

# DJ-1 とプロリン生合成酵素 PYCR1 の相互作用の解析

生命科学院 環境応答統御学分野

梶 勇輔

## (背景と目的)

DJ-1 は新規の癌遺伝子として当研究室で同定され、後に、脳神経疾患パーキンソン病の家族性原因遺伝子 (PARK7) であることも報告された。DJ-1 遺伝子産物は転写調節、抗酸化ストレス、ミトコンドリア complex I 制御などの様々な機能を有し、それらの機能が亢進すると細胞を癌化させ、逆に機能が破綻するとパーキンソン病や脳卒中などの疾患が発症すると考えられている。この DJ-1 の持つ多くの機能は、様々なタンパク質との複合体形成により発現していると考えられ、MALDI-TOF MS による DJ-1 結合タンパク質の単離同定により、新たにプロリン生合成酵素 Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (PYCR1) が同定された。本研究では、抗酸化活性をもつプロリンの生合成系と、同じく抗酸化活性をもつ DJ-1 との関連を検討するために、DJ-1 と PYCR1 の相互作用、及び DJ-1 のプロリン生合成への関与について解析した。

## (結果)

ヒト培養細胞で強制発現させた HA-DJ-1 と F-PYCR1 について、免疫沈降法により *in vivo* での相互作用が示された。また、大腸菌で発現させ精製した GST-DJ-1 と、*in vitro* 転写・翻訳系で合成した <sup>35</sup>S-F-PYCR1 を用いた *in vitro* pull-down 法により GST-DJ-1 とともに PYCR1 が共沈降した。

更に、細胞内における DJ-1 と PYCR1 の局在を蛍光免疫染色法により観察した。DJ-1 は細胞全体にわたって局在し、PYCR1 はミトコンドリアに局在した。DJ-1 はミトコンドリアにも局在しており、両者は細胞内ではミトコンドリアで共局在し、相互作用していることが示唆された。

次に、DJ-1 との相互作用が、PYCR1 酵素活性にどのような影響を与えるかを検討するため、DJ-1 ノックダウン細胞のプロリン含量を acid-ninhydrin 法により測定した。その結果、DJ-1 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べてプロリン含量が増加することが示された。

## (考察及び結論)

PYCR1 は補酵素 NADH、NADPH 依存的に生体内で Pyrroline-5-carboxylate (P5C) を還元し、プロリンを生合成する酵素である。P5C は活性酸素種の生成に関与し、アポトーシスを促進する。その一方で、プロリンはタンパク質の原料アミノ酸としてだけではなく、アポトーシス抑制、抗酸化などの生理活性を示すことが報告されており、PYCR1 は P5C/プロリン量を調節することで細胞増殖や細胞死に関与すると考えられる。本研究より DJ-1 と PYCR1 は相互作用すること、並びに DJ-1 非存在下で細胞内プロリン含量が増加することが示された。これらのことから、DJ-1 は PYCR1 に結合して酵素活性を抑制する、あるいは、DJ-1 が欠損している場合の酸化ストレスに対する防御策として PYCR1 酵素反応が亢進し、細胞内にプロリンを蓄積させることが示唆された。以上より、PYCR1 は DJ-1 と協調的に酸化ストレス応答に寄与する可能性が考えられる。