

γ鎖グロビンにアミノ酸置換を起こした異常ヘモグロビンの構造決定—HbF-Onoda

土井 和子, 上田 智, 原野 恵子*, 原野 昭雄*

健康な新生児の臍帯血から得た溶血液を等電点分画すると, HbF と HbA の間に泳動される異常ヘモグロビンがあることを示した. この異常ヘモグロビン含量は全ヘモグロビンの 26.4% を占め, また HbF 含量は 48.7% であった. グロビンの CM-セルロースカラムクロマトグラフィーは γ 鎖異常を示した. 構造解析は, 異常 γ 鎖のトリプシン消化物のフィンガープリントにみられた異常ペプチドのアミノ酸分析や, カルボキシペプチダーゼ A による C-末端アミノ酸分析によって行われた. この結果, 異常 γ 鎖では, C-末端位 (γ-146) において His→Tyr の置換が起こっていた. また γ-75 位と γ-136 位のアミノ酸は, それぞれ Ile と Gly であった. このアミノ酸置換をもつヘモグロビンの例は, これまでに報告はなく, 我々はこの臍帯血液の採取された病院のある市名にちなんで HbF-Onoda [α_2 G γ I $_2$ 146 (HC3) His→Tyr] と命名した. (平成元年 4 月 4 日採用)

Structural Analysis of Abnormal Hemoglobin with Amino Acid Substitution in the γ Globin Chain—HbF-Onoda

Kazuko Doi, Satoshi Ueda, Keiko Harano* and Teruo Harano*

Isoelectric focusing of the hemolysate of cord blood collected from a healthy Japanese newborn showed the presence of an abnormal hemoglobin band migrating between HbF and HbA bands. The content of the abnormal hemoglobin of the total hemoglobin was 26.4%, while that of HbF was 48.7%. CM-cellulose column chromatography of globin obtained from the hemoglobin gave an abnormal γ chain. (γ^x). A structural abnormality in the γ^x chain was found by amino acid analysis of the abnormal peptide appearing on the fingerprint of the tryptic digest of the γ^x chain and by determination of the amino acids released by Carboxypeptidase-A digestion of its C-terminal region. The results suggested that the γ^x chain had an amino acid substitution of His→Tyr at the position of 146 (C-terminal) of the γ chain. In addition, the amino acid residues at the 75 th and the 136 th positions of the γ^x chain were isoleucine and glycine residues, respectively. This is the first discovery world wide of hemoglobin possessing the amino acid substitution of His→Tyr at the 146 th position of the γ chain. Therefore, we named it

川崎医療短期大学 臨床検査科
〒701-01 倉敷市松島 316

* 川崎医科大学 生化学教室

Department of Medical Technology, Kawasaki College
of Allied Health Professions: 316 Matsushima, Kurashiki,
Okayama, 701-01 Japan

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

HbF-Onoda [α_2 G γ I $_2$ 146 (HC3) His→Tyr] after the city where the cord blood was collected. (Accepted on April 4, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15 (2) : 328—333, 1989

Key Words ① Isoelectric focusing ② Abnormal hemoglobin
③ Abnormal γ chain ④ Fingerprint
⑤ HbF-Onoda [α_2 G γ I $_2$ 146 (HC3) His→Tyr]

はじめに

今日までに、世界で発見された異常ヘモグロビン (Abn Hb) は480余種にのぼっている。このうちの半数以上 (250余種) が β 鎖異常の Abn Hb であり、 α 鎖異常の Abn Hb は約130種である。しかし、 γ 鎖に異常のある Abn Hb は50種を数えるにすぎない。¹⁾ これは、従来から Abn Hb の検出法として応用されてきた電気泳動法 (寒天ゲル、でんぶんゲル電気泳動法) による微量成分の検出の困難さ、実質荷電差の少ない成分間の低分離能、あるいは検体の入手の難しさなどによるところが大きく関係していると思われる。しかし、近年、タンパク質の分離・分析に有効な等電点電気泳動法が Abn Hb の研究分野にも導入され、²⁾ 検索や分析に応用され実績をあげてきている。

今回、我々は健康な新生児の臍帯血液から調製した溶血液を等電点電気泳動法で泳動し、正常な HbF と HbA の間に分画される Hb を発見した。この Hb の一次構造解析をフィンガープリント-アミノ酸分析法、およびカルボキシペプチダーゼAによるグロビンのC-末端部位アミノ酸分析法によって行った。この結果、この Hb は γ 鎖146位 (C-末端位) のアミノ酸 His が Tyr に置換しており、 γ 75位に Ile、 γ 136位に Gly をもち、G γ I 146 His→Tyr の構造で示される γ 鎖をもつ新しい HbF の変異体であることがわかった。¹⁾ ゆえに、我々はこの臍帯血液の採取された病院のある市名にちなんで HbF-Onoda [α_2 G γ I $_2$ 146 (HC3) His→Tyr] と命名した。

この Hb の構造決定について報告する。

材料と方法

1. 血液検体

へパリンで抗凝固した臍帯血液を用いた。

2. 溶血液の調製

血液を生理食塩液で洗浄後、血球の3倍容の蒸留水、0.5倍容の四塩化炭素を加え、攪拌後、2500 rpm, 10分間遠心し、上澄を溶血液として用いた。

3. 等電点電気泳動法 (IEF) による Abn Hb の分画、定量と単離

Pharmalyte (pH 範囲: 6.7~7.7, Pharmacia Co.) を含むポリアクリルアミドゲルを文献²⁾ に従って調製した。電極液に 0.25M HEPES (陽極), 0.1N-NaOH (陰極) を用い、試料は陰極から陽極に向け泳動した (10°C, 16時間)。各 Hb 画分を切り取り、0.01% KCN-0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶出させ、415 nm における吸光度から各 Hb 含量を算出した。また、同分画法で得た Abn Hb 分画を蒸留水中に溶出させ、限外濃縮して Abn Hb 試料とし、一次構造解析に用いた。

4. セルロースアセテート膜電気泳動法による異常鎖の検索

溶血液をメルカプトエタノール-8M尿素-Tris-EDTA-Borate 緩衝液 (pH 8.3) で処理後、同緩衝液中でセルロースアセテート膜電気泳動 (ザートリウス 10×20 cm, 150V, 2時間) し、ボンソーR染色を行った。³⁾

5. グロビン鎖の単離・精製

溶血液を冷1%塩酸-アセトンで処理しグロビンを得た。⁴⁾ このグロビンをCM-セルロースカラムクロマトグラフィー (CM-52, Whatman Co., カラム 1.5×20 cm) にかけて、各鎖に分離した。この際用いた溶離液は、50 mMメルカプトエタノール-8M尿素-リン酸緩衝液 (pH 6.8, Na⁺ イオン勾配 5 mM→35 mM) を用いた。⁵⁾

6. グロビンのトリプシン消化とフィンガープリント

グロビン (~10 mg) を少量の 0.01N-NaOH で溶解し, TPCK-トリプシン (~50 μ g/0.001 N-HCl, Cooper Biochemicals Co.) を加え, pH スタットを用い 0.01N-NaOH pH 8.2 に保ちながら 17 時間消化した. 反応液に 0.01 N-HCl を加え pH 6.5 に調節し, 3000 rpm, 10 分間遠心し可溶成分を分けた. 凍結乾燥し, ペプチド試料とした.

ペプチドを少量の蒸留水に溶かし, セルロース薄層 (Chromagram Sheet, 20 \times 20 mm; Kodak Co.) に塗布し, 電気泳動, ついでクロマトグラフィーを行いフィンガープリントを作製した.⁶⁾ 各ペプチドの検出にはニンヒドリン-酢酸カドミウム/アセトン溶液を用いた.

7. ペプチドのアミノ酸分析

フィンガープリントのペプチド部分を切り取り, 10% 酢酸で抽出した. 乾燥後, 6N-HCl を加え, 真空封管下に 108 $^{\circ}$ C, 22 時間加水分解を行った. HCl を除去し, 自動アミノ酸分析器で分析し, ペプチドのアミノ酸組成を求めた.

8. カルボキシペプチダーゼ A (CPase A) による C-末端部位のアミノ酸配列の決定

精製グロビンを少量の 1/200N-NaOH に溶かし, 50 mM N-エチルモルホリン緩衝液 (pH 8.3) で pH 8.5 に調節した. グロビン鎖: CPase A=200:1 のモル比率になるように CPase A-DFP (Sigma Co.) を加え, 25 $^{\circ}$ C, 4 時間反応させた.⁷⁾ 反応液に終末濃度 5% スルホサルチル酸になるように 20% スルホサルチル酸を加え, 3000 rpm, 10 分間遠心し, 上澄を自動アミノ酸分析器で分

析し, 遊離アミノ酸組成を調べた.

結 果

ここで調べた新生児は, 正常分娩で, その母親には血液学的異常は何らみられなかった. 臍帯血液から得た溶血液の IEF では, HbF と HbA の間に異常バンドが現れ, 全 Hb の 26.4% であった. また HbF 含量は 48.7%, HbA 15.3%, その他糖化 Hb や aging band と考えられる分画が約 10% 存在した (長期保存による) (Fig. 1).

溶血液の尿素解裂セルロースアセテート膜電気泳動では, 正常 α 鎖と γ 鎖グロビンのほかに異常グロビンの泳動縞が現れなかったが, グロビンの尿素-CM セルロースカラムクロマトグラフィーでは正常 γ 鎖, β 鎖および α 鎖グロビンのほかに, 正常 γ 鎖より早く溶出する画分が現れ, fast moving γ 鎖異常をもつ HbF

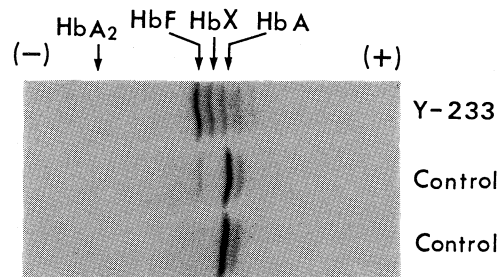


Fig. 1. Isoelectric focusing of the hemolysates (pH range: 6.7~7.7)

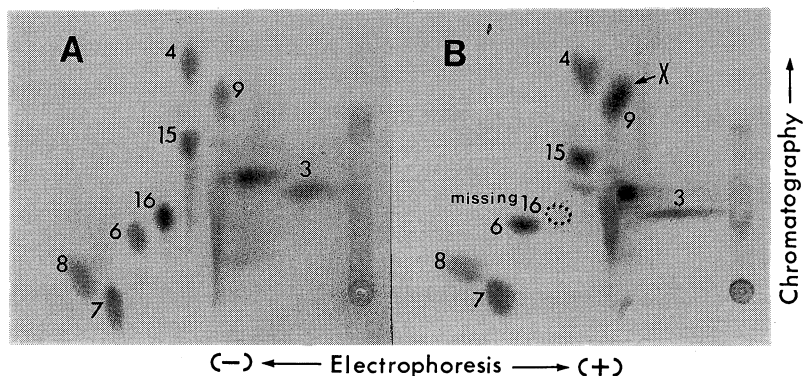


Fig. 2. Fingerprints of the soluble fraction of the tryptic digest of the γ -chain (A: normal, B: abnormal). X: indicates the position of the abnormal peptide spot.

の変異体であることを示し、IEFの挙動と一致していた。

単離した γ 鎖グロビンのトリプシン消化物の可溶性成分のフィンガープリント(Fig. 2)は、 γ T-16ペプチドの消失を示し、その代わりに、 γ T-9ペプチドスポットの上方に異常ペプチドスポットの存在を示した(Fig. 2B, X: 異常ペプチドスポット)。 γ T-9ペプチドの混入を避けるように切り取ったXペプチド部分のアミノ酸組成は、通常、 γ T-16(γ -145-146)はHisとTyr残基から構成されているにもかかわらず、Tyrのみの存在を示した(Table 1)。この結果から、異常 γ 鎖は γ -146位のHisがTyrに置換されたか、あるいは γ -146位のHisが脱落し、鎖の短縮が起こったかの2通りが考えられた。このことを明らかにするために精製 γ 鎖グロビンのC-末端領域のアミノ酸配列を決定することを試みた。CPase Aは基質のペプチド中にPro, Arg残基が存在すると、そのアミノ酸のC-末端位で反応が停止するという特異性がある。⁷⁾ 正常および予想される異常 γ 鎖グロビンのC-末端領域のアミノ酸配列は:

