

- 5) Fine JD, Eady RJA, Bauer EA, et al: The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the third international consensus meeting on diagnosis and classification of EB, *J Am Acad Dermatol*, 2008; 58: 931-950.
- 6) Whatley SD, Mason NG, Holme SA, et al: Gene dosage analysis identifies large deletions of the FECH gene in 10% of families with erythropoietic protoporphyria, *J Invest Dermatol*, 2007; 127: 2790-2794.
- 7) 玉井克人：栄養障害型表皮水疱症, 玉置邦彦編：水疱症 膿疱症 最新皮膚科学大系, 第6巻, 東京, 中山書店, 2002, 186-197.
- 8) Takiyoshi N, Nakano H, Sawamura D: Epidermolysis bullosa pruriginosa with marked phenotypic heterogeneity caused by a recurrent glycine substitution: Incomplete penetrance or a latent case? *J Dermatol*, in press.
- 9) Hayashi M, Kawaguchi M, Hozumi Y, et al: A case of dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa of elderly onset, *J Dermatol*, 2011; 38: 173-178.
- 10) Gouya L, Puy H, Robreau AM, et al: The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH, *Nat Genet*, 2002; 30: 27-28.
- 11) Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, et al: Novel ferrochelatase mutations in Japanese patients with erythropoietic protoporphyria: high frequency of the splice site modulator IVS3-48C polymorphism in the Japanese population, *J Invest Dermatol*, 2006; 126: 2717-2719.



◆特集／多様化する光線過敏症
ヘム合成経路とポルフィリン症

中野 創*

Key words : ポルフィリン症 (porphyria), ヘム合成経路 (heme synthesis pathway), 骨髄性プロトポルフィリン症 (erythropoietic protoporphyria), 晩発性皮膚ポルフィリン症 (porphyria cutanea tarda)

Abstract 皮膚症状を呈するポルフィリン症のなかで最も遭遇する機会の多い病型は骨髄性プロトポルフィリン症 (EPP) と晩発性皮膚ポルフィリン症 (PCT) である。EPP は光線過敏に加えて致死的な肝障害を併発するおそれがあるため、正確な診断が必要である。潜在的 EPP が遺伝子診断で見つかる場合があり、家系内での遺伝子診断が特に肝障害の予防のために重要である。遮光が治療上の大きな位置を占める。PCT の大部分は後天性で、肝炎やアルコール過剰摂取が背景にあることが多い。また、ある種の薬剤で増悪する可能性があることを患者に伝える必要がある。PCT の場合は遮光とともに背景の増悪因子を除くことが治療上大切である。

ヘム合成経路

ヘムはグリシンとサクシニル CoA から複数の中間代謝産物を経て合成される (図 1)。この合成経路にかかわる酵素は 8 つあるが、それぞれの酵素をコードする遺伝子の変異により、ポルフィリン症は現在 9 つの臨床病型に分類されている (表 1)。ポルフィリン症の基本症状は皮膚症状 (光線過敏など)、消化器症状 (肝障害など)、および神経症状 (しびれ、感覚異常など) であるが、急性間歇性ポルフィリン症 (AIP) とアミノレブリン酸脱水素酵素欠損性ポルフィリン症は、酵素活性低下によって蓄積する中間代謝産物 (ポルフィリン体前駆物質) が光で励起されないため、光線過敏症状を呈さない。また、骨髄性プロトポルフィリン症 (EPP) のように神経症状を示さない病型もあり、一つの代謝経路内のどの酵素が障害されるかによって、臨床症状の発現の仕方がそれぞれの病型

で異なっている。また、異型ポルフィリン症では、発作が生じる急性期以外では光線過敏症状が出現しないこともあり、実際、光線過敏を全く自覚していない症例も存在するため、確定診断には遺伝子変異検索が必要となる。X 連鎖優性プロトポルフィリン症は、最近新たに記載された病型で、アミノレブリン酸合成酵素 2 の変異が原因であることが判明したことから、フェロキターゼ遺伝子 (*FECH*) に変異が同定できない EPP から独立疾患として分離された¹⁾。本邦におけるポルフィリン症の過去の報告の集計では晩発性皮膚ポルフィリン症 (PCT) が最多であり、次いで AIP、EPP の順であった²⁾。このうち、PCT は大部分が後天性と考えられ、ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素遺伝子の変異による優性遺伝性の症例はごく稀である。従って、遺伝性を示すポルフィリン症のうち、皮膚科領域で診療する機会の最も多いものは EPP であろう。そこで、本稿ではポルフィリン症のなかから EPP を中心として、PTC についても付随的に臨床皮膚科学上の重要なポイントを述べる。

* Hajime NAKANO, 〒036-8562 弘前市在府町
5 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座、
准教授

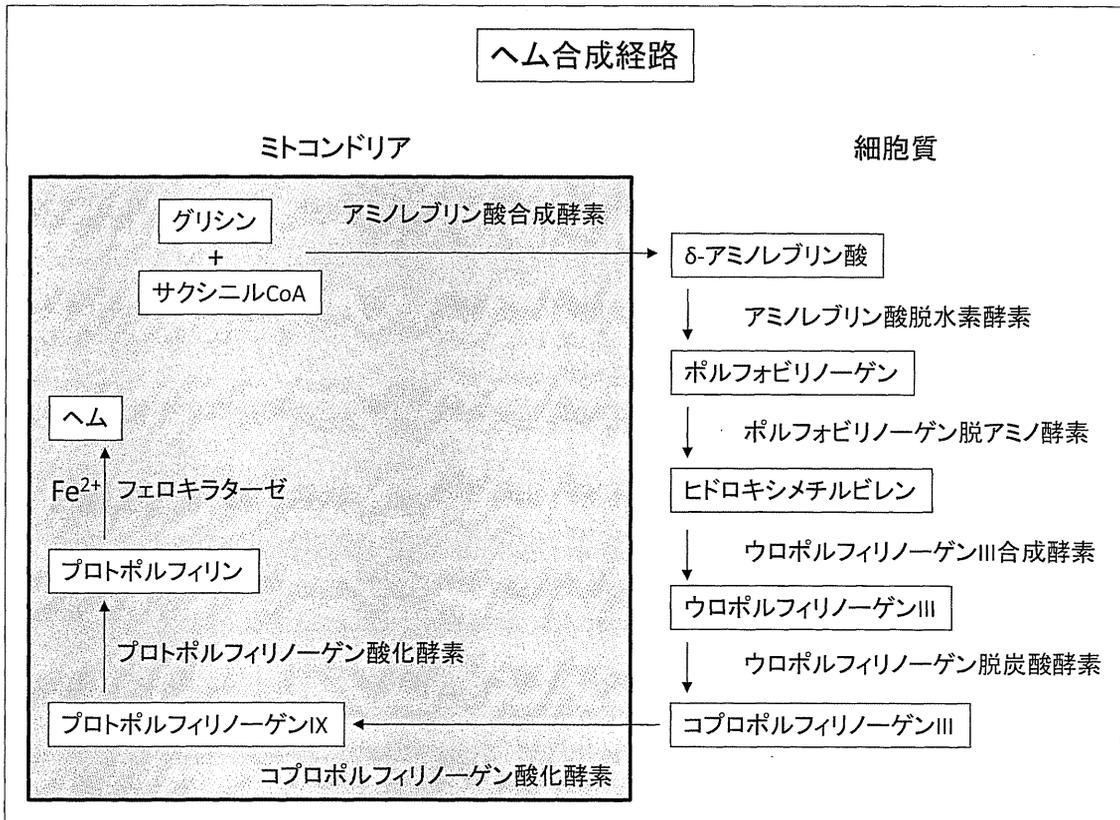


図 1. ヘム合成経路

表 1. ポルフィリン症の病型と原因遺伝子

病 型	原因遺伝子産物	遺伝形式
先天性ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン合成酵素	常劣
骨髄性プロトポルフィリン症	フェロキラーターゼ	常優
X連鎖優性プロトポルフィリン症	アミノレブリン酸合成酵素2	X連鎖
急性間歇性ポルフィリン症	ポルフィロビリノーゲン脱アミノ酵素	常優
アミノレブリン酸脱水素酵素欠損性ポルフィリン症	アミノレブリン酸脱水素酵素	常劣
異型ポルフィリン症	プロトポルフィリノーゲン酸化酵素	常優
遺伝性コプロポルフィリン症	コプロポルフィリノーゲン酸化酵素	常優
晩発性皮膚ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	常優
肝性骨髄性ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	常劣

常劣：常染色体性劣性遺伝 常優：常染色体性優性遺伝
X連鎖：X染色体連鎖

EPP

<臨床的特徴>

EPPはプロトポルフィリン(PP)に鉄イオンをキレートさせ、ヘムを形成する酵素フェロキラーターゼ(FECH)をコードする *FECH* の変異により FECH の活性が低下し、PPが蓄積することによって発症する(図1, 表1)。臨床的には光線過敏症と赤血球中PP値の上昇でEPPと診断されるが、確定診断には遺伝子変異検索が必要である。遺伝形式は常染色体優性遺伝である。本症は遺伝性ではあるが、光線過敏症状は出生後ただちに生じるのではなく、数年を経てから出現する場合が多い。そのため、EPPに罹患していると気づかれない場合が稀ではない。また、さらに重要な点は、症例の数%に重度の肝障害を合併し、生命予後を脅かすことである。従って、正しい診断の下に的確な生活指導を行うことが肝要である。皮膚科的な主症状は光線過敏症とそれに付随する皮膚症状である。幼児期以降、日光曝露後に顔面や手背な

どの露光部に、熱感、疼痛を伴う浮腫性紅斑、小水疱、湿疹様皮疹を生じる。これら急性期の皮疹はその後びらん、結痂、色素沈着、陥凹性小癬痕、苔癬化といった慢性期の症状に取って代わられる。顔面、特に頬部は油性の光沢を帯びるのが特徴的といわれる。また、下口唇に浮腫性紅斑、びらんを生じ、光線性口唇炎の像を呈する場合もある。長時間の屋外活動の後に、光線性爪甲剥離症をきたすこともある。患者は日焼けを起こしやすい体質と自覚し、平素から光線曝露を意識的に避けているため、皮膚科受診時に急性期症状を呈していない可能性もあるが、その場合、露光部の小陥凹を確認することが診断の有力な決め手となる。ただし、同様の所見は種痘様水疱症や多型日光疹などでもみられるため、それらとの鑑別が必要である。

<病 態>

EPP 患者では赤血球に PP が多量に蓄積される。PP の作用波長は 400 nm をピークとする長波長紫外線(UVA)と、それより長波長側の可視光線域にあるので、患者が日光に曝露すると、皮膚を循環する末梢血赤血球中の PP が励起され活性酸素を生じ、赤血球を破壊するとともに、周辺の皮膚組織に障害を与えることによって光線過敏症状が引き起こされると考えられる。PP は水に不溶であり、健常人では大部分は肝臓を経て胆汁中に排出され、糞便から体外に排出されるが、EPP 罹患者では血漿中に過剰に放出された PP が肝臓で処理される過程で処理能力を超えた PP ないしその代謝物が肝細胞や Kupffer 細胞、あるいは肝内胆管に沈着することによって肝障害が生じると考えられている。従って、光線曝露を抑えることが肝障害を予防するために必須である。

遺伝学的に本症はやや複雑な伝播様式をとるが、原因遺伝子が明らかにされる以前から不完全優性遺伝性疾患として認知されていた。それは、家系分析から、明らかに変異を有すると考えられるが発病しない個体、すなわち無症候性キャリアの存在が認められたからである。こうした遺伝様

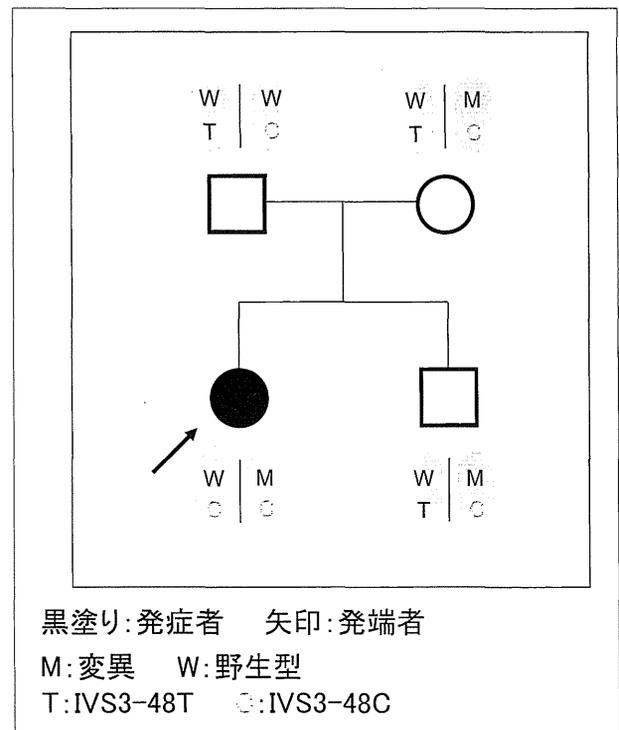


図 2. 遺伝子多型 IVS3-48C で発症が規定される EPP 家系発端者の同胞と母は一方のアリルに遺伝子変異を有するが、他方のアリルに IVS3-48C を持たないため発症しない。

式は換言すれば、浸透率が 100% 未満の優性遺伝ともいえる。一般に、浸透率は遺伝子変異を有する個体のうち、発症している個体の割合と定義されるが、ヨーロッパの白人 EPP 症例では、浸透率は 10% 程度とされてきた。つまり、遺伝子変異を有していても発症するのは 10 人に 1 人ということになる。EPP におけるこのようなメンデルの優性遺伝に 100% 従わない遺伝様式の様式が現在では分子遺伝学的に明らかになっている。体細胞に 2 つ存在する *FECH* のうち、一方のアリルに酵素活性を著しく低下させるような変異があり、かつ、もう一方のアリルのイントロン 3 に遺伝子多型 IVS3-48C が存在すると、スプライシング異常を起こす頻度が高まり、その結果、早期停止コドンを生じるため、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構によって *FECH* mRNA 量が低下することが解明されている³⁾。一方のアリルに病的変異があっても、もう片方のアリルに IVS3-48C がなければ、EPP として発症しない。つまり、EPP の発症は変異の対側のアリルの IVS3-

表 2. ポルフィリン体検査項目

赤血球プロトポルフィリン
血中コプロポルフィリン
尿中ポルフィobilinノーゲン
尿中 δ -アミノレブリン酸
尿中コプロポルフィリン
尿中ウロポルフィリン

48C によって規定されている (図 2). このことは EPP 家系においての確な遺伝カウンセリングを行ううえで極めて重要である⁴⁾.

<検査>

光線過敏を訴える患者について、EPP をはじめとするポルフィリン症を疑った場合、血液および尿中のポルフィリン体を測定する。表 2 に示したとおり、現在、臨床検査委託会社で測定可能な項目は複数あるが、EPP とそれ以外のポルフィリン症との鑑別が必要になることがあるので、表 2 に掲げた項目は一式測定したほうがよい。EPP では赤血球プロトポルフィリン値が高値である一方、尿中ポルフィリン体は通常いずれも陰性である。定性的検査法として、末梢血の塗末標本を蛍光顕微鏡下で観察すると EPP 患者では赤血球が蛍光を発しているのが確認できる。また、末梢血に UVA を照射して溶血が起こるかどうかを調べる、光溶血試験も有用である。これら 2 つの検査法は医療施設での検査環境が整っていれば、簡便で有用な検査法である。一般採血では貧血、肝機能障害をきたしうるので、定期的チェックが必要である。なお、EPP が骨髄異形成症候群に併発したという報告があるので、貧血を伴っている場合にはその質的診断が必要となる。病理組織学的には真皮の毛細血管周囲に PAS 陽性物質が沈着する。

臨床症状と赤血球プロトポルフィリン高値で EPP が強く疑われた症例で、*FECH* に変異が同定されれば確定診断を得られる。現在、臨床的に EPP 確実例の家系で *FECH* に変異が同定される割合は 9 割程度である。*FECH* 変異と IVS3-48T/C 遺伝子多型との関係を調べた報告を総合すると、大部分の症例が IVS3-48C によって EPP の発症が規定されている。従って、EPP 家系にお

いて、発端者の *FECH* 変異が確定されれば、IVS3-48T/C の遺伝子型も調べることによって、患者の同胞のうち、臨床的に無症状の個体が無症候性キャリアであるかそうでないかが特定できる⁴⁾.

EPP における遺伝子診断の最も重要な臨床的意義は、潜在的 EPP 罹患児の発見である。いまだ発症していない EPP 罹患児が、それと知らずに多量の日光に曝露されると重度の光線過敏症状を生じるのみならず、血中に大量に放出された PP に起因する急性肝不全で致命的になる危険性がある。従って、EPP と診断された家系では遺伝子診断を行い、特に、無症候の同胞について、EPP であるかどうかを明らかにしておかなければならない。これまでのところ、肝障害の合併に特異的な *FECH* 変異は決定されていない。停止コドンが生じるようなナンセンス変異やスプライシング異常のように *FECH* の活性がほぼゼロになるような変異では、ミスセンス変異に比べて肝障害を引き起こす可能性が高いことが示唆されているが、その一方、ミスセンス変異であっても肝障害を生じた家系が報告されている。また、同一のミスセンス変異でも肝障害を合併する場合としない場合もあり、特定の変異から将来肝障害を併発するかどうかを推定することは不可能である。

<治療>

EPP 患者の管理目標は、光線過敏症状を起こさないようにすることと、肝障害を併発させないことにある。光線に曝露させないためには遮光が必要であるが、現在では、サンスクリーンによって完全に紫外線を遮断する必要はなく、直射日光は無論避けるべきであるが、ある程度紫外線に曝露されて色素沈着を獲得したほうが、耐性を生じるため好ましいという考え方がある⁵⁾。光線性皮膚炎が生じてしまった場合は、紅斑が主体の皮疹に対しては病変部位に応じたステロイド外用剤を用いる。びらんを伴う皮疹には創傷治癒促進外用薬と外用抗菌剤とを適宜併用する。痒痒があれば抗ヒスタミン内服薬を使用する。活性酸素除去によ

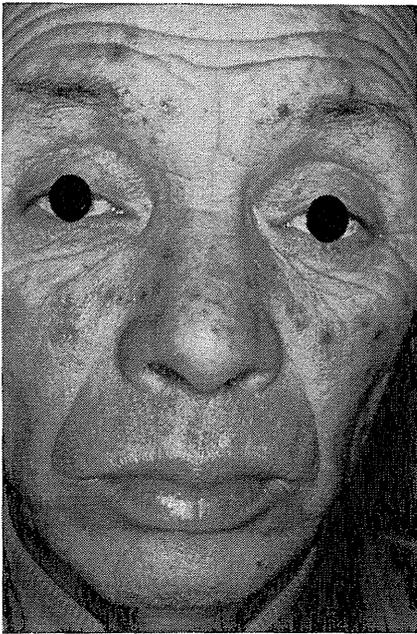


図 3. PCT の顔面皮膚病変
前額部、両頬部、および鼻部に小びらんが
散在している。



図 4. PCT の強皮症様皮膚病変
皮膚硬化のために手指の進展が妨げられてい
る。強皮症で見られる bowed finger のごと
き所見である。

る皮膚炎の症状軽減を期待して、ビタミンCやビタミンEなどの抗酸化ビタミンの投与も行われているが、有効性に関する確かなエビデンスはない。欧米ではEPPに対してβ-カロチン内服療法が行われ、有効とする報告が複数あるが、本邦では未承認である。しかし、光線過敏が軽減されたと述べる患者も実際に経験するため、そのような症例では利用する価値があると思われる。軽度の肝障害に対しては、胆石溶解薬や陰イオン交換樹脂の有効性が報告されている。肝障害は軽度にとどまるうちから小児科医あるいは内科医にコンサルトし、定期的にフォローアップしてもらうべきである。

<日常生活における注意点>

ポルフィリン症の作用波長を効果的に遮蔽可能で使用感にも優れたサンスクリーン剤は現在市販されていないが、厚生労働省研究班が開発中である⁶⁾。現状では従って、つば広の帽子や長袖シャツ、長ズボンなどの着用により物理的に光線を遮断する方法に頼らざるをえない。なお、作用波長光線はガラスも透過するので、室内あるいは自動車内においても光線曝露には十分留意すべきである。

PCT

<臨床的特徴>

本症は通常壮年期以降に発症する。露光部に色素沈着、水疱、びらん、癬痕、皮膚脆弱、多毛などがみられる(図3)。光線過敏症状はほとんど目立たず、自覚されないこともある。皮膚硬化を伴うことがあり、稀に強皮症を思わせる所見を呈する場合がある(図4)。ウイルス性肝炎や肝細胞癌を含めた肝障害、アルコール摂取過剰、鉄負荷、薬剤摂取が背景にあることが多い。

<病態>

肝臓でのウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素の活性低下により発症するとされる(図1, 表1)。稀に常染色体性優性遺伝の症例があるが、大部分は後天性と考えられている。しかし、ヘモクロマトーシスの原因遺伝子HFEのアミノ酸置換が関与しているなど、遺伝的背景が発症にかかわっている可能性が欧米では示唆されている。

<検査>

PCTでは尿中ウロポルフィリンが高値になるが、血中ポルフィリン体は正常値である。血清鉄、

フェリチン値が高値を示す。また、肝機能異常、特にウイルス性肝炎や肝細胞癌の合併を調べなければならない。組織学的に毛細血管周囲のPAS陽性物質沈着が認められるが、EPPほど高度ではないという。

<治療>

PCTでは瀉血療法が有効であり、鉄過剰の患者では特に効果が高いとされる。1回500mlの瀉血を2週に1ないし2回行い、ヘモグロビン値が10g/dl程度になるまで行う。ポルフィリン体が正常値に回復するまでは瀉血療法終了から数か月以上を要するため、それまでは遮光を継続しなければならない。また、抗マラリア剤が有効とされ、欧米では一般的である。鉄キレート剤、シメチジン、インターフェロン(C型肝炎合併例)の有効性が報告されている。いずれにしても、肝障害や薬剤など増悪ないし誘発因子がある場合、症状改善のためにはそれらを可及的に除去する必要がある。

<日常生活における注意点>

他の疾患の治療目的に投薬を受ける際は、ポルフィリン症を悪化させることが知られている薬剤(エストロゲン、バルビツレート、スルホンアミドなど)の使用を避けるべきである。アルコール摂

取も制限する。また、PCTは鉄過剰状態にあり、貧血の合併に対して鉄剤を投与すると、原疾患を悪化させる可能性があることに注意が必要である。

文献

- 1) Watley SD, Ducamp S, Gouya L, et al: C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am J Hum Genet*, **83**: 408-414, 2008.
- 2) Kondo M: Porphyrin in Japan: The past, Present, and Future. *Porphyrias*, **18**: 1-6, 2009.
- 3) Gouya L, Puy H, Robreau AM, et al: The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet*, **30**: 27-28, 2002.
- 4) 中野 創: 皮膚科セミナーウム 3 骨髄性プロトポルフィリン症の遺伝子診断. 日皮会誌, **119**: 1225-1230, 2009.
- 5) 上出良一: 光線過敏症. 皮膚臨床, **51**: 1380-1391, 2009.
- 6) 川田 暁, 上出良一: 遺伝性ポルフィリン症の光線過敏にたいする新規治療薬開発の検討. 厚生労働省科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業 遺伝性ポルフィリン症の全国疫学調査ならびに診断・治療法の開発に関する研究 平成 21 年度総括・分担研究報告書, pp.69-72, 2011.

特集 知っておくべき『肝疾患と皮膚病変』—ウイルス性肝炎治療を中心に

topics 3 Part2. 皮膚科医が知って得する、肝臓と皮膚のトピックス

J Visual Dermatol 11: 1168-1172, 2012

肝障害と晩発性皮膚ポルフィリン症

中野 創

Key words: 晩発性皮膚ポルフィリン症, ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素, 肝障害

はじめに

ポルフィリン症はヘム合成系に関わる8つの酵素のいずれかの活性低下によって、ポルフィリン体あるいはその前駆体が蓄積し、皮膚症状、消化器症状、神経症状などを呈する疾患群の総称であり、現在9つの病型が知られている(表1)。

それらのうち、晩発性皮膚ポルフィリン症 (porphyria cutanea tarda: PCT) はヘム合成系の5番目の酵素であるウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素 [(uroporphyrinogen decarboxylase: UROD (EC 4.1.1.37)] の活性が低下することによって、ポルフィリン体が過剰に生成され、光線過敏性皮膚障害と尿中ウロポルフィリン (uroporphyrin: UP) の大量排出を来すポルフィリン症である¹⁾。ポルフィリン症の他の病型とは異なり PCT の多くは遺伝性を認めず、孤発性 PCT (sporadic PCT: sPCT) とよばれるが、欧米では PCT 症例の 20~30% が UROD をコードする UROD 遺伝子のヘテロ接合性変異による常染色体性優性遺伝性の PCT であるとされ、家族性 PCT (familial PCT: fPCT) とよばれている (OMIM#176100)。sPCT を I 型、fPCT を II 型

とし、さらに家族内発症が認められるものの、UROD の活性低下が肝臓に留まるものを III 型として分類する場合もある。

本邦においては 1957 年から 2002 年までに報告された PCT 303 症例中、家族歴の明らかな PCT はわずかに 3 症例の報告があるのみであり、欧米に比べて圧倒的に sPCT が多い²⁾。発症の男女比はほぼ 1 対 1 である。sPCT は中年以降に発症することが多いが、fPCT の多くは 20 歳までに発症するとされる³⁾。

■ 病因・病態

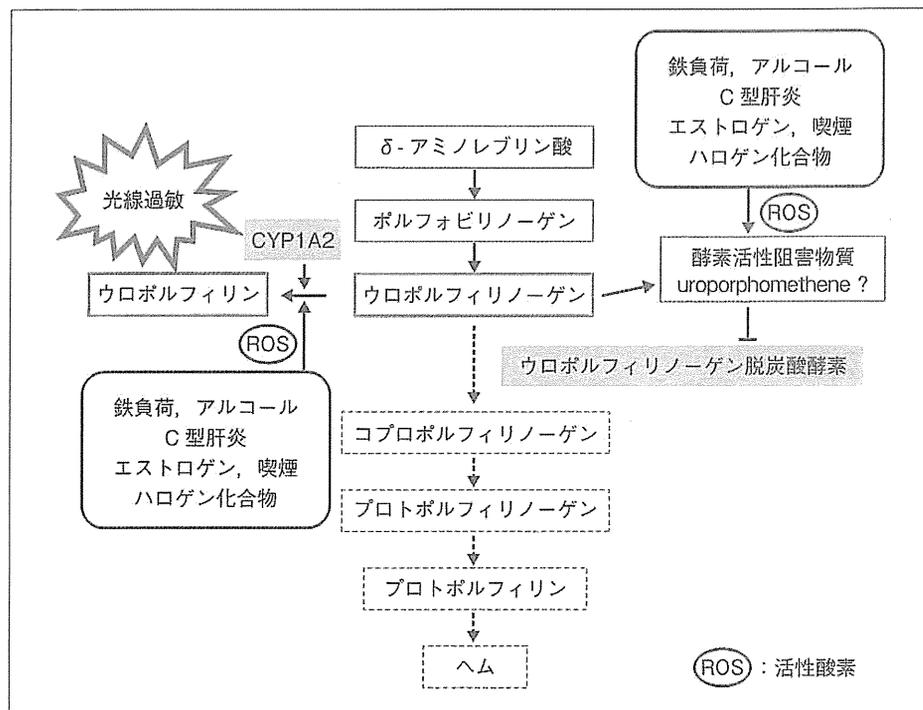
UROD は、ヘム合成系においてウロポルフィリノーゲン III (uroporphyrinogen III: UROGEN III) から脱カルボキシ化によってコプロポルフィリノーゲン III (coproporphyrinogen III: COPROGEN III) を生じる反応を触媒する酵素である。sPCT では部分的 UROD 活性低下が肝で選択的に生じている。このため UROGEN が多量に生じるが、これが肝において酸化を受けて UP になり、循環血中に放出されたものが皮膚に蓄積し、日光曝露を受けて皮膚障害をひき起こすものと理解されている(図1)。

表1 ポルフィリン症の病型

病型	原因遺伝子産物	遺伝形式
先天性赤芽球性ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン合成酵素	常劣
赤芽球性プロトポルフィリン症	フェロケラターゼ	常優
X連鎖優性プロトポルフィリン症	アミノレブリン酸合成酵素2型	X優
急性間欠性ポルフィリン症	ポルフォビリノーゲン脱アミノ酵素	常優
アミノレブリン酸脱水素酵素欠損性ポルフィリン症	アミノレブリン酸脱水素酵素	常劣
多様性ポルフィリン症	プロトポルフィリノーゲン酸化酵素	常優
遺伝性コプロポルフィリン症	コプロポルフィリノーゲン酸化酵素	常優
晩発性皮膚ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	常優
肝性赤芽球性ポルフィリン症	ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素	常劣

常劣: 常染色体性劣性遺伝, 常優: 常染色体性優性遺伝, X優: X染色体連鎖優性

図1 PCT発症のメカニズム



このUROGENの酸化反応にはPCTの誘発因子として知られる鉄、アルコール、エストロゲン、ある種の化合物などによって生成される活性酸素が関与しているとの考えが一般的である⁴⁾。マウスでは肝においてCYP1A2によりUROGENが酸化されてUPを生じることがわかっている(図1)。ただし、ヒトの正常肝はマウスに比べて酸化活性はるかに低い⁵⁾。

PCTの病態の本質は肝におけるURODの活性低下であるが、なぜ肝選択的にURODの活性低下が生じるかはわかっていない。これまでの通説は肝においてUROD阻害物質が形成されるというもので、ここにも各種誘因が作り出す活性酸素が関与しているとの考えが支持されている⁴⁾。近年、鉄依存性に生じる内因性のUROD阻害物質がuroporphometheneとして報告されたが⁵⁾、その存在に疑念を挟む意見もあり⁶⁾、実際今日までその阻害物質は追認されていない。

fPCTでは肝臓以外に、赤血球、皮膚線維芽細胞においても活性低下が証明されており¹⁾、すべての細胞でUROD活性が低下していると考えられる。UROD遺伝子にヘテロ接合性の変異を有する個体では、すべての細胞でUROD活性が50%まで低下しているが、sPCTと共通した誘因により、肝でUROD活性がさらに低下す

るとfPCTとして発症する。sPCTでは皮膚におけるUROD活性は正常で、ヘム合成系自体には異常がないと考えられるが、やはり光線過敏が生じることから、光線過敏性皮膚障害に関しては肝由来のUPが大きく寄与していると思われる。

■ PCTと肝障害

PCTは古くから肝障害と密接な関係があるといわれてきた。それは、誘因としてよく知られるアルコール過剰摂取やC型肝炎ウイルス(HCV)感染が肝障害を伴うからである。しかし、他の誘因のなかにはエストロゲン摂取のように、それ自体肝障害を必ずおこすものではない誘因もある。実際にPCT患者の肝でほぼ必ずみられる異常所見は、組織学的な鉄沈着である³⁾。

PCTの病態における肝障害の位置づけは、3割の症例に肝障害がみられる赤芽球形プロトポルフィリン症のように、遺伝子変異によってポルフィリン代謝酵素活性が低下し、ポルフィリン体が肝に蓄積することによって、二次的に肝障害を来すのとは根本的に異なる(図2)。

sPCTの場合は鉄負荷を伴う肝障害が基盤にあり、そのためUROD活性の低下がおこることによってポルフィリン体の生成が過剰になり、結果、皮膚の光線過敏

特集 知っておくべき『肝疾患と皮膚病変』—ウイルス性肝炎治療を中心に

topics 3 肝障害と晩発性皮膚ポルフィリン症

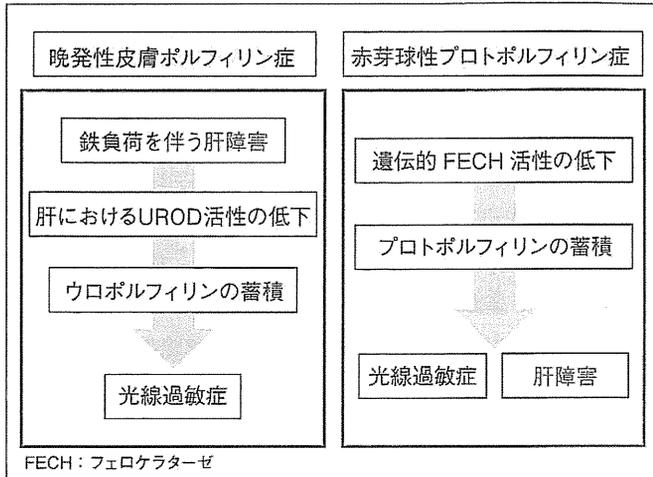


図2 ポルフィリン症における肝障害の位置づけ

が引き起こされる(図2)。fPCTにおいても、UROD 遺伝子のヘテロ接合性の変異によって肝を含む全身の細胞のUROD活性が50%まで低下しているが、それだけでは発症せず、sPCTと共通した誘因が関与して、さらに肝におけるUROD活性が低下することによって、発症していると理解されている。

PCTとその誘発因子

現在までにPCTの誘因として知られているものを表2に掲げた。これら誘因のうち、UROD活性を低下させることが明らかに証明されたものは多くはない。かつて食用穀類の殺菌剤として用いられ、多数のPCT-like syndromeをひき起こしたhexachlorobenzeneはUROD活性の阻害剤であることが明らかにされている。以下、個々の誘因とPCTの病態における役割を簡単に述べる。

① 鉄負荷

肝における鉄負荷は、PCTのほぼすべての症例において共通してみられる所見である。瀉血によって体内の鉄量を減少させるとPCTの症状が改善されることから、鉄負荷の病態への関与は明らかであろう。鉄は活性酸素を介してUPなどのポルフィリン体産生を促進するほか、細胞内のδ-アミノレブリン酸(δ-aminolevulinic acid: ALA)レベルを上昇させることが知られている⁴⁾。鉄代謝に影響する遺伝的因子としては、遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子であるHFE遺伝子のアミノ酸置換があげられ、p.Cys282Tyrあるいは

表2 PCTの誘発因子

鉄負荷
アルコール過剰摂取
エストロゲン服用
C型肝炎ウイルス感染
喫煙
ハロゲン化合物摂取

はp.His63Aspを生じる遺伝子変異が発症に関与しているとの報告が多数ある⁴⁾。しかし、すべてのPCT症例にこれらの変異がみられるわけではない。また、HFE遺伝子に病的変異を有する遺伝性ヘモクロマトーシス患者ではPCTよりもはるかに高度の鉄負荷が存在するが、それらの症例がすべてPCTを発症するわけではない。したがって、鉄負荷はその絶対量ではなく質的な変化が影響しているのかもしれない。

② アルコール過剰摂取

アルコールの過剰摂取は25～90%の症例で認められる⁴⁾。アルコールの過剰摂取は当然肝機能障害をひき起こす。エタノール自体はALA脱水素酵素やフェロケラターゼといったヘム合成系の酵素を阻害することが知られ、また、アルコール摂取した健常人やアルコール依存者において、赤血球UROD活性が低下していることが示されている⁷⁾。アルコール性肝障害ラットでは、肝を含めた全身の鉄貯蔵量が増加していることも示されている⁸⁾。

③ エストロゲン服用

女性のPCT症例におけるエストロゲン服用者の割合は30～70%である⁴⁾。しかし、エストロゲン服用者のうちPCTを発症するのはきわめて一部分にすぎず、本薬剤の発症における役割はわかっていない。HCV感染を伴わないエストロゲン服用女性PCTの6例すべてにおいて、組織学的な脂肪肝が確認されている¹⁰⁾。したがって、エストロゲン服用によって組織学的肝障害が生じるような個体ではPCTが発症するのかもしれない。また、男性の前立腺癌患者がホルモン療法の目的でエストロゲンを服用し、PCTを発症した症例も報告されている。

④ C型肝炎ウイルス感染

ウイルス感染がPCTの発症メカニズムとどのように関係しているかについてもこれまであまりわかっていなかった。HCVの関与が強いとする報告が多数ある一方、明らかな関連性を認めないとする報告もある^{3,10)}。近年、HCV感染者の肝では対照と比較して、鉄代謝に関与するヘプシジンの遺伝子発現が低下していることが示された¹¹⁾。非常に興味深いことに、PCT患者肝では同程度の鉄負荷を有する遺伝性ヘモクロマトーシス患者と比較して、ヘプシジンの発現が有意に低いことが明らかにされている¹²⁾。

ヘプシジンは25残基のアミノ酸からなるシステインが豊富なペプチドであるが、本ペプチドはIL-6等の刺激により肝細胞での産生および血中への放出が促進され、十二指腸の腸細胞に作用して、同細胞から循環系への鉄放出を負に制御する機能を有している¹³⁾。したがって、HCV感染によりヘプシジン発現が低下し、腸細胞から全身への鉄供給が増加し、肝における鉄負荷が生じるためPCTを発症するという機序が考えられている。

⑤ 喫煙

PCT患者の喫煙率は80%以上と高い⁴⁾。喫煙は肝においてCYP1A2を誘導することが知られているため、UP生成に促進的に働く可能性がある。また、活性酸素を発生させることからUROD活性を抑制しているとも考えられる。

以上、PCTの誘発因子について述べたが、症例の大部分はこれら因子が複数関与しているとされており¹⁴⁾、発症要因が個々の症例ごとに多様であることをうかがわせる。

PCTの臨床症状

露光部皮膚、とくに手背に水疱、びらん、痂皮を生じる。治癒後に瘢痕や稗粒腫をしばしば形成する。手背に皮膚の脆弱性がみられる。痒痒を伴うことが多い。ただし、軽症例では光線が皮疹の原因になっていると自覚されない場合もある。顔面に多毛を生じる。強皮症様皮膚硬化がみられることがある¹⁵⁾。肝障害があれば、その病勢に応じた症状が出現する。

診断と鑑別診断

1) 臨床診断

光線過敏性皮膚症状と尿中ポルフィリン体が陽性の場

合、まずはPCTが疑われる。本症では尿中UPが高値になるが、赤血球中ポルフィリン体は正常値である。尿中コプロポルフィリン(coproporphyrin:CP)も上昇する。7-カルボキシルポルフィリンが尿中で検出され、診断に有用である。糞便中にCPやイソコプロポルフィリンが検出され、後者は特異性が高い。肝機能異常、HCV感染の有無を調べる必要がある。血清鉄、フェリチン値が高値を示す。水疱部皮膚では病理組織学的に表皮下の水疱形成、真皮浅層毛細血管周囲のPAS陽性物質沈着がみられる。

2) 遺伝子診断

患者末梢血白血球由来DNAを用いてUROD遺伝子の変異検索が行われており、sPCTとfPCTの鑑別が可能である(弘前大学皮膚科:<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~derma/>)。本邦ではUROD遺伝子に変異が同定された症例はない。海外では2012年8月現在、113の変異が報告されているが、変異の種類と臨床症状の重症度との相関はみられていない。

3) 鑑別診断

他の遺伝性ポルフィリン症のなかで、多様性ポルフィリン症と遺伝性コプロポルフィリン症も光線過敏性皮膚障害と尿中ポルフィリン体陽性を示すため、鑑別が必要になることがある。そのためには尿中のUP、CPおよびALAを調べなければならないが、これらは臨床検査委託会社に依頼可能であり、保険適用になっている。PCTでは尿中ポルフィリン体は常にUP優位であり、ALAは検出されない。

治療と予後

1) 治療

ウイルス性肝炎、アルコール摂取や薬剤などPCTの誘発因子が存在する場合は、できる限りそれらを除去する。瀉血療法が有効であり、鉄過剰状態の患者ではとくに有効である⁸⁾。抗マラリア剤クロロキンが有効であり、欧米では一般的に使用されている。鉄キレート剤、シメチジン、インターフェロン(C型肝炎合併例)の有効性が報告されている。また、貧血を伴っている場合に鉄剤を投与すると、鉄過剰を増長し、症状を悪化させるので注意を要する。

2) 予後

合併している肝障害その他の状態による。PCTは肝細胞癌を発症する率が高いとされ³⁾、長期間未治療の症

特集 知っておくべき『肝疾患と皮膚病変』—ウイルス性肝炎治療を中心に

topics 3 肝障害と晩発性皮膚ポルフィリン症

例などでは肝細胞癌の有無を精査する必要がある。fPCTは浸透率が低く、UROD遺伝子に変異をもっているとしても、発症する割合は10%程度である。このことは家族歴のないsPCTと思われる症例であってもUROD遺伝子変異をもっている可能性を示唆している。したがって、sPCTが疑われる場合は、遺伝子診断を行ったほうがよいと思われる。

文献

- 1) Elder GH et al: Clin Sci (Lond) 58: 477, 1980
- 2) Kondo M et al: Int J Hematol 79: 448, 2004
- 3) Sarkany RP: Clin Exp Dermatol 26: 225, 2001
- 4) Ryan Caballes F, Sendi H, Bonkovsky HL: Liver Int 32: 880, 2012
- 5) Sinclair PR et al: Drug Metab Dispos 26: 1019, 1998
- 6) Phillips JD et al: Proc Natl Acad Sci U S A 104: 5079, 2007
- 7) Bickers DR, Frank J: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine 6th ed, McGraw-Hill Companies, New York, p.1435, 2003
- 8) Valerio LG Jr, Parks T, Petersen DR: Alcohol Clin Exp Res 20: 1352, 1996
- 9) Danton M, Lim CK: Biomed Chromatogr 21: 661, 2007
- 10) Bygum A et al: Acta Derm Venereol 83: 115, 2003
- 11) Fujita N et al: Mol Med 13: 97, 2007
- 12) Ajioka RS et al: Blood 112: 4723, 2008
- 13) Ganz T: Blood 102: 783, 2003
- 14) Jalil S et al: Clin Gastroenterol Hepatol 8: 297, 2010
- 15) 中野 創: MB Derma 191: 25, 2012

中野 創 Nakano, Hajime

弘前大学大学院医学研究科 皮膚科学講座
〒036-8562 弘前市在府町5
E-mail: hnakano@cc.hirosaki-u.ac.jp

The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability

Senkottuvelan Kadirvel^a, Kazumichi Furuyama^a, Hideo Harigae^b, Kiriko Kaneko^c, Yoshiko Tamai^d, Yoji Ishida^e, and Shigeki Shibahara^a

^aDepartment of Molecular Biology and Applied Physiology; ^bDepartment of Hematology and Rheumatology; ^cEndocrinology and Applied Medical Science, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ^dDivision of Transfusion Medicine, Hirosaki University Hospital, Hirosaki, Japan; ^eHematology and Oncology, Internal Medicine, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka, Japan

(Received 29 September 2010; revised 10 January 2012; accepted 18 January 2012)

Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) is essential for hemoglobin production, and a loss-of-function mutation of ALAS2 gene causes X-linked sideroblastic anemia. Human ALAS2 protein consists of 587 amino acids and its carboxyl(C)-terminal region of 33 amino acids is conserved in higher eukaryotes, but is not present in prokaryotic ALAS. We explored the role of this C-terminal region in the pathogenesis of X-linked sideroblastic anemia. *In vitro* enzymatic activity was measured using bacterially expressed recombinant proteins. *In vivo* catalytic activity was evaluated by comparing the accumulation of porphyrins in eukaryotic cells stably expressing each mutant ALAS2 tagged with FLAG, and the half-life of each FLAG-tagged ALAS2 protein was determined by Western blot analysis. Two novel mutations (Val562Ala and Met567Ile) were identified in patients with X-linked sideroblastic anemia. Val562Ala showed the higher catalytic activity *in vitro*, but a shorter half-life *in vivo* compared to those of wild-type ALAS2 (WT). In contrast, the *in vitro* activity of Met567Ile mutant was about 25% of WT, while its half-life was longer than that of WT. However, *in vivo* catalytic activity of each mutant was lower than that of WT. In addition, the deletion of 33 amino acids at C-terminal end resulted in higher catalytic activity both *in vitro* and *in vivo* with the longer half-life compared to WT. In conclusion, the C-terminal region of ALAS2 protein may function as an intrinsic modifier that suppresses catalytic activity and increases the degradation of its protein, each function of which is enhanced by the Met567Ile mutation and the Val562Ala mutation, respectively. © 2012 ISEH - Society for Hematology and Stem Cells. Published by Elsevier Inc.

5-Aminolevulinate synthase (ALAS) is the first and rate-limiting enzyme in the heme biosynthetic pathway [1]. There are two isozymes of ALAS in higher eukaryotes, ALAS1 and ALAS2. ALAS1 (alternatively, ALAS-N) is expressed ubiquitously in all types of nucleated cells, and expression of ALAS2 (or ALAS-E) is restricted in erythroid cells and essential for hemoglobin production during erythroid differentiation [1]. Both ALAS1 and ALAS2, which are encoded by the distinct nuclear genes, function in mitochondria [2,3], and the amino-terminal

region of each isozyme acts as a targeting signal for mitochondrial translocation [4–6]. The remaining regions of ALAS protein consist of a core catalytic region and a carboxyl terminal (C-terminal) region, and the catalytic region is conserved among several species [7]. In addition, the C-terminal region of 33 amino acids (positions 555–587), which is encoded by the 11th exon of the human ALAS2 gene, is well conserved in higher eukaryotes, but the equivalent region is not present in bacterial ALAS [7]. It is conceivable that the C-terminal region of mammalian ALAS2 protein might have an important regulatory role in heme biosynthesis.

The human ALAS2 gene that is mapped on X chromosome consists of 11 exons [8], and a genetic mutation of the ALAS2 gene causes X-linked sideroblastic anemia (XLSA) [9,10] or X-linked dominant protoporphyria [11]. To the best of our knowledge, > 50 different mutations of

Offprint requests to: Kazumichi Furuyama, M.D., Ph.D., Department of Molecular Biology and Applied Physiology, Tohoku University School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan; E-mail: furuyama@med.tohoku.ac.jp

Supplementary data related to this article can be found online at doi: 10.1016/j.exphem.2012.01.013.

the ALAS2 gene have been identified in about 100 pedigrees with XLSA [12–14]. Reported mutations in patients with XLSA are distributed from the 5th exon to the 11th exon of the human ALAS2 gene, but only four mutations were detected in 11th exon [14–17]. In the case of X-linked dominant protoporphyria, two different frame-shift mutations have been identified in the 11th exon of the ALAS2 gene in two independent probands [11]. These frame-shift mutations cause deletions of 19 and 21 amino acids at the C-terminal end of ALAS2, both of which are accompanied by replacement of the C-terminal end with one unrelated amino acid and an unrelated peptide of 23 amino acids, respectively. Using recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*, those authors provided evidence that deletion of 19 or 21 amino acids at C-terminal end increased the catalytic activity of ALAS2, suggesting that the C-terminal region can inhibit the enzymatic activity of ALAS2 [11]. Recently, it was also reported that the substitution (Tyr586Phe) at the penultimate amino acid of the C-terminal of ALAS2 increased its catalytic activity in vitro, which might be related to the severe phenotype of congenital erythropoietic porphyria [18]. Interestingly, such gain-of-function mutations of the ALAS2 gene were solely identified within the C-terminal region of ALAS2 protein. However, it is still unclear how the C-terminal region of ALAS2 is involved in the regulation of ALAS2 function in vivo.

Here, we report novel missense mutations in the 11th exon of the ALAS2 gene in independent probands with XLSA. Based on in vitro and in vivo functional studies of these mutants, as well as a C-terminal deletion mutant, we provide evidence that the C-terminal region of human ALAS2 protein reduces its catalytic activity and protein stability in mitochondria.

Case reports

Case 1

Japanese male proband presented with microcytic hypochromic anemia (hemoglobin: 8.1 g/dL; mean corpuscular volume: 57.7 fL) at age 14 years. Serum ferritin, serum iron, and total iron binding capacity were 222.7 ng/mL, 242 µg/dL, and 279 µg/dL, respectively. Proband's mother and maternal uncles had mild anemia, but they did not receive any medication for anemia.

Bone marrow examination of the patient showed erythroid hyperplasia (myeroid to erythroid ratio [M:E] = 0.45), with ringed sideroblasts comprising >10% of nucleated cells. Pyridoxine treatment (80 mg/d) was started, and the hemoglobin concentration gradually increased from 7.3 g/dL to 12.0 g/dL after 14 months.

Case 2

Japanese male proband was admitted to the hospital at age 36 years because of microcytic hypochromic anemia

(hemoglobin: 6.5 g/dL; mean corpuscular volume: 64.4 fL) with systemic iron overload (ferritin: 2581.4 ng/mL). Anemia was pointed out before he was school age, but he did not receive any medication for anemia. Prussian blue staining of bone marrow cells revealed the presence of ring sideroblasts in the proband, and the diagnosis of sideroblastic anemia was established. Pyridoxine treatment (60 mg/d) was started when hemoglobin was 5.4 g/dL, then anemia was improved after 1 month to 9.9 g/dL hemoglobin. Although pyridoxine treatment was continued for an additional 4 months, the hemoglobin level did not exceed 10 g/dL.

Materials and methods

Reagents

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), Nacalai Tesque (Kyoto, Japan), or Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). Restriction enzymes and modifying enzymes used for construction of each plasmid were purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), unless otherwise noted. ExTaq DNA polymerase and PrimeStar Max DNA polymerase were purchased from Takara Bio Inc. (Shiga, Japan) and were used for polymerase chain reaction (PCR) and site-directed mutagenesis, respectively. Protein concentration was measured with Bio-Rad Protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) or Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin as a standard. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis were performed as described previously [19]. Prestained XL-ladder broad range (APRO Science, Tokushima, Japan) was loaded as a size marker for SDS-PAGE and Western blot analysis.

Identification of ALAS2 mutations

Genetic analyses performed in this project had been approved by the ethical committee of Tohoku University School of Medicine. Blood samples were drawn from the probands and the family members after informed consent. Genomic DNA was then extracted from them using QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). All exons including exon-intron boundaries, the proximal promoter region, and the erythroid enhancer in intron 8 of ALAS2 gene were amplified using ExTaq DNA polymerase. Sequences of primers and the condition for PCR were reported previously [20], except for an antisense primer for exon 5 and a primer pair for the erythroid-specific enhancer region in intron 8. The sequence of antisense primer for exon 5 used is (5'-TCATCTCCTCTGGCCACTGC-3'). For the amplification of the erythroid-specific enhancer in intron 8, the following primers were used: sense, 5'-GGTACCACTCGCATCCCCTGCA GAG-3' and antisense, 5'-GGTACCACACAGCCAAAGGCCTT GCC-3'. Each amplified DNA fragment was electrophoresed on 1% agarose gel in TAE buffer and stained with ethidium bromide. DNA fragment was excised from the gel for purification using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH). Purified DNA fragment was directly sequenced using BigDye terminator v1.1 cycle sequencing kit and ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The same primers were used for PCR and direct sequencing analysis. Sequencing results were

analyzed using Lasergene software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA), and the mutation of ALAS2 gene was confirmed by repeated amplification and direct sequencing.

