

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657093

研究課題名(和文)細胞内銅イオン輸送に関する構成論的理解への挑戦

研究課題名(英文)In vitro reconstitution of intracellular copper transport system

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：銅イオンは必須微量元素の一つであり、タンパク質に結合することで各種の酵素活性の中心として機能している。一方で、遊離状態の銅イオンは活性酸素の発生を触媒することで毒性を発揮することがあるため、その細胞内動態は厳密に制御されねばならない。そこで本課題では、銅結合酵素であるSOD1への銅イオン輸送経路に着目し、細胞内での銅イオンの「流れ」を制御するメカニズムの解明を行った。特に、細胞内に銅イオンを取り込む輸送体であるCTR1と銅シャペロンCCSとの相互作用について解析を行い、SOD1への銅イオン供給を試験管内で再現することができるのかを検討することを最終的な目標として研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：A copper ion is one of the metal ions essential for our life and often functions as an active center of enzymatic reactions in various proteins. Despite this, a free copper ion can be toxic because of its high redox activity that catalytically produces reactive oxygen species. Intracellular copper ions are hence necessary to be well regulated in terms of their localization and amounts. In this study, I have focused upon the intracellular pathway for transferring a copper ion to the copper-containing enzyme, SOD1. An extracellular copper ion has been known to enter into the cell via a copper transporter, CTR1; a copper chaperone, CCS, then delivers the copper ion to SOD1. The ultimate goal of this study is to reconstitute the copper transfer system in a test tube by using CTR1, CCS, and SOD1.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：タンパク質 分子認識 銅イオン

## 1. 研究開始当初の背景

銅イオンは必須微量元素の一つであり、タンパク質に結合することで各種の酵素活性の中心として機能している。一方で、遊離状態の銅イオンは活性酸素の発生を触媒することで毒性を発揮することがあるため、その細胞内動態は厳密に制御されねばならない。実際、銅イオン特異的な輸送体 CTR1 を通じて銅イオンが細胞内へと取り込まれ、引き続き細胞内では、「銅シャペロン」と呼ばれる銅イオン特異的な運び屋タンパク質が銅イオンを銅結合酵素に供給する。私はこれまでに、銅結合酵素の一つである Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) とその銅シャペロンである CCS に着目し、銅イオン輸送の分子メカニズムを明らかにしてきた (*EMBO J* 2004, *PNAS* 2006, *JBC* 2008, 2010 など)。特に、銅イオンを結合した CCS は、銅イオンを持たないアポ型の SOD1 を特異的に認識することができることを明らかにした。また、CCS は SOD1 に銅イオンを供給するとともに、SOD1 の分子内にジスルフィド結合を導入することで銅イオンの供給プロセスを完結させ、SOD1 の構造安定化に寄与していることを明らかにした。

SOD1 は銅イオンを酵素活性の中心として活性酸素を除去する酵素で、様々な生理現象を制御していることが知られている。また、SOD1 の構造が安定化を受けることができなければ、ミスフォールディングすることで線維状の凝集体となり、神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症の発症に寄与することが知られている。つまり、CCS による SOD1 への銅イオンの供給と構造の安定化は、生命現象を維持する上で非常に重要なプロセスであると言える。しかし、細胞内での銅イオン輸送を制御するメカニズムについては未だ多くの点が明らかとなっていない。特に、細胞内に取り込まれた銅イオンがどのように CCS に代表される銅シャペロンへと渡されるのか、そのメカニズムについては不明である。

## 2. 研究の目的

そこで本課題では、SOD1 への銅イオン輸送経路に着目し、細胞内での銅イオンの「流れ」を制御するメカニズムの解明を行った。そのために、細胞内に銅イオンを取り込む輸送体である CTR1 と銅シャペロン CCS との相互作用について解析を行い、CTR1・CCS・SOD1 の三つが揃うことで、SOD1 への銅イオン供給を試験管内で再現することができるのかを検討することを最終的な目標として研究を進めた。さらに、SOD1 のミスフォールディング・凝集に関する研究を進めることで、銅イオン輸送システムの破綻がもたらす病理現象についての理解も試みた。

## 3. 研究の方法

まず、出芽酵母由来の CCS 及び CTR1 に着目し、大腸菌に大量発現させた後に、各種のクロマトグラフィーにより精製した。次に、CTR1 に銅イオンを結合させる手法を確立し、銅イオン結合型 CTR1 を調製した。銅イオン結合型 CTR1 と CCS を試験管内で混合し、一定時間後に、サイズ排除クロマトグラフィーを利用することで両タンパク質を分離した。各々のタンパク質の溶出画分に含まれる銅イオンを比色法により定量し、CTR1 から CCS に銅イオンが移動するか検討した。

また、銅イオンを結合していない SOD1 タンパク質の調製を行い、そのミスフォールディング・凝集を溶液濁度の変化を指標として追跡した。さらに、銅イオン結合プロセスの破綻に伴う SOD1 の構造変化についても、MALDI-TOF 質量分析法を応用した手法により検討した。

## 4. 研究成果

出芽酵母の CCS 及び CTR1 の遺伝子クローニングを行い、大腸菌での大量発現を試みた。CCS については、特に問題なく可溶性タンパク質として発現し、アフィニティークロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーにより精製することに成功した。また、大腸菌から精製した CCS には銅イオンは結合していないことも、銅イオンの比色定量法により確認することができた。一方で、CTR1 は膜タンパク質であるためか、大腸菌を用いた発現システムでは大量調製することが非常に困難であることが分かった。そこで、CTR1 が、その C 末端側に存在するドメイン (CTR1<sup>C</sup>) を細胞質側となるように膜上に配置されていることから、CTR1<sup>C</sup> ドメインが銅シャペロンとの相互作用を行う部位であると考え、出芽酵母由来の CTR1<sup>C</sup> を作製・精製した。その結果、大腸菌内に比較的多量に発現することが分かり、以降の研究では CTR1<sup>C</sup> を用いて CCS との銅イオン輸送に関して検討した。

まず、銅イオン結合型の CTR1<sup>C</sup> を作製するために、精製した CTR1<sup>C</sup> に Cu<sup>+</sup> イオンを滴下したものの、銅結合型 CTR1<sup>C</sup> (Cu-CTR1<sup>C</sup>) は得られなかった。CTR1<sup>C</sup> は 6 つのシステイン残基を配位子として、4 つの Cu<sup>+</sup> イオンを結合することが示唆されている。しかし、電気泳動法による解析の結果、大腸菌で発現させ各種のクロマトグラフィーにより精製した CTR1<sup>C</sup> のシステイン残基は、酸化されて分子間でジスルフィド結合を形成し、CTR1<sup>C</sup> は多量体として存在していることが分かった。そこで、CTR1<sup>C</sup> に形成したジスルフィド結合を効率よく還元する手法を確立し、得られた還元型 CTR1<sup>C</sup> に Cu<sup>+</sup> イオンを滴下すると、約 4 当量の Cu<sup>+</sup> イオンを結合した Cu-CTR1<sup>C</sup> を作製できることが、分光学的手法により明ら

かとなった。Cu-CTR1<sup>C</sup>から CCS への銅イオン移動は、アポ型の CCS (apo-CCS) と Cu-CTR1<sup>C</sup>を混合し、37 °C で 1 時間インキュベートすることで検討した。反応後、CCS と CTR1<sup>C</sup>をサイズ排除クロマトグラフィーにより分離し、CCS を含む分画について、タンパク質及び銅イオンの比色定量を行った結果、CCS は銅イオンを結合していることが分かった。Apo-CTR1<sup>C</sup>と apo-CCS を混合した場合や、apo-CCS のみを用いた際には、銅イオンが検出されなかったことから、CTR1<sup>C</sup>に結合した Cu<sup>+</sup>イオンが CCS に移動したと考えられる。よって、細胞内においても、CCS は CTR1 から直接に銅イオンを受け取っている可能性を示唆することができた。

また、銅イオンを結合していない SOD1 は、その熱安定性が低下することで構造が変化し、分子内に形成したジスルフィド結合が異性化することで、その位置を変化させることが分かった。さらに、ジスルフィド結合の異性化が分子間で生じることで、ジスルフィド結合でクロスリンクされた不溶性のオリゴマーを形成することも明らかにすることができた。CTR1-CCS-SOD1 で構成される銅イオン輸送経路に障害が生じると、SOD1 に銅イオンが供給されなくなり、その結果、SOD1 のタンパク質構造が不安定化し、ジスルフィド結合の異性化などを通じて凝集することが考えられる。つまり、銅イオン輸送経路が破綻することで、筋萎縮性側索硬化症の発症リスクが高まる可能性を提案することができた。

#### 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 6 件)

1: Mariko Ogawa and Yoshiaki Furukawa; "A seeded propagation of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis" *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014 年, 8 巻, 1-5 頁, doi: 10.3389/fncel.2014.00083 (査読有)

2: Takao Nomura, Shoji Watanabe, Kumi Kaneko, Koji Yamanaka, Nobuyuki Nukina, and Yoshiaki Furukawa; "Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis" *The Journal of Biological Chemistry*, 2014 年, 289 巻, 1192-1202 頁, doi: 10.1074/jbc.M113.516492 (査読有)

3. Yoshiaki Furukawa; "Redox environment is an intracellular factor to operate distinct pathways for aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis" *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013 年, 7 巻, 1-9 頁,

doi: 10.3389/fncel.2013.00240 (査読有)

4. Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Shoji Watanabe, Koji Yamanaka, and Nobuyuki Nukina; "Intracellular seeded aggregation of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis" *FEBS Letters*, 2013 年, 587 巻, 2500-2505 頁, doi: 10.1016/j.febslet.2013.06.046 (査読有)

5. Keisuke Toichi, Koji Yamanaka, and Yoshiaki Furukawa; "Disulfide scrambling describes the oligomer formation of SOD1 proteins in the familial form of ALS" *The Journal of Biological Chemistry*, 2013 年, 288 巻, 4970-4980 頁, doi: 10.1074/jbc.M112.414235 (査読有)

6. Yoshiaki Furukawa and Nobuyuki Nukina; "Functional diversity of protein fibrillar aggregates from physiology to RNA granules to neurodegenerative diseases" *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013 年, 1832 巻, 1271-1278 頁, doi: 10.1016/j.bbadis.2013.04.011 (査読有)

[学会発表](計 10 件)

1. 若原 裕磨、本田 一起、古川 良明「亜鉛イオンが制御する細胞内銅イオン輸送のメカニズム」*日本化学会第 94 春季年会*(名古屋大学) 2014 年 3 月 27-30 日

2. 古川 良明「Neurodegeneration: Breakdown of a metal binding process in proteins」*錯体化学会第 63 回討論会*(琉球大学) 2013 年 11 月 2-4 日

3. 若原 裕磨、本田 一起、古川 良明「亜鉛イオンが制御する銅シャペロンシステムの分子認識メカニズム」*日本生物物理学会第 51 回年会*(国立京都国際会館) 2013 年 10 月 28-30 日

4. 中込 健太、三富 康司、古川 良明「SOD1 への細胞内銅イオン輸送を制御するタンパク質ネットワーク」*日本生物物理学会第 51 回年会*(国立京都国際会館) 2013 年 10 月 28-30 日

5. Yoshiaki Furukawa, Kazuki Honda, and Yuma Wakahara; "Molecular recognition of SOD1 by its copper chaperone protein CCS: interplay of zinc ion and disulfide bond controls intracellular copper transport" *16<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, Grenoble, France, July 22-26, 2013

6. Yasuyuki Sakurai and Yoshiaki Furukawa; "The Activation Mechanism of Bacterial Cu,Zn-Superoxide Dismutase" *16<sup>th</sup> International*

*Conference on Biological Inorganic Chemistry,*  
Grenoble, France, July 22-26, 2013

7. 若原 裕磨、本田 一起、古川 良明「銅シャペロンタンパク質 CCS による SOD1 の特異的な分子認識メカニズム」**新規素材探索研究会第12回セミナー**(新横浜フジビューホテル) 2013年6月7日

8. 本田 一起、古川 良明「金属シャペロン CCS による SOD1 の特異的な分子認識メカニズム」**第12回日本蛋白質科学会年会**(名古屋国際会議場) 2012年6月20-22日

9. 清水 将裕、古川 良明「構成論的アプローチによる生体内銅イオン輸送の制御機構解明」**日本化学会第93春季年会**(立命館大学) 2013年3月22-25日

10. 本田 一起、古川 良明「ジスルフィド結合形成が制御する銅シャペロンタンパク質の特異的な分子認識メカニズム」**日本化学会第93春季年会**(立命館大学) 2013年3月22-25日

〔図書〕(計2件)

1. 古川 良明「筋萎縮性側索硬化症におけるタンパク質の線維化とシーディング現象」**遺伝子医学MOOK26号 脳内環境-恒常性維持機構の破綻と病気**(高橋良輔、漆谷真、山中宏二、樋口真人 編集) 2014年、印刷中

2. Yoshiaki Furukawa; "Polymorphism of Tau fibrils" In *Bio-Nanoimaging: Insights into Protein Misfolding and Aggregation* (Uversky, V. and Lyubchenko, Y. Eds), published by Elsevier, 2014, 213-222

〔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