依存を調べた。初速度法から、Ftn アセンブリの初期反応は 2 次反応と 3 次反応の混合であることが示唆された (図 2-6B)。これらの結果から、Ftn アセンブリはウイルス・キャプシドのような核形成型ではないことが分かった。また、本研究のフィッティング結果、並びに過去の HSF の研究から、フェリチンのアセンブリメカニズムは、低次反応が連続して起こる逐次重合型であることが示された (図 2-8, 図 2-13, Gerl and Jaenicke, 1987b)。これより少なくとも、24 量体であるフェリチンではラグ・フェイズを伴う核形成は必須ではないことが分かった。実際に、Ftn のアセンブリ反応では、タンパク質濃度が 5.0 mg/mL という高濃度でも、非常にアセンブリが速い条件 (pH 6.0、イオン強度: 2.1 など) でも、カイネティック・トラップ生じることはなかった (図 2-8, 図 3-2)。

24 量体である Ftn では、核形成型でなくともカイネティック・トラップを生じないことは分かった。では、タンパク質は、どのようにして核形成型か逐次重合型を区別しているのであろう。これには、アセンブリ反応中に形成される初期中間体の安定性が関与していると考えられる。例えば、P22 ファージのアセンブリにおいて、核は初期構造が 5 つ結合した 5 量体であることが示唆されている (Prevelige et al., 1993)。しかしながら、アセンブリの駆動力がブラウン運動によるランダムな衝突だとすると、2 次反応が起こらないということは考えにくい。2 次反応の結果、形成される中間体が非常に不安定であり、形成されるとすぐに解離してしまうと考えた方が合理的である。P22 ファージであれば、5 量体と 4 量体以下の中間体の間には、安定性において大きな差が生じていると考えられる。つまり、4 量体以下の中間体の安定性が著しく低く、すぐに解離してしまい、安定な 5 量体が形成されるまでアセンブリが進行しないと考えられる。核の安定化要因は、ウイルス・キャプシドの種類によって多種多様であると考えられるが、いくつか考えられる例を挙げる。タンパク質の安定性において、接触面積は当然として、対称性も非常に重要になる。例えば、ウイルス・キャプシドやフェリチンは、球殻構造を形成していて、非常に対称性が強い。このような構造は、解離を促すための末端構造が存在しない、閉じた構造であるといえる。フェリチンを例に説明する。フェリチンには 6 量体が 4 種類存在する (図 4-1A)。a, b, c の 6 量体で、青と緑で示された 2 量体は、1 面だけが他の 2 量体に接触しており、3 面が溶媒に

露出している末端構造である。中央の赤で示された 2 量体は、2 面が他の 2 量体に接触しているため、末端の 2 量体よりも解離が起こりにくいと考えられる。d の 6 量体は全ての 2 量体において、2 面が他の 2 量体に接触しているため、末端構造が存在しない。つまり、d の 6 量体は a, b, c の 6 量体よりも安定であると考えられる。また、図 4-1B に示された 10 量体のアイソマーは、中央に 4 面が他の 2 量体に囲まれた非常に解離が起こりにくいとされる 2 量体を持っている。フェリチンが 24 量体を形成した場合、全ての 2 量体が等方的な環境におかれる。つまり、全ての 2 量体が先述した解離しづらい、4 面を 2 量体に囲まれた構造を持っている。このような対称性を持つ構造体の安定性は実験的にも示されている。Crichton と Bryce は、超遠心分析を用いて、HSF の解離と再集合状態の割合を様々な pH で調べた (Crichton and Bryce, 1973)。HSF は pH 3.0 では、24 量体を保っており、2 量体は観測されず、pH 2.8 から 1.6 にかけて急激に 2 量体に解離する割合が増加することが示されている。一方、完全に解離させた後のサンプルに関しては、pH 3.0 で 1 週間、インキュベートした後も 24 量体は観測されなかった。完全に再集合が完了したのは、pH 4.6 の条件下であった。同様の現象は NMR 実験によっても示されている (Imai et al., 1981)。このように解離曲線と再集合曲線が重ならないことをヒステリシスと呼ぶ。解離 - 再集合におけるヒステリシスは、HBV でも観測されている (Singh and Zlotnick, 2003)。ヒステリシスは、一度、末端の存在しない、対称性の高い構造を形成すると、サブユニットの解離が強く阻害されるために発生すると考えられている。RRV のキャプシドは、部分的に対称性が壊れていると示されており、このキャプシドの解離 - 再集合には、ヒステリシスが起らない (Wang et al., 2015)。それゆえ、仮に接触面積が小さくても、対称性のある構造を形成すれば、十分安定になると考えられる。HBV では核は、初期構造 (HBV では 2 量体) が 3 つ結合した 6 量体であるとされている (Zlotnick et al., 1999)。この核は HBV のキャプシドの中で形成可能な、最小の対称を持った閉じた構造である。P22 フェージについては、先述したように核は、初期構造 (P22 フェージでは単量体) が 5 つ結合した 5 量体であると示唆されている (Prevelige et al., 1993)。この核はウイルス・キャプシドで多く見られる 5 回対称を形成する構造だとされている。この 5 量体の安定化については、対称性だけでなく、さらなる安定化要因が考えられている。P22 フェージのキャプシド形成には CP だけでなく SP も必要とされる。SP は CP のアセンブリを補助している分子である。SP が核と結合することが示されている。核を形成する際に、分子

間でフォールディングが起こる場合も、核を安定化する要因であると考えられる。HPVのアセンブリにおける初期段階は2次反応であり、Ftnと同様であるが、ラグ・フェイズが観測される (Casini et al., 2004)。HPVのアセンブリは、初期が高次反応ではないにも関わらず、ラグ・フェイズが観測される、興味深い例である。この核形成は還元剤によって阻害される、つまり初期構造間にジスルフィド結合が形成されない限り、核が形成されないのである。初期中間体が形成されると同時にジスルフィド結合が形成されなければならないため、HPVのアセンブリは、初期中間体は2量体 (5量体が2つ結合した10量体)であるにも関わらず、核形成型になると考えられる。本研究で示された、Ftnの最小の初期構造は4量体である。この4量体は、対称性は持たないが非常に大きな接触面積を持っている。また、上記で紹介したP22フェージやHPVとは異なり、Ftnのアセンブリには他の分子の手助けを必要とせず、酸解離状態と天然状態の遠紫外CDスペクトルがほとんど変化しないことから、アセンブリ反応にフォールディング反応は関与しないと考えられる。そのため、Ftnのアセンブリにおいて、反応開始とともに、ラグ・フェイズなしに、初期中間体である4量体が形成されると考えられる。

#### 4.2 アセンブリにおける静電相互作用

Ftnのアセンブリ速度はpHとイオン強度に依存した。pHに関しては、6.0から8.0まで測定し、Ftnの等電点(5.44)に近づくにつれてアセンブリ速度は上昇した。アセンブリ速度のpH依存性は、CCMVにおいても確認されている。CCMVのCP2量体からキャプシドへのアセンブリ反応が、pH 5.75から4.75の条件下で光散乱法を用いて追跡された。この範囲では、pHが低くなるほどアセンブリ速度が上昇した (Zlotnick et al., 2000)。CCMVの2量体CPとキャプシドの等電点が、様々なpHにおける電気泳動度を測定することで決定された (Vega-Acosta et al., 2014)。CP2量体とキャプシドの等電点は、それぞれ4.8、3.7であった。これらの結果は、Ftnと同様にCCMVのアセンブリにおいても、pHが等電点に近づくほど、アセンブリ速度が上昇することを示している。確かにCCMVのアセンブリ速度は等電点に近づくほど、上昇したが、CP2量体の等電点に近いpH 4.75では、高散乱の最終値が期待される値よりも低い位置でプラトーになってしまった。さらにpH 4.75の条件下でリアセンブリさせたサンプルを電子顕微

鏡で確認したところ、部分的にアセンブリされているが不完全な粒子が 30 %程度、存在していた。これは、アセンブリ速度が大きすぎるとミスアセンブリした粒子が発生することを示している。

