

要な C106 の DJ-1 変異体の精製したタンパク質を用い、*in vitro* 系で直接結合と酵素活性への影響を検討した。変異体でも TH と DDC と直接結合する (図 2A, B) が、ヘテロダイマー形成する変異体 (R98Q, D149A) を野生型と共に加えると、TH 酵素活性はドミナント・ネガティブに減少し、ホモダイマー形成する変異体 (M26I, L166P) でも活性は減少した (図 2C)。

DDC 酵素活性では、ドミナント・ネガティブに減少しなかったが、TH 同様に DJ-1 変異体では活性を増加させる機能は弱いことが示唆された (図 2D)。このことから、家族性のみならず孤発性患者に見られる DJ-1 変異体でも、TH と DDC 酵素活性に影響することが示唆された。

更に、DJ-1 の C106 部位の酸化が、TH と DDC 酵素活性へどのように影響するが検証するために、ヒト SH-SY5Y 細胞に過酸化水素を添加し、TH と DDC 酵素活性を測定した結果、酵素活性は濃度に従って上昇し、次に減少することが示された (図 3A)。また、この時の DJ-1 の C106 部位の酸化状態を調べると、還元型と SOH 型が減少し、SO₂H と SO₃H 型の割合が増加すると急激な活性減少が起こることが示された (図 3B)。更に、様々な条件で DJ-1 の C106 部位を酸化させた DJ-1 タンパク質を *in vitro* 系で調製し、SH-SY5Y 細胞抽出液と共に反応させ、TH と DDC 酵素活性を測定した結果、DJ-1 が高度に酸化された SO₂H, SO₃H 型が増加することにより、活性が減少することが *in vitro* 系でも示された (図 3C, D)。DJ-1 の C106 が酸化されることが活性に重要であることを考えると、パーキンソン病患者の脳内に見られる DJ-1 の過度の酸化型のタンパク質は不活性型であり、これが発症原因の 1 つと考えられる (8)。

DJ-1 ノックダウン SH-SY5Y 細胞では TH 発現量の減少が見られたが、DJ-1 欠損マウスでは TH 発現量の減少は見られなかった (図 4A)。そこで、プロモーター上への DJ-1 の結合を検証した結果、ヒト TH のみで DJ-1/PSF 複合体の結合が検出された (図 4B)。更にその結合領域を詳細に検証した結果、-2909/-2707 内の -2790/-2829 に DJ-1 が結合し (図 5A)、その領域を欠損したプラスミドを発現したヒト SH-SY5Y 細胞では、その領域を含むプラスミドを発現した細胞に比べて転写活性化の減少が見られた (図 5B)。このことから、TH の転写活性化は種特異的であり、少なくともヒトのみに存在する系であることが示された (9)。

＜参考文献＞

1. Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga, H. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 509-513
2. Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., and Heutink, P. (2003) *Science* **299**, 256-259
3. Takahashi, K., Taira, T., Niki, T., Seino, C., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 37556-37563
4. Niki, T., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga, H. (2003) *Mol. Cancer Res.* **1**, 247-261
5. Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., Takahashi, K., and Ariga H. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 213-218
6. Shinbo, Y., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga H. (2005) *Int. J. Oncol.* **26**, 641-648
7. Zhong, N., Kim, C. Y., Rizzu, P., Geula, C., Porter, D.R., Pothos, E.N., Squitieri, F., Heutink, P., and Xu J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 20940-20948

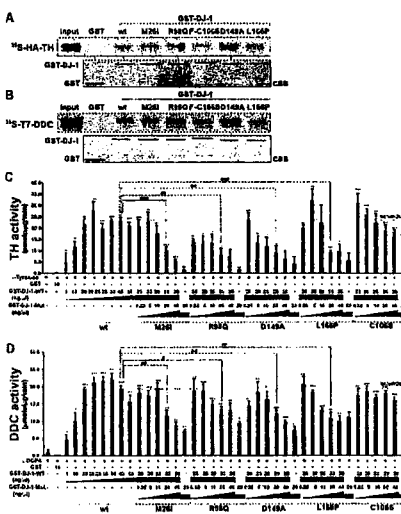


図2. TH-DDC酵素活性へのDJ-1変異体の影響

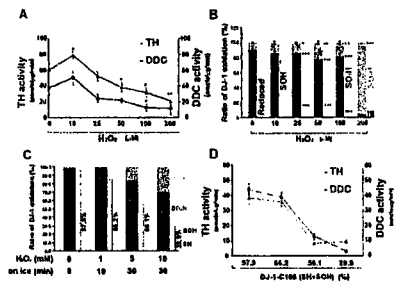


図3. TH・DDC酵素活性へのDJ-1 C106の酸化の影響

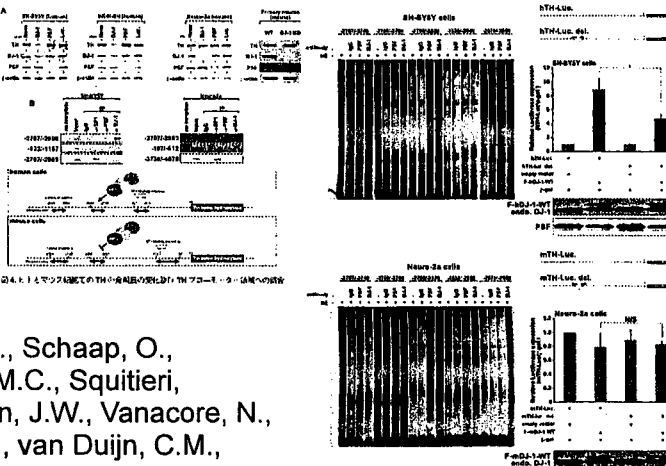


図4. THプロモーター領域へのDJ-1の結合とその転写活性化への影響

8. Ishikawa, S., Taira, T., Niki, T., Takahashi-Niki, K., Maita, C., Maita, H., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S.M.M., (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 28832-28844.
9. Ishikawa, S., Taira, T., Takahashi-Niki, K., Niki, T., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S.M.M., (2010). *J. Biol. Chem.***285**, 39718-39731.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 早 苗

副 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 准教授 仁 木 剛 史

A Study on Significant Roles of Human DJ-1 in Dopamine Biosynthesis

(ドーパミン生合成経路におけるヒト DJ-1の重要な役割に関する研究)

高齢化社会を迎えた現代において、アルツハイマー病等の神経変性疾患の病因解明や治療法・予防法の確立は大きな課題であり、臨床研究と共に分子レベルでの基礎研究が活発に行われてきている。本論文は、アルツハイマー病に次いで頻度の高い脳神経変性疾患であるパーキンソン病について、家族性パーキンソン病原因遺伝子の一つ PARK7 の産物タンパク質 DJ-1 の機能解析を、主要神経伝達物質ドーパミンの生合成系に着目して行い、パーキンソン病の発症機構解明および治療・予防法開発に寄与する知見を得ることを目的としたものである。

著者が所属する研究室において 1997 年に新規癌遺伝子として単離・同定された DJ-1 遺伝子は、2003 年に家族性パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子であることも明らかとなり、以来、同研究室を含む多くの研究室が発症分子機構に係るタンパク質機能解析にしのぎを削ってきている。これまでに、DJ-1 は抗酸化ストレス、転写調節、ミトコンドリア調節など、様々な機能を有する多機能タンパク質であることが明らかとなり、その異常な機能亢進が癌に、機能破綻がパーキンソン病等の神経変性疾患・男性不妊症など癌以外の複数疾患の原因になると考えられている。

パーキンソン病は、運動機能障害、筋肉の硬直、手指の震え、動作の緩慢など特徴的な臨床症状を示す。これは中脳における黒質線条体ニューロンのドーパミン神経細胞死により生じるドーパミン量の減少が原因と考えられるが、その発症詳細機序は未だに不明である。現在使われているパーキンソン病治療薬は神経細胞死によるドーパミン量の減少に対する対症療法であり、これらの薬剤投与中も神経細胞死は進行する。従って、根本的な神経細胞死を抑制する薬剤の開発するためにも詳細な発症機序を解明することが必要であると考えられる。ドーパミンの生合成は、チロシンからチロシン水酸化酵素 (TH) と芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (DDC) の 2 つの酵素によって生合成されるが、著者は、このようにパーキンソン病の本体に深く関わると考えられるドーパミン生合成経路主要 2 酵素、チロシン脱水素酵素 (TH) とドパミンデカルボキシラーゼ (DDC) に DJ-1 が関与しているのではないかとこの仮説を立て、実験を始めた。

ヒトのドーパミン作動性細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、タンパク質レベルでの DJ-1 と TH 及び DDC の相互作用の有無を検証し、それら酵素活性化への影響についても HPLC を用いて L-DOPA (TH 酵素活性)、ドーパミン (DDC 酵素活性) 合成量の変化から定量的に検証した。また、野生型と孤発性・家族性パーキンソン病患者に見られる DJ-1 変異体において、上記と同様の検証を行った。DJ-1 には 3 つのシステインを有し、その中でも 106 番目のシステイン (C106) の酸化状態が重要であることから、次に、酸化ストレス誘導剤処理したヒト SH-SY5Y 細胞を用いて、TH と DDC 酵素活性の変動を測定した。また同様の条件で処理した細胞における DJ-1 の C106 部位の酸化状態を MALDI-TOF-MS により解析・決定した。また、ドーパミン生合成系において、DJ-1 は TH プロモーター上 (-2707/-2909) において、転写リプレッサーの PSF (polypyrimidine tract-binding protein associated splicing factor) と共に関与することが報告されている。そこで、DJ-1 欠損マウス由来の中脳ニューロン及びヒト培養神経細胞 SH-SY5Y 細胞を用いてヒトとマウス間の転写活性化のメカニズムを検証した。

タンパク質レベルにおいて、SH-SY5Y 細胞において TH 及び DDC は共に DJ-1 と相互作用していることが示され、*in vitro* 反応系において、DJ-1 タンパク質の量依存的に TH 及び DDC 酵素活性を増

加させることが示唆された。これらのことから、DJ-1 は TH 及び DCC と結合して、その酵素活性を増大させることが示された。

DJ-1 遺伝子変異のパーキンソン病患者は家族性の他、広く孤発性にも見られることから、この変異体が TH と DDC 酵素活性に影響するか検討するために、パーキンソン病患者由来の DJ-1 変異体 (M26I, R98Q, D149A, L166P) と酸化に重要な C106 の DJ-1 変異体の精製したタンパク質を用い、*in vitro* 系で直接結合と酵素活性への影響を検討した。変異体でも TH と DDC と直接結合するが、ヘテロダイマー形成する変異体 (R98Q, D149A) を野生型と共に加えると、TH 酵素活性はドミナント・ネガティブに減少し、ホモダイマー形成する変異体 (M26I, L166P) でも活性は減少した。DDC 酵素活性では、ドミナント・ネガティブに減少しなかったが、TH 同様に DJ-1 変異体では活性を増加させる機能は弱いことが示唆された。このことから、家族性のみならず孤発性患者に見られる DJ-1 変異体でも、TH と DDC 酵素活性に影響することが示唆された。

更に、DJ-1 の C106 部位の酸化が、TH と DDC 酵素活性へどのように影響するが検証するために、ヒト SH-SY5Y 細胞に過酸化水素を添加し、TH と DDC 酵素活性を測定した結果、酵素活性は濃度に従って上昇し、次に減少することが示された。また、この時の DJ-1 の C106 部位の酸化状態を調べると、還元型と SOH 型が減少し、SO₂H と SO₃H 型の割合が増加すると急激な活性減少が起こることが示された。更に、様々な条件で DJ-1 の C106 部位を酸化させた DJ-1 タンパク質を *in vitro* 系で調製し、SH-SY5Y 細胞抽出液と共に反応させ、TH と DDC 酵素活性を測定した結果、DJ-1 が高度に酸化された SO₂H, SO₃H 型が増加することにより、活性が減少することが *in vitro* 系でも示された。DJ-1 の C106 が酸化されることが活性に重要であることを考えると、パーキンソン病患者の脳内に見られる DJ-1 の過度の酸化型のタンパク質は不活性型であり、これが発症原因の 1 つと考えられる。

DJ-1 ノックダウン SH-SY5Y 細胞では TH 発現量の減少が見られたが、DJ-1 欠損マウスでは TH 発現量の減少は見られなかった。そこで、プロモーター上への DJ-1 の結合を検証した結果、ヒト TH のみで DJ-1/PSF 複合体の結合が検出された。更にその結合領域を詳細に検証した結果、-2909/-2707 内の -2790/-2829 に DJ-1 が結合し、その領域を欠損したプラスミドを発現したヒト SH-SY5Y 細胞では、その領域を含むプラスミドを発現した細胞に比べて転写活性化の減少見られた。このことから、TH の転写活性化は種特異的であり、少なくともヒトのみに存在する系であることが示された。

これらの結果は、パーキンソン病の発症分子機構に大きな示唆を与え、予防・治療法開発にも貢献すると共に、脳神経系制御機構における種特異性の存在を示唆し、ヒト疾患モデル系として多用されるノックアウトマウスおよびノックダウンマウス細胞で得られた知見のヒトへの応用・演繹への留意を喚起した。

上記の成果の主体は、既に著者を筆頭著者とする 2 編の学術論文として Journal of Biological Chemistry に投稿され、2009 年および 2010 年に受理・掲載されている。日本分子生物学会年会、日本神経科学大会等の国内学会だけでなく、2007 年 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders を皮切りに国際学会でも発表し、Annual Meeting of the Society of Neuroscience には 2008-2010 年、3 年連続して発表を果たし、国内外のパーキンソン病等神経変性疾患研究者達との交流を深め、著者の研究をさらに活性化してきている。

以上より、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。