

論文内容要旨

論文題目

赤血球型 5-アミノレプリン酸シンターゼ過剰発現の 赤血球前駆細胞への影響

責任講座：器官病態統御学講座
生命情報内科学分野

氏名： 原田 裕子

【内容要旨】

(背景) ヘム合成系の律速酵素である5-アミノレプリン酸シンターゼには、赤血球に特異的に発現するアイソザイムALAS-Eが存在する。ALAS-Eはそのノックアウトマウスの解析より、生存に必須であることが確認されており、また、細胞内鉄濃度に依存して正に翻訳効率を制御する鉄応答性配列(IRE)が5'-UTRに存在しその制御を受けている。著者らは、赤血球系のプロモーター、転写因子GATA-1遺伝子発現制御領域を用いて、赤血球特異的に野生型ALAS-EおよびIRE欠失型ALAS-Eを過剰発現させるトランスジェニックマウス(WT TgおよびdelIRE Tg)を作製し、両者に軽度の貧血を見出している。一方、ALAS-E発現はHbが合成される赤血球造血後期分化に最も強いが、造血幹細胞であるCD34陽性細胞からすでに発現している。

(目的) ALAS-Eの生理機能がHb合成のためのヘム供給だけでなく、造血前駆細胞の増殖にも関わる可能性を追求するため、上記トランスジェニックマウスを用いてALAS-Eの赤血球造血への関与を検討した。またdelIRE TgがWT Tgより強い貧血を示すことから、ALAS-E IREの赤血球造血への寄与も検討した。

(方法) WT TgとdelIRE Tgについて血液学的解析を行い、また貧血が軽度のため、脱血・脾臓摘出などのストレスを負荷し造血予備能を検討した。さらに骨髄・脾臓細胞から、FACS、コロニーアッセイにより赤血球前駆細胞の定量的・定性的解析を行った。また5-アミノレプリン酸(ALA)などのヘム合成前駆体やヘム合成阻害剤、鉄キレート剤であるdesferrioxamine(DFO)のコロニー形成能への影響を解析し、ALAS-E過剰発現マウスにおける貧血発症機序の解明を試みた。

(結果) WT Tg・delIRE Tgは、トランスジーン発現強度と相関した赤血球数減少を来し、貧血を呈した。脱血などのストレス負荷実験より、両Tgとも予備造血能の低下が示唆された。骨髄・脾臓細胞のFACS解析・コロニーアッセイでは、両Tgとも赤血球系前駆細胞が著明に減少し、個体レベルの貧血と同様にdelIRE Tgの方がWT Tgより重篤な障害を示す傾向があった。またALA添加培地でのコロニーアッセイで、野生型のBFU-E形成能が著しく抑制を受けたことより、ALAがBFU-E段階の前駆細胞の分化増殖を障害することがわかった。またDFO添加でWT TgではCFU-Eコロニー形成能が回復したが、delIRE Tgでは不変であった。

(結語) 赤血球造血におけるALAS-E過剰発現は、前駆細胞レベルでは抑制的に作用し、BFU-E段階の前駆細胞の正常な増殖にはALAS-E発現の調節が重要であることが示唆され、ALAS-EのCFU-Eレベルでの発現調節に、IREを介した翻訳制御が関与している可能性が明らかとなった。

平成 17 年 1 月 31 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：原田 裕子

論文題目：赤血球型 5-アミノレブリン酸シンターゼ過剰発現の赤血球前駆細胞への影響

審査委員：主審査委員

副審査委員

副審査委員

審査終了日：平成 17 年 1 月 13 日

高田 匡
早 二 彦 (青)
磯 尾 裕 信



論文審査結果要旨

赤血球でのヘム合成系の律速酵素である 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS-E) の合成に於ける際立った特徴として細胞内鉄濃度による翻訳段階での調節がある。即ち、ALAS-E mRNA の 5' 非翻訳領域に IRE (iron responsive element) と呼ばれる配列が存在し、これに IRE 結合蛋白質が結合する事により翻訳が阻害される。細胞内鉄濃度が上昇すると、IRE 結合蛋白質は非結合型となり、IRE から遊離し、その結果、阻害は解除され翻訳は促進する。

ALAS-E の第一義の生理機能はアポヘモグロビンへのヘム供給にある。一方、ALAS-E は分化初期の赤血球前駆細胞でも僅かではあるが発現している事実や、幾つかの傍証から本酵素は赤血球の分化や鉄代謝にも関与している事が示唆されている。原田君は赤血球分化初期段階での ALAS-E のこのような生理機能、特に IRE の役割に注目し、その解明のために ALAS-E を赤血球内に特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し検討した。作製したマウスには二種類あり、一つは正常 ALAS-E 発現マウス (WT Tg)、もう一つは IRE 配列を欠く ALAS-E 発現マウス (Δ IRE Tg) である。

WT Tg 及び Δ IRE Tg ではヘムの過剰生成が起っていると推測されるにも拘らず、両者共に貧血症状を呈し、しかもその度合いとトランスジーン発現量とに相関が見られた。また、貧血は Δ IRE Tg でより強い傾向がある事からヘムが赤血球の分化・増殖に抑制的に働く事が示唆された。次いで詳細な解明を目指し、同強度にトランスジーンが発現されている WT Tg 及び Δ IRE Tg を用いて種々の検討を行い、次の知見を得た。

1. 前赤芽球は好塩基性赤芽球、多染性赤芽球を経て正染性赤芽球に分化するが、これら前駆細胞の全細胞数に対する存在比を FACS で解析した結果、正常マウスに較べ両 Tg とも減少しており、特に Δ IRE Tg で少なかった。2. 正常マウスでは前赤芽球の好塩基性赤芽球に対する割合が低いのに対し、両 Tg では高く、これは恐らく両 Tg では前赤芽球から好塩基性赤芽球への分化が抑制されているためと思われる。3. 両 Tg では前赤芽球より未分化段階にある CFU-E 及び BFU-E のコロニー形成が抑制されていた。4. 鉄のキレート剤であるデスフェリオキサミン添加により、正常マウスおよび WT Tg では CFU-E コロニーの形成が亢進したにもかかわらず、 Δ IRE Tg でだけ CFU-E コロニーの形成に変化がなかった。

原田君は以上のような複雑な知見を総合し次の結論を得た。前駆細胞でのヘム過剰による分化・増殖障害を防止するため、律速酵素である ALAS-E に IRE が存在し、鉄濃度依存性に翻訳を制御している。本論文は目的・方法共に妥当であり、得られた結果に対する考察、それから導かれた結論も宜なるものと思われる。従って、審査会は本研究を博士 (医学) の学位を授与するに値するものと判定した。