

電子伝達系遺伝子 *SDHC* の新規 variant 発見と機能解析

佐藤 菜々^{*1}, 菅谷 麻希^{*2}, 久富 寿^{*3}

Identification of alternative splicing transcripts for the *SDHC* gene and distribution of their mRNA in human tissues

Nana SATOH^{*1}, Maki SUGAYA^{*2}, Hisashi HISATOMI^{*3}

(Received September 18, 2009)

1. 背景

ヒトの体は約 60 兆個の細胞で構成されており、1つの細胞の中にミトコンドリアは数百個存在している。ミトコンドリアの主要な役割としては、食事から摂取した炭水化物、脂肪、タンパク質などの栄養素の ATP への変換と細胞への供給である。このようにミトコンドリアは、細胞の様々な活動に必要なエネルギーの大半を合成している重要な細胞小器官であり、どの細胞にも普遍的に存在する。我々は、このミトコンドリア内膜に局在する succinate dehydrogenase (SDH)¹⁾に着目した。SDH はコハク酸をフマル酸へ酸化還元することで tricarboxylic acid cycle の一端を担い、呼吸鎖複合体 II として活動している。一方、コハク酸をフマル酸へ酸化還元した際に生じた電子を次の複合体へ伝達する電子伝達系酵素としても働いているため、電子伝達系複合体 II とも呼ばれている。この SDH は 4 つのタンパク質から構成されている複合体であり、このうちの 하나가 Succinate dehydrogenase subunit C (SDHC) である。SDHC は ubiquinone 酸化還元酵素として働くことで電子の橋渡しをし、SDH の持つ 2 つの酵素機能を直接結びつける役割を果たしている。

SDHC 遺伝子は 1q21 に位置し、49608 bp の DNA 中に 6 つの exon を持つ。Open Reading Frame からは 507 塩基、169 アミノ酸が翻訳される。我々は、ヒト *SDHC* 遺伝子の発現調査の過程で、exon 3 および exon 5 が欠失する 2 種類の新規 alternative splicing variant (ASV) を発見した。我々が発見したこれら ASV は、paraganglioma をはじめとする様々な疾患で確認されはじめている^{1,2)}。本研究では、*SDHC* ASV の機能解析を行うため、これら ASV の臓器別

発現量を RT real-time PCR で調査したので報告する。

2. 材料と方法

ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 細胞から、GuickGene RNA cultured cell HC kit S (富士フィルム)を用いて total RNA を抽出し、Random primer (GIBCO)により、cDNA を合成した。*SDHC* の exon1 に Forward primer を exon6 に Reverse primer を設定し、合成した cDNA を template として RT-PCR 法を行った。RT-PCR 法により得られた PCR 増幅産物を精製後、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer にて塩基配列を解析し、ASV を同定した。同定された ASV は、いずれも 5'および 3' RACE 法により欠失領域以外の塩基配列の保存を確認した。また、7 種類のヒト由来各臓器における完全長 *SDHC* mRNA および各 ASV mRNA 量の測定を RT real-time PCR 法により行った (iCycler iQ real-time Detection System, BIO-RAD)。6-FAM で蛍光標識した TaqMan probe は exon4 に設定し、完全長 mRNA および各 ASV に共通な probe とした。

3. 結果

HCT-15 細胞由来 cDNA を用いて *SDHC* mRNA を増幅した結果、完全長 mRNA 由来増幅産物 (566 bp) よりも明らかに短い 2 種類の増幅産物 (464 bp および 402 bp) が確認された (Figure 1A)。さらに、これら増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した結果、完全長 mRNA 由来増幅産物 (566 bp) はデータベース上における *SDHC* mRNA の塩基配列と完全に一致したために、Full length isoform と決定した。また同様の方法で 2 種類の短い増幅産物を解析した結果、464 bp の増幅産物は Full length isoform から exon3 が欠失する isoform (delta

^{*1}: 理工学研究科理工学専攻博士前期課程

^{*2}: 物質生命理工学科助教

^{*3}: 物質生命理工学科准教授 (hisatomi@st.seikei.ac.jp)

3) および 402 bp の増幅産物は Full length isoform から exon5 が欠失する delta5 と同定した。なお, delta5 では frame shift が生じ, stop codon が 3' non coding region へ移行したことにより, 70 アミノ酸が新たに発生した。これら ASV の細胞内発現量を 7 種類のヒト由来各臓器別に RT real-time PCR 法で測定した結果, これら ASV の各臓器における存在比は普遍的であることが明らかとなった (Figure 1B)。

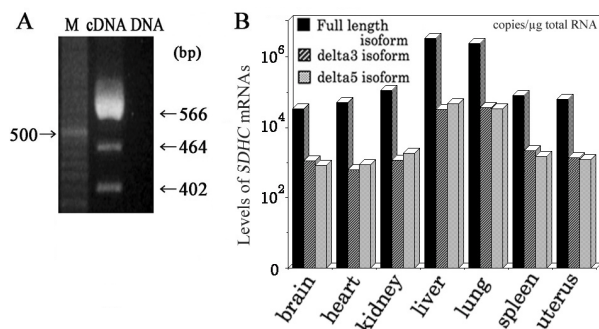


Figure 1. Expression profiles of SDHC splicing variants. A, Alternative splicing of SDHC mRNA. M, molecular weight marker ; cDNA, cDNA of HCT-15 cell line; DNA, genomic DNA. Two shorter signals are observed in the HCT-15 cells. B, Quantification of SDHC mRNA in human normal tissues. mRNA expression levels are presented as the mRNA copy number per μg total RNA.

4. 考察

エネルギー代謝が盛んな心臓, 脳, 骨格筋, 神経などの臓器は, ミトコンドリアの機能異常により障害を受けやすいことが報告されている。中でも, 電子伝達系酵素の異常に伴う症例が大半を占める³⁾。ミトコンドリア DNA の異常による complex I および IV の機能欠損が原因として引き起こされるミトコンドリア病が一般的に広く知られているが, 最近, 電子伝達系酵素で唯一核 DNA 由来である complex II の異常によって起こる疾患も多く報告されている^{3,4)}。そのうち, paraganglioma の患者は SDHB, SDHC および SDHD の変異を持つことが最近の研究により明らかとなった⁴⁾。本研究では, paraganglioma の原因遺伝子である可能性が高い SDHC⁵⁾ から, exon3 あるいは exon5 が欠失した新たな ASV を発見した。SDHC 遺伝子から 102 塩基欠失する delta3 は in-frame mutation であるため, 欠失領域以外のタンパク質は保持されているが, 162 塩基が欠失する delta5 isoform は frame shift により exon5 欠失以降のアミノ酸配列が Full length isoform と全く異なっている。したがって, delta3 isoform は dominant negative inhibitor として機能し, SDH 活性を抑

制すると推測される。また, delta5 isoform においては, dominant negative inhibitor または SDHC とは異なるタンパク質として機能するという両方向からの可能性が推測される。しかし, SDHC ASV をクローニングした plasmid を用いて遺伝子導入し, 過剰発現させたそれぞれの細胞で SDHC Full length mRNA 量を RT-PCR 法により定量した結果, シグナル強度の差異は観察されず, 発現量に変化はなかった。この結果より, SDHC ASV は過剰発現しても, dominant negative inhibitor として機能していないことが示唆された。また delta5 isoform は, 細胞質に点在するミトコンドリアに局在化していることが証明された。これは, Full length isoform および delta3 isoform 同様, 細胞質でタンパク質に翻訳された後, ミトコンドリアへ移行して機能していると考えられる。しかし, 現段階ではミトコンドリアに局在していることが明らかとなっただけで, SDHC ASV の作用機序は未解明である。

SDHC の点突然変異は, ミトコンドリアから産生される過剰な活性酸素発生をもたらす。その結果, 老化の現象と考えられる細胞増殖能の抑制が生じることや, 生体防御機構としてアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路が活性化することが報告されている⁴⁾。また, 細胞が低酸素状態となることで, 血管新生など癌の進展に関与する遺伝子の発現を調節する因子として作用していることが報告され, 癌との関連も示唆されている⁶⁾。今後, SDHC ASV の生体内作用機序を解明し, SDHC ASV によって発症する病気のメカニズムを明らかとする予定である。

なお, 本研究で発見した ASV は, National Center for Biotechnology Information の国際データベースに登録が許可された (AB211234, AB211235)。

参考文献

- 1) Cascón A, Pita G, Burnichon N *et al.* J Clin Endocrinol Metab 94: 1701-1705, 2009.
- 2) Pigny P, Cardot-Bauters C, Do Cao C *et al.* Eur J Endocrinol 160: 227-231, 2009.
- 3) Dong LF, Low P, Dyason JC *et al.* Oncogene 27: 4324-4335, 2008.
- 4) Pasini B, McWhinney SR, Bei T *et al.* Eur J Hum Genet 16: 79-88, 2008.
- 5) Niemann S, Müller U, Engelhardt D, Lohse P. Hum Genet 113: 92-94, 2003.
- 6) Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED *et al.* Cancer Cell 7: 77-85, 2005.