

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291028

研究課題名(和文) 酸素分子が制御する細胞内タンパク質への銅イオン供給メカニズム

研究課題名(英文) A mechanism regulating the copper acquisition by intracellular proteins

## 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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：銅イオンは生命活動に必須の構成成分で、さまざまなタンパク質と結合することにより、酵素活性の中心として機能している。生体内での存在量は微量なレベル(成人で80 mg)に調節され、遺伝的要因や過剰な摂取・欠乏による濃度異常は多くの疾患の原因となる。本課題の遂行により、生体内におけるタンパク質への銅イオン輸送メカニズムの一端が明らかとなり、銅イオン輸送制御の破綻が発症要因となるヒト疾患の病理メカニズムについても、その知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Copper ion is essential to various physiologies. Most of the copper ions in our bodies exist as the protein-bound form and function as active sites for enzymatic reactions. Also, the level of copper ions in our bodies is strictly controlled, and even slight deviation of the copper ions in physiological conditions will lead to pathological conditions and sometimes fatal diseases. Here, we investigated the mechanism regulating the acquisition of copper ions by intracellular proteins and also examined the molecular pathomechanism of the disease caused by the mis-regulation of copper metabolism in the cell. More precisely, we have noted the activation mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1), which requires a copper ion for its enzymatic activity. Also, conformational changes of SOD1 upon dissociation of metal ions have been examined and discussed in relation to the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis.

研究分野：生物無機化学

キーワード：銅シャペロン 神経変性疾患 タンパク質フォールディング SOD1 タンパク質凝集 筋萎縮性側索硬化症

### 1. 研究開始当初の背景

銅イオンは生命活動に必須の構成成分で、さまざまなタンパク質と結合することにより、酵素活性の中心として機能している。生体内での存在量は微量なレベル(成人で80 mg)に調節され、遺伝的要因や過剰な摂取・欠乏による濃度異常は多くの疾患の原因となる。例えば、神経細胞での銅イオンの異常蓄積は、アルツハイマー病などの神経疾患と関連することが指摘され、本研究グループも疾患発症における銅イオンの役割について分子レベルでの解明を試みてきた。

多くの生命現象において銅イオンの生理・病理的役割が重要視される一方で、細胞内への銅イオン導入経路や、細胞内での銅イオン輸送経路については、未だ明らかでない点が多い。特に、遊離(水和)した状態にある銅イオンは、活性酸素を発生させる触媒(フェントン反応)として毒性を発揮しうするため、その生体内での動態は厳密に制御されていなければならない。実際、細胞内では「銅シャペロン」と呼ばれる銅イオン運び屋タンパク質が、銅イオンを結合して目的タンパク質まで運搬しており、銅イオンは遊離状態になることなく、その潜在的な毒性はうまく回避されている。本研究グループではこれまでに、銅タンパク質であるCu,Zn-superoxide dismutase (SOD1)とその銅シャペロンであるCCSに着目し、銅イオン輸送を可能とする触媒サイクルを提案してきた。

非常に基本的ではあるが、銅シャペロンは、目的タンパク質を認識して銅イオンを供給した後、速やかに解離せねばならない。実際、CCSの細胞内濃度はSOD1のその1/10程度であるにもかかわらず、ほぼ全ての細胞内SOD1は銅イオンを結合し活性を有している。つまり、銅シャペロンは、目的タンパク質との会合・解離を繰り返すことで、触媒的に銅イオンを供給していると考えられる。しかし、銅イオンの細胞内動態を理解するためには、銅シャペロンへの銅イオンの供給経路や銅シャペロンの会合・解離の制御など、明らかにすべきメカニズムは多く残されている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、SOD1が酵素として活性化するためには、銅イオンを結合する必要がある点を利用して、生体内におけるタンパク質への銅イオン輸送メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、銅イオン輸送制御の破綻が発症要因となるヒト疾患にも着目することで、銅イオンの生体内動態を理解することを試みた。特に、変異型SOD1が原因となる神経変性疾患の一種、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に焦点をあて、SOD1への金属イオン結合プロセスの破綻がタンパク質構造に及ぼす影響を明らかにし、その病理学的役割の解明を進めた。

