

博士論文

小分子スクリーニングを用いた
パーキンソン病関連因子 DJ-1 の機能解析

新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻

津本研究室

47-127326 田代晋也

1-0	概要	7
1-1	DJ-1 と疾患	7
1-1-0	概要	7
1-1-1	パーキンソン病	7
1-1-2	癌	9
1-2	DJ-1 の生化学的特性	10
1-2-0	概要	10
1-2-1	DJ-1 の構造・物性	10
1-2-2	DJ-1 の機能	13
1-3	研究目的と概要	18
1-3-1	研究目的	18
1-3-1	概要	19
2-0	概要	22
2-1	蛋白質の調製	23
2-1-0	概要	23
2-1-1	実験手順	23
2-1-1-1	DJ-1 発現用ベクター	23
2-1-1-2	各種 DJ-1 の発現	25
2-1-1-3	DJ-1 蛋白質の初期精製	25
2-1-1-4	TEV プロテアーゼ処理による His-Tag の切断除去	26
2-1-1-5	DJ-1 の最終精製	27
2-1-2	結果	28
2-1-2-3	サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製	28
2-2	SPR による一次スクリーニング	29
2-2-0	概要	29
2-2-1	Surface Plasmon Resonance の測定原理	29
2-2-2	実験手順	30
2-2-2-1	DJ-1 の固定化	30
2-2-2-2	ライブラリの情報	31
2-2-2-3	SPR によるスクリーニング	32
2-2-3	結果と考察	32
2-3	ITC、結晶構造解析、SPR による二次スクリーニング	34
2-3-0	概要	34
2-3-1	Isothermal Titration Calorimetry の測定原理	35
2-3-2	実験手順	37
2-3-2-0	概要	37

2-3-2-1	ITC による熱力学パラメータの算出.....	38
2-3-2-2	共結晶構造解析.....	38
2-3-2-3	分光光度計測定.....	38
2-3-2-4	SPR 測定.....	39
2-3-3	結果と考察.....	40
2-3-3-1	DJ-1-Isatin 間相互作用の熱力学パラメータ.....	40
2-3-3-2	共結晶構造.....	41
2-3-3-3	分光光度計による Isatin 平面構造の崩れの測定.....	46
2-3-3-4	SPR による相互作用解析.....	47
2-4	第 2 章の総括.....	48
3-0	概要.....	51
3-0-1	プロテアーゼ.....	51
3-0-2	金属結合活性.....	52
3-0-3	グリオキシラーゼ.....	52
3-1	プロテアーゼ活性.....	53
3-1-0	概要.....	53
3-1-1	蛋白質の調製.....	53
3-1-1-0	概要.....	53
3-1-1-1	実験手順.....	54
3-1-1-1-1	DJ-1 発現用ベクター.....	54
3-1-1-1-2	各種 DJ-1 の発現.....	55
3-1-1-1-3	DJ-1 蛋白質の初期精製.....	56
3-1-1-1-4	プロテアーゼ処理による His-Tag の切断除去.....	57
3-1-1-1-5	DJ-1 の最終精製.....	58
3-1-1-2	結果.....	59
3-1-1-2-1	サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製.....	59
3-1-2	プロテアーゼ活性の検証.....	59
3-1-2-0	概要.....	59
3-1-2-1	実験手順.....	60
3-1-2-2	結果.....	61
3-1-3	熱安定性・分子サイズの解析.....	61
3-1-3-0	概要.....	61
3-1-3-1	実験手法.....	62
3-1-3-2	結果.....	62
3-1-4	結晶構造解析・分子動力学シミュレーション.....	64
3-1-4-0	概要.....	64

3-1-4-1	実験手順.....	64
3-1-4-2	結果と考察.....	65
3-2	金属結合.....	68
3-2-0	概要.....	68
3-2-1	蛋白質の調製.....	68
3-2-1-0	概要.....	68
3-2-1-1	実験手順.....	69
3-2-1-1-1	DJ-1 発現用ベクター.....	69
3-2-1-1-2	各種 DJ-1 の発現.....	69
3-2-1-1-3	DJ-1 蛋白質の初期精製.....	70
3-2-1-1-4	TEV プロテアーゼ処理による His-Tag の切断除去.....	71
3-2-1-1-5	DJ-1 の最終精製.....	72
3-2-1-2	結果.....	73
3-2-1-2-1	サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製.....	73
3-2-2	DSF による DJ-1 結合金属のスクリーニング.....	74
3-2-2-0	概要.....	74
3-2-2-1	Differential Scanning Fluorimetry の測定原理.....	74
3-2-2-2	実験手順.....	75
3-2-2-3	結果.....	75
3-2-3	ITC による DJ-1 結合金属の親和性の算出.....	76
3-2-3-0	概要.....	76
3-2-3-1	実験手順.....	76
3-2-3-2	結果.....	77
3-2-4	共結晶構造解析と ITC による変異体の親和性解析.....	78
3-2-4-0	概要.....	78
3-2-4-1	実験手順.....	78
3-2-4-1-1	共結晶構造解析.....	78
3-2-4-1-2	ITC による変異体解析.....	79
3-2-4-2	結果.....	79
3-3	グリオキシラーゼ活性.....	82
3-3-0	概要.....	82
3-3-1	実験手順.....	84
3-3-2	結果.....	84
3-4	Isatin による DJ-1 機能の阻害.....	85
3-4-0	概要.....	85
3-4-1	実験手順.....	86

3-4-2	結果	87
3-5	第3章の総括	87
4-0	概要	90
4-1	変異体・類縁体解析	90
4-1-0	概要	90
4-1-1	実験手順	92
4-1-1-1	ITC	92
4-1-1-2	共結晶構造解析	93
4-1-2	結果と考察	93
4-2	類縁体のスクリーニング	97
4-2-0	概要	97
4-2-1	実験手順	98
4-2-1-1	ITC測定	98
4-2-1-2	DSF測定	99
4-2-2	結果と考察	99
4-3	さらなる最適化	102
4-3-0	概要	102
4-3-1	実験手順	103
4-3-1-1	ITC測定	103
4-3-1-2	グリオキシラーゼ活性阻害の検証	103
4-3-2	結果と考察	104
4-4	第4章の総括	107
5	5章	110

第 1 章

序論

1-0 概要

パーキンソン病関連因子 DJ-1(PARK 7)は、パーキンソン病・癌などの重要な疾患への強い関与が示唆されながらも、生化学的機能に関しては曖昧な点が多く、現在も研究が進められている蛋白質である。

本研究は、DJ-1 の機能制御をめざし、小分子阻害剤の開発を行ったものである。本論文では、実際に行ったスクリーニングの結果および考察について報告し、さらにその過程で得られた DJ-1 の機能に関する考察に関しても併記する。

本章では研究背景として、標的蛋白質である DJ-1 と疾患の関係、現時点で報告されている DJ-1 の生化学的特徴の概略、そして研究目的に関して記述する。

1-1 DJ-1 と疾患

1-1-0 概要

DJ-1 は、当初は原がん遺伝子として同定された蛋白質であり [1]、のちに遺伝性パーキンソン病との関係が示され、注目を集めた [2]。そして現在では、パーキンソン病に限らず糖尿病や、前立腺がん、乳がん等の多種の癌など、加齢に関係した多くの疾病への関与が示され、重要な研究対象として機能解析が進められており、また、近年では治療標的としての提案もなされている [3][4][5][6]。

以下、DJ-1 の関与が示された代表的な疾患である、パーキンソン病・癌に関して記述する。まず疾患の特徴について述べ、続いて DJ-1 の変異、もしくは過剰発現がそれら疾患の発生機序に対してどのように影響しているかに関して、DJ-1 による酸化ストレス抑制という観点から述べる。

1-1-1 パーキンソン病

原がん遺伝子として同定されたのち、DJ-1 が最初に大きな注目を集めたのは、DJ-1 への変異が家族性パーキンソン病を誘発することが明らかになった時である [2]。

パーキンソン病は神経変性疾患の一種であり、現在も発症機構の詳細が明らかになっておらず、有効な根本治療法が存在しない難病の一つである[7]。主な症状は運動障害で、さらに病態が進行すると 70%の患者が認知症を発症するため、患者の家族等患者の周辺への経済的・物理的負担が大きいことでも知られる。神経変性疾患の中ではアルツハイマー病に次いで患者数が多く、また、アルツハイマー病同様加齢に伴い発症確率が上昇することも知られている。全世界に 100 万人を超える患者が存在すること、さらに、今後予想される世界的な高齢化の中患者数が増加すると予想されることから、発症機構の解明・根本治療法の開発が急務となっている。

以上を背景として、これまで多くの研究者がパーキンソン病の発症機構解明へ向けて研究に従事してきた。そしてその研究過程で、DJ-1 とパーキンソン病の関連は示された。

イタリアのある家系では、若年性のパーキンソン病患者が多数生まれることが知られていた。その家系がゲノム内に有していたのが、DJ-1 の L166P 変異である[2]。その後この変異によってDJ-1が大きく不安定化され、細胞内のDJ-1の発現量が大きく減少すること、またDJ-1をノックアウトしたマウスはパーキンソン病様の症状を示す毒物への感受性が増大することが突き止められ[8]、DJ-1 はパーキンソン病の進行を抑制するうえで重要な役割を果たしていると推定されている。

特にノックアウトマウスで観察された毒物感受性の増大は、DJ-1 の機能を解析するうえで大きな示唆を与えた。その報告内で用いられた毒物は MPTP と呼ばれる農薬であり、神経細胞内のミトコンドリアに作用し、強い酸化ストレスを与えるものだった。MPTP は細胞死を引き起こし、最終的にパーキンソン病様の症状をもたらす。

DJ-1 が本化合物の毒性を抑制することから、DJ-1 は酸化ストレスを抑制することによりパーキンソン病の進行を抑制していると考えられる[9][10][11]。この知見は、過剰な酸化ストレスが老化やパーキンソン病の進行を加速するという既存の報告とも合致しており、DJ-1 の機能解析において重要な礎石となっている[12][13][14]。

1-1-2 癌

同定当初 DJ-1 は原がん遺伝子と考えられていた[1]。実際、その後の研究により DJ-1 は癌の細胞生存に強い影響を与えることが示唆されている[15][16]。

癌とは、ゲノム内の変異や細胞内のシグナル伝達の乱れによって細胞の増殖調節機構が障害され、結果細胞の異常増殖を起こす病気である。多くの先進諸国では心臓病などと並び主要な死因の一つとなっており、治療法は確立していない。また癌もパーキンソン病と同様加齢によって発病率が上昇することが知られており、今後の高齢化社会に向けて治療法の確立が待たれる疾患の一つである[17][18]。

現在、DJ-1 は癌の細胞生存において重要な役割を担っていると考えられている。

癌細胞は活発な細胞増殖を特徴とする。そのためミトコンドリア内の代謝サイクルも活発に働いている。だがこの代謝サイクルは、副産物として細胞内で多量の酸化ストレス物質を生産することが、知られている[19]。

先の項で記したように、DJ-1 は細胞内の酸化ストレスの緩和に大きな役割を果たし、パーキンソン病を防ぐ[20]。この機能が癌の場合では悪性化へとつながると考えられている。

つまり DJ-1 は、ミトコンドリアから発生した酸化ストレスを緩和することで、癌細胞の生存に貢献する。その仮説を支持するように、多くの癌において DJ-1 は発現が増強していることが示されており、また、癌細胞内の DJ-1 を抑制することで癌細胞の酸化ストレスへの感受性が増大し、細胞死が誘発されることが近年示された[16][21]。

これらの報告・仮説に基づき、現在 DJ-1 は、パーキンソン病と酸化ストレスの関連を調べるための足掛かりとして、また癌治療標的分子として注目を集めている[6]。

1-2 DJ-1 の生化学的特性

1-2-0 概要

前節(1-1)では、これまでに報告された DJ-1 が関与する疾患について記述した。本節では、DJ-1 の生化学的特性(構造・物性・機能)を、上記疾患の作用機序とも関連させながら記述する。

1-2-1 DJ-1 の構造・物性

まず DJ-1 の一次構造、すなわちアミノ酸配列に関して述べる。

アミノ酸総数は 189 個である。推定分子量は一分子あたり約 20 kDa であり、蛋白質としては決して大きなものではない。

配列に関しては、DJ-1 は大腸菌からヒトまで比較的多くの種で保存されており、細胞内でなんらかの重要な役割を果たしていることがうかがえる [22][23][24][25]。いくつかの残基では高い保存性が見られ、特に保存性が高いのは、ヒトの Cys106 残基にあたる Cys 残基である。

続いて三次構造に関して述べる。

これまでの DJ-1 の研究結果から、DJ-1 は以下のような構造をしていると現在考えられている。[24][26][27][28]

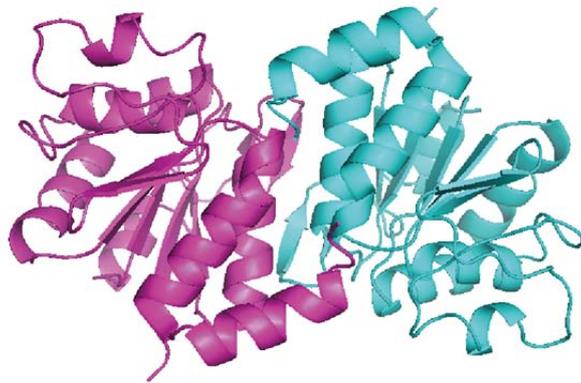


Figure 1-1 DJ-1 の構造(PDB ID:1SOA)

DJ-1 は二量体を形成しており、シアン、水色それぞれがプロトマーを表す。

上記の図は結晶構造であるが、円二色性偏光などの解析の結果とも合致することから溶液中の構造も同様と推定される[29][30]。

特筆すべきは DJ-1 が結晶構造中で二量体構造を組んでいることである。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、免疫沈降法から DJ-1 は溶液中でも二量体を組むことが示されており(たとえば SEC の DJ-1 の溶出位置は 40 kDa に当たる位置である。なお SEC は分子を分子量に従って分画する精製・分析手法である)、これは結晶構造という高濃度蛋白質存在下のみの現象ではない[31][32]。

そして DJ-1 の二量体化は、疾病に対しても重要な影響を与える。

前節(1-1)で既述したように、家族性パーキンソン病を罹患している家系の一部では、DJ-1 に変異が観察される。この変異は DJ-1 の C 末端付近に位置する Leu166 残基が Pro 残基に変異したものであり、DJ-1 の二量体化を妨げ、安定性を大幅に低下させることが知られている。そして不安定化の影響で DJ-1 の細胞内発現量は減少し、パーキンソン病へと至る。つまり二量体化によって DJ-1 は安定化され、本来の機能を発揮できるように設計されている。[31][32]

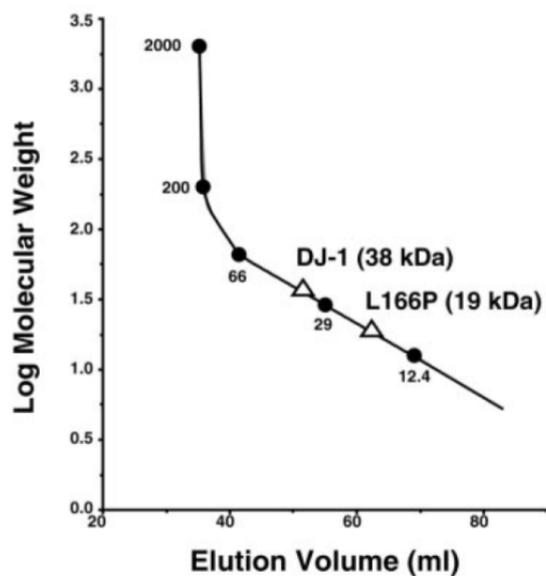


Figure 1-02 SEC から算出された DJ-1 の分子量

SEC の結果から、野生型(WT)は 38 kDa の位置に、家族性パーキンソン病を引き起こす変異体(L166P)は 19 kDa の位置に溶出された。DJ-1 のプロトマーの分子量は約 20 kDa であることからそれぞれ二量体、単量体にあたりと考えられ、この結果は DJ-1 の機能と二量体化が密接に関連していることを示している[31]。

また、詳細は 3 章で記述するが、DJ-1 の二量体化はもっと積極的に機能に関わるという仮説も提出されている[33]。その仮説によれば、DJ-1 は本来プロテアーゼとしての機能を有しているが、プロトマーが二量体化することによってプロテアーゼ活性が抑制されており、C 末端の切断によって単量体になるとプロテアーゼ活性を発揮する。

以上 DJ-1 の構造・物性上の特徴を述べた。これらの中でも、保存性が高い Cys106 残基の存在と、二量体化が疾患に関わる顕著な特徴である。続く DJ-1 の機能に関して述べた節でも、これらの特徴に触れつつ過去の報告に関して概略を記す。

1-2-2 DJ-1 の機能

物性解析とは対照的に、DJ-1 の生化学的機能に関しては現在決定されていない。

仮説が提案されていないためでなく、仮説は数多く提案されているが、それらの再現性が確認されないものが多いためである。

ただしそれらの仮説の中に共通している点がいくつかある[20][34][35][36]。

①DJ-1 は細胞死を抑制する働きがある。

②DJ-1 による細胞死抑制に Cys106 残基が非常に重要な働きをしている。

③酸化ストレスにより DJ-1 は細胞質からミトコンドリアへと移行する。

以下、これまでに提案された仮説の中でも、特に多くの研究者によって検証されているものに関して、上記 3 点と関連付けながら簡単に説明する。

1. プロテアーゼ仮説

本仮説は DJ-1 がプロテアーゼ活性を発揮することにより、酸化ストレスによって誘導された凝集蛋白質を取り除くという仮説である[33][37][38]。

この仮説は、DJ-1 の大腸菌ホモログである HSP31 がプロテアーゼ活性をもつことから、提唱された[39]。

本仮説では DJ-1 は不要な凝集蛋白質を破壊する役割を果たすとされる。提案されている細胞死抑制のメカニズムは以下のようなものである。

ミトコンドリアなどから発生した過剰な酸化ストレスは、様々な蛋白質分子を無秩序に変性させる[40]。無秩序に変性した蛋白質は最終的に細胞死へとつながる。DJ-1 は Cys106 を中心とした触媒ポケットによって変性した蛋白質をとらえ、プロテアーゼ活性で分解し、細胞死を抑制する。

この仮説は、HSP31 の触媒 3 残基が DJ-1 内でも保存されていること、HSP31、DJ-1 ともにプロテアーゼ活性を有するという報告があることを主な理由として、支持されている。

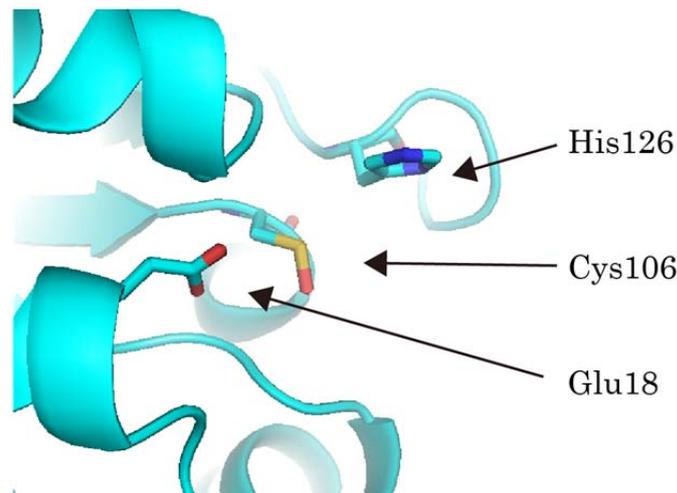


Figure 1-03 DJ-1 の触媒 3 残基

DJ-1 の一次構造内でも特に配列保存性が高い 3 残基。これら 3 残基は、典型的なシステインプロテアーゼの触媒残基と同じ構成であり、DJ-1 ホモログである HSP31 はこれら 3 残基を触媒残基としてプロテアーゼ活性を示す。しかし DJ-1 については、プロテアーゼ活性を示すには配向が異なるとも提起されている。

しかしこの仮説に反対する研究者もいる。反対する主な理由は、HSP31 はプロテアーゼ活性を有するが、DJ-1 はプロテアーゼ活性を有していないという報告もまた存在すること [24]、そして触媒 3 残基に対応する DJ-1 内の 3 つの残基の中の 1 つ、His126 残基が、プロテアーゼ活性を発揮するには不適切な配向をしているためである [28][26]。

近年この点を補足する仮説が提出された。それは、His126 残基の配向と、DJ-1 の二量体化が関係するというものである [33]。

DJ-1 は二量体化することにより、下図のように C 末端領域と His126 残基が接近する。

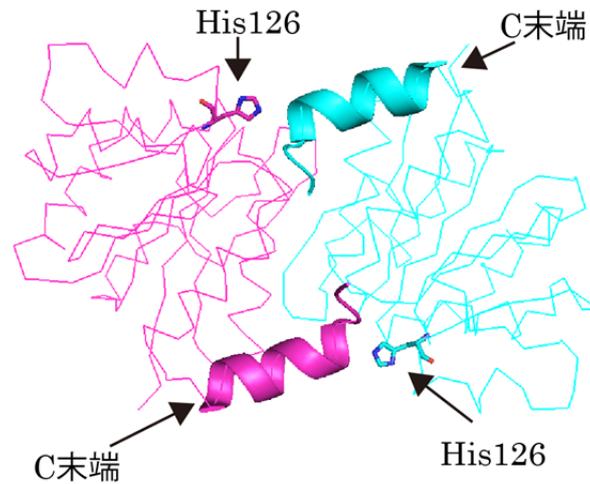


Figure 1-04 C 末端(太く表示)と His126 の位置関係

DJ-1 の二量体構造のリボン図。シアン、水色はそれぞれプロトマーを示す。プロテアーゼ活性を調節するとされる C 末端、His126 は太く表示してある。

その仮説によれば、この接近により His126 と C 末端領域の Pro184 残基が相互作用し、His126 が固定される。しかし C 末端領域を切断すると His126 残基はプロテアーゼ様の配向となり、活性が上昇するというものである。

この仮説を支持する結果として、C 末端領域を切断することにより DJ-1 のプロテアーゼ活性が向上すること、さらに培養細胞内の DJ-1 の一部の C 末端領域が切断されていることが報告されている。

以上のように、DJ-1 のプロテアーゼ仮説の生体内での重要性に関しては現在も激しい議論が行われている。

2.金属結合仮説

本仮説は、DJ-1 が銅と結合することにより銅毒性を防ぎ、細胞死を抑制するというものである[41][42][43]。

本仮説は、パーキンソン病患者の脳中では銅が過剰であるという知見に基づき提案されている。提案されているパーキンソン病抑制・細胞死抑制メカニズムは以下のようなものである。

銅は生体内の化学反応に必須であるが、過剰な遊離銅は、その高い反応性によって毒性を示す。そのため、生体内では銅は蛋白質と結合した形で貯蔵されている。しかし過剰な酸化ストレスは蛋白質を変性させ、銅の遊離を促す。パーキンソン病患者は健常人と比べ脳内に銅が蓄積しているため、酸化ストレスの影響が大きい。

それに対して DJ-1 は、二重の方法によって酸化ストレスを防ぎ、細胞死を抑制する。まず Cys106 残基を介して酸化ストレスによって放出された銅を捕え、毒性を防ぐ。さらに、銅を捕えた DJ-1 は、酵素活性に銅を必須とする Super Oxide Dismutase(SOD)と相互作用し、銅を渡す。SOD は酸化ストレスを緩和することが知られた酵素であり、DJ-1 から銅を渡されることで酸化ストレス防止活性を発揮する。

この仮説は、パーキンソン病で得られた経験事実を説明すること、さらに Cys106 が銅と結合することが結晶構造中で確認されたことなどにより支持されている。

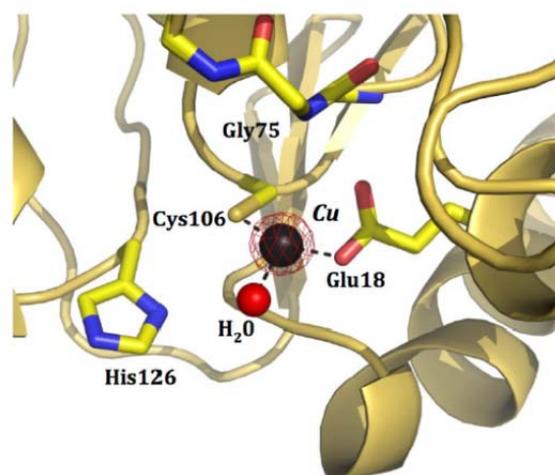


Figure 1-05 DJ-1 と銅の共結晶構造

銅原子(茶色の球)に対して、Cys106 と Glu18 が配位している。[41]

ただしこの仮説に関しても、プロテアーゼ仮説同様、疑問点は指摘されている。DJ-1 と銅の *in vitro* での解離平衡定数 K_D は 400 μM であり、非常に親和性は弱い[41]。放出されると考えられる遊離銅の濃度は $\text{pM}\sim\text{fM}$ のオーダーであるため、DJ-1 の弱い親和性では結合できない可能性がある。

3. グリオキシラーゼ仮説

本仮説は、DJ-1 はミトコンドリアの代謝サイクルの副産物である毒性物質グリオキサールを分解することにより、細胞死を抑制するというものである[44][45]。

この仮説は、DJ-1 の大腸菌ホモログである HSP31 がグリオキサール分解活性、すなわちグリオキシラーゼ活性をもつことから、提案された[46]。

提案されている細胞死抑制メカニズムは以下のようなものである。

酸化ストレスによって、ミトコンドリア解糖系で利用されるべきグルコースが酸化され、メチルグリオキサールへと変わる。メチルグリオキサールは種々の蛋白質と反応、変性させ、最終的に細胞死へと至らしめることが知られている。

DJ-1 はグリオキサールを以下のような機構によって分解し、毒性を防ぐ。

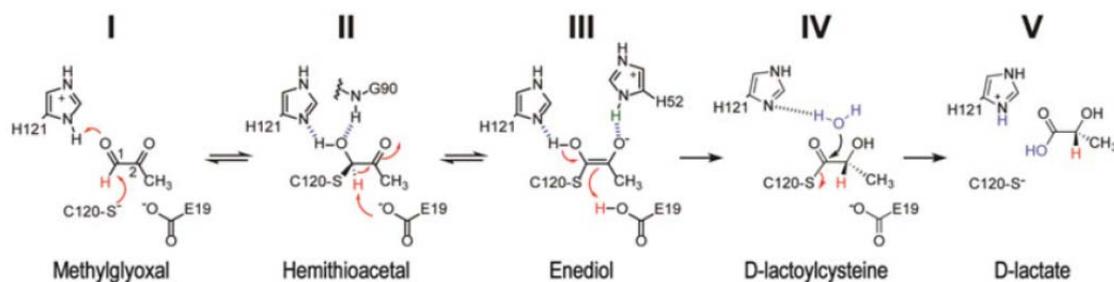


Figure1-06 提案された Glyoxalase 分解機構

Arabidopsis thaliana の DJ-1 ホモログの Glyoxalase 活性機構の概略図。Cys120 がメチルグリオキサールに共有結合し、Glu19 がプロトンを引き抜く。

その後 H121 による補助を受けながら、D 体の乳酸が反応産物として生成される。[45]

この仮説は、反応中間体に類似していると考えられる結晶構造が得られていること、さらに線虫を用いた実験で、DJ-1 をノックアウトした場合グリオキサールへの耐性が弱化することなどから支持されている。

ただし、本仮説に関してもプロテアーゼ仮説同様、反例となる報告があり、生体内での重要性に関して議論は分かれている[47]。

その他にも種々の転写因子の活性化、シャペロン能など、DJ-1 に関しては数多くの機能が提案されている[48][30]。現在、それらの中でいずれの機能が細胞内で致命的な役割を果たしているのかははっきりしていない。

1-3 研究目的と概要

1-3-1 研究目的

以上述べたように、DJ-1 に関しては疫学、分子生物学、生化学等の観点から多くの研究がなされてきた。そして DJ-1 がパーキンソン病、癌など重要な疾患に関与していること、酸化ストレスによる細胞死の抑制に重要であること、多くの生化学的機能を有している可能性があることが判明した。

そこから浮かんでくるのは以下のような疑問である。

- ①DJ-1 のいずれの機能が、どのようにパーキンソン病等の疾患に関わっているのか
- ②DJ-1 は薬剤標的蛋白質として有望か否か

これらの 2 つの問題点を解決するための糸口となる可能性があるのが、DJ-1 の小分子阻

害剤である。

まず①であるが、これまで報告されてきた細胞、もしくは動物実験は、すべて siRNA もしくはノックアウト等の遺伝子改変手法により、DJ-1 の機能を阻害し、結果を解析している。機能解析には小分子阻害剤は用いられていない。

しかし過去の知見によると、小分子阻害剤による阻害と、遺伝子改変手法による阻害が違ふ実験結果をもたらし、それを詳細に解析することで蛋白質の機能の解明に至ったことはままある[49]。

だが現時点では DJ-1 の機能を阻害する小分子阻害剤は開発されておらず、上記のような解析を行うためには、DJ-1 を標的とした阻害剤の開発が必須となる。

また、②に関しても、どのような疾患を標的とするにせよ、薬剤標的蛋白質としての評価にはモデル動物を用いた *in vivo* 実験が不可欠であり、そのためには阻害剤が必要となる。

このような背景から、本研究の目的を、DJ-1 機能阻害剤の探索とした。

1-3-1 概要

小分子阻害剤により DJ-1 の機能を阻害するためには、以下の 2 種類の課題を解決する必要がある。

- ①DJ-1 に特異的に結合する小分子の同定
- ②得られた小分子による DJ-1 の機能阻害の確認

課題①に関しては、主に第 2 章および第 4 章で述べる。これらの章では、DJ-1 に結合する小分子のスクリーニング(第 2 章)、得られたスクリーニング化合物の伸長(第 3 章)について記載する。

課題②に関しては、主に第 3 章および第 4 章で述べる。これらの章では、スクリーニングにより同定された化合物の機能阻害の確認(第 3 章)、伸長化合物の機能阻害の確認(第 4

章)に関して述べる。

第2章で記すスクリーニングの結果、DJ-1に結合する化合物として、生体内に存在する化合物 **Isatin** が得られた。これはパーキンソン病患者の尿中で増加する小分子であることが知られており、生体内でも実際に DJ-1 の働きを制御している可能性がある。

第3章では、まず DJ-1 の現在提案されている代表的な DJ-1 の機能について検証し、その中で最も信頼性が高いと考えられたグリオキシラーゼ活性に関して、**Isatin** による阻害を確認した。結果 **Isatin** は DJ-1 のグリオキシラーゼ活性を阻害した。

第4章では、**Isatin** の構造に基づいて化合物の伸長を行い、さらに伸長化合物による DJ-1 グリオキシラーゼ活性の阻害を確認した。結果 $K_D=90$ nM の阻害剤が得られ、阻害活性 (IC_{50})もそれに準ずるものとなった。

本研究により、通常の細胞アッセイ等で用いるには十分な DJ-1 機能阻害剤が得られた。この化合物はリード化合物として用いるにも十分な活性と物性を兼ね備えたものであると考えられる。

第 2 章

DJ-1 結合小分子の同定

2-0 概要

本章ではスクリーニングによる DJ-1 結合小分子の同定に関して述べる。

通常行われるハイスループットスクリーニングでは、酵素活性など高速で処理可能なアッセイ系を用いてライブラリ内の各種化合物の阻害活性を測定し、阻害剤を探索するが、DJ-1 に関してはスクリーニング開始当初再現性の高い酵素活性が報告されていなかったため、ハイスループットスクリーニング系を立ち上げられなかった。

そこで DJ-1 の活性部位と考えられている Cys106 への小分子の結合を、物理化学的手法により直接同定し、その小分子を基に親和性の高い化合物を得ることを計画した。

本スクリーニング系で用いる物理化学的手法は表面プラズモン共鳴法(SPR)である。これはチップ表面上の質量変化をシグナルとしてとらえる手法であり、検出感度の高さ、スループット性が中程度であることなどから今回行う物理化学的スクリーニングに適していると考えられた[50]。

化合物ライブラリとしてはフラグメントライブラリを用いることとした。フラグメントライブラリは通常用いられるハイスループットスクリーニング用ライブラリ(分子量 300~400 Da の化合物中心)よりも分子量が小さい化合物(分子量 150~250 Da の化合物中心)によって構成されたライブラリであり、通常のライブラリよりも少ない化合物数で広いケミカルスペースを探索可能なライブラリである。化合物数が少ないことから、表面プラズモン共鳴法のスループット性の低さを補うことが可能となる[51][52]。

スクリーニングにより小分子を同定したのち、その結合を等温滴定型熱量測定法(ITC)と共結晶構造解析により検証した。

ITC は横軸に滴定量を、縦軸に結合に伴う発熱量をプロットする手法であり、小分子の蛋白質への結合の熱力学パラメータ(K_D , ΔH , ΔS , 結合比)を精度よく得られる[53][54]。必要な蛋白質量も多いがその分信頼性も高く、化合物の結合の検証を行う二次スクリーニングに適した手法である。

共結晶構造解析は蛋白質上の化合物結合箇所を同定するために行う手法であり、相互作用の様子を原子レベルの解像度で解析することが可能となる。

本章では、SPR にフラグメントライブラリを組み合わせた一次スクリーニングと、ITC と結晶構造解析による二次スクリーニングに関して記す。

2-1 蛋白質の調製

2-1-0 概要

本節ではスクリーニング実験中に用いた蛋白質の調製法を述べる。

本節で用いた蛋白質は His-tag 付加 DJ-1 野生型(HisDJ-1WT)、DJ-1 野生型(DJ-1WT) である。各種蛋白質は主に大腸菌で発現させたのち、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。

最終的な精製度は SDS-PAGE により確認した。

-

2-1-1 実験手順

2-1-1-1 DJ-1 発現用ベクター

最初に、各種蛋白質の発現プラスミドの作成について述べる。

プラスミドは pET28vector を基にして作成した。作成したベクターの概要は以下のとおりである。

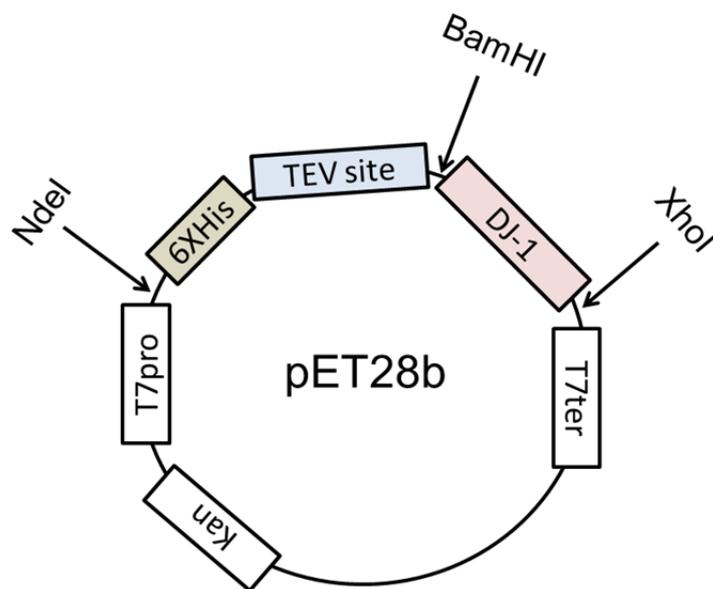


Figure 2-01 発現ベクターの概略図

Kan はカナマイシン耐性遺伝子、T7Pro は T7 プロモーター、6 X His はヘキサヒスチジンタグ、TEV site は Tobacco Etch Virus Protease 切断サイト、T7Ter は T7 ターミネーターを表す。

DJ-1 のアミノ酸配列

```

MASKRALVILAKGAEEMETVIPVDVMRRAGIKVTVAGLAGKDPVQCSRDVVICP
DASLEDAKKEGPDVVVLPGGNLGAQNLSESAAVKEILKEQENRKGLIAAICAGPT
ALLAHEIGFGSKVTTHPLAKDKMMNGGHYTYSENRVKDGILTSRGPPTSFEFA
LAIVEALNGKEVAAQVKAPLVVKD

```

本ベクターを作成する際には、まず変異体導入により Pet28b の T7 プロモーター下流に His-tag および TEV プロテアーゼ切断配列を導入し、その後 5'末端に BamHI サイト、3'末端に XhoI サイトを付加した各種 DJ-1 塩基配列を PCR によって増幅、制限酵素トリガーを用いてベクター内に挿入した。BamHI サイトをアミノ酸配列へと翻訳するとグリシ

ン-セリンとなるが、このグリシンが TEV プロテアーゼ認識配列の C 末端のグリシン-セリンと重なるようにした。結果、TEV プロテアーゼによる His-Tag 切断後の DJ-1 の N 末端にはグリシン-セリンのみが余分な残基として付加されることになった。

2-1-1-2 各種 DJ-1 の発現

このようにして得られたベクターを用い、DJ-1 を BL21(DE3)内にて強制発現させた。

ヒートショック法により DJ-1 ベクターを大腸菌内に導入、カナマイシン 50 µg/ml の LB 培地プレート上 37°C 培養を行いコロニーを形成させた。

同濃度抗生物質を添加した 3 mL LB 培地にて 37°C しんとう培養を行い、およそ 12 時間後、1 LLB 培地に菌を植え継いだ。

37°C しんとう培養を行い、OD₆₀₀=0.5 となった時点で IPTG 0.5 mM で発現を誘導、その後 20°C 条件下でしんとう培養を行った。

約 20 時間後、4°C 6000G 10 分の遠心分離により菌体を回収した。

回収した菌体を、1L の培地分につき 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファ 50 ml でけん濁し、超音波により氷中で破碎した。ここで Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーを行う予定であるにもかかわらず DTT を添加しているのは、DJ-1 の Cys106 残基の酸化を防ぐためである。ただし DTT 濃度は 1 mM と低濃度に抑え、Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーへの影響を防いでいる。

破碎した菌体を、4°C 40000G 30 分の遠心分離により不溶性画分と可溶性画分に分離、可溶性画分のみを回収した。

2-1-1-3 DJ-1 蛋白質の初期精製

次に発現した蛋白質を Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

カラムとしては HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare)を用いし、バッファとしては A バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4),500 mM NaCl,5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを、B バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4),500 mM NaCl,500 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを用意した。

AKTA Prime Plus (GE Healthcare)を用いて精製する。流速は 2.5 ml/min である。

まず HisTrap HP 5 ml を蒸留水 25 ml で洗浄後、25 ml の A バッファによって平衡化した。

その後先ほどの遠心分離で得られた可溶性画分をカラムに注入し、フロースルー画分(下図 FT)を 5 ml ずつ回収した。

続いて A バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、洗浄画分(wash)を 5 ml ずつ回収した。

溶出時の A バッファと B バッファの gradient は、A バッファ:B バッファ=100:0 から A バッファ:B バッファ=0:100 へと 50 ml で推移するように設定し、溶出画分を 5 ml ずつ回収した。

最後に B バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、非特異吸着を洗浄 2 画分として(wash2) 5 ml ずつ回収した。

その後、得られた各画分について、5 μ l 分を 15%SDS-PAGE 上で電気泳動し、発現量および精製度を確認した。(Fig.2-2)

2-1-1-4 TEV プロテアーゼ処理による His-Tag の切断除去

上記手法により得られた His-Tag 付き DJ-1 粗精製画分を TEV プロテアーゼ処理し、His-Tag を除去した。ただし HisDJ-1 WT には本節の処理は行っていない。

まず上記精製法により得られた画分中から純度よく DJ-1 が得られた画分を回収し、TEV

プロテアーゼ 200 µg と混合した。

4°C 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl バッファ中で 16 時間透析後、サンプルを回収し、Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーにより TEV-protease や切断後の His-tag と、目的の DJ-1 蛋白質を分離した。分離の手順は以下のようなものである。

カラムとしては HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare) を用意し、バッファとしては A バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを、B バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを用意した。

AKTA Prime Plus (GE Healthcare) を用いて精製する。流速は 2.5 ml/min である。

まず HisTrap HP 5 ml を蒸留水 25 ml で洗浄後、25 ml の A バッファによって平衡化した。

その後先ほどの TEV プロテアーゼ処理で得られた可溶性画分を 0.22 µm のフィルタでろ過したものをカラムに注入し、フロースルー画分(下図 FT)を 5 ml ずつ回収した。

続いて A バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、洗浄画分(wash)を 5 ml ずつ回収した。

最後に B バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、非特異吸着を洗浄 2 画分として(wash2) 5 ml ずつ回収した。

その後、得られた各画分について、5 µl 分を 15% SDS-PAGE 上で電気泳動し、発現量および精製度を確認した。

純度よく得られた画分を混合し、終濃度 10 mM となるよう DTT を加えたのち、4°C で一晩保存した。

2-1-1-5 DJ-1 の最終精製

His-tag 切断除去後に得られた画分のうち、フロースルー画分および洗浄画分を回収し、

サイズ排除クロマトグラフィーにより最終精製を行った。

用いたカラムは Hiload16/60 Superdex200prepgrade(GEhealthcare)で、4°C 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT バッファ条件下で行った。

クロマトグラムは以下のようになった。

得られた各画分について、50 µl 分を TCA 濃縮し、15%SDS-PAGE 上で電気泳動して精製度を確認した。(Fig.2-4)

純度よく二量体を得られた画分を混合し、終濃度 10 mM となるよう 1 M DTT を添加後、1 ml ずつ 1.5 ml チューブへ分注・-80°C で凍結保存した。

2-1-2 結果

2-1-2-3 サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製

DJ-1WT SECのクロマトグラフィー

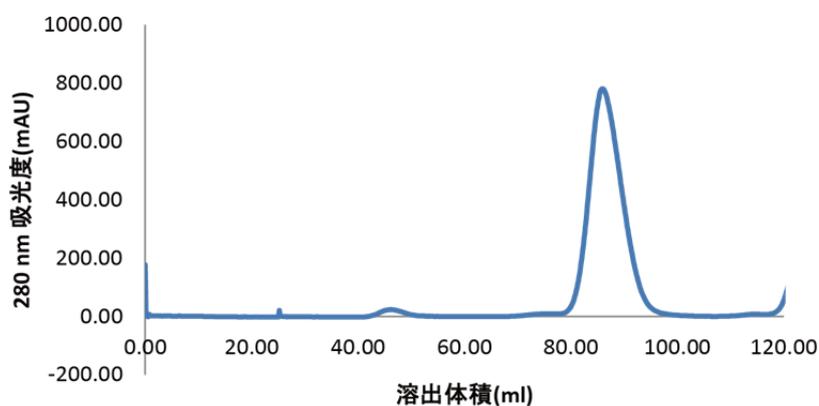


Figure 2-02 DJ-1WT の SEC のクロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製では、二量体の位置に大きなピークが見られた。SDS-PAGE の結果からもこのピークの蛋白質の純度は高いことがわかった。

以上の精製手順により、高純度の DJ-1 を 1 L の培養培地あたり 100 mg 以上取得した。

本章では今後ここで得られた蛋白質を用いる。

2-2 SPRによる一次スクリーニング

2-2-0 概要

本節では SPR を用いたフラグメントスクリーニングに関して記す。

SPR を用いて 300 種類以上の化合物に関して結合を検出する一次スクリーニングは、24 時間以上の測定時間がかかり、その間蛋白質は高活性のまま保たれる必要がある。チップ上での活性を保つためには、DJ-1 の構造を維持したまま固定化する手法が適していると考えられる。

通常用いられる CM5 チップへのアミンカップリング法では、共有結合の非特異性のため蛋白質の構造が破壊されやすい。そこでチップ上への DJ-1 の固定化手法としては、抗 His-tag 抗体を介した Affinity-tag キャプチャー法を用いた。抗 His-tag 抗体を CM5 センサーチップ上にアミンカップリング法で固定化したのち、再び NHS/EDC 混合液で抗体を活性化した。活性化された抗体上に HisDJ-1 WT を流し、キャプチャーと同時に共有結合で固定化した。

固定化した DJ-1 上に Zenobia フラグメントライブラリ 352 種類をそれぞれ流し、化合物ごとの DJ-1 への結合を検出した。

結果 DJ-1 に結合する小分子として Isatin が同定された。

2-2-1 Surface Plasmon Resonance の測定原理

表面プラズモン共鳴分析法(SPR)とは、チップ表面のプラズモン共鳴の変化を検出することによりチップ表面上の分子間相互作用を検出する手法である[53]。

概略図は以下に示す。

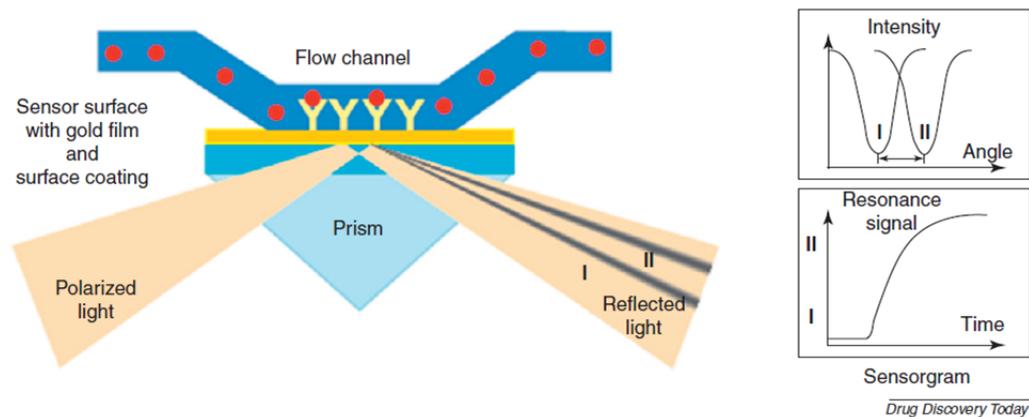


Figure 2-03 SPR の測定原理の概略図[53]

SPR では、まず水晶上に薄い金膜を蒸着させたセンサーチップを用意し、その金膜表面にさらに標的蛋白質を固定する。標的蛋白質に結合する分子は流路を通して金膜及び標的蛋白質と相互作用する。

この状態で標的蛋白質を固定した金膜表面に、水晶側から光を照射、金膜表面上で反射させると、光の一部が金膜表面の金原子に吸収され、表面プラズモンが発生することが知られている。これが表面プラズモン共鳴である。

そして表面プラズモン共鳴による吸光には角度依存性がある。つまり影が発生している。この角度依存性は金膜上のごくわずかな質量変化と相関することが知られており、この影の角度のずれを追跡することにより、標的蛋白質に分子が結合する様子を追跡することが可能となる。図中では I が標的蛋白質のみが金膜上に存在する際のシグナル、II が標的分子と結合分子の複合体が金膜上に存在する際のシグナルに対応している。

2-2-2 実験手順

2-2-2-1 DJ-1 の固定化

まず CM5 センサーチップ上に抗 His-tag 抗体をアミンカップリング法で固定化した。

用いた装置は BiacoreT200(GE Healthcare)である。固定化バッファとしては 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl ,5% Tween20 を用いた。流速は 10 μ l/min である。用いた抗体は Penta His Antibody, BSA-free (QIAGEN)である。

センサーチップ CM5(GE Healthcare)を装置に設置、EDC/NHS 混合溶液を 7 分間流し、チップを活性化した。続いて 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl でバッファ交換した Abs₂₈₀=0.5 の抗 His-tag 抗体を、10 mM 酢酸ナトリウムバッファ(pH5.0)で 20 倍希釈し、活性化したチップ上に 5 分間流した。最後にエタノールアミンによりチップを不活性化した。

続いて DJ-1 を抗体上に固定化する。

まず HisDJ-1 WT を 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl に 4°C で 16 時間透析したものを用意する。EDC/NHS 混合溶液を抗体の固定されたチップ上に 2 分間流し、抗体を活性化する。そこに透析した DJ-1 300 μ M を 2 分間流し、最後にエタノールアミンを 2 分間流して不活性化した。

2-2-2-2 ライブラリの情報

本スクリーニングではフラグメントライブラリを用いる。

用いたライブラリは Zenobia Fragment Library (Zenobia Therapeutics)である。本ライブラリは分子量<200~250 Da, cLogP<2, H-Bond donors<2 という条件によって選定された化合物 352 種類によって構成されている。ここに使われている cLogP とは計算で予測された化合物の脂溶性を指し、H-Bond donors は化合物内に存在する水素結合の電子供与を行うことができる原子の数である。これらが大きくなればなるほど化合物の水への溶解性は悪くなり、物性も扱いにくいものとなる傾向があることが知られている。

本ライブラリの基準は、一般的なフラグメントライブラリの基準(分子量<200~250, cLogP<3, H-Bond donors<3)よりもさらに厳しい基準であり、このライブラリから選定された化合物は、物性が良く扱いやすい化合物が得られると期待される。

2-2-2-3 SPRによるスクリーニング

ランニングバッファとしては 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.005% Tween20, 5% DMSO バッファを用いた。流速は 30 μ l/min である。

次に化合物プレートを作成した。

先ほど記載したライブラリを DMSO により 10 mM まで希釈し、娘プレートとする。娘プレート内の化合物を、化合物を溶解している DMSO も含めて DMSO 濃度 5%、化合物最終濃度 200 μ M となるように 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.005% Tween20 バッファを用いて希釈した。

得られた化合物群をプレート(1 プレート 384 ウェル)に分注し、DJ-1 を固定化した流路上に流した。この際、コンタクトタイムを 15 秒と比較的短めにとることで、非特異的な結合を防いだ。さらにその際 Solvent correction を行うことで DMSO の濃度のずれによるシグナルの補正も行った。

得られた結果は、BiacoreT200 (GE Healthcare)に標準的に備え付けられている Biacore evaluation software によって解析した。

2-2-3 結果と考察

DJ-1 に結合するフラグメント化合物を SPR によりスクリーニングしたところ、以下のよう結果が得られた。

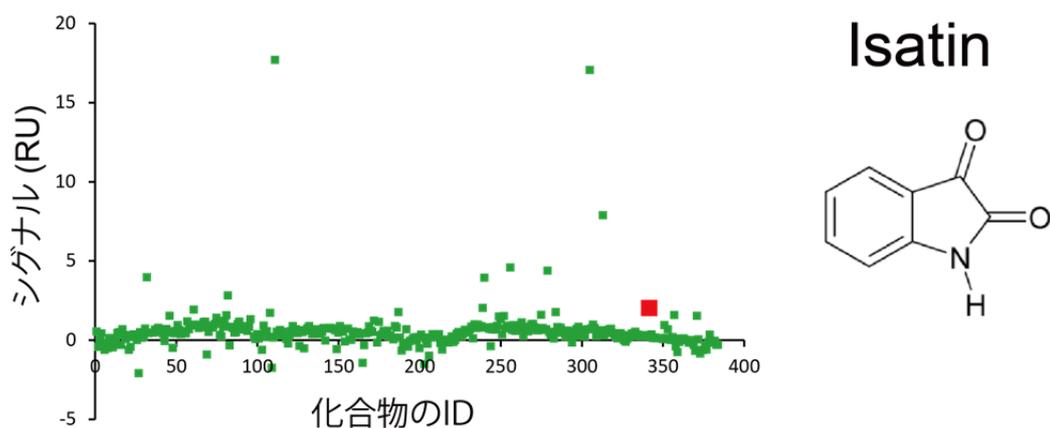


Figure2-04 スクリーニング結果(左)と Isatin の構造(右)

スクリーニング結果は、横軸が化合物の ID、縦軸がシグナルの高さを示し、シグナルが高いほど SPR 系で大きなシグナルを示したことを意味する。

赤四角で示した点が、右で示した化合物 Isatin に対応する。

この中でも赤い点で示した化合物にまず着目した。この化合物はその小さな分子量(149 Da)にも関わらず比較的高いシグナルを示している。そこでこの分子構造に関して論文等を調査したところ、これは Isatin と呼ばれる古くから知られる生体内分子であることが明らかとなった。

さらにこの Isatin は、パーキンソン病治療薬の標的分子である MAO-B を阻害すること、パーキンソン病患者の尿中でこの Isatin の濃度が上昇していることなどが知られていた [55][56]。

本研究で標的としている DJ-1 は、パーキンソン病に関連する因子である。Isatin がパーキンソン病に関与しているならば DJ-1 と何らかの関係があると判断し、この分子を二次スクリーニングへと進めた。

2-3 ITC、結晶構造解析、SPRによる二次スクリーニング

2-3-0 概要

一次スクリーニングにより、DJ-1 に対して結合する化合物の候補として Isatin が選択された。しかし一次スクリーニングは一濃度の SPR のシグナルに基づくものであり、フォールスポジティブも多く含まれていると考えられる。

本章ではフォールスポジティブを除くために行った二種類のアッセイに関して記述する。

まず一つ目は ITC である。ITC は結合に伴う発熱を検出する手法であり、結合に伴うチップ上の質量変化を検出する SPR とは原理が全く異なる。原理が異なる二種類の手法で結合が検出されたならば、その結合はより確からしいと考えられる。

また測定に固定化を要さない点も SPR とは異なっており、この点からも ITC は、固定化で非特異吸着を引き起こすことがある SPR の結果を補うのに適した手法であると考えられる。

二つ目は結晶構造解析である。この手法は DJ-1 と化合物の共結晶を作製し、その結晶に X 線を照射することで得られた回折像を解析することで、構造を決定する手法である。本手法は極めて精度が高く、蛋白質上の構造変化を起こした箇所、化合物の結合箇所を原子レベルの解像度で解析することが可能となる手法である。

以上の解析から、DJ-1 は Isatin と 1:1 の量比で結合しており、その結合箇所は Cys106 周辺のポケットだった。さらに結合箇所を詳細に調べると、DJ-1 は Isatin のジケトン基と共有結合していることが明らかとなった。

溶液中の共有結合を確認するため、分光光度計により Isatin の環構造の崩れを吸光度の変化により検出した。さらに共有結合の可逆性を調べるため、SPR を再び用いて、DJ-1 と Isatin の結合を速度論的に測定した。

上記の手法を用いて、DJ-1 と Isatin の結合を検証し、相互作用形式を精査した。結果

Isatin は DJ-1 に対して、 $K_D=3 \mu\text{M}$ というフラグメントとしてはかなり強力な結合を示した。その結合箇所は Cys106 周辺のポケットであり、ポケットの中心部の Cys106 とは共有結合を結んでいた。そしてその共有結合は、可逆であることが示された。

2-3-1 Isothermal Titration Calorimetry の測定原理

等温滴定型熱量測定(ITC)は、滴定シリンジ中に含まれる分子 A を、異なる分子 B で満たされたサンプルセル中に滴下した際に観察される発熱量に基づいて、二分子間の相互作用の平衡熱力学的パラメータを完全に算出する手法である [53]。

測定装置は図のようになる。

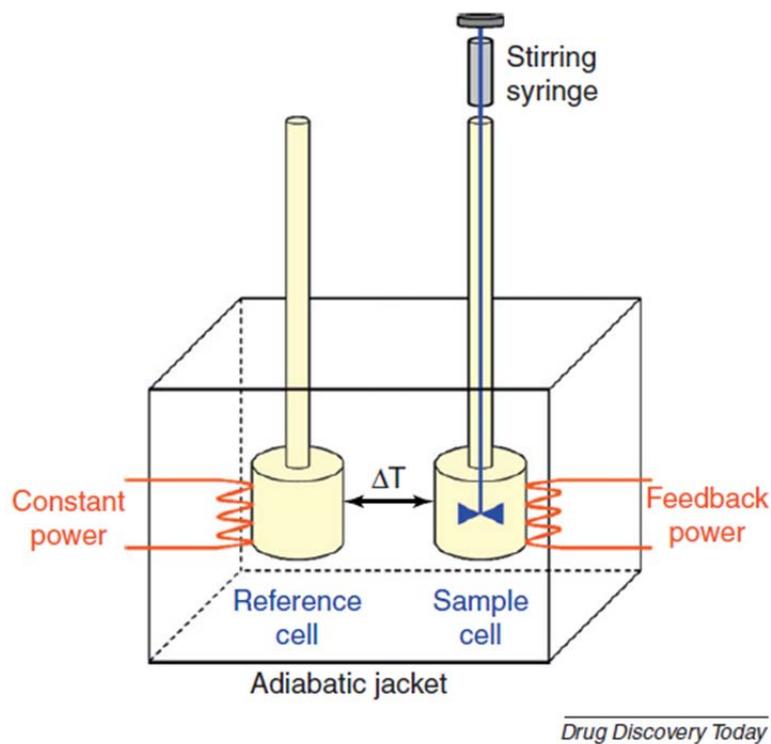


Figure 2-05 ITC の測定装置の概略図[53]

測定装置内には二つのセルが用意されている。片方はリファレンスセル、残る片方がサンプルセルである。装置内では両者の温度が一定かつ等しくなるように絶えず電力を供給

している。

リファレンスセルは絶えず一定の電力を供与されている。しかしサンプルセルは異なる。シリンジからサンプルセル内にサンプルを滴下すると、結合した分子数に正比例した熱が発生する。サンプルセル内の温度を一定に保つためには、発生した熱量分だけ、サンプルセル内に加えるべき電力が減少する。すなわち、この減少した電力量から、サンプルセル内で発生した熱量を逆算することが可能となる。これが ITC の装置測定原理である。

サンプルシリンジから少量のサンプルを一定時間ごとにサンプルセルに滴下した場合、サンプルセルに加えた熱量のプロットは、図のようになる。

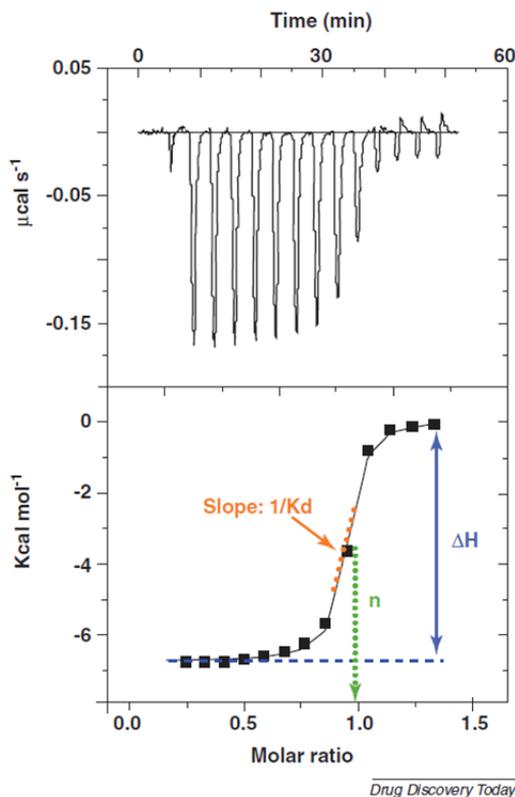
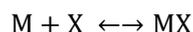


Figure 2-05 ITC の測定データ [53]

このプロットの最大吸熱量が相互作用の ΔH に、傾きが最大となるモル比が結合比に、傾きが結合平衡定数 $K_a=1/K_D$ に、それぞれ対応する。

なお、結合比 1:1 の反応に関しては以下の式に基づいてプロットが解析される。



とする。

$$K_a = \frac{[XM]}{[X][M]}$$

$$X_{total} = [X] + [XM]$$

$$M_{total} = [MX] + [M] = [XM] + \frac{[XM]}{K_a[X]}$$

となる。

XM 複合体の濃度変化と熱変化は以下の式で結ばれる。

$$dQ = d(XM)\Delta H^{\circ}V_0$$

ここで dQ は発熱量、 ΔH° は相互作用の標準エンタルピー、 V_0 はセル容積である。

以上の式から次式が導かれる。

$$\frac{1}{V_0 \left(\frac{dQ}{dX_{total}} \right)} = \Delta H^{\circ} \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{X_r}{2}}{(X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2)^{\frac{1}{2}}} \right)$$

ここで $r=1/(K_a M_{total})$, $X_r=X_{total}/M_{total}$ である。

ITC により得られたパラメータ dQ/dX_{total} とこの式に基づいて、各種熱力学的パラメータは近似計算される。

2-3-2 実験手順

2-3-2-0 概要

ITC 測定・共結晶構造解析に際し、DJ-1 は His-tag を切除したものをを用いた。

ITC は、Cell 内に DJ-1 を、Syringe に Isatin を入れ、測定した。

結晶構造解析は、まず DJ-1 の結晶を還元条件下で調製したのち、その結晶を Isatin を含むバッファ内で静置することで DJ-1 結晶に Isatin を浸透させ、結合させた。共結晶に X 線を照射して得られた回折像を解析、立体構造を得た。

SPR は、スクリーニング時と同様に固定化を行い、Isatin の濃度を変化させて相互作用

を確認した。

2-3-2-1 ITC による熱力学パラメータの算出

用いた装置は MicroCal Auto-iTC 200 (GE Healthcare) で、25°C 条件下での結合に関して熱力学パラメータを算出した。

DJ-1WT を 4°C で 6 時間 PBS に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したのち 0.1 mM となるよう、ろ過した透析外液で希釈した。回収した透析外液中に Isatin を超音波破碎機を用いて溶解させ、1 mM とした。準備した DJ-1WT、Isatin をそれぞれ Auto-iTC 中の Cell、Syringe に詰め、25°C で測定を行った。

2-3-2-2 共結晶構造解析

まず DJ-1 の結晶を調製した。

DJ-1WT を 5 mM DTT、10 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.0) で 4 °C 16 時間透析し、バッファを交換した。DJ-1 を 20 mg/ml に遠心濃縮し、濃縮した DJ-1 と結晶化用バッファを 2 μ l:2 μ l の割合で混合、ハンギングドロップ法で 25°C 中で結晶化した。結晶化用バッファには 200 mM クエン酸ナトリウム、100 mM Tris-HCl, 30% PEG400, 5 mM DTT (pH 8.5) バッファを用いた。

調製した結晶を、180 mM クエン酸ナトリウム、90 mM Tris-HCl, 27% PEG400, 10% DMSO, 2 mM Isatin 中にソーキングし、DJ-1 結晶に Isatin を浸透させた。

得られた結晶にフォトンファクトリー(筑波)の BL5A ビームラインで X 線を照射した。取得したデータからの立体構造の描像は CCP4 および COOT を用いて行った。

2-3-2-3 分光光度計測定

DJ-1WT を 4°C で 16 時間透析し、バッファを置換する。DJ-1WT を回収後、Isatin を濃度 2 mM となるように透析外液である PBS に懸濁、溶解する。その後 DJ-1 / Isatin がそれぞれ終濃度 20 μ M / 10 μ M, 20 μ M / 0 μ M, 0 μ M / 10 μ M となるように混合し、10 mm セ

ルへとつめる。波長 500 nm から 250 nm まで、吸光度を測定した。

2-3-2-4 SPR 測定

固定化は以下のように行った。

まず CM5 センサーチップ上に抗 His-tag 抗体をアミンカップリング法で固定化した。

用いた装置は BiacoreT200(GE Healthcare)である。固定化バッファとしては 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl ,5% Tween20 を用いた。流速は 10 μ l/min である。用いた抗体は Penta His Antibody, BSA-free (QIAGEN)である。

センサーチップ CM5(GE Healthcare)を装置に設置、EDC/NHS 混合溶液を 7 分間流し、チップを活性化した。続いて 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl でバッファ交換した Abs₂₈₀=0.5 の抗 His-tag 抗体を、10 mM 酢酸ナトリウムバッファ(pH5.0)で 20 倍希釈し、活性化したチップ上に 5 分間流した。最後にエタノールアミンによりチップを不活性化した。

続いて DJ-1 を抗体上に固定化する。

まず HisDJ-1 WT を 25 mM HEPES-NaOH(pH7.4), 150 mM NaCl に 4°C で 16 時間透析したものを用意する。EDC/NHS 混合溶液を抗体の固定されたチップ上に 2 分間流し、抗体を活性化する。そこに透析した DJ-1 300 μ M を 2 分間流し、最後にエタノールアミンを 2 分間流して不活化した。

実測定は以下のように行った。

ランニングバッファとしては PBS, 0.005% Tween20, 5% DMSO バッファを用いた。流速は 30 μ l/min である。

秤量した Isatin をランニングバッファに溶解・希釈し、希釈系列を作製したのち、固定化した DJ-1 上に薄い順に流した。希釈系列は 20,10, 5, 2.5, 1.3, 0.63, 0.32 μ M である。

2-3-3 結果と考察

2-3-3-1 DJ-1-Isatin 間相互作用の熱力学パラメータ

ITC 測定により、DJ-1 と Isatin 間の親和性を測定し、相互作用の熱力学パラメータを明らかにした。

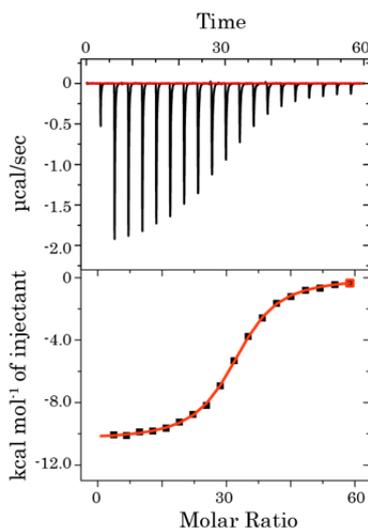


Figure 2-06 DJ-1 と Isatin 間の相互作用の ITC の結果

傾きから算出された親和性は、 $K_D = 2.5 \mu\text{M}$ である。

K_D (μM)	ΔH (kcal)	$-T\Delta S$ (kcal)	N
2.5 ± 0.1	-10.4 ± 0.1	2.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1

Table 2-01 ITC の結果のまとめ。エラーはフィッティングエラーである。

結果、DJ-1 は $K_D=2.5 \mu\text{M}$ というフラグメント化合物としては非常に高い親和性を示した。これは溶液状態であるため、SPR で検出されたシグナルは固定化条件特有のものではない。

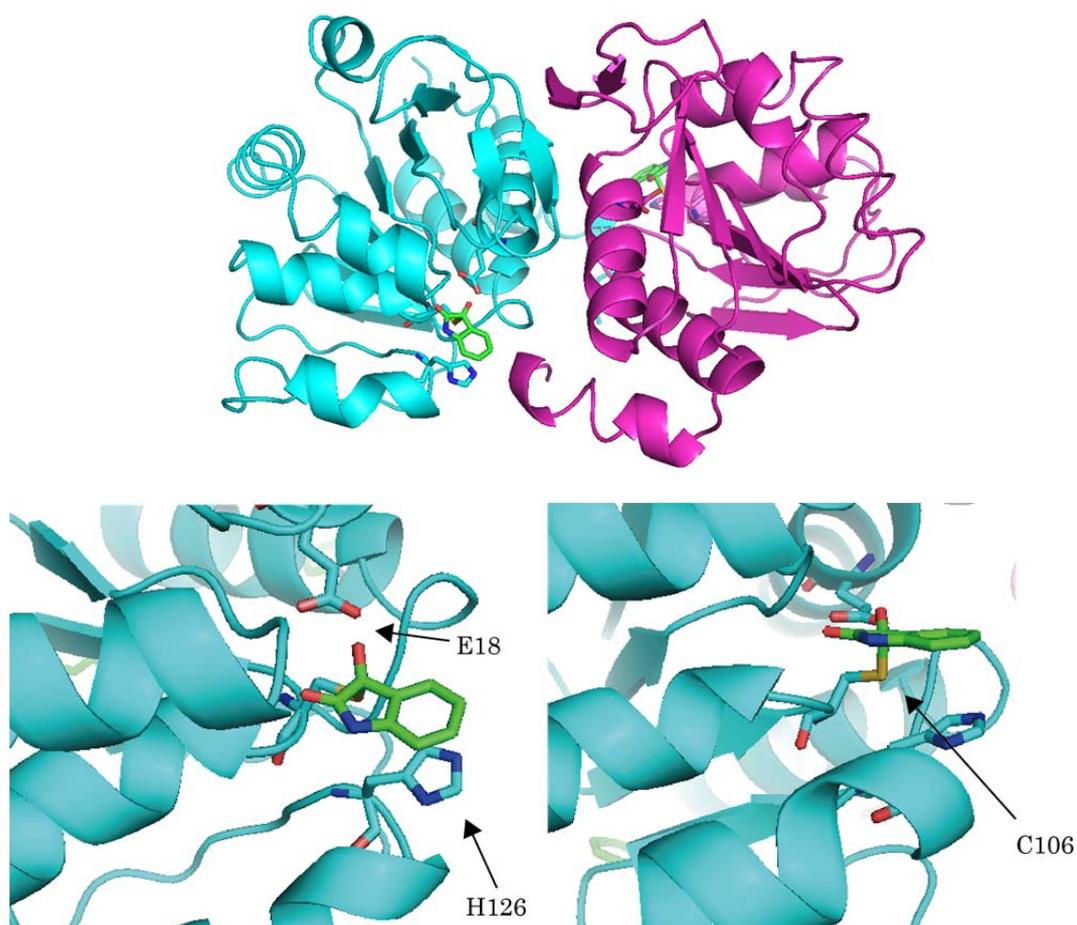
反応に伴う発熱量は大きい。これは大きなエンタルピーを与える相互作用が DJ-1 と

Isatin 間で働いていると考えられる。

2-3-3-2 共結晶構造

ITC の結果を受け、Isatin と DJ-1 の共結晶構造解析を試みた。

結果は以下のようになった。



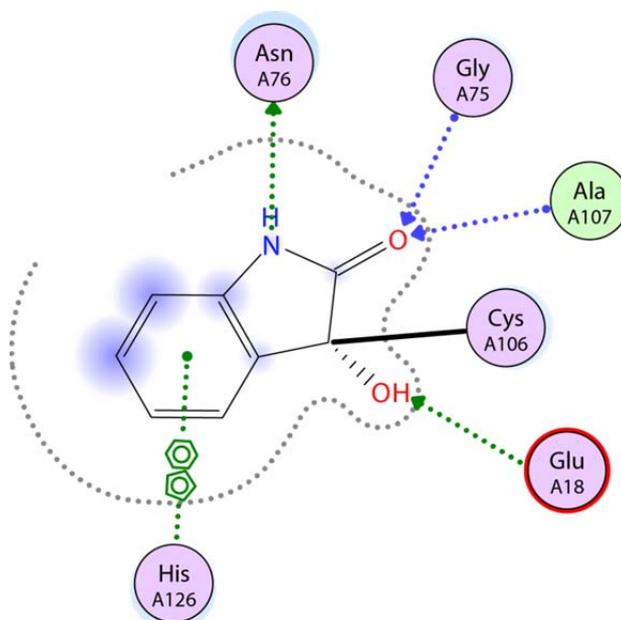
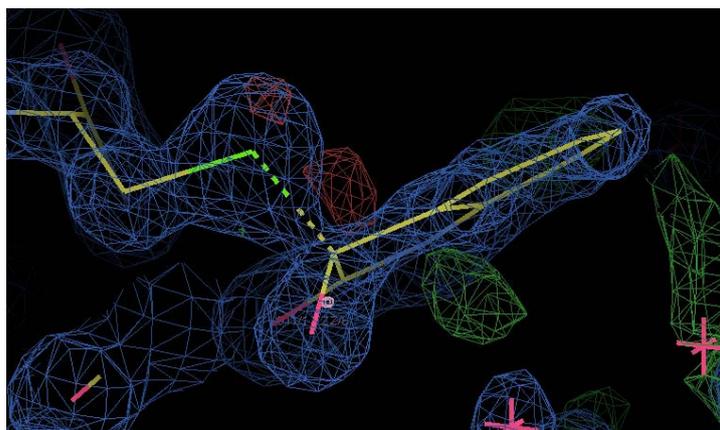


Figure 2-07 Isatin と DJ-1 の共結晶構造。

第一段:DJ-1 と Isatin 複合体の全体構造。

各々のプロトマー(シアン、水色)に対して、一つの Isatin(緑色)が結合している

第二段:結合した Isatin 周辺の構造。

第三段:WinCoot により表示した電子密度図。

青い線は、モデル構造から予測された電子密度と実際に観測された電子密度の差が小さいことを、赤い線はモデル構造から予測された電子密度よりも実際に観測された電子密度が少ないことを示す。

下段:Isatin と DJ-1 の相互作用の模式図(MOE により描像)。緑いろの点線は側鎖原子が水素結合を、青色の点線は主鎖原子が水素結合を結んでいることを示す。

His126 の位置から伸びているのは、 π - π 相互作用である。

Title	WT Isatin		
Protein	DJ-1		
Collection			
PDB ID	---		
Source	PF-BL5A		
Space Group	P 3 ₁ 2 1		
Cell Dimensions			
a,b,c (Å)	75.10	75.10	75.25
α, β, γ (deg)	90.00	90.00	120.00
Wavelength	1.0000		
Resolution (Å)	29.9 (1.39)		
Total Observations	480,396 (39,400)		
Unique Observations	48,912 (6,365)		
Completeness (%)	98.3 (89.3)		
Multiplicity	9.8 (6.2)		
R _{merge}	0.081 (0.685)		
I/σ	16.6 (2.4)		
Refinement			
Resolution (Å)	29.9 (1.39)		
R_{work}/R_{free} (%)	11.4 / 13.7		
Number of molecules			
protein	1		
ligand	1		
Number of atoms			
protein	1,429		
ligand	11		
other (not solvent)	20		
solvent	224		
B-Factors (Å²)			
protein	17.3		
ligand	17.4		
other (not solvent)	27.4		
solvent	23.9		
rmsd bond length (Å)	0.024		
rmsd bond angle (°)	2.52		
Ramachandran			
Core (%)	97.5		
Allowed (%)	1.9		
Disallowed (%)	0.6		
Molecules in ASU	1		
Solvent Content	60.1		
Crystallization			
Solution	200 mM Sodium citrate, 100 mM TRIS-HCl, pH 8.5, 30% PEG 400 (Hampton CS#13)		
Drop Size	4		
Ratio (prot:ppt)	Variable		
Cryo	none		

結晶構造中では Isatin 由来の電子雲ははっきりと観察された。

特筆すべきは、Cys106 と Isatin 間の相互作用である。C-S 間の距離(1.9 Å)が共有結合半径(C,S それぞれ 0.77 Å, 1.02 Å)の和に近いこと、結合した Isatin の平面性が崩れていることなどから、Cys106 と Isatin 間の結合は共有結合であると考えられる。

その他に特徴的な相互作用として、Glu18 残基との間に形成された非常に短い水素結合がある。これは通常 2.8~3.0 Å である水素結合と異なり、2.5 Å と明らかに短かった。この水素結合間の距離は低障壁水素結合と呼ばれるものに近く、安定化に大きく寄与していると考えられる。このことから、Isatin と DJ-1 間の強い相互作用に Glu18 が大きな寄与をしていると推測される。

実際、共有結合エネルギーの面から考えると、C=O 結合の ΔH が 178 kcal/mol, C-O 結合が 85.5 kcal/mol, C-S 結合が 65 kcal/mol であることから、今回の共有結合の形成は $(178-85.5-65)$ kcal/mol、つまり 27.5 kcal/mol 分だけ吸熱的であるはずだが、ITC の結果からは今回はむしろ強い発熱が見られた。Glu18-Isatin 間の水素結合が仮に低障壁水素結合であれば約 20 kcal/mol の発熱の上乗せが予想され、それ以外の π - π 相互作用などの関与も含めれば、これらの発熱の大部分は説明が可能となる。逆にこの短い水素結合が結合に寄与していないとすれば、今回の ITC の大きな発熱は予想しがたいものとなる。このことから、今回の結合には、Glu18 という DJ-1 ホモログ内で保存された残基が、大きな寄与を果たしていると考えられる。

その他の相互作用として His126 との間に形成された π π 相互作用も大きな寄与を果たしていると考えられる。His126 のイミダゾール環は Isatin の環構造からわずかに中心をずらしつつ平行に並んでおり、強力な π π 相互作用が形成されていると思われる。

なお、MOE 上では Asn76 との水素結合も検出されているが、Isatin の -NH は Isatin の環構造と同平面にあるにもかかわらず、Asn76 は Isatin の環構造が形成する平面からわず

かにずれて位置していることから、強い水素結合ではないと考えられる。

以上 Isatin は、DJ-1 の中でも保存性の高い 3 残基(Cys106, Glu18, His126)全てを最大限に活用して、DJ-1 に結合している。

2-3-3-3 分光光度計による Isatin 平面構造の崩れの測定

前節の結果から、結晶構造中では DJ-1 が Cys106 と共有結合していることが明らかとなった。しかし、結晶構造中では DJ-1 の濃度が非常に高く、溶液中とは異なる環境であると考えられ、DJ-1 と Isatin 間の共有結合が溶液中で生じているかどうかは検証の余地が残っている。

Isatin が DJ-1 と共有結合を形成した際、Isatin の平面構造が崩れ、吸光ピークが変化すると予想された。このことを利用し、溶液中での DJ-1 と Isatin 間の共有結合の形成を検出した。

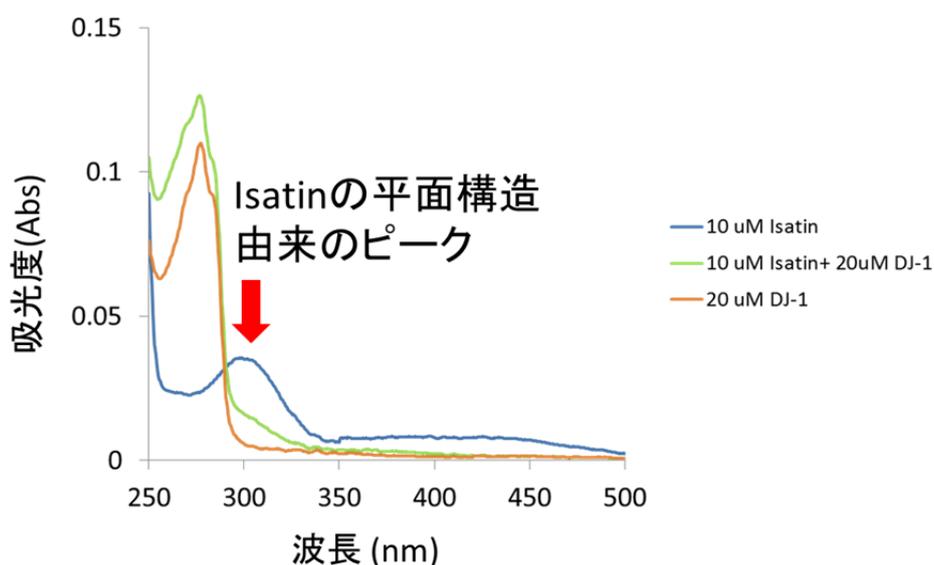


Figure 2-08 吸光度測定による Isatin 平面構造の崩壊の追跡結果。

横軸は波長、縦軸が各波長の吸光度を示す。

青色が Isatin のみ、緑色が Isatin と DJ-1 の混合溶液、橙色が DJ-1 のみの結果である。

Isatin の吸光度曲線で観察されたピークが、DJ-1 と混合されることにより
消失していることが判る。

結果は図のようになった。DJ-1 が Isatin にもともと存在していた 300 nm 近辺のピークが、DJ-1 と混合されることにより低下していることが判る。仮に結合後の Isatin の平面構造の崩壊が-NH 部分にまで及び、Aniline に類似した紫外吸収を示すと仮定すると、Isatin の 300 nm の吸光度は約 1/3 倍にまで低下すると予想される。ゆえにこの結果は溶液中でも Isatin が平面構造を失っていること、つまり DJ-1 と共有結合していることを示していると考えられる。

2-3-3-4 SPR による相互作用解析

結晶構造解析、吸光度測定から、Isatin と DJ-1 が共有結合していることが明らかとなった。共有結合は通常の条件では可逆でないことがある。そこで SPR を用いることにより、可逆性を検証した。

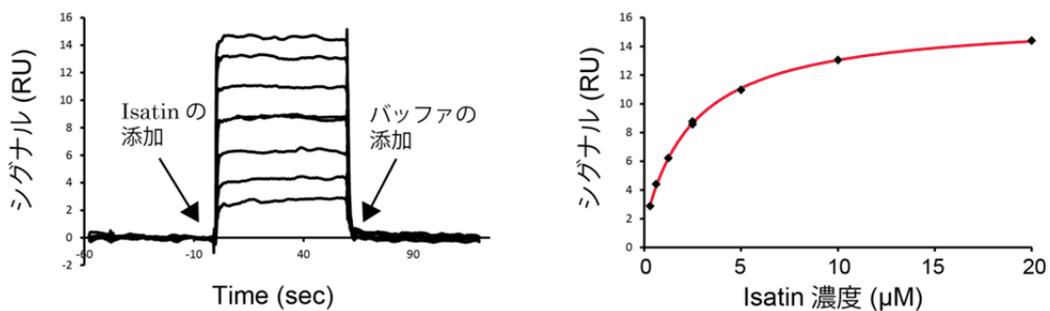


Figure 2-09 SPR による解析結果。左が得られたデータ。

右が濃度ごとのシグナルの高さををプロットしたもの。

左の図の矢印は、それぞれ Isatin、バッファを添加したタイミングを示しており、

Isatin の添加によりシグナルが上昇し、
バッファの添加によりシグナルが低下していることがわかる

結果は図のようになっている。これを見ればわかるように、固定した DJ-1 上に Isatin を流すとシグナルが上昇し、さらにそこにバッファを流すとシグナルが低下している。シグナルの上昇はチップ上の質量の増加を、シグナルの低下は質量の現象を意味することから、Isatin はバッファを流すことによりチップ上の DJ-1 からすぐに離れている。

つまり共有結合は可逆的であり、解離速度は非常に速いと考えられる。

また、濃度ごとのシグナルの高さをプロットし、平衡値解析を行うと、SPR で測定された Isatin と DJ-1 間の親和性は $K_D=2.5 \mu\text{M}$ となり、これは ITC から算出された親和性と一致した。このことから、SPR の固定系で測定された現象は ITC の溶液系で測定された現象とほぼ同一であると予想される。

2-4 第 2 章の総括

本章では SPR を用いたフラグメントスクリーニングによって、DJ-1 結合化合物を取得した。スクリーニングにより選択された化合物は Isatin と呼ばれる古くから知られた生体内小分子であり、この小分子 Isatin は、文献調査などからパーキンソン病と関連が深いことが既に報告されている[55][56][57][58]。特にパーキンソン病治療薬セレギリンの標的分子 MAO-B は、Isatin によって阻害されることが知られており、DJ-1 が Isatin と結合するという本章の結果は興味深い。

二次スクリーニングとして、ITC、結晶構造解析、SPR により Isatin と DJ-1 の結合を検証した。ITC の結果から、DJ-1 と Isatin 間の親和性は $K_D=2.5 \mu\text{M}$ となり、この値は分子量の小さなフラグメント化合物の示す親和性としては非常に強いものであった。反応は発熱的なものだった。

結晶構造解析から、Isatin と DJ-1 の相互作用形式が明らかになった。Isatin は DJ-1 の

Cys106 と共有結合を形成し、そのほか DJ-1 のアミノ酸配列の中でも特に保存性が高い Glu18、His126 等と特異的な非共有結合を形成していた。これは DJ-1 が進化的にも Isatin との相互作用とともに進化している可能性を示唆している[22][25]。

また、吸光度解析、SPR による解析から、DJ-1 と Isatin 間の共有結合は溶液中でも形成され、しかも共有結合であるにもかかわらず可逆的であることが示された。

本章の研究から、DJ-1 の Cys106 へ結合する小分子 Isatin が同定されたため、次章では、Isatin により阻害される DJ-1 の機能を探索していく。

第 3 章

DJ-1 の機能の検証

3-0 概要

第2章で Isatin が DJ-1 の Cys106 周辺ポケットと結合することが明らかになった。次は結合が確認された Isatin が、DJ-1 のこれまでに報告された機能を阻害するか否かを検証する必要がある。

DJ-1 は過去の知見によりプロテアーゼ、グリオキシラーゼ、転写因子、金属との結合など様々な機能に関与することが報告されてきた。本研究で同定した化合物が *in vitro* で DJ-1 の機能を阻害することを確認するためには、それらの機能の中から再現性良く試験可能な機能を選択しなければならない

本章では過去報告された DJ-1 の機能の中、代表的な3種の機能(プロテアーゼ、金属結合活性、グリオキシラーゼ)について検証を行い、引き続き最も再現よく検証されたグリオキシラーゼ活性に関して、Isatin による阻害の確認を行った。

3-0-1 プロテアーゼ

I のプロテアーゼ活性は、DJ-1 の構造がプロテアーゼファミリーに属することから提案された機能であり、DJ-1 の研究の初期から提案され、過去幾度も検証された機能である。ただし検証結果は論文によって異なり、現在も DJ-1 がプロテアーゼ活性を持つか否かについては結論が出ていない[33][37][38]。

特に議論が分かれている論点は、DJ-1 の構造が実際にプロテアーゼファミリーに属するか否かである。DJ-1 の活性部位と考えられているのは Glu18, Cys106, His126 の3残基であり、これはシステインプロテアーゼの典型的な触媒活性残基であるとされる。しかし DJ-1 の場合、この中の His126 の配向がシステインプロテアーゼとは異なる配向をなしており、活性が疑問視されてきた[33]。

本章ではこれらの論点(プロテアーゼ活性の有無・プロテアーゼ様構造の有無)に関して検

証した。検証のために用いたのは、DJ-1 全長及びその C 末端欠損体である。後者の C 末端欠損体は、既報[31]により全長よりもプロテアーゼ活性が高いと報告された蛋白質である。過去の報告では、プロテアーゼ活性が向上した理由として、His126 残基を固定していた Pro184 残基を除くことにより、His126 の配向が変化し、結果活性が向上したと結論している。本章では、DJ-1 全長と欠損体の立体構造の比較、活性の比較などにより、DJ-1 のプロテアーゼ活性・さらに C 末端の機能に関して検証した。

3-0-2 金属結合活性

II の金属結合活性は、DJ-1 がパーキンソン病に関連することから提案された機能である。

パーキンソン病患者の脳内では遷移金属濃度が変化することが知られている。遷移金属は過剰に存在するとき細胞に毒性を示すことが知られており、特に銅などは様々な神経変性疾患と関連があると提案されている。

過去の報告では、この銅の金属毒性が、DJ-1 によって軽減されると提案されてきた[41][42][43]。提案されている機構は、以下のようなものである。パーキンソン病患者中では銅濃度が上昇することで酸化ストレスが誘発されている。DJ-1 はおおもとの銅と結合することで酸化ストレスを防ぐという機構である。銅毒性の軽減に関与するとされるのは Cys106 残基であり、これは結晶構造中でも確かめられている。Cys106 が DJ-1 の機能に重要であることは多くの報告で一致している点であり、この点からも金属結合活性が DJ-1 の細胞保護機能の中核をなすという仮説は魅力的であると考えられる。

本章では DJ-1 の各種遷移金属への金属結合活性および共結晶構造の解析結果に関して報告する。

3-0-3 グリオキシラーゼ

これは DJ-1 に関して提案されている各種機能の中でも比較的新しい機能である。この機能は DJ-1 の類縁蛋白質である HSP31 がグリオキシラーゼ活性を有することから提案され

た機能であり、現在もその機能の重要性に関して研究が進められている[44][45][46]。

この機能の注目すべき点は、本研究の 2 章で同定された DJ-1 のリガンド、Isatin がグリオキシラーゼ活性の基質と類似した構造を持つ点である。グリオキシラーゼ活性に関しては中間体の結晶構造が既に解析されており、その構造は Isatin と DJ-1 の共結晶に類似した点はいくつかある。C.elegans 内での活性の重要性なども検証されており、非常に信頼性の高い仮説であると考えられる。

本章では報告されている活性が再現するか否か、およびその反応速度定数を算出した。

3-1 プロテアーゼ活性

3-1-0 概要

DJ-1 はプロテアーゼ活性を有しており、さらに C 末端を欠損させることで触媒残基の一つ His126 の配向が変化し活性が向上すると提案されていた。これらの知見に基づき、本節では DJ-1 の全長及び C 末端欠損体のプロテアーゼ活性の検証結果と、それに付随した DJ-1C 末端の機能解析の結果に関して述べる。

両蛋白質を大腸菌により発現・精製したのち、それらに関してプロテアーゼ活性を検証した。検証の結果、両蛋白質共に強いプロテアーゼ活性は確認されなかったため、示差走査型熱量測定法・サイズ排除クロマトグラフィーにより両蛋白質の物性を確認した。結晶構造を解析・さらに得られた構造に基づいて分子動力学シミュレーション (MD シミュレーション)を行ったところ、DJ-1 の C 末端は His126 の配向には大きな影響を与えず、二量体化に影響する可能性が高いことが明らかになった。

3-1-1 蛋白質の調製

3-1-1-0 概要

本節では DJ-1 プロテアーゼ活性の検証に用いた蛋白質の調製法を述べる。

本節で用いた蛋白質は DJ-1 野生型(DJ-1WT)、DJ-1C 末端欠損体(DJ-1ΔC)である。各種蛋白質は主に大腸菌で発現させたのち、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。

最終的な精製度は SDS-PAGE により確認した。

3-1-1-1 実験手順

3-1-1-1-1 DJ-1 発現用ベクター

最初に、各種蛋白質の発現プラスミドの作成について述べる。

プラスミドは、DJ-1WT に関しては第 2 章で記載したものをを用いた。DJ-1ΔC に関しては pCold ベクターを基にして作成した。作成したベクターの概要は以下のとおりである。

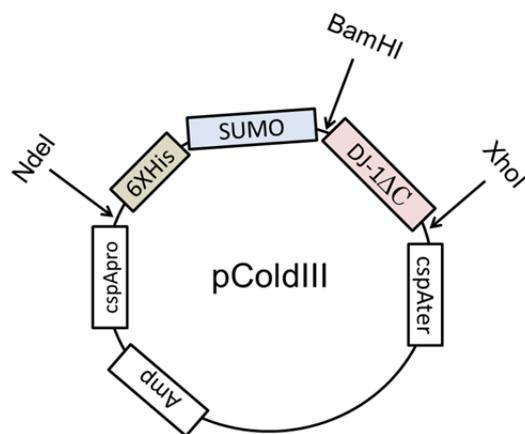


Figure 3-01 DJ-1ΔC のベクター概要

Amp はアンピシリン耐性遺伝子、cspApro はコールドショックプロテインプロモーター、

6 X His はヘキサヒスチジンタグ、

SUMO は SUMO-tag を表す。

DJ-1ΔC の配列

```
MASKRALVILAKGAEEMETVIPVDVMRRAGIKVTVAGLAGKDPVQCSRDDVVICP  
DASLEDAKKEGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESAAVKEILKEQENRKGLIAAICAGPT
```

ALLAHEIGFGSKVTTTHPLAKDKMMNGGHYTYSEN RVEKDGLILTSRGP GTSFEFA
LAIVEALNGK

DJ-1ΔC 発現ベクターを作成する際には、まず変異体導入により pColdIII の T7 プロモーター下流に His-tag および SUMO プロテアーゼ切断配列を導入し、その後 5'末端に HindIII サイト、3'末端に BamHI サイトを付加した DJ-1ΔC 塩基配列(1-175 残基に対応)を PCR によって増幅、制限酵素とリガーゼを用いてベクター内に挿入した。BamHI サイトをアミノ酸配列へと翻訳するとグリシン-セリンとなるが、このグリシンが SUMO プロテアーゼ認識配列の C 末端のグリシン-セリンと重なるようにした。結果、SUMO プロテアーゼによる His-SUMO-Tag 切断後の DJ-1 の N 末端にはセリンのみが余分な残基として付加されることになった。

3-1-1-1-2 各種 DJ-1 の発現

このようにして得られたベクターを用い、DJ-1 を BL21(DE3)内にて強制発現させた。

ヒートショック法により DJ-1 ベクターを大腸菌内に導入、DJ-1WT は第 2 章と同様に、DJ-1ΔC はアンピシリン 50 μg/ml の LB 培地プレート上 37°C 培養によりコロニーを形成させた。

同濃度抗生物質を添加した 3 mL LB 培地にて 37°C しんとう培養を行い、およそ 12 時間後、1 LLB 培地に菌を植え継いだ。

37°C しんとう培養を行い、DJ-1WT は OD₆₀₀=0.5 となった時点で IPTG 0.5 mM で発現を誘導した。その後 20°C 条件下でしんとう培養を行った。DJ-1ΔC は OD₆₀₀=0.5 となった時点であらかじめ 15°C になるよう準備しておいたインキュベータ内に 30 分間静置、続いて IPTG 0.5 mM で発現を誘導した。その後 15°C 条件下でしんとう培養を行った。

約 20 時間後、4°C6000G10 分の遠心分離により菌体を回収した。

回収した菌体を、1L の培地分につき 20 mM Tris-HCl(pH7.4),500 mM NaCl,5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファ 50 ml でけん濁し、超音波により氷中で破碎した。ここで Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーを行う予定であるにもかかわらず DTT を添加しているのは、DJ-1 の Cys106 残基の酸化を防ぐためである。ただし DTT 濃度は 1 mM と低濃度に抑え、Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーへの影響を防いでいる。

破碎した菌体を、4°C40000G30 分の遠心分離により不溶性画分と可溶性画分に分離、可溶性画分のみを回収した。

3-1-1-1-3 DJ-1 蛋白質の初期精製

次に発現した蛋白質を Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

カラムとしては HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare)を用意し、バッファとしては A バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4),500 mM NaCl,5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを、B バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4),500 mM NaCl,500 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを用意した。

AKTA Prime Plus (GE Healthcare)を用いて精製する。流速は 2.5 ml/min である。

まず HisTrap HP 5 ml を蒸留水 25 ml で洗浄後、25 ml の A バッファによって平衡化した。

その後先ほどの遠心分離で得られた可溶性画分をカラムに注入し、フロースルー画分(下図 FT)を 5 ml ずつ回収した。

続いて A バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、洗浄画分(wash)を 5 ml ずつ回収した。

溶出時の A バッファと B バッファの gradient は、A バッファ:B バッファ=100:0 から A バッファ:B バッファ=0:100 へと 50 ml で推移するように設定し、溶出画分を 5 ml ずつ回収した。

最後に B バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、非特異吸着を洗浄 2 画分として(wash2) 5 ml

ずつ回収した。

その後、得られた各画分について、5 μ l 分を 15%SDS-PAGE 上で電気泳動し、発現量および精製度を確認した。

3-1-1-1-4 プロテアーゼ処理による His-Tag の切断除去

上記手法により得られた His-Tag 付き DJ-1 粗精製画分を TEV もしくは SUMO プロテアーゼで処理し、His-Tag およびプロテアーゼ認識配列を除去した。

DJ-1WT に関しては第 2 章と同様に切断した。DJ-1 Δ C に関しては上記精製法により得られた画分中から純度よく蛋白質が得られた画分を回収し、蛋白質質量で DJ-1 の 1/10 量の SUMO プロテアーゼと混合した。

4 $^{\circ}$ C 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl バッファ中で 16 時間透析後、サンプルを回収し、Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーによりプロテアーゼや切断後の His-tag と、目的の DJ-1 蛋白質を分離した。分離の手順は以下のようなものである。

カラムとしては HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare) を用意し、バッファとしては A バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを、B バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを用意した。

AKTA Prime Plus (GE Healthcare) を用いて精製する。流速は 2.5 ml/min である。

まず HisTrap HP 5 ml を蒸留水 25 ml で洗浄後、25 ml の A バッファによって平衡化した。

その後先ほどの TEV プロテアーゼ処理で得られた可溶性画分を 0.22 μ m のフィルタでろ過したものをカラムに注入し、フロースルー画分(下図 FT)を 5 ml ずつ回収した。

続いて A バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、洗浄画分(wash)を 5 ml ずつ回収した。

最後に B バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、非特異吸着を洗浄 2 画分として(wash2) 5 ml

ずつ回収した。

その後、得られた各画分について、5 μ l 分を 15%SDS-PAGE 上で電気泳動し、発現量および精製度を確認した。

純度よく得られた画分を混合し、終濃度 10 mM となるよう DTT を加えたのち、4°C で一晩保存した。

3-1-1-1-5 DJ-1 の最終精製

His-tag 切断除去後に得られた画分のうち、フロースルー画分および洗浄画分を回収し、サイズ排除クロマトグラフィーにより最終精製を行った。

用いたカラムは Hiload16/60 Superdex200pregrade(GEhealthcare)で、4°C 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT バッファ条件下で行った。

クロマトグラムは以下のようになった。

得られた各画分について、50 μ l 分を TCA 濃縮し、15%SDS-PAGE 上で電気泳動して精製度を確認した。

DJ-1WT については純度よく二量体を得られた画分を混合し、終濃度 10 mM となるよう 1 M DTT を添加後、1 ml ずつ 1.5 ml チューブへ分注・-80°C で凍結保存した。DJ-1 Δ C は単量体、二量体に対応すると考えられるピークで分画し、終濃度 10 mM となるよう 1 M DTT を添加後、4°C で保存した。

3-1-1-2 結果

3-1-1-2-1 サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製

DJ-1 Δ CのSECクロマトグラフィー

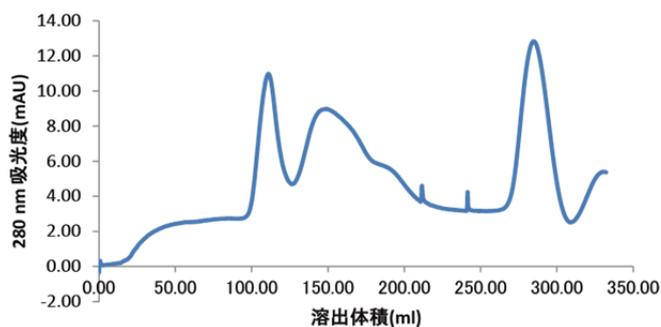


Figure 3-02 DJ-1 Δ C の SEC クロマトグラフィー

DJ-1 Δ C は、DJ-1WT と比べ、圧倒的にボイド画分(溶出物の分子量がカラムの分離能を超えている画分。溶出体積 110 ml 付近)が多い。これは DJ-1 Δ C の大部分が凝集していることを示しており、後述する DJ-1 Δ C の不安定性とも関連していると考えられる。また、ボイド画分を除いても 2 つのピークが観察されるが、これはそれぞれ DJ-1 の二量体(溶出体積 150 ml)、単量体(溶出体積 185 ml)にあたると考えられる。そこで今回の精製ではそれぞれを単離して回収した。

以上の精製手順により、高純度の DJ-1 を取得した。本節では今後ここで得られた蛋白質を用いる。

3-1-2 プロテアーゼ活性の検証

3-1-2-0 概要

本節では DJ-1WT, DJ-1 Δ C のプロテアーゼ活性の検証結果について述べる。

検証手法は蛍光の自己消光に基づく。蛍光剤 BODIPY は pH に依存しない非常に強い蛍

光(励起/発光: 505/513 nm)を有するが、分子同士の接近により自己消光を起こすことが知られている。この BODIPY により複数修飾したカゼインは、通常では蛍光を発さないが、プロテアーゼにより切断されると蛍光を発するようになる。このようにしてプロテアーゼ活性を検出することが可能となる。

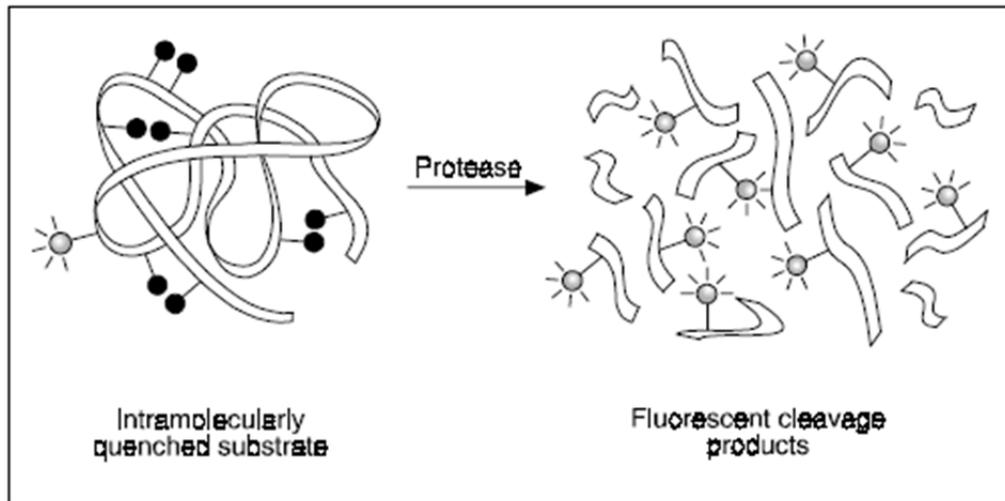


Figure 3-02 EnzChek protease assay kits (Invitrogen)の説明書より抜粋

本節での検証の結果、DJ-1WT, DJ-1 Δ C とともに強いプロテアーゼ活性は有さないことが明らかとなった。過去の知見では DJ-1 Δ C は DJ-1WT と比較して強いプロテアーゼ活性を有すると報告されていたが、本研究ではそちらに関して再現性が得られなかった。

3-1-2-1 実験手順

用いるのは EnzChek protease assay kits (Invitrogen)、装置は EnVision Multilable Reader (PerkinElmer)である。キットのマニュアルに従い、10 mM Tris-HCl, 0.2 mM アジ化ナトリウムバッファ (pH 7.8)内で測定を行った。蛋白質濃度は DJ-1WT, Δ C が 50 μ M, コントロールとして用いた Trypsin は 0.43 μ M である。フィルタは励起/発光: 485/535 nm のフィルタを用いた。活性値は Trypsin の最大活性(18 min の反応)で標準化してある。

なお本結果は、Indiana 大学の Chun-Xiang Wu、Quyên Q. Hoang 博士両名のご協力の

元行われた。

3-1-2-2 結果

既報の通り、DJ-1WT がプロテアーゼ活性を有するのか、また、DJ-1 Δ C が DJ-1WT と比べ高活性であるか否かを検証した。

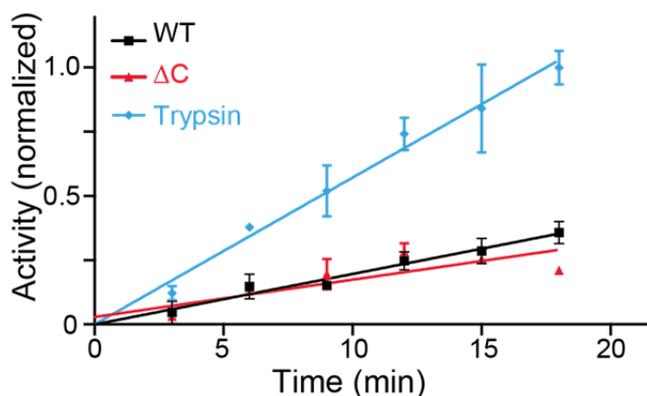


Figure 3-03 DJ-1WT, Δ C のプロテアーゼ活性。

黒線は WT の活性を、赤線は Δ C の活性を示す。すべての活性は Trypsin(水色)の 18 min 時点での活性を 100%として標準化してある。

結果 DJ-1 は、WT, Δ C とともに、同濃度の Trypsin と比較すると約 450 倍ほどプロテアーゼ活性は低かった。これは DJ-1 がプロテアーゼとしては極めて弱いことを示している。

原因としては、今回取得した DJ-1 が変性しているか、もしくは DJ-1 のプロテアーゼ活性は極めて環境に依存しやすく、今回再現性が得られなかったかのどちらかであると思われる。

3-1-3 熱安定性・分子サイズの解析

3-1-3-0 概要

前節の結果から DJ-1 は頑強なプロテアーゼ活性は有さないことが判明した。

プロテアーゼ活性を有さない理由として最も可能性が高いと考えられるのは、DJ-1 の失活である。

そこで DJ-1WT、DJ-1ΔC それぞれの熱安定性、分子状態を DSC、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、Field Flow Fractionation(FFF)によって解析した。

結果 DJ-1WT に比べ DJ-1ΔC は熱安定性が低いこと、さらに DJ-1ΔC は二量体ではなく単量体を形成しやすいことが判明した。

3-1-3-1 実験手法

DSC のために用いた装置は、VP-DSC (GE Healthcare)である。

まず DJ-1WT, DJ-1ΔC を PBS に 4°C16 時間透析した。透析外液によって 30 μM まで希釈したのち、同じく透析外液をリファレンスとして、1°C/分の速度で 25°C から 95°C まで昇温させ、熱安定性を測定した。取得したデータは Origin 7 により解析を行った。

SEC のために用いた装置は、AKTA Explorer (GE Healthcare)である。

DJ-1WT, DJ-1ΔC を PBS に 4°C16 時間透析した。WT は透析外液によって 10 μM まで希釈する。DJ-1ΔC は 10 μM と 50 μM に希釈し、どちらもその後平衡状態に達するよう、4°C で 24 時間静置した。その後 Superdex75 10/300 GL (GE Healthcare)に打ち込み、分析した。

FFF のために用いた装置は Wyatt Eclipse separation system (Wyatt)である。本装置と紫外吸光時計と多角度光散乱検出器(MALS)を組み合わせることにより蛋白質の分子サイズと絶対分子量を決定した。流速は 1 ml/分、Cross Flow は 3 ml/分から 0 ml/分へと段階的に低下させた。解析は ASTRA software package (Wyatt)によって行った。

3-1-3-2 結果

DSC により熱安定性を解析したところ、以下のようになった。

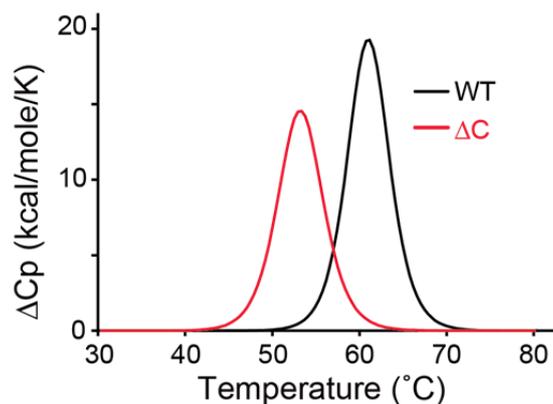


Figure 3-04 DJ-1WT, ΔC の DSC の結果。

温度上昇に伴う熱容量の変化を追跡しており、
ピーク頂点の温度が変性中点温度に対応する。

黒が DJ-1WT、赤が ΔC を示す。

変性中点温度は DJ-1WT, ΔC それぞれ 61.0 °C, 53.5 °C であり、WT に比べ ΔC の方が低い。これは ΔC が不安定化していることを示しており、精製時に凝集体が増加したと合致する。ピークがどちらも一つであることから、変性は二状態間の変性で近似可能であると考えられる。

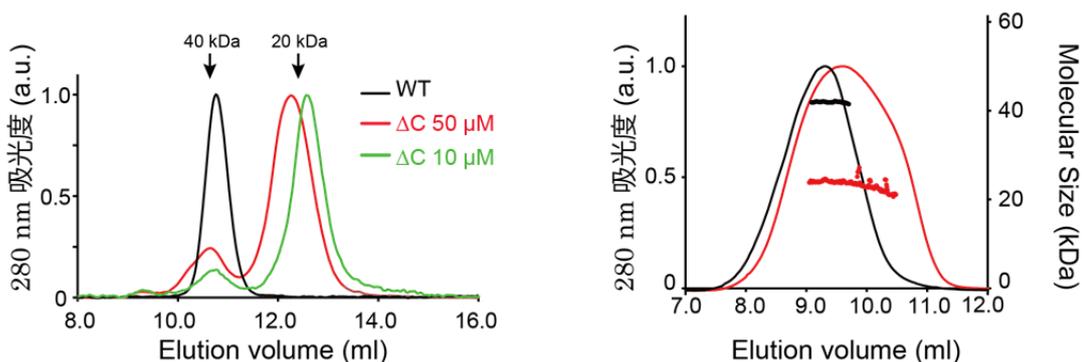


Figure 3-05 DJ-1WT, ΔC の SEC(左),FFF-MALS(右)の結果。

SEC の結果内の矢印はキャリブレーションの位置を示す。

続いて SEC であるが、DJ-1ΔC は WT と比べ溶出位置が遅い。この位置はキャリブレーション

シヨンの結果から単量体の位置で、しかも濃度依存性があることなどから、二量体と単量体間で濃度依存的な平衡関係にあると考えられる。

FFF-MALS の結果もそれを支持している。Figure 3-05 右図が FFF-MALS の結果である。線は FFF による分離の結果を、点がそれぞれのピークに対応した MALS の結果を表す。黒色が WT, 赤色が ΔC に対応している。

WT, ΔC どちらも FFF のピークは一つであり、これは WT, ΔC ともにほぼ単一の分子状態で構成されることを示す。対応する MALS では DJ-1WT は二量体であるが、主に ΔC は単量体となっている。FFF 中では大幅に希釈されるため、濃度依存的な ΔC 二量体は存在することができず、単量体として存在すると考えられる。

3-1-4 結晶構造解析・分子動力学シミュレーション

3-1-4-0 概要

プロテアーゼ活性の検証、物性解析などから、DJ-1 の C 末端はプロテアーゼ活性よりも DJ-1 の二量体化に影響を与えていることが示唆された。本節では C 末端の欠損が DJ-1 に与える影響をより詳細に解析するため、DJ-1 ΔC の結晶構造を解析し、得られた構造を基に分子動力的シミュレーションを行った。

結果 DJ-1 ΔC は DJ-1WT に比べ結合界面が小さく、二量体化に重要ないくつかの相互作用を失っていることが判明した。中でも Pro184 残基と His126 残基は二量体化に重要な残基であると考えられた。一方分子動力的シミュレーションによると、His126 は Pro184 との相互作用を失った後も他の残基によって配向が固定されており、プロテアーゼの触媒残基なるには配向が適切でないと考えられた。

3-1-4-1 実験手順

3-1-4-1-0 概要

結晶構造解析は、DJ-1 ΔC の結晶を取得したのち、それに X 線を照射して得られた回折

像を解析、立体構造を得た。

分子動力学シミュレーションは DJ-1WT 二量体、単量体、DJ-1ΔC 二量体、単量体のそれぞれについて 500 ns ずつ行った。

3-1-4-1-1 結晶構造解析

まず DJ-1 の結晶を調製した。

DJ-1ΔC を 1 mM DTT、20 mM Tris-HCl (pH 8.0, 4°C) で 4°C 16 時間透析し、バッファを交換した。DJ-1ΔC を 5 mg/ml に遠心濃縮し、濃縮した DJ-1ΔC と結晶化用バッファを 2 μl:2 μl の割合で混合、ハンギングドロップ法で 25°C で結晶化した。結晶化用バッファには 200 mM クエン酸ナトリウム、100 mM リン酸-クエン酸バッファ (pH 4.2)、39% PEG300 を用いた。

得られた結晶にフォトンファクトリー(筑波)の BL5A ビームラインで X 線を照射した。取得したデータからの立体構造の描像は CCP4 および COOT を用いて行った。

3-1-4-1-2 分子動力学シミュレーション

分子動力学シミュレーションの初期状態として、DJ-1ΔC に関しては上で得た構造を、DJ-1WT は過去に報告されていた PDB File(PDB Code: 1SOA)を用いた。それぞれの構造から二量体、単量体を取り出し、Cys106 は還元された状態に関して計算した。蛋白質の力場としては ff99SB を、水分子の力場としては TIP3P を用いた。

3-1-4-2 結果と考察

C 末端が二量体化やプロテアーゼ活性に与える影響を詳細に解析するため、DJ-1ΔC の結晶構造を解析した。

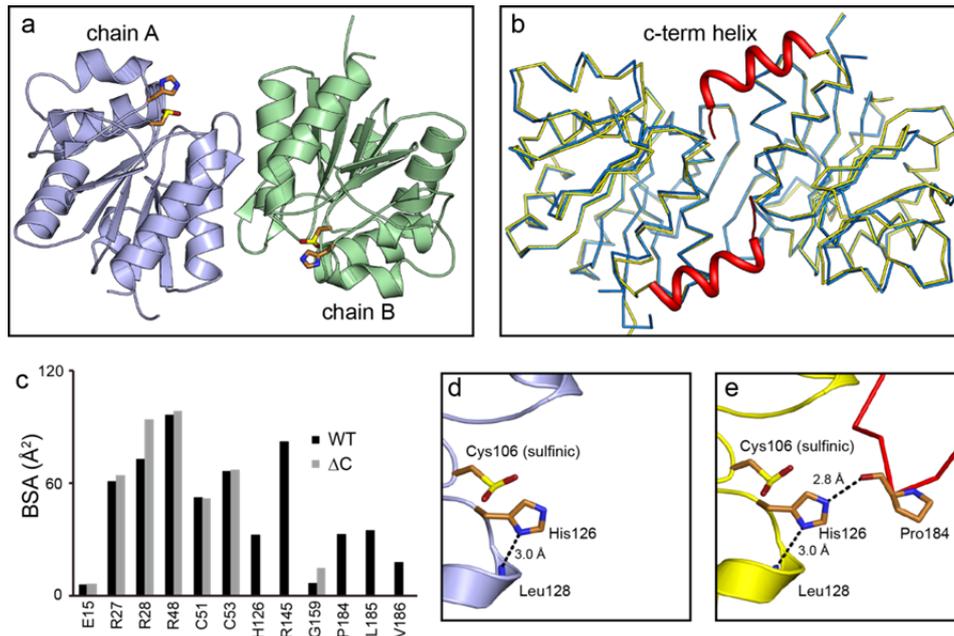


Figure 3-06, 結晶構造解析の結果(a)DJ-1ΔC の構造, (b)DJ-1WT(黄色,

C 末端のみ赤く表示),ΔC(青色の線)を重ね合わせたもの。(c)BSA に対する各残基の貢献

(d)DJ-1ΔC の His126 周辺環境(e)DJ-1WT の His126 周辺環境

まず注目すべきは、結晶構造中では DJ-1ΔC の二量体化が起きていることだろう。これは SEC で濃度依存的に DJ-1ΔC が二量体化していたと考え合わせると、DJ-1ΔC は結晶内という高濃度蛋白質環境下では二量体化したと考えられる。

この結晶構造に基づき、二量体のプロトマー間の相互作用界面を PISA server で解析した。また並行して DJ-1WT(PDB ID: 1SOA)の二量体プロトマー間の相互作用界面も同じく PISA server で解析し、DJ-1ΔC と比較した。

結果、ΔC では WT 中で二量体に重要であった相互作用のいくつかが失われ、さらに界面の埋没表面積(BSA)も大きく変化していることが明らかとなった。

具体的に失われた水素結合は、His126-Pro184、GLy159-Leu185、Arg145-Val186 である。それぞれのペアの右側の残基番号を見ればわかるように、失われた水素結合は C 末端側が関与するものだった。

DJ-1WT, ΔC それぞれの BSA は $1341 \text{ \AA}^2, 920 \text{ \AA}^2$ であり、25%以上の BSA が失われたことになる。このように結晶構造から DJ-1 ΔC は二量体に重要な相互作用の多くを失っていることが明らかとなった。

次に His126 に関してであるが、これは DJ-1 ΔC 中でも WT とほぼ同じ配向だった。この結果はプロテアーゼ活性が非常に弱いことと合致している。His126 の配向が変化しなかった理由としては、His126 が Pro184 だけでなく Leu128 とも水素結合を組んでいることなどが考えられる。

分子動力学シミュレーションも His126 の配向が大きくは変化しないことを支持した。

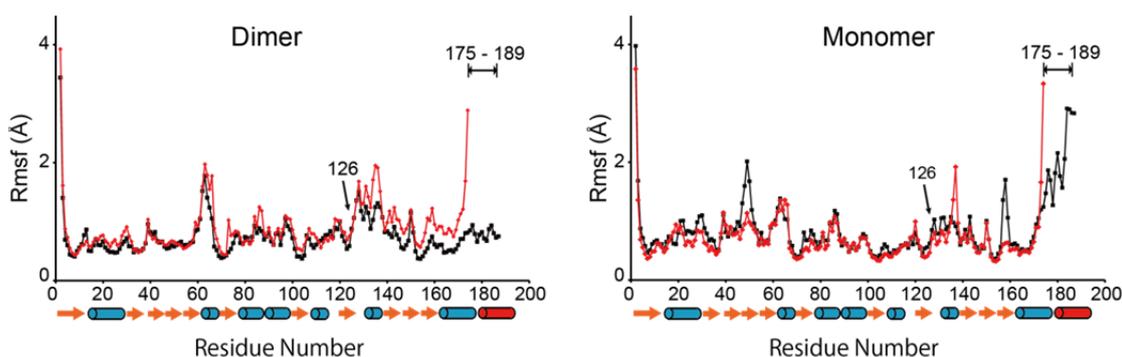


Figure 3-07 DJ-1WT, ΔC の Rmsf をプロットしたもの。赤線は ΔC を、黒線は WT を表す。残基番号の下の記号は、矢印がシート構造を、チューブがヘリックス構造を、赤いチューブは C 末端領域を示している。

上に示すのは DJ-1WT, ΔC それぞれの単量体、二量体に関して分子シミュレーションを行い、各残基の Rmsf をプロットしたものである。

His126 は DJ-1WT, ΔC どちらにおいても大きく動いていないことが判る。それに比べて DJ-1 ΔC 内で大きく動いているのは C 末端側で、これは相互作用を失ったことで C 末端が固定されなくなったためであると考えられる。

以上より、少なくとも我々の系では DJ-1 の C 末端はプロテアーゼ活性ではなく二量体化

に強く影響を与えていることが明らかとなった。

3-2 金属結合

3-2-0 概要

パーキンソン病患者の脳内の金属濃度の変化という現象に基づいて、DJ-1には金属が結合するという仮説が提案された。そして実際にDJ-1は銅と結合することが近年報告されている。

本研究ではこの実験事実を検証し、さらにその過程でその他の金属とDJ-1との結合に関しても確認を行った。

今回DJ-1への結合を検証した金属はMn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II)の6種類である。これら金属は小分子化合物と比較すると分子量が小さく、SPRによる質量の変化は検出が難しい。そこで本節ではSPRとは異なる原理で蛋白質との結合の検出を目指した。

検証の結果、DJ-1は銅よりも亜鉛に強く結合することがDifferential scanning fluorimetry (DSF)、ITCにより示され、その結合箇所はDJ-1の機能部位であるCys106であることが共結晶構造解析から判明した。パーキンソン病患者の脳内では銅だけではなく亜鉛濃度も変化することが知られており、この結合も銅同様DJ-1の機能に何らかの意味を持つと考えられる。

3-2-1 蛋白質の調製

3-2-1-0 概要

本節ではスクリーニング実験中に用いた蛋白質の調製法を述べる。

本節で用いた蛋白質はHis-tag付加DJ-1野生型(HisDJ-1WT)、DJ-1野生型(DJ-1WT)、DJ-1各種変異体(DJ-1E18Q, C106S等)である。各種蛋白質は主に大腸菌で発現させたのち、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。

最終的な精製度は SDS-PAGE により確認した。

-

3-2-1-1 実験手順

3-2-1-1-1 DJ-1 発現用ベクター

最初に、各種蛋白質の発現プラスミドの作成について述べる。

プラスミドは pET28vector を基にして作成した。作成したベクターの配列は以下の赤字で示した部位を改変して作成された。

DJ-1 のアミノ酸配列

MASKRALVILAKGAEEM **E**TVIPVDVMRRAGIKVTVAGLAGKDPVQCSRDVVICP
DASLEDAKKEGPDVVVLPGGNLGAQNLSESAAVKEILKEQENRKGLIAAICAGPT
ALLAHEIGFGSKVTT **H**PLAKDKMMNGGHYTYSEN RVEKDGLILTSRGPPTSFEFA
LAIVEALNGKEVAAQVKAPLVVKD

3-2-1-1-2 各種 DJ-1 の発現

このようにして得られたベクターを用い、DJ-1 を BL21(DE3)内にて強制発現させた。

ヒートショック法により DJ-1 ベクターを大腸菌内に導入、カナマイシン 50 µg/ml の LB 培地プレート上 37°C 培養を行いコロニーを形成させた。

同濃度抗生物質を添加した 3 mL LB 培地にて 37°C しんとう培養を行い、およそ 12 時間後、1 LLB 培地に菌を植え継いだ。

37°C しんとう培養を行い、OD₆₀₀=0.5 となった時点で IPTG 0.5 mM で発現を誘導、その後 20°C 条件下でしんとう培養を行った。

約 20 時間後、4°C 6000G 10 分の遠心分離により菌体を回収した。

回収した菌体を、1L の培地分につき 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファ 50 ml でけん濁し、超音波により氷中で破碎した。ここで

Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーを行う予定であるにもかかわらず DTT を添加しているのは、DJ-1 の Cys106 残基の酸化を防ぐためである。ただし DTT 濃度は 1 mM と低濃度に抑え、Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーへの影響を防いでいる。

破砕した菌体を、4°C40000G30 分の遠心分離により不溶性画分と可溶性画分に分離、可溶性画分のみを回収した。

3-2-1-1-3 DJ-1 蛋白質の初期精製

次に発現した蛋白質を Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

カラムとしては HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare)を用意し、バッファとしては A バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4),500 mM NaCl,5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを、B バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4),500 mM NaCl,500 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを用意した。

AKTA Prime Plus (GE Healthcare)を用いて精製する。流速は 2.5 ml/min である。

まず HisTrap HP 5 ml を蒸留水 25 ml で洗浄後、25 ml の A バッファによって平衡化した。

その後先ほどの遠心分離で得られた可溶性画分をカラムに注入し、フロースルー画分(下図 FT)を 5 ml ずつ回収した。

続いて A バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、洗浄画分(wash)を 5 ml ずつ回収した。

溶出時の A バッファと B バッファの gradient は、A バッファ:B バッファ=100:0 から A バッファ:B バッファ=0:100 へと 50 ml で推移するように設定し、溶出画分を 5 ml ずつ回収した。

最後に B バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、非特異吸着を洗浄 2 画分として(wash2) 5 ml ずつ回収した。

その後、得られた各画分について、5µl 分を 15%SDS-PAGE 上で電気泳動し、発現量お

よび精製度を確認した。

3-2-1-1-4 TEV プロテアーゼ処理による His-Tag の切断除去

上記手法により得られた His-Tag 付き DJ-1 粗精製画分を TEV プロテアーゼ処理し、His-Tag を除去した。ただし HisDJ-1 WT には本節の処理は行っていない。

まず上記精製法により得られた画分中から純度よく DJ-1 が得られた画分を回収し、TEV プロテアーゼ 200 µg と混合した。

4°C 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl バッファ中で 16 時間透析後、サンプルを回収し、Ni カラムアフィニティークロマトグラフィーにより TEV-protease や切断後の His-tag と、目的の DJ-1 蛋白質を分離した。分離の手順は以下のようなものである。

カラムとしては HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare) を用意し、バッファとしては A バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを、B バッファに 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 1 mM DTT バッファを用意した。

AKTA Prime Plus (GE Healthcare) を用いて精製する。流速は 2.5 ml/min である。

まず HisTrap HP 5 ml を蒸留水 25 ml で洗浄後、25 ml の A バッファによって平衡化した。

その後先ほどの TEV プロテアーゼ処理で得られた可溶性画分を 0.22 µm のフィルタでろ過したものをカラムに注入し、フロースルー画分(下図 FT)を 5 ml ずつ回収した。

続いて A バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、洗浄画分(wash)を 5 ml ずつ回収した。

最後に B バッファ 25 ml でカラムを洗浄し、非特異吸着を洗浄 2 画分として(wash2) 5 ml ずつ回収した。

その後、得られた各画分について、5µl 分を 15%SDS-PAGE 上で電気泳動し、発現量および精製度を確認した。

純度よく得られた画分を混合し、終濃度 10 mM となるよう DTT を加えたのち、4°C で一晩保存した。

3-2-1-1-5 DJ-1 の最終精製

His-tag 切断除去後に得られた画分のうち、フロースルー画分および洗浄画分を回収し、サイズ排除クロマトグラフィーにより最終精製を行った。

用いたカラムは Hiload16/60 Superdex200prepgrade(GEhealthcare)で、4°C 20 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT バッファ条件下で行った。

得られた各画分について、50 µl 分を TCA 濃縮し、15%SDS-PAGE 上で電気泳動して精製を確認した。

純度よく二量体が得られた画分を混合し、終濃度 10 mM となるよう 1 M DTT を添加後、1 ml ずつ 1.5 ml チューブへ分注し、-80°C で凍結保存した。

3-2-1-2 結果

3-2-1-2-1 サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製

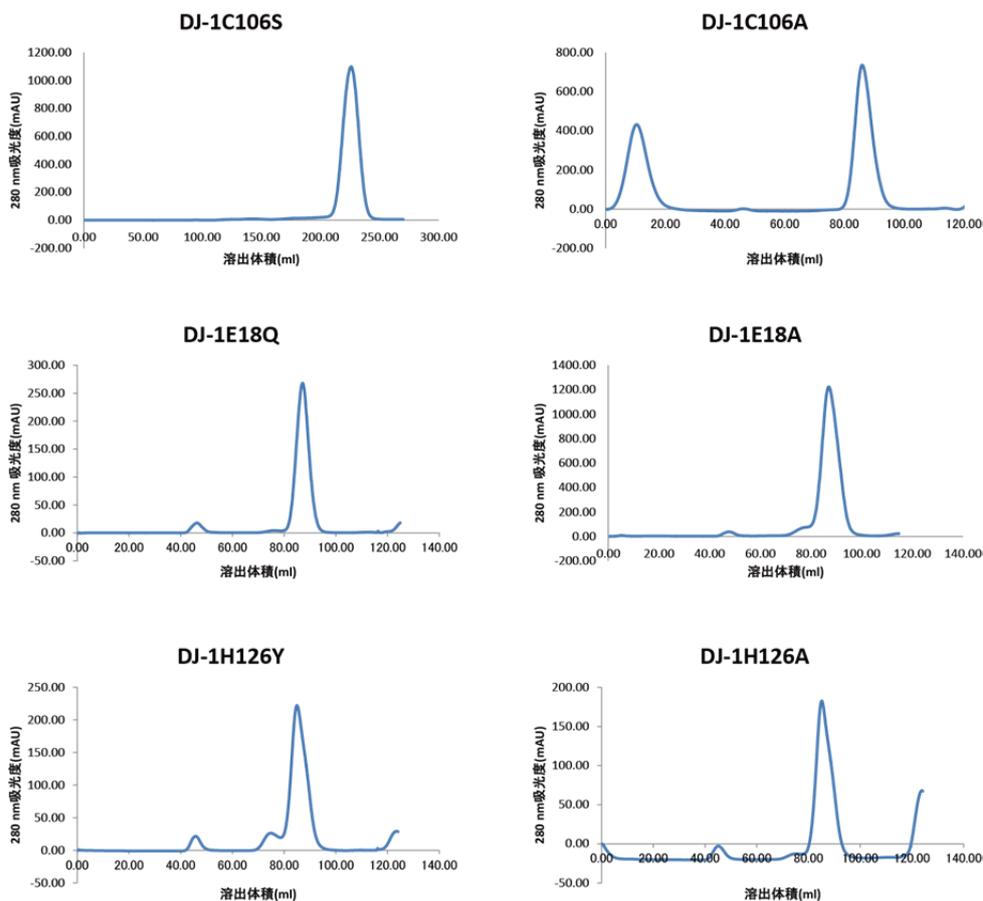


Figure3-08 各種 DJ-1 変異体の SEC のクロマトグラフィー

いずれの蛋白質も、サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製では、二量体の位置に大きなピークが見られた。DJ-1C106A のみもう一つピークが観察されるが、これはボイド画分以前のピークであるため、もともとカラムに付着していたものと考えられる。

以上の精製手順により、高純度の DJ-1 を 1 L の培養培地あたり 100 mg 以上取得した。本章では今後ここで得られた蛋白質を用いる。

3-2-2 DSF による DJ-1 結合金属のスクリーニング

3-2-2-0 概要

小分子が結合すると一般に蛋白質は安定化する。本研究ではこのことを応用して、金属の結合に伴う DJ-1 の変性中点のシフトを、DSF により検出した。

今回の DSF の結果、DJ-1 は Zn(II)によってわずかに安定化されることが判明した。一方 Cu(II)によって DJ-1 は大きく不安定化された。他の金属(Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II))に関しては殆ど変化しておらず、相互作用はしないと考えられた。

3-2-2-1 Differential Scanning Fluorimetry の測定原理

示差走査型蛍光測定(DSF)は、疎水性領域に結合すると蛍光を発するプローブを用いて蛋白質の変性中点を検出する手法である。その測定原理を図によって示す。

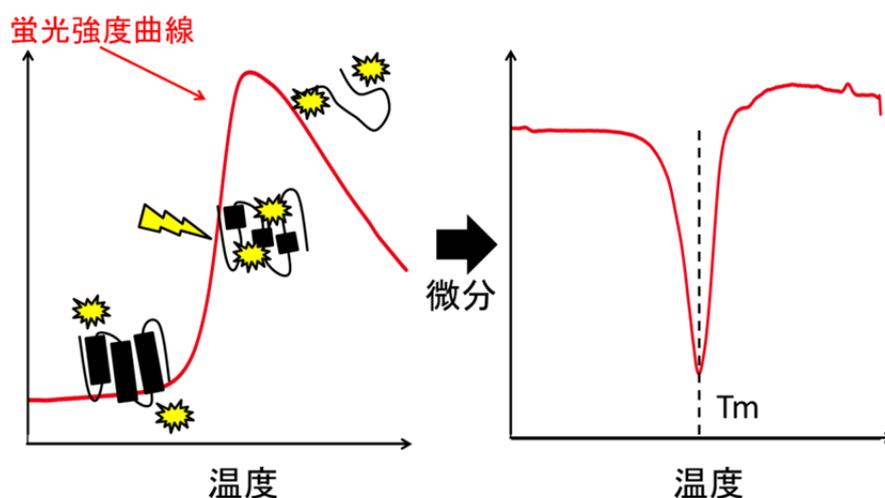


Figure 3-09 DSF の測定原理

蛋白質は常温では多くの場合疎水領域は露出しておらず、一定の構造を持っている。しかし温度を上げていくとやがて変性し、構造が崩れ、疎水性領域が露出する。露出した疎水性領域にプローブが結合することで蛍光が生じ、変性の様子を追跡することができる。

蛍光度の変化が最も大きな位置が変性中点となる。これは微分によって求められる。

通常小分子が蛋白質に結合した場合、蛋白質は安定化され、 T_m が正の方向へシフトする。この T_m の変化を追跡することで蛋白質と小分子が結合しているか否かを検出することが可能となる。

3-2-2-2 実験手順

装置は CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)を用い、蛍光プローブは SYPRO Orange(Invitrogen)を用いた。フィルタは励起/発光: 470/570 nm のフィルタを用いた。

まず DJ-1 を 20 mM Tris-HCl (pH 7.4, 25°C), 150 mM NaCl バッファに 4°C で 6 時間透析した。そして透析外液をランニングバッファとして、10 μ M の金属存在下での 10 μ M の DJ-1 変性を追跡した。金属は $MnCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$ の 6 種類である。温度変化は 30°C から 95°C まで 0.2°C/分の割合で昇温した。

3-2-2-3 結果

DSF により DJ-1 に結合する金属のスクリーニングを行ったところ、以下のような結果を得た。

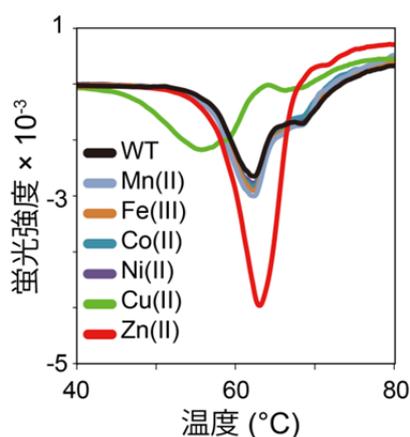


Figure3-10 DJ-1 と金属を混合した容積の DSF の結果

ピークの頂点の温度が変性中点温度に対応する。

Zn(II), Cu(II), Ni(II), Co(II), Fe(III), Mn(II)の6種の遷移金属の中で、DJ-1を安定化したのはZn(II)だった($\Delta T_m=0.6\text{ }^\circ\text{C}$)。DJ-1との結合が報告されていたCu(II)については大幅に不安定化していた($\Delta T_m=-6.6\text{ }^\circ\text{C}$)。

また、今回の結果の特徴として、 T_m のみならず蛍光強度の大きさ自体も変化していることがあげられる。本現象はZn(II), Cu(II)特有であり再現性も得られたため、これら二種の金属特異的にDJ-1は何らかの相互作用を受けていると考えられた。

以上の結果から、DJ-1はZn(II)と結合する可能性が示唆された。

3-2-3 ITCによるDJ-1結合金属の親和性の算出

3-2-3-0 概要

DSFによりDJ-1に結合する金属をスクリーニングしたところ、亜鉛が6種の金属の中で唯一DJ-1を安定化していた。しかしDSFではその親和性は算出することができない。

そこでITCにより亜鉛及びその他金属のDJ-1への結合親和性を評価した。

結果亜鉛はDJ-1に対して $K_D=0.5\text{ }\mu\text{M}$ の親和性で結合することが判明した。生体内の亜鉛濃度は局所的にこの値付近まで上昇することが知られており、DJ-1は亜鉛によって制御されている可能性がある。

3-2-3-1 実験手順

用いた装置はMicroCal Auto-iTC 200 (GE Healthcare)で、 25°C 条件下での結合に関して熱力学パラメータを算出した。

DJ-1WTを 4°C で6時間20 mM Tris-HCl (pH 7.4, 25°C), 150 mM NaClに透析し、バッファを置換する。DJ-1WTは回収したのち0.05 mMとなるよう、ろ過した透析外液で希釈した。回収した透析外液中に金属を溶解させ、0.5 mMとした。なお金属を平衡化するために、金属の溶解後希釈し、6時間 4°C で保存したのちに測定を行った。準備したDJ-1WT、

金属をそれぞれ Auto-iTC 中の Cell、Syringe に詰め、測定した。

3-2-3-2 結果

DSF の結果を受け、6 種の遷移金属について ITC で DJ-1 との親和性を解析した。

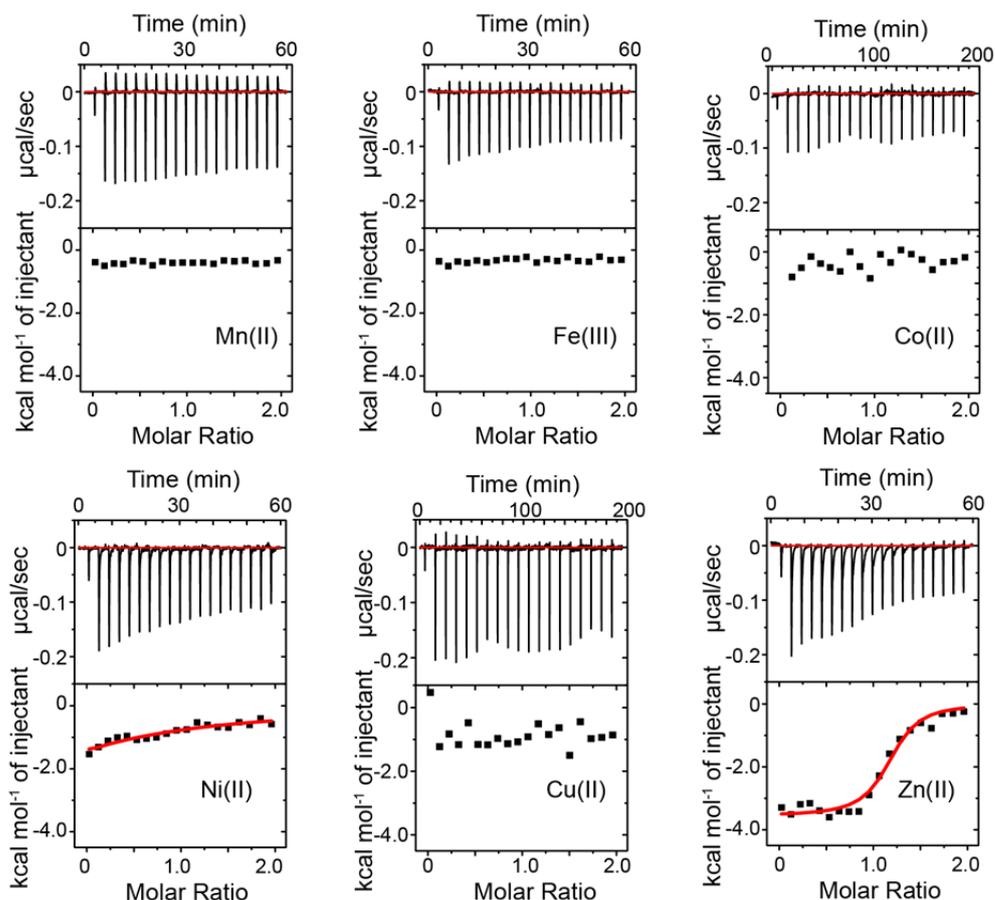


Figure 3-11 ITC を用いた DJ-1 と各種金属間の親和性解析

結果、Zn(II)は DJ-1 に対して $K_D=0.8 \mu\text{M}$ の親和性で結合することが明らかとなった。

発熱量は小さいが、これは Zn(II)の水和水の交換などを考えると妥当である。ただしこの親和性は他の亜鉛結合蛋白質と亜鉛間の親和性と比較すると弱く(多くの場合は K_D は pM オーダー)DJ-1 が生体内で亜鉛と配位するとすれば一時的なものであると考えられる。他の金属は Ni(II)のみが非常に弱い反応を示した($K_D=400 \mu\text{M}$)。DSF 系で DJ-1 を不安定化した

