

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22780303

研究課題名（和文） 植物フェリチンを基盤とした新規金属蓄積分子の創出

研究課題名（英文） Construction of a novel metal accumulating protein using the plant ferritin as a scaffold.

研究代表者

増田太郎（MASUDA TARO）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：40395653

研究成果の概要（和文）：新規カルシウム結合蛋白質の遺伝子をクローニングし、その特性解析を行った。更に詳細なカルシウム貯蔵機構を明らかにするため、本蛋白質の立体構造解析を分解能 1.6 Å で解析し、現在カルシウム貯蔵機構の検討中である。

また、海産多細胞緑藻であるアオサフェリチンの X 線結晶構造解析による立体構造解析に成功し、植物フェリチン特有のドメインであるエクステンションペプチド領域がフェリチン多量体の安定性と鉄貯蔵、放出機構に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have attempted to elucidate the structure and function of plant ferritins. The most prominent feature of the plant ferritin is the extension peptide (EP) in the N-terminus of plant ferritin. The structural analysis of UpFER at 2.4 Å resolution revealed the precise structure and its interaction with the conserved region which forms the oligomeric protein shell. It was also suggested that the removal of the EP from plant ferritin made the protein shell more unstable and hydrophobic, which induce the aggregation and degradation of the ferritin shell. Another experiment was performed on a novel calcium binding protein. To elucidate the mechanism in calcium storage, we have attempted to solve the three dimensional structure of this protein. As result, we determined the structure of this protein at 1.6 Å resolution. Some calcium ions were visible in the electron density map, and we are evaluating the structure and function of this protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：機能分子設計

1. 研究開始当初の背景

鉄は全ての生物にとって生育に必要な必

須元素であるが、その反応性に富む性質から細胞内における活性酸素種の発生を誘起

するという面も併せ持っている。したがって、細胞内における鉄を無毒な状態で貯蔵する必要があり、フェリチンはほぼ全ての生物種において、この役割を担う鉄貯蔵タンパク質である。フェリチン分子は 24 個の相同な構成サブユニットから成る対称性に富んだ球状の多量体を形成しており、内部に数千原子に及ぶ鉄を貯蔵するという極めて特殊な性質を持っている。特定の無機分子にフェリチンに匹敵する特異性を持って集積することができる分子は知られていない。一方、生物の生育に不可欠な必須元素とは別に、現代社会の高度先端技術を支える元素群として、「レアメタル（希少金属）」が近年脚光を浴びている。これら一群の金属元素は、産出量、埋蔵量が少なく、且つ付加価値が高いという特徴を有していることから、国際的な資源の争奪となる様相を呈している。我が国においても、最重要とみなされる 7 種のレアメタル（ニッケル、モリブデン、コバルトなど）の国家備蓄を進めており、不慮の供給難に備えている。

2. 研究の目的

本研究では、鉄原子を特異的にまた、高度に集積するフェリチンにおける鉄貯蔵機構の詳細を明らかとし、鉄原子に対する特異性を規定する部分を遺伝子工学的に改変することにより、付加価値の高いレアメタルを高度に蓄積する新規分子の創出を目的とする。本研究の成果は、海洋、水域などに低濃度に拡散したレアメタルを選択的に回収する技術に応用できる可能性を持っており、生命科学のみならず、環境科学、材料科学など他分野との融合研究への発展が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 植物フェリチン、動物フェリチン変異体の作製

植物由来、動物由来のフェリチン cDNA を用い、金属貯蔵過程に深く関与すると考えられるアミノ酸残基を改変し、変異体を作製した。天然型及び変異型について、鉄貯蔵能及び異種金属蓄積能を評価した。

(2) 新規カルシウム蓄積蛋白質の同定

ザクロ種子において、カルシウム貯蔵に寄与する蛋白質を単一に精製し、N-末端アミノ酸配列を解析した。更に、ザクロ種子より RNA を抽出し、アミノ酸配列から設計した縮重プライマーによる RT-PCR を行うことにより、目的蛋白質の部分配列を得た。引き続き、RACE 法により、cDNA 全長配列を決定した。

(3) アオサフェリチン cDNA の単離と発現蛋白質の調製、構造解析

cDNA の単離は、3. 2. と同様の手法により行った。得られたアオサフェリチン cDNA を

pET21d ベクターに挿入し、大腸菌による発現系を構築した。発現蛋白質を精製後、結晶化条件の検索を行い、緩衝液を 0.1 M Bicine pH 9.0、沈殿剤を 21%の PEG400 とした条件で良好な結晶を得た。

4. 研究成果

平成 22 年度は、まず植物フェリチン（ダイズ由来）の立体構造解析を行い、フェリチンにおける鉄貯蔵機構を解析した。その結果、植物フェリチンにおける鉄の取り込みチャンネルから鉄酸化部位に至る鉄の移動経路を明らかにした。この経路を構成するアミノ酸残基群 (Transit site) は、植物のみならず、脊椎動物のフェリチンにおいても保存されていたことから、動物フェリチンにおいてもこの鉄輸送経路が機能している可能性が考えられた。この仮説を明らかとする為、代表的な動物フェリチンであるヒト H 鎖フェリチンおよび、その Transit site 変異体が大腸菌発現系により調製し、X 線結晶構造解析による立体構造解析と鉄取り込みに関する反応速度解析を行った。その結果、植物で明らかにした Transit site を介したフェリチンにおける鉄取り込み経路は、動物フェリチン（ヒト H 鎖）においても共通していることが明らかとなった（図 1）。これらの成果により、現在まで不明な点が多かったフェリチンにおける金属取り込み機構のうち、鉄取り込みチャンネルから鉄酸化部位への移動経路が明らかとなり、この移動経路は生物種を超えて共通している可能性が示唆された。

