

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26610128

研究課題名(和文)鉄イオンは細胞の磁場センサーか：鉄貯蔵タンパク質フェリチンの低周波磁場感受性解析

研究課題名(英文)Effect of 50 Hz magnetic field on the Fe(II) release kinetics of ferritin

研究代表者

宮田 英威 (Miyata, Hidetake)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90229865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：フェリチンは細胞内において遊離Fe²⁺をFe³⁺の形で貯蔵する。50ヘルツ磁場が小児白血病リスクを上昇させるという報告から細胞内酸化ストレスが磁場により増強されるという可能性がある。その原因としてフェリチンからのFe²⁺の磁場による遊離を想定し、検討した。フェリチン水溶液を50ヘルツ/1 キロヘルツ3.2ミリテスラの磁場に2.5/5時間曝露し、Fe²⁺指示薬フェロジンをを用いて曝露試料と非曝露試料のFe²⁺を測定した。測定曲線をGNUプロットによりフィッティングし、解析した。その結果、50ヘルツ、5時間曝露の場合フェリチンからの鉄イオン解離プロセスが磁場によりわずかに促進されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Effect of 50 Hz magnetic field on the release of Fe²⁺ ions from iron storage protein, ferritin, was studied by absorption spectroscopy. Ferritin oxidizes Fe²⁺ to Fe³⁺ and stores as Fe³⁺ crystal in its interior; when releasing iron ions into solution, ferritin reduces the Fe³⁺. Aqueous solution of ferritin was exposed or not exposed to 50 Hz or 1 kHz, 3.2 mT sinusoidal magnetic field for 2.5/5 hours. After the exposure, ferrozine, an indicator of Fe(II) ions, was added to the solution and the increase in the absorption at 562 nm was measured. Curve fitting by GNU plot was to evaluate the kinetic parameters concerning the rate of dissociation of Fe²⁺ ions from the Fe³⁺ crystal in ferritin and the rate of release of the Fe²⁺ ions after the reduction, and the amount of Fe ions bound to ferritin and in solution was deduced. It was found that the release of Fe³⁺ from the Fe³⁺ crystal was not affected by the magnetic field, but the rate of the un-binding was slightly increased.

研究分野：生物物理学

キーワード：低周波磁場 フェロジン 吸光光度変化 II価鉄

1. 研究開始当初の背景

1970年代後半以来現在に至るまで、50ヘルツ磁場による小児白血病などの発がんリスク上昇が疑われている (Wertheimer and Leeper, 1979)。発がんは細胞酸化ストレスと深く関係しており、酸化ストレスの一つとして細胞内鉄イオンバランスの崩れがある。細胞内鉄イオンはフェリチンに3個の結晶の形で貯蔵され、必要に応じて価に還元されて放出される。これらのことから50ヘルツ磁場によりフェリチンからの鉄イオン放出が変化する可能性が考えられる。これまでにフェリチンに数百キロヘルツ~1メガヘルツの3.2ミリテスラ磁場を曝露した時フェリチンからの価鉄イオン遊離が促進されたとの報告があった (Cespedes and Ueno, 2009)。しかし、50ヘルツ磁場による影響は調べられていなかった。

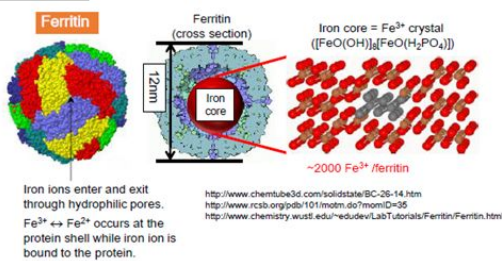
2. 研究の目的

フェリチンを50ヘルツまたは1キロヘルツサイン波磁場に曝露した場合に鉄イオン遊離が影響されるかどうかを研究した。

3. 研究の方法

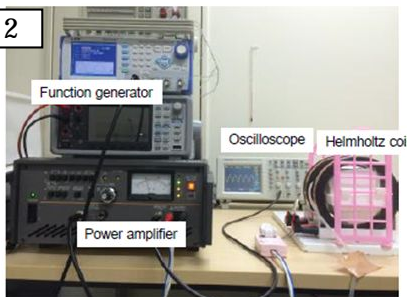
実験にはウマ臍臓より単離したフェリチン (Sigma-Aldrich; 図1) を用いた。

図1



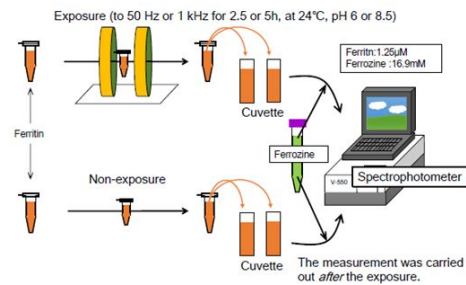
マイクロチューブにフェリチン水溶液を入れ、温度調節したチャンバーにチューブをセットし、高温水循環装置を用いて温度を24に保持した。磁場として周波数50ヘルツと1キロヘルツサイン波、強度として3.2ミリテスラを用いた。曝露には市販の(3Bサイエンティフィック)ヘルムホルツコイル(直径13cm)を用い、コイルに流すサイン型電流はファンクションジェネレーターと電力増幅器(いずれもエヌエフ回路設計ブロック製)により発生させた(図2)。

