

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3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770162

研究課題名（和文） 生体内銅イオン輸送を制御する蛋白質間分子認識メカニズム

研究課題名（英文） Molecular recognition of proteins regulating transport of copper ions in cells

研究代表者

古川 良明 (FURUKAWA YOSHIKI)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：40415287

研究成果の概要（和文）：

生体内における銅イオン輸送を制御するタンパク質間分子認識のメカニズムを解明するために、銅シャペロン（CCS）と含銅酵素（SOD1）との間に見られる会合・解離のプロセスに着目した。CCSはSOD1に銅イオンを輸送するためのタンパク質で、三つのドメインから構成されている。本課題では、SOD1との相互作用に重要であるドメイン（CCS-dII）を精製し、SOD1と会合するために必要な条件を生化学的手法により明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To reveal a molecular mechanism regulating the intracellular transport of copper ions, I have noted specific interactions between a copper chaperone, CCS, and a copper-requiring enzyme, SOD1. Inside cells, a copper-bound form of CCS specifically recognizes apo SOD1 and then delivers a copper ion to SOD1. CCS consists of three domains, among which a central domain (CCS-dII) plays a role in recognizing SOD1. In this study, I have performed *in vitro* biochemical tests using recombinant CCS-dII and SOD1 proteins and found the requirements for these two proteins to associate with each other.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：銅シャペロン蛋白質、SOD1、ジスルフィド結合、蛋白質間分子認識

1. 研究開始当初の背景

SOD1は銅・亜鉛イオンを結合することで、抗酸化酵素としての活性を発現する。酸化ストレスの軽減を担うSOD1活性は寿命と相関があると言われ、SOD1がその活性中心である銅イオンを確保することは、生命維持に関わる重要なプロセスである。これまでに

私は、銅シャペロン蛋白質 CCS が SOD1 を特異的に認識し、SOD1 に銅イオンを導入するメカニズムについて国内外に先駆けて報告してきた。銅イオン結合型 CCS は、銅イオンを持たない SOD1 と複合体を形成することで銅イオンを SOD1 に運び、その後、CCS は SOD1 から速やかに解離する。つまり、SOD1 の活

性化には、SOD1/CCS 間での会合・解離という相反するプロセスが必要であるものの、それらを制御する分子メカニズムについては未だ明らかでない。

SOD1 と同様に、CCS も銅・亜鉛イオンを結合することが知られている。翻訳後に生じる修飾プロセスは蛋白質の構造を変化させることから、金属イオンの結合は SOD1/CCS 間の相互作用を制御している可能性が十分に考えられる。そこで、SOD1 及び CCS における金属イオン結合に伴う両蛋白質間の相互作用変化を検出することで、細胞内における SOD1/CCS 間の認識メカニズムを新たに構築できるのではないかと考えた。

さらに私は、SOD1 に変異が存在すると、金属イオンの結合が正常に行われず、変異 SOD1 が不溶性の塊（凝集体）を形成し神経変性疾患 ALS を引き起こすことを報告してきた。しかし、ALS 変異が SOD1 の金属イオン結合などを阻害するメカニズムに関しては明らかとなっていない。SOD1 における銅イオン結合は CCS が制御していることから、ALS 変異により SOD1/CCS 間認識に異常が生じていることが十分に考えられる。そこで、SOD1 における ALS 変異が SOD1/CCS 間相互作用に与える影響を生化学的手法により明らかとし、ALS 治療法開発のための新たな分子基盤を確立したいと考えた。

2. 研究の目的

本課題の目的は、SOD1/CCS 蛋白質に焦点を当て、生体内における銅イオン輸送を制御する蛋白質間分子認識メカニズムを解明することである。銅イオンは必須微量金属イオンの一つであることから、その細胞内輸送に関する制御メカニズムを解明することは、生命機能の理解につながる非常に重要な研究である。特に、蛋白質に施される翻訳後のプロセスに着目し、それらが SOD1/CCS 間の会合・解離を制御する因子として機能することを明らかにする。

さらに、SOD1/CCS 間の相互作用異常が神経変性疾患 ALS の発症原因となりうる分子病理メカニズムを明らかにする。先に述べたように、SOD1 への金属イオン結合が正常に行われなければ、ミスフォールディングが促進され、不溶性の凝集体となる。実際、SOD1 遺伝子の変異を伴う家族性 ALS では、変異 SOD1 から構成される封入体が形成し、それらが神経細胞内に蓄積することが知られている。よって、ALS 変異が SOD1/CCS 間の相互作用に及ぼす影響を明らかにすることで、SOD1 のミスフォールディングを抑制する手法を検討し、ALS の治療法開発に向けた新たなストラテジーを提供することも本課題の

目的である。以上のように、蛋白質間分子認識の制御が生命機能の維持に果たす役割について、その理解を目指す。

3. 研究の方法

まず、SOD1 及び CCS 遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸菌にトランスフォームし、各々のリコンビナント蛋白質を大量に合成した。CCS は三つのドメインからなる蛋白質で、N 末端側より 2 番目に位置するドメイン（CCS-DII）が SOD1 との相互作用に重要であることが示唆されている。そこで、大腸菌内での CCS-DII の発現系を構築し、可溶性蛋白質として回収できる培養条件を見出した。さらに、CCS-DII には、あらかじめ、連続したヒスチジンからなるタグを N 末端側に融合させておくことで、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーを用いた精製を可能とした。一方で、SOD1 を大腸菌内に過剰発現させると、不溶性の封入体を形成し、可溶性蛋白質としての回収が困難であった。しかし、SOD1 の構造安定化に寄与するとされる亜鉛イオンを添加し、さらに低温下での培養を行うことで、SOD1 の封入体化を防ぎ可溶性蛋白質として精製できることを見出した。