イオン強度に関しては、0.08 から 2.1 まで測定し、イオン強度が上昇するほどアセンブリ速度は上昇した。正味電荷間の反発がほとんど抑制される 0.11 のイオン強度をこえてもアセンブリ速度が上昇し続けたことから、Ftn のアセンブリ速度には、正味電荷間の反発だけではなく、平均して反発しているローカルな相互作用が関与していると考えられる。アセンブリ速度のイオン強度依存性は、HBV や HIV-1 のアセンブリにおいても確認されている。HIV-1 は NaCl が 1.80 から 2.4 M の範囲では単調にアセンブリ速度が上昇した (Lanman et al., 2002)。HBV のアセンブリは、0.50 から 1.50 M の NaCl 濃度で追跡され、NaCl 濃度が高くなるほど、アセンブリ速度が上昇することを示した (Zlotnick et al., 1999)。これは、Ftn と同様に HBV や HIV-1 のアセンブリにおいても、イオン強度が上昇すると正味電荷間の反発、もしくは反発として働いているローカルな相互作用を打ち消すことでアセンブリ速度が上昇していることを示している。しかしながら、HBV のアセンブリでは、1.50 M の NaCl 条件下でミスアセンブリが起こっていることが示唆された。これは CCMV と同様、アセンブリ速度が大きすぎることが原因であると考えられる。また、P22 ファージにおいて、キャプシドの形成割合が NaCl の濃度に依存することが示されている (Parent et al., 2005)。NaCl が存在しない場合、CP と SP の相互作用が強く、部分的にアセンブリしたミスアセンブリが起こる。少量の NaCl の添加は、正しいキャプシドの形成を促進するが、濃度が高くなりすぎると CP と SP の相互作用を打ち消しすぎて、アセンブリが阻害される。これは、Ftn とは異なり、イオン強度が上昇することで、静電相互作用の引力が打ち消されていると考えられる。

正味電荷間の静電相互作用は、ホモオリゴマーにおいては常に反発しているが、ヘテロオリゴマーにおいては、反発もしくは引力として働いている。ローカルな静電相互作用は、Ftn では平均して反発力として、P22 ファージの CP と SP 間では引力として働いていると考えられる。それゆえ、オリゴマータンパク質のアセンブリにおいて正味電荷間の静電相互作用、ローカルな静電相互作用はアセンブリ速度を決める重要な因子であると考えられる。また、正味電荷間の静電相互作用は細胞内のイオン強度でほとんど打ち消されるが、ローカルな静電相互作用は高イオン強度でも残ると考えら

れる。

*E.coli* と *Mycobacterium tuberculosis* のバクテリオフェリチンの2回転対称軸における塩橋を破壊した変異体 (R30A、R69A)は、他の接触面で解離することが示された。2つのオリゴマーは、ともに酸性タンパク質であり、正味電荷間の反発が増加したことによって解離した可能性がある。正味電荷の反発が増加して、解離の様相が変化した例はFtnでも見られる。本研究室の竹部皐月は Arg56 を Glu に置換した変異体 (R56E) を作製した。R56E はプラスに帯電した Arg がマイナスに帯電した Glu に置換されたことで、中性において正味電荷の反発が増加し、一部が2量体へと解離した (竹部, 2014)。Arg56 はフェリチンの内側に位置しているため、外側の残基を置換するよりも、反発の効果が顕著であったと考えられる (図 4-2)。

#### 4.3 球殻状超分子のデザイン

フェリチンのような球殻状超分子は、高い安定性と人工的に作製することが困難である均一なナノスケールの空洞を持っている。また、タンパク質であることから遺伝子組み換え操作を行うことで、容易に改変を行うことができる。そのため、ドラッグデリバリーシステムなどのバイオナノテクノロジーの分野でも利用されている (Fan et al., 2012; Moon et al., 2014; Liang et al., 2014)。それゆえ、自発的に球殻状超分子へとアセンブリするタンパク質デザイン法を確立することは、タンパク質の物理化学的、機能的な面から見ても非常に魅力的である。しかしながら、タンパク質間の接触は、非常に弱い相互作用の積み重ねで形成されているため、人工的にそのような分子を設計することは難しい。Baker のグループは、3量体のタンパク質に新たな相互作用面を導入することで、新規24量体タンパク質のデザインを行い、作製することに成功した (King et al., 2012)。しかしながら、数十種類の変異体を作製し、成功例は数種類と、デザインの成功率は数%である。

タンパク質のフォールディングは、様々なエネルギー面を滑り落ちながら、最安定な構造を探索していくと考えられている。このようなエネルギー地形は、その形からファネルと呼ばれている。Baker のグループは単量体タンパク質のデザインを行い、デザインされたタンパク質のエネルギー地形がファネル状になるものは、良くフォールドすることを示した (Koga et al., 2012)。これは、タンパク質のデザインの成功には、

最終構造の安定性だけでなく、フォールディングの過程も重要であることを示している。

本研究では、フェリチンのアセンブリは様々な構造が形成されていく、全構造モデルであることを提案した。これは、タンパク質のアセンブリがサブユニット同士のランダムな衝突で、進行していくということを考えると、非常に合理的であり、フォールディングのファネルモデルに近い考えである。それゆえ、球殻状超分子をデザインする際に、様々な構造を経由していくという制限をかけることで、その成功率を上げることが可能であると考えられる。また、等電点近傍の pH や高イオン強度のような、アセンブリ速度が大きくなりすぎるような条件では、ミスアセンブリが起こるとされている。本研究では、低イオン強度では、Ftn の正味電荷を 1 つ変更することで 3 倍程度、速度定数を変更することが可能であることを示した。それゆえ、サブユニットの電荷数を操作することで、ある程度ミスアセンブリが起こる可能性を少なくすることができると考えられる。

生体内においてタンパク質は絶えず、合成され、その特異的な機能を発現するために解離 - 集合を繰り返している。これらの反応は、非常に複雑かつ秩序だで行われている。これらの反応は、実質的に生体内の全ての反応に関与するため、タンパク質間の相互作用を完全に解き明かすことは、生命現象を明らかにすることに等しい。それゆえ、タンパク質アセンブリのデザインを自由自在に操作することが可能になれば、人工的な反応系を細胞内に導入することが可能になる。さらには、人工細胞を作製することにも繋がると考えられる。

