

フェリチンの
鉄酸化・ミネラル化に関する研究

2023年3月

氏名 桑田 巧

1. 序論
 - 1.1 細胞内鉄代謝について
 - 1.2 フェリチンの一般的な構造的特徴と真核生物由来のフェリチンについて
 - 1.3 バクテリア由来のフェリチン
 - 1.3.1 バクテリオフェリチン
 - 1.3.2 Dps
 - 1.3.3 バクテリアルフェリチン
 - 1.4 フェリチンの機能解析に関する従来の研究
 - 1.4.1 フェリチン内部への鉄進入機構
 - 1.4.2 フェロキシダーゼ活性サイトの構造的・機能的特徴の比較
 - 1.4.3 フェロキシダーゼ活性サイトでの反応と化学量比
 - 1.4.4 反応中間体と生成物の分子構造
 - 1.4.5 鉄コアの構造と形成機構
 - 1.5 哺乳類の鉄代謝におけるフェリチンの役割と疾患
 - 1.5.1 遺伝的神経変性疾患：神経フェリチン症
 - 1.5.2 遺伝性疾患：遺伝性高フェリチン血症・白内障症候群
2. 大腸菌フェリチンが形成する鉄コアの構造とリン酸の効果
 - 2.1. 序論
 - 2.2. 方法
 - 2.2.1 ホロ EcFtnA の調製
 - 2.2.2 元素分析
 - 2.2.3 AUC 測定
 - 2.2.4 TEM 測定
 - 2.2.5 SAXS 測定
 - 2-3. 結果
 - 2.3.1 ホロ EcFtnA の調製
 - 2.3.2 AUC 測定
 - 2.3.3 TEM 測定
 - 2.3.4 SAXS 測定

- 2-4. 考察
- 2-5. 結論

- 3. 大腸菌フェリチンの鉄酸化メカニズムとリン酸の影響
 - 3-1. 序論
 - 3-2. 方法
 - 3.2.1 高速カイネティック測定
 - 3.2.2 シークエンシャルストップトフローアッセイ
 - 3-3. 結果
 - 3.3.1 リン酸非存在下における EcFtnA の鉄酸化反応の Kinetics
 - 3.3.2 EcFtnA による鉄酸化におけるリン酸の影響
 - 3-4. 考察
 - 3-5. 結論

- 4. 神経フェリチン症関連変異体 (A96T) の機能解析
 - 4-1. 序論
 - 4-2. 方法
 - 4.2.1 HuFTL と A96T の発現・精製
 - 4.2.2 鉄取り込みアッセイ
 - 4-3. 結果
 - 4-4. 考察
 - 4-5. 結論

- 5. 総論
 - 5.1. 鉄コア構造の形態学とリン酸が鉄コア構造に及ぼす影響について
 - 5.2. バクテリアルフェリチンのフェロキシダーゼ活性サイトにおける酸化反応とリン酸が生理学的な機能に及ぼす影響について

- 6. 参考文献

- 7. 謝辞

凡例

本論文中に以下の略語を用いた。

Analytical ultracentrifugation: AUC
Bullfrog M ferritin: BfMF
Campylobacter jejumi bacterial ferritin: CmFtn
Coomassie brilliant blue:CBB
Deslfovibrio vulgaris bacterial ferritin: DvFtn
Divalent metal transporter 1: DMT1
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid): DTNB
DNA binding protein from starved cell: Dps
Escherichia coli: *E. coli*
E. coli bacterioferritin: EcBfr
E. coli bacterial ferritin: EcFtnA
Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA
Energy dispersive X-ray: EDX
Electron Energy Loss Spectroscopy: EELS
Electron paramagnetic resonance: EPR
High-angle annular dark field scanning transmission electron microscopy:
HAADF-STEM
2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid: HEPES
Horse spleen ferritin: HoSF
Human H ferritin: HuFTH
Human L ferritin: HuFTL
Ion-coupled plasma: ICP
Isothermal titration calorimetry: ITC
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside: IPTG
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid: MES
Molecular dynamics: MD

Mycobacterium tuberculosis Bacterioferritin B: Mtb BfrB

Native-polyacrylamide electrophoresis: PAGE

nuclear receptor coactivator-4: NCOA4

1,10-phenanthroline: phen

Phosphate-buffered saline: PBS

Pseudomonas aeruginosa bacterioferritin: Pa BfrB

Pyrococcus furiosus bacterial ferritin: PfFtn

reactive oxygen species: ROS

Root mean square deviation: RMSD

Sodium dodecyl sulfate: SDS

Small-angle neutron-ray scattering: SANS

Small-angle X-ray scattering: SAXS

Transmission electron microscopy: TEM

Tris(hydroxymethyl)aminomethane: Tris

X-ray absorption spectroscopy: XAS

1. 序論

1.1 細胞内鉄代謝について

鉄は全ての生物において、生命活動を維持する為に必要な金属元素である。生体内において、ヘム鉄、鉄硫黄クラスターなど様々な状態でタンパク質と相互作用している。鉄は酸化状態 Fe^{3+} と還元状態 Fe^{2+} の2つのイオン状態で安定的に存在することができる。 Fe^{2+} と Fe^{3+} の間の酸化還元電位は、配位リガンドに依存するが、およそ 770 mV である。この為、鉄結合タンパク質は、電子伝達系（チトクローム c、フェレドキシン）、DNA 合成（リボヌクレアーゼリダクターゼ）をはじめとする様々な代謝経路上の反応に関与している。一方で、この反応性の高さから、遊離状態の Fe^{2+} は、過酸化水素と反応しヒドロキシラジカルを形成する。この反応はフェントン反応 (Equation 1) と呼ばれ、生成物であるヒドロキシラジカルは細胞傷害を引き起こす¹⁻²。



一方で、 Fe^{3+} は中性 pH において溶解度は 10^{-18} M である為、生理的条件下において水に対して不溶である³。したがって、多くの生物は大きく2種類の方法によって、これらの問題を解決している。

第1に、鉄の輸送によって細胞内の鉄ホメオスタシスを維持する方法である。多くの生物では、細胞膜上に鉄トランスポーターが局在しており、鉄トランスポーターを介した鉄のやり取りを行う⁴。また、ラクトフェリンやトランスフェリンなどの鉄結合タンパク質の取り込みにより鉄を獲得する⁵⁻⁶。一部の病原性バクテリアは、宿主由来の鉄結合タンパク質を細胞内に取り込むことで鉄を獲得する経路を持つことが報告されている⁷。

第2に、鉄貯蔵タンパク質フェリチンによって、フェリチン分子内部に鉄を貯蔵する方法である。生体内で、フェリチンは Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化し、細胞内でのラジカル形成を阻害すると同時に、フェリチン内部に酸化鉄を隔離・貯蔵することで、細胞内の鉄ホメオスタシスの維持に関与していると考えられている⁸。この為、酵母をはじめとする一部の生物を除き、フェリチンは細菌から哺乳類まで保存されている。したがって、鉄の貯蔵という生体機能は、哺乳類からバクテリ

アまで様々な生物が利用しており、この鉄の貯蔵プロセスに関連する分子の機能・または機能を発揮する為のメカニズムを研究することは生物学的に重要である。

1.2 フェリチンの一般的な構造的特徴

フェリチンは24量体の球殻状の立体構造をもつタンパク質である(図1)⁹⁻¹⁰。フェリチン分子の内径・外径はそれぞれ約8 nmと12 nmである。直径8 nmのフェリチン内腔は、およそ4500個の鉄原子を貯蔵可能な空間である¹¹⁻¹²。

フェリチンのサブユニット構造はA-Eの5本の α ヘリックスから構成されており、その内、A-Dヘリックスは4ヘリックスバンドル構造を形成している(図2)。フェリチンのサブユニット中央部には、 Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化するための活性サイト(フェロキシダーゼ活性サイト)が存在している。一般的に、フェロキシダーゼ活性サイトにはAとB結合サイト(Dinuclear center)の2ヶ所に鉄が結合可能である。

哺乳類の場合、フェロキシダーゼ活性サイトを有するH鎖(約21 kDa)と、保持しないL鎖(約19 kDa)の2種類のサブユニットから構成される^{8, 13}。この2種類のサブユニット比は、組織によって異なっており、脳や心臓では、H鎖が多く含まれている一方で、肝臓や脾臓ではL鎖が多く含まれている¹⁴。フェリチンの一部は細胞外に放出され、血清中に存在していることが確認されているが、多くは細胞質中に存在している¹⁵。両生類の場合では、H・L鎖の他に、H鎖とアミノ酸配列が異なり、また、フェロキシダーゼ活性を有したM鎖が存在している¹⁶。植物の場合、L鎖に相当するサブユニットは存在しないが、アミノ酸配列の異なるH鎖型のサブユニットのヘテロオリゴマーとして存在している¹⁷。植物由来のフェリチンは、一般的なフェリチンのサブユニット構造に、付加的にN末端に α ヘリックスを保持している¹⁸⁻¹⁹。X線結晶構造解析から、N末端の α ヘリックスは24量体を形成した際にサブユニット間で相互作用あり、フェリチン分子の安定化に寄与していると考えられている。植物由来のフェリチンの場合、N末端にシグナル配列が付加され、プラスチド局在することが報告されている²⁰。上記のように、生物種によって様々な特徴を持っており興味深く、構造・機能について生物種間での比較・整理を行うことは、進化学的に有意義である。

1.3 バクテリア由来のフェリチン

バクテリア由来のフェリチンには、哺乳類フェリチン L 鎖に対応するサブユニットは見られない一方で、ヘム結合型フェリチン（バクテリオフェリチン）、ヘム非結合型フェリチン（バクテリアルフェリチン）、DNA binding protein from starved cell (Dps) の3種類のフェリチン存在することが報告されている²¹。ヒト由来フェリチンH鎖(HuFTH)と *E. coli* 由来バクテリアルフェリチン(EcFtnA)のアミノ酸配列を比較した場合、配列相同性は22%と低いが、サブユニット構造の比較を行った際の C α の RMSD は 1.0Åとサブユニット構造は類似しており、フェロキシダーゼ活性サイトを構成するアミノ酸残基も概ね保存されている（図3）¹⁰。また、バクテリアルフェリチンのフェロキシダーゼ活性サイトの特徴として、付加的に3個目の鉄が結合可能なC結合サイトが存在することが報告されている²²。

1.3.1 バクテリオフェリチン

前述の通り、バクテリオフェリチンはヘム結合型のフェリチンスーパーファミリーに属するタンパク質である。中性 pH 条件下で *E. coli* 由来バクテリオフェリチン (EcBfr) は、24量体の球殻構造を形成することも可能であるが、およそ60%程度が2量体に解離した状態で存在している²³⁻²⁵。EcBfrの結晶構造から、EcBfrの2回転対称軸上にヘム鉄が52番目のメチオニンと結合しており、球殻1分子あたり12個のヘム鉄を有する（図6）²⁶。EcBfrのヘム基は、EcBfr内腔のFe²⁺から、フェロキシダーゼ活性サイトへの電子遷移に関与していると考えられているが、詳細な機構は明らかとなっていない²⁷⁻²⁸。

EcBfrは定常期に豊富に発現しており、過剰に存在するFe²⁺と酸素の酸化的ストレスを軽減する役割を担っていると考えられている³。バクテリオフェリチンのフェロキシダーゼ活性サイトを構成するアミノ酸残基は、部分的に真核生物やバクテリアルフェリチンと異なっている（図4）²⁹。また、フェロキシダーゼ活性サイトにおける反応機構も異なり、酸素1分子に対して4Fe²⁺の化学量比で反応が進行する³⁰。

1.3.2 Dps

Dps は、飢餓状態の *E. coli* で見られるフェリチンスーパーファミリーのタンパク質である³¹。生理的条件下で、12 量体の球殻構造を形成する³²。Dps の内径・外径はそれぞれ 4.5 nm と 9 nm である(図 7)³³。Dps サブユニットは、E ヘリックスに相当する構造は見られないが、4-ヘリックスバンドル構造は保持している。生体内における Dps の機能は、N 末端に豊富に存在するリジン残基によって DNA に結合することで、酸化ストレスから生じる化学的なダメージを排除することである。また、Dps は 2 量体界面にフェロキシダーゼ活性サイトが存在している³⁴。Dps のフェロキシダーゼ活性サイトには、結合親和性の異なる A と B サイトに Fe^{2+} が結合可能である³⁵。2 つの Fe^{2+} が過酸化水素または酸素のどちらかと反応する機構が報告されている³¹。過酸化水素と酸素のいずれの場合においても、1 分子の H_2O_2 、または、1 分子の O_2 に対して 2 Fe^{2+} の化学量比で反応が進行する。ただし、それぞれの反応速度は異なり、酸素を介した酸化反応の反応速度は、過酸化水素を介した場合よりも著しく遅くなる³¹。Dps の本来の生体内での機能を考慮した場合、Dps の本来の役割は、鉄の貯蔵ではなく、フェントン反応によって生じる酸化ダメージから DNA を保護することであると考えられる。Dps が触媒する Fe^{2+} と過酸化水素の反応ではヒドロキシラジカルではなく水を生成する為、 Fe^{2+} と過酸化水素の致命的なダメージを回避するように Dps の鉄酸化機構は改善されていると考えられている。

1.3.3 バクテリアルフェリチン

バクテリアルフェリチンは、真核生物由来のフェリチン H 鎖に相当するヘム非結合型のフェリチンである。EcBfr は、ストレス応答によって発現が制御される一方で、EcFtnA はストレス応答から独立しており RNase III によって発現が制御されている³⁶。共にフェロキシダーゼ活性を有する EcFtnA と EcBfr であるが、細胞内におけるこれらの分子の機能的な役割分担に関する詳細は明らかとなっていない。EcFtnA と EcBfr のフェロキシダーゼ活性を比較した際、鉄の酸化速度は EcFtnA の方が速いことが報告されている³⁷。

EcFtnA に関連する細胞表現型について、鉄が豊富な条件下で前培養を行った後に、鉄が不足した環境に植え継ぎを行った際、*E. coli* が細胞内の EcFtnA 内に

貯蔵された鉄を利用して、細胞の増殖を促進させることが報告されている³。このことから、EcFtnA は細胞内で、鉄酸化による酸化的なストレスの軽減と同時に、定常期における細胞内の鉄のリソースとしての役割を担っていると考えられる³⁸。

また、*Campylobacter jejumi* の場合、*C. jejumi* 由来のフェリチン (CmFtn) の変異体と表現型の変化から、CmFtn は酸化的なストレスを排除すると同時に、鉄欠乏環境下で細胞増殖を促進することが示唆された³⁹。

このように、バクテリアの場合は、H鎖ホモログのバクテリアルフェリチンだけでなく、類似した機能をもつバクテリオフェリチンや Dps が存在しており、これらの分子間の生体内における関係性は十分には理解されていない。

1.4 フェリチンの機能解析に関する従来の研究

1.4.1 フェリチン内部への鉄進入機構

一般的なフェリチンによる鉄酸化機構の最初のステップは、 Fe^{2+} のフェロキシダーゼ活性サイトへの移行である。フェリチンの球殻構造中には 4/3/2 回転対称性が見られる (図 5)。哺乳類由来フェリチンの場合、 Fe^{2+} は 3 回転対称軸上に存在するチャンネルからフェリチン内部に移行し、フェロキシダーゼ活性サイトに結合すると考えられている⁴⁰。哺乳類由来のフェリチンの 3 回転対称軸周辺のアミノ酸残基には、荷電性アミノ酸が多く存在しており、これらのアミノ酸残基が形成する静電ポテンシャル面に従って、 Fe^{2+} をフェリチン内部に誘引していると考えられている⁴¹⁻⁴²。Poisson-Nernst-Planck モデルに基づく全原子 MD シミュレーションの結果は、HuFTH の 3 回転対称軸周辺に配置された鉄イオンの運動を追跡した際に、鉄原子が 3 回転対称軸上のチャンネルを経由し、フェリチン内部に移行する様子が観察された⁴³。フェリチンは鉄に限らず様々な金属イオンを分子内部に取り込むことが可能である。この性質を用いて、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 存在条件下におけるウシガエル由来 M 鎖 (BfMF) を用いた X 線結晶構造解析を行った結果、3 回転対称軸周辺に Mg^{2+} や Co^{2+} の電子密度を確認されたことが報告されている⁴⁴。HuFTH でも同様に、 Zn^{2+} を添加した際に、3 回転対称軸上に Zn^{2+} の電子密度を確認されたことが報告されている⁴⁵。これらの背景から、脊椎動物のフェリチンにおいては、3 回転対称軸上に存在するチャンネルが鉄の主な進入経路で

あることが提案されている。また、鉄シャペロンタンパク質 poly rich-C binding protein (PCBP) ファミリータンパク質が、直接的にフェリチンへ鉄を輸送する経路も報告されている⁴⁶。ITC 測定の結果から、 Fe^{2+} 結合状態の PCBP ファミリータンパク質は、HuFTH を特異的に認識し、PCBP:HuFTH=8:1 の化学量比で相互作用することから、PCBP ファミリータンパク質は、HuFTH の 3 回転対称軸周辺に結合し、鉄を輸送することが示唆されている⁴⁷。

一方で、バクテリオフェリチンや一部のバクテリアルフェリチンの場合、3 回転対称軸周辺の環境は疎水的であることが報告されている⁴⁸。この為、哺乳類フェリチンとは異なる経路によって鉄がフェリチン内部に進入することが示唆されている。バクテリオフェリチンを用いた研究から、B チャンネルが主な鉄の進入経路として提案されている (図 5)⁴⁹⁻⁵⁰。*Pseudomonas aeruginosa* 由来バクテリオフェリチン (Pa BfrB) の全原子 MD シミュレーションから、B チャンネルを経由してフェリチン内部に Fe^{2+} が進入することが示唆された⁵¹。EcBfr の野生型と変異体の鉄酸化速度の比較を行った際、D132F 変異体で著しく反応速度が低下したことが報告されている⁴⁹。これらの結果から、 Fe^{2+} の進入経路として B チャンネルが提案されているが、具体的な機構は明らかとなっていない。この為、バクテリオフェリチンやバクテリアルフェリチンの Fe^{2+} 取り込み機構の解明には、さらなる研究が必要であると考えられる。

1.4.2 フェロキシダーゼ活性サイトの構造的・機能的特徴の比較

次に、フェリチン内部に進入した Fe^{2+} はフェロキシダーゼ活性サイトに結合する。1.2 で述べた通り、フェロキシダーゼ活性サイトには、dinuclear center に 2 つの Fe^{2+} が結合可能であり、このサイトで酸化反応が触媒される。フェロキシダーゼ活性サイトを構成するアミノ酸残基について、HuFTH の場合、A サイトは E27、E62、H65、Q141 から構成され、B サイトは Y34、E61、E62、E107 で構成されている (図 8)⁵²。バクテリアルフェリチンやバクテリオフェリチンで見られる C サイトは、HuFTH でも一部見られており、E61、E64、E67 から構成される。しかし、HuFTH の場合では、ITC 測定の結果から、サブユニットに対して 2 つの Fe^{2+} のみ結合することが示唆されている⁵³。EcFtnA の場合、A サイトは E17、E50、H53、Q127 から構成され、B サイトは Y24、E50、E94、E130 から構成される。バ

クテリア特有の C サイトは E49、E126、Q127、E129、E130 から構成される (図 8)¹⁰。EcBfr の場合は、A サイトは E18、E51、H54、E127 から構成され、B サイトは Y25、E51、E94、E127、H130 から構成される²⁶。C サイトについては、D50、D126、E127、G129、H130 から構成される (図 8)。HuFTH、EcFtnA、EcBfr のフェロキシダーゼ活性サイトを構成するアミノ酸残基を比較すると、E27 (E17、E18)、Y34 (Y24、Y25)、E62 (E50、E51)、H65 (H53、H54)、E107 (E94、E94) は、3 種類のフェリチンすべてで保存されている。一方で、E61 (E49、D50)、A144 (E130、H130)、Q141 (Q127、E127) が、各フェリチンによって異なるアミノ酸残基として挙げられる。HuFTH と EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトを比較した際に見られる顕著な差は、B サイトを構成するアミノ酸残基が、HuFTH は E61 である一方で、EcFtnA の場合では E130 である。EcFtnA の場合、E49 が HuFTH の E69 に相当する位置に存在しているが、E49 は B サイトではなく C サイトを構成している。

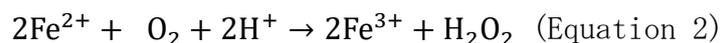
また、EcBfr との比較を行った場合、EcFtnA では、127 番目のアミノ酸がグルタミンであるが、EcBfr ではグルタミン酸に置換されている。加えて、EcFtnA の E130 は、EcBfr では 130 番目のアミノ酸がヒスチジンに置換されているという違いが見られた。EcBfr の E127 に着目した場合、HuFTH では Q141、EcFtnA では Q127 が相当する位置にそれぞれ存在している。HuFTH の Q141 は A サイトを構成し、EcFtnA の Q127 は C サイトを構成するアミノ酸残基である一方で、EcBfr の E127 は、A、B サイトの両方を構成するアミノ酸残基であるという違いが見られた。

PfFtn、HuFTH、EcFtnA については、ITC 測定を用いることで、フェロキシダーゼ活性サイトと Fe^{2+} との結合親和性を定量した結果が報告されている。HuFtn に関して 25°C、pH 7.0 で ITC 測定を行った場合、 $K_{a1} = (5.2 \pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ と $K_{a2} = (1.1 \pm 0.1) 10^3 \text{ M}^{-1}$ と結合親和性の異なる 2 種類の結合定数が計算された⁵³。同様に、25°Cでの PfFtn での ITC 測定は、 $K_{a1} = (2.4 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{a2} = (7.9 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{a3} = (1.7 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ の 3 つの結合定数が計算された⁵³。一方で、EcFtnA については、ITC データから $K_{a1} = (3.5 \pm 0.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{a2} = (1.8 \pm 0.4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 $n_3 K_{a3} \Delta H_3^\circ = (8.5 \pm 16.1) \times 10^5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ が計算された結果が報告されている⁵⁴。PfFtn と EcFtnA は共にフェロキシダーゼ活性サイトに 3 つの

結合サイトを持ち、ITC 測定 of データから各サイトの結合定数が計算された。HuFTH についても同様に、dinuclear center の 2 つの結合サイトに相当する 2 種類の結合定数が計算された。これらのデータを比較すると、HuFTH の K_{a1} は、PfFtn・EcFtnA のものよりも 50-70 倍小さな値を示した。また、 K_{a2} についても、HuFTH は、PfFtn・EcFtnA と比較して 10-100 倍小さな値を示した。

1.4.3 フェロキシダーゼ活性サイトでの反応と化学量比

フェロキシダーゼ活性サイトで生じる反応は、酸素 1 分子に対して、ヒト由来フェリチン H 鎖 (HuFTH) の場合は、 2.2 Fe^{2+} 、EcFtnA では、 3.3 Fe^{2+} の化学量比で進行する²²。超好熱細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来のフェリチン (PfFtn) の場合、酸素 1 分子に対して $2.3-2.8 \text{ Fe}^{2+}$ の化学量比で反応することが報告されている⁵⁵。これらの化学量比が提案する反応式は以下のように記述される。



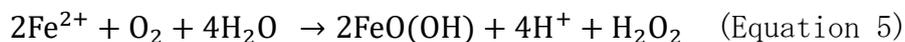
HuFTH や PfFtn の場合は、Equation 2 と 3 の組み合わせとして説明可能である。一方で、前述した EcBfr や EcFtnA の場合は、酸素 1 分子に対して 4 Fe^{2+} の化学量比で反応する機構が存在すると考えられる。

F. Bou-Abdallah らは、EcFtnA について、球殻 1 分子あたり 48Fe^{2+} を繰り返し添加し、反応時に得られる $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ 比を計算した。1 回目の添加で得られる $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ 比は 3.2 であり、添加回数が多くなるにつれ $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ 比が 4.0 に近づくことを報告した⁵⁶。4.0 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ 比で進行する反応は、HuFTH や馬脾臓フェリチン (HoSF) に対して $250\text{Fe}^{2+}/\text{shell}$ の添加の際に観測されており、以下のような反応式であると考えられている⁵⁷⁻⁵⁹。



F. Bou-Abdallah らは、過剰に鉄を添加した際に、Equation 4 と同様の反応が EcFtnA でも生じていると示唆している⁵⁶。同時に、彼らは、Equation 4 が実質

的には、以下の Equation 5 と 6 の組み合わせとして観測されることを提案している。



EcFtnA の C サイトを構成する E49、E127、E130 をアラニンに置換した変異体の $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ 比は、野生型の 3.2 から、2.1-2.2 に減少することが報告されている⁵⁶。また、Y24F 変異体についても 2.4 まで減少することが報告されている。上記の 48Fe^{2+} の添加実験を、これらの変異体について行った結果、野生型と同様に添加回数が多くなるにつれ $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ 比が 4.0 に近づくことが報告された。

1.4.4 反応中間体と生成物の分子構造

フェロキシダーゼ活性サイトでの酸化反応では、反応中間体 (Blue-intermediate) を形成することが報告されている。Blue-intermediate は、500-800nm に広く吸収をもち、真核生物、古細菌、バクテリアのフェリチンにおいて観測されている⁶⁰。Blue-intermediate の分子構造は、メスバウアー分光法やラマン分光により特徴づけされている。HuFTH やウシガエル由来フェリチン M 鎖 (BfMF) のメスバウアースペクトルは、methane monooxygenase (MMO) と類似しており⁶¹、また、650nm で励起した際の BfMF のラマンスペクトルから Fe-O (485 nm)、O-O (851 nm) の伸縮振動数を観測した結果、 μ -1,2- O_2 を有する $\text{Fe}_2(\text{O}_2)$ 構造のモデル化合物と類似した⁶²。これらの結果から、Blue-intermediate の分子構造として、真核生物では μ -1,2-peroxo di Fe^{3+} や μ -peroxo(hydroxo) di Fe^{3+} などが提案されている。これらの中間体を経由した後、メスバウアー分光法の結果から、フェロキシダーゼ活性サイトで、 Fe^{3+} -O- Fe^{3+} が最終産物として生成されることが示唆されている。

1.4.5 鉄コアの構造と形成機構

フェリチンにより酸化された鉄は、フェリチン内腔に鉄コアとして貯蔵される。動物由来のフェリチンが形成する鉄コアは、高い結晶性を持ち、

ferrihydrite 様の化合物を形成すると考えられている。XAS 測定は、試験管内で HoSF 内腔に鉄コアを形成させた結果、鉄コアは ferrihydrite, magnetite, hematite などの化合物から構成される多層性構造を形成することが明らかとなった⁶³。一方で、生体内で、バクテリオフェリチンやバクテリアルフェリチンが形成する鉄コアには鉄と同量のリン酸が含まれることが報告されている⁶⁴⁻⁶⁵。リン酸を含有した鉄コアはアモルファス性の回折像を与える。また、リン酸非存在下の条件において試験管内で、バクテリアルフェリチン内腔に形成された鉄コアは、動物由来のフェリチンが形成する鉄コア構造と同様に高い結晶性を示す⁶⁶⁻⁶⁷。これらの鉄コアに関する化学的な性質は知られているが、具体的な鉄コアの形成機構は明らかになっていない。また、従来の鉄コアの形成に関する研究は、主に HoSF で行われており、バクテリアルフェリチンを用いた研究は少ない。

上記のように、様々な生物種のフェリチンにおいて、その機能に関する研究が幾つも報告されているが、フェリチンの機能に関するメカニズムは未だ完全には理解されていない。

加えて、前述で哺乳類由来フェリチンやバクテリアルフェリチンでの比較で例示したように、生物種によって、構造的・機能的な特徴は大きく異なっている。この為、バクテリア由来のフェリチンが形成する鉄コア構造、また、その形成機構を明らかにすることは生物学に重要である。フェリチンはバクテリアから哺乳類まで広く保存されている為、生物種間での機能の差異を明確にすることで、進化学的にも重要な知見が得られることが期待される。

本研究では、フェリチンの分野に限らず *E. coli* という生物自体が数多く研究がなされている点から、*E. coli* 由来バクテリアルフェリチン (EcFtnA) の機能に着目して研究を行った。

1.5 哺乳類の鉄代謝におけるフェリチンの役割と疾患

哺乳類由来のフェリチンは、H鎖とL鎖の機能の異なる2種類のサブユニットから構成される。各サブユニットの構成比はmRNAの発現量に依存しており、臓器・組織によって異なっている。フェリチンの大半は細胞質に存在しているが、血清にも一部フェリチンが存在していることが報告されている⁶⁸。血中に放出されるフェリチンは主にL鎖から構成されており、部分的に糖鎖修飾されている⁶⁹⁻⁷⁰。血清フェリチンの量は、一部の炎症性疾患の診断マーカーとして用いられている⁷¹。

構造的な特徴として、H鎖、L鎖ともに単独で24量体を形成可能であり、1.2で記述したサブユニット構造を保持している。一方で、H鎖とL鎖の機能的な特徴は大きく異なっており、哺乳類由来のフェリチンにおけるH鎖の場合、サブユニット中に存在するフェロキシダーゼ活性サイトに Fe^{3+} との結合後、550-650 nmに吸収をもつBlue-intermediateを形成する⁷²。この中間体を経由して、350-450 nmに吸収をもつ鉄酸化物を最終産物として形成する⁷²。一方で、L鎖の場合、フェロキシダーゼ活性サイトが欠如しているため、Blue-intermediateを形成することなく、350-450 nmに吸収をもつ鉄酸化物を生成する。UV/vis スペクトルによる鉄酸化物の生成速度をH鎖とL鎖で比較した場合、H鎖の方がL鎖より1000倍程度速く酸化する⁷³。しかし、H鎖ホモオリゴマーよりも、20H:4Lのヘテロオリゴマーのフェリチンの方が、フェロキシダーゼ活性が高いことが報告されており、L鎖サブユニットの機能としてH鎖のフェロキシダーゼ活性のターンオーバーを上昇させることが示唆されている¹³。また、L鎖の球殻内側表面には複数のGlu残基が保存され、鉄コア形成の核形成サイトとして機能することが知られており、フェリチン球殻内部に形成される鉄コアの足場として機能していると考えられている⁷⁴。フェリチン球殻内部には4500個の鉄を貯蔵することが可能な空間があるが、天然由来のフェリチンは3000個程度しか含まない⁷⁵。天然由来のフェリチンが形成する鉄コアにはリン酸が含まれていることが報告されており、哺乳類由来のフェリチンの場合、 $10\text{Fe}:1\text{P}_i$ の割合で存在している。フェリチン内腔に貯蔵された鉄は、細胞からの要求に応じて再利用される。フェリチン内腔に十分な鉄量が存在する場合、アスコルビン酸をはじめとする還元剤などを用いることでフェリチン内腔に貯蔵された鉄を還元し、取り出すこと

が可能である⁷⁶。しかし、還元剤によって放出された遊離した Fe²⁺は、フェントン反応によってヒドロキシラジカルを生成し、細胞傷害を引き起こす可能性がある⁷⁷。キレート剤の添加によって、Fe²⁺によって触媒されるフェントン反応が及ぼす DNA 損傷を抑制することが可能であることが報告されている⁷⁸。

近年、神経変性疾患に関与する内因性の毒素として知られているサルソリノール存在下で、フェリチンから放出された鉄がプロオキシダント剤として働いていることが観測されている⁷⁹。ラット肝ホモジネートに対してフェリチンを添加した場合、アスコルビルラジカルの形成が誘導され、結果として、labile iron pool が増加することも報告されている⁷⁷。また、これによって、フェリチン分子自体がラジカルによるダメージを受け、フェリチン内部に貯蔵された鉄が放出される可能性があることが示唆されている。ドーパミン神経細胞における H 鎖サブユニットの慢性的な発現によって labile iron pool の増加と神経変性が進行することが報告されている⁸⁰⁻⁸¹。

In vivo においては、還元剤による方法だけでなく、タンパク質分解経路を通じて、フェリチン内部に貯蔵された鉄を取り出す方法も存在しており、代表的なものとして、nuclear receptor coactivator-4 (NCOA4) を介して誘導されるフェリチノファジーが報告されている⁸²⁻⁸³。フェリチンのタンパク質分解によって取り出された鉄コアは、グルタチオンなどによって Fe²⁺に還元され、divalent metal transporter 1 (DMT1) を通じて細胞質に放出されることが示唆されている⁸⁴。NCOA4 は H 鎖を特異的に認識することが報告されている⁸³が、NCOA4 によるフェリチンのリソソームへの輸送機構などは明らかとなっていない。

フェリチンの生体内での役割は、細胞の必要に応じて鉄の貯蔵・供給を行うだけでなく、酸化的なストレスとそれに伴う細胞死に関連することが示唆されている⁸⁵。フェリチン H 鎖の過剰発現は、細胞内の labile iron pool や ROS を低減させることが報告されており、一方で、H 鎖のノックアウト・ノックダウンによって labile iron pool や ROS が増加することが報告されている⁸⁶。

NCOA4 によるフェリチノファジーがフェロトーシスの初期段階にみられることが報告されており、神経変性疾患やがん細胞の細胞死に関連している重要な鉄代謝機構である⁸⁷⁻⁸⁸。フェリチノファジーによって、細胞内鉄濃度を上昇させ、それに伴う ROS の形成によってフェロトーシスを誘導するモデルが提案されて

いる⁸⁹が、詳細な機構の解明には更なる研究が必要である。近年、フェロトシスが様々な神経変性疾患や脳疾患と関連することが報告されており、鉄代謝経路と密接な関係にあることが知られている⁹⁰⁻⁹¹。本章では代表的な遺伝性の鉄蓄積性神経変性疾患である神経フェリチン症と、フェリチンに関連する遺伝性疾患として最も古くから研究されている遺伝性高フェリチン血症・白内障症候群について記述する。

1.5.1 遺伝的神経変性疾患：神経フェリチン症

神経フェリチンは、フェリチンL鎖遺伝子 (*FTL1*) の突然変異によって生じる常染色体優勢遺伝性疾患である⁹²⁻⁹³。神経フェリチン症の特徴として、脳・神経細胞・グリア細胞内に、鉄とフェリチン分子を含む封入体の沈着がみられる。神経フェリチン症の症状としては、錐体外路症状、ジストニア、運動失調などが報告されている。

神経フェリチン症の診断手法として最も有用な方法はMRIによる画像診断である⁹²。T2*強調画像やSWI画像などは脳内に沈着した鉄の影響によって、信号強度が変化する為、神経フェリチン症の診断に度々用いられる。しかし、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症と考えられる”the eye of tiger sign”が見られる神経フェリチン症と診断された患者が3例報告されており、これらのMRIの手法が神経フェリチン症を決定づける手法ではなく、現状、神経フェリチン症の診断には塩基配列の解析が必要不可欠である⁹⁴。

これまでに、神経フェリチン症に関連する10種類の突然変異が報告されている^{92, 95}。最初に報告された変異は、北イングランドのカンブリア地方の患者から報告された突然変異で、*FTL1*のエキソン4の460番目にアデニンが挿入されたc.460dupA (p.Arg154Lysfs27)である⁹⁶。この突然変異によって、154番目のアルギニンがリジンに置換され、この残基以降27残基のアミノ酸が変異したフェリチン変異体が生成される。この変異に関しては40例以上の患者で同じ変異が報告されている。*FTL1*は3つのイントロンと4つのエキソン領域から構成され、その内1つを除けば、報告されている神経フェリチン症に関連する全ての変異はエキソン4の領域で生じており、フェリチンのC末端領域のアミノ酸配列を変化させる⁹²。X線結晶構造解析から、伸長したC末端領域は構造をとらず、デ

イスオーダーしていることが報告されている⁹⁷。In vitro での実験において、p.Phe167Serfs26 をはじめとする変異体の鉄取り込みは野生型と比較して著しく低下していることが明らかとなっており、これらの変異体は 1500Fe/shell の低濃度条件下で凝集体を形成することが報告されている⁹⁷⁻¹⁰⁰。

一方で、in vivo での研究では、Hela 細胞および SH-SY5Y 細胞における FTL 変異体の発現は、細胞内においても同様に鉄凝集体を形成することが報告されている^{98, 101}。しかし、この発現に伴って、内在性フェリチンとトランスフェリン受容体の発現レベルが変化し、この結果として、ROS の生成を促進する labile iron pool の増加など細胞内鉄代謝に変化が見られたことが報告されている⁹²。この結果から、凝集体の存在ではなく、凝集体形成に伴って変化した鉄代謝の異常によって神経フェリチン症が発症するモデルも提案されている。

神経フェリチン症に関連する変異体の研究は数多く報告されているが、神経フェリチン症の発症の原因が、フェリチンヘテロポリマーの形成する凝集体の沈着によるものなのか、凝集体形成に伴って変化した鉄代謝の異常によるものなのかは結論付けられていない。

1.5.2 遺伝性疾患：遺伝性高フェリチン血症・白内障症候群

遺伝性高フェリチン血症・白内障症候群 (HHCS) は、血清フェリチン量と若年性の白内障が特徴的な常染色体優性遺伝疾患である¹⁰²。細胞内において、mRNA 結合タンパク質である Iron regulatory protein (IRPs) が、H 鎖、L 鎖の mRNA に結合し、フェリチンの翻訳を制御している¹⁰³。フェリチン L 鎖 mRNA の 5' UTR 領域に存在する iron responsive element (IRE) に突然変異が生じることによって発症する。これまでに、HHCS に関連する 47 個の変異が報告されており、その内 36 個は点変異、9 個が欠損、2 個が欠損・挿入によるものである¹⁰²。前述の IRPs は、フェリチン mRNA の IRE と相互作用することで、フェリチンの翻訳を抑制し、鉄代謝を調節する。

IRE はヘアピン様構造を形成しており、ループ頂点は 5' -CAGUGN-3' の配列で構成されており、ステム領域は、5 塩基対の対称な配列から構成されている¹⁰⁴。IRPs と IRE との相互作用は、鉄濃度に応答し変化する。鉄が欠乏状態にある場合は、IRP が FTL の IRE 領域と相互作用し、FTL の翻訳を抑制する。一方で、鉄

が過剰に存在する場合には、IRPs-IRE との相互作用は阻害され、IRE に eIF4F が結合することで FTL mRNA が安定化され、FTL の翻訳が促進される。IRP と eIF4F は IRE に対して競合している¹⁰⁵。IRPs-IRE 間の相互作用を欠損させるような FTL mRNA の IRE 領域に生じた変異は、FTL の翻訳を抑制しない為、結果として、過剰の FTL が生成され、血清中に存在するフェリチン量も増加する¹⁰²。

HHCS の発症機構に関して最も受け入れられているものとして、FTL の過剰発現によって、鉄欠乏の L 鎖が結晶性の沈着物を多量に形成することが報告されており、これによって水晶体の透明性が欠如するというモデルが提案されている¹⁰²。この副産物として、過剰に発現されたフェリチン L 鎖が血中に分泌される為、HHCS 患者は高い血清フェリチン値を示すと考えられている¹⁰²。

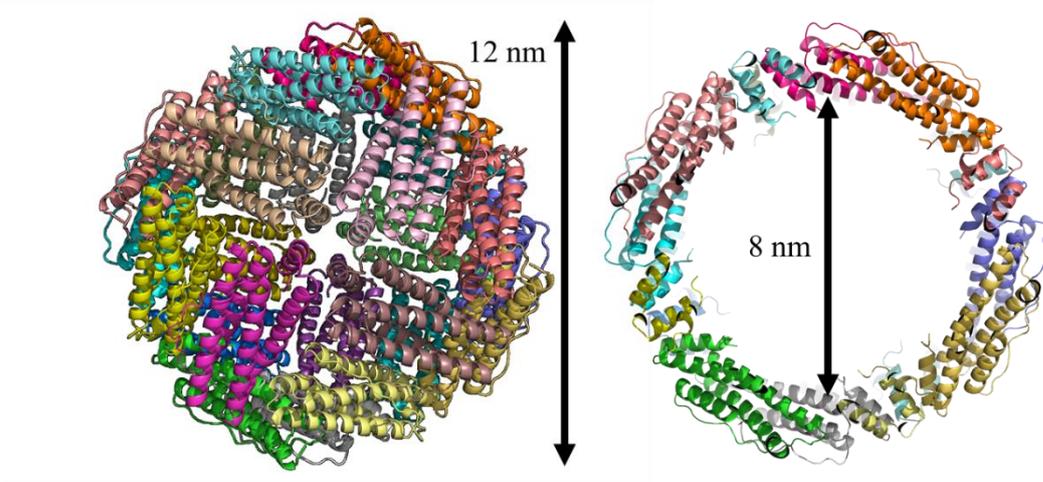


図1. 大腸菌フェリチン (EcFtnA) の立体構造 (PDB ID: 1EUM)

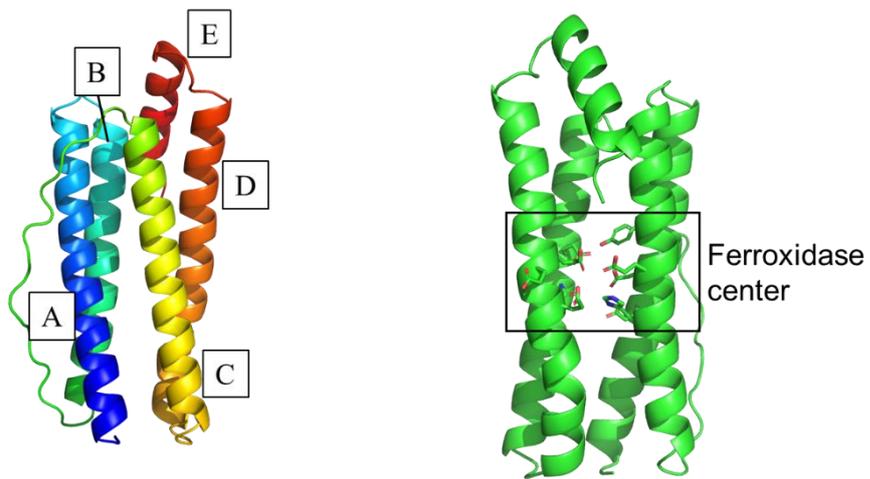


図2. EcFtnA サブユニットの立体構造

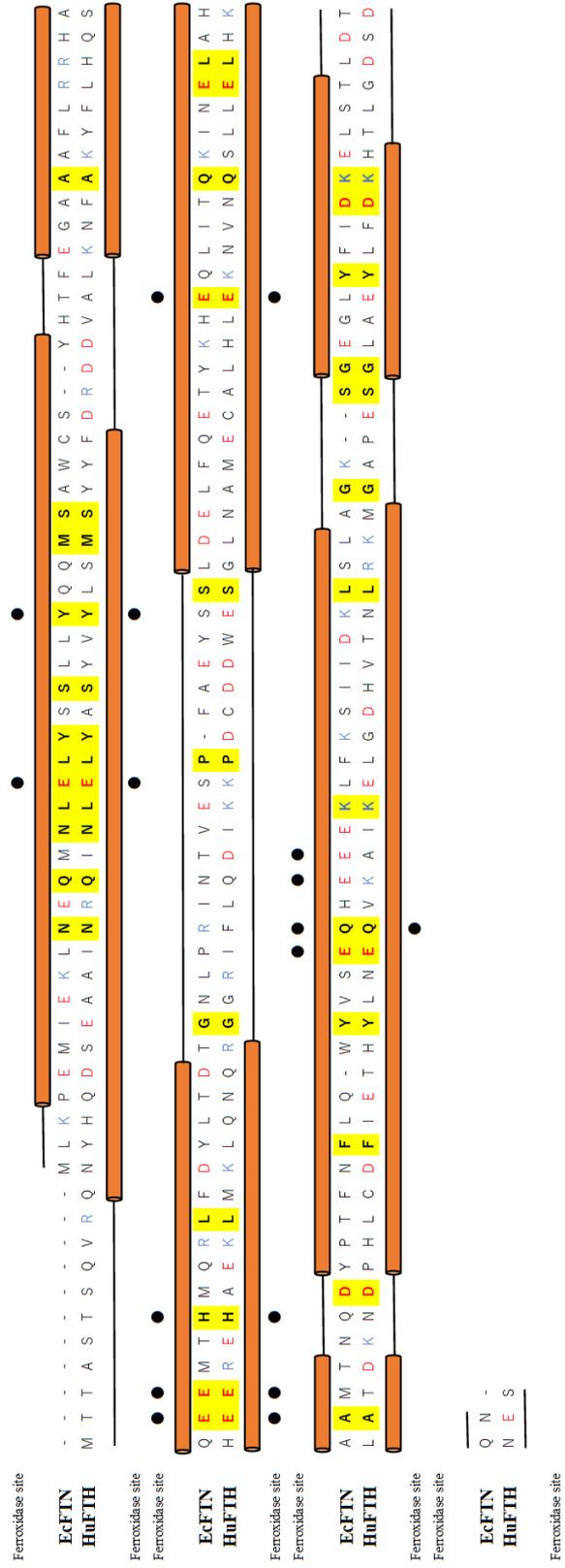


図 3. EcFtnA と HuFTH との アミノ酸配列アライメント

EcFtnA	- M L K P E M I E K L N E Q M N L E L Y S S L L Y Q Q M S A W C S Y H T F E G A A A F L R R H A Q E E M T H M Q R L F D
EcBfr	M K G D T K V I N Y L L N K L L G N E L V A I N Q Y F L H A R M F K N W G L K R L L N D V E Y H E S I D E M K H A D R Y I E
Dps	M S T A K L V K S K A T N L L Y T R N D V S D S E K K A T T V E L L N R Q V I Q F I D L S L I T K Q A H W N M R G A N F I
EcFtnA	Y L T D T G N L P R I N T V E S P F A E Y S I S L D E L F Q E T Y K H E Q L I T Q K - - I N E L A H A A M T N Q D Y I P T F
EcBfr	R I L F L E G L P N L Q D L G - K L N I G E D V E E M L R S D L A L E L D G A K N - - L R E A I G Y A D S V H D Y Y S R
Dps	A V H E M L D G F R T A L I D H L D T M A E R A V Q L L G G V A L G T T Q V I N S K T P L K K S Y P L D I H N V Q D H L K E
EcFtnA	N F L Q W Y V S E Q H E E K L F K S I I I D K L S L A G K S G E G L Y F I D K E L S T L D T Q N
EcBfr	D M M I E I L R D E E G H I D W L E T E L L I Q K M G L Q N Y L Q A Q I R E E G - - - - -
Dps	L A D R Y A I V A N D V R K A I G E A K D D D T A D I L T A A S R D L D K F L W F I E S N I E -

図 4. EcFtnA, EcBfr, Dps とのアミノ酸配列アライメント

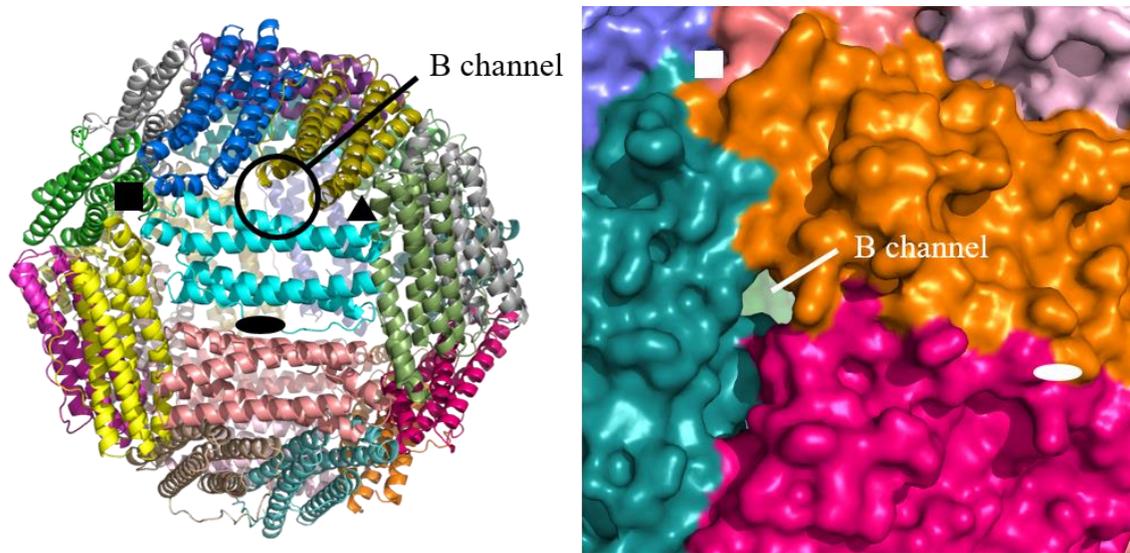


図 5. フェリチンの回転対称性と B チャンネルとの位置関係について

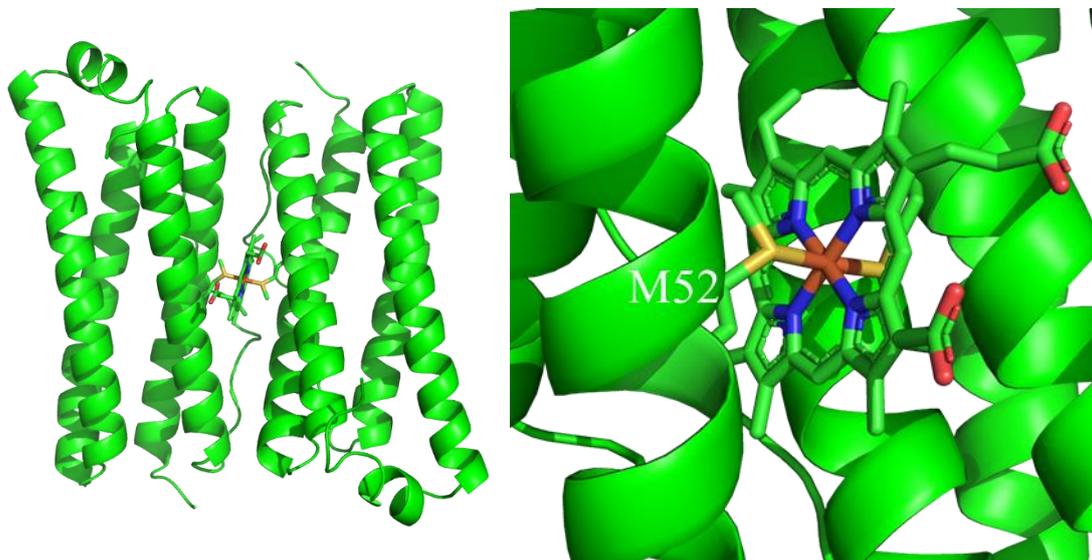


図 6. EcBfr の 2 量体の立体構造 (左) とヘム鉄結合サイト (右)
(PDB ID: 1bfr)

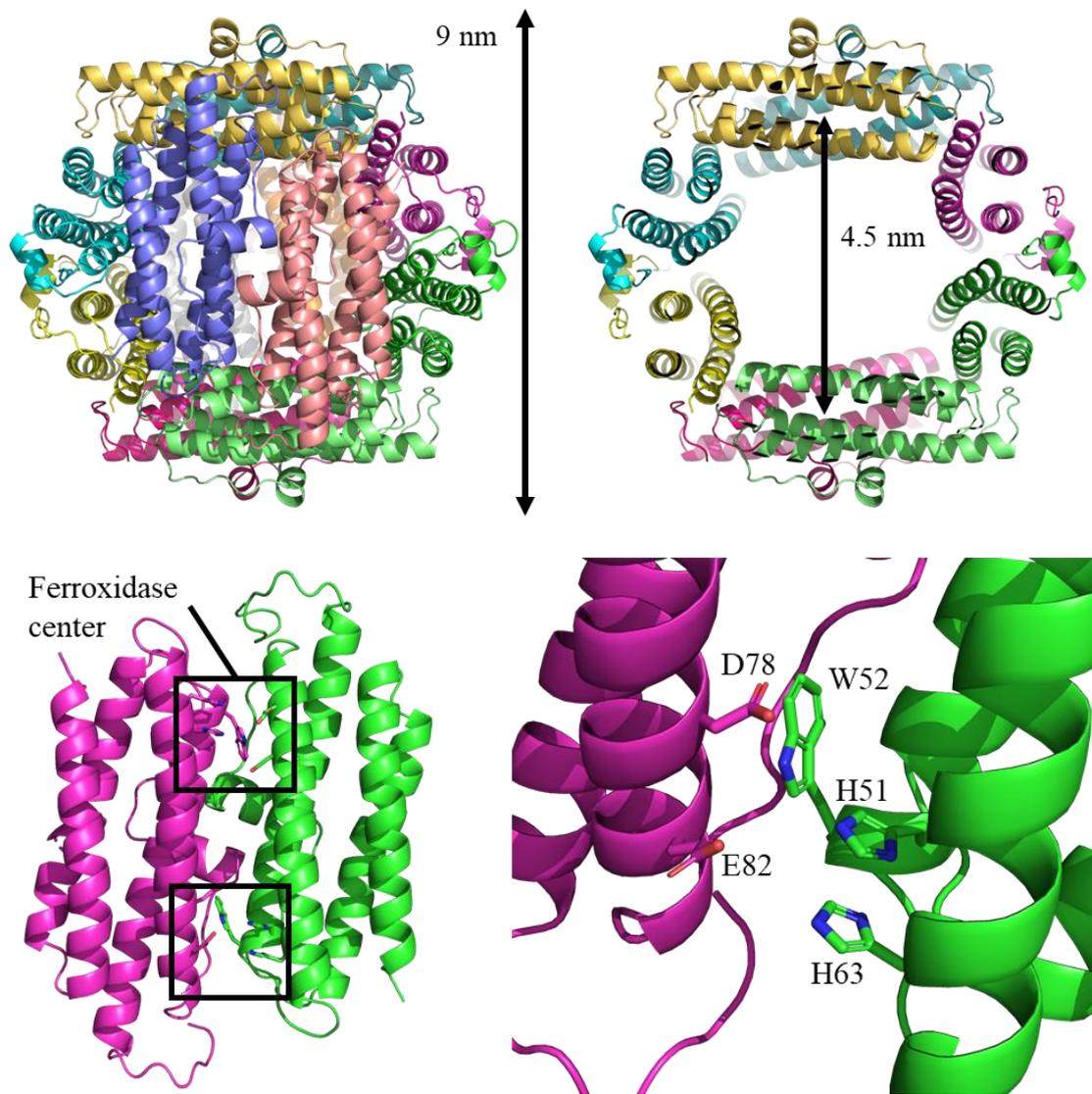


図7. Dps の立体構造（上段）とフェロキシダーゼ活性サイト（下段）について
(PDB ID: 1dps)

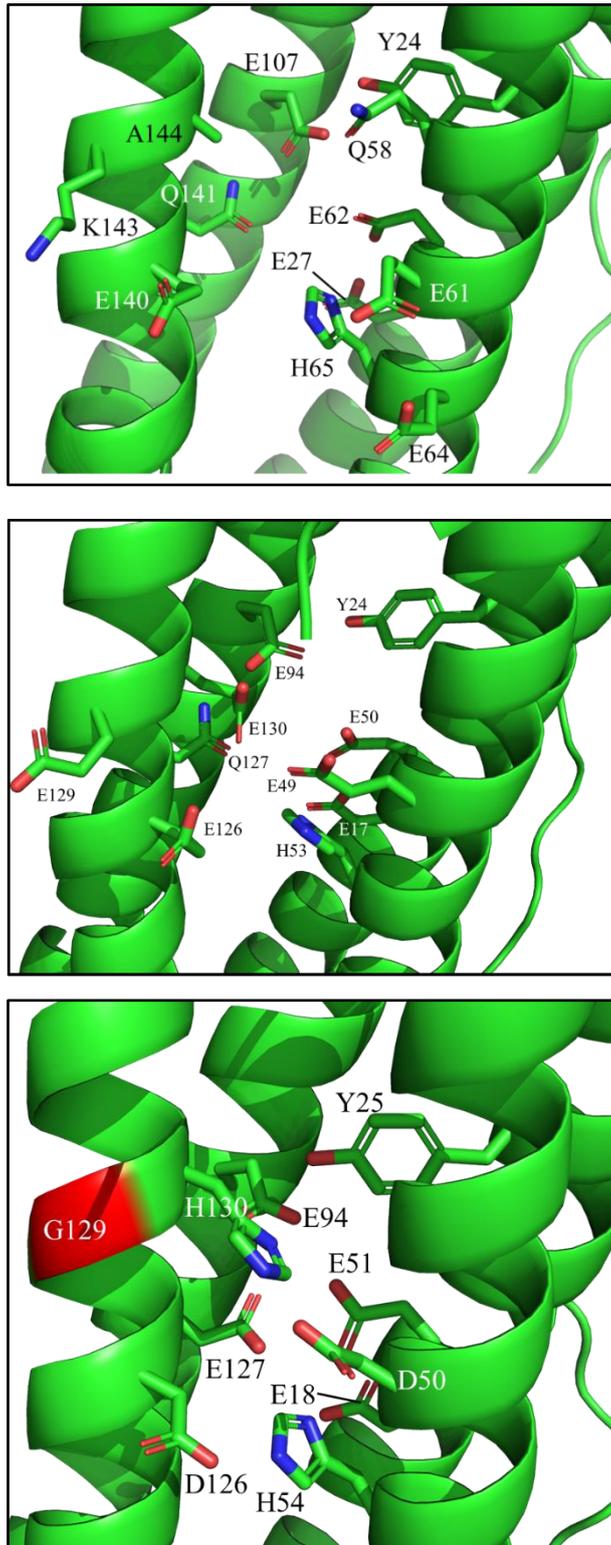


図 8. HuFTH のフェロキシダーゼ活性サイト (上段)、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイト (中段)、EcBfr のフェロキシダーゼ活性サイト (下段) の比較

2. 大腸菌フェリチンが形成する鉄コアの構造とリン酸の効果

2-1. 序論

フェリチンにより酸化された鉄は、フェリチン内腔に鉄コアとして貯蔵される。生体内でフェリチン内腔に形成される鉄コアには、リン酸が含まれることが報告されており、その含有量は生物種によって異なっている。動物の場合、鉄とリン酸の比は 10:1 とリン酸含有量が低く、形成される鉄コアは高い結晶性を示す。一方で、バクテリア・植物の場合、鉄と同程度のリン酸が鉄コアに含まれており、形成される鉄コアはアモルファス性である。様々なフェリチンについて、リン酸存在下で行われた研究は幾つか報告されている¹⁰⁶⁻¹⁰⁹。

フェリチン内腔に形成される鉄コアに関する研究は、主に HoSF を用いて行われてきた。高角暗視野走査透過電子顕微鏡 (HAADF-STEM) により、高解像度の鉄コア構造の観察に成功している。HAADF-STEM の原理として、高角に散乱した電子線を検出する為、得られるコントラストは観察対象の原子番号に依存し、鉄コアの構造の細部まで観察することが可能である。Pan らは、ヒト肝臓フェリチンを用いて、鉄コアを観察した結果、フェリチン内腔に複数のサブ粒子が形成されていることを報告した¹¹⁰。一方で、Lopez-Castro らは、HuFTL では、鉄コアは閉殻状ではない球殻構造を示し、一方で、ヒト心臓フェリチンでは、棒状やブーツ状の鉄コア構造を示し、離散的なサブ粒子を確認することができなかったと報告している¹¹¹。これらの結果のように、フェリチン内腔に形成された鉄コアの形態学的な知見は幾つか報告されているものの、主に哺乳類由来のフェリチンで行われており、また、リン酸存在下での実験は行われていないため、リン酸が鉄コア形成に及ぼす影響は十分に理解されていない。したがって、生体内で、鉄コア中に高いリン酸含有率をもつバクテリアや植物由来のフェリチンが形成する鉄コアの形態学的な知見やリン酸が鉄コア形成に及ぼす影響に関する知見は少ない。

本研究では、EcFtnA を用いて、リン酸の有無による鉄コア形成への影響を、SAXS、AUC、TEM を用いて調べた。

2-2. 方法

2.2.1 ホロ EcFtnA の調製

先行研究で確立されている大腸菌を用いた EcFtnA の過剰発現・精製系に従って、アポ EcFtnA は調製された¹¹²。1 μ M の精製したアポ EcFtnA 溶液と 500mM 硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を 1000:1 で混合し、25 $^{\circ}$ C で 30 分静置した。球殻 1 分子あたり 500 個以上の鉄を添加する場合、この混合溶液に対して 500mM 硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を添加した。混合溶液を Amicon Ultra-15 を用いて 1mL に濃縮し、13000 \times g で 10 分遠心した後、0.45 μ m PVDF フィルターを用いて沈殿を除去した。この溶液をサンプルに、Superose 6 increase を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによってホロ EcFtnA を調製した。フェリチン球殻内部の鉄コア形成は、native-polyacrylamide electrophoresis (native-PAGE) ゲルに対して CBB 染色、プルシアンブルー染色を行うことで確認した。

2.2.2 元素分析

EcFtnA 内腔に形成される鉄コアに含有される鉄量の定量は、ICP 発光分光分析装置 ICPS-7000 によって行われた。鉄濃度定量用の標準液 (富士フィルム和光) から希釈系列を調製した。この希釈系列の溶液を用いて、検量線を作成した。検量線から、ホロ EcFtnA 溶液の鉄濃度を算出した。得られた鉄濃度を、タンパク質濃度で規格化することで、球殻 1 分子あたりの鉄量を導出した。

EcFtnA 内腔に形成される鉄コアに含有されるリン酸量の定量は、以前に報告されているモリブデンアッセイに従って行われた⁷¹。ホロ EcFtnA 溶液のリン酸濃度は、検量線法によって算出された。10mM リン酸水素二カリウム溶液の希釈系列を調製し、この希釈系列をもとに検量線を作成した。サンプル調製の過程で、酸性条件下でタンパク質凝集体が形成される為、凝集体を可溶化する為にすべての溶液の SDS 濃度が 1.25% になるように調製した。溶液混合から室温で 20 分静置した後、740nm の吸光度を測定した。リン酸濃度は、得られた吸光度と希釈系列から作成された検量線をもとに計算された。

2.2.3 AUC 測定

沈降速度法による AUC 測定はベックマン XL-I 超遠心機で、An-50Ti ローター

を用い、20 °C、30000 rpm の条件下で行われた。測定条件は追跡波長 280 nm、ラジカルステップサイズ 0.002 cm、スキャンインターバル 2 分、スキャン回数 30-60 回に設定された。測定サンプルは、タンパク質濃度が 0.1-0.45 mg/mL になるように調製した。得られたスキャンデータは SEDFIT を用いて解析した¹¹³。部分偏比容は、アポ EcFtnA の場合、アミノ酸配列をもとに SEDNTERP から計算した。一方で、ホロ EcFtnA の場合、先行研究で提案されている鉄コアとタンパク質の偏比容の重量平均から計算された¹¹⁴。

2.2.4 TEM 測定

TEM 測定は、JEOL JEM-2100F 透過型電子顕微鏡を用いて行われた。TEM による鉄コアの観測は、染色することなく行った。得られた TEM 画像から、Image J を用いて、鉄コア粒子径を導出した。TEM 画像からの鉄コア粒子径の導出は、ピクセル強度に対して閾値を設定することで、ピクセル強度を 2 値化し、鉄コア領域を定義した。定義された鉄コア領域のピクセル間距離を計算し、最大長を鉄コア粒子径として定義した。

2.2.5 SAXS 測定

SAXS 測定は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory BL-6A または 10C で行われた。X 線の波長は 1.5 Å、試料と検出器の距離は 2 m、正確な距離はベヘン酸銀の散乱を用いて決定した。2 次元データは、Dectris 社の PILATUS 1M または 2M を用いて測定された。散乱データに対する X 線照射損傷を最小限に抑えるため、フローセルを使用した。露光時間は、BL6A で 6 秒、BL10C で 20 秒に設定した。温度はサーモスタットバスから水を循環させることにより 25 °C に保たれた。2 次元データについて、ソフトウェア SAngler を用いて円周積分し、1 次元の散乱プロファイルを得た。また、S/N 比を向上させるために 10~20 枚の散乱プロファイルを平均化した。緩衝液の散乱データを差し引いた後、Guinier 近似またはペア距離分布関数 $P(r)$ プロファイルを用いて、慣性半径 R_g と前方散乱強度 $I(0)$ を得た。Guinier 近似は以下の式で表される。

$$I(Q) = I(0)\exp\left(-\frac{R_g^2 Q^2}{3}\right) \quad (\text{Equation 7})$$

ここで、散乱ベクトル $Q=(4\pi/\lambda)\sin\theta$ (λ は波長、 2θ は散乱角)、 $I(Q)$ は Q 値で与えられる散乱強度である。P(r)関数はソフトウェア GNOM を用いて計算した。

試料溶液のスクロース濃度を変化させ、コントラストマッチング条件を決定した。apoEcFtnA を 50% (w/w) ショ糖溶液と混合し、5%~45% (w/w) ショ糖を含む標準溶液を作製した。正確なスクロース濃度は、アッベ屈折計(島津製作所)を用いて決定した。スクロース濃度が高くなるにつれて、散乱強度が低下しており、 $I(0)$ 値は散乱体と溶媒の電子密度差の二乗に比例することが知られているため、スクロース溶液の濃度から計算した溶媒の電子密度に対して $I(0)$ をプロットし、二次関数でフィッティングした。

2.3. 結果

2.3.1 ホロ大腸菌フェリチンの調製

ホロ EcFtnA は、20 mM リン酸または 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 下で、アポ EcFtnA 溶液に硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を段階的に添加し、調製した。リン酸非存在下の試料について、鉄の添加後、溶液の色が琥珀色に変化した一方で、リン酸存在下では顕著な色の変化を示さなかった (図 9A)。また、リン酸存在下では、UV スペクトルは、400 nm 以上の波長で吸光度を示さない一方で、リン酸非存在下では、400-600 nm までの広い範囲で吸光度を示した (図 9B, C)。この結果から、リン酸存在下と非存在下で、鉄のコアの化学構造が異なることが示唆された。次に、ホロ EcFtnA を、Superose 6 increase を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。特に多量の鉄を供給した場合、ホロ EcFtnA よりも大きな鉄酸化物の会合体が多く含まれていた。この為、ホロ EcFtnA を含む画分を回収し、必要に応じて、再度、クロマトグラフィーを行った。精製試料の全 Fe 濃度は ICP 発光分光法で測定し、一方、タンパク質濃度は、SDS-PAGE 後、CBB 染色時のバンド強度から計算された。これらの鉄、タンパク質濃度から 24 量体あたりの Fe 含有量 (Fe/shell) を算出した。Fe/shell 比は、Fe の添加量が増加するにつれて増加した (表 1)。20 mM リン酸 (pH 7.0) と 25 mM HEPES (pH 7.0) において、最終的にそれぞれ 3000 と 2000 Fe/shell まで添加した。リン酸非存在条件下では、先行研究で報告されている 0.1 M MES (pH 6.5) でホ

ロ EcFtnA を調製した Hudson らの結果と一致した³⁷。先行研究では、ホロ EcFtnA 調製時に見られる凝集体の影響を排除されていないが、本研究では、これらの凝集を遠心分離とゲルろ過クロマトグラフィーによって除去し、すべての実験を行った。

リン酸濃度はリン酸-モリブデン酸アッセイで測定した。Fe/Pi 比は 0.8-2.3 であり (表 1)、天然に存在するバクテリオフェリチンや植物フェリチンで報告されている値と同じであった。一方、25 mM HEPES バッファーに溶解したアポ EcFtnA ではリン酸が検出できなかった。

(A)

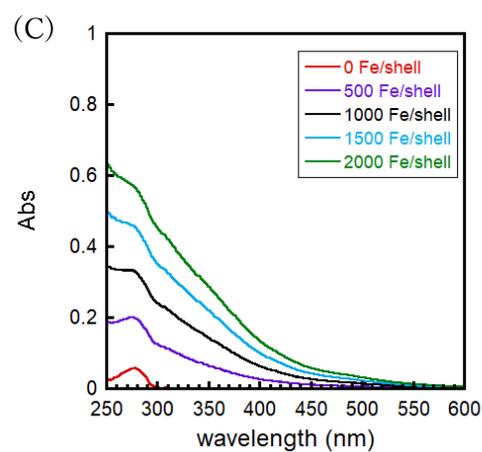
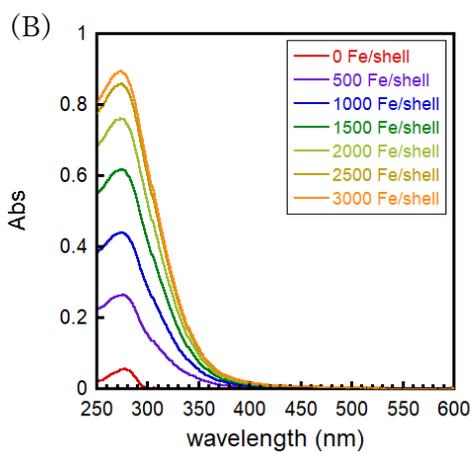
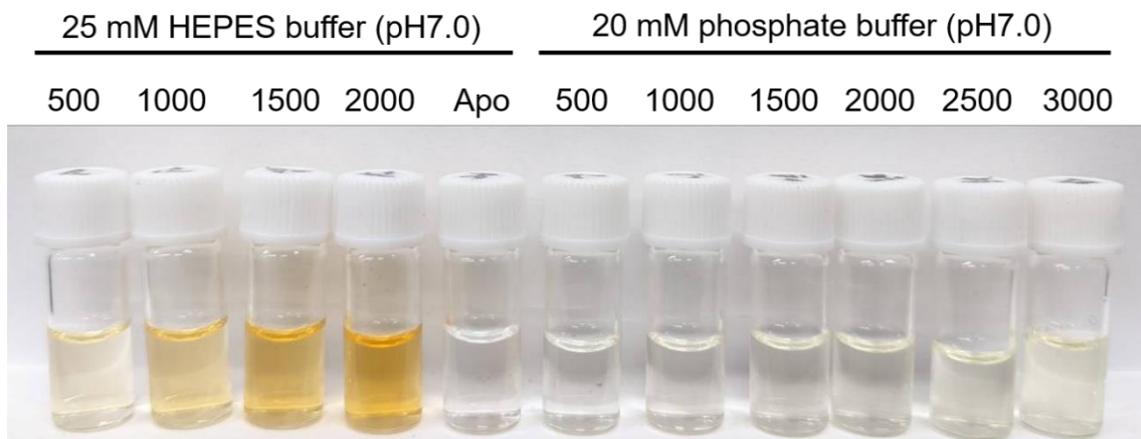


図 9. 精製前のホロ EcFtnA の画像 (A) と精製前のホロ EcFtnA の UV スペクトル.
(B) 20mM リン酸緩衝液 (pH 7)、(C) 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7)

表 1. ICP スペクトル、モリブデンアッセイ、TEM 画像解析、SAXS 測定から得られる鉄コアの性質について

Name	Added Fe ²⁺ per a cage	Fe/shell	PO ₄ /Fe	Mean diameter ^c (nm)	R _g (nm)
20 mM phosphate buffer					
Ft _{p490}	500	490 (±180) ^a	0.44 (±0.06)	7.4 (±2.2)	2.91 (±0.008)
Ft _{p740}	1000	740 (±60)	1.00 (±0.08)	7.4 (±2.8)	3.08 (±0.002)
Ft _{p1050}	1500	1050 (±80)	1.25 (±0.08)	6.8 (±1.7)	3.23 (±0.002)
Ft _{p1920}	2000	1920 (±200)	0.88 (±0.10)	7.6 (±2.0)	3.28 (±0.002)
Ft _{p2200}	2500	2200 (±200)	0.95 (±0.09)	8.1 (±3.0)	3.41 (±0.002)
Ft _{p2640}	3000	2640 (±180)	0.87 (±0.07)	7.5 (±2.2)	3.53 (±0.002)
Ft _{p3140}	3500	3140 (±210)	0.72 (±0.07)	8.6 (±3.1)	3.56 (±0.002)
25 mM HEPES buffer					
Ft _{h470}	500	470 (±40)	N.E. ^b	2.9 (±0.8)	2.56 (±0.012)
Ft _{h1030}	1000	1030 (±80)	N.E.	3.1 (±1.0)	2.78 (±0.008)
Ft _{h1340}	1500	1340 (±100)	N.E.	3.8 (±1.4)	3.02 (±0.005)
Ft _{h2010}	2000	2010 (±150)	N.E.	3.0 (±1.0)	2.98 (±0.004)

^a 標準誤差

^b Not examined

^c TEM 画像から計算される平均直径

2.3.2 AUCによる鉄コアの測定

ホロ EcFtnA について、規格化した沈降係数 s の分布 $c(s)$ を示す (図 10)。アポ EcFtnA の沈降係数 $s_{w,20}$ は 15.2S であり、 $c(s)$ 分布に、24 量体に相当するピークのみが検出された。20 mM リン酸緩衝液中で調製されたホロ EcFtnA の $c(s)$ 分布は、ICP 発光分光法で観測される鉄量が増加するにつれて高い s 値へとシフトした (図 10A)。490Fe/shell の鉄量が ICP 発光分光法で観測されたホロ EcFtnA (p490) の場合、 $c(s)$ 分布は、 s 値 23.2S にピークを持ち、より大きな s 値に向かって非対称に広がっていることが明らかとなった。p740 の $c(s)$ 分布は s 値 27.9S のピークの両側に肩があり、試料中に、異なる数の鉄原子を含む複数の成分を含んでいることが示唆された。p1050 は 39.4 S に対称的なピークを示した。この $c(s)$ 分布には肩は検出できなかったが、ピークの線幅はこの試料が多分散であることを示唆した。p1920、p2200、p2640、p3140 はそれぞれ 42.4S、43.4S、46.5S、45.5S に比較的狭いピークを示した。25 mM HEPES 緩衝液中で調製したホロ EcFtnA の $c(s)$ 分布を図 10 に示す。470Fe/shell の鉄量が ICP 発光分光法で観測されたホロ EcFtnA (h470) の $c(s)$ 分布は、p490 と同様に、 s 値 19.6S にピークを持ち、 s 値が増加する方向に非対称に広がっていることが明らかとなった。しかし、h1030 の $c(s)$ 分布は p1050 と異なっており、h1030 の $c(s)$ 分布は 22.6S に最も高いピークを持ち、より高い s 値の領域において複数のピークが確認された。h1340 の $c(s)$ 分布は 28.1S、33.1S、48.7S に複数のピークが確認され、h2010 の分布では、複数のピークを確認することができなかったが、36.2S にピークがあり、p1920 (42.4S) や p2200 (43.4S) の分布より線幅は広がっていた。この結果は、EcFtnA の内腔に形成される鉄コアが、離散的なものであることを示唆している。また、鉄量に応じて鉄コアの大きさは変化し、EcFtnA 内腔には同程度の大きさの鉄のコアが複数形成されたと考えられる。

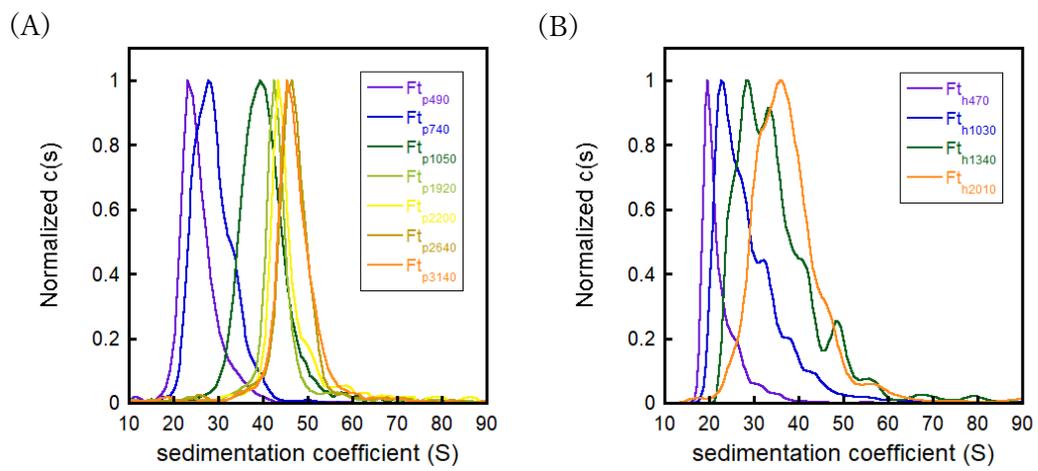


図 10. ホロ EcFtnA の $c(s)$ 分布関数.

