

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17959

研究課題名(和文) HSD10病における分子生物学的機能解析法の確立

研究課題名(英文) Molecular and functional analysis of HSD 10 disease

研究代表者

笹井 英雄 (Sasai, Hideo)

岐阜大学・大学院医学系研究科小児科学・助教

研究者番号：20509781

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)：先行研究で確立したpET28aを用いた大腸菌タンパク発現系を用いてHSD10タンパク(HSD17B10)の機能解析を進めた。イソロイシン代謝系における酵素活性測定では、より迅速で簡便な評価が可能となり、精製タンパクによるwild-typeと病的変異(重症例と軽症例)の差異について追加解析を実施できた。ミトコンドリア内コレステロール代謝系の17 $\alpha$ -hydroxysteroid脱水素酵素の活性測定系を樹立するため、反応条件を変えながら最適化も進めている。また、pET Duetベクターを用いて、HSD10とMRPP1の共発現にも成功したため、タンパク結合能等の機能評価へつなげていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはこれまで、ケトン体代謝異常症の遺伝子解析や機能評価を継続して行ってきた。そして、当教室において、国内初のHSD10病の幼児例を含む本症3症例を明らかにしており、国内での解析を精力的に実施している。HSD10病の中でも、重症例と軽症例では臨床症状には大きな差異がある。HSD10病の詳しい病態や長期予後は不明な部分が多く、治療法も確立していない。本研究の結果は国内外問わず学術的にも臨床的にも大きな意味があるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a molecular biological analysis method for HSD10 disease, we proceeded with the functional analysis of HSD10 protein (HSD17B10) using the protein expression system in *E. coli* using pET28a established in a previous study. The enzymatic activity of HSD10 in the isoleucine-metabolizing system can be evaluated more quickly and easily, and the difference between wild-type and pathological mutations (severe and mild cases) can be analyzed by purified protein. In addition, to establish a system for measuring the activity of 17 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the mitochondrial cholesterol metabolism system using an absorption spectrophotometer, we will optimize the system by changing the reaction conditions. We also succeeded in co-expressing HSD10 and MRPP1 using the pET Duet vector to evaluate the relationship with MRPP1 protein, which is an important component.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：HSD10病 先天代謝異常症 ケトン体 17 $\alpha$ -hydroxysteroid

## 1. 研究開始当初の背景

HSD10 病は稀な X 連鎖劣性遺伝形式の先天代謝異常症であり、重症例では神経退行をきたし予後不良である。原因遺伝子である *HSD17B10* は イソロイシン代謝系の 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA 脱水素酵素(2M3HBD)、ミトコンドリア内コレステロール代謝系の 17 $\alpha$ -hydroxysteroid 脱水素酵素、ミトコンドリア RNaseP の 3 つの機能をもつ多機能タンパクである。これまで、本邦での 3 症例全例を当教室で診断した。同じ HSD10 病でも遺伝子変異の種類によって臨床像に非常に大きな差異があり、その差がどの機能の異常によるのかまだ明らかでないことが多い。同定された 3 種類の変異のうち、p.A154T、p.A157V を有する 2 症例は比較的症状が軽い非典型例であり、p.R226Q の症例は重症型と考えられている。さらに本酵素はミトコンドリア DNA からの転写物のプロセシングに必要な RNaseP を構成する 3 タンパク(HSD10(HSD17B10)、MRPP1、MRPP3)の 1 つであることが明らかとなった(Holzmann J, et al. Cell. 2008)。本症の病態としてはイソロイシン代謝系やミトコンドリア内コレステロール代謝系などの酵素活性低下は主病態でなく、RNaseP の構成タンパクの機能低下が本態であるともいわれているが(Zschocke J, et al. J Inherit Metab Dis. 2012)、それらと臨床像との関連は報告も限られており、詳しい病態は不明な部分が多い。今回、本邦症例で同定された HSD10 病の変異タンパクの機能を解析することで、臨床的重症度と 3 つの機能障害にどのような関連があるのかを明らかにすることを目指す。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまで、ケトン体代謝異常症の遺伝子解析を行ってきた。そして、国内初の HSD10 病の幼児例を含む本症 3 症例を診断している。HSD10 病の詳しい病態や長期予後は未だ分かっておらず、本研究により HSD10 病における分子生物学的機能解析法の確立を目指し、病態解明につなげていく。

## 3. 研究の方法

本研究では変異を導入した HSD17B10 タンパクの酵素活性やタンパクの安定性をみることで、臨床像との比較を行う。HSD17B10 タンパクの以下の 3 機能の差異をみることで病態に迫ることができると考えている。

- 1) イソロイシン代謝系の 2M3HBD としての活性低下が問題となっているのか。
- 2) ミトコンドリア内コレステロール代謝系の 17 $\alpha$ -hydroxy steroid dehydrogenase type10 としての活性低下が問題となっているのか。
- 3) RNaseP の機能低下が問題となっているのか。  
(特に、RNaseP のなかで HSD17B10 タンパクに変異があると、他のコンポーネントと complex がつくりにくくなり、そのため RNaseP の機能低下が問題となる可能性がないか。また、RNaseP を構成する残りの 2 つのタンパク(MRPP1、MRPP3)も発現・精製し、HSD17B10 タンパクとの相互作用に変化がないか。)

筆者らは、科研費(若手研究(B)平成 29 年度~平成 30 年度「HSD10 病の病態解析」課題番号 17K16245 研究代表者: 笹井英雄)による先行研究で、HSD10 関連タンパクの発現実験系を構築した。また、1)に関しては、吸光度計を用いたカップリングアッセイによる酵素活性測定法(Zschocke J, et al. Pediatr Res. 2000)を確立し、変異タンパクにおける活性低下と臨床的重症度のある程度の相関関係を見出した。(Holzmann J, et al. Cell. 2008)を参考に最終的には、ほ乳類細胞用と大腸菌用の発現ベクターの作成に成功し、大腸菌を用いたリコンビナントタンパクも精製可能としている。2)に関し、(He XY, et al. Mol Cell Endocrinol. 2005)を参考に基質をアロプレグナロンとして吸光度計を用いた NAD<sup>+</sup>と NADH の量的変化の検出によるコレステロール代謝の活性測定系の樹立を試みたが、測定法の確立には至らなかった。これは、Wild-type に比較し変異タンパクの不安定性が予想以上に強かったこともあり、タンパク精製から活性測定までに時間を要したことが原因のひとつと考えられる。そのため、先行論文(Oerum S, et al. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017)を参考にバッファの調整や、再タンパク精製から吸光度測定までを迅速に施行する等の工夫を行なった。

さらに、近年の報告で RNaseP の機能発現には HSD17B10 と MRPP1 が結合していることが必須であることも分かってきており、RNaseP の機能測定には HSD17B10 と MRPP1 を共発現させる必要性も示唆されている(Oerum S, et al. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017)。そのため、以下のように研究を行った。

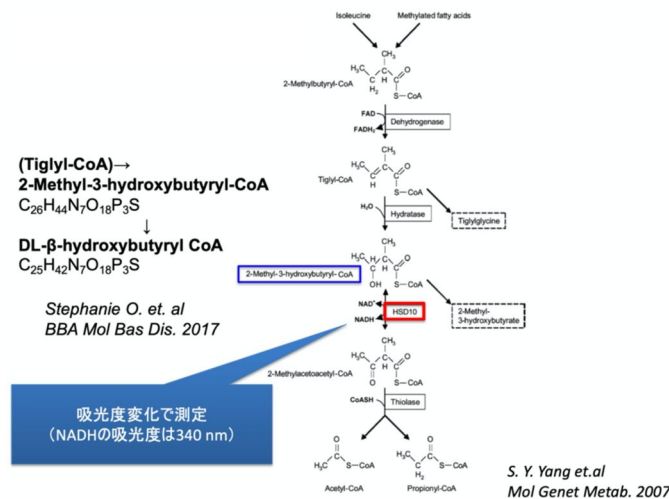
## (1)タンパクの再精製

タンパク発現実験系に関しては(Holzmann J, et al. Cell. 2008)を参照して行い、HSD17B10、MRPP1、MRPP3 の3種類のタンパクに関し発現を行なった。大腸菌を用いたタンパク発現用に pET28 に目的遺伝子を組み込んだ。タンパク精製に使用するため、His x6 等の tag を付加した。タンパク発現を確認後に HSD17B10 を KOD mutagenesis にて塩基置換し、p.R226Q、p.A157V、p.A154T の3種類の変異を導入した。このベクターで、大腸菌 (BL21(DE3)) を用いてタンパク大量培養精製を行った。product に対してイオン交換樹脂ろ過、液体クロマトグラフィー(ニッケルカラム併用法とゲルろ過法)、グルタチオンセファロースろ過を用いて高純度のタンパクを精製した。そして、リコンビナントタンパク(A154T、A157V、R226Q)の再精製を実施した。

## (2)酵素活性測定系

### イソロイシン代謝系における 2M3HBD 酵素活性測定

先行研究では、吸光度計を用いたカップリングアッセイによる T2 の酵素活性測定(Zschocke J, et al. *Pediatr Res.* 2000)と同じカップリングアッセイを用いることで酵素活性測定を行なった。



これは、NAD<sup>+</sup>とNADHの量的変化を吸光度で測定することによりHSD17B10の酵素活性測定が可能である。ただし、基質としてTiglyl-CoAを用いる従来の方法の場合、1回の測定に1時間程度の時間を要し、不安定な変異タンパクの測定には測定精度の懸念があった。そのため、(Stephanie O, et al. *BBA Mol Bas Dis.* 2017)に準じて、基質としてDL-hydroxybutyryl-CoAを用いる新しい測定法を確立した(図1)。この方法により1測定あたり数分で迅速に測定可能となる。

図1 イソロイシン代謝系における 2M3HBD 酵素活性測定

ミトコンドリア内コレステロール代謝系における 17 $\alpha$ -hydroxysteroid 脱水素酵素活性測定同様の手法を用いて、(He XY, et al. *Mol Cell Endocrinol.* 2005)を参考に、基質をアロプレグナロンとして吸光度計を用いた NAD<sup>+</sup>と NADH の量的変化の検出によるコレステロール代謝の活性測定系の樹立を試みた。

## (3)発現実験系の追加構築

デュアルベクターである pet-Duet ベクターを用いて、HSD17B10 と MRPP1 の共発現用のベクターを作成し、タンパク発現を行なった。

## 4. 研究成果

### (A)結果

#### (1)タンパクの再精製

今回、HSD10 関連タンパクに関し、大腸菌を用いたリコンビナントタンパクの再精製を行い、各種のタンパク解析が可能になった。HSD17B10のWild-typeタンパク(WT)、変異タンパク(A154T、A157V、R226Q)の発現に関し、図2に示す。

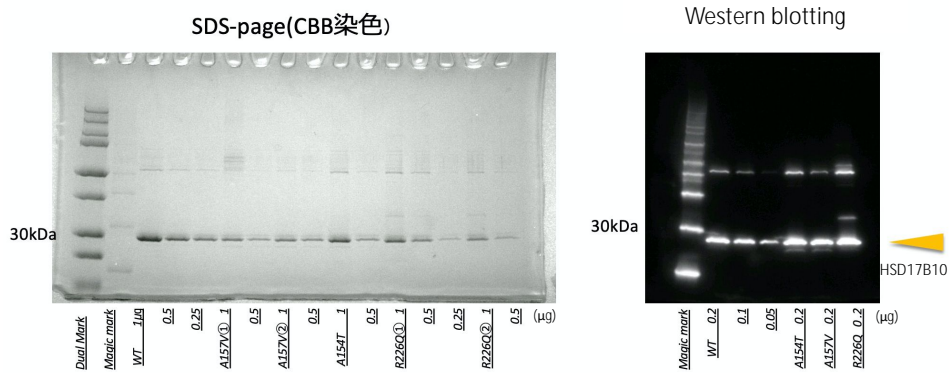


図 2 HSD17B10 タンパク (約 27kDa) を発現し再精製した。

## (2) 酵素活性測定系

### イソロイシン代謝系における 2M3HBD 酵素活性測定

イソロイシン代謝系における 2M3HBD 酵素活性測定に関しては、基質として DL- $\alpha$ -hydroxybutyryl-CoA を用いる測定法を確立した。この方法により 1 測定あたり数分で迅速に測定可能となった。Wild-type と比較し変異タンパクにおける活性低下を認めた。今回の解析では、変異タンパクの活性と臨床的重症度には明らかな相関はみられなかった。図 3 に大腸菌リコンビナントタンパクを用いた活性測定の結果を示す。

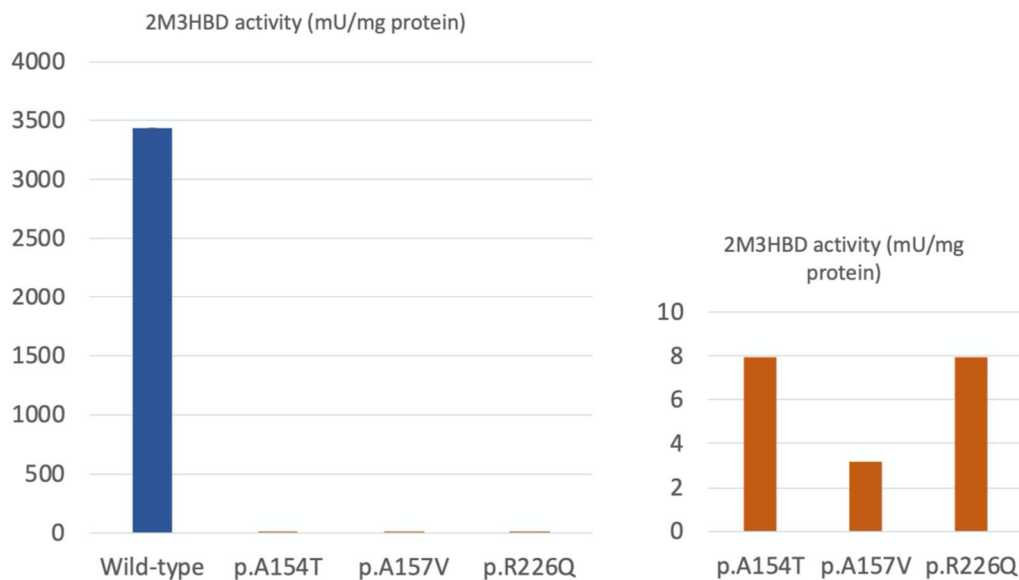


図 3 大腸菌リコンビナントタンパクを用いた 2M3HBD 活性測定：

Wild-type と比較し、変異タンパクでは 2M3HBD 活性が大きく低下している。変異タンパク同士と比較において、軽症の非典型例とされる p.A154T や p.A157V と、重症型とされる p.R226Q の活性に有意差はみられなかった。

### ミトコンドリア内コレステロール代謝系における 17 $\alpha$ -hydroxysteroid 脱水素酵素活性測定

その後は引き続き、ミトコンドリア内コレステロール代謝系における酵素活性測定に関し、(He XY, et al. Mol Cell Endocrinol. 2005)を参考に基質をアロプレグナロンとして吸光度計を用いた NAD<sup>+</sup>と NADH の量的変化の検出によるコレステロール代謝の活性測定系の樹立を試みた。しかし、測定結果が安定せず、現時点では測定の樹立に至っていない。(図 4 参照) 種々の原因が考えられ、一つには、キュベット内で混濁が生じ、吸光度測定が阻害されることなどで適切に活性測定が実施できていない可能性が考慮された。基質であるアロプレグナロンがバッファーに難溶であり、微小な沈殿等を形成している可能性を考慮し、Km 値(7.7 $\mu$ M 程

度)を参考に、基質濃度を下げた測定やキュベット内に界面活性剤のコール酸等を追加した測定を実施したが、やはり吸光度変化に差異は認めなかった。よって、基質の溶解については問題ないと考えている。現在は、リコンビナントタンパクを精製する際の抽出バッファー中の個別成分がアロプレグナロンに干渉している可能性を考慮し、条件検討を継続中である。

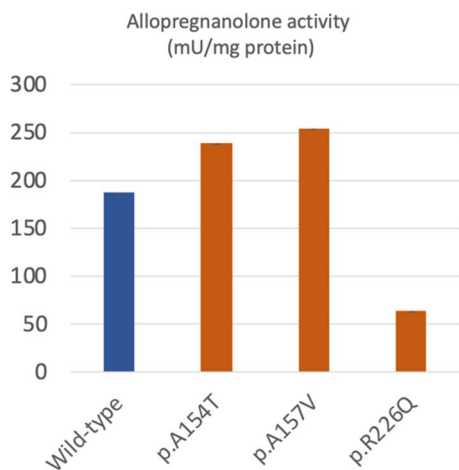


図4 ミトコンドリア内コレステロール代謝系における酵素活性測定

Wild-typeと比較し、変異タンパクのR226Qでは活性が低下してみえるが、測定ごとのばらつきが大きく、現時点での評価は困難と考えている。

### (3)発現実験系の追加構築

HSD17B10 と MRPP1 の共発現用のベクターを作成し、タンパク発現に成功した。今後、KOD mutagenesis を用いて、変異を組み込む予定である。

#### (B)今後の展望

今後、以下の予定で研究を進めることを予定している。

#### (1)コレステロール代謝系における酵素活性測定系の樹立

リコンビナントタンパクを用いて、コレステロール代謝系における酵素活性測定の条件検討を継続して行う。さらに、すでに確保されている患者皮膚線維芽細胞においても同様の酵素活性測定を行う。皮膚線維芽細胞でのコレステロール代謝系の酵素活性測定に関しては報告例がまだなく、重要なデータとなりうるため、対照コントロールと患者(重症例と軽症例)で差異をみる。

#### (2)発現実験系の追加構築

HSD17B10 と MRPP1 の共発現用のベクター(pet-Duet ベクター)作成をさらに進め、KOD mutagenesis を用いて既報の変異を組み込む。HSD17B10 と MRPP1 との結合が RNaseP 活性に重要であることから、HSD17B10 のどの領域が結合に重要であるのかを pet-Duet ベクター上の HSD17B10 に規則的な mutagenesis を起こした変異体も作成し、その安定性についても調べる予定である。

#### (3)RNaseP の機能解析

特に、RNaseP 内で HSD10 タンパクに変異があると、MRPP1 との complex が不安定になり、そのため RNaseP の低下が問題となるのかを調べる。大腸菌用ベクター、それによる作成タンパクを用いて、結合実験=プルダウン、BiaCORE、分析ゲル濾過等の手法によるタンパク機能変化を確認する。また、円二色偏光法でタンパク安定性の確認や、リコンビナントタンパク 3 つ(HSD17B10、MRPP1、MRPP3)を混合して mtRNA の分解実験を行うことで RNaseP 機能の解析を行いたいと考えている。

HSD17B10 は多機能タンパクであり、さらに 3 つのコンポーネントの一つとして機能するため、タンパク機能への関連因子は多く複雑である。引き続き、種々の側面からのタンパク解析を進めていくことで HSD10 病の病態解明につなげていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakama Mina, Sasai Hideo, Kubota Mitsuru, Hasegawa Yuki, Fujiki Ryoji, Okuyama Torayuki, Ohara Osamu, Fukao Toshiyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Novel HADHB mutations in a patient with mitochondrial trifunctional protein deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-020-0097-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka Hiroki, Kimura Takeshi, Ago Yasuhiko, Nakama Mina, Aoyama Yuka, Abdelkreem Elsayed, Matsumoto Hideki, Ohnishi Hidenori, Sasai Hideo, Osawa Masatake, Yamaguchi Seiji, Mitchell Grant A., Fukao Toshiyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Deficiency of 3 hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH1) in mice causes low ketone body levels and fatty liver during fasting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Inherited Metabolic Disease	6. 最初と最後の頁 960 ~ 968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jimd.12243	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ago Yasuhiko, Otsuka Hiroki, Sasai Hideo, Abdelkreem Elsayed, Nakama Mina, Aoyama Yuka, Matsumoto Hideki, Fujiki Ryoji, Ohara Osamu, Akiyama Kazumasa, Fukui Kaori, Watanabe Yoriko, Nakajima Yoko, Ohnishi Hidenori, Ito Tetsuya, Fukao Toshiyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Japanese patients with mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: <i>in vitro</i> functional analysis of five novel HMGCS2 mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2020.9166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sasai H, Ago Y, Matsumoto H, Otsuka H, Hosokawa J, Fujiki R, Ohara O, Nakajima Y, Ito T, Hara K, Kobayashi M, Tajima G, Ichinoi N, Sakamoto O, Jun K, Matsumoto S, Nakamura K, Hamazaki T, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T
2. 発表標題 Summary of 5-year gene panel study for target inherited metabolic diseases in newborn screening -fatty acid oxidation defects-
3. 学会等名 The 6th Annual International Network for Fatty Acid Oxidation Research and Management symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Sasai H, Ago Y, Matsumoto H, Otsuka H, Hosokawa J, Fujiki R, Ohara O, Nakajima Y, Ito T, Hara K, Kobayashi M, Tajima G, Ichinoi N, Sakamoto O, Jun K, Matsumoto S, Nakamura K, Hamazaki T, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T
2. 発表標題	Summary of 5-year gene panel study for target inherited metabolic diseases in newborn screening
3. 学会等名	Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	笹井英雄、吾郷耕彦、松本英樹、大塚博樹、細川淳一、藤木亮次、小原収、中島葉子、伊藤哲哉、小林弘典、長谷川有紀、原圭一、小林正久、但馬剛、市野井奈津子、城戸淳、松本志郎、中村公俊、濱崎孝史、深尾敏幸
2. 発表標題	新生児マススクリーニング対象先天代謝異常症に対する遺伝子パネル解析の5年間のまとめ
3. 学会等名	日本先天代謝異常学会総会 (第61回)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	笹井英雄、吾郷耕彦、松本英樹、赤川翔平、秋葉和壽、長谷川行洋、小林正久、仲間美奈、青山友佳、深尾敏幸
2. 発表標題	HSD17B10タンパクを用いたHSD10病の酵素活性測定
3. 学会等名	日本先天代謝異常学会総会 (第61回)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	笹井英雄
2. 発表標題	高ケトン、低ケトン血症からみつける先天代謝異常
3. 学会等名	日本先天代謝異常学会セミナー (第16回) (招待講演)
4. 発表年	2020年



1. 発表者名 笹井英雄
2. 発表標題 わが国での新規対象疾患の選定基準を策定する上での論点について考える；指標の感度や特異度が十分でない疾患
3. 学会等名 日本マスキング学会学術集会(第47回)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 笹井 英雄, 深尾 敏幸	4. 発行年 2019年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 2
3. 書名 よくわかる新生児マスキングガイドブック(山口清次 編) 「HSD10病」	

1. 著者名 笹井英雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2
3. 書名 今日の小児治療指針(第17版) 「ミトコンドリア 酸化異常症」	

1. 著者名 笹井英雄	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 7
3. 書名 小児科診療 2021 Vol.84 No.2 「確定検査:遺伝子解析を中心に」	



1. 著者名 笹井英雄	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 7
3. 書名 小児科診療 2021 Vol.84 No.2 「ケトン体代謝異常症」	

〔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
---------	---------