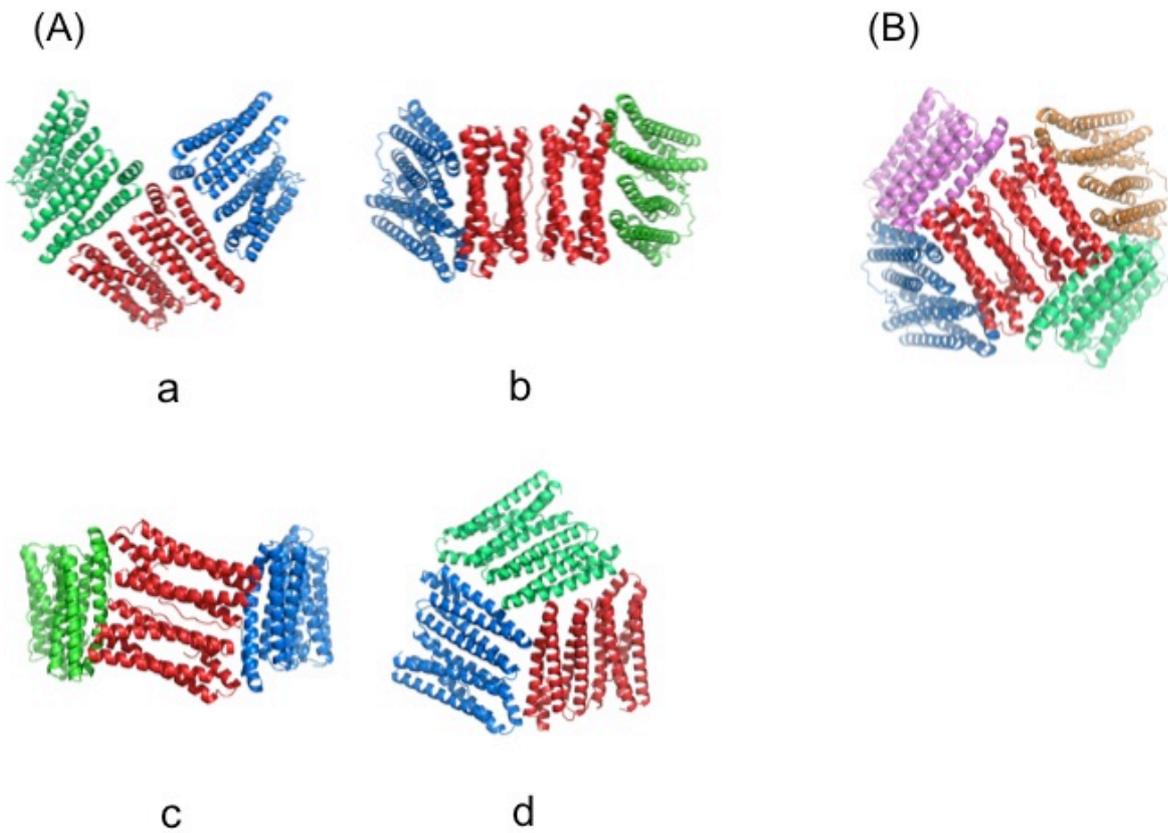


図 4-1 6 量体のアイソマー (A)

a, b, c の青と緑で示された 2 量体は、3 面が溶媒に露出した末端構造を形成している。赤で示された 2 量体は 2 面が他の 2 量体で接触しているため、末端構造よりも安定であると考えられる。4 面が他の 2 量体に囲まれた、溶媒に露出していない 2 量体を持った 10 量体 (B)。

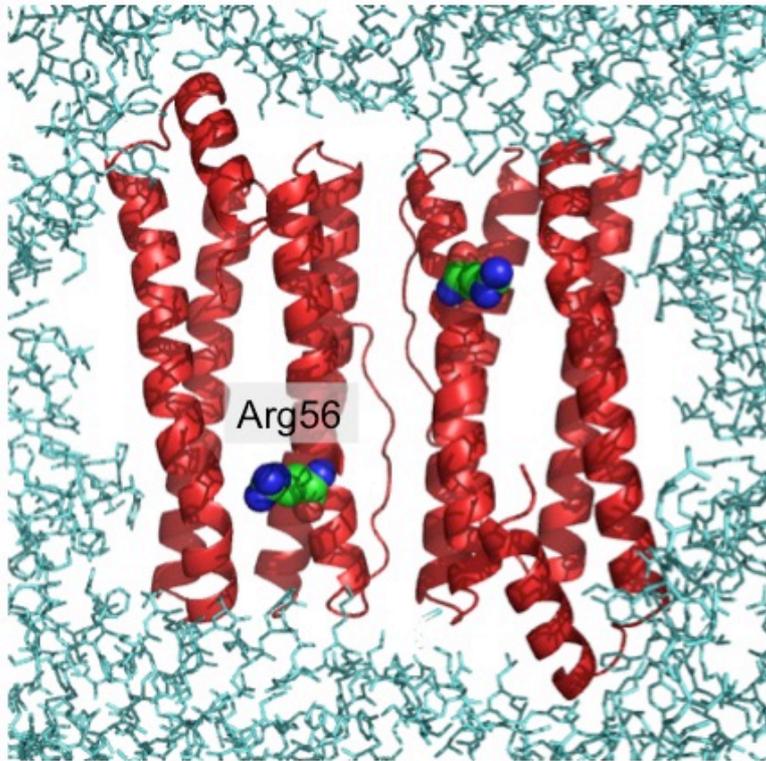


図 4-2 Ftn を内側から見た図  
Arg56 を球状表示している。

## 5 付録

### 5.1 反応速度式 (全構造モデル)

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_2]}{dt} = & -k_4[M_2][M_2] - k_6[M_2][M_4] - k_8[M_2][M_6] - k_{10}[M_2][M_8] - k_{12}[M_2][M_{10}] \\
& - k_{14}[M_2][M_{12}] - k_{16}[M_2][M_{14}] - k_{18}[M_2][M_{16}] - k_{20}[M_2][M_{18}] - k_{22}[M_2][M_{20}] \\
& - k_{24}[M_2][M_{22}] + 2k_{-2,2}[M_4] + k_{-2,4}[M_6] + k_{-2,6}[M_8] + k_{-2,8}[M_{10}] \\
& + k_{-2,10}[M_{12}] + k_{-2,12}[M_{14}] + k_{-2,14}[M_{16}] + k_{-2,16}[M_{18}] + k_{-2,18}[M_{20}] \\
& + k_{-2,20}[M_{22}] - kk_6[M_2][M_2][M_2] - kk_8[M_2][M_2][M_4] - kk_{10}[M_2][M_2][M_6] \\
& - kk_{12}[M_2][M_2][M_8] - kk_{14}[M_2][M_2][M_{10}] - kk_{16}[M_2][M_2][M_{12}] - kk_{18}[M_2][M_2][M_{14}] \\
& - kk_{20}[M_2][M_2][M_{16}] - kk_{22}[M_2][M_2][M_{18}] - kk_{24}[M_2][M_2][M_{20}] - kk_{10}[M_2][M_4][M_4] \\
& - kk_{12}[M_2][M_4][M_6] - kk_{14}[M_2][M_4][M_8] - kk_{16}[M_2][M_4][M_{10}] - kk_{18}[M_2][M_4][M_{12}] \\
& - kk_{20}[M_2][M_4][M_{14}] - kk_{22}[M_2][M_4][M_{16}] - kk_{24}[M_2][M_4][M_{18}] - kk_{14}[M_2][M_6][M_6] \\
& - kk_{16}[M_2][M_6][M_8] - kk_{18}[M_2][M_6][M_{10}] - kk_{20}[M_2][M_6][M_{12}] - kk_{22}[M_2][M_6][M_{14}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_6][M_{16}] - kk_{18}[M_2][M_8][M_8] - kk_{20}[M_2][M_8][M_{10}] - kk_{22}[M_2][M_8][M_{12}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_8][M_{14}] - kk_{22}[M_2][M_{10}][M_{10}] - kk_{24}[M_2][M_{10}][M_{12}]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_4]}{dt} = & -k_6[M_2][M_4] - k_8[M_4][M_4] - k_{10}[M_4][M_6] - k_{12}[M_4][M_8] - k_{14}[M_4][M_{10}] \\
& - k_{16}[M_4][M_{12}] - k_{18}[M_4][M_{14}] - k_{20}[M_4][M_{16}] - k_{22}[M_4][M_{18}] - k_{24}[M_4][M_{20}] \\
& + \frac{1}{2}k_4[M_2][M_2] - k_{-2,2}[M_4] + k_{-2,4}[M_6] + 2k_{-4,4}[M_8] + k_{-4,6}[M_{10}] + k_{-4,8}[M_{12}] \\
& + k_{-4,10}[M_{14}] + k_{-4,12}[M_{16}] + k_{-4,14}[M_{18}] + k_{-4,16}[M_{20}] + k_{-4,18}[M_{22}] \\
& - kk_8[M_2][M_2][M_4] - kk_{10}[M_2][M_4][M_4] - kk_{12}[M_2][M_4][M_6] - kk_{14}[M_2][M_4][M_8] \\
& - kk_{16}[M_2][M_4][M_{10}] - kk_{18}[M_2][M_4][M_{12}] - kk_{20}[M_2][M_4][M_{14}] - kk_{22}[M_2][M_4][M_{16}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_4][M_{18}] - kk_{12}[M_4][M_4][M_4] - kk_{14}[M_4][M_4][M_6] - kk_{16}[M_4][M_4][M_8] \\
& - kk_{18}[M_4][M_4][M_{10}] - kk_{20}[M_4][M_4][M_{12}] - kk_{22}[M_4][M_4][M_{14}] - kk_{24}[M_4][M_4][M_{16}] \\
& - kk_{16}[M_4][M_6][M_6] - kk_{18}[M_4][M_6][M_8] - kk_{20}[M_4][M_6][M_{10}] - kk_{22}[M_4][M_6][M_{12}] \\
& - kk_{24}[M_4][M_6][M_{14}] - kk_{20}[M_4][M_8][M_8] - kk_{22}[M_4][M_8][M_{10}] - kk_{24}[M_4][M_8][M_{12}] \\
& - kk_{24}[M_4][M_{10}][M_{10}]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_6]}{dt} = & -k_8[M_2][M_6] - k_{10}[M_4][M_6] - k_{12}[M_6][M_6] - k_{14}[M_6][M_8] - k_{16}[M_6][M_{10}] \\
& - k_{18}[M_6][M_{12}] - k_{20}[M_6][M_{14}] - k_{22}[M_6][M_{16}] - k_{24}[M_6][M_{18}] + k_6[M_2][M_4] \\
& - k_{-2,4}[M_6] + k_{-2,6}[M_8] + k_{-4,6}[M_{10}] + 2k_{-6,6}[M_{12}] + k_{-6,8}[M_{14}] + k_{-6,10}[M_{16}] \\
& + k_{-6,12}[M_{18}] + k_{-6,14}[M_{20}] + k_{-6,16}[M_{22}] - kk_{10}[M_2][M_2][M_6] - kk_{12}[M_2][M_4][M_6] \\
& - kk_{14}[M_2][M_6][M_6] - kk_{16}[M_2][M_6][M_8] - kk_{18}[M_2][M_6][M_{10}] - kk_{20}[M_2][M_6][M_{12}] \\
& - kk_{22}[M_2][M_6][M_{14}] - kk_{24}[M_2][M_6][M_{16}] - kk_{14}[M_4][M_4][M_6] - kk_{16}[M_4][M_6][M_6] \\
& - kk_{18}[M_4][M_6][M_8] - kk_{20}[M_4][M_6][M_{10}] - kk_{22}[M_4][M_6][M_{12}] - kk_{24}[M_4][M_6][M_{14}] \\
& - kk_{18}[M_6][M_6][M_6] - kk_{20}[M_6][M_6][M_8] - kk_{22}[M_6][M_6][M_{10}] - kk_{24}[M_6][M_6][M_{12}] \\
& - kk_{22}[M_6][M_8][M_8] - kk_{24}[M_6][M_8][M_{10}] + \frac{1}{3}kk_6[M_2][M_2][M_2]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_8]}{dt} = & -k_{10}[M_2][M_8] - k_{12}[M_4][M_8] - k_{14}[M_6][M_8] - k_{16}[M_8][M_8] - k_{18}[M_8][M_{10}] \\
& - k_{20}[M_8][M_{12}] - k_{22}[M_8][M_{14}] - k_{24}[M_8][M_{16}] + k_8[M_2][M_6] + \frac{1}{2}k_8[M_4][M_4] \\
& - k_{-2,6}[M_8] - k_{-4,4}[M_8] + k_{-2,8}[M_{10}] + k_{-4,8}[M_{12}] + k_{-6,8}[M_{14}] + 2k_{-8,8}[M_{16}] \\
& + k_{-8,10}[M_{18}] + k_{-8,12}[M_{20}] + k_{-8,14}[M_{22}] - kk_{12}[M_2][M_2][M_8] - kk_{14}[M_2][M_4][M_8] \\
& - kk_{16}[M_2][M_6][M_8] - kk_{18}[M_2][M_8][M_8] - kk_{20}[M_2][M_8][M_{10}] - kk_{22}[M_2][M_8][M_{12}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_8][M_{14}] - kk_{16}[M_4][M_4][M_8] - kk_{18}[M_4][M_6][M_8] - kk_{20}[M_4][M_8][M_8] \\
& - kk_{22}[M_4][M_8][M_{10}] - kk_{24}[M_4][M_8][M_{12}] - kk_{20}[M_6][M_6][M_8] - kk_{22}[M_6][M_8][M_8] \\
& - kk_{24}[M_6][M_8][M_{10}] - kk_{24}[M_8][M_8][M_8] + \frac{1}{2}kk_8[M_2][M_2][M_4]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{10}]}{dt} = & -k_{12}[M_2][M_{10}] - k_{14}[M_4][M_{10}] - k_{16}[M_6][M_{10}] - k_{18}[M_8][M_{10}] \\
& - k_{20}[M_{10}][M_{10}] - k_{22}[M_{10}][M_{12}] - k_{24}[M_{10}][M_{14}] + k_{10}[M_2][M_8] + k_{10}[M_4][M_6] \\
& - k_{-2,8}[M_{10}] - k_{-4,6}[M_{10}] + k_{-2,10}[M_{12}] + k_{-4,10}[M_{14}] + k_{-6,10}[M_{16}] \\
& + k_{-8,10}[M_{18}] + 2k_{-10,10}[M_{20}] + k_{-10,12}[M_{22}] - kk_{14}[M_2][M_2][M_{10}] \\
& - kk_{16}[M_2][M_4][M_{10}] - kk_{18}[M_2][M_6][M_{10}] - kk_{20}[M_2][M_8][M_{10}] - kk_{22}[M_2][M_{10}][M_{10}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_{10}][M_{12}] - kk_{18}[M_4][M_4][M_{10}] - kk_{20}[M_4][M_6][M_{10}] - kk_{22}[M_4][M_8][M_{10}] \\
& - kk_{24}[M_4][M_{10}][M_{10}] - kk_{22}[M_6][M_6][M_{10}] - kk_{24}[M_6][M_8][M_{10}] + \frac{1}{2}kk_{10}[M_2][M_2][M_6] \\
& + \frac{1}{2}kk_{10}[M_2][M_4][M_4]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{12}]}{dt} = & -k_{14}[M_2][M_{12}] - k_{16}[M_4][M_{12}] - k_{18}[M_6][M_{12}] - k_{20}[M_8][M_{12}] \\
& - k_{22}[M_{10}][M_{12}] - k_{24}[M_{12}][M_{12}] + k_{12}[M_2][M_{10}] + k_{12}[M_4][M_8] + \frac{1}{2}k_{12}[M_6][M_6] \\
& - k_{-2,10}[M_{12}] - k_{-4,8}[M_{12}] - k_{-6,6}[M_{12}] + k_{-2,12}[M_{14}] + k_{-4,12}[M_{16}] + k_{-6,12}[M_{18}] \\
& + k_{-8,12}[M_{20}] + k_{-10,12}[M_{22}] - kk_{16}[M_2][M_2][M_{12}] - kk_{18}[M_2][M_4][M_{12}] \\
& - kk_{20}[M_2][M_6][M_{12}] - kk_{22}[M_2][M_8][M_{12}] - kk_{24}[M_2][M_{10}][M_{12}] - kk_{20}[M_4][M_4][M_{12}] \\
& - kk_{22}[M_4][M_6][M_{12}] - kk_{24}[M_4][M_8][M_{12}] - kk_{24}[M_6][M_6][M_{12}] + \frac{1}{2}kk_{12}[M_2][M_2][M_8] \\
& + kk_{12}[M_2][M_4][M_6] + \frac{1}{3}kk_{12}[M_4][M_4][M_4]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{14}]}{dt} = & -k_{16}[M_2][M_{14}] - k_{18}[M_4][M_{14}] - k_{20}[M_6][M_{14}] - k_{22}[M_8][M_{14}] \\
& - k_{24}[M_{10}][M_{14}] + k_{14}[M_2][M_{12}] + k_{14}[M_4][M_{10}] + k_{14}[M_6][M_8] - k_{-2,12}[M_{14}] \\
& - k_{-4,10}[M_{14}] - k_{-6,8}[M_{14}] + k_{-2,14}[M_{16}] + k_{-4,14}[M_{18}] + k_{-6,14}[M_{20}] \\
& + k_{-8,14}[M_{22}] - kk_{18}[M_2][M_2][M_{14}] - kk_{20}[M_2][M_4][M_{14}] - kk_{22}[M_2][M_6][M_{14}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_8][M_{14}] - kk_{22}[M_4][M_4][M_{14}] - kk_{24}[M_4][M_6][M_{14}] \\
& + \frac{1}{2}kk_{14}[M_2][M_2][M_{10}] + kk_{14}[M_2][M_4][M_8] + \frac{1}{2}kk_{14}[M_2][M_6][M_6] \\
& + \frac{1}{2}kk_{14}[M_4][M_4][M_6]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{16}]}{dt} = & -k_{18}[M_2][M_{16}] - k_{20}[M_4][M_{16}] - k_{22}[M_6][M_{16}] - k_{24}[M_8][M_{16}] \\
& + k_{16}[M_2][M_{14}] + k_{16}[M_4][M_{12}] + k_{16}[M_6][M_{10}] + \frac{1}{2}k_{16}[M_8][M_8] \\
& - k_{-2,14}[M_{16}] - k_{-4,12}[M_{16}] - k_{-6,10}[M_{16}] - k_{-8,8}[M_{16}] + k_{-2,16}[M_{18}] \\
& + k_{-4,16}[M_{20}] + k_{-6,16}[M_{22}] - kk_{20}[M_2][M_2][M_{16}] - kk_{22}[M_2][M_4][M_{16}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_6][M_{16}] - kk_{24}[M_4][M_4][M_{16}] + \frac{1}{2}kk_{16}[M_2][M_2][M_{12}] \\
& + kk_{16}[M_2][M_4][M_{10}] + kk_{16}[M_2][M_6][M_8] + \frac{1}{2}kk_{16}[M_4][M_4][M_8] \\
& + \frac{1}{2}kk_{16}[M_4][M_6][M_6]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{18}]}{dt} = & -k_{20}[M_2][M_{18}] - k_{22}[M_4][M_{18}] - k_{24}[M_6][M_{18}] + k_{18}[M_2][M_{16}] \\
& + k_{18}[M_4][M_{14}] + k_{18}[M_6][M_{12}] + k_{18}[M_8][M_{10}] - k_{-2,16}[M_{18}] - k_{-4,14}[M_{18}] \\
& - k_{-6,12}[M_{18}] - k_{-8,10}[M_{18}] + k_{-2,18}[M_{20}] + k_{-4,18}[M_{22}] - kk_{22}[M_2][M_2][M_{18}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_4][M_{18}] + \frac{1}{2}kk_{18}[M_2][M_2][M_{14}] + kk_{18}[M_2][M_4][M_{12}] \\
& + kk_{18}[M_2][M_6][M_{10}] + \frac{1}{2}kk_{18}[M_2][M_8][M_8] + \frac{1}{2}kk_{18}[M_4][M_4][M_{10}] \\
& + kk_{18}[M_4][M_6][M_8] + \frac{1}{3}kk_{18}[M_6][M_6][M_6]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{20}]}{dt} = & -k_{22}[M_2][M_{20}] - k_{24}[M_4][M_{20}] + k_{20}[M_2][M_{18}] + k_{20}[M_4][M_{16}] \\
& + k_{20}[M_6][M_{14}] + k_{20}[M_8][M_{12}] + \frac{1}{2}k_{20}[M_{10}][M_{10}] - k_{-2,18}[M_{20}] \\
& - k_{-4,16}[M_{20}] - k_{-6,14}[M_{20}] - k_{-8,12}[M_{20}] - k_{-10,10}[M_{20}] + k_{-2,20}[M_{22}] \\
& - kk_{24}[M_2][M_2][M_{20}] + \frac{1}{2}kk_{20}[M_2][M_2][M_{16}] + kk_{20}[M_2][M_4][M_{14}] \\
& + kk_{20}[M_2][M_6][M_{12}] + kk_{20}[M_2][M_8][M_{10}] + \frac{1}{2}kk_{20}[M_4][M_4][M_{12}] \\
& + kk_{20}[M_4][M_6][M_{10}] + \frac{1}{2}kk_{20}[M_4][M_8][M_8] + \frac{1}{2}kk_{20}[M_6][M_6][M_8]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{22}]}{dt} = & -k_{24}[M_2][M_{22}] + k_{22}[M_2][M_{20}] + k_{22}[M_4][M_{18}] + k_{22}[M_6][M_{16}] \\
& + k_{22}[M_8][M_{14}] + k_{22}[M_{10}][M_{12}] - k_{-2,20}[M_{22}] - k_{-4,18}[M_{22}] - k_{-6,16}[M_{22}] \\
& - k_{-8,14}[M_{22}] - k_{-10,12}[M_{22}] + \frac{1}{2}kk_{22}[M_2][M_2][M_{18}] + kk_{22}[M_2][M_4][M_{16}] \\
& + kk_{22}[M_2][M_6][M_{14}] + kk_{22}[M_2][M_8][M_{12}] + \frac{1}{2}kk_{22}[M_2][M_{10}][M_{10}] \\
& + \frac{1}{2}kk_{22}[M_4][M_4][M_{14}] + kk_{22}[M_4][M_6][M_{12}] + kk_{22}[M_4][M_8][M_{10}] \\
& + \frac{1}{2}kk_{22}[M_6][M_6][M_{10}] + \frac{1}{2}kk_{22}[M_6][M_8][M_8]
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d[M_{24}]}{dt} &= k_{24}[M_2][M_{22}] + k_{24}[M_4][M_{20}] + k_{24}[M_6][M_{18}] + k_{24}[M_8][M_{16}] \\
&+ k_{24}[M_{10}][M_{14}] + \frac{1}{2}k_{24}[M_{12}][M_{12}] + \frac{1}{2}kk_{24}[M_2][M_2][M_{20}] + kk_{24}[M_2][M_4][M_{18}] \\
&+ kk_{24}[M_2][M_6][M_{16}] + kk_{24}[M_2][M_8][M_{14}] + kk_{24}[M_2][M_{10}][M_{12}] \\
&+ \frac{1}{2}kk_{24}[M_4][M_4][M_{16}] + kk_{24}[M_4][M_6][M_{14}] + kk_{24}[M_4][M_8][M_{12}] \\
&+ \frac{1}{2}kk_{24}[M_4][M_{10}][M_{10}] + \frac{1}{2}kk_{24}[M_6][M_6][M_{12}] + kk_{24}[M_6][M_8][M_{10}] \\
&+ \frac{1}{3}kk_{24}[M_8][M_8][M_8]
\end{aligned}$$

$m_2 = 1$	$k_4 = m_2kf$	$kk_6 = m_6kkf$	$k_{-2,2} = m_2m_2k_-$
$m_4 = 1$	$k_6 = m_6k$	$kk_8 = m_8kk$	$k_{-2,4} = m_2m_4k_-$
$m_6 = 4$	$k_8 = m_8k$	$kk_{10} = m_{10}kk$	$k_{-2,6} = m_2m_6k_-$
$m_8 = 6$	$k_{10} = m_{10}k$	$kk_{12} = m_{12}k$	$k_{-2,8} = m_2m_8k_-$
$m_{10} = 14$	$k_{12} = m_{12}k$	$kk_{14} = m_{14}kk$	$k_{-2,10} = m_2m_{10}k_-$
$m_{12} = 24$	$k_{14} = m_{14}k$	$kk_{16} = m_{16}kk$	$k_{-2,12} = m_2m_{12}k_-$
$m_{14} = 32$	$k_{16} = m_{16}k$	$kk_{18} = m_{18}kk$	$k_{-2,14} = m_2m_{14}k_-$
$m_{16} = 25$	$k_{18} = m_{18}k$	$kk_{20} = m_{20}kk$	$k_{-2,16} = m_2m_{16}k_-$
$m_{18} = 13$	$k_{20} = m_{20}k$	$kk_{22} = m_{22}kk$	$k_{-2,18} = m_2m_{18}k_-$
$m_{20} = 5$	$k_{22} = m_{22}k$	$kk_{24} = m_{24}kk$	$k_{-2,20} = m_2m_{20}k_-$
$m_{22} = 1$	$k_{24} = m_{24}kr$		
$m_{24} = 1$			

$k_{-4,4} = m_4m_4k_-$	$k_{-6,6} = m_6m_6k_-$	$k_{-8,8} = m_8m_8k_-$	$k_{-10,10} = m_{10}m_{10}k_-$
$k_{-4,6} = m_4m_6k_-$	$k_{-6,8} = m_6m_8k_-$	$k_{-8,10} = m_8m_{10}k_-$	$k_{-10,12} = m_{10}m_{12}k_-$
$k_{-4,8} = m_4m_8k_-$	$k_{-6,10} = m_6m_{10}k_-$	$k_{-8,12} = m_8m_{12}k_-$	
$k_{-4,10} = m_4m_{10}k_-$	$k_{-6,12} = m_6m_{12}k_-$	$k_{-8,14} = m_8m_{14}k_-$	
$k_{-4,12} = m_4m_{12}k_-$	$k_{-6,14} = m_6m_{14}k_-$		
$k_{-4,14} = m_4m_{14}k_-$	$k_{-6,16} = m_6m_{16}k_-$		
$k_{-4,16} = m_4m_{16}k_-$			
$k_{-4,18} = m_4m_{18}k_-$			

$m_{2n}$  は  $2n$  個のサブユニットから形成されるオリゴマーが何種類存在しているか、 $k_{2n}$  と  $kk_{2n}$  はそれぞれ  $2n$  個のサブユニットから形成されているオリゴマーを形成する際の 2 次と 3 次の速度定数、 $k_{-2n,20}$  は  $2n$  量体と  $20$  量体に解離する際の速度定数を、それぞれ表している。統計学的な因子を考えるために、それぞれの速度定数には  $m_{2n}$  が掛けられている。

## 6 参考文献

1. Arosio, P., Ingrassia, R., and Cavadini, P. (2009) Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more, *Biochim Biophys Acta* 1790, 589-599.
2. Baraibar, M. A., Barbeito, A. G., Muhoberac, B. B., and Vidal, R. (2008) Iron-mediated aggregation and a localized structural change characterize ferritin from a mutant light chain polypeptide that causes neurodegeneration, *J Biol Chem* 283, 31679-31689.
3. Bruce, A., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R., and Peter, W. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, New York.
4. Cannon, G. C., Bradburne, C. E., Aldrich, H. C., Baker, S. H., Heinhorst, S., and Shively, J. M. (2001) Microcompartments in prokaryotes: carboxysomes and related polyhedra, *Appl Environ Microbiol* 67, 5351-5361.
5. Casini, G. L., Graham, D., Heine, D., Garcea, R. L., and Wu, D. T. (2004) In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering, *Virology* 325, 320-327.
6. Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G., and Harrison, S. C. (2000) Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16, *Mol Cell* 5, 557-567.
7. Chiaraluce, R., Consalvi, V., Cavallo, S., Ilari, A., Stefanini, S., and Chiancone, E. (2000) The unusual dodecameric ferritin from *Listeria innocua* dissociates below pH 2.0, *Eur J Biochem* 267, 5733-5741.
8. Crichton, R. R., and Bryce, C. F. (1973) Subunit interactions in horse spleen apoferritin. Dissociation by extremes of pH, *Biochem J* 133, 289-299.
9. Curtis, A. R., Fey, C., Morris, C. M., Bindoff, L. A., Ince, P. G., Chinnery, P. F., Coulthard, A., Jackson, M. J., Jackson, A. P., McHale, D. P., Hay, D., Barker, W. A., Markham, A. F., Bates, D., Curtis, A., and Burn, J. (2001) Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease, *Nat Genet* 28, 350-354.
10. Dautant, A., Meyer, J. B., Yariv, J., Précigoux, G., Sweet, R. M., Kalb, A. J., and Frolow, F. (1998) Structure of a monoclinic crystal from of cytochrome b1 (Bacterioferritin) from *E. coli*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 16-24.
11. Dickey, L. F., Sreedharan, S., Theil, E. C., Didsbury, J. R., Wang, Y. H., and Kaufman, R. E. (1987) Differences in the regulation of messenger RNA for housekeeping and specialized-cell ferritin. A comparison of three distinct ferritin complementary DNAs, the corresponding subunits, and identification of the first processed in amphibia, *J Biol Chem* 262, 7901-7907.
12. Doniach, S. (2001) Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering, *Chem Rev* 101, 1763-1778.

13. Fan, K., Cao, C., Pan, Y., Lu, D., Yang, D., Feng, J., Song, L., Liang, M., and Yan, X. (2012) Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues, *Nat Nanotechnol* 7, 459-464.
14. Fargion, S., Arosio, P., Fracanzani, A. L., Cislighi, V., Levi, S., Cozzi, A., Piperno, A., and Fiorelli, G. (1988) Characteristics and expression of binding sites specific for ferritin H-chain on human cell lines, *Blood* 71, 753-757.
15. Fujiwara, K., and Ikeguchi, M. (2008) OLIGAMI: OLIGomer Architecture and Molecular Interface, *The Open Bioinformatics Journal* 2, 50-53.
16. Fuller, M. T., and King, J. (1982) Assembly in vitro of bacteriophage P22 procapsids from purified coat and scaffolding subunits, *J Mol Biol* 156, 633-665.
17. Garmann, R. F., Comas-Garcia, M., Gopal, A., Knobler, C. M., and Gelbart, W. M. (2014) The assembly pathway of an icosahedral single-stranded RNA virus depends on the strength of inter-subunit attractions, *J Mol Biol* 426, 1050-1060.
18. Gerl, M., and Jaenicke, R. (1987a) Assembly of apoferritin from horse spleen: comparison of the protein in its native and reassembled state, *Biol Chem Hoppe Seyler* 368, 387-396.
19. Gerl, M., and Jaenicke, R. (1987b) Mechanism of the self-assembly of apoferritin from horse spleen. Cross-linking and spectroscopic analysis, *Eur Biophys J* 15, 103-109.
20. Gerl, M., Jaenicke, R., Smith, J. M., and Harrison, P. M. (1988) Self-assembly of apoferritin from horse spleen after reversible chemical modification with 2,3-dimethylmaleic anhydride, *Biochemistry* 27, 4089-4096.
21. Glatter, O., and Kratky, O. (1982) *Small angle X-ray scattering*, Academic, London.
22. Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R., and Hogle, J. M. (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA, *Nature Structural Biology* 5, 294-303.
23. Grove, A., and Wilkinson, S. P. (2005) Differential DNA binding and protection by dimeric and dodecameric forms of the ferritin homolog Dps from *Deinococcus radiodurans*, *J Mol Biol* 347, 495-508.
24. Guinier, A., and Fournet, G. (1955) *Small-angle scattering of X-rays*, Wiley, New York.
25. Ha, Y., Shi, D., Small, G. W., Theil, E. C., and Allewell, N. M. (1999) Crystal structure of bullfrog M ferritin at 2.8 Å resolution: analysis of subunit interactions and the binuclear metal center, *J Biol Inorg Chem* 4, 243-256.
26. Hamburger, A. E., West, A. P., Hamburger, Z. A., Hamburger, P., and Bjorkman, P. J. (2005) Crystal structure of a secreted insect ferritin reveals a symmetrical arrangement of heavy and light chains, *J Mol Biol* 349, 558-569.

27. Hammersley, A. P., Svensson, S. O., Hanfland, M., Fitch, A. N., and Hausermann, D. (1996) Two-dimensional detector software: From real detector to idealised image or two-theta scan, *High Pressure Research* 14, 235-248.
28. Harrison, P. M., and Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim Biophys Acta* 1275, 161-203.
29. Hiragi, Y., Inoue, H., Sano, Y., Kajiwara, K., Ueki, T., and Nakatani, H. (1990) Dynamic mechanism of the self-assembly process of tobacco mosaic virus protein studied by rapid temperature-jump small-angle X-ray scattering using synchrotron radiation, *J Mol Biol* 213, 495-502.
30. Imai, N., Arata, Y., and Fujiwara, S. (1981) <sup>1</sup>H NMR study of dissociation and re-association of apoferritin and ferritin, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 54, 1243-1244.
31. Iwahori, K., Yoshizawa, K., Muraoka, M., and Yamashita, I. (2005) Fabrication of ZnSe nanoparticles in the apoferritin cavity by designing a slow chemical reaction system, *Inorg Chem* 44, 6393-6400.
32. Jacob, J., Krantz, B., Dothager, R. S., Thiyagarajan, P., and Sosnick, T. R. (2004) Early collapse is not an obligate step in protein folding, *J Mol Biol* 338, 369-382.
33. Katayama, E. (1998) Quick-freeze deep-etch electron microscopy of the actin-heavy meromyosin complex during the in vitro motility assay, *J Mol Biol* 278, 349-367.
34. Kenney, J. M., von Bonsdorff, C. H., Nassal, M., and Fuller, S. D. (1995) Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores, *Structure* 3, 1009-1019.
35. Khare, G., Nangpal, P., and Tyagi, A. K. (2013) Unique residues at the 3-fold and 4-fold axis of mycobacterial ferritin are involved in oligomer switching, *Biochemistry* 52, 1694-1704.
36. King, N. P., Sheffler, W., Sawaya, M. R., Vollmar, B. S., Sumida, J. P., André, I., Gonen, T., Yeates, T. O., and Baker, D. (2012) Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy, *Science* 336, 1171-1174.
37. Koga, N., Tatsumi-Koga, R., Liu, G., Xiao, R., Acton, T. B., Montelione, G. T., and Baker, D. (2012) Principles for designing ideal protein structures, *Nature* 491, 222-227.
38. Lanman, J., Sexton, J., Sakalian, M., and Prevelige, P. E. (2002) Kinetic analysis of the role of intersubunit interactions in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly in vitro, *J Virol* 76, 6900-6908.
39. Lasocki, S., Gaillard, T., and Rineau, E. (2014) Iron is essential for living!, *Crit Care* 18, 678.
40. Lavelle, L., Gingery, M., Phillips, M., Gelbart, W. M., Knobler, C. M., Cadena-Nava, R. D., Vega-Acosta, J. R., Pinedo-Torres, L. A., and Ruiz-Garcia, J. (2009) Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs, *J Phys Chem B* 113, 3813-3819.

41. Leimberg, J. M., Konijn, A. M., and Fibach, E. (2003) Developing human erythroid cells grown in transferrin-free medium utilize iron originating from extracellular ferritin, *Am J Hematol* 73, 211-212.
42. Leimberg, M. J., Prus, E., Konijn, A. M., and Fibach, E. (2008) Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors, *J Cell Biochem* 103, 1211-1218.
43. Li, L., Fang, C. J., Ryan, J. C., Niemi, E. C., Lebrón, J. A., Björkman, P. J., Arase, H., Torti, F. M., Torti, S. V., Nakamura, M. C., and Seaman, W. E. (2010) Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3505-3510.
44. Liang, M., Fan, K., Zhou, M., Duan, D., Zheng, J., Yang, D., Feng, J., and Yan, X. (2014) H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 14900-14905.
45. Liao, Q. K., Kong, P. A., Gao, J., Li, F. Y., and Qian, Z. M. (2001) Expression of ferritin receptor in placental microvilli membrane in pregnant women with different iron status at mid-term gestation, *Eur J Clin Nutr* 55, 651-656.
46. Luscieti, S., Santambrogio, P., Langlois d'Estaintot, B., Granier, T., Cozzi, A., Poli, M., Gallois, B., Finazzi, D., Cattaneo, A., Levi, S., and Arosio, P. (2010) Mutant ferritin L-chains that cause neurodegeneration act in a dominant-negative manner to reduce ferritin iron incorporation, *J Biol Chem* 285, 11948-11957.
47. Luscieti, S., Santambrogio, P., Langlois d'Estaintot, B., Granier, T., Cozzi, A., Poli, M., Gallois, B., Finazzi, D., Cattaneo, A., Levi, S., and Arosio, P. (2010) Mutant ferritin L-chains that cause neurodegeneration act in a dominant-negative manner to reduce ferritin iron incorporation, *J Biol Chem* 285, 11948-11957.
48. Maciel, P., Cruz, V. T., Constante, M., Iniesta, I., Costa, M. C., Gallati, S., Sousa, N., Sequeiros, J., Coutinho, P., and Santos, M. M. (2005) Neuroferritinopathy: missense mutation in FTL causing early-onset bilateral pallidal involvement, *Neurology* 65, 603-605.
49. Mancuso, M., Davidzon, G., Kurlan, R. M., Tawil, R., Bonilla, E., Di Mauro, S., and Powers, J. M. (2005) Hereditary ferritinopathy: a novel mutation, its cellular pathology, and pathogenetic insights, *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 280-294.
50. Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T., and Mikami, B. (2010) Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin, *J Biol Chem* 285, 4049-4059.
51. Meyron-Holtz, E. G., Fibach, E., Gelvan, D., and Konijn, A. M. (1994) Binding and uptake of exogenous isoferritins by cultured human erythroid precursor cells, *Br J Haematol* 86, 635-641.
52. Moon, H., Lee, J., Min, J., and Kang, S. (2014) Developing genetically engineered encapsulin protein cage nanoparticles as a targeted delivery nanoplatfrom, *Biomacromolecules* 15, 3794-3801.

53. Niwa, T., Kanamori, T., Ueda, T., and Taguchi, H. (2012) Global analysis of chaperone effects using a reconstituted cell-free translation system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8937-8942.
54. Niwa, T., Ying, B. W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T., and Taguchi, H. (2009) Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of Escherichia coli proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4201-4206.
55. Nolting, B. (2006) *Protein folding kinetics biological method*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
56. Ohta, E., Nagasaka, T., Shindo, K., Toma, S., Nagasaka, K., Ohta, K., and Shiozawa, Z. (2008) Neuroferritinopathy in a Japanese family with a duplication in the ferritin light chain gene, *Neurology* 70, 1493-1494.
57. Ohtomo, H., Ohtomo, M., Sato, D., Kurobe, A., Sunato, A., Matsumura, Y., Kihara, H., Fujiwara, K., and Ikeguchi, M. (2015) A Physicochemical and Mutational Analysis of Intersubunit Interactions of Escherichia coli Ferritin A, *Biochemistry* 54, 6243-6251.
58. Okuda, M., Iwahori, K., Yamashita, I., and Yoshimura, H. (2003) Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin, *Biotechnol Bioeng* 84, 187-194.
59. Pain, R. (2000) *Mechanisms of protein folding*, 2nd ed., Oxford University, Oxford.
60. Parent, K. N., Doyle, S. M., Anderson, E., and Teschke, C. M. (2005) Electrostatic interactions govern both nucleation and elongation during phage P22 procapsid assembly, *Virology* 340, 33-45.
61. Perrin, D. D., and Dempsey, B. (1974) *Buffers for pH and metal ion control*, Chapman and hall, London.
62. Pfeiffer, P., and Hirth, L. (1974) Aggregation states of brome mosaic virus protein, *Virology* 61, 160-167.
63. Pozzi, C., Di Pisa, F., Lalli, D., Rosa, C., Theil, E., Turano, P., and Mangani, S. (2015) Time-lapse anomalous X-ray diffraction shows how Fe(2+) substrate ions move through ferritin protein nanocages to oxidoreductase sites, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71, 941-953.
64. Prevelige, P. E., Thomas, D., and King, J. (1988) Scaffolding protein regulates the polymerization of P22 coat subunits into icosahedral shells in vitro, *J Mol Biol* 202, 743-757.
65. Prevelige, P. E., Thomas, D., and King, J. (1993) Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells, *Biophys J* 64, 824-835.
66. Prinsen, P., van der Schoot, P., Gelbart, W. M., and Knobler, C. M. (2010) Multishell structures of virus coat proteins, *J Phys Chem B* 114, 5522-5533.
67. Sakurai, K., and Goto, Y. (2002) Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine Beta-lactoglobulin by amino acid substitution, *J Biol Chem* 277, 25735-25740.

