

令和元年6月17日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09962

研究課題名(和文)先天性ケトン体代謝異常症の研究：欠損細胞株の樹立と変異酵素発現実験系の確立

研究課題名(英文) Research on defects in ketone body metabolism: Establishment of defective cell lines and expression systems of mutant enzymes .

研究代表者

深尾 敏幸 (Fukao, Toshiyuki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70260578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ケトン体代謝異常症の研究において本研究では、既に患者のいるHMGCS2欠損症、HMGCL欠損症、また症例のない3HBD、MCT1欠損症の原因酵素の野生型および変異型cDNAの発現実験系の確立を試みた。HMGCS2の発現系では最初ヒト由来細胞系での発現では十分な発現が得られなかった。そこで大腸菌での蛋白発現系に変更し、日本人に同定された4種の変異HMGCS2の活性が著しく低下していることを明らかにすることができた。3HBDのアッセイ系では3HBDノックアウトマウスの胎仔線維芽細胞を用いた系を確立できた。MCT1、HMGCLについてもマウス胎仔線維芽細胞を用いてノックアウト細胞を構築中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMG-CoA合成酵素欠損症の変異タンパクの発現系の確立をできたことで、日本の症例の確定診断ができ、日本に本症が存在することを論文として報告が可能となった。また日本で症例が同定されていないMCT1欠損症、世界でまだ欠損症の報告がない3HBD欠損症における変異タンパクの評価をできるようにしておくことは今後の迅速な確定診断において重要である。

研究成果の概要(英文)：I have been studying inborn errors of ketone body metabolism. In this study, we tried to establish expression systems of wild-type and mutant cDNAs for HMGCS2 deficiency and HMGCL deficiency of which patients have already been identified in Japan, MCT1 deficiency of which patients have not been identified yet in Japan, and 3HBD deficiency of which patients have never identified in the world. In case of HMGCS2 expression, we failed to get enough expression level for characterization, but we then successfully showed that 4 HMGCS2 mutants reduced enzyme activities significantly using bacterial expression system. In case of 3HBD expression, we established expression system using fetal fibroblast cell line from 3hBDH knock-out mice. We are now trying to establish knock-out cell lines of MCT1 or HMGCL from wild-type fetal fibroblasts.

研究分野：小児科学

キーワード：遺伝子 遺伝学 先天代謝異常症 ケトン体 発現実験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らはケトン体代謝異常症の研究を行ってきて、1) ケトチオラーゼ (T2) 欠損症においては世界で 100 例以上の酵素診断、遺伝子診断を行った。2) サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ (SCOT) 欠損症については、日本で最初の症例を診断し、これまでに世界で 20 例を超える症例を酵素診断、遺伝子診断してきた。これら 2 疾患については世界の診断センターの 1 つとなっている。3) HMG-CoA リアーゼ (HMGCL) 欠損症についても現在日本の症例の遺伝子診断のセンターとなっており、稀な疾患であるが最近の 2 例を遺伝子診断している。4) HMG-CoA 合成酵素 (HMGCS2) 欠損症は世界でも 20 例も報告のない疾患であるが、最近日本で初めて 3 例を診断することが出来た。現在ケトン体代謝異常症を疑われる症例に対して、脂肪酸ケトン体代謝遺伝子パネルを用いて 54 遺伝子の解析を行っている。2014 年に世界ではじめて報告されたモノカルボン酸トランスポーター 1 (MCT1) 欠損症、まだ世界で報告のない 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (3HBD) 欠損症、アセトアセチル-CoA 合成酵素 (AACS) 欠損症についても、今後日本でも疑われる症例が出てくると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、既に患者遺伝子変異を同定している HMGCS2 欠損症、HMGCL 欠損症、まだ症例のない 3HBD 欠損症、MCT1 欠損症、AACS 欠損症の原因酵素の野生型および変異型 cDNA の発現実験系を確立し、これまで同定した変異について評価、発表することと、新たな疾患が発見されたときにいち早く解析出来る様準備しておくことを目的とする。

3. 研究の方法

5 つの酵素の発現実験系は同様の方法で構築可能と考える。早期ナンセンス変異をもつなど酵素欠損線維芽細胞がある場合、その SV40-transformed cell line を作成し、ベースとなる活性の低い発現系を作成する。欠損細胞がないものは CRISPR-Cas9 の系でノックアウトして用いる。発現ベクターとしては基本的には pCAGGS を用いることで、トランスフェクション試薬 Lipofectamine2000 で効率よく導入を行う。発現実験は温度を変えて発現させることで、蛋白の不安定性などの評価も出来るようにする。当初の実験計画は上記であったが、十分な発現が見られず、一部大腸菌での発現系に変更した。

4. 研究成果

HMGCS2 の発現系の構築：もっとも症例の蓄積があり、患者に認められた遺伝子変異の評価のための発現系の構築が最優先であった。最初ヒト細胞培養系での発現ベクターを作成し、SV40 化ヒト線維芽細胞、HeLa 細胞、HepG2 細胞系でのリポフェクタミン、ヌクレオフェクション法を用いた一過性発現を組み合わせて実施したが、Wild-type の発現ベクターを用いても十分な発現が得られなかった。また Lascelles and Quant の報告した HMGCS2 活性測定法 (Clin Chim Acta260:85-97) についても、マウス肝臓ホモジネート、HepG2 細胞などを用いて検討したが、活性測定はうまく行うことができなかった。このため、大きく方針を転換し、大腸菌での蛋白発現、酵素精製系に変更した。これによって大腸菌用の GST 融合発現ベクターを構築し、大腸菌での発現、GST カラム精製を行なって半精製した。Wild-type の半精製 HMGCS2 を用いての酵素アッセイで十分な活性を検出でき、日本人に同定された V253A, M235T, R500C, S392L 変異 HMGCS2 のそれぞれ精製を行い、その活性が著しく低下していることを明らかにすることができた。また G219E 変異は可溶性に乏しく精製が困難であることがわかった。この内容は今年の Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism の年会 (ロツテルダム) で発表し、論文化することになっている。

3HBD のアッセイ系の構築およびそのほかの系の確立について：最初はヒト SV40-transformed fibroblasts で CRISPR-Cas9 系でのノックアウト細胞を作成しようと試みたが、ノックアウト細胞のスクリーニングのためのマーカーとしてなかなかイムのプロットでの検出が難しく難航した。そのため方針を変更し解析を進めていた 3HBD のノックアウトマウスの fetal fibroblasts を確立する方針とした。そして樹立に成功した。アッセイ系は非常に単純であり酵素活性のアッセイはこの細胞を用いて行うことが可能である。MCT1, HMGCL についても最初ヒト SV40-transformed fibroblasts で CRISPR-Cas9 系でのノックアウト細胞を作成しようと試み、いくつかのクローンについて解析を試みたが欠損細胞を得られず、現在 Wild-type のマウス fetal fibroblasts を用いて CRISPR-Cas9 系でのノックアウト細胞を構築中である。これは同じ細胞系で欠損細胞を樹立することが結果を比較する上で重要であるためである。なお AACS については既に共同研究者が発現系を確立しており今回の研究からは除外した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件) 以下 13 件すべて査読あり

1. **Fukao T**, Sasai H, Aoyama Y, Otsuka H, Ago Y, Matsumoto H, Abdelkreem E: Recent advances in understanding beta-ketothiolase (mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase, T2) deficiency. J Hum Genet. 64(2):99-111, 2019 doi: 10.1038/s10038-018-0524-x.

2. Kiema TR, Thapa CJ, Laitaoja M, Schmitz W, Maksimainen MM, **Fukao T**, Rouvinen J, Jänis J, Wierenga RK. The peroxisomal zebrafish SCP2-thiolase (type-1) is a weak transient dimer as revealed by crystal structures and native mass spectrometry. *Biochem J*. 2018 Dec 20. pii: BCJ20180788. doi: 10.1042/BCJ20180788.
3. Nakama M, Otsuka H, Ago Y, Sasai H, Abdelkreem E, Aoyama Y, **Fukao T**. Intronic antisense Alu elements have a negative splicing effect on the inclusion of adjacent downstream exons. *Gene*. 664:84-89., 2018 doi: 10.1016/j.gene.2018.04.064.
4. Nakama M, Otsuka H, Ago Y, Sasai H, Abdelkreem E, Aoyama Y, **Fukao T**. Intronic antisense Alu elements have a negative splicing effect on the inclusion of adjacent downstream exons. *Gene*. 664:84-89., 2018 doi: 10.1016/j.gene.2018.04.064.
5. Sasai H, Aoyama Y, Otsuka H, Abdelkreem E, Nakama M, Hori T, Ohnishi H, Turner L, **Fukao T**. Single-nucleotide substitution T to A in the poly-pyrimidine stretch at the splice acceptor site of intron 9 causes exon 10 skipping in the ACAT1 gene. *Mol Genet Genomic Med* 5(2):177-184, 2017. doi: 10.1002/mgg3.275.
6. Nguyen KN, Abdelkreem E, Colombo R, Hasegawa Y, Can NT, Bui TP, Le HT, Tran MT, Nguyen HT, Trinh HT, Aoyama Y, Sasai H, Yamaguchi S, **Fukao T**, Vu DC: Characterization and outcome of 41 patients with beta-ketothiolase deficiency: 10 years' experience of a medical center in northern Vietnam. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40:395-401. 2017 doi: 10.1007/s10545-017-0026-6.
7. Sasai H, Aoyama Y, Otsuka H, Abdelkreem E, Naik i Y, Kubota M, Sekine Y, Itoh M, Nakama M, Ohnishi H, Fujiki R, Ohara O, **Fukao T**: Heterozygous carriers of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA transferase deficiency can develop severe ketoacidosis. *J Inherit Metab Dis*. 40(6):845-852, 2017 doi: 10.1007/s10545-017-0065-z. 2017
8. Grünert SC, Schmitt RN, Schlatter SM, Gemperle-Britschgi C, Balcı MC, Berg V, Çoker M, Das AM, Demirkol M, Derks TGJ, Gökçay G, Uçar SK, Konstantopoulou V, Christoph Korenke G, Lotz-Havla AS, Schlune A, Staufner C, Tran C, Visser G, Schwab KO, **Fukao T**, Sass JO: Clinical presentation and outcome in a series of 32 patients with 2-methylacetoacetyl-coenzyme A thiolase (MAT) deficiency. *Mol Genet Metab*. 122(1-2):67-75, 2017 doi: 10.1016/j.ymgme.2017.06.012.
9. Aoyama Y, Sasai H, Abdelkreem E, Otsuka H, Nakama M, Kumar S, Aroor S, Shukla A, **Fukao T**: A novel mutation (c.121-13T>A) in the polypyrimidine tract of the splice acceptor site of intron 2 causes exon 3 skipping in mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. *Molecular Medicine Reports* 15:3879-3884, 2017 doi: 10.3892/mmr.2017.6434
10. Akagawa S, **Fukao T**, Akagawa Y, Sasai H, Kohdera U, Kino M, Shigematsu Y, Aoyama Y, Kaneko K: Japanese male siblings with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) without neurological regression. *JIMD reports* 32:81-85, 2017 doi: 10.1007/8904_2016_570
11. Erdol S, Türe M, Yakut T, Saglam H, Sasai H, Abdelkreem E, Ohtsuka H, **Fukao T** : A Turkish patient with Succinyl-CoA:3-oxoacid CoA transferase deficiency mimicking diabetic ketoacidosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening* vol 4, 2016 DOI: 10.1177/2326409816651281
12. Otsuka H, Sasai H, Nakama M, Aoyama Y, Abdelkreem E, Ohnishi H, Konstantopoulou V, Sass JO, **Fukao T**. Exon 10 skipping in *ACAT1* caused by a novel mutation (c.949G>A) located at an exonic splice enhancer site, *Molecular Medicine Reports* 14:4906-4910, 2016 doi: 10.3892/mmr.2016.5819
13. Abdelkreem E, Akella R, Dave U, Sane S, Osuka H, Sasai H, Aoyama Y, Nakama M, Ohnishi H, Mahmoud S, Abd El Aal M, **Fukao T**: Clinical and mutational characterizations of 10 Indian patients with beta-ketothiolase deficiency. *JIMD reports*, 5:59-65, 2016. doi: 10.1007/8904_2016_26.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Sasai H, Ohnishi H, Akagawa S, Akiba K, Hasegawa Y, Kobayashi M, Otsuka H, Aoyama Y, Ago Y, **Fukao T**: Functional analysis of mutant recombinant HSD17B10 proteins using an E. Coli expression system. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 4-7, Athens (Greece) 2018
2. Alijanpour M, Sasai H, Abdelkreem E, Ago Y, Soleimani S, Moslem L, Yamaguchi S, Rezapour M, Taghi M, Matsumoto H, **Fukao T**: Beta-Ketothiolase deficiency: unusual clinical presentation of non-ketotic hypoglycemic episodes due to secondary carnitine deficiency. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 4-7, Athens (Greece) 2018
3. **Fukao T**: (symposium8) Recent advances of defect in ketone body metabolism. The 5th Asian Congress of Inherited Metabolic Diseases, The 17th National Conference on Pediatric Endocrine and Genetic Metabolic Diseases 8/23-26/ 2018 Wuhan, China
4. **Fukao T**: (Invited lecture) Defects in Ketone body metabolism and their newborn screening. The 18th Annual Meeting of Korean Society of Inherited Metabolic Diseases (June 22, 2018 Seoul, South Korea)
5. **Fukao T**: Genetic Diseases of Ketone Body Metabolism (Symposium 6 Complex Genetic Disease). The 12th Asia-Pacific Conference on Human Genetics (11/8-11/10/2017 Bangkok, Thailand Speaker)
6. Sasai H, Aoyama Y, Otsuka H, Abdelkreem E, Naiki Y, Kubota M, Sekine Y, Itoh M, Nakama M, Ohishi H, Fujiki R, Ohara O, **Fukao T**: Heterozygous Carriers of Succinyl-CoA:3-oxoacid CoA Transferase Deficiency Can Develop Severe Ketoacidosis. The 12th Asia-Pacific Conference on Human Genetics (11/8-11/10/2017 Bangkok, Thailand)
7. Otsuka H, Kimura T, Ago Y, Sasai H, Nakama M, Aoyama Y, Abdelkreem E, Ohnishi H, Osawa M, Yamaguchi S, Kawashima Y, Ohara O, **Fukao T**: Insufficient Ketogenesis in 3-hydroxybutyrate Dehydrogenase (Bdh1) KO Mice in Fasting Test. 13th the International Congress of Inborn Errors of Metabolism. (9/5-9/8/2017 Rio De Janeiro, Brazil)
8. Sasai H, Aoyama Y, Otsuka H, Abdelkreem E, Naiki Y, Kubota M, Sekine Y, Itoh M, Nakama M, Ohnishi H, Fujiki R, Ohara O, **Fukao T**: Heterozygous Carriers of Succinyl-CoA:3-oxoacid CoA Transferase Deficiency Can Develop Severe Ketoacidosis. 13th the International Congress of Inborn Errors of Metabolism. (9/5-9/8/2017 Rio De Janeiro, Brazil)
9. Sasai H, Otsuka H, Fujiki R, Ohara O, Nakajima Y, Ito T, Kobayashi M, Tajima G, Sakamoto O, Matsumoto S, Nakamura K, Hamazaki T, Kobayashi H, Hasegawa Y, **Fukao T**: Molecular Diagnosis for Target Metabolic Diseases of Newborn Screening Using a Gene Panel in Japan. 13th the International Congress of Inborn Errors of Metabolism. (9/5-9/8/2017 Rio De Janeiro, Brazil)

〔図書〕(計 1 件)

1. **Fukao T**, Harding CO: Chapter 10 Ketone Synthesis and Utilization Defects. In Sarafoglou K, Hoffmann GF, Roth KS eds 2nd edition Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism McGraw Hill Education NewYork 2017. pp145-160

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：笹井 英雄、吾郷 耕彦、大塚 博樹、松本 英樹、仲間 美奈

ローマ字氏名： SASAI Hideo, AGO Yasuhiko, OTSUKA Hiroki, MATSUMOTO Hideki, MAKAMA Mina

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。