

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390291

研究課題名(和文) 有棘赤血球舞踏病におけるオートファジー性神経変性の分子的機序の解明と治療的研究

研究課題名(英文) Autophagic neurodegeneration in molecular pathogenesis of chorea-acanthocytosis

研究代表者

佐野 輝 (Sano, Akira)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30178800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：有棘赤血球舞踏病の責任タンパク質であるコレインを強制発現させた培養細胞を用いた研究の結果、コレインは、 $\alpha$ -チューブリン、ヒストン脱アセチル化酵素6(HDAC6)と相互作用し、 $\alpha$ -チューブリンの脱アセチル化を促進する可能性が示された。また、コレインは飢餓誘発性細胞死に対し抑制的に働くが、HDAC6阻害剤を培養液に添加するとこの作用が弱まる。HDAC6は、飢餓誘発性オートファジーとも関わるということが報告されている。飢餓誘発性オートファジーに関わる細胞死抑制機構の破綻が有棘赤血球舞踏病の分子病態の一つである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Co-immunoprecipitation assay using extracts from chorein-overexpressing cells showed that chorein, the protein responsible for chorea-acanthocytosis (ChAc), co-precipitated with  $\alpha$ -tubulin and HDAC6, probably leading to facilitation of  $\alpha$ -tubulin deacetylation. Cell viability assay revealed that cells stably expressing chorein, significantly preserved cell viability during nutrient deprivation. These results suggest that chorein interacts with the cytoskeletal proteins and may play an important role in autophagic process, including in the protection against starvation-induced cell damages. Disruption of this cell protection mechanism may be involved in molecular pathogenesis of ChAc.

研究分野：精神神経医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：有棘赤血球舞踏病 chorein オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

有棘赤血球舞踏(chorea-acanthocytosis; ChAc)は有棘赤血球症と Huntington 病類似の症状を呈する神経変性疾患であり、常染色体劣性遺伝形式を呈する。責任遺伝子は *VPS13A* 遺伝子変異であり、塩基数は約 250kb で 73 エクソンからなり、mRNA は約 10kb である。これまでに我々が行ってきた遺伝子解析を含めて、変異は *VPS13A* 遺伝子上に点変異や CNV など多岐にわたり広範囲に存在することが示されている。遺伝子産物 chorein の推定分子量は約 360kDa の大きなタンパク質であるが、赤血球膜分画のウェスタンブロットでは ChAc 患者は truncated protein を含めて chorein のバンドは認めておらず、ChAc 患者では chorein が欠損していることが示されている。chorein は脳などの臓器に豊富に発現しているが、その詳細な機能についてはいまだ明らかでなく、ChAc の分子病態も不明であった。

## 2. 研究の目的

我々は HEK293 細胞での飢餓誘発オートファジーにおいて chorein の発現が増加を示し、また ChAc 患者由来リンパ芽球では飢餓反応誘発オートファジーの反応が遅れることを予備的に観察した。これらの事実は、ChAc における神経細胞死にオートファジーが関わる可能性を示唆している。Parkinson 病や Huntington 病などの神経変性疾患において原因となる異常な蛋白質の蓄積はオートファジーを誘導して発症が抑えられることが近年明らかにされているが、今回の研究で、オートファジー誘導性細胞死に chorein が関わる機構を分子的に検討する。

## 3. 研究の方法

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に、tag と

して C 末に cMyc と FLAG を融合させた全長 *VPS13A*-cDNA を導入した stable transformant 細胞株を作成し以下の研究を行った。

### 1) Cell viability の解析

同細胞と Mock 細胞に対して無血清培地を用いて飢餓状態とし、経時的に MTS 活性を測定し、cell viability を比較した。

### 2) 免疫沈降

chorein-myc-FLAG 安定発現細胞を用いて Tag タンパクの myc と FLAG の両抗体、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体ビーズや抗 HDAC6 抗体ビーズで免疫沈降を行い共沈物を SDS-PAGE 展開し、chorein や  $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -tubulin、HDAC6 の western blot を行った。

### 3) 微小管脱重合剤による細胞障害

Chorein 安定発現細胞と Mock 細胞に対して Nocodazole 処理を行い経時的に MTS assay によって cell viability を比較した。

### 4) $\alpha$ -tubulin のアセチル化の検討

Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞を用い、acetylated tubulin の western blot 法による免疫反応の比較を行った。

### 5) HDAC6 阻害剤による飢餓誘発性オートファジーと chorein の関連

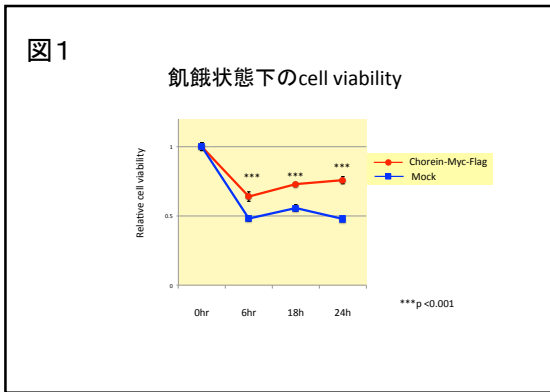
Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞に無血清培地を用いて飢餓状態とし、経時的に MTS assay によって cell viability を検討し、HDAC6 の tubulin への作用を特異的に阻害する tubacin による cell viability の変化を確認した。(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験を必要とするため、鹿児島大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行った(承認番号 19059 平成 21 年 3 月 16 日)。

## 4. 研究成果

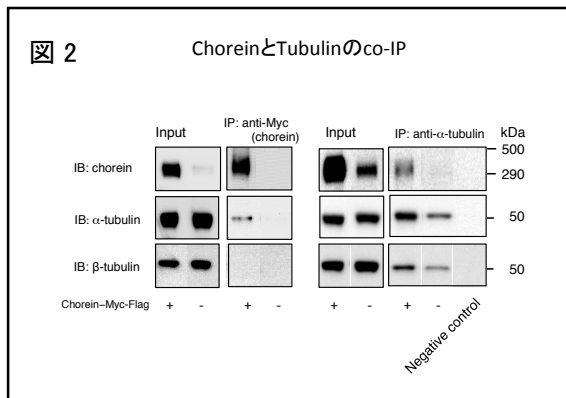
### 1) 飢餓誘発時の cell viability

chorein 安定強発現細胞は、無血清培地による飢餓誘発 6 時間後、18 時間、24 時間後の cell viability は mock 細胞と比較して有意に高かった(図 1)



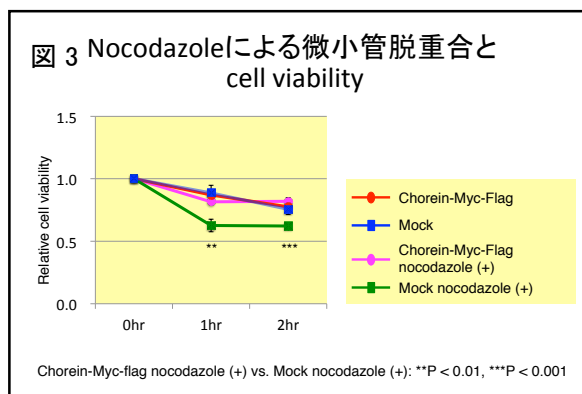
## 2) chorein と $\alpha$ -tubulin の免疫沈降

chorein 安定強発現細胞から抽出したタンパク質について抗 myc 抗体のビーズや抗  $\alpha$ -tubulin 抗体ビーズによって免疫沈降を行った。Western blot で chorein は  $\alpha$ -tubulin と共沈している事が示された (図 2)



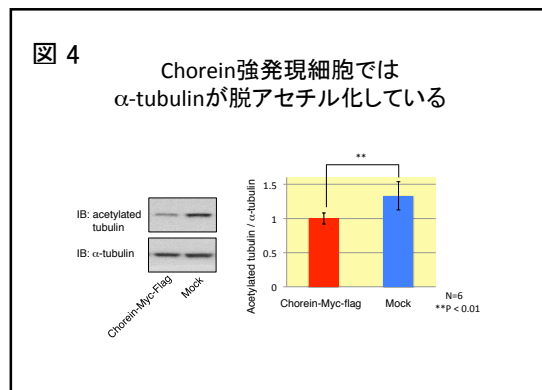
## 3) 微小管脱重合と cell viability

Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞に対して微小管脱重合剤である Nocodazole を培地に添加し、経時的に MTS assay によって cell viability を比較した。Nocodazole 添加1時間後、2時間後において chorein 安定強発現細胞は Mock 細胞と比較して、cell viability が有意に高かった(図 3)。



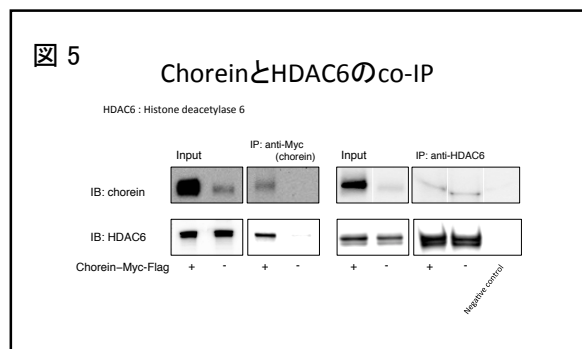
## 4) $\alpha$ -tubulin のアセチル化の検討

Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞を用い、acetylated tubulin の Western blot 法による免疫反応の比較を行ったところ、chorein 強発現細胞では Mock 細胞と比較して acetylated tubulin の免疫反応が有意に低く、chorein 安定強発現細胞では  $\alpha$ -tubulin の脱アセチル化が亢進している事が示唆された (図 4)



## 5) chorein と HDAC6 の免疫沈降

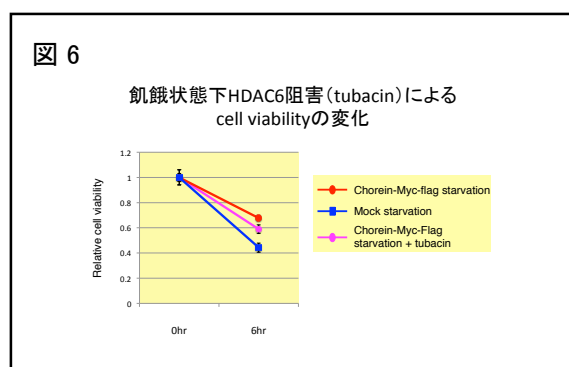
$\alpha$ -tubulin の脱アセチル化に関与する HDAC6 と chorein について免疫沈降を行い、共沈物のウエスタンブロットを行った所、HDAC6, chorein のバンドを認め、両タンパク質が共沈していることが示された (図 5)。



## 6) $\alpha$ -tubulin に対する HDAC6 特異的阻害剤による cell viability

$\alpha$ -tubulin に対する HDAC6 特異的阻害剤である tubacin を添加した培地を用いて飢餓誘発 6 時間後の cell viability を比べると、tubacin を添加した chorein 安定強発現

細胞は加えていない chorein 安定強発現細胞に比べて有意に cell viability が低かった (図 6)。



#### 研究成果のまとめ

chorein は免疫沈降によって $\alpha$ -tubulin や HDAC6 と共沈し、chorein 安定強発現細胞株で脱アセチル化が亢進していることから chorein は $\alpha$ -tubulin、HDAC6 と相互作用しており、 $\alpha$ -tubulin の脱アセチル化に関与している可能性が示唆された。 $\alpha$ -tubulin はアセチル化を受けることによって $\beta$ -tubulin とヘテロ二量体を形成し、この二量体が重合して微小管形成に関与する。逆に脱アセチル化を受けることによって微小管、ヘテロ二量体が脱重合し、可逆的に細胞遊走や細胞骨格形成に関与していることも知られている。chorein 強発現細胞は微小管脱重合阻害剤による細胞障害に対して耐性を持つことから、chorein は微小管の安定化作用を有する事が示唆された。chorein 強発現細胞は飢餓誘発性細胞死に対して抑制的に働くが、HDAC6 の $\alpha$ -tubulin に対する作用を特異的に阻害する tubacin によってこの作用が弱まる事から chorein は HDAC6 の $\alpha$ -tubulin に対する脱アセチル化を促進することによって細胞に飢餓誘発性細胞死に対する耐性を持たせることが示唆される。

HDAC6 は、オートファジーに関わる分子であることが報告されており、chorein は $\alpha$ -tubulin 等の細胞骨格系タンパク質と相互作用し、tubulin のアセチル化などを介

して細胞骨格形成やオートファジーを介した不良細胞内小器官のクリアランスに関与する事が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Shiokawa N, Nakamura M, Sameshima M, Deguchi A, Hayashi T, Sasaki N, Sano A: Chorein, the protein responsible for chorea-acanthocytosis, interacts with  $\beta$ -adducin and  $\beta$ -actin. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 96-101, 2013 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.011.
2. Sangatsuda Y, Nakamura M, Tomiyasu A, Deguchi A, Toyota Y, Goto Y, Nishino I, Ueno S, Sano A: Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA<sup>Val</sup> gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances, *Mitochondrion.*, 12: 617-622, 2012, 査読有 DOI: 10.1016/j.mito.2012.10.002.
3. Hayashi T, Kishida M, Nishizawa Y, Iijima M, Koriyama C, Nakamura M, Sano A, Kishida S: Subcellular localization and putative role of VPS13A/chorein in dopaminergic neuronal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 419: 511-516, 2012, 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.047.
4. Tomiyasu A, Nakamura M, Ichiba M, Ueno S, Saiki S, Morimoto M, Kobal J, Kageyama Y, Inui T, Wakabayashi K, Yamada T, Kanemori Y, Jung HH, Tanaka H, Orimo S, Afawi Z, Blatt I, Aasly J, Ujike H, Babovic-Vuksanovic D, Josephs KA, Tohge R, Rodrigues GR, Dupre N, Yamada H, Yokochi

F, Kotschet K, Takei T, Rudzinska M, Szczudlik A, Penco S, Fujiwara M, Tojo K, Sano A: Novel pathogenic mutations and copy number variations in the VPS13A Gene in patients with chorea-acanthocytosis, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 156: 620-631, 2011, 査読有  
DOI: 10.1002/ajmg.b.31206.

5. Shimo H, Nakamura M, Tomiyasu A, Ichiba M, Ueno SI, Sano A: Comprehensive analysis of the genes responsible for neuroacanthocytosis in mood disorder and schizophrenia, *Neurosci. Res.*, 69: 196-202, 2011, 査読有  
DOI: 10.1016/j.neures.2010.12.001.

[学会発表] (計 7 件)

1. Sasaki N, Nakamura M, Shiokawa N, Deguchi A, Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins on nutrient starvation in HEK293 cells. The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan

2. Shiokawa N, Nakamura M, Deguchi A, Sasaki N, Sano A: Identification of binding partners of chorein.

The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan

3. Deguchi A, Nakamura M, Shiokawa N, Sasaki N, Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins in HEK293 cells treated with a chemical inhibitor of oxidative phosphorylation. The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto

Japan

4. Deguchi A, Nakamura M, Shiokawa N, Sasaki N, Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins in HEK293 cells, 11th biennial meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry /55th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October1-2, 2012, Kobe Japan

5. Shiokawa N, Nakamura M, Sameshima M, Deguchi A, Sano A: Proteomics approach to identify chorein-interacting proteins, 11th biennial meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry /55th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October1-2, 2012, Kobe Japan

6. Hayashi T, Kishida M, Nishizawa Y, Iijima M, Koriyama C, Nakamura M, Sano A, Kishida S: Chorein is involved in exocytosis of dense core vesicles in differentiated PC12 cells, 11th biennial meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry /55th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October1-2, 2012, Kobe Japan

7. 佐野 輝: 「舞踏病原因遺伝子 VPS13A 変異による精神障害発症機構」第 54 回日本神経化学会年会 シンポジウム「精神障害の新規分子について—最近の知見から—」、石川、2011 年 9 月

[図書] (計 2 件)

1. 中村雅之、佐野 輝: 脳とこころのプライマリアケア 2 巻 知能と衰え VII 章 認知症各論 (Huntington 病, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症, 有棘赤血球舞踏病)、シナジー、456-462、2013

2. 中村雅之、佐野 輝：症候群ハンドブック（5. 有棘赤血球を伴う舞踏病）、中山書店：117-121, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~np/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 輝 (SANO, Akira)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：30178800

(2) 研究分担者

中村 雅之 (NAKAMURA, Masayuki)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：90332832

(3) 連携研究者

なし