

## ヒト赤血球膜蛋白 Band 4.2 Codon 142 (GCT→ACT : Ala→Thr) 変異の検索

岡本 直人

ヒト赤血球膜蛋白 band 4.2 完全欠損症例の末梢血白血球より調製した DNA から PCR 法 (polymerase chain reaction) を用いて, band 4.2 の exon 3 を増幅し, 2 種の制限酵素 (EcoR I と Pst I) で消化後, M13mp 19 ベクターに組み込み, その塩基配列を決定した. その結果, exon 3 codon 142 における GCT (Ala) → ACT (Thr) の 1 塩基変異を見出した. 本症 5 家系 6 症例と, このうちの同家系内正常人について 2 家系 6 例とさらに健康人対照 50 例の DNA を, 変異部分を含む ASO (allele specific oligonucleotide) プロブを用いた dot blot 法によって検索した. その結果, 本症 6 例全例にこの点変異を認め, ホモ接合体であった. なおこの変異の遺伝形式は常染色体劣性遺伝と考えられた. 健康人 50 例中 1 例にこの点変異が発見されたが, ヘテロ接合体であった. この codon 142 変異は band 4.2 完全欠損症および本症で見られる 74 kDa 蛋白に, 臨床的, 蛋白化学的, 遺伝学的に密接な関係があることを認めた. (平成 5 年 10 月 28 日採用)

### Analysis of Human Erythrocyte Membrane Protein Band 4.2 on a Codon 142 (GCT→ACT : Ala→Thr) Mutation

Naoto Okamoto

DNA prepared from leukocytes was collected from the peripheral blood of the patients with complete deficiency of human erythrocyte membrane band 4.2. The DNA was amplified by the PCR (polymerase chain reaction) method. The amplified DNA, after digestion with two different restriction endonucleases (EcoR I and Pst I), was introduced to vector M13mp 19 and was sequenced. The nucleotide sequences showed a point mutation that changes codon 142 from GCT (Ala) to ACT (Thr). The presence of the mutation was examined by dot blot analysis with ASO (allele specific oligonucleotide) probes containing the mutation in six patients of five independent families, six asymptomatic individuals of two families among the five families, and 50 controls. As a result, all six patients were found to be as homozygotes of this mutation. This mutation appears to be inherited autosomal recessively. Only one of 50 controls was a heterozygote of this mutation. The mutation of codon 142 certainly appeared to be closely related to complete deficiency

of band 4.2 and the presence of the 74 kDa peptide from the standpoints of clinical medicine, protein chemistry and gene analyses. (Accepted on October 28, 1993) *Kawasaki Igakkaishi* 19 (4) : 371-379, 1993

**Key Words** ① Band 4.2 protein ② Codon 142 of band 4.2 gene ③ PCR  
④ DNA sequencing ⑤ Dot blot analysis

## 緒 言

ヒト赤血球膜蛋白 band 4.2 は band 3 の細胞質ドメインに結合し、収縮蛋白網を膜脂質二重層に固定する作用があると考えられている<sup>1)</sup>。ヒト赤血球から膜 ghost を作製し、この膜 ghost 蛋白を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動法 (SDS-PAGE) を行い、coomassie blue (CB) 染色にて分析すると、band 4.2 は分子量約 72 kDa として検出され (Fig. 1)、その蛋白量は全膜 ghost 蛋白量の約 5% に相当し、赤血球当り約 20 万 copy 存在する<sup>1)~3)</sup>。band 4.2 の genomic DNA の長さは約 20 kb で、13 個の exon で構成されている。また band 4.2 は少なくとも 2 種の isoform を有しており、正常成人の大多数では SDS-PAGE 上

72 kDa (P 4.2 S) の 1 種のみであるが、ごく一部の正常成人 (約 3%) に 72 kDa の他に微量の 74 kDa (P 4.2 L) を認める<sup>1), 4)</sup>。Band 4.2 完全欠損症は Hayashi ら<sup>5)</sup> により初めて報告された疾患で、その後の報告も含め、既報告は日本人、又は日系人を主体としている<sup>1), 6)~12)</sup>。膜 ghost 蛋白を抗 band 4.2 抗体で Western blot を行うと健常人では 72 kDa のバンドが得られるが、本疾患の症例では通常の 10 倍量 (50 μg) の膜 ghost 蛋白を用いて行うと、72 kDa と 74 kDa の 2 本のバンドをごく微量ながら検出される<sup>1)</sup>。また本症の両親では、SDS-PAGE 上 band 4.2 含有量は正常であるが、Western blot では正常量の 72 kDa に加えて微量の 74 kDa が存在することが多い。本症の原因として、Bouhassira らは codon 142 の GCT→ACT の 1 塩基変異を報告した<sup>13)</sup>。しかし、この病因的意義についても尚不明な点が多く、今回日本人 band 4.2 完全欠損症例とその家族および健常人について、PCR (polymerase chain reaction) 法を用いた遺伝子解析を行い、codon 142 変異の意義、74 kDa 蛋白との関連について検討した。

