

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590301

研究課題名 (和文) 赤芽球型アミノレブリン酸合成酵素の翻訳後修飾とその役割

研究課題名 (英文) Post-translational modification of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase and its' role in erythroid differentiation.

研究代表者

古山 和道 (FURUYAMA KAZUMICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80280874

研究成果の概要 (和文)：赤芽球型アミノレブリン酸合成酵素(ALAS2)がタンパク質として合成された後、生体内でどのように調節を受けるのかを明らかにする事を目的に研究を行ない、ALAS2タンパク質は細胞内のヘムの量に応じてALAS2を2分子含むより大きな分子を形成することを見出した。さらに、ALAS2タンパク質はSUMO (Small Ubiquitin like MOdifier)化されうる事も明らかにした。これらは今まで報告されていないALAS2の新規の翻訳後修飾であり、ALAS2の機能発現、さらには赤芽球の分化において果たす役割を今後明らかにしたい。

研究成果の概要 (英文)：Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) is the rate-limiting enzyme of heme biosynthetic pathway in erythroid cells. In this project, we have tried to clarify how the expression of ALAS2 is regulated post-translationally in vivo. As a result, we found that ALAS2 formed covalent homo-dimer, which was not able to translocate into mitochondria, depending on the concentration of intracellular heme level in HEK293 cells. Moreover, we have identified that ALAS2 protein could be SUMOylated, when it was co-expressed with E1, E2 enzyme of SUMOylation and SUMO1 (Small Ubiquitin like Modifier 1) in *E. coli*. These post-translational modifications of ALAS2 protein were hitherto unknown phenomena, thus it should be important to examine how these modifications were involved in the functional regulation of ALAS2 protein, as well as in erythroid differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、鉄芽球性貧血

1. 研究開始当初の背景

アミノレブリン酸合成酵素(aminolevulinic acid synthase; ALAS)はヘム生合成系の律速酵素で、ほ乳類では全ての細胞で発現する非特異型(ALAS-N または ALAS1)と赤芽球にのみ発現が限局する赤芽球型(ALAS-E または ALAS2)の二つのアイソザイムが存在する事が知られている。このうち ALAS2 は、赤血球のヘモグロビンにヘムを供給する役割を担うため、その機能の低下は貧血の原因となる。ALAS2 遺伝子は X 染色体上に存在するため、遺伝的に ALAS2 遺伝子に変異を有する男性は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血(XLSA)を発症する事が知られている。研究代表者らは日本および諸外国からの以来を受け、XLSA 患者の ALAS2 遺伝子の変異を同定し、その変異が酵素活性のどのような影響を与えるかについて検討を行ってきた、その過程において、アミノ酸置換を伴ういくつかの ALAS2 遺伝子の変異は *in vitro* での酵素活性を低下させない事を見出した。これらの ALAS2 遺伝子変異は家族歴などから XLSA の原因である可能性が高いと考えられることから、当該アミノ酸置換は酵素活性には影響を与えなくても、ALAS2 タンパク質の翻訳後修飾に何らかの影響を及ぼす可能性が高いものと予想される。現在まで、ALAS2 タンパク質の翻訳後修飾としては、細胞質で翻訳された 587 残基の ALAS2 (プレカーサータンパク質) ミトコンドリアに移行した後にアミノ末端に存在する 50 残基のミトコンドリア移行シグナルが切除され成熟型 ALAS2 として機能する事と、研究代表者らが発見したスクシニル CoA 合成酵素との結合が、ALAS2 の翻訳後修飾として知られている。

2. 研究の目的

ALAS2 タンパク質がどのような翻訳後修飾を受けるのかを明らかにし、これらの翻訳後修飾が ALAS2 の酵素活性や細胞内での安定性に影響するか否かについて明らかにすることにより、生理的な赤血球造血の新たな調節機構を明らかにする。さらにこれらの翻訳後修飾と、既に報告されている ALAS2 の変異酵素の細胞内における不安定性との関連についても明らかにすることにより、鉄芽球性貧血の病態を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ALAS2 タンパク質を FLAG タグとの融合タンパク質(ALAS2f)としてヒト胎児腎由

来繊維芽細胞 (HEK293 細胞) 内で過剰発現させた後、抗 FLAG 抗体を一次抗体として Western blot 解析を行う。また、同じく HEK293 細胞で発現させた ALAS2f タンパク質を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した後に SDS-PAGE で展開し、その免疫沈降物にどのような分子が含まれるかを液体クロマトグラフィーと質量分析装置を用いて明らかにする (LC/MS 解析)。

(2) ALAS2 タンパク質が SUMO 化を受けるかどうかを明らかにするために大腸菌内で SUMO 化に必須の分子である E1、E2、SUMO1 と glutathion S transferase (GST)-ALAS2 融合タンパク質を共発現させ、GST-ALAS2 タンパク質を精製した後、抗 SUMO1 抗体を用いた免疫 blot 法により SUMO 化 ALAS2 タンパク質の検出を試みる。

(3) 遺伝性鉄芽球性貧血患者で同定された ALAS2 遺伝子変異を組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、精製した後に酵素活性を測定する。さらに FLAG 融合タンパク質としてほ乳類由来の細胞株で発現させ、変異が細胞内局在や細胞内での機能などにどのような影響を与えるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ALAS2 タンパク質を FLAG タグとの融合タンパク質としてヒト胎児腎由来繊維芽細胞 (HEK293 細胞) 内で過剰発現させた後、抗 FLAG 抗体を一次抗体として Western blot 解析を行ったところ、予想される大きさの分子に加えて、より大きな分子 (仮に ALAS2-L と称する) も検出されることを見出した。この ALAS2-L の発現量は細胞内のヘムの量に応じて変化することから、ALAS2-L の形成はヘムによる ALAS2 の発現制御に関与している可能性が示唆された。ALAS2-L の構成成分を明らかにするため、免疫沈降法により精製して SDS-PAGE により分離した後にトリプシン処理を行い、HPLC と質量分析を組み合わせた方法 (LC-MS) により ALAS2-L の構成成分を明らかにすることを試みた結果、ALAS2-L には ALAS2 分子が含まれている事が明らかとなったが、それ以外の分子については再現性よく検出する事はできなかった。また、異なる tag を付与した ALAS2 タンパク質を共発現させ、それぞれの tag に対する抗体で免疫沈降を行って解析したところ、ALAS2-L には ALAS2 がホモ二量体として含まれる事も明らかになった。更に ALAS2-L の細胞内における局在を調べたところ、主としてミトコンドリアの外膜に存在する事が明らかにな

った。ALAS2 タンパク質の基質の一つであるスクシニル CoA はミトコンドリアのマトリクスに存在する事から、ALAS2-L の形成はヘムによる ALAS2 の negative feedback に関与している可能性が高いものと考えられた。

(2)大腸菌で ALAS2 と GST との融合タンパク質(GST-ALAS2)と SUMO 化に必須な E1,E2 酵素、さらには SUMO1 を共発現させた後に精製し、ALAS2 タンパク質が SUMO 化されるかどうかを検討したところ、ALAS2 タンパク質は SUMO 化されうる事が明らかになった。さらに ALAS2 タンパク質の N 末端の約 70 アミノ酸を切除した ALAS2 タンパク質を用いて同様の解析を行なったところ、ALAS2 タンパク質の SUMO 化は観察されなくなった。従って、この N 末端の約 70 アミノ酸に含まれる領域が ALAS2 タンパク質の SUMO 化に必須な領域である事が明らかになった。

(3) ALAS2 タンパク質の C 末端の 33 アミノ酸の配列は、ほ乳類の間ではよく保存されているが、大腸菌などでは欠失している。申請者らは日本人の遺伝性鉄芽急性貧血患者遺伝子のこの C 末端の領域のアミノ酸置換を伴う変異 V562A と M567I を同定した。これらの変異を組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、その酵素活性を測定したところ、M567I の *in vitro* での酵素活性は野生型の約 1/5 まで低下していたが、V562A の酵素活性は野生型よりも更新している事が判明した。そこでこれらの変異体を HEK293 細胞で発現させ、そのミトコンドリア内におけるタンパク質寿命を検討したところ、野生型タンパク質の半減期は約 7.5 時間であったが、V562A 変異体の半減期は約 5 時間に短縮していた。更に ALAS2 タンパク質の C 末端の 33 アミノ酸を欠失した変異体の *in vitro* での酵素活性と HEK293 細胞内での半減期について調べたところ、この欠失変異体は *in vitro* での酵素活性は亢進し、更に細胞内での半減期も野生型よりも長い事が明らかになった。従って、ALAS2 タンパクの C 末端 33 アミノ酸は野生型 ALAS2 の酵素活性と細胞内出の安定性を低下させる機能を有するものと考えられた。従って、V562A 変異は主として細胞内での安定性を低下させる事により、また、M567I 変異は主として酵素活性自体を低下させる事により鉄芽球性貧血の原因になるものと考えられた。