Cu(II)は、ITC では結合が確認されなかった。

以上の結果から、DJ-1 は Zn(II)と結合すると考えられる。

3-2-4 共結晶構造解析と ITC による変異体の親和性解析

3-2-4-0 概要

これまでの結果から DJ-1 が銅ではなく亜鉛に対して強く結合することが明らかとなった。続いてこの結合の機構及び相互作用部位を検証するため、共結晶構造解析を行い、さらに得られた共結晶構造に基づいて変異体解析を行った。

結果 DJ-1 は機能残基である Cys106 を介して亜鉛と相互作用していることが判明した。これは既に報告されている銅の結合部位とほぼ同じであり、Cys106 の機能の重要性を裏付けている。

3-2-4-1 実験手順

3-2-4-1-1 共結晶構造解析

まず DJ-1 の結晶を調製した。

DJ-1WT を 5 mM DTT、10 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.0) で 4°C 16 時間透析し、バッファを交換した。DJ-1 を 20 mg/ml に遠心濃縮し、濃縮した DJ-1 と結晶化用バッファを 2 μ l:2 μ l の割合で混合、ハンギングドロップ法で 25°C 中で結晶化した。結晶化用バッファには 200 mM クエン酸ナトリウム、100 mM Tris-HCl, 30% PEG400, 5 mM DTT (pH 8.5) バッファを用いた。

調製した結晶を、180 mM クエン酸ナトリウム、90 mM Tris-HCl, 27% PEG400, 10% DMSO, 0.5 mM ZnSO₄ 中にソーキングし、DJ-1 結晶に ZnSO₄ を浸透させた。

得られた結晶にフォトンファクトリー(筑波)の BL5A ビームラインで X 線を照射した。取得したデータからの立体構造の描像は CCP4 および COOT を用いて行った。

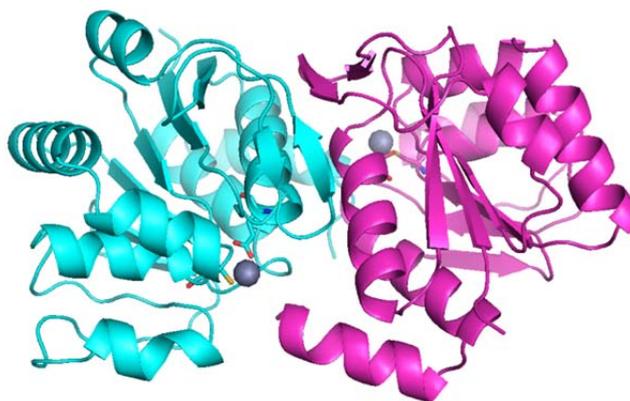
3-2-4-1-2 ITC による変異体解析

用いた装置は MicroCal Auto-iTC 200 (GE Healthcare) で、25°C 条件下での結合に関して熱力学パラメータを算出した。

DJ-1 各種変異体を 4°C で 6 時間 20 mM Tris-HCl (pH 7.4, 25°C), 150 mM NaCl に透析し、バッファを置換する。DJ-1 各種変異体は回収したのち 0.15 mM となるよう、ろ過した透析外液で希釈した。回収した透析外液中に金属を溶解させ、1.5 mM とした。なお金属の水和状態を平衡化するために、金属の溶解後希釈し、6 時間 4°C で保存したのちに測定を行った。準備した DJ-1 変異体、ZnSO₄ をそれぞれ Auto-iTC 中の Cell、Syringe に詰め、25°C にて測定を行った。

3-2-4-2 結果

DJ-1 と Zn(II) の相互作用形式を詳細に解析するため、結晶構造解析、変異体解析を行った。



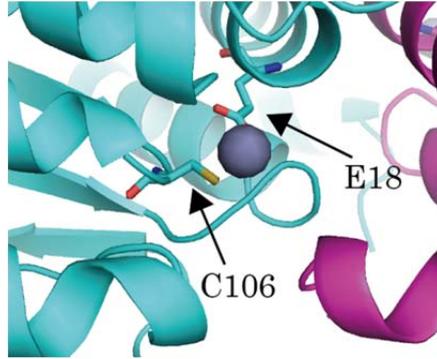


Figure 3-12 DJ-1 と Zn(II)の共結晶構造。上段は全体構造
下段は Zn(II)の結合部位を拡大したもの。

Title Protein Collection	WT Zinc DJ-1
PDB ID	4P36
Source	PF-BL5A
Space Group	P 3 ₁ 2 1
Cell Dimensions a, b, c (Å) α, β, γ (deg)	75.01 75.01 75.53 90.00 90.00 120.00
Wavelength	1.0000
Resolution (Å)	29.8 (1.18)
Total Observations	713,646 (19,808)
Unique Observations	80,469 (3,909)
Completeness (%)	99.9 (99.5)
Multiplicity	8.9 (5.1)
R_{merge}	0.070 (0.650)
I/σI	16.2 (2.2)
Refinement	
Resolution (Å)	29.8 (1.18)
R_{work}/R_{free} (%)	11.9 / 13.8
Number of molecules	
protein	1
ligand	1
Number of atoms	
protein	1,553
ligand	1
other (not solvent)	20
solvent	232
B-Factors (Å²)	
protein	16.5
ligand	14.6
other (not solvent)	54.3
solvent	33.3
rmsd bond length (Å)	0.007
rmsd bond angle (°)	1.28
Ramachandran	
Core (%)	96.2
Allowed (%)	3.2
Disallowed (%)	0.6
Molecules in ASU	1
Solvent Content	60.1
Crystallization	
Solution	200 mM Sodium citrate, 100 mM TRIS-HCl, pH 8.5, 30% PEG 400 (Hampton CS#13)
Drop Size	4
Ratio (prot:ppt)	Variable
Cryo	none

結晶構造解析の結果から、DJ-1 は Cys106, Glu18 を介して Zn(II) と相互作用していることが明らかとなった。配位形式はゆがんだ四面体である(残り二つは水分子と考えられる)。この形式は Zn(II) としては珍しい形式で、これが原因となって弱い親和性を生んでいると考えられる。

変異体解析の結果、Cys106, Glu18 が Zn(II) との結合に必須であることが明らかとなった。これは結晶構造解析の結果を裏付けるものである。

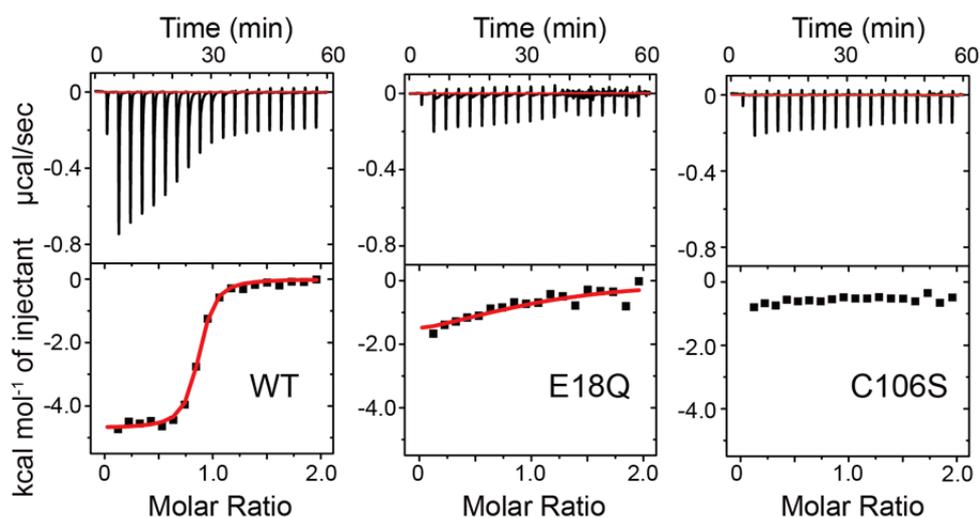


Figure 3-13 ITC による DJ-1 変異体と Zn(II) 間の相互作用の解析

左から順に、DJ-1WT、DJ-1E18Q、DJ-1C106S 変異体と、Zn(II) の相互作用。

以上から、DJ-1 は Cu(II) よりも Zn(II) に好んで配位することが明らかとなった。これは既報とは異なる結果であった。

3-3 グリオキシラーゼ活性

3-3-0 概要

グリオキサール・メチルグリオキサールはミトコンドリア内のエネルギー代謝サイクルから発生する副産物であり、反応性が高く、様々な蛋白質を修飾することが知られている。

グリオキサールによって修飾された蛋白質は本来の機能を失い、変性・失活へとつながり、最終的には細胞死へと至る。

近年、大腸菌内の熱応答性蛋白質 Heat shock protein 31 (HSP31)が、従来報告されていたシャペロン能のほかに、グリオキサールを分解する作用、すなわちグリオキシラーゼ活性を有すると報告された。それに続いて HSP31 のホモログである DJ-1 もグリオキシラーゼ活性を有しており、この活性が DJ-1 の抗酸化ストレス能において非常に重要であるという報告がなされた。

既報による提案は以下のようなものである。すなわち、ミトコンドリアに酸化ストレスがかかることにより発生した酸化ストレス物質を DJ-1 が分解する。結果酸化ストレスの蓄積が防止され、DJ-1 はパーキンソン病を抑制する。この仮説は同報告内で、単利精製後の酵素を用いた生化学的手法、細胞、線虫を用いた分子生物学的手法両面から検証されており非常に信頼性が高いと考えられる。

またグリオキシラーゼの基質であるグリオキサールはジケトン構造を持つ化合物であり、この構造は Isatin とも共通している。そしてグリオキシラーゼ活性に必要であるとされる残基は Isatin の結合においても必須となっている Cys106 残基である。

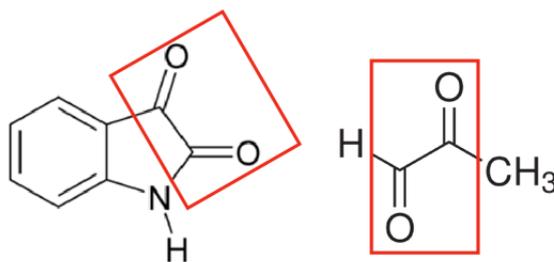


Figure 3-07 Isatin(左)とメチルグリオキサール(右)

赤四角で囲んだ構造が類似

以上の事実を踏まえると、DJ-1 の本活性の Isatin による阻害の検証を行うことは本阻害剤のプローブとしての有用性を確認するうえで重要となると考えられた。

本節では既報の DJ-1 グリオキシラーゼ活性の確認を行い、さらに酵素反応速度定数についても算出を行った。

3-3-1 実験手順

DJ-1WT を 4 °C で 24 時間 100 mM リン酸ナトリウムバッファ、1 mM DTT (pH 7.0) に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したのち 1.0 μM となるよう、ろ過した透析外液で希釈し、室温で静置した。なお室温は 25 °C だった。

基質としてはフェニルグリオキサールを用いた。フェニルグリオキサールは 250 nm に特徴的な吸光ピークを持つが、DJ-1 によって変換されると 250 nm の吸光ピークは失われる。

回収した透析外液に秤量したフェニルグリオキサールを溶解し、透析外液を用いて希釈系列を調製、室温で静置した。調製した希釈系列は 0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200, 400 μM である。各種希釈系列を調製したのち、30 μl の DJ-1 と 30 μl のフェニルグリオキサールを素早く混合、UVstar 384 well に 100 μl 移し、Enspire (Perkin Elmer 社) で吸光度の時間変化を測定した。測定条件は、測定波長 250 nm、データ取り込み間隔を 15 sec、測定温度は 26 °C、0-300 sec に関して測定した。

IC₅₀ の算出は Origin Pro を用いて行った。

3-3-2 結果

既報のグリオキシラーゼ活性が再現よく得られるかを追試した。

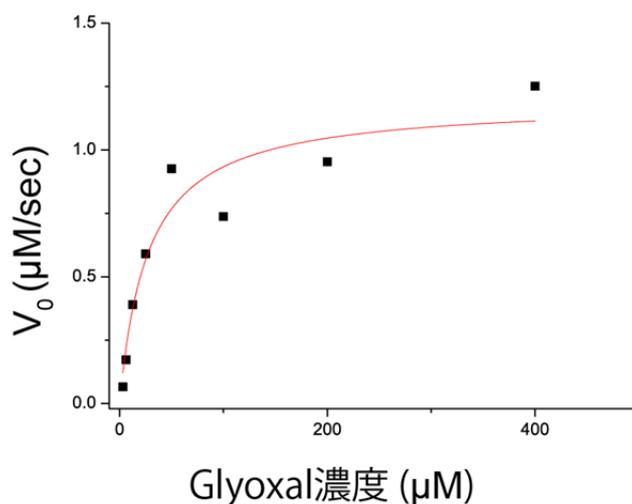


Figure 3-08 DJ-1 によるグリオキサール分解活性の測定結果。

横軸はグリオキサール濃度、縦軸は酵素反応初速度を示す。

結果、DJ-1 の酵素反応初速度は濃度依存的に上昇し、ある一定の濃度をこえると上昇比は低下した。これは典型的な酵素反応図のプロットであり、DJ-1 がグリオキシラーゼ活性を有することを示している。酵素反応速度定数の再現性も比較的良好($K_m=27 \mu\text{M}$, $k_{cat}=2.4 /\text{sec}$)であり、DJ-1 は文献値に近いグリオキシラーゼ活性を有していると考えられる。

3-4 Isatin による DJ-1 機能の阻害

3-4-0 概要

前節までで 3 種類の DJ-1 の機能に関する仮説を検証した。そして、グリオキシラーゼ活性が非常に再現よく検証された。

DJ-1 のグリオキシラーゼ活性に関しては反応機構が推定されており、その中では Cys106 がきわめて重要な役割を果たす。

第 2 章で同定された Isatin は Cys106 に結合する。このことから、グリオキシラーゼ活性は Isatin によって競合的に阻害される可能性が非常に高い。

そこで、Isatin 存在下で実際にグリオキシラーゼ活性が阻害されるか否かを検証した。

結果、DJ-1 のグリオキシラーゼ活性は Isatin によって阻害されることが明らかとなった。

3-4-1 実験手順

DJ-1WT を 4 °C で 24 時間 100 mM リン酸ナトリウムバッファ、1 mM DTT (pH 7.0) に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したのち氷中に保持した。

続いて 100 mM リン酸ナトリウムバッファ (pH 7.0) を新たに調製、さらにその一部を分取して 1% DMSO を混合、調製された 2 種のバッファをそれぞれ室温で静置した。今後はそれぞれ 0% ランニングバッファ、1% ランニングバッファと呼び、今後ランニングバッファとして用いる。これは DTT による Isatin の分解を防ぐためである。なお室温は 25 °C だった。

基質としては再びフェニルグリオキサールを用いた。秤量したフェニルグリオキサールを DMSO に溶解し、0% ランニングバッファと 1% ランニングバッファを用いて希釈、60 μ M (1% DMSO) とした。

同様に秤量した Isatin を DMSO に溶解し、0% ランニングバッファと 1% ランニングバッファ、そして氷中で保持していた DJ-1 を用いて希釈、100 μ M Isatin + 1 μ M DJ-1 溶液 (1% DMSO) を調製。続いて DMSO と 0% ランニングバッファと 1% ランニングバッファ、DJ-1 を用いて 1 μ M DJ-1 溶液 (1% DMSO) を調製。この 1 μ M DJ-1 溶液と、先ほどの 100 μ M Isatin + 1 μ M DJ-1 溶液 (1% DMSO) を用いて希釈系列 1 μ M DJ-1 + 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0 μ M Isatin 溶液 (1% DMSO) を調製した。

各種希釈系列を調製したのち、50 μ l の DJ-1 と 50 μ l のフェニルグリオキサールを素早く混合、UVstar 384 well に 100 μ l 移し、Enspire (Perkin Elmer 社) で吸光度の時間変化を測定した。測定条件は、測定波長 250 nm、データ取り込み間隔を 15 sec、測定温度は 26 °C、0-300 sec に関して測定した。

IC₅₀ の算出は Origin Pro を用いて行った。

3-4-2 結果

Isatin による DJ-1 のグリオキシラーゼ活性の阻害の検証を行った。

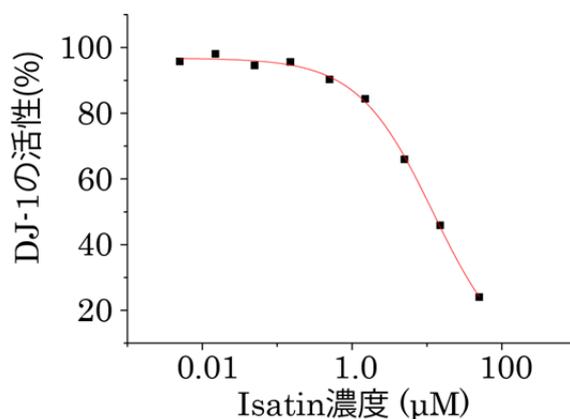


Figure 3-09 Isatin による DJ-1 グリオキサール分解活性の阻害の確認。

横軸は Isatin 濃度、縦軸は DJ-1 の活性(酵素反応初速度)を表す。

Isatin により DJ-1 のグリオキシラーゼ活性は阻害され、 $IC_{50}=12 \mu M$ となった。

3-5 第 3 章の総括

本章では、Isatin による *in vitro* での阻害が検証できる系を探索した。検証した DJ-1 の機能は、プロテアーゼ、金属結合、グリオキシラーゼの 3 種類である。

まずプロテアーゼであるが、この機能に関しては、本研究では再現性が得られなかった。これはプロテアーゼ活性を向上させるという C 末端を除去した変異体に関しても同様で、DJ-1 のプロテアーゼ活性は系の状態に対して非常に敏感な活性であると考えられた。そのため本研究では、プロテアーゼ活性の Isatin による阻害を我々が観察するのは非常に難しいと結論付けた。

次に金属結合活性に関して検証を行った。既報では DJ-1 は銅と結合し、酸化ストレスを緩和すると提案されていた。そこで本研究では銅を含む 6 種の遷移金属に関して、DSF、ITC、結晶構造解析により DJ-1 との親和性を測定したところ、DJ-1 は銅よりもむしろ亜鉛

に対して強く結合することが明らかとなった。亜鉛は銅同様パーキンソン病患者の脳内で濃度が上昇していることが知られている遷移金属であり、DJ-1 の制御に銅と共に関与している可能性が予想される。しかし、現時点では細胞内の亜鉛の DJ-1 への影響について言及した報告は存在せず、重要性が不明であるため、Isatin による阻害の検証に用いることは見送られた。

最後に検証されたのはグリオキシラーゼ活性である。これは本研究中で容易に再現性が得られた。さらに Isatin による阻害も確認され、 $IC_{50}=12 \mu M$ となった。

本章の結果から、Isatin は DJ-1 のグリオキシラーゼ活性を阻害することが明らかとなった。この機能は既に細胞、線虫を用いた系によって生体内での重要性が明らかとされている機能であり、Isatin は DJ-1 の機能探索のプロープとして有望であると考えられる。

第4章

化合物の伸長

4-0 概要

前章までの結果から、スクリーニングによって DJ-1 結合化合物として Isatin が同定され、さらに DJ-1 のグリオキシラーゼ活性を Isatin が阻害することが明らかとなった。

しかし Isatin と DJ-1 間の親和性は $K_D=3 \mu\text{M}$ であり阻害剤として決して強力ではない。細胞アッセイなどに用いられる阻害剤の多くは、 K_D =数十~数百 nM の親和性を有しており、Isatin は親和性を数十倍向上させる必要がある [59]。

本章では構造情報に基づき、Isatin を基本骨格とした類縁体について DJ-1 との親和性を検証した。

結果 DJ-1 に対して $K_D=100 \text{ nM}$ 前後の親和性で結合する化合物を見出した。またそれらの化合物は Isatin よりも強く DJ-1 のグリオキシラーゼ活性を阻害した。

4-1 変異体・類縁体解析

4-1-0 概要

本章では構造情報に基づき Isatin を伸長し、DJ-1 に対してより強い親和性を示す化合物の取得を狙う。おおもととなる構造は、第 2 章の結果から以下のようなものとなる。

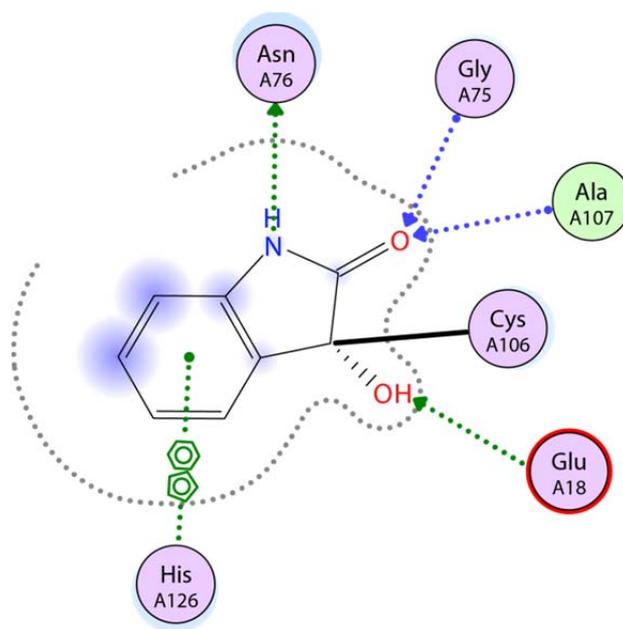


Figure 4-01 Isatin と DJ-1 の相互作用

Isatin と DJ-1 の相互作用の模式図(MOE により描像)。緑いろの点線は側鎖原子が水素結合を、青色の点線は主鎖原子が水素結合を結んでいることを示す。

His126 の位置から伸びているのは、 π - π 相互作用である。

図には DJ-1 と Isatin の相互作用のうち、主要なものが示してある。特に顕著な相互作用は①Cys106 との共有結合、②E18 との非常に短い水素結合、③H126 との π - π 相互作用の 3 種である。また、Isatin の周辺に水に対して露出した部分がいくらかあるのも見て取れる。

本節では、まず変異体解析と類縁体の解析によって、これらの相互作用の中でどれが必須で、どれが必須でないのかを検証した。

変異体解析では、DJ-1 の各種変異体(C106S, C106A, E18Q, E18A, H126Y, H126A)を製作し、変異体それぞれの Isatin への親和性を ITC により確認した。

結果、Cys106 および Glu18 を変異させると親和性は完全に失われ、それら二種には劣るが His126 も親和性に対して大きな影響を与えていることが明らかとなった。

また類縁体解析では、Isatin の構造中で共有結合に致命的と思われるケトン官能基を除い

た Oxindole と、Isatin の各 C 原子にメチル基が修飾されたものをそれぞれ購入し、ITC により結合を確認した。またメチル基によって修飾されたものの中で最も親和性に低下した化合物については結晶構造を取得した。

結果、Oxindole に関しては親和性が完全に失われ、Cys106 との共有結合の重要性が改めて裏付けられた。そしてメチル基によって修飾された各種 Isatin 類縁体は、いずれも親和性が低下した。そしてその中でも特に顕著な低下を示した化合物は、結晶構造解析から、DJ-1 の構造を一部変化させていることが明らかとなった。

なお、下に今回用いた類縁体を示す。

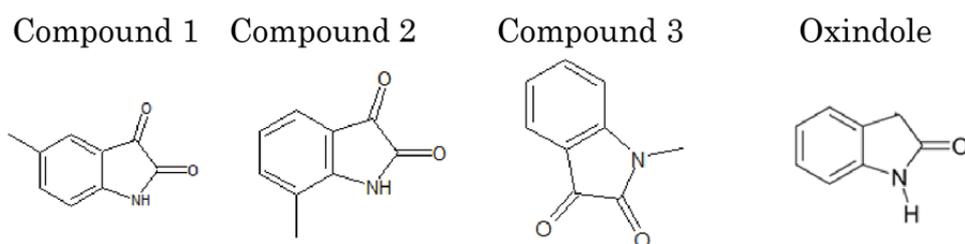


Figure 4-02 今回用いた Isatin 類縁体

4-1-1 実験手順

4-1-1-1 ITC

用いた装置は MicroCal Auto-iTC 200 (GE Healthcare) で、25°C 条件下での結合に関して熱力学パラメータを算出した。またバッファに関しては、今回の実験では、変異体解析に関しては DMSO を含むバッファで、類縁体に関しては含まないバッファで測定を行った。

DMSO を含まない変異体の測定系に関してまず述べる。DJ-1WT を 4°C で 6 時間 PBS に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したのち 0.1 mM となるよう、ろ過した透析外液で希釈した。回収した透析外液中に Isatin を超音波破碎機を用いて溶解させ、1.0 mM とした。準備した DJ-1WT、Isatin をそれぞれ Auto-iTC 中の Cell、Syringe に詰め、

25°C で測定を行った。

次に DMSO を含む Isatin 類縁体の測定系に関して述べる。DJ-1WT を 4°C で 6 時間 PBS に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したのち 0.05 mM かつ 5% DMSO となるよう、ろ過した透析外液及び DMSO で希釈した。続いて Isatin 類縁体を DMSO に溶解させ、透析外液で終濃度 0.5 mM、5% DMSO となるよう希釈した。準備した DJ-1WT、Isatin をそれぞれ Auto-iTC 中の Cell、Syringe に詰め、25°C で測定を行った。

4-1-1-2 共結晶構造解析

まず DJ-1 の結晶を調製した。

DJ-1WT を 5 mM DTT、10 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.0) で 4°C 16 時間透析し、バッファを交換した。DJ-1 を 20 mg/ml に遠心濃縮し、濃縮した DJ-1 と結晶化用バッファを 2 µl:2 µl の割合で混合、ハンギングドロップ法で 25°C 中で結晶化した。結晶化用バッファには 200 mM クエン酸ナトリウム、100 mM Tris-HCl, 30% PEG400, 5 mM DTT (pH 8.5) バッファを用いた。

調製した結晶を、180 mM クエン酸ナトリウム、90 mM Tris-HCl, 27% PEG400, 10% DMSO, 2 mM Isatin 類縁体の液滴中にソーキングし、DJ-1 結晶に Isatin 類縁体を浸透させた。

得られた結晶にフォトンファクトリー(筑波)の BL5A ビームラインで X 線を照射した。取得したデータからの立体構造の描像は CCP4 および COOT を用いて行った。

4-1-2 結果と考察

変異体解析・類縁体解析の結果は以下のようになる。

変異体名	K_D (μM)	ΔH (kcal)	$-T\Delta S$ (kcal)	N
WT	2.5	-10.4	2.7	1.1
E18A	ND	ND	ND	ND
E18Q	ND	ND	ND	ND
C106A	ND	ND	ND	ND
C106S	ND	ND	ND	ND
H126A	260	-3.1	-1.8	3.6
H126Y	22	-9.8	3.4	1.2

Table 4-01 変異体解析

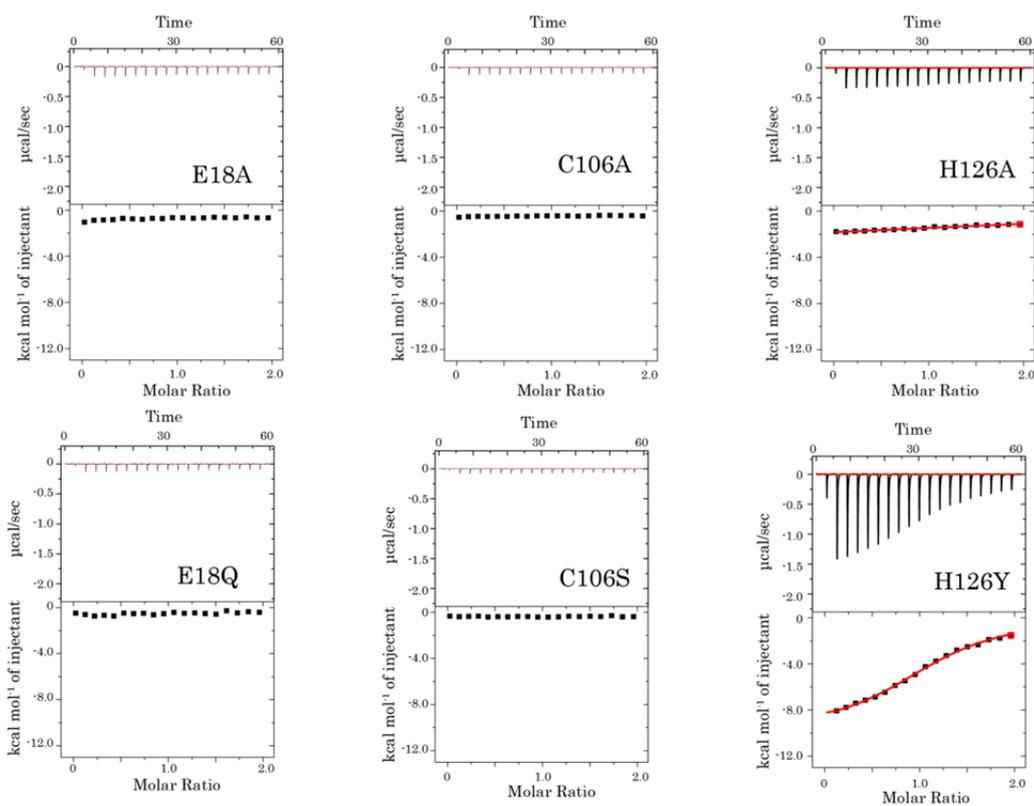


Figure 4-03 変異体解析の結果

化合物名	K_D (μM)	ΔH (kcal)	$-T\Delta S$ (kcal)	N
Isatin	3.2	-11.6	4.1	1.0
Oxindole	ND	ND	ND	ND
Compound 1	5.6	-10.2	3.1	1.0
Compound 2	5.1	-10.1	2.9	1.0
Compound 3	14	-8.9	2.3	1.1

Table 4-02 類縁体解析

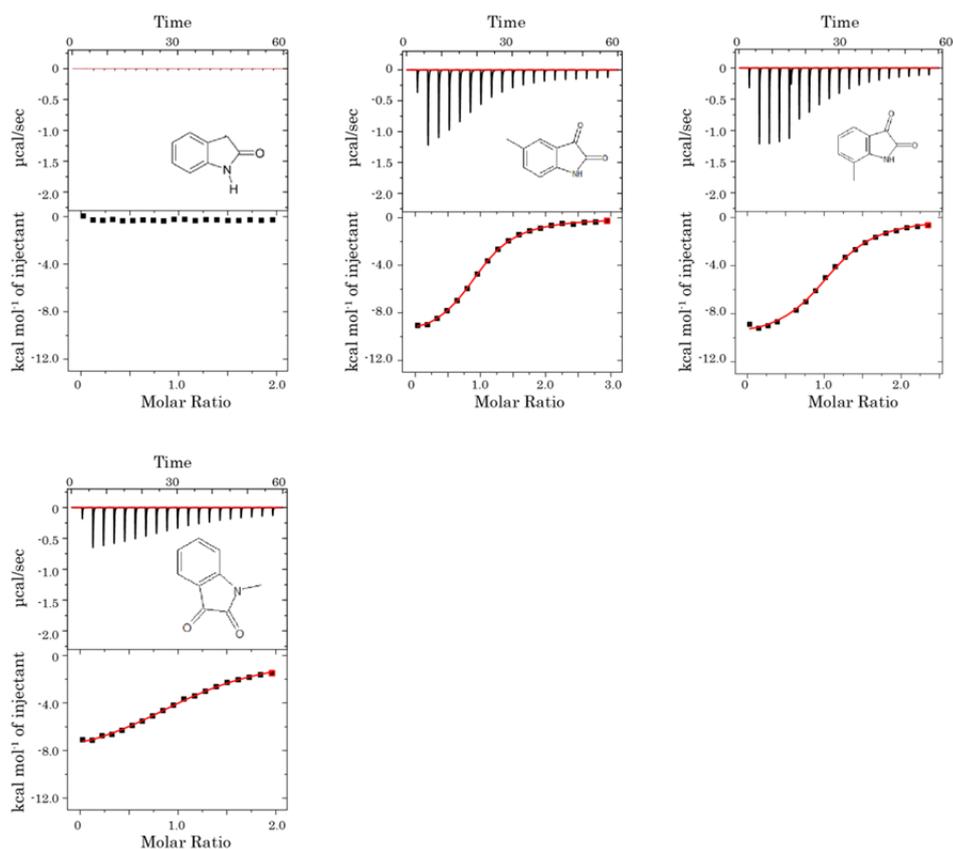


Figure 4-03 類縁体解析の結果

まず図表から明らかなように、DJ-1 の Cys106 との共有結合は Isatin との結合に必須である。これは共有結合を形成しない場合、Isatin とアミノ酸残基が衝突・反発し、その他の Glu18 や His126 との非共有結合も適切に形成されないと考えられることから、容易に予想

されたことであつた。

特徴的なのは、Glu18 との非常に短い水素結合までも必須であることである。このような水素結合は酵素反応などではたびたび観察されるものの、阻害剤では比較的珍しい。酵素反応との類似性などから、Glu18 はこの非常に短い水素結合を形成することで共有結合の形成を補助していると考えられる。

H126Y に比べ H126A の親和性が低いことから、His126 との π - π 相互作用も Isatin の結合に重要な役割を果たしていることは明らかであり、これらの解析から、Isatin の基本骨格中で相互作用に重要でない場所は殆ど存在しないと考えられる。親和性が消失してしまった Oxindole の結果も、それを裏付けている。

一方、メチル付加類縁体による解析は、Isatin 基本骨格に種々の官能基を付加すること自体は、親和性に対してそれほど影響を与えないことを示唆している。

中でも興味深いのは、最も影響が大きかった類縁体との共結晶構造である。

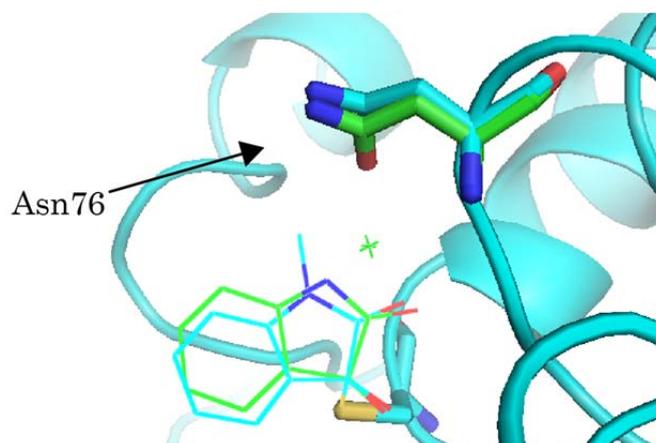


Figure 4-05 Asn76 の運動。緑色は Isatin との共結晶、青色は Compound3 との共結晶である。緑色の Asn76 と Isatin 間の距離は、青色の Asn76 と Isatin と比べ近いのが見て取れる。

この共結晶中では、付加したメチル基が Asn76 をわずかに押し下げ、ドアのように開いた Asn76 の奥には細い溝が続いている。これはこの部位へのもっと大きな官能基の付加により親和性が向上する可能性を示唆している。

4-2 類縁体のスクリーニング

4-2-0 概要

DJ-1 変異体と Isatin 類縁体の解析の結果から、共有結合をする官能基が結合に必須であること、そして伸長する位置によっては、少なくともメチル基を修飾することが可能な空間は存在することが明らかとなった。

そこで Isatin を基本骨格とする化合物群の特徴を考える。

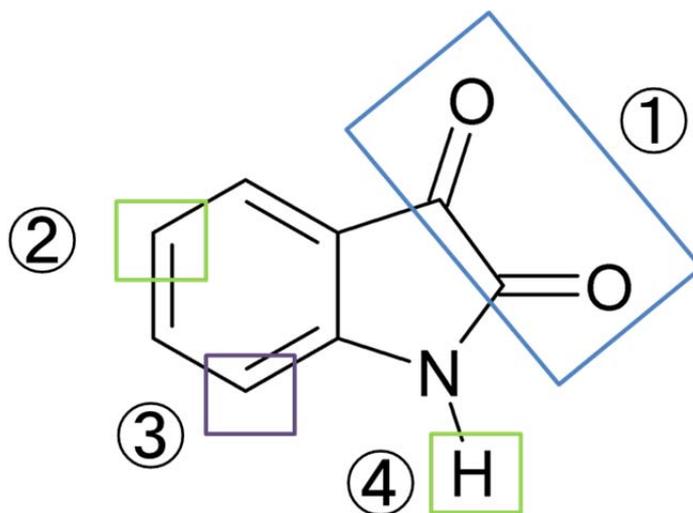


Figure 4-06 Isatin 骨格内の修飾可能部位

①、③は相互作用への重要性、可用性などから、本論文では変換を見送った。

市販品の数などから判断すると、Isatin を基本骨格としたとき最も容易に伸長可能な部位は、①の枠で囲った部位である。論文検索などを見ても、多くの Isatin 類縁体は①の位置

を反応点として伸長が行われている。

しかし、この部位は DJ-1 との親和性を最も重要な部位でもあることが変異体・類縁体解析から明らかになった。予想される Cys106 との共有結合形成機構からも改変した場合の親和性への影響は甚大であると考えられる。そのため今回はこの部位を改変することは見送った。

残る②、③、④であるが市販品の数などから判断すると、②、④は容易に伸長することが可能であると考えられる。

②に関しては、結晶構造から判断する限り修飾する空間はそれほど残されておらず、あまり巨大な官能基で修飾すると蛋白質と衝突してかえって親和性が低下すると考えられる。そこで-F, -Cl などの小さな官能基で修飾された類縁体を購入し、ITC で親和性を測定した。

④に関しては、類縁体解析から親和性が低下することが明らかとなっている。しかし、結晶構造解析からこの部位への修飾は DJ-1 側の構造を動かし、Asn76 が門のように開閉することが判明した。そこで東大オープンイノベーションセンターのライブラリ情報に基づいてこの部位が修飾された化合物を購入し、親和性を測定した。その際、購入した化合物数が多かったため、まず DSF で T_m の変化の大きかった化合物のみを選定し、ITC 測定へと供与した。

結果、②の部位に関しては-F による修飾が、④の部位に関してはエチル基、フェニルエチル基による修飾が顕著な親和性向上を示した。

4-2-1 実験手順

4-2-1-1 ITC 測定

用いた装置は MicroCal Auto-iTC 200 (GE Healthcare)で、25°C 条件下での結合に関して熱力学パラメータを算出した。

DJ-1WT を 4°C で 6 時間 PBS に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したの

ち 0.05 mM かつ 5%DMSO となるよう、ろ過した透析外液及び DMSO で希釈した。続いて Isatin 類縁体を DMSO に溶解させ、透析外液で終濃度 0.5 mM、5% DMSO となるよう希釈した。準備した DJ-1WT、Isatin をそれぞれ Auto-iTC 中の Cell、Syringe に詰め、25°C で測定を行った。

4-2-1-2 DSF 測定

装置は CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad)を用い、蛍光プローブは SYPRO Orange(Invitrogen)を用いた。フィルタは励起/発光: 470/570 nm のフィルタを用いた。

まず DJ-1 を PBS バッファに 4°C で 6 時間透析した。

続いてランニングバッファとして PBS+1%DMSO バッファを用意した。DMSO とランニングバッファ、透析外液を用いて、5 μ M DJ-1+50 μ M Isatin 類縁体+SYPRO Orange 溶液(1% DMSO)を調製し、昇温による DJ-1 の変性を追跡した。温度変化は 30°C から 95°C まで 0.2°C/分の割合で昇温した。

4-2-2 結果と考察

Isatin へのハロゲン付加の親和性への影響を検証するため、ITC により類縁化合物の親和性を測定した。

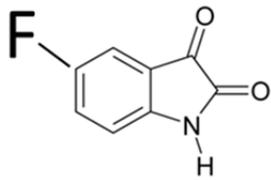
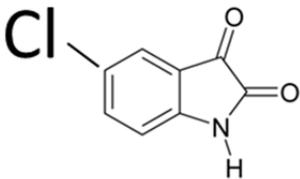
化合物名	K_D (μ M)	ΔH (kcal)	$-T\Delta S$ (kcal)	N
Isatin	3.2	-11.6	4.1	1.0
	0.93	-12.4	4.2	1.0
	0.76	-10.6	2.3	0.95

Table 4-03 Halogen 原子による Isatin への修飾の相互作用への影響

この際、Br、I に関しては化合物溶解性の関係で測定が難しかったため、F、Cl に絞って測定を行った。

測定の結果は F、Cl いずれの付加類縁体も DJ-1 への親和性が向上した。しかし向上の内容は異なっていた。

F による付加類縁体の場合は Isatin に比べエンタルピー的に有利であったのに対し、Cl による付加類縁体の場合は Isatin に比べエンタルピー的に不利だった。これは F による付加類縁体は Isatin と DJ-1 間の相互作用に加えて、新たな相互作用が生じている可能性を示唆している。一方 Cl に関しては、Cl が付加することによって類縁体の疎水性が上昇し、結果疎水的に DJ-1 への相互作用が強くなっている可能性を示している。

本研究は DJ-1 に特異的なプローブを得ることが目標である。このことから、部位②に関しては F を付加する類縁体がより適していると考えられる。

続いて、DSF により部位④へと官能基を付加した化合物群についてスクリーニングを行い、その中でも有意に Isatin より Tm シフトが大きかった(>1.0 °C)ものに関して ITC で親和性を測定した。以下に示すのは DSF で Tm シフトが有意に高かった化合物で、なおかつ ITC 測定が可能な溶解度を持つ化合物群である。

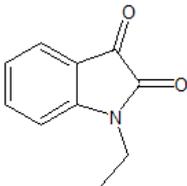
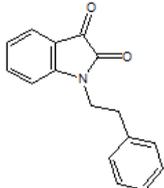
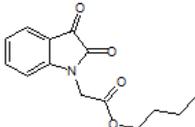
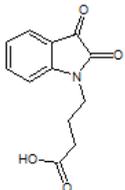
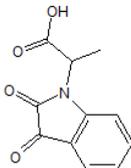
化合物名	K _D (μM)	ΔH (kcal)	-TΔS (kcal)	N	ΔT _m (°C)
Isatin	3.2	-11.6	4.1	1.0	0
	0.63	-11.9	3.5	0.92	3.2
	0.75	-12.0	3.7	0.94	2.8
	0.59	-11.2	5.0	1.0	2.8
	1.4	-10.6	7.1	1.0	2
	7.7	-12.6	5.5	1.1	6.2

Table 4-04 様々な官能基による Isatin への修飾の相互作用への影響

溶解性の問題から、8種の化合物の中で ITC を測定できたのは4種であった。その中でエチル基、フェニルエチル基を付加した化合物に関しては付加前の Isatin に比べ親和性が

増大していた。特にエチル基は、メチル基の付加が親和性の低下へとつながったことを考えると興味深い結果である。

なお、エチル基、フェニルエチル基を付加した化合物の ΔH は Isatin と比較して大きな変化はない。すなわちこれら官能基は、水素結合等の特異的な相互作用よりもむしろ、疎水性相互作用などのエンタルピー変化を生じにくい相互作用によって親和性を向上させていると考えられる。

残りの化合物に関しては、親和性は増大していない。DSF の結果と比較すると、おそらく原因として、結合以外の理由(SYPRO Orange への干渉など)によって DJ-1 を安定化した、もしくは高温環境下でのみ DJ-1 との親和性が強くなるものと考えられる。

DSF のフォールスポジティブ率の高さはよく知られていることでもあることから、今回は ITC の結果に注目し、④の部位に関してはエチル、フェニルエチル基による付加を用いて最適化を進めることとした。

4-3 さらに最適化

4-3-0 概要

前節の結果から、部位②と④に修飾した Isatin 類縁体の一部は DJ-1 に対して Isatin よりも高い親和性を有することが明らかとなった。では、これらの修飾を組み合わせることでさらに高い親和性の化合物が得られると考えるのは容易である。

そこでこれらの修飾を組み合わせた類縁体を購入し、DJ-1 との親和性を ITC で測定した。さらにそれらの類縁体の中で特に物性が良いものに関して DJ-1 グリオキシラーゼ活性の阻害を検証した。

結果、親和性・阻害能共に向上した。

4-3-1 実験手順

4-3-1-1 ITC 測定

用いた装置は MicroCal Auto-iTC 200 (GE Healthcare) で、25°C 条件下での結合に関して熱力学パラメータを算出した。

DJ-1WT を 4°C で 6 時間 PBS に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したのち 0.05 mM かつ 5%DMSO、もしくは 0.01 mM かつ 5%DMSO となるよう、ろ過した透析外液及び DMSO で希釈した。続いて Isatin 類縁体を DMSO に溶解させ、透析外液で終濃度 0.5 mM かつ 5% DMSO、もしくは 0.1 mM かつ 5%DMSO となるよう希釈した。準備した DJ-1WT、Isatin 類縁体を、Cell:Syringe の濃度比が、F-Isatin-ethyl 付加体については 0.05 mM DJ-1:0.5 mM Isatin、F-Isatin-ethylphenyl 付加体については 0.01 mM DJ-1:0.1 mM Isatin となるよう、それぞれ Auto-iTC 中の Cell、Syringe に詰め、25°C で測定を行った。

4-3-1-2 グリオキシラーゼ活性阻害の検証

DJ-1WT を 4°C で 24 時間 100 mM リン酸ナトリウムバッファ、1 mM DTT (pH 7.0) に透析し、バッファを置換する。DJ-1WT は回収したのち氷中に保持した。

続いて 100 mM リン酸ナトリウムバッファ (pH 7.0) を新たに調製、さらにその一部を分取して 1%DMSO を混合、調製された 2 種のバッファをそれぞれ室温で静置した。今後はそれぞれ 0%ランニングバッファ、1%ランニングバッファと呼び、今後ランニングバッファとして用いる。これは DTT による Isatin の分解を防ぐためである。なお室温は 25°C だった。

基質としては再びフェニルグリオキサールを用いた。秤量したフェニルグリオキサールを DMSO に溶解し、0%ランニングバッファと 1%ランニングバッファを用いて希釈、60 μ M (1% DMSO) とした。

購入した Isatin 類縁体を DMSO に溶解し、0%ランニングバッファと 1%ランニングバッファ、そして氷中で保持していた DJ-1 を用いて希釈、100 μM Isatin 類縁体 +1 μM DJ-1 溶液(1%DMSO)を調製。続いて DMSO と 0%ランニングバッファと 1%ランニングバッファ、DJ-1 を用いて 1 μM DJ-1 溶液(1% DMSO)を調製。この 1 μM DJ-1 溶液と、先ほどの 100 μM Isatin 類縁体 +1 μM DJ-1 溶液(1%DMSO)を用いて希釈系列 1 μM DJ-1+100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0 μM Isatin 溶液(1% DMSO)を調製した。

各種希釈系列を調製したのち、50 μl の DJ-1 と 50 μl のフェニルグリオキサールを素早く混合、UVstar 384 well に 100 μl 移し、Enspire (Perkin Elmer 社)で吸光度の時間変化を測定した。測定条件は、測定波長 250 nm、データ取り込み間隔を 15 sec、測定温度は 26 °C、0-300 sec に関して測定した。

4-3-2 結果と考察

これまでの得られた結果から推測された、DJ-1 にたいしてより親和性の高い Isatin 類縁体について、ITC により親和性を測定した。

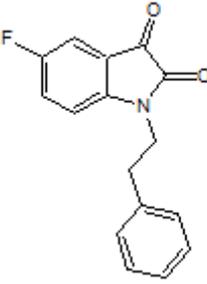
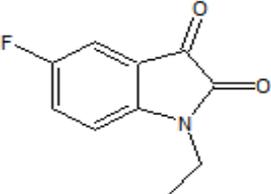
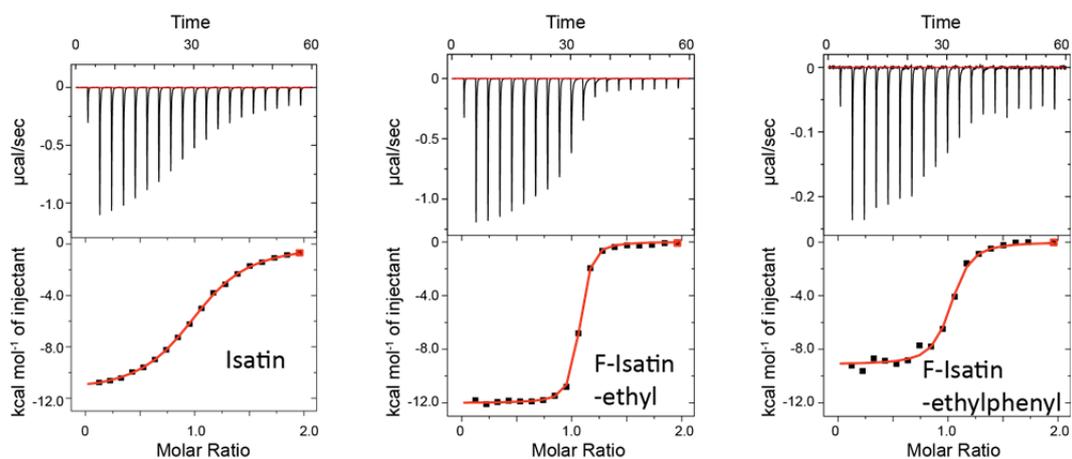
化合物名	K_D (μM)	ΔH (kcal)	$-T\Delta S$ (kcal)	N	IC_{50} (μM)
Isatin	3.2	-11.6	4.1	1.0	0
	0.063	-9.1	-0.59	0.99	0.29
	0.097	-12.0	2.4	1.03	0.36

Table 4-05 親和性が向上した修飾を組み合わせた場合の相互作用への影響



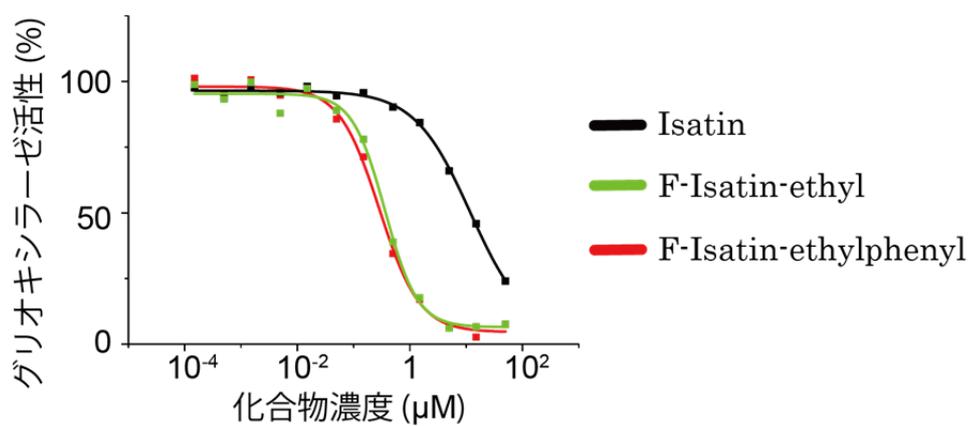
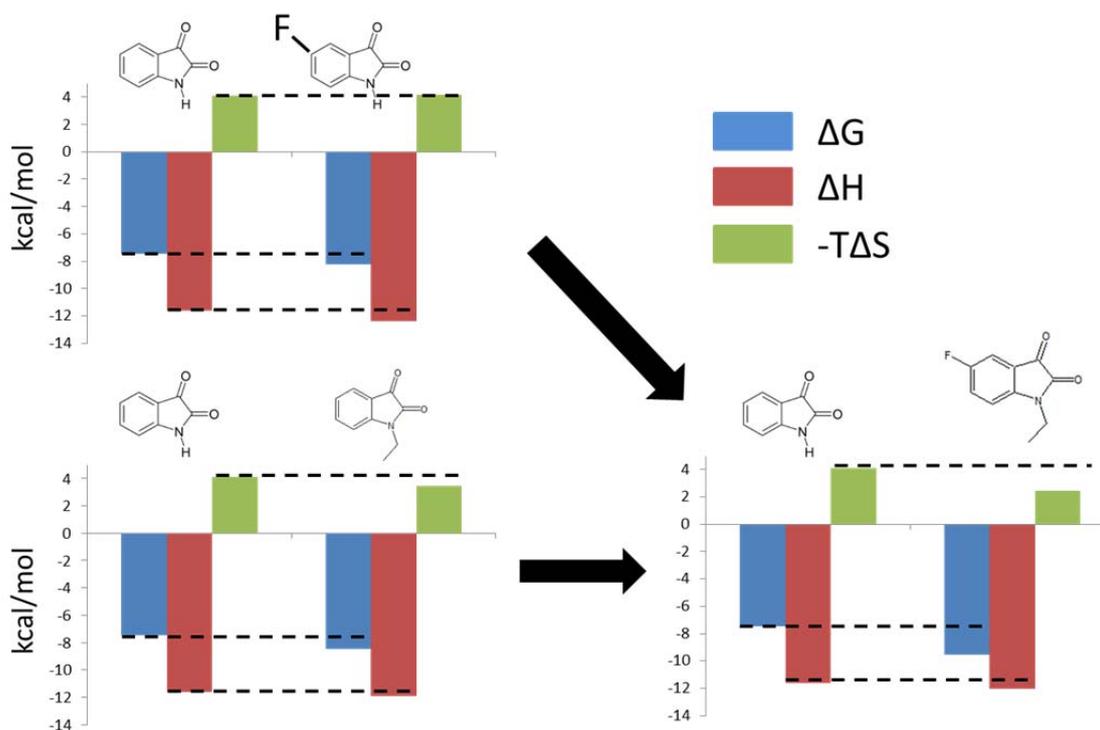


