

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701  
研究種目：若手研究  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K15746  
研究課題名（和文）In vivoにおけるchoreinとオートファジーの関わり

研究課題名（英文）In vivo involvement of chorein and autophagy

## 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Choreinとの相互作用が確認されたタンパク質はmyosin VIと相互作用し細胞内カルシウムイオン制御に関与しており、オートファジーとの関連が報告されている。RNAiによってVPS13A遺伝子をノックダウン（VPS13A-KD）したHEK293細胞ではML-SA1刺激によりカルシウム濃度が上昇した。これらからオートファジー障害によるカルシウム濃度上昇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。また、細胞飢餓状態においてVPS13A-KD細胞の脂肪輸送障害や、酸化障害を認め、ChAcの分子病態には、脂肪酸が動員されるプロセスであるリポファジーの障害の存在が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、オートファジー関連タンパク質とchoreinが相互作用し、そのchoreinの障害によって細胞内カルシウム濃度上昇しており、ChAcの神経細胞死の分子病態の一つである可能性が示唆された。また、ChAcの病態にオートファジーの中でも脂肪滴動員に関与するリポファジー障害が関与している可能性が示唆された。ChAcは精神症状を高率に呈する神経変性疾患であり、これらの新規細胞障害機構が精神疾患の病因にもなっていることが示唆された。ChAcの病態は精神疾患の病態に関わる可能性が高く、さらなる研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：An interaction between chorein and a protein involved in intracellular calcium ion regulation, which interacts with myosin VI, was confirmed. In HEK293 cells with VPS13A gene knockdown (VPS13A-KD) by RNAi, calcium concentration increased upon ML-SA1 stimulation. This interacting protein has been reported to be associated with autophagy, suggesting that increased calcium concentration due to autophagy impairment could be one of the molecular pathologies of chorea-acanthocytosis (ChAc). Additionally, in VPS13A-KD cells under starvation conditions, impaired fat transport and -oxidation were observed. This suggests that the molecular pathology of ChAc includes a defect in lipophagy, a process where lipid droplets are degraded by autophagy and fatty acids are mobilized.

研究分野：精神神経医学

キーワード：有棘赤血球舞踏病 VPS13A chorein 脂肪輸送 リポファジー

## 1. 研究開始当初の背景

神経有棘赤血球症 (Neuroacanthocytosis; NA) は、末梢血に有棘赤血球症と神経症候を併せ持つ病態への包括的用語である。運動症状を来す NA の中核群は、有棘赤血球舞踏病 (Chorea-acanthocytosis: ChAc) と McLeod 症候群 (MLS) に占められる。ChAc は、末梢血に有棘赤血球症を来し、脳神経系では尾状核の萎縮を伴い、舞踏運動などの不随意運動や多彩な精神症状を頻度高く生じる稀な遺伝性神経変性疾患であり、ChAc の原因遺伝子である *VPS13A* 遺伝子の機能喪失性変異による遺伝子産物 chorein の欠損が病因である。ChAc は世界で 1000 例程度と考えられており、本邦からの症例報告が多い。私たちの研究グループは、chorein が脳に発現が豊富であること、細胞分画ではミクロソームやシナプトソーム分画に豊富に豊富であることを報告した。また、GABA 受容体関連タンパク質との関連発現や、ドパミン分泌に関与すること、 $\beta$ -adducin と  $\alpha$ -actin などの細胞骨格系タンパク質と相互作用することなどを報告してきた。近年、オートファジーを介する異常蛋白質のクリアランス機構の破綻がパーキンソン病などの神経変性疾患の発症に関与していることが報告されている。申請者は chorein がヒストン脱アセチル化酵素 6 (Histone Deacetylase 6: HDAC6) や  $\alpha$ -tubulin と相互作用し、オートファジーを促進させる働きを有することを報告した。このことから、ChAc の病態がオートファジー機構の破綻であることが示唆された。また、最近では chorein が脂質の脂質輸送やオルガネラ間の脂質交換に関与すると考えられており、脂質の適切な輸送の障害が病態に関与し、特にエンドソーム-リソソーム系やミトコンドリア-小胞体接触部位で機能すると考えられている。また、ChAc に酷似した症候を示す MLS の責任蛋白である XK は、脂質スクランブラーゼの一つと考えられている。私たちは chorein と XK の相互作用を報告しており、これらから、chorein と XK は脂質輸送や脂質のホメオスターシスに関与する分子と考えられる。

## 2. 研究の目的

ChAc はうつ病、幻覚妄想、強迫性障害などの多彩な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 に関与するタンパク質の異常が精神疾患の分子的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い。さらにオートファジー機構と chorein の関係を明らかにする。また、脂質輸送との関連から、培地からグルコースを省いた飢餓刺激時に、エネルギー源として脂肪酸の取り込みが活発となり、ミトコンドリアへ供給され、 $\beta$ 酸化によりエネルギーを補充する。chorein が欠損した場合、この機能が低下することを証明する。他の精神疾患との関連性を解明し、新しい治療法を探索する研究の足がかりにしたい。

## 3. 研究の方法

野生型マウスと ChAc モデルマウスの脳組織、特に線条体について、 $\alpha$ -tubulin や他のオートファジー関連タンパク質の発現を検討した。動物実験室の改築移転があり、マウスの繁殖が制限されていたため、月齢ごとのマウスを十分に確保することが困難であったため、細胞実験を進めた。HEK293 細胞で抗 chorein 抗体を用いた免疫沈降を行い、免疫反応を確認した。また、脂肪酸とりこみ検出キットを用い、培養液に Minimum Essential Medium (MEM: glucose 4.5 g/L 含有、アミノ酸含有)、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS: glucose 1.0 g/L 含有、アミノ酸なし) もしくは Phosphate-Buffered Saline (PBS: glucose 無し、アミノ酸なし) を用いて、それぞれの無血清飢餓条件で脂肪酸の取り込みと脂肪滴の変化を観察し、Fatty Acid Oxidation (FAO) blue 試薬によって  $\beta$ 酸化の程度を *VPS13A* 遺伝子ノックダウン (*VPS13A*-KD) 細胞と Control 細胞との間で比較した。

## 4. 研究成果

### 1. オートファジー関連タンパク質との相互作用

野生型マウスと ChAc モデルマウスの脳組織において、オートファジー関連タンパク質の発現について検討したが、有意な差が得られたタンパク質は同定できなかった。

HEK293 細胞による免疫沈降反応においては、オートファジー関連タンパク質である A タンパク質と共沈していた (図 1)。A タンパク質はリソゾームと関連し、細胞内カルシウムイオン制御に関わっていることが知られているタンパク質である。リソゾームの Transient Receptor Potential Mucolipin 1 (TRPML1) チャネルのアゴニストである N-(3-aminopropyl)-2-[(3-methylphenyl)methyl]oxy-N-(2-thienylmethyl)benzamide (ML-SA1) を用いて刺激すると、HEK293 細胞において *VPS13A*-KD 細胞では Control 細胞と比較して細胞内カルシウムイオン濃度が *VPS13A*-KD 細胞において高くなることが確認できた (図 2)。また、ML-SA1 刺激によって *VPS13A*-KD 細胞では細胞死が生じており、カルシウム濃度上昇が細胞死の原因である可能性が示唆された。

図 1 抗chorein抗体による免疫沈降

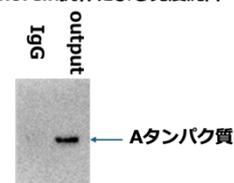
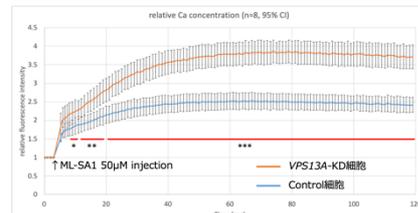


図 2 ML-SA1 刺激による細胞内カルシウムイオン濃度

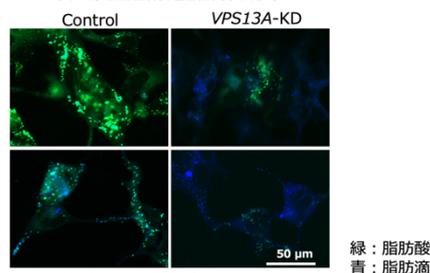


ML-SA1刺激後にVPS13A-KD細胞において、有意にカルシウムイオン濃度が高くなった。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

## 2. 脂肪代謝

HBSS 無血清培地の飢餓条件下において、*VPS13A*-KD 細胞は、新規に取り込んだ脂肪酸が既存の脂肪滴に取り込まれるまでの時間が遷延しており、脂肪酸の輸送障害が生じていることが示唆された (図 3)。

図 3 添加脂肪酸と脂肪滴の分布

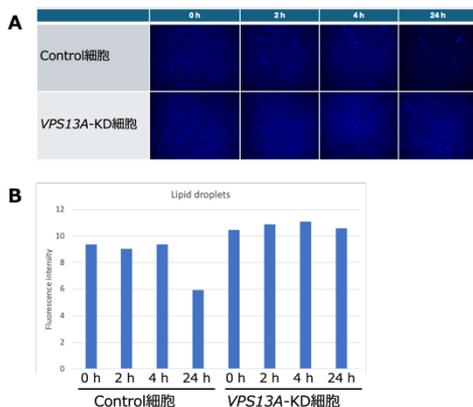


Control細胞では緑と青がmergeした水色の顆粒が多いが、*VPS13A*-KD細胞では緑色と青色の顆粒が独立したものが多く、*VPS13A*-KDにおいて、添加した脂肪酸が存在していた脂肪滴に輸送されていないことを示唆している。

HBSS 無血清培地の飢餓条件下において、24 時間経過すると、Control 細胞では脂肪滴が減少したが、*VPS13A*-KD 細胞では、脂肪滴の変化がなかった (図 4)。*VPS13A*-KD 細胞では飢餓状態での脂肪滴の利用障害が示唆された。

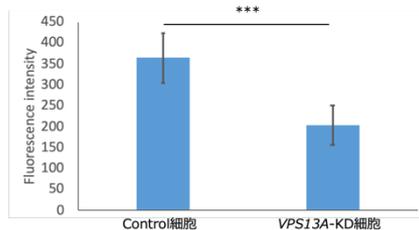
FAO blue によって飢餓条件下のβ酸化を評価すると、*VPS13A*-KD 細胞は Control 細胞に比べて、β酸化は半分程度であった (図 5)。

図 4 HBSS無血清培地における脂肪滴の経時変化



脂肪滴は、飢餓状態24時間経過すると、Control細胞では利用されて減少しているが、*VPS13A*-KD細胞ではその数は変化に乏しい。

図 5 FAOblueによるβ酸化の評価



*VPS13A*-KDでは、Control細胞と比べてβ酸化が半分程度であった。  
\*\*\* $P < 0.0001$ ;  $n = 24$ ; error bar, 95%CI

飢餓状態下においては、PBS では細胞の死滅のため、評価困難であった。MEM 培地を用いた無血清培地ではグルコースやアミノ酸の利用が可能であるため、Control 細胞と *VPS13A*-KD 細胞間で変化が見られなかった。HBSS 培地を用いた場合、*VPS13A*-KD では、脂肪酸が減少し、β酸化が減少する。脂肪滴は大型化し、ミトコンドリアの形態異常が生じることが明らかとなった (表 1)。

**表1 飢餓条件の違いによるControl細胞とVPS13A-KD細胞の変化**

	MEM	HBSS	PBS
Glucose	4500 mg / L	1000 mg / L	0 mg / L
Amino acid	あり	なし	なし
以下実験結果のまとめ			
細胞死(肉眼的判定)	なし (24 hr)	なし (24 hr)	Control : 24 hrで8割死滅 VPS13A-KD : 24 hrで全滅
脂肪酸	Control : 少ない VPS13A-KD : 少ない	Control : 多い VPS13A-KD : 少ない	Control : 多い VPS13A-KD : 少ない
β酸化	なし	Control : あり VPS13A-KD : なし	Control : あり VPS13A-KD : なし
脂肪滴 (4 hr)	変化なし	Control : 小型多数 VPS13A-KD : 多数	Control : 小型多数 VPS13A-KD : 多数
脂肪滴 (24 hr)	変化なし	Control : 小型多数 VPS13A-KD : 大型化	大型化?
ミトコンドリア	異常なし	WT : 異常なし VPS13A-KD : 変形	WT : 変形 VPS13A-KD : 変形と分断

これらから、chorein は脂肪の輸送に関与しており、chorein が障害されると、脂肪滴の利用障害や輸送障害を生じ、飢餓状態下でのβ酸化障害を生じ、エネルギー産生が困難になることが示唆された。

chorein と相互作用する A タンパク質がカルシウム代謝に関与しており chorein の障害によって、ML-SA1 刺激による細胞内カルシウム濃度が上昇しており、ChAc の神経細胞死と関与していることが示唆された。ChAc では脂肪輸送の障害により、飢餓状態ではエネルギー産生障害や細胞死が生じ、これらが細胞死の病態に関与していることが示唆された。すなわち、ChAc の分子病態には、脂肪滴がオートファジーによって分解され、脂肪酸が動員されるプロセスであるリポファジーの障害の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arai Kaoru, Nishizawa Yoshiaki, Nagata Omi, Sakimoto Hitoshi, Sasaki Natsuki, Sano Akira, Nakamura Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Role of Chorein Deficiency in Late Spermatogenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 240 ~ 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines12010240	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西澤芳明、齊之平一隆、浦田結嘉、新井薫、佐々木なつき、佐野輝、中村雅之
2. 発表標題 VPS13A ノックダウンによるフェロトーシスの促進
3. 学会等名 第45回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------