

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子 DJ-1 の機能と創薬応用

平成 1 5 年度 総括研究報告書

主任研究者 有賀寛芳

平成 1 6 年 (2004) 年 4 月

## 目次

I 総括研究報告	
パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子 DJ 1 の機能と創薬応用 有賀寛芳	— 1
II 研究成果の刊行に関する一覧表	— 7
III 研究成果の刊行物・別刷	— 8

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総括研究報告書

パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子 DJ 1 の機能と創薬応用

主任研究者 有賀寛芳 北海道大学大学院薬学研究科教授

研究要旨

本研究室で新規癌遺伝子として単離同定した DJ 1 は昨年度家族性パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子として同定され、DJ 1 の機能解析と DJ 1 が関与するパーキンソン病発症機構の解明を目的として本研究がスタートした。DJ-1 は細胞増殖、受精、癌、不妊、パーキンソン病と多機能を有するか、本来の機能は転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼであることが明らかとし、これらのいずれかの欠損もパーキンソン病発症原因となる。

## A 研究目的

DJ-1は新規癌遺伝子として我々が1997年に単離・同定した。DJ-1は癌遺伝子機能に加えて、アントロゲン受容体の正の転写調節因子として機能し(Takahashi et al 2001, Niki et al 2003)、受精時の精子の卵への接着、侵入に必須であり(Okada et al 2002)、活性酸素により発現誘導される。今年度に入り、DJ-1が家族性パーキンソン病 PARK7の原因遺伝子であることが報告された。DJ-1は精巣、脳で発現が高いか、脳では中脳黒質に強く発現する(Bandopadhyay et al 2003)。我々は更に、DJ-1は自己酸化されることにより活性酸素除去し、活性酸素誘導細胞死抵抗機能を有し、PARK7変異のこの機能消失が PARK7 発症原因の1つであることを明らかにした(Taira et al 2003)。また、DJ-1のX線構造解析から、DJ-1は2量体を形成とプロテアーゼ機能を有することか予想された(Honbou et al 2003)。事実、DJ-1の抗酸化ストレス能には2量体形成(Taira et al 2003)と、K130へのSUMO-1修飾(Shinbo et al submitted)が必須でありDJ-1変異体か dominant-negative 効果を示すことを明かした。更に、PARK2の遺伝子産物であるユビキチンリカーゼ Parkin の基質である Pael 受容体を DJ-1 か Parkin とは独立して分解することを明らかにした。これらの結果と孤発性パーキンソン病患者にも DJ-1 変異が報告されていることから、DJ-1は広くパーキンソン病発症に関与している可能性がある。そこで、種々のパーキンソン病 DJ-1 変異の機能変動を DJ-1 結合タンパク質と DJ-1 の相関、細胞、遺伝子改変動物での解析により、パーキンソン病発症機構を分子レベルで明らかにする。

## A 研究方法

### 1 DJ-1の抗酸化ストレス機能

大腸菌で発現後精製したDJ-1と過酸化水素を反応させ、スコルボチン反応で過酸化水素量を定量した。また、マウスNIH3T3細胞に野生型及びパーキンソン病に見られる各種変異体DJ-1を定常的に発現している細胞株を構築し、過酸化水素、6-ヒドロキソトパミンなどを細胞に加えた場合の細胞内活性酸素量をDCFH添加後、フローサイトメーターで定量した。

### 2 酸化ストレス誘導細胞死に対するDJ-1の抵抗性

上術した各種細胞株、及びDJ-1遺伝子をターケ

トとしたsiRNAを導入DJ-1ノックダウン細胞に過酸化水素を1-2時間作用させ、生細胞数をMTT法で定量した。

### 3 DJ-1のプロテアーゼ活性

精製DJ-1とウサギ網状赤血球抽出液で合成した各種のタンパク質を反応させ、反応物をSDS-電気泳動で展開させた後、フルオロクラフィーでそれらのタンパク質の分解を検討した。また、パエル受容体とDJ-1 cDNAを293T細胞にtransfection後、抗パエル受容体抗体でその分解を検討した。

### 4 DJ-1のSUMO-1化

H1299細胞抽出液を抗DJ-1抗体で免疫沈降させ、沈降物を抗SUMO-1抗体でWestern blottingを行った。パーキンソン病に見られるL166P変異体をH1299細胞にtransfectionし、同様に解析した。

## B 研究結果

### 1 DJ-1の抗酸化ストレス機能

大腸菌で産生後精製した組み換えDJ-1と過酸化水素をin vitroで反応させたところ、DJ-1のンステインが自己酸化されることで、DJ-11分子あたり最低6分子の過酸化水素を消去すること、また、マウスNIH3T3、ヒト神経細胞SH-SY5Y細胞に過酸化水素と投与したところ、細胞内でin vitro同様に過酸化水素が消去されることを明らかにした。次に、siRNAによるDJ-1ノックダウンSH-SY5Y細胞では過酸化水素、MPP<sup>+</sup>、6-ヒドロキソトパミンが誘導する細胞死により感受性が高まることか明らかとなった。更に、L166P、C106S、DJ-1のSUMO-1修飾されないK130Rなどの種々のDJ-1変異体を導入したNIH3T3細胞株を作成し、過酸化水素の消去能、過酸化水素が誘導する細胞死に対する感受性を検討したところ、いずれもDJ-1機能の消失、現弱が見られた(Taira et al EMBO Rep 2004)。次に、パーキンソン病患者で見られるDJ-1変異体M26I、R98Q、D149Aで同様な解析を行ったところ、L166Pほどではないか抗酸化ストレス機能の低下が見られた(Takahashi et al 投稿中)。細胞に種々の濃度の過酸化水素を投与し、酸化されるDJ-1のンステインを質量分析法で解析したところ、C106→C53→C46の順でS03Hの形で酸化されること

か明らかとなった(Kinumi et al BBRC, 2004)。一方、DJ-1のヒト脳での発現を免疫染色、イムノフロント法で解析し、ほとんどの組織でDJ-1が強く発現し、パーキンソン病患者では一部Lewy bodyにも局在していた。更に、弧発性及びR98Q変異を有するパーキンソン病患者脳でのDJ-1を2次元電気泳動で検討したところ、健常人に見られる非酸化型DJ-1の消失と健常人と異なった酸化型DJ-1の存在が明らかとなった(Bandopadhyay et al Brain, 2004)。

## 2 適正なSUMO-1化と過剰なSUMO-1化

ヒトH1299細胞のDJ-1をイムノフロント法で解析したところ、DJ-1はSUMO-1修飾されていることが明らかとなった。DJ-1には16個のリジンが存在するのでこれら全てをアルギニンに変化した変異DJ-1を作成しH1299細胞でのSUMO-1化の有無を解析したところ、種間で高度に保存されている130番目のリジン(K130)がSUMO-1化サイトであることが明らかとなった。そこでこれらの変異体を使いDJ-1の抗酸化、細胞増殖、細胞癌化能に対する機能を解析したところ、K130へのSUMO-1化が全ての機能に必須であった。更に、L166P変異体はすべてのリジンか、あるいはK130が多重にSUMO-1化されており、これによりミトコンドリアへの局在変動、不溶化が起り、抗アポトーシス機能の消失が見られた(Shinbo et al 投稿中)。

## 3 DJ-1のプロテアーゼ活性

DJ-1のX線結晶構造解析を行ったところ、古細菌タンパク質であるプロテアーゼpf1との構造類似性からDJ-1のプロテアーゼ活性が推測された(Honbou et al J Biol Chem 2003)。しかしながら、プロテアーゼ基質の結合領域はC末のペプチドでブロックされている。そこで、合成基質を使い組み替え体DJ-1のプロテアーゼ活性を測定したところ、完全長では弱いプロテアーゼ活性しか有しないか、C末のペプチドを欠損したDJ-1はより強いプロテアーゼ活性を示した。次に、すでに明らかにしているDJ-1の種々の結合タンパク質、パー

キンソン病関連タンパク質かDJ-1のプロテアーゼ基質である可能性を検討したところ、Parkinのユビキチン化基質であるPael-receptorがヒト293T細胞内でDJ-1により分解された。活性中心であるC106の変異体DJ-1にはこの活性がない。次に、Pael-receptorが誘導するアポトーシスをDJ-1が抑制することかFax解析で明らかとなった。プロテアーゼ阻害剤存在下でもDJ-1のPael-receptorの分解が起こることから、DJ-1はインステインプロテアーゼとして独立に機能すると考えられる(Niki et al 投稿中)。また、Pael-receptorによるERストレスに対してDJ-1は抵抗性を細胞に与えた(Yokota et al BBRC, 2003)。細胞内ではDJ-1が他のタンパク質と複合体を形成してこれらのタンパク質がブロックされているC末部分を開くことか考えられるか、この候補としてHsp70をDJ-1結合タンパク質として同定した。

## 4 DJ-1の転写調節遺伝子、プロテアーゼ基質の同定

siRNAにより定常的にDJ-1発現がノックダウンされているNIH3T3細胞株と、テトラサイクリンによりsiRNA発現が制御できる誘導型DJ-1ノックダウン293細胞株を作成した。これらの細胞、及びL166P導入NIH3T3細胞株を使用してDNAマイクロアレイ、プロテオーム解析を行い親株と比較した。DJ-1ノックダウン細胞では極めて大きな遺伝子発現変動が起り、特に、ストレス誘導、炎症、更にtau, synphilinといった神経変性疾患関連遺伝子、脳細胞のアポトーシス関連遺伝子が多数含まれていた。一方、DJ-1ノックダウン細胞ではDJ-1プロテアーゼ基質の発現上昇が見られるはすである。現在までに、神経変性疾患関連タンパク質であるtransthyretin、レチノイン酸結合タンパク質CRABP-1、タンパク質合成の開始因子eIF4Aが候補タンパク質として同定された。Transthyretin、CRABP-1は神経変性疾患との関連が示されている。また、ERストレスなどを与えアポトーシスを起こさせると過剰なタンパク質合成を抑制させるべく、タンパク質合成関連因子の発現抑制が起ること

も知られているので今後詳細に解析したい。

## 5 DJ-1遺伝子導入マウス、欠損マウスの作成と解析

ここ何年間もDJ-1ノックアウトマウス作成を行っているか、DJ-1遺伝子欠損ES細胞は致死になってしまうのでまた作成には至っていない。そこで、Cre-LoxP系による誘導型DJ-1ノックアウトマウス作成を開始し現在ターゲットヘクターの完成間しかであり、次年度にはDJ-1ノックアウトマウス作成の完了したい。また、東京医科歯科大・横田講師との共同研究でDJ-1ノックダウンES細胞を作成し、現在マウス胚に移植したので、DJ-1ノックダウンマウスの誕生を待っている。

既に野生型DJ-1トランスジェニックマウスは作成していた。このマウスにパーキンソン病を発症させるMPTPを投与してその病態変動を順天堂大学 水野教授、服部助教授との共同研究で進めている。今年度、L166P, K130R変異体トランスジェニックマウスを作成した。L166Pトランスジェニックマウスは受精効率が低く増やすことに困難が伴っているか野生型DJ-1トランスジェニックマウス同様に解析予定である。

一方、モデル動物としてショウジョウハエを使ってDJ-1, Pael receptor とパーキンソン病との関連を米国 Lui 教授と共同研究を進めている。DJ-1欠損ハエは神経変性疾患様症状を示すことか明らかとなったので今後より詳細に解析を行いたい。

## C 考察

DJ-1の基本的な3つの機能—転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼ—が存在することを明らかにした。転写調節因子としては以前からのアントロゲン受容体の正の転写調節因子であることを明らかにしてきたか、脳で発現する、また脳変性疾患に関する遺伝子との関連は不明である。DJ-1ノックダウン細胞を使用してのDNAマイクロアレイ解析より、tau, synphilin, transthyretin が候補となった、今後解析の必要がある。一方、 $\alpha$  synuclein トランスジェニックマウスではDJ-1発現が低下するという報告(私信)も寄せられており、転写因子としての機能解析は重要と考えら

れる。

2番目の抗酸化ストレス因子としての機能はパーキンソン病との関連で特に注目される。弧発性パーキンソン病が酸化ストレスによって生ずるという考え方は古くから支持されていたか、それを担う遺伝子、タンパク質の同定は行われていなかった。本研究においてDJ-1かその遺伝子の候補であり、実験的に証明した事は極めて意義が高い。弧発性パーキンソン病では実際に非還元型で活性型と考えられるDJ-1の消失と同時に、野生型DJ-1に見られる酸化常態と異なったDJ-1が見られることはパーキンソン病発症過程でのDJ-1の抗酸化ストレス機能の重要性が示唆される。

3番目のプロテアーゼ機能もまたパーキンソン病発症と直接関わる現象である。家族性パーキンソン病原因遺伝子として同定されたParkin, UCH L1 はユビキチンリガーゼ、脱ユビキチン化酵素である。パーキンソン病ではtau,  $\alpha$  synuclein, Pael receptor などのレウィー体、あるいは小胞体への凝集が起り、これらが細胞死を誘導することか知られており、ユビキチン化されプロテアソーム系で分解される。一方、DJ-1はインステインプロテアーゼであり、プロテアソーム系と独立してPael receptor を分解した。このように、生体にとって有害なタンパク質は複数の系により分解される事を示す最初の例である。今のところ、DJ-1のプロテアーゼ基質はPael receptor だけであるか、DJ-1ノックダウン細胞を使ってのプロテオーム解析により現在複数の候補が挙がっており、今後の解析を急ぎたい。

パーキンソン病患者に見られるDJ-1変異体は程度の差はあれ、すべて抗酸化ストレス機能が低下していた。最初に見つかったL166Pは極めて異常であり、タンパク質としての構造かとれず、過剰にSUMO-1化され不溶化されていた。DJ-1の全ての機能に130番目のリシンへのSUMO-1化は必須である。パーキンソン病患者では健常人と比較して不溶化DJ-1の存在か報告されており、これらのDJ-1が過剰にSUMO-1化されている可能性か存在し、今後臨床サイトと提携してこの可能性を検討したい。

## D 結論

本計画はDJ-1の基本的な機能解析を行い、その機能変動かいかにかパーキンソン病発症の原因とな

るかを解明することを第1の目的とし、それらを踏まえて創薬応用を第2の目的とした。

前者においては、DJ-1は転写調節因子、抗酸化ストレス、プロテアーゼの異なる3つの機能を有する事が明らかとなり、これらの機能消失がパーキンソン病の発症原因になると考えられた事は極めて重要である。DJ-1の機能消失が家族性パーキンソン病PARK7に加えて孤発性パーキンソン病の発症に関連する可能性があり次年度以降に臨床分野との共同研究でこの可能性を明らかにしたい。更に、パーキンソン病以外に複数の脳神経変性疾患患者でDJ-1の発現変動、不溶化などが報告され、また、Parkin, tau,  $\alpha$ -synucleinとDJ-1との複合体形成も報告され始めたことから、広く脳神経変性疾患患者にDJ-1が関与する可能性がある。事実、今年度行ったDNAマイクロアレイ、プロテオーム解析から神経変性疾患関連因子がDJ-1機能のターゲット候補となったのでより詳細に解析したい。

DJ 1の106番目のシステイン(C106)は活性酸素により最初に酸化されるアミノ酸であると同時に、プロテアーゼの活性中心である。現在、C106がSO<sub>3</sub>H付加されたDJ 1を認識する抗体を作成しているか、この抗体はパーキンソン病のバイオマーカーとしての可能性がある酸化型 DJ 1の検出に利用できる。また、DJ 1に興味を示してくれた製薬会社も存在するので、これらと連携して創薬応用の可能性も探っていきたい。

#### E 健康危険情報

なし

#### F 研究発表 (本研究に関連するもののみを記す)

##### 1 論文発表

1) Ariga, H, Iguchi Ariga, S M M and Taira, T (2003)

DJ 1, a target protein of androgen related endocrine disrupters (minireview)

Environmental Sci 10, 13-21

2) Niki, T, Takahashi Niki, K, Taira, T, Iguchi Ariga, S M M and Ariga, H (2003)

DJBP, a novel DJ 1 binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ 1 antagonizes this inhibition by abrogation

of this complex

Mol Cancer Res 1, 247-261

3) Yoshida, K, Sato, Y, Yoshinaka, M, Nozawa, S, Ariga, H and Iwamoto, T (2003)

Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue

Mol Reprod Dev 66, 391-397

4) Honbou, K, Suzuki, N N, Horiuchi, M, Niki, T, Taira, T, Ariga, H and Inagaki, F (2003)

The Crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease

J Biol Chem 278, 31380-31384

5) Honbou, K, Suzuki, N N, Horiuchi, M, Niki, T, Taira, T, Ariga, H and Inagaki, F (2003)

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of DJ-1, a protein associated with male fertility and Parkinsonism

Acta Cryst D59, 1502-1503

6) Yokota, T, Sugawara, K, Ito, K, Takahashi, R, Ariga, H and Mizusawa, H (2003)

Down regulation of DJ-1 enhances the cell death by oxidative stress, ER-stress and proteasome inhibition

Biochem Biophys Res Commun 312, 1342-1348

7) Bandopadhyay, R, Kingsbury, A, Cookson, M, Reid, A, Evans, I, Hope, A, Pittman, A, Lashley, T, Canet-Aviles, R, Miller, D, Mc Lendon, C, Strand, C, Leonard, A, Ariga, H, Wood, N, de Silva, R, Hardy, J, Holton, J, Lees A and Revesz, T (2004)

The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease

Brain 127, 420-430

8) Taira, T, Saito, Y, Niki, T, Iguchi-Ariga, S M M, Takahashi, K and Ariga, H (2004)

DJ-1 plays a role in anti-oxidative stress to prevent cell death

EMBO Rep 5, 213-218

9) Taira, T, Iguchi-Ariga, S M M and Ariga, H (2004)

Co-localization with DJ-1 is essential for the androgen receptor to exert its transcription activity that has been impaired by androgen-antagonists

Biol Pharm Bull 27, 574-577

10) Kinumi, T, Kimata, J, Taira, T, Ariga, H and Niki, E (2004)

Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells

Biochem Biophys Res Commun 317, 722-728

##### 2 学会発表

1) Hiroyoshi Ariga, Takeshi Niki, Sanae M M Iguchi-Ariga, Kazuhiko Takahashi and Takahiro

