

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591505

研究課題名(和文)ケトン体代謝とその異常症の解析 SCOT 遺伝子発現調節機構の解明を中心にしてー

研究課題名(英文) Study on ketone body metabolism and its defects: mainly gene expression mechanism of SCOT gene

研究代表者

深尾 敏幸 (Fukao, Toshiyuki)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70260578

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)：主にケトン体代謝に重要なSCOT遺伝子の肝臓特異的発現調節機構について解析し、1)3'非コード領域へのmiRNA結合等による肝臓特異的な調節はないこと。2)転写レベルにおいて肝臓ではSCOT発現が抑制されていることを明らかにした。また、-ケトチオラーゼ欠損症でのD317N変異はミスセンス変異というよりスプライシング異常を来す変異であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I mainly analyzed the mechanism of liver-specific suppression of SCOT gene. 1)Liver specific suppression activity was not observed in human and mouse 3' non-coding region sequences when examined by a luciferase assay. 2)Using ChiP assay with RNA polymerase 2 antibody, transcriptional activity of SCOT gene regions were compared with that of GAPDH in mouse heart, kidney and liver tissues. SCOT transcription in the liver was much low comparing to that in the kidney and heart. These data suggest that SCOT gene expression is suppressed mainly at the transcriptional level in liver. I also confirmed that a missense mutation c.949G>A(D317N) caused exon 10 skipping in the mini-gene splicing experiment, indicating that this mutation functions as a splicing mutation rather than a missense mutation.

研究分野：小児科学

キーワード：ケトン体代謝 先天代謝異常症 スプライシング 遺伝子異常 遺伝子発現調節 OXCT1 ChiPアッセイ

1. 研究開始当初の背景

ケトン体は脳においてグルコースの代替となるほぼ唯一のエネルギー供給ベクターである。ケトン体は肝臓で主に酸化系由来で産生され、肝外組織で取り込まれ、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ (SCOT) およびミトコンドリア・アセトアセチル-CoA チオラーゼ (T2) によって活性化され、acetyl-CoA となってエネルギーとして利用される。ケトン体の利用障害をきたす SCOT、T2 の欠損症では重篤なケトアシドーシス発作をきたし死亡したり、重篤な後遺症を来しうる稀な疾患である。しかし診断がつけば、重篤な発作を予防して正常発達することができることから重要な疾患である。

申請者は、国内外におけるケトン体利用障害をきたす T2 欠損症、SCOT 欠損症疑い患者の酵素診断、遺伝子解析のセンター的役割を現在まで果たしてきている。

ヒト T2、SCOT の cDNA、Gene はすべて申請者らが報告しており、世界の T2 欠損症、SCOT 欠損症の大半の臨床情報、細胞を有し、蛋白遺伝子解析はすべて申請者らが報告し、臨床への還元のための報告も行っている (英文原著論文 60 編、英文総説 3 編、英文著書分担執筆 4 編など)。アミノ酸置換の蛋白 3 次構造への影響についての検討にも早くから注目し、ヒト T2、SCOT 蛋白モデルを発表し、その後フィンランドの Wierenga 博士との共同研究で、ヒト細胞質チオラーゼ、ヒト T2 の蛋白 3 次構造を決定した。ケトン体利用系の SCOT、T2 の発現調節についての知見は少なく、ケトン体代謝の異常症とともに生理的な遺伝子発現機構についても申請者が行っていくべき課題と考えている。

2. 研究の目的

本研究のテーマは平成 21 年度～23 年度で「ケトン体代謝異常症の分子病態とその原因酵素遺伝子の発現調節機構の解明」として行ってきて、その結果をふまえて行う研究である。

(1) ミスセンス変異の RNA プロセッシング (主にスプライシング) への影響
エクソン内の 1 塩基置換により、新たなスプライス部位が生じた例 (Mol Genet Metab 2008) や実際ゲノムレベルでの遺伝子診断ではエクソン内の 1 塩基置換がスプライシングに影響を与えるのかを知ることは難しい。ミスセンス変異を導入した mini-gene splicing experiments を行い、どの程度 RNA プロセッシングに影響するのかについて検討する。

(2) SCOT 遺伝子は肝臓で発現すると、futile cycle を形成し、肝臓で合成したケトン体を肝外組織へ送りだすのに不都合となる。このためラットでもヒトでも SCOT 蛋白は肝臓外では広く発現しているのに、肝臓特異的に発現していない。肝臓特異的発現抑制機構の解明は未だ達成できていないが、有名な

-fetoprotein でさえ、出生後の発現抑制、腫瘍化での再発現メカニズムの詳細は不明である。そのため十分チャレンジする研究課題と考え、継続して解析を計画する。ヒト遺伝子の解析では肝臓そのもののデータが得難く、それがクリアな結果として出にくい要因の 1 つと考えられた。今回はヒトに加えマウスの SCOT 遺伝子の解析、多動物種比較解析を行うことで解析を進めた。

3. 研究の方法

(1) ミスセンス変異の RNA プロセッシング (主にスプライシング) への影響

ACAT1 遺伝子の c.951C>T を解析した exon 9～11 (一部イントロンの中間を除去) を組み込んだ splicing mini-gene を用いて、c.949G>A 変異を in vitro mutagenesis で組み込んだ。これを SV40-transformed fibroblasts に導入して、RNA 抽出、cDNA 合成後、これら splicing constructs に由来する cDNA を解析した。エクソン 10 スキップに与える効果を c.951C>T と比較した。

参考論文: Fukao et al: A novel mutation (c.951C>T) in an exonic splicing enhancer results in exon 10 skipping in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. Mol Gene Metab 100 (2010) 339-344.

(2) 3' non-coding region における SCOT 遺伝子発現量調節の可能性

pMIR-Report system の miRNA expression reporter vector (pMIR-report luciferase) という発現ベクターの firefly ルシフェラーゼの cDNA の下流にヒトおよびマウスの SCOT 3' non-coding region を挿入した。それを HepG2 細胞、HeLa 細胞にリポフェクタミンを用いて細胞に導入し、24 時間共発現させ、細胞を回収後ルシフェラーゼ活性の測定を行った。ウミシイタケの異なる蛍光のルシフェラーゼベクター (hRluc) を共発現させた。

(3) ChiP アッセイによる SCOT 遺伝子発現解析

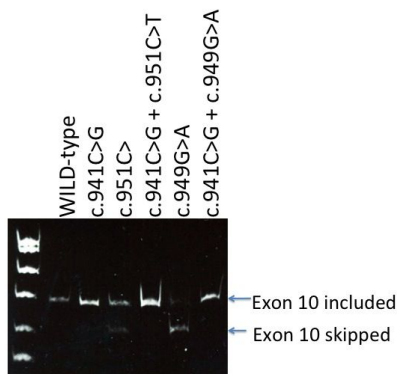
マウスの肝臓、心臓、腎臓について Epiquick Tissue Chromatin Immunoprecipitation Kit のプロトコールに従って、RNA polymerase 2 での免疫沈降をおこなったのちに SCOT、GAPDH での real time PCR を行った。用いて行った。

4. 研究成果

(1) ミスセンス変異の RNA プロセッシング (主にスプライシング) への影響

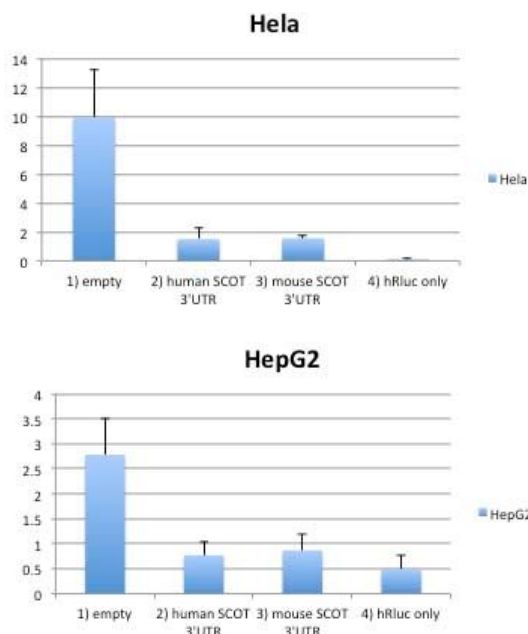
我々は D317N (c.949G>A) という変異を 1 患者で同定した。この変異は以前に同定した exonic splicing enhancer 変異 c.951C>T (D317D) と 2 塩基しか離れておらず exonic splicing enhancer SF2/ASF の結合サイトのコンセンサスから同様に外れる方向への変異と考えられた。そこでこの変異についても、

mini gene splicing experimnt でその効果を確認した。その結果本変異は c.951C>T と同様に、一部の転写産物においてエクソン 10 をスキップし、その効果はエクソン 10 の最初の 1 塩基 c.941 を C>G に変更することで消失した。



(2) 3' non-coding region における SCOT 遺伝子発現量調節の可能性

SCOT 遺伝子の 3' non-coding region はヒトにおいて約 1660 bp, マウスにおいても約 1570 bp あり、翻訳領域に比べて長いのが特徴であり、miRNA の結合などによりその領域に発現量が組織特異的に調節されている可能性がある。pMIR-report luciferase というベクターで firefly ルシフェラーゼの cDNA の下流に マウス および ヒトの 3' non-coding region を挿入して、肝臓由来で SCOT mRNA の発現のない HepG2 細胞、SCOT 発現の強い HeLa 細胞に導入して、そのルシフェラーゼの発現をみることで、この領域が肝臓特異的 SCOT mRNA 量の発現量の調節に関与しているかの検討を行った。図には 1) SCOT 3' non-coding region のはいていない pMIR-report luciferase+hRLuc、2) ヒトの SCOT 3' non-coding region を挿入した pMIR-report luciferase+hRLuc、3) マウスの SCOT 3' non-coding region を挿入した pMIR-report luciferase+hRLuc、4) hRLuc のみを HeLa 細胞で発現した場合 (HeLa) と HepG2 細胞で発現した場合 (HepG2) の pMIR-report luciferase/hRLuc の比を示した。このように HeLa 細胞においても、HepG2 においても SCOT 遺伝子の 3' non-coding region を挿入した場合同程度にルシフェラーゼ活性の低下を示し、肝臓特異的な発現調節という観点からはこの領域は大きな関与をしないと結論づけた。



(3) ChIP アッセイによる SCOT 遺伝子発現解析

広く組織発現する GAPDH と SCOT 遺伝子の RNA polymerase 2 による ChP アッセイをマウス肝臓、腎臓、心筋において行うことで、SCOT 遺伝子がどれだけ RNA polymerase 2 によって転写を受けているかについて検討することができる。それが肝臓において特異的に低下していれば、転写そのものが低下していることが示唆出来る。Epiquick Tissue Chromatin Immunoprecipitation Kit を用いて行った。その結果肝臓においては確かに RNA polymerase 2 による ChIP アッセイで他の臓器より SCOT 転写が低下していることが示唆された。しかしその低下が発現がほとんどないことを示すほどではなく、実験系の限界を示すものかもしれない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Aoyama Y, Yamamoto T, Sakaguchi N, Ishige M, Tanaka T, Ichihara T, Ohara K, Kouzan H, Kinosada Y, **Fukao T**. Application of multiplex ligation-dependent probe amplification and identification of a heterozygous Alu-associated deletion and a uniparental disomy of chromosome 1 in two Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Int J Mol Med* in press 査読あり
2. Hori T, Yamaguchi S, Shintaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Hakayanagi M, **Fukao T**: Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int* 57:41-48, 2015 doi: 10.1111/ped.12585. 査読あり
3. **Fukao T**, Mitchell G, Saas JO, Hori T, Orii K, Aoyama Y: Ketone body metabolism and its defects. *J Inherited Metab Dis*

- 37:541-551, 2014 doi: 10.1007/s10545-014-9704-9. 査読あり
4. Wang S, Yang H, Wu J-W, Gauthier N, **Fukao T**, Mitchell GA: The evolution of lipid energy metabolism in humans. *J Hum Evol.* 77:41-49, 2014. DOI: 10.1016/j.jhevol.2014.06.013. 査読あり
 5. Kiema TR, Harijan RK, Strozyk M, **Fukao T**, Alexson SE, Wierenga RK: The crystal structure of human mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase (T1): insight into the reaction mechanism of its thiolase and thioesterase activities. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 70:3212-25, 2014 DOI: 10.1107/S1399004714023827. 査読あり
 6. **Fukao T**, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet* 59:609-14, 2014 DOI: 10.1038/jhg.2014.79. 査読あり
 7. Hori T, **Fukao T**, Murase K, Sakaguchi N, Harding CO, Kondo N. Molecular basis of two exon skipping (exons 12 and 13) by c.1248+5g>a in OXCT1 gene. Study on intermediates of OXCT1 transcripts in fibroblasts. *Hum Mutat* 34:473-480, 2013. DOI: 10.1002/humu.22258. 査読あり
 8. Shafqat N, Kavanagh KL, Sass JO, Christensen E, **Fukao T**, Lee WH, Oppermann U, Yue WW. A structural mapping of mutations causing succinyl-CoA: 3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 36(6):983-987, 2013. doi: 10.1007/s10545-013-9589-z. 査読あり
 9. Buhaş D, Bernard G, **Fukao T**, Lortie A, Décarie J-C, Chouinard S, Mitchell GA. A treatable new cause of cholea: beta-ketothiolase deficiency. *Movement Disorders* 28:1054-1056, 2013 DOI: 10.1002/mds.25538. 査読あり
 10. **Fukao T**, Aoyama Y, Murase K, Hori T, Wierenga R, Boneh A, Kondo N: Development of MLPA for Human ACAT1 Gene and Identification of a Heterozygous Alu-mediated Deletion of Exons 2 and 3 in a Patient with Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase (T2) Deficiency. *Mol Genet Metab*, 110:184-187, 2013 DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.07.004. 査読あり
 11. Akella RR, Aoyama Y, Mori C, Lingappa L, Cariappa R, **Fukao T**: Metabolic encephalopathy in beta-ketothiolase deficiency: The first report from India. *Brain Dev.* 2014 Jun;36(6):537-40 DOI: 10.1038/jhg.2013.103. 査読あり
 12. **Fukao T**, Maruyama S, Ohura T, Hasegawa Y, Toyoshima M, Haapalainen AM, Kuwada N, Imamura M, Yuasa I, Wierenga RK, Yamaguchi S, Kondo N. Three Japanese patients with beta- ketothiolase deficiency who share a mutation , c.431A>C(H144P) in ACAT1: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. *JIMD reports* 3:107-115, 2012 DOI: 10.1007/8904_2011_72. 査読あり
- [学会発表](計11件)
1. **Fukao T**, Sasai H, Aoyama Y, Akiba K, Goto M, Hasegawa Y, Kobayashi M, Ida H, Akagawa S, Hori T, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y. Three patients with HSD10 disease in Japan. 4th Asian Congress for Inherited Metabolic Disease 2015 March 20-21, 2015, Taipei (TAIWAN)
 2. **Fukao T**, Hori T, Sasai H, Ohtsuka H, Kimura T, Aoyama Y: Alu elements insertions into intron 9 affect exon 10 recognition with a suboptimal splice acceptor site in human ACAT1 gene. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 2-5, 2014, Innsbruck (AUSTRIA)
 3. Akiba K, **Fukao T**, Goto M, kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake T, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y: The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) without intellectual disability. Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism, September 2-5, 2014 Innsbruck (AUSTRIA)
 4. **Fukao T**: Clinical Importance of ketone body metabolism and its defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism and 3rd National Conference of ISIM, Sep 19-21, Hyderabad (INDIA), 2014
 5. **Fukao T**: (Educational lecture 9) Inborn errors of ketogenesis and ketone body utilization. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic

- Diseases / The 55th Annual meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. November 27-29, 2013 幕張 (千葉)
6. Hori T, **Fukao T**, Murase K, Sakaguchi N, Harding Cary O, Kondo N: (P-50) Molecular basis of two-exon skipping (exons 12 and 13) by c.1248+5g>a in *OXCT1* gene: Further analysis on splicing intermediates. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. November 27-29, 2013 幕張 (千葉)
 7. Aoyama Y, Ishige M, Tanaka T, **Fukao T**: (P-49) Development of MLPA and identification of a heterozygous alu-associated deletion including exons 2-4 in a patient with HMGCL deficiency. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. November 27-29, 2013 幕張 (千葉)
 8. **Fukao T**, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Ohtake A, Moriyama Y, Usuda N, Hasegawa Y: (O-31) The first case of HSD10 disease (2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency) from Asia. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55th Annual meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. November 27-29, 2013 幕張 (千葉)
 9. **Fukao T**. Ketone body metabolism and its defects. Update. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2013 (September 3-6th), Barcelona (Spain)
 10. Nguyen KN, Chi DV, Nguyen HT, Can NBT, Bui TP, Yamaguchi S, **Fukao T**. Report of 23 cases with betaketothiolase deficiency in a Vietnam center. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2013 (September 3-6th), Barcelona (Spain)
 11. **深尾敏幸**: ケトン体代謝異常症の病態解明に関する研究 . 日本先天代謝異常学会 学会賞受賞講演 . 第 5 4 回日本先天代謝異常学会総会 , 2012 年 11 月 15 日-17 日 (岐阜)

6 . 研究組織

(1) 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 : 7 0 2 6 0 5 7 8