

原 著

Hb Miyada : $\beta\delta$ -融合遺伝子による 異常ヘモグロビンの構造とその遺伝子解析

原野恵子¹⁾ 上田 智²⁾

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科¹⁾

川崎医療福祉大学 医療技術学部 医療情報学科²⁾

(平成5年3月31日受理)

Hb Miyada : Analyses of the Structure and the
Gene of Abnormal Hemoglobin with $\beta\delta$ -Hybrid Globin Gene

Keiko HARANO¹⁾ and Satoshi UEDA²⁾

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Medical Professions

Kawasaki University of Medical Welfare¹⁾

Kurashiki, 701-01, Japan

Department of Medical Informatics

Faculty of Medical Professions

Kawasaki University of Medical Welfare²⁾

Kurashiki, 701-01, Japan

(Accepted Mar. 31, 1993)

Key words : Hb Miyada, $\beta\delta$ -hybrid gene, cloning, nucleotide sequencing,
globin biosynthesis

Abstract

Isoelectric focusing of hemolysate from peripheral blood of the patient, which was detected during an assay of the Hb A_{1c} level, showed the presence of a slow-moving abnormal hemoglobin located at the same position to Hb A₂. Its content, including the Hb A₂ content, in the total Hb by DEAE-HPLC amounted to 19.8%. Structural analysis indicated that the abnormal globin consisted of the β -like globin from the N-terminus to amino acid 12 and of the δ -like globin from amino acid 22 through the C-terminus. Thus, this Hb was predicted to be identical to Hb Miyada. Analyses of the globin gene arrangement by the Southern-blot-hybridization method and the nucleotide sequence of the clone prepared from DNA amplified by PCR showed that the crossover must have

occurred without loss of bases within the first nucleotide of the 18th and the first nucleotide of the 22nd codon of these β - and δ -genes. Reticulocyte in peripheral blood of the patient was incubated with ^3H -Leu. The individual globin chains were separated and the incorporated radioactivity determined. The synthesis of the normal α - and β -chains was well-balanced ($\beta/\alpha=1.06$) for 2 hour incubation, but during this time there was no radioactivity incorporated into the Miyada ($\beta\delta$)-chain. It seems, therefore, that the synthesis of the Miyada ($\beta\delta$)-chain occurs early during erythroid maturation and is completed before the reticulocyte stage as reported for the δ - and ($\delta\beta$)-chains of Hb A₂ and Hb Lepore.

要 約

HbA_{1c} 値測定の際に、異常 Hb の保因者が検出された。末梢血液から調製された溶血液の等電点分画は Hb A₂ と同様の挙動を示す slow-moving の異常 Hb の存在を示した。DEAE-HPLC 分析による異常 Hb 含量は HbA₂ を含め19.8%であった。この Hb の構造解析は、グロビンのアミノ酸組成分析から β 鎖と δ 鎖遺伝子間の crossover によって生じる融合型 ($\beta\delta$) グロビンをもつ Hb Miyada と推定された。サザンブロットハイブリダイゼーションによる遺伝子配列解析や DNA クローンの塩基配列の解析から、この異常グロビンは N-末端から17位までが β 鎖で、22位から C-末端が δ 鎖から成り立っており、この18位の第1塩基と22位の第1塩基間が crossover site と考えられた。患者の末梢血液の網状赤血球での合成グロビン分析は、 $\beta/\alpha=1.06$ で合成均衡を示したが、($\beta\delta$)融合グロビンへの放射活性物質の取り込みは観察されなかった。このことは、Hb A₂ や Hb Lepore の δ 鎖や ($\delta\beta$) 鎖グロビンに見られると同様に、($\beta\delta$)融合グロビンの合成能は赤血球の成熟過程において急速にその機能を低下し、網状赤血球の前段階で終わってしまうためと考えられる。

はじめに

ヘモグロビン (Hb) は、 α 鎖様グロビンと非 α 鎖 (β 鎖, γ 鎖および δ 鎖グロビン) 様グロビンサブユニットがそれぞれヘムを取り込み、対を成し、会合して4量体 (HbA は $\alpha_2\beta_2$ で示される) となった複合タンパクである。正常成人の血液中の Hb 組成は、HbA ($\alpha_2\beta_2$): 96% 以上, HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$): 2~3%, および HbF ($\alpha_2\gamma_2$): 1% 以下となっており、それら正常グロビン鎖のアミノ酸組成とその配列は一定の状態を保っている。

ヘモグロビン異常症 (Hemoglobinopathy) は、ヘモグロビンを構成するグロビン鎖サブユニット上のアミノ酸配列が正常とは異なったアミノ酸配列がもととなった構造異常ヘモグロビン (異常 Hb) 症とサブユニット間の合成不均衡によって生ずるサラセミア症とに大別される。このう

ち、構造異常 Hb は世界中で約580種が発見されており、その大部分は単一のアミノ酸置換にもとづくもので [α 鎖グロビン異常 (167種), β 鎖グロビン異常 (296種), γ 鎖グロビン異常 (62種), δ 鎖グロビン異常 (23種)] である。グロビン鎖の2箇所アミノ酸置換の見られる異常 Hb 症 (15種), アミノ酸残基の挿入や脱落にもとづく異常 Hb 症 (22種), N-末端や C-末端領域に余分のアミノ酸配列の見られる異常 Hb 症 (7種), あるいは類似性の高い構造遺伝子間で生じた融合遺伝子に由来するグロビンで構成された異常 Hb 症 (Hb Lepore, Hb Anti-Lepore (=Miyada), Hb Kenya など; 7種) やコドンの組み換え (4種) など、異常構造には様々なものがある¹⁾。

最近、糖尿病患者の検出やその治療経過観察には Hb 中に含まれる糖化 Hb, HbA_{1c}, が有効な指標とされるようになり、通常、その測定

には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が使用されている。今回, HPLC での HbA_{1c} 値測定の際, クロマトパターン異常を示す検体に遭遇し, 保因者の血液検体からの異常 Hb の解析を行い Hb Anti-Lepore 型の Hb Miyada [$\alpha_2(\beta\delta)_2$]であることを決定した。構造解析, 遺伝子解析, Hb 合成試験の結果について報告する。

材料と方法

1. 血液検体: ヘパリンあるいは EDTA-Na₂ を抗凝固剤に末梢血液を採取した。

2. 血液検査: 血球計測や生化学的検査は通常の方法で行った。

3. HbA_{1c} の測定²⁾: 東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 HLC-723GHbII を用い, その操作はマニュアルに従って行った。

4. 溶血液の調製: 生理食塩水での洗浄で得た赤血球層の約 2 倍量の蒸留水と 0.5 倍量の四塩化炭素を加え, 攪拌し, 遠心して上層を集め溶血液として用いた。

5. 溶血液の等電点分画: pH 6-8 の等電分画用ポリアクリルアミドゲルを調製した。分画の条件は文献に従って行った³⁾。

6. Hb 分析: DEAE-5 PW (7.5×75mm, 東ソー) を用いる HPLC 法 (装置: CCP&8010, 東ソー) で行った。溶離液には 20mmol/l トリス-塩酸 (pH8.0) と 0.5mol/l NaCl-20mmol/l トリス-塩酸 (pH8.0) のグラジエント系を用い, 流速 1.0ml/分, 検出は 415nm で行った。

7. 異常グロビン鎖の単離: CM-セルロース (CM-52, Whatman Co.; カラムサイズ: 12×200mm) カラムクロマトグラフィーで各グロビン鎖に分けた。この際, 溶離液には, 8 mol/l 尿素-リン酸ナトリウム (Na イオン勾配: 7→35 mmol/l, pH6.75) 緩衝液を用いた⁴⁾。単離されたグロビンは 0.2N-酢酸を溶出液として G-25 Sephadex (Pharmacia Chemicals Co.; カラムサイズ: 30mm×100cm) を通したのち, 凍結乾燥した。

8. グロビン鎖のトリプシン消化: グロビンを 0.01N-水酸化ナトリウムに溶かし, グロビンの約 100 分の 1 量比の TPCK-トリプシンを 0.01 N-塩酸に溶かしたものを加え pH 8-9 の範囲内

で 1 夜消化した。反応液の pH を 6.4 とし, 不溶性成分と可溶性成分とに分けた。

9. ペプチドの逆相 HPLC 分析: 分析には逆相カラム Capcell Pak C₁₈-SG120 (4.6×250mm, Shiseido Co.), 高速液体クロマトグラフ装置 (Shimadzu Liquid Chromatograph 4A) を用い, 溶離液には 9 mmol/l トリメチルアミン-酢酸 (pH6.0) (A) と アセトニトリル (B) のリニアグラジエント (A→50%B/100分, 流速 0.7ml/分) を用いた。分別されたペプチドのアミノ酸分析は, 6 N-塩酸で 20 時間加水分解後, 自動アミノ酸分析計でそのアミノ酸組成を求めた。

10. Hb 合成試験⁵⁾: ヘパリン加に採血された末梢血液を生理食塩水で洗浄し, 血球層の上層部約 0.2ml をとり, ³H-Leu を含むアミノ酸培地中で 37°C, 2 時間培養した。その後, 生理食塩水で洗浄し, 0.01% サポニン液に溶かし溶血液とした。

11. 合成 Hb のカラムクロマトグラフィー分析: 合成 Hb 溶血液を冷アセトン-塩酸で処理しグロビンを得た。10mg のグロビンを CM-セルロースカラム (7×100mm) (分離条件は 7. に同じ) で各グロビン鎖に分画した。分画液を 280nm で比色分析後, 液体シンチレーションカウンターで ³H-Leu の取り込み量を測定し, 各グロビン鎖への総取り込み量から, グロビン鎖の合成比率 (β/α) を求めた。

12. 末梢血液からの DNA の調製⁶⁾: ヘパリン加に採血した末梢血液を遠心し, 上層部のバフィーコートを集め, プロテアーゼ, フェノール-クロロホルムで順次処理し, エタノールから DNA を回収した。TE (10mmol/l トリス-1 mmol/l EDTA, pH7.4) に溶かし, DNA 溶液とした。

13. サザンプロットハイブリダイゼーション⁷⁾: DNA (3 μ g) に反作用緩衝液, 制限酵素を加え, 指定された温度条件下で約 5 時間反応後, 0.8% アガロースゲル電気泳動を行い, 分離された DNA 断片をニトロセルロース膜にサザンプロットし, 加熱 (80°C) 乾燥した。ランダムプライム法で ³²P-ラベルした DNA 検出用プローブと 1 夜ハイブリダイゼーションを行い, 洗浄後, X-線フィルムに露光し, オートラジオグラムを得た。

14. PCR (polymerase chain reaction) 法による合成 DNA の調製⁸⁾: Gene-Amp (Cetus-Perkin Elmer Co.) を用い, つぎの条件下で行った. 反応液100 μ l 中に DNA (0.3 μ g), PCR プライマー [β 遺伝子の 5'-550領域の30mer (Sph I site をもつ) と δ IVS 2-660領域の30mer (HindIII site をもつ) 各20pmol], 反応緩衝液, dNTP液 (各20nmol) および Taq I 酵素 (2.5u) を加え, ミネラルオイル (Sigma Co., 75 μ l) を重層した後, 94 $^{\circ}$ C (1分:変性), 55 $^{\circ}$ C (30秒:アニーリング) および72 $^{\circ}$ C (3分:合成) の各反応を順次30回繰り返した. ミネラルオイルを取り除き, 50 μ l の 4 mol/l-酢酸アンモニウム溶液を加え, 375 μ l の冷イソプロピルアルコールを加え, -20 $^{\circ}$ C に30分間置いた後, 遠心し, 上清を除いた. 10 μ l の TE 溶液に溶解した.

15. PCR 合成 DNA のクローニング⁷⁾: Sph I と HindIII で 2重消化した PCR 合成 DNA と, 同じ酵素で消化した M13mp19ベクターとから T4 リガーゼ反応により組み換え体を得, エレクトロポレーション法により JM109へ形質転換し, X-gal, IPTG を含む YT プレート上に撒き, 37 $^{\circ}$ C, 1夜培養した. 無色のプラークを取り, JM109を含む SOB (バクトトリプトン-イーストエクストラクト-NaCl-KCl)-Mg²⁺ 添加液体培養液中で 5~6 時間培養し, 単鎖 DNA (ssDNA) を得た.

16. DNA の塩基配列解析: ssDNA と塩基配列決定用合成プライマー, α ³⁵S-dATP および DNA シーケンスキット (Sequenase Ver.2. USB) を用い, 指定条件下で反応を行い, 塩基配列解析用試料を得た. 塩基配列解析には, TBE 緩衝液グラジエント-6%ポリアクリルアミドゲル上で2000ボルト (定電圧), 3.5時間泳動を行った後, ゲルを10%酢酸-10%メタノール溶液で洗浄し, ロ紙上で乾燥した⁹⁾. 露光は X-線フィルム上で1夜行った.

結 果

患者は慢性腎不全で血液透析中の56歳男性で, 福岡県出身者であった. 末梢血液の HLC-723 GHbIIによる HbA_{1c} のクロマトパターンは,

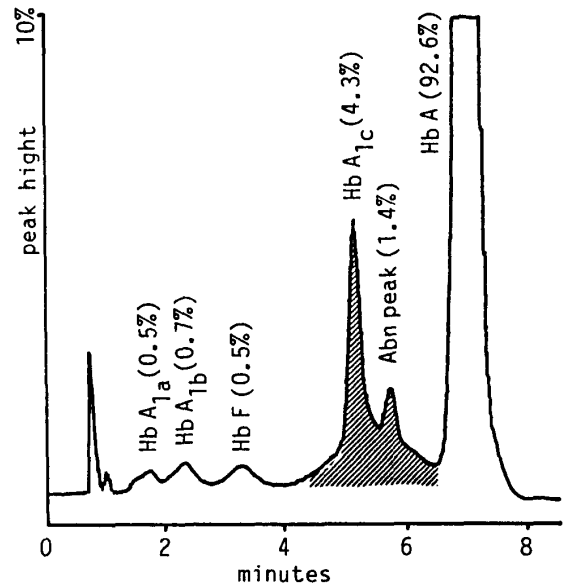


図1 Hb Miyada 保因者の末梢血液の HLC-723 GHbIIによる Hb 分析

HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA_{1c} と HbA の通常見られる Hb 類の外に, HbA_{1c} と HbA ピーク間に異常のピーク(1.4%)が見られ, 異常 Hb に由来する異常ピークと思われた. HbA_{1c} 値(4.3%) は正常範囲内であった(図1). この患者の末梢血液検査所見は: WBC $4.9 \times 10^3/\mu$ l, RBC $304 \times 10^4/\mu$ l, Hb 8.7 g/dl, Ht 26.4%, MCV 86.8fl, MCH 28.6pg, MCHC 33.0%, 網状赤血球1.0%, であり透析と腎臓障害による貧血症と思われた. 末梢血生化学検査では: T. Bil(0.1 mg/dl), 血糖 (71mg/dl), 血清鉄 (80 μ g/dl) や TIBC (196 μ g/dl) と特に異常値は見られなかった.

溶血液の等電点分画は, 正常 HbA を主成分に陰極側の HbA₂ 位置に強いバンドが見られ, HbF バンドは非常に弱いものであった(図2A). DEAE-カラムによる HPLC でも HbA₂ 位置に強い異常 Hb の存在を示すピークが現れ, その含量は19.8%(HbA₂ を含む)であった. HbF ピークはほとんど検出されなかった (アルカリ変性法では0.23%) (図2B). 溶血液の尿素解裂-セルロースアセテート膜電気泳動法は β 鎖と α 鎖グロビンの間の δ 鎖グロビンに相当する位置に明瞭な泳動縞を現し, 尿素-CM-セルロースカラムクロマトグラフ法によるグロビン鎖分析でも β 鎖グロビンと α 鎖グロビンの間の δ 鎖

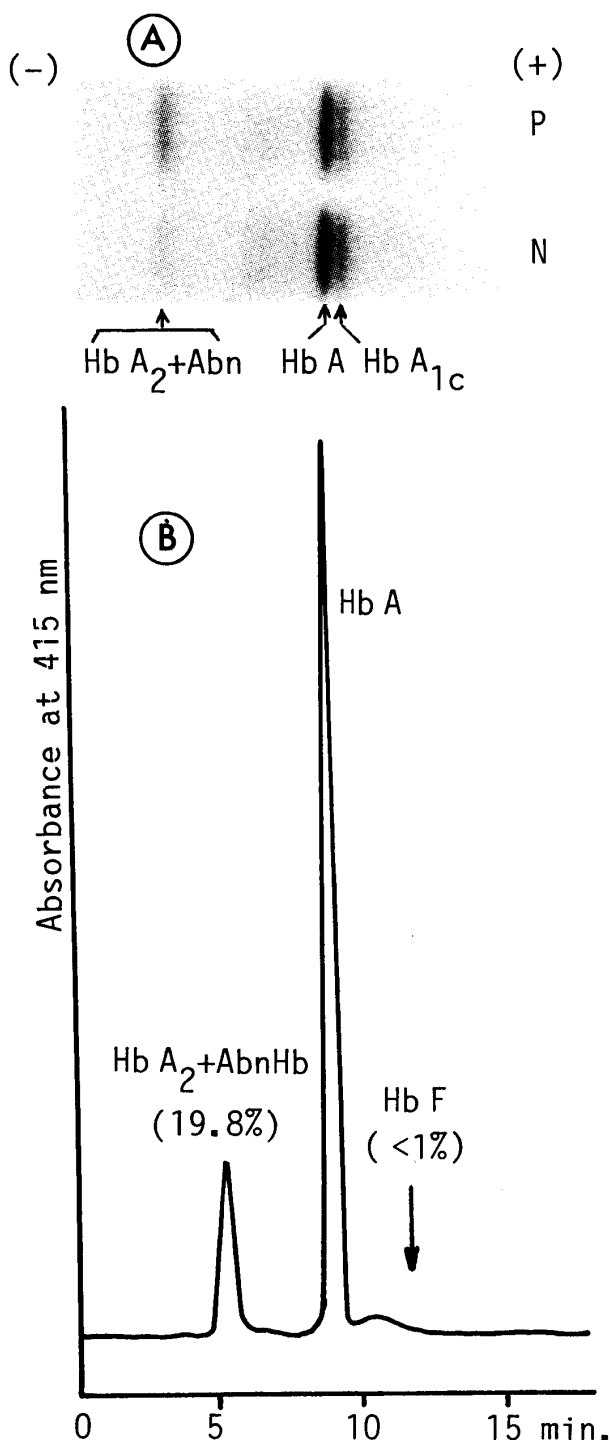


図2 (A): 溶血液の等電点分画 (pH 範囲: 6.7-7.7). P: 患者 N: 正常人
(B): Hb Miyada 患者溶血液の DEAE-HPLC による Hb 分析.

グロビンに相当する位置に明瞭なピークの出現を認めた (図6参照). 異常 Hb は非 α 鎖グロビン異常にもとづくものと考えられた.

カラムクロマトグラフ法によって単離された異常グロビンはトリプシン消化され, pH6.4で可溶成分と不溶成分ペプチドに分けられた. 可溶性ペプチドの逆相 HPLC のクロマトグラムは正常 β 鎖と正常 δ 鎖グロビン (保持時間27分のピークの存在は δ 117-120由来) の双方に類似したクロマトパターンを示した. 各ペプチドのアミノ酸組成から各ピークのペプチドを同定し (β 鎖グロビンを基本に番号付けをした), それを図3に示した. 可溶性のトリプティックペプチド β T-1, -4, -6, -7, -8, -9, -14と-15は δ Tのそれらと同一のアミノ酸組成をもっているが, β T-2, -3, -5と-13は δ Tのそれらとのアミノ酸組成を異にする. 図3中に示す①と②のペプチドのアミノ酸分析は β T-1と β T-2の β 鎖グロビン由来のペプチドに属していると考えられるが, ③④⑤のペプチドは δ 鎖グロビン由来の δ T-3, δ T-13と δ T-5ペプチドと同定される (表1). β 鎖グロビンの可溶性成分ペプチドに見られない保持時間27分位のペプチドは δ 117-120に相当し, δ 鎖グロビンの δ 116Arg (β 鎖では His) の存在に起因するものであった. これらのアミノ酸分析から, この異常グロビンは β T (あるいは δ T) -2と β T (δ T) -3との分断点近傍 (N-末端13位から21位) から N-末端側は β 鎖グロビンから構成され, C-末端側は δ 鎖グロビンで構成された $\beta\delta$ -融合型のグロビンであることが示唆された. グロビン鎖分析結果からは融合点は明確にはされないが, コドン13-21領域での融合遺伝子にもとづく Anti-Lepore型の異常 Hb, Hb Miyada¹⁰⁾ と同定された. この融合型グロビンの産生を明らかにするには構造遺伝子の解析を行うことが必要と考えられる. このためには DNA のサザンブロットハイブリッド法や PCR 法を応用した遺伝子解析法が有効手段である.

患者末梢血液から採取した genomic DNA を制限酵素 EcoRI, BamHI, BglIIや HpaI で消化し, ニトロセルロース膜にサザンブロットし, ³²P-ラベルした 5' β 1.4 (β 遺伝子 5'-領域の BamHI 部位から β 6位の Eco81 I 部位までの 1.4kb) プローブとハイブリダイゼーションを行った. この結果, EcoRI/5' β 1.4や BamHI/5' β 1.4

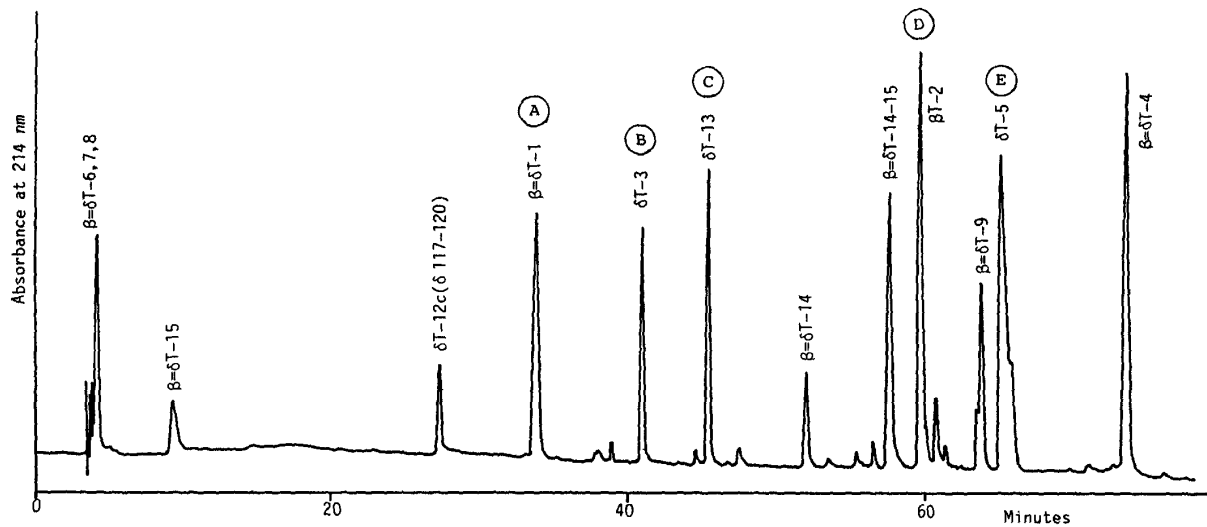


図3 Miyada ($\beta\delta$) グロビンのトリプシン消化物の可溶性画分の逆相 HPLC によるペプチド分析。
ペプチド番号は β 鎖グロビンを基準にして帰属した。図中の A, B, C, D, E の帰属は表1を参照。

Table 1 各ペプチドのアミノ酸分析と相当するペプチドの理論的アミノ酸組成

Amino Acids	Peak A	β -1	δ -1	Peak B	β -3	δ -3	Peak C	β -13	δ -13	Peak D	β -2	δ -2	Peak E	β -5	δ -5
Asp				2.21	2	2				0.12		1	2.75	3	3
Thr	0.95	1	1				1.00	1	1	1.00	1	1	0.17	1	
Ser										0.97	1		2.58	2	3
Glu	2.15	2	2	0.97	2	1	4.28	3	4				1.02	1	1
Gly				3.15	3	3				1.01	1	1	1.82	2	2
Ala				1.88	1	2	1.95	2	2	1.97	2	2	1.05	1	1
Val	0.73	1	1	3.03	3	3	0.06	1		0.99	1	1	0.98	1	1
Met							0.94		1				0.68	1	1
Leu	1.05	1	1	1.09	1	1				1.06	1	1	1.15	1	1
Tyr							0.88	1	1						
Phe							0.94	1	1				2.53	3	3
Lys	0.99	1	1				0.92	1	1	0.94	1	1	0.94	1	1
His	0.73	1	1												
Arg				0.95	1	1									
Pro	1.01	1	1				1.02	2	1				1.70	2	2

では特に異常バンドを観察できなかったが, Bgl II/5'β1.4と HpaI/5'β1.4では, 正常な遺伝子配列では観察できない異常バンドが現れた。これら異常バンドは, 正常 β 鎖遺伝子群間の β 鎖と δ 鎖遺伝子上の相同性の高い領域での Crossover によって生ずる異常 Miyada 遺伝子群から予想されるものに相当していた(図4)。さらに, PCR-クローニング法によって得られたクローンからの ssDNA の塩基配列を行った。解析したクローンはすべて同一の塩基配列をもつ $\beta\delta$ 融合遺伝子型のものであった(図5)。すなわち, 5'-プロモーター領域の CCAAT box, ATA box 領域の塩基配列, 5'-非翻訳領域の塩基配列や翻

訳開始位置から β 17コドン [β 17は AAG (Lys) に対し δ 17は AAA (Lys)] までは β 遺伝子の塩基配列に一致していた。しかし, β 22コドン GAA (Glu) は GCA (Ala= δ 22) に変換しており, 3'下流領域のイントロン-1内の塩基配列は δ 鎖遺伝子の塩基配列に一致していた。このことから Miyada 遺伝子はコドン18の第1塩基とコドン22の第1塩基間の13塩基内での Crossover によって生じたものと思われる(図5中で点線で囲んで示した領域)。この解析結果は, 先のグロビンのアミノ酸組成分析の結果からの予想とよく一致している。なお, Miyada 遺伝子の第2コドンは CAC で HgiAI 切断部位が存在し,

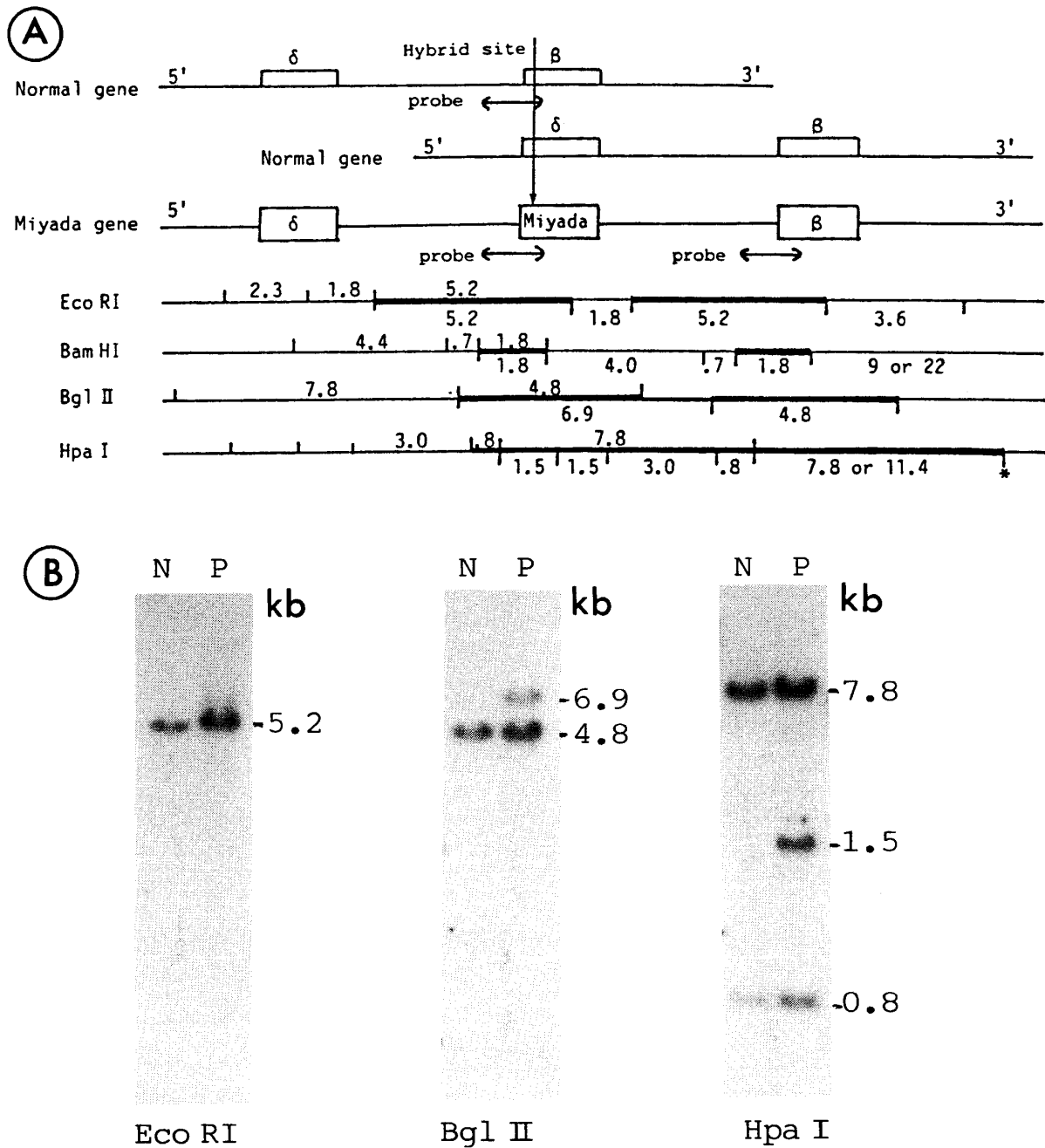


図4 (A): サザンブロットハイブリダイゼーションによって検出される制限酵素と DNA 断片サイズ (kb). 5' β 1.4プローブによって検出される DNA 断片は図中で太線で示した. 線上の数字は正常遺伝子配列に, 線下の数字は異常遺伝子配列に観察される DNA 断片長 (kb) を示す.
 (B): 制限酵素と5' β 1.4プローブのハイブリダイゼーションによって得られたオートラジオグラム.

その多型は (+) で示されるものであった.
 この患者の末梢血液の網状赤血球による合成 Hb の分析では, 図6に示すように正常 β 鎖と α 鎖グロビンピーク間に異常 Hb に由来するグロビンピークが現れるが, β 鎖や α 鎖グロビンに見られる ^3H -Leu の取り込みはほとんど観察

されず, 末梢血液の網状赤血球中の異常グロビン mRNA はほとんど活性をもたないことを示した. β 鎖と α 鎖グロビンの合成比率 (β/α) は1.06であり正常範囲内 (正常値: 0.9~1.2) にあった.

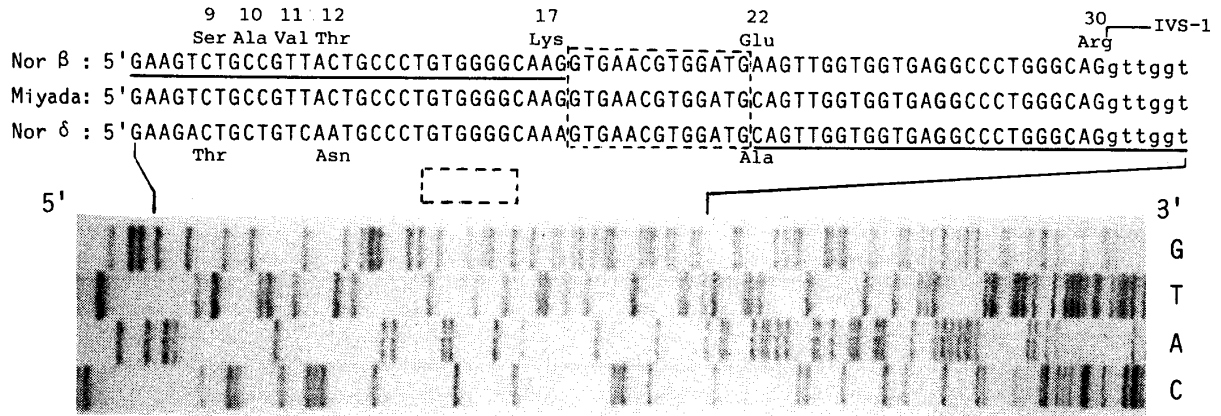


図5 Hb Miyada 保因者 DNA の PCR 増幅-クローニングからのクローンの塩基配列決定のオートラジオグラム。
下線で示した部分が Miyada ($\beta\delta$) 融合遺伝子として観察できる。Crossover 領域を点線四角で囲んで示した。

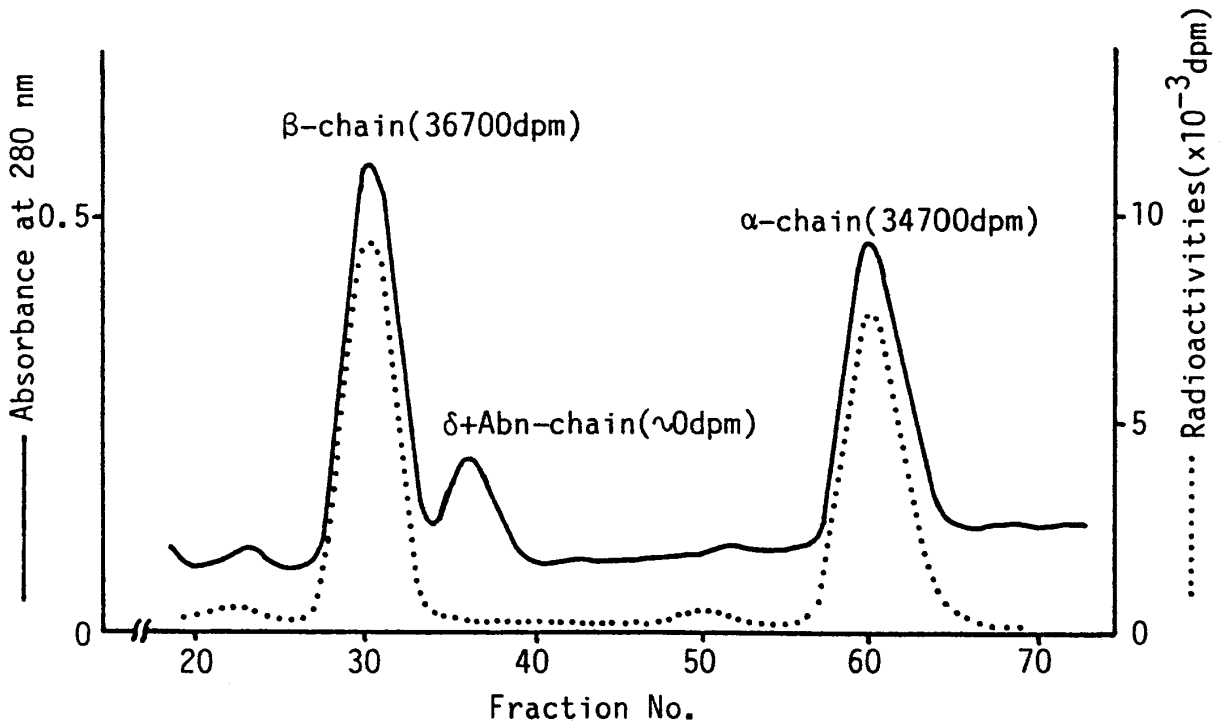


図6 末梢血液中での合成グロビンの CM-セルロースカラム分析。
実線はグロビンの溶出パターンを示し、点線は各グロビンへの ^3H -Leu の取り込みを示す [() 内数字はグロビンへの ^3H -Leu の全活性量 (dpm) を示す]。

考 察

糖化 Hb 含量測定用の HLC-723GHbII は、陽イオン交換樹脂を担体にし、異種イオン強度の溶出液で Hb 成分を HbA_{1a}、HbA_{1b}、HbF、HbA_{1c} および HbA 画分の順に溶出させ、総 Hb

中の HbA_{1c} 含量を測定しようとするものである。この際 HbA₂ は HbA 画分内に含まれる²⁾。この HLC で検出される異常 Hb はアルカリ緩衝液 (pH 8.6) 中での電気泳動で fast-moving に相当し、HbA 画分より早く (あるいは陽極) に移動する Hb が主なものとなる。これに対し slow-

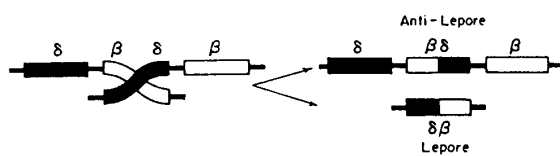


図7 δ 鎖と β 鎖遺伝子間での Crossover による融合遺伝子の生成機構。

moving の異常 Hb では, その主成分は HbA 画分に含まれるため検出されにくくなるが, その糖化 HbX_{1c} 成分が HbA_{1c} 近傍に現れ, 異常 Hb の発見につながることもある. 今回の HLC 上での異常ピークはこの例に当たり, 等電点分画や DEAE-HPLC で slow-moving 異常 Hb に相当する Hb が検出された. HbA₂ と同等の電気泳動的挙動を示す異常 Hb には HbC [β 6 (A3) Glu→Lys] や HbE [β 26 (B8) Glu→Lys] がよく知られており, また, Hb Agenogi [β 90 (F9) Glu→Lys] は日本人に発見された HbE 様の異常 Hb である¹⁾.

異常 Hb の構造解析は, 異常グロビンのトリプシン消化による生成ペプチドのアミノ酸分析で行われ, Hb Miyada¹⁰⁾ の構造を示唆した. Hb Miyada は β 鎖と δ 鎖遺伝子間での Crossover によって生じたと考えられる Anti-Lepore 型の $\beta\delta$ 融合鎖グロビンをもつ特異な異常 Hb である(図7). さらに, サザンブロットハイブリダイゼーション法による遺伝子解析や RCR-クローニング法を応用した遺伝子塩基配列の解析から, コドン17と22の間で β 鎖と δ 鎖遺伝子が Crossover し, 5'端には β 鎖遺伝子, 3'端には δ 鎖遺伝子由来の構造をもつ Miyada (Anti-Lepore) 遺伝子を同定することができた. Kimura ら¹¹⁾ や Driscoll ら¹²⁾ は, Hb Miyada の発端者の遺伝子解析を行っており, その構造はここに示した Hb Miyada 保因者からの遺伝子と同一構造のものであった. 同じ福岡県下在住者であることから, 血縁関係にあるものと思われるが, 今回, 家族調査まで行うことは出来なかった. Hb Miyada と類似の Anti-Lepore 型遺伝子をもつ異常 Hb に Hb P-Nilotic, Hb P-Congo, Hb Lincoln Park がある. このうち Hb P-Nilotic の β 鎖と δ 鎖との遺伝子融合領域は Liu ら¹³⁾ によって異常遺伝子のクローニング-塩基配列解

析から明らかにされコドン31と50の間の54塩基配列中での Crossover であることが見いだされ, Miyada 遺伝子との違いが報告されている. Hb P-Congo はコドン22から116の領域での Crossover が想定されており¹⁴⁾, Hb Lincoln Park は Hb P-Nilotic と同様の領域での Crossover を起こしている外に, δ 137Val→0 の3塩基脱離がある¹⁵⁾.

Miyada 遺伝子をもつ β 鎖様遺伝子群は 5'- ϵ -G γ -A γ - ψ β - δ -($\beta\delta$)- β -3' 配列であり, Hb Miyada 保因者の δ - β 遺伝子領域は: 5'- δ -($\beta\delta$)- β -3'/5'- δ - β -3' のヘテロ接合体である. Miyada ($\beta\delta$) 遺伝子は 5' 端に β 鎖由来のプロモーター領域を保持しているため, その遺伝子からの転写効率や生成した mRNA 活性は β -mRNA と同様の効率・活性を有すると考えられる. しかし, Hb Miyada の全 Hb 中の含量は約17% (HbA₂ を含め19.8%) であり, 遺伝子構造から予想される含量 (33%) の約 1/2 である. これに対し, ($\delta\beta$)-融合遺伝子から産生されるグロビンをもつ Hb Lepore では, 予想含量 (50%) に対し低値の 9-12% を示す¹⁶⁾¹⁷⁾. 骨髄赤芽球による *in vitro* のグロビン合成実験では, δ 鎖由来のプロモーター領域をもつ ($\delta\beta$)-Lepore グロビンは培養初期では盛んにグロビン合成 (5分後: $\delta\beta/\beta=20.7\%$) を行い, 成熟赤血球内の含量に匹敵する合成量を示す. しかし, 時間の経過とともにその合成能は漸次低下 (60分後: 10.6%, 120分後: 9.8%) することが示された¹⁸⁾. また, 末梢血液中の網状赤血球ではその合成は観察されない¹⁹⁾. 同様の現象は δ 鎖グロビンにも見られ, 培養初期には β 鎖に対し 3% であったものが60分後には1.5%に低下する¹⁸⁾. 赤血球の成熟過程における δ 鎖や ($\delta\beta$) 融合鎖グロビン mRNA の不安定性が原因しているものと考えられている¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾. Hb Lepore のヘテロ接合体はサラセミア症様の軽度の貧血症状を呈し, ホモ接合体は重症のサラセミア症症状を呈する²²⁾²³⁾. δ -mRNA の寿命は β -mRNA に比べ短く, HbA₂ の低含量の原因にも考えられている.

ここに示す Hb Miyada 保因者の末梢血液中の網状赤血球による合成 Hb の解析は, 非 α 鎖

と α 鎖間に合成不均衡を示さなかったが ($\beta/\alpha = 1.06$)、Miyada ($\beta\delta$) 融合型グロビンへの放射活性物質の取り込みはほとんど観察されず、Roberts ら²⁴⁾によって報告された結果と類似していた。この Hb 合成試験の結果から、①: Miyada-mRNA の遺伝子からの低い転写効率がグロビン産生の低下を起こしている、②: 転写された Miyada-mRNA が短寿命のため赤血球の成熟過程において急速にそのグロビン産生能を減じている、かのいずれかが考えられる。しかし、Hb Miyada の転写過程は β 鎖遺伝子型プロモーターに支配されていること、 δ 鎖遺伝子のプロモーター配列をもつ Hb Lepore も赤芽球内では Hb 合成を行っていることより、プロモーター領域の違いによるものとは考えられない。Miyada (Anti-Lepore) - mRNA も

Lepore-mRNA や δ -mRNA に見られるように赤血球の成熟過程において部分的分解を受けその機能を失っているのかも知れない。また、 α_2 鎖と α_1 鎖遺伝子間や $\epsilon\gamma$ 鎖と $\Lambda\gamma$ 鎖遺伝子間に見られるような塩基配列の差異がこの現象に原因しているのかも知れない。今後の Miyada 遺伝子や mRNA の広範な詳細な研究に待たねばならない。

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始ご指導いただいた川崎医科大学・生化学原野昭雄助教授に感謝いたします。

なお、本研究は文部省科学研究費補助金 (04671444) および川崎医療福祉大学プロジェクト研究費によって行った。

文 献

- 1) International Hemoglobin Information Center (IHIC) (1992) Variants list. *Hemoglobin*, **16**, 127—313.
- 2) 東ソー株式会社, 東ソー自動グリコヘモグロビン分析計-HLC-723GHb II 使用説明書
- 3) 原野昭雄, 原野恵子, 小出智子, 岡田美恵子, 上田 智, 柴田 進 (1980) 等電点分画法による異常血色素の Mass Screening 法. *臨床病理* **28**, 149—152.
- 4) Clegg JB, Naughton MA and Weatherall DJ (1966) Abnormal human haemoglobins, separation and characterization of the α and β chains by chromatography, and determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J Bangkok. *The Journal of Molecular Biology*, **19**, 91—108.
- 5) 原野昭雄, 上田 智 (1981) ヘモグロビン合成・分析法-サラセミア症診断のための新しい技術. *臨床病理* **29**, 670—679.
- 6) Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E and Surrey S (1982) Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin*, **6**, 27—36.
- 7) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 9.31-9.57.
- 8) Harano T, Harano K and Ueda S (1990) Application of polymerase chain reaction (PCR) to molecular analysis of the β globin gene of Japanese β^0 -thalassemia-Hb San Diego [β^{109} (G11) Val \rightarrow Met]. *Acta Haematologica Japonica*, **53**, 882—888.
- 9) Biggin MD, Gibson TJ and Hong GF (1983) Buffer gradient gels and ^{35}S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. **80**, 3963—3965.
- 10) Ohta Y, Yamaoka K, Sumida I and Yanase T (1971) Hemoglobin Miyada, a $\beta\delta$ fusion peptide (anti-Lepore) type discovered in a Japanese family. *Nature New Biology*, **234**, 218—219.
- 11) Kimura A, Ohta Y, Fukumaki Y and Takagi Y (1984) The fusion gene in man: DNA sequence

- analysis of the abnormal globin gene of hemoglobin Miyada. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **119**, 968—974.
- 12) Driscoll MC, Ohta Y, Nakamura F, Bloom A and Bank A (1984) Hemoglobin Miyada : DNA analysis of the anti-Lepore $\beta\delta$ fusion gene. *American Journal of Hematology*, **17**, 355—362.
 - 13) Liu Jz, Harano T, Lanclos KD and Huisman THJ (1987) The δ - β crossover leading to the $\beta\delta$ hybrid gene of Hb P-Nilotic is located within 54 base pairs of the 5' end of exon 2 or between codon 31 and 50. *Biochimica et Biophysica Acta*, **909**, 208—212.
 - 14) Lehmann H and Charlesworth D (1970) Observation on Haemoglobin P (Congo type). *The Biochemical Journal*, **119**, 43—43.
 - 15) Honig GR, Shamsuddin M, Mason RG and Vida LN (1978) Hemoglobin Lincoln Park : A $\beta\delta$ fusion (anti-Lepore) variant with an amino acid deletion in the δ chain-derived segment. *The Proceeding of National Academy of Science, the United States of America* **75**, 1475—1479.
 - 16) Baglioni V and Ventruto V (1968) Human abnormal haemoglobins. 11. A chemical study of haemoglobin Lepore from a homozygote individual. *European Journal of Biochemistry*, **5**, 29—32.
 - 17) Labie D, Schroeder WA and Huisman THJ (1966) The amino acid sequence of the δ - β chains of Hemoglobin Lepore_{Augusta}=Lepore_{Washington}. *Biochimica et Biophysica Acta*, **127**, 428—437.
 - 18) Lang A, White JM and Lehmann H (1972) Synthesis of Hb Lepore ($\alpha_2\delta\beta_2$) : Influence of δ and β nucleotide sequence on synthesis of $\delta\beta$ chain. *Nature New Biology*, **240**, 268—271.
 - 19) White JM, Lang A, Lorkin PA, Lehmann H and Reeve J (1972) Synthesis of Haemoglobin Lepore. *Nature New Biology*, **235**, 208—210.
 - 20) White JM, Lang A and Lehmann H (1972) Compensation of β chain synthesis by the single β chain gene in Hb Lepore trait. *Nature New Biology*, **240**, 271—273.
 - 21) Roberts AV, Weatherall DJ and Clegg JB (1972) The synthesis of human haemoglobin A₂ during erythroid maturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **47**, 81—87.
 - 22) Efremov GD (1978) Hemoglobin Lepore and anti-Lepore. *Hemoglobin* **2**, 197—233.
 - 23) Efremov DG, Efremov GD, Zisovski N, Stojanovski N, Kutlar F, Diaz-Chico JC, Kutlar A, Yang KG, Stoming TA and Huisman THJ (1988) Variation in clinical severity among patients with Hb Lepore-Boston- β thalassaemia is related to the type of β -thalassaemia. *British Journal of Haematology*, **68**, 351—355.
 - 24) Roberts AV, Clegg JB, Weatherall DJ and Ohta Y (1973) Synthesis in vitro of anti-Lepore haemoglobin. *Nature New Biology*, **245**, 23—24.