— 原 著 —

1 回鉄負荷ラットで認められた肝臓 イソフェリチンの機能的不均一性*

稲垣 知恵子

日本医科大学第2生化学教室 (主任: 吉野芳夫教授)

Functional heterogeneity of the rat liver ferritin induced by single dose administration of iron

Chieko Inagaki

The Second Department of Biochemistry (Chief: Prof. Yoshio Yoshino), Nippon Medical School

The alteration of the constituents of the ferritin component was investigated by H/L subunit ratio and isoferritin pattern after single dose administration of the iron to the rats. The biochemical characterization of the ferritin was performed 3, 24, and 72 hours respectively.

The results obtained were as follows :

1) The protein concentration of the liver ferritin 3 hours after iron administration was three times higher in comparison with control group, however, it decreased to two times after 72 hours. Contrary, the value of the iron deficiency rats was 1/7 of the control group.

2) The H/L subunit ratio of newly synthesized ferritin at 3 hours, after the iron administration was H-subunit predominate (H/L : 57/43) in comparison with the control (33/67), however, it returned to the control level after 72 hours. The H/L subunit ratio of the liver ferritin from the iron deficiency rats was 47/53 and was essentially identical with that of liver ferritin 3 hours after iron administration.

3) The newly synthesized ferritin revealed higher iron content in the time course of 3 to 72 hours in comparison with the control group. The iron content of the liver ferritin from anemic rats remained identical level with that of the control rats. It was suggested that there was no increase in the amounts of the iron poor ferritin in the livers of the iron deficient rats.

4) The ferritin of the rat liver was fractionated into the six isomers at the range of pI 5.04 ~ 5.72. The isoferritin at the most acidic side, pI 5.04 was 9/1 in H/L subunit and was H-subunit predominant. As the pI shift to the basic, the ratio decrease gradually and the most basic isomer become L-subunit dominant, and L-subunit consisted 77% of the composition.

5) The isoferritin patterns detected by the protein were altered after the iron administration. The pattern became the acidic ferritin dominant at 3 hours, then the intermediate type at 24 hours, and finally reverted to the level of the control at 72 hours after the iron administration.

6) The patterns detected by ^{59}Fe activity and iron distribution in the same experiment disclosed identical results which were obtained by the protein detection.

Key words : liver ferritin, isoferritin, H/L subunit ratio of ferritin, iron loaded rats, iron deficient rats

Present address : The Second Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

緒 言

ferritin は、水溶性貯蔵鉄蛋白質として各種動植物中に広く存在している¹⁻³⁾。apoferritin の分子量は平均約 450,000 といわれ、24 個の subunit からなる球状蛋白質で、分子の内腔には磷酸加水酸化鉄ミセルの型で鉄を含有している。ferritin 分子内の鉄含有量は、生体の鉄貯蔵量によって変化し、ferritin 1 分子当たり約数百から最高 4,500 原子までの鉄を含有することができる^{2,4)}。in vivo における鉄剤投与は多くの組織、細胞中の ferritin の合成を高め^{5,6)}、また鉄欠乏による ferritin の崩壊も知られている^{7,8)}。単一組織に由来する細胞から得られた ferritin であっても、等電点電気泳動により、わずかに等電点が異なる isoferritin に分画される^{9,10)}。しかし、その微細不均一性 (microheterogeneity) の由来については、二つの相反する説がある。その一つは、二つの異なった一次構造を持つ H, L subunit の heteropolymer 説であり¹⁻³⁾、他の一つは ferritin 合成後の分子修飾により不均一性が生ずると考える説である。現時点では、両説ともに分子レベルでの解明に至っていない。

鉄剤投与による細胞内 ferritin の合成が、DNA の転写レベルで行われるか否かについての作用機序に関する見解も必ずしも一致していない^{3,6)}。今回著者は、ラットを用いて鉄投与による肝臓 ferritin 合成を経時的に観察した。すなわち、isoferritin 合成を蛋白質および鉄の両面から検討するとともに、鉄投与後の ferritin の H, L 両 subunit の比率の変化についても考察を試み、鉄代謝におけるラット肝臓 isoferritin の機能的役割を検討したので報告する。

実験材料および方法

(1) 材料

1) 実験動物

体重 50 g 前後の Wistar 系メスラットを、オリエンタル酵母製の通常の固形飼料で、体重約 280 g になるまで飼育したものを使用した。貧血ラットは上記の幼若ラットを通常飼料で体重約 120 g まで飼育し、その後、除鉄飼料 (オリエンタル酵母製)¹¹⁾ を 10 日間与えた。この際、ラットの体重は 170 g、Hb 値は平均 11.5 g/dl (正常平均値 16.5 g/dl) であった。対照群および鉄負荷群ではラット 8~10 匹を 1 グループにし、貧血群では 40 匹を 1 グループにして、それぞれの肝臓から ferritin を調製した。

2) 試薬

Agar は Difco 社製、Agarose は Hoechst 社製、Fesin (静脈注射用鉄剤、Saccharated ferrioxide 2% 含糖酸化鉄水溶液) は 武田薬品工業製。⁵⁹FeCl₃ は New England Nuclear 社製。Sephadex IEF は Pharmacia 社製。Carrier Ampholyte は LKB 社製をそれぞれ購入使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

(2) 方法

1) 鉄負荷実験

対照 (非鉄負荷) ラットおよび貧血ラットは一夜絶食後、腹部大動脈より汚血し肝臓を摘出した。鉄負荷ラットでは大腿静脈より ⁵⁹Fe (⁵⁹FeCl₃) 10 μCi に Carrier 鉄として Fesin 2 mg を混和し、重碳酸ナトリウムで pH 7.4 に調整したものを静脈注射し、3, 24, 72 時間後に上記群と同様に汚血後、肝臓を摘出した。そのほか ⁵⁹Fe 活性の分布を調べるため、脾臓、心臓、腎臓、血液を採取、さらに 5 匹のラットをそれぞれメタボリックゲージで飼育し、各時間ごとの糞尿を採尿し ⁵⁹Fe 活性を測定した。

2) Ferritin の精製

ラット肝臓重量の 5 倍量の蒸留水を加え、4°C で Waring Blender で homogenize 後、75°C で 15 分間加熱、冷却後、2,000×g、30 分遠心分離し、上清の一部についてロケット免疫電気泳動を行い、ferritin 蛋白質を定量した。残りは 6% 酢酸で pH 4.8 にし、2,000×g、30 分間遠心分離、上清を酢酸ナトリウムで pH 6.8 に調製、脱イオン水で 3 日間十分に透析した。沈殿を除き、上清を ToYo ultrafilter UK-50 で濃縮、6% 調整用ディスク電気泳動で ferritin の精製を 2 回行った。また、ferritin の純度は電気泳動法によって確認した。

3) 調製用等電点分画

Pharmacia Fine Chemical (スウェーデン) 発行の instruction manual に従って行った。Sephadex IEF 15 g を秤量、これと 12 ml の LKB Ampholyte (pH 4~6, 5~7, 3.5~10 を各々 4 ml ずつ混合した)、蒸留水 225 ml を気泡が入らないように混合し、ゲル槽中に流し入れる。一夜冷蔵庫に放置後、1 M-H₃PO₄、1 M-NaOH をそれぞれ電極液として用い、8w、40 分間前泳動を行った。試料をゲル槽中に加え、60w、4 時間、4°C に冷却しつつ電気泳動を行った。泳動後 isoferritin 分画を採取し、CO₂-free 蒸留水を加え上清の pH、⁵⁹Fe 活性、鉄、蛋白質量を

それぞれ測定した。その後、十分量の 3% NaCl を用いて等電点電気泳動 (IEF) ゲルより iso-ferritin を溶出させた。

4) 鉄および蛋白質の定量

鉄は Drysdale and Munro 法¹³⁾により比色定量を行った。蛋白質は、抗ラット肝 ferritin ウサギ血清 (M.D. Kitajima より提供を受けた。) と純粋ラット肝 ferritin (電気泳動により確認済) を抗原として、ロケット免疫電気泳動法により測定した。なお、抗原 (標準液) に用いたラット肝臓 ferritin は、2) の方法で精製後、免疫電気泳動、アクリルアミド電気泳動を行い、ferritin 以外の不純物質の混入がないことを確認し、Lowry 法¹⁴⁾にて蛋白質量を測定した。

5) Subunit 分析

吉村の方法¹⁵⁾に従って SDS ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。ゲルのサイズは 16×30 cm, ゲル作成溶液は Watanabe らの方法¹⁶⁾に従った。精製した ferritin (蛋白濃度 10~30 μ g) 溶液に 20% SDS, 2 β -mercaptoethanol を等量混合し、100°C, 10分間加熱後、2w で 48時間 (10°C) SDS ゲル電気泳動を行った。泳動後 coomassie Blue-R-250 で蛋白染色を行い、脱色後クロマトスキャナーで subunit 比を測定した。なお、分子量測定用標準物質として BSA (68,000), Ovalbumin (43,000), Chymotrypsinogen (25,700), Lysozyme (14,300) を用いた。

6) 主な使用器具

自記 γ 線計数機 (Aloka Autowell, Gamma System, ARC 221). Waring blender (日本精機社製). 限外濾過器 (東洋濾紙株式会社, UHP-25, UHP-62, UHP-76, 使用した Ultra filter はすべて UK-50). 吸光度測定 (日立分光光度計 124 型). pH メーター (Radio meter 社製, pH M 64 Research pH meter). 等電点電気泳動装置 (Pharmacia 社製 Flat Bed Apparatus FBE 3000). スキャナー (Shimazu Dual-Wave length TLC Scanner CS-910).

結 果

1. 鉄負荷実験における各臓器への鉄取り込み量

鉄負荷 3, 24, 72 時間後における肝臓, 心臓, 脾臓, 腎臓, 血液, 糞尿およびその他の臓器へ取り込まれた ⁵⁹Fe 活性の比率を Table 1 に示した。鉄投与後 3 時間で肝臓での ⁵⁹Fe 活性は 33.7% であったものが、24 時間後には 43.6% となり、3 時間値に対して約 30% の増加がみられたが、72 時間後には再

Table 1 ⁵⁹Fe activities incorporated into the rat tissues at 3, 24 and 72 hr after the ⁵⁹Fe administration

	⁵⁹ Fe %		
	3 hr	24 hr	72 hr
Liver	33.7	43.6	34.0
Heart	0.3	0.2	0.2
Spleen	2.5	2.2	2.0
Kidney	0.9	1.5	2.1
Blood	28.3	21.6	38.8
Feces and urine	0.1	0.5	8.5
Others	34.2	30.4	14.4

び減少し、3 時間後に等しくなった。脾臓およびその他の臓器では ⁵⁹Fe 投与後、⁵⁹Fe 活性はわずかながら減少したが、72 時間後には再び増加した。なお、ラット血液量は体重の 6.5% として計算した¹⁷⁾。

2. Ferritin の subunit 分析

精製 ferritin を SDS, 2 β -mercaptoethanol 存在下で 100°C 加熱処理し、subunit に分解し、SDS 平板電気泳動法によって、subunit 比の分析を行った。3, 72 時間後の精製 ferritin 15, 20 μ g を電気泳動した結果を示した (Fig. 1)。

ferritin の H, L subunit の分子量は、実験方法の 5) で述べた標準物質を用いて測定した。標準曲線から、H 21,000, L 19,500 と計算された。

精製 ferritin について、対照群、鉄負荷後 3, 24, 72 時間群の ferritin を subunit に分解し、SDS-PAGE 法で電気泳動し、染色後のクロマトスキャン像をトレースした (Fig. 2)。

二つの H, L subunit は従来の方法と異なり、十分に分離され、クロマトスキャンによる H/L subunit % を正確に算出することができた。

3. Ferritin 蛋白質および subunit 構成比の経時的変化

ferritin の精製の項で述べたように、ラット肝臓の 75°C 抽出液中の ferritin の蛋白量を、抗ラット肝臓 ferritin ウサギ血清を用い、ロケット免疫電気泳動によって求めた結果を表示した (Table 2)。

対照群では、肝臓 1g 中に 111.0 μ g の ferritin が存在していたが、鉄投与によって約 3 倍量の 305.5 μ g に増加した。その後 24, 72 時間と時間の経過に伴って減少した。貧血群では対照群に比べ 16.6 μ g となり、約 1/7 に減少した。したがって、相当量の

Fig. 1 Separation of H and L subunits obtained by SDS-PAGE prepared from rat liver ferritins

Fig. 2 Traces of the densitometric scan of the ferritin subunits separated by SDS-PAGE
The results showed the rat liver ferritin derived from the control, the iron loaded and the iron deficient rats.

ferritin が、鉄欠乏食によって消費されたことになる。
 ^{59}Fe 投与によって、H-subunit 構成比は対照群 33% から鉄負荷 3 時間後には 48% に増加したが、その後 24, 72 時間と時間の経過とともに、漸次減少した。逆に L-subunit 構成比は対照群 67% であるものが、鉄負荷 3 時間後には一旦 52% に低下し、その後時間

Table 2 Effect of a single dose of iron on the amount of ferritin protein and H/L subunit ratio

Time after ^{59}Fe administration	Ferritin protein (μg) / Liver (g)	Total sub-unit (%)		Newly synthesized subunit (%)	
		H	L	H	L
Control	111.0	33	67	—	—
3 hr	305.5	48	52	57	43
24 hr	289.5	46	54	54	46
72 hr	203.9	34	66	35	65
Anemia	16.6	47	53	—	—

とともに増加して、72 時間後には H/L subunit 比は対照群とほぼ等しくなった。さらに、対照群の蛋白量および subunit % (H/L) を基準にし、各時間の H/L 比に対応させて、新しく合成された subunit の H/L 比を計算した。新しく合成された H-subunit は、3 時間後には 57% と対照群の 33% に比べかなり多くの H-subunit が合成された。24, 72 時間と経時的に H-subunit は 54, 35% とそれぞれ減少し、逆に L-subunit は増加した。この新しく合成された H/L subunit は、72 時間後には対照群に等しくなった。なお、貧血群では鉄投与後 3 時間の H/L 比は 47/53 となり、3 時間値と同様に H-subunit が優勢であった。

4. Isoferritin の subunit 構成比

精製 ferritin の調製用等電点電気泳動を行い、pI

Table 3 The relation between pIs and H/L subunit ratio in the isoferferritin from the rat liver

Isoferritin		Subunit %	
No.	pI	H	L
1	5.04	90	10
2	5.28	54	46
3	5.40	36	64
4	5.52	35	65
5	5.62	34	66
6	5.72	23	77

