

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590091

研究課題名（和文） 家族性パーキンソン病原因遺伝子DJ-1発現誘導機構解明と  
治療法開発への試み研究課題名（英文） Study on transcriptional activation mechanism of DJ-1 gene (*PARK7*)  
and the trial to Parkinson's disease cure development

研究代表者

平 敬宏 (TAIRA TAKAHIRO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：70197036

研究成果の概要（和文）：家族性パーキンソン病（PARK7）原因遺伝子産物であるDJ-1タンパク質は、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）とタンパク質複合体を構成する事が明らかにされていたが、DJ-1タンパク質のTH発現誘導機構については、未解明であった。本研究では、DJ-1タンパク質のチロシンヒドロキシラーゼ（TH）の発現誘導機構を明らかにし、さらにヒトとマウスではその作用に違いがある事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The DJ-1 protein which is a familial Parkinson's disease (PARK7) causative gene product. It was already shown clearly that DJ-1 protein is associated with tyrosine hydroxylase (TH). Although it had been unknown the mechanism of transcriptional activation of TH gene by DJ-1 protein. In this research, We clarified trans-activation mechanism TH gene by DJ-1 protein. Also among human, mouse and rat, it was shown clearly that a mechanism has a difference.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：DJ-1，パーキンソン病，酸化ストレス，神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

DJ-1は、新規がん遺伝子として我々が1997年に報告した後、2003年になり家族性パーキンソン病（PARK7）原因遺伝子である事が判明

した。従来よりパーキンソン病（PD）発症には、酸化ストレスによる神経細胞傷害が提起されていたが、我々はDJ-1タンパク質が酸化ストレス防御因子である事を明らかにしている

(Taira et al EMBO Report, 2004)。しかしながら、PD 発症には様々な遺伝要因と環境要因を介して、酸化ストレスのみならず小胞体ストレス、ミトコンドリア機能低下、タンパク質分解系の障害、細胞骨格の異常等が複雑に連関するため、その全容は未解明であった。

一方、DJ-1 タンパク質は、神経細胞内で巨大なタンパク質複合体を形成する事が明らかにされ、その複合体には、PD 発症に深く関与する tyrosine hydroxylase (TH) が含まれている事が明らかにされていた。神経細胞由来 SH-SY5Y 細胞に、si-RNA を導入し DJ-1 タンパク質をノックダウンすると、TH のタンパク質発現、mRNA 転写量をそれぞれ低下させる事が明らかになった。これにより、DJ-1 タンパク質が、dopamine 産生を制御する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

先行研究から、DJ-1 タンパク質がパーキンソン病発症に強く関連した dopamine 産生制御に関与する事が示唆されたことから、その発現制御メカニズム解明を目指した。また dopamine 産生制御を応用した新規パーキンソン病治療法の開発を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) TH 遺伝子転写プロモーターの単離

データベースから、TH 遺伝子転写プロモーター領域約 5 kb, 10 kb を増幅するプライマーを作成し、ヒトおよびマウスゲノム DNA を鋳型とし PCR で DNA 断片を得た。得られた断片の塩基配列解析から、目的の TH 遺伝子プロモーター領域である事を確認後、プロモーター下流に Luciferase 遺伝子を連結したレポータープラスミドを作成した。

### (2) TH 遺伝子レポータープラスミドの確認

レポータープラスミドを、ヒト神経細胞由来 SH-SY5Y 細胞、マウス神経細胞由来 Neuro2a 細胞に導入し、転写活性を有することを確認した。

### (3) DJ-1 タンパク質の TH 遺伝子転写プロモーターへの作用検討

レポータープラスミドと各種 DJ-1 発現プラスミドを共導入して、転写活性変化を調べた。

### (4) DJ-1 タンパク質の TH プロモーター上の作用点決定

TH 遺伝子転写プロモーターの 5' 側から連続的な各種 deletion レポータープラスミドを作成し、DJ-1 タンパク質の TH プロモーター上の作用点を、Luciferase assay により決定

した。さらに、作用点を欠損または塩基置換を導入したレポータープラスミドを作成した。

### (5) 転写制御機構の解明

レポーターアッセイにより決定した DJ-1 タンパク質の作用点に、DJ-1 とともに作用する転写因子を、クロマチン免疫沈降法により同定する。

## 4. 研究成果

### (1) TH 遺伝子転写プロモーター上の DJ-1 タンパク質の作用点決定

ヒト SH-SY5Y 細胞に、ヒト TH 遺伝子レポータープラスミド及びヒト DJ-1 タンパク質発現プラスミドを共導入すると、DJ-1 用量依存的に TH 遺伝子発現量 (Luciferase 活性) が上昇し、その作用点が既に報告のあった転写抑制タンパク質 PSF (polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor) の作用部位と一致することが判明した。

### (2) DJ-1 タンパク質による TH 転写活性化機構

DJ-1 タンパク質が、転写抑制タンパク質である PSF を吸収することにより、TH プロモーター上から解離させることが明らかになった。これにより、TH プロモーターは PSF の転写抑制作用を解除し、発現誘導されることを明らかにした。

### (3) DJ-1 は、DDC (dopa decarboxylase) 遺伝子も活性化する

Dopamine は、最初にチロニンが、TH により DOPA (L-Dihydroxyphenylalanine) に変換され、ついで DDC により Dopamine に変換される。Dopamine 生合成では TH が律速酵素であるが、DDC 酵素活性は Dopamine 生成量を左右する。SH-SY5Y 細胞に DJ-1 タンパク質を強制発現、または si-RNA 添加によりノックダウンさせ、DDC 酵素活性、及び DDC mRNA 量の変動を検討した結果、DJ-1 タンパク質は、DDC mRNA 発現誘導し DDC 酵素活性を上昇させることも明らかになった。

### (4) DJ-1 タンパク質による TH および DDC 酵素活性化は、ヒト特異的である

DJ-1 タンパク質による、TH 及び DDC 酵素活性化は、ヒト特異的に観察され、マウスでは活性化が生じない、種特異性を明らかにした。この結果は、ヒト PARK7 患者で DJ-1 遺伝子が責任遺伝子として機能しているのに対し、DJ-1 欠損 (KO) マウスでは、パーキンソン病特有表現型を示さない矛盾点が示されていたが、dopamine 生成制御がヒト特異的であり、この矛盾点を説明できた。

以上の研究成果は、パーキンソン病におけるDJ-1 タンパク質の重要性をさらに認識づけるものであり、DJ-1 タンパク質（製剤）による dopamine 生成活性化により新規パーキンソン病治療法の可能性が示すものである。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 11 件）

1. Ashizawa A, Higashi C, Masuda K, Ohga R, Taira T, Fujimuro M. The Ubiquitin System and Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. (2012) *Front. Microbiol.*, 査読有, 3:1-10.
2. Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakagawa T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. (2011) The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neurosci.*, 査読有, 8; 12: 81.
3. Inden M, Kitamura Y, Takahashi K, Takata K, Ito N, Niwa R, Funayama R, Nishimura K, Taniguchi T, Honda T, Taira T, Ariga H. (2011) Protection against dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease-model animals by a modulator of the oxidized form of DJ-1, a wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7. *J Pharmacol Sci.*, 査読有, 117(3): 189-203
4. Ishikawa, S., Taira, T., Takahashi-Niki, K., Niki, T., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S.M.M. (2010) Human DJ-1-specific transcriptional activation of tyrosine hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 285: 39718-39721
5. Yamane, K., Kitamura, Y., Yanagida, T., Takata, T., Yanagisawa, D., Taniguchi, T., Taira, T. and Ariga, H. (2009) Oxidative neurodegeneration is prevented by UCP0045037, an allosteric modulator for the reduced form of DJ-1, a wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, 10(11): 4789-4804.
6. Hayashi, T., Ishimori, C., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Kim, Y.-C., Maita, H., Maita, C., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S.M.M. (2009) DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 390, 667-672.
7. Ishikawa, S., Taira, T., Niki, T., Takahashi-Niki, K., Maita, C., Maita, H., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S.M.M. (2009) Oxidative status of DJ-1-dependent activation of dopamine synthesis through interaction of tyrosine hydroxylase and 4-dihydroxy-l-phenylalanine (l-DOPA) decarboxylase with DJ-1. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 284, 28832-28844.
8. Kim, Y.-C., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H. (2009) Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. *Int. J. Oncol.*, 査読有, 35, 1331-1341.
9. Inden, M., Kitamura, Y., Tamaki, A., Yanagida, T., Shibaike, T., Yamamoto, A., Takata, K., Yasui, H., Taira, T., Ariga, H. and Taniguchi, T. (2009) Neuroprotective effect of the antiparkinsonian drug pramipexole against nigrostriatal dopaminergic degeneration in rotenone-treated mice. *Neurochem. Int.*, 査読有, 55(8), 760-767.
10. Yanagida, T., Kitamura, Y., Yamane, K., Takahashi, K., Takata, K., Yanagisawa, D., Yasui, H., Taniguchi, T., Taira, T., Honda, T. and Ariga, H. (2009) Protection against oxidative stress-induced neurodegeneration by a modulator for DJ-1, a wild-type of familial Parkinson's disease-linked

PARK7. *J. Pharmacol. Sci.* 査読有, 109, 463-468.

11. Yanagida, T., Tsushima, J., Kitamura, Y., Yanagisawa, D., Takata, K., Shibaike, T., Yamamoto, A., Taniguchi, T., Yasui, H., Taira, T., Morikawa, S., Inubushi, T., Tooyama, I. and Ariga, H. (2009) Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 査読有, 1, 36-42.

[学会発表] (計7件)

1. 平 敬宏, 家族性パーキンソン病 (PARK7)原因遺伝子産物 DJ-1 タンパク質の生物種差 第13回応用薬理シンポジウム 2011, 09, 03 船橋市
2. 鈴木千恵, 手石方康弘, 笹島仁, 横澤英吉, 平 敬宏, 藤室雅弘, がんウイルスによるアポトーシス制御因子 p32/HABP1/ gC1qRの機能阻害 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同会 2010, 12, 12 神戸市
3. Kunio Miyake, Takae Hirasawa, Masaki Soutome, Masayuki, Itoh, Yu-ichi Goto, Kazushi Endoh, Shinichi Kudou, Sana Yokoi, Takahiro Taira, Johji Inazawa, Takeo Kubota, Identification of MeCP2-target synaptic molecules associated with pathogenesis of Rett syndrome 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同会 2010, 12, 08 神戸市
4. 石川静麻, 平 敬宏, 仁木加寿子, 仁木剛史, 有賀寛芳, 有賀早苗, ヒト DJ-1 特異的なチロシン水酸化酵素遺伝子の転写活性化調節 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会 第20回日本神経回路学会大会合同大会 2010, 09, 03 神戸市
5. 平 敬宏, 家族性パーキンソン病 (PARK7)原因遺伝子産物 DJ-1 タンパク質の機能と今後の研究課題 第17回順天堂大学神経学セミナー 2010, 03, 30 東京都文京区
6. 石川静麻, 平 敬宏, 有賀寛芳, 有賀早苗, Human DJ-1-dependent activation

of dopamine biosynthesis through interction of tyrosine hydroxylase with DJ-1 第32回日本分子生物学会年会 2009, 12, 09, 横浜市

7. 金 允哲, 北浦廣剛, 平 敬宏, 有賀早苗, 有賀寛芳, Inhibition of PTEN phosphatase activity by the direct interaction of DJ-1 with PTEN under the oxidative conditions 第32回日本神経科学会大会 2009, 9, 16 名古屋市

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

平 敬宏 (TAIRA TAKAHIRO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：70197036

##### (2)研究分担者

王賀 理恵 (OHGA RIE)

山梨大学・医学部・助手

研究者番号：00160432

藤室 雅弘 (FUJIMURO MASAHIRO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：20360927

(2009年度～2010年度)

##### (3)連携研究者

なし