

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860697

研究課題名(和文)パーキンソン病原因因子DJ-1による異常ミトコンドリア・タンパク質除去機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of mitochondrial regulation by DJ-1

## 研究代表者

仁木 加寿子(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) 3,100,000円

## 研究成果の概要(和文)：

酸化ストレス下でグリア細胞から分泌されたDJ-1が、酸化ストレス下での神経細胞の保護に重要であり、家族性パーキンソン病PARK7で報告されているDJ-1変異体およびDJ-1機能を失った変異体ではその保護能力が低下していたことが明らかとなりました。DJ-1とBeclinが酸化ストレス下において結合が増強され、DJ-1がオートファジーを促進する方向で働いていることが示唆されました。また、DJ-1の基質として神経細胞においてミトコンドリアを輸送するモータータンパク質であるKIF1Bが得られました。

## 研究成果の概要(英文)：

Secreted DJ-1 from astrocytes protected co-cultured neurons against oxidative stress, while the DJ-1 mutants discovered in PARK7 did not. DJ-1 directly interacts with Beclin and this binding was promoted by oxidation of DJ-1. There are different views on the function of DJ-1 in autophagy. Then, I investigated whether DJ-1 promote or suppress autophagy, and then it became clear that DJ-1 promotes autophagy. We identified KIF1B as target substrate for DJ-1 protease. It is possible that DJ-1 regulate mitochondrial transport through cleavage of KIF1B.

研究分野：分子生物学

キーワード：DJ-1 PARK7

### 1. 研究開始当初の背景

DJ-1は1997年に新規がん遺伝子として同定され、2004年に家族性パーキンソン病原因遺伝子 PARK7であることが報告された遺伝子です。申請者らはこれまでに、DJ-1タンパク質が転写調節機能、抗酸化機能を持つことを報告しています。パーキンソン病は、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る神経変性疾患です。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。特に、パーキンソン病とミトコンドリアの関係については古くから示唆されています。申請者らはこれまでに、DJ-1欠損細胞においてミトコンドリア Complex I 活性が低下している事を報告しており、他のグループからも DJ-1 とミトコンドリアの関係を示唆する報告がいくつかされていますが、そのメカニズムは未だ不明です。また近年、DJ-1とは異なる家族性パーキンソン病に關与する Parkin と PINK1 の研究から、機能不全に陥ったミトコンドリアを除去する品質管理がパーキンソン病解明の鍵を握っているという報告がされ、DJ-1 がその機構に關与しているのか、全く別の機構で制御しているのか疑問が持たれます。

### 2. 研究の目的

申請者は最近、家族性パーキンソン病原因遺伝子産物 DJ-1 と、オートファジーに必須な Beclin の結合を見い出しました。本申請研究では DJ-1 と Beclin の相互作用に加えて、DJ-1 のプロテアーゼ機能についても解析し、DJ-1 による機能不全ミトコンドリアの排除・異常タンパク質の分解機構について明らかにすることを目的としています。また、この研究は DJ-1 が關与する疾患の治療への礎にもなりえ、また、DJ-1 の分泌機構にも注目することで、DJ-1 をターゲットとした創薬、DJ-1 のバイオマーカーへの活用も視野に入れて解析することを目的としました。

### 3. 研究の方法

パーキンソン病の発症に繋がる機能不全ミトコンドリアの DJ-1 による排除を、申請者が新たに見出した DJ-1 と Beclin の相互作用から解析し、同様に発症原因となる異常タンパク質の分解を DJ-1 のプロテアーゼ機能から解析しました。また、DJ-1 が酸化ストレス下で分泌されることから、分泌及び再取り込みされる可能性も含めた機構の解析及び、生体内での酸化ストレスと分泌 DJ-1 の相関関係を解析しました。

#### (1) DJ-1 と Beclin による障害ミトコンドリア排除機構[mitophagy]の解明

DJ-1 のオートファジーへの関与が、オートファジーに影響を与える Beclin 量の変化によるものなのか、Beclin と他のタンパク質との

相互作用への関与なのかが不明なため検討しました。また、DJ-1 と Beclin の結合が外部刺激を受けて変動するのかも検討しました。

#### (2) DJ-1 のプロテアーゼ機能の解析及び基質探索

DJ-1 は通常状態では酵素活性が無い、もしくは非常に低いと考えて作製した C 末端領域を欠損した DJ-1 (以後 DJ-1 H9) がプロテアーゼ活性を有することが明らかとなったため、これを基に DJ-1 のプロテアーゼ機能を解析しました。基質探索には、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調べ、その中から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。得られた配列をもとに蛍光基質ペプチドを作製し、DJ-1 のプロテアーゼとしての指摘条件等を検討しました。

#### (3) DJ-1 の分泌機構の解明

DJ-1 の分泌について現在明らかになっているのは、酸化ストレス時に酸化型 DJ-1 の状態で分泌されるということのみなため、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 を用い検討します。この dish を用いると、DJ-1 を分泌する側の細胞と、分泌された DJ-1 を受け取る側の細胞が混じることなく、純粋に分泌物のみで考える事ができます。また、細胞を分けて準備できるため、酸化ストレスの度合いや薬剤の種類・量をかえての検討が行える利点もあります。

まず、アストロサイトより分泌された DJ-1 に、初代培養神経細胞を酸化ストレスから保護する機能があるかどうかを、上記の dish で酸化ストレスをかけ、共培養後に初代培養神経細胞の生細胞を Cell counting Kit により測定しました。

次に、分泌された DJ-1 が他の細胞に再取り込みされる可能性があるため、共培養後、初代培養神経細胞内の DJ-1 量の測定をウエスタンブロットティング法により測定し、また、培養上清中の DJ-1 量の測定もウエスタンブロットティング法および ELISA 法で検討しました。

更に、分泌 DJ-1 による効果が分泌 DJ-1 の影響である事を確認するために、抗 DJ-1 抗体を培養液中に添加し、同様の検討を行い解析しました。

### 4. 研究成果

#### (1) DJ-1 と Beclin による障害ミトコンドリア排除機構[mitophagy]の解明

DJ-1 と Beclin の結合を in vivo および in vitro で検討し、DJ-1 が直接 Beclin と結合すること、さらに、その結合が酸化ストレ

ス下において増強することを見出しました。次に、これまでに報告されている, DJ-1 とオートファジーの関係について, DJ-1 がオートファジーを促進するという見解と, DJ-1 がオートファジーを抑制するという見解があったため, DJ-1 をノックダウンして検討し, DJ-1 をノックダウンするとオートファジーが抑制されることを確認しました。本助成事業は終了してはいますが, 上記の結果を受けて, 引き続き解析を行っています。

#### (2) DJ-1 のプロテアーゼ機能の解析及び基質探索

基質探索スクリーニングにより, DJ-1 による切断を強く受ける配列が valine-lysine-valine-alanine(VKVA)であることが明らかとなったことから, この配列をもつ蛍光ペプチドを作製し, DJ-1 のプロテアーゼとしての性質を検討しました。その結果, DJ-1 は pH5.5 の時に最も高いプロテアーゼ活性を持つ事, 塩濃度や金属イオンの影響を受ける事などが明らかとなりました。また, 基質候補として ABL1 および KIF1b を見出し, in vitro において DJ-1 による切断を受けることを明らかとしました。

#### (3) DJ-1 の分泌機構の解明

神経細胞とアストロサイトをお互いの細胞が接することなく共培養できる系において, アストロサイトより分泌された DJ-1 が初代培養神経細胞を酸化ストレスから保護する機能があることを明らかとしました。さらに, 家族性パーキンソン病で報告されている DJ-1 変異体では, 分泌 DJ-1 による神経細胞保護機能が低い事も明らかとしました。次に, 上記の保護機能が本当に分泌された DJ-1 によるものなのかどうかを確認するために, 分泌された DJ-1 を補足できる抗 DJ-1 抗体を探索し, 最も適した抗体を用いて, 細胞に分泌された DJ-1 が補足された時の神経細胞の酸化ストレスへの脆弱性を調べたところ, 抗 DJ-1 抗体の添加によって, 神経細胞の酸化ストレスへの脆弱性が高まりました。

#### 本助成事業における成果のまとめ

(1) DJ-1 と Beclin が酸化ストレス下において結合が増強され, DJ-1 がオートファジーを促進する方向で働いていることが示唆されました。(2) DJ-1 の基質として神経細胞においてミトコンドリアを輸送するモータータンパク質である KIF1B が得られました。(3) において, 分泌された DJ-1 が酸化ストレス下において神経細胞の保護に重要であり, DJ-1 変異体はその保護能力が低下していたことが明らかとなりました。

#### 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)

Takahashi-Niki K, Ganaha Y, Niki T, Nakagawa S, Kato-Ose I, Iguchi-Ariga SM, Ariga H  
DJ-1 activates SIRT1 through its direct binding to SIRT1  
BBRC/474/131-136/doi:10.1016/ 2016年/  
査読有

Takahashi-Niki K, Kato-Ose I, Murata H, Maita H, Iguchi-Ariga SM, Ariga H.  
Epidermal Growth Factor-dependent Activation of the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway by DJ-1 Protein through Its Direct Binding to c-Raf Protein.  
J Biol Chem./290/17838-17847/doi:10.1074/2015年/ 査読有

Takahashi-Niki K, Inafune A, Michitani N, Hatakeyama Y, Suzuki K, Sasaki M, Kitamura Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H.  
DJ-1-dependent protective activity of DJ-1-binding compound no. 23 against neuronal cell death in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease.  
J Pharmacol Sci./127(3)/ 305-310. doi: 10.1016/ 2015年/ 査読有

パーキンソン病における DJ-1 の役割  
仁木(高橋)加寿子  
BIO Clinica/ 30(8)/ 87-91/ 2015年/査読無  
(総説)

Saito Y, Miyasaka T, Hatsuta H, Takahashi-Niki K, Hayashi K, Mita Y, Kusano-Arai O, Iwanari H, Ariga H, Hamakubo T, Yoshida Y, Niki E, Murayama S, Ihara Y, Noguchi N.  
Immunostaining of oxidized DJ-1 in human and mouse brains.  
J Neuropathol Exp Neurol./ 73(7)/ 714-728/  
doi: 10.1097/ 2014年/ 査読有

Yamane, T, Suzui, S, Kitaura, H, Takahashi-Niki K, Iguchi-Ariga, S.M.M. and Ariga, H.  
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.  
PLoS ONE / 8(11)/ e78374/doi: 10.1371/2013年/ 査読有

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

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

FEBS Letters / 587(16)/ 2493-2499/ doi: 10.1016/ 2013 年/ 査読有

Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SM  
Neuroprotective Function of DJ-1 against Parkinson's Disease.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity / 683920 /doi: 10.1155/ 2013 年/ 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Takahashi-Niki K, Ariga, H.

Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease.

The 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry

2015 年 9 月 12 日/ 大宮ソニックシティ (埼玉県・大宮市)

仁木(高橋)加寿子, 綿引 祐実, 北浦 廣剛, 仁木 剛史, 有賀 寛芳

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

第 87 回日本生化学会大会

2014 年 10 月 18 日/国立京都国際会館 (京都府・京都市)

仁木(高橋)加寿子, 綿引 祐実, 北浦 廣剛, 仁木 剛史, 有賀 寛芳

分泌 DJ-1 による神経保護

第 37 回日本神経科学大会

2014 年 9 月 11 日/ パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔その他〕

アウトリーチ活動

2016 年 3 月 23 日 (札幌市)

札幌市内小学校において出張授業

「11歳のハローワーク-研究者編-」

2015 年 12 月 19 日 (札幌市)

「さっぽろサイエンスフェスティバル 2015」

において、北大病院薬剤部と連携してブース出展

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

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