

7人の日本人に見られた中性—中性アミノ酸
置換を起した異常血色素, Hb Owari
[α 121 (H4) Val→Met]

川崎医科大学 生化学

原野 恵子, 原野 昭雄

川崎医科大学 検査診断学

今井 直美, 上田 智, 森 博雄

川崎医科大学 公衆衛生学

中 島 行 正

(昭和60年8月27日受付)

A New Hemoglobin Variant with Neutral to Neutral
Amino Acid Substitution, Hb Owari [α 121
(H4) Val→Met], Found in Seven Japanese

Keiko Harano and Teruo Harano

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Naomi Imai, Satoshi Ueda
and Hiroo Mori

Department of Clinical Pathology, Kawasaki Medical School

Yukimasa Nakashima

Department of Public Health, Kawasaki Medical School

(Accepted on August 27, 1985)

1. 新しく, 発見された異常血色素 Hb Owari は等電点分画法で Hb F と Hb A の間に分画され, その含量は 12.7—19.0% を示した.
2. 発見された Hb Owari の保因者は合計 7 名であり, 末梢血液検査はすべて正常であった.
3. Hb Owari の不安定性試験は陰性であった.
4. Hb Owari の異常鎖はセルロースアセテート膜電気泳動で検出されないが, ヘモグロビン組成から α 鎖にアミノ酸置換が起っていることが予想された (α^x).
5. α^x 鎖のトリプシン消化物の可溶・不溶性成分ペプチドのアミノ酸組成が調べられた. 不溶性成分のキモトリプシン消化物のフィンガープリントに異常ペプチドスポットが現われ, そのアミノ酸分析から α 121 Val→Met の置換が示された.
6. Hb Owari は酸素解離曲線の測定から正常な機能を有するものと考えられた.

1. A new hemoglobin variant, Hb Owari which was amounted 12.7—19.0% of the whole hemoglobin, was found between the Hb F and Hb A bands by isoelectric focusing.

2. There were seven carriers of Hb Owari. Hematological and chemical examinations of their peripheral blood were normal.
3. Instability test of Hb Owari was negative.
4. The abnormal globin chain (α^X) could not be detected by cellulose acetate electrophoresis, but the amino acid substitution of Hb Owari was deduced to be in the α globin chain on the basis of the hemoglobin composition.
5. The α^X chain was digested with trypsin and separated into two fractions, soluble and insoluble. The fingerprint of the insoluble fraction digested further with chymotrypsin showed an extra abnormal peptide spot. Amino acid analysis demonstrated the substitution of Val \rightarrow Met at the 121st position of the α chain.
6. Oxygen dissociation curves of Hb Owari were identical to those of normal hemoglobin, suggesting that this new variant has normal functional properties for oxygen.

Key Words ① Hb Owari [α 121 (H4) Val \rightarrow Met] ② Isoelectric focusing
③ Functional properties ④ Neutral-neutral amino acid substitution

緒 言

1982年以来、近畿大学医学部附属病院(大阪)に入院・来院されている患者や、愛知県碧南市医師会臨床検査センターを中心に毎年行われている各種事業所の健康診断者や一般人の健康診断者を対象として異常血色素症の検索を等電点分画法で行ってきた。これらの中で計7名のものが Hb F と Hb A の間に等電点分画される異常血色素 (Abn Hb) の保因者であることが発見された。この Abn Hb は他の電気泳動法 (例えばセルロースアセテート膜電気泳動法) では識別することが難しいものであった。構造解析の結果は α -グロビン鎖のトリプシン消化物の不溶性画分のアミノ酸分析から α 鎖 121 番目のバリン (Val) 残基がメチオニン (Met) 残基に置換されたものであることを示した。この Abn Hb は新しい Hb であり、我々はこの Hb を Hb Owari [α 121 (H4) Val \rightarrow Met] と命名した。この Abn Hb の酸素解離曲線の測定結果は特に異常を示さなかった。

この Abn Hb についての我々の実験結果を報告する。

材料と実験方法

検体および検索法: 異常血色素症のスクリーニングに用いられた検体は、病院および検査センターで EDTA-3K を抗凝固剤として採血され、血液学的・生化学的検査を終えたものを溶血液 (簡易法) とし、キャリアーアンホライトとして Ampholine (pH range 7~9; LKB Produkter AB) を含むポリアクリルアミドゲルを担体とした等電点電気泳動を行った。¹⁾ さらに精査する場合にはキャリアーアンホライトとして Pharmalyte (pH range 6.7~7.7; Pharmacia Chemicals Co.) が用いられた。

溶血液の調整: 通常の方法に従って行った。

異常血色素 (Abn Hb) の単離・精製および Hb 組成の分析: Pharmalyte をキャリアーアンホライトとして用いる等電点分画法で行った。すなわち、溶血液をゲル上に塗布、通電し、Hb を各分画に分けたのち、それぞれの Hb 分画をゲルから切り出し、蒸留水中に溶出させた。溶出液を減圧下にコロジオンバックを用い濃縮し、Hb (Abn Hb あるいは Hb A) 溶液を作成し、異常鎖の単離、Hb 機能測定のために材料とした。Hb 組成の測定には約 10 μ l の溶血液

を用い、同様に等電点分画後、各 Hb 分画を切り取り、0.1% KCN-1Nリン酸緩衝液(pH 7.4)の一定量中に溶出させ、その溶出液を 415 nm で比色分析した。

微量 Hb 成分の分析：Hb 中に含まれる Hb A₂、Hb F の含量は上記方法のほか、つぎの方法によっても分析・定量された。Hb A₂ の定量：セルロースアセテート膜電気泳動(緩衝液：Tris-EDTA-Borate, pH 8.6)により分画後、緩衝液に対して溶出し比色分析した。²⁾ Hb F の定量：アルカリ変性法 (Betke 法)により求めた。³⁾

Hb の不安定性テスト：単離された Abn Hb 分画や全溶血液について Carrel の方法³⁾ や Bender らの方法⁴⁾ を少し改変した方法で行い、Hb A や正常人の溶血液での結果と比較した。

一次構造の解析：(1) 異常鎖の単離：分離・精製した Hb 溶液を冷アセトン-塩酸で処理しグロビンを得⁶⁾ たのち、CM-セルロース (CM-52 Whatman Co.) をつめたカラムクロマトグラフィーにかけ、8 M尿素-リン酸緩衝液(Na⁺イオン濃度 5 mM \rightarrow 35 mM の直線濃度勾配緩衝液)を溶出液として β -グロビン鎖、つづいて α -グロビン鎖を溶出させた。⁷⁾ 各グロビンを透析膜に入れ水に対して透析後、Sephadex G 25 (Pharmacia Chemicals Co., 溶出液 0.2 M 酢酸)を通し、完全に塩類を除き純粋なグロビンを得た。

(2) グロビンの消化およびフィンガープリントの作成：2~3 mg のグロビンを少量の水に溶かし、約 100 倍モル量の TPCK-トリプシン (Worshington Co.) の 0.01 N 塩酸に溶かしたものを加え、0.01 N NaOH で液性を pH 8.2 に保ちつつ加水分解反応を行った。反応液の pH を 6.4 に調節し、遠心分離し可溶成分と不溶成分に分けた。約 200 μ g の可溶性成分を少量の水に溶かしセルロース薄層 (Kodak Co.) に塗布し、ピリジン-酢酸-水 (pH 6.4) 系中で電気泳動し、さらに n-ブタノール-酢酸-水系中で第 2 次元のクロマトグラフィーを行った。⁸⁾ 不溶性成分についてはさらにキモトリプ

シンで加水分解後、同様の操作を行った。ペプチドスポットの検出にはニンヒドリン-酢酸カドミウム-アセトン、フルオレサミン-アセトン溶液を噴霧することによって行った。

(3) ペプチドのアミノ酸分析：各ペプチドをフィンガープリントから切り取り、10%酢酸で溶出し、6 M塩酸(定沸点塩酸)中 105°C、20時間加熱し、加水分解した。加水分解物のアミノ酸分析は IRICA-5500 によって自動分析した。

酸素解離曲線の測定：今井の方法⁹⁾ によって行った。すなわち、0.05 M bis-Tris 緩衝液 (pH 6.9~7.9) で Hb 溶液を希釈し、60 μ M (on heme basis) 溶液を調整し測定温度は 25°C で行った。また有機リン酸化合物 (2,3-DPG, IHP) の効果の測定には、上記溶液に DPG, IHP を加え、1 mM-溶液を調製し行った。

実験結果

Abn Hb, Hb Owari, の保因者の末梢血液検査データは **Table 1**, に示す通りであり、2人の女性 (S. Ka および T. Ya) を除けばすべて正常である。S. Ka は子宮癌の患者であり、T. Ya は妊娠中の婦人であった。

溶血液の等電点分画法、通常我々の Abn Hb の検索には Carrier ampholyte として Ampholine (pH range 7-9) を用いており、Abn Hb の分画を僅かに認め、この分画の存在を知ることが出来るが (**Fig. 1-A**), pH range 狭い carrier ampholyte (Pharmalyte, pH の 6.7-7.7) を用いることにより Abn Hb の存在を明瞭に認めることが出来た (**Fig. 1-B**)。この等電点分画法から算出された Abn Hb の含量は 12.7~19% の範囲にあり α -鎖に異常(アミノ酸置換)をもつ Hb であることが期待される。

Tris-EDTA-Borate 緩衝液 (pH 8.6) 中での全溶血液のセルロースアセテート膜電気泳動では Abn Hb の分画を認めることが出来ず、また全溶血液や単離された Abn Hb 分画の尿素解裂-セルロースアセテート膜電気泳動法で

Table 1. Hematological data of the carriers of Hb Owari

	T. Ka	H. Mi	R. Ka	M. Yo	S. Ka	T. Ya	S. Kan
M or F/age	M/51	M/35	M/23	M/25	F/66	F/	M/62
Hb F %	0.8	0.5	0.4	0.2	0.5	0.9	1.1
Hb A ₂ %	2.9	2.9	2.8	2.4	2.7	2.8	2.9
Hb A ₁ %	6.0	6.3	5.9	7.2	8.0	6.8	6.5
Abn Hb %	15.3	16.3	12.7	19.0	12.9	17.2	16.9
Instab. test	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
RBC×10 ⁴ /μl	442	449	485	483	352	449	472
Hb g/dl	14.2	15.0	14.5	14.7	10.4	13.9	14.5
Ht %	41.3	42.0	43.7	42.5	32.1	41.5	43.4
MCV fl	94	94	90	88	91	92	92
Retic %	0.7	1.2	1.4	0.3	0.9	0.8	1.5
Fe μg/dl	154	102	189	146	74	67	121
TIBC μg/dl	285	328	328	351	283		319

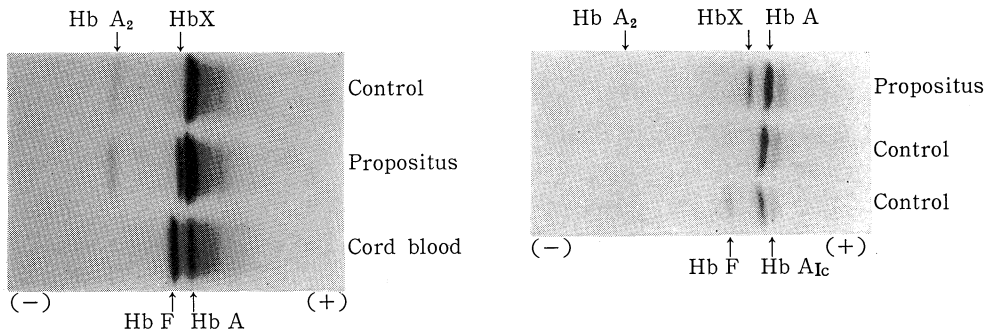


Fig. 1. Isoelectric focusing patterns of the hemolysates on polyacrylamide gel containing Ampholine (pH range 6-9) (A) or Pharmalyte (pH range 6.7-7.7) (B) as carrier ampholytes.

も異常鎖の判別をすることは不可能であった。このためこの Abn Hb はアミノ酸置換を起していたとしても正常な鎖の間では電気泳動によって区別されるだけの荷電差をもっていないものと判定される。

Abn Hb 分画から得られた全グロビンは CM-52 カラムクロマトグラフィーによって α -と β -グロビン鎖に別けられ、それぞれのトリプシン消化物のフィンガープリントを作成し、正常なものとの比較がなされた。 β -鎖については全く異常が発見されなかった。また α -グロビン鎖からのトリプシン可溶性ペプチド成分には異常が認められなかったが (Fig. 2-A), 不溶性成分のキモトリプシン消化物のフィンガ

ープリントは正常なペプチドスポットの外に余分のペプチドスポットが現われた (Fig. 2-B e' の記号で示されている)。この異常ペプチドのアミノ酸分析の結果は Table 2 に示されており、ペプチド α 118-122: ¹¹⁸Thr-Pro-Ala-Val-His¹²² の 118 番目の Val 残基が Met 残基に置換されたものと説明される。さらに正常な α 118~122 ペプチドと同一位置にあるペプチドスポット (Fig. 2-B; e) のアミノ酸分析結果はスポット e' の場合と全く同様に解釈されるものであった (Table 2)。したがってペプチドスポット e' は酸化され易いアミノ酸であるメチオニン (Met) 残基が 121 番目の Val 残基と置換され、一部は酸化された形として異常

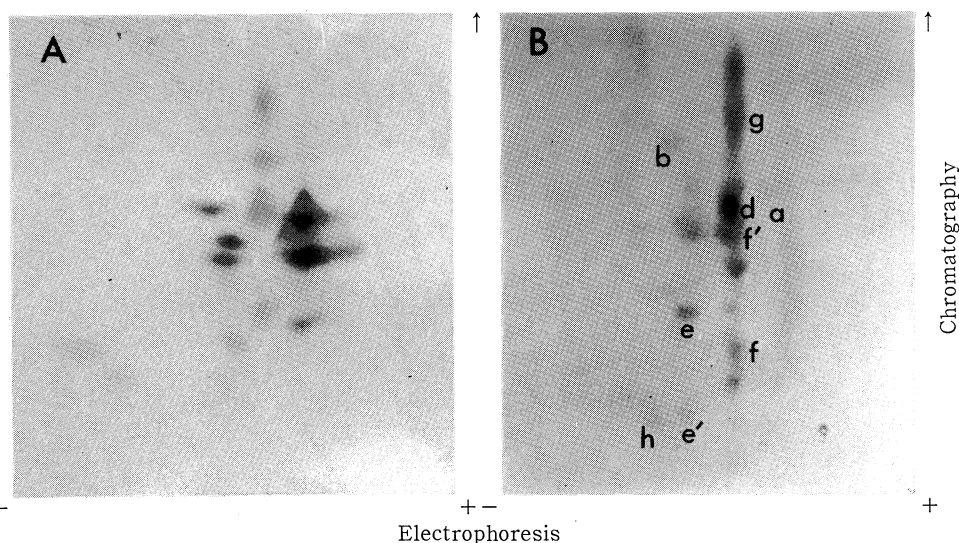


Fig. 2. Fingerprints of the enzymatic digests. A: The soluble fraction of the tryptic digest of the α Owari chain. B: The chymotryptic digest of the insoluble fraction of the tryptic digest of the α Owari chain. The peptide spots on the map (B) are as follows:

a: 98 Val-Asp-Pro-Val-Asn- 98 Phe- b: 99 Lys-Leu- 101 Leu c: 102 Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr- 109 Leu- d: 110 Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Clu- 117 Phe- e & e': 118 Thr-Pro-Ala-Met(nor, Val)- 122 His- f: 123 Ala-Ser-Leu-Asp- 127 Lys- f': f+ 128 Phe- g: 129 Leu-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val- 138 Leu- h: 137 Thr-Ser- 139 Lys-

Table 2. Amino acid composition of the peptide spots, e' and e.

	Found		Theoretical No. α 118-122
	spot e'	Spot e	
Thr	0.93	1.02	1
Pro	1.03	1.11	1
Ala	1.04	1.02	1
Val	0.0	0.0	$\frac{1}{1}$
His	1.01	0.97	$\frac{1}{1}$
Met	0.98	0.91	$\frac{0}{1}$

ペプチドスポットとしてフィンガープリント上に現われ、他の部分、非酸化状態のペプチドは正常の α 118-122 ペプチドと同様の挙動を示したものと考えられる。故に、この Abn Hb は α 121 Val \rightarrow Met の置換様式で示される新しい変種の Hb で、我々はこれを発端者の居住地名に因んで Hb Owari [α 121 (H4) Val \rightarrow Met] と命名した。

単離された Abn Hb について酸素解離曲線

が測定された (**Fig. 3, Table 3**). Hb A の場合と比較して特に差異は認められず、この Abn Hb は特別に機能異常を示さないものと判定された。

考 察

この Abn Hb, Hb Owari [α 121(H4)Val \rightarrow Met], は α -グロビン鎖 121番目の Val 残基が Met 残基に置換されたこれまでに報告例のない新しい Abn Hb であった。⁹⁾ Hb Owari のアミノ酸置換 (Val \rightarrow Met) は中性アミノ酸から中性アミノ酸への変換であり通常我々が使用している pH 範囲の等電点分画法¹⁾での分離は僅かなものであったが (**Fig. 1-A**), pH 範囲の狭い等電点分画法 (Pharmalyte pH range 6.7-7.7 を使用) の応用は、この異常分画を明瞭に分けることが出来、更に Hb 組成の定量分析も可能にするに十分なものであった。これまでに発見されている多くの Abn Hb は正常

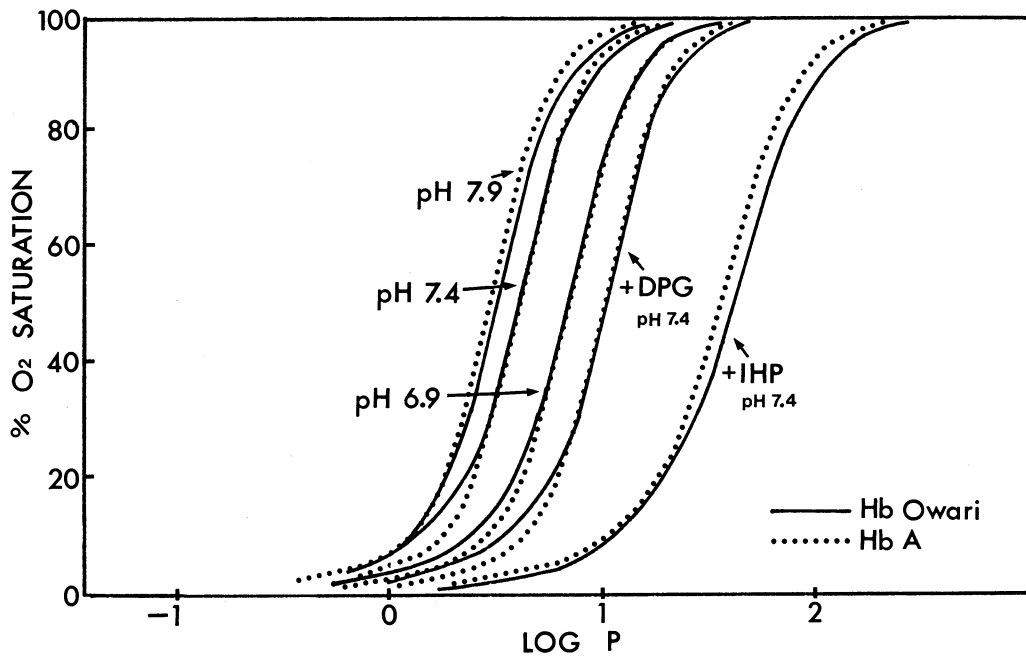


Fig. 3. Oxygen dissociation curves in 0.05M bis-Tris buffer containing 0.1M Cl⁻ ion at 25°C.

Table 3. Oxygen binding properties of Hb Owari (isolated from the hemolysate of T. Ya) and Hb A.

	Hb Owari P ₅₀ (mmHg)	Hb A P ₅₀ (mmHg)
pH 7.9	3.3	3.0
pH 7.4	4.2	4.2
pH 6.9	7.0	7.3
pH 7.4-1 mM DPG	10.3	10.0
pH 7.4-1 mM IHP	40.7	34.9
Bohr eff. pH 6.9-7.9	-0.37	-0.43
DPGeff. PDPG/Pfree	2.5	2.4
IHP eff. PIHP/Pfree	9.7	8.3
Hill's n const. (pH 7.4)	2.8	3.1

Hb との間に荷電差があり、一般に用いられる電気泳動法（例えば、セルロースアセテート膜電気泳動法）でその存在を知ることは可能であるが、この Hb Owari のように荷電差を持たない Abn Hb の場合では、その確認は困難なものである。また Hb Owari は安定な Abn Hb であるため、不安定性などによって生ずる副産物的な Hb の存在も観察することは出来ない。しかしながら等電点分画法は、ここにみら

れたように僅かの等電点差をもつ Hb の分離・確認に有効な手段であるといえる。

Hb Owari にみられるようなアミノ酸置換の決定は一般に困難なものであるが、幸運なことに、トリプシン消化物の不溶性画分のキモトリプシン消化物のフィンガープリント上に正常なペプチドスポットの外に余分の異常ペプチドスポットが現われた (Fig. 2-B)。新しく置換されたアミノ酸が Met 残基であったため、これを含むペプチドが一部酸化型 Met を含むものになり、正常の位置の外に余分のペプチドスポットを現わしたものと考えられる。

α 121 位にあるアミノ酸は Hb 分子表面に位置しており、 α 9 位-アスパラギンや α 116-グルタミン酸とゆるやかな結合 (van der waals 結合) をしている。¹⁰⁾ 類似の性質、大きさをもつ α 121 位のアミノ酸置換 (Val→Met) は Hb 分子の不安定性や分子変形を起すような効果はないものと考えられる。このため、Hb Owari の酸素解離曲線は正常 Hb のそれと差異がない。また α 121 位アミノ酸と関連をもつ α 116 位アミノ酸の置換した Hb O-Indonesia [Glu→

Lys]¹¹⁾，Hb Ube-4 [Glu \rightarrow Ala]¹²⁾ や Hb Oleander [Glu \rightarrow Gln]¹³⁾ (α 9 位アミノ酸置換 Abn Hb の報告例はない⁹⁾) の機能も正常である。

Val \rightarrow Met 置換した Abn Hb には Hb Olympia [β 20 (B2)]¹⁴⁾，Hb Köln [β 98 (FG5)]¹⁵⁾ や Hb San Diego [β 109 (G11)]¹⁶⁾ があり，分子の不安定性や機能異常が報告されている。これら Hb の置換位置アミノ酸は Hb 分子の安定性や機能発現に重要な役割を果しているためであるが，Hb Owari の場合にはこのような役割は小さいものと考えられる。

謝 辞

終りに，本研究に御協力を頂いた近畿大学医学部臨床病理学講座・大場康寛教授，日本電装株式会社健康管理部・福井久雄部長，碧南市医師会臨床検査センター・関正巳氏に感謝致します。また酸素解離曲線の測定に御協力・援助を下さいました大阪大学医学部生理学教室・今井清博講師に深謝致します。

なお，本研究は川崎医科大学昭和59年度プロジェクト研究費59-502によって行われた。

文 献

- 1) 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
- 2) Ueda, S., Shibata, S., Miyaji, T. and Ohba, Y.: Routine Hb A₂ estimation by cellulose acetate membrane electrophoresis. Kawasaki med. J. 1 : 113-120, 1975
- 3) Carrell, R. W. and Kay, R.: A simple method for detection of unstable hemoglobins. Br. J. Haematol. 23 : 615-619, 1972
- 4) Bender, J. W., Adachi, K. and Asakura, T.: Precipitation of oxyhemoglobin A and S by isopropanol. Hemoglobin 5 : 463-474, 1981
- 5) Anson, M. L. and Mirsky, A. E.: Protein coagulation and its reversal. The separation of insoluble globin, soluble globin and heme. J. gen. Physiol. 13 : 469-476, 1930
- 6) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, J. D.: Abnormal human haemoglobin, separation and characterization of the α and β chains by chromatography, and determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J Bangkok. J. mol. Biol. 19 : 91-108, 1966
- 7) Harano, K., Harano, T., Ueda, S. and Shibata, S.: Mapping and amino acid analysis of tryptic peptides of globin by use of cellulose thin layer. Kawasaki med. J. 4 : 323-326, 1978
- 8) Imai, K.: Measurement of accurate oxygen equilibrium curves by an automatic oxygenation apparatus. Methods in Enzymol. 76 : 438-449, 1981
- 9) International Hemoglobin Information Center (IHIC). List of abnormal hemoglobin in the world. Hemoglobin 8 : 243-300, 1984
- 10) Sack, J. S., Andrew, L. C., Magnus, K. A., Hanson, J. C., Rubin, J. and Love, W. E.: Location of amino acid residues in human deoxy hemoglobin. Hemoglobin 2 : 153-169, 1978
- 11) Baglioni, C. and Lehmann, H.: Chemical heterogeneity of haemoglobin O. Nature 196 : 229-232, 1962
- 12) Ohba, Y., Miyaji, T., Matsuoka, M., Morito, M. and Iuchi, I.: Characterization of Hb Ube-4: α 116 (GH 4) Glu-Ala. Hemoglobin 2 : 181-186, 1978
- 13) Schneider, R. G., Hightower, B., Carpentieri, U., Duerst, M. L., Shih, T. B. and Jones, R. T.: Hb Oleander (α 116 (GH 4) Glu-Gln): Structure and functional characterization. International Society of Haematology, European and African Division, Sixth Meeting, Athens, Greece, 1981
- 14) Stamatoyannopoulos, G., Nute, P. E., Adanson, J. W., Bellingham, A. J., Funk, O. and Hornung, S.: Hemoglobin Olympia (β 20 Valine-Methionine): An electrophoretically silent variant

- associated with high oxygen affinity and erythrocytosis. J. clin. Invest. 52: 342—349, 1973
- 15) Carrell, R. W., Lehmann, H. and Hutchison, H. E.: Haemoglobin Köln (β 98 Valine-Methionine): An unstable protein causing inclusion-body anaemia. Nature 210: 915—916, 1966
- 16) Nute, P. E., Stamatoyannopoulos, G., Hermodson, M. A., Roth, D. D. and Hornung, S.: Hemoglobinopathic erythrocytosis due to a new electrophoretically silent variant, Hemoglobin San Diego (β 109 (G 11) Val-Met). J. clin. Invest. 53: 320—328, 1974