

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591488

研究課題名（和文）：精神疾患と有棘赤血球舞踏病病因遺伝子のコピー数多型解析

研究課題名（英文）：Copy number variation analysis of chorea-acanthocytosis gene in psychiatric disorders

研究代表者：中村 雅之 (NAKAMURA MASAYUKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90332832

研究成果の概要（和文）：有棘赤血球舞踏病遺伝子を包括的な遺伝子変異解析を行ったところ、気分障害にのみ存在するコピー数変異や機能変化を来す可能性がある変異を認めた。赤血球や同遺伝子産物 chorein を高発現させた培養細胞において、chorein と細胞骨格系の分子と相互作用が示唆される結果を得た。これらの機能関連が破綻することにより有棘赤血球舞踏病や気分障害が引き起こされる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We performed a comprehensive mutation screen of chorea-acanthocytosis (ChAc) gene and identified pathogenic copy number variation and a potentially functional variant in mood disorder subjects. The results of protein analysis of erythrocyte and cultured cell line highly expressing chorein suggest that chorein may interact with cytoskeletal proteins and disruption of these interaction may lead to ChAc or mood disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：(1) 有棘赤血球舞踏病 (2) VPS13A 遺伝子 (3) chorein (4) コピー数変異 (CNV) (5) 細胞骨格

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症や気分障害などの精神障害は、罹患率の高さから、ありふれた疾患 (common diseases) であり、遺伝子のみが原因となって疾患を発症するのではなく、ある同一の環境要因にさらされた場合に発症の引き金となる遺伝子 (疾患感受性遺伝子) が存在するとされ、遺伝的要因と環境要因が複雑に絡みあ

う多因子性の複雑な疾患 (multifactorial complex disease) と考えられている。Common disease である孤発性の Parkinson 病において、稀な疾患である Gaucher 病の原因遺伝子の  $\beta$ -glucosidase の稀少な疾患変異を持つヘテロ接合性保因者を高頻度に認め、"multiple rare variants-common disease" 仮説を実証した例として注目されている。常染色体劣性遺伝性の

神経変性疾患である有棘赤血球舞踏病 (chorea acanthocytosis: ChAc) 家系内の病因遺伝子 VPS13A の変異をヘテロ接合性にもつ保因者の中に、高率に気分障害や強迫性障害などの精神障害を認める。これは、前述の Goucher 病と Parkinson 病の關係に極めて類似しており、気分障害患者に対し、VPS13A 上の稀な点変異の検索を直接シーケンシング法により予備的に行ったところ、健常者には認めない点変異を見出した。ChAc 患者にはコピー数変異 (Copy Number Variation: CNV) を有すものが少なからず存在するため、精神疾患の患者に対しても CNV のスクリーニングも必要である。我々は漏れなく VPS13A 遺伝子上の CNV を見出すための方法を確立しており、今回、VPS13A 上の CNV 解析を気分障害について行うこととなった。CNV と精神疾患に関しては、Gene chip を用いて全染色体領域に渡って CNV をスキャンすることが可能となり、高頻度に精神疾患を発症するとされる Velo-cardio-facial 症候群 (VCFS) の原因である 22 番染色体長腕 11 上の欠失領域の CNV に加え、1q21.1, 15q11.2 及び 15q13.3 領域の欠失などの CNV 領域が統合失調症と関連するとの報告がなされ、非常に注目されるようになっており、VPS13A 上の CNV と精神疾患の関連について期待が持たれていた。

我々は、VPS13A 遺伝子産物 chorein について研究を重ねており、その ChAc モデルマウスにおける細胞内局在や組織間分布、GABA 受容体に与える影響などを明らかにしてきた。しかし chorein の機能については明らかでなく、結合タンパク質の同定から機能予測していく必要があった。

## 2. 研究の目的

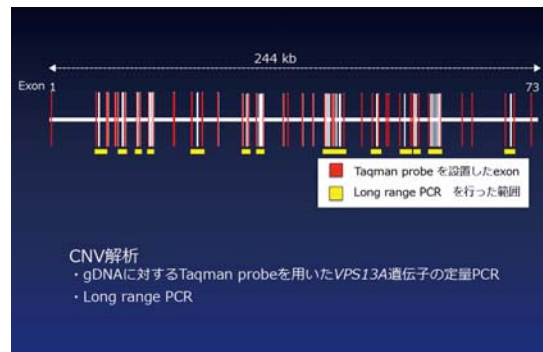
(1) 有棘赤血球舞踏病という稀な劣性遺伝病の疾患遺伝子変異保因者とありふれた疾患である気分障害との関連性を明らかにする。

(2) その責任遺伝子産物 chorein の結合タンパク質などを同定することにより、分子病態を解明する。

## 2. 研究の方法

### (1) CNV 解析 (図 1)

図 1



気分障害、健常者の白血球から DNA を抽出する。ロングレンジ PCR をいくつかの組み合わせ (図 1)、VPS13A の全エクソンを網羅するようにプライマーを設計する。抽出した DNA を鋳型に設計したプライマーを用いてロングレンジ PCR を行い、duplication や deletion などの CNV をスクリーニングする。また、定量 PCR を行うためにそれぞれの long-range PCR 領域内に Taqman probe と定量用の Primer を設計し、real-time PCR を用いて遺伝子定量を行い、VPS13A の CNV を詳細に解析する。

### (2) Chorein の機能解析

VPS13A cDNA を発現ベクターにクローニングする。それらを神経細胞などトランスフェクションし、神経細胞に与える影響や

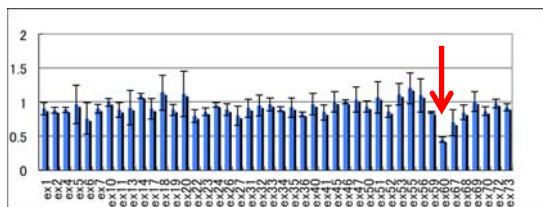
VPS13A 遺伝子産物である chorein の局在などを解析する。また、それらの細胞や赤血球膜タンパク質などを持ちいて免疫沈降-ペプチドマスフィンガープリンティング法などにより、chorein 結合タンパク質などを同定し、chorein の結合タンパクについて解析する。また、それぞれの結合タンパクと chorein の共有細胞内小器官との局在関連性を解析し、それらの機能から類推される神経細胞における影響などを解析していく。

### 3. 研究成果

#### (1) VPS13A 遺伝子変異スクリーニングと CNV 解析

85名の気分障害患者を対象としたVPS13Aの上流領域を含めた全エクソン（総計76エクソン）のリシークエンシングに加え72名的气分障害患者へのロングレンジPCR法とTaqman probeを用いた定量的PCR法を組み合わせCNVを解析した。その結果、VPS13Aのリシークエンシングでは、10種類の新規の非同義的変異と17種類の新規の同義的変異を同定した。その中で、健常者には認められなかった非同義的変異は3種類で、同義的変異は8種類であり、いずれもヘテロ接合性に認められた。これらの非同義的変異は哺乳類の種間で保存されていた。S2302N、L2338Vの変異は、VPS13Aの遺伝子産物であるchoreinの小胞体輸送関連タンパク質共通構造であるVPSAP内に認めた。また、H196R変異とR208変異は機能予測ソフトで解析を行なうと、“probably damaging”であり、病因変異の可能性が示唆された。VPS13Aのコピー数バリエーション解析では、1名的气分障害患者に、VPS13Aの疾患変異であるexon60-61欠失変異をヘテロ接合性に認めた(図2矢印)。健常群にはそのような疾患変異や機能変化を来す可能性を持つvariantは見いだせなかった。これらから有棘赤血球舞踏病遺伝子は、気分障害及の病因に関与している可能性が示唆された。

図 2



#### (2) chorein の機能解析

赤血球膜分画から抽出したタンパク質を用い

てchoreinと結合し相互作用するタンパク質を同定するために、抗chorein抗体を用いた免疫沈降を行い、得られたタンパク質をSDS-PAGE後、銀染色し質量分析を行った。その結果、chorein結合候補タンパク質としていくつかの細胞骨格系のタンパク質が同定された。HEK293細胞を用いてVPS13Aの遺伝子産物であるchoreinの安定発現細胞株を樹立し、chorein安定発現細胞株から抽出したタンパク質に対しても同様に免疫沈降-質量分析を行い同じ細胞骨格系のタンパク質が落ちてくる事を確認した。また同定されたタンパク質の抗体を用いてchorein安定発現細胞株から抽出したタンパク質に対して免疫沈降を行いchoreinが落ちてくる事も確認した。また免疫蛍光染色によりchoreinと共在を確認でき、choreinは細胞骨格系の分子と関わっており、それらの機能が破綻することによりChAcや気分が引き起こされる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. 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
2. \*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: 196-102, 2011 (\*Contributed equally to the manuscript) 査読有
3. \*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 (\*Contributed equally to the manuscript) 査読有

4. Miki Y, Nishie M, Ichiba M, Nakamura M, Mori F, Ogawa M, Kaimori M, Sano A, Wakabayashi K: Chorea-acanthocytosis with upper motor neuron degeneration and 3419\_3420 delCA and 3970\_3973 delAGTC VPS13A mutations, *Acta Neuropathol.*, 119: 271-273, 2009 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) Hirochika Shimo, Masayuki Nakamura, Nari Shiokawa, Akiyuki Tomiyasu, Shu-ichi Ueno, Akira Sano: Resequencing and copy number variations analyses for genes responsible for neuroacanthocytosis in subjects with mood disorders and schizophrenia. XVII World congress Psychiatric genetics 2009年11月5日

サンディアゴ

(2) Akiyuki Tomiyasu, Masayuki Nakamura, Nari Shiokawa, Hirochika Shimo, Mio Ichiba, Shu-ichi Ueno<sup>2</sup>, Akira Sano: NOVEL PATHOGENIC MUTATIONS AND COPY NUMBER VARIATIONS OF VPS13A IN PATIENTS WITH CHOREA-ACANTHOCYTOSIS XVII World congress Psychiatric genetics 2009年11月5日 サンディアゴ

[図書] (計2件)

1. 中村雅之、佐野輝: 中山書店、精神科キーワード事典 (ゲノム CNV)、2011, 597-599
2. 中村雅之、佐野輝、中山書店、症候群ハンドブック 5.有棘赤血球を伴う舞踏病、2011, 117-121

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 雅之 (NAKAMURA MASAYUKI)

鹿児島大学医学部歯学部附属病院・講師

研究者番号 : 90332832