

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

A study on the assembly mechanism of ferritin using time-resolved small-angle X-ray scattering

13D5604 佐藤大輔

指導教授 池口雅道

SYNOPSIS

Escherichia coli ferritin (Ftn) is a spherical-shell shaped protein consisting of 24 identical subunits arranged with 4/3/2 symmetry. Ftn dissociates into 2-mers at acidic pH and can reassemble into the native 24-mer when pH increases. To clarify the assembly mechanism of Ftn, the assembly reaction was initiated by a stopped-flow mixing of the acid-dissociated Ftn solution and high pH buffer solutions and was monitored by measuring time-resolved small-angle X-ray scattering. I succeeded in monitoring the overall reaction. The assembly rate depended on the protein concentration, and its dependence suggests that the initial reaction order was 2.44. I proposed a model in which all possible structures were considered. The model could explain the observed kinetics. The assembly rate also depended on ionic strength and pH. It was confirmed to increase with increasing NaCl concentration and with approaching pH to pI of Ftn. Because the net charge of subunits is expected to be negative at pH 8.0, I considered that the repulsion between the net charges of subunits caused the dependences. To test this hypothesis, the assembly rates of mutants with different charges were measured, and the assembly rates of the mutants increased with decreasing the net charge. Therefore, the repulsion between subunit net charges was found to be an important factor determining the assembly rate.

Keywords: ferritin; assembly mechanism; net charge; TR-SAXS; initial rate method; global fitting

1. 緒言

フェリチンは生体にとって必須元素である鉄を貯蔵するタンパク質である。鉄を貯蔵するという機能から、フェリチンは真正細菌、古細菌、植物、脊椎動物と広い範囲で発見されている。フェリチンは、24量体の球殻状タンパク質であり、4/3/2回転対称を持っている。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-DヘリックスとC末端に存在するEヘリックスで構成されている。フェリチンの立体構造は広く保存されている。真正細菌のフェリチンは同一のサブユニットから形成されるホモオリゴマーである。サブユニットの中央に鉄を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。一方、哺乳類のフェリチンは構造的に相同であるH (heavy)サブユニットとL (light)サブユニットから形成されている、ヘテロオリゴマーである。Hサブユニットは真正細菌と同様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、鉄の取り込みの促進、24量体の安定性に寄与している。HサブユニットとLサブユニットの混合比は組織によって異なる。例えば、ウマ脾臓フェリ

チン (HSF) はほとんどがLサブユニットで構成されている。これらのサブユニットは、単独でも24量体を構成することができる[1]。フェリチン、ウイルス・キャプシド、エンキャプスリン、プロテアソームのような多量体タンパク質は、特異的な機能獲得のために、サブユニットが正確に天然構造へとアセンブリする必要がある。

HSFについての解離、再集合における研究は1960-1980年代にかけて行われていた。HSFは可逆的に酸性pHで解離し、低pHで高濃度のグアニジン塩酸塩溶液中で変性する。Stefaniniとその共著者等は、疎水性試薬を用いて誘導した部分的な再集合において、6量体の形成を示し[2]、また、超遠心とCDスペクトルの結果から、再集合過程において2量体-4量体-8量体平衡の存在を提案した[3]。GerlとJaenickeは、分子架橋法とSDS-PAGEを用いて、アセンブリ反応中に2量体、3量体、12量体が蓄積することを示した[4]。このように様々な研究が行われているにも関わらず、フェリチンのアセンブリメカニズムは明らかになっていない。

時間分解 X 線小角散乱 (TR-SAXS) は、大きい構造

変化を伴う反応を追跡するために使われてきた[5]。タンパク質のアセンブリに関しては、ウイルス・キャプシドのアセンブリを SAXS の変化で追跡した例が報告されている[6, 7]。SAXS はタンパク質のアセンブリを追跡するために、非常に適した方法であるが、フェリチンのアセンブリを SAXS で追跡した例は存在しない。検出器のデータ読み込み時間やシグナル・ノイズ比の問題から、ミリ秒オーダーの反応を追跡することは難しかったのが、原因と考えられる。近年、放射光施設と検出器の発展から、数十ミリ秒の時間分解能で反応を追跡することが可能となった[8]。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 線とデータ読み込み時間が数ミリ秒である高速二次元検出器 PILATUS を用いて、フェリチンのアセンブリ反応を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、新しい知見を得ることができると期待した。ターゲットタンパク質として、大腸菌フェリチン (Ftn) を選択した。Ftn は酸性 pH で天然様の 2 次構造、3 次構造を保持したまま 2 量体に解離し、pH を上昇させることで天然の 24 量体を再構成可能である。Ftn は HSF と異なり、高濃度のアセンブリにおいても 24 量体より大きな会合体を形成せず、SAXS 実験に非常に適している。

2. 方法

2-1 発現菌体とタンパク質の精製

本研究室の砂戸により、WT Ftn の過剰発現系が、竹部により、正味電荷を変更した変異体が作製された[9, 10]。37 °C で一晩、培養した Ftn 発現菌体溶液を超音波破碎した。得られた破碎液に対して、75 °C 熱処理を 2 回、0.1 % (w/v) ポリエチレンイミン処理、硫酸処理 (60 %飽和) を行った。沈殿画分を溶解させ、ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行った。5 mM 亜ジチオン酸ナトリウム、10 mM EDTA/2Na を用いて Ftn サンプルから鉄を取り除いた。少なくとも室温で 1 時間以上放置した後、緩衝液交換を行い、亜ジチオン酸ナトリウム、EDTA を取り除いた。WT、変異体ともに上述の方法で発現、精製が行われた。

2-2 TR-SAXS によるアセンブリ反応の追跡

酸性解離した Ftn 溶液と pH を上昇させるための緩衝液を stopped-flow 混合し、アセンブリ反応を開始させ、その反応を SAXS の変化で追跡した。測定され

た散乱関数から Guinier 近似 (式 1) を用いて慣性半径: R_{app} 、前方散乱強度: $I(0)$ を算出した。式 1 の Q は散乱ベクトルの大きさを意味している。 R_{app} は、単粒子系であれば散乱体の分子サイズを表し、 $I(0)$ は散乱体の質量濃度、分子量、ビーム強度に比例する。多粒子系では、 $I(0)$ はその平均値、 R_{app} は大きい構造に重み付けられた値になる。全ての実験は SPring-8 の BL45XU で行われた。

$$\ln I(Q) = \ln I(0) - \frac{R_{app}^2 Q^2}{3}$$

式 1 Guinier 近似

3. 結果および考察

3-1 WT Ftn のアセンブリ反応の追跡

Ftn のアセンブリ反応は 15 ミリ秒の時間分解能で測定され、全反応の追跡に成功した。測定された散乱関数から Guinier 近似を用いて、 R_{app} 、 $I(0)$ を算出し、時間の対数に対してプロットした (図 1)。2 本の破線は、2 量体と 24 量体の R_{app} と $I(0)$ を示している。

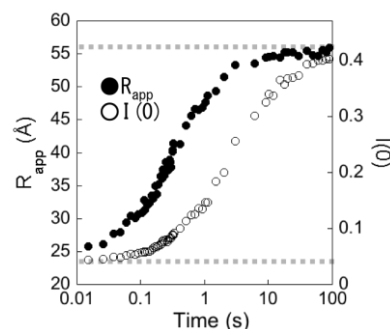


図 1 WT のアセンブリ反応の追跡

3-2 初期反応次数

Ftn のアセンブリ速度は、タンパク質濃度に依存し、タンパク質濃度が上昇するとともにアセンブリ速度も大きくなった。Ftn アセンブリの初期反応次数を見積もるために、初速度のタンパク質濃度依存を調べた。見かけの初期反応次数は 2.44 となったため、反応初期には、2 つの 2 量体が 4 量体を形成する反応と、3 つの 2 量体が 6 量体を形成する反応が起きていると考えられる。4 次以上の反応は確率的に起こりにくいため、この解析では考慮しなかった。

3-3 アセンブリモデル

初期反応は、2 次、3 次反応が起きていると示唆された。この結果から、続く反応も 2 次と 3 次反応の

みを考慮する。HSFの結果から、24量体を形成する前に様々な構造を経由することが示唆されている。そこで私は、Ftnのアセンブリメカニズムとして、考えられる全ての構造を経由する全構造モデルを提案した。初期構造が2量体であり、この2量体が単量体へ解離することは考えにくいことから、中間体は全て偶数のサブユニットから構成されていると考えられる。そのため、全構造とは2量体から24量体までの、偶数のサブユニットから成る全ての構造とした。その結果、2量体から24量体までに14量体の32種をピークとして127種類の構造があることが分かった。モデルを簡略化するため、もしくは観測値を再現するために以下の7つの近似を導入した。

1. 解離反応は2つの分子種に分かれる反応のみを考慮する。
2. 24量体は安定であるため、解離しない。
3. 2次反応において、初期と最終反応以外の速度定数 (k) は同じとする。言い換えると、4量体形成、24量体形成には個別の速度定数 (それぞれ k_f , k_r) を考える。
4. 3次反応において、初期反応以外の速度定数 (kk) は同じとする。言い換えると、6量体形成には個別の速度定数 (kkf) を考える。
5. 解離反応に関しては、速度定数 ($k_$) は全て同じとする。
6. 2次反応、3次反応、解離反応において、いくつかの反応を経由しなければならない場合、その経由しなければならない反応は考慮しない。例えば、2量体と6量体 a から8量体 a を形成する場合、以下の3段階の反応を経由しなければならない (図2)。

- (i) 6量体 a \rightarrow 2量体 + 4量体
 - (ii) 4量体 + 2量体 \rightarrow 6量体 b
 - (iii) 6量体 b + 2量体 \rightarrow 8量体 a
- 上記の反応を以下のように近似する。
6量体 a + 2量体 \rightarrow 8量体 a

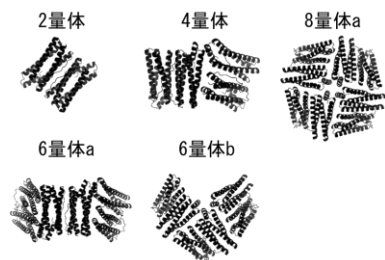


図2 2量体から8量体の構造

3-4 グローバルフィッティング

モデルから反応速度式を作成し、各濃度の R_{app} , $I(0)$ の上昇カーブに対してグローバルフィッティングを行った。全濃度のデータに対して、同じ速度定数 (Table1) で良好なフィッティングが行えた (図3)。そのため、Ftnのアセンブリを全構造モデルで説明することに成功した。HSFとこれらの結果を合わせて、フェリチンにおけるアセンブリメカニズムとして、全構造モデルを提案する。

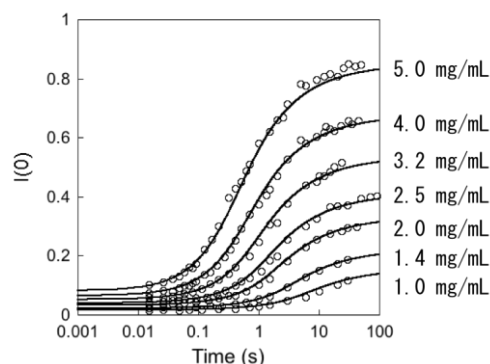


図3 $I(0)$ に対するグローバルフィッティング

Table1 フェリチンアセンブリの速度定数

k_f	5.20×10^4 /M s
k	1.14×10^3 /M s
kkf	3.59×10^8 /M ² s
kk	6.76×10^7 /M ² s
$k_$	1.90×10^{-2} /s
k_r	1.21×10^6 /M s

3-5 アセンブリ速度のイオン強度、pH 依存

Ftnのアセンブリ速度はイオン強度に依存した (図4)。イオン強度はNaClを用いて変更し、2 Mまではアセンブリ速度が上昇することを確認した。pHはNaOHを用いて、8.0に調整されている。Ftnはホモオリゴマーであり、その等電点は5.4である。そのため、Ftnのサブユニットは負に帯電していると考えられ、サブユニットの正味電荷間に反発が起きていると考えられる。また、Ftnのアセンブリ速度はpHにも依存した。pHは6.0から8.0の間で測定され、pHがFtnの等電点に近くなるとアセンブ

り速度が上昇した。Ftn アセンブリ速度の pH、イオン強度依存性の原因は、ともに正味電荷間の反発であると考えられた。このような、アセンブリ速度の pH、イオン強度依存性はウイルスにおいても確認されている [11, 12]。

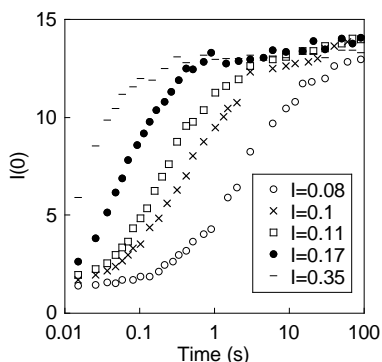


図 4 アセンブリ速度のイオン強度依存

3-6 WT と変異体のアセンブリ速度

本研究室の竹部は、グルタミン酸をグルタミンに、段階的に 4 つまで置換した変異体を作製した [10]。変異体名は置換の少ない順に EQ1、EQ2、EQ3、EQ4 となっている。これらの変異体は WT と同様の構造を持つことが確認されている。また、解離、再集合が WT と同様に可能である。アセンブリ速度への正味電荷の影響を見積もるために、WT と変異体のアセンブリ反応を追跡し、そのアセンブリ速度を比較した。その結果、正味電荷が減少するほどアセンブリ速度は大きくなった (図 5)。しかしながら、この効果は 0.17 程度のイオン強度によって打ち消されることが分かった (図 6)。サブユニットの正味電荷間の相互作用はホモオリゴマーであれば反発力、ヘテロオリゴマーであれば反発力もしくは引力として働くはずである。そのため、オリゴマーのアセンブリにおいて正味電荷はその速度を制御する一因といえる。しかしながら、その効果は 0.17 程度のイオン強度で打ち消されるため、生理学的な条件においては重要な問題にはならないことが分かった。また、Ftn のアセンブリ速度はイオン強度が 0.17 を越えても上昇する。そのため、Ftn のアセンブリ速度には、正味電荷間の静電相互作用だけでなく、平均して反発項になっているローカルな静電相互作用も関与していると考えられる。

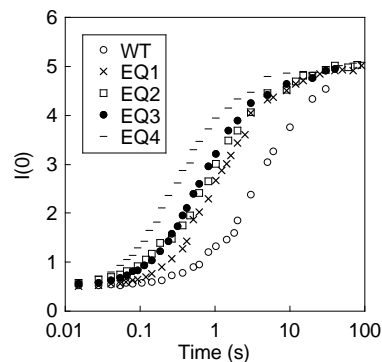


図 5 WT と変異体のアセンブリ速度の比較

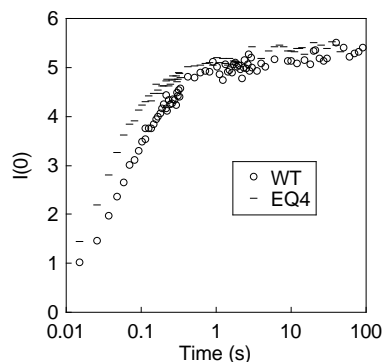


図 6 $I=0.17$ でのアセンブリ速度の比較

4. 参考文献

1. Arosio, et al. (2009). *Biochim Biophys Acta* 1790, 589-99.
2. Stefanini, S. et al. (1979). *FEBS Lett* 100, 296-300.
3. Stefanini, S. et al. (1987). *Biochemistry* 26, 1831-7.
4. Gerl, M. and Jaenicke, R. (1987). *Eur Biophys J* 15, 103-109.
5. Chaudhuri, B. N. (2015). *Protein Sci* 24, 267-76.
6. Cuillel, M. et al. (1983). *J Mol Biol* 164, 645-50.
7. Tuma, R. et al. (2008). *J Mol Biol* 381, 1395-406.
8. Tresset, G. et al. (2013). *J Am Chem Soc* 135, 15373-81.
9. 砂戸歩美 2010 年度 創価大学 修士論文
10. 竹部皐月 2013 年度 創価大学 修士論文
11. Zlotnick, A. et al. (1999). *Biochemistry* 38, 14644-52.
12. Zlotnick, A. et al. (2000). *Virology* 277, 450-456