(A) 20mM リン酸緩衝液 (B) 25 mM HEPES 緩衝液

2.3.3 TEMによる鉄コア観察

2.3.2での仮説を確かめるために、鉄コアの形態をTEMで観察した。AUC測定と同一のサンプルを用いて、染色を行わずにTEM画像を取得した(図11および図12)。p490とp740のTEM画像では、様々な大きさの粒子が見られたが、S/N比の問題により、個々の鉄コア形状について議論が可能な、明瞭なTEM画像を得ることが困難であった。一方で、球殻1分子あたり1000個以上の鉄原子を含む試料のTEM画像では、均一な大きさの鉄コア粒子が観測された(図12C, D)。ImageJを用いて、TEM画像中の鉄コア粒子数を調べ、粒径に関するヒストグラムを作製した(図13, 14)¹¹⁵。リン酸存在下で再構成された鉄コアの平均粒径は、鉄の含有量に関係なく6.8-8.6 nmの範囲であった(表1)。この値は、フェリチン分子の内径と一致する。一方、25 mM HEPES 緩衝液で調製されたホロ EcFtnA は、直径が2-4 nmの範囲において、2-4個の小さな鉄コア粒子のクラスターが確認された(図11)。この観察結果は、リン酸非存在下の場合、EcFtnAの内腔に小さな鉄コア粒子のクラスターが形成されることを示唆するAUCの結果と一致する。Hudsonらは、ホロ EcFtnAをTEMで観察し、鉄コアの直径が 7.9 ± 1 nmであると報告した³⁷。先行研究と本研究の結果の間に矛盾がある理由は明らかではないが、pH条件の違い、あるいは溶液調製の過程における鉄の添加量の違いの可能性があると考えられる。ここで重要な点は、リン酸濃度以外は同じ方法で調製したにもかかわらず、リン酸存在下と非存在下で再構成された鉄コアは異なる形態を示したことである。

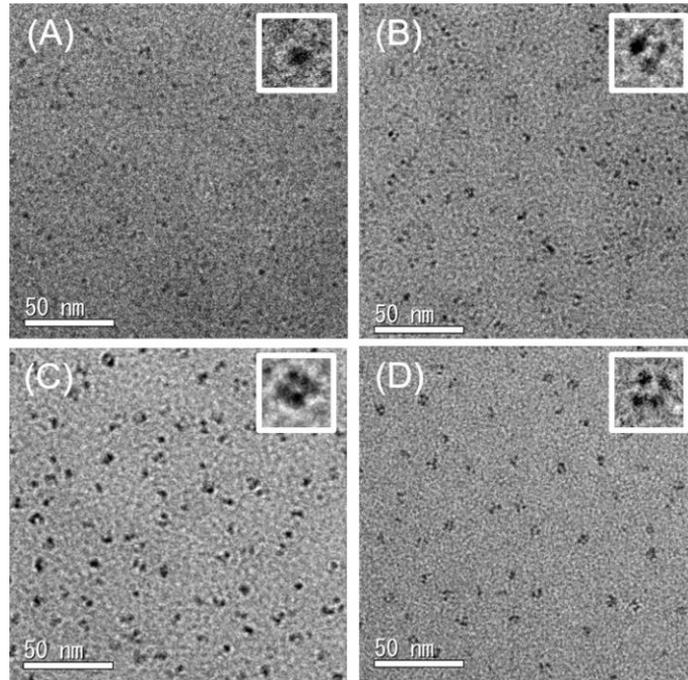


図 11. リン酸非存在下で調製されたホロ EcFtnA の TEM 画像.
 (A)h470. (B)h1030. (C)h1340. (D)h2010.

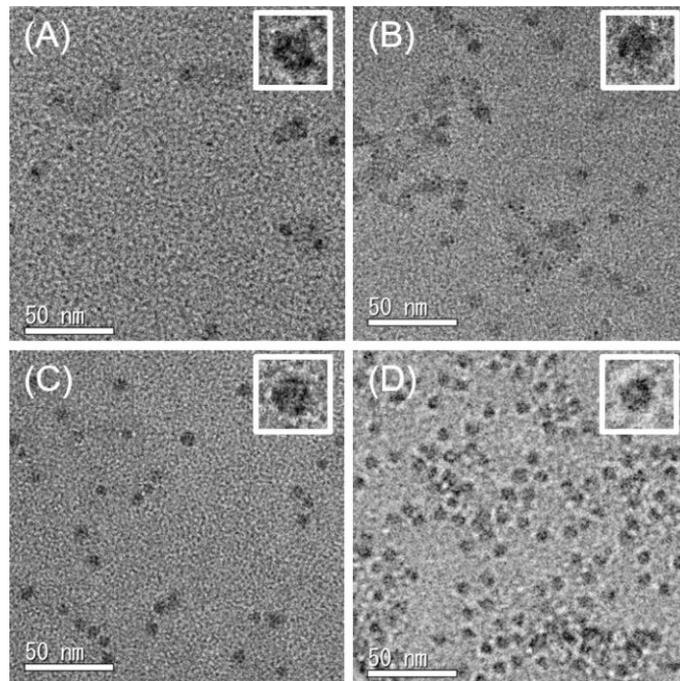


図 12. リン酸存在下で調製されたホロ EcFtnA の TEM 画像.
 (A)p470. (B)p740. (C)p1920. (D)p2640.

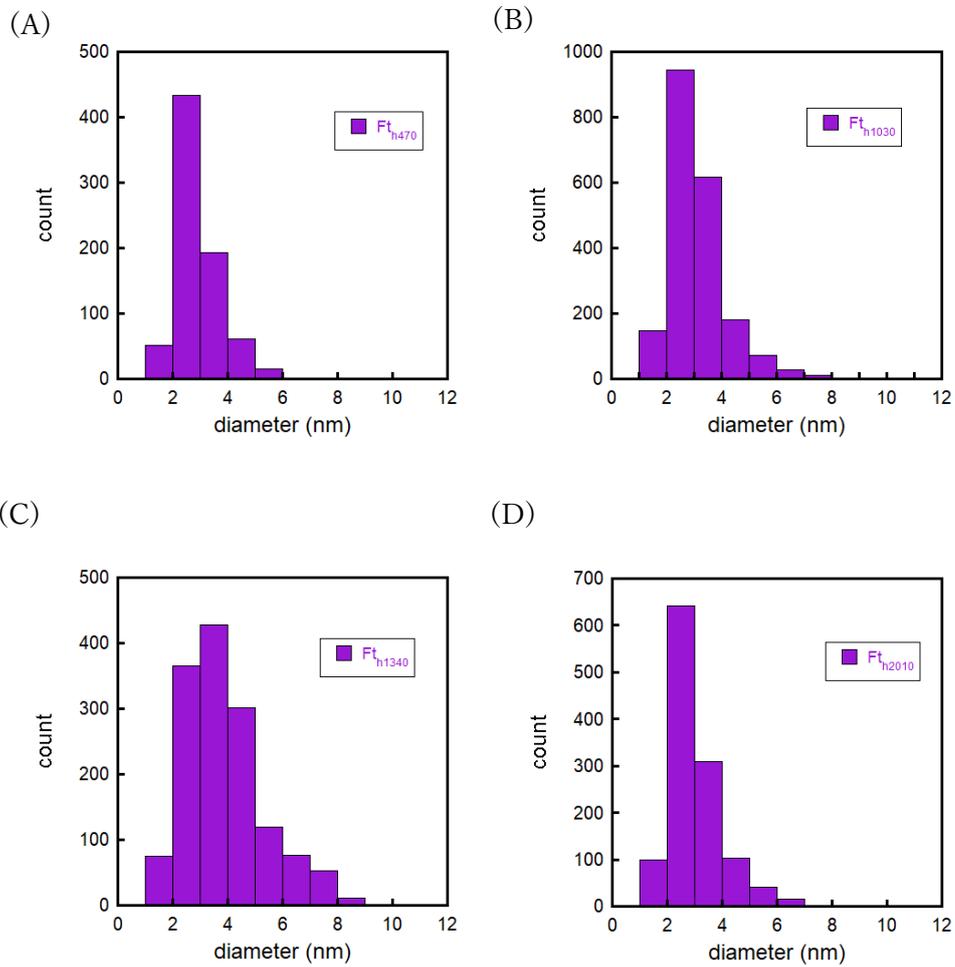


図 13. TEM 画像から計算されるリン酸非存在下で EcFtnA 内腔に形成された鉄コア粒子の直径の分布. (A)h470. (B)h1030. (C)h1340. (D)h2010.

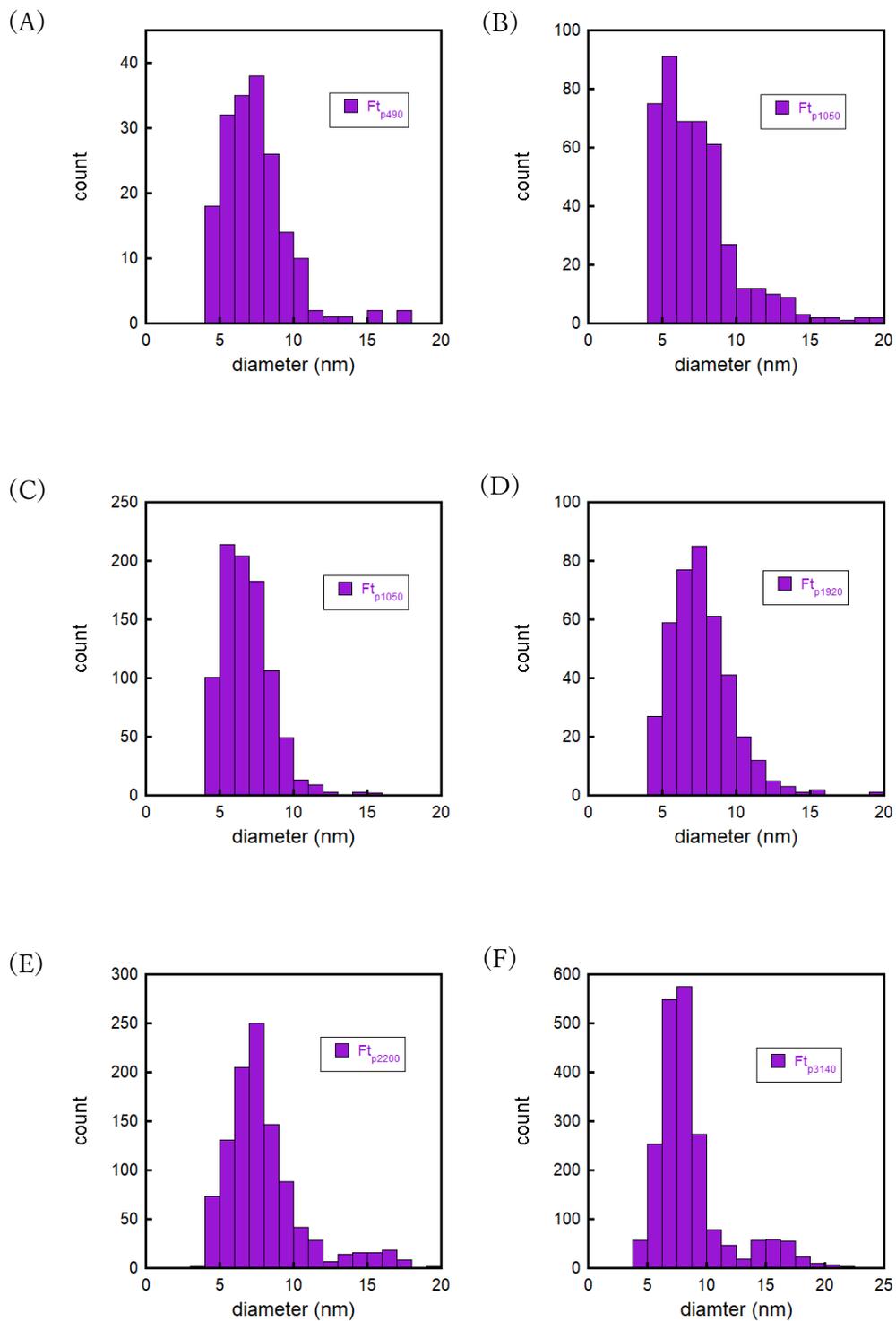


図 14. TEM 画像から計算されるリン酸存在下で EcFtnA 内腔に形成された鉄コア粒子の直径の分布.

(A) p490. (B) p740. (C) p1050. (D) p1920. (E) p2200. (F) p3140

2.3.4 SAXS による観察

SAXS 測定は、タンパク質の電子密度が溶媒の電子密度と一致し、鉄コアからの散乱のみを観測できるコントラストマッチング条件下で行われた。第一に、コントラストマッチング条件を決定する為にアポ EcFtnA の SAXS 測定を、様々なスクロース濃度条件下で行った (図 15)。スクロース濃度が上昇するに従って散乱強度の低下が確認された (図 15A)。前方散乱強度 $I(0)$ を溶媒の電子密度に対してプロットすると、 407.29 nm^{-3} で $I(0)=0$ となり、この電子密度からスクロース濃度を計算すると、53.55%(w/w)であることが明らかとなった (図 15B)。リン酸を含む鉄コアと含まない鉄コアの SAXS プロファイルを示す (図 16)。鉄とリン酸を多く含む鉄のコアの散乱プロファイルは、大きな粒子に特徴的なFRINGEを示した。鉄の含有量を減らした場合、p490 では 1.4 nm^{-1} 付近のFRINGEはブロードになり、消失した (図 16A)。一方で、HEPES 緩衝液で再構成したホロ EcFtnA の散乱プロファイルには、高い鉄量の場合であってもFRINGEを確認することができなかった (図 16B)。鉄コアの慣性半径 R_g は、 $P(r)$ 関数から算出した。慣性半径は鉄の含有量が増加するに伴い、大きくなることが明らかとなった (図 17)。鉄コアを半径 4nm の均一な球と仮定すると、球の半径 R と回転半径の関係、 $R_g = \sqrt{\frac{3}{5}}R$ から、理論上の R_g 値は 3.1 nm となる。リン酸の存在下で再構成されたホロ EcFtnA で観測された最も高い R_g は、理論値より大きく、リン酸を含む鉄コアが球ではなく球殻構造であることが示唆された。一方、リン酸非存在下で得られた R_g は、半径 4 nm の均一球の理論 R_g より小さかった。

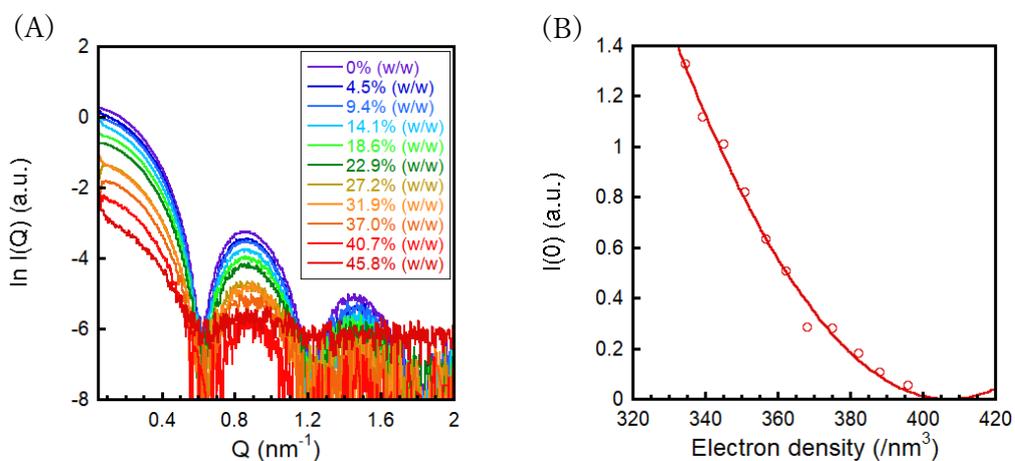


図 15. コントラストマッチング条件の決定.

- (A) 0-45.8% (w/w) スクロース溶液中でのアポ EcFtnA の SAXS プロファイル.
 (B) 溶媒のシヨ糖濃度から計算される電子密度と前方散乱強度 $I(0)$ との関係.

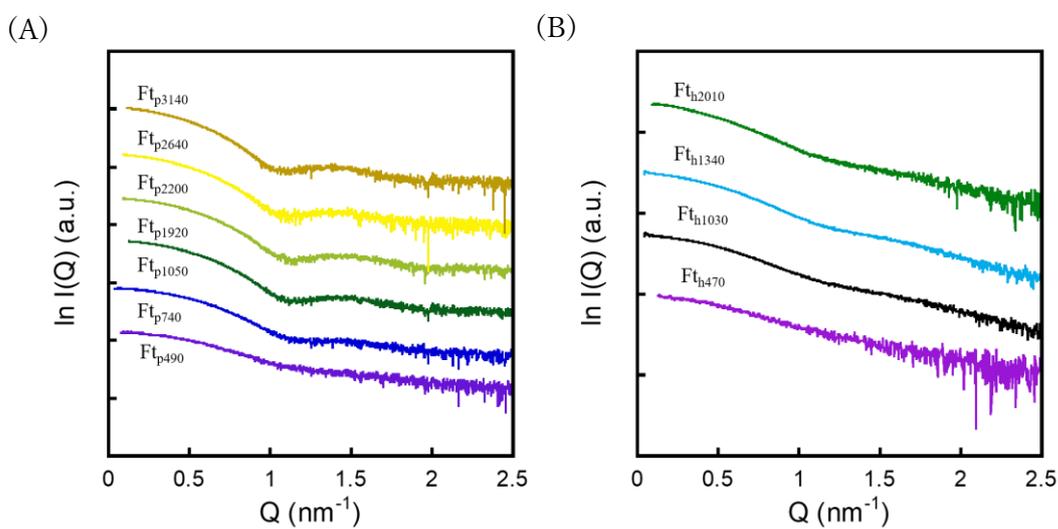


図 16. コントラストマッチング条件下で測定された
 ホロ EcFtnA の散乱プロファイル.

- (A) 20 mM リン酸緩衝液 (B) 25 mM HEPES 緩衝液.

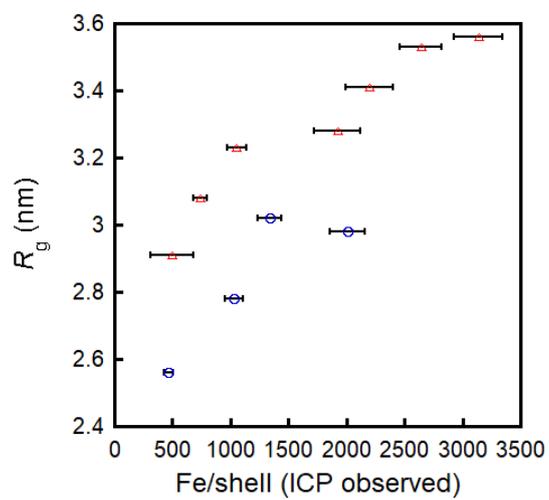


図 17. 鉄コアに含まれる鉄量に対する慣性半径の変化 .
 (赤三角) 20 mM リン酸緩衝液 (青丸) 25 mM HEPES 緩衝液.

2.4. 考察

TEM 画像から、リン酸存在下で再構成された鉄のコアは、直径 6.8~8.6 nm の球状であることが明らかになった。このサイズは、X 線結晶構造解析によって明らかにされた EcFtnA 分子の内径と一致する¹⁰。SAXS による鉄コア構造の観測は、フェリチン内腔に形成された鉄コアの形状が球殻構造であることを示唆した。TEM 観察から、鉄コアの粒径はフェリチン分子の内径 (8 nm) と一致する。一方で、得られた Rg が 3.6 nm であることから、鉄コアの内径が約 6 nm であると推定される。本研究では、リン酸存在下で約 3000 個の鉄を保持した鉄コア (p3140) が外径 8 nm と内径 6 nm の球殻構造であることを示した。この鉄コア構造の理論体積は 155 nm³ であり、一方で、ホロ EcFtnA の中心にある直径 6 nm の球体の空隙は 113 nm³ である。この容積に鉄原子を同じ密度で収容すると、さらに 2200 個の鉄原子を収容可能である。計算値として、合計で 5200 個の鉄原子を収容可能であることから、この推定値は、フェリチンが最大 4500 個の鉄原子を貯蔵できるという一般的な概念を支持する。概ね均一な球殻状の鉄コアが形成される機構として、フェリチンを足場に鉄コア形成が進行することによって、鉄コア内部空洞へ進入可能な経路が閉じられ、形成された鉄コアの表面で Fe²⁺ がさらに鉄コア内部に沈着するのを防いでいると考えられる。

AUC 測定で得られた c(s) 分布が徐々に s 値が増加する方向にシフトしている点を考えると、鉄コアはまずフェリチンを足場に形成され、内腔の中心に向かって成長すると考えられる。仮に、コアが外径 4 nm の薄い球殻として形成される場合、鉄量が低い場合、Rg 値は 4 nm に近くなる。しかし、p490 の Rg 値は予想された値よりも小さい値を示した。(i) p490 と p740 では球状の TEM 像がほとんど観察されなかった。(ii) p490 と p740 の c(s) 分布にはいくつかの肩があり、異なる量の鉄原子を含む個別の鉄コアサブ粒子が存在することが示唆される。これらの鉄コアのサブ粒子は、鉄を追加供給すると互いに融合し、球殻状の構造を形成すると考えられる。これらの結果は、リン酸非存在下での鉄コア成長と同様であるが、1.4 nm⁻¹ でFRINGEが現れることから、リン酸存在下では比較的低い鉄量で融合した球殻状の鉄コア構造が現れることを示唆している。

Honarmand Ebrahimi らは、酸化された Fe³⁺ がフェリチン内腔に抜けるゲートウェイ部位を提案した¹⁰⁶。C サイトに相当する PfFtn のゲートウェイ部位は E49、

E126、E129、E130 残基から構成され、EcFtnA にも保存されている。リン酸による Fe^{2+} 酸化の促進を説明するために、次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、フェリチン内腔に進入した Fe^{2+} と入れ替わる。(ii) 進入した Fe^{2+} はリン酸があれば、そのリン酸イオンと結びつき、形成された Fe^{2+} -リン酸複合体はフェロキシダーゼ活性サイトから Fe^{3+} を追い出す。(iii) この過程でリン酸は Fe^{2+} から解離して Fe^{3+} と結合する。(iv) Fe^{3+} -リン酸複合体はゲートウェイ部位に移動し、ゲートウェイ部位のグルタミン酸側鎖が持つ負電荷とリン酸の静電反発により、フェリチン内腔に放出される。HuFTH では、E129 と E130 がそれぞれアラニンとリジンに置換されている。HuFTH では、リン酸とゲートウェイ部位のグルタミン酸との間の静電反発が減少している為、リン酸は、その後の Fe^{2+} の酸化の律速段階となる Fe^{3+} の Fe^{2+} による置換の反応を加速することはない。EcFtnA では、ゲートウェイ部位残基が保存されているため、PfFtn と同様のメカニズムで Fe^{3+} -リン酸複合体が放出される可能性がある。また、 Fe^{3+} -リン酸複合体の放出は全てのサブユニットで起こり、これが均一な球殻状の鉄コアの形成に寄与している可能性がある。

リン酸非存在下で再構成したホロ EcFtnA の TEM 像と $c(s)$ 分布から、鉄コアはいくつかのサブ粒子が集まったクラスターであることが明らかとなった。 $c(s)$ 分布に対してマルチガウスフィッティングを行った結果、 $c(s)$ 分布から各ピーク成分の s 値が得られた (図 18)。各成分のパラメータを表 2 に示す。h1030 の成分 5 と 6、h1340 の成分 5-8、h2010 の成分 4 は、Fe/shell 比が 5000 以上の異常値を示した。これらの成分は、以下に記述する理由で観測されたものであると考えられる。本研究では試料をゲルろ過クロマトグラフィーで精製しており、holo-EcFtnA よりもかなり大きな酸化鉄/水酸化鉄/リン酸鉄の凝集体は除去されると考えられるが、holo-EcFtnA に近いサイズの凝集体は完全に除去されない可能性がある。このような凝集体はタンパク質よりも密度が高いため、沈降速度が速く、大きな s 値を与える。第二に、異常な Fe/shell 比を示す理由として、48 量体以上の分子が存在するためと考えられる。フェリチンが 48 量体、72 量体、96 量体などを形成することはよく知られている¹¹⁶⁻¹¹⁷。今回の調製ではオリゴマーは除去されているが、少量の二量体が試料中に存在する可能性がある。フェリチン内腔に 3000 個の Fe/shell が保持した EcFtnA が 48 量体を形成する場

合、この 48 量体は 1 分子中に 6000 個の Fe が保持する分子として挙動する可能性がある。第三に、鉄コアの部分偏比容は、各成分の鉄含有量を推定する上で重要である。本研究では、リン酸を含まない鉄コアの組成がフェリハイドライトとして近似できると仮定し、May らが報告した式を用いて、各成分の Fe/shell 比を算出した¹¹⁴。しかし、この仮定は正しくない可能性が考えられる。HoSF の鉄コアは、フェリハイドライト相、マグネタイト相、ヘマタイト相を含む多相性であることが報告されている⁶³。本研究で再構成した鉄コアの詳細な化学構造は不明であり、部分偏比容も不確かである。この為、各成分の Fe/Shell 比には大きな誤差があることに注意しなければならない。しかしながら、この計算はリン酸非存在下で形成された鉄コアのサブ粒子の大きさを推定する上で有意義である。重要な点は、Fe/shell 比が 5000 より大きい成分の面積が 7%以下であることである (表 2)。s 値が大きい成分は吸光係数も大きくなると考えられるが、今回の計算ではすべての成分が観測波長の 280 nm において同じ吸光係数を持つと仮定したため、実際の成分の集団は 7%よりずっと小さいと考えられる。

h470 の最小の s 値は 19.3S で、沈降係数から計算される鉄コアに含まれる鉄原子の数は約 360 個であった。この s 値とアポ EcFtnA の s 値 (15.2S) の間にはピークが見られないため、鉄原子はこの値まで急速に蓄積されたと考えられる。c(s)分布の複数のピークが、1 個、2 個、3 個、あるいはそれ以上の鉄コアサブ粒子を含む各クラスター構造に由来することを考慮すると、隣り合うピーク間の鉄含有量の差は、1 個の粒子に含まれる鉄原子の個数となると考えられる。上記の異常な Fe/shell 比を除いた c(s)分布に見られる隣接するピーク間の鉄原子数の差は 800-1600 であり、鉄コアのサブ粒子は 800-1600 個の鉄原子で構成されていることが示唆された。鉄コアがフェリハイドライトであると仮定すると、この鉄原子の数から計算される部分偏比容は 0.274~0.280 cm³/g となる。鉄コアのサブ粒子を球体と仮定すると、これは 4-5 nm の粒子径を与える。この値は、部分偏比容の不確かさと TEM 像からの粒子径の推定値の誤差を考慮すると、TEM 観察の結果と一致する。

ここで、“鉄コアのサブ粒子の数と配置は何で決まるのか？”を考える。哺乳類のフェリチンの場合、鉄コア粒子の数は 3 回対称軸に位置する親水性チャンネルの数と関係があることが示唆されている^{40, 110}。EcFtnA の場合、3 回対称

軸上に存在するチャンネルは疎水的であり、 Fe^{2+} が進入するためのチャンネルとして機能する可能性は低い¹⁰。López-Castro らは、鉄コアの配置関係と L 鎖の空間配置は関連しており、それぞれの L 鎖サブユニットが鉄コアの核生成を促進する部位を持つことを示唆した¹¹。HuFTL の鉄コア成長の初期段階は、質量分析と X 線結晶構造解析によってよく調べられている^{74, 118}。HuFTL では、E53、E56、E57、E60 が核生成部位を構成していると考えられている⁷⁴。EcFtnA の対応する残基は、E49 を除いて、R45、Q48、T52 に置換されており、核形成部位とは考えにくい。バクテリアのフェリチンでは、B チャンネルが鉄の進入経路として主要であることが指摘されている⁴⁹。EcFtnA では、B 型チャンネルは S32、Y33、H34、T35、E37、T62、D63、K132、K135、S136、D139 の親水性アミノ酸の側鎖で覆われている。また、B チャンネルは E49、E126、E129、E130 によって構成される C サイト近傍に位置する^{10, 119}。これらの残基の 1 つである E129 は、3 回転対称軸上のチャンネルからフェロキシダーゼ部位への鉄の通過部位として提案された。大豆フェリチン 4 の E173 と HuFTH の E140 にも対応する¹⁸。この為、EcFtnA では、E129 は B チャンネルからフェロキシダーゼ部位への鉄の通過部位である可能性が考えられる。しかし、24 個の B チャンネルはフェリチン内部に存在するため、B チャンネルが鉄コアのサブ粒子の形成起点である可能性は低いと考えられる。

リン酸非存在下での哺乳類フェリチンでは、鉄コアの形成が異なるメカニズムで起こることが示されている：(1) フェロキシダーゼ活性サイトでの鉄酸化反応、(2) 800 $\text{Fe}^{2+}/\text{shell}$ の添加で支配的になる鉄コア表面で生じる酸化反応、(3) フェロキシダーゼ活性サイトでの反応 (1) で生じる H_2O_2 と Fe^{2+} の間で生じる酸化反応が考えられる⁵⁷。EcFtnA も同様のメカニズムで反応が進行すると考えると、本研究で用いた実験条件では、鉄のコア表面での酸化が支配的であると考えられる。EcFtnA では、コアの核生成部位はまだ不明であり、当初は C サイトが核形成部位として示唆されたが¹¹⁹、その後の変異体を用いた研究^{22, 56, 120}により、E49A、E126A、E130A はフェロキシダーゼ活性サイトのターンオーバーが加速しコア形成が促進することが示された⁵⁶。野生型の持つ C サイトは核形成部位ではなく、リン酸存在下ではフェロキシダーゼ活性中心での鉄のターンオーバーを抑制していると考えられる。この抑制は、C サイトが Fe^{3+} -リン酸複合体の

内腔への放出を促進するという提案されている機構とは対照的である。したがって、リン酸の存在下では、Cサイトが核生成サイトとして機能している可能性がある。この結果が、リン酸の有無による鉄コアの形態に関する違いの一つであると考えられる。

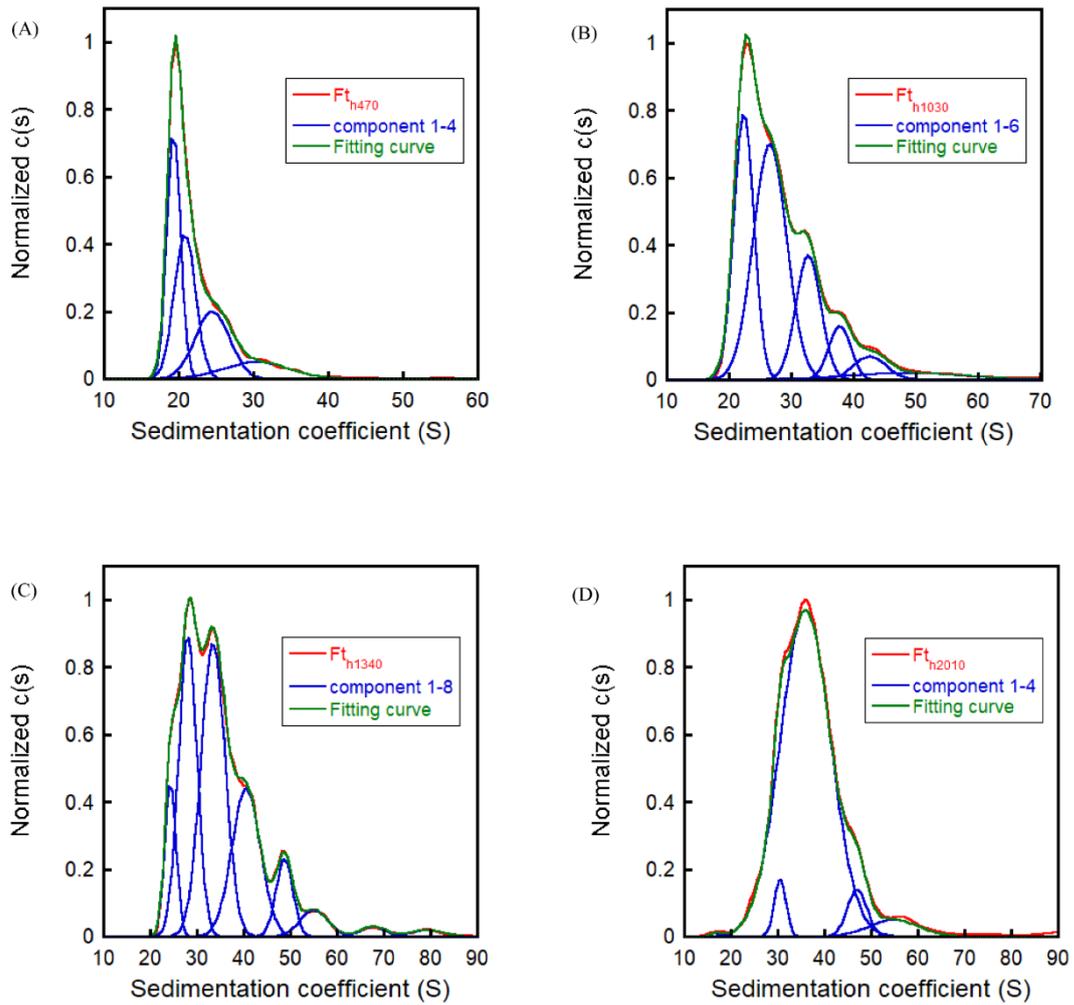


図 18. リン酸非存在下におけるホロ EcFtnA の $c(s)$ 分布関数に対するガウシアンフィッティングの結果.

(A)h470. (B) h1030. (C) h1340. (D) h2010.

表 2. $c(s)$ 分布関数に対するマルチガウシアンフィッティングのフィッティングパラメータ

Name		Peak (S)	Area (%) ^a	Fe/shell ^b	Δ Fe/shell
F _{th470}	Component 1	19.3	34.2	360	-
	Component 2	20.8	31.4	780	420
	Component 3	24.5	23.5	1760	980
	Component 4	30.5	10.8	3370	1610
F _{th1030}	Component 1	22.3	27.9	450	-
	Component 2	26.5	41.1	1460	1010
	Component 3	32.7	16.2	2930	1470
	Component 4	37.8	6.4	4120	1200
	Component 5	48.8	4.3	5290	1170
	Component 6	42.7	4.1	6740	1450
F _{th1340}	Component 1	24.3	8.2	620	-
	Component 2	28.0	26.3	1440	820
	Component 3	33.4	33.2	2660	1220
	Component 4	40.5	20.1	4250	1590
	Component 5	48.7	6.3	6090	1840
	Component 6	55.1	3.5	7530	1440
	Component 7	67.8	1.2	10380	2850
	Component 8	79.4	1.0	12990	2600
F _{th2010}	Component 1	30.5	3.5	1370	-
	Component 2	35.9	86.9	2470	
					1090
	Component 3	47.0	4.8	4730	2260
	Component 4	54.9	4.6	6350	1620

^a 面積は存在比に比例しないことに注意。280nm における吸光係数はすべての成分で同じと仮定したが、鉄の含有量が多いほど吸光係数は高い。

^b Fe/shell 比の算出方法は本文に記載した通りに沈降係数から算出した。

2.5. 結論

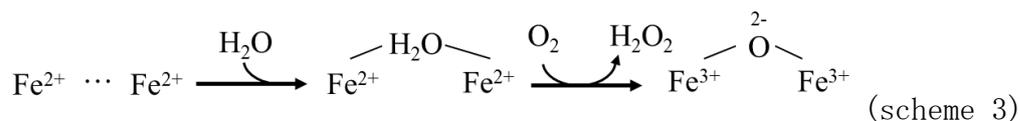
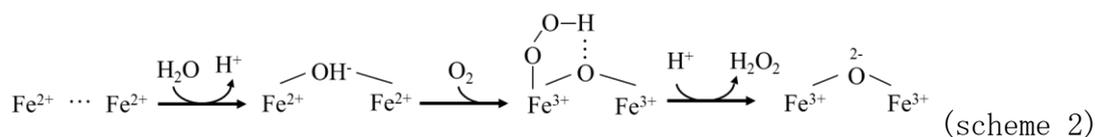
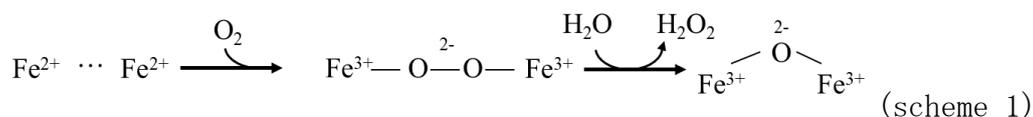
本研究では、SAXS、TEM、AUC の手法を相補的に用いて、EcFtnA 内腔に形成された鉄コア構造を解析し、鉄コア構造に及ぼすリン酸の影響を調べた。試験管内で、リン酸存在下で形成された鉄コアは、鉄の含有量と同程度の量のリン酸を含んでいた。鉄コアのサイズ分布を AUC 測定によって分析したところ、リン酸存在下では連続的な $c(s)$ 分布が観測されたが、リン酸非存在下では離散的な $c(s)$ 分布が得られた。TEM で観察される鉄コアのサイズは、リン酸存在下では、フェリチンの内径と一致した。一方で、リン酸非存在下では、複数の小さなサブ粒子から構成されるクラスター構造が観察された。鉄のコア形状に関する情報を得るために、コントラストマッチング条件下で SAXS を測定した結果、リン酸存在下では散乱プロファイルにフリンジが観察されたが、リン酸非存在下では観察されなかった。これらの結果をまとめると、リン酸非存在下では、EcFtnA 内腔に形成される鉄コアは、2-4 nm のサブ粒子のクラスター構造を形成する一方で、リン酸存在下では、外径が 8 nm、内径が約 6 nm の球殻状の鉄コア構造を形成することが明らかとなった。

3. 大腸菌フェリチンの鉄酸化メカニズムとリン酸の影響

3.1. 序論

フェリチン内腔に形成される鉄コアには、リン酸が含まれている。特に、バクテリア・植物由来のフェリチンが形成する鉄コアには、鉄と同程度のリン酸が含まれているが、フェリチンの機能にどのような影響を及ぼしているかは明らかとなっていない。1.4で述べた通り、チャンネルを通じてフェリチン内部に進入した Fe^{2+} はフェロキシダーゼ活性サイトに結合し、酸化される。フェロキシダーゼ活性サイトでの反応は、様々な手法と生物種のフェリチンを用いて、速度論的な研究結果が報告されている⁶⁰。

HuFTH の場合は、Dinuclear center に 2 つの Fe^{2+} が結合し、 $2.2 \text{ Fe}^{2+}/\text{O}_2$ の化学量比で反応が進行する。この反応過程では、Blue-intermediate と呼ばれる反応中間体が形成され、最終産物が生成されることが示唆されている。Blue-intermediate は可視領域に吸収をもつ為、500-700 nm の波長を用いて、Blue-intermediate の形成・減衰が追跡されている⁷²。同様に、フェロキシダーゼ活性サイトで形成された Fe^{3+} の最終産物は、300-350 nm の紫外領域に吸収を持つ⁷²。したがって、300-350 nm の波長を用いて、最終産物の形成を追跡することが可能である。これらを用いた速度論的研究背景から、Dinuclear center における反応スキームとして、以下のスキームが提案されている¹²¹。



一方で EcFtnA の場合、 $3.8 \text{ Fe}^{2+}/\text{O}_2$ の化学量比で反応が進むため、HuFTH とは別のスキームで反応が進行すると考えられるが、詳細な反応機構は明らかとな

っていない。したがって、EcFtnA による反応機構を解明することは生物学的な意義をもつ。また、バクテリアルフェリチンの鉄酸化活性にリン酸がどのような影響があるのかは十分に理解されていない。本研究は、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性を調べ、EcFtnA の機能に及ぼすリン酸の明らかにすることを目的とする。

3-2. 方法

3.2.1 高速カイネティック測定

高速カイネティクス測定は、Applied photophysics 社製 SX-20 ストップトフロー装置を用いて行われた。精製したアポ EcFtnA 溶液と硫酸アンモニウム鉄溶液は混合比 1:1 で混合された。アポ EcFtnA の濃度は $2 \mu\text{M}$ になるように調製された。使用された緩衝液は、混合後の溶液条件が 25 mM HEPES (pH 7.0)、25 mM HEPES, 1 mM リン酸 (pH 7.0)、25 mM HEPES, 5 mM リン酸 (pH 7.0) となるように調製された。硫酸アンモニウム鉄(II)溶液は、溶液中での自動酸化を最小限に抑えるために、96 mM になるように秤量後、4 mM HCl 溶液に溶かし、ストック溶液とした。このストック溶液から希釈系列を作成し、測定には、実験直前に 100 倍希釈した溶液を使用した。測定は、追跡波長に 310nm を使い、25°Cで行った。光路長は 1 cm に設定した。デッドタイム測定には、DTNB/チオグリセロールの反応系を用いて、1.5 ms と決定した¹²²。

3.2.2 シークエンシャルストップトフローアッセイ

シーケンシャルストップトフローアッセイは、Applied photophysics 社製 SX-20 ストップトフロー装置を用いて行われた。1 回目の混合は、混合比 1:1 で行われた。アポ EcFtnA 溶液のタンパク質濃度は、 $0.25\text{--}1 \mu\text{M}$ になるように調製された。緩衝液の条件は、高速カイネティック測定と同様の条件を採用した。一方で、硫酸アンモニウム鉄溶液については、高速カイネティック測定と同様に、 $24\text{--}240 \mu\text{M}$ となるようにストック溶液を作製した。2 回目の混合は、1 回目の混合液と、混合比 1:1 で、1 mM phen 溶液を混合した。測定には、追跡波長 510 nm、25°Cの条件で行われた。光路長は 1cm に設定した。 $\text{Fe}^{2+}\text{--}(\text{phen})_3$ 濃度の決定には、モル吸光係数 $11100 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を用いた。

3-3. 結果

3.3.1 リン酸非存在下における EcFtnA の鉄酸化反応の Kinetics

EcFtnA の鉄酸化反応は 310nm の吸光度変化によって追跡した。鉄酸化反応は stopped-flow 装置を使用し開始された。アポ EcFtnA に対して、球殻 1 分子あたり 48-480 個の鉄 (48-480 Fe/shell) を添加した場合、図 19 に示すカインेटィクカーブを得た。48-480 Fe/shell において、カインेटィクカーブは、遅延相、数百 ms で反応が完了する速い反応相と、速い反応が終了した後に起こる遅い反応相の少なくとも 3 種類の反応相が確認された。96-480 Fe/shell で確認できる速い反応相について、どの条件においても、この速い反応で得られる 310nm の吸光度はおよそ 0.23 であった。各反応相について、詳細な反応機構を調べるためにシーケンシャルストップフローアッセイを行った。

シーケンスミキシング実験により、サンプル混合後の酸化鉄量の定量を行った。1 回目の混合では、アポ EcFtnA 溶液と硫酸アンモニウム鉄 (II) 溶液を混合し、任意時間 25°C で静置した後、この混合液は 1mM 1,10-phenanthroline (phen) 溶液と混合された。Fe²⁺ は phen と 1:3 の比率で複合体を形成し、この複合体の吸収スペクトルは 510 nm 付近にピークをもつ。510 nm の吸光度をもとに、サンプル中の鉄濃度を定量した。図 20 が示す通り、EcFtnA を含まない場合、複合体形成の反応はおよそ 30 ms 以内に完了した。EcFtnA 存在下では、インキュベーション時間が 100ms 以内では、2 種類の反応相が存在していることが明らかとなった。速い反応相は、EcFtnA と結合していない Fe²⁺ が phen と複合体を形成する反応に由来すると考えられる。一方で、遅い反応相は、EcFtnA に結合した Fe²⁺ が、EcFtnA から解離し、phen と複合体を形成する反応に由来すると考えられる。また、Fe³⁺-phen の複合体は 510 nm にほとんど吸収をもたない為、EcFtnA 非存在下と存在下における比較において、プラトーに達した 20 s 以上の時間域における吸光度の違いは、酸化された鉄濃度として定量される。0-30 ms の時間域から EcFtnA と非結合状態の Fe²⁺、20 s 以上の時間域から EcFtnA と結合状態にある Fe²⁺、EcFtnA 非存在下との吸光度差から Fe³⁺ 濃度を定量した。定量した鉄濃度をタンパク質濃度で規格化し、Fe/shell 比を計算した。計算された Fe/shell 比を、インキュベーション時間に対してプロットした結果、310 nm で追跡したカインेटィクカーブと類似したグラフ概形を示した (図 21)。310 nm でのカインेट

イックカーブと同様に、速度の異なる2種類の反応相を確認することができ、各反応で得られた Fe/shell 比を調べたところ、50 ms、100 ms の時点で、74 Fe/shell であった。この結果は、速い反応相において、フェロキシダーゼ活性サイトの A、B、C に結合した3つの鉄が酸化される反応を示唆している。したがって、遅延相は、フェロキシダーゼ活性サイトに対する Fe^{2+} の結合反応が律速段階となっている為に観測されたと考えられる。EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトには、3つの鉄のみ結合可能である為、遅い反応は Fe^{3+} がフェロキシダーゼ活性サイトから解離した後に、新しい Fe^{2+} が酸化される反応であることが考えられる。

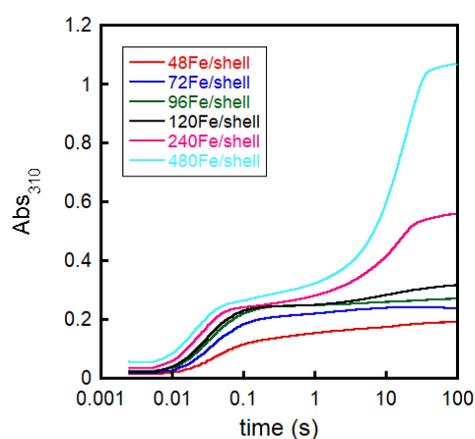


図 19. リン酸非存在下における 310 nm による EcFtnA の鉄酸化反応の追跡.