### 3. 研究の方法

本研究では、主に、精製タンパク質を用い

た *in vitro* での実験を行ったが、必要となるタンパク質については、大腸菌に過剰発現させることで調製し、His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーによる精製、及び、サイズ排除クロマトグラフィーによる精製を行った。精製したタンパク質サンプルは、電気泳動法によりほぼ単一のバンドであることを確認してから使用した。

また、タンパク質の構造的特徴については、円二色性分光法、多角度散乱法、及び、赤外分光法による解析を行った。また、二次元NMRを利用した残基レベルでのタンパク質構造変化の検討を行い、溶液中におけるタンパク質コンフォメーションについては、X線小角散乱を利用して解析を行った。その他、SDS-PAGEやウェスタンブロット法といった電気泳動を行うことで生化学的な解析についても進めたが、いずれも常法に従った。

### 4. 研究成果

本研究課題の成果は、以下の3点にまとめることができる。

(1)大腸菌由来のSodCタンパク質において、銅イオン、及び、亜鉛イオンの結合メカニズムを明らかにすることができた。特に、金属イオンの結合には分子内ジスルフィド結合の形成が必須であり、ジスルフィド結合が形成していなければ、その構造安定性が極度に低下し、大腸菌内では速やかに分解されてしまうことが分かった。つまり、SodCにおいては、ジスルフィド結合の形成と金属イオンの獲得がリンクしていることが考えられた。さらに、両プロセスが進行するためには酸素分子が必要であることも明らかにすることができた。嫌気条件下ではSodCへの金属イオンの取り込みは完結せず活性化しなかった。SodCはスーパーオキシドの不均化を行う抗酸化酵素であることから、酸素分子が存在しない環境下では、その活性化が必要でないと考えられ、非常に合理的な活性制御のメカニズムであると言える。SodCのジスルフィド結合は、真核生物由来のSOD1にも高度に保存されていることから、CCSに依存しなくても、自律的に銅イオンを取り込んで活性化できるのではないかと考えられる。

(2)SOD1への銅イオン供給を行うために必要となるCCSとのタンパク質間相互作用を制御する因子を明らかにすることができた。CCSは3つのドメインから構成され、中央のドメイン(CCS<sup>dll</sup>)がSOD1と類似した構造を有する。SOD1がホモ二量体を形成することを考慮すると、CCS<sup>dll</sup>はSOD1の二量体化を模倣することでSOD1を認識すると考えられる。そこで、CCS<sup>dll</sup>とSOD1の会合をサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により評価したところ、溶液中に亜鉛イオンを添加することで、CCS<sup>dll</sup>はSOD1と複合体を形成することが分かった。SOD1及びCCS<sup>dll</sup>には、Zn<sup>2+</sup>イオンの結合部位が存在することから、

CCSがSOD1を認識する際には亜鉛イオンが重要な役割を果たすと考えられる。つまり、遊離の亜鉛イオン濃度が非常に少ない細胞質内においては、CCSによるSOD1の活性化は亜鉛イオンが制御している可能性を示唆することができた。

(3)変異型SOD1はALSの発症要因であることが報告されており、一部の変異によって、金属イオンとの親和性が極度に低下することが知られている。つまり、金属イオンが解離したアポ型がALSの要因となる毒性の発揮に関わることが提案されている。本課題では、銅イオン、及び、亜鉛イオンを結合していないアポ型のSOD1タンパク質について、その構造的特徴を各種の分光法、ならびに、光散乱の技術を駆使することで明らかにした。具体的には、二次元NMRにより得られる部位特異的な揺らぎの情報と、X線小角散乱により得られる溶液中でのタンパク質コンフォメーションの情報を組み合わせることで、金属イオンの解離とS-S結合の切断に伴い、SOD1における一部のループ構造が揺らぎの大きな不規則構造に転移することが考えられた。このような劇的な構造変化がSOD1の異常な凝集を加速し、ALSの発症要因となる新たなメカニズム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11件)

1. Eiiichi 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
2. 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
3. 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. 査読有
4. 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. 査読有
5. Yasuyuki Sakurai, Itsuki Anzai, and Yoshiaki Furukawa  
“A primary role for disulfide formation in the productive folding of prokaryotic Cu,Zn-superoxide dismutase”  
*The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289, 20139-20149. 査読有
6. 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, 289, 1192-1202. 査読有
7. Mariko Ogawa and Yoshiaki Furukawa  
“A seeded propagation of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis”  
*Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, 8, Article 83 (doi: 10.3389/fncel.2014.00083). 査読有
8. 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, 7, Article 240 (doi: 10.3389/fncel.2013.00240). 査読有
9. 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, 587, 2500-2505. 査読有
10. 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, 288, 4970-4980. 査読有

11. Yoshiaki Furukawa and Nobuyuki Nukina  
 “Functional diversity of protein fibrillar aggregates from physiology to RNA granules to neurodegenerative diseases”  
*Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1832, 1271-1278. 査読有
- [学会発表](計29件)
1. 徳田栄一、森崎祐太、三澤日出巳、渡邊征爾、山中宏二、古川良明  
 「銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼの金属イオン結合状態を識別できる新規抗体の開発と筋萎縮性側索硬化症の病理解明への応用」  
**日本薬学会第136年会**, 2016/3/26-29, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  2. 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**, 2016/3/24-27, 同志社大学(京都府・京田辺市)
  3. 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ヤペロンのドメイン構造」  
**日本化学会第96春季年会**, 2016/3/24-27, 同志社大学(京都府・京田辺市)
  4. 安齋樹、向山厚、秋山修志、古川良明  
 「タンパク質の熱変性を通じて理解する神経変性疾患の発症メカニズム」  
**日本化学会第96春季年会**, 2016/3/24-27, 同志社大学(京都府・京田辺市)
  5. Yoshiaki Furukawa  
 “Protein conformational disorder leading to neurodegenerative diseases”  
**The 3<sup>rd</sup> Mini-Symposium on Cutting-Edge Chemistry**, 2016/3/11, Hsinchu (Taiwan)
  6. Yoshiaki Furukawa, Itsuki Anzai, Kennichi Nagasawa, Shuji Akiyama, Mizue Imai, and Koichiro Ishimori  
 “Lost in metallation: the disaster on a protein structure leading to neurodegeneration”  
**2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies**, 2015/12/15-20, Honolulu (USA)
  7. 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**, 2015/9/13-15, 金沢大学(石川県・金沢市)
  8. 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**, 2015/9/13-15, 金沢大学(石川県・金沢市)
  9. Kenichi Nagasawa, Takao Nomura, and Yoshiaki Furukawa  
 “A new peptide-based method to detect misfolded SOD1 proteins”  
**日本生物物理学会第53回年会**, 2015/9/13-15, 金沢大学(石川県・金沢市)
  10. 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**, 2015/9/13-15, 金沢大学(石川県・金沢市)
  11. 古川良明  
 「銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼの光と影：抗酸化機能と神経変性疾患」  
**第28回生物無機化学夏季セミナー**, 2015/8/28-30, 伊豆山喜旅館(静岡県・伊東市)
  12. Yoshiaki Furukawa  
 “Lights and shadows of Cu,Zn-superoxide dismutase”  
**The 17<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry**, 2015/7/20-24, Beijing (China)
  13. Carolyn Lim, Yoshiyuki Usami, and Yoshiaki Furukawa  
 “Fungal isolates with different pathotypes show distinct levels of SOD1 activity controlled by copper chaperone”  
**The 17<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry**, 2015/7/20-24, Beijing (China)
  14. 安齋樹、向山厚、秋山修志、古川良明  
 「神経変性疾患に関連した異常なタンパク質オリゴマーの形成メカニズム」  
**第42回生体分子科学討論会**, 2015/6/12-13, 高崎シティーギャラリー(群馬県・高崎市)
  15. Yoshiaki Furukawa  
 “A new maturation mechanism of metalloproteins regulated by formation of a disulfide bond”  
**Mini Symposium in IMS**, 2014/12/17, 分子科学研究所(愛知県・岡崎市)

16. Yoshiaki Furukawa  
 “Disulfide formation acts as a redox sensor for enzymatic activation of Cu,Zn-superoxide dismutase”  
*7<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference*, 2014/11/30-12/5, Gold Coast (Australia)
17. Yuma Wakahara and Yoshiaki Furukawa  
 “Molecular recognition in copper chaperone system is regulated by Zn ion”  
*7<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference*, 2014/11/30-12/5, Gold Coast (Australia)
18. Yoshiaki Furukawa  
 “A molecular mechanism of bacterial superoxide dismutase regulated by disulfide formation”  
*The 7<sup>th</sup> Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations*, 2014/11/26-28, Seoul (South Korea)
19. 古川良明  
 「ジスルフィド結合が制御するSOD1タンパク質の凝集メカニズム」  
 2014 **タウ研究ミーティング**, 2014/8/1, 同志社大学東京オフィス(東京都・中央区)
20. 古川良明  
 「タンパク質の凝集に関わる実験的諸問題について」  
**第14回日本蛋白質科学会年会**, 2014/6/25-27, ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)
21. 安齋樹、東一圭祐、古川良明  
 「筋萎縮性側索硬化症に見られる銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼの異常オリゴマー化とその抑制法の開発」  
**日本化学会第94春季年会**, 2014/3/27-30, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
22. 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**, 2014/3/27-30, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
23. 櫻井靖之、古川良明  
 「ジスルフィド結合による銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ活性の制御メカニズム」  
**日本化学会第94春季年会**, 2014/3/27-30, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
24. 古川良明、鈴木陽、清水英明  
 「DNA/RNA 結合タンパク質 TDP-43 の塩基配列認識に高い選択性を与えるメカニズム」  
**日本化学会第94春季年会**, 2014/3/27-30, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
25. Yoshiaki Furukawa  
 “Neurodegeneration: Breakdown of a metal binding process in proteins”  
**錯体化学会第63回討論会**, 2013/11/2-4, 琉球大学千原キャンパス(沖縄県・中頭郡)
26. Takao Nomura and Yoshiaki Furukawa  
 “Conformational alteration of SOD1 by disulfide formation: epitope analysis of antibody specifically recognizing SOD1 with a disulfide bond”  
**4<sup>th</sup> Asia-Pacific International Peptide Symposium**, 2013/11/6-8, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)
27. 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**, 2013/7/22-26, Grenoble (France)
28. Yasuyuki Sakurai and Yoshiaki Furukawa  
 “The activation mechanism of bacterial Cu,Zn-superoxide dismutase”  
**16<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry**, 2013/7/22-26, Grenoble (France)
29. Yoshiaki Furukawa, Takao Nomura, Shoji Watanabe, Kumi Kaneko, Koji Yamanaka, and Nobuyuki Nukina  
 “Amyloid-like fibrillation of FUS is triggered by a pathogenic mutation in a familial form of amyotrophic lateral sclerosis”  
**第36回日本神経科学大会**, 2013/6/20-23, 国立京都国際会館(京都府・京都市)
- 〔図書〕(計3件)
1. 古川良明  
 「タンパク質を再現性よく凝集させるコツ」  
**実験医学** 1月号, 羊土社, 2015, 93-97
2. 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MOOK 26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), メディカル ドウ出版, 2014, 153-157
3. Yoshiaki Furukawa

“Chapter 19: 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

### (3)連携研究者

野村 尚生 (NOMURA, Takao)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：90597840