

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断基準・重症度分類・診断ガイドラインの確立に関する研究

遺伝性鉄芽球性貧血の新たな原因遺伝子の探索

研究分担者 古山和道（岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授）

研究要旨： 遺伝性鉄芽球性貧血の新たな原因遺伝子を同定することを目的として、原因遺伝子として最も報告数が多い ALAS2 に注目し、ALAS2 タンパク質と結合してその機能を調節するタンパク質の同定を試みた。その結果、いくつかのタンパク質が ALAS2 タンパク質と結合することが明らかとなった。今後、それらのタンパク質が ALAS2 タンパク質の機能にどのように関わるのか、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血患者の原因遺伝子としてさまざまな遺伝子が報告されているが、いまだに原因遺伝子が明らかではない遺伝性鉄芽球性貧血患者は少なくない。一方で、ALAS2遺伝子を始めとして赤芽球のヘム生合成系調節に関わるタンパク質をコードする遺伝子が複数報告されていることから、ALAS2遺伝子の機能を調節する分子が遺伝性鉄芽球性貧血の発症原因となりうることを想定し、そのようなタンパク質を同定する試みを行った。

B. 研究方法

ドキシサイクリン（Dox）により特定の外来遺伝子の発現を調節できるFli-In T-Rex293細胞（FT293細胞）でFlag-tagを付与したALAS2タンパク質（ALAS2F）を強制発現したのちに非変性条件下で抗FLAG抗体を用いて免疫沈降法にてALAS2タンパク質を精製し、質量分析装置を用いてALAS2Fタンパク質と複合体を形成するタンパク質を同定した。

（倫理面への配慮）

本研究は培養細胞等を用いて実施しており、倫理面への配慮を必要とする研究は含まない。

C. 研究結果

さまざまなタンパク質がALAS2タンパク質に結合することが明らかとなった。そのうち、ALAS2タンパク質と同じくミトコンドリアのマトリクスに局在するタンパク質として興味深かったのは、

CLPXタンパク質で、既に我々がALAS1タンパク質（ALAS2のアイソザイム）のヘム依存性分解を制御する分子として報告したプロテアーゼClpXPの基質認識に関与する分子である。また、それ以外の興味深い分子として、HSPA9（Grp75）が同定された。HSPA9はミトコンドリアマトリクスに局在するシャペロンタンパク質で、HSP70に分類される。これらのタンパク質については質量分析装置による同定に加えて、Western blot法も用いてその複合体の形成を確認している。

D. 考察

ALAS1は細胞内のヘム量を一定に保つために、ヘムによるネガティブフィードバックを転写、翻訳、分解の各段階で受けることは報告されている。我々が報告したClpXPによるヘム依存性のALAS1タンパク質の分解もその一環であると考えている。しかしながら、ALAS2は赤芽球内でヘモグロビンに大量のヘムを供給するために機能しているので、ALAS1のようなネガティブフィードバックは受けられないと考えられていた。一方で、我々の検討結果ではALAS1とALAS2は同程度にCLPXと結合するようだが、ALAS2はALAS1に比べてFT293細胞内では明らかに安定的に存在していた。また、それは培養液中へのヘミンの添加に対しても明らかであった。その理由は現在のところ不明だが、シャペロンタンパク質であるHSPA9がALAS2と結合することと無関係ではないのではないかと推測している。すなわち、ALAS2タンパク質をClpXPによる

ヘム依存性分解からHSPA9が何らかの形で保護しているのではないかという仮説を立てて検証を続けている。HSPA9の機能喪失型変異は遺伝性鉄芽球性貧血の原因となることが既に報告されている。その発症メカニズムは、HSPA9の機能低下に伴いミトコンドリア内の鉄-硫黄クラスターの合成が減少し、その結果IRP1がALAS2 mRNAの5'UTRに存在するiron regulatory element (IRE) への結合を介してALAS2の翻訳を抑制するためであると報告されている。しかしながら、今回の我々の実験結果は、そのような作用に加えて、HSPA9がヘム存在下においてALAS2タンパク質を安定化する役割を持つ可能性を示唆するものと考えている。

E. 結論

質量分析装置を用いた解析により、ALAS2タンパク質のミトコンドリア内における分解と安定化に関与する可能性があるタンパク質を同定した。今後、これらの分子の役割を更に明らかにすることは、遺伝性鉄芽球性貧血の診断を進める上で重要な情報を提供しうるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 鈴木亘, 久保田美子, 金子桐子, 古山和道. LC-MSによるミトコンドリアマトリクスアプロテアーゼClpXPおよびLONP1の基質探索・同定. 第93回日本生化学大会 (2020年9月14-16日, WEB) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし