

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790970

研究課題名(和文)パーキンソン病原因遺伝子DJ-1の神経細胞保護機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of neuroprotective function of Parkinson's Disease Gene DJ-1

研究代表者

仁木 加寿子(Takahashi-Niki, Kazuko)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50447645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：

[酸化ストレス時に分泌されるDJ-1の機能解析]酸化ストレス条件下において、アストロサイトから分泌されたDJ-1により、共培養した神経細胞の細胞生存率が増加する事を明らかとしました。また、家族性パーキンソン病PARK7で報告されている変異型DJ-1の細胞外への分泌が、野生型DJ-1に比べて少ないことを見出しました。
[DJ-1のプロテアーゼ機能の解析]DJ-1のプロテアーゼとしての性質の解明を行いました。また、DJ-1によって切断される配列の絞り込みを行い、基質候補を得ました。

研究成果の概要(英文)：

[Function analysis of DJ-1 secreted under oxidative stress] We found that secreted DJ-1 from astrocytes protected co-cultured neurons against oxidative stress. Furthermore, we found that the amount of secreted DJ-1 mutants found in Familial Parkinson's disease PARK7 was less than DJ-1 wt.
[Function analysis of DJ-1 as protease] We analyzed the biochemical characterization of DJ-1 protease. Furthermore, we identified the recognition sequences for DJ-1 protease and targeted proteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：DJ-1 パーキンソン病 PARK7 酸化ストレス 分泌

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、1997年に新規がん遺伝子として DJ-1 を同定し (Nagakubo D et al. 1997)、DJ-1 が転写調節機能を持つ事、抗酸化機能を持つ事、プロテアーゼ活性を持つ事を報告しています。

DJ-1 は 2004 年に家族性パーキンソン病原因遺伝子 PARK7 である事が報告され、申請者は PARK7 患者に見られる変異型 DJ-1 遺伝子産物は抗酸化機能が減弱している事を報告しました。

パーキンソン病は、アルツハイマー病に次いで多い神経変性疾患で、中脳黒室ドーパミン神経の変性・脱落により発症し、運動障害などを生じます。神経が冒される原因については諸説あり、酸化ストレス・ミトコンドリア障害、異常タンパク質の蓄積などの関与が示唆されています。しかしなぜドーパミン神経が障害をうけるのかといったことも含めまだ未解明の部分が多い状況です。

2. 研究の目的

DJ-1 のこれまでに明らかとなっている様々な機能に加え、ダイレクトに神経細胞を保護している機構を明らかにしていくために、3つの目的を設けました。

(1) 神経細胞が損傷した際の DJ-1 の再生・修復機構の解明

(2) DJ-1 が酸化ストレス下で細胞外に分泌されて、神経細胞を保護している機能の解明

(3) DJ-1 がプロテアーゼとして細胞を凝集ストレスから保護している機能の解明

3. 研究の方法

本申請研究を解析するうえで考慮すべき論文を申請者らは 2008 年に発表しています。この論文では「脳卒中時に DJ-1 が分泌され、脳卒中直後の脳に DJ-1 を投与したところ脳卒中による傷害が軽減された」事を報告しています。加えて、脳虚血の再還流時に活性酸素が出るとの見解もあり、本申請研究は異なる 3つのアプローチであると同時に、『(2)DJ-1 の分泌 (3)自身の酸化による抗酸化機能とプロテアーゼとしての機能 (1) 神経細胞の修復』という DJ-1 の連続した保護機能を総合的に解析する事も計画しました。

(1)DJ-1 の神経細胞再生・修復機能の検討
DJ-1 の神経細胞再生を観察するために初代神経培養細胞を作製し、機械的もしくは薬剤により傷を作製し、神経再生を経時的な観察・測定を試みました。

(2) 分泌された DJ-1 の機能解析
酸化ストレス時に分泌される DJ-1 の機能を解析するために、BD Falcon 社から発売されているインサート培養用 dish を用いて行いました。材料は妊娠マウス及びラットの胎児から大脳皮質および中脳の初代神経培養細胞

胞を作製し、アフィディコリンもしくは AraC などでグリア細胞を排除した物を主に用いました。

DJ-1 を分泌する初代グリア培養細胞は別途妊娠マウス及びラットの胎児から作製してセルカルチャーインサートにまき、神経細胞が培養されている dish にセットし、過酸化水素処理による酸化ストレスをかけ、分泌された DJ-1 の抗酸化機能、ROS 消去能を解析しました。

さらに、グリア細胞を不死化し、家族性パーキンソン病 PARK7 で報告された DJ-1 変異体を導入した細胞株を作成し、その分泌量、分泌による変異 DJ-1 の抗酸化機能、ROS 消去能を解析しました。

(3) DJ-1 のプロテアーゼ機能の解析

ペプチド研究所から発売されている基質ライブラリーを用いて、DJ-1 の野生型、C106S 変異体、DJ-1 H9、DJ-1 H9C106S を添加して基質特異性を検討しました。

ライブラリーのデザイン上、上記の一次スクリーニングでは 25 種類の基質混合物の段階までであるため、酵素活性の高かった基質混合物のサンプルの水解断片を LC-MS で分析し、その分子量から水解された部位のアミノ酸配列を特定しました。

4. 研究成果

(2) 分泌された DJ-1 の機能解析

酸化ストレス条件下において、DJ-1 の分泌により共培養した神経細胞の細胞生存率が增加する事を明らかとしました。また、家族性パーキンソン病患者で報告されている変異型 DJ-1 のいくつかは、細胞外への分泌が野生型に比べて少ない事も見出しました。

これらのことから、家族性パーキンソン病 PARK7 の患者さんでは、酸化ストレスが生じた際に細胞外に分泌されて働く DJ-1 量が健康人に比べて少ないために、酸化ストレスに対して脆弱であり、早期にパーキンソン病を発症するのではないかと考えられます。

(3) DJ-1 のプロテアーゼ機能の解析

DJ-1 プロテアーゼの性質として、pH5.5 において最も活性が高いこと、二価イオンによる阻害を受け、特に銅イオンによって強く阻害される事を明らかとしました。

また、DJ-1 による切断配列も解析し、valine-lysine-valine-alanine (VKVA) の配列を特に好んで切断する事を見出しました。

これらの結果を受けて、DJ-1 によって切断される基質を探索し、いくつかの基質候補を得、その中から invitro において実際に DJ-1 による切断を受ける基質の同定に至りました。今後はこれら基質をとおした DJ-1 のプロテアーゼとしての機能を解析し、パーキンソン病発症メカニズム解明及び治療法・予防法解明につなげていけると期待しています。

(1) DJ-1 の神経細胞再生・修復機能の検討
本項目については、(1)(2)の解析を受けて着手したため、本助成事業は終了していますが、申請書に記載した実験手法に基づき解析を継続しています。

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8件)

Transcriptional activation of the cholecystokinin gene by DJ-1 through interaction of DJ-1 with RREB1 and the effect of DJ-1 on the cholecystokinin level in mice.

Yamane, T., Suzui, S., Kitaura, H., Takahashi-Niki K., Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H.

PLoS ONE / 8(11)/ e78374/ 2013

doi: 10.1371/journal.pone.0078374. 査読有

Identification of the recognition sequence and target proteins for DJ-1 protease.

Mitsugi H., Niki T., Takahashi-Niki K., Tanimura K., Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M., Iguchi-Ariga SM, Ariga H.

FEBS Letters / 587(16)/ 2493-9/ 2013

doi: 10.1016/j.febslet.2013.06.032.

査読有

Neuroprotective Function of DJ-1 against Parkinson's Disease.

Ariga H*. Takahashi-Niki K., Kato I, Maita H, Niki T., Iguchi-Ariga SM

Oxidative Medicine and Cellular Longevity / 683920 / 2013 review

doi: 10.1155/2013/683920. 査読有

Oxidized DJ-1 inhibits p53 by sequestering p53 from promoters in a DNA-binding affinity- dependent manner.

Kato I, Maita H, Takahashi-Niki K., Saito Y, Noguchi N, Iguchi-Ariga SM, Ariga H.

Mol Cell Biol./ 33(2)/ 240-59/ 2013

doi: 10.1128/MCB.01350-12. 査読有

Transcriptional activation of low-density lipoprotein receptor gene by DJ-1 and effect of DJ-1 on cholesterol homeostasis.

Yamaguchi S, Yamane T, Takahashi-Niki K., K, Kato I, Niki T, Goldberg MS, Shen J, Ishimoto K, Doi T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H.

PLoS One./ 7(5)/ e38144/ 2012

doi: 10.1371/journal.pone.0038144. 査読有

Stimulation of vesicular monoamine

transporter 2 activity by DJ-1 in SH-SY5Y cells.

BBRC/ 421(4)/ 813-8/ 2012

Ishikawa S, Tanaka Y, Takahashi-Niki K., Niki T, Ariga H. Iguchi-Ariga SM.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.095. 査読有

Neuroprotective effect of a new DJ-1-binding compound against neurodegeneration in Parkinson's disease and stroke model rats.

Kitamura Y, Watanabe S, Taguchi M, Takagi K, Kawata T, Takahashi-Niki K., Yasui H, Maita H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H.

Mol Neurodegener./ 6(1)/ 1750-/ 2011

doi: 10.1186/1750-1326-6-48. 査読有

総説

DJ-1 のミトコンドリアにおける機能

仁木(高橋)加寿子、仁木剛史、有賀(井口)早苗、有賀寛芳

薬学雑誌/132 巻/1105-10 頁/2012 年/査読無

[学会発表](計6件)

アストロサイトから分泌された DJ-1 による神経細胞死抑制

仁木(高橋)加寿子、綿引佑実、仁木剛史、北浦廣剛、有賀(井口)早苗、有賀寛芳

第86回日本生化学会大会/2013年9月11日 神奈川県横浜市

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

仁木(高橋)加寿子、仁木剛史、有賀(井口)早苗、有賀寛芳

第85回日本生化学会大会/2012年12月15日 福岡県福岡市

DJ-1 のミトコンドリアにおける機能

仁木(高橋)加寿子、仁木剛史、米田千夏、我那覇陽子、有賀(井口)早苗、有賀寛芳

日本薬学会第132回年会シンポジウム/2012年3月29日 北海道札幌市

DJ-1 のミトコンドリアにおける機能

仁木(高橋)加寿子、仁木剛史、米田千夏、我那覇陽子、有賀(井口)早苗、有賀寛芳

ミトコンドリアと DDS2 /2012年1月20日 北海道札幌市

DJ-1 の抗酸化ストレスセンサーとしての役割

仁木(高橋)加寿子、仁木剛史、有賀(井口)早苗、有賀寛芳

第84回日本生化学会大会/2011年9月22日 京都府京都市

Oxidative stress-response by DJ-1 and its binding compounds.

Takahashi-Niki K., Niki, T, Iguchi-Ariga,

S.M.M and Ariga, H.
ISN-ESN 2011 23rd Biennial Meeting
2011年8月29日 ギリシャ アテネ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://bunseiserver.pharm.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
仁木 加寿子(Takahashi-Niki Kazuko)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 50447645

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし