

平成19年 2月

Rubigilda Carbonell Paraguison

## 学位論文審査要旨

主査 福本宗嗣  
副主査 大野耕策  
同 難波栄二

### 主論文

Enhanced autophagic cell death in expanded polyhistidine variants of HOXA1 reduces PBX1-coupled transcriptional activity and inhibits neuronal differentiation

(HOXA1遺伝子ポリヒスチジン伸長変異におけるオートファジーを介した細胞死の促進とPBX-1結合転写活性及び神経分化の抑制)

(著者：Rubigilda Carbonell Paraguison、檜垣克美、山本賢司、松本英夫、佐々木司、加藤進昌、難波栄二)

平成19年1月 Journal of Neuroscience Research 85巻 479頁～487頁

# 学 位 論 文 要 旨

## Enhanced autophagic cell death in expanded polyhistidine variants of HOXA1 reduces PBX1-coupled transcriptional activity and inhibits neuronal differentiation (HOXA1遺伝子ポリヒスチジン伸長変異におけるオートファジーを介した細胞死の促進とPBX-1結合転写活性及び神経分化の抑制)

HOXA1遺伝子はホメオボックス遺伝子ファミリーの一つで、脳の初期発達に関与している。ヒトHOXA1遺伝子には10個のヒスチジンが連続するポリヒスチジン領域がある。自閉症の研究などから、これまでにこの領域のポリヒスチジンが7個、11個、12個の通常とは異なる長さの多型が見つかった。この11個と12個のポリヒスチジン伸長変異をもつHOXA1遺伝子の発現により、核内凝集体が形成され細胞死に至ることが示されていたが、その詳細については検討がなされていなかった。そこで、本研究ではポリヒスチジン伸長変異をもつHOXA1遺伝子を培養神経細胞などに発現させることにより、核内凝集体の時間的な経過、細胞死の機構、PBX1を介した転写活性などの解析を行い、さらにレチノイン酸による神経細胞の分化への影響について検討した。

### 方 法

ポリヒスチジンの伸長変異をもつHOXA1遺伝子を作成し、CMVプロモーターをもつpCMV-ScriptとpEGFP-N1に組み込み発現ベクターを構築した。PBX1発現コンストラクトpSGPbx1aおよびb-ARE配列を含むルシフェラーゼ発現コンストラクトpAdMLAREはZappavigna教授より供与された。発現実験にはCOS-7、マウスEC細胞株P19、およびヒト神経芽細胞株SK-N-SHなどの培養細胞を用いた。アポトーシスの阻害にはz-VAD-fmkを用いた。オートファジーの阻害には3-メチルアデニン、またその誘導にはラパマイシンを用いた。転写活性はHOXA1、PBX1、pAdMLAREさらに内部標準としてpEGFP-N1を共発現した後に、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。HOXA1とPBX1の結合の検討は免疫沈降法を用いた。SK-N-SHおよびP19細胞にレチノイン酸を加え神経分化を誘導した。神経細胞特異タンパク(MAP2)に対する免疫染色により神経分化の程度を解析した。

## 結 果

11個と12個の伸長したポリヒスチジンをもつHOXA1遺伝子を細胞に発現させることにより、初期の段階では細胞質にも凝集体が形成し、時間とともに核内に多く蓄積することが示された。核内の凝集体はアポトーシスを阻害するz-VAD-fmkを加えても変化はなく、オートファジーを阻害する3-メチルアデニンを加えることで増強した。逆に、オートファジーを誘導するラパマイシンを加えることにより核内の凝集体は減少し、細胞死が軽減した。ヒスチジンの伸長したHOXA1はPBX1との結合が阻害され、PBX1を介した転写活性も低下を示した。レチノイン酸を加えSK-N-SHおよびP19細胞の神経分化を誘導した場合には、ポリヒスチジンが伸長した変異だけではなく、ポリヒスチジンが7個に短縮した変異でも、神経分化の誘導が阻害された。

## 考 察

ポリヒスチジンの伸張変異のあるHOXA1遺伝子の発現により、神経細胞などの機能異常が起きる機序が明らかにされた。まず、HOXA1遺伝子のポリヒスチジンが伸長することによりHOXA1のPBX1への結合が阻害され、そのためにPBX1を介する転写活性が低下した。そのために、PBX1が制御する遺伝子群の発現に異常をきたし、核内凝集体を形成し細胞死を引き起こすと考えられた。また、この細胞死に至るメカニズムはアポトーシスではなくオートファジーが重要であることが示された。さらに、伸長のみならずポリヒスチジンが短縮する場合にも神経分化の異常が示されたことにより、これらの長さの変異は核内凝集体形成とは異なる神経発生のメカニズムにも影響を与えることが示唆された。HOXA1は脳の発生などに重要な遺伝子であり、この長さの変異により脳に異常を呈する疾患が発症する可能性がある。この変異型のヘテロ接合体では症状はまったくないが、ホモ接合体は発見されておらず、ホモ接合体になった場合に疾患を発症する可能性がある。今後、動物モデルを作成し解析するとともに、原因不明の精神神経疾患での検討が必要と考えられた。

## 結 論

ヒスチジンの長さの変異をもつHOXA1遺伝子の発現により細胞機能が障害され、神経分化の異常が引き起こされることが明らかになった。この変異は精神神経疾患の新たな原因になる可能性が示された。