



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on impairment of DJ-1, the product of a causative gene of Parkinson's disease [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	安田, 樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12732号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65583
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuki_Yasuda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 安 田 樹

学 位 論 文 題 名

Studies on impairment of DJ-1, the product of a causative gene of Parkinson's disease
(パーキンソン病原因遺伝子産物 DJ-1 の機能破綻に関する研究)

パーキンソン病は、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、異常タンパク質の蓄積などによる中脳黒質のドパミン神経細胞死によって引き起こされ、様々な遺伝因子や環境因子によって発症する多因子疾患であると考えられている。パーキンソン病原因遺伝子として、現在 *PARK1-18* が同定されており、環境因子としては農薬曝露などが考えられている。高齢者で多く発症する疾患であり、65歳以上では100人に1人が発症すると言われている。そのため、高齢社会において癌、アルツハイマー病と並んでその対策が急務とされている。

我々が同定した原癌遺伝子 *DJ-1* は後にパーキンソン病原因遺伝子 *PARK7* として報告され、パーキンソン病患者において様々な変異が見つかっている。その遺伝子産物 DJ-1 はミトコンドリア機能調節やシャペロンなど様々な機能が報告されているが、主な機能は酸化ストレスであり、DJ-1 のシステイン残基が酸化されることで活性酸素の1つである過酸化水素を除去する機構と他のタンパク質に結合することで抗酸化経路を活性化する機構が知られている。また、DJ-1 は通常 dimer として機能し、酸化ストレス機能を含む多くの機能に 106 番目のシステイン残基 (C106) が必要であることが分かっている。

パーキンソン病発症の主な原因が酸化ストレスであるため、DJ-1 の抗酸化機能の破綻がパーキンソン病発症につながると考えられる。パーキンソン病患者の脳内でシステイン過剰酸化型の DJ-1 や、通常形成している DJ-1 dimer は SDS による変性で解離するが、SDS による変性後にも解離しない SDS-resistant DJ-1 dimer が見出されており、これらの DJ-1 は機能破綻型と考えられるが、原因など詳細は不明なままである。未だ十分に明らかとなっていない DJ-1 抗酸化ストレス機能の破綻機構を解明するため、以下の研究を行った。

DJ-1 を強い酸化ストレス下に曝すため、除草剤パラコートを用いた。パラコートはフラビン酵素依存的に NADPH から電子を奪ってパラコートラジカルとなった後、酸化されて元に戻る時にスーパーオキシドを発生させる。パラコートはこの反応を何度も繰り返すため、大量のスーパーオキシドが発生し細胞障害を引き起こす。まず、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞にパラコートを処理し Western blotting で DJ-1 を検出した。この実験により、パラコート処理で SDS による変性、熱処理、DTT による還元後にも検出される DJ-1 dimer が形成されることが新たに見出された。これは前述したパーキンソン病患者でも見られた SDS-resistant dimer である。この dimer は通常の dimer 形成ができない DJ-1 変異体では

作られず、DJ-1 機能に重要な C106 をセリンに置換した変異体 (C106S) でも作られなかった。更に、フリーラジカルスカベンジャーであるアスコルビン酸やフラビン酵素阻害剤である Diphenyleneiodonium (DPI) を前処理した SH-SY5Y 細胞にパラコートを処理すると、共に SDS-resistant DJ-1 dimer は作られなかった。以上のことから、パラコートによってフラビン酵素依存的に作られたスーパーオキシドが DJ-1 の C106 に作用し、SDS-resistant dimer を形成させることが示唆された。

スーパーオキシドが直接 SDS-resistant DJ-1 dimer を形成させるかどうかを検討するため、*in vitro*においてパラコート酸化還元系を再構成し DJ-1 の検出を行った。フラビン酵素の1つである NADPH シトクロム P450 レタクターゼ (CPR)、NADPH、パラコートの反応系に DJ-1 を添加し SDS-PAGE 後 CBB 染色を行うと、パラコートの濃度依存的に SDS-resistant DJ-1 dimer が出現した。このことはアスコルビン酸添加で完全に抑制され、C106S 変異体では起こらなかった。以上の実験により、スーパーオキシドが直接 DJ-1 の C106 に作用し、SDS-resistant dimer を形成させることが示唆された。

この SDS-resistant DJ-1 dimer が DJ-1 の機能破綻型かどうかを明らかにするため、SDS-resistant DJ-1 dimer 形成と *in vitro*における DJ-1 の過酸化水素除去能、細胞内における DJ-1 の過酸化水素による細胞死抑制能の関係について検討した。パラコート酸化還元系で発生させたスーパーオキシドで SDS-resistant DJ-1 dimer を形成させると、DJ-1 の過酸化水素除去活性はパラコートの濃度依存的に減少した。また、SH-SY5Y 細胞の DJ-1 ノックアウト細胞 (DJ-1-KO) とこの親株 (SH-SY5Y) に過酸化水素を処理すると、DJ-1-KO では親株より有意に細胞生存率が低下したが、パラコートを前処理して同様の実験を行うと、過酸化水素による SH-SY5Y と DJ-1-KO 間の細胞生存率の差が減弱し、このことはパラコートの濃度に依存した。これらの結果より、スーパーオキシドによって形成される SDS-resistant DJ-1 dimer は抗酸化ストレス能に関して機能破綻型であることが明らかとなった。

更に、パーキンソン病患者で見つかっている DJ-1 点変異体の SDS-resistant dimer 形成について検討した。驚くことに、今回検討した DJ-1 の点変異体 10 種の内 5 種がパラコート未処理の定常状態で SDS-resistant dimer を形成していた。

本研究により、フリーラジカルであるスーパーオキシドにより DJ-1 dimer が SDS-resistant dimer へ変化し、DJ-1 が機能破綻することが新たに明らかとなった。パラコートはパーキンソン病のリスクファクターであると考えられており、前述したように SDS-resistant DJ-1 dimer はパーキンソン病患者でも見出されていることから、この dimer への変換による DJ-1 機能破綻がパーキンソン病発症の原因の1つとなっている可能性が考えられる。また、この研究が個体レベルまで応用できれば、パーキンソン病のバイオマーカーや治療薬への応用も期待出来、長寿健康社会の QOL 向上に大きく貢献できると考えている。