

## 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 24年 4月 6日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591317

研究課題名（和文） 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

研究課題名（英文） Molecular basis of disorders in ketone body metabolism and regulation of genes involving in its metabolism

## 研究代表者

深尾 敏幸（FUKAO TOSHIYUKI）

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70260578

## 研究成果の概要（和文）：

ケトン体代謝異常症のβ-ケトチオラーゼ（T2）欠損症およびサクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ（SCOT）欠損症の遺伝子診断の向上のための MLPA 法を確立した。また病態解析において、T2 欠損症の軽症変異と臨床診断について、SCOT 欠損症の 5 症例における臨床像、変異とその蛋白構造に与える影響について報告した。SCOT 転写産物におけるスプライシングオーダーを健常者と 2 エクソンスキップする患者で解析した。肝臓特異的 SCOT 発現調節機構について ChIP アッセイなどを用いて解析した。

## 研究成果の概要（英文）：

We established MLPA analysis of ACAT1 and OXCT1 genes to improve molecular diagnosis of beta-ketothiolase (T2) deficiency and succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase deficiency, respectively. We published papers describing 1) T2 "mild" mutation and its effects on clinical (chemical) phenotype 2) clinical characterization of 5 SCOT deficient patients, their mutations, mutational effects on tertiary structure of SCOT molecules. We analyzed splicing order of SCOT transcript in controls and a patient of which SCOT mRNA had two exon skipping. We also analyzed liver-specific silencing of SCOT using Chip assay.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：遺伝・先天異常学、人類遺伝、先天代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

ケトン体の利用障害（SCOT, T2 の欠損症）

ではケトン体の著しい蓄積から重篤なケトアシドーシス発作をきたす。これらの疾患は

死亡したり、重篤な後遺症を来しうる稀な疾患である。この疾患群は、頻度は高くないが診断がつけば、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。代表研究者は、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果たしてきた。

(1) T2 欠損症および SCOT 欠損症の遺伝子解析により、いくつも稀な機序でスプライシング異常をきたすと考えられるものや、1 アミノ酸置換でも温度によって活性が残存したり、失活するなどの特徴をもつと考えられるものがあり、詳細な解析が必要と考えられる。

(2) T2 欠損症の遺伝子解析において、T2 遺伝子内の Alu 配列部での相同組み換えによる複数のエクソンの欠失や重複が同定された。一方 SCOT 欠損症においては酵素活性で明らかに活性がないのに、一方のアリールしか変異が同定されないケースが多く、おそらく同様の機序によると考えられるが、それを簡便に検出するための MLPA 法を確立することが、遺伝子診断の上で必要と考えるに至った。

(3) SCOT 遺伝子の肝臓特異的 silencing 機構を明らかにすることは①ケトン体代謝のよりよき理解②一般的な遺伝子蛋白発現の調節機構の理解につながる。実際にヒト肝臓では SCOT 蛋白が検出できないこと、また Northern blot でも SCOT mRNA が検出できないことを明らかにした (Fukao et al, *Pediatr Res* 1997)。ヒト肝臓由来の細胞株では、HepG2 細胞が SCOT 蛋白、SCOT mRNA の発現が著しく低下しており、肝細胞の特徴を維持していることを明らかにした (Orii KE, Fukao T, 2008)。ヒト SCOT 遺伝子の 5' flanking region 約 2.2 Kb とその deletion mutants を Luc ベクターに組み込み、SCOT 蛋白、mRNA 発現がなく肝細胞の特徴を維持している HepG2 細胞と、肝外組織由来の HeLa 細胞へ導入し、その Luc 活性のパターンを比較したが、肝臓特異的 silencing を説明できる cis-elements は同定できなかった。SCOT 遺伝子の基本プロモーターは GC box をもち Sp 1 が結合することを示した (Orii KE, Fukao T, 2008)。

## 2. 研究の目的

(1) ケトン体代謝異常症の酵素診断、遺伝子診断の国際的センターとしての機能を維持して、さらに症例を蓄積し、個々の症例における分子病態を明らかにする

(2) T2 欠損症、SCOT 欠損症における独自の MLPA 法の確立による変異検出率の向上

(3) SCOT 遺伝子の肝臓特異的発現抑制機

構の解明の3つを具体的な目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) T2, SCOT 欠損症例の蓄積、遺伝子解析。世界各地からの症例の相談に応じ、臨床経過、細胞株の維持、酵素活性、蛋白解析、遺伝子解析を行う。

(2) MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法の確立

本法は遺伝子の部分欠失の同定に優れた確立された方法である。頻度の高い疾患についてはキットとして供給されているが、T2, SCOT 欠損症のような稀な疾患では、独自でそのシステムを構築する必要がある。システム構築のプロトコールに従って方法を確立する。

(3) 遺伝子変異の詳細な解析

3-1) T2 欠損症のエクソン 10 内のサイレンス変異によるエクソンスキップ

このサイレンス変異がエクソン 10 スキップの原因と考えられ、変異により Exonic splicing enhancer (ESE) 配列が弱まることが推測されている。患者変異を導入した mini-gene construct、同じ ESE 配列を減弱させる 1 塩基置換、authentic splice 部位を増強する 1 塩基置換を導入した mini-gene construct を作成して transfection によるスプライシング実験これらにより病態を明らかにする。

3-2) SCOT 欠損症のミスセンス変異の情報が蓄積しているので、その cDNA の発現実験を温度を 30 度、37 度、40 度で行うことで、変異の温度感受性の特徴を明らかにする。

3-3) SCOT 患者に見られた 2 エクソンスキップするスプライス部位の異常の解析。SCOT 遺伝子の splicing order を hnRNA の RT-PCR によって解析する。

(4) SCOT 遺伝子の肝臓特異的発現抑制機構の解明。

HepG2 細胞 (肝細胞特徴維持) において SCOT 遺伝子の転写がオンなのかオフなのかを明らかにする。方法は以下の 2 つで確認する。ChiP アッセイ  
核内 heteronuclear RNA

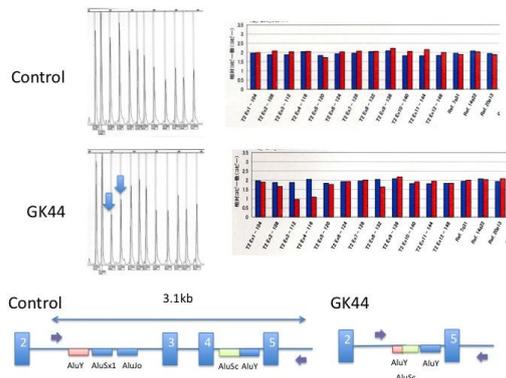
## 4. 研究成果

(1) T2, SCOT 欠損症例の蓄積、遺伝子解析。世界各地からの症例の相談に応じ、臨床経過、細胞株の維持、酵素活性、蛋白解析、遺伝子解析を行う。

(2) MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法の確立

T2 欠損症：実際にこれまで同定したエクソン 8-9 の重複例、エクソン 2-4 の欠失例のホモ接合体をポジティブコントロールとして系を確立した。あたりに図に示すエクソン 3-4 の欠失のヘテロ接合の症例を同定する

ことができた。このような症例は本法を用いないと解析できない。



SCOT 欠損症についても MLPA 法を確立することができた。1 例でエクソン 1 7 の欠失のヘテロ接合が疑われたが、欠失の範囲の決定まではできていない。

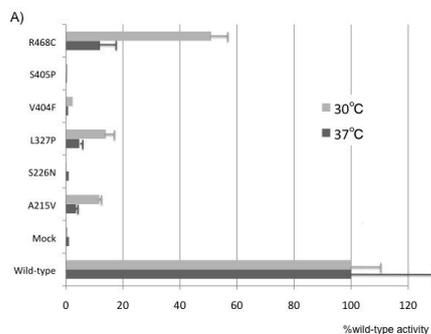
### (3) 遺伝子変異の詳細な解析

3-1) T2 欠損症のエクソン 1 0 内のサイレンス変異によるエクソンスキップ。  
このサイレンス変異がエクソン 1 0 スキップの原因と考えられ、変異により Exonic splicing enhancer (ESE) 配列が弱まることを mini-gene construct によるスプライシング実験で明らかにした (Fukao T, et al. Mol Genet Metab 2010)。

3-2) SCOT 欠損症の 5 症例の遺伝子変異を同定し、ミスセンス変異の温度感受性の特徴を明らかにした。

GS Number	Nationality	First ketoacidotic oris				Persis- tent	Frequ- ency of keton- uria	Present age	Gene Mutation	
		Onset	Blood gas pH	HCO3	BE				paternal	maternal
GS07	France	1y5m	6.92	4		+	2 (6y)	S405P	S405P	
GS13	Croatia	6m	6.90	3.2	-27	-	2 (12y)	L327P	L327P	
GS14	Tunisia	1y7m	6.93	6		+	7 (21y)	R468C	R468C	
GS17	USA	3y	6.99	5	-25	+	2 (9y)	A215V	S226N	
GS18	Germany**	3d	7.08		-22.6	+	5 (10y)	E273X	V404F	

R468C は残存活性をもつ変異 (発現実験より)



(Fukao T et al. Biochim Biophys Acta, 2011)

3-3) SCOT 患者に見られた 2 エクソンスキップするスプライス部位の異常の解析。  
SCOT 遺伝子の splicing order を hnRNA の RT-PCR によって解析し、スプライシングのオーダーがコントロールと患者において異なることを明らかにした。

### (4) SCOT 遺伝子の肝臓特異的発現抑制機構の解明。

①プロモーター領域のメチル化解析  
ヒトおよびマウスプロモーター領域からイントロン 1 の 5' 上流域にかけて CpG islands が存在する。その部分の CpG メチル化について検討したが、ヒトにおいて HepG2 細胞でも hypomethylated な状態で、マウスにおいては肝臓においてもほとんど non-methylated な状態であることが明らかとなった。このことはこの CpG 領域のメチル化が肝臓特異的 silencing 機構に関与しないことが示唆された (Fukao T, et al, Mol Med Rep 2010)。

### ②ChiP アッセイ

肝臓の特徴をもち SCOT 発現のほとんどない HepG2 細胞と、SCOT を発現している HeLa 細胞において RNA polymerase2 の抗体を用いた ChiP assay をおこなった。その結果 HeLa 細胞より HepG2 細胞のほうが SCOT は低下していたが、mRNA 発現量の低下を説明できるほどではなかった。核内 heteronuclear RNA の発現でも同様であり、マウスやラットなどの臓器を用いた解析でないと明確な結論はえられないと考えられた。

## 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 12 件)

- 1) 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 whoshare 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 査読有
- 2) Macdonald MJ, Longacre MJ, Stoker SW, Kendrick MA, Thonpho A, Brown LJ, Hasan NM, Jitrapakdee S, Fukao T, Hanson MS, Fernandez LA, Odorico J. Differences between human and rodent pancreatic islets: low pyruvate carboxylase, ATP citrate lyase and pyruvate carboxylation; high glucose-stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. J Biol Chem.

286:18383-18396, 2011 査読有

3) **Fukao T**, Sass JO, Kursula P, Thimm E, Wendel U, Ficicioglu C, Monastiri K, Guffon N, Varic I, Zobot M-T, Kondo N. Clinical and molecular characterization of five patients with Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency Biochimica Biophysica Acta Molecular Basis of Disease 1812:619-24, 2011 査読有

4) **Fukao T**, Ishii T, Amano N, Kursula P, Takayanagi M, Murase K, Sakaguchi N, Kondo N, Hasegawa T. A neonatal onset succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT)-deficient patient with T435N and c.658-666dupAACGTGATT p.N220\_I222dup mutations in the OXCT1 gene. J Inherit Metab Dis. 33:636, 2010 査読有

5) Hori T, **Fukao T**, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N. Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: The time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. Tohoku J Exp Med 221:191-195, 2010 査読有

6) Hasan NM, Longacre MJ, Seed-Ahmed M, Kendrick MA, Gu H, Ostenson CG, **Fukao T**, Macdonald MJ. Lower Succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA Transferase (SCOT) and ATP Citrate Lyase In Pancreatic Islets of A Rat Model of Type 2 Diabetes: Knockdown of SCOT Inhibits Insulin Release In Rat Insulinoma Cells. Arch Biochem Biophys. 499(1-2):62-68, 2010 査読有

7) **Fukao T**, Horikawa R, Naiki Y, Tanaka T, Takayanagi M, Yamaguchi S, Kondo N: 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 Genet Metab 100:339-344, 2010 査読有

8) **Fukao T**, Nguyen HT, Nguyen NT, Vu DC, Can NTB, Pham ATV, Nguyen KN, Kobayashi H, Hasegawa Y, Bui TH, Niezen-Koning KE, Wanders RJA, de Koning T, Nguyen LT, Yamaguchi S, Kondo N. A common mutation, R208X, identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency Mol Genet Metab 100(1):37-41, 2010 査読有

9) **Fukao T**, Zhang G, Matsuo N, Kondo N: CpG islands around exon 1 in Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene were hypomethylated even in human and mouse hepatic tissues where SCOT gene expression was completely suppressed.

Molecular Medicine Reports 3:355-359, 2010 査読有

10) Thümmeler S, Dupont D, Acquaviva C, **Fukao T**, de Ricaud D. Different Clinical Presentation in Siblings with Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase Deficiency and Identification of Two Novel Mutations. Tohoku J Exp Med 220:27-31, 2010 査読有

11) Purevsuren J, **Fukao T**, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yamaguchi S. Clinical and molecular investigations of 5 Japanese patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. Mol Genet Metab 98:372-377, 2009 査読有

12) Macdonald MJ, Longacre MJ, Langberg EC, Tibell A, Kendrick MA, **Fukao T**, Ostenson CG. Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. Diabetologia. 52:1087-1091, 2009 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1) **深尾敏幸**, 堀友博, 近藤直実:  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の遺伝子診断: MLPA 法の確立とエクソン欠失、重複の検出. 第 53 回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 幕張 2011

2) **深尾敏幸**, 山口清次, 高柳正樹, 重松陽介, 新宅治夫, 堀川玲子: 日本人 HMG-CoA リアーゼ欠損症の臨床像: 研究班におけるアンケート調査から. 第 53 回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 幕張 2011

3) 岡和田祥子, 加藤 寛幸, 勝又元, 古田千左子, 関根 裕司, 山内豊浩, **深尾敏幸**: 急性胃腸炎を契機に発見された SCOT (サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ) 欠損症の 1 例. 第 53 回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 幕張 2011

4) 堀友博, **深尾敏幸**, Paul M. Fernhoff, Cary Harding, 近藤直実: SCOT hnRNA におけるスプライシングオーダー: エクソン 12 と 13 をスキップする症例の解析. 第 53 回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 幕張 2011

5) **Fukao T**, Hori T, Boneh A, Kondo N. Establishment of MLPA method for ACAT1 gene and identification of intragene deletions and duplication caused by Alu sequence-mediated non-equal homologous recombination in beta-ketothiolase deficiency. 2011 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. August 30-September 2, 2011 (Geneva, Switzerland)

6) **Fukao T**, Yamaguchi S, Takayanagi M, Shigematsu Y, Ishige M, Tanaka T,

Takahashi T, Ihara T, Murakami J, Ohtsu Y, Onigata K, Kosaka K, Yorifuji T, Kondo N. HMG-CoA lyase deficiency in Japan: Question-based follow-up study. 2011 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. August 30-September 2, 2011 (Geneva, Switzerland)

7) **深尾敏幸**, 堀友博, 近藤直実:  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の遺伝子診断:MLPA法の確立とエクソン欠失、重複の検出:第114回日本小児科学会学術集会 4月15-17日 東京 2011

8) **深尾敏幸**:先天性ケトン体代謝異常症の発症形態と患者数の把握のための調査研究:第14回中部出生前医療研究会3月5日名古屋 2011

9) **深尾敏幸**, 山口清次, 重松陽介, 高柳正樹, 新宅治夫, 堀川玲子 「先天性ケトン体代謝異常症の発症形態と患者数の把握、診断指針に関する研究」班  
先天性ケトン体代謝異常症(T2欠損症、SCOT欠損症)の診断指針-日本で診断された症例の検討から 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21-23日、大阪、2010

10) **深尾敏幸**, 堀友博, 近藤直実:サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ(SCOT)欠損症5症例の検討。 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21-23日、大阪、2010

11) 堀友博, **深尾敏幸**, 深澤佳絵, 寺澤大祐, 近藤直実:間欠的嘔吐、不機嫌で発症した男児遅発性OTC欠損症の1例。 第52回日本先天代謝異常学会総会 10月21-23日、大阪、2010

12) **Fukao T**, Maruyama S, Ohura T, Toyoshima M, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Kondo N. Subtle abnormality in urinary organic acid and blood acylcarnitine profiles may result in misdiagnosis of beta-ketothiolase (T2) deficiency with mild mutations. 2010 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. August 31-September 3, 2010 (Istanbul, Turkey)

13) **Fukao T**, Sass, JO, Thimm E, Wendel U, Ficicioglu C, Monastiri K, Guffon N, Baric I, Zobot M-T, Kondo N. Clinical and molecular studies of five patients with succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase deficiency. 2010 Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. August 31-September 3, 2010 (Istanbul, Turkey)

14) Nguyen Thi Hoan, Nguyen Ngoc Khanh, Vu Chi Dung, Bui Phuong Thao, Can Thi Bich Ngoc, Khu Khanh Dung, Seiji Yamaguchi,

**Toshiyuki Fukao**, Nguyen Thanh Liem. Clinical and laboratory features of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency in Viet Nam. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. March 7-10, Fukuoka, Japan, 2010

15) **Toshiyuki Fukao**, Hoan Thi Nguyen, Nhan Thu Nguyen, Ngoc Thi Bich Can, Dung Chi Vu, Anh Thi Van Pham, Khanh Ngoc Nguyen, Hironori Kobayashi, Yuki Hasegawa, Thao Phuong Bui, Liem Thanh Nguyen, Seiji Yamaguchi, Naomi Kondo. A common mutation R208X identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. March 7-10, Fukuoka, Japan, 2010

16) **深尾敏幸**, 堀川玲子, 内木康博, 田中藤樹, 近藤直実,  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の分子病態: Exonic splicing enhancer 変異の解析. 第51回日本先天代謝異常学会総会 11月5日-7日 東京, 2009

17) 丸山慎介, 豊島光雄, 鎌田直美, **深尾敏幸**, 堀川玲子, 内木康博, 田中藤樹, 近藤直実,  $\beta$ -ケトチオラーゼ欠損症の分子病態: Exonic splicing enhancer 変異の解析. 第51回日本先天代謝異常学会総会 11月5日-7日 東京, 2009

18) **Fukao T**, Naiki Y, Tanaka, Kondo N. An exonic splicing mutation identified in a beta-ketothiolase-deficient patient. 11th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, August 29-September 2, SanDiego, USA, 2009

19) **深尾敏幸**, 近藤直実, 内木康博, 堀川玲子, 田中藤樹. エクソン内1塩基置換により, Exonic splicing Enhancer 配列に影響し, エクソンスキップを来したミトコンドリアアセトアセチル-CoAチオラーゼ(T2)の1症例. 第54回日本人類遺伝学会 8月24日-26日 東京, 2009  
〔図書〕(計8件)

1) **深尾敏幸**: Vii 遺伝子検査の実際 2) 先天性代謝異常症: 有波忠雄, 太田敏子, 清水淑子, 福嶋亜紀子, 三村邦裕 編集 メディカルサイエンス遺伝子検査学, 東京 近代出版 2012年: 122-128頁

2) **深尾敏幸**: ケトン体: 高柳正樹 専門編集 小児科臨床ピクシス 見逃せない先天代謝異常, 東京, 中山書店 2010年: 93-95

3) **深尾敏幸**: ケトーシス: 高柳正樹 専門編集 小児科臨床ピクシス 見逃せない先天代謝異常, 東京, 中山書店 2010年: 14-17

4) **深尾敏幸**: ケトン体利用異常症: 高柳正樹 専門編集 小児科臨床ピクシス 見逃せ

ない先天代謝異常，東京，中山書店 2010年：218—221

5) **深尾敏幸**：β-ケトチオラーゼ欠損症：高柳正樹 専門編集 小児科臨床ピクシス 見逃せない先天代謝異常，東京，中山書店 2010年：260—262

6) **深尾敏幸**：β-ケトチオラーゼ欠損症：山口清次 編集 有機酸代謝異常ガイドブック—臨床所見と GC/MS データ解釈のノウハウ，東京，診断と治療社 2011年：56—57

7) **深尾敏幸**：ケトン体代謝異常症：山口清次 編集 有機酸代謝異常ガイドブック—臨床所見と GC/MS データ解釈のノウハウ，東京，診断と治療社 2011年：112—113

8) 浦澤林太郎，久保徹夫，**深尾敏幸**：急性胃腸炎を契機に急激な意識障害を起こした9ヶ月男児：遠藤文夫，山口清次，高柳正樹，**深尾敏幸** 編集委員．症例から学ぶ先天代謝異常症～日常診療からのアプローチ～，東京診断と治療社；2009年：100~102.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ketone.jp/>

## 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：70260578

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：