

## 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

古山和道, Costantine Chasama Kamata

岩手医科大学医学部, 生化学講座分子医化学分野

(Received on November 8, 2022 & Accepted on November 28, 2022)

### 要旨

赤芽球型 5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子 (ALAS2) は赤芽球におけるヘム合成の律速酵素で, その遺伝的変異は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血 (XLSA) の発症原因となることが知られている. XLSA の患者で現在までに 90 種類を超える ALAS2 遺伝子変異が報告されているが, それぞれの変異が疾

患発症の原因となっているのかを実験的に明らかにした報告は多くない. 我々は現在までに 20 種類近い変異を同定し, そのほとんどについて *in vitro* での検討結果とともに報告してきた. 本総説では自検例を中心に, XLSA の確定診断における *in vitro* 実験系の重要性を振り返りたい.

**Key words :** *erythroid-specific 5-aminolevulinic acid synthase, X-linked sideroblastic anemia*

### I. 遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子

遺伝性鉄芽球性貧血は骨髄に環状鉄芽球が見られる遺伝性の貧血症の総称で, 原因遺伝子として様々な遺伝子が報告されており, 赤芽球におけるヘム合成や鉄代謝, あるいはミトコンドリアの機能の維持に重要な遺伝子が多く含まれる (表 1). また, 遺伝性鉄芽球性貧血は患者の症状から, 貧血が主体となる非症候性遺伝性鉄芽球性貧血と, 貧血に加えて様々な全身性の症状を伴う症候性遺伝性鉄芽球性貧血に分類される (表 1). 非症候性遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子は赤芽球にのみ, あるいは赤芽球で強く発現しているもの (ALAS2,

SLC25A38) か, 鉄-硫黄クラスターをミトコンドリアのタンパク質に供給する役割を担うもの (GLRX5, HSPA9, HSCB) で, Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) では SIDBA1-SIDBA5 と分類されている (表 1). このうち最初に遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として報告されたのは, 赤芽球におけるヘム合成系の律速酵素である赤芽球型 5-アミノレブリン酸合成酵素 (erythroid-specific 5-aminolevulinic acid synthase, ALAS2) 遺伝子で<sup>1)</sup>, その変異は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血 (X-linked sideroblastic anemia, XLSA) の原因として広く知られており, 本邦でも原因遺伝子としての報告例は最も多い<sup>2)</sup>. Taylor ら<sup>3)</sup>によれば XLSA の患者でコード領域に 91 種類の変異が報告されており, そのほとんどはミスセンス変異である

Corresponding author: Kazumichi Furuyama  
furuyama@iwate-med.ac.jp

表 1. 遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子

原因遺伝子	疾患名	OMIM symbol (number)	染色体	遺伝形式	症候性
ALAS2	X-linked sideroblastic anemia (XLSA)	SIDBA1 (300751)	Xp11.21	XLR	-
SLC25A38	anemia, sideroblastic, 2, pyridoxine-refractory	SIDBA2 (205950)	3p22.1	AR	-
GLRX5	anemia, sideroblastic, 3, pyridoxine-refractory	SIDBA3 (616860)	14q32.13	AR	-
HSPA9	anemia, sideroblastic, 4	SIDBA4 (182170)	5q31.2	AD	-
HSCB	anemia, sideroblastic, 5	SIDBA5 (619523)	22q12.1	AR	-
ABCB7	anemia, sideroblastic, and spinocerebellar ataxia	ASAT (301310)	Xq13.3	XLR	+
PUS1	myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia 1	MLASA1 (600462)	12q24.33	AR	+
YARS2	myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia 2	MLASA2 (613561)	12p11.21	AR	+
LARS2	hydrops, lactic acidosis, and sideroblastic anemia	HLASA (617021)	3p21.31	AR	+
TRNT1	sideroblastic anemia with B-cell immunodeficiency, periodic fevers, and developmental delay	SIFD (616084)	3p26.2	AR	+
SLC19A2	thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome	TRMA (249270)	1q24.2	AR	+
NDUFB11	X-linked sideroblastic anemia	N/A	Xp11.3	XLR	+
MT-ATP6	myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia 3	MLASA3 (500011)	mt DNA	mt	+
mtDNA	Pearson's Marrow Pancreas syndrome (PMPS)		mt DNA	mt	+

という。藤原ら<sup>4)</sup>がまとめた XLSA の 154 家系で 72 種類の ALAS2 変異を解析したところ、最も多いのはミスセンス変異で (140 家系)、次に多いのが第一イントロンのエンハンサー領域の変異 (9 家系) で、それ以外のプロモーターの変異 (1 家系) やフレームシフト変異 (2 家系)、ナンセンス変異 (1 家系)、1 アミノ酸欠失 (1 家系) は少数であった。いずれにしても XLSA 患者で見られる ALAS2 遺伝子変異のうち最も多いのはミスセンス変異であるが、その変異は ALAS2 タンパク質の特定の領域に集中しているわけではない<sup>3)</sup>。また、XLSA 患者の約半数はビタミン B6 (ピリドキシン = ALAS2 の補酵素であるピリドキサールリン酸の前駆体) の投与により貧血が改善するとされているが、ビタミン B6 反応性と変異の位置についても明らかな関連は認められないようである<sup>3)</sup>。もっとも、正常者におけるバリエーションとして報告されていないとはいえ全ての変異について遺伝子型と表

現型との関連が確認されているわけではなく、これまで報告された遺伝子変異の全てが疾患の原因となっているかどうかは疑問も残る。では XLSA の確定診断にいたるには遺伝子変異の同定だけではなく、どのような検討が必要なのだろうか。本稿では自検例を中心に、ALAS2 遺伝子の変異 (遺伝子型) と酵素活性やヘモグロビン合成能の低下 (表現型) との関連を *in vitro* で検証する方法について以下に概説する。

## II. 遺伝子型と表現型との関連の確認方法

### 1. 転写調節領域の変異

プロモーターおよびエンハンサー領域における変異により遺伝性鉄芽球性貧血を発症する場合、ALAS2 遺伝子の転写効率が低下した結果としてタンパク質量が不足する事が発症原因となることが予想される。したがって、プロモーターアッセイを実施することにより、当該変異が転写活性低下の原因となるかどうか

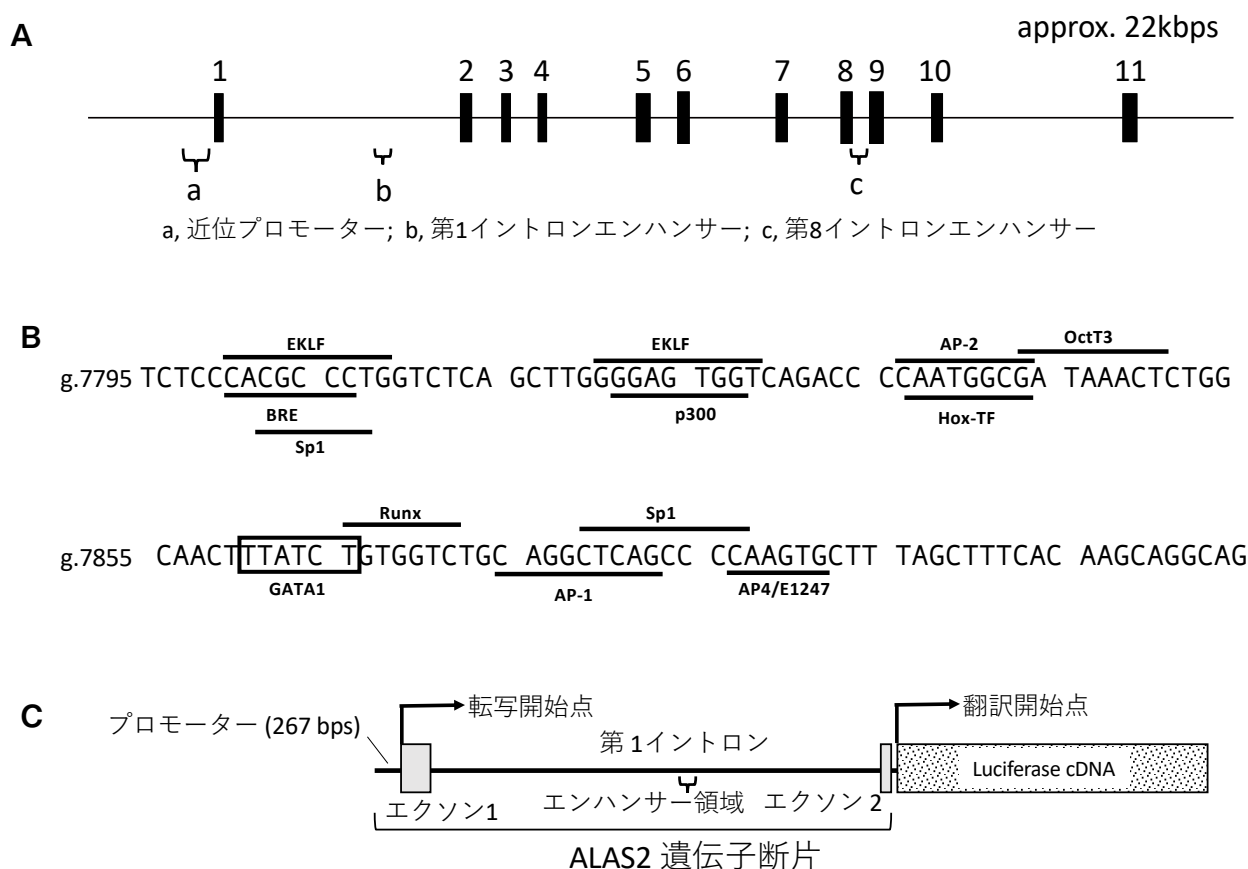


図1. ヒト ALAS2 遺伝子の構造と遺伝子発現調節領域

- A. ALAS2 遺伝子の構造と遺伝子発現調節領域の位置関係。  
 B. ALAS2 遺伝子の第1イントロンエンハンサー領域のシス配列。  
 C. プロモーターアッセイに用いたレポーターベクターの構造。

かの確認が可能である。この場合、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いたプロモーターアッセイを実施して確認することが一般的で、遺伝子発現に最低限必要なプロモーター領域も含めて転写調節領域を含めたレポーターベクターを作成して使用する。また、組織特異的な転写調節の有無を明らかにするためには当該組織に由来する培養細胞を用いて測定することが重要である。例えば ALAS2 遺伝子の場合には、ALAS2 の発現調節領域としては、近位プロモーター領域<sup>5)</sup>、第1イントロンのエンハンサー領域<sup>6)</sup>、第8イントロンのエンハンサー領域<sup>7)</sup>の3カ所が知られており(図1A)、いずれにおいて

も転写因子の GATA1 の結合配列が重要な役割を果たすことが報告されている。このうち、XLSA 患者で変異が報告されているのはプロモーター領域<sup>8)</sup>と第1イントロンのエンハンサー領域<sup>6,9)</sup>の変異のみである。後者には様々な転写調節因子のシス配列が含まれるが(図1B)、赤芽球特異的な転写因子である GATA1 の結合配列を中心に点変異あるいは欠失変異が XLSA 患者で同定されている(表2)。我々は ALAS2 遺伝子の第1イントロンのエンハンサー機能を明らかにし、さらには XLSA 患者で同定された変異の影響を明らかにすることを目的に、野生型の ALAS2 遺伝子プロモーターと野生型あるいは変異型の第

表 2. ALAS2 遺伝子の第 1 イントロンのエンハンサー配列で同定された変異

	塩基配列	プロモーター活性 (K562 細胞)	家系数	文献
野生型	--cctgcagaccacaGATAaagttgccagagtttatcgccattggggt--	100%		
GGTA 変異	--cctgcagaccacaGGTAaagttgccagagtttatcgccattggggt--	17%	5	6), 9)
delGATA 変異	--cctgcag-----gggt--	10.5%	1	6)
GACA 変異	--cctgcagaccacaGACAaagttgccagagtttatcgccattggggt--	n.d.	1	9)
CATA 変異	--cctgcagaccacaCATAaagttgccagagtttatcgccattggggt--	n.d.	1	9)
AATA 変異	--cctgcagaccacaAATAaagttgccagagtttatcgccattggggt--	n.d.	1	未発表

1 イントロンエンハンサーを組み合わせてホタルシフェラーゼをレポーター遺伝子として発現させるレポータープラスミドを作成し(図 1C), 赤芽球系培養細胞の K562 細胞に導入してその活性を測定した<sup>6)</sup>. GATA1 の結合配列のコンセンサス配列は A/GGATAA/T10) とされているが, 患者の ALAS2 遺伝子の第 1 イントロンエンハンサーではコンセンサス配列の全てを含んだ 35 塩基対の欠失変異のみならず, コンセンサス配列の AGATAA が AGGTAA に 1 塩基が置換されただけでも当該領域における GATA1 転写因子の結合はほぼ完全に阻害され<sup>6)</sup>, かつプロモーター活性も 1/5 以下に低下していた(表 2). 一方, このコンストラクトのプロモーター活性は線維芽細胞では野生型と変異型の間でほとんど差がなかったことから, 同エンハンサーが赤芽球特異的に ALAS2 遺伝子の転写活性を調節していることは明らかで, ALAS2 遺伝子の第 1 イントロンのエンハンサー領域の GATA1 結合配列が ALAS2 遺伝子の赤芽球特異的発現に重要な役割を果たすことが明らかとなった. さらには同領域に変異を有する XLSA 患者骨髄における ALAS2 mRNA の発現レベルが正常対象の 15% 未満に低下していたこと<sup>6)</sup>とも合わせて, XLSA 患者で同定された同部の変異が XLSA の発症原因になりうると結論づけた.

## 2. コード領域における変異と組換えタンパク質を用いた酵素活性の測定

アミノ酸置換を伴うと予想されるコード領域の変異の場合, cDNA に当該変異を導入して glutathione S-transferase (GST), maltose binding protein (MBP) などとの融合タンパク質として大腸菌で発現させ, GST 融合タンパク質であれば glutathione sepharose, MBP 融合タンパク質であれば amylose resin を利用して精製した後に酵素活性を測定することにより, 当該変異が酵素活性に直接影響するかどうかを明らかにすることができる. 我々は XLSA 患者で同定された遺伝子変異に由来する 13 種類の変異酵素を主に GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させて精製し, 酵素活性を測定した<sup>11-16)</sup>(図 2). その結果, 13 種類中 9 種類の変異酵素の活性は, 補酵素である pyridoxal phosphate (PLP) を酵素活性測定系に添加した状態 (PLP 存在下), あるいは添加しなかった状態 (PLP 非存在下) のいずれかあるいは両方で野生型と比較して酵素活性が低下していることを確認した. 一方, 3 種類の変異酵素 (p.Asp190Val, p.Arg452Cys, p.Arg452His) は野生型とほぼ同等の酵素活性で, p.Val562Ala 変異を有する酵素は野生型よりも高い活性を示した. p.Val562Ala 変異を有する患者試料は入手できなかったため, doxycycline の添加量

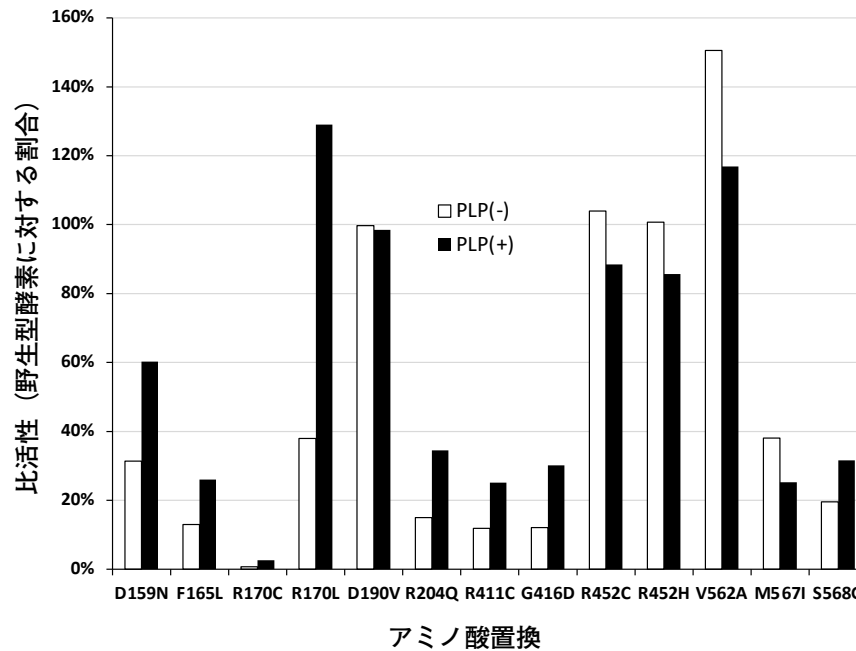


図2. ミスセンス変異を導入した組換え ALAS2 タンパク質の酵素活性  
野生型酵素の活性を 100% とした場合の比活性で示す. PLP(-) は Pyridoxal phosphate (PLP) 非添加条件下での酵素活性. PLP(+) は PLP 添加条件下での酵素活性.  
D159N, p.Asp159Asn; F165L, Phe165Leu; R170C, p.Arg170Cys; R170L, p.Arg170Leu; D190V, p.Asp190Val; R204Q, p.Arg204Gln; R411C, p.Arg411Cys; R411H, p.Arg411His; G416D, p.Gly416Asp; R452C, p.Arg452Cys; R452H, p.Arg452His; V562A, p.Val562Ala; M567I, p.Met567Ile; S568G, p.Ser568Gly

により転写量が調節できる培養細胞を用いて野生型の ALAS2 cDNA と p.Val562Ala 変異を持つ cDNA を線維芽細胞中ではほぼ同レベルで発現させたところ, mRNA の発現量が同じでもタンパク質量は変異型の方が少なかったことから, タンパク質の細胞内での安定性が低下しているものと推察した<sup>16)</sup>. 一方, 野生型とほぼ同等の酵素活性を示す p.Asp190Val, p.Arg452Cys, p.Arg452His の3種類の変異のうち p.Asp190Val 変異酵素は ATP 特異的 succinyl CoA 合成酵素  $\beta$  サブユニット (SUCLA2) との複合体の形成ができないことが報告されており<sup>11)</sup>, 複合体形成の異常が貧血発症の原因の1つと推察されている. さらに Bishop ら<sup>17)</sup> は, p.Met567Val や p.Ser568Gly 変異酵素も SUCLA2 との結

合能が低下していることを報告している. また, p.Arg452Cys, p.Arg452His については Bishop らの検討<sup>17)</sup> によれば, 大過剰の基質の存在下では酵素活性は低下しないが, 詳細にカイネティクスを調べてみると, succinyl CoA および補酵素である PLP との親和性がこれらの変異酵素では低下しており, そのことが発症と関与しているらしい. 以上をまとめると, 変異型組換えタンパク質の酵素活性が低い場合には当該遺伝子変異が発症原因と考えると差し支えがないと思われるが, 時間当たりの酵素活性が正常あるいは高値の場合には, 一部の基質との親和性の低下や細胞内におけるタンパク質の安定性, あるいは他の分子との複合体の形成に影響している可能性が高いと考えられ, さらに詳細な検討が必要と

思われる。

### 3. 疾患モデル細胞の樹立

プロモーターアッセイを用いた場合でも、組換えタンパク質を用いた場合でも、症状や家系内の有病者を検索することにより当該変異が発症原因である可能性を高い確率で推定することが可能だが、遺伝子変異と表現型（症状など）の直接的な関連を断定することは困難である。それゆえに、疾患モデル動物の作成を通して遺伝子変異と遺伝性疾患との関連を直接的に証明する試みが行われている。XLSA に関して ALAS2 遺伝子の knock-out マウス<sup>18, 19)</sup> やゼブラフィッシュ<sup>20)</sup> を用いたモデル生物が作成され病態の解析に利用されてきたが、貧血は観察されても典型的な環状鉄芽球を観察することは困難であった。その原因としては、マウスにおいては ALAS2 遺伝子の完全な欠失が胎生致死であったことと、ゼブラフィッシュにおいては鉄の代謝機構がヒトとは大きく異なることが影響していると考えられた。一方、近年のゲノム編集技術の普及は、培養細胞を用いてモデル細胞を樹立することを可能とした。実際、我々は CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を利用して臍帯血由来の赤芽球系培養細胞（HUDEP-2 細胞）の ALAS2 遺伝子のエンハンサー領域に変異を導入し、赤血球に分化させることにより、環状鉄芽球を *in vitro* で観察することに世界で初めて成功し、これにより、ALAS2 遺伝子第1イントロンのエンハンサー内の GATA 結合配列の変異により環状鉄芽球が形成されうることを証明した<sup>21)</sup>。その後、同様に ALAS2 遺伝子のエンハンサーに変異を導入した iPS 細胞由来の赤芽球系培養細胞を用いて *in vitro* で環状鉄芽球が観察されることが報告され<sup>22)</sup>、さらには CRISPR/Cas9 と鋳型 DNA を同時に細胞内に導入して部位特異的相同組み換えを誘発する方法により ALAS2 遺伝子にミスセンス変異

を挿入したモデル細胞を樹立することが可能である事も報告されている<sup>23)</sup>。

### III. まとめ

遺伝子変異と表現系との関連を *in vitro* で明らかにするには様々な方法が用いられるが、現在までの ALAS2 遺伝子変異と XLSA との関連を明らかにする方法について我々の行ってきた試みを中心に概説した。XLSA については ALAS2 遺伝子の機能欠失型変異により発症することはほぼ疑いないと考えられているので、いずれかの方法により機能欠失型変異であること（プロモーター活性の低下、あるいは酵素活性の低下や遺伝子産物の半減期の短縮、など）が証明できれば確定診断として良いのではないかと考えている。ただし、酵素活性については ALAS2 タンパク質の C 末端の約 30 アミノ酸が酵素活性の抑制機能を持つこと<sup>16, 24)</sup> が報告されていることなどから、C 末端の欠失が遺伝子組換えタンパク質の酵素活性に大きく影響する可能性があり注意が必要である。特に、N 末端に精製の GST ペプチドや MBP ペプチドを用いた場合には精製の過程で C 末端が限定分解を受けることが少なからず認められた（未発表データ）ため、現在我々は ALAS2 タンパク質の C 末端を保護する形で精製を進めることが可能で、最終的には余分なペプチドをほとんど含まない組換えタンパク質が得られる方法を用いて組換えタンパク質を精製し、酵素活性の測定を行っている<sup>16)</sup>。可能であれば、以前に測定した変異酵素もこの方法で精製した組換えタンパク質を用いて酵素活性を測定してみたいと考えている。

ゲノム編集を用いたモデル細胞の作成は今後さらに様々な疾患で実施されるものと期待される。既に述べたように XLSA のモデル細胞の樹立は複数のグループから報告されており、XLSA の病態の解析に利用されている。

例えば、脱核するまでの分化誘導は困難ながん細胞由来の K562 細胞を用いた場合には環状鉄芽球は観察されず、脱核するまで分化誘導が可能な非腫瘍性の培養細胞 (HUDEP2 細胞) を用いて赤芽球から赤血球に向けての分化誘導を行った場合にのみ環状鉄芽球の観察が可能であったこと<sup>21)</sup>から、赤芽球の分化過程の比較的後期においてヘモグロビンの合成のために大量の鉄が細胞内に取り込まれることが環状鉄芽球の形成には必要であると推測される。また、環状鉄芽球を形成した細胞は鉄が関与する細胞死 (ferroptosis) を起こしやすい可能性が、やはりモデル細胞を用いた実験により指摘されている<sup>23)</sup>。このようにモデル細胞を用いた XLSA の病態の解析はすでに進められているが、我々や他のグループが確立したモデル細胞の樹立方法は、ALAS2 遺伝子のみならず遺伝性鉄芽球性貧血の他の原因遺伝子の変異が環状鉄芽球の形成と直接的に関連するか否かの解析にも有用であると予想され、さらには鉄芽球性貧血のみならず、様々な遺伝性の赤芽球系疾患の病態や治療法

の開発に資するものと期待されている。しかしながらモデル細胞の樹立には時間がかかること、あるいはモデル細胞に利用できる培養細胞は今のところ女性由来の細胞しかない (主に男性で発症する XLSA などの場合には最適なモデルとは言い難い) ことなど、今後さらに解決すべき問題も少なくない。現時点では変異の種類に適した方法で機能喪失型変異であることを確認していくのが現実的であると考えている。

本総説の作成にあたり、継続的に議論をしてくださった岩手医科大学生化学講座分子医化学分野の久保田美子准教授、金子桐子講師、鈴木 亘助教と研究環境の整備に尽力してくださっている秘書の澤田奈穂子さんに心から感謝致します。

本総説の作成は厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患政策研究事業・遺伝性骨髄不全症、文部科学省科学研究費補助金・基盤研究 C (21K06874) の補助を受けて行われた。

利益相反：著者らに開示すべき利益相反はない。

## References

- 1) **Cotter PD, Baumann M and Bishop DF:** Enzymatic defect in "X-linked" sideroblastic anemia: molecular evidence for erythroid delta-aminolevulinate synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4028-4032, 1992.
- 2) **Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, et al.:** Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol* **92**, 1-9, 2013.
- 3) **Taylor JL and Brown BL:** Structural basis for dysregulation of aminolevulinic acid synthase in human disease. *J Biol Chem* **298**, 101643, 2022.
- 4) **藤原 亨:** 鉄芽球性貧血に関する最新の知見. *臨床血液* **63**, 600-607, 2022.
- 5) **Surinya KH, Cox TC and May BK:** Transcriptional regulation of the human erythroid 5-aminolevulinate synthase gene. Identification of promoter elements and role of regulatory proteins. *J Biol Chem* **272**, 26585-26594, 1997.
- 6) **Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, et al.:** 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* **99**, 252-261, 2014.
- 7) **Surinya KH, Cox TC and May BK:** Identification and characterization of a conserved erythroid-specific enhancer located in intron 8 of the human 5-aminolevulinate synthase 2 gene. *J Biol Chem* **273**, 16798-16809, 1998.
- 8) **Bekri S, May A, Cotter PD, et al.:** A promoter mutation in the erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) gene causes X-linked sideroblastic anemia. *Blood* **102**, 698-704, 2003.
- 9) **Campagna DR, de Bie CI, Schmitz-Abe K, et al.:** X-linked sideroblastic anemia due to ALAS2 intron 1 enhancer element GATA-binding site

- mutations. *Am J Hematol* **89**, 315-319, 2014.
- 10) **Merika M and Orkin SH**: Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol* **15**, 2437-2447, 1995.
  - 11) **Furuyama K, Fujita H, Nagai T, et al.**: Pyridoxine refractory X-linked sideroblastic anemia caused by a point mutation in the erythroid 5-aminolevulinate synthase gene. *Blood* **90**, 822-830, 1997.
  - 12) **Furuyama K, Uno R, Urabe A, et al.**: R411C mutation of the ALAS2 gene encodes a pyridoxine-responsive enzyme with low activity. *Br J Haematol* **103**, 839-841, 1998.
  - 13) **Harigae H, Furuyama K, Kimura A, et al.**: A novel mutation of the erythroid-specific delta-aminolaevulinate synthase gene in a patient with X-linked sideroblastic anaemia. *Br J Haematol* **106**, 175-177, 1999.
  - 14) **Furuyama K, Harigae H, Kinoshita C, et al.**: Late-onset X-linked sideroblastic anemia following hemodialysis. *Blood* **101**, 4623-4624, 2003.
  - 15) **Furuyama K, Harigae H, Heller T, et al.**: Arg452 substitution of the erythroid-specific 5-aminolaevulinate synthase, a hot spot mutation in X-linked sideroblastic anaemia, does not itself affect enzyme activity. *Eur J Haematol* **76**, 33-41, 2006.
  - 16) **Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, et al.**: The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol* **40**, 477-486 e471, 2012.
  - 17) **Bishop DF, Tchaikovskii V, Hoffbrand AV, et al.**: X-linked sideroblastic anemia due to carboxyl-terminal ALAS2 mutations that cause loss of binding to the beta-subunit of succinyl-CoA synthetase (SUCLA2). *J Biol Chem* **287**, 28943-28955, 2012.
  - 18) **Nakajima O, Takahashi S, Harigae H, et al.**: Heme deficiency in erythroid lineage causes differentiation arrest and cytoplasmic iron overload. *EMBO J* **18**, 6282-6289, 1999.
  - 19) **Harigae H, Nakajima O, Suwabe N, et al.**: Aberrant iron accumulation and oxidized status of erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase (ALAS2)-deficient definitive erythroblasts. *Blood* **101**, 1188-1193, 2003.
  - 20) **Brownlie A, Donovan A, Pratt SJ, et al.**: Positional cloning of the zebrafish sauterne gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nat Genet* **20**, 244-250, 1998.
  - 21) **Kaneko K, Kubota Y, Nomura K, et al.**: Establishment of a cell model of X-linked sideroblastic anemia using genome editing. *Exp Hematol* **65**, 57-68 e52, 2018.
  - 22) **Saito K, Fujiwara T, Hatta S, et al.**: Generation and molecular characterization of human ring sideroblasts: a key role of ferrous iron in terminal erythroid differentiation and ring sideroblast formation. *Mol Cell Biol* **39**, e00387-18, 2019.
  - 23) **Ono K, Fujiwara T, Saito K, et al.**: Congenital sideroblastic anemia model due to ALAS2 mutation is susceptible to ferroptosis. *Sci Rep* **12**, 9024, 2022.
  - 24) **Whatley SD, Ducamp S, Gouya L, et al.**: C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am J Hum Genet* **83**, 408-414, 2008.



*In vitro* analyses for the diagnosis of  
congenital sideroblastic anemia

Kazumichi FURUYAMA and Costantine Chasama KAMATA

Department of Molecular Biochemistry, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

*(Received on November 8, 2022 & Accepted on November 28, 2022)*

Abstract

---

Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) is the rate-limiting enzyme for heme biosynthesis in erythroid cells, and the genetic mutations cause X-linked sideroblastic anemia. Although more than 90 kinds of genetic mutation of the gene have been reported previously, the genotype-phenotype relationship has experimentally examined only a part of these cases. We have

previously identified approximately 20 kinds of mutation of the ALAS2 gene in patients with X-linked sideroblastic anemia and have reported them with experimental data as the cause of the disease. In this review article, we will discuss the role of *in vitro* analysis in diagnosing congenital sideroblastic anemia.

---