Expression and purification of recombinant ALAS2 proteins

Complementary DNA for human mature ALAS2 that lacks the amino-terminal region was amplified with PrimeStar Max DNA polymerase (Takara Bio Inc.) using the following primers (sense, 5'-GGTGGTCATATGATCCACCTTAAGCAACAAAGG-3'; anti-sense, 5'-GGCATAGGTGGTGACATACTG-3'), each of which was phosphorylated at its 5' end beforehand. Amplified complementary DNA (cDNA) was digested with NdeI restriction enzyme, and was cloned between NdeI site and blunt ended SapI site of pTXB1 expression vector (New England Biolabs). Resulting plasmid, named as pTXB1-AEm, expresses human mature ALAS2 in *E. coli* as a fusion protein with Intein tag and Chitin binding domain at its C-terminal end. Using pTXB1-AEm as a template, each mutation or deletion was introduced using PrimeStar Max site-directed mutagenesis kit (Takara Inc.). The sequences of primers used for mutagenesis are available upon request. After the amplification of cDNA or mutagenesis, the sequence of mature ALAS2 cDNA and the junction sequence for fusion protein was confirmed by DNA sequencing before use. These expression vectors were used for transformation of the *E. coli* strain, BL21(DE3). Expression and purification of recombinant proteins were performed according to manufacturer's instruction for Impact System (New England Biolabs), with minor modifications. Briefly, expression of recombinant proteins was induced in *E. coli* with 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside at 25°C for overnight. The isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside-treated cells were collected by centrifugation and resuspended with lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.5], 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 μ g/mL antipain, 1 μ g/mL pepstatin, and 1 μ g/mL leupeptin). After sonication and centrifugation, cleared cell lysates were incubated with Chitin beads for 1 hour at 4°C, and then washed with wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.5], 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Triton X-100). To obtain a tag-free recombinant mature ALAS2 protein, on-column cleavage was induced with 50 mM dithiothreitol in wash buffer at room temperature for 16 hours. After the elution from the column, each recombinant protein was dialyzed against wash buffer before use. Purity of each recombinant protein was examined using SDS-PAGE, followed by staining with Quick-CBB PLUS (Wako Pure Chemical). Enzymatic activity of each recombinant protein was measured according to the protocol described previously [21]. Student's *t* test was performed for statistical analysis.

Expression of wild-type or mutant ALAS2 protein in eukaryotic cells

The plasmid "pGEM-AET," which carries cDNA for full-length ALAS2 tagged with FLAG at its C-terminal, was described previously [22]. Site-directed mutagenesis was performed by PrimeStar Max mutagenesis kit (Takara Inc.) using pGEM-AET as a template to obtain cDNA encoding each FLAG-tagged mutant. In addition, cDNA encoding FLAG-tagged luciferase protein was constructed by replacing ALAS2 cDNA in pGEM-AET with amplified luciferase cDNA derived from pGL3 basic (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

For establishing the stable transformants in which expression of FLAG-tagged ALAS2 protein or FLAG-tagged luciferase protein is inducible with tetracycline, cDNA for each protein was cloned into pcDNA5/FRT/TO vector (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). The resulting cDNA construct was then co-introduced with pOG44 vector into Flp-In T-Rex 293 cells (Invitrogen), derived from human embryonic kidney cells (HEK293). After transfection, cells were incubated with 100 μ g/mL Hygromycin B (Wako Pure Chemicals) and 15 μ g/mL Blasticidin (Invitrogen). At least three independent clones, which were resistant to Hygromycin B and sensitive to Zeocin (Invitrogen), were selected and expanded for subsequent experiments. This phenotype of a given clone confirmed the integration of each cDNA expression cassette into the expected site in the genome of Flp-In T-Rex 293 cell line.

For the determination of protein stability, expression of wild-type ALAS2 or mutant ALAS2 was induced by the addition of tetracycline into the culture medium (final concentration of 1 μ g/mL) for 48 or 72 hours, and then the culture medium was replaced with fresh complete medium containing tetracycline with or without 10 μ M cycloheximide. At 0, 3, 6, 9, and 12 hours after incubation, cells were harvested and lysed in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.2], 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 1 mM sodium fluoride, 0.4 mM Na₃VO₄, 10 mM N-ethylmaleimide, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 2 μ g/mL leupeptin, and 2 μ g/mL aprotinin). Cell lysates were centrifuged at 13,200g for 10 minutes at 4°C, and the supernatants were used for SDS-PAGE. Expression of FLAG-tagged ALAS2 protein was detected by Western blot analysis with anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) as a first antibody. For normalization of loaded samples, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was detected with anti-GAPDH monoclonal antibody (MAB374; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) as a first antibody. For a second antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (NA931V1 GE Healthcare, UK Limited, Buckinghamshire, UK) was used. Intensity of each band was measured using ImageJ software (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The intensity of each band for FLAG-tagged ALAS2 was normalized with that of GAPDH, and the normalized intensity of FLAG-tagged ALAS2 at each time point was compared with that of the sample harvested at 0 hour. We repeated this series of experiments three times for each clone, and an average of these results was used for determination of the half-life of each protein.

The catalytic activity of each mutant protein was also evaluated by comparing the accumulation of porphyrins in Flp-In T-Rex 293 cells that expressed wild-type or mutant ALAS2 cDNA in an inducible manner. For this assay, cells of low-passage numbers (between passage 5 and passage 15) were used for obtaining reproducible results. To induce expression of wild-type ALAS2 or mutant ALAS2 protein in isolated cell lines, cells were treated for 60 hours with tetracycline at a suitable concentration (12.5–50 ng/mL), depending on cell lines. Then, cells were washed with phosphate-buffered saline twice and collected in the sample tube. Flp-In T-Rex 293 cells, which express FLAG-tagged luciferase protein in an inducible manner, were also treated with tetracycline as a negative control. Cells were separately collected for Western blot analysis and RNA preparation. Real-time PCR analysis was performed as described previously [23]. Remaining cells were collected by centrifugation and then packed cells were exposed to ultraviolet light for detection of porphyrins.

Table 1. Summarized features of recombinant ALAS2 proteins

Recombinant protein	In vitro enzymatic activity (nmol ALA/mg protein/h)			Half-life in HEK293 cells (h)	Porphyrin accumulation in HEK293 cells
	Without PLP (% of wild-type)	With 200 μ M PLP (% of wild-type)	Ratio with/without PLP		
Wild-type	14,824 \pm 754 (100%)	27,627 \pm 713 (100%)	1.86	7.8	+++
Val562Ala	22,324 \pm 1,555 (150.6%)	32,300 \pm 709 (116.9%)	1.44	5.3	++
Met567Ile	5,653 \pm 897 (38.1%)	6,975 \pm 299 (25.2%)	1.23	>12	\pm
Ser568Gly*	(19.5%)*	(31.6%)*	2.51*	>12	\pm
delC33	15,769 \pm 382 (106.4%)	53,066 \pm 1,843 (192.1%)	3.37	>12	++++

*Data with GST-fused Ser568Gly protein taken from reference [15].

Results

Identification of novel mutations of ALAS2 gene

Analyzing the genomic DNA extracted from the proband of case 1, we identified the c.T1685C mutation in the 11th exon of ALAS2 gene (Supplementary Figure E1A, upper panel; online only, available at www.exphem.org). This transition results in an amino acid substitution at the 562nd residue of ALAS2 protein from valine to alanine (Val562Ala). The same mutation was identified in one allele of the proband's mother (Supplementary Figure E1A, middle panel; online only, available at www.exphem.org), and the proband's father does not carry this mutation (Supplementary Figure E1A, lower panel; online only, available at www.exphem.org), indicating the X-linked inheritance of this mutation. For the proband of case 2, the c.G1701C transversion was identified in exon 11 of ALAS2 gene (Supplementary Figure E1B; online only, available at www.exphem.org), the mutation of which results in an amino acid substitution at the 567th residue from methionine to isoleucine (Met567Ile).

To exclude the possibility that these mutations represent single nucleotide polymorphisms, we examined the 11th exon of ALAS2 gene in 96 Japanese healthy volunteers (57 male and 39 female subjects, with the total allele number of 135) using PCR followed by direct sequencing. As a result, no base change was found in the 11th exon of ALAS2 gene in these subjects, suggesting that the mutation found in each proband might not represent single nucleotide polymorphism. It is therefore conceivable that either the c.T1685C or c.G1701C mutation might be responsible for XLSA.

Enzymatic activities of mutant ALAS2 proteins in vitro

Wild-type ALAS2 or each mutant ALAS2 protein was expressed in *E. coli* and purified as a tag-free protein. The combination of pTXB1 expression vector and IMPACT system allowed us to obtain a tag-free/C-terminal intact recombinant protein. Indeed, modified Coomassie Brilliant Blue staining of the gel after SDS-PAGE revealed that the purity of each prepared protein was >95% (data not shown). These recombinant proteins were suitable for

determination of the catalytic activity of each mutant protein that carries the amino acid substitution near the C-terminal end.

We measured the catalytic activity of each recombinant ALAS2 protein with or without pyridoxal 5-phosphate (PLP). Data are summarized in Table 1. Unexpectedly, the catalytic activity of Val562Ala protein was significantly higher than that of wild-type protein ($p = 0.0046$), when the activity was measured without PLP in the assay mixture. In addition, in the presence of 200 μ M PLP, Val562Ala mutant showed significantly higher activity than that of wild-type ALAS2 ($p = 0.0087$). In contrast, the catalytic activity of Met567Ile protein was lower than that of wild-type protein, irrespective of without PLP ($p = 0.0011$) or with PLP ($p = 0.0003$). It is also noteworthy that the PLP-associated increases in enzymatic activities were 86%, 44%, and 23% for wild-type, Val562Ala, and Met567Ile proteins, respectively, suggesting that Val562Ala and Met567Ile mutations decreased the responsiveness to PLP (Table 1). The lowest PLP responsiveness of Met567Ile mutant protein might account for the clinical course of the proband in case 2; that is, the anemia of this proband was improved only marginally, despite pyridoxine treatment.

Because we previously reported on the Ser568Gly mutation [15], which is also located in the C-terminal region of human ALAS2 protein, the reported data for the Ser568Gly mutation were included as a reference in Table 1. In vitro enzymatic activity of glutathione *S*-transferase (GST)-fused Ser568Gly was significantly lower than that of the GST-fused wild-type ALAS2 with or without PLP [15]. Therefore, the functional consequence of amino acid substitution at Ser568 was similar to that of Met567Ile (Table 1). In addition, the degree of PLP-mediated increase in Ser568Gly activity, indicated as "ratio with/without PLP" in Table 1, was larger than that with wild-type protein, although the possibility remains that the GST tag might have influenced the PLP responsiveness of a recombinant ALAS2 protein. We, therefore, included Ser568Gly mutant in subsequent analyses.

The higher catalytic activity of Val562Ala protein prompted us to examine the function of the C-terminal region of ALAS2 protein. We measured the enzymatic

activity of the deletion mutant that lacks the 33 amino acids at the C-terminal end (positions 555–587) of human ALAS2 (delC33 mutant), the region of which was conserved among mammalian ALAS2 proteins, including Val562. As shown in Table 1, the enzymatic activity of the delC33 mutant was higher by two times in the presence of PLP than that of wild-type ALAS2 ($p = 0.002$), whereas they showed similar enzymatic activity in the absence of PLP. These results suggest that the 33 amino acids at the C-terminal end of human ALAS2 protein might repress the enzymatic activity, probably by interfering with the access of PLP cofactor to the catalytic site.

Stability of mutant ALAS2 proteins in vivo

We were interested in studying how the Val562Ala mutation is associated with XLSA, despite higher enzymatic activity. We examined the stability of the Val562Ala mutant protein and other C-terminal mutant proteins in vivo. When human ALAS2 protein is expressed as a FLAG-tagged protein in eukaryotic cells, the precursor and mature proteins should be detected as 65.7-kDa and 60.5-kDa proteins, respectively. As shown in Figure 1B (upper panel) and Figure 2 (middle panel), FLAG-tagged wild-type ALAS2 and mutant ALAS2 proteins, except for delC33 mutant, were detected as bands at about 60 kDa, an expected size of the mature protein. These results suggest that the leader peptide at the N-terminal end was cleaved after translocation of the precursor protein into mitochondria [4]. In fact, the precursor protein was detected at an expected size, when HeLa cells were transfected with FLAG-ALAS2 expression vector, and then incubated with hemin (Supplementary Figure E2; online only, available at www.exphem.org), which is known to inhibit mitochondrial translocation of ALAS precursor protein into mitochondria [4]. Based on our experiments (Fig. 1A–C), the half-lives of wild-type and Val562Ala mature proteins in mitochondria were calculated as 7.8 hours and 5.3 hours, respectively. The half-life of the Val562Ala mutant protein (Fig. 1C) is shorter than that of wild-type ALAS2 protein (Fig. 1B). In contrast, the half-life of Met567Ile (Fig. 1D) or Ser568Gly (Fig. 1E) mutant was not measurable by our experiments because the 50% reduction of the protein level was not observed within 12 hours for these mutants. Thus, the half-lives of Met567Ile and Ser568Gly mutants were longer than 12 hours. Importantly, the amino acid substitutions in the C-terminal region influenced the stability of the mature ALAS2 protein in mitochondria in different manners. Namely, Val562Ala mutation results in destabilization of the mature protein, and either Met567Ile or Ser568Gly mutation stabilizes the mature protein in mitochondria.

In addition, we measured the half-life of delC33 mutant in HEK293-derived cells (Fig. 1F), showing that the 50% reduction was not observed within 12 hours, which was similar to Met567Ile and Ser568Gly mutants. These results

suggested that the 33 amino acids at C-terminal region of ALAS2 protein suppressed the catalytic activity in vitro, as well as protein stability in mitochondria. Our data also indicate that Val562Ala mutation might enhance the destabilization function of the C-terminal region, whereas Met567Ile and Ser568Gly mutations might enhance the suppressive function for enzymatic activity.

Enzymatic activity of each ALAS2 mutant protein in vivo

Val562Ala mutant showed higher enzymatic activity in vitro (Table 1), but it was less stable in mitochondria (Fig. 1A) compared with wild-type ALAS2. On the other hand, Met567Ile and Ser568Gly mutants showed lower enzymatic activities in vitro (Table 1), with prolonged half-lives in mitochondria (Fig. 1A). We, therefore, determined the catalytic activity of each mutant protein in vivo. For this purpose, we compared the accumulation of porphyrins in HEK293-derived cells that expressed wild-type protein or a mutant protein, as we described previously [20]; that is, the accumulation of porphyrins was evaluated by comparing the intensity of the fluorescence under ultraviolet light (Fig. 2, upper panel). The accumulation of porphyrins was detected in cells expressing wild-type ALAS2, but not in cells expressing tagged luciferase. These results indicate that FLAG-tagged ALAS2 is catalytically active in mitochondria. In contrast, the accumulation of porphyrins was decreased in cells expressing Val562Ala, Met567Ile, or Ser568Gly protein, compared to cells expressing wild-type ALAS2. Among these three missense mutations, Val562Ala mutant showed higher catalytic activity than did Met567Ile or Ser568Gly mutant (Fig. 2, upper panel). In addition, the highest porphyrin accumulation was observed in cells expressing delC33. Of note, the expression level of Val562Ala mutant protein was much lower than that of any other mutant or wild-type ALAS2, as judged by Western blot analysis (Fig. 2, middle panel), although there was no significant difference in relative expression level of each mutant ALAS2 messenger RNA (Fig. 2, lower panel). These results suggest that Val562Ala mutant protein is catalytically hyperactive but unstable in mitochondria, which is consistent in part with the higher enzymatic activity detected in vitro (Table 1) and with the short-half life in vivo (Fig. 1A).

In conclusion, Val562Ala, Met567Ile, or Ser568Gly ALAS2 has lower enzymatic activity in mitochondria compared with the activity of wild-type ALAS2. Therefore, these three mutations are categorized as a loss-of-function mutation and are responsible for sideroblastic anemia.

Discussion

It is well known that a loss-of-function mutation of the ALAS2 gene causes XLSA. In addition to the ALAS2 gene, other genes (e.g., SLC25A38 [24], GLRX5 [25], ABCB7 [26], PUS1 [27], SLC19A2 [28], and mitochondrial DNA [29]) were reported to be responsible for

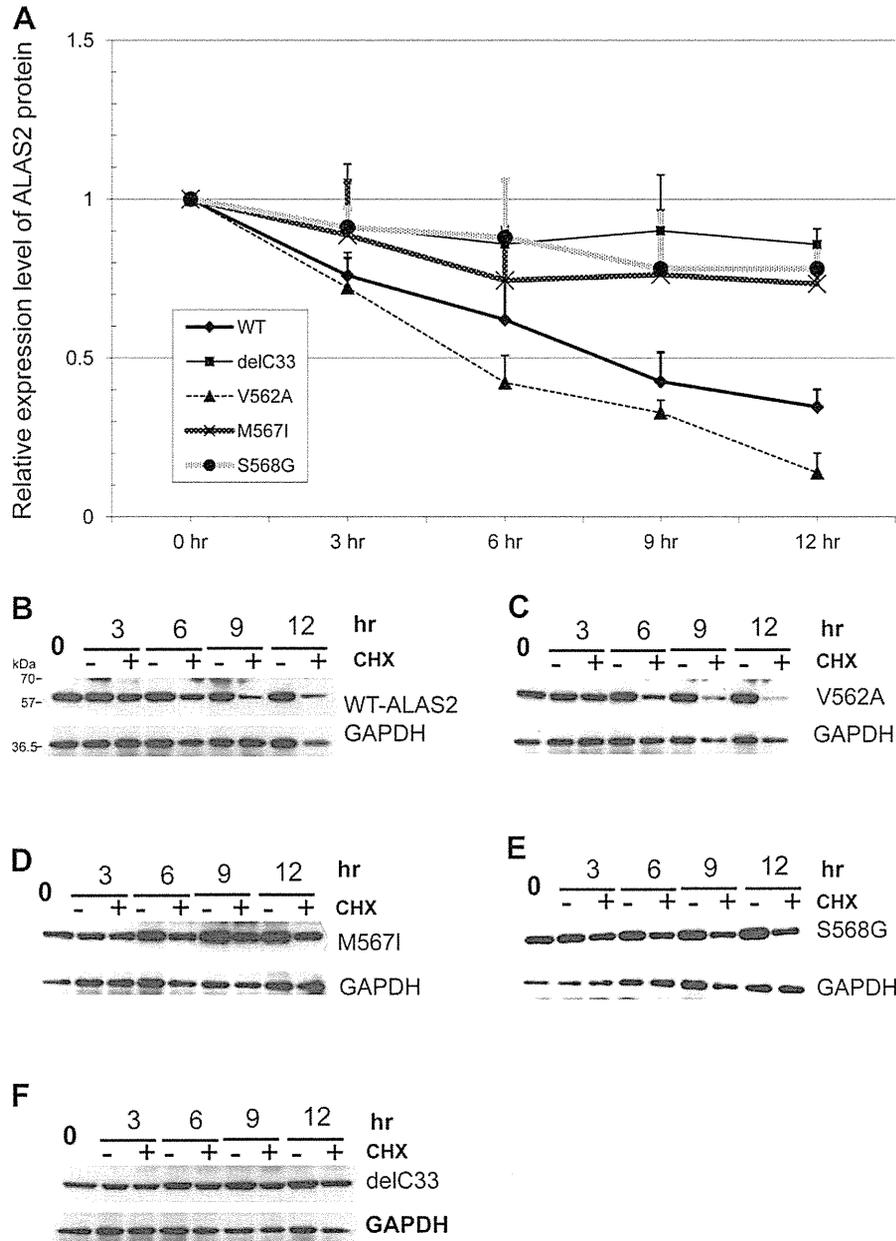


Figure 1. Effect of cycloheximide on FLAG-tagged ALAS2 protein level in eukaryotic cells. Expression of each FLAG-tagged protein was induced with tetracycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in HEK293-derived cells for 48 hours, and then cells were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide (CHX) for the indicated hours. Cells were collected and lysed in RIPA buffer, and FLAG-tagged proteins were detected by Western blot analysis (B–F). The intensity of the FLAG-tagged protein was normalized with the intensity of GAPDH for each time point. In (A), the relative intensity representing FLAG-tagged protein at 0 hours was considered to be 100%. The half-life of each protein was calculated on the basis of 50% reduction of each protein expression from the relative expression curves obtained from the samples with CHX. Average value of three independent experiments was used for preparing (A). Representative data of each ALAS2 protein are shown (B–F): (B) wild-type (WT) ALAS2; (C) Val562Ala; (D) Met567Ile; (E) Ser568Gly; and (F) delC33.