140 141 142 143 144 145 146
 正常: -Ala-Leu-Ser-Ser-Arg-Tyr-His
 異常: — — — — — — -Tyr
 or脱落

Table 1. Comparison of the amino acid components of the γ T-16 peptide from the normal γ -chain and the abnormal peptide (X on Fig. 2B) from the abnormal γ -chain

amino acids	Found (nmol)		Expected for γ T-16
	normal	abnormal	
Tyr	10.51	3.33	1
His	14.48	—	1

Table 2. Amino acids released from the abnormal and normal γ -chains (μ mol/ μ mol of γ -chain)

	Histidine	Tyrosine	Arginine
normal	0.79	0.81	—
abnormal	0.06	1.62	—

であることから、CPase A消化により遊離するアミノ酸成分の割合を検討すると、先の疑問を解明することができると考えた。正常および異常 γ 鎖グロビンのCPase A酵素反応によって遊離・検出したアミノ酸の定量値から γ 鎖グロビンに対する比率を算定すると、正常 γ 鎖から遊離したTyr, Hisの値(μ molアミノ酸/ μ mol γ 鎖)はほぼ等しいのに対し、異常 γ 鎖からはTyrのみが遊離し、 γ 鎖当たり2個分に相当した(Table 2)。このことは γ 146 His \rightarrow Tyrの置換を示唆するものであった。さらに、 γ 75位と γ 136位のアミノ酸を決定するため、 γ T-9と γ T-15のペプチドのアミノ酸組成を分析し(Table 3)、 γ 75 Ileと γ 136 Glyを決定した。以上のことから、この異常 γ 鎖は G_{γ}^I 146 His \rightarrow Tyrであると結論づけられ、このAbn HbをHbF—Onoda [$\alpha_2 G_{\gamma}^I$ 146 (HC3) His \rightarrow Tyr]と命名した。

考 察

HbF—Onoda [$\alpha_2 G_{\gamma}^I$ 146 (HC3) His \rightarrow Tyr]は γ 鎖のC-末端位(γ -146)でアミノ酸置換を起こしたHbFの変異体で、世界各国から発見報告されている50種のHbF-変異体にはみ

Table 3. Amino acids components of γ T-9 (γ 67-76) and γ T-15 (γ 133-144) peptides of the abnormal γ -chain (nmol)

amino acids	γ T-9		γ T-15	
	Found	Expected (γ 75Ile)	Found	Expected (γ 136Gly)
Asp	1.0	1		
Thr	0.8	1	1.0	1
Ser	1.1	1	3.1	3
Gly	1.3	1	1.3	1
Ala	1.0	1	2.0	2
Val	0.6*	1	1.8	2
Met			0.4*	1
Ile	0.8	1		
Leu	1.8	2	1.2	1
Lys	0.9	1		
Arg			1.0	1

* indicates N-terminal amino acid of the peptide

られない全く新しい型の変異体であった。¹⁾ これまで日本あるいは日本人から最初に発見・報告され、日本の地名を冠した HbF 変異体は 8 種 (Hb F-Meinohama [$G\gamma^I$ 5 (A2) Glu→Gly], Hb F-Kotobuki [$A\gamma^I$ 6 (A3) Glu→Gly], Hb F-Tokyo [$G\gamma^I$ 34 (B6) Val→Ile], Hb FM-Osaka [$G\gamma^I$ 63 (E7) His→Tyr], Hb F-Iwata [$A\gamma^I$ 72 (E16) Gly→Arg], Hb F-Minoo [$G\gamma^I$ 72 (E16) Gly→Arg], Hb F-Yamaguchi [$A\gamma^T$ 80 (EF4) Asp→Asn], Hb F-Ube [γ 108 (G10) Asn→Lys]) あり、Hb F-Onoda は第 9 番目の日本名を冠する Hb F-変異体となる。¹⁾

Hb F-Onoda の保因者であった新生児や母親には、特に血液学的異常は認められていなかった。しかし、HbA ($\alpha_2\beta_2$) の β 鎖グロビンの C-末端位でアミノ酸が置換した Abn Hb には 4 種の報告例があり、塩基性 (His)→塩基性 (Arg) アミノ酸置換をもつ Hb Cochin-Port Royal [β 146 His→Arg]⁹⁾ 以外の塩基性→酸性 (Asp) あるいは中性 (Pro, Leu) アミノ酸置換をもつ Hb Hiroshima [β 146 His→Asp],⁹⁾ Hb York [β 146 His→Pro],¹⁰⁾ Hb Cowtown [β 146 His→Leu]¹¹⁾ は、いずれも保因者には

血液学的異常が観察され、また Abn Hb の機能異常が観察されている。 β 146 位のアミノ酸は Hb 分子の $\alpha_2\beta_1$ 接触部位にあり、Hb 機能と密接に関連した重要なアミノ酸である。特に、同一 β 鎖内 94 位 Asp と α 鎖の 40 位 Lys との間で形成される塩橋結合は、Hb 分子の酸素型—非酸素型 (還元型) の平衡移動の際に重要な役目を担っている。このため、 β 146 位のアミノ酸置換は Hb Hiroshima, Hb York, Hb Cowtown にみられるような機能異常 (酸素親和性亢進) を起こすと考えられている。事実、Hb Hiroshima 分子の X-線解析では、 β 146 His→Asp の置換により、還元型 Hb 分子において形成されるべき β 146 His と β 94 Asp 間の塩橋結合が形成されず、還元型 Hb 構造の安定化が弱く、酸素型 Hb 構造が優位であることが示されている。¹²⁾ β 鎖様グロビンである γ 鎖の C-末端部位 (γ -146) の His→Tyr 置換をもつ Hb F-Onoda も Hb Hiroshima などに観測された Hb 機能異常が予想される。

本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費 (62-402, 63-304) によって行った。

文 献

- 1) International Hemoglobin Information Center (IHIC): Variant List. Hemoglobin 12: 209—282, 1988
- 2) 原野昭雄, 原野恵子, 小出智子, 岡田美恵子, 上田 智, 柴田 進: 等電点電気泳動法による異常血色素の Mass Screening 法. 臨病理 28: 149—152, 1980
- 3) Ueda, S. and Schneider, R. G.: Rapid differentiation of polypeptide chains of hemoglobin by cellulose acetate electrophoresis of hemolysates. Blood 34: 230—234, 1969
- 4) 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
- 5) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, J. D.: Abnormal human haemoglobins, separation and characterization of the α and β chains chromatography, and determination of two new variations, Hb Chesapeake and Hb J Bangkok. J. med. Biol. 19: 91—108, 1966
- 6) Harano, K., Harano, T., Ueda, S. and Shibata, S.: Mapping and amino acid analysis of triptic peptides of globin by use of cellulose thin layer. Kawasaki med. J. 4: 323—326, 1978
- 7) 池中徳治: 生化学実験講座 1・タンパク質の化学 II 一次構造決定法. 第 1 版. 東京, 東京化学同人. 1976, pp. 203—208
- 8) Wajcman, H., Kilmartin, J. V., Najman, A. and Labie, D.: Hemoglobin Cochin-Port Royal—consequences of the replacement of the β chain C-terminal by an arginine. Biochem.

Biophys. Acta 400 : 354—364, 1975

- 9) Imai, K.: Oxygen-equilibrium characteristics of abnormal Hemoglobin Hiroshima ($\alpha 2\beta 2$ 143Asp). Arch. Biochem. Biophys. 127 : 543—547, 1968
- 10) Brem, G. H., Bromberg, P. A., Alben, J. O., Brimhall, B., Jones, R. T., Mintz, S. and Rother, I.: Altered C-terminal salt bridges in Haemoglobin York cause high oxygen affinity. Nature 259 : 155—156, 1976
- 11) Shneider, R. G., Brenner, J. E., Brimhall, B., Jones, R. T. and Shin, T. B.: Hemoglobin Cowtown ($\beta 146$ (HC3) His→Leu). A mutant with high oxygen affinity and erythrocytosis. Am. J. clin. Pathol. 72 : 1028—1032, 1979
- 12) Perutz, M. F., Del Pulsinell, P., Ten Eyck, L., Kilmartin, J. V., Shibata, S., Iuchi, I., Miyaji, T. and Hamilton, H. B.: Hemoglobin Hiroshima and the Mechanism of the alkaline Bohr effect. Nature New Biology 232 : 147—149, 1971