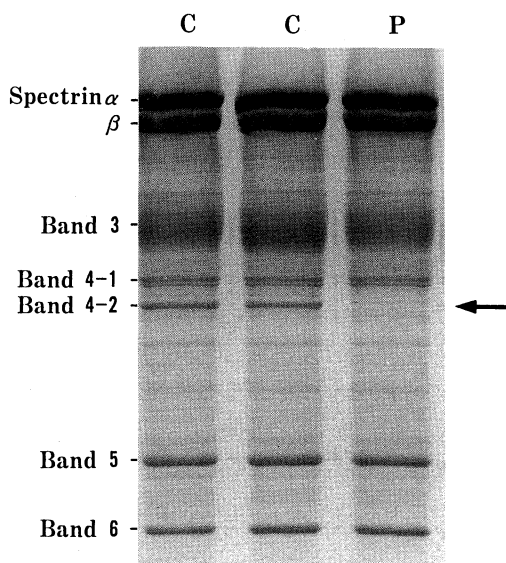


Fig. 1. Red cell membrane protein on SDS-PAGE in the patient with a band 4.2 deficiency. (C: normal P: patient)

## 方 法

**Genomic DNA の抽出法** Poncz らの方法<sup>14)</sup> に順じて次のように行った。SDS-PAGE (CB 染色) で band 4.2 完全欠損を認めた日本人患者 (23 歳、女性) のヘパリン加末梢血 10 ml を生理食塩水 (140 mmol/l NaCl 5 mmol/l KCl 7 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) を加え、遠心 (2500 rpm) し、buffy coat を採取した。20 ml の溶血試薬 (131 mmol/l NH<sub>4</sub>Cl, 0.9 mmol/l (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>, pH 6.5) を加え、10 分間振盪後、遠心し、白血球層を回収し、9.5 ml の STE 溶液 (100 mmol/l

NaCl, 1 mmol/l EDTA, 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4), 0.5 ml の10% SDS 溶液 (ラウリル硫酸ナトリウム), 50 $\mu$ l の10 mg/ml Proteinase K 溶液を加え, 37°C一晩孵置した. それに等量のフェノール (10 mmol/l Tris-Cl pH 8 で飽和) を加え, 振盪・遠心し, フェノールを除去後, 等量のクロロホルム液 (1/25容のイソamilアルコールを含む) を加え, 同様の操作により水層のDNAを回収し, 約50 mlのエタノールを加え, ゆっくりと振盪し, DNAを析出させた. 70%エタノールで洗浄後, 軽く乾燥し, TE 溶液 (10 mmol/l Tris-Cl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.3) 1.0 ml に溶解し, DNA 試料とした.

**PCR 法による exon 3 の増幅** DNA の増幅は, Gene Amp amplification reagent kit (Perkin Elmer Cetus Instruments, USA) を用いて次のように行った. プライマーは Sung ら<sup>3)</sup> の塩基配列を参考に, codon 142 を含む exon 3 の約 240 base を増幅するように調製した. その配列は, 5'側 (J5): TGCGAATTC-TAATCACCGTGTGACTACAG (*EcoR* I site), 3'側 (K3): TTTCTGCAGCAGGTC-CAAACCTTACCTCTA (*Pst* I site) である. 1  $\mu$ l の DNA 溶液 (200 ng), 10 $\mu$ l の反応緩衝液 (10 mmol/l Tris-Cl  $\cdot$  pH 8.3, 50 mmol/l KCl, 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.01% ゼラチン, 3 mmol/l DTT), 16 $\mu$ l の 4 種 dNTP 溶液 (各 200 mmol/l), 2 種の Primer (各 30 pmol), 0.5 $\mu$ l の耐熱性 Taq polymerase (2.5 units), さらに蒸留水を加えて総量 100  $\mu$ l とした. 蒸発防止用のミネラルオイル (light oil, Sigma, Co., USA) 75  $\mu$ l を重層し, PCR 法によって増幅した<sup>5), 6)</sup>. 反応の条件は 94°C  $\cdot$  1 分間, 55°C  $\cdot$  30秒間, 72°C  $\cdot$  1 分間とし, 30 サイクル施行した. 反応終了後, クロロホルムにより, ミネラルオイルを除去し, 50 $\mu$ l の 4 mmol/l 酢酸ナトリウム溶液と 375  $\mu$ l のイソプロピルアルコールを加え -20°C で 20 分間静置後, 遠心 (13000 rpm) して目的の DNA 産物を回収し, 10  $\mu$ l の TE 溶液に溶解し, 2% アガロースゲル電

気泳動により確認した.

**クローニングとシーケンシング** 増幅した DNA 断片を制限酵素 *EcoR* I と *Pst* I で消化し, 2% アガロースゲル電気泳動によって分離し, そのゲルから目的の DNA 断片を Prep-A-Gene DNA Purification Matrix Kit (Bio-Rad, Lab., USA) で回収・精製した. 同一の制限酵素で処理した M13mp 19 ベクター DNA と混合し, T4 DNA ligase (Toyobo, Co., Japan) で ligation 反応を 16°C  $\cdot$  16 時間行い, 組み換え DNA を調製した. *E. coli* パルサー (Bio-Rad, Lab., USA) による Electroporation 法を用いて JM109 competent cell に transfect した. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranose) と IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を含む SOB 寒天プレート (SOB 培地: tryptone 20 g, yeast extract 5 g, NaCl 0.585 g, KCl 0.186 g に寒天 15 g を加え蒸留水で 1 l とした) にまき, 37°C 一晩放置した. プレートより無色のプラークを数個採取し, 各シングルプラークのファージを JM109 とともに, SOB 培地で 37°C  $\cdot$  6~7 時間培養・増幅した. 遠心 (2500 rpm) して上清を集め, 1/4 容の 20% polyethylene glycol-2.5 mol/l NaCl 溶液を加え, 室温 30 分間静置後, 遠心 (9000 rpm) し, ファージを回収し, TE 溶液に懸濁させた. さらにフェノール・クロロホルムで順次処理後, エタノール沈殿を行い, 乾燥後 TE 溶液に溶解させ, 1 本鎖 DNA を調製した<sup>16)</sup>.

DNA sequencing は Sanger らの dideoxy 法<sup>17)</sup> で施行した. 試薬は T7 DNA polymerase による sequencing Kit (Sequenase Version 2.0, US Biochemicals, USA) を使用し<sup>18)</sup>,  $\alpha$ -<sup>35</sup>S dATP (37.5~55 TBq/mmol, NEN Research Products, Inc. USA) を標識試薬に用いて, 指定条件下で反応を行った. シーケンスゲルは Tris $\cdot$ EDTA-borate 緩衝液 (pH 8.3) を用いた 8 mol/l 尿素加 5% アクリルアミドゲルを使用し, 2000V (一定), 3 時間電気泳動を行った. ゲルを 10% 酢酸-10% メタノール溶液で洗浄し, 乾燥後, X線フィルムを用いてオート

ラジオグラフィーを行った<sup>16)</sup>.

**ドットプロットによる解析** Band 4.2 完全欠損症5家系6症例と、うち2家系の臨床的に正常な家族6例および健康人50例を対象として、codon 142を含むASOをプローブとした dot blot analysis を行った。

**ASOのエンドラベリング** codon 142におけるG-Aの1塩基の違いをもつ次の2種のASOプローブを作製した。正常プローブ(N003)の塩基配列は、CCTGCGGACGCTGTCAT-TG、変異プローブ(M003)は、CCTGCGGACACTGTCATTGとした。プローブの標識には、DIG-dUTP(digoxigenin-11-deoxyuridine-triphosphate)と Terminal transferase<sup>19)</sup>を含むDIG-DNA Tailing Kit (Boehringer Mannheim, Co., Germany) を使用し、次のように行った。100 ngのASOプローブ、5  $\mu$ lの反応緩衝液、1  $\mu$ lのDIG-dUTP溶液(1 nmol)、2.5  $\mu$ lの terminal transferase (50 unites) に蒸留水を加えて総量を25  $\mu$ lとし、37°Cで1.5時間加温し標識した。

**ハイブリダイゼーションと免疫学的検出** PCR法で増幅したDNA断片(100 ng)をTE溶液で希釈し10  $\mu$ lとし、0.4 mol/l NaOH-25 mmol/l EDTA溶液90  $\mu$ lを加え(総量100  $\mu$ l)、95°Cで10分間加温後、氷冷し、DNAを変性させた。

2  $\times$  SSPE (20  $\times$  SSPE : 3 mol/l NaCl, 0.2 mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02 mol/l EDTA, pH 7.4) 溶液中に浸しておいたナイロンメンブレン(ゼータプローブGTメンブレン, Bio-Rad, Lab., USA)をドットプロッターにセットし、DNA試料100  $\mu$ lを各well中にのせ、ゆっくりと吸引してメンブレンフィルター上に転写した。100  $\mu$ lの20  $\times$  SSPE溶液で各wellを2回洗浄後メンブレンを取り出し、2  $\times$  SSPE溶液中に10分間浸し、Gene Linker UVチャンバー(Bio-Rad, Lab., USA)で、DNAをメンブレンに固定した。メンブレン100 cm<sup>2</sup>当り20mlの hybridization 溶液〔5  $\times$  SSC (750 mmol/l NaCl, 75 mmol/l sodium citrate), 0.1% SDS, 2% (w/v) dry milk fraction〕中にメンブレンを浸し、59°Cで2時間振盪させ、ブロッキングを行った。標識したASOプローブ2.5  $\mu$ lを含む hybridization 溶液5 ml中にメンブレンを移し、59°Cで一晩 hybridization を行った。メンブレンを50 mlの2  $\times$  SSPE-0.1% SDS溶液で室温10分間洗浄、次いで50 mlの1  $\times$  SSPE-0.1% SDS溶液で正常プローブの場合64°C、変異プローブの場合62°Cの条件で10分間洗浄した<sup>20)</sup>。

免疫学的検出<sup>20)</sup>には、DIG-dUTP detection kitを使用し、次のように行った。メンブレンを100 mlの2% (w/v) dry milk溶液で60分間

Table 1. Genotypic and phenotypic expression in the band 4.2 deficiency studied.

Case No.	Age (y.o.)	Sex	Peripheral blood					Indirect bilirubin (mg/dl)	Band 4.2		Codon 142 mutation	Splenectomy
			RBC ( $\times 10^6/\mu$ l)	Ht (%)	MCHC (%)	Retic. (%)	Morphology		SDS-PAGE	Western blotting		
I-1	37	F	1.80	16.5	33.3	4.4	Ost	1.0	nearly missing	72(T)/74(T)	+/+	-
II-1	36	M	3.89	36.1	34.9	10.4	Ost	2.2	nearly missing	72(T)/74(T)	+/+	-
III-1	64	F	3.09	28.1	34.2	0.8	Ost	0.7	nearly missing	72(T)/74(T)	+/+	-
IV-1	28	F	2.51	24.2	38.8	18.1	Ost	1.2	nearly missing	72(T)/74(T)	+/+	-
IV-2	33	F	3.96	36.8	34.5	2.2	Ost	0.4	nearly missing	72(T)/74(T)	+/+	-
V-1	23	F	4.04	35.4	35.0	1.8	Ost	0.1	nearly missing	72(T)/74(T)	+/+	+
V-2	48	F	4.08	36.0	34.7	1.0	N?	0.1	normal	72/74(T)	+/-	-
V-3	22	F	4.22	36.8	34.8	1.2	N	0.1	normal	72	-/-	-

1) OST : ovalostomatocytosis N : normal

2) T : trace

ブロッキング後, 150 mU/ml のアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と30分間反応を行った。これを100 ml の TBS 緩衝液(100 m mol/l Tris-Cl, 150 mmol/l NaCl, pH 7.5)で15分間・2回洗浄し, NBT(nitro blue tetrazolium)と BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)で発色させた。

結 果

Band 4.2 完全欠損症 5 家系 6 例とそのうち 1 家系 2 家族の検索結果を示す (Table 1)。本症例 (Table 1・V-1) の genomic DNA より PCR 法にて exon 3 を増幅し, アガロースゲル上約 240bp のバンドを認めた (データ示さず)。この DNA を制限酵素で消化後, M13mp 19ベクターに導入した。組み換え体は, 数個~数十個の陽性プラークを得た。陽性プラークより 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。band 4.2 遺伝子の塩基配列は Sung らによる報告<sup>3)</sup>を基にして異常配列を検索した。その結果, exon 3 codon 142 における GCT (Ala)→ACT (Thr) の 1 塩基変異を見出した (Fig. 2)。この変異部位を含む ASO をプローブとして, 本症とその家族および健常人の DNA を dot blot 法で検索した (Fig. 3)。本症 6 例全例が変異プロ

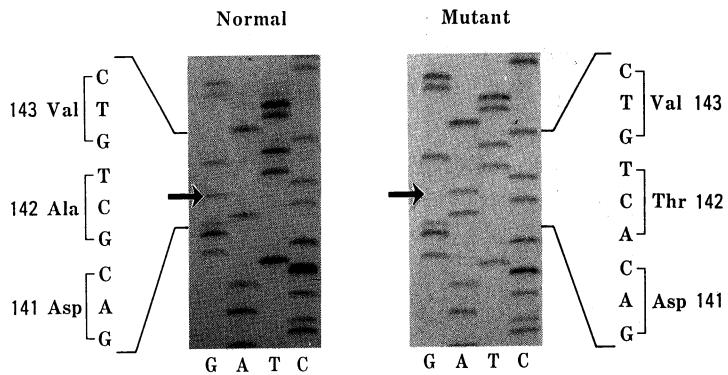


Fig. 2. Sequence analysis of PCR-amplified band 4.2 exon 3 using a primer set of J5 and K3 from the genomic DNA of a normal control (left) and P. 4.2 deficient V1 (right). V1 has a point mutation changing codon 142 from GCT (Ala)→ACT (Thr).

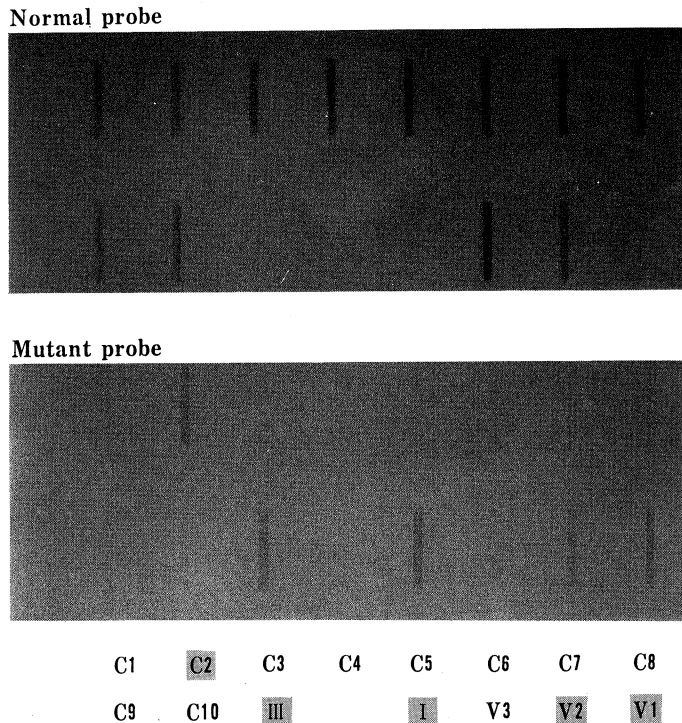


Fig. 3. Dot blot analysis of the codon 142 mutation. PCR-amplified DNA from three P. 4.2-deficiency cases (I, III, VI) hybridized only to the mutant probe, whereas the DNA from 9 of 10 Japanese controls and the sister of V1 (V3) hybridized to normal probe. But DNA from mother of V1 (V2) and only one control (C2) hybridized to both normal and mutant probes. We analysed six P. 4.2-deficiency cases (five races), six familial cases (two races), and 50 Japanese controls in all.

ープとのみ反応し, codon 142 は ACT の homozygote 変異を呈していた. 2家系9例の結果から, この変異は常染色体劣性遺伝が示唆された(Fig. 4). また健常人50例中1例のみが, 正常と異常の両方のプローブと反応し, ヘテロ接合体であった. そのヘテロ接合体を示した健常人の赤血時膜ghost を抗 band 4.2抗体を用いて Western blot を行ったところ, 72 kDa と 74 kDa の2本のバンドをみとめた (Fig. 5). band 4.2 完全欠損症では, codon 142 変異の他に, 日本人で codon 119 (exon 3) TGG (Trp) → TGA (Ter)<sup>11)</sup>, Tunisia 人で codon 310 (exon 7) CGA (Arg) → CAA (Gln)<sup>12)</sup> の遺伝子変異が見つかった. 本症6例に対し, これらの変異についても dot blot 法にて検索を行ったが, 全例ともこれらの変異は認められなかった (データ示さず).

考 察

Band 4.2 完全欠損症の既報告は, Tunisia 人1家系2症例<sup>12)</sup>を除き, 全例日本人または日系人<sup>1), 5) ~ 11)</sup>である. 疾患頻度は正式な study がなされておらず詳細不明であるが, 自験例では, 1974年7月以降に赤血球膜異常症の検索を行った総数約750例中7家系8症例であった. 今回このうち5家系6症例を検索し, 全例

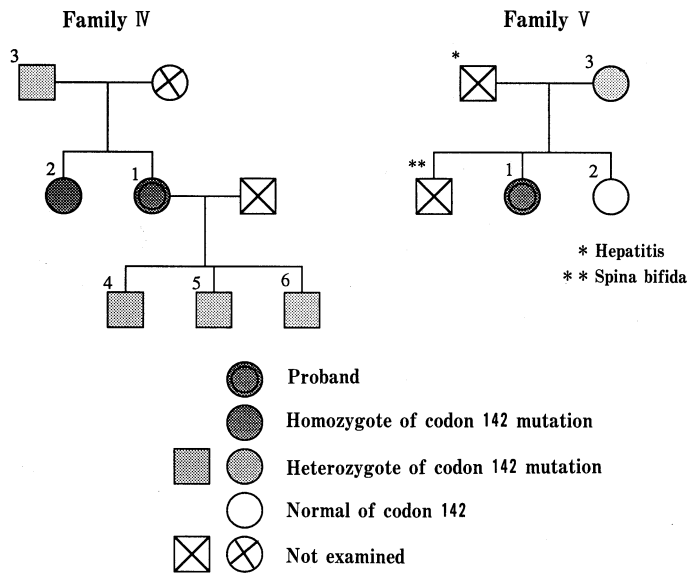


Fig. 4. Pedigree of families IV and V.

