

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15490

研究課題名（和文）Choreinの細胞死調整機構への関わりに関する研究

研究課題名（英文）Study on the role for chorein in the regulation of cell death

研究代表者

佐々木 なつき（Sasaki, Natsuki）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30755252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：有棘赤血球舞蹈病（ChAc）の責任蛋白質であるchoreinを強制的に過剰に発現させた細胞とRNA干渉法によってchoreinの発現を落としたHEK293細胞を用いて、staurosporine刺激と過酸化水素刺激によって起こる細胞生存率の変化を検討した結果、choreinの発現が多いほど有意に過酸化水素刺激による細胞死を抑制する作用をもっていると考えられる結果となった。このことから、choreinは酸化ストレスによる細胞死を抑制する役割を担う分子の可能性があり、その細胞死抑制機構の破綻がChAcの分子病態の一つである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体における細胞死にはアポトーシスの他にもオートファジーやネクローシスといった複数の細胞死機構が様々な機能しているものと考えられている。Chorein機能喪失をきたしているChAcの分子病態において、これまで報告してきたオートファジーだけでない細胞死の調整機構が破綻している可能性が示唆された。また、ChAcはうつ病、幻覚妄想、強迫性障害などの精神症状を高率に呈する神経変性疾患である。これらの事実はchoreinの機能異常が精神疾患の病因にもなっていることを示唆するものであり、choreinと関連する分子は他の精神疾患の病態に関わる可能性が高く、今後のさらなる研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Cell viability assay using chorein-overexpressing HEK293 cells and chorein-knockdown HEK293 cells revealed that chorein significantly preserved cell viability after treatment with hydrogen peroxidase. These results suggest that chorein may have a role in suppressing cell death due to oxidative stress. Disruption of this cell protection mechanism may be involved in molecular pathogenesis of chorea-acanthocytosis.

研究分野：精神神経医学

キーワード：有棘赤血球舞蹈病 chorein 酸化ストレス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

有棘赤血球舞踏病(chorea-acanthocytosis; ChAc)は Huntington 病類似の精神神経症状と有棘赤血球症を呈する稀な遺伝性神経変性疾患であり、常染色体潜性(劣性)遺伝形式を呈する。病因は *VPS13A* 遺伝子の機能喪失性変異であり、変異は点変異や CNV など多岐にわたり遺伝子上の広範囲に存在することが示されている。*VPS13A* 遺伝子産物の chorein は推定分子量約 360kDa の巨大な蛋白質であるが、赤血球膜分画のウェスタンブロットで ChAc 患者は全長 chorein がバンド消失しており、chorein が欠損していることが示されている。申請者らは chorein を強制発現させた細胞では chorein が  $\alpha$ -tubulin とヒストン脱アセチル化酵素 6 (HDAC6) と相互作用し、飢餓誘発性細胞死に対して抑制的に働くこと (*FASEB J.* 30: 3726-3732, 2016) を報告しており、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が示唆されたが、詳細は明らかではなく、ChAc の分子病態も不明である。

### 2. 研究の目的

Alzheimer 型認知症や Parkinson 病、Huntington 病などのさまざまな神経変性疾患における神経障害の進行にはオートファジー機構の破綻やアポトーシスやネクロトーシスなどの細胞死メカニズムが関連していると言われている。我々は、chorein が飢餓誘発性オートファジーと関わり、細胞死を抑制的に働くことを示唆する結果が得られていたが、酸化ストレスやアポトーシスによる細胞死における chorein の役割は明らかになっていなかった。今回の研究でさまざまな細胞死に chorein が関わる機構を分子的に検討する。また、器質性精神疾患として、単一遺伝子変異による均一な疾患単位である ChAc は多彩な精神疾患を高率に合併する。従って、ChAc の分子病態はうつ、幻覚妄想、強迫性障害などの精神症状の分子機序の一端に関わることが示唆される。

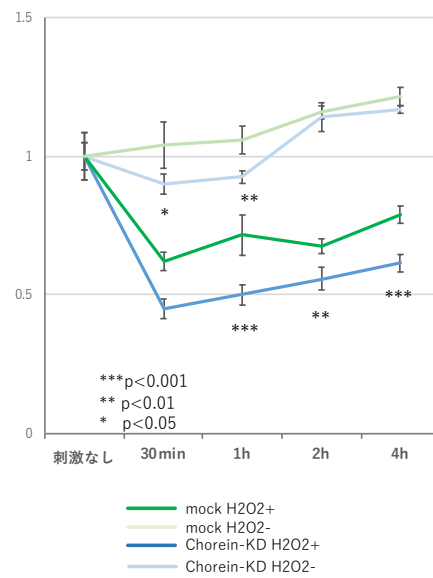
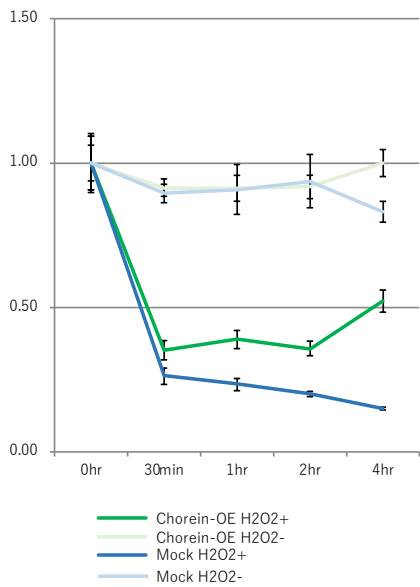
### 3. 研究の方法

HEK293 細胞に、c-myc-tag と FLAG-tag を融合させた全長 *VPS13A* cDNA を導入した細胞を作成し、chorein を強制発現させた HEK293 安定発現細胞株を樹立していた。その chorein 強発現細胞 (chorein-OE 細胞) と、HEK293 細胞を RNAi によって chorein をノックダウンさせた細胞 (chorein-KD 細胞) を用いた。それらの細胞と mock 細胞に対して、staurosporine 刺激と過酸化水素刺激を行い、経時的に MTS 活性を測定し、cell viability を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 過酸化水素刺激での cell viability

Chorein-OE 細胞では、過酸化水素刺激後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間後の cell viability は mock 細胞と比較して有意に高かった。また、chorein-KD 細胞でも過酸化水素刺激 1 時間、2 時間、4 時間後の cell viability は mock 細胞と比較して有意に低下していた。



(2) Staurosporine 刺激での cell viability

Chorein-OE 細胞では、staurosporine 刺激後 24 時間後の cell viability は mock 細胞と比較して有意に低かった。しかし、chorein-KD 細胞では staurosporine 刺激後の cell viability は mock 細胞と比較して有意な結果は得られなかった。

Chorein の発現量と過酸化水素刺激下での細胞生存率は比例しており、酸化ストレスによる細胞死を抑制する役割を担う分子の可能性があるとの結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagata O, Nakamura M, Sakimoto H, Urata Y, Sasaki N, Shiokawa N, Sano A.	4. 巻 503
2. 論文標題 Mouse model of chorea-acanthocytosis exhibits male infertility caused by impaired sperm motility as a result of ultrastructural morphological abnormalities in the mitochondrial sheath in the sperm midpiece.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communication	6. 最初と最後の頁 915-920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.06.096.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuka Urata, Masayuki Nakamura, Natsuki Sasaki, Nari Shiokawa, Yoshiaki Nishida, Kaoru Arai, Hanae Hiwatashi, Izumi Yokoyama, Shinsuke Narumi, Yasuo Terayama, Takenobu Murakami, Yoshikazu Ugawa, Hiroki Sakamoto, Satoshi Kaneko, Yusuke Nakazawa, Ryo Yamasaki, Shoko Sadashima, Toshiaki Sakai, Hiroaki Arai, Akira Sano	4. 巻 3
2. 論文標題 Novel Pathogenic XK Mutations in McLeod Syndrome and Interaction Between XK Protein and Chorein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology Genetics	6. 最初と最後の頁 e328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXG.0000000000000328.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----