hereditary or congenital sideroblastic anemia. Among these candidate genes, mutations in ALAS2 gene are most frequently identified in patients with sideroblastic anemia [30], but characterization of each mutant ALAS2 protein was not fully performed. To the best of our knowledge, 24 of 56 mutations of the ALAS2 gene were characterized in vitro using recombinant proteins with or without a peptide-tag [9,10,14,15,20,21,31–36]. In the 11th exon

of the ALAS2 gene, Ser568Gly [15], Arg559His [17], Arg560His [16], and Arg572His [14] mutations have been reported; however, only Ser568Gly and Arg572His mutants were characterized using recombinant proteins. Concerning the Ser568Gly mutation [15], we confirmed that Ser568Gly mutation resulted in decreased enzymatic activity in vitro (about 30% of wild-type with PLP in the assay mixture), as shown in Table 1. In contrast, Ducamp et al. [14] were

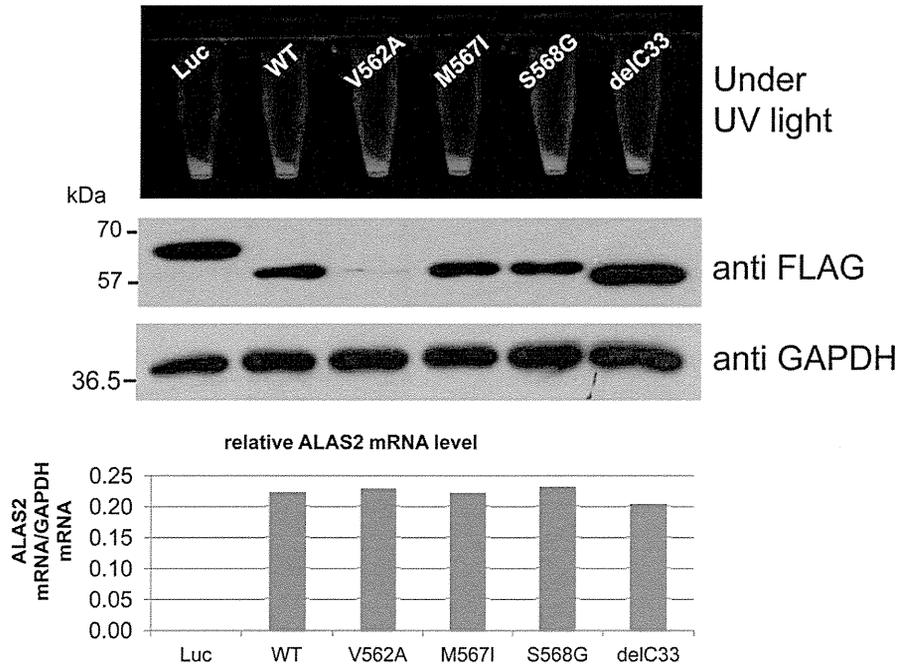


Figure 2. Evaluation of porphyrin production in cells expressing each ALAS2 mutant protein. Each FLAG-tagged ALAS2 protein or FLAG-tagged luciferase protein as a control was expressed in Fip-In T-REx 293 cells. Accumulation of porphyrins in each cell line was visualized by ultraviolet light exposure (upper panel). Expression levels of each FLAG-tagged protein and GAPDH (loading control) were detected by Western blot analysis (middle panels). Expression level of ALAS2 messenger RNA (mRNA) was measured by real-time PCR, and it was normalized with the expression level of GAPDH mRNA. Note that the data confirm the similar mRNA level of each ALAS2 protein (lower panel).

unable to determine the defect of the Arg572His mutant using an *in vitro* system because the mutant protein showed the enzymatic activity similar to that of wild-type ALAS2.

Measurement of enzymatic activity of every recombinant protein *in vitro* is one of the most useful techniques to characterize a mutant ALAS2 protein. Met567Ile mutant showed lower enzymatic activity than did wild-type protein (see Fig. 2), suggesting that this mutation causes sideroblastic anemia. In contrast, we were unable to uncover the pathogenesis of Val562Ala mutant protein using this *in vitro* assay system, indicating a limitation of the *in vitro* assay system with a bacterially expressed recombinant protein. In fact, using the *in vivo* system (Fig. 2), we have successfully demonstrated that the Val562Ala mutant protein showed lower porphyrin accumulation due to enzyme instability compared to wild-type ALAS2. In addition, the half-life of mature Val562Ala protein (5.3 hours) was shorter than that of wild-type ALAS2 (7.8 hours) (Fig. 1), suggesting that Val562Ala mutation altered the protein stability in mitochondria. These *in vivo* methods seem to be useful to characterize a mutant protein that does not show decreased enzyme activity in the *in vitro* assay system.

It is of particular interest that the Val562Ala and Met567Ile mutants exerted opposite effects on the enzymatic activity *in vitro* (Table 1) and on the protein stability in mitochondria (Fig. 1). In this connection, the deletion of 33 amino acids at C-terminal end of ALAS2 protein, the region of which contains Val562 and Met567 residues,

resulted in higher enzymatic activity *in vitro* and *in vivo* (Table 1) and stable protein with a longer half-life in mitochondria (Fig. 1). The C-terminal region has a suppressive function on enzymatic activity, as well as protein stability in mitochondria. Because this region is conserved in eukaryotic ALAS2 but is absent in prokaryotic ALAS, the suppressor domain might be involved in the functional regulation of ALAS2 in mitochondria. In fact, in the C-terminal region, two frame-shift mutations of the ALAS2 gene were reported to cause X-linked dominant protoporphyria [11], and six (including present two cases) missense mutations were identified in patients with XLSA. In addition, it was recently reported that the Tyr586Phe mutation of ALAS2 protein increased the enzymatic activity, which can contribute to the severe clinical phenotype of the patient with congenital erythropoietic porphyria [18]. These results suggest that the C-terminal region of ALAS2 functions as an intrinsic suppressor for protoporphyria production in erythroid cells.

It is still unclear how this C-terminal region suppresses the enzymatic activity of ALAS2 protein in mitochondria. It has been reported that certain amino acids are essential for catalytic activity of mouse Alas2 [18,37–45]. However, only limited information is available concerning the role of the C-terminal region in the catalytic activity of ALAS2. To-Figueras et al. [18] performed the stoichiometric analysis of the mature ALAS2 protein to characterize Tyr586-Phe mutant, which was reported as a gain-of-function

mutation at the penultimate C-terminal amino acid of ALAS2 protein. Steady-state kinetic analyses revealed that Tyr586Phe mutant showed higher catalytic activity with greater catalytic efficiency for glycine and succinyl-CoA than those of wild-type ALAS2. In addition, these authors provided evidence that the Tyr586Phe mutant enzyme was able to form and release ALA more rapidly than wild-type enzyme. Similar mechanisms might underlie the increased activity of every C-terminal deletion mutant, including the mutant ALAS2 protein with the deletion of 19 or 21 amino acids [11] and the delC33 mutant. In addition, the delC33 mutant expressed enzymatic activity similar to wild-type ALAS2 without PLP in assay mixture, but its enzymatic activity was increased about twofold compared to the wild-type with PLP (Table 1). These results suggest that this region might be involved in efficient use of PLP or accessibility of PLP to the catalytic site.

Crystal structure analysis of homodimeric ALAS from *Rhodobacter capsulatus* (ALAS_{RC}) revealed that ALAS_{RC} showed open or closed structure, which was related to the conformational change of the active site loop [17]. This active site loop consists of evolutionally conserved structure at the C-terminal region of ALAS_{RC}, and seems to cover the catalytic site, which is located at the homodimer interface of ALAS protein. It should be noted that ALAS_{RC} does not contain the C-terminal region equivalent to that of mammalian ALAS2 [17]. The open conformation was observed only in the substrate-free ALAS_{RC} protein, and the closed conformation was observed in ALAS_{RC} protein that bound glycine and succinyl-CoA. To clarify the functional consequence of the conformational change of this active site loop, Lendrihas et al. introduced a mutation into nonconserved amino acid at this active site loop in mouse Alas2 protein and obtained several hyperactive variants [46]. Pre-steady-state kinetic analysis revealed that release of ALA from the catalytic site of the enzyme, which is coincident with opening of the active site loop [45], was accelerated in these hyperactive variants. Because the release of ALA from catalytic site is the rate-limiting step of enzymatic reaction of ALAS [47], these results suggest that the dynamic conformational change of this active site loop might control the rate of the reaction. Importantly, the accelerated release of ALA from the enzyme was also proposed in Tyr586Phe mutant [18]. It is therefore possible that the C-terminal domain of human ALAS2 protein is involved in the regulation of the conformational change of the active site loop.

In the present study, we determined the stability of ALAS2 protein *in vivo*, although the protein was tagged with a small peptide and expressed in HEK293-derived cells. Based on our assay condition, the half-life of human ALAS2 mature protein is 7.8 hours; however, it is not clear whether this result is comparable with that of the native ALAS2 protein in erythroid mitochondria, which has never been reported. On the other hand, this assay revealed that

the stability of the Val562Ala mutant protein was decreased in mitochondria (Fig. 1), although the *in vitro* assay using purified recombinant protein failed to detect the unstable property of this mutant. In addition, our *in vivo* assay system clearly showed that the C-terminal region of 33 amino acids of human ALAS2 protein suppressed the enzymatic activity and decreased the protein stability. It is also interesting that the Val562Ala mutation and the Met567Ile mutation have opposite effects on the two functions of the C-terminal region. These results suggest that independent mechanisms might be involved in the reduction of enzymatic activity and destabilization in mitochondria. Taken together, the C-terminal region of ALAS2 protein can decrease catalytic activity by altering the open or closed structure of the catalytic site, while the post-translational modification of the C-terminal region, which is induced by a certain intracellular condition (e.g., increased or decreased oxidative stress) or by the association with other molecules, can enhance the disappearance of ALAS2 protein from mitochondria. The crystal structure of ALAS from ALAS_{RC} provided critical information about the mechanisms for catalytic reaction of ALAS [45,46]. However, determination of the crystal structure of mammalian ALAS2 should await additional investigation on the function of the C-terminal region of ALAS2 protein.

Funding disclosure

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (to K. Furuyama) and Health and Labour Sciences Research Grants (to H. Harigae).

Acknowledgment

We are also grateful to Biomedical Research Core of Tohoku University Graduate School of Medicine for allowing us to use various facilities.

Conflict of interest disclosure

No financial interest/relationships with financial interest relating to the topic of this article have been declared.

References

1. Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, Desnick RJ. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. p. 2991–3062.
2. Hayashi N, Yoda B, Kikuchi G. Difference in molecular sizes of delta-aminolevulinatase synthetases in the soluble and mitochondrial fractions of rat liver. *J Biochem*. 1970;67:859–861.
3. Bishop DF, Henderson AS, Astrin KH. Human delta-aminolevulinatase synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics*. 1990;7: 207–214.