

200500766B

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 15 年度～平成 17 年度 総合研究報告書

主任研究者 有 賀 寛 芳

平成 18 (2006) 年 4 月

目次

| | |
|--|------|
| I. 総合研究報告 | |
| 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 | — 10 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | — 12 |

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

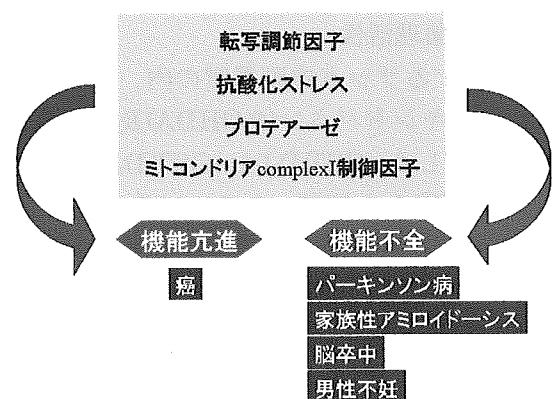
本研究室で新規癌遺伝子として単離同定した DJ-1 は 2003 年度家族性パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子として同定され、現在まで 13 箇所の DJ-1 遺伝子変異がパーキンソン病患者で報告されている。DJ-1 の機能解析と DJ-1 が関与するパーキンソン病発症機構の解明を目的として本研究がスタートした。DJ-1 は細胞増殖、受精、癌、不妊、パーキンソン病と多機能を有するが、本来の機能は転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼ、更にミトコンドリア complex 1 の制御因子であることが明らかとし、これらのいずれかの欠損もパーキンソン病発症原因となる。また、弧発性パーキンソン病患者脳では不活性型と考えられる異常酸化型の DJ-1 が観察された。更に、パーキンソン病モデルラットの DJ-1 タンパク質を注射すると劇的にドパミン神経細胞死の阻止とそれに伴う行動異常が改善された。更に、虚血性脳卒中ラットも同様に DJ-1 は抑制した。DJ-1 活性は 106 番目のシステイン(C106)の酸化状態で制御されるが、この C106 領域に結合する低分子化合物を in silico で同定した。これらの DJ-1 結合化合物は DJ-1 C106 の酸化を押さえることにより、活性型 DJ-1 を維持することで、酸化ストレス誘導神経細胞死を抑制した。ことから、DJ-1 と DJ-1 結合化合物はパーキンソン病および他の神経変性疾患の創薬ターゲットおよび治療薬になることが示された。

A. 研究目的

申請者が新規癌遺伝子として1997年に単離し研究をしてきたDJ-1は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本研究プログラムが始まった。現在までにパーキンソン病患者で13箇所のDJ-1遺伝子変異(欠損、点突然変異)が報告されている。パーキンソン病は酸化ストレス、それに伴う異常タンパク質の凝集、ミトコンドリアのcomplex 1の機能阻害が原因と考えられているが詳細な分子機構は明らかでなかった。我々は以前及び本プログラムによって、DJ-1は転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼの3つの機能を有し、その機能破綻はパーキンソン病などの脳神経変性疾患、男性不妊、細胞癌化の原因となることを明らかとした。

そこで、DJ-1の機能解明を行うことでパーキンソン病の発症機構を解明し、同時に、パーキンソン病治療薬への展開を志向した。

DJ-1の機能と疾患



B. 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、スコルポ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、ドパミン性神経細胞株SH-SY5Y細胞に過酸化水素、6-ヒドロキシドパミンなどを細胞

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。

上術した各種細胞株、及びDJ-1遺伝子をターゲットとしたsiRNAを導入DJ-1ノックダウン細胞D2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。

2. DJ-1結合タンパク質とDJ-1との相互作用

既に同定しているHIPK1, Hsp70などのシャペロンとの相互作用を、免疫沈降→沈降物をWestern blotting解析で同定した。また、細胞内の共局在を免疫染色法で解析した。HIPK1に対する機能解析のために、H1299細胞にHIPK1に対するsiRNAを作用後、過酸化水素処理を行い、DJ-1発現と細胞死をMTTアッセイで測定した。

3. DJ-1のプロテアーゼ活性

精製DJ-1と各種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、Western blotting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、トランスサイレチン(TTR), α -シヌクレインとDJ-1 cDNAを293T, D2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。

5. DJ-1の薬理活性

2つ存在するラット中脳黒質の内、左側の黒質に6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)及び大腸菌が発現後精製したGST-DJ-1, GST-DJ-1(L166P), GSTを6-OHDAと同時に、あるいは後で注射した。数日後、脳切片を作成し、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)抗体でドーパミン作動性ニューロンを染色した。また、メタンフェタミン等の薬剤を投与し、ラットの回転運動を測定した。

また、ドーパミン代謝物DOPACをHPLCで測定した。

6. DJ-1結合化合物の単離と薬理活性

富士通BioServerを使い、DJ-1の機能調節領域と考えられる複数の領域に結合する化合物を科学技術教育協会から購入した化合物ライブラリーよりバーチャルスクリーニングした。ターゲット領域に対して得られた上位化合物をそれぞれ4-5化合物を購入し、6-OHDAあるいは過酸化水素処

理したSHSY-5Y細胞に対するこれらの化合物の効果をMTTアッセイで検討した。

6. DJ-1によって転写調節される遺伝子の同定

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L166P DJ-1を定常的に発現している細胞株、DJ-1ノックダウン細胞株D2で発現変動している遺伝子をアフィメトリックスGeneChipを用いてマイクロアレイ解析を行った。得られて遺伝子の発現をRT-PCRで解析した。

C. 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のシ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+, 6-ヒドロキシドーパミンが誘導する細胞死により感受性が高まることが明らかとなった。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ほどではないが抗酸化ストレス機能の低下が見られた(Takahashi-Niki et al. BBRC, 2004)。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のシ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が明らかとなった(Kinumi et al. BBRC, 2004)。同時に、DJ-1の機能発揮には後述のK130へのSUMO-1かとともに、C106が酸化されることが必須であることが明らかとなった(Takahashi-Niki et al. BBRC, 2004)。

一方、DJ-1のヒト脳での発現を免疫染色、イム

ノブロット法で解析し、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)。

酸化ストレスはパーキンソン病発症と深く関わっていることが以前から報告されている。この酸化ストレスの原因として神経毒を含む環境物質の存在が示唆されている。の中で、環境化学物質であるビスフェノール A (BPB)は胎児期マウスに投与すると成獣マウスになってパーキンソン病症状を示し、また成獣マウス/ラット脳に投与するとドーパミン神経細胞死が起こることが知られている。BPA 処理により細胞は活性酸素を発生し、ミトコンドリア complex 1 活性が低下した。DJ-1 はこれに反応し発現上昇しミトコンドリアに移行し complex 1 活性の維持を図るが、BPA 濃度上昇とともに酸化型 DJ-1 が増加し機能が低下した(Ooe et al. Toxicol. Sci, 2005)。更に、DJ-1 活性を調節する C106 が酸化された DJ-1 のみを認識する抗体を作成した。これは、パーキンソン病の診断に使用可能である。

2. DJ-1のSUMO-1化と機能調節

ヒトH1299細胞のDJ-1をイムノブロッ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が、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、不溶化が起こり、抗アポトーシス機能の消失が見られた(Shinbo et al. Cell Death. Diff. 2006)。ハ

ンチントン病の封入体構成タンパク質もSUMO-1化されることが最近報告されており、神経変性疾患関連タンパク質のSUMO-1化は今後重要な課題となるかもしれない。

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pfi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が、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が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が抑制することが明らかとなった。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はシ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のによる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末部分を開くことが考えられるが、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。

更に、DJ-1のプロテアーゼ基質としてパエル受容体を報告した。更に、後述のtransthyretinに加えて、レヴィー小体の主要構成成分である α -シヌクレインもDJ-1によってin vitro, in vivoで分解された。

4. DJ-1の転写調節遺伝子の同定

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細胞株作成し、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こり、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。この中でtau遺伝子のプロモーター解析を行い、DJ-1はtau遺伝子の転写抑制を行っていることを明らかにした(Nishinaga et al. Neuscience Lett. 2005)。

5. 酸化ストレスとDJ-1

DJ-1はHsp70, CHIPのシャペロンと結合し、酸化ストレスによりその結合が増加した。更に、酸化ストレスによりDJ-1はミトコンドリアに一部移行し、ミトコンドリアに局在するシャペロンであるmtHsp70/Grp75と結合、共局在した(Li et al. Free Radic. Res. 2005)。

またDJ-1はHIPK1に結合しHIPK1を分解することで、酸化ストレス誘導細胞死を抑制することを明らかにした(Sekito et al. Free Radic. Res. 2006)。

6. ミトコンドリアcomplex 1の制御因子としてのDJ-1

酸化ストレスと同時に、ミトコンドリアcomplex 1の機能低下はパーキンソン病発症の本体の1つと考えられている。DJ-1はミトコンドリアcomplex 1サブユニットNDUFA4と結合し、DJ-1ノックダウン細胞では著しくComplex 1の酵素活性が低下し、逆にDJ-1ノックダウン細胞にDJ-1を発現させるとComplex 1の酵素活性が復帰することからcomplex 1の正の制御因子であることを明らかとした。また、免疫電子顕微鏡観察よりDJ-1はミトコンドリア外膜、マトリックスに加えて、Complex 1が存在する内膜にも存在することが示された。

7. パーキンソン病の創薬ターゲットとしてのDJ-1

6-OHDA投与パーキンソン病モデルラットの中脳黒質にDJ-1タンパク質を直接注入すると、黒室と線条体のドーパミンニューロン死とが阻止され、ドーパミンが線条体に運搬されることにより、行動異常が劇的に阻止されることを明らかにした。パーキンソン病患者に見られる変異DJ-1であるL166Pにはこの活性がない。線条体では低下していたドーパミン、その代謝物、ドーパミントランスポーター濃度も回復していた。これは6-OHDA投与による活性酸素を注入DJ-1が細胞内に移行し消去していると考えられた。これにより、DJ-1によるパーキンソン病の創薬の可能性が示された(Inden et al. submitted)。

更にDJ-1活性は106番目のシステイン(C106)の酸化状態で制御されるが、このC106領域に結合する低分子化合物をin silicoで同定した。これらのDJ-1結合化合物はDJ-1 C106の酸化を押しやることにより、活性型DJ-1を維持することで、酸化ストレス誘導神経細胞死を抑制した。ことから、DJ-1とDJ-1結合化合物はパーキンソン病および他の神経変性疾患の創薬ターゲットおよび治療薬になることが示された。

8. ドーパミン合成のキー酵素であるチロシンヒドロキシラーゼとDJ-1が結合することが明らかとなり、ドーパミン合成にDJ-1が関与する可能性が考えられた。

9. DJ-1と他の神経変性疾患

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ずである。これにより、家族性アミロイドニューロパシー(FAP)の原因タンパク質transthyretin (TTR)を同定した。DJ-1は(TTRとともに細胞外に分泌されTTRを分解した。しかしながら、酸化ストレス付加細胞ではDJ-1は分泌されない。FAP患者では不活性型DJ-1が血清中に分泌され、健常人、FAP発症前carrierでは分泌され

ないことより、DJ-1がTTR分解をさせないことがFAP発症原因と1つと考えられた。

脳虚血による脳梗塞モデルラットにDJ-1タンパク質を注入すると、神経細胞死と行動機能低下が60%以上軽減された。脳梗塞後、DJ-1は脳精髓液に分泌される。

以上より、DJ-1はパーキンソン病発症の全てのステップに関与し、更に酸化ストレスが関与する他の神経変性疾患発症にも関与することが示唆された。DJ-1結合化合物は申請細胞死を抑制する根本的な治療薬の可能性が高い。

D. 考察

DJ-1の基本的な4つの機能—転写調節、抗酸化ストレス、プロテアーゼ、ミトコンドリア complex 1の制御因子—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ド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が、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 が候補となったので今後解析の必要がある。

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が、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が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に見られる酸化状態と異なった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, α -synuclein, Pael-receptorなどのレヴィー体、あるいは小胞体への凝集が起こり、これらが細胞死を誘導することが知られており、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はシステイン

プロテアーゼであり、プロテアソーム系と独立してPael-receptor, α -synuclein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。DJ-1のプロテアーゼ基質はPael-receptorに加えて、家族性アミロイドシスの原因タンパク質トランスサイレチン(TTR)を同定し、細胞内でのDJ-1による分解を示した。家族性アミロイドシス患者では、TTRによる凝集体とDJ-1の局在はミラーイメージになっており、パーキンソン病患者の α -synucleinのケースと似ている。現在、 α -シニユクレイントランスジェニックマウスと野生型DJ-1トランスジェニックマウスを掛け合わせており、今後解析が期待される。

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がとれず、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番目のリジンへの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の存在が報告されており、これらのDJ-1が過剰にSUMO-1化されている可能性が存在し、今後臨床サイドと提携してこの可能性を検討したい。

パーキンソン病発症の1つとしてミトコンドリア complex 1の機能低下がある。DJ-1の4番目の機能として、complex 1の正の制御因子であることが明らかとなった。実際、酸化ストレスを与える薬剤、またビスフェノール Aなどを細胞に投与するとミトコンドリア、complex 1の酵素活性が低下し、同時にDJ-1はミトコンドリアに移動しその機能維持に関与した。DJ-1はDNAに損傷を与える紫外線などの照射によるストレス時には核に、また酸化ストレスではミトコンドリアとそのストレスを受けた場所に移動しストレス除去にあたることが明らかとなった。パーキンソン病患者では既にDJ-1自身の機能低下のため、このストレス防御ができなくなっていると考えられる。

今回、6-OHDAを中脳黒質に投与したパーキンソン病モデルラットにDJ-1タンパク質を直接投与すると黒質と線条体のドーパミンニューロン死の阻害とそれに伴う行動異常が劇的に回復した。投与DJ-1は速やかに細胞内に移行し活性酸素除去にあたったことより、DJ-1が創薬ターゲットに

なりうることを示したことは大きな成果であった。

現在パーキンソン病の治療薬としてはドパミン神経細胞死によって不足するドパミンの対症療法—ドパミン前駆体、ドパミン分解系の阻害薬の投与—が行われているが、この治療中も神経細胞死は進行する。従って、根本的に酸化ストレス誘導神経細胞死を抑制する薬剤の開発が必須である。今回、DJ-1の活性中心であるC106に結合し、酸化ストレス誘導神経細胞死を抑制する複数の化合物を同定した。現在、パーキンソン病モデルラットで薬理活性を検討しているが、細胞レベルに加え、動物レベルでも効果があれば画期的な治療薬の開発につながる。

E. 結論

本計画はDJ-1の基本的な機能解析を行い、その機能変動がいかに関与する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、酸化ストレス、プロテアーゼ、ミトコンドリアcomplex 1の機能調節の異なる4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る。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, α -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、FAPとの関連を検討し、DJ-1によるTTR分解と発症が密接に関与していることを示した。

また、パーキンソン病モデルラット脳にDJ-1タンパク質を直接投与するとドーパミンニューロン死とそれに伴う行動異常が劇的に阻止されることより、DJ-1による創薬が考えられた。また、同様に、虚血性脳卒中ラットもDJ-1注入により、大幅な病態改善が見られた。更に、DJ-1結合低分子化合物を複数同定し、DJ-1タンパク質と同様に酸化ストレス誘導神経細胞死を抑制したことは、今後の治療薬への発展を期待させるものであり大きな

成果であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 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., Yoshiike, 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. D* 59, 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.
 - 11) Takahashi-Niki, K., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. (2004)
Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 389-397.
 - 12) Sekito, A., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. Stimulation of transforming activity of DJ-1 by Abstrakt, a DJ-1-binding protein. *Int. J. Oncol.* 26, 685-690 (2005).
 - 13) Shinbo, Y., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. *Int. J. Oncol.* 26, 641-648 (2005).
 - 14) Li, H.M., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic. Res.* 39, 1091-1099 (2005).
 - 15) Nishinaga, H., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Andreadis, A., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. Expression profiles of genes in DJ-1-knockdown and L166P DJ-1 mutant cells. *Neuroscience Lett.* 390, 54-59 (2005).
 - 16) Ooe, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol. Sci.* 88, 114-126 (2005).
 - 17) Shinbo, Y., Niki, T., Taira, T., Ooe, H., Takahashi-Niki, K., Maita, C., Seino, C., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Diff.* 13, 96-108 (2006).
 - 18) Sekito, A., Koide-Yoshida, S., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. DJ-1 interacts with HIPK1 and affects H2O2-induced cell death. *Free Radic. Res.* 40, 155-165 (2006).
 - 19) Ito, G., Ariga, H., Nakagawa, Y. & Iwatsubo, T. Roles of distinct cysteine residues in S-nitrosylation and dimerization of DJ-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 667-672 (2006).
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—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—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シンポジウム
- 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
- 11) 平 敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
多機能癌遺伝子産物 DJ-1 の SUMO-1 修飾による機能制御構
第 63 回日本癌学会総会 9/29/04 福岡国際会議場
- 12) 仁木加寿子、仁木剛史、平 敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
パーキンソン病患者に見られる DJ-1 変異体の抗酸化ストレス能の減少
第 77 回日本生化学会大会ワークショップ
10/16/04 パシフィコ横浜
- 13) 李 紅梅、仁木剛史、平 敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
DJ-1-HSP70-Pael receptor 複合体による DJ-1 のプロテアーゼ活性
第 77 回日本生化学会大会ワークショップ
10/16/04 パシフィコ横浜
- 14) 小出静代、平 敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
多機能タンパク質 DJ-1 の神経疾患における機能解析
第 27 回日本分子生物学会年会
- 12/10/04 神戸国際会議場
- 15) 関戸亜弥、平 敬宏、有賀(井口)早苗、有賀寛芳
DJ-1 結合タンパク質 HIPK1 の解析
第 27 回日本分子生物学会年会
12/10/04 神戸国際会議場
- 16) 大江洋正、平敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
内分泌かく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
第 27 回日本分子生物学会年会
12/10/04 神戸国際会議場
- 17) 平 敬宏、仁木 (高橋) 加寿子、仁木剛史、有賀 (井口) 早苗、有賀寛芳
家族性パーキンソン病 (PARK7) 原因遺伝子 DJ-1 およびその変異体の抗酸化活性と病態
第 27 回日本分子生物学会年会
12/10/04 神戸国際会議場
- 18) 林 拓哉、平 敬宏、有賀寛芳、有賀 早苗
DJ-1 のミトコンドリア complex 1 への結合による活性制御
第 27 回日本分子生物学会年会
12/10/04 神戸国際会議場
- 19) 大江洋正、平敬宏、松本健一、有賀早苗、有賀寛芳
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
CREST 「内分泌かく乱物質」終了シンポジウム
9/15/04 コクヨホール、東京
- 20) 出河千夏、平 敬宏、仁木剛史、有賀早苗、有賀寛芳
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
CREST 「内分泌かく乱物質」終了シンポジウム
9/15/04 コクヨホール、東京
- 21) 平 敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
パーキンソン病原因遺伝子 DJ-1 による活性酸素消去機構
第 125 回日本薬学会年会 ワークショップ
3/31/05 東京ビックサイト

- 22) Hiroyoshi Ariga
Function of DJ-1, a causative gene product for familial Parkinson's disease, and its therapeutic application to Parkinson's disease
The Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (武田科学振興財団薬科学シンポジウム) 12/5/05 東京
- 23) Shizuyo Koide-Yoshida, Takahiro Taira, Sanae Iguchi-Ariga, Hiroyoshi Ariga
Functional analysis of DJ-1 in Familial amyloidotic polyneuropathy
PharmaSciences (武田科学振興財団薬科学シンポジウム) 12/5/05 東京
- 24) Hiromasa Ooe, Takahiro Taira, Sanae M.M. Iguchi-Ariga and Hiroyoshi Ariga
Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1
Forth international symposium of the 21th COE program. 10/10/05 Hakodate
- 25) HONG MEI LI¹, HIROYOSHI ARIGA², SANAE M. M. IGUCHI-ARIGA
DJ-1, an oxidative stress-responsive gene, as a useful monitor of environmental materials in fish cells
Forth international symposium of the 21th COE program. 10/10/05 Hakodate
- 26) Shizuyo Koide-Yoshida, Takahiro Taira, Sanae Iguchi-Ariga, Hiroyoshi Ariga
Functional analysis of DJ-1 in Familial amyloidotic polyneuropathy
Forth international symposium of the 21th COE program. 10/10/05 Hakodate
- 27) Hiroyoshi Ariga
DJ-1, a protein connecting Parkinson's disease with endocrine disrupting chemicals (EDs)
第 82 回生理学会シンポジウム
5/19/05 仙台
- 28) 有賀寛芳、平 敬宏、北村佳久、有賀早苗
抗酸化ストレスタンパク質 DJ-1 とパーキンソン病
第 27 回日本薬学会年会シンポジウム 3/29/06 仙台
- 29) 大江洋正、平敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
ビスフェノールAによる活性酸素種の増加と細胞傷害に対するDJ-1の防御機構
第 7 回環境ホルモン学会
- 30) 吉田-小出 静代¹, 平 敬宏^{1,3}, 有賀早苗^{2,3}, 有賀寛芳
多機能タンパク質 DJ-1 の家族性アミロイドシスにおける機能解析
第 28 回日分子生物学会年会 12/9/05 福岡
- 31) 李 紅梅、仁木剛史、平 敬宏、有賀早苗、有賀寛芳
酸化ストレスにより増強される DJ-1 の mtHSP70 との結合とミトコンドリアへの局在
第 28 回日分子生物学会年会 12/9/05 福岡
- 32) 宮崎 真、北浦広剛、松本健一、有賀早苗、有賀寛芳
DJ-1 に結合する低分子化合物の同定とその酸化ストレスによる神経細胞死抑制能
第 28 回日分子生物学会年会 12/9/05 福岡
- 33) 北村佳久、平 敬宏、位田雅俊、高田和幸、谷口隆之、有賀早苗、有賀寛芳
パーキンソン病モデルラットにおけるドパミン神経細胞死および行動異常の DJ-1 タンパク質による抑制効果
第 28 回日分子生物学会年会 12/9/05 福岡
- 34) 平 敬宏、関戸亜弥、西永裕美、仁木剛史、仁木加寿子、有賀早苗、有賀寛芳
DJ-1 の HIPK1 への結合による細胞死制御と DJ-1 によって変動する遺伝子の解析
第 28 回日分子生物学会年会 12/9/05 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称: 神経変性疾患治療薬

出願番号: 特願 2005-339011

出願人: 北海道大学、

発明者: 有賀寛芳

特許出願日: 平成 17 年 11 月 2

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-Arigo, 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-Arigo, 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., Yoshiike, 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 |

| | | | | | |
|--|--|--------------------------------|-----|-----------|------|
| Takahashi-Niki, K., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. | Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. | Biochem. Biophys. Res. Commun | 320 | 389-397 | 2004 |
| Sekito, A., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. | Stimulation of transforming activity of DJ-1 by Abstrakt, a DJ-1-binding protein | Int. J. Oncol. | 26 | 685-690 | 2005 |
| Shinbo, Y., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. | DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3 | Int. J. Oncol. | 26 | 641-648 | 2005 |
| Li, H.M., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. | Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress | Free Radic. Res. | 39 | 1091-1099 | 2005 |
| Nishinaga, H., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Andreadis, A., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H | Expression profiles of genes in DJ-1-knockdown and L166P DJ-1 mutant cells | Neuroscience Lett. | 390 | 54-59 | 2005 |
| Ooe, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. | Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1 | Toxicol. Sci. | 88 | 114-126 | 2005 |
| Shinbo, Y., Niki, T., Taira, T., Ooe, H., Takahashi-Niki, K., Maita, C., Seino, C., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. | Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities | Cell Death Diff. | 13 | 96-108 | 2006 |
| Sekito, A., Koide-Yoshida, S., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. | DJ-1 interacts with HIPK1 and affects H2O2-induced cell death | Free Radic. Res. | 40 | 155-165 | 2006 |
| Ito, G., Ariga, H., Nakagawa, Y. & Iwatsubo, T. | Roles of distinct cysteine residues in S-nitrosylation and dimerization of DJ-1 | Biochem. Biophys. Res. Commun. | 339 | 667-672 | 2006 |

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

Takeshi Niki,^{1,3} Kazuko Takahashi-Niki,^{1,3} Takahiro Taira,^{1,3} Sanae M.M. Iguchi-Ariga,^{2,3} and Hiroyoshi Ariga^{1,3}

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences and ²College of Medical Technology, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo, Japan; and ³CREST, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama, Japan

Abstract

DJ-1 was identified by us as a novel oncogene that transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with *ras*. We later identified PIAS (protein inhibitor of activated STAT) α as a DJ-1-binding protein, and found that DJ-1 restored androgen receptor (AR) transcription activity that was repressed by PIAS α . To further characterize the function of DJ-1, we cloned cDNA encoding a novel DJ-1-binding protein, DJBP, by a yeast two-hybrid system. DJBP mRNA was found to be specifically expressed in the testis. In addition to the binding of DJBP to the COOH-terminal region of DJ-1, DJBP was also found to bind *in vitro* and *in vivo* to the DNA-binding domain of the AR in a testosterone-dependent manner and to be colocalized with DJ-1 or AR in the nucleus. Furthermore, a co-immunoprecipitation assay showed that the formation of a ternary complex between DJ-1, DJBP, and AR occurred in cells in which DJ-1 bound to the AR via DJBP. It was found that DJBP repressed a testosterone-dependent AR transactivation activity in monkey Cos1 cells by recruiting histone deacetylase (HDAC) complex, including HDAC1 and mSin3, and that DJ-1 partially restored its repressed activity by abrogating DJBP-HDAC complex. These results suggest that AR is positively regulated by DJ-1, which antagonizes the function of negative regulators, including DJBP.

Introduction

DJ-1 was identified as a protein that transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with activated *ras* (1). The human

DJ-1 gene, which is comprised of seven exons, is mapped to 1p36.2–36.3, where many chromosome aberrations in cancer have been reported (2). DJ-1 was found to be more strongly expressed in the testis than other tissues and also in sperm, suggesting that DJ-1 has at least two functions, one function in somatic cells, especially in germ cells, and one function in sperm.

With regard to the function of DJ-1 in somatic cells, we have identified PIAS (protein inhibitor of activated STAT) α /ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) as a DJ-1-binding protein (3). PIAS α /ARIP3 belongs to the PIAS family of proteins, including PIAS1, PIAS3, PIAS α , PIAS β , and PIAS γ , and was characterized at first as a testis-specific AR coregulator (4, 5). We have shown that PIAS α inhibits the transcription activity of the AR by binding to the DNA-binding domain of AR and that DJ-1 antagonizes this inhibition by sequestering PIAS α from the AR in CV-1, Cos1, and TM4 Sertoli cells, indicating that DJ-1 is a positive regulator of the AR (3). Although PIAS family proteins have been shown to play roles in SUMO-1 conjugation (6–11) and in the regulations of STAT (12, 13), nuclear receptors (4, 5, 14–17), and K channels (18), the contribution of DJ-1 to such functions is not clear.

RS, another name for human DJ-1, has been reported by another group as a protein of an RNA-binding protein regulatory subunit (19). It has recently been reported that DJ-1/RS was strongly expressed and secreted from cells to serum in about half of breast cancer patients, some of whom possessed an antigen against DJ-1/RS, indicating that DJ-1/RS is a biomarker for breast cancer (20). It has also been reported that pI of DJ-1 changed from 6.2 to 5.8 by treatment of cells with H₂O₂, paraquat, or lipopolysaccharide that resulted in the production of reductive oxygen species, suggesting that DJ-1 might be a sensor to oxidative stresses (21, 22).

With regard to the function of DJ-1 in sperm, a rat homologue of human DJ-1 has been identified by other laboratories as a key protein related to infertility of male rats that had been exposed to sperm toxicants such as ornidazole and epichlorohydrin (23–26). DJ-1/RS/CAP1 has been shown to be expressed in the sperm head and to be translocated to the cytoplasm of sperm after treatment of rat sperm with the above toxicants (27, 28). Furthermore, we and others have reported that an anti-SP22 or anti-DJ-1 antiserum inhibited fertility *in vitro*, suggesting that DJ-1 plays a role in

Received 7/16/02; revised 11/1/02; accepted 12/19/02.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Grant support: Ministry of Education, Science, Sport, Culture and Technology of Japan.

The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the DDBJ/GenBank/EBI Data Bank with accession number AB073862.

Requests for reprints: Hiroyoshi Ariga, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan. Phone: 81-11-706-3745; Fax: 81-11-706-4988.

E-mail: hiro@pharm.hokudai.ac.jp

Copyright © 2003 American Association for Cancer Research.

fertilization (29, 30). The results suggest that DJ-1 affects both the production of sperm by activation of the AR to express male-specific genes and the fertilization function of mature sperm.

The AR is a member of the nuclear receptor superfamily and plays a role as a ligand-dependent transcription factor. After a ligand binds to the AR, the AR is translocated into the nucleus and binds to the androgen-responsive element, ARE, on the androgen-activating gene that affects development, growth, and regulation of male reproductive functions (31–34). The AR, like other nuclear receptor family proteins, possesses domains for transactivation, DNA-binding domain (DBD), and ligand-binding domain (LBD) at the NH₂-terminal, central, and COOH-terminal regions, respectively. Transcriptional activity of the AR is known to be regulated by various coregulators that bind to the respective domain of AR. More than 30 proteins of such coregulators have been reported (Ref. 35, see homepage at <http://www2.mcgill.ca/androgendb>).

To further characterize the function of DJ-1, we cloned cDNA encoding a novel DJ-1-binding protein, DJBP, by a yeast two-hybrid system using a human testis library in this study. DJ-1, DJBP, and AR were found to form a ternary complex, in which DJ-1 bound to AR via DJBP. DJBP repressed testosterone-dependent AR transactivation activity and DJ-1 restored its repressed activity, suggesting that DJBP and DJ-1 have mutually antagonizing functions with respect to the AR.

Results

Cloning of cDNA Encoding DJBP From a Human Testis cDNA Library

To identify proteins that bind to DJ-1, a yeast two-hybrid screening was carried out using a human testis cDNA library with full-sized DJ-1 as a bait, and cDNA encoding a novel DJ-1-binding protein, named DJBP, was cloned. DJBP cDNA comprises 2119 bp and encodes 570 amino acids (Fig. 1). DJBP contains three LXXLL-like motifs, LXXLL, YLXXL, and ILXXL, located at amino acid numbers 74, 92, and 235, respectively. The LXXLL motif is known to be the sequence that is necessary for coactivators to interact with nuclear receptors. To examine the expression of DJBP mRNA in human tissues, Northern blotting was carried out using a premade tissue blot with labeled DJBP cDNA as a probe (Fig. 2). Two distinct bands, of 1.9 and 7 kb in length, the former of which corresponds to the length of the DJBP cDNA obtained, were detected only in the testis (Fig. 2, lane 12). DJ-1 was also confirmed to be strongly and moderately expressed in the testis and other tissues, respectively, as described previously (1).