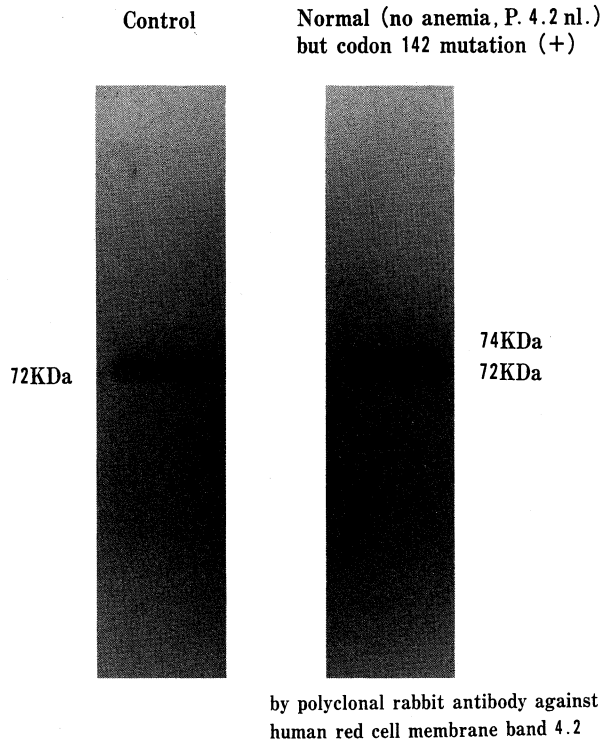


Fig. 5. Western blot analysis of band 4.2. A normal Japanese control (C 2), who has a codon 142 mutation, detects 72 kDa and 74 kDa.

codon 142 の両 allele に 1 塩基変異を認めるホモ接合体であった。この変異は Bouhassira らの報告した変異<sup>13)</sup> と同一であり、本邦でも他施設で確認されていた<sup>10), 11)</sup>。これら 6 例全て Western blot で微量の 72 kDa と 74 kDa の band 4.2 蛋白が検出された。72 kDa 蛋白 (P4.2S) と 74 kDa 蛋白 (P4.2L) の違いは、exon 1 における 90 塩基の splicing の有無によることが確認されている<sup>4)</sup>。この alternative splicing 機構と codon 142 mutation との関係は解明されていない。また今回、健康人 50 例中 1 例に hetero 変異が検出されこの異常 allele の健康人における頻度は約 2～3% と推定された。Western blot 法では正常の 72 kDa に加え微量の 74 kDa の band 4.2 蛋白が認められた。この所見は band 4.2 蛋白欠損症例の家系内正常人の所見と一致する。また服巻らの報告によると、健康人 100 例につき、本症にみられる codon 142 の異常を dot blot 法にて検討したところ 3 例のヘテロ接合体が発見されている<sup>11)</sup>。今回の成績はその頻度に近似していた。これは健康人にみられる 74 kDa の出現頻度とほぼ同率であった。和田ら<sup>9)</sup> は、二相性液体培養法を用いて赤芽時における本蛋白の発現を経時的に Western blot 法で解析した結果、赤芽球の成熟に伴い、第二相 day 5 で 74 kDa のみを、day 7 で 74 kDa と 72 kDa を、day 9 で 72 kDa 蛋白のみを検出したと報告している。この結果より、74 kDa 蛋白は 72 kDa 蛋白の precursor である可能性が高い。溶血性貧血患者では網赤血球増多を伴うことが多く、74 kDa が網赤血球に由来する可能性はあるが、網赤血球増多のない健康人や本症家族例に 74 kDa が存在することは、この仮説では説明できない。

Band 4.2 は赤芽球の細胞質内で生合成され、band 3 の細胞質ドメインを介して、膜脂質二重層へ固定される。したがって、band 4.2 異常の原因としては少なくとも次の 3 つが考えられる。(1) band 4.2 自体の異常、(2) band 4.2 の膜への組み込みに関与する band 3 の異常、(3) その他の異常に伴う band 4.2 異常である。後天的に肝胆道疾患に続発して band 4.2 が減少する症

例が報告されている<sup>21)</sup>。先天性の band 4.2 異常として、完全欠損症の他に部分欠損症がある。この band 4.2 部分欠損症は欧米を中心に報告されており、何らかの band 3 異常を伴っている。実例として、band 4.2 の約 30% 欠損をみる band 3 Tuscaloosa は、band 3 の細胞質ドメインに相当する codon 327 の CCC (Pro)→CGC (Arg) の変異が<sup>22)</sup>、band 4.2 の 88% 欠損と band 6 (G-3-PD) の 30% 欠損をみる band 3 Montefiore は GAG (Glu)→AAG (Lys) の変異が<sup>23)</sup> 存在する。つまり、これらの病態の本質は band 4.2 自体ではなく band 3 異常にあり、その結果として band 4.2 の結合固定障害を生じ、膜 ghost 上 band 4.2 の減量をきたしているものと推定される。これに対し、主に日本人にみられる band 4.2 完全欠損症では、band 3 の構造・機能に異常が発見されていないこと、band 4.2 の遺伝子異常の実例があることより、その病態の本質は band 4.2 自体にあるものと考えられる。

自験例を含めた日本人の band 4.2 完全欠損症 (P. 4.2 Nippon type) にはいくつかの共通点がみられる。それは、1. 臨床的に中等度の非代償性溶血性貧血を示すこと、2. 赤血球形態は ovalostomatocytosis を呈すること、3. SDS-PAGE で band 4.2 は完全欠失していること、4. Western blot では微量の 72 kDa と 74 kDa を認めること、5. 遺伝子解析上 codon 142 の両方の allele に変異があることである。加えて本症は常染色体劣性遺伝形式をとり、ヘテロと考えられる家族は band 4.2 蛋白量は正常だが微量の 74 kDa が存在し、codon 142 の片方の allele に変異が存在する。例外として、前述の日本人 codon 119 変異例は codon 142 の hetero 変異を伴っており<sup>11)</sup>、Tunisia 人の codon 310 変異をもつ完全欠損例では、codon 142 は正常であり、末梢赤血球形態は日本例のそれと異なり discocyte 主体の典型的 micro spherocytosis であった<sup>12)</sup>。現時点で、codon 142 変異が polymorphism である可能性は否定できないが、少なくとも本症で極めて高率に発見されている

ことより、日本人を主体として band 4.2 完全欠損症 (P. 4.2 Nippon) と codon 142 変異と 74 kDa 蛋白の間には何らかの関連があることは確実である。しかし、exon 1 の splicing や codon 142 の異常のみで band 4.2 蛋白の完全欠損を説明するにはやや無理がある。本症例の mRNA で band 4.2 gene が発現しているが蛋白としては存在しない理由を含めて、一つの仮説を立てた。すなわち本症の病因は codon 142 の点変異に加え、何か別の異常(おそらく遺伝子変異)が存在し、それは exon 1 の splicing と codon 142 にも関与するものと推定される。これによって生じた異常蛋白は band 3 と結合できずほとんど消失し、残ったわずかな蛋白が 72 kDa と 74 kDa として Western blot で検出される。ヘテロ例では、この異常蛋白と正常蛋白の両方が生じ、正常蛋白は splicing により 72 kDa となり band 3 と結合する。異常蛋白は消失するが、わずかな残存物が 74 kDa として検出される(異常蛋白の 72 kDa は正常のそれと同じ大きさなので検出不能)。ヘテロ例では正常に比べ 1/2 量の 4.2 蛋白

しか生じないが、band 3 と結合できる蛋白量が正常の本来の生成量よりかなり少ないものであれば矛盾しない。これは仮説でしかなく、その実証のためには症例の集積、intron や promotor を含む band 4.2 全 DNA の解析、splicing 機構と codon 142 の解明が必要である。また発端者に女性が多いこともその原因究明を必要としている。こうした今後の課題について検索を進めたい。

最後に、研究の助言・指導をしていただいた川崎医科大学大学院医科分子生物学講座 細川桂一教授、同血液内科学 八幡義人教授、九州大学遺伝情報実験施設 服巻保幸教授、本学生化学第三講座 原野昭雄助教授、原野恵子博士に深謝致します。

本研究の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費(研究代表者 八幡義人: 2-301, 3-305, 4-301, 5-101)のもとで行われた。

本研究は平成4年度日本私学振興財団私立大学等經常費補助金特別補助(高度化推進特別経費)の援助を受けて行われた。附記して謝意をあらわします。

## 文 献

- 1) 八幡義人, 神崎晁郎, 井上孝文: 赤血球膜タンパク band 4.2 異常症. 「Annual Review 血液1993」(高久史麿, 宮崎澄雄, 斉藤英彦, 溝口秀昭編). 東京, 中外医学社. 1993, pp. 29-48
- 2) Korsgren C, Lawler J, Lambert S, Speicher D, Cohen CM: Complete amino acid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 613-617, 1990
- 3) Sung LA, Chien S, Chang LS, Lambert K, Bliss SA, Bouhassira EE, Nagel RL, Schwartz RS, Rybicki AC: Molecular cloning of human protein 4.2: A major component of the erythrocyte membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 955-959, 1990
- 4) Sung LA, Chien S, Fan YS, Lin CC, Lambert K, Zhu L, Lam JS, Chang LS: Human erythrocyte protein 4.2: Isoform, expression, differential splicing, and chromosomal assignment. Blood 79: 2763-2770, 1992
- 5) Hayashi S, Koomoto R, Yano A, Ishigami S, Tsujino G, Saeki S, Tanaka K: Abnormality in a specific protein of the erythrocyte membrane in hereditary spherocytosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57: 1038-1044, 1974
- 6) 福田光之, 小松正歳, 稲葉龍太郎, 神崎晁郎, 橋本正志, 池田明代, 高原真弓, 八幡義人: 感冒薬投与後に著しい溶血発作で発症した膜蛋白分画 4.2 欠損を伴う溶血性遺伝性精円赤血球症の一例. 臨床血液 29: 559-564, 1988
- 7) Rybicki AC, Heath R, Eolf JL, Lubin B, Schwartz RS: Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in



- stabilizing ankyrin on the membrane. *J. Clin. Invest.* 81: 893—901, 1988
- 8) Ideguchi H, Nishimura J, Nawata H, Hamasaki N: A genetic defect of erythrocyte band 4.2 protein associated with hereditary spherocytosis. *Brit. J. Haematol.* 74: 347—353, 1990
  - 9) Yawata Y, Wada H, Kanzaki A: Expression of membrane cytoskeletal and integral proteins of human erythroid cells studied by a two phase liquid culture system. *Blood* 76: 20a-NO, 71, 1990 Abstract.
  - 10) Iwamoto S, Kajii E, Kamesaki T, Akifuji Y, Ikemoto S: Point mutation in the band 4.2 gene associated with autosomal recessively inherited erythrocyte band 4.2 deficiency. *Eur. J. Haematol.* 50: 286—291, 1993
  - 11) 服巻保幸, 井手口 裕: 赤血球膜蛋白質 Band 4.2 欠損症の分子遺伝学的解析. *Int. J. Hematol.* 57: 243-NO, 573, 1993 Abstract.
  - 12) Delaunay J, Hayette S, Cohen C, Korsgren C, Ghanem A, Fattoum S, Santos MED, Dhermy D, Morle L: Hereditary hemolytic anemia associated with the absence of protein 4.2. *Proceeding of 8th Symposium Molecular Biology of Hematopoiesis* Basel, Switzerland, July 9—13, 1993 Abstract.
  - 13) Bouhassira EE, Schwartz RS, Yawata Y, Ata K, Kanzaki A, Qiu J. JH, Nagel RL, Rybicki AC: An alanine-to-threonine substitution in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (Protein 4.2<sup>NIPPON</sup>) *Blood* 79: 1846—1854, 1992
  - 14) Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S: Construction of human gene libraries for small amounts of peripheral blood: Analysis of  $\beta$ -like globin genes. *Hemoglobin* 6: 27—36, 1982
  - 15) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487—491, 1988
  - 16) 原野昭雄, 原野恵子, 櫛田由美, 上田 智:  $\beta$  6 位にアミノ酸置換をもった異常色素 (Hb S, Hb C, Hb Machida) の PCR 法による遺伝子解析. *川崎医学会誌* 16: 101—106, 1990
  - 17) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4761—4771, 1987
  - 18) Tabor S, Richardson CC: DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4761—4771, 1987
  - 19) 満田年宏, 横田俊平: 非放射性 DNA 標識法を用いた高感度 DNA 検出システム(1)—Dig-ELISA 法—. *細胞* 21: 233—235, 1989
  - 20) 満田年宏, 横田俊平: 非放射性 DNA 標識法を用いた高感度 DNA 検出システム(2)—Dig-ELISA 法—. *細胞* 21: 281—283, 1989
  - 21) Iida H, Hasegawa I, Nozawa Y: Biochemical studies on abnormal erythrocyte membranes protein abnormality of erythrocyte membrane in biliary obstruction. *Biochim. Biophys. Acta* 443: 394—401, 1976
  - 22) Jarolim P, Palek J, Rubin HL, Prchal JT, Korsgren C, Cohen CM: Band 3 Tuscaloosa: Pro<sup>327</sup> → Arg<sup>327</sup> substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein 4.2. *Blood* 80: 523—529, 1992
  - 23) Rybicki AC, Qiu J. JH, Musto S, Rosen NL, Nagel RL, Schwartz RS: Human erythrocyte protein 4.2 deficiency associated with hemolytic anemia and a homozygous<sup>40</sup> glutamic acid → lysine substitution in the cytoplasmic domain of band 3 (Band 3<sup>Montefiore</sup>). *Blood* 81: 2155—2165, 1993