5.04~5.72 の間に六つの同位体に分画し、それぞれの isoferferritin の H/L subunit 比率を表示した (Table 3)。

最酸性側 (pI 5.04)、および塩基性側 (pI 5.72) の isoferferritin は、肉眼で ferritin の brown band が確認できなかったが、ロケット免疫電気泳動によりその存在が確認された。

pI 5.04 の最酸性側 isoferferritin は H-subunit を 90% 含有し、pI 5.72 の最塩基性側 isoferferritin は L-subunit を 77% 含有していた。pI 5.28 の酸性側 isoferferritin では H/L 比は 54/46 で、H-subunit がなお優勢であった。一般に pI が塩基性側になるにしたがって、isoferferritin 中の L-subunit の含有比は増加した。

5. Isoferritin の蛋白量 (%) の経時的変動

対照群を基準にして ^{59}Fe 投与後 3, 24, 72時間、および貧血ラットの isoferferritin 蛋白量の経時の変化を百分率で図示した (Fig. 3)。

対照群では pI 5.45 付近の isoferferritin 量が最も多く、 ^{59}Fe 投与後 3 時間後には pI 5.28 の酸性側 isoferferritin が多量に合成され、pI 5.5 以上の塩基性側 isoferferritin 蛋白量 (%) は相対的に低下した。24 時間後には全体の peak は移行型となり、72 時間後には対照群の分布 pattern に近づいた。鉄欠乏ラットの isoferferritin の main peak は対照群の分布と一致したが、より塩基性側 isoferferritin の蛋白量 (%) は低下した。

6. Ferritin の鉄量

精製した ferritin について、蛋白量をロ

ケット免疫電気泳動法、鉄を比色法により測定し Fe/Protein 比を求め、さらに ferritin 分子中に含まれている鉄原子数を計算した (Table 4)。なお, apoferferritin の分子量は 450,000 として計算した。ferritin の鉄含有量は ^{59}Fe 投与によって 3 時間後には、対照群より約 10% 増加し、72 時間後にはやや減少した。新しく合成された ferritin の鉄含有量を、対照群を基準にして各時間ごとの値を計算すると、3 時間では ferritin 1 分子に 3,132 個の鉄原子を含み、対照群の 2,691 個より約 15% 増加し、新しく合成された ferritin は、1 分子当たりより多くの鉄を含有していることが明らかになった。しかし、72 時間を経過すると対照群の鉄含有量に戻り、再調整が行われることを示していた。貧血ラットでは、1 分子当たりの鉄含有量に著しい低下はみられず、対照群に比べるとやや低値であった。

7. Isoferritin の鉄量 (%) および ^{59}Fe 活性 (%) の経時の変化

^{59}Fe 投与後、各時間ごとの isoferferritin 1 分子当たりの鉄量 (%), およびそれらの ^{59}Fe 活性 (%) を

Fig. 3 Effect of a single dose of iron on the isoferferritin patterns detected by the protein content

Table 4 Effect of a single dose of iron on the number of iron atoms in ferritin molecule

Time after ^{59}Fe administration	Fe atoms/Protein molecule	Ferritin protein (μg)/Liver (g)	Ferritin Fe(μg)/Liver (g)	Newly synthesized Fe atoms/Protein molecule
Control	2,691	111.0	37.2	—
3 hr	2,964	305.5	113.0	3,132
24 hr	2,997	289.5	107.9	3,183
72 hr	2,780	203.9	70.7	2,898
Anemia	2,675	16.6	5.5	—

図示した (Fig. 4).

対照群では pI 5.2~5.4 の間に大きな peak があり, pI 5.7 付近に小さな peak がみられ, 蛋白量 (%) から見た対照群の isoferitin pattern とは異なっていた. 鉄投与後, 3時間で酸性側の pI 5.28 にある isoferitin の ^{59}Fe 活性が非常に高く, ^{59}Fe の取り込みが盛んであることを示している. しかし, 他のすべての isoferitin では, 鉄量 (%) と ^{59}Fe 活性 (%) の分布はほぼ一致していた. 24 時間後には, 移行型でやや対照群の pattern に類似しており, 72 時間後には塩基性側 isoferitin (pI 5.4) に主要な

peak は移行した. 貧血群では塩基性側で鉄含有量の多い isoferitin がみられ, 対照群の分布と異なっていた.

8. Isoferitin 1 分子当たりの鉄含有量の経時的変化

pH 勾配に対応する鉄含有量に, 一定の傾向はみられなかった (Fig. 5). 鉄投与後 3 時間で pI 5.28 付近の isoferitin の鉄含有量は少ないが, Fig. 3 で示したように, この部分の isoferitin 蛋白は多量に合成されていることから, 鉄含有量の少ない iron poor

Fig. 4 Effect of a single dose of iron on the isoferitin patterns detected by ^{59}Fe activity and iron content

Fig. 5 Alteration of the number of iron atoms in liver isoferritin molecule dependent on the iron administration or iron deficiency

ferritin が新しく合成されたことを示している。また、塩基性側 isoferritin は一般に鉄含有量が多く、24時間では移行型に、72時間では次第に対照群の pattern に近づき、酸性側 isoferritin の鉄含有量は 2,400～3,000 の間でほぼ均一になった。塩基性側は、3,200～3,800 とやや高値になった。貧血ラットから得た isoferritin の鉄含有量は、対照群とほぼ類似していた。

考 察

1. 鉄負荷実験について

メスラットを用い、UIBC を飽和させるに十分量以上の carrier 鉄 2mg を ^{59}Fe とともに静注し、鉄投与による肝臓 ferritin の生成、およびその subunit について経時的変化を観察した。さらに、各時間ごとの ferritin を調製用等電点分画法により isoferritin に分画し、それぞれ蛋白量、鉄量の両面から経時的変化をあわせて観察した。ラットに静注した ^{59}Fe は3時間後、約 33.7% が肝臓に取り込まれ、24 時間後には 43.6% と最高値を示したが、72 時間後には減少した。この時期に、24 時間後に一度低下した血中 ^{59}Fe 活性は再び上昇し、さらに腎臓、糞尿中の ^{59}Fe 活性もそれぞれ増加し、肝臓からの ^{59}Fe の出動、お

よび腎臓を通過しての排泄が行われていることが認められた。ラット肝臓では、non-heme 鉄の 50～60%¹⁸⁾ が ferritin として貯えられるが、対照群に比べ鉄の投与後3時間では、ferritin 量は約3倍に増加し、72 時間後にもなお対照群の約2倍の ferritin が存在していた。対照群の ferritin 量を基準にして、新しく合成された ferritin 量を計算によって求めると、肝臓 1g 当たり3時間では 194.5 μg であったものが、72 時間では 92.9 μg となり、約 1/2 に低下していることがわかった。肝臓中の ferritin は常に合成、分解を繰り返していることはもちろんであるが、ferritin の half-life を考えた場合、72 時間¹⁹⁾、49 時間 (メス)、58 時間 (オス)¹⁸⁾、あるいは 55.5 ± 2 時間 (メス)¹²⁾ といずれも使用した核種により、それぞれ異なった値が報告されているが、いずれにしても鉄投与後 50 時間を経過すると、新しく合成された ferritin は half-life time を迎えることになる。その結果、ferritin 量の低下をもたらす、Table 1 にみられたように、その時期に肝臓からの鉄の出動も増加し、鉄の投与により一度合成された ferritin が分解されて含有していた鉄の放出が起こると考えられる。ferritin の定量法は従来の免疫沈降法²⁰⁾、Lowry 法¹⁴⁾に代わり、直接、抗ラット肝臓 ferritin ウサギ血清を

用いたロケット免疫電気泳動法を用いて測定した。この方法は、上記二つの定量法の欠点²¹⁾を補うもので、75°C 抽出液または IEF で分画した isoferritin を直接、かつより正確に測定することができた。

Drysdale⁹⁾, Urushizaki ら¹⁰⁾による等電点分画法によって ferritin が同位体に分画され、isoferritin と名付けられて以来、その microheterogeneity の成因について、全く異なった二つの説が平行して存在している。すなわち、その一つは 1975 年 Drysdale⁹⁾が、isoferritin は分子量がわずかに異なる H, L (22,000, 19,000)⁹⁾二つの subunit が hybrid を形成し、一次構造を異にする 2 種の H, L subunit から成っているという仮説である²¹⁾。他の一つは、ferritin 蛋白質の立体構造面から考えて約 12 個のアミノ酸が異なる二つの subunit が、完全な高次構造をとることは不可能であるという考え方⁴⁾に基づいた 24 個 subunit 均一説である。つまり、isoferritin は、蛋白合成後、なんらかの分子修飾を受けて変換したものであるという仮説である^{12, 23)}。しかし現在なお、不均一性の機構については分子のレベルでの解明をみるに至っていない。著者は、鉄投与による ferritin, あるいは isoferritin の機能的不均一性をみるため、H, L subunit 説に基づいてその解明を行った。二つの subunit は、Watanabe らの方法¹⁹⁾に基づき SDS-PAGE を作成、さらにより長いガラス平板を用い、長時間電気泳動を行うことにより、従来の結果より分離良好な二つの subunit を得た。

次に、肝臓 ferritin の等電点電気泳動所見について、著者はわずかに pI が異なる同位体を pI 5.0～5.7 の間に 6 分画した。No. 1-pI 5.04 の最酸性側 isoferritin は蛋白量も微量で、H-subunit を 90% 以上含有していた。Kohgo ら²⁴⁾は、2 種の核種 (¹⁴C, ³H) を用いた二重標識法で、ラット肝臓 isoferritin の代謝回転の相違を調べたのち、鉄過剰投与 ferritin から Biolyte を用いた等電点電気泳動を行い、pI 5.0～5.4 の間に四つの同位体を分画した。それぞれの H/L 比は、クロマトスキャンから、pI 5.0 で 45.8±2.2/54.2±2.2% となり、著者の最酸性側 isoferritin の H/L 比と大幅に異なっていた。最近、Bredenka-mp and Joubert²⁵⁾が、市販の Ampholine pH 4～6 (LKB), Pharmalyte pH 4～6.5 (Pharmacia), および Biolyte pH4～6 (Bio-Rad Labo) と 3 種の異なった商品を用いての比較実験で、ヒト肝臓、心臓の等電点泳動を行ったところ、それぞれ異なった pattern を

得ている。ヒト肝臓 isoferritin の pattern は、著者の用いた LKB 製では、酸性側から塩基性側に比較的バランス良く isoferritin が分布していた。しかし、Bio-Rad Labo 製のものは、isoferritin 像は塩基性側に片寄り、酸性側のそれは出現程度が低かった。ヒト肝臓とラット肝臓では、isoferritin の分布は多少異なるが²⁶⁾、Kohgo らは Biolyte を用いていることから、この大幅な相違は恐らく用いた試薬の違いによるのではないかと考えている。さらに、鉄過剰ラットを用いたので、H/L 比が異なる可能性もある。

鉄の投与によって、3 時間後には新しく合成された ferritin の H/L 比は 57/43 となり、対照群の 33/67 に比べて H-subunit が優勢になり、24 時間では 54/46, 72 時間では 35/65 と対照群にほぼ等しい値となった。この現象を isoferritin レベルでみると、3 時間後には H-subunit 優勢な酸性側 isoferritin が新しく合成される。また、isoferritin の鉄量の面から、その分布比率をみると、鉄投与後 3 時間で、pI 5.28 の比較的酸性側の isoferritin に異常に多量の ⁵⁹Fe が取り込まれ、新しく合成された isoferritin は、この部分に主として存在していることを示している。この事実は、Wagstaff²⁸⁾らがヒト肝臓 isoferritin を用い、その apoferritin について、in vitro で 2 価鉄を添加した場合、酸性側 isoferritin が塩基性側のものよりも、より効率よく鉄を取り込む性質があるという報告と一致した。鉄を投与することにより、isoferritin 間の蛋白量、および鉄量の相対的比率は対照群に比べ大きく変化した。鉄投与後 3 時間で、pI 5.28 の酸性側 isoferritin の Fe/Protein 比は約 1,600 (鉄原子数)で、塩基性側 Fe/Protein 比の 3,000～3,600 に比べかなり低く、従来から言われているように、鉄投与により iron poor ferritin が多量に生産されるという説^{8, 19)}を支持するものである。さらに、新しく合成された ferritin は 1 分子当たり 3,132 個の鉄原子を含み、対照群の 2,691 個に比べ鉄含有量の多い isoferritin も同時に合成されている結果になった。一方、isoferritin 間の鉄量 (%) 分布を経時的に見た場合、24 時間で最も対照群の pattern に近づいたが、蛋白量 (%) 分布はこの時期に移行型を示し、72 時間後に対照群に近づき、鉄量 (%) は 72 時間後には酸性側が非常に減少していた。つまり、isoferritin の蛋白量 (%), および鉄量 (%) の経時的分布は、両者必ずしも一致していなかった。1 分子当たりの鉄含有量は、pI との相関がみられなかった。しか

し、No. 1 および No. 6 の最酸性側、および最塩基性側の iso-ferritin の分布を除外して考えると、Treffry ら¹²⁾の言うように一般的に塩基性側 iso-ferritin の鉄含有率は、鉄投与後に時間とともに、徐々に増加する傾向にあった。なお、ferritin への鉄の取り込み、出動に関して、Harrison らが提唱した *in vitro* での last-in-first-out の仮説は、Clegg and Treffry⁴⁾ からも *in vivo* で証明している。本研究では鉄投与後、24, 72 時間後の ferritin 鉄は、3 時間後に取り込まれた鉄が、再出動したのか否かは、今回証明できなかったが、Fe/Protein 比からみると、鉄投与後、3, 24, 72 時間と時間の経過につれて、徐々に対照群の pattern に再編成されていく傾向にあり、酸性側優勢より、塩基性側 iso-ferritin 優勢へと、鉄量 (%) の移動が見られた。

2. 貧血ラットについて

除鉄飼料で貧血ラットを作成する際、体重 50 g を過ぎるころから、4～5 週間^{7,8)} 除鉄飼料で飼育し、Hb 値が正常は 15.4 ± 1.4 g/dl のものが 9.7 ± 1.5 g/dl⁷⁾、あるいは 13 g/dl のものが約 5 g/dl⁸⁾ にまで減少したラットを使用するのが一般の方法である。しかし、著者は貧血ラット肝臓中の ferritin 量の低下、および強度の貧血による生理的機能の低下を避けるため、体重 120 g のラットから出発し、10 日間除鉄飼料で飼育、Hb 値が 16.5 g/dl のものが、11.0 g/dl に低下した中程度の貧血ラットについて実験を行った。肝臓 1 g 中の ferritin の蛋白量、鉄量は約 1/7 に減少した。ferritin 1 分子当たりの鉄含有率は対照群と変わりなく、また iso-ferritin 蛋白量 (%) 分布は対照群の数値と類似していたが、鉄量 (%) 分布は異なっており、酸性側 iso-ferritin での減少、塩基性側 iso-ferritin での相対的増加が特長であった。一方 H/L 比は 47/53 で、対照群の数値と類似しており、また潅血性貧血で得た渡辺らの比率¹³⁾と似ていた。

鉄欠乏による ferritin からの鉄の出動に関して、*in vitro* でみられる種々の還元剤、FMN/NADH を用いた報告でみられるような機構が、果たして *in vivo* でも行われているのか否かは疑問^{3,4)} である。したがって、ferritin それ自体の寿命のうちに何回も鉄の取り込み、出動が iso-ferritin 間で行われるのか、あるいは鉄の出動により ferritin 分子は崩壊するのか、あるいは鉄含有量が多くなり過激変性を起こし、hemosiderin に変化するのは明確ではない。少な

くとも、鉄欠乏状態で ferritin は鉄含有量の少ない、iron poor ferritin に変化するのではなく、対照群と同様な鉄含有量を持ちつつその量が減少している。この現象は、ferritin が鉄出動に伴って、その分子が分解することを示唆している。他方、iso-ferritin レベルで蛋白量 (%) と鉄量 (%) の分布を観察すると、塩基性 iso-ferritin の減少とその鉄含有量の増加が特長的である。そして、相当量、鉄が出動するような状態にあっても、中間の pI に位置する iso-ferritin は正常、また正常に近い状態のまま安定であると言える。Kohgo ら²⁴⁾は、H-subunit 優位な酸性側 iso-ferritin は、細胞内 hemoglobin 合成などの鉄イオンの需要に速やかに対応し、L-subunit はより安定な鉄イオンの解毒と長期の鉄貯蔵に関係していると述べている。この説は、ferritin の合成過程での実験結果から提唱されたものであるが、今回の貧血ラットでは、その鉄代謝機構を H/L subunit 説で十分説明できない。すなわち、鉄欠乏時には最初に ferritin 中の鉄が出動し、Hb の低下をカバーし、さらに貧血が進行すると Hb の低下をもたらすことはすでに知られているが、その際、酸性側 iso-ferritin はより速やかに対応し、さらに貧血が進行すると、L-subunit が多い塩基性側 iso-ferritin が分解することになる。しかし、対照群と比べて Fig. 3 に示すように、酸性側 iso-ferritin 蛋白量 (%) は、あまり変化なく、むしろ塩基性側 iso-ferritin 蛋白量 (%) の損失が著名である。この事実からは、慢性的に鉄が不足すると、恐らく Hb 合成のために、塩基性側 iso-ferritin が使われるのではないかと考えられる。この塩基性側 iso-ferritin の鉄量 (%) は高く、1 分子当たりの鉄含有量は対照群の値と変わらない。いわゆる iron poor ferritin ではない。そして、前述のように中間 pI を持つ iso-ferritin は、鉄の欠乏の際にも依然として安全な形で存在している。H-subunit rich な酸性側 iso-ferritin は、代謝回転が速いという Kohgo らの仮説は、鉄の出動するような状態では、十分に説明はできなかった。

結 論

ラットは、UIBC を飽和する以上の量の鉄を投与されると、新しく ferritin が合成され、その鉄含有量、pI、H/L subunit 比が、互いになんらかの関連を持つような変化が生じた。このことは、iso-ferritin 構成においても同様であり、これらの結果は、

Wagstaff, Kohgo らの結果を支持するものである。生体では過剰量の鉄が侵入することにより, ferritin, isoferritin の蛋白量, 鉄量の両面よりみて, 正常の pattern を一過性に乱すような現象が起きる。鉄量が正常に戻ると, それらの一過性現象も消失し, もとの状態に戻るが, 慢性的に鉄が欠乏した時には, 合成実験で組み立てられた H/L subunit 説の逆は必ずしもあてはまらない。さらに No.1, 6 の微量に存在する isoferritin は, 免疫学的にも ferritin であり, H/L subunit を持っているが, 他の isoferritin と比べ, 鉄に対する反応性は非常に乏しい。以上の研究結果は, isoferritin が機能的に複雑な動態を示すことを明らかにしたもので, isoferritin の構造と機能の関連に, 興味深い知見を加えるものである。

稿を終るに臨み, 多大の協力をいただいた第2生化学教室神成節子助手, 平井幸彦助手をはじめとする教室員各位に深謝いたします。また, 抗ラット肝臓 ferritin 血清を下さった北島米夫先生に深謝いたします。また, 本学基礎医学実験動物室職員各位に深謝いたします。

なお, 本論文の要旨は昭和 57 年度, 第 55 回日本生化学会総会, 第 6 回鉄代謝研究会で発表した。

文 献

- Munro, H.N. : Ferritin structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol. Rev.*, **58**, 318~396, 1978.
- Harrison, P.M., Clegg, G.A., and May, K. : Ferritin structure and function. "Iron in Biochemistry and Medicine II" (Jacobs, A., and Worwood, M. eds.), p. 131~171, Academic Press, London, 1980.
- Aisen, P., and Listowsky, I. : Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 357~393, 1980.
- Clegg, G.A., Fitton, J.E., Harrison, P.M., and Treffry, A. : Ferritin molecular structure and iron-storage mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **36**, 56~86, 1980.
- Yoshino, Y., Manis, J., and Schachter, D. : Regulation of ferritin synthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.*, **243**, 2911~2917, 1968.
- Bomford, A.B., and Munro, H.N. : Biosynthesis of ferritin and Isoferritins. "Iron in Biochemistry and Medicine II" (Jacobs, A., and Worwood, M. eds.), p. 173~201, Academic Press, London, 1980.
- 吉野芳夫, 平松芳子, 柳下晃, 寺戸国昭 : 貧血ラットにみられる鉄吸収の亢進について。栄と食糧, **24**, 206~210, 1971.
- Hunter, J.E. : Variable effects of iron status on the concentration of ferritin in rat plasma, liver and spleen. *J. Nutr.*, **108**, 497~505, 1978.
- Drysdale, J.W. : Microheterogeneity in ferritin molecules. *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 256~258, 1970.
- Urushizaki, I., Ishitani, K., and Niitsu, Y. : Microheterogeneity of rat liver ferritin; Comparison of electrofocusing and chromatographic fractions. *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 95~110, 1973.
- 渡辺直樹, 新津洋司郎 : Isoferritin の hybrid 構造と免疫学的特性に関する研究。札幌医誌, **48**, 385~396, 1979.
- Treffry, A., and Harrison, P.M. : Evidence for post-translational changes in rat liver ferritin. *Biochim. Biophys. Acta*, **610**, 421~424, 1980.
- Drysdale, J.W., and Munro, H.N. : Small-scale isolation of ferritin for the assay of the incorporation of ¹⁴C-labeled amino acids. *Biochem. J.*, **95**, 851~858, 1965.
- Lowry, O.H., Resebrough, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.
- 吉村誠 : 胎盤 ferritin の研究, 特に正常分娩母子の鉄栄養への影響について。日医大誌, **50**, 65~75, 1983.
- Watanabe, N., and Drysdale, J.W. : Natural enrichment of ferritin mRNA in mRNP particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 207~212, 1981.
- 吉野芳夫, 熊木敏郎, 山下博邦, 若林恒郎 : 鉄過剰投与・モルモットの血漿にみられる造血抑制作用について。日医大誌, **30**, 57~62, 1964.
- Linder, M.C., Moor, J.R., Scott, L.E., and Munro, H.N. : Mechanism of sex difference in rat tissue iron stores. *Biochim. Biophys. Acta*, **297**, 70~80, 1973.
- Drysdale, J.W., and Munro, H.N. : Regulation of synthesis and turnover of ferritin in rat liver. *J. Biol. Chem.*, **241**, 3630~3637, 1966.
- Linder, M.C., and Munro, H.N. : Assay of tissue ferritin. *Anal. Biochem.*, **48**, 266~278, 1972.
- Conlon-Hollinshead, C., Bomford, A., and Munro, H.N. : Rapid one-step purification translation systems. *Anal. Biochem.*, **120**, 235~241, 1978.
- Watanabe, N., and Drysdale, J.W. : Evidence for distinct mRNAs for ferritin subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 507~511, 1971.
- Russele, S.M., and Harrison, P.M. : Heterogeneity in horse ferritins; A comparative study of surface charge, iron content and kinetics of iron uptake. *Biochem. J.*, **175**, 91~104, 1978.
- Kohgo, Y., Yokota, M., and Drysdale, J.W. : Differential turnover of rat liver isoferritins. *J. Biol. Chem.*, **255**, 5195~5200, 1980.
- Bredenkamp, B.L.F., and Joubert, S.M. : The effect of ampholytes on ferritin isoelectric focusing patterns. *J. Chromatogr.*, **230**, 327~333, 1982.
- Arosio, P., Adelman, T.G., and Drysdale, J.W. : On ferritin heterogeneity further evidence for heteropolymers. *J. Biol. Chem.*, **253**, 4451~4458, 1978.
- Hoy, T.G., and Jacobs, A. : Ferritin polymers and the formation of haemosiderin. *Br. J. Haematol.*, **49**, 593~602, 1981.
- Wagstaff, M., Worwood, M., and Jacobs, A. : Properties of human tissue isoferritin. *Biochem. J.*, **173**, 969~977, 1978.

(受付: 1982 年 12 月 21 日)