68. Sana, B., Johnson, E., Le Magueres, P., Criswell, A., Cascio, D., and Lim, S. (2013) The role of nonconserved residues of *Archaeoglobus fulgidus* ferritin on its unique structure and biophysical properties, *J Biol Chem* 288, 32663-32672.
69. Segel, D. J., Eliezer, D., Uversky, V., Fink, A. L., Hodgson, K. O., and Doniach, S. (1999) Transient dimer in the refolding kinetics of cytochrome c characterized by small-angle X-ray scattering, *Biochemistry* 38, 15352-15359.
70. Singh, S., and Zlotnick, A. (2003) Observed hysteresis of virus capsid disassembly is implicit in kinetic models of assembly, *J Biol Chem* 278, 18249-18255.
71. Stefanini, S., Agrò, A. F., Chiancone, E., and Antonini, E. (1979) Binding of hydrophobic compounds to apoferritin subunits. Effects on the polymerization state, *FEBS Lett* 100, 296-300.
72. Stefanini, S., Chiancone, E., Arosio, P., Finazzi-Agrò, A., and Antonini, E. (1982) Structural heterogeneity and subunit composition of horse ferritins, *Biochemistry* 21, 2293-2299.
73. Stefanini, S., Vecchini, P., and Chiancone, E. (1987) On the mechanism of horse spleen apoferritin assembly: a sedimentation velocity and circular dichroism study, *Biochemistry* 26, 1831-1837.
74. Stillman, T. J., Hempstead, P. D., Artymiuk, P. J., Andrews, S. C., Hudson, A. J., Treffry, A., Guest, J. R., and Harrison, P. M. (2001) The high-resolution X-ray crystallographic structure of the ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*; Comparison with human H ferritin (HuHF) and the structures of the Fe<sup>3+</sup> and Zn<sup>2+</sup> derivatives, *Journal of Molecular Biology* 307, 587-603.
75. Sutter, M., Boehringer, D., Gutmann, S., Günther, S., Prangishvili, D., Loessner, M. J., Stetter, K. O., Weber-Ban, E., and Ban, N. (2008) Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment, *Nat Struct Mol Biol* 15, 939-947.
76. Svergun, D. I., and Koch, M. H. J. (2003) Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution, *Reports on Progress in Physics* 66, 1735-1782.
77. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *Journal of Applied Crystallography* 28, 768-773.
78. Tanaka, S., Kerfeld, C. A., Sawaya, M. R., Cai, F., Heinhorst, S., Cannon, G. C., and Yeates, T. O. (2008) Atomic-level models of the bacterial carboxysome shell, *Science* 319, 1083-1086.
79. Tresset, G., Le Coeur, C., Bryche, J. F., Tatou, M., Zeghal, M., Charpilienne, A., Poncet, D., Constantin, D., and Bressanelli, S. (2013) Norovirus capsid proteins self-assemble through biphasic kinetics via long-lived state-like intermediates, *J Am Chem Soc* 135, 15373-15381.
80. Tsukamoto, R., Iwahor, K., Muraoka, M., and Yamashita, I. (2005) Synthesis of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles using the cage-shaped protein, apoferritin, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 78, 2075-2081.

81. Tuma, R., Tsuruta, H., French, K. H., and Prevelige, P. E. (2008) Detection of intermediates and kinetic control during assembly of bacteriophage P22 procapsid, *J Mol Biol* 381, 1395-1406.
82. Vega-Acosta, J. R., Cadena-Nava, R. D., Gelbart, W. M., Knobler, C. M., and Ruiz-García, J. (2014) Electrophoretic mobilities of a viral capsid, its capsid protein, and their relation to viral assembly, *J Phys Chem B* 118, 1984-1989.
83. Vidal, R., Ghetti, B., Takao, M., Brefel-Courbon, C., Uro-Coste, E., Glazier, B. S., Siani, V., Benson, M. D., Calvas, P., Miravalle, L., Rascol, O., and Delisle, M. B. (2004) Intracellular ferritin accumulation in neural and extraneural tissue characterizes a neurodegenerative disease associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene, *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 363-380.
84. Wang, J. C., Chen, C., Rayaprolu, V., Mukhopadhyay, S., and Zlotnick, A. (2015) Self-Assembly of an Alphavirus Core-like Particle Is Distinguished by Strong Intersubunit Association Energy and Structural Defects, *ACS Nano* 9, 8898-8906.
85. Wang, Z., Li, C., Ellenburg, M., Soistman, E., Ruble, J., Wright, B., Ho, J. X., and Carter, D. C. (2006) Structure of human ferritin L chain, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 800-806.
86. Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., and Weiner, A. M. (1987) *Molecular biology of the gene*, Vol. 1, 4th ed., Benjamin Cummings, San Francisco.
87. Wong, K. K. W., and Mann, S. (1996) Biomimetic synthesis of cadmium sulfide-ferritin nanocomposites, *Advanced Materials* 8, 928-&.
88. Yamashita, I., Hayashi, J., and Hara, M. (2004) Bio-template synthesis of uniform CdSe nanoparticles using cage-shaped protein, apoferritin, *Chemistry Letters* 33, 1158-1159.
89. Yamashita, I., Iwahori, K., and Kumagai, S. (2010) Ferritin in the field of nanodevices, *Biochim Biophys Acta* 1800, 846-857.
90. Zhang, Y., Fu, J., Chee, S. Y., Ang, E. X., and Orner, B. P. (2011) Rational disruption of the oligomerization of the mini-ferritin E. coli DPS through protein-protein interface mutation, *Protein Sci* 20, 1907-1917.
91. Zhang, Y., Raudah, S., Teo, H., Teo, G. W., Fan, R., Sun, X., and Orner, B. P. (2010) Alanine-shaving mutagenesis to determine key interfacial residues governing the assembly of a nano-cage maxi-ferritin, *J Biol Chem* 285, 12078-12086.
92. Zhang, Y., Wang, L., Ardejani, M. S., Aris, N. F., Li, X., Orner, B. P., and Wang, F. (2015) Mutagenesis study to disrupt electrostatic interactions on the twofold symmetry interface of Escherichia coli bacterioferritin, *J Biochem*.
93. Zlotnick, A., Aldrich, R., Johnson, J. M., Ceres, P., and Young, M. J. (2000) Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus, *Virology* 277, 450-456.

94. Zlotnick, A., Johnson, J. M., Wingfield, P. W., Stahl, S. J., and Endres, D. (1999) A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly, *Biochemistry* 38, 14644-14652.
95. Zondlo, J., Fisher, K. E., Lin, Z., Ducote, K. R., and Eisenstein, E. (1995) Monomer-heptamer equilibrium of the Escherichia coli chaperonin GroES, *Biochemistry* 34, 10334-10339.
96. 砂戸歩美 2011年 創価大学 修士論文
97. 佐藤大輔 2013年 創価大学 修士論文
98. 竹部皐月 2014年 創価大学 修士論文
99. 近藤薫 2015年 創価大学 卒業論文
100. 舘康介 2015年 創価大学 修士論文

## 7 謝辞

本研究を行うにあたり、本学、池口雅道教授に直接、御指導頂きました。研究において困難を乗り越えてこられたのも、池口教授のおかげであります。厚くお礼申し上げます。プログラミングについては、藤原和夫准教授に御教示頂きました。コンピューターを用いた解析を行わなければ、この研究を行うことはできませんでした。心から感謝申し上げます。SAXSの解析については山田好輝博士、CD、SEC等の実験については大友秀明博士にお世話になりました。深く感謝致します。菌体や変異体の作製については砂戸歩美さん、竹部臯月さん、サンプルの調整については黒部淳史さんにご協力を頂きました。感謝申し上げます。共に励ましあった友人に感謝申し上げます。ESI-MSの測定には、大阪大学の内山進准教授、岡崎統合バイオサイエンスセンターの石井健太郎博士に行って頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。本研究の一部は笹川科学研究助成による資金援助を受けて行われました。

最後に、ここまで私を育て、支えてきてくれた両親に感謝の意を表明して謝辞とさせていただきます。