博士（薬　学）　仁　木　加寿子

学 位 論 文 題 名

DJ-1の転写調節、抗酸化ストレス機能の解析

学位論文内容の要旨

1. ヒト，マウス DJ-1 遺伝子のクローニング及びヒト DJ-1 プロモーターの Sp1 依存的転写活性化についての解析

DJ-1 は *ras* と協調的に細胞をトランスフォームさせる新規がん遺伝子として，当研究室において単離・同定された．DJ-1 の発現，機能を調べる為に，ヒト，マウス genomic DNA をクローニングし，解析した．ヒトは 24 kb，マウスは 16 kb におよぶ領域に 7 つのエキソンを持ち，DJ-1 タンパク質はエキソン 2 から 6 にコードされている事が明らかとなった．さらに，ヒト DJ-1 遺伝子は染色体 1p36.2-1p36.3 に存在する事も明らかとなった．次に，CAP site hunting 法によりヒト DJ-1 の転写開始点を同定した．さらに，ヒト DJ-1 のプロモーターを Luciferase assay により解析した．その結果，転写開始点の上流 100 bp 付近が転写活性化能には最も重要であることが明らかとなり，-108 ～ -100 bp に Sp1 結合配列があった．そこで，この領域に変異を導入したところ転写が抑制された．さらに Bandshift assay により，Sp1 の結合を確認した．これらの事から，DJ-1 の転写が Sp1 によって主に制御されている事が明らかとなった．

2. DJ-1 は PIASxαの結合によって阻害されるアンドロゲンレセプターの転写を調節する

DJ-1 は不妊への関与も報告されているが，その機能は不明であった．そこで，精巣での DJ-1 の機能を解明するため，ヒト精巣ライブラリーを用いた酵母 Two-hybrid 法で DJ-1 結合タンパク質の探索を行った．その結果，転写因子 STAT やアンドロゲンレセプター (AR)の転写活性を調節する事が報告されている PIASxα（protein inhibitor of activated stat xα）/ARIP3 (androgen receptor interacting protein 3)が得られた．DJ-1 と PIASxαは *in vitro*, *in vivo* により直接結合する事が確認された．DJ-1 は，PIASxαのアンドロゲンレセプター結合領域の前半を含む 433-493 aa 領域に結合する事がわかった．さらに，DJ-1 が PIASxαと AR の結合を競合的に阻害することが明らかとなった．PIASxαは AR の DNA 結合部位に結合して AR 依存的転写を調節すること，DJ-1 が AR-PIASxα複合体形成を阻害することから，DJ-1 の AR の転写活性に対する影響を検討した．その結果，AR 依存的転写は，PIASxα導入により抑制が認められた．さらに，PIASxαによる抑制作用は，DJ-1 により解除された．PIASxαによるAR 転写阻害を DJ-1 が解除するメカニズムを Bandshift assay により解析した結果，AR の DNA 結合能は PIASxαによって阻害され，さらに DJ-1 の共導入により解除される事を確認した．これらの事から，内分泌かく乱物質による精巣での DJ-1 減少を伴う不妊化が報告されているが，これは，PIASxαによる AR 依存的転写抑制が持続される事により，精子形成障害などが引き起こされている可能性が考えられる．

3. DJ-1 結合タンパク質 DJBP は HDAC 複合体をリクルートし，アンドロゲンレセプターの転写活性化能を抑制する．また DJ-1 はその複合体形成を阻害することで転写を調節する

DJ-1 結合タンパク質の探索を行った結果，得られたクローンに DJBP (DJ-1 binding protein)と名付けた．DJBP は 570 aa からなるタンパク質で，精巣特異的に発現していた．DJ-1 と DJBP は *in vitro*, *in vivo* において直接結合する事が確認された．また，両者は核内において共局在する事も明らかとなった．次に，DJBP と AR の相互作用を検討した結果，DJBP はテストステロン依存的に AR の DNA 結合領域に結合する事が示された．さらに，免疫沈降実験により DJ-1 は DJBP を介して AR に相互作用することが明らかとなった．そこで，AR による転写調節への DJBP の影響を検討した．その結果，DJBP はテストステロン依存的な AR 転写活性化機能を抑制する事がわかった．さらに DJBP による AR 転写の抑制は DJ-1 によって解除された．そのメカニズムを解明したところ，DJBP は転写抑制に重要な働きをしめす HDAC 複合体をリクルートする事がわかった．更に，DJ-1 の影響を検討した結果，DJ-1 が HDAC 複合体と DJBP の結合を阻害し，その結果，DJBP による AR の転写調節機能の抑制を解除する事が明らかとなった．

4. パーキンソン病患者で発見された DJ-1 変異は抗酸化ストレス能が低下する

DJ-1 は，2003 年に家族性パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子として報告され，エキソン 1-5 の欠損と 166 番目のロイシンがプロリンに置換した変異体(以下 L166P)がみつかり，その後数種類の変異がみつかっている．また，DJ-1 は酸化される事で活性酸素除去能を持ち，その機能には二量体形成が必須であることが示されている．そこで家族性 PARK7 患者で発見された DJ-1 変異体の二量体形成能を検討した．その結果，数種類の変異のうち L166P のみ野生型とのヘテロ二量体が形成されなかった．次に，DJ-1 は半減期の長い安定したタンパク質であるが，L166P 変異体はプロテアソームによって分解されることが報告がされている．そこで，他の DJ-1 変異体の安定性について，恒常的に変異型 DJ-1 を発現する細胞株を構築して検討した．その結果，野生型には無いプロテアソームによる分解を全ての変異体がうけている事が示された．次に，これらの DJ-1 変異体発現株と，内在性 DJ-1 を siRNA でノックダウンした細胞株を用いて酸化ストレスに対する機能を検討した．その結果，L166P 株と，酸化部位変異 C106S 株では，野生型や他の変異体に比べて活性酸素量が多いことが示された．次に，酸化ストレス曝露時での活性酸素除去能を検討するために，過酸化水素を添加して検討した．その結果，親株に比較して，野生型 DJ-1 高発現株は若干低い活性酸素量を示した．一方，L166P 株，C106S 株及びノックダウン株では活性酸素量が特に高い値を示し，他の変異 DJ-1 発現株も親株と比較して高かった．この結果から，内在性の DJ-1 による活性酸素除去を変異体が阻害していることが示唆された．次に，酸化ストレス誘導細胞死に対する DJ-1 変異の影響について検討した．その結果，野生型 DJ-1 高発現株は親株よりも高い過酸化水素抵抗性を示し，C106S 株，L166P 株は過酸化水素に対して高い感受性を示し，他の変異もそれに続く感受性を示した．以上の結果から，PARK7 で報告された全ての変異 DJ-1 はプロテアソームによる分解を受け，さらに，変異体は野生型と結合する事で，DJ-1 の持つ活性酸素除去能を阻害する事が明らかとなった．この事から，DJ-1 の変異により，活性酸素に脆弱なドーパミン神経の変性が引き起こされ，それが PARK7 の発症原因の一つであることが示された．

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　有　賀　寛　芳
副　査　教　授　南　　雅　文
副　査　助教授　松　本　健　一
副　査　助教授　上　原　　孝

学位論文題名

DJ-1の転写調節、抗酸化ストレス機能の解析

DJ-1は*ras*と協調的に細胞をトランスフォームさせる新規がん遺伝子として，当研究室において単離・同定された．その発現は普遍的に見られ，特に脳，精巣で高いことを明らかにしている．DJ-1は二量体形成し，転写制御，抗酸化ストレスなどの多機能を有し，その機能亢進によるがん，機能不全による家族性パーキンソン病，男性不妊等の発症原因になると考えられえている．これら機能のうち，DJ-1の精巣での機能と，パーキンソン病発症における抗酸化ストレスについて解析を行ったので報告した．

1．精巣における結合タンパク質の検索

精巣でのDJ-1の機能を解明するため，ヒト精巣ライブラリーを用いた酵母Two-hybrid法でDJ-1結合タンパク質の探索を行った．その結果，アンドロゲンレセプター（AR）の転写抑制因子として報告のあるPIASxαのC末端領域（335-572 aa）が得られた．PIASファミリーはPIAS1，3，xα，xβ，yの５種類が転写因子STAT抑制タンパク質として報告されている．またSUMO-1修飾酵素E3リガーゼであることも報告された．スクリーニングにより得られたPIASxαは部分長であったため，全長を用いて結合を解析した．また，各種変異体を用い，PIASxαのDJ-1結合部位を同定した．その結果，全長においても結合が確認され、その結合にはAR結合領域ARID (androgen receptor interacting domain)の前半を含む433-493 aaが必須であった．次に，reticulocyte lysateで合成したDJ-1とPIASxαを用いた*in vitro*結合解析により両者が直接結合する事が確認された．さらに，DJ-1とPIASxαを強制発現させて免疫沈降実験（*in vivo*）を行い，細胞内での両者の結合を確認した．

2．DJ-1のPIASxαに対する作用

三者の強制発現による免疫沈降実験を行いDJ-1がPIASxαとARの結合を競合的に阻害することが示された．次に，DJ-1のARの転写に及ぼす作用を検討した．AR依存的転写は，テストステロン依存的に転写を活性化し，PIASxα導入により抑制が認められた．さらに，PIASxαによ

る抑制作用は，DJ-1の共導入により用量依存的に解除された．また，この抑制解除作用はDJ-1の機能喪失変異体K130RX [14]では認められなかった．この転写抑制解除作用を解析する為にARのDNA結合能に対するPIASxαとDJ-1の影響をBand-shift assayで検討した．結果，ARとDNAの結合はPIASxαによって阻害され，DJ-1の共導入により用量依存的に解除された．

3．家族性パーキンソン病原因遺伝子としてのDJ-1の機能

2003年にDJ-1は家族性パーキンソン病PARK7の原因遺伝子として報告された．そこで家族性PD患者より新たに発見された各DJ-1変異体について，二量体形成能を検討した．FLAGタグを付加した野生型DJ-1及び各種変異体DJ-1を恒常的に発現するマウスNIH3T3細胞株を構築し，細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降し，内在性のマウスDJ-1を抗マウスDJ-1特異抗体で検出した．その結果，L166Pと野生型DJ-1のヘテロダイマー形成は確認されなかったのに対して、他の変異体M26I，R98Q，C106S，D149Aにおいては，野生型と変異体のヘテロ二量体が確認された．

次に、DJ-1変異体について，前述の各種DJ-1発現細胞株を用いて、各種DJ-1タンパク質の安定性について検討した．その結果，変異体M26IとL166Pが野生型に比べて不安定であった．更に、その発現はプロテアソーム阻害薬MG132の添加により増加し，この増加は他の変異体R98Q，D149Aにおいてもみられたが，DJ-1の酸化部位の変異体C106Sではみられなかった．この事から，PDで報告されている変異体がプロテアソーム系によって分解されている事が示され，その分解がPD発症につながる事が推測された．

次ぎに，内在性DJ-1をsiRNA発現ベクター導入により，1/20以下に抑制したknockdown細胞株（D2）をNIH3T3細胞で樹立し，他の変異体株と共に酸化ストレスに対するDJ-1の機能を以下検討した．通常の培養条件下で発生している活性酸素を定量するために，各細胞株に，活性酸素定量試薬DCFH-DAを添加し，フローサイトメトリーで活性酸素量を測定した結果，変異体L166P株と，酸化部位が置換されたC106S変異体では，野生型や他の変異体に比べて活性酸素量が多いことが示された．

DJ-1発現量を1/20に減少したD2細胞株でも，野生型DJ-1発現細胞株（WT）と同程度の活性酸素量であった．この結果は，DJ-1の細胞内含有数が高く，通常の培養条件下では活性酸素を消去出来ると示唆される．

そこで，酸化ストレス曝露時での活性酸素除去能を検討するために，培地に過酸化水素（100 μM）を添加し，同様に活性酸素量を定量した．その結果，全ての細胞株で細胞内活性酸素量が増加していた．親株であるNIH3T3（3T3）細胞とControl Vector導入株に比較して，WTでも同程度の活性酸素量を示し，内在性のDJ-1量で添加された過酸化水素を十分消去していることが明らかになった．一方，L166P発現細胞及びknock-down細胞株のD2細胞では活性酸素量が高い値を示した．他の変異DJ-1発現細胞ではその中間の活性酸素量を示した．この結果は，内在性のDJ-1が活性酸素消去を担い，過剰な変異体が内在性DJ-1機能を阻害していることが明らかになった．次に，過酸化水素による細胞死に対する各種DJ-1の影響について検討した．各細胞株に750，875 μMの過酸化水素を添加し，生細胞数をMTT assayで測定した．その結果，

野生型DJ-1発現株（WT）は親株（3T3）よりも高い過酸化水素抵抗性を示し，DCFH-DAでの活性酸素定量結果と同様に，C106SとL166Pは過酸化水素に対して高い感受性を示し，M26I,

R98Qもそれに続く感受性を示した.

このように、仁木　加寿子は精力的にDJ-1の機能解析を行ない、多くの成果をあげた。これらの業績は仁木　加寿子に博士（薬学）の学位授与に十分値し、推薦するものである。