

## 赤芽球特異的 5- アミノレブリン酸合成酵素の 遺伝子変異と疾患

古山和道

岩手医科大学医学部, 生化学講座: 分子医化学分野教授

(Received on March 9, 2015 & Accepted on March 12, 2015)

### 要旨

5-アミノレブリン酸合成酵素 (5-aminolevulinate synthase: ALAS) はヘム生合成の初発反応を触媒する酵素で, 全ての細胞で発現する ALAS1 と赤芽球でのみ発現する ALAS2 の二種類のアイソザイムが存在する. 現在までのところ ALAS1 の遺伝子変異

による疾患は報告されていないが, ALAS2 遺伝子の変異は鉄芽球性貧血と骨髄性プロトポルフィリン症という二つの異なる疾患の原因となることが知られている. 本稿においては, ALAS2 遺伝子の変異に伴うこれらの疾患の発症機序について概説する.

*Key words* : 5-aminolevulinate synthase, heme, porphyria, sideroblastic anemia

### I. ヘム生合成と組織特異的調節

ヘムは動物の全ての細胞で合成される必須の分子で, 様々なタンパク質の補欠分子として機能するだけではなく, 転写, 翻訳, miRNA のプロセッシングにかかわるなど, その役割は多岐にわたる<sup>1)</sup>. ヘムは 8 つの酵素による連続的な反応により合成されるが, 最初の酵素である ALAS と最後の 3 つの酵素はミトコンドリアに局在する (図 1). 従って, ミトコンドリアでグリシンとスクシニル CoA を基質として ALAS により産生されたアミノレブリン酸 (5-aminolevulinate: ALA) は細胞質に移行し, 細胞質で 4 つの酵素による反応を経て coproporphyrinogen III として再びミトコンドリアに戻り, 最終的にはフェロケラターゼ (FECH) によりプロトポルフィリン IX に二価の鉄が挿入されてヘムが合成される. ヘム生合成系の律速段階は ALAS が触媒する反応であると考えられており<sup>2)</sup>, 細胞内のヘム量を適切なレベルに維持するために ALAS の発現は転

写, 翻訳, ミトコンドリア移行の各段階で調節されている<sup>3)</sup>. ALAS には赤芽球も含め全ての細胞で発現する ALAS1 と骨髄の赤芽球でのみ発現する ALAS2 の二つのアイソザイムが存在する. ヒトでは ALAS1 遺伝子は 3 番染色体, ALAS2 遺伝子は X 染色体上にマップされており, どちらも細胞質で翻訳された後にミトコンドリアのマトリクスに移行して反応を触媒するミトコンドリアタンパク質であるが, 全く異なる発現制御を受けている<sup>3)</sup>. 中でも大きな相違は, ALAS1 が細胞内のヘム量を一定に保つため最終産物のヘムによりその発現が強く抑制されるのに対して, ALAS2 では ALAS1 で見られる様な feedback 制御は明らかではないという点である. これは, 赤芽球以外の細胞では過剰な遊離ヘム (タンパク質等に結合していないヘム) は酸化ストレスの原因となるため生成が厳密に制御されなければならないのに対し, 赤芽球では分化に伴いヘモグロビンの十分な合成のために多量のヘムが必要となり, 生成された

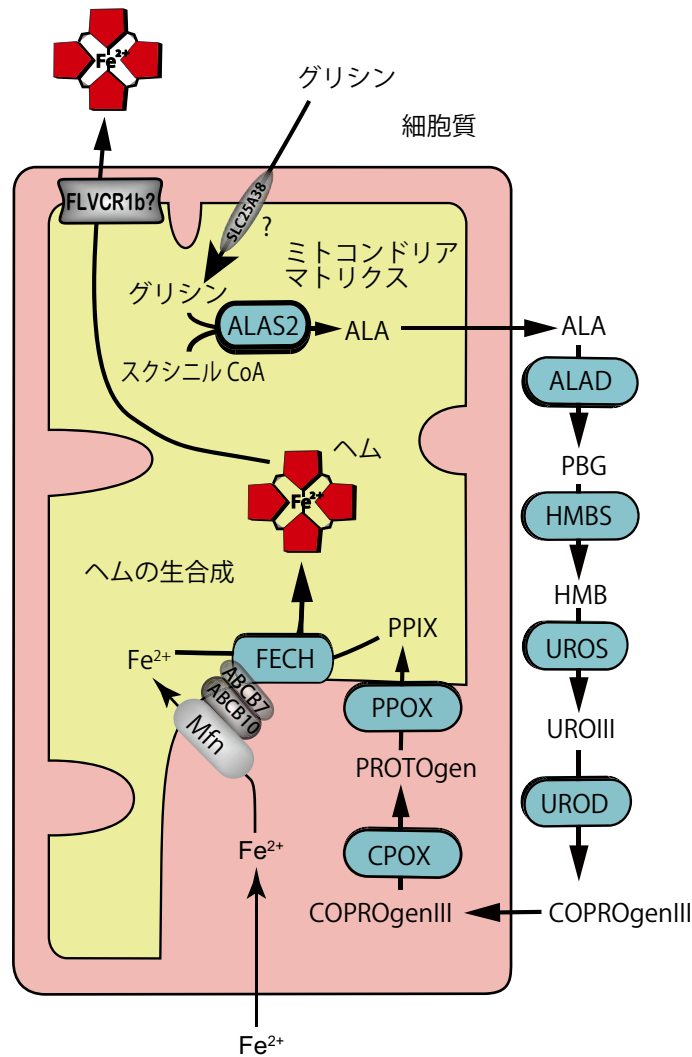


図1. 赤芽球におけるヘム生合成機構

矢印上には酵素名あるいはトランスポーター名を示す。矢印の起点および終点には酵素の基質と生成物、あるいは輸送される分子名を示す。

酵素名 ALAS2, erythroid-specific 5-aminolevulinatase synthase; ALAD, 5-aminolevulinatase dehydratase; HMBS, hydroxymethylbilane synthase (別名 PBGD, porphobilinogen deaminase); UROS, uroporphyrinogen III synthase; UROD, uroporphyrinogen decarboxylase; CPOX, coproporphyrinogen oxidase; PPOX, protoporphyrinogen oxidase; FECH, ferrochelatase  
基質・生成物名 ALA, aminolevulinic acid; PBG, porphobilinogen; HMB, hydroxymethylbilane; UROIII, uroporphyrinogen III; COPROgenIII, coproporphyrinogen III; PROTOgen, protoporphyrinogen IX; PPIX, protoporphyrin IX

トランスポーター名 Mfn, mitoferrin 1; ABCB7, ATP-binding cassette subgroup B member 7; ABCB10, ATP-binding cassette subgroup B member 10; SLC25A38, solute carrier family 25 subgroup A member 38; FLVCR1b, feline leukemia virus C receptor type 1b

ヘムはほぼ全てグロビンと結合してヘモグロビンとなり、余った場合でも細胞膜におけるヘムのトランスポーターである FLVCR1a により赤血球の外に排出される<sup>4)</sup> という違いに起因す

るものと考えられる。FLVCR 遺伝子欠失マウスが前赤芽球の分化異常を伴う重度の大球性貧血と胎生致死の表現型を呈することも<sup>5)</sup>、赤芽球において比較的過剰にヘムが合成されている

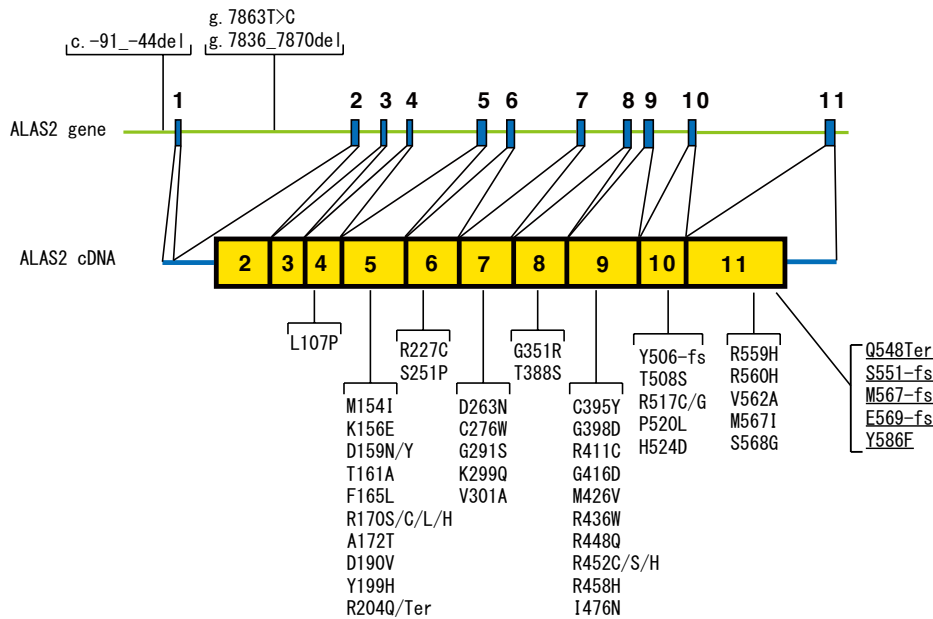


図2. ヒト ALAS2 遺伝子の構造と遺伝子変異  
 ヒト ALAS2 遺伝子の構造と、現在までに報告された遺伝子変異とその部位を示す。上段の遺伝子変異の数字は cDNA あるいはゲノム DNA 上の位置 (NCBI reference sequence, NG\_8983.1) を表す。下段にアミノ酸置換を伴う変異と、その変異が同定されたエクソンを示す。ミスセンス変異を表す際にはアミノ酸は一文字で表記し、Ter はナンセンス変異を、-fs は欠失あるいは挿入によるフレームシフト変異を示す。下線で示す変異は XLDPP あるいは骨髄性プロトポルフィリン症患者で同定された変異。

事を示唆するものと考えられる。

鉄欠乏性貧血を除くとヘム生合成系の異常による疾患として症例数が多いのはポルフィリン症で<sup>6)</sup>、基本的には ALAS1 以外のヘム生合成系の酵素の機能低下が原因となり発症する。現在までの所、ALAS1 遺伝子の変異に起因する疾患は知られていない。ポルフィリン症の中で患者数が最も多いとされる急性間欠性ポルフィリン症の急性発作の発症時には ALAS1 の発現亢進が大きな役割を果たすが、それは生理的な feedback 調節に起因するもので、ALAS1 自体には異常はない。一方、ALAS2 遺伝子の変異は機能喪失型の変異が X 染色体連鎖鉄芽球性貧血の原因となることが以前より知られていたが<sup>7,8)</sup>、近年、機能亢進型の変異が X 染色体連鎖優性型プロトポルフィリン症の原因となることが報告された<sup>9)</sup>。遺伝子変異の部位が異なる

とはいえ、同じ遺伝子の変異が異なる疾患の原因となることは比較的珍しく、それぞれの発症機序について自験例を含めて考察したい。

## II. 鉄芽球性貧血

鉄芽球性貧血は骨髄に環状鉄芽球 (ring sideroblast: 核の周囲を鉄が沈着したミトコンドリアが取り囲む様に存在する赤芽球) が出現することを特徴とする貧血症の総称で、大きく先天性のものと後天性のものに分類される<sup>10)</sup>。先天性の鉄芽球性貧血は比較的稀な疾患であるが、ALAS2 遺伝子の変異によるものが最も多い。ALAS2 遺伝子以外にも SLC25A38, GLRX5, ABCB7, PUS1, SLC19A2 などの遺伝子変異による遺伝性鉄芽球性貧血が知られており、また、ミトコンドリア DNA の変異による Pearson's 症候群も先天性の鉄芽球性貧血

を伴うことで有名である<sup>10)</sup>。このうち ALAS2, SLC25A38, GLRX5 の変異による鉄芽球性貧血は貧血以外に当該遺伝子の変異が原因と考えられる症状はないが, ABCB7, PUS1, SLC19A2 遺伝子の変異や Pearson's 症候群では貧血以外のさまざまな症状を伴う。従って, XLSA と鑑別診断が必要な先天性鉄芽球性貧血は現在知られる限り SLC25A38 と GLRX5 の遺伝子変異によるものであるが, GLRX5 の遺伝子変異による貧血は現在までに世界で 1 家系の報告があるのみで<sup>11)</sup>, SLC25A38 の変異は現在までの所本邦での報告は無い。現在までに本邦で報告された遺伝性鉄芽球性貧血の家系のうちのうち, 原因遺伝子が明らかな家系はほとんどが ALAS2 遺伝子の変異によるものである<sup>12)</sup>。しかしながら欧米では SLC25A38 の変異の報告は少ないので<sup>13)</sup>, 今後本邦でも報告される可能性は低い様におもわれる。また, 次世代シーケンサを用いて原因遺伝子が不明である遺伝性鉄芽球性貧血の家系の遺伝子を現在解析中であるので, 全く新たな原因遺伝子が報告される可能性も高い。

後天性鉄芽球性貧血の原因としては, 薬剤性, アルコール中毒などによるものなどが知られているが, 骨髓異形成症候群に含まれる環状鉄芽球を伴う不応性貧血 (Refractory Anemia with Ring Sideroblasts: RARS) が最も頻度が高いと思われる。骨髓異形成症候群の発症機序が未だに明らかではないので, RARS における環状鉄芽球の形成機序も明らかではないが, 最近, 患者ゲノムの網羅的な解析により, RARS 患者では SF3B1 遺伝子にアミノ酸置換を伴う体細胞変異が高頻度に同定されることが報告された<sup>14)</sup>。SF3B1 は mRNA のスプライシングに関与するタンパク質で, その変異がどのように環状鉄芽球の形成や骨髓異型症候群の発症にかかわるのかは明らかではなく, 今後の研究の進展が待たれる。

### III. X 染色体連鎖鉄芽球性貧血 (X-linked sideroblastic anemia: XLSA)

#### 1. 発症の分子基盤

##### 1) ミスセンス変異

XLSA は ALAS2 遺伝子の機能喪失型変異により発症する。ALAS2 遺伝子は 11 のエクソンから構成されるが<sup>15)</sup>, 図 2 に示す様にほとんどの変異はミスセンス変異で, 酵素の活性を担う部分をコードする第 4 エクソンから第 11 エクソンの間に多種多様な変異が報告されている。変異の報告は第 5 エクソンと第 9 エクソンに比較的多いが, これらのエクソンが活性中心を形成する部分をコードすると予想されていることと無縁ではないと考えられている<sup>16)</sup>。変異酵素のいくつかについては *in vitro* で酵素活性を測定しており, ALAS の補酵素であるピリドキサーリン酸 (PLP) の十分な添加により酵素活性が上昇するものも少ないが<sup>17, 18)</sup>, その様な変異を有する症例は臨床的にもビタミン B6 の投与に反応して貧血が改善することが多いようである。ただ, 日常生活で自覚症状がなくなるまでに貧血が回復する場合でも, 完全に正常域にまで改善することは余り多くはない。また, 中には酵素活性がほとんど変化しないミスセンス変異も報告されており<sup>19, 20)</sup>, このような変異は ALAS2 タンパク質の機能を調整する様なタンパク質との複合体の形成を阻害することが細胞内における酵素活性あるいは安定性の低下につながるものと予想されている<sup>21)</sup>。

##### 2) 遺伝子転写調節領域における変異

ALAS2 遺伝子の発現は赤芽球特異的であるが, 近位プロモーター領域と第 8 インtron に存在する赤芽球特異的エンハンサー領域が制御にかかると報告されていた<sup>22, 23)</sup>。現在までの所, 第 8 インtron のエンハンサー領域の変異による XLSA の報告は無いが, 近位プロモーター領域の欠失変異 (c.91\_44del) が XLSA 患者で同定されている<sup>24)</sup>。最近我々は第 1 インtron に赤芽球特異的なエンハンサー領域が

存在することを明らかにし、さらに同領域で中心的な役割を果たしているのは GATA1 転写因子の結合配列であることを明らかにして報告した<sup>25)</sup>。さらに、当該 GATA1 結合配列の 1 塩基置換、あるいは GATA1 結合配列を含んだ領域の欠失変異を有する XLSA の家系を複数同定して報告した<sup>25)</sup>。これらの家系は、これまでエクソーム解析でも原因遺伝子が同定できなかった家系であり、in vitro での検討の結果からも、第 1 イントロンのエンハンサー領域の変異が XLSA の発症原因となるものと考えられる。同部の変異は欧米の XLSA 症例でも同定されていることから<sup>26)</sup>、今後報告が増加する可能性が高い。

## 2. 臨床的特徴

### 1) 診断

ALAS2 遺伝子は X 染色体上に存在するため、ALAS2 遺伝子の変異による表現型は伴性劣性遺伝の遺伝形式をとり、基本的には男性のみ発症する。貧血は小球性低色素性で、赤血球容積粒度分布幅 (RDW) の拡大が認められることが多い<sup>7)</sup>。患者男性の母親は変異遺伝子の保因者であり、通常は鉄芽球性貧血を発症しないが、保因者の女性では貧血を認めない場合でも RDW の拡大が認められることがある<sup>27)</sup>。これは、X 染色体のランダムな不活化により変異遺伝子を発現している赤芽球由来の赤血球が小球性になるためと考えられている。また、ごく稀にはあるが、キャリアの女性が発症することがあり、これは X 染色体の不均衡な不活化により変異遺伝子を発現する赤芽球が多くなるためと考えられている<sup>28)</sup>。発症年齢は出生直後に診断される例から、軽症例では老年期に初めて診断されるものまで幅広い。貧血がそれほど重度でない場合には学校検診などで初めて貧血を指摘されて診断に至ることが少なくない。さらに、透析によるビタミン B6 の不足により老年期になって初めて診断された例もある

ので<sup>29)</sup>、加齢により頻度が増す RARS との鑑別も重要である。環状鉄芽球の出現が本症の診断には必須であるが、その形成機序としては、ALAS2 遺伝子の変異に伴う活性あるいは発現量の低下により、赤芽球におけるポルフィリン体の供給が低下し、必要な量のヘムが合成できなくなるにもかかわらず、ミトコンドリアへの鉄の供給は減少しないためにミトコンドリアに鉄が蓄積すると考えられている。しかしながら、同じくヘムの合成異常によるポルフィリン症でミトコンドリアへの鉄の沈着が見られることは多くないので、環状鉄芽球の形成にはそれ以外の何らかの因子がかかわるものと推定されているが現在までの所明らかにはされていない。また、患者は輸血歴がない場合でも全身性の鉄過剰状態にあることが多く、血清鉄、血清フェリチン値の上昇は、同じく小球性低色素性の貧血である鉄欠乏性貧血との重要な鑑別点となる。鉄欠乏性貧血の治療として行なわれる鉄剤の投与は XLSA では二次性のヘモクロマトーシスを重症化させる可能性が高いので注意が必要である。

### 2) 治療

上述の様に ALAS の補酵素であるピリドキサーリン酸 (PLP)、あるいはその前駆体であるピリドキシン (ビタミン B6) の投与により貧血が改善する例がある<sup>7)</sup>。これは遺伝子変異によるアミノ酸置換の結果として変異酵素の PLP への親和性が低下する場合、PLP の濃度を上げる事により酵素活性が回復するためと考えられている。ピリドキシンは水溶性ビタミンで、投与による副作用もほとんど報告されていないことから考えても、ピリドキシンの投与は最初に行なうべき治療法であろう。ただし、転写レベルでの ALAS2 の発現低下が原因と考えられる XLSA 症例や ALAS2 以外の遺伝子変異に起因する遺伝性鉄芽球性貧血遺伝性鉄芽球性貧血や RARS では効果は期待できないが、一時的に貧血が軽度改善する事は

あるようである。現在のところピリドキシンあるいは PLP の投与以外の有効な治療法は知られていないが、重症例に対して骨髄移植が行なわれたという報告がある<sup>30)</sup>。また、鉄芽球性貧血に伴う全身性の鉄過剰症は、放置すると原発性ヘモクロマトーシスと同様に肝不全や心筋の機能低下に進展し、患者の予後を左右する合併症を引き起こす。従って、輸血の有無にかかわらず、鉄過剰状態にある XLSA 症例では鉄のキレート剤の投与により積極的に除鉄を行なう必要がある。

#### IV. ポルフィリン症

ヘム生合成系の中間代謝産物をポルフィリン体と総称するが、ポルフィリン症はヘム生合成系の酵素のいずれかの活性低下により、その酵素の基質やそれまでの中間代謝産物 (= ポルフィリン体) が蓄積することにより発症する疾患の総称である<sup>6)</sup>。厳密にはアミノレブリン酸やポルホビリノーゲンはポルフィリン体では無いが、ヘム生合成系の酵素の活性低下によりこれらの分子が蓄積する場合には臨床的にはポルフィリン症と呼ばれている。最初の反応を触媒する ALAS 以外の図 1 に示す 7 つの酵素の活性低下によるポルフィリン症が知られており、主な症状の由来する臓器に応じて骨髄性、あるいは肝性ポルフィリン症に大きく分類される。最も症例数の多い肝性ポルフィリン症は急性間欠性ポルフィリン症で、3 番目の酵素であるヒドロキシメチルピレン合成酵素 (HMBS、あるいはポルホビリノーゲンデアミナーゼ、PBGD と呼ばれる) の遺伝的な欠損により発症する疾患で、ポルホビリノーゲン (PBG) と ALA が蓄積する。通常の生活では PBG と ALA の蓄積がそれほどではないため症状もなく経過するが、薬剤やストレスなどにより ALAS1 の活性が亢進すると急激に ALA と PBG が蓄積し、内臓神経症状 (腹痛、悪心、嘔吐など) を呈して発症する。他の急性腹症を呈する疾患との鑑別が重要である。

#### V. X 染色体連鎖優性プロトポルフィリン症 (X-linked dominant protoporphyria: XLDPP)

##### 1. 発症の分子基盤

骨髄性プロトポルフィリン症はヘム生合成系の最後の酵素であるフェロケラターゼ (FECH) の活性の低下により、その基質であるプロトポルフィリン IX (PPIX) が蓄積することにより発症する骨髄性ポルフィリン症である。最近、FECH 遺伝子に変異が無い遺伝性プロトポルフィリン症の家系において ALAS2 遺伝子の第 11 エクソンに変異が同定された<sup>9)</sup>。(図 2、下線とともに記した変異) これらの変異は、いずれも ALAS2 タンパク質のカルボキシル末端のアミノ酸欠失を招く変異で、それにより ALAS2 の酵素活性が亢進するために赤芽球におけるポルフィリン産生が増加し、相対的に FECH の酵素活性が低下 (不足) するために PPIX が蓄積するものと考えられている。このことはヒトの ALAS2 のカルボキシル末端に酵素活性を抑制する領域が含まれることを意味している。実際、ほ乳類の ALAS タンパク質と原核生物の ALAS とのアミノ酸配列を比較してみると、活性中心の部分については原核生物との相同性も高いが、N 末端と C 末端の部分は原核生物には存在しない<sup>31)</sup>。興味深いことにこれらの N 末端と C 末端の領域は ALAS1 あるいは ALAS2 のそれぞれについては異なる種の間でも保存されているが、ALAS1 と ALAS2 の間では相同性は高くない<sup>1)</sup>。この事からも、ALAS2 の C 末端は ALAS2 に特異的な機能の調節にかかわることが推察されるが、実験的にヒト ALAS2 タンパク質の C 末端の 33 アミノ残基を欠失させた変異体を作成して酵素活性や細胞内におけるタンパク質の安定性を検討した所、PLP が十分に存在すると酵素活性は野生型の約 2 倍に上昇し、細胞内における半減期も延長することが明らかとなった<sup>32)</sup>。一方、この ALAS2 の C 末端領域内では酵素活

性と安定性を低下させる，あるいは酵素活性はむしろ上昇させるが安定性は低下する，といった様々な遺伝子変異が XLSA の患者で同定されており<sup>32)</sup>，さらに最後尾に近いアミノ酸の置換が ALAS2 の酵素活性を上昇させるため，骨髄性ポルフィリン症の重症化因子となると考えられていることなどから<sup>33)</sup>，この領域がかかわる調節機序は比較的複雑であると予想されており，今後の研究の進展が待たれている。

## 2. 臨床的特徴

PPIX は皮膚などに蓄積すると日光過敏症を誘発し，肝臓に蓄積すると肝障害・胆石の原因となる。PPIX は疎水性が高いため，尿中にはほとんど排泄されず，胆汁とともに糞便中に排泄される。したがってプロトポルフィリン症は糞便，血漿，赤血球に PPIX が蓄積していることを生化学的に確認することにより診断される。PPIX は赤色蛍光を発するため，赤血球の塗抹標本を蛍光顕微鏡で観察すると赤色の蛍光を発する赤血球が観察されることも診断の一助となる。治療としては日光への暴露を避けるなどの保存的な治療法が主で，特異的な治療法はない。

## VI. 結 語

以上，ALAS2 の遺伝子変異と疾患との関連について概説したが，患者における ALAS2 の遺伝子変異の解析が，ALAS2 タンパク質自体の機能調節機構や赤芽球特異的な転写調節の解明に果たして生きた役割は非常に大きい。一方のアイソザイムである ALAS1 については，肝性ポルフィリン症との関連から転写調節機序については多くの報告があるが，タンパク質自体の特徴や機能の調節機構についての報告は多くない。現在の所，XLSA や XLDPP，肝性ポルフィリン症には臓器移植等を除いて根治的な治療法は存在しないので，新たな治療法の開発も視野にいった ALAS1 および ALAS2 の発現・機能制御機構の解明が待たれている。

利益相反：著者には開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) **Furuyama K, Kaneko K and Vargas PD:** Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med* **213**, 1-16, 2007.
- 2) **Bishop DF and Desnick RJ:** Assays of the heme biosynthetic enzymes. *Preface Enzyme* **28**, 91-93, 1982.
- 3) **Furuyama K and Yamamoto M:** Differential Regulation of 5-Aminolevulinate Synthase Isozymes in Vertebrates, In "Handbook of Porphyrin Science", ed by Kadish KMS, et al., pp. 1-39, World Scientific, USA, 2013
- 4) **Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, et al.:** Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* **118**, 757-766, 2004.
- 5) **Keel SB, Doty RT, Yang Z, et al.:** A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* **319**, 825-828, 2008.
- 6) **Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, et al.:** Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias, In "The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease", ed by Scriver CR, et al., pp. 2991-3062, McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, 2001.
- 7) **Bottomley SS:** Sideroblastic Anemias, In "Wintrobe's clinical hematology 12th ed.", ed by Greer JP, et al., pp. 835-856, Philadelphia | London: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- 8) **Harigae H and Furuyama K:** Hereditary

- sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations. *Int J Hematol* **92**, 425-431, 2010.
- 9) **Ducamp S, Schneider-Yin X, de Rooij F, et al.:** Molecular and functional analysis of the C-terminal region of human erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase associated with X-linked dominant protoporphyria (XLDPP). *Hum Mol Genet*, 2013.
  - 10) 張替秀郎, 藤原 亨, 古山和道: ヘム代謝と貧血. *臨床血液* **55**, 729-734, 2014.
  - 11) **Ye H, Jeong SY, Ghosh MC, et al.:** Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J Clin Invest* **120**, 1749-761, 2010.
  - 12) **Ohba R, Furuyama K, Tsuchiya S, et al.:** Epidemiological and genetic analysis of sideroblastic anemia-multi-center study in Japan. *Blood* **116**, 1716-1717, 2010.
  - 13) **Bergmann AK, Campagna DR, McLoughlin EM, et al.:** Systematic molecular genetic analysis of congenital sideroblastic anemia: evidence for genetic heterogeneity and identification of novel mutations. *Pediatr Blood Cancer* **54**, 273-278, 2010.
  - 14) **Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al.:** Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69, 2011.
  - 15) **Conboy JG, Cox TC, Bottomley SS, et al.:** Human erythroid 5-aminolevulinate synthase. Gene structure and species-specific differences in alternative RNA splicing. *J Biol Chem* **267**, 18753-18758, 1992.
  - 16) **Astner I, Schulze JO, van den Heuvel J, et al.:** Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. *EMBO J* **24**, 3166-3177, 2005.
  - 17) **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.
  - 18) **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.
  - 19) **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.
  - 20) **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.
  - 21) **Furuyama K and Sassa S:** Interaction between succinyl CoA synthetase and the heme-biosynthetic enzyme ALAS-E is disrupted in sideroblastic anemia. *J Clin Invest* **105**, 757-764, 2000.
  - 22) **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.
  - 23) **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.
  - 24) **Ducamp S, Kannengiesser C, Touati M, et al.:** Sideroblastic anemia: molecular analysis of the ALAS2 gene in a series of 29 probands and functional studies of 10 missense mutations. *Hum Mutat* **32**, 590-597, 2011.
  - 25) **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.
  - 26) **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.
  - 27) **Cotter PD, May A, Li L, Al-Sabah AI, et al.:** Four new mutations in the erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) gene causing X-linked sideroblastic anemia: increased pyridoxine responsiveness after removal of iron overload by phlebotomy and coinheritance of hereditary hemochromatosis. *Blood* **93**, 1757-1769, 1999.
  - 28) **Cazzola M, May A, Bergamaschi G, et al.:** Familial-skewed X-chromosome inactivation as a predisposing factor for late-onset X-linked sideroblastic anemia in carrier females. *Blood* **96**, 4363-4365, 2000.



- 29) **Furuyama K, Harigae H, Kinoshita C, et al.:** Late-onset X-linked sideroblastic anemia following hemodialysis. *Blood* **101**, 4623-4624, 2003.
- 30) **Urban C, Binder B, Hauer C, et al.:** Congenital sideroblastic anemia successfully treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **10**, 373-375, 1992.
- 31) **Munakata H, Yamagami T, Nagai T, et al.:** Purification and structure of rat erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase. *J Biochem* **114**, 103-111, 1993.
- 32) **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, 2012.
- 33) **To-Figueras J, Ducamp S, Clayton J, et al.:** ALAS2 acts as a modifier gene in patients with congenital erythropoietic porphyria. *Blood* **118**, 1443-1451, 2011.