

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 5月22日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570175

研究課題名（和文） 鉄貯蔵タンパク質フェリチンの集合体形成と細胞内輸送の制御機構

研究課題名（英文） Regulation of ferritin oligomerization and transport in cytoplasm

研究代表者

中川 裕之（NAKAGAWA HIROYUKI）

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：80274562

研究成果の概要（和文）：細胞質中で鉄を保存する構造を形成するタンパク質であるフェリチンは、微小管に依存して細胞内を輸送される。しかし、それに関わるモーター分子は同定されていなかった。そこで、哺乳類培養細胞から抽出した細胞質に存在するフェリチン結合タンパク質を探索した。その結果、微小管モータータンパク質分子であるキネシンがフェリチンと結合している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ferritin, an iron storage molecule in cytoplasm, has been shown to transport as oligomer on microtubule, but it has been still unclear motor molecules responsible for that movement. Thus we explored motor molecules binding to ferritin oligomer in cytoplasm prepared from mammalian culture cells. As a result, we found that kinesin, a motor molecule moving along microtubule, was bound to ferritin in cytoplasm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成22年度	700,000	210,000	910,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：運動・輸送

1. 研究開始当初の背景

鉄は、呼吸鎖複合体のシトクロムにヘム鉄として結合し酸化還元反応の中心となり、またDNAの生合成経路でRNAのリボース部位還元反応の活性中心としても機能している。このように、鉄はほぼ全ての生物種の生存に必須な微量元素である。しかし、遊離の鉄イオンはフリーラジカルの産生源となるため、細胞内の鉄イオン濃度が過剰になると、発生したフリーラジカルがタン

パク質、核酸や脂質と反応し、細胞の機能に障害を起こす。哺乳類では、神経変性疾患であるパーキンソン病やアルツハイマー症候群において、鉄イオンの神経細胞内動態が神経変性と密接な関係を持つ可能性が示されている。

哺乳類細胞の細胞質では、鉄原子の多くがフェリチンに貯蔵されている。フェリチンは、バクテリアから植物や動物まで広範な生物種で発現し、哺乳類ではH鎖（MW 21k

Da) と L 鎖 (MW 20k Da) の 2 つのサブユニットタンパク質が存在する。それらのサブユニットが 24 個集合して殻状構造を形成する。フェリチン殻の内部空間には、最大で 4,500 個の鉄原子がナノ結晶として貯蔵される。細胞質中でフェリチンは、過剰な鉄イオンの取り込みと必要な場所での放出を行っていると考えられている。したがって、鉄原子および鉄イオンの細胞内動態は、フェリチンの細胞内分布と密接な関係を持つと予想される。しかし、フェリチンの細胞内動態は、我々が報告するまでほとんどわかっていなかった。

我々は、ウシ副腎皮質から新規な微小管結合タンパク質 (MAP) を探索し、フェリチンが MAP であることが明らかになった。我々は、細胞内でフェリチン殻の集合体が微小管と結合していることも明らかになった。培養細胞にマイクロインジェクションした蛍光標識フェリチンの細胞内動態を観察したところ、フェリチン集合体が微小管依存的に細胞質中を移動していることが明らかになった。フェリチン集合体の形成は、細胞培養液中の鉄イオン濃度の上昇に伴い促進された。フェリチンと微小管の試験管内における相互作用は単純なイオン結合であると予想されていたが、フェリチン集合体の細胞質中における移動は明らかに一方向性の運動を含んでいた。これらの結果は、細胞内でフェリチン集合体は微小管上をモーター分子によって輸送されていることを強く示唆する。そこで、フェリチン集合体を輸送する微小管モーター分子の同定とフェリチン集合体の形成を制御する仕組みを明らかにすることを目的として本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞質中でフェリチン集合体と相互作用するモーター分子の同定と、フェリチン集合体の形成と輸送の制御機構の解析を行うことを目的し、実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

HepG2 細胞をホルマリン固定し、抗フェリチン抗体と抗細胞質ダイニン抗体あるいは抗キネシン抗体で二重染色した。

(2) 細胞質画分の調製

HepG2 細胞を、ビーズ破砕機 μ T-01 を用いて抽出液 (10 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, 10 mM KCl, protease inhibitor cocktail) 中で破砕し、遠心して得られた上清を細胞質画分とした。

(3) サイズ排除クロマトグラフィー

試料溶液を、HiPrep 16/60 Sephacryl S-300HR をセットした ÄKTAprime plus を用いてサイズ排除クロマトグラフィーを行った。

(4) 免疫沈降

HepG2 細胞抽出液に含まれるフェリチンを抗フェリチン抗体で免疫沈降し、共沈するタンパク質を回収した。

(5) 微小管モータータンパク質の解析

SDS-PAGE とウェスタンブロッティング法を用いて、細胞抽出液、クロマトグラフィー分画および免疫沈降画分に含まれるモータータンパク質分子を解析した。

4. 研究成果

(1) フェリチンと微小管モータータンパク質の細胞内局在比較

HepG2 細胞で、フェリチンは小さな凝集体として細胞質に分散していた。細胞質ダイニンは細胞質全体に分散し、フェリチンとの明らかな共局在は観察できなかった (図 1)。

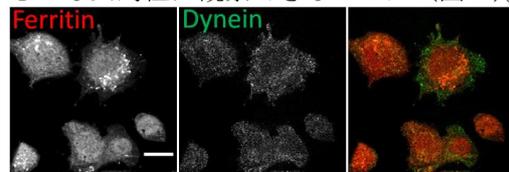


図 1

キネシンは細胞質中の凝集体に局在していたが、フェリチンと明らかな共局在は見られなかった (図 2)。

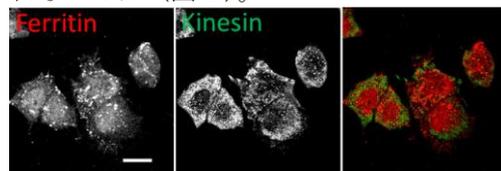


図 2

以上の結果は、細胞質でフェリチンが形成している凝集体へ、モーター分子は顕著には集積していないことを示している。

(2) サイズ排除クロマトグラフィーによるフェリチン結合モーター分子の解析

HepG2 細胞の細胞質抽出液をサイズ排除クロマトグラフィー法で分画した (図 3)。SDS-PAGE でピークに含まれるタンパク質成分を解析したところ、Peak B にフェリチンは分画された (図 4 赤枠)。

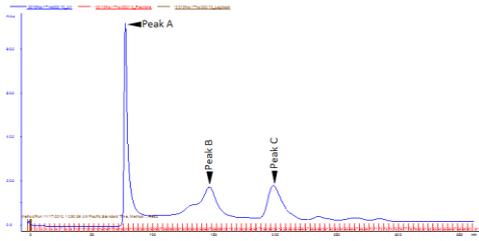


図 3

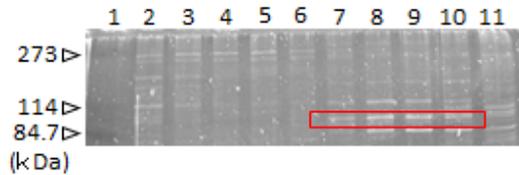


図 4

哺乳類のフェリチンは単量体 24 個が集合し、鉄を貯蔵するための内部空間を持った殻構造であるフェリチン分子となる。HepG2 細胞のフェリチンが形成している構造を知るために、市販の精製ウマフェリチン標品と溶出体積を比較した。HepG2 細胞のフェリチン (図 5 低分子量赤枠) の溶出体積は、精製ウマフェリチン標品 (図 5 高分子量赤枠) よりも明らかに少量であった。したがって、細胞抽出液中のフェリチンは、精製ウマフェリチン標品よりも高分子量であると言える。精製ウマフェリチン標品には、フェリチン結合タンパク質が含まれていない。したがって、HepG2 細胞の細胞質抽出液から分画したフェリチン分子には、フェリチン以外の分子が結合していると予想された。

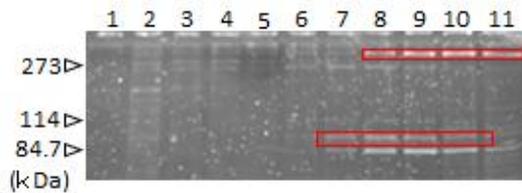


図 5

そこで、細胞質ダイニンあるいはキネシンがフェリチン画分に含まれるか否かを、それぞれに対する抗体を用いたウェスタンブロッティング法で解析した。どちらのモーター分子も、フェリチン画分から検出できなかった。この結果は、フェリチン画分にモーター分子が含まれていない可能性を示すが、フェリチン画分に含まれるフェリチンの総量も少なかったため、フェリチン結合分子もわずかでその量が検出限界を下回っていた可能性もあった。そこで、フェリチン結合分子の

濃縮効果が期待できる免疫沈降による解析を行った。

(3) 免疫沈降法による解析

HepG2 細胞の細胞質抽出液に、抗フェリチン抗体を添加し、抗原抗体複合体を形成させた。遠心分離によって、複合体を沈殿させて回収した。沈殿に含まれるタンパク質分子を、ウェスタンブロッティング法で解析したところ、フェリチン (図 6 レーン 1 赤矢頭) と共にキネシン (図 6 レーン 2 赤矢頭) が沈殿から検出された。しかし、細胞質ダイニンは検出できなかった (図 6 レーン 3)。

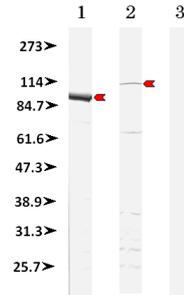


図 6

キネシンは様々な細胞内小胞の輸送モーター分子であるため、フェリチンとは関係がない小胞と共に沈殿した可能性があった。そこで、抗フェリチン抗体を表面に結合させた磁性ビーズを細胞抽出液に添加し、遠心分離を用いずにフェリチンをその結合タンパク質と共に回収した。抗フェリチン抗体による検出では、分子量 90 kDa 付近に磁性ビーズ表面の抗マウス IgG 抗体に由来する非特異的反応が出現しているが、30 kDa 付近に単量体フェリチン分子が検出された (図 7 レーン 1 赤矢頭)。抗キネシン抗体によって、キネシン分子を検出された (図 7 レーン 2 赤矢頭)。

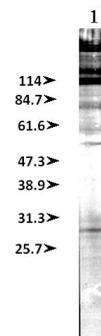


図 7

以上の結果は、フェリチン分子の細胞内輸送には、キネシンが関わっていることが強く示唆している。キネシンは微小管上を一方方向に移動するが、フェリチンは細胞内で多様な方向に運動することが報告されている。した

がって、フェリチン分子のモーターはキネシン以外にも存在すると考えられる。今後は、それらのモーター分子の同定を進めることで、フェリチン分子細胞内輸送機構の包括的な理解が進むと期待される。

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし

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5件)

1. M. Sumiyoshi, S. Sato, Y. Takeda, K. Sumida, K. Koga, T. Itoh, H. Nakagawa, Y. Shimohigashi, M. Shimohigashi. A Circadian Neuropeptide PDF in the Honeybee, *Apis mellifera*: cDNA Cloning and Expression of mRNA. *Zoological Science*. 査読有. 28. 2011. 897-909.
2. M. Tominaga, E Nishihara, T. Oogami, M. Iwasaki, Y. Takagi, M. Shimohigashi and H. Nakagawa. Neurite elongation from *Drosophila* neural BG2-c6 cells stimulated by 20-hydroxyecdysone. *Neuroscience Letters*. 査読有. 482. 2010. 250-254.
3. K. Shioji, Y. Oyama, K. Okuma and H. Nakagawa. Synthesis and properties of fluorescence probe for detection of peroxides in mitochondria. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*. 査読有. 20. 2010. 3911-3915.
4. S. Koikawa, M.R. Hasan, M. Tominaga, S. Miyamoto, S. Kotani, H. Nakagawa. Movement of Ferritin Oligomers in Hepatoma Cells. *Science Journal of Kanagawa University*. 査読有. 20. 2009. 77-80.
5. M.R. Hasan, H. Nakagawa, S. Kotani. Iron Metabolism and Microtubule. *Science Journal of Kanagawa University*. 査読有. 20. 2009. 1-9.

〔図書〕(計1件)

1. K. Tokuraku, K. Matsushima, H. Nakagawa and S. Kotani. Microtubule-associated protein 4. *Cytoskeleton of the Nervous System, Advances in Neurobiology 3*, edited by R. A. Nixon, and A. Yuan, Springer Science+Business Media, NY (2011), 151-166.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 裕之 (NAKAGAWA HIROYUKI)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：80274562