

学位論文題名

パーキンソン病原因遺伝子産物DJ-1による酸化ストレス
依存的なp53機能調節機構の解析

学位論文内容の要旨

●INTRODUCTION

DJ-1は *ras* と協調的に働くガン遺伝子として発見され、その後パーキンソン病原因遺伝子 *PARK7* であることが明らかとなっている。DJ-1 の特徴の一つは酸化ストレスにより、106番システイン残基が容易に酸化されることである。システイン残基のSH基は酸化ストレス後SOH, SO₂H, SO₃Hと段階的に酸化される。実際に孤発性パーキンソン病患者で過剰酸化型のDJ-1が蓄積することなど、疾患や細胞における酸化とDJ-1の関係の重要性はいくつか報告されている。しかし、分子レベルで酸化修飾がDJ-1の機能にどのような影響を与えるかは不明である。もう一つのDJ-1機能の特徴はDJ-1が様々なタンパク質と結合してその機能を調節することである。DJ-1はタンパク質と直接結合し、転写やミトコンドリア調節機能、シャペロン機能などを発揮することが報告されている。しかし、どのようにその結合を使い分けているのか、また結合や機能調節への酸化型DJ-1の関与は不明である。そこで本研究では酸化ストレスに対応するDJ-1の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、DJ-1の酸化修飾状態の違いがタンパク質との結合親和性を変化させ、そのタンパク質の機能を調節するか検討した。

●RESULTS

現在報告されているDJ-1結合タンパク質の中で、酸化ストレスと関与するタンパク質において、酸化ストレスがDJ-1との結合能へ影響を与えるか検討した。その結果p53を含むいくつかのタンパク質で結合量が変化した。このうち、癌抑制遺伝子産物p53とDJ-1の関係についてさらに実験を行った。

過剰発現系、内在性実験系にて酸化ストレスとして過酸化水素を処理して免疫沈降実験を行い、p53とDJ-1の結合が酸化により増加することを明らかにした。本研究で用いた酸化ストレス条件においてはp53のセリン残基の中で15番目と20番目のセリン残基のリン酸化量が増加した。このことから、p53S15A、S20A、S15・20A変異体を作成し、結合量増加へp53修飾の影響を免疫沈降実験により調べた。その結果、野生型p53とp53セリン部位変異体のDJ-1結合量は同等であった。つづいてDJ-1の酸化修飾部位である106番目のシステイン残基へ変異を入れたDJ-1C106S変異体を用いてDJ-1-p53結合量増加へのDJ-1修飾の影響を等電点電気泳動と免疫沈降実験により調べた。その結果、酸化ストレス処理後野生型DJ-1とp53の結合量は増加したのに対し、DJ-1C106S変異体とp53の結合量増加は起こらなかった。このことからp53のリン酸化ではなくDJ-1の106番システイン残基が酸化ストレス時の結合量増加に必須であることが明らかとなった。

p53がストレスを受けて活性化し、ターゲット遺伝子の転写を調節すること、酸化ストレス下でDJ-1とp53の結合が増加することから、酸化ストレス特異的にDJ-1がp53の転写活性を調節することが予測された。MAPKホスファターゼDUSP1は様々なストレスの中でも酸化ストレスにのみ応答してp53により発現誘導されるという報告があることから、p53によるDUSP1発現へのDJ-1の関与を検討した。p53ターゲット遺伝子の酸化ストレス後のmRNA発現変動を調べたところ、DUSP1 mRNAはストレス処理後30分と速やかに誘導されたのに対し、p21、NOXA、PUMAではストレス処理後2時間で発現はピークに達した。DJ-1とp53の結合量も酸化ストレス処理後30分でもっとも増加したことから、p53によるDUSP1 mRNA発現へDJ-1が与える影響を検討した。その結果、p53の主要なターゲット遺伝子であるp21では変化が見られなかったのに対し、DUSP1ではmRNA発現が野生型に比べ、DJ-1欠損細胞で増加していた。このことから、DJ-1は酸化によるDUSP1のmRNA発現を抑制することが示唆された。この発現低下がDJ-1の転写に対する効果であるかを検討するためDUSP1プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。通常のルシフェラーゼアッセイではストレス後短時間の転写活性の低下を観察することはできないため、半減期の短いルシフ

ェラーゼを用いて検討を行った。その結果、DUSP1 プロモーター活性の酸化ストレス依存的上昇は野生型 DJ-1 の導入により抑制されたが、DJ-1 C106S 変異体には抑制効果は見られなかった。このことから、DJ-1 が p53 の転写を抑制することにより DUSP1 発現が減少すること、DJ-1 106 システインは p53 による DUSP1 の転写活性化にも重要であるということが明らかになった。

p53 の部位欠損変異体を用い、pull-down を行ったところ、DJ-1 は p53 の DNA 結合領域へ結合した。このことから DJ-1 による p53 の転写活性の抑制は p53 と DNA の結合を DJ-1 が阻害している可能性が考えられた。そこで p53 の DNA 結合へ DJ-1 が与える効果を検討するため CHIP アッセイを行った。野生型 DJ-1 導入により p53 の DUSP1 プロモーターへの結合が低下したのに対し、DJ-1C106S 変異体には抑制効果は見られなかった。このことから、DJ-1 は p53 の DNA 結合領域へ結合することにより DUSP1 プロモーター上への結合を阻害していることが明らかとなった。

DUSP1 は MAPK ホスファターゼとして働き、ERK を脱リン酸化する。そのため DJ-1 非存在下では DUSP1 の発現増加により ERK の脱リン酸化が増加すると予測し、1 度目の酸化ストレス添加 2 時間後に 2 度目の酸化ストレス添加を行い、ERK リン酸化量を調べた。1 度目の酸化ストレス 2 時間後では野生型に比べ、DJ-1 欠損細胞で DUSP1 発現が高く、それに伴い ERK のリン酸化が野生型に比べ、DJ-1 欠損細胞で低下していた。DUSP1 をノックダウンすると DJ-1 欠損細胞において ERK リン酸化量が増加したことから DJ-1 非存在下では DUSP1 増加により酸化ストレス後の ERK リン酸化量が減少することが明らかとなった。続いて、FACS 解析を行い、細胞周期のうち sub-G1 量を定量することによりアポトーシス量を調べた。その結果、DUSP1 ノックダウンにより DJ-1 欠損細胞において sub-G1 量が約 60% に低下した。このことから、DJ-1 非存在下では DUSP1 の増加により酸化ストレス後のアポトーシスが増加することが明らかとなった。

DJ-1 による DNA 結合阻害は DUSP1 で起こり、p53 ターゲット遺伝子である p21 では起こらなかった。DUSP1 プロモーターは非コンセンサスの p53 結合配列を含み、一方の p21 プロモーターには p53 と結合親和性の強いコンセンサスの p53 結合配列が存在する。このことから DJ-1 が p53 の転写活性化を抑制する仕組みには p53 結合配列依存的であるという仮説と p53 の DNA 結合親和性依存的であるという仮説の 2 つが考えられた。後者の場合、DNA 結合親和性が低下した p53 変異体の結合親和性の強いコンセンサスの p53 結合配列への結合でも DJ-1 が抑制できると考えられる。そこで、多発性癌疾患の Li-Fraumeni 症候群患者で見られる DNA 結合親和性の低下割合の異なる p53R181L、p53R181C、p53R181P の 3 種 p53 変異体を用いて DJ-1 による p53 の転写活性化抑制機構を検討した。ルシフェラーゼアッセイにより、p53 変異体の p21 プロモーター活性を調べると、野生型 p53 と比較して p53R181L では約 80%、p53R181C では約 20% へ活性が低下しており、p53R181P では活性が見られなかった。p21 プロモーターの転写活性化能が残っていた p53R181L、R181C 変異体による p21 プロモーター活性へ DJ-1 が与える影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた。その結果、p53R181L、R181C 変異体による p21 プロモーターの活性化は野生型 DJ-1 導入により抑制されたが、DJ-1C106S 変異体には抑制効果は見られなかった。また、DJ-1 による抑制効果は p53R181L 変異体に比較して DNA 結合親和性がより低下した p53R181C 変異体で強くみられた。このことから、DJ-1 による p53 転写活性の抑制が p53 の DNA 結合親和性依存的に起こることが明らかになった。

●CONCLUSION

DJ-1 は酸化ストレスにより、酸化型 DJ-1 へと変化し、p53 の DNA 結合領域へと結合することにより p53 の DUSP1 プロモーターへの結合が阻害され、DUSP1 の mRNA 発現が抑制された。これにより脱リン酸化が減少することにより酸化ストレス後の ERK リン酸化が増加し、細胞死が抑制された。

DJ-1 は DNA への結合親和性の強い野生型 p53 による p21 プロモーターの転写活性化へは阻害効果を示さなかったのに対し、DNA 結合親和性の低い p53 変異体の p21 プロモーターの転写活性化を阻害した。このことから DJ-1 が抑制できるターゲットは p53 結合配列依存的ではなく、p53 の標的 DNA への結合強度に応じて規定されていると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 松 田 正
副 査 講 師 南 保 明日香
副 査 講 師 米 田 宏

学位論文題名

パーキンソン病原因遺伝子産物DJ-1による酸化ストレス 依存的なp53機能調節機構の解析

DJ-1は *ras* と協調的に働くガン遺伝子として発見され、その後パーキンソン病原因遺伝子 *PARK7* であることが明らかとなっている。DJ-1 の特徴の一つは酸化ストレスにより、106 番システイン残基が容易に酸化されることである。システイン残基のSH基は酸化ストレス後SOH, SO₂H, SO₃Hと段階的に酸化される。実際に弧発性パーキンソン病患者で過剰酸化型のDJ-1が蓄積することなど、疾患や細胞における酸化とDJ-1の関係の重要性はいくつか報告されている。しかし、分子レベルで酸化修飾がDJ-1の機能にどのような影響を与えるかは不明である。もう一つのDJ-1機能の特徴はDJ-1が様々なタンパク質と結合してその機能を調節することである。DJ-1はタンパク質と直接結合し、転写やミトコンドリア調節機能、シャペロン機能などを発揮することが報告されている。しかし、どのようにその結合を使い分けしているのか、また結合や機能調節への酸化型DJ-1の関与は不明である。そこで本研究では酸化ストレスに対応するDJ-1の分子メカニズムを明らかにすることを目的として、DJ-1の酸化修飾状態の違いがタンパク質との結合親和性を変化させ、そのタンパク質の機能を調節するか検討した。

現在報告されているDJ-1結合タンパク質の中で、酸化ストレスと関与するタンパク質において、酸化ストレスがDJ-1との結合能へ影響を与えるか検討した。その結果p53を含むいくつかのタンパク質で結合量が増加した。このうち、癌抑制遺伝子産物p53とDJ-1の関係についてさらに実験を行った。

過剰発現系、内在性実験系にて酸化ストレスとして過酸化水素を処理して免疫沈降実験を行い、p53とDJ-1の結合が酸化により増加することを明らかにした。本研究で用いた酸化ストレス条件においてはp53のセリン残基の中で15番目と20番目のセリン残基のリン酸化量が増加した。このことから、p53S15A、S20A、S15・20A変異体を作成し、結合量増加へp53修飾の影響を免疫沈降実験により調べた。その結果、野生型p53とp53セリン部位変異体のDJ-1結合量は同等であった。つづいてDJ-1の酸化修飾部位である106番目のシステイン残基へ変異を入れたDJ-1C106S変異体を用いてDJ-1-p53結合量増加へのDJ-1修飾の影響を等電点電気泳動と免疫沈降実験により調べた。その結果、酸化ストレス処理後野生型DJ-1とp53の結合量は増加したのに対し、DJ-1C106S変異体とp53の結合量増加は起こらなかった。このことからp53のリン酸化ではなくDJ-1の106番システイン残基が酸化ストレス時の結合量増加に必須であることが明らかとなった。

p53がストレスを受けて活性化し、ターゲット遺伝子の転写を調節すること、酸化ストレス下でDJ-1とp53の結合が増加することから、酸化ストレス特異的にDJ-1がp53の転写活性を調節することが予測された。MAPKホスファターゼDUSP1は様々なストレスの中でも酸化ストレスにのみ応答してp53により発現誘導されるという報告があることから、p53によるDUSP1発現へのDJ-1の関与を検討した。p53ターゲット遺伝子の酸化ストレス後のmRNA発現変動を調べたところ、DUSP1 mRNAはストレス処理後30分と速やか

p53 の結合量も酸化ストレス処理後 30 分でもっとも増加したことから、p53 による DUSP1 mRNA 発現へ DJ-1 が与える影響を検討した。その結果、p53 の主要なターゲット遺伝子である p21 では変化が見られなかったのに対し、DUSP1 では mRNA 発現が野生型に比べ、DJ-1 欠損細胞で増加していた。このことから、DJ-1 は酸化による DUSP1 の mRNA 発現を抑制することが示唆された。この発現低下が DJ-1 の転写に対する効果であるかを検討するため DUSP1 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。通常のルシフェラーゼアッセイではストレス後短時間の転写活性の低下を観察することはできないため、半減期の短いルシフェラーゼを用いて検討を行った。その結果、DUSP1 プロモーター活性の酸化ストレス依存的上昇は野生型 DJ-1 の導入により抑制されたが、DJ-1 C106S 変異体には抑制効果は見られなかった。このことから、DJ-1 が p53 の転写を抑制することにより DUSP1 発現が減少すること、DJ-1 106 番システインは p53 による DUSP1 の転写活性化にも重要であるということが明らかになった。

p53 の部位欠損変異体を用い、pull-down を行ったところ、DJ-1 は p53 の DNA 結合領域へ結合した。このことから DJ-1 による p53 の転写活性の抑制は p53 と DNA の結合を DJ-1 が阻害している可能性が考えられた。そこで p53 の DNA 結合へ DJ-1 が与える効果を検討するため CHIP アッセイを行った。野生型 DJ-1 導入により p53 の DUSP1 プロモーターへの結合が低下したのに対し、DJ-1C106S 変異体には抑制効果は見られなかった。このことから、DJ-1 は p53 の DNA 結合領域へ結合することにより DUSP1 プロモーター上への結合を阻害していることが明らかとなった。

DUSP1 は MAPK ホスファターゼとして働き、ERK を脱リン酸化する。そのため DJ-1 非存在下では DUSP1 の発現増加により ERK の脱リン酸化が増加すると予測し、1 度目の酸化ストレス添加 2 時間後に 2 度目の酸化ストレス添加を行い、ERK リン酸化量を調べた。1 度目の酸化ストレス 2 時間後では野生型に比べ、DJ-1 欠損細胞で DUSP1 発現が高く、それに伴い ERK のリン酸化が野生型に比べ、DJ-1 欠損細胞で低下していた。DUSP1 をノックダウンすると DJ-1 欠損細胞において ERK リン酸化量が増加したことから DJ-1 非存在下では DUSP1 増加により酸化ストレス後の ERK リン酸化量が減少することが明らかとなった。続いて、FACS 解析を行い、細胞周期のうち sub-G1 量を定量することによりアポトーシス量を調べた。その結果、DUSP1 ノックダウンにより DJ-1 欠損細胞において sub-G1 量が約 60% に低下した。このことから、DJ-1 非存在下では DUSP1 の増加により酸化ストレス後のアポトーシスが増加することが明らかとなった。

DJ-1 による DNA 結合阻害は DUSP1 で起こり、p53 ターゲット遺伝子である p21 では起こらなかった。DUSP1 プロモーターは非コンセンサスの p53 結合配列を含み、一方の p21 プロモーターには p53 と結合親和性の強いコンセンサスの p53 結合配列が存在する。このことから DJ-1 が p53 の転写活性化を抑制する仕組みには p53 結合配列依存的であるという仮説と p53 の DNA 結合親和性依存的であるという仮説の 2 つが考えられた。後者の場合、DNA 結合親和性が低下した p53 変異体の結合親和性の強いコンセンサスの p53 結合配列への結合でも DJ-1 が抑制できると考えられる。そこで、多発性癌疾患の Li-Fraumeni 症候群患者で見られる DNA 結合親和性の低下割合の異なる p53R181L、p53R181C、p53R181P の 3 種 p53 変異体を用いて DJ-1 による p53 の転写活性化抑制機構を検討した。ルシフェラーゼアッセイにより、p53 変異体の p21 プロモーター活性を調べると、野生型 p53 と比較して p53R181L では約 80%、p53R181C では約 20% へ活性が低下しており、p53R181P では活性が見られなかった。p21 プロモーターの転写活性化能が残っていた p53R181L、R181C 変異体による p21 プロモーター活性へ DJ-1 が与える影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた。その結果、p53R181L、R181C 変異体による p21 プロモーターの活性化は野生型 DJ-1 導入により抑制されたが、DJ-1C106S 変異体には抑制効果は見られなかった。また、DJ-1 による抑制効果は p53R181L 変異体に比較して DNA 結合親和性がより低下した p53R181C 変異体で強くみられた。このことから、DJ-1 による p53 転写活性の抑制が p53 の DNA 結合親和性依存的に起こることが明らかになった。

これらの知見は、DJ-1 の細胞がん化とシグナル伝達機構に対し大きく貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、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。