

# ピリドキサルリン酸不応性X染色体連鎖鉄芽球性貧血における赤血球型 - アミノレブリン酸合成酵素遺伝子の変異とその変異酵素に関する研究

著者	古山 和道
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54828">http://hdl.handle.net/10097/54828</a>

①

博士論文

ピリドキサーリン酸不応性X染色体連鎖鉄芽球性貧血に  
おける赤血球型 $\delta$ -アミノレブリン酸合成酵素遺伝子の変異  
とその変異酵素に関する研究

東北大学医学部第二医化学

古山 和道



## 要約

$\delta$ -アミノレブリン酸合成酵素(ALAS)はミトコンドリアにおいてヘム合成系の初発反応を触媒する酵素であるが、鉄芽球性貧血患者骨髄では本酵素の活性が低い場合が多いことが知られていた。特に、X染色体に連鎖して遺伝する型の鉄芽球性貧血(XLSA)については、赤血球型ALAS(ALAS-E)遺伝子がX染色体上にあることが明らかにされたことにより、ALAS-E遺伝子が病因である可能性が強く示唆され、実際に本酵素の補酵素であるピリドキサルリン酸(PLP)の投与で貧血が改善される症例(PLP反応性XLSA)ではALAS-E遺伝子の変異が報告されている。しかし、PLPの投与が無効の症例(PLP不応性XLSA)においてはALAS-E遺伝子の変異についての詳細な報告はない。本研究では、PLP不応性XLSAの症例のALAS-E遺伝子変異を新たに同定し、その変異により本酵素のミトコンドリアにおけるプロセッシングに異常をきたすことを実証した。さらに、この症例の骨髄細胞においては、ALAS-E活性が低下していることだけでなく、ALAS-E蛋白量も著しく減少していることを確認した。しかし、変異酵素の触媒能自体には正常酵素と比べ大きな差はみられなかった。従って、変異酵素は異常なプロセッシングを受けることによりその安定性が低下し、分解が早まるために、その減量を来すものと推察された。以上の結果より、PLP不応性XLSAにおいても本遺伝子の変異が病因になりうること、しかもこの場合のALAS-E活性低下は酵素とPLPの結合親和性の異常による機能低下ではなく、酵素量の減少が主因である可能性が高いことが明らかになった。



## 緒言

$\delta$ -アミノレブリン酸合成酵素(以下ALAS)はピリドキサルリン酸(PLP)を補酵素とし、ミトコンドリアにおいてサクシニルCoAとグリシンから $\delta$ -アミノレブリン酸を合成する反応を触媒する酵素である。本反応はヘム生合成系の初発反応であり、ALASはこの反応系において中心的な役割を担っている。ALASには赤血球系細胞を含めすべての細胞で発現している非特異型ALAS(ALAS-N)と、赤血球系細胞でのみ発現しヘモグロビンのヘムを供給することを目的としている赤血球型ALAS(ALAS-E)の2種類のアイソザイムが存在する<sup>1),2)</sup>。近年、その蛋白をコードする遺伝子がそれぞれ同定され、ヒトALAS-E遺伝子は全部で11のエクソンからなること、ヒトにおいてはALAS-N遺伝子は3p21上に、ALAS-E遺伝子はXp11.21に存在することなどが明らかにされた<sup>3)-5)</sup>。

鉄芽球性貧血は骨髄において環状鉄芽球が出現することを特徴とする疾患群であるが、発症の形式により、家族性に発症する遺伝性のものとそれ以外のものに大別されている。さらに遺伝性の中ではX染色体に連鎖して遺伝する群とそうでない群とに分類され、前者はX染色体連鎖鉄芽球性貧血(X-linked Sideroblastic Anemia:以下XLSA)と呼ばれている。一方、治療に対する反応性の違いから、ピリドキサルリン酸(pyridoxal phosphate :以下PLP)の投与に反応して貧血が改善する症例(PLP反応性)と無効の症例(PLP不応性)に分類されている<sup>6)</sup>。

鉄芽球性貧血症例の骨髄におけるALAS活性を測定した報告では、発症の形式に関わらず活性の低い例が多いこと<sup>7)-9)</sup>や、ALASの補酵素であるPLP投与に反応して貧血が改善する例が少なからず存在すること<sup>6)</sup>等から、遺伝性鉄芽球性貧血の原因としてALASが関与している可能性が指摘されていた。上記のごとくALAS-E遺伝子がX染色体上に存在することが明らかにされるに至り、特にXLSAにおけるALAS-E遺伝子の関与が注目されるようになった。実際、1992年 Cotterら<sup>10)</sup>は、PLP反応性のXLSAの男性患者のALAS-E遺伝子に点変異を見だし、この変異によりALAS-E活性は低下するもののPLPの過剰な添加により補正されることを大腸菌による発現系とin vitroの測定系を用いて示し、その症例においてはALAS-E遺伝子の変異が鉄芽球性貧血の原因であると結論した。また、1994年 Coxら<sup>11)</sup>は、別のPLP反応性XLSAの1家系においてALAS-Eの点変異が病因と関わってい



ることを指摘した。さらに数例のXLSAにおける本遺伝子の解析が報告されている<sup>12)-14)</sup>が、いずれもPLP反応性の症例についての報告で、PLP不応性XLSAの原因遺伝子についての詳細な報告はまだない。報告されているPLP不応性の遺伝性鉄芽球性貧血1例では患者のALAS-E遺伝子のプロモーターとエクソンに変異は認めず、その他の解析結果からもその症例におけるX染色体の関連性は除外されている<sup>15)</sup>。また、2例のPLP不応性XLSA患者を含む報告<sup>16)</sup>もあるが、その報告では患者骨髄のALAS活性は正常範囲内かむしろ上昇している。

本研究では、PLP不応性XLSAの原因を解明することを目的として、PLP不応性XLSA患者のALAS-E遺伝子の解析を行い、その点変異を同定した。さらに、その点変異は酵素の触媒能には大きな影響を与えず、ミトコンドリア内で切断され成熟型になる際の過程に影響していること、そのため分解されやすい不安定な成熟型酵素が形成され骨髄内での活性の低下の原因となっている可能性が高いことなどを、生化学的分子生物学的手法を用いて明らかにした。



## 症例と方法

症例：患者は日本人の男性で、18歳の時に高校の健康診断にて貧血を指摘され、広島大学原爆放射能医学研究所血液内科を受診した。受診時、身長163cm、体重50.5kgで自覚症状は無かったが、理学的所見として眼瞼結膜に貧血を認め、軽度の収縮期心雑音を聴取した。一般検査では白血球数は $5600/\text{mm}^3$ で分画に異常なく、血小板数も $356,000/\text{mm}^3$ と正常範囲内であったが、ヘモグロビン(Hb)は8.9g/dl、赤血球数(RBC)は $480 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、ヘマトクリット(Ht)は32.1%で平均赤血球容積(MCV)は62.2fl、平均ヘモグロビン濃度(MCHC)は29.0%と著しい小球性低色素性貧血を認めた。総鉄結合能は $250\mu\text{g}/\text{dl}$ であったが、血清鉄は $237\mu\text{g}/\text{dl}$ 、フェリチンは $1339.9\text{ng}/\text{ml}$ 、と高値を示していた。総ビリルビン、LDH、ハプトグロビン、HbFはいずれも正常範囲内であった。

骨髓穿刺細胞診では有核細胞数は $31.0 \times 10^4/\text{mm}^3$ と正常範囲であったが、G/E比は0.6と低値で赤芽球過形成を呈していた。顆粒球系、リンパ球系、巨核球系の細胞には形態学的な異常を認めなかったが、Prussian blue染色では赤芽球の約30%が環状鉄芽球であった。骨髓でのALAS活性は $0.84\text{nmolALA}/10^8\text{EBL}/30\text{min}$ (対照： $20.0 \pm 7.59$  (平均 $\pm$ S.D.))と低下していた。以上の検査結果より本症例は鉄芽球性貧血と診断され、ピリドキサルリン酸を最初は $200\text{mg}/\text{day}$ で10週間経口で投与され、 $120\text{mg}$ に減量後さらに4週間投与されたが貧血は改善しなかった。現在患者は20歳で、特に治療を受けずに経過観察されているが、貧血は進行していない。

患者の母親にも軽度の小球性低色素性貧血(Hb  $10.0\text{g}/\text{dl}$ 、RBC  $344 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、Ht 30.2%、MCV 87.8fl、MCHC 33.1%)を認めるが、血清鉄は $198\mu\text{g}/\text{dl}$ と正常範囲であり、上記の検査結果および臨床経過から遺伝性の鉄芽球性貧血の可能性も考え、ALAS-E遺伝子の異常の有無につき検討を行った。

患者のゲノムDNAの調製：患者および患者の母、姉の末梢血をヘパリン存在下に採血し、比重遠心法にて単核球分画を分離し、Epstein-Barr virusを用いて形質転換<sup>17)</sup>し株化した。



その後、株化したリンパ球からTurboGen™ Genomic DNA Isolation Kit(Invitrogen)を用いてゲノムDNAを調製した。

患者ALAS-E遺伝子の塩基配列の決定：当研究室の永井により単離されたヒトALAS-E遺伝子クローンにつき、プロモーター領域と11個の全エクソンの近傍のイントロンの塩基配列を決定し、第1エクソンを含んだプロモーター250bpと各エクソンを増幅できるようにプライマーを化学合成した(図1)。プロモーターと各エクソンの増幅はSaiki<sup>18)</sup>らの方法(Polymerase Chain Reaction:PCR)を一部変更して行った。実際には0.5 µgの患者ゲノムDNA、各々100 pmolのセンスおよびアンチセンスのプライマー、10 µlの10 x Tth DNA polymerase reaction buffer、各20 mmolのdNTPs mix、2.5単位のTth DNA polymeraseに蒸留水を加えて総量を100 µlとし、DNA Thermal Cycler(Parkin Elmer Cetus)を用いて、94°C 1分、53~60°C 1分、72°C 1分のサイクルを30サイクル繰り返し、DNAを増幅した。PCR産物はQIAEX agarose gel extraction kit を用いて精製し、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing KitとDNA Sequencer Model 373A(Parkin Elmer)を用いた直接塩基配列決定法によりその塩基配列を決定した。さらに、患者DNAについてはddT tailingを施したpBluescript cloning vector にサブクローニングした後、dideoxy法<sup>19)</sup>により塩基配列を確認した。

野生型および点変異を導入したALAS-EとGSTとの融合蛋白の大腸菌における発現と精製：先にクローニングしておいたALAS-EのcDNAにKunkelら<sup>20)</sup>の方法を用いて患者のゲノムDNAで認められたものと同じ部位に点変異を導入し、目的の点変異以外に変異がないことを確認した後、患者由来の変異cDNAとして用いた。野生型および変異型cDNAを、第4エクソン内のBglII siteとクローニングベクター上のBamHI siteで切断し、そのcDNA断片をpGEX-3X発現ベクター(Promega)のBam HI siteに再度クローニングし直した。その結果、この発現ベクターからは、ヒトALAS-E蛋白質の活性中心を含むコア酵素部分<sup>21)</sup>のアミノ末端側にグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)がFactor Xa認識配列を介して融合している蛋白質が産生されることが予測された。次に、このベクターを用いて



BL21 pLysS大腸菌(Novagen)を形質転換し、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン添加LB培地で定常状態になるまで37°Cにて一晚培養した。翌日、そのうちの10mlをアンピシリン添加LB培地で500mlに希釈し、さらに37°Cにて3時間培養した。次いで、最終濃度0.1mMになるようにisopropylthio- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG)を添加し、25°Cにて一晚培養した。翌日大腸菌を遠心にて集菌した後、沈殿を20mlの溶解液(50 mM HEPES/pH7.5、1 mM EDTA、5 mM DTT、0.1 % Triton X100)にて再浮遊させた後、-80°Cにて3時間以上凍結させた。凍結した大腸菌を氷上で融解し、最終濃度で各250 mg/lのDNase IとRNase A、1 mMのMgCl<sub>2</sub>を添加した後、室温に15分間放置した。これらの試料を4°Cで10,000g、30分間遠心し、その上清を限外濾過膜(0.45 $\mu\text{m}$ )を用いて濾過し、グルタチオンセファロース4Bアフィニティカラムに吸着させ、20 mlの洗浄液(50 mM HEPES/pH7.5、1 mM EDTA、5 mM DTT)にて洗浄した後、5 mmol/Lのグルタチオンを添加した洗浄液にて融合蛋白質溶液を溶出した(GST-AE:GST融合野生型ALAS-E、GST-mut:GST融合変異型ALAS-E)。この融合蛋白質溶液の一部はFactor Xaにて消化した後、再度グルタチオンセファロース4Bアフィニティカラムを用いて未消化の融合蛋白質とGSTを除去した(Xa-AE:Factor Xaで消化後の野生型ALAS-E、Xa-mut:Factor Xaで消化後の変異型ALAS-E)。それぞれの試料は-20°Cで保存し、酵素活性の測定の直前に融解した。以上の方法を用いて精製した蛋白質のALAS活性をNakakukiら<sup>22)</sup>の方法を用いて分光光度法により測定した。

**患者骨髓細胞のALAS活性の測定と免疫ブロット法によるALAS-E蛋白質の定量：**  
患者骨髓をヘパリン存在下にて採取し、その一部で有核細胞数と赤芽球比率を測定した後、1.15%KCl含有0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)にて2回洗浄し、5mlの蒸留水を加えて溶血させた後、11.5%のKClを0.5ml添加して等張液に戻した。この細胞浮遊液を44,800gで30分間遠心して得られた沈殿を1.15%のKCl溶液にて2回洗浄した後、0.25 Mのしよ糖溶液を用いてホモジェネートを作成した。これらの検体はALAS活性と蛋白質量の測定まで-80°Cにて保存した。骨髓細胞中のALAS活性の測定はAokiら<sup>9)</sup>の方法に従った。免疫ブロット法による蛋白質の定量には上記のホモジェネートの1x10<sup>5</sup>個の赤芽球に相当する量をSDSサンプルバッファー(50mM Tris-Hcl/pH6.8, 100mM DTT, 2% SDS, 10%



Glycerol, 0.1% bromophenol blue)中で3分間煮沸した後、12,000gで1分間遠心し、その上清についてLaemmli gel system<sup>23)</sup>を用いてSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、PVDF膜に蛋白質をトランスファーし、5%スキムミルクを含むTris-Buffered Saline(TBS)でブロッキングした。抗体としては、1次抗体として抗ラットALAS-Nウサギ抗体を、2次抗体としてHRP標識抗ウサギIgGヤギ抗体を用い、ECL法(Amersham)を用いてバンドを検出した。

真核細胞におけるヒトALAS-E遺伝子の一過性発現実験：真核細胞での発現実験のため、野生型と変異型のヒトALAS-EcDNAの全長をpCAGGS発現ベクター<sup>24)</sup>のEcoRI siteに組み込んだ(pCAGG-AEとpCAGG-mut)。宿主の細胞としてはウズラの線維芽細胞由来の細胞株であるQT6<sup>25)</sup>を用いた。QT6細胞株の継代には牛胎児血清(FBS)を10%になるように加えたDulbecco's Modified Eagle 培地(DMEM)を用いた。準備したQT6細胞にリン酸カルシウム法<sup>26)</sup>を用いてpCAGG-AEとpCAGG-mut、さらに導入効率の検定のためのルシフェラーゼ発現ベクターであるpGLcontrol(Promega)をそれぞれ導入し、12時間後に培地を交換した後、さらに36時間培養後スクレーパーを用いて細胞を採取した。遠心により細胞を集め、山内らの方法<sup>27)</sup>で蛋白分解酵素阻害剤の存在下にミトコンドリア画分を調製し、SDSサンプルバッファー中で3分間煮沸した後、12,000gで3分間遠心し、その上清を用いてSDS-PAGEを行い、上記の抗ラットALAS-Nウサギ抗体を用いて免疫ブロット法をおこなった。



## 結果

患者ゲノムDNAにおける変異：EB virusで患者末梢血単核球を株化して得られた細胞からゲノムDNAを調製し、上記の方法でALAS-E遺伝子のすべてのエクソンとプロモーター領域250bpの塩基配列を決定したところ、第5エクソンに含まれる第562塩基目のアデニン(A)がチミン(T)へと変異していた(A<sup>562</sup>toT;図2パネルaとb、図3)。そのほかは、すでに公表されているヒトALAS-EのcDNA<sup>28,29</sup>)と一致していた。この変異により第190番目のアスパラギン酸はバリンへと変異しているものとみられる。また患者の母親(図2パネルc)と姉のALAS-Eの第5エクソンを同様にPCR法で増幅し、直接塩基配列決定法によりその塩基配列を決定したところ、患者で同定したのと同じ点変異を持つ遺伝子と正常の塩基配列を持つ遺伝子の2つの遺伝子をヘテロで保有していることが明らかとなった。この点変異は、患者と、また相互にも血縁関係のない9人の日本人では認められなかったため、本遺伝子の多形性を示すものではなく、この患者家系に特有のものでX染色体に連鎖して遺伝しているものと考えられた。

大腸菌で発現させたALAS-E蛋白の酵素活性：本症例の点変異が酵素活性に影響を与えるかどうかについて検討するためにGSTとの融合蛋白として野生型と変異型のヒトALAS-Eを大腸菌にて発現させ、グルタチオンセファロース4Bアフィニティカラムを用いて精製し、その酵素活性を測定した(図4)。GSTと融合しているALAS-E蛋白質はALAS-E蛋白の第4エクソンの途中からカルボキシ末端にかけての部分で、Nakakukiら<sup>22</sup>)が示したパパイン消化から保護される活性中心を含んだ部分である。ここで発現させたGST融合蛋白質は、そのままでも酵素活性は測定できるが、ファクターXaでGST部を切り放した方が単位質量あたりの活性は上昇した。また、ALAS-Eの補酵素であるPLPを測定系に添加した場合の方が添加しない場合よりも活性は上昇した。しかしながら、いずれの場合も野生型と変異型の間には明らかな活性の差は認められなかった。

患者骨髄細胞のALAS-E蛋白量：患者骨髄細胞においてはALAS活性が正常の約20分の1に低下していたが、実際どれだけのALAS-E蛋白質が存在しているかを知るために、骨



髓のALAS活性を測定したものと同一試料につき、免疫ブロット法を行った。免疫ブロット法で用いた抗体は抗ラットALAS-N兔抗体であるが、この抗体がヒトALAS-E蛋白質をも認識することは、大腸菌で発現させたヒトALAS-E蛋白を認識することで確認した。ヒトALAS-E蛋白は細胞質で前駆体として合成され、ミトコンドリアに移行した後ミトコンドリア内で切断酵素によりアミノ末端の一部が除去され、成熟型としてミトコンドリアのマトリックスで機能することが知られている。ヒトALAS-E蛋白の前駆体の分子量はそのcDNAの塩基配列より64.5kであることが推定されるが、その成熟型の分子量についてはまだ知られていない。以前、Munakataら<sup>21)</sup>によりラットALAS-Eの前駆体の分子量が64kで、その成熟型の分子量は56kであることが報告されており、アミノ酸配列の相同性から考えて、ヒトALAS-E蛋白の成熟型の分子量も56k付近であると考えられた。正常な骨髓ALAS-E活性を示す鉄欠乏性貧血患者と本症例の $1 \times 10^5$ 個の赤芽球相当の骨髓試料を用いて比較してみたところ、ヒトALAS-E蛋白質と思われる56k付近のバンドの濃度は、鉄欠乏性貧血患者の約20分の1に減少していた(図5)。患者の骨髓細胞のALAS活性がやはり対照の約20分の1であることから考えると、本例における骨髓のALAS活性の低下の主な原因は、酵素自体の活性低下ではなく、ミトコンドリア内の酵素量の減少であることが推察された。

真核細胞での一過性発現蛋白：本症例の点変異が細胞内でのALAS-E酵素蛋白質の生理的修飾に影響するか否かについて検討するために、野生型と変異型のcDNAをpCAGGベクターを用いリン酸カルシウム法によりウズラの繊維芽細胞株であるQT6細胞にそれぞれ導入し、強制発現させた。野生型のcDNAを導入後のQT6細胞のミトコンドリア分画を免疫ブロット法で調べてみると、2つの主なバンドが認められた(図6:レーン2)。大きい方のバンドは約64kで、これはcDNAの塩基配列から推定したヒトALAS-E前駆体の大きさにほぼ一致していた。小さい方のバンドは約58kで、このバンドが成熟型のヒトALAS-E蛋白であると考えられた。これらの二つのバンドはpCAGGベクターを導入しないQT6細胞では認められなかった(図6:レーン1)。一方、変異型を導入したQT6細胞では、前駆体と思われるバンドの大きさには野生型との差を認めなかったが、成熟型と思われるバンドは野生型に比較して明らかに大きく、しかも2本認められ、それぞれ59.5kと59.0kであった(図6:



レーン3)。野生型に認められた58kのバンドは認められなかった。以上の結果から、本症例で認められたALAS-E遺伝子の変異は、ミトコンドリア内での前駆体のプロセッシングの過程に影響を与えているものと考えられた。

強制発現させたALASが十分な活性を有し、ミトコンドリアで機能していれば、合成されるポルフィリン量が増加しているものと期待される。そこで、これを検討する目的で、野生型と変異型のALAS-Eを発現させたQT6細胞のホモジェネート(図7:パネル a)に365nmの紫外線を照射した(図7:パネル b)ところ、ベクターを導入していないQT6細胞は特に変化がなかったが(図7:試料1)、野生型と本症例の点変異を導入したQT6細胞ではいずれも明瞭な赤色蛍光が観察された(図7、試料2と3)。ルシフェラーゼ活性を指標としてみる限り遺伝子導入効率は変異型の方が約1.5倍高いにも拘わらず、蛍光の強さはむしろ野生型の方が若干強かった。また、本症例とは別に同定したPLP反応性の鉄芽球性貧血患者の点変異を導入したQT6細胞では明らかな蛍光は観察されなかった(図7、試料4)。この蛍光を発する物質がポルフィリン体であることは容易に想像されるが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いて分析したところ、ALAS-Eを強制発現させたQT6細胞内ではウロポルフィリンとプロトポルフィリンが著増していた(表1)。いずれのポルフィリン体も対照細胞では検出されなかった。紫外線を照射した場合にみられる蛍光の強さは、導入効率を補正した場合、常に野生型の方が変異型よりも強かった。



## 考察

本研究では、PLP不応性鉄芽球性貧血の患者のALAS-E遺伝子を解析し、同遺伝子の第5エクソンにアデニンからチミンへの点変異を同定した。同じ点変異は患者の母親と姉においては野生型とヘテロで存在するが、現在までの報告例や9例の自検例ではこの部分に変異は認められていないことから、遺伝子の多形性とは考え難く、本症例は今回同定された変異に基づくXLSAであると考えられた。PLP不応性のXLSAの発症に本遺伝子が関与していることについて詳細に検討した報告は現在までなく、この報告が第1例目である。

この点変異により第190番目のアミノ酸であるアスパラギン酸がバリンへと変異するわけであるが、この変異は酸性アミノ酸から中性アミノ酸への、さらに親水性アミノ酸から疎水性アミノ酸への大きな変化であるにもかかわらず、大腸菌で発現させ精製した酵素で比較した限り、その触媒能は野生型と変わりがなかった。しかし、この変異cDNAを真核細胞で発現させて野生型と比較してみると、ミトコンドリア内での前駆体のプロセッシングの過程に影響していることが明らかとなった。点変異によりALAS-E前駆体の高次構造や荷電状態が変化し、前駆体切断酵素が基質の切断部位を正確に認識できなくなることが原因であると推察されるが、変異型で見られるような異常な修飾を受けた蛋白質は、正常の場合に比較してミトコンドリア内での安定性が低下し、早期に分解されるのではないかと考えられる。今回の強制発現させる実験では、用いた発現ベクターが強力であるため、発現させた酵素がミトコンドリア内に蓄積し、ミトコンドリア内での成熟型蛋白の不安定性を確認することはできなかった。発現の制御を受けている患者の骨髓細胞ではALAS-E蛋白量およびALAS活性の低下は顕著になるものと考えられる。

QT6細胞で強制発現させたALAS-Eがミトコンドリアに移行し機能していると考えられる根拠は、免疫ブロット法で認められた前駆体よりも小さいバンドの存在の他に、紫外線を照射した際に発する蛍光である。このQT6細胞の発する蛍光はヘム合成系の中間体のポルフィリン体であると考えられたので、HPLC法によりポルフィリン分析を行ったところ、野生型、変異型いずれの細胞中でも、対照に比較してウロポルフィリンおよびプロトポルフィリンが著増していた。ポルフィリン体はALAから合成され、ALAの一方の基質であるsuccinyl-CoAはミトコンドリアのマトリックスにのみ存在するため、このようなQT6細胞内でのポルフィリン体の蓄積は、強制発現したALASがミトコンドリアに到達し、ミト



コンドリア内で機能していることを示している。

一方、PLP不応性の患者の点変異がmRNAのスプライシングに影響を与えていないかどうかを検討するために、上記の患者骨髄サンプルから得られたmRNAを逆転写酵素によりcDNAとした後、第3エクソン上のセンスおよび第6エクソン上のアンチセンスプライマーを用いたPCRにより第4、5エクソン部分を増幅し、ヒトALAS-EcDNAの全長をプローブとしてサザンブロット法によりPCR産物の同定を行ったが、正常のプロセッシングによると考えられる大きさのバンド以外は認められなかった。以上のことから、この変異がmRNAのスプライシングの異常に関与している可能性は低いと考えられた。ノーザンブロット法によるmRNAの定量は試料の制約から実施できなかった。

免疫ブロット法により骨髄細胞で認められたALAS-E蛋白の量の低下の程度は、骨髄のALAS活性の低下の程度と合致するものであった。しかし、そのバンドの分子量(56k)はQT6細胞で発現させたヒトALAS-Eの成熟型の分子量(58k)よりやや小さい。また、QT6細胞での発現実験で見られたような成熟型の大きさの変化も認められなかった。骨髄で見られた大きさのバンドは、ALAS-Eを過剰発現させたQT6細胞から上記の方法で調整したミトコンドリア画分では認められなかったが、蛋白分解酵素阻害剤を加えずに調製した場合には、野生型、変異型いずれの検体でも56kの部位にバンドが認められた(図8)。すなわち骨髄細胞で認められたバンドは、蛋白分解酵素によりある程度部分分解を受けた後のものと考えられる。しかしながら、免疫ブロット法に用いたのと同じ骨髄サンプルに明らかにALAS活性が存在すること、そのバンド以外には活性を有するALAS-Eと考えられるバンドが認められないことから、骨髄サンプルにおける56kのバンドの濃度は骨髄細胞中のALAS-Eの量のある程度反映しているものと考えられる。

PLP反応性のXLSAについてはALAS-E遺伝子の点変異の報告が相次いでいる。PLP反応性の症例における点変異は第8、第9エクソンに集中しているが、これはALAS-E蛋白の第9エクソンの最初、全体では第411番目のアミノ酸であるリジンにPLPが補酵素として結合するためと思われる。本研究で報告しているPLP不応性の症例とは別に、新たに同定したPLP反応性の鉄芽球性貧血患者における点変異も、第9エクソン内の第1328塩基目のアデニンがグリシンに変異しており、この変異により第426アミノ酸のメチオニンがバリンへと変異していた。この変異も現在までに報告されておらず、本邦のPLP反応性の鉄芽球



性貧血における本遺伝子の変異についての最初の報告例となる。また、この変異を導入した変異遺伝子をQT6細胞で強制発現させたところ、ミトコンドリアへの移行とプロセッシングの過程は野生型と同様であるにもかかわらず、紫外線を照射しても蛍光は認められなかった(図7: 試料4)。このことから、この症例の点変異は酵素の触媒能を低下させることが考えられた。

現在までの主な報告例からは、PLP反応性の症例では第9エクソン付近に点変異があり、補酵素であるPLPの結合が妨げられるために酵素活性が低下し、大量のPLPの投与によりその活性が回復するため貧血が改善するものと考えられている例が多い。これに対してPLP不応性の症例の病因については現在までのところ明らかにされておらず、ALAS-Eの変異が病因と関与しているのかどうかさえも明らかではなかった。最近Cotterら<sup>12)</sup>は今回の症例と同じく第5エクソンに点変異を同定した症例について、大腸菌で発現させた点変異を有する蛋白を精製した際、その過程で喪失する蛋白が多いことから、その点変異が酵素の安定性に影響している可能性があるとして報告している。しかし、その症例の臨床経過を見ると明らかにPLPが有効であったと思われる時期があり、しかも大腸菌で発現させた酵素の活性は野生型と比較して低下していたが、PLPの添加によりある程度改善するため、PLP不応性の症例とは言いがたい。

本研究では、PLP反応性の症例のみならずPLP不応性の症例においてもALAS-E遺伝子の変異が病因と深く関わっていることを示した。今後、さらに症例を重ね、ALAS-E遺伝子の転写や翻訳、さらにはミトコンドリアでのプロセッシングの異常などがXLSAや他の鉄芽球性貧血の病因にどのように関わっているのかを検討して行きたい。



参考文献

1. Watanabe, N., N. Hayashi, and G. Kikuchi. 1983.  $\delta$ -aminolevulinate synthase isozymes in the liver and erythroid cells of chicken. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113:377-383.
2. Yamamoto, M., N. S. Yew, M. Federspiel, J. B. Dodgson, N. Hayashi, and J. D. Engel. 1985. Isolation of recombinant cDNAs encoding chicken erythroid  $\delta$ -aminolevulinate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3702-3706.
3. Asterin, K. H., and D. F. Bishop. 1989. Assignment of human  $\delta$ -aminolevulinate synthase (ALAS2) to the X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* 51:953-954
4. Cox, T. C., M. J. Bawden, N. G. Abraham, S. S. Bottomley, B. K. May, E. Baker, L. Z. Chen, and G. R. Sutherland. 1990. Erythroid 5-aminolevulinate synthase is located on the X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 46:107-111.
5. Cotter, P. D., H. F. Willard, J. L. Gorski, and D. F. Bishop. 1992. Assignment of human  $\delta$ -aminolevulinate synthase (ALAS2) to a distal subregion of band Xp11.21 by PCR analysis of somatic cell hybrids containing X: autosome translocations.
6. Beutler E. 1990. Hereditary and secondary acquired sideroblastic anemia. *In* Haematology 4th Edition. W. J. Williams, E. Beutler, A. J. Erslev, M. A. Lichtman, editors. McGraw-Hill, Inc. U.S.A. 554-557.
7. Takaku, F., and K. Nakao. 1971.  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase activity in erythroblasts of patients with sideroblastic anemia. *Life Sciences.* 10:721-726.
8. Tanaka, M., and H. Ohta. 1972. A case of primary acquired sideroblastic anemia with deficient  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase activity in bone marrow erythroblasts. *Tohoku J. Exp. Med.* 106:199-206.
9. Aoki, Y., G. Urata, O. Wada, and F. Takaku. 1974. Measurement of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase activity in human erythroblasts. *J. Clin. Invest.* 53:1326-1334.
10. Cotter, P. D., M. Baumann, and D. F. Bishop. 1992. Enzymatic defect in X-linked



- sideroblastic anemia: Molecular evidence for erythroid  $\delta$ -aminolevulinate synthase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4028-4032.
11. Cox, T. C., S. S. Bottomley, J. S. Wiley, M. J. Bawden, C. S. Matthews, and B. K. May. 1994. X-linked pyridoxine-responsive sideroblastic anemia due to a THR388-to-SER substitution in erythroid 5-aminolevulinate synthase. *N. Engl. J. Med.* 330:675-679.
  12. Cotter, P.D., D. L. Rucknagel, and D. F. Bishop. 1994. X-linked sideroblastic anemia: Identification of the mutation in the erythroid-specific  $\delta$ -aminolevulinate synthase gene (ALAS2) in the original described by Cooley. *Blood.* 84:3915-3924.
  13. Cotter, P. D., M. Baumann, D. L. Rucknagel, E. J. Fitzsimons, A. May, and D. F. Bishop. 1992. Heterogeneity in X-linked sideroblastic anemia due to unique mutations in the erythroid  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase gene. *The 42nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics.* :A45. (Abstr.)
  14. Bottomley, S.S., P. D. Wise, L. H. Whetsell, and F. V. Schaefer. 1993. Heterogeneity of molecular defects of erythroid 5-aminolevulinate synthase in X-linked sideroblastic anemia. *Blood.* 82:433a. (Abstr.)
  15. Jardine, P.E., P.D. Cotter, S.A. Johnson, E. J. Fitzsimons, L. Tyfield, P.W. Lunt, and D. F. Bishop. 1994. Pyridoxine-refractory congenital sideroblastic anemia with evidence for autosomal inheritance: exclusion of linkage to ALAS2 at Xp11.21 by polymorphism analysis. *J. Med. Genet.* 31:213-218.
  16. Bottomley, S. S., H. M. Healy, M. A. Brandenburg, and B. K. May. 1992. 5-aminolevulinate synthase in sideroblastic anemias. *Am. J. Hematol.* 41:76-83.
  17. Kure, R., K. Narisawa, and K. Tada. 1992. Enzymatic diagnosis of nonketotic hyperglycinemia with lymphoblasts. *J. Pediatr.* 120:95-98.
  18. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.
  19. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-



- terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:5463-5467.
20. Kunkel, T. A., J. D. Roberts, and R. A. Zakour. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154:367.
21. Munakata, H., T. Yamagami, T. Nagai, M. Yamamoto, and N. Hayashi. 1993. Activity and structure of rat erythroid-specific  $\delta$ -aminolevulinate synthase. *J. Biochem. (Tokyo)*. 114:103-111.
22. Nakakuki, M., K. Yamauchi, N. Hayashi, and G. Kikuchi. 1980. Purification and some properties of  $\delta$ -aminolevulinate synthase from the rat liver cytosol fraction and immunochemical identity of the cytosolic enzyme and the mitochondrial enzyme. *J. Biol. Chem.* 255:1738-1745.
23. Lammler, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
24. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants by a novel eukaryotic vector. *Gene*. 108:193-200.
25. Moscovici, C., M. G. Moscovici, H. Jimenez, M. M. C. Lai, M. J. Hayman, and P. K. Vogt. 1977. Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese Quail. *Cell*. 11:95-103.
26. Kingston, R. E., C. A. Chen, and H. Okayama. 1990. Calcium phosphate transfection. In *Current Protocols in molecular biology*. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, editors. Greene/Wiley, New York. 9.1.1-9.1.9.
27. Yamauchi, K., N. Hayashi, and G. Kikuchi. 1980. Translocation of  $\delta$ -aminolevulinate synthase from the cytosol to the mitochondrial and its regulation by hemin in the rat liver. *J. Biol. Chem.* 255:1746-1751.
28. Comboy, J. G., T. C. Cox, S. S. Bottomely, M. J. Bawden, and B.K. May. 1992. Human Erythroid 5-Aminolevulinate Synthase. *J. Biol. Chem.* 267:18753-18758.
29. Bishop, D.F., 1990. Two different genes encode  $\delta$ -aminolevulinate synthase in



humans: nucleotide sequences of cDNA for the housekeeping and erythroid genes.

*Nucl. Acids Res.* 18: 7187-7188.



図1：第1エクソンとその上流250bpのプロモーター領域、および2から11までの各エクソンをPCR法により増幅するためのプライマーの塩基配列。

第9エクソンは前半と後半の2つに分けて増幅した。第9エクソン前半部と第10エクソンの増幅にはそれぞれ2組のプライマーによるnested PCRを必要とした。

図2：PLP不応性XLSA患者におけるALAS-E遺伝子の点変異(直接塩基配列決定法)。正常者、患者、患者の母親のALAS-E遺伝子の第5エクソンをPCR法により増幅し、直接塩基配列決定法により塩基配列を決定した。

a：正常者、b：患者、c：患者の母親

図3：PLP不応性XLSA患者におけるALAS-E遺伝子の点変異(dideoxy法)。

正常者と患者のALAS-E遺伝子の第5エクソンをPCR法により増幅し、pBlueScriptクローニングベクターにクローニングした後、dideoxy法で塩基配列を決定した。

1：患者、2：正常者

図4：大腸菌で発現させた野生型および変異型ALAS-E蛋白の酵素活性

GST-AE：GST蛋白が結合した野生型蛋白、GST-mut：GST蛋白が結合した変異型蛋白、

Xa-AE：FactorXaでGSTを切り離した後の野生型蛋白、Xa-mut：FactorXaでGSTを切り離

した後の変異型蛋白、n.d.：not determined

図5：免疫プロット法による骨髓におけるALAS-E蛋白量の検出。

免疫プロット法により患者骨髓細胞のホモジェネートの赤芽球 $1 \times 10^5$ 相当量のなかのALAS-E蛋白を検出した。

レーン1：ラット肝ホモジェネート、レーン2：ラット網状赤血球ホモジェネート、

レーン3：K562細胞ホモジェネート、レーン4：正常ALAS活性を有する鉄欠乏性貧血患

者骨髓ホモジェネート、レーン5：PLP不応性XLSA患者骨髓ホモジェネート



#### 図 6 : QT6細胞で強制発現させたヒトALAS-E蛋白 (1)

pCAGGs発現ベクターを用いて野生型および変異型ALAS-E蛋白をQT6細胞で発現させ、蛋白分解酵素阻害剤の存在下にミトコンドリア画分を調製し、免疫ブロット法により検出した。

レーン 1 : 対照QT6細胞、レーン 2 : 野生型のALAS-E、レーン 3 : PLP不応性の変異型ALAS-E

#### 図 7 : ALAS-E発現細胞中の蛍光

野生型および変異型のALAS-EをQT6細胞中で発現させ、洗浄した細胞をポッター型ホモジェナイザーを用いて0.25Msucrose中でホモジェネートとし、365nmの紫外線を照射した。

パネル a : 紫外線照射前、パネル b : 紫外線照射時

試料 1 : 対照のQT6細胞、試料 2 : 野生型ALAS-E、試料 3 : PLP不応性の変異型ALAS-E、試料 4 : PLP反応性の変異型ALAS-E

#### 図 8 : QT6細胞で強制発現させたヒトALAS-E蛋白 (2)

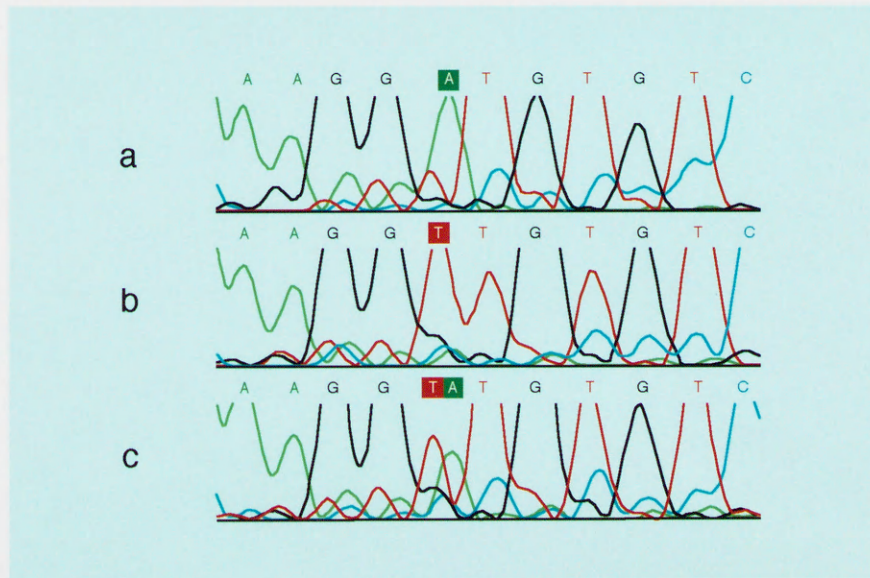
pCAGGs発現ベクターを用いて野生型および変異型ALAS-E蛋白をQT6細胞で発現させ、蛋白分解酵素阻害剤の非存在下にミトコンドリア画分を調製し、免疫ブロット法により検出した。

レーン 1 : 対照QT6細胞、レーン 2 : 野生型ALAS-E、レーン 3 : PLP反応性の変異型ALAS-E、レーン 4 : PLP不応性の変異型ALAS-E



	sense	antisense
promoter and 1 st exon	5'-GATGGTCTGATCCAAAAGCC-3'	5'-TGTGTACAGCCCTGAGAGAC-3'
2 nd exon	5'-CGAGGATCAAAGGCTTGGCT-3'	5'-GGCCAGTATAACTTGGAACT-3'
3 rd exon	5'-GGGGTACATTAGATATCAGC-3'	5'-ATTAGCCTAGCTCAGGACTG-3'
4 th exon	5'-CACATGCTTCTTTTCC-3'	5'-GATGCCTTCCCTATTCCGGT-3'
5 th exon	5'-ATACAGACTAGCCAGGAGA-3'	5'-AAGTTTCCA CTGCCAGCTCT-3'
6 th exon	5'-AACATTGACTCCCATCAAGG-3'	5'-CTGGATGCTGTATTGCA GGA-3'
7 th exon	5'-CCAGGTCAAACCTGAAGGTT-3'	5'-TTTTGTGAGACCACAACACTAG-3'
8 th exon	5'-GAAAGGTTATGATGCCTACC-3'	5'-AAGAA TTTTGTAAAGGGCCTC-3'
9 th exon	5'-CATGATCCTGTTGCTCTGGA-3'	5'-AGCGTGAGGCTCCCA GAATA-3'
5' of 9 th exon	5'-CATGATCCTGTTGCTCTGGA-3'	5'-GCA TGTGCTTGACA TTGCCGC-3'
3' of 9 th exon	5'-ACCCGTGACTTGGTGGACAT-3'	5'-AGCGTGAGGCTCCCA GAATA-3'
10 th exon	5'-ATCTGCTTAATGGAGCTAGT-3'	5'-AAACTCAGTGGTCTCTGTCC-3'
nested	5'-CCAGAGTGGCAGGTA CTGTT-3'	5'-GCTTCTCTTTCAGATCCTGG-3'
11 th exon	5'-TGGCTCATCTGTACTGTGAC-3'	5'-TGACCAACAAGTGACCTATG-3'







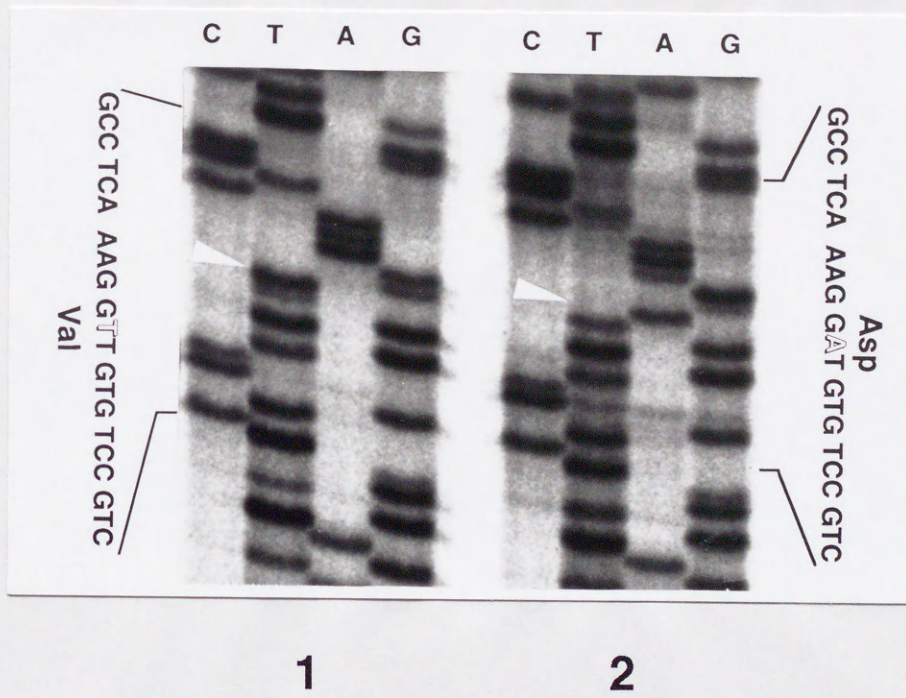




图 4

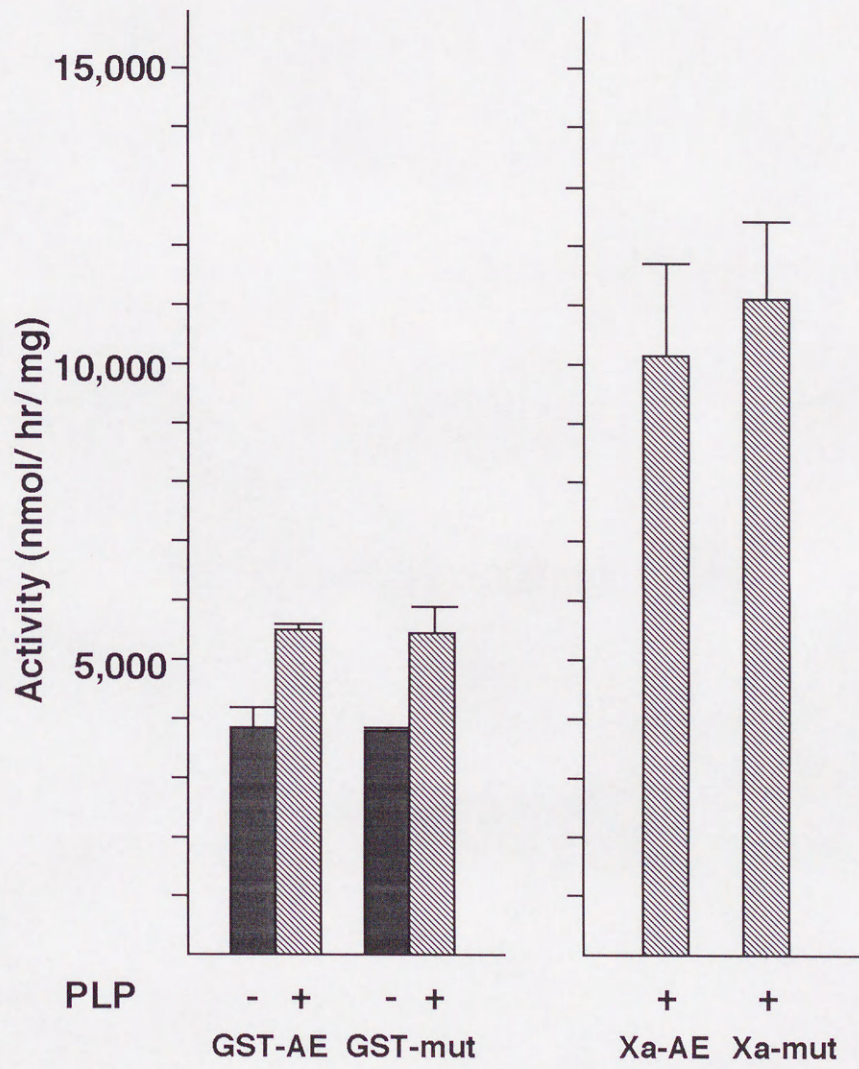




图 5

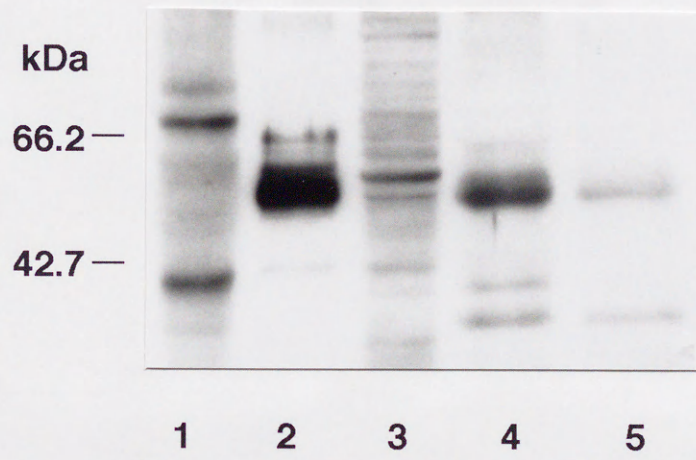
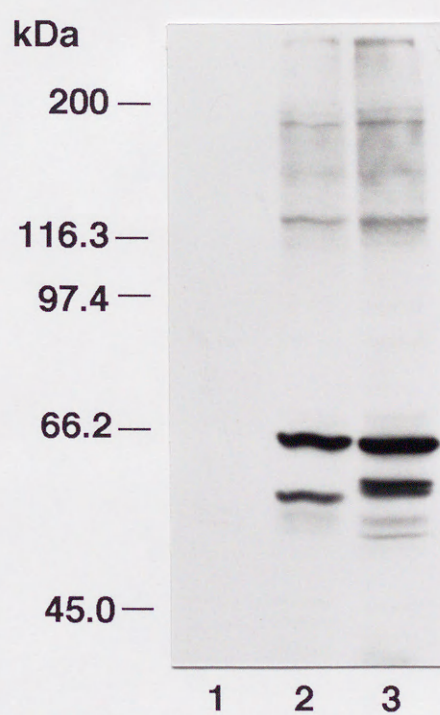


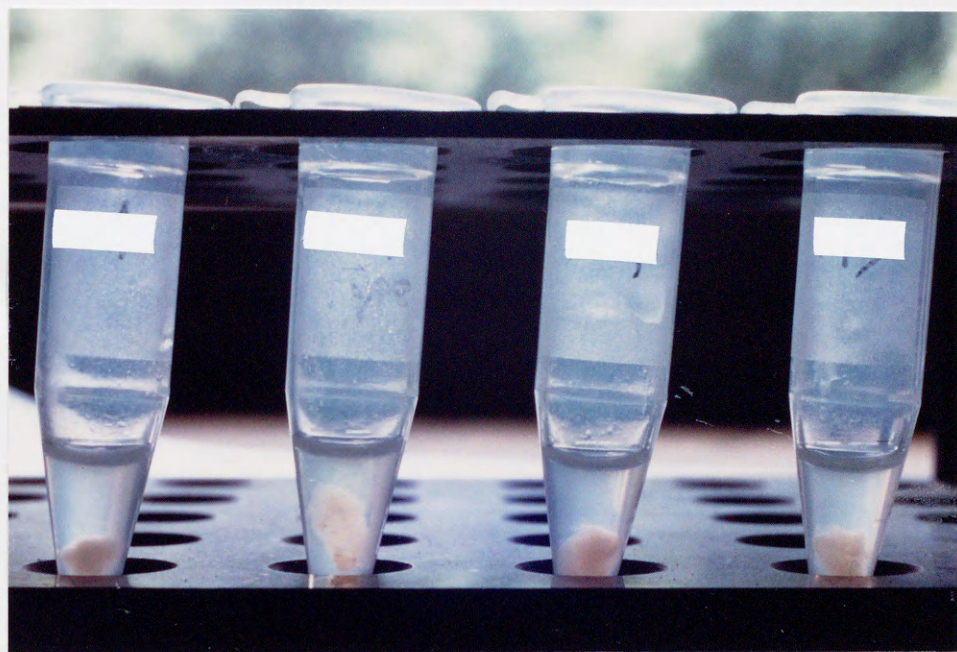


图 6





a



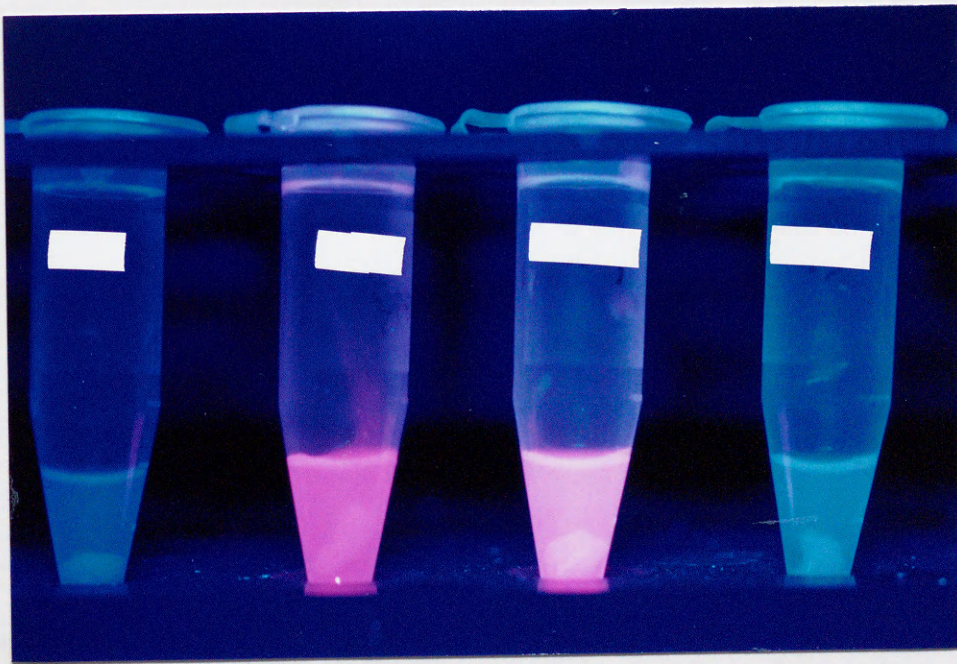
1

2

3

4

b



1

2

3

4



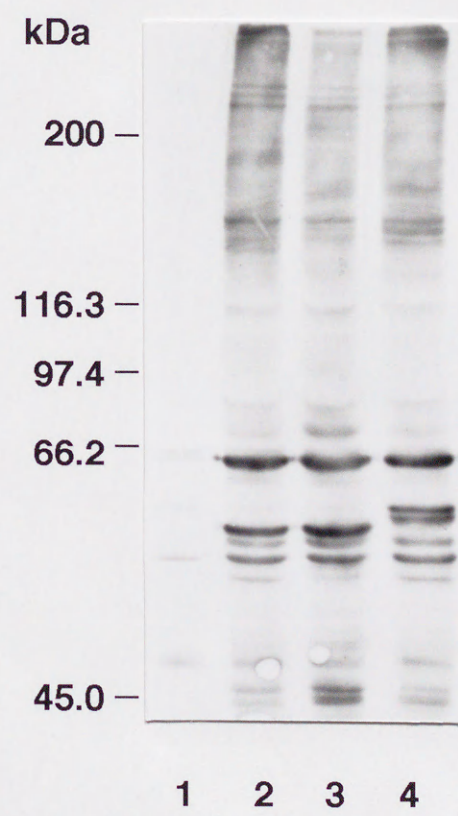




表 1. ヒトALAS-E遺伝子発現細胞株中のポルフィリン量

	Uro.	Hepta.	Copro. I	Copro. III	Proto IX
細胞ホモジネート					(ng/ml)
コントロール	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
野生型	1180.0	353.7	trace	trace	494.7
V190変異型	276.8	173.0	trace	trace	976.6
培養上清					
コントロール	0.2	n.d.	0.91	n.d.	n.d.
野生型	18.1	7.6	14.8	32.9	0.7
V190変異型	1.8	0.6	3.5	18.0	trace

Uro.: Uroporphyrin, Hepta.: Heptacarboxycoproporphyrin, Copro. I: Coproporphyrin I, Copro. III: Coproporphyrin III, Proto. IX: Protoporphyrin IX, n.d.: not detect,



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