図2



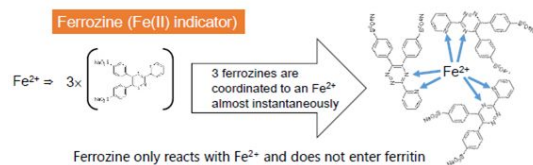
曝露時間は2.5時間と5時間を採用した。

図3



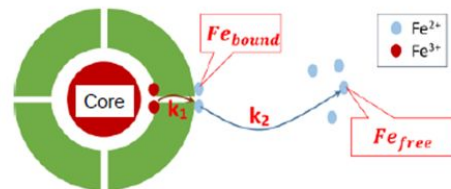
曝露後に価鉄イオン指示薬フェロジンを用いてフェリチン外に遊離した価鉄イオン濃度を吸光度測定した(図4)。

図4



なお、フェリチンがアルカリ性では酸化されやすいことから酸性(pH6)とアルカリ性(pH8.5)において実験を行った。測定で得られた曲線を、先行研究(Harrison et al., 1974; Jones et al., 1978; Wolsczak and Gajda, 2010)を元に独自に構築した鉄イオン放出の速度式にあてはめるフィッティングを行い、フェリチンにおける価鉄解離過程とフェリチンからの価鉄放出過程のレートを見積もった(図5)。曝露条件に置いたサンプルと非曝露条件に置いたサンプルについてレートを比較した。

図5

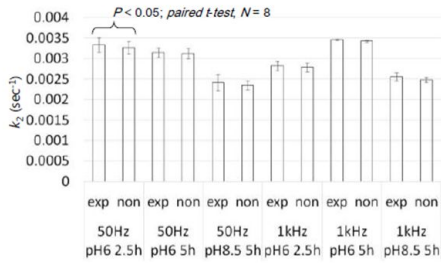


4. 研究成果

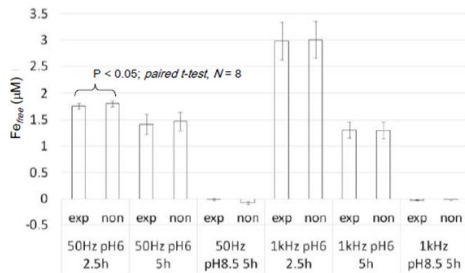
pH6において50ヘルツ、3.2ミリテスラ磁場に2.5時間曝露した試料で鉄イオンの結晶からの放出レートが非曝露試料と比較してわずかに高かった(図6上)。また、同じ試料でフェリチン外へ放出された価鉄イオン

濃度がわずかに上昇することが分かった(図6下)

図6



The k_2 value from a previous study 0.0037(sec⁻¹) (Jones et al., Biochemistry, 1978)
The k_1 value was not affected



Fe_{free} was ~ 0 at pH8.5, being consistent with the fact that it was rapidly oxidized to Fe^{3+} at this pH; Fe_{bound} was not affected.

これらの結果はメガヘルツ帯のみならず我々に身近な 50 ヘルツ磁場によってもフェリチンからの鉄イオン放出が促進されることを示唆している。しかしながら、曝露試料と非曝露試料の差が小さいため、確定的な結論を得るには曝露強度や時間などを変えた実験をさらに行い、大きな変化の見られる条件を探索・解明する必要がある。

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 2件)

1. Measurement of lamellipodia protrusion by optical trapping.

Sakai K-I, Kohmoto S, Nobezawa D, Ikeda K-I, Miyata H. 査読有.

J. Phys. Soc. Japan. 84: 024802-1-7 (2015)

2. Analysis of gene expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to 50-Hz magnetic field.

Miyata H, Ishido M, Nakayama M, Ishizawa K-I, Murase M, Hondou T.

J. Integrative Res. 1: 01033008-1-11 (2014). 査読有.

[学会発表](計 5件)

1. 50 - Hz 磁場曝露による免疫細胞生存率、DNA 損傷度変化。
中山希祐、中村文、本堂毅、宮田英威。
日本物理学会第 71 回年次大会(2016 年 3 月 19 日~3 月 22 日、東北学院大学泉キャンパス)(仙台市泉区)。

2. 50 - Hz 磁場に曝露されたマクロファージにおけるスーパーオキシドアニオン産生。
西垣千尋、中山希祐、中村文、水越厚、北條祥子、宮田英威。
早稲田大学応用脳科学シンポジウム(2016 年 3 月 7 日、早稲田大学所沢キャンパス)(埼玉県所沢市)。

3. 磁場によるプラスミド DNA への影響。
長谷川雅彦、本堂毅、宮田英威。
日本生物物理学会第 53 回年会(2015 年 9 月 13 日~2015 年 9 月 15 日、金沢大学角間キャンパス)(石川県金沢市)。

4. 50Hz 磁場がマクロファージ遺伝子に及ぼす影響。
中山希祐、中村文、本堂毅、宮田英威。
日本臨床環境医学会第 24 回学術集会(2015 年 6 月 6 日~2015 年 6 月 7 日、北里大学白金キャンパス)(東京都港区)。

5. 鉄イオン貯蔵タンパク質に対する交流磁場の影響。
山田悠太、本堂毅、宮田英威。
日本生物物理学会第 52 回年回(2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日、札幌コンベンションセンター)(北海道札幌市)。

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮田英威 (Hidetake Miyata)
東北大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号 : 9 0 2 2 9 8 6 5

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

本堂 毅 (Tsuyoshi Hondou)
東北大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号 : 6 0 2 6 1 5 7 5