

授与番号	甲第 1920 号
------	-----------

## 論文内容の要旨

Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase is stabilized by HSPA9 in  
mitochondrial matrix

(赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素はミトコンドリアマトリクスで HSPA9 により安定化される)

(Costantine Chasama Kamata, 久保田美子, 古山和道)  
(岩手医学雑誌 75 巻, 2 号 令和 5 年 6 月掲載予定)

### I. 研究目的

5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS) はヘム生合成系の律速酵素で, 全ての細胞で発現する ALAS1 と, 赤芽球特異的に発現する ALAS2 の 2 つのアイソザイムが存在する. ALAS1 の発現は最終産物のヘムにより抑制されるが, ALAS2 ではそのような制御は知られていない. 本研究では, ヘムが過剰なはずの赤芽球でも ALAS2 が安定に発現するメカニズムについて明らかにすることを目的に研究を実施した.

### II. 研究対象ならび方法

まず, ALAS2 タンパク質と FLAG-tag との融合タンパク質 (ALAS2F) の発現カセットを構築し, ドキシサイクリン (DOX) 誘導性に発現を誘導できる培養細胞株 (FT293) に導入した. そのようにして DOX 誘導性に ALAS2F を発現する培養細胞株 (FT293<sup>ALAS2F</sup>) を樹立した. 同様に ALAS1 と FLAG-tag の融合タンパク質である ALAS1F を DOX 誘導性に発現する培養細胞株 (FT293<sup>ALAS1F</sup>) を用いて, ヘム過剰条件下での ALAS1F と ALAS2F の半減期を測定した. また, 免疫沈降と質量分析により ALAS2F タンパク質と複合体を形成するタンパク質を同定し, ALAS2F の安定性に寄与する可能性が高いタンパク質を選択した. さらに, siRNA や特異的阻害剤を用いて当該タンパク質の発現や機能を抑制し, ALAS2F の発現や半減期への影響の有無について検討を行った.

### III. 研究結果

ヘム過剰条件下における ALAS1F タンパク質の半減期が 30 分未満であったのに対して ALAS2F の半減期は約 3.5 時間であった. また, ALAS2F と複合体を形成するタンパク質としてミトコンドリアに局在するシャペロンタンパク質である HSPA9 が同定されたため,

ALAS2F の安定化における HSPA9 の役割についてさらに検討を行った。その結果、siRNA を用いて HSPA9 の発現を抑制したり、HSPA9 の特異的阻害剤として知られる MKT-077 で FT293<sup>ALAS2F</sup> を処理すると、mRNA の発現量は減少していないにも関わらず、ALAS2F タンパク質の発現量が低下した。また siRNA を用いて HSPA9 の発現量を低下させた状態では、ヘム過剰条件下における ALAS2F の半減期は約 1 時間に短縮した。これらの結果から、HSPA9 は ALAS2F の安定化に寄与している可能性が高いと考えられた。一方、ALAS2 タンパク質が発現している赤芽球でどのようなタンパク質と複合体を形成しているのかについての情報は得られておらず、今後、赤芽球においても HSPA9 が ALAS2 タンパク質の安定化に寄与しているのかどうかについて、さらに検討する必要がある。

#### IV. 結語

ALAS2 と複合体を形成し、ALAS2 タンパク質の安定化、ひいてはヘモグロビンの合成に寄与するタンパク質としてミトコンドリアマトリクスに局在するシャペロンタンパク質である HSPA9 を同定し、その役割について、siRNA や特異的阻害剤を用いて明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 伊藤 薫樹 (内科学講座：血液腫瘍内科分野)  
副査 教授 平 英一 (薬理学講座：情報伝達医学分野)  
副査 教授 前沢 千早 (医療開発研究部門：腫瘍生物学分野)

本論文は、赤芽球特異的5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS)であるALAS2がミトコンドリアに存在するシャペロン蛋白の一つであるHSPA9と結合することを、独自に樹立したドキシサイクリン誘導型の融合蛋白発現細胞株を用いて免疫沈降法と質量分析により明らかにした。HSPA9の機能を明らかにするためにHSPA9の発現を分子遺伝学および薬理的に抑制するとALAS2の半減期が短縮する一方で、ALAS2の転写自体の低下は認めなかった。以上から、HSPA9はALAS2と複合体を形成することにより、ALAS2の安定性の維持に寄与する可能性が示唆された。これまでHSPA9がALAS2と複合体を形成し、ALAS2の安定化維持に寄与するという報告はなく、新規性の高い研究である。今後、赤芽球系細胞株などを用いた系特異的な検証が期待される。

## 試験・試問の結果の要旨

種々の分子遺伝学的・生化学的研究手法、結果の解釈および今後の方向性や臨床病態との関連性について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

## 参考論文

- 1) 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 (古山和道と共著). 岩手医学雑誌 75 巻, 1 号 (2023 年 4 月掲載予定)
- 2) 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 (古山和道, 他 1 名と共著). 岩手医学雑誌 75 巻, 2 号 (2023 年 6 月掲載予定)