

## NMR を用いた DJ-1 機能の解明

東京都医学総合研究所

松田憲之

### 1. 成果の概要 (1~2 ページ)

#### 研究の背景と実施内容

遺伝性パーキンソン病(PD)の原因遺伝子の研究から、PD 発症メカニズムに関して多くのことが分かりつつある。DJ-1 は潜性遺伝性 PD である PARK7 の原因遺伝子であるが、DJ-1 の分子機能については諸説あって議論が続いており、未だ謎に包まれている。興味深いことに、原核生物(細菌)のゲノム中にも DJ-1 のホモログが存在しており、細菌の DJ-1 相同遺伝子は内在性アルデヒドであるメチルグリオキサール(MGO)の解毒に関与することが報告されている。

原核生物 DJ-1 ホモログの機能から手がかりを得て、研究実施者は DJ-1 の分子機能がミトコンドリアを障害するアルデヒド結合体、つまり「ミトコンドリア機能に必須な補酵素 A(CoA)と MGO の複合体」の加水分解反応を介した解毒にあることを既に報告している (Matsuda ら, Sci. Rep. 2017)。しかしながら、MGO-CoA 複合体が DJ-1 の「生体内の真の基質」なのかどうかは不明である。実際、DJ-1 が MGO 以外のアルデヒドに対しても作用するかどうかは殆ど解析されておらず、また予想される反応産物が産生されているかどうかまで厳密に確認した仕事も殆ど存在しない。そこで NMR を用いて、他のアルデヒドに対する DJ-1 の作用を検討するとともに、DJ-1 の反応様式を解析し、最終的には本研究を通じて DJ-1 の新規基質の同定を目指した。

まず、MGO あるいはグリオキサール(GO)と DJ-1 を反応させた際の化学反応を観察した。重水リン酸 buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.0 in D<sub>2</sub>O) 中で、10 mM MGO/GO と 20 μM の野生型(WT)DJ-1 あるいは不活性型 DJ-1 変異体(C106S)を反応させた後に、溶液 600MHz NMR 装置を用いて <sup>1</sup>H スペクトルを測定し、両者の化学シフトパターンの差から、MGO/GO が DJ-1 によって別な物質に変換されるかどうかを検討した。また、他のアルデヒドに対する DJ-1 の作用を検討するために、各々 10 mM のグリセルアルデヒド・ギ酸・ホルミルメチオニン・ジメチルホルムアミド・グリオキシル酸を重水リン酸 buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.0 in D<sub>2</sub>O) 中で 20 μM の野生型(WT) DJ-1 あるいは不活性型 DJ-1 変異体(C106S)と反応させ、同様に溶液 600MHz NMR 装置を用いて 1 次元 <sup>1</sup>H スペクトルの変化を測定した。

さらに、反応後の最終産物を確認するために、MGO の加水反応後の生成物として予想される乳酸、GO の加水反応後の生成物として予想されるグリコール酸についても、<sup>1</sup>H NMR で化学シフトを測定し、「MGO や GO と DJ-1 の反応産物」の化学シフトパターンとの比較解析を行なった。

#### 本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較

上述の条件下で、10 mM MGO を 20 μM の野生型(WT) DJ-1 あるいは不活性型 DJ-1 変異体(C106S)と反応させた後に <sup>1</sup>H スペクトルを測定したところ、まず MGO 単独で予想外の場所に化学

シフトのシグナルが観察された。つまり、MGO を  $^1\text{H}$  NMR で測定すると帰属困難な2ピークが観察されたが、それらは MGO の2つのカルボニル基の一方あるいは両方に水が付加したヘミアセタールに由来すると考えることで、矛盾なく解釈が可能であった。ここに野生型 DJ-1 を反応させると化学シフトのパターンが大きく変化する一方、変異型 DJ-1(C106S)と反応させても化学シフトのパターンは変化しなかった。MGOと同様に  $\alpha$ -oxoaldehyde であるグリオキサール(GO)を野生型 DJ-1 と反応させた場合も、DJ-1 変異体(C106S)と反応させたものと比較して、化学シフトパターンが大きく変化した。

一方で、MGO や GO 以外のアルデヒドとしてグリセルアルデヒド・ギ酸・ホルミルメチオニン・ジメチルホルムアミド・グリオキシル酸などを DJ-1 と反応させた際には、化学シフトのパターン変化は観察されなかった。これらの結果から、DJ-1 が加水反応の基質として使用できるアルデヒドは、 $\alpha$ -oxoaldehyde に限定されることが示唆された。

想定された加水反応が起きているかどうかを確認するために、1) MGO と DJ-1 を反応させた後の  $^1\text{H}$  NMR 化学シフトのパターンと、加水反応後の生成物として予想される乳酸の化学シフトのパターンを比較するとともに、2) GO と DJ-1 を反応させた後の  $^1\text{H}$  NMR 化学シフトのパターンと、加水反応後の生成物として予想されるグリコール酸の化学シフトのパターンを比較した。比較対象に用いた2者の化学シフトパターンは良く一致したことから、確かに予想通りの反応が起きていることが確認された。さらに基質類似物として、 $\alpha$ -oxoaldehyde (=  $\alpha$ -ケトアルデヒド) に類似した  $\alpha$ -ケト酸を選択して、DJ-1 と反応させてシグナルを観察した。MGO に対応する類似  $\alpha$ -ケト酸としてピルビン酸、GO に対応する類似  $\alpha$ -ケト酸として Glyoxylic acid を DJ-1 と反応させたが、化学シフトのパターン変化は全く観察されなかった。

以上の結果をまとめると、NMR を用いた厳密な検討実験から、DJ-1 は  $\alpha$ -oxoaldehyde に加水反応を行なうこと、 $\alpha$ -ケト酸と反応しないこと、最終産物は  $\alpha$ -hydroxy acid であることが示された。このように、「新規基質の同定」はできなかったが、それ以外の「反応様式の解析・解明」については当初目標を達成できた。

## 今後の展開、課題

今後の展開としては、アセトアルデヒド・ホルムアルデヒド・アクロレイン・4-Hydroxynonenal 等のまだ試していない生体内アルデヒドを DJ-1 と反応させて、変化を観察する実験が考えられる。ただし、ホルムアルデヒドはそれ自身が DJ-1 タンパク質と架橋して DJ-1 の酵素活性を減弱させることが予想されるし、アクロレインや 4-Hydroxynonenal はその反応性の高さ故に試薬自身を安定して使用することが困難であり、これら問題点を解決してから実験を行なう必要があるだろう。DJ-1 は遺伝性潜性 PD(パーキンソン病)の原因遺伝子なので、その機能喪失が PD の発症につながることは間違いない。仮に DJ-1 の真の分子機能がアルデヒド自体の解毒反応であれば、(1) DJ-1 によって分解されるべきアルデヒドの蓄積をモニターすることで、PD 発症のリスクを評価する、(2) そのアルデヒドの蓄積を防ぐ(分解を促進する)阻害物質として治療薬シーズを検索する、というような社会的・経済的に波及効果をもつアウトプットが期待できる。

## 2. 利用における感想(改善要望等を含む)

研究実施者は NMR 解析の素人であり、600MHz NMR 装置を使うことなど本来はできない立場であるが、理研スタッフの松上先生・林先生に測定をフォローしていただくことで、無事に NMR 解析を行なって実験データを得ることができた。非常に感謝している。

一方で、おそらくプログラミングの知識がないと機器の操作内容を理解できないところがあり、私はプログラミングの知識が皆無なので、教えてくださった松上先生・林先生に大きな負担をかけていたと思われる。プログラミングの知識が無くても直感的に操作可能であれば、あるいは素人向けの操作マニュアルがあれば、もう少し簡単に使わせていただくことができるのかもしれない。(もちろん高額機器なので、いずれにしても理研スタッフの方に立ち合っでご確認をいただく必要はあると思われるが、もう少しご負担をかけずに済むかもしれない)。

## 3. 利用周辺環境に関する希望

特になし

## 4. 今後の利用予定

研究は継続しており、いつか再び NMR を使用させていただきたいと思っている。

## 5. 今後期待するその他のサービス

特になし

## 6. その他

特になし

## 7. 利用実施時期及び期間

2018 年 1 月 10 日 ~ 2018 年 1 月 11 日

当初計画どおり

## 8. 利用研究基盤

溶液 600MHz      2018 年 1 月 10 日~2018 年 1 月 11 日      (1 日間)