Interaction of DJBP With DJ-1

To assess the association of DJBP with DJ-1 *in vivo*, human 293T cells were transfected with expression vectors for Flag-tagged DJ-1 (F-DJ-1) with or without HA-tagged DJBP (HA-DJBP). Forty-eight hours after transfection, cell extracts were prepared and subjected to an immunoprecipitation reaction with an anti-Flag antibody. The precipitates were then blotted with an anti-HA or -Flag antibody (Fig. 3A). The results showed that HA-DJBP was coprecipitated with F-DJ-1 in cells cotransfected with F-DJ-1 and HA-DJBP but not in cells transfected with

HA-DJBP alone (Fig. 3A, lanes 1 and 2), respectively), indicating that DJBP binds to DJ-1 in 293T cells. To examine the binding of DJBP to DJ-1 in a physiological condition, the proteins in the extracts prepared from bovine testes were first immunoprecipitated with an anti-DJ-1 antibody or non-specific IgG and the precipitates were immunoblotted against an anti-DJBP antibody (Fig. 3B). The anti-DJ-1 antibody did precipitate DJ-1 (Fig. 3B, lane 2 in lower panel). DJBP, on the other hand, was detected in the immunoprecipitate with the anti-DJ-1 antibody but not with IgG (Fig. 3B, lanes 1 and 2), respectively). These results clearly indicate that DJBP binds to DJ-1 in cells.

To examine the interaction of DJBP with DJ-1 *in vitro*, F-DJ-1 and DJBP were expressed in *E. coli* as glutathione *S*-transferase (GST)-fusion proteins and purified after releasing GST by digestion of GST-fusion proteins with PreScission protease. Purified DJBP was mixed with or without F-DJ-1 and subjected to immunoprecipitation reaction with the anti-Flag antibody followed by the detection of proteins in the precipitates with an anti-DJBP antibody (Fig. 3C). The results showed that DJBP was coprecipitated with F-DJ-1 in the mixture containing F-DJ-1 and DJBP but not in the mixture containing DJBP alone (Fig. 3C, lanes 1 and 2), respectively), indicating that DJBP directly binds to DJ-1.

To determine the DJ-1-binding region in DJBP, a yeast two-hybrid assay was carried out using various deletion mutants of DJBP fused to the GAL4-activating domain and DJ-1 fused to the LexA DNA-binding domain as a bait (Fig. 3D). DJ-1 was found to bind to COOH-terminal regions of DJBP spanning amino acid numbers 193–570; 250–570, and 372–570 but not to NH₂-terminal regions, indicating that amino acids 372–570 of DJBP are bound by DJ-1. This was also confirmed by the results of an *in vitro* pull-down assay using GST or GST-fusion proteins of DJBP containing amino acids 1–570 (full length) and 371–570, in which DJBP and its deletion mutant but not GST were bound by DJ-1 (Fig. 3E).

Colocalization of DJBP and DJ-1

To determine the localization of DJ-1 and DJBP, an expression vector for HA-DJBP was transfected into monkey Cos1 cells, and the cells were stained with anti-HA and anti-DJ-1 antibodies to show the introduced HA-DJBP and endogenous DJ-1, respectively, and visualized with FITC and rhodamine-conjugated secondary antibodies under a confocal laser microscope (Fig. 4). The results showed that endogenous DJ-1 and HA-DJBP were localized mainly in the nucleus and both proteins were colocalized in the nucleus (Fig. 4, A–C, respectively).

Association of DJBP With the Androgen Receptor

To determine whether DJBP associates with AR *in vivo*, 293T cells cultured in the presence of 100 nM testosterone were transfected with expression vectors for HA-DJBP with or without F-AR, and 48 h after transfection, cell extracts were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody and the precipitated protein was detected with an anti-HA or the anti-Flag antibody (Fig. 5A). The results showed that HA-DJBP was coprecipitated with F-AR in cells cotransfected with both F-AR

```

1 aaagactagcttggagcaggctcatcagtatcttggttaccaaaagcaaaaacagatggt 60
61 cagacttgctcaagaattttctagaaccgataatgagggcaatggcattcttcgacgcc 120
121 gggacataaagaacgcaactgtacggttttgatattccctccaccaagagatttgaaa 180
181 agctttgggcaagatacagacaccgagggaaaaggccacattactaccaggaattttac 240
241 agaaattgggtatttaactatcgctgctccatcgccctgtgagcagagattatttca 300
301 acttcatgggtcattttacaaagccacagcagctacaggaagagatgaaggagctgcgc 360
      M G H F T K P Q Q L Q E E M K E L Q Q

361 agagcacagagaaggctgtggcagccaggataaagcttatggaccgccatcaagatatca 420
      S T E K A V A A R D K L M D R H Q D I S

421 gcaaagcattcaccaaaactgatcaatccaaaaccaactacatatccatattgcaagatgc 480
      K A F T K T D Q S K T N Y I S I C K M H

481 atgaagtgtggaagaatgtggatgttctctaccgaagggagctgaccatctgctaa 540
      E V L E E C G C S L T E G E L T H L L N

541 acagttggggagtcagccggcatgataatgctatcaattacctcgacttctcgagagcag 600
      S W G V S R H D N A I N Y L D F L R A V

601 tggagaacagcaagtcacagcagctcagcccaaggaaaagaagagcattgccaatca 660
      E N S K S T G A Q P K E K E E S M P I N

661 attttgcaacgctgaatccacagcaggttggtaggaagatccaggaagtagttgagctct 720
      F A T L N P Q E V V R K I Q E V V E S S

721 cccagctggcttggccagcattttctgcatggataaagagatacagatttggtaa 780
      Q L A L S T A F S A L D K E D T G F V K

781 aggcacagaaatcgacaagttcttaaggatttctgttacaactaacggacaatcagt 840
      A T E F G Q V L K D F C Y K L T D N Q Y

841 atcattatTTTTTgaggaactaagaattcatctaacccccatataaaattggaaatatt 900
      H Y F L R K L R I H L T P Y I N W K Y F

901 ttctccagaacttttagctgttctctggagagacagctgagtgggctgagaaaatgc 960
      L Q N F S C F L E E T A D E W A E K M P

961 ccaaagggccgcccctacctctcccaagccacagccagagacatcctggctgcgc 1020
      K G P P P T S P K A T A D R D I L A R L

1021 tccacaagcagtgacttccattaccatgccatcaccaggagtttgagaattttgaca 1080
      H K A V T S H Y H A I T Q E F E N F D T

1081 ccatgaaaacgaacacatctccagagaggagtttagggcatttgtaatcgccgcgtcc 1140
      M K T N T I S R E E F R A I C N R R V Q

1141 aaatcctgacgcagcaacagtttgacagactctggaacgagatgcagtcgaatgcaagg 1200
      I L T D E Q F D R L W N E M P V N A K G

1201 ggaggctgaaataaccggacttctgagcaggttcagttccgagacagcagccacaaa 1260
      R L K Y P D F L S R F S S E T A A T P M

1261 tggccactgggtgactcggcctggcccgagagaggagcagtgctcctgacgtctcggaag 1320
      A T G D S A V A Q R G S S V P D V S E G

1321 gcaccagatctgccctctcattgccactcaggagctgagaccagggtcaaaagtgcaga 1380
      T R S A L S L P T Q E L R P G S K S Q S

1381 gccaccctgtactccagcagcaccaccgtgatcccgccactccaccctgagaaact 1440
      H P C T P A S T T V I P G T P P L Q N C

1441 gtgatccatagagacaggctccggaagagaatccaggctgctggcgcagctcctga 1500
      D P I E S R L R K R I Q G C W R Q L L K

1501 aagaatgcaaggagaagcagctggccagacagggacatcaacgcctccgatttctcgg 1560
      E C K E K D V A R Q G D I N A S D F L A

1561 ctcttgggagaaattcaacctggacataagcaagaggagtgctcagcagctcattataa 1620
      L V E K F N L D I S K E E C Q Q L I I K

1621 aatcagacttaagagcaacgggaaatttgcatctgtgacttcatcagagctgtgtcc 1680
      Y D L K S N G K F A Y C D F I Q S C V L

1681 tcctgctaaaagcaaggaagctcactgatgcacagatgaagatccagaatgcacaca 1740
      L L K A K E S S L M H R M K I Q N A H K

1741 agatgaaagaagcggcggcagcagccatcttttactctgctctgctgctattcagc 1800
      M K E A G A E T P S F Y S A L L R I Q P

1801 ccaaaattgtcactgtgaggccaatggcggcagcttcaaaagctatgatgaggctg 1860
      K I V H C W R P M R R T F K S Y D E A G

1861 gaacaggctgctaagcgtcgcagatttcaggacggtcctgagacagctacagcatcaacc 1920
      T G L L S V A D F R T V L R Q Y S I N L

1921 tctctgaggaagagttcttccatattctggagtattacgataagacgctgtcttcaaaa 1980
      S E E E F F H I L E Y Y D K T L S S K I

1981 tctcctacaacgacttctccggcattctcctcagtagacaccctgctgtgtgccagc 2040
      S Y N D F L R A F L Q *

2041 gggacgacagccacagggcctgtttcaaggctaataaaatcctataatttggaaaaaaa 2100
2101 aaaaaaaaaaaaaaaaaa 2119

```

FIGURE 1. Nucleotide and amino acid sequences of DJBP. The nucleotide sequence of DJBP cDNA was determined by a dideoxy method using Long Reader 4200 (LI-Cor, Lincoln, Nebraska) and Gene Rapid (Amersham BioScience, Bucks, UK) autosequencers, and the deduced amino acid sequence is shown. LXXLL motifs within the amino acid sequence are *underlined*.

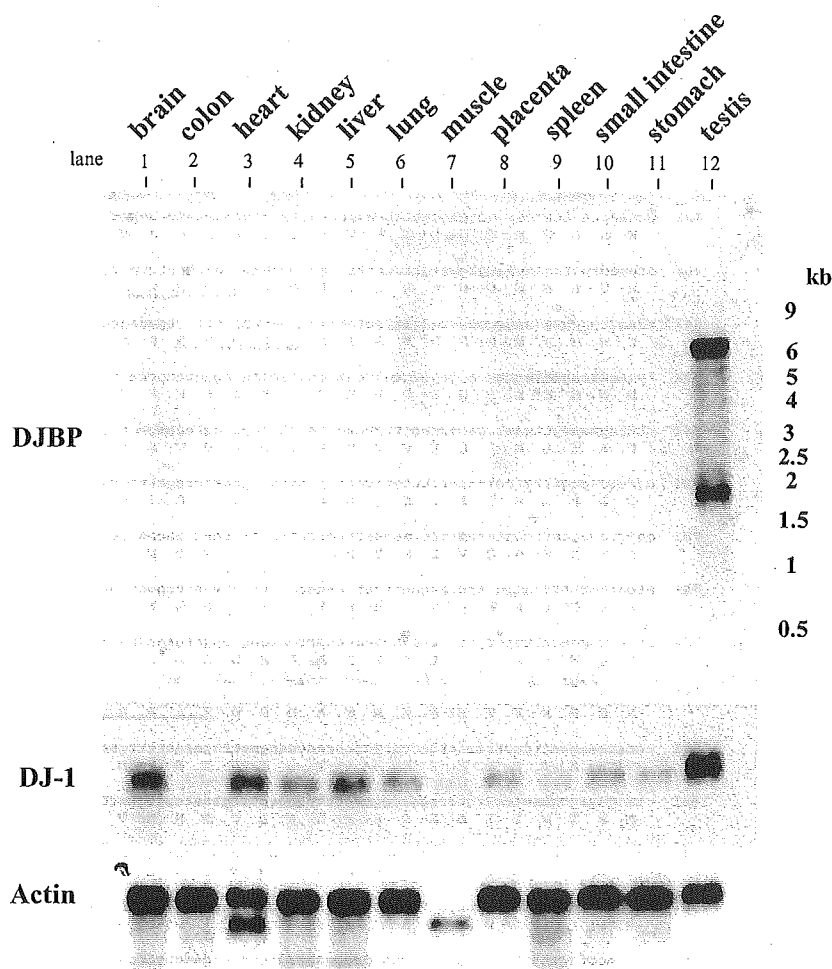


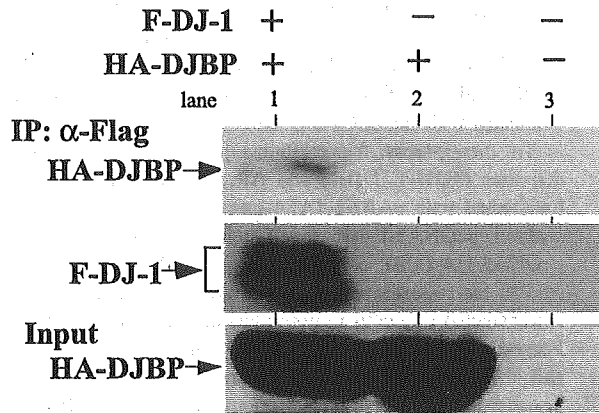
FIGURE 2. Northern blot analysis of DJBP in various human tissues. Human Northern RNA blot (12 major tissues, Origene, Rockville, MD) was hybridized with labeled cDNAs of DJBP (upper panel), DJ-1 (middle panel), and β -actin (lower panel) as probes. Positions of size markers are shown on the right in the upper panel.

and HA-DJBP but not in cells transfected with HA-DJBP alone (Fig. 5A, lanes 1 and 2), respectively), indicating that DJBP binds to AR in 293T cells. To assess the direct interaction between DJBP and AR, a GST pull-down assay was carried out using purified GST-DJBP and GST. Purified proteins were reacted in the presence of 100 nM testosterone with 35 S-AR synthesized *in vitro* in a reticulocyte lysate, and the bound proteins were visualized by fluorography (Fig. 5B). The results showed that labeled AR bound to DJBP but not to GST, indicating that DJBP directly interacts with the AR (Fig. 5B,

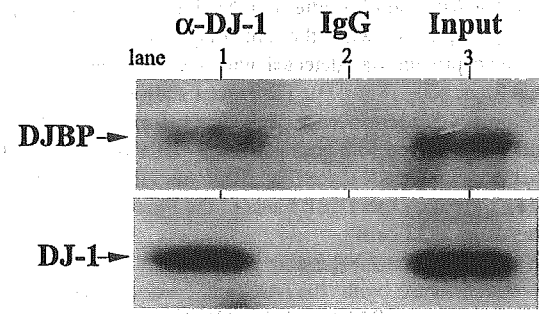
lanes 1 and 2), respectively). Because it is known that some coregulators for the AR bind to the AR in a ligand-dependent manner, testosterone (a ligand of the AR)-dependent binding activity of DJBP to AR was examined by a liquid β -galactosidase assay in yeast. Because DJBP binds to the COOH-terminal half of the AR, as shown in Fig. 6B, this truncated form of the AR, AR Δ N, was used in this assay (Fig. 5C). The results showed that β -galactosidase activity obtained between DJBP and AR Δ N increased with increase in the dose of testosterone. To further confirm the testosterone-

FIGURE 3. Interaction of DJBP with DJ-1. **A.** 293T cells were transfected with pcDNA3-F-DJ-1 and pcDNA3-HA-DJBP. At 48 h after transfection, cell extracts were prepared and subjected to an immunoprecipitation reaction using an anti-Flag antibody (M2, Roche Applied Science, Rotkreuz, Switzerland). The precipitates were blotted with an anti-HA or the anti-Flag antibody. **B.** The proteins in the extract from bovine testes were first immunoprecipitated with an anti-DJ-1 antibody or non-specific IgG. The proteins in the precipitates were separated in a 12.5% polyacrylamide gel and blotted with an anti-DJBP antibody or the anti-DJ-1 antibody. Lane 1, the extract used for the binding reaction was applied to the same gel (Input). **C.** F-DJ-1 and DJBP were expressed in *Escherichia coli* as GST-fusion proteins and purified after releasing GST by digestion of GST-fusion proteins with PreScission protease (Amersham BioScience) as described in "Materials and Methods." One microgram of each purified protein was mixed and subjected to an immunoprecipitation reaction using an anti-Flag antibody. The precipitates were blotted with an anti-DJBP antibody. Lane 3, the DJBP used for the reactions (Input) was run in parallel. **D.** Yeast L40 cells were transformed with expression vectors for LexA, LexA-DJ-1, and various deletion mutants of DJBP fused to the GAL4-activation domain. The β -galactosidase activity of each colony was measured. **E.** DJBP(1-570), DJBP(372-570), and DJ-1 were expressed in *E. coli* as GST-fusion proteins and purified. GST-free DJ-1 was then prepared after releasing GST from GST-DJ-1 by digestion with PreScission protease. DJ-1 and GST-DJBPs were mixed together and subjected to a pull-down assay as described in "Materials and Methods." The proteins bound to GST-DJBPs were blotted with an anti-DJ-1 antibody. Lane 4, the DJ-1 used for the reactions (Input) was run in parallel.

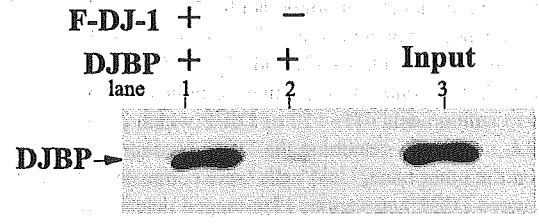
A *In vivo*



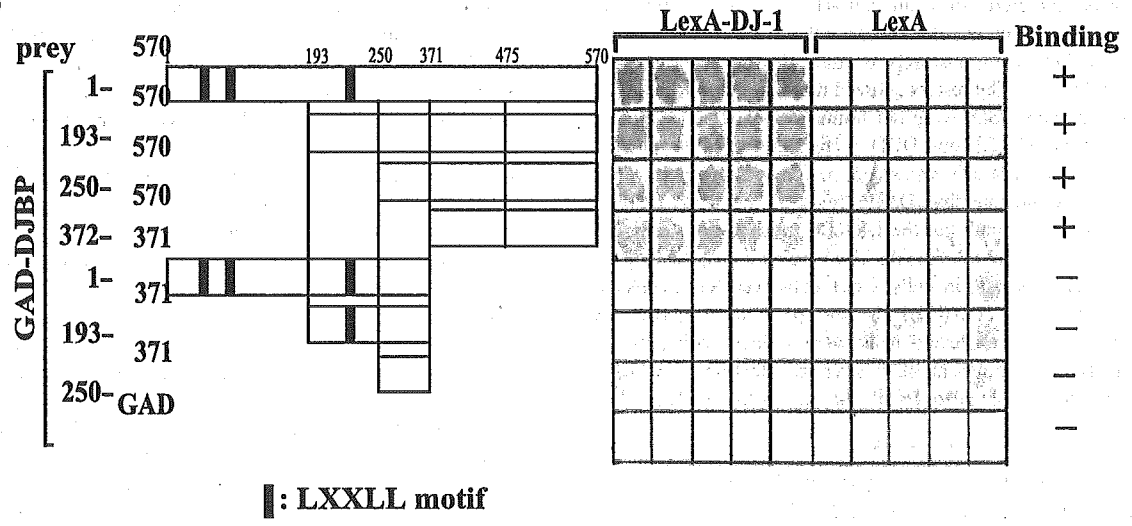
B *In vivo-endo*



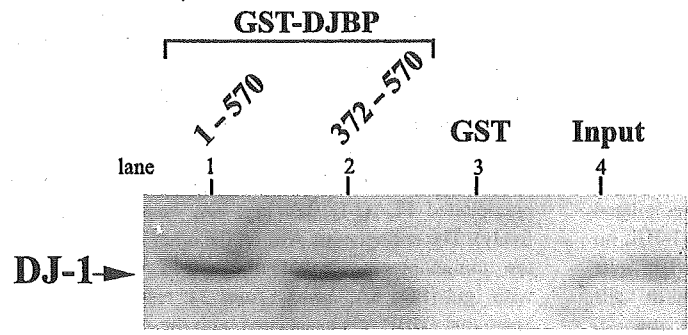
C *In vitro*



D



E



dependent binding activity of DJBP to the AR *in vivo*, 293T cells cultured in the various amounts of testosterone were transfected with expression vectors for Flag-DJBP with or without the AR, and 48 h after transfection, cell extracts were immunoprecipitated with the anti-Flag antibody and the precipitated protein was detected with the anti-Flag antibody or an AR antibody (Fig. 5D). The results showed that AR was coprecipitated in a testosterone-dependent manner with F-DJBP in cells cotransfected with both AR and F-DJBP but not in cells transfected with the AR alone (Fig. 5D, lanes 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, and 11), indicating that DJBP binds to the ligand-binding form of the AR in 293T cells.

To determine the AR-binding region of DJBP, 293T cells were cotransfected with the AR and various Flag-tagged deletion mutants of DJBP, and the AR that co-immunoprecipitated with DJBP in cells were detected with an anti-AR antibody after the immunoprecipitation of cell extracts with an anti-Flag antibody (Fig. 6A). In addition to the full-sized DJBP, DJBP deletion mutants of amino acids 372–570 and 476–570 also immunoprecipitated the AR, whereas DJBP deletion mutants of amino acids 1–371 and 372–475 did not (Fig. 6A, lanes 1, 3, 5, 2, and 4), respectively), indicating that the AR binds to amino acids 476–570 of DJBP which do not contain LXXLL motifs. To determine the DJBP-binding region of the AR, on the other hand, Cos1 cells were cotransfected with the HA-tagged DJBP and various Flag-tagged deletion mutants of the AR, and DJBP that co-immunoprecipitated with ARs in cells was detected with an anti-HA antibody after the immunoprecipitation of cell extracts with the anti-Flag antibody (Fig. 6B). Deletion constructs of the AR are schematically shown in Fig. 6C. The results showed that while two mutants of the AR, Δ C and LBD, were not bound by DJBP, the deletion mutants of the AR, Δ N and DBD, were, like the wild-type AR, bound by DJBP (Fig. 6B, lanes 2, 5, 3, 4, and 1), respectively). These results indicate that DJBP binds to the DNA-binding domain of the AR and that the LXXLL motif is not necessary for DJBP to interact with the AR. To examine the colocalization of DJBP with the AR in cells, Cos1 cells were cotransfected with F-DJ-1 and HA-DJBP in the presence of 100 nM testosterone, and transfected cells were stained with anti-AR and anti-HA antibodies at 48 h after transfection. HA-DJBP was found to be colocalized with the AR in the nucleus (data not shown).

Repression of AR Transactivation Activity by DJBP and Restoration of Its Repression by DJ-1

Because we showed in this study that DJBP binds to both DJ-1 and AR and in a previous study that DJ-1 does not directly bind to the AR (3), we then examined the relationships among DJBP, DJ-1, and AR. 293T cells cultured in the presence of 100 nM testosterone were transfected with various combinations of F-AR, HA-DJBP, and DJ-1-HA, the cell extracts were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody, and the precipitants were blotted with anti-HA and Flag antibodies (Fig. 7A, lanes 1–8). HA-DJBP was co-immunoprecipitated with F-AR as expected (Fig. 7A, lanes 2 and 3). DJ-1-HA, on the other hand, was co-immunoprecipitated with F-AR in cells transfected with both HA-DJBP and F-AR but not in cells transfected with F-AR alone (Fig. 7A, lanes 3 and 4),

respectively). Expression levels of the respective proteins of F-AR, HA-DJBP, and DJ-1-HA were comparable in transfected cells (Fig. 7A, see Input). Furthermore, the amounts of DJ-1 and HA-DJBP co-immunoprecipitated with F-AR were found to be stimulated in the presence of 100 nM testosterone (Fig. 7A, lanes 9 and 10). Thus, these results clearly indicate that DJ-1, DJBP, and AR form a ternary complex, in which DJ-1 associates with the AR via DJBP.

To then assess the relationship between the biological activities of DJ-1, DJBP, and AR, monkey Cos1 cells were transfected with pARE2-TATA-Luc as a reporter and with or without pcDNA3-F-AR together with various amounts of pcDNA3-HA-DJBP or pEGFP-N1 in the presence or absence of 100 nM testosterone. The plasmid, pCMV- β -gal, was also cotransfected into cells to normalize the transfection efficiency. Forty-eight hours after transfection, cell lysates were prepared and their luciferase activities were measured (Fig. 7B). A testosterone-dependent transcription activity of the AR was first confirmed in the transfected cells without pcDNA3-HA-DJBP (data not shown). It was found that neither DJBP nor EGFP responded to pARE2-TATA-Luc reporter in the absence of the AR. The results then showed that while introduction of EGFP that did not bind to the AR, pEGFP-N1, did not affect the AR activity, DJBP repressed the testosterone-dependent transcription activity of the AR in a dose-dependent manner and about 70% of the AR activity was repressed after 1 μ g of pcDNA3-HA-DJBP was transfected into cells (Fig. 7B), suggesting that DJBP acts as a negative regulator of the AR. DJ-1-HA or EGFP was then cotransfected into Cos1 cells together with 1 μ g of pcDNA3-HA-DJBP and pARE2-TATA-Luc, and the luciferase activities were determined (Fig. 7C). The results showed that while introduction of vector, pEGFP-N1, did not affect the AR activity, DJ-1 partially restored AR transcription activity repressed by DJBP in a dose-dependent manner. Because DJ-1 directly binds to DJBP but not the AR, these results suggest that DJ-1 changes the AR from a transcriptional negative form to an active form as we reported in the case of DJ-1 and PIASx α (3).

Association of DJBP With Histone Deacetylase Complex

Because transcriptional repression pathways of genes are often connected with histone deacetylase (HDAC) or corepressor complex, it is possible that the transcriptional repression of the AR by DJBP uses the same or similar pathway connected with HDAC. To explore this possibility, an expression vector for FLAG-tagged DJBP was transfected into human 293T cells cultured in the presence of 100 nM testosterone. Forty-eight hours after transfection, the cell extract was prepared and the proteins in the extract were first immunoprecipitated with the anti-FLAG antibody or non-specific IgG. The precipitates were immunoblotted against an anti-AR antibody (Fig. 8A). It was first confirmed that the anti-FLAG antibody did not precipitate proteins in the extracts from cells into which FLAG-DJBP had not been transfected, and that the anti-FLAG antibody precipitated FLAG-DJBP (Fig. 8A, lanes 3 and 1), respectively). The endogenous AR, on the other hand, was detected in the immunoprecipitate with the anti-FLAG antibody but not with IgG (Fig. 8A, lanes 1 and 2), respectively), indicating again that DJBP was associated with the AR in 293T cells. The

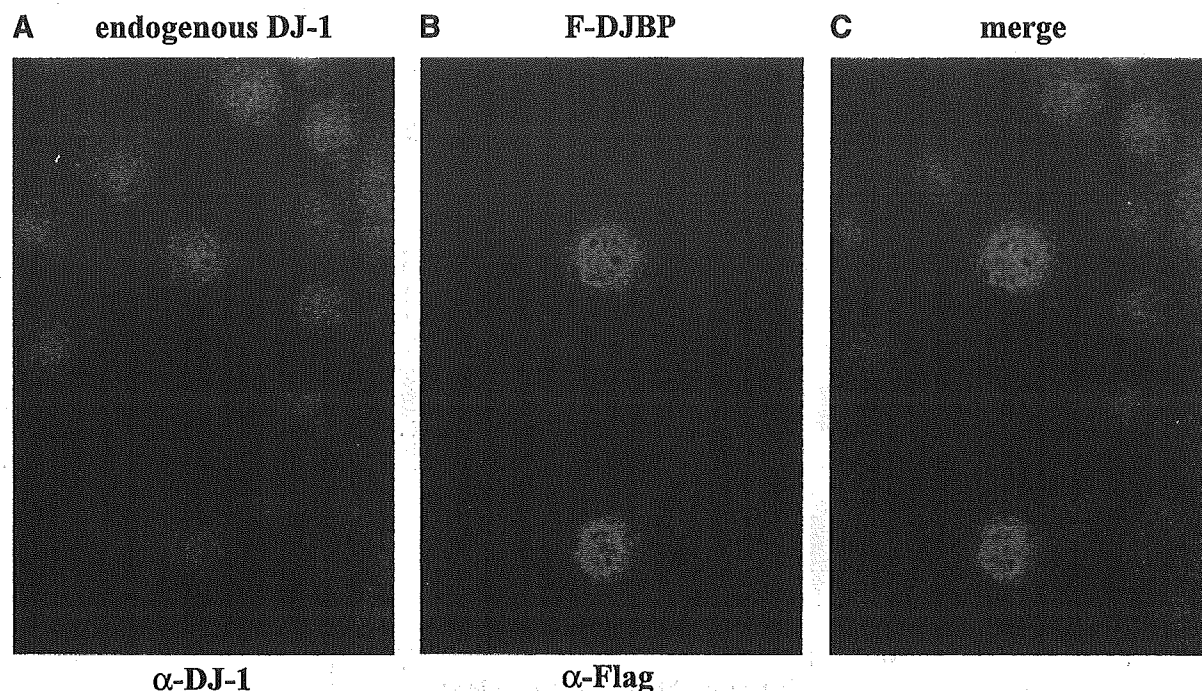


FIGURE 4. Colocalization of DJBP with DJ-1 in Cos1 cells. Cos1 cells were transfected with pcDNA3-HA-DJBP, stained with anti-HA (A) and anti-DJ-1 (B) antibodies at 48 h after transfection, and visualized under a confocal laser microscope. C. Figs. A and B are merged.

same blot as that shown in Fig. 8A was reprobbed with anti-HDAC1 and mSin3A antibodies (Fig. 8A). Endogenous HDAC1 and mSin3A were detected in the immunoprecipitates with the anti-FLAG antibody but not with IgG, indicating that DJBP and the AR are complexed with a corepressor complex, including HDAC1 and mSin3A. It was found that neither HDAC1 nor mSin3A directly bound to DJBP by the pull-down assay, in which GST-DJBP was reacted with ^{35}S -HDAC1 or ^{35}S -mSin3A synthesized *in vitro* in a reticulocyte lysate (data not shown), suggesting that the DJBP-bound AR or the DJBP-AR complex recruits the corepressor complex.

To confirm the existence of the HDAC complex in the transrepression pathway of the AR to DJBP, TSA, an inhibitor of HDAC1, was added to the cells transfected with the AR and various amounts of DJBP in the presence of 100 nM testosterone, and the luciferase activity was measured (Fig. 8B). The results showed that TSA abrogated the DJBP-repressed transcription activity of the AR and further increased the transcription activity of the AR to the level comparable to that obtained after introduction of the AR alone, suggesting that repression of the AR transcription activity by DJBP is carried out by the HDAC complex.

Abrogation of the DJBP-HDAC Complex by DJ-1

To determine the mechanism underlying the abrogation of the DJBP-repressed AR transcription activity by DJ-1, FLAG-tagged DJBP and various amounts of HA-tagged DJ-1 or EGFP were transfected into human 293T cells cultured in the presence of 100 nM testosterone. Forty-eight hours after transfection, the cell extract was prepared and the proteins in

the extract were first immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. The precipitates were immunoblotted against anti-HA, anti-HDAC1, anti-GFP, and anti-FLAG antibodies as described in Fig. 8A (Fig. 9). It was first confirmed that the constant amounts of endogenous HDAC1 were expressed and that DJ-1-HA and EGFP were expressed in a dose-dependent manner in transfected cells (Input, Fig. 9, lanes 9–16). It was also confirmed that FLAG-DJBP was precipitated with the anti-FLAG antibody (Fig. 9, lanes 1–3, 5, and 6). While EGFP was not detected in the precipitates, DJ-1-HA was also detected with the anti-HA antibody in the immunoprecipitates from cells that had been transfected with FLAG-DJBP (Fig. 9, lanes 2 and 3), indicating that DJBP was associated with DJ-1 in ectopically expressed 293T cells. It was found that endogenous HDAC1 was, however, first detected in the immunoprecipitates from cells that had been transfected with FLAG-DJBP alone and then the amounts of immunoprecipitated HDAC1 decreased in a dose-dependent manner (Fig. 9, lanes 1–3), indicating that DJ-1 abrogated the DJBP-HDAC complex, thereby leading to the restoration of the AR transcription activity repressed by DJBP.

Discussion

In this study, we identified a novel DJ-1-binding protein, named DJBP, by a yeast two-hybrid system using a human testis cDNA library. DJBP contains three LXXLL-like motifs that are known to be necessary for coactivators to interact with nuclear receptors. Expressions of DJBP mRNAs of 2 and 7 kb in length were found to be limited to the testis of human tissues,