

## 制限酵素分析による異常血色素の構造解析

原野 昭雄, 原野 恵子, 大森 直美\*, 上田 智\*

DNA の制限酵素分析は Abn Hb の構造解析に有効な手段となっており, Hb Takamatsu [ $\beta$  120 (GH3) Lys→Gln], Hb Riyadh [ $\beta$  120 (GH3) Lys→Asn] と Hb D Los Angeles [ $\beta$  121 (GH4) Glu→Gln] の 3 種の Abn Hb の構造解析が試みられた。

Hb Takamatsu の保因者の DNA を制限酵素 Bal I で消化し,  $^{32}\text{P}$ -ラベルした  $\beta$  IVS 2 probe と hybridize すると, 正常人にみられる 2.1 kb の fragment band のほかに, 1.5 kb の新しい fragment band が現れた。これはこの Abn Hb のアミノ酸置換  $\beta$  120 Lys→Gln によるアミノ酸コドンの AAA (Lys) から CAA (Gln) への変換の結果, Bal I の切断部位 (5'-TGG↓CCA-3') が新生したことを示すものであった。しかし, 同位置のアミノ酸置換をもつ Hb Riyadh では Lys→Asn の置換のため Bal I の切断部位の新生はみられず, 正常と同じ DNA fragment pattern を示した。

Hb D Los Angeles 保因者からの DNA の EcoRI/ $\beta$  IVS 2 の処理では, 正常な 5.2 kb の fragment band のほかに 8.8 kb の大きな fragment band が現れた。アミノ酸置換は Eco RI の作用部位の消失を起こす領域での塩基置換によるものであった。

(昭和63年12月6日採用)

## Structural Analysis of Abnormal Hemoglobin with Restriction Endonuclease

Teruo Harano, Keiko Harano, Naomi Ohmori\* and Satoshi Ueda\*

DNA restriction endonuclease mapping is useful for study of the structural analysis of abnormal hemoglobins. This paper describes deduction of the structure of three abnormal hemoglobins, Hb Takamatsu [ $\beta$  120(GH3)Lys→Gln], Hb Riyadh [ $\beta$  120(GH3)Lys→Asn], and Hb D Los Angeles [ $\beta$  121(GH4)Glu→Gln].

When DNA from the carrier heterozygous for Hb Takamatsu was digested with Bal I and hybridized to a  $^{32}\text{P}$ -labelled  $\beta$  IVS 2 probe, an abnormal 1.5 kb fragment band together with the normal 2.1 kb fragment band was observed on an autoradiogram, showing the production of a new restriction site (5'-TGG↓CCA-3') for Bal I owing to the alteration of the  $\beta$  120 codon from AAA (Lys) to CAA (Gln). However, Hb Riyadh, which has the amino acid substitution of Lys→Asn (AAT or AAC) at  $\beta$  120, showed no abnormal fragment bands, when the same procedure was used.

川崎医科大学 生化学教室  
〒701-01 倉敷市松島 577  
\* 同 検査診断

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School:  
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan  
Department of Clinical Pathology

Although normal DNA digested with Eco RI and hybridized to a  $\beta$ IVS2 probe gives only a 5.2 kb fragment band, the DNA from a subject carrying the  $\beta$ D Los Angeles mutation revealed an additional 8.8 kb fragment band, an abnormal fragment band caused by loss of the Eco RI restriction site. (Accepted on December 6, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15 (1): 102-108, 1989

**Key Words** ① Restriction endonuclease mapping ② Restriction endonuclease ③ Hb Takamatsu ④ Hb D Los Angeles

## はじめに

DNA の制限酵素地図の作成や RFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析は、遺伝性疾患の保因者の同定、特に出生前診断には有効な方法である。しかし、RFLP 分析の場合は、家族調査は欠くことのできない要因であり、家族関係がはっきりしないときは、誤った診断をすることがある。遺伝性疾患の遺伝子解析による診断は、疾患を起こす遺伝子領域内での塩基置換が、制限酵素の作用部位の新生や消失を起こす場合に、制限酵素分解物と適当な  $^{32}\text{P}$ -ラベルした probe との hybridization によって直接的に行うことができる。

我々は、日本人特有の異常血色素 (Abn Hb) で、四国・高松地区に集中的に発見された Hb Takamatsu [ $\beta$ 120 (GH3) Lys $\rightarrow$ Gln]<sup>1)</sup> や、世界的に広く分布しているといわれる Hb D Los Angeles [ $\beta$ 121 (GH4) Glu $\rightarrow$ Gln]<sup>2)</sup> について、酵素的分析による直接検出を試みたので報告する。

## 材料と方法

対象:  $\beta$  鎖グロビンにアミノ酸置換を起こした Hb Takamatsu, Hb Riyadh [ $\beta$ 120 (GH3) Lys $\rightarrow$ Asn]<sup>3)</sup> と Hb D Los Angeles の保因者。

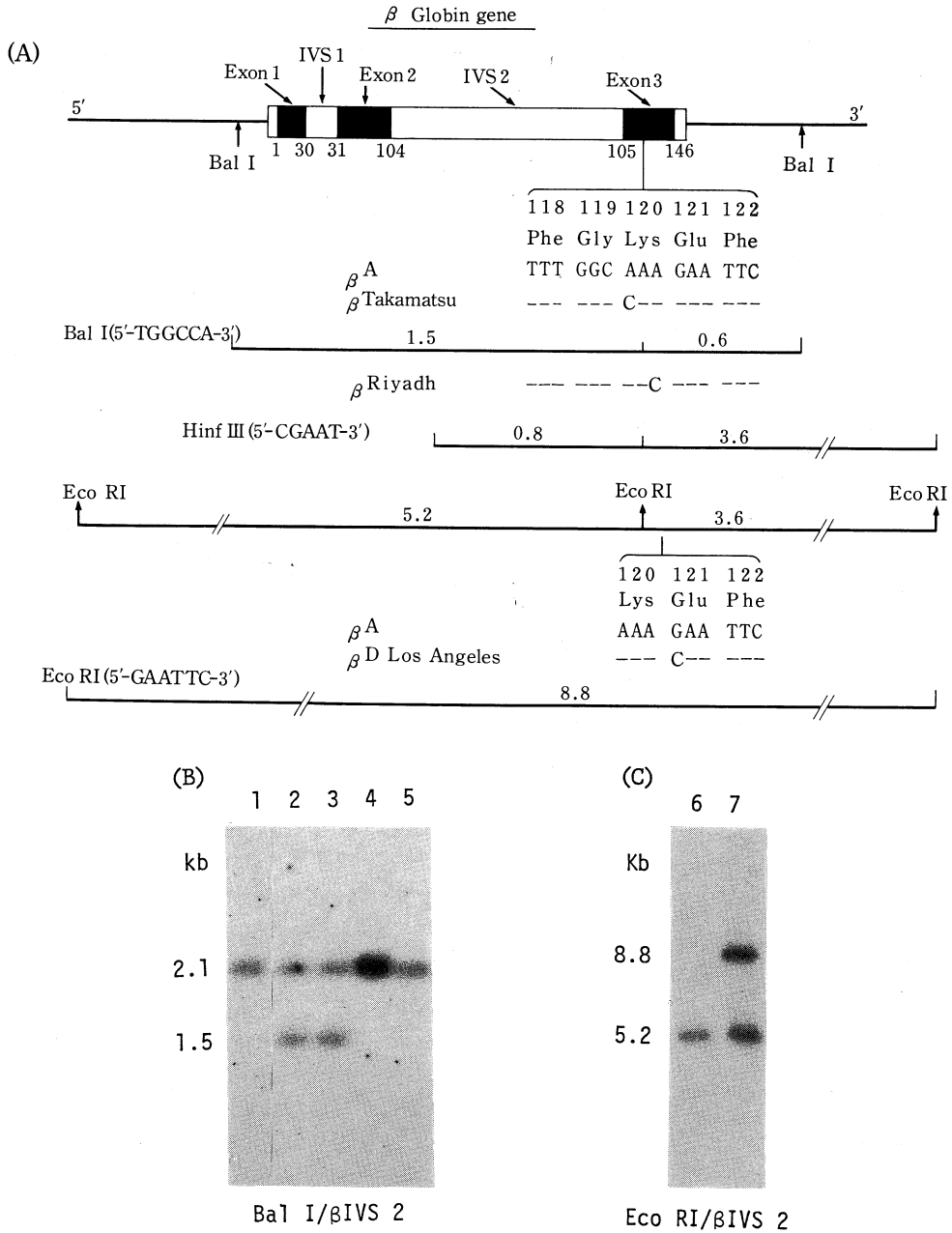
DNA の単離: Poncz らの方法<sup>4)</sup> に準じてつぎのように行った。約 10 ml の末梢血液を生理食塩水で洗い、buffy coat を集めた。lysing 溶液 [131 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.9 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ] で処理後、遠心 (2,500 rpm) し白血球層を集めた。9.5 ml の STE 溶液 [10 mM Tris  $\cdot$  Cl

(pH 8.0), 10 mM EDTA, 10 mM NaCl], 0.5 ml の 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 溶液と 50  $\mu$ l の proteinase K [10 mg/ml 10 mM Tris  $\cdot$  Cl (pH 8.0)] 溶液を加え、37°C, 1 夜 incubate した。同量のフェノール、クロロホルムで順次処理、遠心して上清を集め、約 70 ml のアルコールに入れ、DNA を析出させた。70% アルコールで洗浄し、真空乾燥し、TE 溶液 [10 mM Tris  $\cdot$  Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA] に溶かし、DNA 試料とした。

probe の調製: クローン化されたヒト  $\beta$  グロビン遺伝子を Eco RI-Bam HI (Nippon Gene Co.) で消化し、 $\beta$ IVS 2 領域を含む約 1 kb の DNA 断片をとり出し、同じ制限酵素で消化した M13 mp 19 RFI を vector として、T<sub>4</sub> Ligase で ligate した (12°C, 20 時間)。

一方、JM 109 株の overnight culture を 2 $\times$ YT 培地中で OD<sub>550</sub>~0.5 になるまで培養し、CaCl<sub>2</sub> で処理して competent cells を調製し、<sup>5)</sup> 先の組み換え DNA を transfect した。X-gal, IPTG を含む YT-plate 上にまき、37°C, 1 夜 incubate した。無色の plaque をとり、JM 109 株に infect し、2 $\times$ YT 培地中で培養した。遠心して菌体を集め、アルカリ法で組み換え DNA を調製した。<sup>6)</sup> Eco RI-Bam HI で消化し、アガロースゲル電気泳動-DEAE paper (Bio Rad Laboratory) 吸着法<sup>7)</sup> で約 1 kb の DNA 断片を回収し、probe ( $\beta$ IVS 2) とした。 $^{32}\text{P}$ -ラベルは nick translation 法<sup>8)</sup> で行い、hybridization probe とした。

DNA の制限酵素による消化: 約 5  $\mu$ g の DNA をとり、制限酵素約 20 unit を加え、指定された条件下で 2~4 時間反応を行った。反応液を 0.8% アガロース電気泳動にかけ、各 DNA 断



**Fig. 1.** (A): Map of the  $\beta$ -globin gene area showing the position of the cleavage sites of the restriction endonucleases, Bal I, Hinf III and Eco RI.

(B and C): Autoradiogram showing genomic DNA samples, which were prepared from the carriers of Hb Takamatsu (B), Hb Riyadh (B), and Hb D Los Angeles (C), digested with the restriction endonuclease and hybridized to the  $\beta$ IVS 2 probe. Lanes 1 and 6 = normal subjects, lanes 2 and 3 = subjects heterozygous for Hb Takamatsu, lanes 4 and 5 = subjects heterozygous for Hb Riyadh, lane 7 = subject heterozygous for Hb D Los Angeles.

片にかけた。アルカリ，中和反応処理後，ニトロセルロースメンブレンに Southern blot した。<sup>9)</sup> ここで用いた制限酵素は Bal I (Toyobo Co.)，Eco RI であった。

probe hybridization: <sup>32</sup>P-ラベルした probe と salmon sperm DNA を沸騰浴中で10分間加熱し，氷中で急冷する。これを dextran-sulfate-hybridization 溶液 (50% formamide, 5×Denhardt's 溶液, 5×SSPE, 0.1% SDS, 100μg/ml salmon sperm DNA, 10% dextran-sulfate) に入れ，あらかじめ 6×SSC 溶液処理し，熱処理した salmon sperm DNA を含む hybridization 溶液中で約4時間処理したメンブレンを入れて，42°C でゆっくり攪拌しながら20時間 hybridization を行った。<sup>9)</sup> washing 溶液 (2×SSC, 0.1% SDS) で十分洗浄し，乾燥後，X線フィルムを用いてオートラジオグラフィを1～2夜行った。

## 結 果

Bal I 消化物の  $\beta$ IVS 2 probe による検索：制限酵素 Bal I は 5'-TGG↓CCA-3' の塩基配列が存在する部位に働き，中央の G-C 間を切断する。このような塩基配列は正常な  $\beta$ グロビン遺伝子の Exon 部には存在せず，5'- $\beta$  遺伝子上流のフランキング領域にある CCAAT box 位と 3' 端の poly A 付加部位より下流約400塩基対 (bp) の位置に存在する (Fig. 1 A)。この結果，正常人 DNA の Bal I 消化物の  $\beta$ IVS 2 probe hybridization では約2,100塩基対 (2.1 kb) の fragment が観察される。しかし，Hb Takamatsu のアミノ酸置換  $\beta$ 120 Lys→Gln は，Lys コドン AAA の Gln コドン CAA または CAG への変換であるが，一点突然変異の AAA→CAA の変換が起こったものと予想される。この変換が起これば，この領域での Bal I 作用部位の新生が考えられ，Bal I- $\beta$ IVS 2 probe hybridization では1460 bp (約1.5 kb) の fragment が現れることになる。事実，Hb Takamatsu のヘテロ接合体では，2.1 kb の fragment のほかに，1.5 kb の fragment が

現れ，この塩基置換の起こっていることを示した (Fig. 1 A, B)。これに対し，同じ  $\beta$ 120 位でのアミノ酸置換をもつ Hb Riyadh [ $\beta$ 120 Lys→Asn] では， $\beta$ 120 アミノ酸コドン変換は AAA→AAT または AAC であり，Bal I 作用部位の新生を伴わない。この結果，Hb Riyadh 保因者の場合には，正常人と同じ DNA fragment pattern を与えた (Fig. 1 A, B)。

Eco RI 消化物の  $\beta$ IVS 2 probe による検索： $\beta$ グロビン遺伝子領域での Eco RI の作用部位 (5'-G↓AATTC-3') は， $\beta$  遺伝子 Exon 3 の  $\beta$ 121-122 位アミノ酸 (Glu-Phe) をコードする塩基配列 5'-GAA-TTC-3' に存在する。また，この部位より上流 5.2 kb の位置と，下流 3.6 kb の位置とにある (Fig. 1 A)。正常人 DNA の Eco RI- $\beta$ IVS 2 probe hybridization では，上流域の 5.2 kb の fragment のみが観察される。しかし， $\beta$ 121 Glu→Gln のアミノ酸置換の起こっている Hb D Los Angeles 保因者では，Glu のコドン GAA が Gln のコドン CAA (または CAG であるが，CAA が優位) への変換が考えられ，Eco RI 作用部位の消失が起こる。このため，Hb D Los Angeles 保因者からの DNA の Eco RI/ $\beta$ IVS 2 処理では，5.2 kb と 3.6 kb の fragment が結合して生じた 8.8 kb の DNA fragment が観察された (Fig. 1 A, C)。

## 考 察

DNA の制限酵素分解と適当な probe との組合せによって多くの Abn Hb の構造推定ができることは，臨床診断学上重要な出生前診断に活用される。しかし，今日，我々が酵素学的分析に利用できる酵素には数に限りがあり，すべての Abn Hb の構造を推定することは不可能である。Hb Takamatsu は四国・高松を中心に多数の保因者が発見されており，また，同位置でのアミノ酸置換を起こした Hb Riyadh も日本各地で発見されている (Fig. 2)。これら2種の Abn Hb の電気泳動的挙動や構造決定の際のフィンガープリント<sup>10)</sup> は大変よく似てお

り (Fig. 3), また, 両者のフィンガープリント上から異常ペプチドを純粋に単離することはむづかしく, アミノ酸分析も高精度に行う必要がある. DNA の酵素学的分析はこの両者を判定する上で有力な手段となる.

Hb Takamatsu のように, 塩基置換 (アミノ酸置換) が制限酵素の作用部位を新生する

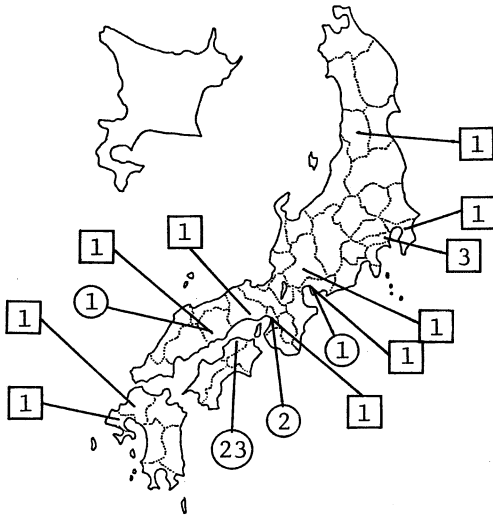


Fig. 2. Distribution of Hb Takamatsu (Ⓜ) and Hb Riyadh (□). n : indicates the frequencies.

場合は, その構造推定が容易であるが, Hb D Los Angeles のように, 制限酵素作用部位の消失はアミノ酸置換を特定することはできない. Hb Riyadh は  $\beta$ 120 位のアミノ酸置換とはいえ, Bal I には感応せず他の種類の制限酵素を用いなければならない. Hb Riyadh の  $\beta$ 120 Lys $\rightarrow$ Asn のアミノ酸置換が, AAA $\rightarrow$ AAC の塩基置換でなく, AAA $\rightarrow$ AAT であれば, 制限酵素 Hinf III (5'-CGAAT-3')<sup>11)</sup> に感応し, 正常人 DNA の Hinf III- $\beta$ IVS 2 probe hybridization では 4.4 kb の fragment を与えるが, Hb Riyadh では 0.8 kb の fragment を観察することができる.<sup>12)</sup> アミノ酸の置換と同時に, 塩基変換コドンを知ることができる. しかし, 現在のところ, 我々は Hinf III を入手, 使用することはできない.

$\beta$  グロビン遺伝子の Exon 領域で, Bal I の作用部位が新生するような一塩基置換は正常人の  $\beta$  グロビン遺伝子領域の塩基配列<sup>13)</sup> を基にして推定することができる (Table 1). Hb Takamatsu のほかに, 1 種の silent mutation と 6 種の Abn Hb の生成が考えられる. これらのうち, すでに発見された Abn Hb は Hb

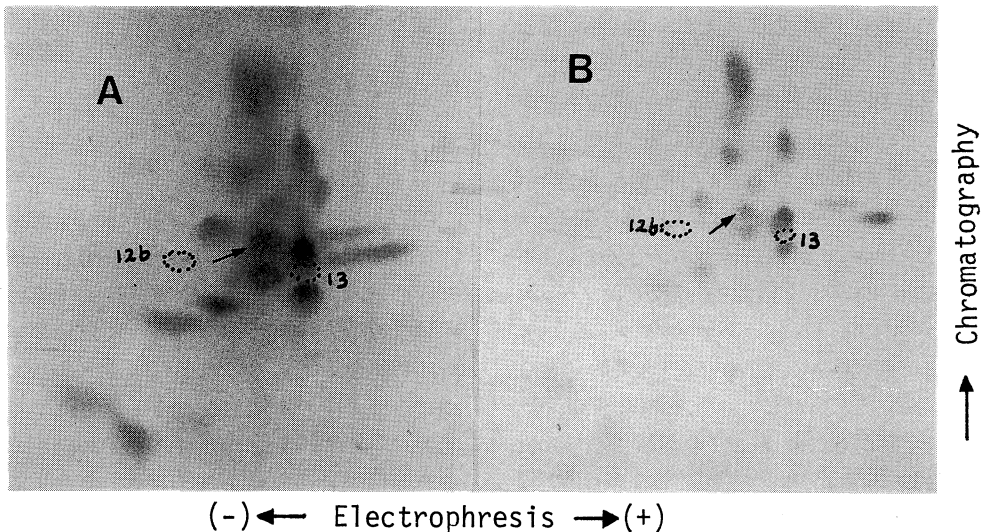


Fig. 3. Fingerprints of the tryptic digests of the aminoethylated  $\beta$ Takamatsu (A) and  $\beta$ Riyadh (B) chains. The  $\beta$ T-12b and  $\beta$ T-13 peptide spots disappeared are shown by the dotted circles, and the abnormal peptide spot ( $\beta$ <sup>X</sup>T-12 b +  $\beta$  T-13) is indicated by the arrow.

**Table 1.** Hemoglobin variant produced by addition of restriction site of Bal I (5'-TGGCCA-3') due to the point mutation in the region of exons 1, 2, and 3 of the  $\beta$  globin gene.

Position Amino acid seq.	Nucleotide seq.		Substitution of amino acid	Variant
	Normal	Abnormal		
$\beta$ 55-57 Met-Gly-Asn	ATG GGC AAC --- -C---		$\beta$ 56 Gly→Ala	not detected
$\beta$ 63-65 His-Gly-Lys	CAT GGC AAG --- --- C---		$\beta$ 65 Lys→Gln	Hb J-Cairo
$\beta$ 73-75 Asp-Gly-Leu	GAT GGC CTG --- --- -A-		$\beta$ 75 Leu→Gln	not detected
$\beta$ 106-108 Leu-Gly-Asn	CTG GGC AAC --- -C---		$\beta$ 107 Gly→Ala	not detected
$\beta$ 114-116 Leu-Ala-His	CTG GCC CAT --- --- A--		$\beta$ 116 His→Asn	not detected
$\beta$ 118-120 Phe-Gly-Lys	TTT GGC AAA --- --- C---		$\beta$ 120 Lys→Gln	Hb Takamatsu
$\beta$ 137-139 Val-Ala-Asn	GTG GCT AAT --- -C---		$\beta$ 138 Ala→Ala	Silent mutation
$\beta$ 141-143 Leu-Ala-His	CTG GCC CAC --- --- A--		$\beta$ 143 His→Asn	not detected

J-Cairo [ $\beta$ 65 Lys→Gln]<sup>14)</sup> である。Hb J-Cairo 保因者 DNA の Bal I- $\beta$ IVS 2 probe hybridization では 1660 bp (約 1.7 kb) の fragment が観察されると予想される。現在の技術では、0.1 kb の DNA fragment 差は確認可能な大きさであり、この方法によって Hb Takamatsu と Hb J-Cairo は区別される。また、別種の probe、例えば  $\beta$  グロビン遺伝子の Exon 1 部を含む DNA の小断片を probe として選べば、さらにその判別は容易となる (Hb J-Cairo: 450 bp, Hb Takamatsu: 1460 bp の各 fragment が出現)。しかし、これに関する報告はない。

DNA の制限酵素分析による診断は、特にタンパク質レベルで検出のむずかしい Abn Hb に有効である。例えば、東南アジア地域で  $\alpha$ -サラセミア様症状を呈する Hb Quong Sze [ $\alpha$ 125 (H8) Leu→Pro]<sup>14)</sup> は、mRNA が非常に不安定なために、Hb 分子として血液中にその存在

を認めることのできない Abn Hb である。しかし、このアミノ酸置換は制限酵素 Msp I (5'-C↓CGG-3') の作用部位を新生するため Hb Quong Sze の保因者かどうかの判定が容易に行われている。<sup>15)</sup> また、日本では、Hb Showa-Yakushiji [ $\beta$ 110 (G12) Leu→Pro] が発見されており、Hb Quong Sze と同様にサラセミア様症状を呈し、制限酵素 Msp I の作用部位の新生がみられる。<sup>16)</sup> タイを中心に東南アジア地域に多発する Hb E [ $\beta$ 26 (B8) Glu→Lys] は制限酵素 Mnl I (3'-GGAG-5') の作用部位の消失がみられ酵素分析による検出が可能となっている。<sup>17)</sup>

今日の分子生物学の発展は、医学特に診断学分野において、その有効性が示されており、難解な病態解析での有力な手掛かりを与えようとしている。

本研究は、川崎医科大学 プロジェクト研究費 (62-401, 62-402) の一部によって行われた。

## 文 献

- 1) Iuchi, I., Hidaka, K., Harano, T., Ueda, S., Shibata, S., Shimasaki, S., Mizushima, J., Kubo, N., Miyake, T. and Uchida, T.: Hemoglobin Takamatsu [ $\beta$ 120(GH 3)Lys→Gln]: A new abnormal hemoglobin detected in three unrelated families in the Takamatsu area of Shikoku.

- Hemoglobin 4 : 165—176, 1980
- 2) Harano, T., Harano, K., Ueda, S. and Nakaya, K. : Hb D Los Angeles [ $\beta$ 121(GH4)Glu→Gln] in Japan. Hemoglobin 11 : 177—180, 1987
  - 3) Miyaji, T., Ohba, Y., Matsuoka, M., Kudoh, H., Asano, M., Yamamoto, K. and Satoh, T. : Hemoglobin Karatsu : Beta 120(GH3) Lysine→Asparagine. An example of Hb Riyadh in Japan. Hemoglobin 1 : 461—466, 1977
  - 4) Poncz, M., Solowiejczyk, D., Harpel, B., Mory, Y., Schwartz, E. and Surrey, S. : Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood : Analysis of  $\beta$ -like globin genes. Hemoglobin 6 : 27—36, 1982
  - 5) Mandel, M. and Higa, A. : Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. mol. Biol. 53 : 159—162, 1970
  - 6) Berger, S. L. and Kimmel, A. R. : Methods in Enzymology. Vol. 152, Guide to molecular cloning techniques, Orlando, Academic press. 1987
  - 7) Dretzen, G., Ballard, M., Sassone-Corisi, P. and Chambon, P. : A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem. 112 : 295—298, 1981
  - 8) Southern, E. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. mol. Biol. 98 : 503—517, 1975
  - 9) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Cold Spring Harbor. 1982
  - 10) 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
  - 11) Piekarowicz, A., Bickle, T. A., Shepherd, J. C. W. and Ineichen, K. : The DNA sequence recognized by the Hinf III restriction endonuclease. J. mol. Biol. 146 : 167—172, 1981
  - 12) Trent, R. J., Davis, B., Wilkinson, T. and Kronenberg, H. : Identification of  $\beta$  variant hemoglobins by DNA restriction endonuclease mapping. Hemoglobin 8 : 443—462, 1984
  - 13) Lown, R. M., Efstratiadis, A., O'Connell, C. and Maniatis, T. : The nucleotide sequence of the human  $\beta$ -globin gene. Cell 21 : 647—651, 1981
  - 14) Goossens, M., Lee, K. Y., Liebhaber, S. A. and Kan, Y. W. : Globin structural mutant  $\alpha^{125}$  Leu→Pro is a novel cause of  $\alpha$ -thalassaemia. Nature 296 : 864—865, 1982
  - 15) Zeng, Y. T., Huang, S. Z. and Chen, M. J. : The types and distribution of  $\alpha$ -thalassaemia-2 in China. Hemoglobin 12 : 455—458, 1988
  - 16) Kobayashi, Y., Fukumaki, Y., Komatsu, N., Ohba, Y., Miyaji, T. and Miura, Y. : A novel globin structure mutant, Showa-Yakushiji ( $\beta$ 110 Leu→Pro), causing  $\beta$  thalassaemia phenotype. Blood 70 : 1688—1691, 1987
  - 17) Thein, S. L., Lynch, J. R., Old, J. M. and Weatherall, D. J. : Direct detection of Haemoglobin E with Mnl I. J. med. Genet. 24 : 110—112, 1987