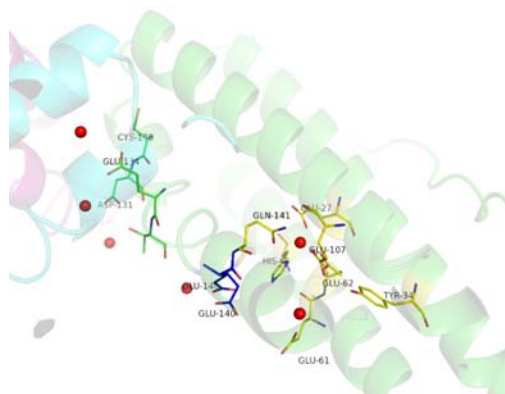


図 1 ヒトフェリチンにおける鉄の移動経路

平成 23 年度は、新規金属蓄積蛋白質として、ザクロ由来クラス III キチナーゼを同定した。本蛋白質は、一分子に約 10 から 20 個のカルシウムイオンを結合する性質があり、種子中においてカルシウム貯蔵蛋白質として機能していた。報告者は、当該蛋白質の遺伝子をクローニングし、その特性解析を行い、カルシウム貯蔵様式を提案した (Yang H. et al. Plant J. 2011, 68, 765-776)。更に詳細なカルシウム貯蔵機構を明らかにするた

め、本蛋白質の結晶化を試み、X線結晶構造解析による立体構造解析を目指した。結果として、分解能 1.6 Å で構造解析に成功し、現在立体構造の情報を基礎としたカルシウム貯蔵機構の解明を行っている。

また、高等植物から進化的に大きく隔たった、海産多細胞緑藻であるアオサにおいて、フェリチンが金属の安定な貯蔵に大きく寄与していることを明らかにした（投稿中）。この中で、アオサに存在するフェリチンは、高等植物由来のものに類似しており、ヒト由来のフェリチンよりも鉄貯蔵活性が高いことを示した。更に、このアオサフェリチンの X線結晶構造解析による立体構造解析に成功し、植物フェリチン特有のドメインであるエクステンションペプチド領域がフェリチン多量体の安定性と鉄貯蔵、放出機構に関わっていることを明らかにした（図 2）（Masuda T. et al. *Protein Sci.* 2012, 21: 786-796）。

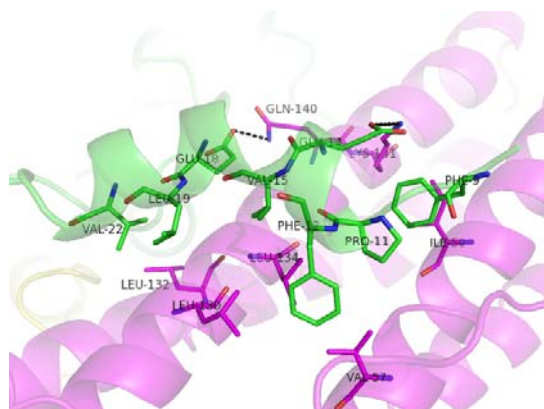


図 2 アオサフェリチンにおける保存領域（紫）と EP 部位（緑）の相互作用

新規金属貯蔵蛋白質の設計に関し、植物由来のフェリチンの N, C-末端に金属特異的ペプチドを付加した変異体を作製した。この変異体は、天然型植物フェリチン蛋白質と比較して、ターゲットとした金属元素の蓄積量が約 5 倍増大し、本研究の目的である、金属特異性の改変を達成したと考えられる（投稿準備中）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

(1) Masuda T., Morimoto S., Mikami B. & Toyohara H. (2012) The extension peptide of plant ferritin from sea lettuce contributes to shell stability and surface hydrophobicity. *Protein Sci.* 21: 786-796 DOI: 10.1002/pro.2061.

査読有

(2) Yang, H., Zhang, T., Masuda, T., Lv, C., Sun, L., Qu, G., Zhao, G. (2011)

Chitinase III in pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.) – a high capacity calcium-binding protein in amyloplasts. *Plant J.* 68: 765-776 DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04727.x.

査読有

(3) Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T. & Mikami, B. (2010) The universal mechanism for iron translocation to the ferroxidase site in ferritin, which is mediated by the well conserved transit site. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 400: 94-99

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705053>

査読有

(4) Deng, J., Liao, X., Yang, H., Hua, Z., Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T., Zhao, G. (2010) Role of H-1 and H-2 subunits of soybean seed ferritin in oxidative deposition of iron in protein. *J. Biol. Chem.* 285: 32075-32086

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702403>

査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

(1) 日本農芸化学会 2012 年度大会
高等植物型フェリチンの N-末端領域はフェリチン多量体の会合に参与する
増田太郎、森本晋一郎、三上文三、豊原治彦
2012 年 3 月 24 日（京都女子大学）

(2) Forth congress of the International BioIron Society, Vancouver, BC, Canada, Taro Masuda, Fumiyuki Goto, Toshihiro Yoshihara, Bunzo Mikami
The universal pathway of iron traffic in ferritin
2011 年 5 月 23 日 (Sheraton Vancouver Wall Center Hotel, Vancouver, BC, Canada)

(3) 日本農芸化学会 2011 年度大会
生物種を超えて共通するフェリチンにおける鉄貯蔵機構
増田太郎、後藤文之、吉原利一、三上文三
2011 年 3 月 27 日（京都女子大学）

(4) 日本蛋白質科学会 2010 年度大会
植物フェリチンの立体構造解析より明らかとなった種を超えて共通するフェリチンにおける鉄貯蔵機構
増田太郎、後藤文之、吉原利一、三上文三
2010 年 6 月 17 日（札幌コンベンションセンター）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 太郎 (MASUDA TARO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40395653

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：