

# 内分泌かく乱化学物質誘導酸化ストレスに対する DJ-1の防御機構の研究

## 学位論文内容の要旨

### 【序論】

DJ-1 は *ras* と協調的にマウス繊維芽細胞である NIH3T3 細胞をトランスフォームさせる新規ガン遺伝子として、当研究室において単離、同定された。DJ-1 は 189 aa からなる約 21kDa のタンパク質で、多くの組織で発現が確認されている。DJ-1 は Ornidazol などの投与により不妊になったラット、ヒト精子で発現低下し、抗 DJ-1 抗体が受精を阻害することから DJ-1 が生殖機能に関わることが明らかとなった。一方、黒質の神経細胞が変性して起こるパーキンソン病の原因遺伝子として DJ-1 が同定された。パーキンソン病や不妊は環境因子により生ずる酸化ストレスが要因であると考えられており、この防御因子としての DJ-1 機能が推定されている。

今回前半では、げっ歯類で酸化ストレスを誘導することが報告されているビスフェノール A(BPA)処置でのマウス、培養細胞における DJ-1 に対する影響を報告する。後半では、パーキンソン病患者の脳において酸化型 DJ-1 が増加していることが報告され、酸化ストレスマーカーとしての DJ-1 の臨床診断学的有用性を判断するために、抗酸化型 DJ-1 抗体を作製し、その特徴を報告する。

### 【結果/考察】

**1.BPA 処置マウスおよび培養細胞における DJ-1 の発現変動** BPA のヒトへの曝露量の報告から、マウスへの BPA 投与量は 10 および 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight とし、コーンオイルに溶解し毎日経口投与した。0、1、2 週間後にそれぞれ脳、精子を摘出し、Western blot により DJ-1 を定量した。100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight、2 週間の BPA 投与群で、脳、精子で DJ-1 は 2 倍程度に増加した。マウス個体での生体反応を、マウス神経芽腫 Neuro2a 細胞およびマウス精原細胞 GC1 を用いて実験を行なった。両培養細胞に BPA を処置したところ、DJ-1 は経時的、用量依存的に増加し、最大 2.5 倍になった。以上、BPA 処置により DJ-1 は増加することが明らかとなった。

**2.BPA 処置による細胞内の活性酸素種(ROS)の増加** DJ-1 は酸化ストレスにより発現が誘導されることが報告されていることから、BPA 処置により生体内での ROS の増加が予想されたことから、ROS を検出する蛍光試薬 DCFH-DA を用いて、Flow cytometry により解析を行なった。Neuro2a、GC1 とともに、BPA 処置後 12 時間で ROS の増加が確認された。以上、BPA は ROS を増加することが明らかとなった。

**3.BPA 誘導酸化ストレスによる酸化型 DJ-1 の増加** DJ-1 には 3 つのシステインが存在し、酸化ストレス下で主に 106 番目のシステイン(C106)が酸化されることにより DJ-1 の等電点が酸性

側にシフトすることが報告されていることから、等電点電気泳動により BPA 誘導酸化ストレスによる DJ-1 の酸化体の増加を検出した。Neuro2a、GC1 ともに、BPA 処置により酸化型 DJ-1 が経時的、用量依存的に増加した。以上、BPA による ROS の増加により DJ-1 は酸化されることが明らかとなった。

**4. BPA による DJ-1 の細胞内局在変動** ミトコンドリアは細胞内の ROS 産生のものであること、また、ロテノン、MPP<sup>+</sup>等の薬剤はミトコンドリアを標的に ROS を増加させることから、ミトコンドリアに蓄積しスーパーオキシド(O<sup>2-</sup>)に蛍光を発する MitoSOX を用い、共焦点顕微鏡で、BPA の標的器官の特定と BPA による DJ-1 の細胞内局在変動を観察した。さらに MitoTrakker でミトコンドリアを対比染色した。Neuro2a、GC1 ともに、BPA 処置により、DJ-1 はミトコンドリア内またはその周囲に局在し、特に BPA 処置により O<sup>2-</sup>が増加しているミトコンドリアで顕著に観察された。以上、BPA はミトコンドリアを標的に ROS を増加させ、DJ-1 は酸化ストレスの誘導された場所で発現誘導及び細胞内局在移行することが明らかとなった。

**5. BPA によるミトコンドリア機能障害** ロテノン、MPP<sup>+</sup>等の薬剤がミトコンドリア Complex I の機能を阻害し、酸化ストレスを誘導することが知られている。BPA もミトコンドリアで酸化ストレスを誘導することが示された。そこで Complex I 活性を測定することで BPA のミトコンドリアの機能障害を検討した。Complex I 活性は Neuro2a で 75μM 以上、GC1 において 150μM 以上で減少し、Complex I の発現も同様に減少した。この時、whole cell での DJ-1 の発現も減少していた。以上、DJ-1 は BPA 誘導酸化ストレスからミトコンドリアを保護していることが推定された。また、DJ-1 ノックダウン細胞で Complex I の発現の低下に伴わない Complex I の活性の低下が観察されたことから、DJ-1 が直接 Complex I の機能維持する可能性が示された。

**6. BPA 誘導細胞死に対する DJ-1 の抵抗性の変化** DJ-1 が BPA 誘導酸化ストレスからミトコンドリアを保護していることが推定されたことから、DJ-1 の発現量の変化による、BPA 誘導細胞死に対する抵抗性を MTT assay により測定した。Neuro2a、GC1 細胞ともに、DJ-1 ノックダウン細胞は BPA 誘導細胞死に対する感受性を増加した。また、Neuro2a、GC1 細胞ともに、DJ-1 過剰発現細胞は BPA 誘導細胞死に対し抵抗性を示した。以上、DJ-1 は BPA 誘導酸化ストレスから細胞を防御する機能を有することを明らかとした。DJ-1 は直接的な抗酸化ストレス因子としての機能だけではなく、酸化ストレス応答シグナル伝達系に関与することが示唆され、DJ-1 の機能解析が必要とされる。

**7. 抗酸化型 DJ-1 抗体の特徴** パーキンソン病患者の脳において DJ-1 が酸化していることが報告され、主に DJ-1 の C106 が酸化されていることが報告されている。そこで C106 の酸化に特異的な抗酸化型 DJ-1 検出抗体を作成し、その特徴を解析した。抗酸化型 DJ-1 抗体は、等電点電気泳動で酸性型 DJ-1 のみを検出することが確認された。C46S、C53A、C106S の変異体 DJ-1 を用いた実験から、作製した抗酸化 DJ-1 抗体は C106 の酸化に特異性であることが明らかとなった。今後、抗酸化型 DJ-1 抗体の臨床診断学的応用が期待される。

## 【結論】

1. マウス個体、培養細胞において BPA 処置により、DJ-1 は増加することを明らかとした。
2. 培養細胞において BPA は ROS を増加させ、酸化型 DJ-1 を増加することを明らかとした。
3. 培養細胞において BPA はミトコンドリアの機能を障害することを明らかとした。
4. 培養細胞において DJ-1 は BPA 処置によりミトコンドリアで増加した ROS に反応し、ミトコンドリア内またはその周囲で発現誘導および局在移行することを明らかとした。
5. 培養細胞において DJ-1 は BPA 誘導細胞死に抵抗性をあたえることを明らかとした。
6. 抗酸化型 DJ-1 抗体は Cys106 を特異的に認識し、酸化型 DJ-1 のみを認識する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳  
副 査 教 授 五十嵐 靖 之  
副 査 助 教 授 松 本 健 一  
副 査 助 教 授 井ノ口 仁 一

学 位 論 文 題 名

## 内分泌かく乱化学物質誘導酸化ストレスに対する DJ-1の防御機構の研究

*DJ-1* は *ras* と協調的にマウス繊維芽細胞由来 NIH3T3 細胞をトランスフォームさせる新規ガン遺伝子として、当研究室において単離、同定された。*DJ-1* は Ornidazol などの投与により不妊になったラット、ヒト精子中で発現低下し、抗 *DJ-1* 抗体が受精を阻害することから *DJ-1* が生殖機能に関わることが示唆された。一方、パーキンソン病の原因遺伝子として *DJ-1* が同定された。パーキンソン病や不妊は環境要因などにより生ずる酸化ストレスが大きな要因と考えられており、この防御因子としての *DJ-1* 機能が推定されている。今回前半は、ビスフェノール A(BPA)処置でのマウス、培養細胞における *DJ-1* に対する影響を、後半では、酸化ストレスマーカーとしての *DJ-1* の診断学的有用性を判断するために、酸化型 *DJ-1* を認識する抗体を作製し、その特徴付けを報告した。

### 1. BPA 処置マウスおよび培養細胞における DJ-1 の発現変動

マウスへ BPA 毎日経口投与した。0,1,2 週間後にそれぞれ脳・精子を摘出し、Western blot により *DJ-1* を定量した。100 µg/kg body weight、2 週間の BPA 投与群で、コーンオイルのみの投与群と比較し、脳・精子において *DJ-1* の発現量は 1.5~2 倍に増加した。マウス個体での生体反応を詳細に解析するために、以後マウス神経細胞由来の Neuro2a 細胞およびマウス精原細胞由来の GC1 細胞を用いて実験を行なった。両培養細胞に BPA を処置したところ、*DJ-1* は経時的・用量依存的に増加し、DMSO のみの処置群との比較で、最大 2.5 倍になった。以上より、マウス個体および培養細胞において、BPA 処置により *DJ-1* の発現量は増加することがわかった。

### 2. BPA 処置による細胞内の活性酸素種(ROS)の増加

ROS を検出する蛍光試薬である DCFH-DA を用いて、Flow cytometry により解析を行なった。Neuro2a, GC1 細胞ともに、BPA 処置後 12 時間ですでに細胞内で ROS の増加が確認された。以上より、培養細胞において BPA は酸化ストレスを誘導することがわかった。

### 3. BPA 誘導酸化ストレスによる酸化型 DJ-1 の増加

DJ-1には3つのシステイン(Cys46、Cys53、Cys106)が存在し、酸化ストレス下で、主にCys106が酸化されることによりDJ-1の等電点が酸性側(pI6.3→pI5.8)にシフトすることが報告されている。そこで等電点電気泳動により、BPA誘導酸化ストレスによるDJ-1のpIシフトを検出した。Neuro2a,GC1細胞ともに、BPA処置により酸化型DJ-1が経時的・用量依存的に増加した。以上より、培養細胞においてBPA誘導酸化ストレスによりDJ-1は酸化されることがわかった。

#### 4.BPAによるDJ-1の細胞内局在変動

細胞免疫染色により共焦点顕微鏡で、BPA処置によるDJ-1の局在変動を観察した。さらに主要なROS産生場であるミトコンドリアをMitoTrakkerで染色し、また、ミトコンドリアに蓄積しスーパーオキシド(O<sup>2</sup>)に特異的な蛍光試薬であるMitoSOXでも同時に染色した。Neuro2a,GC1細胞ともに、BPA処置により、DJ-1はミトコンドリア内または周囲に局在し、特にO<sup>2</sup>が増加しているミトコンドリアで顕著に観察された。以上から、BPAはミトコンドリアを標的にROSを増加し、DJ-1は酸化ストレスの誘導された場所で、発現誘導及び局在移行することが明らかとなった。

#### 5.BPAによるミトコンドリア機能障害

complexI活性を測定することによりBPAのミトコンドリアの機能障害を検討した。complexI活性はNeuro2aにおいて75μM以上、GC1において150μM以上で減少し、complexIの発現も同様に減少した。この時、whole cellでのDJ-1の発現も減少していた。以上から、DJ-1はBPA誘導酸化ストレスからミトコンドリアを保護していることを明らかにした。また、DJ-1ノックダウン細胞でcomplexI活性の低下が見られたことから、DJ-1が直接complexIの機能維持する可能性が示された。

#### 6. BPA誘導細胞死に対するDJ-1の抵抗性の変化

DJ-1の発現量の変化による、BPA誘導細胞死に対する抵抗性をMTT assayにより測定した。Neuro2a,GC1細胞へのDJ-1に対するsiRNAの導入は、78時間無処置細胞と比べDJ-1の発現を10%程度に低下した。その時DJ-1ノックダウンによる有意な細胞死は確認されなかった。Luciferaseに対するsiRNAを導入した細胞ラインとの比較で、Neuro2a,GC1細胞ともに、DJ-1ノックダウン細胞はBPA誘導細胞死に対する感受性を増加した。また、Neuro2a,GC1細胞へのpcDNA3-F-DJ-1の導入は、78時間で内在性DJ-1と同程度のFlag-DJ-1を発現した。ベクターのみを導入した細胞ラインとの比較で、Neuro2a,GC1細胞ともに、DJ-1過剰発現細胞はBPA誘導細胞死に対し抵抗性を示した。

以上より、DJ-1はBPA誘導酸化ストレスから細胞を防御する機能を有することを明らかとした。DJ-1は直接的な抗酸化ストレス因子としての機能だけではなく、酸化ストレスに応答するシグナル伝達に関与することが示唆され、さらなる詳しいDJ-1の機能解析が必要とされている。

#### 7.抗酸化型DJ-1抗体の特徴付け

パーキンソン病患者の脳においてDJ-1の等電点が酸性側にシフトしていることが報告されている。その要因としてDJ-1のCys106のSH基がSO<sub>2</sub>HまたはSO<sub>3</sub>Hに酸化されていることが考えられる<sup>7)</sup>。そこでCys106にSO<sub>3</sub>を付加し、その前後5アミノ酸計11アミノ酸を抗原ペプチドとし、ファージディスプレイ法を用いて酸化型DJ-1を検出する抗体を作成し、その特徴付けを行った。抗酸化型DJ-1抗体

は、等電点電気泳動により酸性側の DJ-1 を特異的に検出することが確認された。C46S,C53A,C106S の変異体 DJ-1 を用いた実験から、やはり抗酸化 DJ-1 抗体は Cys106 に特異的であることが確認された。今後、抗酸化型 DJ-1 抗体の診断学的応用が期待される。

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