さらに、精製した CCS-DII および SOD1 には、銅・亜鉛イオンが結合したものが一部含まれているため、それらをトリクロロ酢酸による処理で除去する手法を開発し、均一なアポ型蛋白質を作製した。各々の蛋白質への亜鉛イオン結合は、亜鉛イオン特異的なキレート剤を用いたり、あるいはコバルトイオンを代わりに添加したりすることによって、分光学的に定量的なキャラクタリゼーションを行った。

CCS-DII および SOD1 の両蛋白質間での会合過程については、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて検討を行った。しかし、両蛋白質の分子量が比較的近いことから（CCS-DII, 16.3 kDa; SOD1, 15.8 kDa）、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、280nm の吸光度変化を追跡するだけでは、どちらの蛋白質に由来する溶出ピークであるのか判断することが困難であった。そこで、クロマトグラムにおける各フラクションを電気泳動法により解析する手法を開発し、CCS-DII 及び SOD1 の会合状態を検討した。

4. 研究成果

SOD1 はスーパーオキシドの除去を触媒する酵素であり、活性中心である銅イオンと、構造の安定化に関わる亜鉛イオンを結合することで活性化する。私はこれまでに、活性型 SOD1 は強固な二量体を形成するものの、銅・亜鉛イオンが解離した（アポ型）SOD1 は

単量体化しやすいことを明らかとしてきた。つまり、金属イオンの結合は SOD1 の四次構造を制御する重要な因子である。

本課題で着目した CCS-DII は、SOD1 と非常に類似した立体構造を有しており、亜鉛イオンの結合を担うアミノ酸残基についても保存されている。実際、CCS-DII が亜鉛イオンを結合することは、分光学的手法により確認することができた。また、亜鉛イオンを結合していないアポ型 CCS-DII は、単量体として存在するのに対して、亜鉛イオンを結合すると自己会合し二量体となることを明らかにすることができた。つまり、SOD1 と同様に、CCS の四次構造形成において、金属（亜鉛）イオン結合は重要な因子であることが分かった。

さらに興味深いことに、アポ型の CCS-DII は、SOD1 と会合することがなかったものの、亜鉛イオンを結合した CCS-DII は SOD1 とのヘテロ会合体を形成することが示唆された。亜鉛イオン結合は、SOD1 及び CCS-DII における各々の自己会合過程のみならず、両蛋白質間での特異的な分子認識を制御する可能性を考えることができた。

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 Feng Ding, Yoshiaki Furukawa, Nobuyuki Nukina, and Nikolay V. Dokholyan; “Local Unfolding of Cu, Zn Superoxide Dismutase Monomer Determines the Morphology of Fibrillar Aggregates”, **Journal of Molecular Biology**, 2012, in press, 査読有
- ② Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, and Nobuyuki Nukina; “Molecular Properties of TAR DNA Binding Protein-43 Fragments are Dependent upon Its Cleavage Site”, **Biochimica et Biophysica Acta**, 2011, 1812, 1577-1583, 査読有
- ③ Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, and Nobuyuki Nukina; “Tau Protein Assembles into Isoform- and Disulfide-dependent Polymorphic Fibrils with Distinct Structural Properties”, **The Journal of Biological Chemistry**, 2011, 286, 27236-27246, 査読有
- ④ Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Shoji Watanabe, Koji Yamanaka, and Nobuyuki Nukina; “A Seeding

Reaction Recapitulates Intracellular Formation of Sarkosyl-insoluble Transactivation Response Element (TAR) DNA-binding Protein-43 Inclusions”, **The Journal of Biological Chemistry**, 2011, 286, 18664-18672, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 古川 良明; 「タンパク質の線維化による神経変性疾患 ALS の病態制御メカニズム」、先端融合科学シンポジウム「タンパク質アセンブリー会合、超分子化、凝集」、2012 年 2 月 1 日、神戸大学・六甲台キャンパス
- ② Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Shoji Watanabe, Koji Yamanaka, and Nobuyuki Nukina; “A Seeded Aggregation of TDP-43 Reproduces the Intracellular Formation of Sarkosyl-Insoluble Inclusions”, 22nd International Symposium on ALS/MND, 2011 年 12 月 1 日、シドニー (オーストラリア)
- ③ 東 圭祐, 古川 良明; “A Thiol-disulfide Status in SOD1 Controls Distinct Pathways for Aggregate Formation in Amyotrophic Lateral Sclerosis”, 日本生物物理学会第 49 回年会、2011 年 9 月 16 日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス
- ④ 三 富 康 司, 古川 良明; “Morphological and Biochemical Properties of Protein Aggregates Controlled by “Post-aggregation Modifications””, 日本生物物理学会第 49 回年会、2011 年 9 月 16 日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス
- ⑤ 古川 良明; “Polymorphism of Protein Aggregates Produced by Genetic and Chemical Modifications”, 日本生物物理学会第 49 回年会、2011 年 9 月 17 日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス
- ⑥ 古川 良明, 金子 貢巳, 貫名 信行; 「タウが形成するジスルフィド結合依存的な線維構造とその多型発現のメカニズム」、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 7 日、ホテル阪急エキスポパーク

[図書] (計 1 件)

- ① Yoshiaki Furukawa; InTech, “Amyotrophic Lateral Sclerosis”, 2012, 335-356

[その他]

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

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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし