

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K13258

研究課題名(和文)パーキンソン病原因因子DJ-1が、酸化環境のセンサーとして働くメカニズム

研究課題名(英文)DJ-1 serves as a sensor for oxidative state in cells

研究代表者

加藤 いづみ(KATO, IZUMI)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40634994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病原因因子DJ-1のシステイン106残基のSH基は、酸化後、段階的に酸化価数を変化させる。しかし、酸化価数に着目した分子タンパク質研究とタンパク質結合や細胞死を判定する細胞生物学研究が個別に行われていた。そのため、DJ-1の酸化価数に応じた結合タンパク質選択のメカニズムや神経細胞死制御機構は明らかではなかった。申請者は恒常的酸化型DJ-1変異体、恒常的還元型DJ-1変異体を作製し、それらのp53結合能を評価すると共に、神経細胞死抑制効果を調べることにより、DJ-1がシステイン106残基の酸化に応じて、機能を変化させる機構を、分子レベル、細胞レベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病発症機序を解明するためには、酸化ストレスによるドパミン作動性神経細胞死が、酸化ストレス後のどの反応によって起こるのかが明らかにすることが重要である。ここでは、パーキンソン病原因因子DJ-1がシステイン106残基の酸化型でのみ、p53と結合し、神経細胞死を抑制することを相互作用解析、細胞活性化測定から明らかにした。従来のDJ-1変異体とは異なり、DJ-1システイン106残基のチオール基を保持した恒常的還元型DJ-1変異体を作製したことで、DJ-1の酸化型と還元型の機能の違いを明確に分けることができるようになったことは、発症メカニズム解明のためにも非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease causative factor DJ-1 changes the oxidation valence of its cys106 stepwise after oxidation. However, since molecular protein research focusing on the oxidation valence and cell biology research on determining protein binding and cell death were conducted separately. Therefore, the mechanism of binding protein selection according to the oxidation valence of DJ-1 and the death control mechanism of nerve cells was not clear. We prepared a constitutively oxidized DJ-1 mutant and a constitutively reduced DJ-1 mutant, evaluated their p53-binding ability, and investigated the effect of suppressing nerve cell death, thereby revealed the mechanism by which the function changes in response to the oxidation of DJ-1 cys106 at the molecular and cellular levels.

研究分野：生物物理学

キーワード：酸化ストレス DJ-1 p53 分子間相互作用 パーキンソン病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

指定難病6のパーキンソン病は神経変性疾患の一つである。その発症機序のひとつとして、酸化ストレスによるドパミン作動性神経細胞死が挙げられる。しかしながら、酸化ストレス後にどのような反応が起こって神経細胞死が起こるのかは未知である。また、神経変性そのものを改善する治療薬はなく、その開発が望まれる。

DJ-1は家族性パーキンソン病原因遺伝子 *PARK7* である。我々は DJ-1 タンパク質が p53 などさまざまなタンパク質と結合することにより、転写調節因子やシグナル伝達因子、ミトコンドリア機能調節因子として機能することを報告してきた。DJ-1 タンパク質はホモ二量体を形成し、Cys106のSH基は酸化後SOH, SO₂H, SO₃Hと段階的に変化する。実際にパーキンソン病患者脳には過剰酸化型DJ-1が蓄積している。そのため、DJ-1は神経細胞内の酸化度を感知するセンサーとして働き、酸化度に応じた細胞内反応を司ると考えられてきた。しかしながら、DJ-1がどのように酸化ストレスレベルを感知し神経細胞内反応を制御するのかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ストレスのレベルに応じたDJ-1酸化価数変化がDJ-1機能を変化させると予測し、DJ-1-p53結合に着目し、パーキンソン病発症に重要である神経細胞死の制御機構を明らかにすることを目的に、研究を進めた。

以下の3項目を目的に実験を行った。まず、細胞内では均一に制御することが困難なDJ-1の酸化価数を制御すること、二つ目はDJ-1の酸化価数の変化がp53に与える影響を分子レベル、細胞レベルで解析すること。三つ目はDJ-1の酸化価数変化に伴う構造変化がp53結合能に及ぼす影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) DJ-1酸化価数の制御

DJ-1の酸化部位であるCys106以外の残基に変異をいれることで、Cys106のSH基が酸化されない恒常的還元型DJ-1変異体を新たにデザイン、作製した。作製した精製タンパク質のCys106酸化状態を調べるため、酸化型DJ-1認識抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。さらに、予備研究にてデザイン、作製済みであった恒常的酸化型DJ-1とともに、細胞発現系用プラスミドを作製した。

(2) 各酸化型DJ-1の神経細胞死抑制効果の比較

神経細胞へ恒常的酸化型DJ-1変異体もしくは今回新たに作製した恒常的還元型DJ-1変異体を過剰発現させ、過酸化水素投与後の細胞生存変化をMTS assayにて解析した。

(3) DJ-1とp53の相互作用解析

恒常的酸化型DJ-1変異体と今回新たに作製した恒常的還元型DJ-1変異体の各発現プラスミドを用い、大腸菌Rosetta2(DE3)を形質転換した。その後、グルタチオンセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行い、恒常的酸化型DJ-1と恒常的還元型DJ-1の各精製タンパク質を調整した。各恒常的DJ-1モデルタンパク質とp53DNA結合領域(DBD)との結合量の変化を、in vitroにて各酸化型DJ-1とp53を混合後、ゲル濾過クロマトグラフィーにおけるピーク位置を比較することにより、測定した。

(4) 恒常的DJ-1モデルタンパク質の結晶化

恒常的酸化型DJ-1変異体タンパク質、恒常的還元型DJ-1変異体タンパク質の結晶化およびX線結晶構造解析を行い、Cys106付近の詳細構造からDJ-1Cys106酸化価数を観測した。

(5) 恒常的酸化型DJ-1結合タンパク質の探索

DJ-1ノックアウトドパミン作動性神経細胞SH-SY5Y細胞へ恒常的酸化型DJ-1モデルDJ-1C106D変異体を導入して、酸化ストレス処理後免疫沈降実験を行い、恒常的酸化型DJ-1結合因子をSDS-PAGE後、質量分析計(waters AQUITY UPLC/Xevo G2-S Q Tof)を用いて同定を試みた。

4. 研究成果

(1) DJ-1は溶液中でも非常に酸化されやすく、大腸菌を用いた発現、精製では酸化価数調節が困難なため、各酸化価数のDJ-1が混在し、精製後の還元状態の維持は難しい。本研究では、還元剤が未添加でも、Cys106が還元型となる恒常的還元型DJ-1変異体を作製し、その大量調整に成功した。作製した恒常的還元型DJ-1タンパク質は酸化剤を加えた条件でも、酸化型DJ-1認識抗体で検出されなかった。このことは、新たにデザイン、作製したDJ-1変異体が恒常的還元型DJ-1モデルとして有用であることを示している。この恒常的還元型DJ-1変異体と予備実験の段階で作製していた恒常的酸化型DJ-1変異体を用いて、以後の相互作用実験を行うこととした。

さらに、今回新たに細胞内発現用の恒常的還元型 DJ-1 変異体及び、恒常的酸化型 DJ-1 変異体のプラスミドを作製し、以後の MTS assay に使用した。

(2) DJ-1 ノックアウトドパミン作動性神経細胞 SH-SY5Y 細胞へ空ベクター、野生型 DJ-1、恒常的酸化型 DJ-1 変異体、恒常的還元型 DJ-1 変異体をそれぞれ発現させ、酸化ストレス添加後の細胞生存を MTS assay にて測定した。その結果、恒常的酸化型 DJ-1 変異体が野生型 DJ-1 と同様に、酸化ストレス後の細胞死抑制に働くことを明らかにした。

(3) 野生型 DJ-1、恒常的酸化型 DJ-1 変異体タンパク質もしくは恒常的還元型 DJ-1 変異体タンパク質と p53 DBD の結合を、各タンパク質を *in vitro* で混合させた後、ゲル濾過クロマトグラフィーにて分離を行うことにより、測定した。その結果、酸化処理を行った野生型 DJ-1、恒常的酸化型 DJ-1 変異体でのみ、高分子側へシフトが見られた。このシフトは恒常的還元型 DJ-1 変異体では起こらなかった。また、補因子存在下で不安定化していた p53 DBD が恒常的酸化型 DJ-1 存在下で、安定化することを見出した。この安定化は恒常的還元型 DJ-1 との反応では見られなかった。溶出画分の変化は、溶出フラクションを使用した SDS-page, western blotting の実験においても、確認することができた。これにより、p53 DBD が酸化型 DJ-1 とのみ結合することが明らかとなった。

(4) 恒常的酸化型 DJ-1 変異体タンパク質および恒常的還元型 DJ-1 変異体タンパク質の結晶構造をそれぞれ 2.4 Å、2.6 Å で決定した。野生型 DJ-1 タンパク質では、酸化剤を加えない結晶化においても、溶液中で容易に酸化される DJ-1 の性質ゆえに Cys106 の SH 基が SOH 型の結晶が得られることが多い。今回、結晶化を行った恒常的還元型 DJ-1 では Cys106 以外の残基に変異をいれることで、Cys106 の SH 基が酸化されず、チオールとして存在することが確認できた。

(5) 各酸化型モデル特異的 DJ-1 変異体を DJ-1 ノックアウトドパミン作動性神経細胞へ導入し、プルダウン実験を行って、恒常的還元型 DJ-1 特異的結合因子のバンドが複数得られている。当初は酸化型 DJ-1 特異的因子同定を目的として行ったプルダウン実験であったが、酸化型 DJ-1 特異的結合因子に加え、恒常的還元型 DJ-1 を用いたプルダウン実験により、恒常的還元型 DJ-1 特異的結合因子も確認された。SH-SY5Y 細胞抽出液へ変異体タンパク質を添加して、プルダウン実験を行うことにより、質量解析に必要な高容量の結合因子獲得できたことで、結合因子の同定が特定できつつある。

以上の結果から、DJ-1 は cys106 の酸化に応じて、p53 結合能を変化させること、さらに神経細胞死抑制機能発揮には cys106 の酸化状態が必須であることが考えられた。今後は、恒常的酸化型 DJ-1 変異体、恒常的還元型 DJ-1 変異体の結合因子探索をさらに進め、パーキンソン病発症に繋がる酸化ストレスに応じた神経細胞死に、DJ-1 が司令塔として果たす役割を明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takuya Yamane, Izumi Kato-Ose, Tatsuji Sakamoto and Yoshihisa Nakano	4. 巻 12
2. 論文標題 Secretion of Legumain Increases in Conditioned Medium from DJ-1-Knockout Cells and in Serum from DJ-1-Knockout Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open Biochem. J.	6. 最初と最後の頁 29-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1874091X01812010029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 雄大、加藤 いづみ、前仲 勝実、市川 聡、堺谷 政弘
2. 発表標題 パーキンソン病治療薬を指向した酸化ストレス誘導神経細胞死抑制剤の構造活性相関研究
3. 学会等名 第35回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------