

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

ALAS2遺伝子と複合体を形成する分子の同定

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：令和2年度には、新たな遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子同定の一環としてALAS2タンパク質と複合体を形成する分子を質量分析装置を用いて同定した。令和3年度には同定された分子の1つであるHSPA9タンパク質のALAS2発現における役割についてさらなる検討を行った。

A. 研究目的

本邦で最も多い遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子は赤芽球型5-アミノレブリン酸合成酵素（ALAS2）遺伝子である。ALAS2遺伝子と複合体を形成するタンパク質は、複合体形成を介してALAS2タンパク質の機能制御を行う可能性があり、従ってそのようなタンパク質の機能異常は遺伝性鉄芽球性貧血の原因となる可能性があると考えた。昨年度は質量分析装置を用いてALAS2タンパク質と複合体を形成するタンパク質を同定することを試み、複数のミトコンドリアタンパク質を同定した。そのようにして同定したタンパク質の1つであるHSPA9タンパク質は、以前より鉄芽球性貧血の原因遺伝子として報告されていた。そのメカニズムとしては、HSPA9は鉄-硫黄クラスターの形成に必須であるため、HSPA9の欠失はアコニターゼのiron regulatory protein 1（IRP1）への転換を促し、その結果ALAS2 mRNAの5'非翻訳領域に存在するiron responsive element（IRE）へのIRP1の結合を介してALAS2遺伝子の発現を翻訳レベルで阻害するためとされていた。一方、令和2年度の我々の検討ではALAS2タンパク質とHSPA9タンパク質は直接複合体を形成する可能性が高いと予想されたため、令和3年度はALAS2タンパク質の機能発現におけるHSPA9の役割について検討を実施した。

B. 研究方法

Doxycycline（DOX）依存性にベクター由来のタンパク質の発現誘導ができる細胞株（FT293）を用いて、ALAS2タンパク質のC末端にFLAG-tagを付与した融合タンパク質（ALAS2F）をDOX誘導性に発現

する培養細胞株を樹立した。その細胞株にHSPA9の発現を抑制するsiRNAを導入し、あるいはHSPA9の特異的な活性阻害剤とされるMKT-077を用いて機能を抑制することにより、ALAS2Fの発現がどのように変化するかをanti-FLAG抗体を用いてWestern blot法により観察した。

（倫理面への配慮）

本研究に倫理面への配慮が必要な研究は含まれない。

C. 研究結果

siRNAを用いてFT293の内在性HSPA9の発現を抑制したところ、ALAS2Fタンパク質の発現も減少した。HSPA9は鉄-硫黄クラスターの形成に関わるため、HSPA9の発現抑制により鉄-硫黄クラスターの合成が低下し、その結果アコニターゼはIRP1に変換される。IRP1はALAS2 mRNAの5'非翻訳領域に存在するIREを介してALAS2 mRNAの翻訳を抑制することが知られている。このため、IREを欠失したALAS2F発現ベクターを作成して同様にsiRNAによりHSPA9の発現を抑制してその影響を調べたところ、IREの有無にかかわらず、HSPA9の発現抑制に伴いALAS2Fタンパク質の発現量は低下した。さらに、HSPA9の特異的阻害薬として知られるMKT-077を作用させてHSPA9の機能を抑制したところ、siRNAを用いた場合と同様にALAS2Fタンパク質の発現は抑制され、その効果はIREを欠失させたcDNAを用いた場合にも認められた。

D. 考察

HSPA9はミトコンドリアに局在するHsp70タンパ

ク質で、タンパク質のミトコンドリア移行やミトコンドリア内でのシャペロンとしての役割など、様々な機能を有することが知られている。以前よりHSPA9の遺伝的な変異が遺伝性鉄芽球性貧血の原因となりうることが報告されていたが、それはALAS2 mRNAの5'非翻訳領域に存在するIREを介して翻訳が抑制されるためであると報告されていた。しかしながら今回の我々の検討では、翻訳抑制作用に加えて、HSPA9はALAS2タンパク質と複合体を形成し、シャペロンタンパク質としてALAS2タンパク質の安定化に寄与している可能性が高いと思われた。ALAS2タンパク質のアイソザイムであるALAS1タンパク質は過剰なヘムの存在下では容易に分解されて細胞内のヘム濃度を一定に保つ役割を果たしているが、ALAS2タンパク質はヘモグロビン合成のためにヘム濃度が高い赤芽球の中でも安定して機能することが知られている。ヘム存在下におけるALAS2タンパク質の安定性はHSPA9との複合体の形成によるものであることを示唆するものと考えている。

E. 結論

HSPA9遺伝子の変異は鉄-硫黄クラスターの形成阻害を介してALAS2mRNAの翻訳を抑制することが鉄芽球性貧血発症の原因とされていたが、HSPA9の役割はそれにとどまらず、ALAS2タンパク質のシャペロンとしてALAS2タンパク質の機能発現において重要な役割を果たしている可能性が高いことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura K, Kitagawa Y, Aihara M, Ohki Y, Furuyama K, Hirokawa T. Heme-dependent recognition of 5-aminolevulinate synthase by the human mitochondrial molecular chaperone ClpX. **FEBS Lett.** 2021 Dec;595(24):3019-3029. doi: 10.1002/1873-3468.14214.

2. 学会発表

- 1) 鈴木亘, 久保田美子, 金子桐子, 古山和道. CLPX はタンパク質相互作用の調節を介して肝細胞におけるミトコンドリア β 酸化を制御する. **第 94 回日本生化学会大会** (2021 年 11 月 3 日-5 日, 横浜 (Web 開催)).

- 2) 金子桐子, 久保田美子, 鈴木亘, 古山和道. SLC25A38 遺伝子変異細胞の樹立. **第 94 回日本生化学会大会** (2021 年 11 月 3 日-5 日, 横浜 (Web 開催)).
- 3) 久保田美子, 鈴木亘, 金子桐子, 古山和道. 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素のヘム依存的分解反応に関わる因子の同定. **第 44 回日本分子生物学会年会** (2021 年 12 月 1 日-3 日, 横浜 (ハイブリッド開催)).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし