

遺伝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発症機序の解明

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原因遺伝子として様々な遺伝子が報告されているが、それらの遺伝子の変異が表現型の変化とどのように結びつくのかは明らかでない場合が少なくない。我々は質量分析法を用いて 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過程で、既知の原因遺伝子の遺伝子産物を検出し、発症機序について新たな知見を得ることができた。このような網羅的な解析は、新たな原因遺伝子を同定する可能性のみならず、既知の原因遺伝子の変異と発症機序との関連について新たな知見を得られる可能性も秘めている。

A. 研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血（congenital sideroblastic anemia, CSA）の原因遺伝子として様々な遺伝子の変異が報告されているが、本邦で最も多く同定されているのは赤芽球型5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子（ALAS2）の変異である。さらにALAS2タンパク質の機能を抑制する分子が同定できれば、遺伝性鉄芽球性貧血の新たな原因を同定することができる可能性がある。そこで、我々はALAS2タンパク質と結合してその機能を調節する分子を同定することを目的にALAS2タンパク質と複合体を形成するタンパク質の同定を試みた。

B. 研究方法

ドキシサイクリン誘導性にFLAG-tagを付与したALAS2タンパク質（ALAS2F）を線維芽細胞内で発現させることが可能な培養細胞株を樹立し、ALAS2Fタンパク質の発現を誘導した上で抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行い、ALAS2F複合体に含まれるタンパク質を質量分析装置を用いて同定した。

（倫理面への配慮）

培養細胞を用いた研究であり、倫理面への配慮が必要な内容は含まない。

C. 研究結果

ALAS2タンパク質と複合体を形成するタンパク質として様々なタンパク質を同定した。その中にCSAの原因遺伝子として既に報告されていたミト

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あるHSPA9が含まれていた。このため、ALAS2タンパク質の安定化にHSPA9が関与する可能性についてさらに検討を行った。HSPA9の発現を特異的に抑制するsiRNAを用いてHSPA9の発現量が成熟型ALAS2Fタンパク質の細胞内の半減期に影響を与えるか否かを調べたところ、HSPA9の発現の抑制により、ALAS2Fタンパク質の半減期も短縮していた。また、HSPA9の特異的な阻害剤を用いてHSPA9の機能を抑制した場合も、ALAS2Fタンパク質の発現量が低下することが明らかになった。これらの結果から、HSPA9の発現量の低下や機能の抑制はALAS2タンパク質の細胞内における分解を促進する可能性が高いことが明らかとなった。

D. 考察

以前の報告では、HSPA9の変異は鉄-硫黄クラスターの合成を阻害し、iron-regulatory protein 1 (IRP1) のALAS2 mRNAの5'非翻訳領域に存在するiron responsive element (IRE) への結合を促進することによりALAS2タンパク質の翻訳を阻害することがCSAの発症原因であるとされていた。実際、IREを欠失した変異型mRNAからのALAS2タンパク質の発現は野生型mRNAから発現するそれよりも多いことから、IRP-IREによるタンパク質の発現制御もALAS2の発現においては重要な役割を果たすものと推察される。我々の研究結果は、それに加えて、HSPA9がALAS2タンパク質と直接結合して安定化することが正常なALAS2タンパク質の機能を維持

するために重要であることを示唆するものと考えている。一方で、今回の我々の研究は線維芽細胞を用いた検討にとどまっており、今後、赤芽球系細胞を用いた検討も必要であると考えている。

E. 結論

免疫沈降法と質量分析を組み合わせた方法により、ALAS2タンパク質と複合体を形成するタンパク質としてHSPA9を同定し、その結合がALAS2タンパク質の細胞内における安定化に寄与する可能性を見出した。HSPA9遺伝子の遺伝的な変異はIRP-IREシステムを介してALAS2の翻訳を抑制し、CSAの発症原因となるものと報告されていたが、我々の研究結果はHSPA9遺伝子変異に起因するCSAの新たな発症機序を明らかにするのみならず、赤芽球の生理的な分化におけるHSPA9の新たな役割を示唆するものと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 古山和道, Kamata CC. 遺伝性鉄芽球性貧血の確定診断における in vitro 実験系の役割について. **岩手医学雑誌** 2023. (in press)
- 2) 鈴木亘, Kamata CC, 古山和道. 質量分析による赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素複合体タンパク質の解析. **岩手医学雑誌** 2023. (in press)
- 3) Kamata CC, Kubota Y, Furuyama K. HSPA9 stabilizes recombinant ALAS2 protein ectopically expressed in a nonerythroid human cell line. **岩手医学雑誌** 2023. (in press)

2. 学会発表

- 1) 古山和道. ミトコンドリアシャペロン CLPX による代謝制御機構について. **レドックス R&D 戦略委員会 2022 年度「夏のシンポジウム」** (2022 年 8 月 19 日, 盛岡) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし