

# フェリチンの鉄酸化・ミネラル化に関する研究

## Studies on the iron oxidation/mineralization of ferritin

学籍番号 20D5901 氏名 桑田 巧 指導教員名 池口 雅道

### SYNOPSIS

Ferritin keeps cells from being damaged by reactive oxygen species produced by  $\text{Fe}^{2+}$  and stores the oxidized iron in its cavity as iron cores. The iron core contains a various amount of inorganic phosphate (Pi). In bacteria, the amount of phosphate is comparable to that of iron. In contrast, ferritins from mammals contain only a tenth phosphate. It is not clear how the phosphate works in the iron oxidation and mineralization process. In this research, I investigated the effect of the phosphate on the structural feature of iron cores formed in the cavity of *Escherichia coli* ferritin (EcFtnA) and on its function. First, the structure of iron cores was characterized using analytical ultracentrifugation, transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering. These experiments revealed that the iron core was a cluster of small particles of which diameter were 2-4 nm in the absence of phosphate whereas it had a hollow spherical structure of which the inner and outer diameters were 6 and 8 nm, respectively. The effects of phosphate on the oxidation/mineralization kinetics were also investigated spectrophotometrically. The oxidation reaction showed at least two kinetic phases when iron atoms beyond 72 Fe/protein shell were added. The initial phase corresponds to the binding of three irons to a ferroxidase center and subsequent oxidation, whereas the second one reflects the turnover, that is, the movement of oxidized iron from the ferroxidase center to the cavity. By comparing the kinetic curves with and without phosphates, it was revealed that the phosphate accelerated only the second phase, suggesting that the phosphate increases the turnover rate of the iron oxidation and/or mineralization process by EcFtnA.

Neuroferritinopathy is a rare disease caused by mutations to human ferritin light chain gene (*ftII*). While 9 of ten mutations reported to date produce ferritin mutants extended from 4 to 16 amino acid residues in the C-terminal region, A96T is a point mutant associated with neuroferritinopathy. The functional information of A96T has not been obtained in contrast to frameshift mutants. The iron incorporation activity of A96T mutant was investigated by native-PAGE using Prussian blue staining and change in absorbance intensity at 310nm. The result revealed that the iron incorporation activity of A96T is similar to that of human ferritin light chain wild type, and suggested that the pathogenic mechanism caused by A96T is different from the model proposed for frameshift mutants.

Keywords: Ferritin; Iron core formation; Phosphate; Neuroferritinopathy

## 1. 緒言

### 1-1. EcFtnA の鉄酸化・ミネラル化に及ぼすリン酸の影響

生体内において、鉄は酸素運搬や呼吸鎖などの生命活動の維持に必要不可欠な元素である。遊離した  $\text{Fe}^{2+}$  はフェントン反応によって過酸化水素と反応し、ヒドロキシラジカルを形成し細胞障害を引き起こす<sup>[1]</sup>。一方で、酸化された  $\text{Fe}^{3+}$  は水に対して不溶である。多くの生物種は鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンによって、余剰な  $\text{Fe}^{2+}$  を酸化し、フェリチン内腔に酸化鉄を貯蔵することで、これらの問題を回避している<sup>[2]</sup>。

フェリチンは 24 量体の球殻状の立体構造を持つタンパク質複合体である<sup>[3]</sup>。フェリチンのサブユニットは A-E の 5 本の  $\alpha$ -ヘリックスから構成され、A-D の  $\alpha$ -ヘリックスは 4-ヘリックスバンドル構造を形成する。4-ヘリックスバンドル構造の中心には鉄の酸化活性 (フェロキシダーゼ活性) サイトが存在している。フェロキシダーゼ活性サイトで酸化された鉄は、直径が約 8nm のフェリチン内腔に不溶性の鉄コアとして貯蔵されている<sup>[4,5]</sup>。

フェリチンは、細菌・古細菌から哺乳類に至るまで広く保存されている。フェリチンのアミノ酸配列の配列相同性は、大腸菌とヒトフェリチンで比較した場合で約 20% 程度であるが、上記の立体構造を共有している<sup>[4]</sup>。生物種間での比較において、上記のようにフェリチンの構造的な特徴は共有されている一方で、機能的な側面においては多くの違いが報告されている。生体内においてフェリチンは、哺乳類では、フェロキシダーゼ活性を保持する H 鎖と活性を持たない L 鎖から構成されたヘテロオリゴマーとして存在している<sup>[7]</sup>。一方で、細菌・古細菌では、H 鎖に相当するサブユニットのホモオリゴマーとして存在する。

生体内でフェリチン内腔に形成された鉄コアには鉄の

他に無機リン酸が含まれることが報告されている<sup>[8,9]</sup>。鉄コアに含まれる無機リン酸の存在比は生物種によって異なり、哺乳類では、鉄とリン酸の存在比は 10:1 である一方で、細菌・植物においては、鉄と同量の無機リン酸が含まれることが報告されている<sup>[8,9]</sup>。リン酸の有無によって、鉄コアの結晶性や化学反応性が異なっていることが報告されており、リン酸非存在下で調製された鉄コアは高い結晶性を示す一方で、リン酸を含む鉄コアはアモルファスである<sup>[9,10]</sup>。

従来の鉄コア形成に関する研究は、リン酸を含まない鉄コアに対して透過型電子顕微鏡によるアプローチを用いたものが主であった<sup>[11]</sup>。しかし、無機リン酸を含んだ鉄コアに関する研究は行われておらず、無機リン酸がフェリチンの機能・フェリチン内腔に形成される鉄コアに対して与える影響は明らかとなっていない。また、従来の研究では試験管内で鉄コアの作製を行った場合、フェリチン球殻外部に形成される鉄の凝集体が問題となっていた。本研究ではゲル濾過クロマトグラフィーを用いてホロフェリチンを精製することで、この問題を解消した。これによって、分析超遠心 (AUC)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、X 線小角散乱 (SAXS) 等の様々な実験手法を用いることが可能になり、大腸菌由来フェリチン (EcFtn) について、無機リン酸が鉄の酸化活性、鉄コアの形成に及ぼす影響を明らかにした。リン酸が鉄コア構造に及ぼす影響を調べることによって、生体内における鉄コア形成機構の解明につながると期待される。

### 1-2. 神経フェリチン症に関連変異体 A96T の機能解析

神経フェリチン症は、フェリチン L 鎖遺伝子 (*ftII*) の突然変異によって生じる遺伝性疾患である。神経フェリチン症に関連する 10 種類の変異体が報告されており、その内

9種類はフレームシフト変異体が生じることが報告されている。先行研究において、フレームシフト変異体の1つ p.Phe167SerfsX26 の X線結晶構造解析の結果から、伸長したC末端領域はディスオーダーしている<sup>[12]</sup>。加えて、野生型と比較して鉄取り込み能が著しく低下し、凝集体を形成することが報告されている<sup>[12]</sup>。これらの結果に基づき、フレームシフト変異体による神経フェリチン症は、変異体サブユニットを含むフェリチン分子同士が、伸長したC末端領域と鉄を介して凝集体を形成し、細胞内で沈着するという発症モデルが提案されている。

一方で、神経フェリチン症に関連する唯一の点変異体として96番目のアラニンがスレオニンに置換されたA96Tが報告されている。しかし、A96T変異体が他のフレームシフト変異体のように鉄取り込み能が低下しているのかは報告されておらず、同様に機構によって、神経フェリチン症が発症するか明らかとなっていない。A96Tの鉄取り込み能を調べることによって、A96Tによる神経フェリチン症の発症機構が解明されると期待される。

## 2. 方法

### 2-1. アポ・ホロ EcFtnA の調製

アポ EcFtnA の調製は、本研究室の砂戸が確立した大腸菌を用いたタンパク質発現系、精製系に従って行われた<sup>[13]</sup>。ホロ EcFtnA の調製は下記の通りに行われた。まず、1  $\mu$ M のアポ EcFtnA 溶液と 500mM 硫酸アンモニウム鉄(II)溶液を 1000:1 の割合で混合し、25°Cで30分静置した。20mM リン酸緩衝液 (pH 7) と 25mM HEPES 緩衝液 (pH 7) の条件下で、この操作を繰り返し、500-4000 個の鉄を添加し、ホロ EcFtnA を含む溶液を作製した。この混合液を Superose 6 increase カラムクロマトグラフィーに供し、フェリチン球殻外部に存在する鉄を除去することで、ホロ EcFtnA を精製した。球殻内に取り込まれた鉄量は、イオン誘導プラズマ(ICP)発光分光分析によって定量された。また、鉄コアに含まれるリン酸はモリブデンアッセイによって定量された。

### 2-2. ホロ EcFtnA 内腔に形成された鉄コア構造の特徴づけ

25mM HEPES もしくは 20mM リン酸緩衝液中で作製、精製されたホロ EcFtnA について、分析超遠心、透過型電子顕微鏡、X線小角散乱による特徴づけを行った。

沈降速度法を用いた AUC 測定は、ベックマン XL-I 超遠心分析装置で 20°C、30000 rpm の条件で行った。沈降過程は波長 280nm を用いて追跡し、得られたデータについて SEDFIT を用いて解析を行い、沈降係数  $s$  の分布  $c(s)$  を得た。

TEM による鉄コアの観察については、日本電子 JEM-2100F 透過型電子顕微鏡を用いて非染色の条件のもと観察を行った。

SAXS 測定については、Photon Factory ビームライン BL6A、10C で行われた。X線波長は 1.5Å、カメラ長 2m で測定を行った。コントラストマッチング条件の決定は、0-45% (w/w)濃度のスクロース溶液中でアポ EcFtnA の SAXS 測定を行った。得られた散乱カーブについて、Guinier 近似のもと前方散乱強度  $I(0)$  を導出した。 $I(0)$  を溶媒の電子密度に対してプロットし、フィッティングカーブからコントラストマッチング条件を決定した。

### 2-3. Stopped-flow によるフェロキシダーゼ活性の測定

2  $\mu$ M アポ EcFtnA 溶液と 96-960  $\mu$ M 硫酸アンモニウム鉄(II)溶液を Applied Photophysics 社 SX-20 stopped-flow 装置を用いて 1:1 の比率で高速混合し、EcFtnA による鉄の酸化反応を 310nm の吸光度変化を用いて追跡した。0, 1, 5, 20mM のリン酸条件下において、同様の実験を繰り返し行った。すべての実験は 25°Cで行われ、各測定について5回の実験データを積算した。

### 2-4. ヒトフェリチン L 鎖野生型 (HuFTL) と A96T 変異体の鉄取り込みアッセイ

1  $\mu$ M アポ HuFTL 溶液および 0.5-4.5mM 硫酸アンモニウム鉄(II)溶液を混合し、混合後、室温で 2h 静置した。混合溶液を遠心し、沈殿を除去した後、上清の UV/vis スペクトルを測定した。また、上清をサンプルに native-PAGE を行い、プルシアンブルー染色によって鉄コアを検出した。

## 3. 結果・考察

### 3-1. AUC 測定による鉄コア構造の解析

精製したホロ EcFtnA について沈降速度法を用いた AUC 測定を行った。各サンプル名は、EcFtnA 内部に取り込まれた鉄量とリン酸の有無を表している (図 1, 2)。得られた AUC 測定のデータについて SEDFIT を用いて解析し、 $c(s)$  分布を得た。リン酸存在条件下で鉄コアを形成した場合、鉄量が増加するに従って、 $c(s)$  分布のピークは沈降係数が増加する方向にシフトした (図 1)。この結果は、フェリチン球殻内部における鉄コアの形成を示している。一方で、25mM HEPES 緩衝液下で鉄コアを形成した場合、リン酸存在条件下と同様に、添加した鉄量の増加に伴って、 $c(s)$  分布のピークが沈降係数増加する方向にシフトした。ただし、リン酸を含まないホロ EcFtnA の  $c(s)$  分布は、複数のピークが観測された。HEPES 緩衝液下で観測された  $c(s)$  分布に含まれる離散的なピークは、EcFtnA 内腔に複数の鉄コアを形成したホロ EcFtnA が存在していることを示唆している。

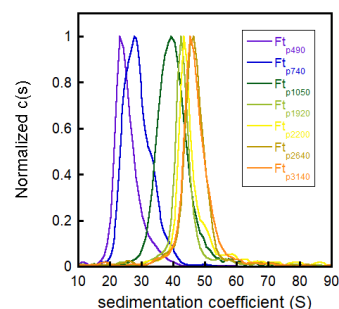


図 1. リン酸存在下(20mM リン酸緩衝液)において作製されたホロ EcFtnA の  $c(s)$  分布

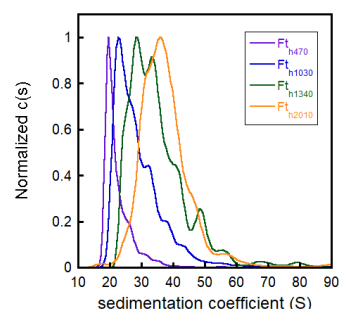


図 2. リン酸非存在下(25mM HEPES 緩衝液)において作製されたホロ EcFtnA の  $c(s)$  分布

### 3-2. TEM による鉄コア構造の観察

20mM リン酸緩衝液、25mM HEPES 緩衝液のそれぞれで調製された鉄コアを TEM で観察した (図 3, 図 4)。図 3、図 4 で示された TEM 画像は、非染色で観察されたものである。図 3 から、リン酸存在下で作製された鉄コアについて、ImageJ を用いて、鉄コアの平均直径を計った場合、リン酸存在下では 7.9 nm であった。この結果は、EcFtnA の結晶構造から計算されるフェリチン内径 8nm と一致して

おり、フェリチン内腔に鉄コアが形成されていることを示している。一方で、25mM HEPES 緩衝液中で作製された鉄コアについては、フェリチンの内腔に直径 2-4nm 小さな鉄コア粒子のクラスターが形成されていることが確認された (図 4)。HEPES 緩衝液中で形成される小さな鉄コア粒子の数は、フェリチン分子ごとに異なっており、c(s)分布関数に複数のピークが確認された結果と一致している。

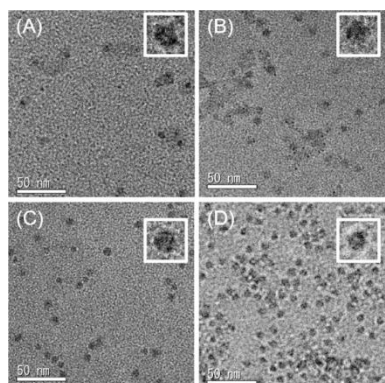


図 3. リン酸存在下(20mM リン酸緩衝液)において作製された鉄コアの TEM 画像。  
(A) Ftp490, (B) Ftp740, (C) Ftp1920, (D)Ftp2640

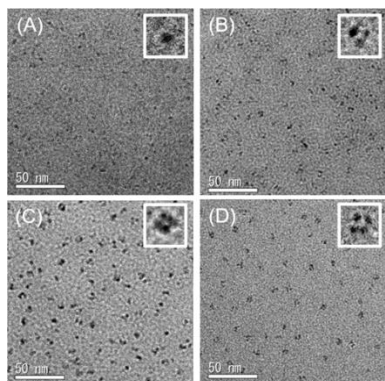


図 4. リン酸非存在下(25mM HEPES 緩衝液)において作製された鉄コアの TEM 画像。  
(A) Fth470, (B) Fth1070, (C) Fth1340, (D)Fth2010

### 3-3. SAXS による鉄コア構造の観察

SAXS を用いて鉄コアの構造を調べた。鉄コアのみに由来する散乱を得るために、タンパク質と溶媒の電子密度が一致するコントラストマッチング条件下 (53.55%スクロース溶液) で測定を行った。リン酸存在下では、鉄コアの散乱カーブは、鉄量の増加に伴って、フリンジが生じていることが確認できる (図 5A)。この結果は、鉄量の増加に伴い鉄コアの粒子が大きくなっていることを示唆している。これらの散乱カーブから、ソフトウェア GNOM を用いて P(r)関数、慣性半径 Rg を計算した。得られた Rg を鉄量に対してプロットしたところ、鉄量の増加に伴い、Rg も増加した (図 6)。Ftp3140 について着目した場合、得られた Rg は 3.56 nm であった。フェリチン内径が約 8 nm であることから、鉄コアを電子密度が均一な球と仮定した場合、計算される理論的な Rg は 3.1 nm である。実験値が理論値よりも 0.5 nm ほど大きいことが明らかとなった。鉄コアの平均直径が 7.9 nm であると TEM の観察結果によって示されていることから、リン酸存在条件下で形成された鉄コアの構造は、内部が空洞となった球殻状の構造であることが示唆された。

### 3-4. Stopped-flow による鉄酸化反応の追跡

Stopped-flow 装置を用いて、アポ EcFtnA と硫酸アンモニウム鉄溶液を高速混合し、EcFtnA による鉄酸化反応を

追跡した。追跡波長には 310 nm を用いた。球殻 1 分子あたり 48-480 個の鉄を添加した場合、混合後、310 nm の吸光度の上昇が見られ、添加した鉄量が増加するに伴って、観測される吸光度変化も大きくなった。96Fe 以上添加した場合、3つの反応相が観測された (図 7)。同様の実験を、1 mM、5 mM リン酸の条件下で行ったところ、後半の反応相が速くなっていることが確認された (図 8)。前半の反

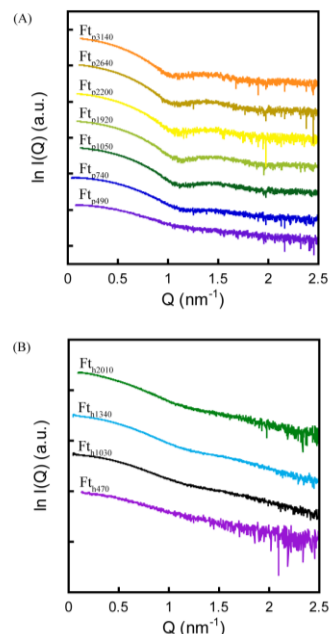


図 5. コントラストマッチング条件下で得られた鉄コアに由来する散乱カーブ  
(A) 20mM リン酸緩衝液 (B) 25mM HEPES 緩衝液

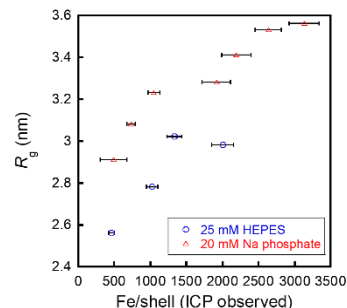


図 6. 鉄量に対する鉄コアの慣性半径の変化

応については、吸光度変化がサブユニットあたり 3 個の鉄の酸化に相当していることが明らかとなった。EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトには、3つの鉄結合部位が存在しているため、前半の反応相についてはアポ EcFtnA に対する鉄の結合・酸化の過程を追跡していると考えられる。後半の反応については、反応生成物がフェロキシダーゼ活性サイトから離脱後、新たな鉄が結合・酸化されるターンオーバーを観測していると考えられる。リン酸濃度が増加するにつれて、後半の反応が加速しているという結果から、リン酸はフェリチンの酸化過程においてターンオーバーの速度を上昇させていると考えられる。リン酸がターンオーバーに影響を及ぼすことを示唆する実験結果は、先行研究の *Pyrococcus furiosus* 由来のフェリチンに関する報告<sup>[10]</sup> と一致している。リン酸を含まない鉄コアを形成する哺乳類とリン酸を含む鉄コアを形成する細菌・古細菌のフェロキシダーゼ活性サイトについて比較を行った場合、哺乳類フェリチンH鎖はフェロキシダーゼ活性サイトに 2 個の鉄が結合可能である一方で、細菌・古細菌由来のフェリチンには、付加的な 3 個目の鉄の結合を可能とする Site-C が存在している。EcFtnA の場合、site-C を構成する残基はす

べてグルタミン酸である。これらの結果から、リン酸による鉄酸化の促進を説明する為に、下記のような機構を提案した。(i) フェロキシダーゼ活性サイトで酸化された2つの $Fe^{3+}$ は、フェリチン内部に取り込まれた $Fe^{2+}$ に置換される。(ii)  $Fe^{2+}$ -P<sub>i</sub>複合体として存在した場合、 $Fe^{3+}$ -P<sub>i</sub>複合体に入れ替わり、フェロキシダーゼ活性サイトの site-C に移動する。(iii) site-C を構成するグルタミン酸残基の側鎖とリン酸との間の静電反発によって、フェリチン内腔に放出され、これによってフェロキシダーゼ活性のターンオーバーが上昇したと考えられる。

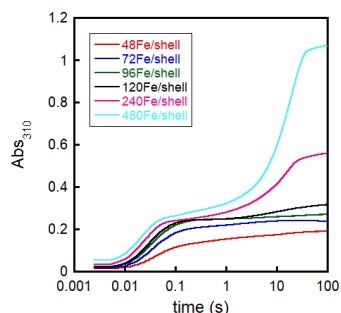


図7. リン酸非存在下(25mM HEPES 緩衝液)における鉄酸化反応の追跡。

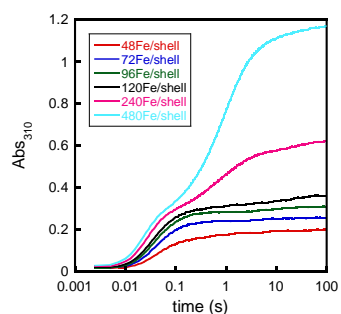


図8. リン酸存在下(5mM リン酸緩衝液)における鉄酸化反応の追跡。

### 3-5. ヒトフェリチン L 鎖野生型 (HuFTL) と A96T 変異体の鉄取り込みアッセイ

20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、鉄の添加を行った場合、HuFTL について高い鉄濃度条件下で凝集体が形成された為、100mM PIPES 緩衝液 (pH 7.0) で測定を行った。同様の実験を EcFtnA について行った結果、前述のように、凝集体を形成することなく鉄を取り込み、鉄コアを形成した。その結果、添加した鉄量の増加に伴って、Abs<sub>310</sub> が上昇し、高い鉄濃度条件下でプラトーに達していることが確認された (図9)。

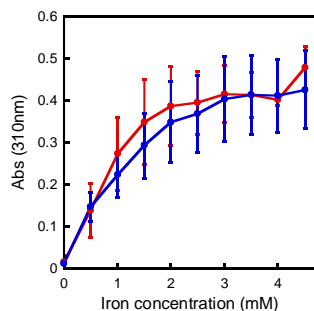


図9. Abs<sub>310</sub> の変化を用いた鉄取り込み能アッセイ。  
(■) HuFTL. (●) A96T. エラーバーは標準偏差。

このサンプルを用いて、Native-PAGE を行い、プルシアンブルー染色によって鉄コアの検出を行った。HuFTL と

A96T とともに 24 量体に相当する位置に鉄コア形成を示すバンドが見られた。Image J を用いて、バンド強度を定量した結果、鉄濃度の上昇に伴ってバンド強度は増加する傾向を示した。また、得られたバンド強度は HuFTL と A96T で差は見られなかった。これらの結果から、A96T の鉄取り込み能は HuFTL と同等であることが示された。したがって、A96T が野生型と同等の鉄取り込み能をもつという結果は、従来のフレームシフト変異体によって提唱される鉄取り込み能の低下と、ディスオーダーした C 末端と鉄を介した凝集体形成による神経フェリチン症の発症モデルとは異なる機構で、A96T が神経フェリチン症を引き起こすことを示唆している。

## 4. 結論

EcFtnA の鉄コア形成・鉄取り込みに及ぼすリン酸の影響を調べた。リン酸の存在下では、EcFtnA に形成される鉄コアの構造は球殻状の構造を形成することが明らかとなった。また、リン酸濃度の上昇に伴って、遅い反応相の反応が加速し、フェロキシダーゼ活性のターンオーバーが上昇したことが示唆された。一方で、神経フェリチン症関連変異体 A96T については、A96T の鉄取り込み能は野生型と同等であり、従来のフレームシフト変異体とは異なる神経フェリチン症の発症機構であることが示唆された。

### 【参考文献】

- [1] Koppenol, W. H.; Hider, R. H., Iron and redox cycling. Do's and don'ts. *Free Radic Biol Med.*, 133 (2019), 3-10.
- [2] P.M. Harrison, P. Arosio, The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1275 (1996) 161-203.
- [3] R.R. Crichton, J.P. Declercq, X-ray structures of ferritins and related proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1800 (2010) 706-718.
- [4] V.J. Wade, A. Treffry, J.P. Laulhere, E.R. Bauminger, M.I. Cleton, S. Mann, J.F. Briat, P.M. Harrison, Structure and composition of ferritin cores from pea seed (*Pisum sativum*), *Biochim. Biophys. Acta*, 1161 (1993) 91-96.
- [5] T.G. Pierre, K.S. Kim, J. Webb, S. Mann, D.P.E. Dickson, Biomineralization of Iron: Mössbauer Spectroscopy and Electron Microscopy of Ferritin Cores from the Chiton *Acanthopleura hirtosa* and the Limpet *Patella laticostata*, *Inorganic Chemistry*, 29 (1990) 1870-1874.
- [6] T.J. Stillman, P.D. Hempstead, P.J. Artymiuk, S.C. Andrews, A.J. Hudson, A. Treffry, J.R. Guest, P.M. Harrison, 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(3+) and Zn(2+) derivatives, *J. Mol. Biol.*, 307 (2001) 587-603.
- [7] F.A. Fischbach, J.W. Anderegg, An X-ray scattering study of ferritin and apoferritin, *J. Mol. Biol.*, 14 (1965) 458-471.
- [8] S. Mann, J.M. Williams, A. Treffry, P.M. Harrison, Reconstituted and native iron-cores of bacterioferritin and ferritin, *J. Mol. Biol.*, 198 (1987) 405-416.
- [9] G.D. Watt, R.B. Frankel, D. Jacobs, H. Huang, G.C. Papaefthymiou, Fe<sup>2+</sup> and Phosphate Interactions in Bacterial Ferritin from *Azotobacter vinelandii*, *Biochemistry*, 31 (1992) 5672-5679.
- [10] K. Honarmand Ebrahimi, P.L. Hagedoorn, W.R. Hagen, Phosphate accelerates displacement of Fe(III) by Fe(II) in the ferroxidase center of *Pyrococcus furiosus* ferritin, *FEBS Lett.*, 587 (2013) 220-225.
- [11] S. Narayanan, R. Shahbazian-Yassar, T. Shokuhfar, Transmission electron microscopy of the iron oxide core in ferritin proteins: Current status and future directions, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 52 (2019) 453001.
- [12] Baraibar, M. A.; Muhoherac, B. B.; Garringer, H. J.; Hurley, T. D.; Vidal, R., Unraveling of the E-helices and disruption of 4-fold pores are associated with iron mishandling in a mutant ferritin causing neurodegeneration. *J Biol Chem*, 285 (2010) 1950-6.
- [13] 砂戸歩美 2010年度 創価大学 修士論文