

令和元年6月14日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16245

研究課題名(和文) HSD10病の病態解析

研究課題名(英文) Functional analysis of HSD 10 disease

研究代表者

笹井 英雄 (Sasai, Hideo)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20509781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHSD10タンパクの発現実験系を確立し、すでに同定している変異を導入したHSD10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。今回、HSD10病のタンパク発現実験系の確立を試み、pET28aを用いた大腸菌によるタンパク発現系に関して構築することに成功した。大腸菌による精製タンパクを用いて、イソロイシン代謝系における酵素活性測定を実施し、wild-typeと病的変異(重症例と軽症例)との差異を解析することができた。今後はミトコンドリア内コレステロール代謝系の活性測定やRNasePの機能測定を予定している。

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症例を明らかにしており、国内での解析は申請者らが中心であり独創的であるといえる。HSD10病の詳しい病態や長期予後は分かっておらず、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られる。

研究成果の概要(英文)：HSD10 disease is a rare X-linked recessive disorders caused by a mutation in the HSD17B10 gene. HSD10 is a multifunctional protein which has three functions. Clinical severity of this disorder is various ranging neonatal severe form to atypical form. The HSD17B10 gene was incorporated into pET28a and the vectors with wild-type cDNA or with each mutant cDNA (A154T, A157V, R226Q) were used to produce high-purity recombinant protein in E. coli expression system. The enzyme activity of 2M3HBD in the isoleucine metabolism system was measured spectrophotometrically. The enzyme activity of 2M3HBD in the mutant protein was significantly decreased compared to wild-type. Also, as compared with A154T and A157V, the enzyme activity was lower in R226Q. In this experiment, there is a certain correlation between the decrease in activity of 2M3HBD and the clinical severity in the isoleucine metabolism system. We are planning to study the further functional analysis.

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

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

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 α -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をコードする。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。

本邦の HSD10 病の 3 症例のうち、A154T 変異、A157V 変異の 2 症例は幼児期発症で比較的症状が軽い「非典型例」と考えられ、現在のところ神経退行は目立っておらず小学校にて通常学級に通級できている。一方、R226Q 変異の症例は新生児期に発症しており重症型と考えられ、11 ヶ月時にアシドーシス発作を契機に亡くなっている。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、その機序は何によるのか？タンパクレベルでどういった病態の差があるのか？と考えたことが、今回の研究の着想に至った経緯である。

最近、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、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。

2. 研究の目的

今回、本邦症例で同定された HSD10 病の変異タンパクを発現させ、3 つの機能を解析することで、臨床的重症度と 3 つの機能障害がどのような関連があるのかを明らかにすることで病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

まず HSD10 タンパクの発現実験系を確立した。そして、HSD10 病の病態を明らかにするため、以下の仮説をたて、これらの wild-type と病的変異(重症例と軽症例)での差異をみることで病態に迫ることができると考えた。

- 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 α -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 HSD10 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はないか。)

(1)発現実験系の構築

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、HSD10、MRPP1、MRPP3 の 3 種類のタンパクに関し発現を行なった。

今回、用途別にそれぞれで 2 系統の発現実験系を作成した。(ほ乳類細胞用と大腸菌用)

ほ乳類細胞用

ほ乳類培養細胞を用いた一過性タンパク発現用に pcDNA3.1+に目的遺伝子を組み込んだ。その際、Western blotting、免疫沈降用に tag 配列を挿入した。HEK293T 細胞に Lipofectamin2000 を使用し transfection したのち、Western blotting を行いタンパク発現を確認し、HSD10 を KOD mutagenesis にて塩基置換した。HSD10 に p.R226Q、p.A157V、p.A154T の 3 種類の変異を導入した。

大腸菌用

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 HSD10 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ろ過を用いて高純度のタンパクを精製した。

(2)酵素活性測定系の樹立

イソロイシン代謝系における 2M3HBD 酵素活性測定

当教室では以前より T2 欠損症を多数診断しており、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。NAD⁺ と NADH の量的変化を吸光度で測定することにより HSD10 の酵素活性測定を行った。

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

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⁺ 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。

4. 研究成果

(1) 結果

今回、HSD10 関連タンパクの発現実験系を構築することができた。遺伝子導入効率の関係で想定より多くの時間を要したが、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た。

特に、大腸菌を用いたリコンビナントタンパクが精製可能となったことで、各種のタンパク解析への道筋がついた。図 1 にその精製過程の泳動結果を示す。

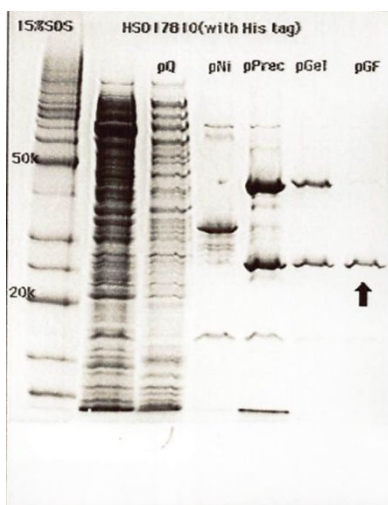


図 1 大腸菌を用いたリコンビナントタンパクの精製過程：
Q セファロースろ過 (陰イオン交換樹脂)
液体クロマトグラフィー (ニッケルカラム併用)
PreScission Protease
液体クロマトグラフィー (ゲルろ過)
グルタチオンセファロースろ過
により目的の HSD10 タンパクを精製 (約 27kDa)

また、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、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。

図 2 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。

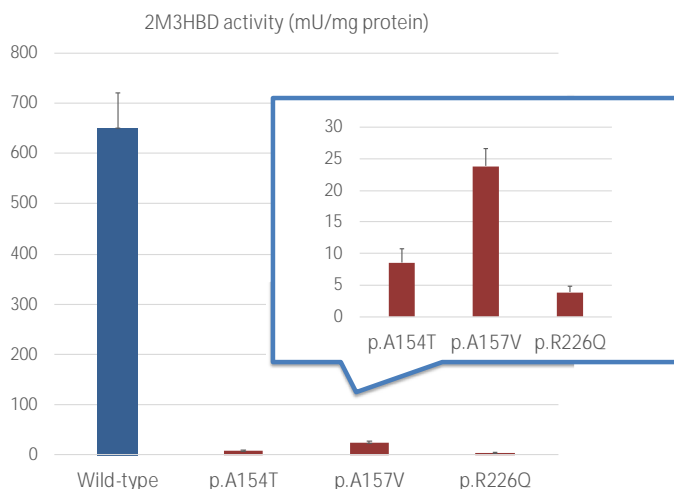


図 2 大腸菌リコンビナントタンパクを用いた 2M3HBD 活性測定：

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が、変異タンパク同士の比較においては、軽症の非典型例とされる p.A154T や p.A157V と比べ、重症型とされる p.R226Q の活性がより低下している。

そして、大腸菌リコンビナントタンパクによる Western blotting の結果を図 3 に示す。

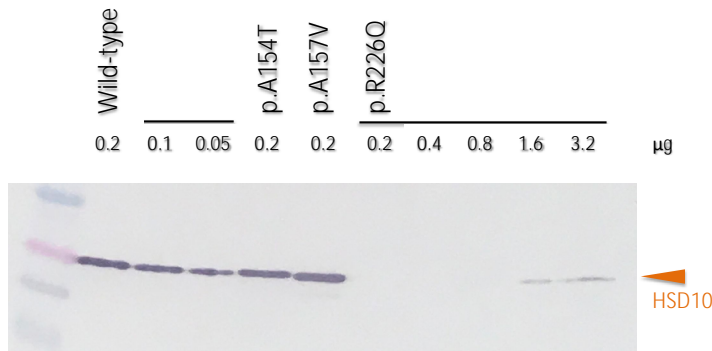


図3 大腸菌リコンビナントタンパクによる Western blotting:

Wild-type と比較し、重症型とされる p.R226Q では目的バンドが非常に低下しており、p.R226Q タンパクの不安定性が示されている。

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⁺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ているが、現時点では測定法の確立には至っていない。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。別の先行論文(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で測定が可能になると考えている。

(2)今後の展望

近年の報告で RNaseP の機能発現には HSD10 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 HSD10 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、今後、以下の予定で研究を行うことを予定している。

タンパクの再精製、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 (A154T、A157V、R226Q) の再精製を行う。その後、コレステロール代謝系における酵素活性測定を施行し比較検討を行う。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、重要なデータとなる可能性がある。対照コントロールと患者 (重症例と軽症例) で差異をみる。

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、HSD10 と MRPP1 の共発現用のベクターを作成する。発現を確認して、KOD mutagenesis を用いて変異を組み込む。

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。
円二色偏光法でタンパク安定性を確認する。

リコンビナントタンパク 3つ(HSD10,MRPP1,MRPP3)を混合して mtRNA の分解実験を行うことで RNaseP 機能の解析を行う。

引き続き、タンパク解析を進めていくことで HSD10 病の病態を明らかとしていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1) Nakama Mina, Otsuka Hiroki, Ago Yasuhiko, **Sasai Hideo**, Abdelkreem Elsayed, Aoyama

Yuka, Fukao Toshiyuki : Intronic antisense Alu elements have a negative splicing effect on the inclusion of adjacent downstream exons. Gene. 664, pp.84-89, 2018, DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.064. 査読有

2) Fukao Toshiyuki, **Sasai Hideo**, Aoyama Yuka, Otsuka Hiroki, Ago Yasuhiko, Matsumoto Hideki, Abdelkreem Elsayed : Recent advances in understanding beta-ketothiolase (mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase, T2) deficiency. Journal of Human Genetics. 64, pp.99-111, 2018, DOI: 10.1038/s10038-018-0524-x. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1) **笹井英雄**, 吾郷耕彦, 松本英樹, 大塚博樹, 細川淳一, 藤木亮次, 小原收, 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, 坂本修, 城戸淳, 松本志郎, 中村公俊, 濱崎孝史, 深尾敏幸 : Gene panel study for target metabolic diseases of newborn mass screening in Japan. 日本先天代謝異常学会総会 (第 60 回), 2018 年

2) **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 2018(国際学会), 2018 年

3) **Sasai H**, Ago Y, Otsuka H, Hosokawa J, Fujiki R, Ohara O, Nakajima Y, Ito T, Hara K, Kobayashi M, Tajima G, Sakamoto O, Matsumoto S, Nakamura K, Hamazaki T, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T : Gene panel study for target metabolic diseases in newborn mass screening, Annual symposium of the society for the study of inborn errors of metabolism 2018(国際学会), 2018 年

4) **笹井英雄**, 深尾敏幸 : 代謝性疾患マススクリーニング診療における遺伝子検査の重要性(意義) AMED 深尾班の遺伝子パネルの現状, 日本マス・スクリーニング学会学術集会 (第 45 回), 2018 年

5) **笹井英雄**, 大西秀典, 赤川翔平, 秋葉和壽, 長谷川行洋, 小林正久, 大塚博樹, 青山友佳, 深尾敏幸 : リコンビナント HSD17B10 タンパクを用いた HSD10 病の病態解析, 日本先天代謝異常学会学術集会 (第 59 回), 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

該当なし

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。