

# ヘモグロビン M-Hyde Park の遺伝性に関する研究

末次 慶收

ヘモグロビン (Hb) 異常症の一つで Hb M 症と呼ばれる一群に分類される Hb M-Hyde Park [ $\beta$  92His  $\rightarrow$  Tyr] は,  $\beta$  グロビン鎖のアミノ酸置換によるメト化ヘモグロビン (ferri-Hb) の形成によってチアノーゼと溶血性貧血を呈する. 今回, Hb M 症の疑われる男児 (発端者), 父親 (パキスタン人), 母親 (日本人) と兄のパキスタン人家系について, 溶血液の Hb 分析, グロビンの構造解析や遺伝子解析を行い, 発端者とパキスタン人の父親が Hb M-Hyde Park のヘテロ保因者であると診断した.

また, 本家系と日本人3家系6症例について,  $\beta$  グロビン遺伝子群の7ヶ所,  $\beta$  グロビン遺伝子内部の5ヶ所の多型を PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) 法, PCR-直接 sequence 法により決定し, 比較した. この結果,  $\beta$  M-Hyde Park の変異を持つ allele はパキスタン人と日本人では異なったパターンを示した. これは Hb M-Hyde Park の変異発生源が, 異なる民族間で独立したものであることを示唆している.

さらに, 最近開発された遺伝子解析法である Single Step Extension Method (SSE: または SNaPshot 法) を導入し,  $\beta$  グロビン遺伝子内部の5ヶ所の多型と, Hb M-Hyde Park の変異の決定を行った. この結果, 本法は PCR-直接 sequence 法の結果と一致し, 既知の変異や多型を決定する方法としては, ARMS (Amplification Refractory Mutation System) 法や PCR-RFLP 法, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法に比べより簡便で優れた方法であると考えられた. (平成16年10月21日受理)

## Gene Analysis of Hemoglobin M-Hyde Park [ $\beta$ 92His $\rightarrow$ Tyr]

Yoshimasa SUETSUGU

Hemoglobin (Hb) M-Hyde Park [ $\beta$  92His  $\rightarrow$  Tyr] is a type of Hb M diseases in which the cyanosis and hemolytic anemia are caused by ferri-Hb formation due to amino acid replacement of the  $\beta$ -globin chain. In the present study, the author examined the hemoglobinopathy of a Pakistani family, which is composed of the propositus (one year old boy suspected of Hb M disease), his parents and an elder brother. It was decided that two members of the family, the boy and his father, were heterozygous for Hb M-Hyde Park.

Single nucleotide polymorphism (SNP) at the seven positions of the  $\beta$  globin gene cluster (haplotype) and five SNPs of the  $\beta$ -globin gene (framework) of this family and three Japanese families (six patients) were determined by PCR-RFLP and PCR-direct sequencing. The results

showed that the SNPs of the abnormal allele obtained from the six Japanese carriers of Hb M-Hyde Park were of only one type, but that of the Pakistani family were different from those of the Japanese. Therefore, it was deduced that origins of Hb M-Hyde Park differ in the Pakistani and Japanese.

In addition, the Single Step Extension Method (SSEM ; or SNaPshot method) for gene analysis was applied to determine the framework of the  $\beta$ -globin gene. The results were consistent with that of PCR-direct sequencing. This SSEM might be considered to be simpler and better than the ARMS (Amplification Refractory Mutation System), PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) and SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) methods for the detection of known mutations or SNPs. (Accepted on October 21, 2004) *Kawasaki Igakkaishi* 30(2) : 123-135, 2004

**Key Words** ① Hb M-Hyde Park ② Haplotype ③ Framework  
④ Single nucleotide polymorphism (SNP)  
⑤ Single step extension method (SSEM)

## はじめに

ヘモグロビン (Hb) 異常症は、Hb を構成する  $\alpha$  グロビン鎖、あるいは  $\beta$  グロビン鎖分子の質的異常である異常 Hb 症と、量的な異常 (不均衡) を生じるサラセミアに大別され、いずれも先天的な遺伝子異常症である。異常 Hb 症は、各構成グロビン遺伝子のエキソン領域の一塩基置換によってアミノ酸置換 (変異) を持つグロビン分子が合成され、Hb 分子の安定性や酸素結合能に変化を引き起こす。これにより臨床的にはほとんど異常所見の無いものから、Hb 分子の不安定性による溶血性貧血、高酸素親和性による多血症、低酸素親和性によるチアノーゼや Hb S 症 (鎌状赤血球症貧血) にみられる血管閉塞など多彩な臨床所見を呈する<sup>1), 2)</sup>。一方、サラセミアは、グロビン遺伝子の欠失や、転写活性の低下、異常 mRNA 産生などによって  $\alpha$  グロビン鎖と  $\beta$  グロビン鎖間の合成不均衡を引き起こす疾患である。臨床的にはほとんど問題とならない軽症型の  $\alpha$  サラセミア-2、重症型の Hb H 症でみられる溶血性貧血、 $\beta$  サラセミアの無効造血など異常の程度は様々である。

今研究では、グロビンのアミノ酸置換によってメト化 Hb (ferri-Hb) を生じるために先天性

にチアノーゼを呈する、Hb M 症の一つである不安定な Hb M-Hyde Park を持つパキスタン人家系について、異常 Hb の検出、グロビンの構造解析、グロビン合成試験 ( $\alpha/\beta$  合成比)、遺伝子解析を行い、家系内の遺伝様式、異常 allele の日本人家系との遺伝性の比較を行った。また遺伝子解析の新しい方法として最近開発された Single Step Extension Method (SSE 法)<sup>3)</sup>を用い、遺伝子診断法としての有用性を検討した。

## 材料と方法

### 1. 血液試料と DNA

ヘルニア手術目的での入院時、口唇のチアノーゼを指摘された発端者の男児 (1 歳)、同様の口唇色を呈しているパキスタン人の父、口唇色正常な日本人の母と兄の 4 人の血液検体を用いた。EDTA 添加末梢血の血球計測は通常法で行った。遺伝子解析に用いた DNA は、白血球層からフェノール-クロロホルム法で抽出した。TE (10 mmol/L Tris-1 mmol/L EDTA, pH 7.4) に溶解して DNA 溶液とした。また、過去に当教室で解析した日本人の Hb M-Hyde Park 症例、3 家系 6 症例についても同様の遺伝子解析を行った。なお、DNA の抽出および研究利用について、Hb 異常症の診断・病態解析を目的とすることでインフォームドコンセン

トを得た上で使用した。

## 2. 異常 Hb の診断

### 1) Hb 分析

全血 1.2 ml を 0.9% 食塩水で洗浄後、赤血球分画を四塩化炭素で溶血させ、遠心した上清を分取し、溶血液を得た。溶血液の陰イオン交換樹脂高速液体クロマトグラフィー法 (DEAE-HPLC; DEAE-5PW, 7.5 × 75 mm, Tosoh Co., Tokyo, Japan, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 と 0.5 mol/L NaCl-20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 によるグラジエント)<sup>4)</sup>及びキャリヤーアンホライトを含む等電点電気泳動法 (IEF; pH: 6 ~ 9)<sup>5)</sup>で Hb 分析を行い、異常 Hb の検出と各 Hb の組成を算出した。不安定性の検出は、イソプロパノール沈殿法 (Carrell 法; 17% イソプロパノール/0.1 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4)<sup>6)</sup>によって行った。

### 2) グロビン構造解析

溶血液を 1% 塩酸-アセトン処理によって脱ヘムし、グロビンを調製した。グロビンを CM セルロース (CMC) カラムクロマトグラフィー (CM-52, Whatman Paper Co., Kent, UK; 8 mol/L 尿素-50 mmol/L メルカプトエタノール-リン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.85, ナトリウム濃度: 7.5 → 32.5 mmol/L のリニアグラジエント) によって各グロビンを分離、分取し、水に対して透析後、凍結乾燥した<sup>7)</sup>。得られた異常グロビン画分はアミノエチル化後、Sephadex G25 Fine カラム (溶出液: 0.2 mol/L 酢酸溶液) を通し<sup>8)</sup>、凍結乾燥した。TPCK-トリプシン (Tp) により消化し、Tp 消化ペプチドを逆相 HPLC [RP-HPLC; 0.1% トリフルオロ酢酸溶液とアセトニトリル (0 → 50%) によるリニアグラジエント] によって検出された異常ペプチドを単離<sup>9)</sup>、凍結乾燥後、6 mol/L 塩酸を加え、減圧下で封管し、110℃, 20 時間加水分解した。アミノ酸自動分析機でアミノ酸組成を求めた。

### 3) グロビン合成試験

全血 400  $\mu$ l を生理食塩水で洗浄後、血球層を

トリチウム標識ロイシン (<sup>3</sup>H-Leu) を含むアミノ酸培地中で 37℃, 2 時間のインキュベートした。生理食塩水で洗浄後、0.01% サポニン溶液 0.8 ml を加え溶血させ、合成 Hb 溶血液とした<sup>7)</sup>。溶血液から 2) グロビン構造解析と同様にグロビンを調製、CMC カラムクロマトグラフィーで  $\alpha$  グロビン鎖と  $\beta$  グロビン鎖を分画した。各チューブに含まれる <sup>3</sup>H-Leu を液体シンチレーションカウンター (シンチゾール 500, 同仁化学, 熊本, を使用) で dpm 値を測定し、各グロビン画分中の dpm 値の合計値から  $\beta/\alpha$  合成比を算出した<sup>7)</sup>。

### 4) Polymerase Chain Reaction (PCR) - 直接 sequence 法

テンプレート DNA の調製は、1. で得たゲノム DNA を用い、 $\beta$  グロビン遺伝子および  $\alpha 2$  と  $\alpha 1$  グロビン遺伝子のエキソン部分の全領域を含むよう設計したプライマー、緩衝液、各種ヌクレオチドおよび PCR 酵素を用い PCR を行った。 $\beta$  グロビン遺伝子は TaKaRa Ex Taq (TaKaRa Bio. Inc., Shiga, Japan) を PCR 酵素として用い、解裂反応 95℃, アニール 55℃, 伸長反応 72℃ で 30 サイクルを行った。 $\alpha$  グロビン遺伝子は HotstarTaq (Qiagen Sciences, Merlyland, USA) を用い、解裂 95℃, アニール 55℃, 伸長 72℃ で 35 サイクルを行った<sup>10)</sup>。

PCR 増幅物の精製は、1% アガロースゲル電気泳動 (1 × TEA バッファー, 60 V, 60 分) を行い、目標サイズのパンド ( $\beta$  グロビン遺伝子では約 3 kb,  $\alpha$  グロビン遺伝子は約 1 kb) をゲルから切り取り、DNA 抽出キット (Freeze'n squeeze DNA, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で回収した。イソプロパノール及びエタノールで沈殿させ TE に溶解した。

精製 DNA ( $\beta$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$ ) をテンプレートとして、サイクルシーケンス法 (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits ver.3.1, Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan) で処理後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan) で塩基配列を決定した<sup>11)</sup>。



### 3. 遺伝様式の解析

#### 1) PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法

パキスタン人由来の家系4検体と、日本人由来3家系6検体の合計10検体について検討を行った。β様グロビン遺伝子群に存在する7ヶ所の制限酵素多型部位 (Fig. 1A)<sup>12)</sup>の5'側と3'側に対応するプライマーを用いてPCRで増幅し、その増幅物を各制限酵素で消化した<sup>13)</sup>。切断の有無を1%アガロースゲルまたは2% Nusieve gel (Takara Bio Co., Shiga, Japan) 電気泳動法で確認、各部位の切断の有/無を+/−で判定した。

#### 2) βグロビン遺伝子の framework の決定

βグロビン遺伝子のPCR産物の直接シーケンス法 (前述) で、βグロビン遺伝子内の5ヶ所の多型 (Fig. 1B) を決定した<sup>12), 14)</sup>。

#### 3) パキスタン人と日本人の Hb M-Hyde Park の比較

PCR-RFLP法と直接シーケンス法で得られたβ様グロビン遺伝子群の多型 (ハプロタイプ) を比較検討した。

#### 4. Single Step Extension Method (SSE 法)

本法<sup>3)</sup>は、キャピラリーシーケンサーを用いて多型あるいは変異塩基を検出する遺伝子解析の一手法である。多型あるいは変異部位の1塩基手前までの検出プライマーを作製し、蛍光標識した4種類のddNTP (dideoxynucleotide triphosphate) を用いてPCRを行う。ddNTPを用いるので、この反応では1塩基だけの伸長反応となる。このPCR産物をキャピラリーシーケンサー (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Japan) で解析することで、予想される多型あるいは変異塩基を検出することができる。この際、複数個の異なる塩基長の

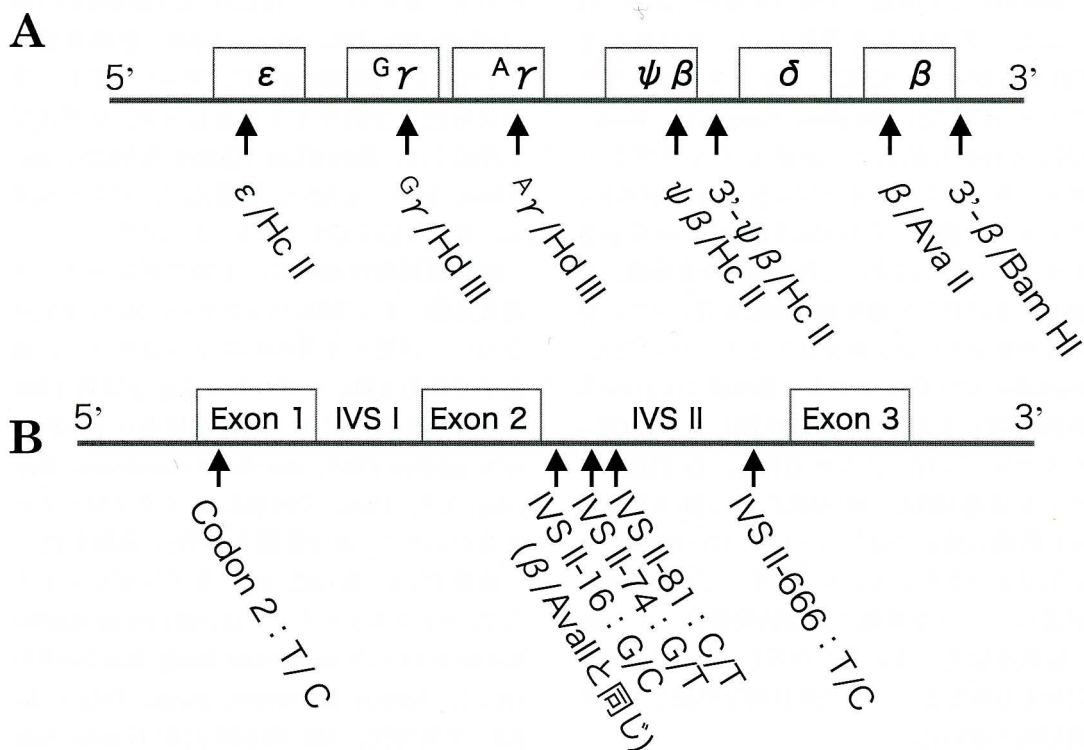


Fig. 1 βグロビン遺伝子群とβグロビン遺伝子に含まれる多型 A: βグロビン遺伝子群の制限酵素認識多型 B: βグロビン遺伝子内部の多型

**Table 1** Single step extension method で用いた変異検出のプライマー。

	detected site	primer sequence	direction	primer length (mer)	concentration (pmol/ $\mu$ L)	common/SNP(mutation)
1	$\beta$ codon 2	5'-AACAGACACCATGGTGCA	forward	18	1	C/T
2	IVS II-16	5'-CTTCAGGGTGAGTCTATGGGAC	forward	22	0.5	G/C
3	IVS II-74	5'-GTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGA	forward	26	0.5	G/T
4	IVS II-81	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAACCCATTCTAACTGTACCCT	reverse	40	1.5	C/T
5	IVS II-666	5'-TTACAATTATATGCAGAAATATTTATATGCAGA	reverse	34	1.8	C/T
6	$\beta$ codon 92 (Hb M-Hyde Park)	5'-ATATATATATATATATATATATATATATCTTTGCCACACTGAGTGAGCTG	forward	52	1.8	C/T

1～5 は  $\beta$  グロビン遺伝子の framework (Fig. 1B) 決定, 6 は Hb M-Hyde Park の変異検出のためのプライマー。

検出プライマーを混合することで、一つの反応系で複数（最大10種類）の変異を同時に検出することが可能である。今回の検討では  $\beta$  グロビン遺伝子内の 5ヶ所の多型 (Fig. 1B) の framework を決定するための 5種類の検出プライマーと、Hb M-Hyde Park の変異点に対応した検出プライマーの計 6種類の検出プライマーを混合した系で解析した。それぞれの検出プライマーの配列は Table 1 に示す。

パキスタン人家系 4 検体と日本人 3 家系 6 検体の計10検体の DNA を材料に、 $\beta$  グロビン遺伝子の 3つのエキソン部分を含む約1.7 kb を、プライマー (forward: 5'-AACTCCTAAGGCC AGTGC, reverse: 5'-TTGGACAGCAAGAAA GCGAG), TaKaRa Ex Taq を用いて PCR (解裂 95℃, アニール55℃, 伸長72℃, 35サイクル) で増幅, 得られた産物 2.5  $\mu$ l に Exonuclease I (ExoI, TaKaRa) 1U, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, TaKaRa) 1U を加え, 37℃, 30分間反応させ, 初回 PCR で余ったプライマーと dNTP を分解させた。さらに, 80℃, 30分間加熱して ExoI と SAP を不活化した。滅菌水 2.5  $\mu$ l と SNaPSHOT 試薬 (Applied Biosystems) 2.5  $\mu$ l, 検出プライマー混合液 1  $\mu$ l を加え, 解裂 96℃, アニール50℃, 伸長60℃, 25サイクルの PCR で 1塩基伸長反応を行った。ついで, SAP 1U を加え37℃, 60分間の反応で ddNTP を分解し, さらに, 75℃, 30分間の加熱で SAP を不活化して得られた反応液 0.5  $\mu$ l に Gene Scan 120 LIZ size standard 0.5  $\mu$ l, HiDi ホルムアミド

**Table 2** 末梢血検査所見

	発端者	兄	父	母
RBC ( $10^4/\mu$ l)	337	465	383	363
Hb (g/dl)	10.3	10.8	12	10
Ht (%)	32.9	34	37.2	32.4
retic (%)	4.1	0.6	3.9	1
MCV (fl)	97.6	73.1	97.1	89.3
MCH (pg)	30.5	23.2	31.3	27.5
MCHC (%)	31.3	31.7	32.2	30.9
WBC ( $/\mu$ l)	7000	4700	6900	7100
Plt ( $10^4/\mu$ l)	39.9	34.3	25.8	31.1

10  $\mu$ l を加え, 95℃, 2分間の反応で DNA を解裂させたのち, キャピラリーシーケンサーにかけ, 解析アプリケーション Gene Scan (Applied Biosystems Japan) で解析を行った。

## 結 果

### 1. 異常 Hb の診断

#### 1) 末梢血検査所見

家族の Hb 濃度はいずれも Hb 10～12 g/dl 程度で軽度の貧血を認めた。発端者と父は網状赤血球数の増加を認め, 明らかな出血の病歴は無いことから溶血性貧血が疑われた。一方, 兄は MCV 低値, 母は MCV が正常下限の小球性貧血であった (Table 2)。

#### 2) Hb 分析

Figure 2 に発端者溶血液の Hb 分析の結果を示す。Figure 2A の DEAE-HPLC による Hb 分析では, 正常 Hb A より早く Hb A<sub>2</sub> と重なって溶出する異常 Hb X のピークを認め, その含量は 14.7% であった。また, Hb F に相当するピー

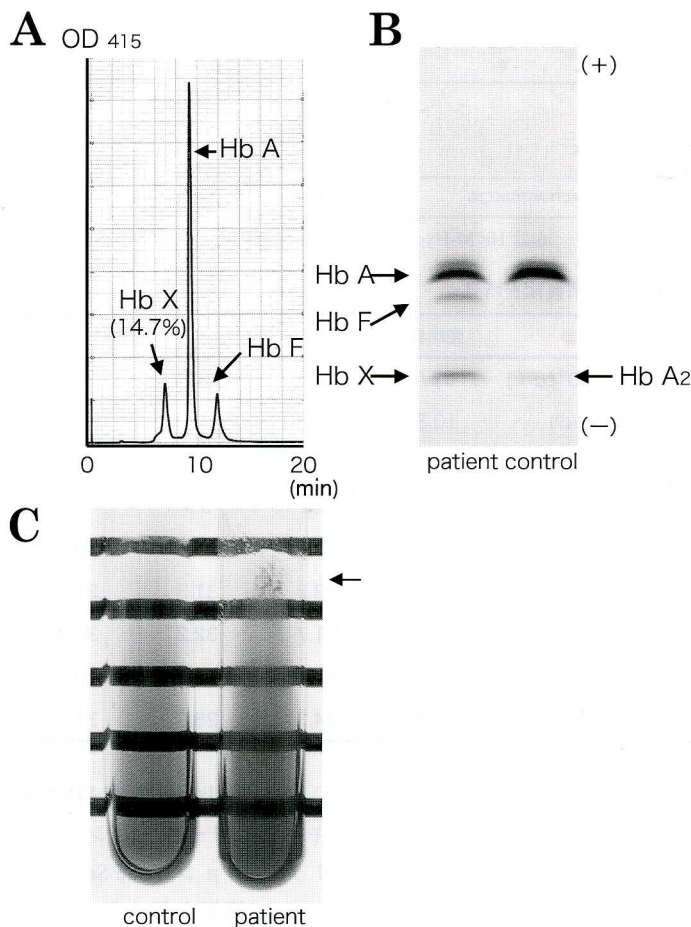


Fig. 2 発端者溶血液のヘモグロビン分析

A: DEAE-HPLC

各ヘモグロビン, および異常 Hb X の含量を示す.

B: 等電点電気泳動

各ヘモグロビン, および異常 Hb X を示す.

C: 不安定性試験

図では試験管を倒して撮影. ←は変性ヘモグロビンの沈殿形成を示す.

クも認められた. IEFでも Hb A の陰極側, Hb A<sub>2</sub> に重なる位置に異常 Hb X のバンドと Hb F のバンドを認めた (Fig. 2B). イソプロパノール不安定性試験は, 発端者の溶血液に明らかな沈殿の形成を認め (Fig. 2C, ←で示されている), 不安定性試験陽性と判定された. 父の溶血液でも同様の異常 Hb X が確認されたが, 兄と母の溶血液では特に異常はみられなかった.

### 3) グロビン構造解析

CMC カラムクロマトグラフィーで分画されたグロビンピークは正常な  $\beta$  グロビンより早く溶出されるピークが現れた (Fig. 3A). 異常  $\beta$  グロビンとして集められた画分のトリプシン消化物の逆相クロマトグラムを Figure 3B に示した. 正常  $\beta$  グロビンのクロマトパターンと比較し, 保持時間 50 分付近に出現する  $\beta$ Tp-10-11 のピークが消失し,  $\beta$ Tp, -4, -5, -9 が出現する 65 分付近に異常ピークを認めた. この結果から,  $\beta$  Tp-10-11 ( $\beta$  codon 83-104; Gly-Thr-Phe-Ala-Thr-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg に相当) のいずれかにアミノ酸置換があると推定された. しかしながら, 分離した異常ピークのアミノ酸分析 (データは不記) では, 異常アミノ酸置換を決定するには至らなかった.

### 4) Hb 合成試験

末梢血液中の網状赤血球にて合成されたグロビンの分析結果を Figure 4 に示した. 異常  $\beta$  グロビン鎖, 正常  $\beta$  グロビン鎖および  $\alpha$  グロビン鎖に取り込まれた  $^3\text{H}$ -Leu の放射活性値 (dpm) は,

それぞれ  $7.2 \times 10^3$ ,  $7.2 \times 10^3$  および  $24.5 \times 10^3$  であった. この結果, 異常  $\beta$  グロビン鎖 ( $\beta$  Abn) と正常  $\beta$  グロビン鎖間の合成には均衡がみられたが,  $\alpha$  グロビン鎖に対する全  $\beta$  グロビン鎖 ( $\beta + \beta$  Abn) の合成比は 0.59 と不均衡が認められた.

### 5) PCR-, 直接 sequencing

PCR で増幅した  $\beta$  グロビン遺伝子の 5' 側から順次塩基配列を解析した結果, Figure 5 に示すように発端者  $\beta$  グロビン遺伝子 codon 92



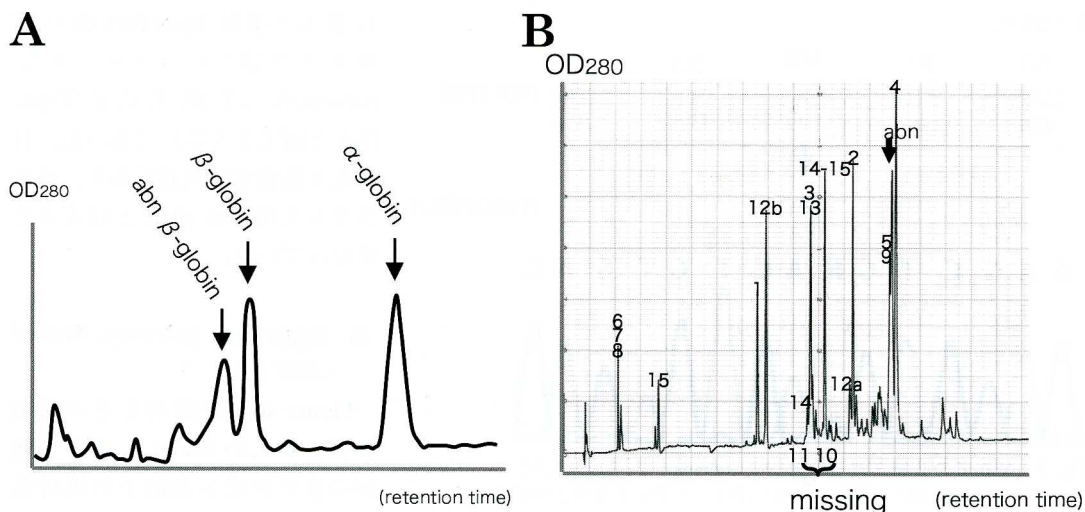


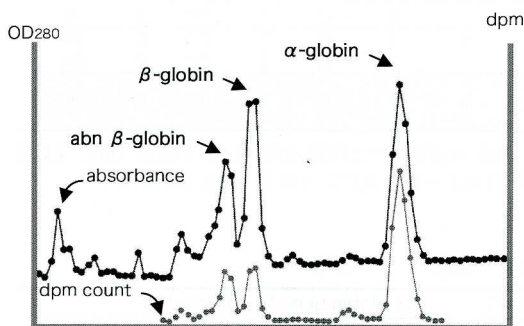
Fig. 3 グロビタンパク構造解析

A: CMセルロースカラムクロマトグラフィー

発端者溶血液から調製したグロビタンパクを用いた。各グロビンのピークを↓で示す。異常 (abn) β グロビン蛋白を単離し、アミノエチル (AE) 化, トリプシン消化を行った。

B: 逆相クロマトグラフィー

トリプシン消化異常 AEB グロビンのクロマトパターンを示す。既知のパターンと比較して、消化ペプチド 10-11の欠失と異常ペプチド, abn ↓のピークの出現がみられる。



$$\beta + \beta \text{ abn} / \alpha = 0.59$$

$$\beta \text{ abn} : 7.2 \times 10^3 \text{ dpm}$$

$$\beta : 7.2 \times 10^3 \text{ dpm}$$

$$\alpha : 24.5 \times 10^3 \text{ dpm}$$

Fig. 4 発端者のヘモグロビン合成試験

上段グラフはCMセルロースカラムクロマトグラフィーによって分離された各グロビン蛋白のピーク (OD280の吸光度) を, 下段グラフは3H標識ロイシンの各グロビンへの取り込み (dpm カウント値) を示す。各グロビンピークの dpm カウント値の合計から, β/α グロビン合成比算出した。

CACの第1塩基にCとTのヘテロ型が認められ, アミノ酸の置換はHis (CAC) → Tyr (TAC) に相当した。同様の変異は父にも認め

られたが, 兄と母は正常なCのみであった。この結果, この家系の異常Hbは, Hb M-Hyde Park [ $\beta$  92 His (CAC) → Tyr (TAC)]と同定された。

## 2. 遺伝様式の解析

PCR-RFLP法およびPCR直接sequencing法によって得られた, パキスタン由来の本家系4検体のalleleのハプロタイプをTable 3に示す。β codon 92にHb M-Hyde Parkの変異を持つ発端者と父, および正常な母のハプロタイプを比較した結果, β M-Hyde Parkのalleleのε/Hinc II, Gγ/Hind III, Aγ/Hind III, ψβ/Hinc, II, 3'-ψβ/Hinc, II, 3'-β/Bam HIのポリモルフィズムは“-+--+”で示された。同様に異常βグロビン遺伝子のframework: β codon2(C/T), IVS II, 16(C/G), IVS II, -74, (G/T), IVS II-81, (C/T), IVS II-666 (C/T)はそれぞれT, G, T, T, C (Type IIIと同定される)であった。

日本人のHb M-Hyde Parkの3家系, 6検体についての同様の検討をした結果(Table 4),

β codon

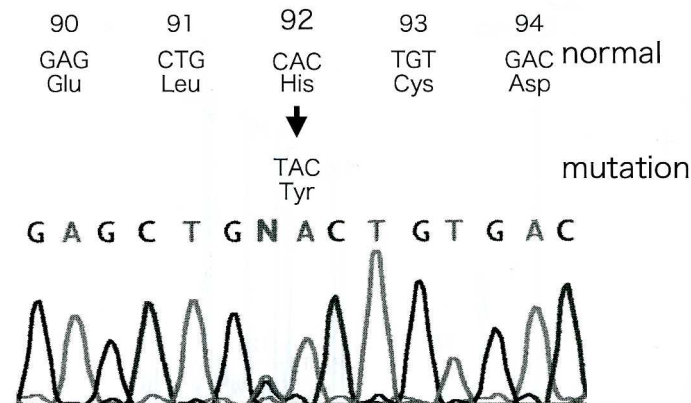


Fig. 5 発端者のβ鎖グロビン遺伝子 codon90～94の塩基配列  
βコドン92 CAC (His)→TAC (Tyr) の遺伝子変異が検出された。

日本人のβ M-Hyde Park のハプロタイプは“+ - - - +”，framework は T, G, T, C, C (Type, IIIA と同定される) であった。日本人 6 検体では共通であり，パキスタン人由来の allele とは大きく異なっていた。

### 3. Single Step Extension Method (SSE 法)

Figure 6 に発端者とその母および日本人の family 2-弟の 3 検体のβグロビン遺伝子の解析結果を示す。6 種類の検出プライ

Table 3 パキスタン人由来 Hb M-Hyde Park の allele type

β codon 92*		β globin gene cluster haplotype**						β globin gene framework***					Type
		ε	Gγ	Aγ	ψ β	3'ψ β	3' β	β codon 2	IVS II				
									16	74	81	666	
発端者	TAC	-	+	-	-	+	+	T	G	T	T	C	III
	CAC	+	-	+	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
父(パキスタン人)	TAC	-	+	-	-	+	+	T	G	T	T	C	III
	CAC	+	-	-	-	-	-	C	C	T	C	T	II
母(日本人)	CAC	+	-	+	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
	CAC	+	-	-	-	-	-	T	G	T	C	C	IIIA
パキスタン由来のHb M-Hyde Park allele type	TAC	-	+	-	-	+	+	T	G	T	T	C	III

\*: CAC (His) は正常コドン，TAC (Tyr) は Hb M Hyde Park の変異。\*\*: PCR-RFLP により決定 (Fig. 1A 参照)。+ は制限酵素による切断あり。- は切断なし。\*\*\*: PCR-直接シーケンスにより決定 (Fig. 1B 参照)。

Table 4 日本人とパキスタン人の Hb M-Hyde Park の allele type の比較

family No.	β codon 92*	β globin gene cluster haplotype**						β globin gene framework***					Type
		ε	Gγ	Aγ	ψ β	3'ψ β	3'β	β codon 2	IVS II				
									16	74	81	666	
1	TAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
	CAC	-	+	-	-	+	-	C	C	T	C	T	II
2-兄	TAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
	CAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
2-弟	TAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
	CAC	+	-	-	-	-	+	C	C	G	C	T	I
3-子1	TAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
	CAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
3-子2	TAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
	CAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
3-母	TAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
	CAC	-	+	-	+	+	+	T	G	T	C	C	IIIA
日本人	TAC	+	-	-	-	-	+	T	G	T	C	C	IIIA
パキスタン人	TAC	-	+	-	-	+	+	T	G	T	T	C	III

\*: CAC (His) は正常コドン，TAC (Tyr) は Hb M Hyde Park の変異。\*\*: PCR-RFLP により決定 (Fig. 1A 参照)。+ は制限酵素による切断あり。- は切断なし。\*\*\*: PCR-直接シーケンスにより決定 (Fig. 1B 参照)。



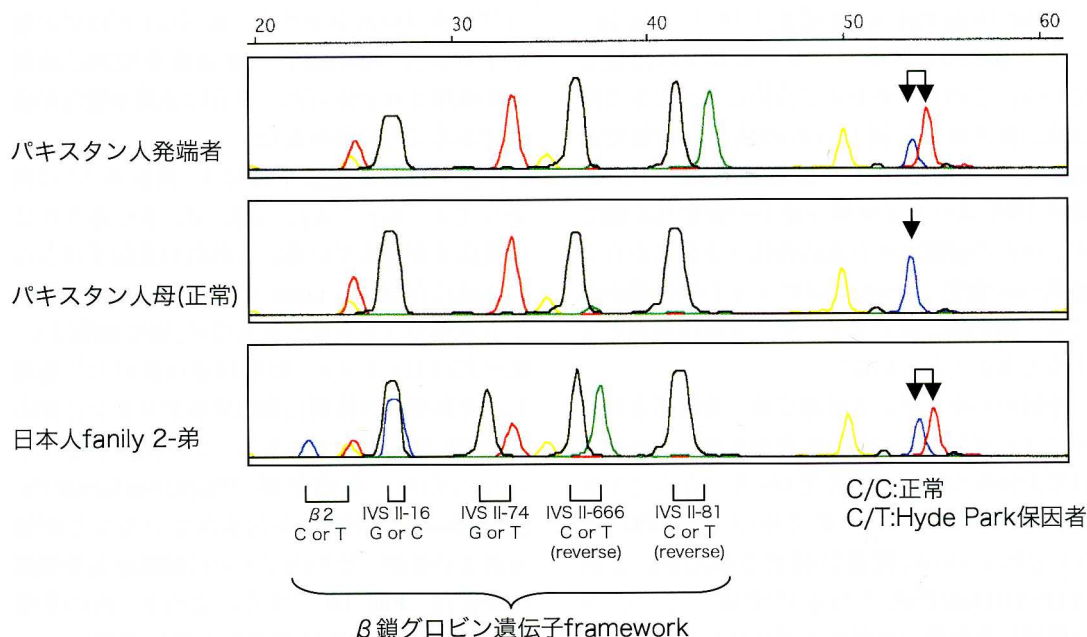


Fig. 6 Single, step, extension method による  $\beta$  鎖グロビン 遺伝子の framework の決定, および Hb M-Hyde Park の診断

左からプライマー塩基長の短い順に,  $\beta 2$ , IVS II-16, IVS II-74, IVS II-666, IVS II-81 の多形, Hb M-Hyde Park の変異検出ピークが出現している。ピークが2つの場合はヘテロ接合, 1つの場合はホモ接合を表す。ピークの色は伸長した ddNTP の種類を示しており, 黒は ddGTP, 青は ddCTP, 赤は ddTTP, 緑は ddATP を表す。

マーの塩基長の短い順に, 左から  $\beta 2$ , IVS II-16, IVS II-74, IVS II-666, IVS II-81, Hb M-Hyde Park のピークが出現している。なお IVS II-666 と IVS II-81 の検出プライマーはリバースプライマーなので, アンチセンス側の塩基が検出されている。

発端者の  $\beta$  グロビン遺伝子の framework は:  $\beta 2$  T/T, IVS II-16 G/G, IVS II-74 T/T, IVS II-666 C/C, IVS II-81 C/T で,  $\beta$ M-Hyde Park は C/T ヘテロの保因者として検出された。一方, 母の framework は T/T, G/G, T/T, C/C, C/C で,  $\beta 92$  コドンの第1塩基については正常の C のピークのみ認められ, Hb M-Hyde Park 保因者ではない。同様に, 日本人検体についても framework は C/T, G/C, G/T, C/T, C/C で, Hb M-Hyde Park の保因者と決定された。これらの結果は PCR-直接 sequence 法で得られた結果とも一致していた。

## 考 察

Hb M 症は, グロビンの作るヘムポケットに生じたアミノ酸置換によって2価のヘム鉄が3価へと酸化されメト化 Hb (ferri-Hb) となることによって黒褐色を呈し, 酸素結合能を失い, 臨床的には特徴的なチアノーゼを呈する異常 Hb 症の一群である。現在までに知られている Hb M 症には, Hb M-Iwate [ $\alpha$  87His  $\rightarrow$  Tyr], Hb M-Boston [ $\alpha$  58His  $\rightarrow$  Tyr], Hb M-Saskatoon [ $\beta$  63His  $\rightarrow$  Tyr], Hb M-Hyde Park [ $\beta$  92His  $\rightarrow$  Tyr] のヘム鉄と接触する近位および遠位 His の Tyr に変換した4種のほかに, Hb M-Milwaukee-I [ $\beta$  67Val  $\rightarrow$  Glu] がある。Hb M-Hyde Park は1966年, Heller<sup>15)</sup> らによって初めて異常構造が明らかにされた。本邦では1968年, Shibata<sup>16)</sup> らによって Hb M-Akita として報告されたが, 後の遺伝子解析により両者は同じ異常塩基配列を持つことが判明した<sup>17)</sup>。

Hb M-Hyde Park の異常  $\beta$  グロビン鎖は、コドン  $\beta 92$  のヒスチジンがチロシンに置換している。このヒスチジンは遠位ヒスチジンと呼ばれ、 $\beta$  グロビン鎖とヘムの結合に重要である。この部位にアミノ酸置換を持つ Hb M-Hyde Park はヘモグロビン分子の安定性が保てず、ヘムの解離、ヘム鉄の酸化（2価鉄から3価鉄への変化）、ヘモグロビン分子の崩壊が起り、臨床的にはチアノーゼと溶血性貧血を呈すると考えられている<sup>2)</sup>。

今回のパキスタン人家系では、発端者と父にチアノーゼと軽度の溶血性貧血を認め、ヘモグロビン分析では両者に異常 Hb X の存在と不安定性を認めた。この異常 Hb X は、HPLC と IEF 分析で Hb A<sub>2</sub> 付近に観察されたが、これは Hb M-Hyde Park そのものではなく、ヘムを解離した状態の変性ヘモグロビンであると考えられている。このため、他の多くの  $\beta$  グロビン鎖異常症であれば理論的に50%程度存在する異常 Hb 画分は、Hb M-Hyde Park では20～30%程度にとどまるとされ、本家系でも発端者で14.7%と低い値であった。単離された異常  $\beta$  グロビン鎖の構造解析では、トリプシン消化異常  $\beta$  グロビンペプチドの RP-HPLC 解析で、正常クロマトパターンと異なる溶出時間にピークが観察された。この異常ペプチド画分 ( $\beta$  Tp-10-11) のアミノ酸組成を分析したが、アミノ酸置換を特定するには至らなかった。発端者 DNA の  $\beta$  グロビン遺伝子を PCR-直接 sequence 法で解析した結果、 $\beta 92$  CAC (His)  $\rightarrow$  TAC (Tyr) の変異が認められ、Hb M-Hyde Park と診断された。この異常は父にも認められた。母と兄の  $\beta$  グロビン鎖は正常であった。グロビン合成試験では、発端者では全- $\beta/\alpha$  合成比が0.59と低く、 $\beta$  サラセミア様の結果が得られたが、これは Hb M-Hyde Park の異常  $\beta$  グロビン鎖の不安定性によるもので、サラセミアのようなグロビン合成低下が原因ではないと考えられている<sup>18)</sup>。一方、母と弟は小球性貧血であり  $\beta/\alpha$  合成比は1.67、1.55と高く  $\alpha$  サラセミアが予想されたが、Gap-PCR 法による  $\alpha$  サラセ

ミアスクリーニング<sup>19)</sup>や、 $\alpha 2$  や  $\alpha 1$  グロビン遺伝子の直接 sequence 法による塩基配列には異常が検出されなかった。さらに詳細な検討が必要であるように思われた。

$\beta$  様グロビン遺伝子群は5'側から3'に向かって  $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\psi\beta$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  の各グロビン遺伝子が並んでいる。これらの遺伝子はさらに上流に存在する Locus Control Region (LCR) からの発現コントロールを受け、胎生初期は  $\epsilon$ , 胎生期は  $G\gamma$  と  $A\gamma$ , 出生以降は  $\beta$  が主に発現し、それぞれの時期に発現するグロビンに対応した Hb を産生している<sup>1)</sup>。この遺伝子群にはいくつかの一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) が含まれていることが知られているが、その内7ヶ所に制限酵素多型部位が存在 (Fig. 1A)<sup>12)</sup>する。この7ヶ所の多型を組み合わせて  $\beta$  様グロビン遺伝子群のハプロタイプが決定される。また、 $\beta$  グロビン遺伝子内のコドン2, IVS II-16, IVS II-74, IVS II-81, IVS II-666 の5ヶ所にも SNPs<sup>12)</sup>が知られており (Fig. 1B), これらの多型の組み合わせで  $\beta$  グロビン遺伝子の frame work が決定される。このようにして決定された  $\beta$  様グロビン遺伝子群あるいは  $\beta$  グロビン遺伝子の SNPs を利用して Hb 異常症と民族間の特異的な関係や世界的な分布、異なるハプロタイプでの重症度の違いの解析などが多数報告されている<sup>20)~23)</sup>。

Hb M-Hyde Park は、これまでヨーロッパ諸国や日本人あるいは黒人などで報告されており、世界的に分布している異常症と考えられる。パキスタン人家系と日本人3家系で  $\beta$  様グロビン遺伝子群のハプロタイプと  $\beta$  グロビン遺伝子の framework を決定し、 $\beta$  M-Hyde Park の allele を比較した。その結果、日本人の3症例の異常 allele は、同じハプロイドを示したが、パキスタン家系の異常 allele とは異なっていた。これは民族的に異なる日本人とパキスタン人の間では、Hb M-Hyde Park の変異は独立した発生起源をもち、遺伝的な関連のないことを示唆するものである。黒人の中に頻出する鎌状



赤血球貧血症の Hb S 症は、世界中に広く分布する Hb 異常症であるが、HbS 症全体のうち約 90% は Benin, Bantu, Senegal, Cameroon, Arab-Indian と呼ばれる 5 種類のハプロタイプで構成されており、遺伝的な独立性をもっている<sup>23), 24)</sup>。Hb M-Hyde Park においても日本人、パキスタン人の他にもヨーロッパ人や黒人ではまた異なるハプロタイプを有しているかもしれない。

最近開発された SNPs を決定するための SSE 法は、ジデオキシ法の原理を用いた特定のプライマーに続く一塩基のみを決定する方法で、Minisequence 法<sup>25)</sup>、Single Base Extension Method<sup>3)</sup> などとも呼ばれる。本法では PCR 法で増幅した遺伝子領域に含まれる複数（最大10カ所）の SNPs を同時に検出することが可能である。既知の変異 (SNPs) を検出する方法としては、ARMS (Amplification Refractory Mutation System) 法<sup>26), 27)</sup> や RFLP 法<sup>28)</sup>、SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法<sup>29)</sup> などと比較して効率良く解析が可能である。今回は、SSE 法によって  $\beta$  グロビン遺伝子の framework の決定のため、5 種類のプライマーを作製して行った。SSE 法によって得られた framework は、sequence 法と同じであった。

SSE 法は、本来 SNPs を決定するための方法であるが、既知の Hb 異常症の診断についても応用が可能である<sup>24)</sup>。今回 Hb M-Hyde Park のコドン  $\beta 92$  CAC  $\rightarrow$  TAC の第 1 塩基を検出するために 5' 上流からコドン 91 第 3 塩基までに相当する 52 塩基長のプライマーを作製し、framework 決定のための 5 つのプライマーと組み合わせで解析を行った。その結果、Hb M-Hyde Park 保因者家族の発端者と父では、コド

ン  $\beta 92$  の第 1 塩基は C/T のヘテロ型で現れ、非保因者の母と兄では C のホモ型で検出された。本法によっても Hb M-Hyde Park が診断された。Hb M-Hyde Park 以外の Hb 異常症の多くは一塩基置換によるアミノ酸置換であることから、本法の応用が可能と考えられる。また、 $\beta$  サラセミアの変異の多くは、1 塩基置換、1 ～ 数塩基の欠失あるいは挿入によるフレームシフト変異である。正常塩基配列に続いて異常塩基が出現する点が既知のものであれば、本法を利用して検出が可能と考えられる。

本研究によって比較的まれな Hb 異常症で、Hb M 症の Hb M-Hyde Park のパキスタン人家系の解析を通して、本症は日本人とパキスタン人で遺伝的な発生起源が異なる可能性が示された。また最近開発された遺伝子解析法である SSE 法は、より簡便に SNPs の解析や Hb 異常症の診断ができる優れた方法と考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、原野昭雄、前川崎医科大学学生化学助教授、川崎医療福祉大学臨床栄養学科、原野恵子助教授には、研究全般にわたる御指導と本稿の御校閲を戴き深甚なる感謝の意を表します。また、川崎医科大学学生化学 湊川洋介指導教授には、実験を遂行する上で多大なる御助力をいただいたことに深く感謝を申し上げます。また、順天堂大学小児科 藤田宏夫先生には、貴重な検体を御提供頂いたことに深く感謝を申し上げます。

本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費 (H13-104, H14-102 および H15-209)、文部科学省科学研究費補助金 (12672259 および 14572193, TH) の援助により行われた。

## 参 考 文 献

- 1) 服部幸夫：異常ヘモグロビンとサラセミア。「赤血球」(藤井寿一、高桑雄一編)。第 1 版、東京、医学書院。1998, pp 179-194
- 2) 大庭雄三：ヘモグロビン異常。「血液病学」(三輪史郎、青木延雄、柴田昭編)。第 2 版、東京、分光堂。1995, pp 806-813



- 3) Kobayashi M, Rappaport E, Blasband A, Semeraro A, Sartore M, Surrey S, Fortina P : Fluorescence-based DNA minisequence analysis for detection of known single base changes in genomic DNA. *Mol Cell Probes* 9 : 175-182, 1995
- 4) Harano T, Harano K, Imai K, Murakami T, Matsubara H : Hb Kurosaki [ $\alpha 7$  (A5) Lys  $\rightarrow$  Glu] a new  $\alpha$  chain variant found in a Japanese woman. *Hemoglobin* 19 : 197-201, 1995
- 5) 原野昭雄, 原野恵子, 小出智子, 岡田美恵子, 上田 智, 柴田 進 : 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, 1980
- 6) Carrell RW, Kay R : A simple method for detection of unstable haemoglobins. *Brit J Haematol* 23 : 615-619, 1972
- 7) 柴田 進, 原野昭雄 : サラセミアの診断. グロビン鎖生成試験. 検査と技術 8 : 1038-1044, 1980
- 8) Jones RT : Structural studies of aminoethylated hemoglobins by automatic peptide chromatography. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Vol. XXIX, 297-308, 1964
- 9) Orisaka M, Tajima T, Harano T, Harano K, Kushida Y, Imai K : A new variant, Hb Hanamaki or  $\alpha_2$ 139 (HC1) Lys  $\rightarrow$  Glu $\beta_2$ , found in a Japanese family. *Hemoglobin* 16 : 67-71, 1992
- 10) Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S : Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood : Analysis of  $\beta$ -like globin genes. *Hemoglobin* 6 : 27-36, 1982
- 11) Protocol : ABI Prism. BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits. Edited by PE Biosystems, 1999
- 12) D. Labie, J. Elion : Sequence polymorphisms of potential functional relevance in the  $\beta$ -globin gene locus. *Hemoglobin*, 20 : 85-101, 1996
- 13) Winchagoon P, Fucharoen S, Wilairat P, Chihara K, Fukumaki Y : Nondeletional type of hereditary persistence of fetal hemoglobin : molecular characterization of three unrelated Thai HPFH. *Br J Haematol* 87 : 797-804, 1994
- 14) Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antnarakis SF, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJV : Linkage of  $\beta$ -thalassemia mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphism with DNA polymorphisms in human  $\beta$ -globin gene cluster. *Nature* 296 : 627-631, 1982
- 15) Heller P, Coleman R D, Yakulis V J : Structural studies of haemoglobin M Hyde Park. In proceedings of the 11 th congress of the international society of blood transfusion, Sydney, part 4, pp 1073-1084, 1966
- 16) Shibata S, Miyaji T, Iuchi I, Ohba Y, Yamamoto K : Amino acid substitution in hemoglobin M Akita. *J Biochem*, 63 : 193, 1968
- 17) Hutt PJ, Pisciotta AV, Fairbanks VF, Thibodeau SN, Green MM : DNA sequence analysis proves Hb M-Milwaukee-2 is due to beta-globin gene codon 92 (CAC  $\rightarrow$  TAC), the presumed mutation of Hb M-Hyde Park and Hb M-Akita. *Hemoglobin* 22 : 1-10, 1998
- 18) Harano T, Ueda S, Shibata S : Hemoglobin biosynthesis in reticulocytes of a patient with Hb M-Hyde Park ( $\beta 92$ , His  $\rightarrow$  Tyr) disease. *Proc Jpn Acad* 57B : 135-140, 1981
- 19) Samuel S C, Corinne D B, Douglas R H, Garry R C : Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood* 95 : 360-362, 2000
- 20) Fucharoen S, Katsube T, Fucharoen G, Sawada H, Oishi H, Katsuno M, Nishimura J, Motomura S, Miura Y, Fukumaki Y : Molecular heterogeneity of beta-thalassemia in the Japanese : Identification of two novel mutations. *Br J Haematol* 74 : 101-107, 1990
- 21) Hiti AL et al : Beta-globin haplotypes from blood spot for follow-up of newborn hemoglobinopathy screening. *Am J Hematol*, 54 : 76-78, 1997
- 22) Chen LZ, Eastaugh S, Board PG, Kirk RL : Evolution of beta-globin haplotypes in human populations. *Mol Biol Evol* 7 : 423-437, 1990
- 23) Powars DR, Chan L, Schroeder WA : Beta S-gene-cluster haplotype in sickle cell anemia : Clinical implications. *Am L Pediatr Hematol Oncol* 12 : 367-374, 1990

- 24) Zago MA, Silva WA Jr, Gualandro S, Yokomizu IK, Araujo AG, Tavela MH, Gerard N, Krishnamoorthy R, Elion J : Rearrangements of the beta-globin gene cluster in apparently typical beta S haplotypes. *Hematologica* 86 : 142-145, 2001
- 25) Wen Wang, Shirley KY Kham, Gare-Hoon Yeo, Thuan-Chong Quah, Samuel S Chong : Multiplex minisequencing screen for common Southeast Asian and Indian  $\beta$ -thalassemia mutations. *Clinical Chemistry* 49 : 209-218, 2003
- 26) Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ : Rapid detection and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia : studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Lancet* 336 : 834-837, 1990
- 27) Fortina P, Doti G, Conant R, Monokian G, Parrella T, Hitchcock W, Rappaport E : Detection of the most common mutations causing  $\beta$ -thalassemia in Mediterraneans using a multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *PCR Methods Appl* 2 : 163-166, 1992
- 28) Old J, Petrou M, Modell B, Weatherall D : Feasibility of antenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia by DNA polymorphisms in Asian Indian and Cypriot populations. *Br J Haematol* 57 : 255-263, 1984
- 29) Cai S, Kan Y : Identification of the multiple  $\beta$ -thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Clin Invest* 85 : 550-553, 1990