

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

## 赤芽球特異的5-アミノレブリン酸合成酵素複合体の形成とその役割

研究分担者 古山 和道（岩手医科大学医学部 教授）

研究要旨：赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素（ALAS2）は赤芽球におけるヘモグロビンの合成のためのヘムを供給するのに必須の酵素で、ALAS2 遺伝子の遺伝的変異は遺伝性鉄芽球性貧血の原因として知られている。近年、様々なタンパク質が複合体を形成することが報告されているが、ALAS2 タンパク質の複合体の形成に関する情報は非常に少ない。このため、質量分析法を用いて ALAS2 と複合体を形成するタンパク質を網羅的に同定することを試みた。その結果、ALAS2 タンパク質はエネルギー代謝やアミノ酸代謝に関与するタンパク質、プロテアーゼおよびシャペロンタンパク質などと複合体を形成することが明らかとなった。この結果から、ALAS2 タンパク質は複合体の形成を介して、様々な調節を受けている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素（ALAS2）は赤芽球におけるヘム生合成の律速酵素で、ヘモグロビンの合成のためのヘムを供給するのに必須の酵素である。ALAS2 遺伝子の遺伝的変異は遺伝性鉄芽球性貧血の原因として知られている。近年、様々なタンパク質が複合体の形成を介して、それぞれの機能を調節することが報告されているが、ALAS2 タンパク質の複合体の形成に関する情報は非常に少ない。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、その複合体形成の赤芽球分化における役割について考察を行った。

### B. 研究方法

ALAS2 タンパク質を FLAG-tag との融合タンパク質（ALAS2F）としてドキシサイクリン誘導性に発現制御が可能な HEK293 細胞を樹立し、ALAS2F タンパク質を発現させた後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降して複合体を精製した。その後、複合体をトリプシンで処理し、質量分析装置（LC/MS）にて複合体に含まれるタンパク質を同定した。同定されたタンパク質のうち、ミトコンドリアのマトリクスに局在するタンパク質を選択し、パルスウェイ解析を実施した。

（倫理面への配慮）

本研究に倫理的な配慮が必要な実験等は含まれていない。

### C. 研究結果

ALAS2 と結合するタンパク質として、タンパク質分解に関与するマトリクスプロテアーゼ（CLPX, CLPP, LONP1）、エネルギー代謝に関与するタンパク質（ATP 合成酵素、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDH）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼなど）、アミノ酸代謝に関与するタンパク質（グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼなど）などが同定された。さらに ALAS2 に特異的ではなかったが、シャペロンタンパク質（HSPA9, HSPD1）も含まれていた。

これらのタンパク質のうち、いくつかについては、ALAS2 のアイソザイムである非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素（ALAS1）とも複合体を形成することを確認している。例えば、CLPXP はヘム依存性に ALAS1 タンパク質を分解し、LONP1 は酸化された ALAS1 タンパク質の分解に関与すると考えられている。このため、ALAS1 と ALAS2 とで複合体形成の役割に異なる点があるのかどうか、LONP1 についてさらなる検討を行った。FLAG-tag を付与した ALAS1（ALAS1F）を ALAS2F と同様に HEK293 細胞で発現させ、免疫沈降したのちに、複合体に含まれる LONP1 の量を比較したところ、大きな差を認めなかった。一方、ALAS1F, ALAS2F を発現する細胞における LONP1 の発現を siRNA を用いて特異的に抑制したところ、その効果は異なっており、LONP1 タンパク質の発現低下に伴い ALAS1F タンパク質は増加したが、ALAS2F タンパク質は減少した。

## D. 考察

シャペロンタンパク質はその性質上、多くのタンパク質と複合体を形成するため、特定のタンパク質との関係における役割を明らかにすることは困難である。しかしながら、その結合はすべてのタンパク質において等しいわけではなく、細胞内の状況に応じて、変化するようである。今回我々が行った網羅的解析では定量的な複合体形成の解析は困難だが、免疫沈降後にWestern blotによる解析(IP-Western)を行うことにより、半定量的に解析することは可能であった。実際、HSP70タンパク質の1つであるHSPA9タンパク質は、LC/MS解析ではALAS2Fのみならず陰性コントロールとして用いたルシフェラーゼとも複合体を形成したが、IP-Westernで確認したところ、ALAS2Fとの結合量の方がルシフェラーゼとのそれよりも明らかに多いことが明らかとなった。しかしながら、IP-Western解析のためにはそれぞれのタンパク質に対する特異的な抗体が必要であり、複合体を形成するすべてのタンパク質に対して解析を追加実施することは困難であり、現実的ではない。一方、複合体形成の役割を明らかにするためには、特定の遺伝子のsiRNAを用いて発現を抑制することが有用である。実際、LONP1の発現抑制がALAS2Fの発現レベルを低下させる結果は、タンパク質分解酵素として知られるLONP1がシャペロンとしての機能を有する可能性が高いことを示唆している。特に、ALAS2タンパク質の発現は赤芽球分化に伴い亢進することが知られているので、赤芽球分化においてLONP1がどのような役割を果たすのか、大変に興味深い。

## E. 結論

本研究ではALAS2タンパク質と複合体を形成するタンパク質を免疫沈降法と質量分析装置を用いて網羅的に検索し、タンパク質分解酵素、シャペロンタンパク質などに加えて、エネルギー代謝に関わる酵素やアミノ酸代謝に関与する酵素など、様々なタンパク質を同定することができた。これらのタンパク質により、ALAS2タンパク質がどのような制御を受けているのかについて、今後さらなる検討が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Kubota Y, Kaneko K, Kamata CC, and Furuyama K. CLPX regulates mitochondrial fatty

acid beta-oxidation in liver cells. *J Biol Chem*. 2023 Oct;299(10):105210. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105210. PMID: 37660922.

- 2) Kamata C, Kubota Y, Furuyama K. Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase is stabilized by HSPA9 in mitochondrial matrix. *岩手医学雑誌* 2023;75(2):49-67.
- 3) 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;75(2):69-79.
- 4) 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;75(1):1-9.
- 5) 藤原亨, 古山和道, 張替秀郎. 遺伝性鉄芽球性貧血. *遺伝性骨髄不全症診療ガイドライン 2023*. 日本小児血液・がん学会編, 診断と治療社(東京), 2023, p29-36.

### 2. 学会発表

- 1) Furuyama K. (シンポジウム) Multiple roles of mitochondrial ATP-dependent unfoldase CLPX in the regulation of intracellular energy metabolism. **第96回日本生化学会大会** (2023年10月31日-11月2日, 福岡). (口演).
- 2) 鈴木亘, 久保田美子, 金子桐子, Kamata CC, 古山和道. CLPXは肝細胞においてミトコンドリアβ酸化を制御する. **第96回日本生化学会大会** (2023年10月31日-11月2日, 福岡). (ポスター).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし