

氏名（本籍）	松本英樹	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1172号	
学位授与日付	令和3年10月20日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	<i>In vitro</i> functional analysis of four variants of human asparagine synthetase	
審査委員	（主査）教授	長岡 仁
	（副査）教授	中島 茂                      教授 大倉 宏之

## 論文内容の要旨

### 【背景と目的】

アスパラギン合成酵素欠損症 (ASNSD) は先天性の小頭症，難治性けいれん，重度の精神運動発達遅滞などをきたす稀少疾患であり，アスパラギン合成酵素 (ASNS) をコードする *ASNS* 遺伝子の両アリル性変異により生じる。ASNS はアスパラギン酸，グルタミン（もしくはアンモニア），ATP から，アスパラギン，グルタミン酸，AMP を生成する。アスパラギンは細胞増殖に必須のアミノ酸であり，ASNS の発現量や酵素活性の低下が推定されている ASNSD 患者由来皮膚線維芽細胞はアスパラギン非含有培地では増殖できない。ASNSD は患者生体試料を用いた生化学的診断方法が現時点では存在せず，確定診断は遺伝子検査に依存する。一方で ASNS の酵素活性を定量的に評価することは困難であることから，病的意義不明バリエーション検出時の変異型 ASNS の機能解析や評価は大きな課題であった。

これらの問題を解決するため，本研究では変異を導入したリコンビナント ASNS タンパクの安定的発現方法を確立し，ASNS の定量的酵素活性の評価法を開発した。また，CRISPR/Cas9 法とレンチウイルス発現系を用い，培養細胞での ASNS の定量的酵素活性の評価系も確立した。

### 【対象と方法】

1) カイコを用いたリコンビナント ASNS タンパクの発現・精製：pFastBac1 ベクターに C 末端に 6×His タグを付加した human ASNS の cDNA を挿入した。*Escherichia coli* BmDH10Bac を用いて遺伝子組み換え BmNPV バクミドを作成し，高純度精製した後，Cellfectin II reagent を用いて 5 齢のカイコ幼虫に感染させた。感染の 6-8 日後にカイコの脂肪体からリコンビナント ASNS タンパクを回収し，Ni-NTA affinity chromatography を利用して発現・精製した。得られたタンパクを SDS-PAGE により分子量を確認し，抗 ASNS 抗体を用いて Immunoblot で同定した。同様に日本人 ASNSD 患者で発見された 4 つの変異型 ASNS (p. Leu145Ser, p. Leu247Trp, p. Val489Asp, p. Trp541Cysfs\*5) についてもタンパクを発現・精製した。

2) ASNS 酵素活性の定量的測定方法の確立：グルタミンを基質とした反応液を作成し，カイコで発現させたリコンビナント ASNS タンパク 6.4 μg を用いて 60 分間酵素反応を行った。反応後に生成されたアスパラギンを「ニンヒドリンと分光光度計を用いた測定系」と「HPLC 蛍光検出を用いた測定系」の 2 つの方法で測定し，それぞれ酵素活性を定量的に評価した。HPLC を用いた方法では同時にグルタミン酸も測定した。野生型 ASNS と，上記 4 つの変異型 ASNS で同様の実験を行った。また，アンモニアを基質とした反応液でも同様に酵素反応・酵素活性測定を行った。

3) *ASNS* 欠損 HEK293 細胞株の樹立：CRISPR/Cas9 法を用いて HEK293 細胞の *ASNS* 遺伝子をノックアウトした。樹立した候補細胞株は，Sanger シークエンスで *ASNS* 遺伝子の配列を解析した。また，

樹立した候補細胞株の ASNS タンパクの有無を、抗 ASNS 抗体を用いた Immunoblot で評価した。

4) レンチウイルスを用いた ASNS 欠損 HEK293 細胞株に対する形質転換実験：pLVSIN-EF1 $\alpha$ -AcGFP-N1 ベクターに野生型 ASNS, 4つの変異型 ASNS の cDNA を挿入し, Lenti-X 293T 細胞株と Lentiviral Mix High Titer Packaging Mix, Trans IT-293 Transfection Reagent を用いて遺伝子組み換えレンチウイルスを作成し, それを用いて ASNS 欠損 HEK293 細胞株に形質転換を行った。形質転換前後の細胞を用い, アスパラギン含有培地, 非含有培地でそれぞれ細胞増殖速度を比較した。

以上の実験は組み換え DNA 実験 (承認番号: 2 岐大研企第 3 号-14, 2 岐大研企第 3 号-30) に基づいて実施した。

#### 【結果】

1) カイコを用いて野生型 ASNS, 4つの変異型 ASNS を発現・精製した。SDS-PAGE, Immunoblot による評価により, p. Leu145Ser 変異型 ASNS, p. Val489Asp 変異型 ASNS はタンパク安定性が低いことが示された。

2) ニンヒドリンを用いた方法, HPLC を用いた方法ともに, 変異型 ASNS のアスパラギン合成能が極めて低いことが示された。p. Leu247Trp 変異型 ASNS のみ反応基質による酵素活性に差異があり, アンモニアを反応基質にした場合にわずかに酵素活性が高い結果が得られた。

3) ASNS 欠損 HEK293 細胞株を樹立した。Sanger シークエンスと Immunoblot で ASNS の欠失を確認した。ASNS 欠損 HEK293 細胞株はアスパラギン非含有培地では増殖できなかった。

4) レンチウイルス発現系を用い, ASNS 欠損 HEK293 細胞株に野生型 ASNS, 4つの変異型 ASNS を発現した。野生型 ASNS を発現させた細胞はアスパラギン非含有培地で増殖できたが, 変異型 ASNS を発現させた細胞はアスパラギン非含有培地では増殖できなかった。p. Leu247Trp 変異型 ASNS はアスパラギン非含有培地で野生型と比較し増殖速度に有意差を認めたが, 他の変異型 ASNS とは異なった傾向を示した。

#### 【考察】

日本人 ASNSD 患者で発見された 4つの変異型 ASNS はアミノ酸配列変化に伴う立体構造変化から予想された通り, 野生型よりも酵素活性が著明に低下していた。また, 野生型 ASNS を遺伝子導入された ASNS 欠損 HEK293 細胞株はアスパラギン非含有培地でも増殖できたが, ASNS 欠損 HEK293 細胞株と, 変異型 ASNS を遺伝子導入された ASNS 欠損 HEK293 細胞株はアスパラギン非含有培地では増殖できなかった。以上の実験結果より, 日本人患者で同定された 4つの変異は病的バリエーションと判断した。

#### 【結論】

本研究ではカイコを用いた新規のリコンビナント ASNS タンパクの発現方法を確立し, ASNS の酵素活性を定量的に評価する方法を確立した。培養細胞を用いた評価系とリコンビナントタンパクを用いた評価系の結果は一致しており, 本研究で確立した方法により変異型 ASNS の病原性を評価することが可能となった。今後, ASNSD の正確な診断や病態解明への貢献が期待できる。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者 松本英樹は, 培養細胞とリコンビナントタンパクを用いて, 変異型アスパラギン合成酵素 (ASNS) の活性を評価する方法を新たに開発し, これまで病的意義が不明であった 4種類の変異型 ASNS 遺伝子に病原性があることを明らかにした。本研究の成果は, 先天代謝異常症の診断及び病態解析法を顕著に進歩させるものであり, 小児科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Hideki Matsumoto, Nana Kawashima, Takahiro Yamamoto, Mina Nakama, Hiroki Otsuka, Yasuhiko Ago, Hideo Sasai, Kazuo Kubota, Michio Ozeki, Norio Kawamoto, Yukihiro Esaka, Hidenori Ohnishi: *In vitro* functional analysis of four variants of human asparagine synthetase. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2021;44(5):1226-1234.