

## *Glutathione synthetase* mRNA における新規 splicing variant の発見

内田 麻里恵<sup>\*1</sup>, 菅谷 麻希<sup>\*2</sup>, 久富 寿<sup>\*3</sup>

### Identification of an alternative splicing transcript for the glutathione synthetase gene in human hepatocarcinoma cell line

Marie Uchida<sup>\*1</sup>, Maki Sugaya<sup>\*2</sup>, Hisashi HISATOMI<sup>\*3</sup>

(Received September 27, 2008)

#### 1. 背景

我々ヒトを含む好気性生物は、酸素からエネルギーを得るため、その過程で発生する活性酸素による生体内高分子の過酸化や DNA の損傷などのリスクと常に隣り合わせである。活性酸素による生体内酸化を抑制するために、ヒトは細胞内で抗酸化物質であるグルタチオンを合成している。グルタチオンは自らが酸化されることで酸化型グルタチオンとなり、細胞内の活性酸素を除去する。一方で、酸化されたグルタチオンはグルタチオン還元酵素で還元され、再度抗酸化物質として使用される。この還元型グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの3つのアミノ酸から成るトリペプチドである。還元型グルタチオンの合成には2種類の酵素が必要である。まずシステインとグルタミン酸がγ-グルタミルシステイン合成酵素(EC.6.3.2.2)によって結合し、さらにグルタチオン合成酵素(EC.6.3.2.3)がグリシンを結合させ、グルタチオンが合成される。γ-グルタミルシステイン合成酵素が2つのタンパク質の複合体であるのに対し、グルタチオン合成酵素は単独のタンパク質であるため、その変異は直接グルタチオン合成に影響すると考えられる。グルタチオン合成酵素をコードする遺伝子(*glutathione synthetase*: GSS)は、ヒトでは20q11.2に位置し、12個の exon から474個のアミノ酸を翻訳する<sup>1, 2)</sup>。我々はグルタチオン合成酵素遺伝子に着目し、その mRNA の変異解析の結果、完全長 mRNA の他に exon4 および5を欠失する splicing variant を発見したのでここに報告する。

#### 2. 材料と方法

##### 2-1. Splicing variant の発見

ヒト肝臓がん由来細胞株 Huh-7 細胞から QuickGene RNA cultured cell HC kit S (FUJIFILM)を用いて total RNA を抽出し、random primer(GIBCO)により cDNA を合成した。合成した cDNA に PCR 溶液 (1×Paq5000<sup>TM</sup> Reaction Buffer, 0.25 mM dNTP (TAKARA BIO), 30 pM Forward Primer, 30 pM Reverse Primer, 0.8 U Paq5000<sup>TM</sup> DNA polymerase)を添加し、94°C/30 秒, 60°C/35 秒, 72°C/30 秒を1サイクルとした PCR 反応を45サイクル行った(2720 サーマルサイクラー/Applied Biosystems)。反応終了後、PCR 増幅産物を2%アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色した PCR 増幅産物を UV トランスイルミネーターによって確認した。PCR 反応に用いる Primer を数種類設計し、完全長 mRNA の増幅が最も良好な組み合わせを解析に用いた。また、12種類の exon を複数同時に増幅するように primer を設定した。増幅された PCR 産物を精製後、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)により標識し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により塩基配列を決定した。決定した塩基配列を National Center for Biotechnology Information のデータベース([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))上の GSS mRNA と比較し、変異を同定した。

#### 3. 結果

Huh-7 由来 cDNA を用いて GSS mRNA を増幅した結果、exon4 から exon9 までを含む領域(842 bp)を増幅した場合に、約 330 bp 短い増幅産物が確認された。この短い

<sup>\*1</sup>: 工学研究科応用化学専攻博士前期課程

<sup>\*2</sup>: 物質生命理工学科助教

<sup>\*3</sup>: 物質生命理工学科准教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

増幅産物をアガロースゲルから切り出し、塩基配列を決定したところ、exon4 および exon5 が完全に欠失した variant であることが証明された(Figure 1)。他の exon4 および exon5 を含む PCR 産物でも、同様に短い増幅産物が確認された。一方、これら exon を含まない領域を増幅した PCR 産物では、変異が予測可能な増幅産物は確認されなかった。

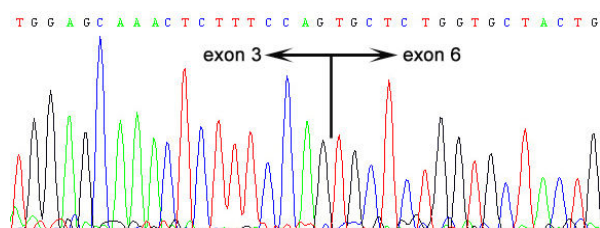


Figure 1. Sequence analysis of the transcript bearing the deletion of both exon 4 and exon 5 of the *GSS* gene. The sequence shows the in-frame deletion, corresponding to the complete loss of exons 4 and 5. Sequence analyses were performed as described in Materials and methods.

#### 4. 考 察

グルタチオンは肝臓や腎臓、赤血球などに高濃度に存在し、細胞内でのレドックス状態の制御を担っている。そのため、グルタチオンの欠乏は、即座にレドックス状態の崩壊を招き、細胞損傷の引き金にもなる。したがって、グルタチオンを合成するγ-グルタミルシステイン合成酵素およびグルタチオン合成酵素の活性化は恒常的である必要がある。GSS遺伝子の変異によるグルタチオン合成酵素のアミノ酸変異(活性低下)によりγ-グルタミルシステインが基質として使用できなくなると、過剰なγ-グルタミルシステインから合成させるピログルタミン酸の尿への排泄に起因する5-オキソプロリン尿症(ピログルタミン酸尿症)が発症する<sup>3, 4)</sup>。ピログルタミン酸尿症は常染色体性劣性遺伝の代謝性アシドーシスであり、患者のグルタチオン合成酵素活性の低下が報告されている<sup>3, 4)</sup>。このように、グルタチオン合成酵素をコードするGSS遺伝子の変異は、グルタチオン減少による抗酸化能の低下を誘発するだけでなく、直接疾患を発症させることが明らかである。本研究で発見されたexon4およびexon5の欠失GSSは、従来発見されていた変異とは全く異なるため、その機能解析やタンパク質分布の解明により、新たな疾患との関連が示唆される可能性が高い。

本研究で発見した変異体の欠失領域はグルタミン合成motif(202aa-302aa)の直前であり motif が必要な立体構造を維持するために重要な領域であると考えられる。現時点では、PCR 反応で増幅される exon3 から exon8 までの

領域の欠失を確認したに過ぎず、exon4 および exon5 を欠失する変異体が mRNA として機能するのか、あるいはタンパク質が翻訳されているかなどの調査は未実施である。また、欠失 mRNA の存在比や組織における分布なども未解明である。今後、これら課題を解決し、本研究で発見した変異 mRNA の機能解析を実施する予定である。

本研究で発見した GSS alternative splicing variant は、本来なら mRNA の成熟過程で nonsense-mediated mRNA decay system により分解されるはずである。変異 mRNA の存在は、その system からの回避を意味し、非常に興味深い。この GSS alternative splicing variant は、完全長 mRNA から翻訳される完全長タンパク質よりも 111 個のアミノ酸が欠失している。つまり、タンパク質の N 末端や C 末端はもちろん、欠失したアミノ酸配列以外は完全に維持されている。これは、Dominant Negative Inhibitor として機能するために非常に好都合である。今後、さまざまな解析により、そのシグナル伝達経路も同定する予定である。

#### 参考文献

- 1) Shi, Z.-Z., Habib, G. M., Rhead, W. J., Gahl, W. A., He, X., Sazer, S., Lieberman, M. W. : Mutations in the glutathione synthetase gene cause 5-oxoprolinuria. *Nature Genet.* 14: 361-365, 1996.
- 2) Webb, G. C., Vaska, V. L., Gali, R. R., Ford, J. H., Board, P. G. : The gene encoding human glutathione synthetase (GSS) maps to the long arm of chromosome 20 at band 11.2. *Genomics* 30: 617-619, 1995.
- 3) Mohler, D. N., Majerus, P. W., Minnich, V., Hess, C. E., Garrick, M. D. : Glutathione synthetase deficiency as a cause of hereditary hemolytic disease. *New Eng. J. Med.* 283: 1253-1257, 1970.
- 4) Ristoff, E., Mayatepek, E., Larsson, A. : Long-term clinical outcome in patients with glutathione synthetase deficiency. *J. Pediatr.* 139: 79-84, 2001.