

$\beta 6$ 位にアミノ酸置換をもった異常血色素 (Hb S, Hb C, Hb Machida) の PCR 法 (Polymerase Chain Reaction) による遺伝子解析

原野 昭雄, 原野 恵子, 櫛田 由美*, 上田 智*

異常血色素 (Hb S [$\beta 6$ (A3) Glu→Val], Hb C [$\beta 6$ (A3) Glu→Lys] や Hb Machida [$\beta 6$ (A3) Glu→Gln]) 保因者の末梢血液中白血球層から調製された DNA を 1 対の amplification primer と熱安定性 Taq ポリメラーゼによって増幅した。増幅 DNA は 2 種の制限酵素 (Sph I と Hind III) で消化し, アガロースゲル電気泳動-DEAE セルロース抽出法によって精製後, 同種制限酵素で処理されている M13mp19 ベクターに組み込まれた。DNA sequencing は dideoxy 法で行い, $\beta 6$ 位コドンの塩基置換について調べた。Hb S, Hb C や Hb Machida の異常 β 遺伝子の $\beta 6$ 位コドンは, 正常 β^A 遺伝子で GAG であるのに対し, β^S 遺伝子では GTG, β^C 遺伝子では AAG, そして $\beta^{Machida}$ 遺伝子では CAG であった。これら $\beta 6$ コドンの変異はそれぞれの異常血色素の置換アミノ酸に相当するものであった。

この方法は異常血色素, 特に (超) 不安定異常血色素の一次構造解析の有益な方法となると考えられる。

(平成 2 年 3 月 12 日採用)

Genetical Analysis of Abnormal Hemoglobins, Hb S, Hb C and Hb Machida, with Amino Acid Substitution at $\beta 6$ by the Polymerase Chain Reaction (PCR)

Teruo Harano, Keiko Harano, Yumi Kushida* and Satoshi Ueda*

DNA prepared from leukocytes collected from the peripheral blood of relevant carriers of abnormal hemoglobins, Hb S [$\beta 6$ (A3) Glu→Val], Hb C [$\beta 6$ (A3) Glu→Lys] and Hb Machida [$\beta 6$ (A3) Glu→Gln], was amplified by use of a pair of amplification primers and thermostable Taq DNA polymerase. The amplified DNA, after digestion with two different restriction endonucleases (Sph I and Hind III) and purification by the method of agarose electrophoresis and DEAE-cellulose extraction, was introduced to vector M13mp19, which had been digested with the same enzymes. DNA sequencing was carried out by the dideoxy chain termination method to determine the nucleotide change at codon 6 of the abnormal β globin gene. The nucleotide sequences at codon 6 of the abnormal β globin

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

genes from Hb S, Hb C and Hb Machida were GTG for the β^S gene, AAG for the β^C gene and CAG for the β^{Machida} gene. The sequence for the normal β^A gene was GAG. These nucleotide mutations corresponded to the codon of the substituted amino acid of the relevant abnormal hemoglobins.

This technique may become a very useful analytical method for determining the primary structure of the abnormal hemoglobins and, especially, of (super)-unstable ones. (Accepted on March 12, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16(1): 101-106, 1990

Key Words ① **Abnormal hemoglobins** ② **Polymerase chain reaction**
③ **DNA sequencing**

はじめに

血色素 (Hb A: $\alpha_2\beta_2$) の変異体である異常血色素 (Abn Hb) の構造は, Hb を構成する α 鎖と非 α 鎖 (β 鎖) グロビンの構造遺伝子の変異によって引き起こされたものである.¹⁾ 今回, われわれは 3 種の Abn Hbs, Hb S [$\beta 6$ (A3) Glu→Val], Hb C [$\beta 6$ (A3) Glu→Lys] および Hb Machida [$\beta 6$ (A3) Glu→Gln]²⁾ の β 鎖遺伝子の $\beta 6$ コドンの差異について, 遺伝子増幅法 (PCR: polymerase chain reaction)³⁾ を応用し, 解析を試みたので報告する.

材料と方法

末梢血液: Hb S, Hb C および Hb Machida 保因者と診断された患者からヘパリン加に採血した末梢血液を用いた.

DNA の調整: Poncz らの方法⁴⁾ に準じてつぎのように行った. 末梢血液約 5 ml を生理食塩水 (140 mM NaCl-5 mM KCl-7 mM MgCl₂) で洗浄, 遠心 (2500 rpm) し, buffy coat を集めた. 10 ml の溶血試薬 (131 mM NH₄Cl-0.9 mM (NH₄)HCO₃, pH 6.5) を加え, 10 分間ゆっくり振盪する. 遠心して白血球層をペレットとして集め, 4.5 ml の STE 溶液 (0.1 M NaCl-1 mM EDTA-50 mM Tris, pH 7.4), 0.5 ml の 10% SDS 溶液 (ラウリル硫酸ナトリウム) と 20 μ l のプロテナーゼ K 溶液 (10 mg を 1 ml の Tris-HCl, pH 8.0 に溶解) を加え, 37°C 一夜

放置した. 等量のフェノール (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 で飽和したものを) を加え, ゆっくり振盪, 遠心してフェノールを除き, さらに等量のクロロホルム (1/25 容のイソアミルアルコールを含む) を加え, 振盪・遠心してクロロホルム層を除いた. 約 50 ml のエタノール中に注ぎ, DNA の生成を待った. DNA をとり出し, 70% エタノールで洗浄, 軽く乾燥したのち, TE 溶液 (10 mM Tris-1 mM EDTA, pH 7.4) 0.5~1.0 ml に溶解した. 10 μ l の DNA 溶液を 0.1% SDS 溶液 590 μ l で希釈し, 260 nm の吸光度を測定した. 吸光度の 3000 倍が DNA 濃度 (μ g/ml) に相当する. 正常成人の末梢血液 1 ml から 30 μ g の DNA が得られる.

DNA の増幅反応: 増幅反応に必要な amplification primer の位置は **Figure 1** に示すように β 鎖遺伝子の 5' 端 flanking 領域から IVS2 の 5' 端領域を含む部位を設定し, 二本鎖 DNA の双方の鎖に相補的な 20 mer と 30 mer (増幅 DNA の 3' 端に Hind III site をもつように設計) のオリゴヌクレオチドを合成した (Operon Technology, USA). PCR 反応には Gene Amp amplification reagent kit (Perkin Elmer Cetus, USA) を用いた.⁵⁾ 1 μ l の DNA 溶液, 10 μ l の反応緩衝溶液, 16 μ l の

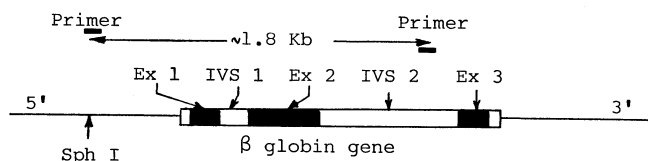


Fig. 1. The location of a pair of amplification primer and the expected size of amplified DNA

dNTP 溶液 (2 mM), 各 5 μl のプライマー溶液 (~50 pmol), Taq ポリメラーゼ (0.5 μl; 2.5 Unit) と蒸留水を加えて総量を 100 μl とし, さらにミネラルオイル (light oil, Sigma Co., USA) 100 μl を重層して programmable thermal controller (MJ Research, Inc., USA) に設置した. 反応のプログラムは次のように設定した. DNA 変性 95°C, 1 分間, プライマー・アニーリング 55°C, 2 分間, プライマー・伸長反応 72°C, 3 分間とし, これら反応を順次 30 回くり返した. プログラム終了後, クロロホルムを加え, ミネラルオイルを除去, 50 μl の 4 M 酢酸ナトリウム溶液と 375 μl のイソプロピルアルコールを加え, -20°C, 30 分間放置した. DNA を遠心 (13000 rpm) して集め, 20 μl の TE 溶液に溶解した. 増幅 DNA の検索には 0.6% アガロースゲル電気泳動を用いた.

クローニングとシーケンシング: 増幅した DNA 断片 (~1.8Kb) を制限酵素 Sph I と Hind III で消化し, 0.6% アガロースゲル電気泳動にかけ, 目的の DNA 断片を DEAE セルロース (DE 81, Bio Rad Laboratories, USA) で抽出, 精製した.⁶⁾ 同種制限酵素で処理した M13mp19 ベクター DNA と混合し, T4 リガーゼ (Toyobo Co., Japan) によるライゲーション反応を 12°C, 17 時間行い, Ca²⁺ イオン処理した JM109 コンピテントセルにトランスフェクトした.^{7),8)} X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranose) と IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を含む TY 寒天プレート (1 l 中にトリプトン 8g, イーストエクストラクト 5g, NaCl 5g と寒天 15g を含む, pH 7.4) にまき, 37°C, 一夜放置した. プレートから無色のプラークを数個とり, JM109 に感染, 2×TY 培地中, 37°C, 6~7 時間培養した. 遠心 (2500 rpm) して上澄みを集め, 1/4 倍容の 20% ポリエチレングリコール-2.5 M NaCl 溶液を加え室温 30 分間放置後, 遠心 (9000 rpm) して沈殿を集めた. 沈殿を TE 溶液に懸濁させ, フェノール, クロロホルムで順次処理, 0.1 倍容の 3M 酢酸

ナトリウム (pH 7.0), 1 ml のエタノールを加え, -20°C, 20 分間放置した. 遠心 (13000 rpm) して沈殿を集め, さらに 70% エタノールで洗浄, 乾燥後, TE 溶液に溶解させ, 1 本鎖 DNA 溶液を調製した.⁸⁾

DNA シーケンシングは Sanger らの dideoxy 法で行った.⁹⁾ 試薬に T7 DNA ポリメラーゼを使用する sequencing kit (Sequenase, US Biochemicals, USA) を用い指定条件下で反応を行った.¹⁰⁾ sequencing primer には合成オリゴヌクレオチド (17 mer), アイソトープ標識試薬に α³⁵S dATP (37.5~55 TBq/mmol, NEN Research Products, Inc., USA) を用いた. またシーケンスゲルとして 8M 尿素-5% アクリルアミド-Tris-EDTA-borate 緩衝液 (pH 8.3) グラジエントゲル¹¹⁾ を調製し, 2000 V (一定), 3 時間電気泳動を行った. ゲルを 10% 酢酸-10% メタノール液で洗い, 乾燥後, X線フィルムを使用してオートラジオグラムを得た.

結 果

一対の amplification primer によって増幅された DNA (1 μl) を λファージ DNA/Hind III digest をマーカーとして 0.6% アガロース電気泳動すると 400 bp 付近の幅広いバンドのほかに, 1.8 Kb 付近にもバンドが現われた (Fig. 2). この 1.8 Kb 付近のバンドは β 鎖遺伝子の 5' flanking 領域, Exon 1, IVS 1, Exon 2 および IVS 2 の 5' 領域を含む DNA 断片と考えられた. この DNA を Sph I と Hind III で消化し, 0.6% アガロースゲル電気泳動-DEAE セルロース抽出, 精製の後, M13mp19 ベクターに導入した. 組換え体は X-gal, IPTG を含む寒天プレートで検索し, 全増幅 DNA から数個~数十個の無色の陽性プラークを得ることができた. 陽性プラークから 1 本鎖 DNA を調製し, dideoxy 法による DNA シーケンシングを行った. β 遺伝子の塩基配列は Poncz ら¹²⁾ によって報告された塩基配列を基にして異常配列の検索を行った.

Abn Hb 保因者の DNA から得られた組換え体は2種 (正常と異常 β 鎖遺伝子) の遺伝子を含み, その割合は大略1:1であった. 正常 β 鎖遺伝子 (β^A) の Exon 1 の 5' 領域の塩基配列を **Figure 3A** に示す. この塩基配列は Ponczらの報告したそれに一致するものであった (β^2 コドンには CAC (His) と CAT (His) の二通りがあり, 制限酵素 Hgi AI ($G^T_A GC^T_A C$) の RFLP (restriction fragment length polymorphism) である¹³⁾. Hb S 保因者からの遺

伝子には, β^A と同じ塩基配列をもつ遺伝子のほかに, β^6 コドンが GTG の Val のコドンに変換した遺伝子の存在が認められ, β^6 位に Val をもつグロビンを産生する β^S 遺伝子と考えられた (**Fig. 3B**). Hb S の β^6 Glu \rightarrow Val のアミノ酸置換, すなわち $GAG \rightarrow GTG$ の塩基変換は β^A 5~7 の塩基配列: $CCTCAGGAG$ にみられる制限酵素 Mst II ($CCTNAGG$) の作用部位を消失することになる. このため β^S 遺伝子の存在は Mst II 反応の異常から推測することができるため Hb S の診断・検出にこの酵素反応が応用される.¹⁴⁾ Hb C 保因者の DNA からの異常遺伝子の β^6 コドンは CAG の, 両者とも正常 β^6 コドン GAG の第1塩基の変換した塩基配列が観察され, それぞれ Glu \rightarrow Lys と Glu \rightarrow Gln のアミノ酸変換が起こっていることを示した (**Fig. 3C, D**). Hb C や Hb Machida での β^6 コドンから Hb S にみられるような Mst II に対する異常反応は起こらないと考えられ, Mst II 消化は正常と区別されない. なお, $\beta^{Machida}$ 遺伝子の β^2 コドンの Hgi AI に対する RFLP は T (-) であったが, β^S と β^C 遺伝子のそれは C (+) であった.

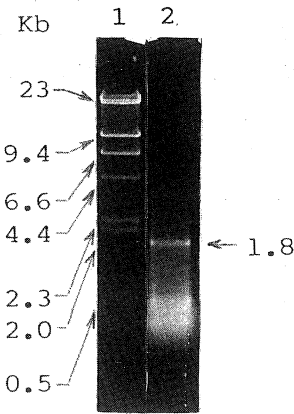


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis. Lane 1: λ phage DNA/Hind III digest as a molecular weight marker. Lane 2: Amplified DNA.

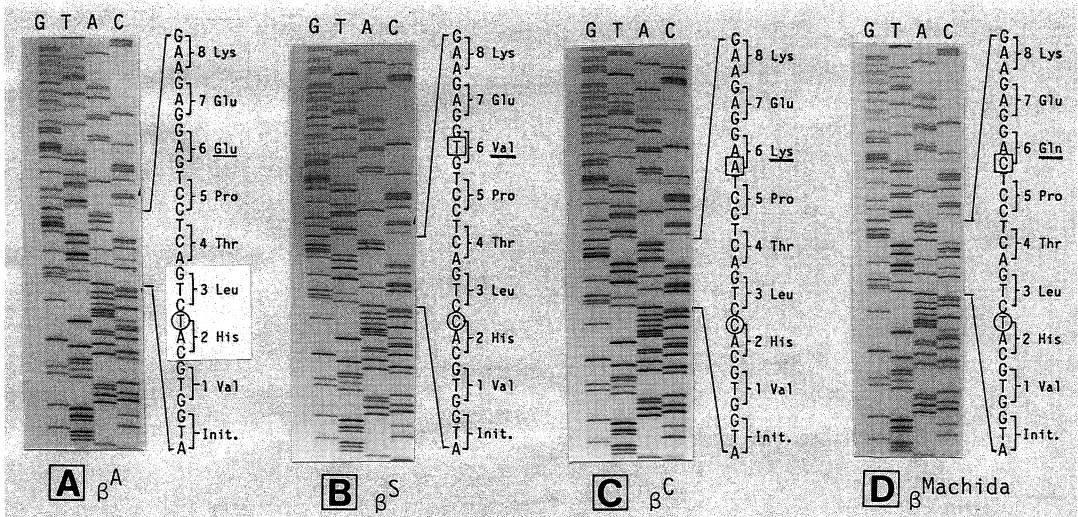


Fig. 3. Sequence analysis of a M13mp19 clone from an amplified 1.8 Kb DNA

考 察

従来の Abn Hb 構造解析は、Abn Hb を構成する異常グロビンのアミノ酸分析やアミノ酸配列決定が行われてきた。¹⁵⁾ しかしこのペプチド分析法では十分量のペプチドを集める必要があり、特に不安定な Hb や正常な Hb と識別困難な Hb (silent variant) からの異常ペプチドの単離・精製は困難である。また Hb Quong Sze [α 125 (H8) Len→Pro]¹⁶⁾ のように血液中に発見できない Hb では、ペプチド分析法による構造解析は不可能である。Hb Quong Sze では、そのグロビン遺伝子のクローニングからその超不安定 Abn Hb の構造が決められた。¹⁶⁾ クローニング法では調製された gene libraries からの目的 (標的) 遺伝子の検出は大変煩雑で労力を要するものである。これに対し、最近多方面にわたって応用されつつある PCR 法は、ごく少量の DNA (1 μ g 以下) を

もとに標的遺伝子を特異的に増幅 (10⁵~10⁶倍) し、増幅遺伝子の直接クローニングはその効率を高め、また標的遺伝子の検索の煩雑さを極力おさえることができ、遺伝子レベルで異常の検出ができる画期的方法である。本研究での増幅遺伝子は、Hb の β 鎖遺伝子の 5' flanking 領域, Exon 1 (β 1-30), IVS 1, Exon 2 (β 31-104) と IVS 2 の 5' 領域を含む 1.8Kb の長大なものであった。この方法によって β 1-104 位のコドン変異をもつ色々の Abn Hb 構造を調べることができる。今日では、増幅遺伝子の直接シーケンシング法¹⁷⁾ や特殊な標識オリゴヌクレオチド・プローブを使ったドットハイブリッド法¹⁸⁾ も行われ、簡易的・迅速に遺伝子レベルでの病態異常の検出が行われるようになってきている。

本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費 1-306 によって行った。

文 献

- 1) Bunn, H. F. and Forget, B. G.: Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects. Philadelphia, W. B. Saunders Company. 1986
- 2) Harano, T., Harano, K., Ueda, S., Imai, K. and Seki, M.: Hemoglobin Machida [β 6 (A3) Glu→Gln], a new abnormal hemoglobin discovered in Japanese family. Structure, function and biosynthesis. Hemoglobin 6 : 531-535, 1982
- 3) Saiki, R. K., Scharfs, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230 : 1350-1354, 1985
- 4) Poncz, M., Solowiejczyk, D., Harpel, B., Mory, Y., Schwartz, E. and Surrey, S.: Construction of human gene libraries for small amounts of peripheral blood: Analysis of β -like globin genes. Hemoglobin 6 : 27-36, 1982
- 5) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487-491, 1988
- 6) Dretzen, G., Ballard, M., Sassone-Gross, P. and Chambon, P.: A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem. 112 : 295-298, 1983
- 7) Messing, J.: New M13 vectors for cloning. In Methods in Enzymology, vol. 101, ed. by Wu, R., Grossman, L. and Moldave, K. New York, Academic Press. 1983
- 8) Norrander, J., Kempe, T. and Messing, J.: Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene 26 : 101-106, 1983
- 9) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

- Proc. natl. Acad. Sci. USA 74 : 5463—5467, 1977
- 10) Tabor, S. and Richardson, C. C.: DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. natl. Acad. Sci. USA 84 : 4767—4771, 1987
 - 11) Biggin M. D., Gibson T. J. and Hong, G. F.: Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. Proc. natl. Acad. Sci. USA 80 : 3963—3965, 1983
 - 12) Poncz, M., Schawartz, E., Ballantine, M. and Surrey, S.: Nucleotide sequence analysis of the globin gene region in human. J. biol. Chem. 258 : 11599—11609, 1983
 - 13) Orkin, S. H., Kazazian, H. H., Jr., Antonarakis, S. E., Goff, S. C., Boehm, C. D., Sexton, J. P., Waber, P. G. and Giardina, P. J. V.: Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. Nature 296 : 627—631, 1982
 - 14) Wilson, J. T., Milner, P. F. and Summer, M. E.: Use of restriction endonucleases for mapping the allele for β^s globin. Proc. natl. Acad. Sci. USA 79 : 3628—2631, 1982
 - 15) Huisman, T. H. J. and Jonxiz, J. H. P.: The hemoglobinopathies. Techniques for identification. New York, Marcel Dekker, Inc. 1977
 - 16) Goosens, M., Lee, K. Y., Liebhaber, S. A. and Kan, Y. W.: Globin structural mutant 125Leu Pro is a novel cause of α -thalassemia. Nature 296 : 864—865, 1982
 - 17) Wong, C., Dowling, C. E., Saiki, R. K., Higuchi, R. G., Erlich, H. A. and Kazazian, H. H., Jr.: Characterization of β -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature 330 : 384—386, 1987
 - 18) Saiki, R. K., Chang, C.-A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., Jr. and Erlich, H. A.: Diagnosis of sickle cell anemia and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes. N. Engl. J. Med. 319 : 537—541, 1988