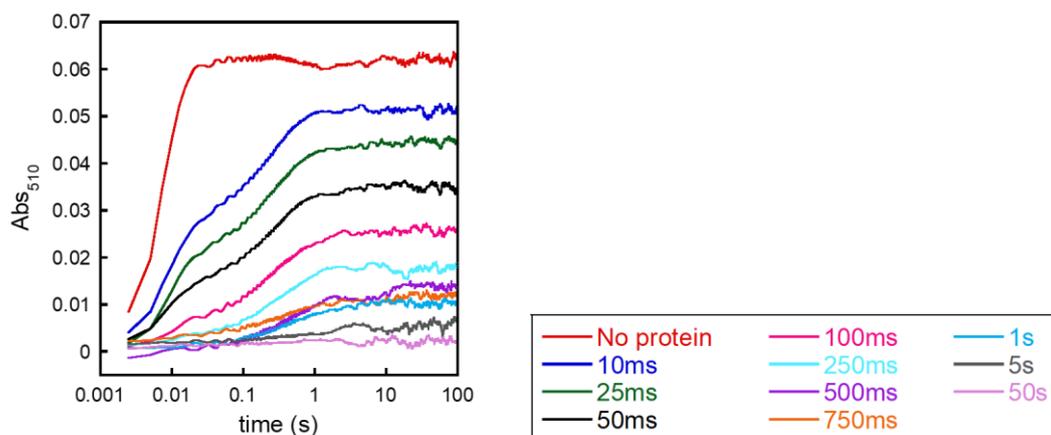


図 20. EcFtnA 存在下における Fe^{2+} - $(\text{phen})_3$ 複合体形成の追跡. 25mM HEPES 緩衝液中 (pH 7) で、 $^{48}\text{Fe}/\text{shell}$ の鉄が添加された。

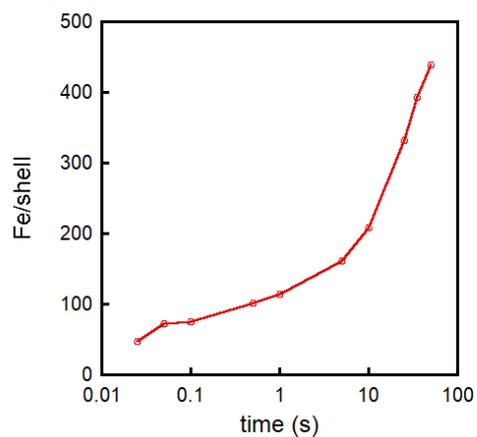


図 21. EcFtnA が生成する反応プロダクト量とインキュベート時間の関係. 25mM HEPES 緩衝液中 (pH 7) で、 $^{48}\text{Fe}/\text{shell}$ の鉄が添加された。

3.3.2 EcFtnA による鉄酸化におけるリン酸の影響

3.3.1 と同様の方法において、追跡波長 310 nm によって、リン酸存在下における EcFtnA のフェロキシダーゼ活性を測定した。リン酸の影響による吸光係数の顕著な違いは確認できなかった。48-480 Fe/shell を添加した場合の、カイネティックカーブを図 22 に示す。リン酸存在下であっても同様に、少なくとも 3 つの反応相を確認することができた。48 Fe/shell について、リン酸存在下と非存在下で比較したところ、顕著な違いは見られなかった (図 23)。一方で、遅い反応については、1 mM および 5 mM のリン酸濃度で、リン酸濃度が増加するにつれて反応が加速していることが確認された。この結果は、アポ EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトによる鉄の酸化過程には、リン酸は影響しないが、EcFtnA のターンオーバーの上昇には関与していることが明らかとなった。

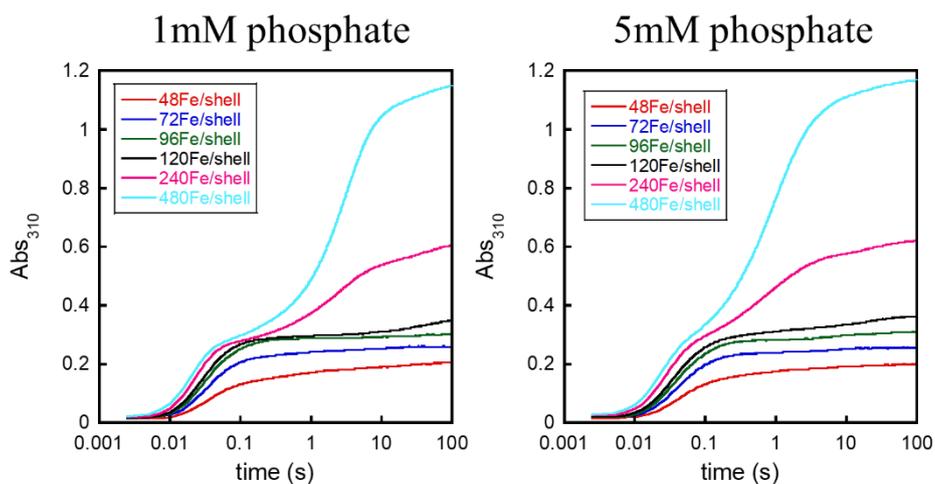


図 22. リン酸存在下における 310 nm による EcFtnA の鉄酸化反応の追跡

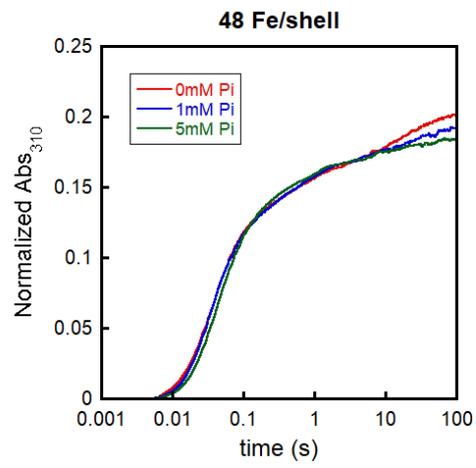
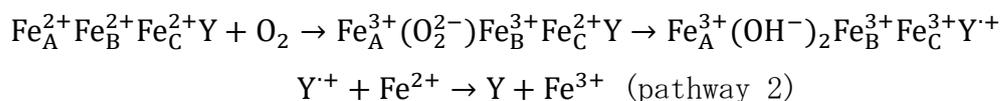
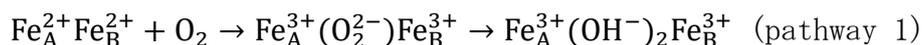


図 23. $^{48}\text{Fe}/\text{shell}$ 添加時のカイネティックカーブとリン酸濃度の関係

3.4. 考察

カイネティクス測定によって、EcFtnAによるフェロキシダーゼ活性を調べた。25 mM HEPES 緩衝液条件下で、48-480Fe/shell を添加した結果、得られたカイネティックカーブは、遅延相、速い反応相、遅い反応相の少なくとも3つの反応相が見られた。シークエンシャルストップフローアッセイの結果、速い反応相は、フェロキシダーゼ活性サイトで3つのFe²⁺が酸化される反応、一方で、遅い反応相は、フェロキシダーゼ活性のターンオーバーで説明可能であることが明らかとなった。速い反応相が、3つのFe²⁺で酸化されることから、EcFtnAのフェロキシダーゼ活性サイトでの反応は、1.4で記述したEquation 3の通りに反応が進行することが期待される。

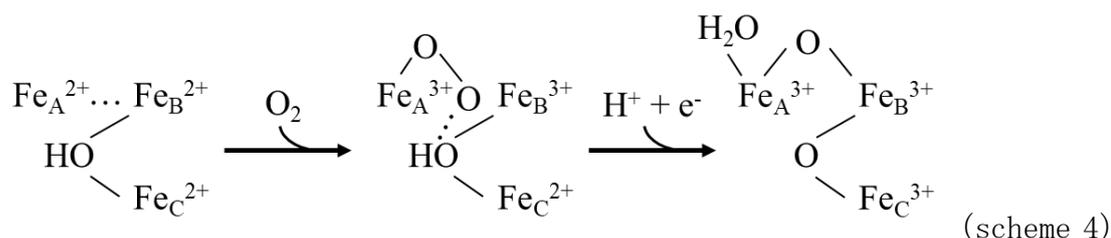
EcFtnAでのフェロキシダーゼ活性サイトでの反応機構として、以下の2つのパスウェイから構成されるモデルを提案している⁵⁶。



F. Bou-Abdalla らは、提案されたモデルに対して、観測されるFe²⁺/O₂は、pathway 1と2の量比によって決定していると考察した⁵⁶。EcFtnAの点変異を用いた実験では、フェロキシダーゼ活性サイトでの反応は、EcFtnAでは、3.2 Fe²⁺/O₂で反応が進行するが、E130A (C サイト)、E126A (C サイト)、E49A (C サイト)では2.2-2.4 Fe²⁺/O₂に減少し、バクテリアルフェリチン特有のCサイトを構成するアミノ酸残基をアラニンに置換するとHuFTH様の反応機構に変化することを示した⁵⁶。この実験結果は、Treffry らが報告しているFe²⁺/O₂と一致している²²。また、すべての生物種のフェロキシダーゼ活性サイトに保存されているY24 (EcFtnA) をフェニルアラニンに置換した変異体Y24Fでも、同様の実験結果が得られることを報告した¹²³。これらの実験結果から、CサイトまたはY24によって進行するpathway 2の存在を示唆した。本研究のシークエンシャルストップフローアッセイは、48-480Fe/shellの条件下で、速い反応相が72 Fe/shell (3 Fe/subunit)の酸化反応であることを示した。この結果は、F. Bou-Abdallah

らが提案した pathway 2 とは矛盾する結果となった。仮に、pathway 2 の反応が正しい場合、シーケンシャルストップトフローアッセイで得られる、速い反応相の反応は、96 Fe/shell (4 Fe/subunit) で進行すると期待され、彼らの過程と本研究での実験結果の間に矛盾が生じる。

Pereira らが DvFtn について、メスバウアースペクトルと EPR が提案するバクテリアルフェリチンのフェロキシダーゼ活性サイトにおける酸化機構は以下のスキームである¹²⁴。



本研究のシーケンシャルストップトフローアッセイの結果から、速い反応相が 72 Fe/shell (3 Fe/subunit) の酸化反応であることを示すため、scheme 4 とは矛盾しない。

彼らは、メスバウアースペクトルから、フェロキシダーゼ活性サイトに結合した鉄の占有状態を計算した結果、 Fe_A^{2+} 、 $\text{Fe}_B^{2+}/\text{Fe}_C^{3+}$ 、 $\text{Fe}_B^{2+}/\text{Fe}_C^{2+}$ 、 $\text{Fe}_A^{2+}/\text{Fe}_B^{2+}/\text{Fe}_C^{2+}$ で、添加した鉄量が増加するに伴って $\text{Fe}_B^{2+}/\text{Fe}_C^{2+}$ 、 $\text{Fe}_A^{2+}/\text{Fe}_B^{2+}/\text{Fe}_C^{2+}$ が増加する傾向が観測された。E130A 変異体では、 $\text{Fe}_B^{2+}/\text{Fe}_C^{2+}$ は観測されず、 $\text{Fe}_A^{2+}/\text{Fe}_B^{2+}$ のみ観測される結果が報告された¹²⁴。DvFtn で $\text{Fe}_A^{2+}/\text{Fe}_B^{2+}$ と $\text{Fe}_B^{2+}/\text{Fe}_C^{2+}$ として帰属されている2つの成分は、Bauminger らの論文で b 状態と e 状態と名付けられ EcFtnA でも観測されている¹²⁰。EcFtnA の E94A (B サイト)、E17A (A サイト)、E50A (A、B サイト)、Y24F (B サイト) は e 状態の割合が増加し、一方で、E130A (B、C サイト)、E49A (C サイト)、E126A (C サイト) では b 状態の割合が増加する。これらの実験結果は、EcFtnA と DvFtn で一致しており、DvFtn で提案された酸化スキームは EcFtnA にも適応可能であることが考えられる。

フェロキシダーゼ活性に関する速度論的な実験について、Treffry らは、E49A、E126A、E130A は野生型よりもフェロキシダーゼ活性が低下することを報告している²²。また、Blue-intermediate の形成・減衰を 600 nm で追跡した場合、E49A、E126A、E130A、E129K/E130A は、600nm の吸光度が顕著に増加したことを報告し

た¹²³。また、 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ 比が 2.4 まで減少する Y24F では、600nm の吸光度変化は野生型と同様の値を示すことを報告した¹²³。ただし、370 nm の吸光度変化は E49A、E126A、E130A、Y24F のすべてで減少する¹²³。Treffry らが行った蛍光消光による Fe^{2+} の結合に関する速度論的解析は、Y24F は結合速度が加速しているが、酸化速度は低下し、E130A は野生型と結合速度に違いは見られない一方で、酸化速度は Y24F と同様に減少した¹²⁵。これらの先行研究から、本研究における EcFtnA の速い反応は 1.4.3 で述べた Tyr ラジカル形成を伴う反応 (Equation 3) であることが考えられる。

ただし、別の実験結果として、鉄酸化反応において過酸化水素の生成することが報告されている⁵⁶。F. Bou-Abdallah らは、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトでの反応で、過酸化水素が生じることを報告しており、上記に示した化学反応 Equation 3 では、過酸化水素は生成されない為、別の反応 pathway が存在すると考えられる。F. Bou-Abdallah らは、考えられる pathway として、哺乳類のような dinuclear center での反応機構 (pathway 2) を示唆した。また、Dps などによって観察される、pathway 2 での反応で生じる過酸化水素と 2 つの Fe^{2+} が反応する反応機構 (Equation 4, 5) によって、4 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ で反応が進行することで、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトでの反応が 3.5 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ の化学量論で進行することを説明することができることを示唆した。この反応について、本研究の速度論的な実験結果から、4 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ の反応速度は少なくとも 3 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ よりも遅いと考えられる。ただし、4.0 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ は、フェロキシダーゼ活性サイトを持たない HuFTL でも進行することが報告されており、ミネラル表層での反応と考えられる。EcFtnA での 4.0 $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2$ で進行する酸化反応が、HuFTL のものと同一かは明らかではなく、より詳細な機構の解明にはさらなる研究が必要であると考えられる。

310 nm で酸化反応を追跡し、リン酸の影響を調べた結果、リン酸存在条件下であっても遅延相、速い反応相、遅い反応相の 3 種類の反応が観測された。リン酸有無による顕著な違いは、リン酸濃度の増加に伴って、遅い反応が加速することが明らかとなった。一方で、リン酸の有無に限らず、速い反応の反応には変化がないことが明らかとなった。この結果は、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトにおける酸化反応にリン酸は影響しないことを示している。また、遅い反応は、フェロキシダーゼ活性のターンオーバーで説明されることから、リン酸はフ

フェロキシダーゼ活性サイトから Fe^{3+} の解離を促進していると考えられる。この結果は、Ebrahimi らの、PfFtn における結果と一致している¹⁰⁶。 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} と $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ との結合定数は、それぞれ $\log K = 8.30$ (25°C 、 $I = 0.5 \text{ M}$)、 $\log K = 3.25$ (25°C 、 $I = 0 \text{ M}$) である¹²⁶。1.4.2 で述べた通り、ITC 測定から EcFtnA の結合定数は、 $K_{a1} = (3.5 \pm 0.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{a2} = (1.8 \pm 0.4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 $n_3 K_{a3} \Delta H_3^\circ = (8.5 \pm 16.1) \times 10^5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ と報告されている⁵⁴。 Fe^{2+} について着目し各結合定数を比較した場合、リン酸よりも EcFtnA の方が高い親和性を持つため、フェロキシダーゼ活性サイトでの酸化反応には影響がないと考えられる。一方で、 Fe^{3+} ではリン酸の方が EcFtnA よりも高い親和性を持つ。 Fe^{3+} と EcFtnA との間の結合定数は、ITC 測定で報告はなされていないが、 $^{57}\text{Fe}^{3+}$ を用いたメスバウアースペクトル測定から、フェロキシダーゼ活性サイトに結合した Fe^{3+} が Fe^{2+} に置き換わることが観測されており¹²⁷、 Fe^{2+} よりも結合定数が低いことを考慮すると、フェロキシダーゼ活性サイトに結合した Fe^{3+} は、リン酸によって容易にフェロキシダーゼ活性サイトから離脱する為、これによってターンオーバーが上昇すると考えられる。

3.5. 結論

EcFtnA のフェロキシダーゼ活性に関して、カイネティック測定・解析を行った。96 Fe/shell 以上の鉄を添加した場合、遅延相、速い反応相、遅い反応相の少なくとも 3 種類の反応が確認された。シーケンシャルストップフローアッセイの結果から、速い反応相は 72 Fe/shell (3 Fe/subunit) の酸化反応であることが明らかとなった。一方で、遅い反応相は、EcFtnA のターンオーバーに由来することが考えられる。

1-5 mM リン酸の条件下で、同様のカイネティック測定を行った結果、速い反応相については変化が見られなかったものの、リン酸濃度の増加に伴って、遅い反応が加速したことが確認された。以上の結果から、リン酸の影響は、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性のターンオーバーを上昇させていることが考えられる。

4. 神経フェリチン症関連変異体 (A96T) の機能解析

4.1. 序論

神経フェリチン症は、フェリチン L 鎖遺伝子 (*FTL1*) の突然変異によって生じる遺伝子疾患である。神経フェリチン症に関連する L 鎖変異体を含むフェリチン分子は、脳内神経細胞やグリア細胞内に過剰な鉄と共に蓄積される⁹²⁻⁹³。*FTL1* 遺伝子は 4 つのエキソン領域と 3 つのイントロン領域から構成され、その内エキソン 4 の領域に変異が生じることで、C 末端領域に 4-16 残基のアミノ酸が伸長したフェリチン L 鎖変異体を生成する⁹² (図 24)。先行研究から、神経フェリチン症に関連する変異は 10 種類報告されており、その内 9 種類はフレームシフト変異体を生成することが明らかとなっている^{92, 95}。フレームシフト変異体の 1 つである p.Phe167SerfsX26 変異体 (以下、FTL498-499InsTC と呼ぶ) の X 線結晶構造解析の結果から、突然変異によって伸長した C 末端領域はディスオーダーしていることが報告されており、FTL498-499InsTC では、4 回転対称軸上で各サブユニットの E ヘリックスが分子間で形成するヘリックスバンドル構造が観測されていない^{97, 100}。野生型と比較して構造安定性は低下しているが、FTL498-499InsTC 変異体は生理的条件下で 24 量体を形成することが明らかとなっている¹⁰⁰。先行研究において、*in vitro* における鉄取り込みアッセイの結果から、これらのフレームシフト変異体の鉄取り込み能は HuFTL 野生型と比較し著しく低下しており、高濃度の鉄イオン存在下で凝集体を形成することが報告されている⁹⁹⁻¹⁰⁰。これらの結果から、細胞内でディスオーダーした C 末端領域が鉄を介して凝集体を形成することによって、凝集体が神経細胞内に沈着し神経フェリチン症が発症するというモデルが提案されている⁹⁹。

神経フェリチン症患者の組織から精製された凝集体には FTH、FTL、FtL498-499InsTC の 3 種類のサブユニットすべてが存在することが報告されている^{100, 128}。先行研究において、H 鎖と野生型または FtL498-499InsTC をはじめとする変異型 L 鎖のいずれかから構成されるフェリチンヘテロポリマーを分析した結果、変異体サブユニットを含むすべてのヘテロポリマーにおいて、鉄取り込み能が著しく低下し、構造安定性も低下していることが示された⁹⁷。これらの結果は、僅かに変異型 L 鎖が 24 量体中に存在するだけで、球殻 1 分子中に存在する 6 つの 4 回転対称軸上のチャンネルのうち 1-2 個の構造・物理化学的な性質を変化さ

せ、鉄取り込み能を低下させるには十分であることを示唆している。また、神経フェリチン症に関連する変異がドミナントネガティブに作用することを明確に示している。

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 変異体が報告されている(図 25)¹²⁹。本研究の山本・岡田は、HuFTL 野生型と A96T 変異体を、大腸菌発現系を用いて過剰発現させ、精製後、各分子の構造的な特徴づけを行った^{137, 138}。その結果、A96T は、生理的条件下で 24 量体にアセンブリし、HuFTL 野生型と同様の立体構造を持つことを示した。しかし、A96T 変異体について機能的な特徴づけは行われておらず、A96T 変異体が他のフレームシフト変異体と同様に鉄取り込み能が低下しているかは明らかとなっていない。本研究では、神経フェリチン症に関連する唯一の点変異体である A96T 変異体を、大腸菌発現系を用いて発現・精製した後、鉄取り込み能を調べることによって、A96T と神経フェリチン症との関連性を明らかにすることを目的とする。

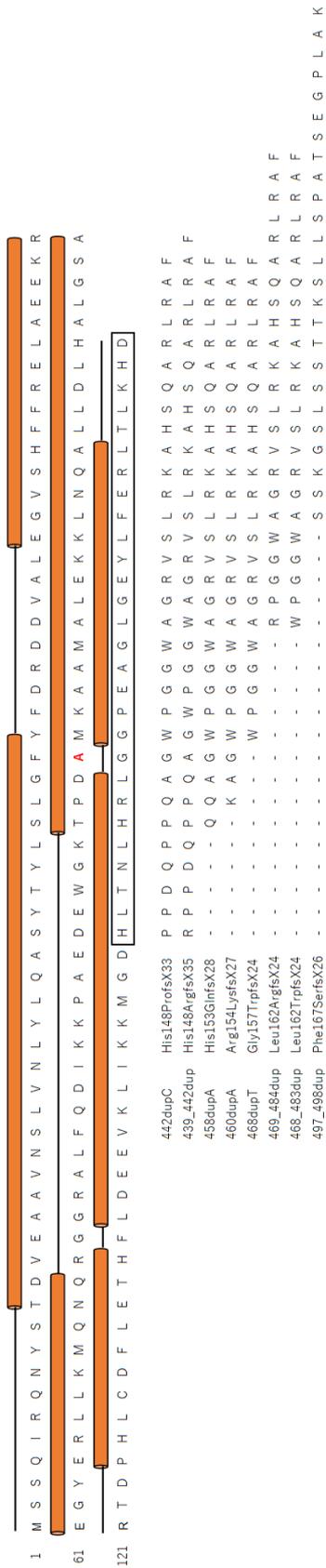


図 24. 神経フェリチン症に関連する変異体とアミノ酸配列アライメント

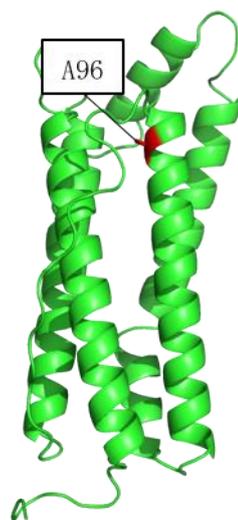


図 25. HuFTL のサブユニット立体構造と A96 の位置について.
PDBID: 2FFX.

4.2.1 HuFTL と A96T の発現・精製

HuFTL 発現プラスミドは、HuFTL をコードする DNA フラグメントを人工合成し、この DNA フラグメントを pET-3c ベクターに挿入し、作製された。HuFTL 発現ベクターを用いて、*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した。この細胞を 37 °C で培養後、OD₆₀₀ が 0.6-0.8 で、0.1 mM IPTG によってタンパク質発現を誘導した。IPTG 添加後、25°C で 20h 培養した。培養した細胞は遠心によって回収され、PBS で懸濁後、超音波破碎法によって処理された。HuFTL は破碎液上清に存在しており、破碎液上清は 65°C、10 分間熱処理された。熱処理溶液を遠心した後、上清に対して終濃度が 50%飽和となるように、硫酸アンモニウムを添加した。形成された沈殿を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で懸濁後、懸濁液は同緩衝液に対して 4 °C、一晚透析された。透析溶液をサンプルに Sephacryl S-300 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる精製を行った後、Q-sepharose 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて、0-350 mM NaCl 溶液の濃度勾配によって溶出された。SDS-PAGE, Native-PAGE によって、HuFTL を含むフラクションを確認し、この溶液に対して終濃度が 5 mM 亜ジチオン酸ナトリウム, 10mM EDTA の条件下で脱鉄処理が行われた。脱鉄処理溶液は、Sephadex G-25 脱塩カラムクロマトグラフィーを用いて、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に交換された。この溶液をサンプルに、Superose 6 increase ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行い、HuFTL を精製した。

A96T 発現プラスミドは、HuFTL 発現ベクターを鋳型に QuikChange site-directed mutagenesis kit を用いて作製された。A96T 発現ベクターを用いて、*E. coli* BL21 (DE3) を形質転換した。この細胞を 37 °C で培養後、OD₆₀₀ が 0.6-0.8 で、0.4 mM IPTG によってタンパク質発現を誘導した。IPTG 添加後 37 °C で一晚培養した。HuFTL と同様に、培養した細胞は超音波破碎法で処理された。A96T は破碎液沈殿に存在しており、1% Triton X-100 で懸濁、遠心による回収を 3 回繰り返した。その後、蒸留水で同様の操作を行った後、10 M 尿素溶液で可溶化した。A96T のリフォールディングは、10 M 尿素による懸濁液を室温中で 100 倍量の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で希釈することで行われた。リフォールディング溶液は遠心後、DEAE-sepharose 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて、0-500 mM NaCl 溶液の濃度勾配によって溶出された。SDS-PAGE,

Native-PAGE によって、A96T を含むフラクションを確認し、Superdex-200 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製した。

4.2.2 鉄取り込みアッセイ

100 mM PIPES 緩衝液 (pH 7.0) 中の精製したアポ HuFTL または A96T 溶液 (1 μ M) と、0-4.5 mM 硫酸アンモニウム鉄(II) 溶液を混合し、混合後 25 °C で 2 h 静置した。混合溶液を遠心し、上清を回収した。鉄取り込み能は、回収した上清の 310 nm の吸光度 (Abs_{310}) と、上清溶液をサンプルに native-PAGE を行い、プルシアンブルー染色によるバンドのバンド強度から定量した。

4.3 結果

4.2.2 に記述した方法に従って、アポ HuFTL および A96T の発現・精製を行った。精製された A96T 変異体は、円二色性スペクトル、AUC、SAXS によって特徴づけられ、生理的条件下で HuFTL 野生型と同様の立体構造を保持することが明らかとなった^{137, 138}。生理的条件下で A96T が野生型と同様の立体構造を保持していることが明らかとなった為、機能面に変化が見られるか確認する為に、鉄取り込み能を調べた。球殻 1 分子に対して 500-4500 個の鉄の化学量比になるように濃度の異なる硫酸アンモニウム鉄溶液の希釈系列を作製した。これらの硫酸アンモニウム鉄溶液とタンパク質溶液の混合後、混合溶液を遠心し、上清の UV/vis スペクトルを測定した。20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、鉄の添加を行った場合、HuFTL 野生型について高い鉄濃度条件下で凝集体が形成された為、100 mM PIPES 緩衝液 (pH 7.0) で測定を行った。その結果、添加した鉄量の増加に伴って、 Abs_{310} が上昇し、 Fe^{2+} 添加量が 2500Fe/shell 以上の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 26)。上記のサンプルについて、native-PAGE を行い、プルシアンブルー染色によって鉄コアの存在に由来するバンドを検出した (図 27)。24 量体に相当する位置にバンドが検出され、バンド強度を Image J で定量した結果、得られたバンド強度は、HuFTL と A96T との間で差は見られなかった (図 28)。これらの結果から、in vitro において、A96T 変異体は野生型と同様の鉄取り込み能を保持しており、フェリチン球殻内部に鉄コアを形成することが可能であることが明らかとなった。

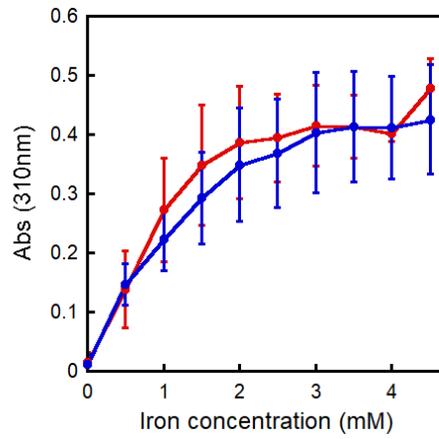


図 26. A_{310} 変化を用いた HuFTL 野生型と A96T の鉄取り込みアッセイ.
(赤)HuFTL. (青)A96T. エラーバーは標準偏差.

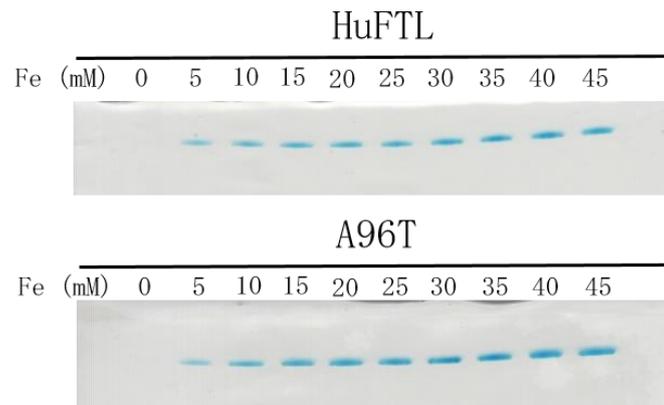


図 27. プルシアンブルー染色による HuFTL と A96T の鉄取り込みアッセイ

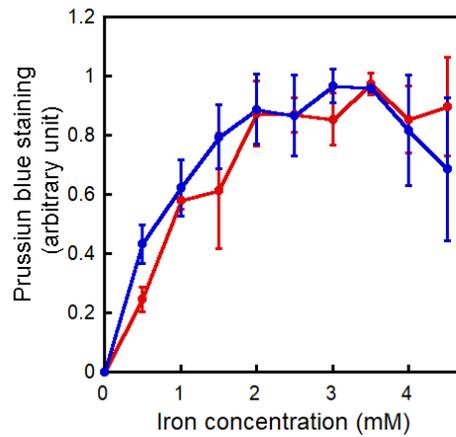


図 28. プルシアンブルー染色でのバンド強度の比較
(赤)HuFTL. (青)A96T. エラーバーは標準偏差.

4.4 考察

各鉄濃度条件における A₃₁₀ とプルシアンブルー染色された native-PAGE のバンド強度の変化について、500-3000Fe/shell の領域では、それぞれの値は上昇した。3500Fe/shell 以上の条件においては、ほとんど変化が見られずプラトーに達しており、これらの結果から、A96T は HuFTL と同等の鉄取り込み能力を持つことが明らかになった。先行研究において、神経フェリチン症に関連するフレームシフト変異体 FTL498-499InsTC は、1 mM 以上の鉄濃度条件(1000Fe/shell) で凝集体を形成することが報告されている。この点において、神経フェリチン症に関連する全ての変異体が、鉄取り込み能が著しく低下し、高い凝集体形成傾向を必ずしも示すわけではないことが明らかとなった。

A96 は C-helix の N 末端付近に位置し、H 鎖を含む哺乳類のフェリチンに保存されている。鉄取り込みアッセイの結果から、A96T は野生型と同等の鉄の取り込み能を保持しており、鉄取り込み能に A96 が必須でないことが示された。したがって、本研究の A96T が野生型と同等の鉄取り込み能を保持しているという結果は、A96T は神経フェリチン症に関連するフレームシフト変異体の結果から提唱されているディスオーダーした C 末端領域と鉄を介した凝集体形成のモデルとは異なる機構で神経フェリチン症を発症することを示唆している。

岡田は、A96T 変異体のリフォールディング効率が野生型と比較して低下していることを報告している。この結果に基づき、岡田は、細胞内で A96T が正しくフォールディングせず、凝集体を形成するために、鉄代謝に変化が生じた結果として、神経フェリチン症が発症するというモデルを提案した¹³⁷。

A96T 変異体に関する病理学的な先行研究について、これまでに免疫組織化学染色や鉄の沈着に対して感度の高い T₂*強調 MRI 画像に関する報告はなされていない。また、Muhoberac と Vidal らは、A96T 変異のキャリアである母親が、無症状であることから、A96T 変異が神経フェリチン症の原因であるか否かという点について指摘している⁹³。この為、A96T が病原性であり、フレームシフト変異体とは異なる機構によって神経フェリチン症が発症するのか、もしくは、単に HuFTL の多型の 1 つでしかないのかは明らかになっていない。したがって、A96T による神経フェリチン症の発症機構の解明には in vivo での更なる研究が必要であると考えられる。

4.5 結論

HuFTL および A96T の鉄取り込み能を A₃₁₀ とプルシアンブルー染色された native-PAGE のバンド強度の変化を用いて定量した。A₃₁₀ とプルシアンブルー染色された native-PAGE のバンド強度は HuFTL と A96T で差は見られず、A96T は HuFTL と同等の鉄取り込み能を保持することが明らかとなった。この結果は、A96T による神経フェリチン症の発症の発症機構が、先行研究で提案されているフレームシフト変異体の鉄取り込み能の低下と凝集体形成による発症機構とは異なる可能性があることを示唆している。

5. 総論

5.1. 鉄コア構造の形態学とリン酸が鉄コア構造に及ぼす影響について

本研究は、SAXS、TEM、AUC の実験手法を組み合わせることによって、リン酸が鉄コア構造に及ぼす影響を調べた。先行研究では、Silva らは、ウシ肝臓フェリチンやラット肝臓フェリチンで、リン酸が鉄コア形成や球殻内部からの鉄の放出に影響を及ぼすことを示唆した⁷⁵。Parida らは、Mtb BfrB の鉄コア構造に及ぼすリン酸の影響を調べている¹⁰⁷。Reutovich らは、HuFTH と HuFTL のヘテロポリマーが形成する鉄コア構造にリン酸が及ぼす影響を調べた¹³⁰。

本研究では、EcFtnA について SAXS、TEM、AUC を相補的に用いて、鉄コア構造を解析し、リン酸が鉄コア構造に及ぼす影響を調べた。TEM による観察と AUC 測定から計算される $c(s)$ 分布関数から、リン酸非存在下では、EcFtnA 内腔に直径 2-4 nm のサブ粒子が複数形成される一方で、リン酸存在下では、直径 8 nm の概ね均一な鉄コア粒子が観測された。一方で、SAXS 測定では、観測された R_g の値から、リン酸存在下で形成された鉄コア粒子が内径 6 nm 程の球殻構造であることを明らかにした。

鉄コア構造を調べる際に、TEM は簡便かつ強力な手法である。近年は、HAADF-STEM によって、鉄コア細部の構造を鮮明に観察することが可能になった。HAADF-STEM は高角に散乱した電子線を用いるため、小角側に EDX や EELS を設置することで、同時に元素分析も可能である。この為、リン酸を含む鉄コアの観察で、鉄コア内での Fe やリン酸の分布などを測定可能であることが期待される。一方で、TEM は、細部まで鮮明に観察することは可能であるが、溶液中での分子全体のふるまい（巨視的な特徴）を調べることには不向きな手法である。TEM 画像から統計データを計算することも可能であるが、例えば HAADF-STEM ではアポフェリチンはコントラストが弱く観測出来ない点など完全ではない。本研究では TEM 以外にも AUC や SAXS を用いて鉄コア構造の特徴づけを行った点が、先行研究と異なるユニークな点である。HoSF について、SAXS、SANS を用いた実験や AUC を用いた実験は報告されているが、先行研究では、ホロフェリチン作製の際に生じるフェリチン球殻外部に形成された酸化鉄やタンパク質の凝集体を除去していない為、データの解釈が困難となっていた^{114, 131}。本研究では、調製したホロ EcFtnA 溶液について、ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製し、SAXS、TEM、AUC 測

定を行った。これらの手法の相補的な利用は、ホロ EcFtnA に限らず、他の生物種のフェリチンの鉄コア構造の解明にも適用できると考える。また、フェリチンの内腔には、半導体材料などに利用可能な鉄以外の金属ナノ粒子も形成される。したがって、フェリチンの内腔に形成された鉄以外の金属ナノ粒子の構造解析にも、本研究で用いた実験手法は応用可能であると期待される¹³²⁻¹³⁵。

5.2. バクテリアルフェリチンのフェロキシダーゼ活性サイトにおける酸化反応とリン酸が生理学的な機能に及ぼす影響について

ここで、“バクテリアルフェリチンと哺乳類フェリチン H 鎖におけるフェロキシダーゼ活性サイトでの反応機構の差は、どのような進化学な背景に由来するのか？”について考える。構造生物学的な違いとして、バクテリアルフェリチンのフェロキシダーゼ活性サイトに特有に見られる C サイトが挙げられる。C サイトの詳細な機能は明らかではないが、Treffry らが行った変異体を用いた実験は、E49A、E126A、E130A は、反応機構が HuFTH 様に変化し、ターンオーバーが上昇することを報告した²²。また、これらの変異体の酸化速度は野生型と比較して低下していることも報告している¹²³。

本研究で、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性に関してストップフロー装置を用いた速度論的解析を行ったところ、48-480Fe/shell の鉄を添加した結果、遅延相、速い反応相、遅い反応相の少なくとも 3 つの反応が確認され、速い反応相は 3 つの Fe^{2+} の酸化反応、遅い反応相はフェロキシダーゼ活性サイトのターンオーバーであることが明らかとなった。この結果から、リン酸存在下で反応が進行する条件下ではリン酸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するため、C サイトを取り除くことで、酸化速度を遅くする代わりにターンオーバーを上昇させるという方向に選択圧がかかる可能性は低いと考えられる。

一方で、哺乳類の場合、細胞内のリン酸濃度が同等であるにも関わらず、フェリチン内腔に形成される鉄コアにリン酸を含まない理由は不明である。試験管内で、リン酸存在条件下で、ウシ肝臓フェリチンの内腔に形成される鉄コア中に含まれる P_i と Fe の比は、 $\text{P}_i : \text{Fe} = 1 : 2-4$ であることが報告されている⁷⁵。この為、生体内で哺乳類由来のフェリチン内腔に形成される鉄コアのリン酸含有量は低いが、in vitro で、生体由来よりも高いリン酸含有量の鉄コアを形成す

ることが可能である。本研究では、20mM リン酸緩衝液中で、HuFTL の鉄取り込み実験を行った際に、沈殿が生じた。同様の結果が、リコンビナント HoSF L 鎖ホモオリゴマーや HuFTL ホモオリゴマーで観測されている^{71, 136}。鉄の添加によって凝集体を形成することから、リン酸がフェロキシダーゼ活性を持たない L 鎖の鉄取り込みを阻害するような影響を保持していることが示唆されている。フェロキシダーゼ活性をもつ場合、早急に Fe³⁺に酸化され、フェリチン内腔に鉄コアとして堆積する為、球殻外部での鉄酸化による凝集体形成を抑制することができると考えられる。一方で、L 鎖の場合は、フェロキシダーゼ活性が欠損しており、溶存酸素による自動酸化によって緩やかに鉄コアの形成が進行する為、リン酸存在下においては、フェリチン球殻外部で形成される Fe-PO₄ 複合体の存在量が H 鎖の場合よりも増加し、結果として凝集体が形成しやすいと考えられる。

哺乳類フェリチンの場合は、機能の異なる 2 種類のフェリチンサブユニットのヘテロオリゴマーである一方で、バクテリアルフェリチンは H 鎖型のサブユニットのホモオリゴマーである。哺乳類フェリチンの場合、鉄コア形成の核形成サイトを持つ L 鎖サブユニットが存在している為、哺乳類フェリチンの H 鎖サブユニットは“鉄の貯蔵”よりも、酸化的ストレスを効率的に排除するように進化したと考えられる。また、金属シャペロンとして PCBP などが存在している為、一時的に Fe²⁺が金属シャペロンと結合し、フェントン反応を防いでいる可能性も考えられる。バクテリアの場合、バクテリアルフェリチンだけではなく、バクテリオフェリチンも存在している。単細胞系のバクテリアなどは、Fe によって誘起される酸化的ストレスは致命的であり、これに起因する選択圧がかかることが期待されるが、酸化的ストレスに応答して発現が誘導されるのは EcBfr であり、EcFtnA は RNaseIII で制御されている。EcBfr と EcFtnA の C サイトを比較した場合、EcBfr の C サイトを構成するアミノ酸残基は少し異なる為、酸化的なストレスは EcBfr に対して選択圧がかかっている可能性が考えられる。したがって、バクテリアルフェリチンが少ない酸素量でより多くの鉄を速く酸化し、貯蔵する為には、リン酸と C サイトの存在が重要となっていると考えられるが、その役割を解明する為には更なる研究が必要である。結論として、鉄コア中のリン酸は鉄コアの形成過程の単なる副産物ではなく、フェリチンによる鉄酸化・ミネラル化に影響を及ぼし、鉄代謝に重要な役割を担っていると考えられる。

6. 参考文献

1. Koppenol, W. H.; Hider, R. H., Iron and redox cycling. Do's and don'ts. *Free Radic Biol Med* **2019**, *133*, 3-10.
2. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **1984**, *219* (1), 1-14.
3. Andrews, S. C., Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol* **1998**, *40*, 281-351.
4. Banerjee, S.; Chanakira, M. N.; Hall, J.; Kerkan, A.; Dasgupta, S.; Martin, D. W., A review on bacterial redox dependent iron transporters and their evolutionary relationship. *J Inorg Biochem* **2022**, *229*, 111721.
5. Li, L.; Fang, C. J.; Ryan, J. C.; Niemi, E. C.; Lebron, J. A.; Bjorkman, P. J.; Arase, H.; Torti, F. M.; Torti, S. V.; Nakamura, M. C.; Seaman, W. E., Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (8), 3505-10.
6. Gammella, E.; Buratti, P.; Cairo, G.; Recalcati, S., The transferrin receptor: the cellular iron gate. *Metallomics* **2017**, *9* (10), 1367-1375.
7. Litwin, C. M.; Calderwood, S. B., Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **1993**, *6* (2), 137-49.
8. Harrison, P. M.; Arosio, P., The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1275* (3), 161-203.
9. Crichton, R. R.; Declercq, J. P., X-ray structures of ferritins and related proteins. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1800* (8), 706-18.
10. Stillman, T. J.; Hempstead, P. D.; Artymiuk, P. J.; Andrews, S. C.; Hudson, A. J.; Treffry, A.; Guest, J. R.; Harrison, P. M., 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* **2001**, *307* (2), 587-603.
11. Fischbach, F. A.; Anderegg, J. W., An x-ray scattering study of ferritin and apoferritin. *J Mol Biol* **1965**, *14* (2), 458-73.
12. Haggis, G. H., The iron oxide core of the ferritin molecule. *J Mol Biol* **1965**, *14* (2), 598-602.
13. Mehlenbacher, M.; Poli, M.; Arosio, P.; Santambrogio, P.; Levi, S.; Chasteen, N. D.; Bou-Abdallah, F., Iron Oxidation and Core Formation in Recombinant Heteropolymeric Human Ferritins. *Biochemistry* **2017**, *56* (30), 3900-3912.
14. Rucker, P.; Torti, F. M.; Torti, S. V., Recombinant ferritin: modulation of subunit stoichiometry in bacterial expression systems. *Protein Eng* **1997**, *10* (8), 967-73.
15. Theil, E. C., Ferritin protein nanocages-the story. *Nanotechnol Percept* **2012**, *8* (1), 7-16.
16. Pozzi, C.; Di Pisa, F.; Lalli, D.; Rosa, C.; Theil, E.; Turano, P.; Mangani, S., 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* **2015**, *71* (Pt 4), 941-53.

17. Briat, J. F.; Duc, C.; Ravet, K.; Gaymard, F., Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1800* (8), 806-14.
18. Masuda, T.; Goto, F.; Yoshihara, T.; Mikami, B., 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* **2010**, *285* (6), 4049-4059.
19. Masuda, T.; Morimoto, S.; Mikami, B.; Toyohara, H., The extension peptide of plant ferritin from sea lettuce contributes to shell stability and surface hydrophobicity. *Protein Sci* **2012**, *21* (6), 786-96.
20. Lescure, A. M.; Proudhon, D.; Pesey, H.; Ragland, M.; Theil, E. C.; Briat, J. F., Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88* (18), 8222-6.
21. Andrews, S. C., The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1800* (8), 691-705.
22. Treffry, A.; Zhao, Z.; Quail, M. A.; Guest, J. R.; Harrison, P. M., How the presence of three iron binding sites affects the iron storage function of the ferritin (EcFtnA) of Escherichia coli. *FEBS Lett* **1998**, *432* (3), 213-8.
23. Le Vay, K.; Carter, B. M.; Watkins, D. W.; Dora Tang, T. Y.; Ting, V. P.; Colfen, H.; Rambo, R. P.; Smith, A. J.; Ross Anderson, J. L.; Perriman, A. W., Controlling Protein Nanocage Assembly with Hydrostatic Pressure. *J Am Chem Soc* **2020**, *142* (49), 20640-20650.
24. Andrews, S. C.; Smith, J. M.; Hawkins, C.; Williams, J. M.; Harrison, P. M.; Guest, J. R., Overproduction, purification and characterization of the bacterioferritin of Escherichia coli and a C-terminally extended variant. *Eur J Biochem* **1993**, *213* (1), 329-38.
25. Kilic, M. A.; Spiro, S.; Moore, G. R., Stability of a 24-meric homopolymer: comparative studies of assembly-defective mutants of Rhodobacter capsulatus bacterioferritin and the native protein. *Protein Sci* **2003**, *12* (8), 1663-74.
26. Dautant, A.; Meyer, J. B.; Yariv, J.; Precigoux, G.; Sweet, R. M.; Kalb, A. J.; Frolow, F., Structure of a monoclinic crystal from of cytochrome b1 (Bacterioferritin) from E. coli. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1998**, *54* (Pt 1), 16-24.
27. Bradley, J. M.; Svistunenko, D. A.; Lawson, T. L.; Hemmings, A. M.; Moore, G. R.; Le Brun, N. E., Three Aromatic Residues are Required for Electron Transfer during Iron Mineralization in Bacterioferritin. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54* (49), 14763-7.
28. Crow, A.; Lawson, T. L.; Lewin, A.; Moore, G. R.; Le Brun, N. E., Structural basis for iron mineralization by bacterioferritin. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (19), 6808-13.
29. Andrews, S. C.; Smith, J. M.; Yewdall, S. J.; Guest, J. R.; Harrison, P. M., Bacterioferritins

and ferritins are distantly related in evolution. Conservation of ferroxidase-centre residues. *FEBS Lett* **1991**, *293* (1-2), 164-8.

30. Yang, X.; Le Brun, N. E.; Thomson, A. J.; Moore, G. R.; Chasteen, N. D., The iron oxidation and hydrolysis chemistry of Escherichia coli bacterioferritin. *Biochemistry* **2000**, *39*(16), 4915-23.

31. Calhoun, L. N.; Kwon, Y. M., Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in Escherichia coli: a review. *J Appl Microbiol* **2011**, *110* (2), 375-86.

32. Andrews, S. C.; Robinson, A. K.; Rodriguez-Quinones, F., Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **2003**, *27* (2-3), 215-37.

33. Haikarainen, T.; Papageorgiou, A. C., Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. *Cell Mol Life Sci* **2010**, *67* (3), 341-51.

34. Chiancone, E.; Ceci, P., The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1800* (8), 798-805.

35. Ilari, A.; Stefanini, S.; Chiancone, E.; Tsernoglou, D., The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site. *Nat Struct Biol* **2000**, *7* (1), 38-43.

36. Izuhara, M.; Takamune, K.; Takata, R., Cloning and sequencing of an Escherichia coli K12 gene which encodes a polypeptide having similarity to the human ferritin H subunit. *Mol Gen Genet* **1991**, *225* (3), 510-3.

37. Hudson, A. J.; Andrews, S. C.; Hawkins, C.; Williams, J. M.; Izuhara, M.; Meldrum, F. C.; Mann, S.; Harrison, P. M.; Guest, J. R., Overproduction, purification and characterization of the Escherichia coli ferritin. *Eur J Biochem* **1993**, *218* (3), 985-95.

38. Touati, D.; Jacques, M.; Tardat, B.; Bouchard, L.; Despied, S., Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of Escherichia coli: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* **1995**, *177* (9), 2305-14.

39. Wai, S. N.; Nakayama, K.; Umene, K.; Moriya, T.; Amako, K., Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol Microbiol* **1996**, *20* (6), 1127-34.

40. Levi, S.; Santambrogio, P.; Corsi, B.; Cozzi, A.; Arosio, P., Evidence that residues exposed on the three-fold channels have active roles in the mechanism of ferritin iron incorporation. *Biochem J* **1996**, *317* (Pt 2), 467-73.

41. Takahashi, T.; Kuyucak, S., Functional properties of threefold and fourfold channels in ferritin deduced from electrostatic calculations. *Biophys J* **2003**, *84* (4), 2256-63.

42. Chandramouli, B.; Bernacchioni, C.; Di Maio, D.; Turano, P.; Brancato, G., Electrostatic

and Structural Bases of Fe²⁺ Translocation through Ferritin Channels. *J Biol Chem* **2016**, *291* (49), 25617-25628.

43. Laghaei, R.; Kowallis, W.; Evans, D. G.; Coalson, R. D., Calculation of iron transport through human H-chain ferritin. *J Phys Chem A* **2014**, *118* (35), 7442-53.
44. Tosha, T.; Ng, H. L.; Bhattasali, O.; Alber, T.; Theil, E. C., Moving metal ions through ferritin-protein nanocages from three-fold pores to catalytic sites. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (41), 14562-9.
45. Toussaint, L.; Bertrand, L.; Hue, L.; Crichton, R. R.; Declercq, J. P., High-resolution X-ray structures of human apoferritin H-chain mutants correlated with their activity and metal-binding sites. *J Mol Biol* **2007**, *365* (2), 440-52.
46. Shi, H.; Bencze, K. Z.; Stemmler, T. L.; Philpott, C. C., A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* **2008**, *320* (5880), 1207-10.
47. Leidgens, S.; Bullough, K. Z.; Shi, H.; Li, F.; Shakoury-Elizeh, M.; Yabe, T.; Subramanian, P.; Hsu, E.; Natarajan, N.; Nandal, A.; Stemmler, T. L.; Philpott, C. C., Each member of the poly-r(C)-binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *J Biol Chem* **2013**, *288* (24), 17791-802.
48. Ohtomo, H.; Ohtomo, M.; Sato, D.; Kurobe, A.; Sunato, A.; Matsumura, Y.; Kihara, H.; Fujiwara, K.; Ikeguchi, M., A Physicochemical and Mutational Analysis of Intersubunit Interactions of Escherichia coli Ferritin A. *Biochemistry* **2015**, *54* (40), 6243-51.
49. Wong, S. G.; Grigg, J. C.; Le Brun, N. E.; Moore, G. R.; Murphy, M. E.; Mauk, A. G., The B-type channel is a major route for iron entry into the ferroxidase center and central cavity of bacterioferritin. *J Biol Chem* **2015**, *290* (6), 3732-9.
50. Bradley, J. M.; Moore, G. R.; Le Brun, N. E., Diversity of Fe(2+) entry and oxidation in ferritins. *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *37*, 122-128.
51. Rui, H.; Rivera, M.; Im, W., Protein dynamics and ion traffic in bacterioferritin. *Biochemistry* **2012**, *51* (49), 9900-10.
52. Hempstead, P. D.; Yewdall, S. J.; Fernie, A. R.; Lawson, D. M.; Artymiuk, P. J.; Rice, D. W.; Ford, G. C.; Harrison, P. M., Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J Mol Biol* **1997**, *268* (2), 424-48.
53. Honarmand Ebrahimi, K.; Bill, E.; Hagedoorn, P. L.; Hagen, W. R., The catalytic center of ferritin regulates iron storage via Fe(II)-Fe(III) displacement. *Nat Chem Biol* **2012**, *8* (11), 941-8.
54. Bou-Abdallah, F.; Woodhall, M. R.; Velazquez-Campoy, A.; Andrews, S. C.; Chasteen, N. D., Thermodynamic analysis of ferrous ion binding to Escherichia coli ferritin EcFtnA. *Biochemistry* **2005**, *44* (42), 13837-46.
55. Honarmand Ebrahimi, K.; Hagedoorn, P. L.; Jongejan, J. A.; Hagen, W. R., Catalysis of

- iron core formation in *Pyrococcus furiosus* ferritin. *J Biol Inorg Chem* **2009**, *14* (8), 1265-74.
56. Bou-Abdallah, F.; Yang, H.; Awomolo, A.; Cooper, B.; Woodhall, M. R.; Andrews, S. C.; Chasteen, N. D., Functionality of the three-site ferroxidase center of *Escherichia coli* bacterial ferritin (EcFtnA). *Biochemistry* **2014**, *53* (3), 483-95.
57. Zhao, G.; Bou-Abdallah, F.; Arosio, P.; Levi, S.; Janus-Chandler, C.; Chasteen, N. D., Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide. *Biochemistry* **2003**, *42* (10), 3142-50.
58. Yang, X.; Chen-Barrett, Y.; Arosio, P.; Chasteen, N. D., Reaction paths of iron oxidation and hydrolysis in horse spleen and recombinant human ferritins. *Biochemistry* **1998**, *37* (27), 9743-50.
59. Bou-Abdallah, F.; Biasiotto, G.; Arosio, P.; Chasteen, N. D., The putative "nucleation site" in human H-chain ferritin is not required for mineralization of the iron core. *Biochemistry* **2004**, *43* (14), 4332-7.
60. Honarmand Ebrahimi, K.; Hagedoorn, P. L.; Hagen, W. R., Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. *Chem Rev* **2015**, *115* (1), 295-326.
61. Pereira, A. S.; Small, W.; Krebs, C.; Tavares, P.; Edmondson, D. E.; Theil, E. C.; Huynh, B. H., Direct spectroscopic and kinetic evidence for the involvement of a peroxodiferric intermediate during the ferroxidase reaction in fast ferritin mineralization. *Biochemistry* **1998**, *37* (28), 9871-6.
62. Moenne-Loccoz, P.; Krebs, C.; Herlihy, K.; Edmondson, D. E.; Theil, E. C.; Huynh, B. H.; Loehr, T. M., The ferroxidase reaction of ferritin reveals a diferric μ -1,2 bridging peroxide intermediate in common with other O₂-activating non-heme diiron proteins. *Biochemistry* **1999**, *38* (17), 5290-5.
63. Galvez, N.; Fernandez, B.; Sanchez, P.; Cuesta, R.; Ceolin, M.; Clemente-Leon, M.; Trasobares, S.; Lopez-Haro, M.; Calvino, J. J.; Stephan, O.; Dominguez-Vera, J. M., Comparative structural and chemical studies of ferritin cores with gradual removal of their iron contents. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (25), 8062-8.
64. Chasteen, N. D.; Harrison, P. M., Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol* **1999**, *126* (3), 182-94.
65. Treffry, A.; Harrison, P. M.; Cleton, M. I.; de Bruijn, W. C.; Mann, S., A note on the composition and properties of ferritin iron cores. *J Inorg Biochem* **1987**, *31* (1), 1-6.
66. Rohrer, J. S.; Islam, Q. T.; Watt, G. D.; Sayers, D. E.; Theil, E. C., Iron environment in ferritin with large amounts of phosphate, from *Azotobacter vinelandii* and horse spleen, analyzed using extended X-ray absorption fine structure (EXAFS). *Biochemistry* **1990**, *29* (1), 259-64.
67. Wade, V. J.; Treffry, A.; Lauthere, J. P.; Bauminger, E. R.; Cleton, M. I.; Mann, S.; Briat, J. F.; Harrison, P. M., Structure and composition of ferritin cores from pea seed (*Pisum sativum*).

Biochim Biophys Acta **1993**, *1161* (1), 91-6.

68. Arosio, P.; Ingrassia, R.; Cavadini, P., Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1790* (7), 589-99.

69. Gasser, B. I., Determination of Serum Ferritin Glycosylation in Hyperferritinemia Associated to Iron Overload and Inflammation. *EJIFCC* **2009**, *20* (2), 136-40.

70. Cohen, L. A.; Gutierrez, L.; Weiss, A.; Leichtmann-Bardoogo, Y.; Zhang, D. L.; Crooks, D. R.; Sougrat, R.; Morgenstern, A.; Galy, B.; Hentze, M. W.; Lazaro, F. J.; Rouault, T. A.; Meyron-Holtz, E. G., Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood* **2010**, *116* (9), 1574-84.

71. Hilton, R. J.; David Andros, N.; Watt, R. K., The ferroxidase center is essential for ferritin iron loading in the presence of phosphate and minimizes side reactions that form Fe(III)-phosphate colloids. *Biometals* **2012**, *25* (2), 259-73.

72. Bauminger, E. R.; Harrison, P. M.; Hechel, D.; Hodson, N. W.; Nowik, I.; Treffry, A.; Yewdall, S. J., Iron (II) oxidation and early intermediates of iron-core formation in recombinant human H-chain ferritin. *Biochem J* **1993**, *296* (Pt 3) (Pt 3), 709-19.

73. Levi, S.; Luzzago, A.; Cesareni, G.; Cozzi, A.; Franceschinelli, F.; Albertini, A.; Arosio, P., Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferroxidase site. A study of iron uptake and ferroxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J Biol Chem* **1988**, *263* (34), 18086-92.

74. Ciambellotti, S.; Pozzi, C.; Mangani, S.; Turano, P., Iron Biomineral Growth from the Initial Nucleation Seed in L-Ferritin. *Chemistry* **2020**, *26* (26), 5770-5773.

75. de Silva, D.; Guo, J. H.; Aust, S. D., Relationship between iron and phosphate in mammalian ferritins. *Arch Biochem Biophys* **1993**, *303* (2), 451-5.

76. Cassanelli, S.; Moulis, J., Sulfide is an efficient iron releasing agent for mammalian ferritins. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1547* (1), 174-82.

77. Rousseau, I.; Puntarulo, S., Ferritin-dependent radical generation in rat liver homogenates. *Toxicology* **2009**, *264* (3), 155-61.

78. Liu, Y.; Hu, N., Electrochemical detection of natural DNA damage induced by ferritin/ascorbic acid/H₂O₂ system and amplification of DNA damage by endonuclease Fpg. *Biosens Bioelectron* **2009**, *25* (1), 185-90.

79. Kang, J. H., Ferritin enhances salsolinol-mediated DNA strand breakage: protection by carnosine and related compounds. *Toxicol Lett* **2009**, *188* (1), 20-5.

80. Kaur, D.; Rajagopalan, S.; Andersen, J. K., Chronic expression of H-ferritin in dopaminergic midbrain neurons results in an age-related expansion of the labile iron pool and subsequent neurodegeneration: implications for Parkinson's disease. *Brain Res* **2009**, *1297*, 17-22.

81. Kaur, D.; Rajagopalan, S.; Chinta, S.; Kumar, J.; Di Monte, D.; Cherny, R. A.; Andersen,

- J. K., Chronic ferritin expression within murine dopaminergic midbrain neurons results in a progressive age-related neurodegeneration. *Brain Res* **2007**, *1140*, 188-94.
82. Anderson, C. P.; Shen, M.; Eisenstein, R. S.; Leibold, E. A., Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1823* (9), 1468-83.
83. Mancias, J. D.; Pontano Vaites, L.; Nissim, S.; Biancur, D. E.; Kim, A. J.; Wang, X.; Liu, Y.; Goessling, W.; Kimmelman, A. C.; Harper, J. W., Ferritinophagy via NCOA4 is required for erythropoiesis and is regulated by iron dependent HERC2-mediated proteolysis. *Elife* **2015**, *4*.
84. La, A.; Nguyen, T.; Tran, K.; Sauble, E.; Tu, D.; Gonzalez, A.; Kidane, T. Z.; Soriano, C.; Morgan, J.; Doan, M.; Tran, K.; Wang, C. Y.; Knutson, M. D.; Linder, M. C., Mobilization of iron from ferritin: new steps and details. *Metallomics* **2018**, *10* (1), 154-168.
85. Cozzi, A.; Corsi, B.; Levi, S.; Santambrogio, P.; Albertini, A.; Arosio, P., Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem* **2000**, *275* (33), 25122-9.
86. Cozzi, A.; Corsi, B.; Levi, S.; Santambrogio, P.; Biasiotto, G.; Arosio, P., Analysis of the biologic functions of H- and L-ferritins in HeLa cells by transfection with siRNAs and cDNAs: evidence for a proliferative role of L-ferritin. *Blood* **2004**, *103* (6), 2377-83.
87. Gryzik, M.; Asperti, M.; Denardo, A.; Arosio, P.; Poli, M., NCOA4-mediated ferritinophagy promotes ferroptosis induced by erastin, but not by RSL3 in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2021**, *1868* (2), 118913.
88. Fang, Y.; Chen, X.; Tan, Q.; Zhou, H.; Xu, J.; Gu, Q., Inhibiting Ferroptosis through Disrupting the NCOA4-FTH1 Interaction: A New Mechanism of Action. *ACS Cent Sci* **2021**, *7* (6), 980-989.
89. Muhoberac, B. B.; Vidal, R., Iron, Ferritin, Hereditary Ferritinopathy, and Neurodegeneration. *Front Neurosci* **2019**, *13*, 1195.
90. Weiland, A.; Wang, Y.; Wu, W.; Lan, X.; Han, X.; Li, Q.; Wang, J., Ferroptosis and Its Role in Diverse Brain Diseases. *Mol Neurobiol* **2019**, *56* (7), 4880-4893.
91. Yan, H. F.; Zou, T.; Tuo, Q. Z.; Xu, S.; Li, H.; Belaidi, A. A.; Lei, P., Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, *6* (1), 49.
92. Levi, S.; Rovida, E., Neuroferritinopathy: From ferritin structure modification to pathogenetic mechanism. *Neurobiol Dis* **2015**, *81*, 134-43.
93. Muhoberac, B. B.; Vidal, R., Abnormal iron homeostasis and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* **2013**, *5*, 32.
94. McNeill, A.; Birchall, D.; Hayflick, S. J.; Gregory, A.; Schenk, J. F.; Zimmerman, E. A.; Shang, H.; Miyajima, H.; Chinnery, P. F., T2* and FSE MRI distinguishes four subtypes of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Neurology* **2008**, *70* (18), 1614-9.
95. Ni, W.; Li, H. F.; Zheng, Y. C.; Wu, Z. Y., FTL mutation in a Chinese pedigree with

- neuroferritinopathy. *Neurol Genet* **2016**, *2*(3), e74.
96. 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.; Burn, J., Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet* **2001**, *28*(4), 350-4.
97. Luscieti, S.; Santambrogio, P.; Langlois d'Estaintot, B.; Granier, T.; Cozzi, A.; Poli, M.; Gallois, B.; Finazzi, D.; Cattaneo, A.; Levi, S.; Arosio, P., Mutant ferritin L-chains that cause neurodegeneration act in a dominant-negative manner to reduce ferritin iron incorporation. *J Biol Chem* **2010**, *285*(16), 11948-57.
98. Cozzi, A.; Santambrogio, P.; Corsi, B.; Campanella, A.; Arosio, P.; Levi, S., Characterization of the l-ferritin variant 460InsA responsible of a hereditary ferritinopathy disorder. *Neurobiol Dis* **2006**, *23*(3), 644-52.
99. Baraibar, M. A.; Barbeito, A. G.; Muhoberac, B. B.; Vidal, R., Iron-mediated aggregation and a localized structural change characterize ferritin from a mutant light chain polypeptide that causes neurodegeneration. *J Biol Chem* **2008**, *283*(46), 31679-89.
100. Baraibar, M. A.; Muhoberac, 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* **2010**, *285*(3), 1950-6.
101. Cozzi, A.; Rovelli, E.; Frizzale, G.; Campanella, A.; Amendola, M.; Arosio, P.; Levi, S., Oxidative stress and cell death in cells expressing L-ferritin variants causing neuroferritinopathy. *Neurobiol Dis* **2010**, *37*(1), 77-85.
102. Celma Nos, F.; Hernandez, G.; Ferrer-Cortes, X.; Hernandez-Rodriguez, I.; Navarro-Almenzar, B.; Fuster, J. L.; Bermudez Cortes, M.; Perez-Montero, S.; Tornador, C.; Sanchez, M., Hereditary Hyperferritinemia Cataract Syndrome: Ferritin L Gene and Physiopathology behind the Disease-Report of New Cases. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*(11).
103. Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Andrews, N. C., Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **2004**, *117*(3), 285-97.
104. Wilkinson, N.; Pantopoulos, K., The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front Pharmacol* **2014**, *5*, 176.
105. Khan, M. A.; Domashevskiy, A. V., Iron enhances the binding rates and translational efficiency of iron responsive elements (IREs) mRNA with initiation factor eIF4F. *PLoS One* **2021**, *16*(4), e0250374.
106. Honarmand Ebrahimi, K.; Hagedoorn, P. L.; Hagen, W. R., Phosphate accelerates displacement of Fe(III) by Fe(II) in the ferroxidase center of *Pyrococcus furiosus* ferritin. *FEBS Lett* **2013**, *587*(2), 220-5.
107. Parida, A.; Mohanty, A.; Kansara, B. T.; Behera, R. K., Impact of Phosphate on Iron

Mineralization and Mobilization in Nonheme Bacterioferritin B from *Mycobacterium tuberculosis*. *Inorg Chem* **2020**, *59* (1), 629-641.

108. Cheng, Y. G.; Chasteen, N. D., Role of phosphate in initial iron deposition in apoferritin. *Biochemistry* **1991**, *30* (11), 2947-53.

109. Johnson, J. L.; Cannon, M.; Watt, R. K.; Frankel, R. B.; Watt, G. D., Forming the phosphate layer in reconstituted horse spleen ferritin and the role of phosphate in promoting core surface redox reactions. *Biochemistry* **1999**, *38* (20), 6706-13.

110. Pan, Y. H.; Sader, K.; Powell, J. J.; Bleloch, A.; Gass, M.; Trinick, J.; Warley, A.; Li, A.; Brydson, R.; Brown, A., 3D morphology of the human hepatic ferritin mineral core: new evidence for a subunit structure revealed by single particle analysis of HAADF-STEM images. *J Struct Biol* **2009**, *166* (1), 22-31.

111. Lopez-Castro, J. D.; Delgado, J. J.; Perez-Omil, J. A.; Galvez, N.; Cuesta, R.; Watt, R. K.; Dominguez-Vera, J. M., A new approach to the ferritin iron core growth: influence of the H/L ratio on the core shape. *Dalton Trans* **2012**, *41* (4), 1320-4.

112. Sato, D.; Ohtomo, H.; Yamada, Y.; Hikima, T.; Kurobe, A.; Fujiwara, K.; Ikeguchi, M., Ferritin Assembly Revisited: A Time-Resolved Small-Angle X-ray Scattering Study. *Biochemistry* **2016**, *55* (2), 287-93.

113. Schuck, P., Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **2000**, *78* (3), 1606-19.

114. May, C. A.; Grady, J. K.; Laue, T. M.; Poli, M.; Arosio, P.; Chasteen, N. D., The sedimentation properties of ferritins. New insights and analysis of methods of nanoparticle preparation. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1800* (8), 858-70.

115. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W., NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **2012**, *9* (7), 671-5.

116. Williams, M. A.; Harrison, P. M., Electron-microscopic and chemical studies of oligomers in horse ferritin. *Biochem J* **1968**, *110* (2), 265-80.

117. Yang, D.; Matsubara, K.; Yamaki, M.; Ebina, S.; Nagayama, K., Heterogeneities in ferritin dimers as characterized by gel filtration, nuclear magnetic resonance, electrophoresis, transmission electron microscopy, and gene engineering techniques. *Biochim Biophys Acta* **1994**, *1206* (2), 173-9.

118. Massai, L.; Ciambellotti, S.; Cosottini, L.; Messori, L.; Turano, P.; Pratesi, A., Direct detection of iron clusters in L ferritins through ESI-MS experiments. *Dalton Trans* **2021**, *50* (45), 16464-16467.

119. Hempstead, P. D.; Hudson, A. J.; Artymiuk, P. J.; Andrews, S. C.; Banfield, M. J.; Guest, J. R.; Harrison, P. M., Direct observation of the iron binding sites in a ferritin. *FEBS Lett* **1994**, *350* (2-3), 258-62.

120. Bauminger, E. R.; Treffry, A.; Quail, M. A.; Zhao, Z.; Nowik, I.; Harrison, P. M., Stages in iron storage in the ferritin of *Escherichia coli* (EcFtnA): analysis of Mossbauer spectra reveals a new intermediate. *Biochemistry* **1999**, *38* (24), 7791-802.
121. Treffry, A.; Hirzmann, J.; Yewdall, S. J.; Harrison, P. M., Mechanism of catalysis of Fe(II) oxidation by ferritin H chains. *FEBS Lett* **1992**, *302* (2), 108-12.
122. Paul, C.; Kirschner, K.; Haenisch, G., Calibration of stopped-flow spectrophotometers using a two-step disulfide exchange reaction. *Anal Biochem* **1980**, *101* (2), 442-8.
123. Zhongwei Zhao, A. T., Michael A. Quail, John R. Guest and Pauline M. Harrison, Catalytic iron(II) oxidation in the non-haem ferritin of *Escherichia coli*: the early intermediate is not an iron tyrosinate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997**, 3977-3978.
124. Pereira, A. S.; Timoteo, C. G.; Guilherme, M.; Folgosa, F.; Naik, S. G.; Duarte, A. G.; Huynh, B. H.; Tavares, P., Spectroscopic evidence for and characterization of a trinuclear ferroxidase center in bacterial ferritin from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (26), 10822-32.
125. Amyra Treffry, Z. Z., M. A. Quail, John R. Guest & P. M. Harrison The use of zinc(II) to probe iron binding and oxidation by the ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1998**, *3*, 682-688.
126. Smith, R. M. a. M., A. E., Critical Stability Constants. **1976**, *4*.
127. Bauminger, E. R.; Treffry, A.; Hudson, A. J.; Hechel, D.; Hodson, N. W.; Andrews, S. C.; Levi, S.; Nowik, I.; Arosio, P.; Guest, J. R.; et al., Iron incorporation into ferritins: evidence for the transfer of monomeric Fe(III) between ferritin molecules and for the formation of an unusual mineral in the ferritin of *Escherichia coli*. *Biochem J* **1994**, *302* (Pt 3) (Pt 3), 813-20.
128. 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.; Delisle, M. B., 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* **2004**, *63* (4), 363-80.
129. Maciel, P.; Cruz, V. T.; Constante, M.; Iniesta, I.; Costa, M. C.; Gallati, S.; Sousa, N.; Sequeiros, J.; Coutinho, P.; Santos, M. M., Neuroferritinopathy: missense mutation in FTL causing early-onset bilateral pallidal involvement. *Neurology* **2005**, *65* (4), 603-5.
130. Reutovich, A. A.; Srivastava, A. K.; Smith, G. L.; Foucher, A.; Yates, D. M.; Stach, E. A.; Papaefthymiou, G. C.; Arosio, P.; Bou-Abdallah, F., Effect of Phosphate and Ferritin Subunit Composition on the Kinetics, Structure, and Reactivity of the Iron Core in Human Homo- and Heteropolymer Ferritins. *Biochemistry* **2022**, *61* (19), 2106-2117.
131. Melnikova, L.; Petrenko, V. I.; Avdeev, M. V.; Garamus, V. M.; Almasly, L.; Ivankov, O. I.; Bulavin, L. A.; Mitroova, Z.; Kopcansky, P., Effect of iron oxide loading on magnetoferritin

structure in solution as revealed by SAXS and SANS. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2014**, *123*, 82-8.

132. Kunzle, M.; Eckert, T.; Beck, T., Binary Protein Crystals for the Assembly of Inorganic Nanoparticle Superlattices. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (39), 12731-12734.

133. Yamashita Ichiro, H. J., Hara Masahiko, Bio-template Synthesis of Uniform CdSe Nanoparticles Using Cage-shaped Protein, Apoferritin. *Chemistry Letters* **2004**, *33* (9), 1158-1159.

134. Naito, M.; Iwahori, K.; Miura, A.; Yamane, M.; Yamashita, I., Circularly polarized luminescent CdS quantum dots prepared in a protein nanocage. *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49* (39), 7006-9.

135. Pulsipher, K. W.; Honig, S.; Deng, S.; Dmochowski, I. J., Controlling gold nanoparticle seeded growth in thermophilic ferritin protein templates. *J Inorg Biochem* **2017**, *174*, 169-176.

136. Santambrogio, P.; Levi, S.; Cozzi, A.; Corsi, B.; Arosio, P., Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centres. *Biochem J* **1996**, *314* (Pt 1) (Pt 1), 139-44.

137. 岡田 裕太 2017 年 創価大学 修士論文.

138. 山本 知輝 2017 年 創価大学 修士論文.

6. 謝辞

本研究で直接御指導して頂きました池口雅道教授に心から感謝申し上げます。研究内容をはじめ、研究に向き合う姿勢まで様々なことを教えて頂きました。

研究について沢山のアドバイスをしてくださった、藤原和夫准教授、青木英莉子助教に深く感謝申し上げます。

佐藤大輔博士には、高エネルギー加速器研究機構での SAXS 実験のノウハウから解析の仕方まで様々なことを教えて頂き、大変お世話になりました、心より感謝申し上げます。

思う存分研究に励めるように私を支えてくれた両親に心から感謝申し上げます。