

実施課題名 低分子化合物NMRによるDJ-1の真の基質解明のための技術開発

【背景】(実施課題の背景・目的を簡潔に具体的に記載してください。)

DJ-1は潜性(劣性)遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるが、その分子機能については諸説あり、未だ謎に包まれている。実施責任者はDJ-1が「チオールと結合した内在性アルデヒド:メチルグリオキサール(MGO)の加水分解酵素としての活性を有する」ことを報告したが(松田ら, Sci. Rep. 2017)、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不明であり、また想定される反応産物が実際に産生されているかどうかを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、MGO以外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た。

【実施内容】(別紙の利用報告書に記載してある実施内容を簡潔に具体的に記載してください。)

重水リン酸 Buffer 中で MGO を野生型 DJ-1 あるいは不活性型 DJ-1 変異体(C106S)と反応させた後に、理化学研究所の 600MHz NMR装置を用いて¹Hスペクトルを測定した。両者の化学シフトパターンに差が生じるかどうかを検討したところ、野生型 DJ-1 と反応させた時に MGO の化学シフトのパターンが大きく変化した(Fig.1, 星印)。MGO と同様の α-oxoaldehyde であるグリオキサール(GO)を野生型 DJ-1 と反応させた際にも化学シフトのパターン変化が観察されたが、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の他のアルデヒドを DJ-1 と反応させた際には、パターン変化は観察されなかった。MGO や GO に DJ-1 が作用すると、MGOからは乳酸が、GOからはグリコール酸が産生すると予想される。そこで、MGO と DJ-1 を反応させた後の化学シフトのパターンと乳酸の化学シフトのパターンを、あるいは GO と DJ-1 を反応させた後の化学シフトのパターンとグリコール酸の化学シフトのパターンを比較したところ、両者は良く一致した(Fig.2, 星印)。さらに MGO に類似するα-ケト酸としてピルビン酸を、GO に類似するα-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。このようにNMRを用いた厳密な検討実験から、(1) DJ-1 はアルデヒドの中でもα-oxoaldehyde を基質にすること、(2) α-ケト酸とは反応しないこと、(3) DJ-1 が作用した後の最終産物はα-hydroxy acid であること、が示された (Fig. 3)。

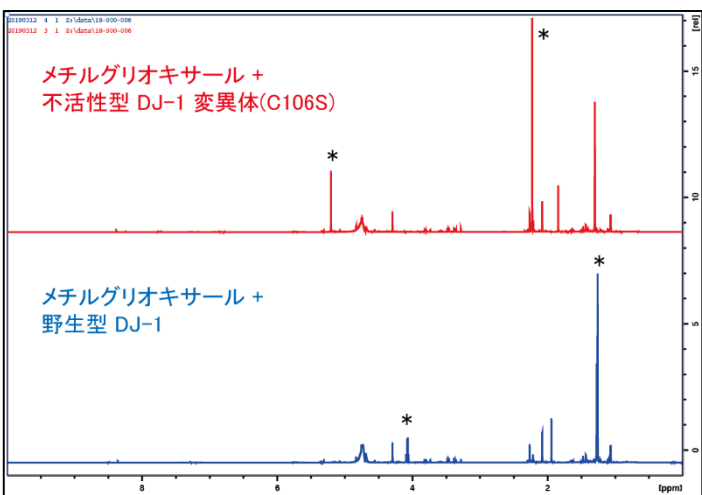


Fig.1 MGO + 野生型 DJ-1 反応産物と、MGO + 変異型 DJ-1 反応産物の化学シフトパターンの比較

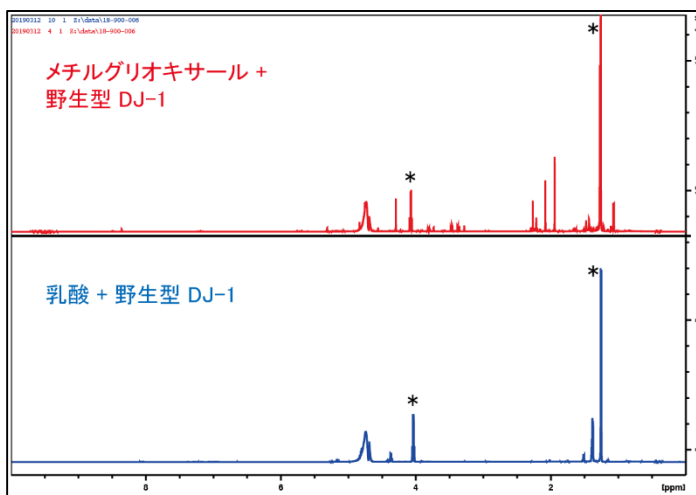


Fig.2 MGO + 野生型 DJ-1 の反応産物と、乳酸の化学シフトパターンの比較

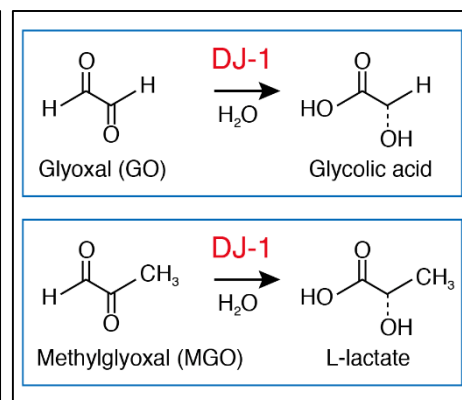


Fig.3 本研究で確認された DJ-1 と GO あるいは MGO の反応様式

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF18-01-R-013			
利用課題名	低分子化合物 NMR による DJ-1 の真の基質解明のための技術開発			
実施機関名	東京都医学総合研究所			
実施部署名	生体分子先端研究分野 ユビキチンプロジェクト			
実施責任者管理職名・氏名	職名	プロジェクトリーダー	氏名	松田 憲之
実施部署所在地	156 - 8506 東京都世田谷区上北沢 2-1-6			
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	<p>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 <i>PARK7</i> 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。</p> <p>DJ-1 が他の PD 原因因子と大きく異なる点は、原核生物(細菌)のゲノム中にもホモログが存在することである。つまり、DJ-1 はパーキンソン病 (PD) の原因遺伝子であるにもかかわらず、神経を持たない植物や酵母、さらには細菌のような原核生物に相同遺伝子が存在する。また細菌の <i>DJ-1</i> 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。</p> <p>原核生物 DJ-1 ホモログの機能から手がかりを得て、実施責任者は 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示唆する結果を得た。2017 年に実施責任者はこのことを論文で報告したが (Matsuda ら, <i>Sci. Rep.</i> 2017)、一方で MGO-CoA 複合体が DJ-1 の唯一かつ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す。</p>			
利用実施時期、及び期間 (チェックボックスにチェックを入れてください)	平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日 総利用日数： 2 日間			

		<input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)
利用施設 理化学研究所	NMR装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・(○) 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1 : 平成 30 年 5 月 15 日～平成 30 年 5 月 15 日 (1 日間) 利用期間 2 : 平成 31 年 3 月 12 日～平成 31 年 3 月 12 日 (1 日間)
その他の 利用施設		※4 NMR 施設以外の装置、支援などを利用した場合は記載してください 利用無し。
成果の 概要	実施内容 (字数制限はあり ませんが 400 字～ 800 字以内(程度)で お書きください。)	※申請書との整合性にご配慮ください。 実施責任者は DJ-1 が MGO-CoA を分解することを示したが、その反応効率の低さから、DJ-1 の標的が他にも存在する可能性は否定できない。そこで、まずは NMR を用いて MGO 以外のアルデヒドに対する DJ-1 の作用を検討するとともに、MGO に対する DJ-1 の反応様式を解析した。 吸光度で反応を追う際には、288nm に吸収を持つ MGO-CoA hemithioacetal を基質として用いるメリットが存在したが、NMR を用いて反応を追跡する際にはシグナルが煩雑になる。そこで、まず DJ-1 と MGO を単独で反応させた際に 1H NMR でどのような化学シフトが観察されるかどうかを観察した。 重水リン酸 buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.0 in D ₂ O) 中で、10 mM MGO と 20 uM の精製した野生型 (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 1H スペクトルを測定し、両者の化学シフトパターンに差が現れるかどうかを検討することで、反応液中に含まれる MGO が DJ-1 によって変化す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、10 mM 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 ₂ O) 中で 20 uM 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 1H 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、グリオキサール (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、1H 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。最後に基質の特異性を確認するために、MGO や GO の類似物 (α -oxoaldehyde / α -ケトアルデヒドに対応する α -ケト酸) であるピルビン酸や Glyoxylic acid についても DJ-1 と反応後に 1H NMR で化学シフトを測定した。

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>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 600MHz NMR 装置を用いて 1H スペクトルを測定し、両者の化学シフトパターンが変化するかどうかを検討したところ、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 1H NMR で測定すると帰属困難な 2 ピークが観察されるが、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られた。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 と同様の α-oxoaldehyde であるグリオキサール (GO) を 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0 in D₂O) 中で野生型 DJ-1 と反応させた際にも、不活性型 DJ-1 変異体(C106S) と反応させたものと比較して、化学シフトのパターンが大きく変化した。</p> <p>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、α-oxoaldehyde に限定されることが示唆された。</p> <p>また、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 1H 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 1H 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。</p> <p>さらに基質類似物として、α-oxoaldehyde (= α-ケトアルデヒド) に類似した α-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 α-ケト酸としてピルビン酸、GO に対応する類似 α-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。以上の結果から、NMR を用いた厳密な検討実験からも、DJ-1 は α-oxoaldehyde に加水反応を行なうこと、α-ケト酸とは反応しないこと、最終産物は α-hydroxy acid であることが示された。</p>
<p>成果発表</p>	<p>※本課題利用による論文・学会発表・特許(出願中含む)等で本事業に関連する謝辞を記載頂いた成果について、可能な範囲で記載して下さい。</p> <p>(謝辞の記載例【英文】: <i>The NMR experiments were performed at (機関名) of NMR Platform supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.</i></p> <p>【和文】: 本研究の NMR 測定は、文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR 共用プラットフォーム」の(機関名)を利用しました。</p> <p>本課題利用による成果は、将来的に論文として発表する予定です。</p>

<p>今後の展開 (字数制限はありませんが300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>※特に、本課題により得られた NMR 技術を用いた応用について</p> <p>本課題から得られた NMR の知見を活かした今後の展開として、アセトアルデヒド・ホルムアルデヒド・アクロレイン・4-Hydroxynonena 等のまだ試していない生体内アルデヒドを DJ-1 と反応させてその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-Hydroxynonena 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、これら問題点の解決方法を考えてから実験を行なう必要がある。</p> <p>一方で、アルデヒドは反応性の高さから工業的に重要であり、近年ではファンconi貧血なども含めてヒト疾患との関連も注目されつつあるので、NMR による測定・帰属方法を確立することは、最先端技術開発や将来的な実用性向上につながると期待される。そのために、今後とも測定結果を開発サイドにフィードバックすることにより、NMR 技術領域の最先端技術開発につながるように心がけていきたい。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し (字数制限はありません 300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>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、あるいはアルデヒドの結合した低分子の加水分解を介した解毒反応であれば、(1) DJ-1 によって分解されるべき基質: アルデヒド - 低分子化合物結合体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 - 低分子化合物結合体の蓄積を防ぐ(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。さらに生理的な証拠を得ていくことで「アルデヒド修飾による神経変性疾患」という新たなパラダイムの確立も考えられる。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。なお複数機関の利用の場合は、どの施設に対する感想かも明記して下さい。</p> <p>本施設を利用して良かった点: 実施責任者は 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。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>※特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前に利用機関先の課題担当者にご相談ください。</p> <p>() あり : (○) なし 「あり」の場合理由:</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 本当に有難うございました。今後とも、宜しくお願い致します。</p>