

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14480

研究課題名(和文)細胞内亜鉛シャペロン同定への挑戦

研究課題名(英文)Identification of intracellular zinc chaperones

研究代表者

古川 良明 (Furukawa, Yoshiaki)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：40415287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛イオンは生命の維持に不可欠な金属イオンで、タンパク質に結合することでその構造を安定化させたり、酵素活性の中心として機能したりする。一方で、亜鉛イオンは錯体形成能力が非常に高く、鉄や銅といった他の金属イオンを結合すべきタンパク質にも結合し、それらの生理活性を低下させる危険性がある。実際、細胞内における亜鉛イオンは何らかの生体物質と結合しており、遊離状態としての濃度は非常に低く抑えられている。そのような細胞内環境において、亜鉛結合タンパク質がどのように亜鉛イオンを獲得しているのか明らかでない。そこで本課題では、未だ発見されていない「亜鉛シャペロン」の探索に挑戦した。

研究成果の概要(英文)：A zinc ion plays essential roles in keeping our lives healthy by stabilizing the native structures of proteins and/or by functioning as an active site for enzymatic reactions. A zinc ion has also a high capability to form a complex with various kinds of ligands and can thus bind at the binding site for the other metal ions such as iron and copper ions in proteins. Such a "mis-metallation" can further reduce or even negate the enzymatic activity of metalloproteins. Actually, intracellular zinc ions exist as complexes with biomolecules, and almost no "free" zinc ions has been proposed to exist in a cell. In such a intracellular environment, we still do not know how Zn-binding proteins acquire zinc ions. In this study, we have challenged the identification of "Zn chaperone" proteins that can deliver a zinc ion to Zn-requiring proteins.

研究分野：生物無機化学

キーワード：金属タンパク質

1. 研究開始当初の背景

亜鉛イオンは、鉄イオンに次いで含量の多い必須微量元素の一つで、タンパク質に結合することでその構造を安定化させたり、酵素活性の中心として機能したりする。特に、タンパク質への亜鉛イオン結合は転写や翻訳といった基本的な細胞活動を制御しており、細胞内亜鉛イオンの代謝に異常が生じると、糖尿病や味覚異常、成長遅延、免疫異常など、各種の疾患の原因になることが報告されている。

生命現象における亜鉛イオンの重要性がますます認識される一方で、その細胞内挙動については未知のままである。亜鉛イオンは、金属イオンの中でも特に錯体形成能力が高いために、鉄や銅イオンを結合するはずのタンパク質に結合し、それらの活性を阻害してしまうことがある。よって、特定のタンパク質に亜鉛イオンを運搬・供給する細胞内メカニズムが存在すると推察されるが、その詳細については全くと言って良いほど知見が得られていない。

亜鉛イオンと同じく必須微量元素に分類される銅イオンの場合には、特定のタンパク質に銅イオンを供給する「銅シャペロン」と呼ばれる一連のタンパク質群が存在する。銅シャペロンが関与する細胞内銅イオンの輸送ネットワークについては研究が進んでいるものの、亜鉛イオンを運搬する「亜鉛シャペロン」が細胞内に存在するのかは未だに不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、亜鉛シャペロンの網羅的な探索を行い、亜鉛イオンの細胞内挙動を説明する新たな分子メカニズムの提案を行うことを目的とした。まず、亜鉛シャペロンの探索に特化したスクリーニングシステムの構築に挑戦し、同定されたタンパク質の亜鉛イオン結合能に関する定量的な評価を試みた。

3. 研究の方法

本研究において着目した銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) について、その酵素活性の中心である銅イオンは CCS と呼ばれる銅シャペロンによって供給されることが知られているが、SOD1 がどのように亜鉛イオンを獲得しているのかは不明である。銅シャペロン CCS は SOD1 と特異的に相互作用することで銅イオンを供給することを考慮すると、亜鉛イオンを SOD1 に供給する亜鉛シャペロンについても、SOD1 と特異的に相互作用することが予想される。そこで、亜鉛イオン結合部位を含む「亜鉛フラグメント」と相互作用するタンパク質を探索した。具体的には、酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法を利用することで、亜鉛フラグメントと相互作用するタンパク質の探索を行った。Y2H 法は出芽酵母におけるレポー

ター遺伝子の転写活性を指標としたタンパク質間相互作用の検出手法である。本研究では、抗生物質耐性遺伝子、及び、青白選択を可能とする α -galactosidase 遺伝子の転写活性を指標とし、規格化した 460 万種のヒト遺伝子クローンからなるライブラリーを利用して、亜鉛フラグメントと相互作用するタンパク質をスクリーニングした。

4. 研究成果

Y2H 法を利用した亜鉛フラグメントとの相互作用タンパク質のスクリーニングを行った結果、抗生物質存在下で青いコロニーを形成する 185 個のクローンを得ることができ、擬陽性のクローンを除外したところ、37 個のクローンにおいて亜鉛フラグメントとの相互作用が考えられた。そこで、37 個のクローンについて DNA 配列解析を行ったところ、31 個のクローンではフレームシフトした異常タンパク質の発現が考えられたが、残り 6 個のクローンにおいて正常なタンパク質をコードしていることが分かった。また、これら 6 種類のタンパク質のうちの 2 種類は亜鉛イオンを結合するタンパク質であることも分かった。

そこで、亜鉛フラグメントと相互作用することが明らかとなった 2 種類の亜鉛結合タンパク質に着目し、全長の SOD1 タンパク質との相互作用を Y2H 法により検討したところ、抗生物質存在下では酵母は生育しなかった。SOD1 において亜鉛フラグメントに相当する領域はタンパク質内部に埋もれた状態にあるために、2 種類の亜鉛結合タンパク質は全長の SOD1 とは相互作用できないのではないかと考えられる。実際、SOD1 遺伝子の途中で終止コドンを導入することで、C 末側を切除した SOD1 断片を作製し、亜鉛結合タンパク質との相互作用を Y2H 法により検討したところ、Leu84 以降を切除した SOD1^{L84X}、及び、Pro62 以降を切除した SOD1^{P62X} と相互作用することが分かった。つまり、SOD1 において、C 末端側の領域が亜鉛結合タンパク質との相互作用を阻害していると考えられた。

本研究において同定された 2 種類の亜鉛結合タンパク質は、いずれも生理機能が未知であるものの、亜鉛フィンガーモチーフ (ZnF) がタンデムに連なったタンパク質であることが一次配列をもとに予測された。ZnF は亜鉛イオンを結合して構造を形成し、DNA 結合などの機能を果たすことが知られている。よって、亜鉛結合タンパク質は SOD1 の亜鉛イオン結合領域を認識し、ZnF に結合した亜鉛イオンを SOD1 に供給する亜鉛シャペロンではないかと期待した。しかし、SOD1 の亜鉛フラグメントと相互作用している領域は、タンデムに連なった ZnF ではなく、その N 末端側の領域 (Nterm) であることが分かった。以上より、本研究により同定された亜鉛結合タンパク質が SOD1 への亜鉛イオン

の結合を制御する亜鉛シャペロンであるのかは未だ定かでないものの、通常はSOD1の内部に埋もれている亜鉛イオン結合領域と特異的に相互作用することができるアミノ酸配列(Nterm)を同定することに成功した。SOD1内部構造の露出(ミスフォールディング)は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症の原因になることが提案されていることを考慮すると、Ntermを利用することでSOD1のミスフォールディングをターゲットとした疾患の予防・治療法開発への展開も可能になるのではないかと期待される。

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7件)

Eiichi Tokuda, Itsuki Anzai, Takao Nomura, Keisuke Toichi, Masahiko Watanabe, Shinji Ohara, Seiji Watanabe, Koji Yamanaka, Yuta Morisaki, Hidemi Misawa, and Yoshiaki Furukawa, “Immunochemical characterization on pathological oligomers of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis” *Molecular Neurodegeneration*, 2017, 12, 2. DOI: 10.1186/s13024-016-0145-9, 査読有

Itsuki Anzai, Eiichi Tokuda, Atsushi Mukaiyama, Shuji Akiyama, Fumito Endo, Koji Yamanaka, Hidemi Misawa, and Yoshiaki Furukawa, “A misfolded dimer of Cu/Zn-superoxide dismutase leading to pathological oligomerization in amyotrophic lateral sclerosis” *Protein Science*, 2017, 26, 484-496. DOI: 10.1002/pro.3094, 査読有

Itsuki Anzai, Keisuke Toichi, Eiichi Tokuda, Atsushi Mukaiyama, Shuji Akiyama, and Yoshiaki Furukawa, “Screening of Drugs Inhibiting In vitro Oligomerization of Cu/Zn-Superoxide Dismutase with a Mutation Causing Amyotrophic Lateral Sclerosis” *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2016, 3, 40. DOI: 10.3389/fmolb.2016.00040, 査読有

Yoshiaki Furukawa, Yoh Suzuki, Mami Fukuoka, Kenichi Nagasawa, Kenta Nakagome, Hideaki Shimizu, Atsushi Mukaiyama, and Shuji Akiyama, “A molecular mechanism realizing sequence-specific recognition of nucleic acids by TDP-43” *Scientific Reports*, 2016, 6, 20576. DOI: 10.1038/srep20576, 査読有

Yoshiaki Furukawa, Itsuki Anzai, Shuji Akiyama, Mizue Imai, Fatima Joy Consul Cruz, Tomohide Saio, Kenichi Nagasawa, Takao Nomura, and Koichiro Ishimori, “Conformational Disorder of the Most Immature

Cu,Zn-Superoxide Dismutase Leading to Amyotrophic Lateral Sclerosis” *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291, 4144-4155. DOI: 10.1074/jbc.M115.683763, 査読有

Eiichi Tokuda and Yoshiaki Furukawa, “Copper homeostasis as a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations” *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17, 636. DOI: 10.3390/ijms17050636, 査読有

Mariko Ogawa, Hisashi Shidara, Kotaro Oka, Masaru Kurosawa, Nobuyuki Nukina, and Yoshiaki Furukawa, “Cysteine residues in Cu,Zn-superoxide dismutase are essential to toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 463, 1196-1202. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.084, 査読有

[学会発表](計13件)

小久保鉄平、櫻井靖之、古川良明「金属タンパク質の活性化におけるシステイン残基の二元的役割」**日本化学会第97春季年会** 慶應義塾大学(神奈川県・横浜市)2017年3月16-19日

福岡真実、古川良明「銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼの「完全活性化」を制御するメカニズム」**日本化学会第97春季年会** 慶應義塾大学(神奈川県・横浜市)2017年3月16-19日

Yoshiaki Furukawa, “A chaperone-independent maturation mechanism of Cu/Zn-superoxide dismutase” *5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry*, Kolkata (India) January 7 - 11, 2017

Yoshiaki Furukawa, Teppei Kokubo, and Yasuyuki Sakurai, “A dual role of cysteine residues in the activation of Escherichia coli Cu/Zn-superoxide dismutase” *8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference*, Auckland (New Zealand) December 4 - 9, 2016

Mami Fukuoka and Yoshiaki Furukawa, “A mechanism on the allosteric activation of Cu/Zn-superoxide dismutase” *8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference*, Auckland (New Zealand) December 4-9, 2016

古川良明 “A quest for metallochaperone supplying a Zn ion to Cu/Zn-superoxide dismutase” **第39回日本分子生物学会年会** パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)2016年11月30日-12月2日

古川良明、小久保鉄平、櫻井靖之 “A dual role of cysteine residues in the activation of *Escherichia coli* Cu,Zn-superoxide dismutase”
第26回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 北海道大学(北海道・札幌市) 2016年6月17-18日

小久保鉄平、櫻井靖之、古川良明「抗酸化酵素の活性発現を可能にする金属イオンの新たな獲得メカニズム」**日本化学会第96春季年会** 同志社大学(京都府・京田辺市) 2016年3月24-27日

福岡真実、長野功、古川良明「細胞内銅イオン輸送を可能にする銅シャペロンのドメイン構造」**日本化学会第96春季年会** 同志社大学(京都府・京田辺市) 2016年3月24-27日

Kyohei Onose, Yuko Nishiura, and Yoshiaki Furukawa “A mechanism describing pathological oligomerization of SOD1 in a budding yeast model” **日本生物物理学会第53回年会** 金沢大学(石川県・金沢市) 2015年9月13-15日

Mami Fukuoka, Isao Nagano, and Yoshiaki Furukawa “A new mechanism of SOD1 activation regulated by copper chaperone in *Clonorchis sinensis*” **日本生物物理学会第53回年会** 金沢大学(石川県・金沢市) 2015年9月13-15日

Teppei Kokubo, Yasuyuki Sakurai, and Yoshiaki Furukawa “A new intramolecular route to acquire metal ions in superoxide dismutase” **日本生物物理学会第53回年会** 金沢大学(石川県・金沢市) 2015年9月13-15日

Yoshiaki Furukawa “Lights and shadows of Cu,Zn-superoxide dismutase” *The 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, Beijing(China) July 20-24, 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.keio.ac.jp/~furukawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 良明 (FURUKAWA YOSHIAKI)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：40415287