

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 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790809

研究課題名（和文） パーキンソン病原因遺伝 DJ-1 による酸化ストレスの防御機構

研究課題名（英文） Antioxidative defense mechanism of DJ-1, parkinson's disease related gene

研究代表者

仁木 剛史（NIKI TAKESHI）

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90377193

研究成果の概要（和文）：DJ-1 は抗酸化ストレス等の様々な機能を有し、機能不全でパーキンソン病を引き起こす。以前、我々は、DJ-1 結合化合物（compound B）が神経細胞死を抑制することを報告しているが、その作用メカニズムは不明である。この研究において、我々は compound B の Nrf2 転写活性化に対する影響を検討した。compound B は、過酸化水素により誘導される Nrf2 タンパク質安定性及び転写活性化を促進した。DJ-1 と結合化合物が Nrf2 活性化を増強して酸化ストレスによる神経細胞死から保護する事が示された。

研究成果の概要（英文）：DJ-1 has multiple functions, including anti-oxidative stress, and its dysfunction may be linked to the onset of Parkinson's disease. In previous study, we isolated compounds that bind to DJ-1. These compounds prevented oxidative stress-induced cell death via DJ-1. But the action mechanism of DJ-1 binding compounds is unknown. In this study, we examined the effects of compound B, a DJ-1 binding compound on Nrf2 transcriptional activity. Compound B facilitated the H₂O₂-induced Nrf2 transactivation. Additionally, protein stability of Nrf2 was improved by compound B with H₂O₂. We suggest that DJ-1 and its binding compound B protect against neuronal death through enhancement of oxidative stress-induced Nrf2 transactivation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、神経内科学

キーワード：神経分子病態学、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

脳神経疾患の分子機構解明は今後迎える高齢化社会の重要な課題である。また、脳は酸化ストレスに脆弱であり、パーキンソン病を含む多

くの疾患を誘発する。現在、家族性パーキンソン病は 10 数種類の遺伝子座に変異が発見されている。また、神経の変性は酸化ストレスによる神経のアポトーシスが主な原因と考えられている。

本申請課題対象である DJ-1 は機能不全でパーキンソン病を発症する。

DJ-1 は、抗酸化ストレス、転写調節、プロテアーゼ、ミトコンドリアコンプレックス 1 の制御機能を有することが申請者により明らかになっている。これまでに、申請者らはパーキンソン病患者に見られる DJ-1 変異体は抗酸化ストレス作用が減弱していること明らかにしている。DJ-1 の抗酸化ストレスのメカニズムは DJ-1 の有する 3 つのシステイン残基が活性酸素種により酸化され、ROS を除去することで細胞死を抑制すると考えられている。

さらに DJ-1 は酸化ストレス応答遺伝子の主な転写因子 Nrf2 を安定化することが示された。Nrf2 は非酸化ストレス下では、Keap1 と結合して細胞質に保持され、ユビキチン-プロテアソーム系により分解される。酸化ストレス存在下では、Nrf2 は Keap1 から解離し、核移行して酸化ストレス応答(防御)遺伝子群の上流に存在する ARE 配列に結合して転写を活性化する。

また、DJ-1 は、酸化ストレスに対する防御として PI3K-AKT 経路にも関与することが、明らかにされつつあり、細胞死との関与など興味深い知見が得られている。

現在使用されているパーキンソン病治療薬はドパミンの補給、分解抑制の代償薬であり、治療中も神経細胞死は進行するため根本的な治療法はない。さらに最近、申請者らが決定した DJ-1 の結晶構造を基にして、DJ-1 の C106 に結合する低分子化合物をバーチャルスクリーニングし、候補化合物の酸化ストレス誘導神経細胞死抑制能を検討したところ、DJ-1 との結合力に比例して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することに成功した(Miyazaki et al. 2008)。今後、パーキンソン病治療薬として発展させるためにも、その病因解明と治療法の確立は極めて重要である。

2. 研究の目的

DJ-1 による酸化ストレスの防御のメカニズムを分子、細胞、動物固体レベルで解析し、さらにこれらの疾患の発症機構を明らかにし、同時に治療薬、診断薬への医療用途を目的とする。特に以前、我々のグループにより同定している DJ-1 に結合し、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制する化合物の作用機序を明らかにすることに主眼をおいて研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1)Nrf2 転写活性化能の検討

Nrf2 の結合配列である ARE 配列をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に連結させたプラスミドを細胞に導入した。同時に pCMV- β -galactosidase を同時に導入し、その活性で導入効率を補正した。導入 48 時間後、過酸化水素(0-400 μ M)、

compound B(1 μ M)を培地に添加し、細胞を回収しルシフェラーゼアッセイを行った。

(2)Nrf2 タンパク質安定性の解析

SH-SY5Y 細胞に 100 μ M H₂O₂、1 μ M compound B シクロフェキサミド(10 μ g/ml)を添加し、20 分毎に細胞を回収した。その細胞抽出液を抗 Nrf2 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより Nrf2 タンパク質を定量した。

(3)Keap1 と DJ-1 の結合解析

SH-SY5Y 細胞に Flag-Keap1 を恒常的に発現させた細胞を樹立した。その細胞抽出液を用いて抗 Flag 抗体で免疫沈降し、抗 DJ-1 抗体でウエスタンブロッティングを行った。

(4)compound B による Nrf2 転写活性化に対する PI3K、AKT 阻害薬の影響の検討

研究の方法(1)と同様の方法に PI3K 阻害薬(10 μ M LY294002)、AKT 阻害薬(0.1 μ M Akt inhibitor IV)を添加してルシフェラーゼアッセイを行った。

(5)PTEN 欠損細胞を用いた compound B の Nrf2 転写活性化能に対する解析

PTEN が欠損しているヒト前立腺がん PC3 細胞を用いて研究の方法(1)と同様の方法でルシフェラーゼアッセイを行った。

(6)in vitro PTEN フォスファターゼ活性の測定

大腸菌を用いて DJ-1、PTEN を発現精製した。DJ-1 及び PTEN に 1 μ M compound B、100 μ M H₂O₂ を添加し、PTEN malachite green assay kit を用いて PTEN フォスファターゼを測定した。

4. 研究成果

(1)過酸化水素誘導 Nrf2 転写活性化に対する compound B の影響

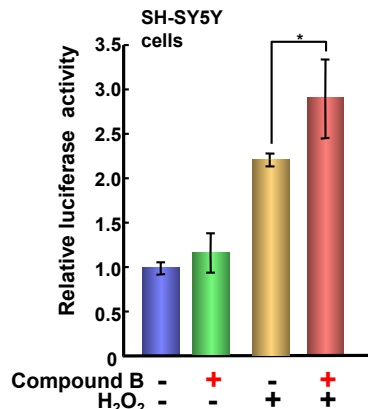
Nrf2/Keap1 経路に compound B が影響するのかわかると神経芽細胞種 SHSY5Y で Nrf2 による転写活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。溶媒の DMSO と比較して compound B 単独では転写活性に変化はなかった。過酸化水素により増加する活性が、さらに compound B を添加することで有意に増強した。

またこの効果は処理後 6 時間後から増加が観察された。これらから compound B は Nrf2 を介して細胞死抑制効果を発揮することが示唆されました。

次に、compound B の Nrf2 増強効果が DJ-1 を介したものかどうか検討した。DJ-1 をノックアウトした細胞では、DJ-1 を発現している細胞と比べて強い酸化ストレス条件下で Nrf2 による転写活性化がしていた。それに対して、さらに compound B を添加しても変化はなかった。これ

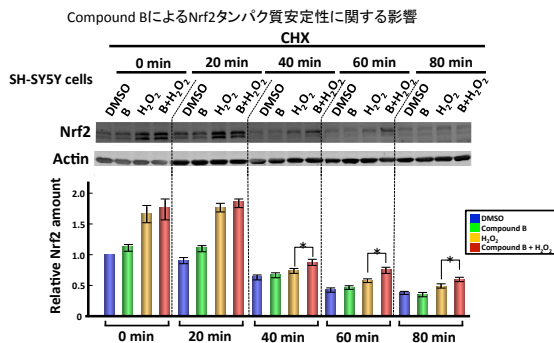
より compound B の Nrf2 増強効果が DJ-1 を介したものであることが明らかになった。

Compound Bと過酸化水素によるNrf2転写活性に対する影響



(2) Nrf2 タンパク質安定性に対する compound B の影響

Compound B による Nrf2 転写活性化増強作用の要因として Nrf2 タンパク質の安定性が関与しているかどうか検証した。SHSY5Y 細胞にタンパク質の新規合成阻害剤であるシクロヘキサミド (CHX) を処理し Nrf2 タンパク質量を比較した。CHX 処理後 40 分後から過酸化水素と CompoundB の同時処理で有意に Nrf2 タンパク質の減少が抑制されることが明らかとなった。このことから Compound B による Nrf2 による転写活性化の増強は、Nrf2 タンパク質の安定性の増強によることが示唆された。



(3) Nrf2 タンパク質安定性に対する compound B の作用メカニズムの検討

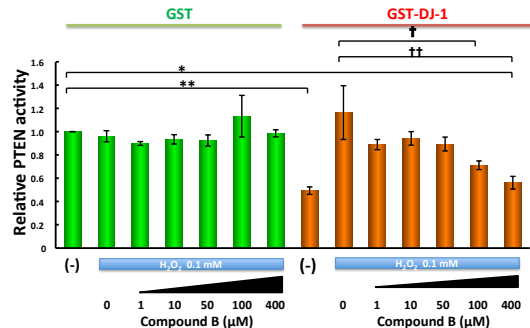
DJ-1 と Compound B が Nrf2 タンパク質を安定化することから、当初 Nrf2 の分解を促進する Keap1 との関連を考えたが、Keap1 と DJ-1 の結合が見られなかったことから、Nrf2 の別の制御経路である PI3K/Akt 経路に注目した。DJ-1 はこの経路を抑制する PTEN フォスファターゼに結合しその酵素活性を抑制することが報告されている。まず PI3K/Akt 経路に CompoundB が影響するのかを PI3K および Akt インヒビターを用い

て検討した。PI3K インヒビター、Akt インヒビターにより、未処理の細胞示される過酸化水素条件下での Compound B による Nrf2 による転写活性化の増強が見られなくなった。このことから Compound B の作用点は PI3K あたりであることが示唆された。

次に、PTEN 欠損細胞ヒト前立腺癌由来 PC3 細胞を用いて同様の実験を行った。PTEN 欠損細胞でも過酸化水素処理によって Nrf2 転写活性は増加した。しかし Compound B 添加をしてもさらなる増加は観察されず、PTEN 欠損細胞では Compound B の効果が失われることが示された。このことから Compound B と DJ-1 は PTEN を介して PI3K/Akt 経路を活性化し Nrf2 による転写を活性化していることが考えられた。

そこで大腸菌を用いて PTEN および DJ-1 を発現、精製し in vitro での酵素活性への影響を検討した。GST-DJ-1 を加えるとコントロールと比較して DJ-1 による有意な PTEN 活性の抑制が見られた。そこに過酸化水素を加えると、DJ-1 による PTEN 酵素活性の抑制は解除された。しかしながら高濃度の Compound B の添加により過酸化水素により解除された DJ-1 の PTEN 抑制効果が再び見られた。またコントロールの GST ではこのような変化は見られなかった。このことから Compound B によって酸化ストレスによる DJ-1 過剰酸化が回避され PTEN 酵素活性の抑制が維持されることが示唆された。

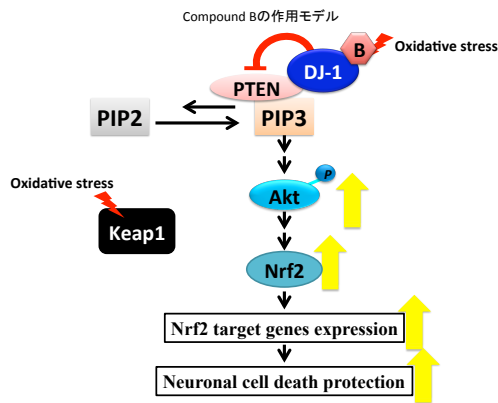
酸化ストレス下でのDJ-1とcompound BのPTEN活性に対する影響



以上の結果から、このようなモデルを考えている。Nrf2 は主に Keap1 経路を介して制御されているが、DJ-1 は Nrf2 上流の PTEN の酵素活性を抑制することで Nrf2 の転写活性を制御していると考えられる。Compound B を加えていない状態で酸化ストレスが加わると DJ-1 による PTEN の抑制が外れ、Akt 経路を介して Nrf2 は活性化されない。Keap1 経路による Nrf2 の活性化に対して過剰な活性化の抑制の方向に働きバランスを取っているのではないかと考えている。

しかし、Compound B を処理した条件で酸化ストレスが加わると DJ-1 による PTEN の抑制は維持され Akt 経路の活性化、Nrf2 の転写活性の増強が引き起こされ Nrf2 標的遺伝子の抗酸化ストレス遺伝子群によって細胞死が抑制されること

が考えられる。



(4)まとめ

DJ-1 とその結合化合物である compound B と DJ-1 により機能調節を受ける PTEN フォスファターゼの3者の関係を in vitro で作用の本体まで再構成できたことは高い評価を得られると考えられる。今後、これらの結果を活性面からだけではなく、構造解析などを行い、さらに結果を検証していきたいと考えている。

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2件)

① Human DJ-1-specific transcriptional activation of tyrosine hydroxylase gene. Ishikawa S, Taira T, Takahashi-Niki K, Niki T, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. Journal of Biological Chemistry 査読あり 2010年 285(51):39718-31 DOI: 10.1074/jbc.M110.137034

② Stimulation of vesicular monoamine transporter 2 activity by DJ-1 in SH-SY5Y cells Shizuma Ishikawa, Yuki Tanaka, Kazuko Takahashi-Niki, Takeshi Niki, Hiroyoshi Arigab, Sanae M.M. Iguchi-Ariga Biochem. Biochemical and Biophysical Research. 2012年 in press 査読あり DOI: 0.1016/j.bbrc.2012.04.095

[学会発表] (計5件)

① Niki, T., Takahashi-Niki, K., Okamoto, A., Endo, J., Ariga, H., Iguchi-Ariga, S. M. M. Oxidative stress-response by DJ-1 and its binding compounds. The 41th annual meeting of the Society for Neuroscience (2011年11月12日 Washington DC, USA)

② 仁木 剛史, 仁木(高橋) 加寿子, 岡本麻美, 遠藤仁朗, 瀬在和哉, 有賀 寛芳, 有賀(井口) 早苗

パーキンソン病原因遺伝子産物DJ-1とその結合化合物による酸化ストレス誘導Nrf2転写活性化能に対する影響

第84回日本生化学会大会 (2011年9月23日、神戸)

③ 仁木(高橋) 加寿子, 仁木 剛史, 辻美咲, 北浦 廣剛, 有賀(井口) 早苗, 有賀 寛芳

DJ-1の抗酸化ストレスセンサーとしての役割

第84回日本生化学会大会 (2011年9月23日、神戸)

④ 仁木加寿子, 仁木剛史, 有賀(井口) 早苗, 有賀寛芳

パーキンソン病原因遺伝子DJ-1の抗酸化ストレス機能の解析

BMB2010(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大会) (2010年12月、神戸)

⑤ 仁木剛史, 仁木(高橋)加寿子, 遠藤仁朗, 瀬在和哉, 岡本麻美, 有賀寛芳, 有賀(井口) 早苗

パーキンソン病原因遺伝子産物DJ-1とその結合化合物による酸化ストレス応答

BMB2010(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大会) (2010年12月、神戸)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/emolb/introduce.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁木 剛史 (NIKI TAKESHI)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：90377193

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

仁木 加寿子 (NIKI KAZUKO)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：50447645