- Taira (2003)  
DJ-1, a multi-functional protein, related to Parkinson's disease and infertility  
The second International Symposium on Redox Life Science
- 2) 平 敬宏、斉藤芳郎、仁木剛史、有賀早苗、高橋和彦、有賀寛芳 (2003)  
DJ-1, a protein responsible for Parkinson's diseases (PARK7), plays a role in the anti-oxidative stress  
第 76 回日本生化学会大会
- 3) 大江洋正、平敬宏、松本健一、有賀早苗、有賀寛芳 (2003)  
内分泌攪乱化学物質曝露マウスにおける DJ-1 の発現変動と作用機序  
環境ホルモン学会第 6 回研究発表会
- 4) 関戸 亜弥、仁木 剛史、平 敬宏、有賀 (井口) 早苗、有賀 寛芳 (2003)  
DJ 1 結合タンパク質 Abstrakt 及び HIPK1 の同定と機能解析  
第 26 回日本分子生物学会年会
- 5) 新保 有美、仁木 剛史、平 敬宏、有賀 (井口) 早苗、有賀 寛芳 (2003)  
DJ 1 の SUMO-1 化一適正、多重 SUMO 1 化による機能調節  
第 26 回日本分子生物学会年会
- 6) 西永裕美、平敬宏、有賀早苗、有賀寛芳 (2003)  
DJ 1 結合因子としての Lyn の同定とその作用機序  
DJ-1 の SUMO-1 化一適正、多重 SUMO-1 化による機能調節  
第 26 回日本分子生物学会年会
- 7) 出河千夏、平 敬宏、仁木剛史、有賀早苗、有賀寛芳 (2003)  
多機能タンパク質 DJ-1 の抗酸化ストレスおよび細胞増殖における機能  
第 26 回日本分子生物学会年会
- 8) 仁木 剛史、平 敬宏、有賀 (井口) 早苗、有賀 寛芳 (2003)  
DJ-1 のプロテアーゼ活性とパーキンソン病発症機構  
第 26 回日本分子生物学会年会
- 9) 有賀寛芳、平 敬宏、仁木剛史、有賀早苗 (2003)  
家族性パーキンソン病 PARK7 原因遺伝子 DJ 1 の機能  
第 26 回日本分子生物学会年会 ノンポンウム
- 10) 平 敬宏 (2004)

若年型家族性パーキンソン病 (PARK7) の原因  
遺伝子 DJ 1 の機能  
第 77 回日本薬理学会シンポジウム

H 知的財産権の出願・登録状況  
なし



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ariga, H , Iguchi Ariga, S M M and Taira, T	DJ 1, a target protein of androgen-related endocrine disrupters (minireview	Environmental Sci	10	13-21	2003
Niki, T, Takahashi Niki, K , Taira, T, Iguchi Ariga, S M M and Ariga, H	DJBP, a novel DJ-1 binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ 1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex	Mol Cancer Res	1	247-26	2003
Yoshida, K , Sato, Y, Yoshike, M , Nozawa, S , Ariga, H and Iwamoto, T	Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue	Mol Reprod Dev	66	391-397	2003
Honbou, K , Suzuki, N N , Horiuchi, M , Niki, T , Taira, T, Ariga, H and Inagaki, F	The Crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease	J Biol Chem	278	31380- 31384	2003
Honbou, K , Suzuki, N N , Horiuchi, M , Niki, T , Taira, T, Ariga, H and Inagaki, F	Crystallization and preliminary crystallographic analysis of DJ-1, a protein associated with male fertility and Parkinsonism	Acta Cryst	D59	1502- 1503	2003
Yokota, T, Sugawara, K , Ito, K , Takahashi, R , Ariga, H and Mizusawa, H	Down regulation of DJ 1 enhances the cell death by oxidative stress, ER stress and proteasome inhibition	Biochem Biophys Res Commun	312	1342- 1348	2003
Bandopadhyay, R , Kingsbury, A , Cookson, M , Reid, A , Evans, I , Hope, A , Pittman, A , Lashley, T , Canet-Aviles, R , Miller, D , Mc Lendon, C , Strand, C , Leonard, A , Ariga, H , Wood, N , de Silva, R , Hardy, J , Holton, J , Lees A and Revesz, T	The expression of DJ 1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease	Brain	127	420-430	2004
Taira, T, Saito, Y, Niki, T, Iguchi-Arigo, S M M , Takahashi, K and Ariga, H	DJ-1 plays a role in anti-oxidative stress to prevent cell death	EMBO Rep	5	213-218	2004
Taira, T, Iguchi-Arigo, S M M and Ariga, H	Co-localization with DJ-1 is essential for the androgen receptor to exert its transcription activity that has been impaired by androgen-antagonists	Biol Pharm Bull	27	574-577	2004
Kinumi, T, Kimata, J, Taira, T, Ariga, H and Niki, E	Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells	Biochem Biophys Res Commun	317	722-72	2004

20030713

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。