

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590353

研究課題名(和文) 調節性ヘムプールの変化に即応するためのヘム生合成調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms for heme biosynthesis in response to the change of regulatory heme pool.

研究代表者

古山 和道 (Furuyama, Kazumichi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：80280874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムは様々なタンパク質の補欠分子として機能する生体には必須の小分子で、全ての細胞で合成されている。一方で過剰なヘムは酸化ストレスの誘因となる事から、その生合成は厳密に制御される。本研究においてはヘム生合成系の律速酵素である非特異型アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1)の翻訳後修飾機構が厳密なヘム産生の制御にどの様に関わるかについて検討を行なった。その結果、ALAS1がミトコンドリア内で特定のタンパク質分解酵素とヘム依存性に分解されている可能性が高い事などを見出し、その発現制御において新たな翻訳後修飾機構が関与する可能性が高い事を明らかにする事ができた。

研究成果の概要(英文)：Heme is an essential prosthetic group of several proteins, and is synthesized in all living cells. On the other hand, production of heme was strictly regulated in each cells, since excess amount of heme produces reactive oxygen species. It has been well known that the expression of non-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS1), which is the first and the rate limiting enzyme of heme biosynthetic pathway in non-erythroid cells, is regulated at transcriptional, as well as at several post-transcriptional levels for the strict regulation of heme biosynthesis. In the present project, we have challenged to determine the novel mechanisms, which is involved in the precise and quick response of ALAS1 expression to the change of heme contents in the cells. As a result, we have successfully identified novel mechanisms for post-translational regulation of ALAS1 protein in mitochondria.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ヘム 翻訳後修飾 ミトコンドリア 5-アミノレブリン酸合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

ヘムは脊椎動物ではほぼ全ての細胞で合成される補欠分子で、酸素の運搬と貯蔵、酵素活性の調節や電子伝達系の一部として機能する事が知られている。さらに最近では、転写や概日リズムの調節、そして miRNA の前駆体のプロセシングの調節にもヘムが関与する事が報告され、細胞内におけるその機能はますます広がりを見せている。一方、タンパク質に結合していないヘムは活性酸素の発生源となりうるため、過不足のないようにある一定の範囲内に維持されると推定されており、これを調節性ヘムプールと呼ぶ。すなわち、ヘムの増加がヘム生合成を直接的に抑制するという negative feedback 機構が作動するきっかけは調節性ヘムプールの増加であると考えられている。このヘムによる negative feedback 機構の中心となっているのはヘム生合成系の律速酵素であるアミノレプリン酸合成酵素(ALAS)で、細胞質で合成された後ミトコンドリア内のマトリクスに移行しミトコンドリア内でホモ2量体として機能するミトコンドリアタンパク質である。ALASには全ての細胞で発現しているALAS1(またはALAS-N)と赤芽球でのみ発現するALAS2(またはALAS-E)の2種類のアイソザイムが存在し、赤芽球系細胞以外の細胞ではALAS1のみが発現している。疾患との関連では、ALAS2 遺伝子は遺伝性鉄芽球性貧血や一部の遺伝性赤芽球性ポルフィリン症の原因遺伝子として知られており、ALAS1 の発現調節の異常は急性間欠性ポルフィリン症の発症と深く関わる。ALAS1 の発現は、細胞内の調節性ヘムプールの増加に際して、転写、翻訳、翻訳後修飾のいずれの段階においても抑制される事が知られているが、酵素タンパク質を直接制御する翻訳後修飾が迅速な発現調節においては重要な役割をはたすと考えられる。申請者らは従来、ALAS2 の翻訳後調節と鉄芽球性貧血の発症機構との関連について研究を進めてきたが、培養細胞中でALAS2 タンパク質を発現させた際に、予想される大きさの分子に加えてそのほぼ2倍の大きさの分子がSDS-PAGE/Western blot法で検出される事を見出した。この予想より大きな分子は、発現細胞をヘム生合成の阻害剤で処理すると検出できなくなり、ヘムの誘導體であるヘミンで処理するとヘミンの濃度依存性に増加することから、細胞内の調節性ヘムプールの増減に応じて変化すると考えられた。さらに、異なる tag を付与したALAS2 タンパク質を同時に発現させ、一方の tag に対する抗体で免疫沈降を行ったところ、その免疫複合体中にも前述の大きな分子が存在し、

かつ、免疫沈降に用いた抗体ではないもう一方の tag に対する抗体でも同じ位置に検出できる事から、この大きな分子にはALAS2 タンパク質のホモ2量体が共有結合したものの(ALAS2 covalent-homodimer; ALAS2c-h と記す)が含まれていると考えられた。さらに、ALAS2c-h の細胞内での局在を調べたところ、主としてミトコンドリア外膜に集積していることが明らかとなった。ALAS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のみ存在するためALAS2c-h は酵素活性を発現できない可能性が高い。これらの結果は、ALAS2c-h の形成は調節性ヘムプールの増加によるnegative-feedback 調節機構の一部を担う可能性を示唆すると考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者はALAS2のみならずALAS1においてもヘムがミトコンドリア外におけるホモ2量体の共有結合を迅速に促進することを確認した。本研究では、これらの結果をさらに発展させ、ALAS1 の発現調節における共有結合ホモ2量体(ALAS1 covalent-homodimer; ALAS1c-h)の形成と分解機構の詳細を明らかにする事、さらには細胞内ヘム量に応じたヘム依存性の未知のALAS1発現制御機構を明らかにすることにより、ヘム生合成の調節機構の詳細を明らかにする事を主な目的として開始された。本研究により得られる結果は、ヘム生合成の異常が発症に関与しているポルフィリン症などの病態の詳細を明らかにし、新たな治療法を開発する上でも重要な情報を提供しうるものと期待される。

## 3. 研究の方法

まず、ALAS1 を FLAG-tag との組換えタンパク質として発現誘導できる培養細胞を樹立する。その後、ALAS1c-h の合成機構を明らかにするために、発現させたALAS1 タンパク質を免疫沈降法により精製し、様々な翻訳後修飾に対応した特異抗体等を用いたWestern blot 法や質量分析法などを用いてALAS1c-h が受けている修飾を明らかにする。また、ヘムが結合すると予想される部位の変異体や欠失変異体等を用いて、共有結合の形成に関わる領域を明らかにする。以上の実験と並行して、ALAS1c-h の分解機構を明らかにするために、ユビキチン化等の修飾を受けるか否かを明らかにし、さらに免疫染色法などを用いてオートファジーとの関連についても検討する。また、ALAS1 と複合体を形成するタンパク質を質量分析装置を用いて網羅的に同定し、ALAS1c-h の形成や、ALAS1 の未知の翻訳後修飾に関わ

る分子を同定する。

#### 4. 研究成果

再現性よく、かつ効率的に研究を進める事を目的に、まず精製・検出用に FLAG-tag を付与した ALAS1 を安定的に、かつ誘導性に発現させることのできる細胞株の樹立を試みた。その結果、ALAS1 のカルボキシル末端に FLAG-tag を付与した組換えタンパク質をテトラサイクリンの添加により誘導性に発現させることができる HEK293 細胞(ヒト胎児腎臓由来の繊維芽細胞株)を樹立する事に成功した。次に、FLAG-tag に対する抗体を用いた免疫沈降により ALAS1c-h も含めて精製できる事を確認した後、ヘムの添加により ALAS タンパク質が非特異的な酸化を受けるかどうかの検討を、カルボニル化タンパク質検出キットを用いて行なった。すなわち、過剰なヘムが ALAS1 タンパク質を酸化し、その結果 ALAS1c-h の形成が促進されるのではないかと考えたが、ALAS1c-h の形成における ALAS タンパク質の酸化の関与は明らかではなかった。また、既知の ALAS1 のヘム結合領域に変異を導入した場合にも、ALAS1c-h の形成に大きな変化は認められなかった。

次に、ALAS1c-h の形成に関与している ALAS1 以外のタンパク質を同定する事を目的に、強制発現させた ALAS1-FLAG タンパク質を免疫沈降法により生成した後に SDS-PAGE を行い、クーマジーブリンアントブルーを用いて染色した後に ALAS1c-h と思われる部分を抽出し、質量分析装置を用いてどのようなタンパク質が含まれるかの解析を行なった。しかしながら、ALAS1c-h の形成を促進する可能性が高そうなタンパク質は同定されなかった。一方で、同様の方法により、質量分析装置を用いて ALAS1 タンパク質と複合体を形成するタンパク質について網羅的な探索を行なったところ、ALAS1 は様々なタンパク質と複合体を形成する可能性が高い事が明らかになった。それ等の複合体を形成する分子の中には既に報告されているものも含まれていたが、ほとんどは現在までに未だ ALAS1 と複合体を形成する事が報告されていない分子であった。そのうちのいくつかの分子について、ALAS1 との複合体の形成を確認するために、強制発現させた ALAS1-FLAG タンパク質を免疫沈降して精製し、免疫沈降物の中に当該タンパク質が含まれるかどうかを Western blot 法により解析したところ、いくつかのタンパク質については再現性よく複合体の形成が確認できる事が明らかとなった。そのようにして複合体の形成が確認できたタンパク質の

中にはミトコンドリア内における ALAS1 の分解に関わる可能性があるタンパク質分解酵素が含まれていたため、それらについてヘムの有無と複合体の形成との関連について検討を行なった。その結果、当該タンパク質分解酵素と ALAS1 との複合体の形成はヘム存在下で増強され、反対に細胞内でのヘム合成を抑制すると複合体を形成しにくくなる事が明らかとなった。以上の結果は ALAS1 タンパク質が特定のタンパク質分解酵素によりミトコンドリア内においてヘム依存性に分解される可能性が高い事を示すものと考えられた。

今後は、ALAS1 のミトコンドリア内におけるヘム依存性分解がどの様に制御されているのか、などについて、さらに検討を重ねる事により、ヘム合成系の調節機構の詳細を明らかにし、理解する事が重要であると考えられる。また、これらの結果は、ALAS1 タンパク質の過剰な発現が発症の原因となる遺伝性ポルフィリン症の新たな治療薬の開発にもつながるものと期待される。

#### 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7件)

- 1: Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S. Identification of a novel erythroid-specific enhancer for the ALAS2 gene and its loss-of-function mutation which is associated with congenital sideroblastic anemia. *Haematologica*. 2014 Feb;99(2):252-61. doi:10.3324/haematol.2013.085449. PubMed PMID: 23935018; PMCID: PMC3912954.
- 2: Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol*. 2013 Jan;92(1):1-9. doi:10.1007/s00277-012-1564-5. PMID: 22983749; PMCID: PMC3536986.
- 3: Canh Hiep N, Kinohira S, Furuyama K, Taketani S. Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. *J Biochem*. 2012 Dec;152(6):509-19. doi: 10.1093/jb/mvs097. PMID: 22923740.

- 4: Li B, Takeda K, Ishikawa K, Yoshizawa M, Sato M, Shibahara S, Furuyama K. Coordinated expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 and heme oxygenase 2: evidence for a regulatory link between glycolysis and heme catabolism. *Tohoku J Exp Med.* 2012;228(1):27-41. PMID: 22892400.
- 5: Kaneko K, Nishiyama H, Ohba K, Shibasaki A, Hirose T, Totsune K, Furuyama K, Takahashi K. Expression of (pro)renin receptor in human erythroid cell lines and its increased protein accumulation by interferon- $\gamma$ . *Peptides.* 2012Oct;37(2):285-9. doi:10.1016/j.peptides.2012.07.015. PMID: 22884881.
- 6: Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol.* 2012 Jun;40(6):477-86.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2012.01.013. PMID: 22269113.
- 7: Ohgari Y, Miyata Y, Miyagi T, Gotoh S, Ohta T, Kataoka T, Furuyama K, Taketani S. Roles of porphyrin and iron metabolisms in the  $\alpha$ -aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage of tumor cells. *Photochem Photobiol.* 2011 Sep-Oct;87(5):1138-45. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00950.x PMID: 21668870.

〔図書〕(計1件)

1. Furuyama K and Yamamoto M. Handbook of porphyrin science, volume 27, p1-39 Ferreira G.C. edited, World Scientific Publishing Co.Ltd.

〔学会発表〕(計6件)

学会発表

1. 古山和道 「ヘム鉄-プロトポルフィリン」が関与する細胞内クロストーク機構」第86回日本生化学会大会、2013年9月11日～2013年9月13日、パシフィコ横浜
2. 古山和道、金子桐子、藤原亨、張替秀郎、柴原茂樹 「ヒト赤芽球特異的 5-

アミノレブリン酸合成酵素遺伝子における新たな赤芽球特異的 エンハンサーの同定」第85回日本生化学会大会、2012年12月14日～2012年12月16日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

3. Furuyama K, Kaneko K, Fujiwara T, Harigae H, Shibahara S. 「Identification of the Novel Erythroid-Specific Enhancer in the First Intron of Human ALAS2 Gene; The Mutation Disrupting GATA Transcription Factor-Binding Site in the Enhancer Causes X-Linked Sideroblastic Anemia」54th Annual Meeting of American Society of Hematology: 2012年12月8日～2012年12月11日: Atlanta, U.S.A.

4. Senkottubelan Kadirvel, 古山和道、金子桐子、張替秀郎、柴原茂樹 「赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素のカルボキシル末端は内因性抑制ドメインとして機能する」第84回日本生化学会大会、2011年9月21日～2011年9月24日、京都国際会館

5. Rie Ohba, Kazumichi Furuyama, Atsushi Manaba, Etsuro Ito, Seiji Kojima, Keiya Ozawa, Hideo Harigae 「Characteristics of sideroblastic anemia in japan - from the analysis of multicenter study」第73回日本血液学会総会、2011年10月14日～2011年10月16日、名古屋国際会議場

6. Kiriko Kaneko, Akiko Shibasaki, Hiroshi Nishiyama, Takuo Hirose, Koji Ohba, Kazuhiro Totsune, Kazumichi Furuyama and Kazuhiro Takahashi 「Expression of (pro) renin receptor in human erythroid cell lines: the effect of interferon - gamma」第53回アメリカ血液学会総会  
発表年月日: 2011年12月10日～2011年12月13日: San Diego, U.S.A.

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.iwate-med.ac.jp/education/gakubu\\_in/basic\\_kouza/seika/](http://www.iwate-med.ac.jp/education/gakubu_in/basic_kouza/seika/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古山和道 (FURUYAMA, Kazumichi)  
岩手医科大学・医学部・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

金子桐子 (KANEKO Kiriko)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10545784

(3)連携研究者

なし