

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591685

研究課題名(和文) Choreinとミトコンドリア関連細胞死の関連について

研究課題名(英文) The association between chorein and mitochondria-related cell death

研究代表者

中村 雅之(Nakamura, Masayuki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：90332832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫沈降法や免疫細胞化学法などの研究の結果、コレインは細胞骨格系タンパク質やオートファジー関連タンパク質と相互作用することが示唆された。ミトコンドリア膜電位を消失させマイトファジーを誘発する脱共役剤で細胞を処理すると、コレインと細胞骨格系タンパク質との相互作用が増強した。また、コレイン強発現細胞ではコントロール細胞と比べてオートファジーを誘発する飢餓刺激やマイトファジーを誘発する脱共役剤刺激後の細胞生存率が有意に高かった。これらの結果から、コレインはオートファジーやマイトファジーに関わる細胞死抑制機構に関与しており、それらの機構の破綻が有棘赤血球舞踏病の分子病態である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Co-immunoprecipitation assay and immunocytochemical analysis using chorein-overexpressing cells showed interaction between chorein and cytoskeletal proteins and autophagy-related proteins. The chorein-cytoskeletal proteins interaction was increased in CCCP-treated cells. Cell viability was significantly increased in chorein-overexpressing cells compared with mock transfected control cells during nutrient deprivation and during CCCP treatment. These results suggest that chorein interacts with cytoskeletal proteins and autophagy-related proteins and may play protective roles in cell death mediated by autophagy- and mitophagy-related mechanisms. Their disruption may be one of the molecular pathogenic mechanisms of chorea-acanthocytosis.

研究分野：精神神経医学

キーワード：有棘赤血球舞踏病 chorein オートファジー マイトファジー

## 1. 研究開始当初の背景

有棘赤血球舞踏病 (chorea acanthocytosis: ChAc) はハンチントン病類似の精神神経症状と有棘赤血球症を呈する稀な常染色体劣性遺伝性神経変性疾患である。病因は *VPS13A* 遺伝子変異であり、遺伝子産物 chorein の欠損 / 機能喪失を伴う。C57BL6 と 129/Sv のハイブリッド種のマウスモデルでは異常発現に差異を認めていた。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り、家系における変異保因者にも精神疾患が多発する。chorein は脳などの臓器に発現が豊富であることや GABA 受容体関連タンパク質との関連性について報告されていたが、chorein 欠損による神経変性の機構については未だ不明のままであった。近年、ミトコンドリア機能異常と神経変性疾患や精神疾患との関連が報告されてきており、また、細胞自己貪食作用 (オートファジー) やミトコンドリアの自己貪食作用 (マイトファジー) と神経変性疾患との関連が報告されていた。

## 2. 研究の目的

Chorein の分子機能を明らかにするために、chorein と分子的な結合を介して相互作用を行っているタンパク質を見出す。生化学的に chorein 結合タンパク質を同定し、並行してミトコンドリア膜電位消失刺激による細胞死に chorein が関わる分子的機構を詳細に検討し、ミトコンドリア障害時や細胞飢餓刺激時の chorein の機能を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) Chorein 安定発現細胞株の樹立と chorein と相互作用するタンパク質の同定

細胞に、c-Myc-tag と FLAG-tag を融合させた全長 *VPS13A*-cDNA を導入し、chorein を強制発現させた HEK293 安定発現細胞株を樹立する。その細胞株を用いて、chorein を強制

発現させた培養細胞を回収し、可溶化剤含有の各種の濃度で chorein 可溶化の程度や結合タンパク質の回収率などを検定しつつ、最適の可溶化条件を選択し、chorein をもっとも含有すること確認した遠心上清画分を次の段階への出発材料とする。同上清に対して tag タンパク質の抗体を固定化したカラムで全長 chorein を含む画分を回収し、この画分を SDS-PAGE で展開し、タンパク染色で検出される特異的バンドをゲルから回収し、トリプシン処理後に質量分析解析を行い、データベースと比較して当該タンパク質を同定し、ウェスタンブロット法を用いて免疫学的に同定したタンパク質を確認する。

ChAc 患者、*VPS13A* 遺伝子変異保因者、健常者の赤血球膜分画を用いて 2 次元電気泳動を行い、タンパク染色後に患者-保因者-健常者間で濃度差のあるスポットについてゲルから回収し、トリプシン処理後に質量分析を行い、データベースと比較して当該タンパク質を同定し、ウェスタンブロット法を用いて免疫学的に同定したタンパク質を確認する。またそれらのタンパク質について免疫沈降を行い、chorein との相互作用の有無を検討する。

### (2) ミトコンドリア膜電位消失刺激や細胞飢餓刺激中に chorein と相互作用するタンパク質の同定

chorein を強制発現させた安定発現細胞株を用いて、脱共役剤である carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) を添加することによりミトコンドリア膜電位消失刺激を与え、対照と比較しながら、chorein が相互作用するタンパク質がどのように変化し機能するかを明らかにする。CCCP 刺激後の細胞株と未刺激の細胞株を材料として、前述の「(2) Chorein と相互作用するタンパク質の同定」と同様の解析を行ない、相互作用するタンパク質の変化を捉え、変化したタンパク質と chorein について免疫蛍光染色法を行

うことによって chorein との共在や局在の変化を明らかにして、細胞死抑制の分子メカニズムを明らかにする。

また、同様に細胞飢餓刺激に関連し、chorein と相互作用するタンパク質を同定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Chorein と相互作用するタンパク質の同定

ChAc 患者 ( *VPS13A* 遺伝子変異 2 つ )、*VPS13A* 遺伝子変異保因者 ( 同変異 1 つ )、健常者 ( 同変異 0 ) の赤血球膜分画を用いて 2 次元電気泳動で発現を行い、タンパク染色で差のあるスポットが 35 得られた。それらに対して質量分析を行い、同定したタンパク質の中で chorein を強制発現させた HEK293 安定発現細胞を用いた免疫沈降で chorein と双方向的に共沈したタンパク質は  $\alpha$ -adducin isoform 1 と  $\alpha$ -actin であった。どちらのタンパク質も ChAc 患者の赤血球膜でタンパク質レベルでの発現減少を認めた。 $\alpha$ -adducin と chorein について chorein を強制発現させた HEK293 安定発現細胞を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、どちらも顆粒状に染まり、多くは共局在を示した。これらの結果から、 $\alpha$ -adducin と  $\alpha$ -actin は chorein と相互作用していることが示唆された。

##### (2) ミトコンドリア膜電位消失刺激や細胞飢餓刺激中に chorein と相互作用するタンパク質の同定

chorein を強制発現させた安定発現細胞と Mock 細胞を用いて、CCCP 刺激後にそれぞれの細胞の生存率を確認したところ、chorein 強制発現細胞の方が優位に生存率が高かった。CCCP 刺激を与えた細胞と与えていない細胞からタンパク質を抽出し、抗 chorein 抗体を用いて免疫沈降し、共沈物について SDS-PAGE を行った。CCCP 刺激後にタンパク染色が強まったバンドについて質量分析を行ったところ、myosin と  $\alpha$ -actin が同定さ

れた。両タンパク質について、chorein を強制発現させた HEK293 安定発現細胞を用いた免疫沈降を行うと chorein と双方向的に共沈した。また、HEK293 安定発現細胞を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、CCCP 刺激によって chorein と myosin、chorein とミトコンドリアとの共在が強まった。CCCP 刺激によって、不良ミトコンドリアを除去するマイトファジーが誘導されることが知られており、マイトファジーに関連することが示唆された。また、chorein を強制発現させた HEK293 安定発現細胞では、飢餓刺激に対して耐性を持っていた。chorein は飢餓刺激によって誘導される自己貪食作用 ( オートファジー ) に関わる HDAC6 や  $\gamma$ -tubulin と免疫沈降法によって共沈した。これらから、chorein は不良タンパク質除去や不良ミトコンドリア除去に関わるオートファジーやマイトファジーに関与することが示唆され、これらの機構の破綻が ChAc の病態機序の一つである可能性がある。

#### 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 3 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  $\alpha$ -adducin and  $\alpha$ -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.

〔学会発表〕(計8件)

1. Natsuki Sasaki, Masayuki Nakamura, Nari  
Shiokawa, Akiko Kodama, Akira Sano:  
Chorein interacts with  $\alpha$ -tubulin and  
HDAC6, and its overexpression preserves  
cell viability from nutrient starvation.  
第57回日本神経化学会2014(奈良)

2. Hitoshi Sakimoto, Omi Nagata, Masayuki  
Nakamura and Akira Sano: Modifiers for  
symptoms of chorea-acanthocytosis  
-Effect of genetic background on ChAc  
model mouse- 第36回生物学的精神医学会  
2014(奈良)

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

〔図書〕(計2件)

1. 中村雅之、佐野 輝: 神経症候群(第2版)

11 - その他の神経疾患を含めて - 有棘赤血球舞蹈病(Chorea-acanthocytosis)、**別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ**、27 : 173-177、2014

2. 中村雅之、佐野 輝: 脳とこころのプライマリケア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, 有棘赤血球舞蹈病)、シナジー、456-462、2013

〔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/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

研究者番号 :

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし