

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22591131

研究課題名 (和文) 高ロイシン血症例における分枝鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素のチアミン反応性に関する研究研究課題名 (英文) Familial hyperleucinemia with normal branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase activity suggesting novel mechanism of thiamin-responsive maple syrup urine disease

研究代表者

但馬 剛 (Tajima Go)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：00432716

研究成果の概要 (和文)：

新生児期から血中ロイシン高値が続く、分枝鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素 (BCKD) 活性正常の同胞例を解析し、BCKD kinase (BCKDK) に父由来ヘテロ接合性新規 1 塩基置換を同定した。BCKDK は E1 $\alpha$  のリン酸化によって BCKD 複合体を不活化する酵素であり、本家系は BCKDK の機能亢進性変異による常染色体優性遺伝性メープルシロップ尿症という新規病型と考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We performed genetic analysis of two siblings showing persistent hyperleucinemia since newborn period in spite of normal levels of branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase (BCKD) activity, and detected a heterozygous missense basal substitution in BCKD kinase (BCKDK) gene that derived from their father. As BCKDK inactivates BCKD complex by phosphorylation of E1 $\alpha$  subunit, this family suggests a novel autosomal-dominant subtype of maple syrup urine disease caused by a gain-of-function mutation of BCKDK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児代謝・栄養学，メープルシロップ尿症，分枝鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素複合体，分枝鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素キナーゼ (BCKDK)，常染色体優性遺伝

## 1. 研究開始当初の背景

(1)メープルシロップ尿症 (MSUD) の新生児マス・スクリーニング (NBS) における血中

ロイシン高値例の確定検査として、我々は 2002 年から分枝鎖  $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素 (BCKD) 複合体の活性測定を行ってきた。その過程で、NBS 陽性以降ロイシンはじめ分

枝鎖アミノ酸 (BCAA) 高値が遷延しているにも関わらず、正常な BCKD 複合体活性を示す同胞例 (家系 A, 2 兄弟) を発見した。

(2)MSUD には「チアミン反応型」という病型が知られている。BCKD 複合体を構成するサブユニット (E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2, E3) のうちチアミン結合部位は E1 $\alpha$  に存在するが、チアミン反応型 MSUD 症例の遺伝子変異は E2 に見出されてきた。近年、過剰量のチアミン存在下でも活性が正常の 40%程度に留まる現象を説明できる特殊な分子機序が明らかにされている。

(3)我々が遭遇した同胞例は正常対照と同等の活性値を示すことから、従来の E2 変異例とは異なる機序によるチアミン反応性の病型である可能性が推測された。

## 2. 研究の目的

同胞例であることから遺伝子異常の存在が強く推定され、その解析によって、MSUD のチアミン反応性機序に関する新知見を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

同胞例の原因として、E1 $\alpha$  のチアミン結合部位に直接影響する変異の存在を推測し、直接シーケンス法による全エクソン+イントロン境界域の解析から開始した。期待される変異が同定されれば、速度論的解析によるチアミン反応性を評価する方針とした。

## 4. 研究成果

(1)E1 $\alpha$  の解析では変異が同定されなかった。大欠失などタンパク機能に重大な障害を及ぼす検出困難な変異の存在は論理的に考えられないため、BCAA 代謝に関連する他の分子のシーケンスを順次進めることとした。

(2)BCKD 複合体の活性に直接寄与する E1 $\beta$ , E2, E3 のうち、高乳酸血症を伴い病型が大きく異なる E3 を除いて解析を行ったが、変異は同定されなかった。

(3)BCKD 複合体の上流に位置する分枝鎖アミノトランスフェラーゼ (BCAT) には 2 種のアイソザイム (BCAT-1, BCAT-2) が存在するが、これらの変異による BCAA 代謝障害の実例はヒトでは知られていない。両遺伝子の解析も実施したが、変異は同定されなかった。

(4)残る関連分子として、E1 $\alpha$  のリン酸化/脱リン酸化によって BCKD 複合体の活性を調節する BCKD kinase (BCKDK), BCKD phosphatase (BCKDP) の塩基配列を解析した。

BCKDP は BCKD 複合体を活性化させる酵素であり、その変異による MSUD の初例が 2011 年にヨーロッパ先天代謝異常学会 (SSIEM) で報告されている (Oyarzabal A et al. J Inherit Metab Dis 34: S79, 2011) が、我々の症例では変異を認めなかった。

(5)BCKDK は BCKD 複合体の活性を抑制する酵素であることから、BCAA 代謝障害の原因としては考えにくかったが、新規のヘテロ接合性 1 塩基置換 (c.406C>A, p.L136M) が検出された (図 1)。両親の解析にて上記アレルは父親由来と判明した。本家系には新生児スクリーニング陰性の同胞がさらに 3 名あり、うち 2 名は正常配列で、1 例は c.406C>A のヘテロ接合体であった (表 1)。

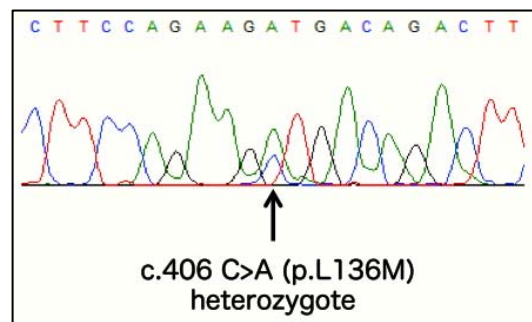


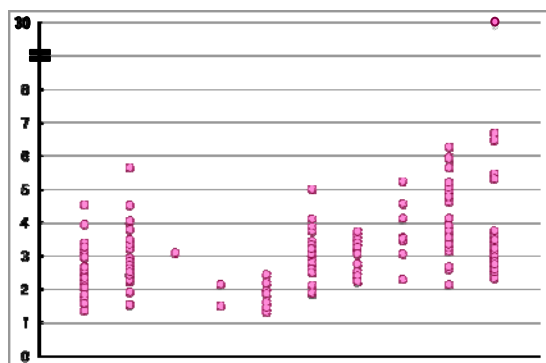
図 1. 家系 A の兄弟例で同定された BCKDK ヘテロ接合性 1 塩基置換

表 1. 3 家系の酵素活性と遺伝子解析結果

家系	番号	個体	活性 (%)	分子	アミノ酸置換 (WT=正常)
A	1	患児, 弟	105	B C K D K	L136M/WT
	2	患児, 兄	117		
	3	父	未検		
	4	母			
	5	同胞 1			WT/WT
	6	同胞 2			
	7	同胞 3	L136M/WT		
B	8	長姉	15	E1 $\alpha$	R84W/Q177X
	9	次姉	33		
	10	妹	6		
C	11	兄	8	E1 $\beta$	P234T/ E264K
	12	弟	12		

(6)本家系とは別の 2 家系で、よく似た臨床経過ながら BCKD 複合体活性の明らかな低下を認めた同胞例 (家系 B, 3 姉妹/家系 C, 2 兄弟) についても遺伝子解析を実施したところ、家系 B では E1 $\alpha$ , 家系 C では E1 $\beta$  に、それぞれ複合ヘテロ接合性変異が同定された (表 1)。これら 3 家系の血中 BCAA 濃度を比較したところ、家系 A の BCKDK c.406C>A ヘテロ個体は家系 B, C の罹患児と同程度の分布を示した (※A-3, 7 は今後のデータ蓄積が必

要) のに対し、家系 A の BCKDK 正常個体は正常レベルであった(図 2)。



A-1 A-2 A-3 A-7 A-4,5,6 B-8 B-9 B-10 C-11 C-12

図 2. 3 家系の血漿ロイシン値の分布(mg/dL)

(7)BCKDK c. 406C>A が BCKD 複合体活性を低下させるなら、BCKDK によるリン酸化を亢進させる機能獲得性変異でなければならず、その場合の表現型は常染色体優性遺伝形式に従うことになる。BCKDK については、ノックアウトマウスが BCKD 複合体活性の亢進による慢性的な低 BCAA 血症と発育障害・てんかん発作ほか各種の神経症状を呈することが報告されていたが、ヒトでも昨年、自閉症状とてんかんを示す家系例の解析で、BCKDK 機能喪失性変異(c. 671G>C, p. R224P) のホモ接合体が初めて報告された(Novarino G et al. Science 338: 394, 2012)。

(8)現在、家系 A の BCKDK 機能解析実験を進めているが、上記文献に記載された機能喪失性変異と比較検討するため、野生型 BCKDK の発現ベクター／各変異を組み込んだ BCKDK 発現ベクター(図 3-1, 3-2)／BCKDK の基質に相当する野生型 E1 $\alpha$  の発現ベクターを作成した段階である。今後これを HEK293 細胞へ導入し、E1 $\alpha$  のリン酸化部位に特異的な抗体(作成中)を用いて、家系 A の変異 BCKDK によるリン酸化亢進の有無を検証する方針である。

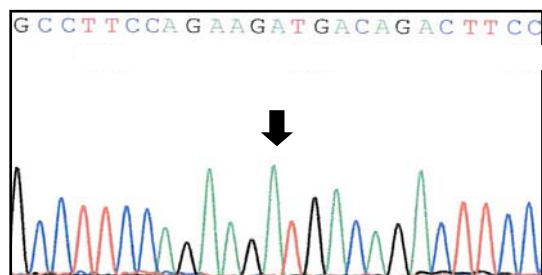


図 3-1. BCKDK 406C>A (L136M) 発現ベクター

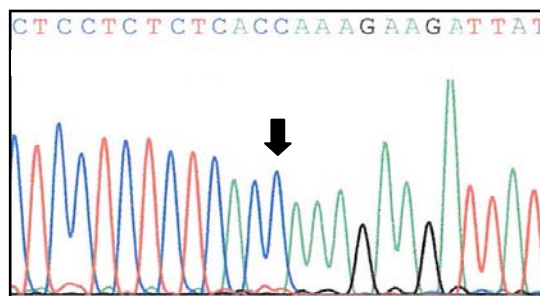


図 3-2. BCKDK 617G>C (R224P) 発現ベクター

(9)当初の想定とは異なる展開となったが、従来の MSUD の概念を超えた BCAA 代謝の臨床的意義を明らかにしていく新たな契機であり、特に BCAA 欠乏による自閉症例は食事療法による治療の可能性が期待される。BCKDK 機能解析系を確立することで今後、国内における BCAA 高値例・低値例の診断と治療管理の向上につなげたいと考えている。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- 香川礼子, 津村弥来, 原圭一, 岡田賢, 但馬剛, 佐倉伸夫, 徳原大介, 岡野善行, MSUD の酵素診断: 正常活性を示すロイシン持続高値同胞例の BCKDK 遺伝子解析, 第 54 回日本先天代謝異常学会, 2012 年 11 月 15-17 日, 岐阜市.
- Go Tajima, Miyuki Tsumura, Yoko Mizoguchi, Akari Utsunomiya, Keiichi Hara, Satoshi Okada, Yoshiyuki Okano, Nobuo Sakura, Masao Kobayashi, Enzymatic diagnosis of maple syrup urine disease in Japan: application of HPLC-based radioisotope-free method measuring isovaleryl-CoA production, Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) Annual Symposium 2011, 30 Aug - 2 Sep, 2011, Geneva, Switzerland.

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

但馬 剛 (Tajima Go)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 00432716

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

岡田 賢 (Okada Satoshi)  
広島大学・病院 (医)・病院助教  
研究者番号：80457241

津村 弥来 (Tsumura Miyuki)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
研究員  
研究者番号：80646274

香川 礼子 (Kagawa Reiko)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
大学院生

宇都宮 朱里 (Utsunomiya Akari)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
大学院生

溝口 洋子 (Mizoguchi Yoko)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
大学院生