本研究課題により、ALAS2 タンパク質は①細胞内ヘム濃度に応じて共有結合したホモ二量体を形成する事、②SUMO 化を受ける

可能性が高い事、③C 末端の 33 アミノ酸はほ乳類に特有の配列で ALAS2 の活性を抑制する機能を有すること、等が明らかになった。今後、これらの ALAS2 の翻訳後修飾が ALAS2 の機能発現、さらには赤芽球の分化において果たす役割を明らかにする事は、正常な造血機構および様々な貧血の病態を明らかにする上で非常に重要であると考えられるため、今後更に詳細な検討を続けていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Harigae H, Furuyama K, Hereditary sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations. *Int J Hematol*. 2010 vol. 92:425-31. 査読有り
2. Han F, Takeda K, Ono M, Date F, Ishikawa K, Yokoyama S, Shinozawa Y, Furuyama K, Shibahara S. Hypoxemia induces expression of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2 proteins in the mouse myocardium. *J Biochem*. 2010 vol. 147:143-51. 査読有り
3. Takeda K, Takahashi NH, Yoshizawa M, Shibahara S. Lipocalin-type prostaglandin D synthase as a regulator of the retinoic acid signalling in melanocytes. *J Biochem*. 2010 vol. 148:139-48. 査読有り
4. Numata I, Okuyama R, Memezawa A, Ito Y, Takeda K, Furuyama K, Shibahara S, Aiba S. Functional expression of heme oxygenase-1 in human differentiated epidermis and its regulation by cytokines. *J Invest Dermatol*. 2009 vol. 129:2594-603. 査読有り
5. Han F, Takeda K, Ishikawa K, Ono M, Date F, Yokoyama S, Furuyama K, Shinozawa Y, Urade Y, Shibahara S. Induction of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart under hypoxemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 vol. 385:449-53. 査読有り
6. Kaneko K, Furuyama K, Aburatani H, Shibahara S. Hypoxia induces erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase expression in human erythroid cells through transforming growth factor-beta signaling. *FEBS J*. 2009 vol. 276:1370-82. 査読有り
7. Tsukiji N, Nishihara D, Yajima I, Takeda

- K, Shibahara S, Yamamoto H. Mitf functions as an in ovo regulator for cell differentiation and proliferation during development of the chick RPE. Dev Biol. 2009 vol.326:335-46. 査読有り
8. Vargas PD, Furuyama K, Sassa S, Shibahara S. Hypoxia decreases the expression of the two enzymes responsible for producing linear and cyclic tetrapyrroles in the heme biosynthetic pathway. FEBS J. 2008 vol.75:5947-59. 査読有り
9. Nagai T, Kikuchi S, Ohmine K, Miyoshi T, Nakamura M, Kondo T, Furuyama K, Komatsu N, Ozawa K. Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. J Cell Biochem. 2008 vol.104:680-91. 査読有り
10. Dutta S, Furuyama K, Sassa S, Chang KP. Leishmania spp.: delta-aminolevulinic acid-inducible neogenesis of porphyria by genetic complementation of incomplete heme biosynthesis pathway. Exp Parasitol. 2008 vol.118:629-36. 査読有り
11. Li B, Takeda K, Yokoyama S, Shibahara S. A prolyl-hydroxylase inhibitor, ethyl-3,4-dihydroxybenzoate, induces haem oxygenase-1 expression in human cells through a mechanism independent of hypoxia-inducible factor-1alpha. J Biochem. 2008 vol.144:643-54. 査読有り
12. Kuesap J, Li B, Satarug S, Takeda K, Numata I, Na-Bangchang K, Shibahara S. Prostaglandin D2 induces heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2008 vol.367:413-9. 査読有り
13. Satarug S, Wisedpanichkij R, Takeda K, Li B, Na-Bangchang K, Moore MR, Shibahara S. Prostaglandin D2 induces heme oxygenase-1 mRNA expression through the DP2 receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2008 vol.377:878-83 査読有り
3. 金子桐子 他、低酸素刺激によるヘモグロビン合成誘導機構、第81回日本生化学会大会、2008年12月9日、神戸市
4. Furuyama K. et al., Tissue specific regulation of the enzymes in heme biosynthetic pathway under hypoxia, 第8回国際ポルフィリン-ヘムシンポジウム、2008年10月17日、松江市
5. パトリック バルガス 他、低酸素は肝癌由来細胞株におけるヘム生合成系酵素の発現を抑制する。日本生化学会東北地方会、2008年5月17日、盛岡市

[その他]

ホームページ等

URL: <http://www.mbap.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古山 和道 (FURUYAMA KAZUMICHI)
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：80280874

(2) 研究分担者

柴原 茂樹 (SHIBAHARA SHIGEKI)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00154253

[学会発表] (計5件)

1. Rie Ohba 他、Epidemiological and Genetic Analysis of Sideroblastic Anemia --- Multicenter Study In Japan, 第52回アメリカ血液学会総会、2010年12月6日、アメリカ合衆国オーランド市
2. 玉井佳子 他、ALAS2のexon11に遺伝子変異(T1731C変異)を認めたピリドキシン反応性 X-linked 鉄芽球性貧血の一例。第71回日本血液学会学術集会。2009年10月23日、京都市