Figure 4-07 親和性が向上した修飾を組み合わせた場合の相互作用への影響(上)と
グリオキシラーゼ活性阻害能への影響(下)



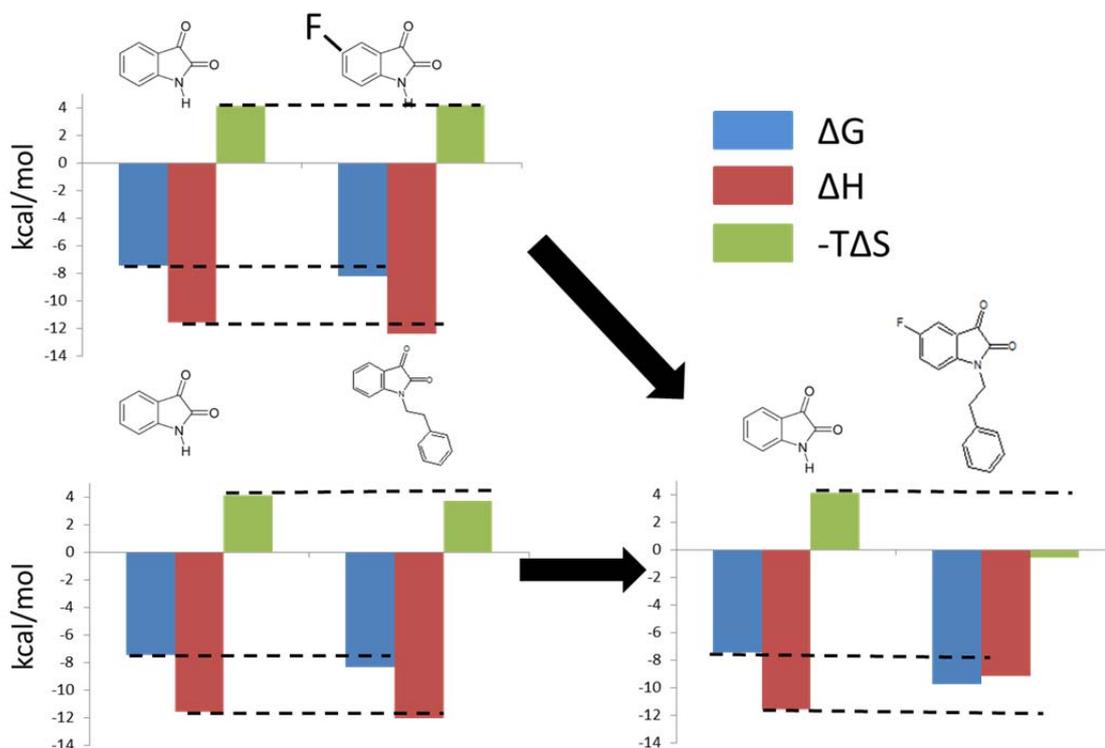


Figure 4-08 修飾に伴う結合の熱力学的パラメータの変化

推測通り、類縁体はこれまでに得られた類縁体をしのぐ親和性の強さを示した。エンタルピー、 ΔG は必ずしも相加的ではなく、これは官能基を付加することにより脂溶性が変化し、結果的に疎水性相互作用が一部働いているためと考えられた。

またグリオキシラーゼ活性の阻害も検証した。

こちらに関しても ITC 同様おおもとなつた *Isatin* よりも高い阻害能を示しており、妥当な結果であるといえる。

4-4 第4章の総括

第4章では、*Isatin* の構造を基本骨格として、DJ-1 に対してより親和性が高くグリオキシラーゼ活性を強く阻害する化合物の探索をおこなつた。

構造情報に基づいた変異体解析、類縁体解析により、*Isatin* のいずれの原子が重要であるかを解析し、結果 *Isatin* の中でも2つの部位に絞って付加を進めることを決定した。

2つの部位それぞれに関して、構造情報に基づいて付加した類縁体を購入し、DSF、ITCにより親和性を測定したところ、2つの部位それぞれについて親和性を向上させる類縁体が得られた。

部位②、④で親和性の向上へとつながった付加官能基を組み合わせた化合物は、ほぼ相加的に親和性が向上した。このことから部位②、④の官能基付加は独立して親和性を向上させていると考えられる。また親和性の向上に伴い DJ-1 のグリオキシラーゼ活性阻害能も向上した。

以上、本研究により DJ-1 の重要な機能であるグリオキシラーゼ活性を十分な阻害率で阻害する化合物が得られた。

第 5 章

結論

5 章

本研究では、機能解析・薬剤標的評価を見据えた DJ-1 機能阻害剤の獲得を目的とした。

第 2 章ではこれに向けて SPR を用いたフラグメントスクリーニングを実施し、さらに得られた化合物の DJ-1 への結合を ITC、共結晶構造解析、SPR の 3 つの手法によって再確認した。

結果 DJ-1 の Cys106 を中心としたポケットに、 $K_D=3.6 \mu\text{M}$ というフラグメントとしては非常に強い親和性で結合する生体内小分子 Isatin を同定した。

この Isatin はパーキンソン病とも関連が深い分子であることが知られている。特に、MAO-B と呼ばれる酵素は、パーキンソン病治療薬であるセレギリンの標的分子として知られるが、同時に Isatin によっても阻害されることが知られている。Isatin の MAO-B 阻害の K_i は数 μM オーダーであるといわれており、Isatin の生体内濃度がほぼこのオーダーであることを考慮すると、生体内でも同様の阻害が起きている可能性は高い。

今回の研究では、DJ-1 がほぼ同程度の親和性で Isatin と結合することが明らかになった。これは DJ-1 の関与するシグナル伝達経路と MAO-B の関与するシグナル伝達経路が Isatin を介して交差している可能性があることを示しており、パーキンソン病の発生機序を考えらるうえで興味深いと思われる。

続く第 3 章では、これまでに提案されてきた DJ-1 の機能仮説の中から、プロテアーゼ、金属結合、グリオキシラーゼの 3 種を取り上げ、それぞれについて追試および詳細な解析を行った。

まずプロテアーゼ仮説に関してだが、本研究中では、DJ-1 のプロテアーゼ活性は確認されなかった。また、C 末端により DJ-1 のプロテアーゼ活性が制御されているという既報が存在することから、そちらに関しても追試を行ったが、やはりプロテアーゼ活性は確認されなかった。C 末端の切断による変性や凝集の可能性も考えて DSC、SEC、FFF-MALS などの手法により検証を行ったところ、C 末端は安定性と二量体化に強く影響していること

が明らかとなった。このことは結晶構造解析と分子動力学シミュレーションからも裏付けられた。また SEC、DSC のけっかなどを確認した限りでは、精製後の蛋白質に限っては、C 末端の切断によって凝集や変性は起こしていない。つまり、DJ-1 は構造をある程度維持しつつ単量体となっていたということになる。

ゆえにプロテアーゼ活性に関しては、蛋白質の置かれた環境への依存性がきわめて高い可能性があり、阻害の確認実験には適していないと考えられた(このことは細胞内でプロテアーゼ活性が重要な役割を果たしていない、ということは意味しない。なぜなら、特定環境下でプロテアーゼ活性の厳密な制御を望む場合には、環境依存性は有利に働きうるからである)。

続いて行ったのは、金属結合活性に関する研究である。これは、DJ-1 が銅と結合し、銅毒性を防ぎつつ酸化ストレス応答因子 SOD1 の働きを助けるという既報の提案に基づいて行われた。

本研究中で DSF、ITC を用いて DJ-1 と各種遷移金属の親和性を測定したところ、DJ-1 は過去に報告された Cu(II)よりも Zn(II)に対して強く結合するという結果が得られた。結晶構造解析、変異体解析によってもこれは確かめられ、DJ-1 は Cys106, Glu18 を介して Zn(II)と $K_D=0.8 \mu\text{M}$ の親和性で結合することが明らかとなった。この親和性は亜鉛蛋白質としては弱い、既報の銅との親和性($K_D=400 \mu\text{M}$)と比べるとはるかに強い親和性であった。一方銅に関しては、DSF 測定系では DJ-1 を大幅に不安定化させており、高温条件下では DJ-1 に対して大きな影響を与えている可能性が考えられた。ただしこちらも環境依存性が予想される。亜鉛に関しては現時点では DJ-1 との関連については報告がないため、細胞内での重要性も明らかでない。そこで阻害実験の検証に用いるのは見送られた。

最終的に比較的再現性良く確認されたのは、グリオキシラーゼ活性であった。これは Isatin と一部似た分子を基質とする活性である。再現性良く活性が確認できること、線虫などを用いて DJ-1 のグリオキシラーゼ活性の重要性なども報告されていることなどから、

Isatin 及びその類縁体による DJ-1 の機能阻害の確認には、3 種類の仮説の中でも本活性が最も適していると考えられた。

そして実際に Isatin はグリオキシラーゼ活性を阻害した。

第 4 章では、第 2 章で同定された Isatin を基軸に化合物の伸長を試みた。

その際、既に得られている構造情報を活用し、変異体解析と類縁体を用いた解析で、Isatin のどの原子が DJ-1 との相互作用にどの程度影響を及ぼしているかを調べ、市販品の購入の容易さなども検討に入れつつ、最終的に官能基を付加する箇所を定めた。

そしてその 2 か所の片方に官能基を付加したものをいくつか購入し、DSF、ITC を用いて親和性を測定したところ、2 か所それぞれに関して親和性が向上した類縁体を得られた。そして親和性が向上した官能基の付加を組み合わせると、さらに親和性は向上し、おおもととなった Isatin と比べると約 30 倍程度の親和性の向上が観察された。グリオキシラーゼ活性の阻害効率も向上し、最終的に細胞アッセイなどに用いるには十分と考えられる親和性の阻害剤が得られた。

本研究を通して、最終的には 2 つの学術的貢献が果たされた。すなわち、DJ-1 の研究ツールとしての阻害剤の開発と、Isatin を中心とした DJ-1 と MAO-B のシグナル伝達経路の交差の示唆である。本研究が今後のパーキンソン病の病理解明、ひいては疾患治療へとつながることを期待して、結びとする。

参考文献

- [1] D. Nagakubo, T. Taira, H. Kitaura, M. Ikeda, K. Tamai, S. M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga, "DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 231, no. 231, pp. 509–513, 1997.
- [2] V. Bonifati, P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. J. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joosse, J. W. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. a Oostra, and P. Heutink, "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism.," *Science*, vol. 299, no. January, pp. 256–259, 2003.
- [3] D. Jain, R. Jain, D. Eberhard, J. Eglinger, M. Bugliani, L. Piemonti, P. Marchetti, and E. Lammert, "Age- and diet-dependent requirement of DJ-1 for glucose homeostasis in mice with implications for human type 2 diabetes.," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, pp. 221–30, 2012.
- [4] J. E. Tillman, J. Yuan, G. Gu, L. Fazli, R. Ghosh, A. S. Flynt, M. Gleave, P. S. Rennie, and S. Kasper, "DJ-1 binds androgen receptor directly and mediates its activity in hormonally treated prostate cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 10, pp. 4630–4637, 2007.
- [5] T. Kawate, K. Iwaya, R. Kikuchi, H. Kaise, M. Oda, E. Sato, S. Hiroi, O. Matsubara, and N. Kohno, "DJ-1 protein expression as a predictor of pathological complete remission after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 139, pp. 51–59, 2013.
- [6] J. Cao, S. Lou, M. Ying, and B. Yang, "DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 93, no. 3, pp. 241–250, 2014.
- [7] P. M. a Antony, N. J. Diederich, R. Krüger, and R. Balling, "The hallmarks of Parkinson's disease.," *FEBS J.*, vol. 280, no. 23, pp. 5981–93, Dec. 2013.
- [8] R. H. Kim, P. D. Smith, H. Aleyasin, S. Hayley, M. P. Mount, S. Pownall, A. Wakeham, A. J. You-Ten, S. K. Kalia, P. Horne, D. Westaway, A. M. Lozano, H. Anisman, D. S. Park, and T. W. Mak, "Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to

- 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 14, pp. 5215–5220, 2005.
- [9] Y. Yang, S. Gehrke, M. E. Haque, Y. Imai, J. Kosek, L. Yang, M. F. Beal, I. Nishimura, K. Wakamatsu, S. Ito, R. Takahashi, and B. Lu, "Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, pp. 13670–13675, 2005.
- [10] D. J. Moore, L. Zhang, J. Troncoso, M. K. Lee, N. Hattori, Y. Mizuno, T. M. Dawson, and V. L. Dawson, "Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 1, pp. 71–84, 2005.
- [11] T. Yokota, K. Sugawara, K. Ito, R. Takahashi, H. Ariga, and H. Mizusawa, "Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 312, pp. 1342–1348, 2003.
- [12] M. F. Beal, "Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases," *Ann. Neurol.*, vol. 38, pp. 357–366, 1995.
- [13] Y. Zhao and B. Zhao, "Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease," vol. 2013, no. C, 2013.
- [14] C. López-Otín, M. a Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, "The hallmarks of aging.," *Cell*, vol. 153, no. 6, pp. 1194–217, Jun. 2013.
- [15] H. Z. Zeng, Y. Q. Qu, W. J. Zhang, B. Xiu, A. M. Deng, and A. Bin Liang, "Proteomic analysis identified DJ-1 as a cisplatin resistant marker in non-small cell lung cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, pp. 3489–3499, 2011.
- [16] R. H. Kim, M. Peters, Y. Jang, W. Shi, M. Pintilie, G. C. Fletcher, C. DeLuca, J. Liepa, L. Zhou, B. Snow, R. C. Binari, A. S. Manoukian, M. R. Bray, F. F. Liu, M. S. Tsao, and T. W. Mak, "DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN," *Cancer Cell*, vol. 7, no. March, pp. 263–273, 2005.

- [17] D. Hanahan and R. a. Weinberg, “The hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [18] D. Hanahan and R. a. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [19] E. Cadenas and K. J. a. Davies, “Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 29, no. 00, pp. 222–230, 2000.
- [20] T. Taira, Y. Saito, T. Niki, S. M. M. Iguchi–Ariga, K. Takahashi, and H. Ariga, “DJ–1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death.,” *EMBO Rep.*, vol. 5, no. 2, pp. 213–218, 2004.
- [21] J. Cao, M. Ying, N. Xie, G. Lin, R. Dong, J. Zhang, H. Yan, X. Yang, Q. He, and B. Yang, “The Oxidation States of DJ–1 Dictate the Cell Fate in Response to Oxidative Stress Triggered by 4–HPR: Autophagy or Apoptosis?,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 21, no. 10, p. doi: 10.1089/ars.2013.5446, 2014.
- [22] J. I. Lucas and I. Marín, “A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ–1,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, pp. 551–561, 2007.
- [23] J. Lin, J. Prahlad, and M. a. Wilson, “Conservation of oxidative protein stabilization in an insect homologue of parkinsonism–associated protein DJ–1,” *Biochemistry*, vol. 51, pp. 3799–3807, 2012.
- [24] S. J. Lee, S. J. Kim, I. K. Kim, J. Ko, C. S. Jeong, G. H. Kim, C. Park, S. O. Kang, P. G. Suh, H. S. Lee, and S. S. Cha, “Crystal Structures of Human DJ–1 and Escherichia coli Hsp31, Which Share an Evolutionarily Conserved Domain,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 45, pp. 44552–44559, 2003.
- [25] S. Bandyopadhyay and M. R. Cookson, “Evolutionary and functional relationships within the DJ1 superfamily.,” *BMC Evol. Biol.*, vol. 4, p. 6, 2004.
- [26] M. a Wilson, J. L. Collins, Y. Hod, D. Ringe, and G. a Petsko, “The 1.1–Å resolution crystal structure of DJ–1, the protein mutated in autosomal

- recessive early onset Parkinson's disease.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, pp. 9256–9261, 2003.
- [27] X. Tao and L. Tong, "Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 33, pp. 31372–31379, 2003.
- [28] K. Honbou, N. N. Suzuki, M. Horiuchi, T. Niki, T. Taira, H. Ariga, and F. Inagaki, "The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 33, pp. 31380–31384, 2003.
- [29] K. Görner, E. Holtorf, S. Odooy, B. Nuscher, A. Yamamoto, J. T. Regula, K. Beyer, C. Haass, and P. J. Kahle, "Differential Effects of Parkinson's Disease-associated Mutations on Stability and Folding of DJ-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 8, pp. 6943–6951, 2004.
- [30] W. Zhou, M. Zhu, M. a. Wilson, G. a. Petsko, and A. L. Fink, "The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward α -synuclein," *J. Mol. Biol.*, vol. 356, pp. 1036–1048, 2006.
- [31] J. a Olzmann, K. Brown, K. D. Wilkinson, H. D. Rees, Q. Huai, H. Ke, A. I. Levey, L. Li, and L.-S. Chin, "Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 9, pp. 8506–15, Feb. 2004.
- [32] D. J. Moore, L. Zhang, T. M. Dawson, and V. L. Dawson, "A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization.," *J. Neurochem.*, vol. 87, pp. 1558–1567, 2003.
- [33] J. Chen, L. Li, and L. S. Chin, "Parkinson disease protein DJ-1 converts from a zymogen to a protease by carboxyl-terminal cleavage," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 12, pp. 2395–2408, 2010.
- [34] J. Blackinton, M. Lakshminarasimhan, K. J. Thomas, R. Ahmad, E. Greggio, A. S. Raza, M. R. Cookson, and M. a. Wilson, "Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, pp. 6476–6485, 2009.

- [35] M. a Wilson, "The role of cysteine oxidation in DJ-1 function and dysfunction.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 15, no. 1, pp. 111–122, 2011.
- [36] R. M. Canet–Avilés, M. a Wilson, D. W. Miller, R. Ahmad, C. McLendon, S. Bandyopadhyay, M. J. Baptista, D. Ringe, G. a Petsko, and M. R. Cookson, "The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine–sulfenic acid–driven mitochondrial localization.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, pp. 9103–9108, 2004.
- [37] H. Mitsugi, T. Niki, K. Takahashi–Niki, K. Tanimura, K. Yoshizawa–Kumagaye, M. Tsunemi, S. M. M. Iguchi–Ariga, and H. Ariga, "Identification of the recognition sequence and target proteins for DJ-1 protease," *FEBS Lett.*, vol. 587, no. 16, pp. 2493–2499, 2013.
- [38] S. Koide–Yoshida, T. Niki, M. Ueda, S. Himeno, T. Taira, S. M. M. Iguchi–Ariga, Y. Ando, and H. Ariga, "DJ-1 degrades transthyretin and an inactive form of DJ-1 is secreted in familial amyloidotic polyneuropathy," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 19, pp. 885–893, 2007.
- [39] A. Malki, T. Caldas, J. Abdallah, R. Kern, V. Eckey, J. K. So, S. S. Cha, H. Mori, and G. Richarme, "Peptidase activity of the Escherichia coli Hsp31 chaperone," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 15, pp. 14420–14426, 2005.
- [40] T. C. Squier, "Oxidative stress and protein aggregation during biological aging," *Exp. Gerontol.*, vol. 36, pp. 1539–1550, 2001.
- [41] S. Girotto, L. Cendron, M. Bisaglia, I. Tessari, S. Mammi, G. Zanotti, and L. Bubacco, "DJ-1 Is a copper chaperone acting on SOD1 activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, pp. 10887–10899, 2014.
- [42] M. R. Puno, N. a. Patel, S. G. Møller, C. V. Robinson, P. C. E. Moody, and M. Odell, "Structure of Cu(I)–bound dj-1 reveals a biscysteinate metal binding site at the homodimer interface: Insights into mutational inactivation of dj-1 in parkinsonism," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. I, pp. 15974–15977, 2013.
- [43] X. M. Xu, H. Lin, J. Maple, B. Björkblom, G. Alves, J. P. Larsen, and S. G. Møller, "The Arabidopsis DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 10, pp. 1644–51, May 2010.

- [44] J. Y. Lee, J. Song, K. Kwon, S. Jang, C. Kim, K. Baek, J. Kim, and C. Park, "Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 14, pp. 3215–3225, 2012.
- [45] D. Choi, J. Kim, S. Ha, K. Kwon, E.-H. Kim, H.-Y. Lee, K.-S. Ryu, and C. Park, "Stereospecific mechanism of DJ-1 glyoxalases inferred from their hemithioacetal-containing crystal structures," *FEBS J.*, vol. 281, pp. 5447–5462, 2014.
- [46] K. P. Subedi, D. Choi, I. Kim, B. Min, and C. Park, "Hsp31 of Escherichia coli K-12 is glyoxalase III," *Mol. Microbiol.*, vol. 81, no. July, pp. 926–936, 2011.
- [47] S. Hasim, N. A. Hussin, F. Alomar, K. R. Bidasee, K. W. Nickerson, and M. a Wilson, "A Glutathione-independent Glyoxalase of the DJ-1 Superfamily Plays an Important Role in Managing Metabolically Generated Methylglyoxal in Candida albicans.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 3, pp. 1662–74, Jan. 2014.
- [48] T. Yamane, S. Suzui, H. Kitaura, K. Takahashi-Niki, S. M. M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga, "Transcriptional activation of the cholecystokinin gene by DJ-1 through Interaction of DJ-1 with RREB1 and the effect of DJ-1 on the cholecystokinin level in mice," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, 2013.
- [49] W. a Weiss, S. S. Taylor, and K. M. Shokat, "Recognizing and exploiting differences between RNAi and small-molecule inhibitors.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 739–744, 2007.
- [50] A. M. Giannetti, *From eperimental design to validated hits: A comprehensive walk-through of fragment lead identification using surface plasmon resonance*, 1st ed., vol. 493. Elsevier Inc., 2011, pp. 169–218.
- [51] P. J. Hajduk and J. Greer, "A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. March, pp. 211–219, 2007.
- [52] M. M. Hann, a R. Leach, and G. Harper, "Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery.," *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 856–64, 2001.

- [53] S. Núñez, J. Venhorst, and C. G. Kruse, "Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery.," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 1–2, pp. 10–22, Jan. 2012.
- [54] J. E. Ladbury, G. Klebe, and E. Freire, "Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. jANuAry, pp. 23–27, 2010.
- [55] C. Binda, M. Li, F. Hubalek, N. Restelli, D. E. Edmondson, and A. Mattevi, "Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high–resolution crystal structures.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 17, pp. 9750–9755, 2003.
- [56] I. Pharmacological and N. Hamaue, "Pharmacological Role of Isatin, an Endogenous MAO Inhibitor," *YAKUGAKU ZASSHI*, vol. 123, no. 4, pp. 352–362, 2000.
- [57] V. Glover, J. M. Halket, P. J. Watkins, a Clow, B. L. Goodwin, and M. Sandler, "Isatin: identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin.," *J. Neurochem.*, vol. 51, pp. 656–659, 1988.
- [58] A. Medvedev, O. Buneeva, and V. Glover, "Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy," *Biol. Targets Ther.*, vol. 1, no. 2, pp. 151–162, 2007.
- [59] P. Workman and I. Collins, "Probing the Probes: Fitness Factors For Small Molecule Tools," *Chem. Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 561–577, 2010.

謝辞

本研究におきましては、研究する上で素晴らしい環境、適切なアドバイスおよび指導を与えてくださいました津本浩平教授に感謝いたします。常識も大事だけれどもまずは実験事実を大切に、必要とあらば常識を捨て、そのうえで実験事実を説明できる理論を構築していくという姿勢は、私が研究を進めるうえでたびたび重要な指針を与えてくださいました。先生が教えてくださった相互作用の世界の知識はもちろんですが、それ以上に先生が伝えてくださった研究姿勢によって本研究は成り立っております。厚く御礼申し上げます。

副査としてお世話になりました伊藤耕一教授にお礼申し上げます。先生からいただいたご指摘により、本博士論文は構成がよりわかりやすく、論理的なものとなりました。

副査としてお世話になりました本田真也教授にお礼申し上げます。本論文中でも特に重要な、Isatin と DJ-1 の反応機構に関する精密な解析は、本田先生からのご指摘があればこそです。

副査としてお世話になりました和田猛教授にお礼申し上げます。Isatin の化学的な性質の解析や、Isatin に基づいた阻害剤の開発を進めるうえで、いくつもの重要なご指摘をいただきました。

副査としてお世話になりました富田野乃准教授にお礼申し上げます。DJ-1 と Isatin の生物学的な関連性について多くのアドバイスをいただきました。

次に当研究室主幹研究員の Jose M. M. Caaveiro 先生にお礼を申し上げます。本研究の基本的な性質の多く、特に結晶構造解析の多くは Jose 先生のお力添えがあって初めて成り立つものです。またそれだけではなく、Jose 先生は研究で重要なのは何よりも情熱であることを体感させてくださいました。今後もこの熱が続く限りは研究を続けていきたいと考えております。

また、本研究、特にスクリーニングに関してご指導いただいた当研究室の助教、長門石

暁先生にお礼を申し上げます。スクリーニング系を立ち上げる際にくじけそうになったのを乗り越えられたのは、先生のご指導があつてこそでした。

Indiana 大学の Quyen Q. Hoang 教授にお礼を申し上げます。DJ-1 の物性解析を進めるうえで必要となった基本的な実験の多くは、教授との討論に基づき決定されました。

Indiana 大学の Chun – Xiang Wu さんにお礼を申し上げます。DJ-1 の物性解析の実験のいくつかは彼との共同研究により行われました。中でもプロテアーゼアッセイは彼が主導した実験であり、本論文中でも重要な位置を占めております。

当研究室の特任研究員、秋葉宏樹さんにお礼を申し上げます。本研究を進めるうえで必要な有機化学、反応理論に関して数多くの貴重なご助言をいただきました。

同じく特任研究員、木吉真人さんにお礼を申し上げます。パーキンソン病、癌等の難病に関する薬学について貴重なご助言をいただきました。

同級生の松長遼君、ありがとうございます。研究上の助言ももちろんですが、それ以上に、ひたむきに自分の行うべきことにまい進する松長君の姿を、私は目標にしております。

当研究室の博士後期課程 2 年である工藤翔太君、田中耕路君にお礼を申し上げます。二人の研究に対する情熱にときに圧倒され、ときに競争心を掻き立てられたのは、本研究を進めるうえで素晴らしい環境だったと思います。

その他当研究室に所属するもしくは当研究室とともに研究を行ったすべての職員、学生にお礼を申し上げます。

最後に、私を慈しみ育ててくださいました父母と弟にお礼を申し上げます。3 人から頂いたご恩に見合うだけの仕事をしようというのが、本研究を進める原動力でした。本研究だけでなく、今後の私の仕事がそれに値するものとなりますよう、今後も精進してまいります。