

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原因遺伝子の確認法の確立と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では複数の原因遺伝子とその変異が報告されているが、実際に遺伝子型と表現型の直接的な関連を確認する方法は確立されていなかった。このため、1年目にはゲノム編集技術を用いて培養細胞の遺伝子に変異を導入し、実際に環状鉄芽球が観察されるかどうかを確認した。一方、エクソーム解析でも原因遺伝子が不明な患者が少なくないことから、2、3年目には原因遺伝子となりうるような新たな遺伝子の探索を試みた。

A. 研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子としてはALAS2、SLC25A38、ABCB7などの複数の遺伝子とその変異が報告されている。しかしながら、それらの遺伝子の変異が実際に環状鉄芽球を形成する原因となりうるか否かを明らかにする方法は報告されていなかった。このため、1年目にはゲノム編集技術を用いて赤芽球系培養細胞の遺伝子に変異を導入し、環状鉄芽球が観察されるかどうかの検討を行った。また、遺伝性鉄芽球性貧血患者の中にはエクソーム解析を実施しても原因遺伝子が明らかではない患者も少なくない。このことから、未知の原因遺伝子が存在することを想定し、2、3年目にはそのような遺伝子の同定を試みた。

1年目の研究によりALAS2タンパク質の発現低下が遺伝性鉄芽球性貧血の原因となることが明らかとなったので、ALAS2タンパク質と複合体を形成し、ALAS2タンパク質の機能を調節する分子をコードする遺伝子は新たな原因遺伝子となりうるものと推定された。このため、ALAS2タンパク質と複合体を形成するタンパク質を同定し、その機能を明らかにすることを目的として実験を行なった。

B. 研究方法

1年目には遺伝子型と表現型との関連を明らかにすることを目的に、ゲノム編集技術の1つであるCRISPR/Cas9システムを用いて、ヒト臍帯血由来の赤芽球系培養細胞であるHUDEP2細胞のALAS2遺伝子の赤芽球特異的エンハンサー領域に機能欠失型変異を導入した。野生型HUDEP2細胞とALAS2

遺伝子の発現が低下したHUDEP2細胞（HA2low）をそれぞれ分化誘導することにより、遺伝性鉄芽球性貧血の特徴である環状鉄芽球が観察されるかどうかを観察した。

2・3年目には未知の遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子を同定することを目的として、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Flp-In T-Rex293細胞（FT293細胞）でFlag-tagを付与したALAS2タンパク質（ALAS2F）を強制発現した後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。それらのタンパク質の中からALAS2タンパク質の機能を調節する可能性のある分子としてHSPA9タンパク質を選択し、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

1年目には、まず本邦で原因遺伝子として報告されることが最も多いALAS2遺伝子に着目し、赤芽球系培養細胞のALAS2遺伝子の第一イントロンに存在する赤芽球特異的エンハンサーに変異を導入することによりALAS2遺伝子の発現を抑制し、環状鉄

芽球が観察されるか観察した。ALAS2遺伝子はX染色体上に存在するため、ALAS2遺伝子の変異による鉄芽球性貧血は伴性劣性遺伝の遺伝形式をとるX染色体連鎖鉄芽球性貧血 (XLSA) として知られている。K562細胞は慢性骨髄性白血病を発症した女性由来の培養細胞で、特定の試薬を培養液に添加することによりヘモグロビン合成が刺激されることが知られている。まず、CRISPR/Cas9システムを用いてX染色体の両方のアレルの第一イントロンのエンハンサー部位に変異が導入されたクローン [KA2low細胞] を選択し、さらなる解析を行った。その結果、KA2low細胞は野生型K562細胞に比べてALAS2 mRNA の発現量が低く、ヘモグロビン合成能も低下していた。また、その差は分化誘導後にも認められたが、K562細胞は分化誘導後も脱核は観察されず、また野生型、変異型、分化誘導前後のいずれの細胞においても環状鉄芽球は観察されなかった。

次に非腫瘍性の赤芽球系培養細胞株で、臍帯血幹細胞に由来するHUDEP2細胞を用いて同様の検討を行った。HUDEP2細胞も女性由来の細胞であるためX染色体の両方のアレルに変異が挿入されなければ表現型が観察されない可能性が高い。CRISPR/Cas9システムを用いてALAS2遺伝子の第一イントロンのエンハンサー部位に変異を導入し、両方のアレルに変異が導入されているクローン [HA2low細胞] を選択した。HA2low細胞では野生型細胞に比べてALAS2 mRNAの発現量が低下し、ヘモグロビン合成能も低下していることを確認した。HA2low細胞を分化誘導すると野生型細胞と同様に一部の細胞は脱核するまで分化が進み、さらに分化誘導後のHA2low細胞では環状鉄芽球が多数観察された。これらの結果から、エンハンサー領域の変異によるALAS2遺伝子の発現低下が遺伝性鉄芽球性貧血の直接の発症原因となることは明らかであると思われた。さらにALAS2遺伝子以外にも、原因遺伝子として報告のある他の遺伝子について、HUDEP2細胞の両方のアレルにフレームシフト変異を導入したところ、やはり分化誘導に伴い環状鉄芽球が観察されることを確認した。(令和4年3月末の時点で未報告)

1年目の結果からALAS2タンパク質の機能低下が遺伝性鉄芽球性貧血の原因となることが明らかとなったので、2、3年目にはALAS2タンパク質と複合

体を形成しALAS2タンパク質の機能を調節するタンパク質を同定することを試みた。その結果、複数のタンパク質がALAS2タンパク質と複合体を形成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。HSPA9タンパク質の機能低下は間接的にALAS2 mRNAの翻訳を抑制することにより遺伝性鉄芽球性貧血の原因となることが知られていたが、タンパク質同士が直接相互作用することは報告されていなかった。そこでHSPA9タンパク質がALAS2タンパク質の機能の発現にどのように関与するかを検討した。

ALAS2Fを発現するFT293細胞にHSPA9の発現を抑制するsiRNAを導入し、あるいはHSPA9の特異的な阻害剤として知られるMKT-077を培養液中に添加することによりその機能を抑制し、ALAS2Fタンパク質の発現がどのように変化するか観察した。また、HSPA9タンパク質の機能欠失は鉄-硫黄クラスターの合成低下を介してアコニターゼをIron Regulatory Protein 1 (IRP1) に変換して、ALAS2 mRNAの5'非翻訳領域に存在するIron Responsive Element (IRE) に結合させることによりALAS2 mRNAの翻訳を抑制することが知られているので、IREを欠失したALAS2 cDNA (ALAS2ΔIRE) を作成して発現させ、翻訳レベルでの制御を受けない条件でのsiRNAや阻害剤の効果も検討した。その結果、siRNAでHSPA9の発現を低下させた場合も、あるいはMKT-077でHSPA9の機能を抑制した場合のいずれにおいてもALAS2Fタンパク質の発現量は低下した。また、LAS2ΔIREからALAS2Fタンパク質を発現させた場合にも同様の効果が認められた。これらのことから、HSPA9の機能は鉄-硫黄クラスターの合成を介してALAS2 mRNAの翻訳を調節するのみならず、タンパク質レベルでALAS2タンパク質と結合することによりシャペロンタンパク質としてALAS2タンパク質の安定性に寄与するものと

考えられた。

D. 考察

1年目の結果より、同様の遺伝子変異を導入した場合でも、K562細胞では観察できなかった環状鉄芽球が、HUDEP2細胞では観察が可能であった。K562細胞が分化誘導後でも増殖が衰えないのに対し、HUDEP2細胞では分化に伴い増殖能は極端に低下しており、赤芽球の生理的な分化に近いような印象であった。これらの点が表現型の違いに与える影響は大きいように思われる。その点を考慮すると、疾患モデル細胞の樹立を目的とする場合には非腫瘍性の培養細胞を用いることがより現実的な選択肢であると思われた。

また、ALAS2遺伝子の発現量の低下が、環状鉄芽球形成の直接的な原因となりうること、そして環状鉄芽球は分化の過程で出現することが明らかになった。さらに、今回の研究結果はALAS2遺伝子のコード領域のみならず、遺伝子発現調節領域における変異も疾患の原因となることを示している。従って、XLSAを疑う患者では、ALAS2遺伝子のエクソン領域のみならず、第一イントロンの赤芽球特異的エンハンサー領域についても塩基配列を確認する必要があると思われる。遺伝性鉄芽球性貧血が疑われる患者家系の症例でも、エクソーム解析で候補となる原因遺伝子のコード領域には変異を認めず、さらに他の遺伝子のコード領域にも原因となりそうな変異が同定されない例が少なくない。そのような場合には、既に原因として知られる遺伝子の発現調節領域における遺伝子変異の有無を解析するというようなアプローチも必要と思われた。

一方で、新たな原因遺伝子を同定するためにはすでに原因となることが明らかなタンパク質の機能を調節するタンパク質を同定することも有用であると考えられる。そのような目的でALAS2タンパク質と結合し複合体を形成するタンパク質を探索する試みを行った。特定のタンパク質と複合体を形成するタンパク質の網羅的な同定は、質量分析装置を利用することにより可能である。実際、質量分析装置を用いた今回の検討により、ALAS2タンパク質と複合体を形成するタンパク質を複数同定することが可能であり、そのうちの1つは既に遺伝性鉄芽球性貧血の原因として報告されている分子（HSPA9）であった。このことは、質量分析装置を用いた解析

により未知の原因遺伝子を同定するアプローチの可能性を示唆するものと考えている。また、既知の原因遺伝子が同定された場合でも、既に推定されていたものとは異なるメカニズムが発症に関与している可能性を示唆したことも大変に興味深い。

E. 結論

X染色体連鎖鉄芽球性貧血のモデル細胞を樹立し、ALAS2遺伝子の変異が環状鉄芽球の形成に直接寄与することを明らかにした。他の候補遺伝子においても同様の手技を用いることにより、今後の遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子診断に際して、結果の妥当性を担保することが可能になると考えられる。

また、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としてHSPA9タンパク質を同定した。さらに、HSPA9タンパク質の機能欠失はIRE-IRPシステムを介して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タンパク質の安定性の維持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-aminolevulinic 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, 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, 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 (ハイブリット開催)).
- 4) 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日-16日, Web開催).
- 5) 久保田美子, 金子桐子, 鈴木亘, Kamata Costantine Chasama, 古山和道. ミトコンドリア内ヘム依存的ALAS1分解の調節機構. **第92回日本生化学大会** (2019年9月18日-20日, 横浜).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし