

## 日本人の遺伝性球状赤血球症における ankyrin 遺伝子変異の解析

中西 秀和

日本人における遺伝性球状赤血球症 (HS) の病因解析のため, genomic DNA を用いた ankyrin-1 (ANK-1) の遺伝子解析をおこなった. 本研究では, HS 63家系, 67例を対象とした. このうち20家系20例において, HS の病因と推定される19種の ANK-1 遺伝子異常 (frameshift mutation 9種, nonsense mutation 4種, splicing 異常 6種) が検出された. これらの遺伝子変異はいずれも, 欧米諸国では既報がなく, わが国固有のものと考えられた. 日本人の HS における ANK-1 遺伝子異常は全体の30-50%を占めていると推察された. これら ANK-1 遺伝子異常を有する症例における赤血球膜蛋白分析の成績では, ankyrin 蛋白欠損型を呈した症例はなく, 一方で protein 4.2 (P 4.2) 単独部分欠損を呈した症例が17例 (85%) 認められた. よって, 日本人に特徴的とされる P 4.2 単独部分欠損を伴う HS では, その多くが ankyrin 遺伝子異常を有しており, ankyrin が P 4.2 の安定性に関与している可能性が示唆された. (平成14年2月26日受理)

### Ankyrin Gene Mutations in Japanese Patients with Hereditary Spherocytosis

Hidekazu NAKANISHI

To elucidate the pathogenesis of hereditary spherocytosis (HS) in the Japanese population, we studied the ankyrin-1 (ANK-1) gene of genomic DNA from Japanese patients with HS. Sixty-seven patients from 63 unrelated families were included in this study. Nineteen mutations of the ANK-1 gene pathognomonic for HS from 20 families were identified: nine frameshift mutations, four nonsense mutations, and six abnormal splicing mutations. These mutations have not been previously reported, and are thought to be specific to the Japanese population. The incidence of ANK-1 gene mutations in Japanese HS patients ranges from at the least 30% to 50% of the total HS kindred. At the protein level, ankyrin deficiency was not observed in these 20 patients with ankyrin mutations. In contrast, mild deficiency of protein 4.2 (P 4.2) was observed in 17 patients (85%) with ankyrin mutations. Therefore, it is feasible that most cases of HS with a mild deficiency of P 4.2 at the protein level, most common in Japanese HS kindred, are caused by ankyrin mutations. (Accepted on February 26, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28(2): 73-82, 2002

**Key Words** ① Ankyrin ② Hereditary spherocytosis  
③ Red blood cell membrane ④ Gene analysis ⑤ Protein 4.2

## はじめに

成熟赤血球膜に発現している赤血球型の ankyrin (ANK-1) は、電気泳動上 210 kDa の分子量を持つ巨大な蛋白であり、構造蛋白の band 3 と骨格蛋白である spectrin との間に介在し、両者を密接に結びつけるアンカーとしての役割を有している<sup>1)~3)</sup>。

ANK-1 遺伝子は遺伝子座を 8p11.2 に置き、42 の exon から成る。成熟赤血球膜には 210 kDa を示す主要な ankyrin 2.1 に加え、2.2, 2.3, 2.4, 2.6, 2.9 の少なくとも 6 種の isoform が検出され、これらの isoform は 3' 側の alternative splicing によって生成される<sup>2), 4)~7)</sup>。

赤血球膜蛋白生化学分析により、遺伝性球状赤血球症 (hereditary spherocytosis: HS) でみられる膜異常は、(1) spectrin 単独欠損型、(2) ankyrin + spectrin 複合欠損型、(3) band 3 欠損型、(4) protein 4.2 欠損型の 4 種に分類される。さらに近年、HS 患者におけるこれらの膜蛋白の当該遺伝子の解析によって ankyrin, band 3, protein 4.2,  $\beta$ -spectrin および  $\alpha$ -spectrin 遺伝子変異が同定されている<sup>3)~5)</sup>。

欧米諸国における HS 患者の赤血球膜蛋白分析の成績では、ankyrin + spectrin 複合蛋白欠損型が 60~80%、band 3 欠損型が 10~20%、明らかな欠損を認めないものが 10~20% と報告されている<sup>8), 9)</sup>。以上の結果から ankyrin が主病因と推定され、その遺伝子解析が行われた結果、多くの ankyrin + spectrin 複合欠損型に ankyrin 遺伝子異常が検出された<sup>10)~12)</sup>。

そこで当教室において日本人の HS 60 症例に関して赤血球膜蛋白分析を行ったところ、ankyrin + spectrin 複合蛋白欠損型は 10% 未満と非常に少なく、band 3 欠損型と protein 4.2 欠損型が主体で、人種差による病因の違いが示唆された<sup>13), 14)</sup>。さらに、日本人 HS 37 家系に対して band 3 遺伝子解析を行い、band 3 欠損型の病因遺伝子は band 3 遺伝子自体であることが判明した<sup>15)</sup>。また protein 4.2 欠損型において

protein 4.2, band 3 遺伝子の解析を行ったところ、protein 4.2 欠損型の大半を占める軽度欠損型に関しては protein 4.2, band 3 いずれの遺伝子にも変異が存在しないことが判明した<sup>16)</sup>。

そこで本研究は、日本人の HS における ankyrin 異常症の実態を解明するため、ankyrin 遺伝子解析をおこない、さらに ankyrin 遺伝子変異を有する症例を対象として phenotype の検討を行うこととした。

## 対 象

当教室で経験した日本人の HS 63 家系 67 症例および対照健常人 46 人を本研究の対象とした。HS 対象者の遺伝形式の内訳は autosomal dominant type (AD type) 23 家系 26 例、non-dominant type 40 家系 41 例であった。

また、対象とした症例は、臨床血液学的所見、赤血球膜蛋白電気泳動、走査電顕による赤血球形態などによって、HS と診断した。HS の重症度の判定は Lux ら<sup>17)</sup>の指標を用いた。

なお、溶血性貧血の遺伝歴が、臨床血液学的もしくは遺伝学的見地からの問診上明らかでない場合を non-dominant type とした。

## 方 法

### 1. 赤血球膜蛋白分析

Dodge らの方法<sup>18)</sup>を一部改変<sup>16)</sup>して調整した赤血球膜蛋白を Fairbanks ら<sup>19)</sup>による 3.5~17% exponential gradient gel (アクリルアミド容積比 3.5%:17%=35:8)を用いた SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 法によって、分離した。各膜蛋白分画の同定は、SDS-PAGE 泳動後、ゲルを coomassie brilliant blue R-250 で染色し、乾燥後、Protein + DNA Image Ware Systems (PDI-Toyobo Co., Tokyo, Japan) にて行った。各膜蛋白分画の定量法は、対象者および健常コントロールについてそれぞれ全膜蛋白分画 (band 1~7 分画の総和) に対する各膜蛋白の相対比を算出した後、それぞれ

算出された値について、健常コントロールの平均値に対する対象者の健常コントロールの平均値からの増減量を百分率として表した。

## 2. Ankyrin-1 遺伝子解析

末梢血単核細胞から抽出した genomic DNA を用いて、ankyrin-1 遺伝子の42個の各 exon と

5'側非翻訳領域の promoter 領域について、polymerase chain reaction (PCR)/single-strand conformation polymorphism (SSCP) 解析を行った (Table 1)。

遺伝子の増幅は GeneAmp PCR™system (model 2400, Perkin-Elmer Co., USA) を使用し、denaturation 95°C, 30 sec., annealing 59°C, 20 sec.,

**Table 1.** Design of primers for the ankyrin-1 (ANK-1) gene\*

Exon	5' -Primer	Product length (bp)	3' -Primer
Promoter A	5'-CAGGGCCGAAGCTTCTCTAC-3'	260	5'-CGGGGAGAGCTGAGTTCAGAG-3'
Promoter B	5'-GCAGAAGAGGAGATGCCCTG-3'	412	5'-CATGCCGGTCTTTTCAGCAGG-3'
1	5'-CCCGGCCGACAGCAAGCGCCTCTG-3'	236	5'-GTGGCCCCCTCTGACATCTCCCG-3'
2	5'-AGTCGAACTCGCTTGTGCCAC-3'	390	5'-TTCAGAGACAACAGGCCTGCC-3'
3	5'-TTTGACTAACCATGCCCTTCC-3'	188	5'-AAACTTGAATTTTCAATGCAAAGC-3'
4	5'-GTAGCAGGCCAGTGGGAAAC-3'	179	5'-CCTCTAGTCCAGACCAGAGAGCCA-3'
5	5'-TGCGGGTGGATGCTAATGATG-3'	186	5'-ACACCTGGGAGACTTCTGGT-3'
6	5'-GCTGGCGTCAGACGAGTCAGA-3'	259	5'-AGCTCCTCCTCCTCCTCGC-3'
7	5'-CATCCCAGGGCTGATTCTGAG-3'	227	5'-GAGCAACTGCCAGCCCCAAG-3'
8	5'-AGCAGCTGCATTCCAGGAAGG-3'	227	5'-CTGCTCTGGGTGAGGCTTGTG-3'
9	5'-AGGCAGTCTTCTCTCCAAATGGC-3'	200	5'-ATGCGCCTGACAGGAAGGAAG-3'
10	5'-CATGCTCGGTCCCCAGAAGAC-3'	283	5'-CTGCACCTTCTCCAGCAGCAC-3'
11	5'-TGCTTCCCTTTGTGTGGGCTG-3'	150	5'-CCCAGGCTCCTCTGCAGTCTC-3'
12	5'-AGCGAAAGACTGCCACTTATCG-3'	209	5'-GGTGAAAGTGCCTCTGAGC-3'
13	5'-GTGTGTGCCGTTTGGACAGC-3'	188	5'-CCCTTCCCTTCTGCTTTCAC-3'
14	5'-AAAGTTGGATTTGGTAACATTCGCG-3'	308	5'-TGGCTGAGTGAGCCTGTTGCTTCT-3'
15	5'-CCCAAGTCTGACAGCCTGT-3'	169	5'-AACCTGAGAGCTGCAGGGGAG-3'
16	5'-GGAGTGACAGCCGGCTCTTTTGTG-3'	194	5'-ACTGAAGTAGCAGTACTGCTTCC-3'
17	5'-GTCAGCTCAGCATTCCTGTAACCAG-3'	300	5'-CACACGTTGTTATCCAGCACACCAG-3'
18	5'-TTTACTTGATAGAAGGTGATGAACG-3'	189	5'-AAGTGTGAGCAAGGAGTCCACACAG-3'
19	5'-TCAGACAGCTCCGGTCACTCC-3'	193	5'-CTGATGTGGCATGGAGAAGGG-3'
20	5'-GTCTAGTGGCTGGCTAACCTG-3'	175	5'-TTCTAAACTCAGGAGAGAGAGTGTACTCAC-3'
21	5'-CACCCGGGTGCTCTTTC-3'	155	5'-AGTGTGTCTGGGGTGGGTGC-3'
22	5'-TGTGTGCGGCTCTAGTTTGGG-3'	162	5'-CTCTGTCCCCACCAGCCTGAG-3'
23	5'-CCTTACCCCGTCCGCTCACTTG-3'	160	5'-GGACCTCCCGGGAGCACTG-3'
24	5'-GTGTGCACATGTGGATCAGCC-3'	165	5'-CCATGTGGGGAAACCACAGAG-3'
25	5'-CCTCCACGCCCTGGCAC-3'	204	5'-CTGGAGACAGGAGTCCCCGAG-3'
26	5'-GGGGACTCCTGTCTCCAGCTC-3'	373	5'-TCCCCATCAGGACAGATGGAA-3'
27	5'-GCCTTGTATGAGCACTCCCC-3'	236	5'-AACGCGTTGGGAGCTTCC-3'
28	5'-TGGTGGCCTGTGTGTGATT-3'	289	5'-AGGCCTGGAGTTCAGTCCACC-3'
29	5'-GGCCTGAGTGTCTGCCTCTG-3'	274	5'-CAGCCGAGAACAAGAAGCGAGG-3'
30	5'-CCCCAGCCCCATTTCTGC-3'	171	5'-TGAGGACGGCCACACAATAC-3'
31	5'-CTGTTGGGCACTTGGGAACAC-3'	303	5'-TGTCAGAGGCGGTGCAG-3'
32	5'-GCTGTATCTGCTTTTCTCTCTGC-3'	179	5'-AGAACTCAGCCAGAGGGTGC-3'
33	5'-CTCGAGGAATTCCTTTGTGTGATTG-3'	186	5'-CGGGCAAGGCTCCTCGG-3'
34	5'-TCTCTGGGAAGGTGGGAGAGTCCA-3'	189	5'-ACGCCACCCTTCTTGGGAAGGGAG-3'
35	5'-CCTGTCAACTGTGTCTGCC-3'	152	5'-CTGCCCAATTCCCCAC-3'
36	5'-TCCCAGTGCCACCCAGCCTGTGT-3'	263	5'-AGGAGTCTAGGACAGGCTTCTC-3'
37	5'-ACCGCCTGGAGTAACGTGCATCTC-3'	238	5'-TGTAGGGCAGGGCTCCGGCTCAGTC-3'
38A	5'-CCTGTCTGTGCCATCCAG-3'	339	5'-TTCCAGAGAGCCCCAATCCG-3'
38B	5'-TCTGATGCCACAGGTCACGAG-3'	357	5'-ACAAAAAGGGACCCTCGTCCC-3'
39	5'-AATGAGACTGATGGGTGACCAGGTG-3'	420	5'-CGATGCTGGGAAGGAACAGCAGCAC-3'
40	5'-CCAGACTCCCACCTCACCAATCTGC-3'	190	5'-TTAGCTTCTAGCCCACTGCTCTC-3'
41A	5'-TGACCAGCCCTTCTCTCTC-3'	187	5'-CGCCTCAGTACCTTGGAGTGT-3'
41B	5'-AGCACGAGGAGGTGACTGTAG-3'	241	5'-CACGGAGGTGCAGACACTG-3'
41C	5'-CACCTCCTCCACTCACCTC-3'	311	5'-AGAAGGGCAGCGTTACCTCC-3'
42	5'-GGTTTTGTCTGGACGTTGCAC-3'	137	5'-CCTCAGGTCAGCTCTCTCC-3'

\*All primers are designed for the promoter region and each exon of the ANK-1 gene, although 2 (for the promoter region : A and B), 2 (38A and 38B), or 3 (41A, 41B, and 41C) overlapping sets of primers are required because of their large sizes. The nucleotide sequence for each primer is given from the 5' to 3' end.

extension 72°C, 30 sec., 33 cycle の条件で行った。また、PCR 反応系の全容量は 50  $\mu$ l とし、genomic DNA を 150 ng, primer を 0.2 pmol/ $\mu$ l, AmpliTaq Gold™ (Roche Molecular Inc., USA) を 0.03 U/ $\mu$ l 用いた。

SSCP は Orita らの方法<sup>20)</sup>を一部改変<sup>16)</sup>して行った。変性試薬 [47.5% formamide, 15 mmol/l EDTA, 20 mmol/l Tris (pH 8.0), 0.025% bromophenol blue, 0.01% xylene cyanole FF] 20  $\mu$ l に対し PCR 産物を 3  $\mu$ l 加え、100°C, 10 分間熱処理後、急冷した。泳動試料は 3  $\mu$ l を用いた。遺伝子の検出には、Bassam らの銀染色法<sup>21)</sup>を用いた。

PCR/SSCP 解析にて異常バンドが認められた症例について、同じ primer を用いた PCR 産物のシーケンシングをおこなった。即ち、TA Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA) を用いてクローニングを行った後、BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) にて解析を行った。

病因遺伝子変異と polymorphism との鑑別に関しては、1) 健常者に認められない変異、2) nonsense 変異や frameshift 変異、または splice site 近傍に存在して splicing 異常をきたすことが推察される変異、の 2 点の条件を満たす変異を病因遺伝子変異と判定した。また、健常者より allele frequency が著しく高く、かつ本症患者において当該変異がホモ接合体あるいはヘテロ二重接合体として存在する変異は、autosomal recessive type の HS の病因となりうる変異と考えた。なお、本研究において ankyrin gene mutation に関しては、そのホモ接合体あるいはヘテロ二重接合体の症例は存在しなかった。

## 結 果

### 1. Ankyrin-1 遺伝子解析結果

#### 1-1. 病因遺伝子異常

以下の 4 群の日本人 HS 症例について、genomic DNA を用いた PCR/SSCP スクリーニングによって、ankyrin-1 遺伝子異常の有無を検討した。

(a) Band 3 遺伝子解析にて band 3 遺伝子異常を認めなかった症例

Band 3 遺伝子解析が施行された日本人 HS 37 家系のうち、band 3 遺伝子異常が認められなかった 29 家系 32 症例に対して ankyrin 遺伝子解析を施行した。遺伝形式の内訳は AD 型 8 家系 11 症例、non-dominant 型 21 家系 21 症例であった。また、この 29 家系中には band 3 蛋白部分欠損を有する症例が 2 家系含まれている。今回の ankyrin 遺伝子解析によって、AD 型 2 家系、non-dominant 型 6 家系にて、以下の 8 種の病因遺伝子異常と推定される遺伝子変異が同定された。Frameshift mutation 3 種：(1) Ankyrin Osaka I, exon 17, codon 637, 1nt. ins. "C"; (2) Ankyrin Mie, exon 26, codon 951-953, 7nts. del. "GCCGCCT" & 4nts. ins. "TCTG"; (3) Ankyrin Chiba IV, exon 36, codon 1437, 1nt. del. "G". Nonsense mutation 1 種：Ankyrin Tokyo I, exon 31, codon 1252, CGA→TGA. Abnormal splicing 4 種：(1) Ankyrin Shiga, intron 5, 1nt. ins. "a", 3-4 nts after end of exon 5; (2) Ankyrin Kyoto, intron 8, g→c, 5 nts. after end of exon 8; (3) Ankyrin Yamagata, intron 22, gt→ct, 1 nt. after end of exon 22; (4) Ankyrin Chiba I, intron 28, gt→ct, 1nt. after end of exon 28.

(b) 赤血球膜蛋白分析にて、band 3 欠損が認められなかった症例

Band 3 遺伝子解析は施行されていないが、赤血球膜蛋白分析にて band 3 欠損が認められず、band 3 遺伝子異常を有しないと推定される日本人 HS 25 家系 25 症例に対して ankyrin 遺伝子解析を施行した。遺伝形式の内訳は AD 型 10 家系 10 症例、non-dominant 型 15 家系 16 症例であった。その結果、AD 型 4 家系、non-dominant 型 8 家系にて、以下の 11 種の病因遺伝子異常と推定される遺伝子変異が同定された。Frameshift mutation 6 種：(1) Ankyrin Chiba II, exon 1, codon

**Table 2.** Clinical, biochemical, and genetic characteristics in Japanese HS probands with ankyrin mutations

Name of mutation	Location	Mutation	Type of mutation	Inheritance	Hb (g/dl)	Retic (%)	Spectrum	Ankyrin (% of normal)	P4 2	Band 2 2	Splenectomized
Ankyrin Chiba II	Exon 1, codon 2-5	<b>CCCTATCTCTG→TG</b>	Frameshift (PCT)	AD (heterozygous)	5.4	7.3	101	92	72	70	-
Ankyrin Nara	Intron 1, 5nt after end of exon 1	<b>AAGtgg→AAAgga</b>	Abnormal splicing?	AD (heterozygous)	10.9	19.8	91	105	97	90	-
Ankyrin Sartama	Exon 5, codon 111 or 112	<b>GGTTTT→GGTTT</b>	Frameshift (PCT)	non-AD (heterozygous)	15.1	1.8	91	102	98	96	+
Ankyrin Shiga	Intron 5, 3-4nt after end of exon 5	<b>AAGtaag→AAGgaaag</b>	Abnormal splicing?	non-AD (heterozygous)	10.0	21.4	91	107	88	76	-
Ankyrin Tokyo II	Exon 6, codon 187-190	<b>CGCACGGCTGCG→CG</b>	Frameshift (PCT)	de novo (heterozygous)	11.6	5.6	101	93	76	79	-
Ankyrin Kyoto*	Intron 8, 5nt after end of exon 8	<b>AGtggg→AGtggg</b>	Abnormal splicing?	AD (heterozygous)	9.3	14.4	93	113	86	103	-
Ankyrin Tokyo III	Exon 16, codon 571, 572 or 573	<b>ACCCCTCTG→ACCCCTG</b>	Frameshift (PCT)	de novo (heterozygous)	7.3	16.8	93	112	87	96	-
Ankyrin Aichi*	Exon 16, codon 592-593	<b>GGGGGC→GGGGGGGGGG</b>	Frameshift (PCT)	de novo (heterozygous)	9.7	6.0	101	91	82	86	-
Ankyrin Osaka II	Exon 17, codon 612	<b>CAAG→TAG</b>	Nonsense	de novo (heterozygous)	9.2	8.4	100	100	89	86	-
Ankyrin Osaka I	Exon 17, codon 637	<b>ACG→ACCG</b>	Frameshift (PCT)	non-AD (heterozygous)	9.2	23.8	106	92	78	64	-
Ankyrin Kagoshima	Exon 22, codon 798-799	<b>GTCAGT→GT</b>	Frameshift (PCT)	non-AD (heterozygous)	9.7	20.6	96	96	90	83	-
Ankyrin Yamanaishi	Exon 22, codon 798-799	<b>GTCAGT→GT</b>	Frameshift (PCT)	de novo (heterozygous)	8.1	21.8	101	116	78	85	-
Ankyrin Yamagata	Intron 22, 1nt after end of exon 22	<b>AGt→AGt</b>	Abnormal splicing?	non-AD (heterozygous)	6.6	9.2	103	107	96	107	-
Ankyrin Mie	Exon 26, codon 951-953	<b>TGCGGCTG→TTCGCG</b>	Frameshift	de novo (heterozygous)	10.6	11.4	100	107	83	110	-
Ankyrin Chiba I	Intron 28, 1nt after end of exon 28	<b>AGt→AGt</b>	Abnormal splicing?	non-AD (heterozygous)	6.9	21.5	97	122	77	69	-
Ankyrin Chiba III	Exon 31, codon 1230	<b>TAC→TAG</b>	Nonsense	non-AD (heterozygous)	9.2	22.4	96	109	84	56	-
Ankyrin Tokyo I	Exon 31, codon 1252	<b>CGA→TGA</b>	Nonsense	AD (heterozygous)	7.9	24.8	100	115	89	84	-
Ankyrin Chiba IV*	Exon 36, codon 1437	<b>GTTG→TG</b>	Frameshift (PCT)	non-AD (heterozygous)	10	11	109	108	79	84	-
Ankyrin Okayama*	Intron 36, 1nt before start of exon 37	<b>agTG→agtG</b>	Abnormal splicing?	AD (heterozygous)	13.4	7.7	104	92	83	78	-
Ankyrin Toyama	Exon 38, codon 1640	<b>CAAG→TAG</b>	Nonsense	AD (heterozygous)	11	12.8	98	99	88	154	-

nt indicates nucleotide ; PCT, premature chain termination ; AD, autosomal dominant.

\* These mutations have recently been identified as new mutations.

2-5, 10nts. del. "CCCTATTCTG"; (2) Ankyrin Saitama, exon 5, codon 111 or 112, 1nt. del. "T"; (3) Ankyrin Tokyo II, exon 6, codon 187-190, 10nts. del. "CACGGCTGCG"; (4) Ankyrin Tokyo III, exon 16, codon 571, 572 or 573 1 nt. del. "C"; (5) Ankyrin Aichi, exon 16, codon 592-593, 5nts. ins. "GGGGC"; (6) Ankyrin Kagoshima (Ankyrin Yamanashi), exon 22, codon 798-799, 4nts. del. "CAGT". Nonsense mutation 3種: (1) Ankyrin Osaka II, exon 17, codon 612, CAG→TAG; (2) Ankyrin Chiba III, exon 31, codon 1230: TAC→TAG; (3) Ankyrin Toyama, exon 38: codon 1640, CAG→TAG. Abnormal splicing 2種: (1) Ankyrin Nara, intron 1, g→c: 5nts. after end of exon 1; (2) Ankyrin Okayama, intron 36, ag→aa, 1nt. before start of exon 37.

#### (c) Band 3 異常症 8 家系

Band 3 遺伝子異常が同定されている 5 家系 (B3 Okinawa, B3 Kagoshima, B3 Kumamoto, B3 Philadelphia, B3 Yamagata), および Band 3 遺伝子解析は施行されていないが, 赤血球膜蛋

白分析にて band 3 欠損が認められている 3 家系に対して, ankyrin 遺伝子解析を行った. その結果, これらの症例からは, 病因遺伝子異常と推定される遺伝子変異は同定されなかった.

#### (d) P 4.2 完全欠損症例

P 4.2 完全欠損症例(Nippon type, homozygote) 1 家系 1 症例に対して, ankyrin 遺伝子解析を行った結果, 病因遺伝子異常と推定される遺伝子変異は同定されなかった.

今回 ankyrin 遺伝子解析を行った日本人 HS 63家系67症例のうち, 20家系から同定された, 19種の病因遺伝子異常と推定される遺伝子変異の一覧を **Table 2** に示した. これらの遺伝子変異はいずれも欧米での既報がなく, 日本人に特徴的と推定された. また, non-dominant type の ankyrin 遺伝子異常症のうち 5 家系について, 両親を含めた linkage study を行った結果, いずれの家系においてもこれらの遺伝子異常は de novo mutation であると考えられた.

**Table 3** Polymorphism and allele frequency of the ankyrin-1 gene in healthy control subjects and HS probands

Location	Polymorphism	Name of variant	allele frequency	
			HS (n=62)	Control (n=46)
Intron 1	C→T, 84nts before start of exon 2	122(-84C→T)	0.00	0.01
Exon 2	codon 11: G <del>A</del> T→G <del>C</del> T (Asp→Ala)	D11A	0.01	0.01
Exon 4	codon 105: AAC <del>C</del> →AA <del>T</del> (silent)	399C→T	0.12	0.15
Exon 6	codon 199: CC <del>G</del> →CC <del>A</del> (silent)	681G→A	0.18	0.16
Intron 7	C→T, 32nts before start of exon 8	796(-32C→T)	0.01	0.02
Exon 17	codon 619: C <del>G</del> T→C <del>A</del> T (Arg→His)	R619H	0.05	0.02
Exon 18	codon 691: GG <del>C</del> →GG <del>T</del> (silent)	2157C→T	0.12	0.10
Exon 20	codon 737: CCC <del>C</del> →CC <del>G</del> (silent)	2295C→G	0.01	0.01
Exon 21	codon 783: ACC <del>C</del> →AC <del>T</del> (silent)	2433C→T	0.12	0.10
Intron 22	T→C, 13nts after end of exon 22	2545(+13T→C)	0.01	0.00
Exon 26	codon 971: CTC <del>C</del> →CT <del>G</del> (silent)	2997C→G	0.45	0.52
Intron 26	C→T, 46nts after end of exon 26	3044(+46C→T)	0.23	0.30
Intron 28	C→G, 21nts after end of exon 28	3411(+21C→G)	0.06	0.04
Exon 33	codon1367: GCC <del>C</del> →GC <del>T</del> (silent)	4185C→T	0.05	0.05
Exon 39	codon 1755: GT <del>G</del> →GT <del>A</del> (silent)	5439G→A	0.15	0.21
Intron 40*	C→T, 3nts before start of exon 41	5563(-3C→T)	0.81	0.77
Intron 41	G→A, 71nts after end of exon 41	5703(+71G→A)	0.15	0.17
Intron 41	C→T, 364nts after end of exon 41	5703(+364C→T)	0.01	0.00

nt indicates nucleotide.

\*This polymorphism has recently been detected as a new one

### 1-2. Polymorphism

Ankyrin-1 遺伝子の Polymorphism として、missense mutation 2 種、silent mutation 16種が検出された (Table 3)。これらの polymorphism の allele frequency はいずれも、HS 症例と健常者との間で明らかな差異は認められなかった。そのうち D11A, 122 (-84C→T), 796 (-32C→T), 2295C→G, 2545 (+13T→C), 3411 (+21C→G), 5563 (-3C→T), 5703 (+364C→T) は欧米では既報がなく、日本人固有のものと考えられた。

### 2. Ankyrin 遺伝子異常症の臨床血液学的所見

今回検出された ankyrin 病因遺伝子異常を有する日本人 HS 症例のうち、摘脾を施行されていない発端者19例についての臨床血液学的所見を、これまで当教室で発見された band 3 遺伝子異常を有する日本人 HS 症例<sup>14), 15)</sup>と比較検討を行った。その結果、ankyrin 遺伝子異常を有する症例は、軽度～重度の様々な程度の非代償性溶血性貧血を呈しているが (Table 2), Hb 値  $9.1 \pm 1.8$  g/dl (band 3 遺伝子異常群  $12.1 \pm 1.2$ ), reticulocytes  $15.1 \pm 6.5\%$  (同  $9.0 \pm 5.2$ ) と、ankyrin 遺伝子異常群は band 3 遺伝子異常群よりも、明らかに重症と考えられる (Table 4,  $P < 0.01$ )。

### 3. Ankyrin 遺伝子異常症における膜蛋白分析

今回検出された ankyrin 遺伝子異常を有する HS 症例の膜蛋白生化学分析所見 (Table 2,

Table 5) では、20家系いずれの発端者についても ankyrin 減少は認められなかった。これらの症例のうち、17例 (85%) については、軽度の P 4.2 単独欠損が認められ、その他 3 例 (15%) については、いずれの膜蛋白欠損も認められなかった。また、赤血球型 ankyrin の isoform である ankyrin 2.2 については、14例 (70%) で10～45%の減少が認められた。一方、この ankyrin 2.2 の減少は ankyrin 遺伝子異常が検出されなかった43症例の中にも、8例に認められた。

## 考 察

今回の研究では、まず日本人の HS 症例における ankyrin 遺伝子異常症の頻度を明らかにする目的で、以前に当教室で band 3 遺伝子解析を施行された日本人 HS 37家系を母集団とし、このうち band 3 遺伝子異常が同定されなかった29家系29例に対して ankyrin 遺伝子解析をおこなった。その結果、8家系の症例 (22%) から ankyrin 遺伝子異常が同定された。また、band 3 蛋白欠損を有さない日本人 HS 25家系に対して ankyrin 遺伝子解析を行った結果、12家系 (48%) に ankyrin 遺伝子異常が同定された。著者らの検索<sup>13), 14)</sup>によると、日本人の HS 家系における band 3 蛋白欠損症の頻度は約20～30%であった。一方、SSCP 法による遺伝子異

Table 4. Clinical characteristics of Japanese HS probands with ankyrin mutations and band 3 mutations

	Number of kindred	Number of probands	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCHC (%)	Reticulocytes (%)	Indirect bilirubin (mg/dl)
Ankyrin mutation	19	19	$9.1 \pm 1.8$	$84.5 \pm 6.8$	$34.3 \pm 1.6$	$15.1 \pm 6.5$	$2.0 \pm 1.4$
Band 3 mutation	11	11	$12.1 \pm 1.2$	$89.5 \pm 6.3$	$36.0 \pm 1.4$	$9.0 \pm 5.2$	$2.1 \pm 1.7$
P-value	-	-	$<0.01$	0.03	$<0.01$	$<0.01$	0.87

Data are shown as means  $\pm$  standard deviation. Hb indicates hemoglobin ; MCV, mean corpuscular volume ; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 5. Characteristics of membrane protein deficiencies in HS probands with ankyrin mutations and band 3 mutations

	Spectrin alone	Ankyrin-related (Ank/Sp+Ank)	Band 3-related (B3/B3+P4.2)	Protein 4.2 alone	No deficiency
Ankyrin mutations (n=20)	0	0	0	17 (85%)	3 (15%)
Band 3 mutations (n=11)	0	0	11 (100%)	0	0

Ank indicates ankyrin ; Sp, spectrin ; B3, band 3 ; P4.2, protein 4.2 ; Ank/Sp+Ank, deficiency of ankyrin alone or of combined spectrin and ankyrin ; B3/B3+P4.2, deficiency of band 3 alone or of combined band 3 and protein 4.2.

常の検出感度は、一塩基置換で30~75%、挿入や欠失で70~100%とされている<sup>22)~26)</sup>。また、ÖzcanらはSSCP法によるankyrin遺伝子異常の検出感度が約70%であると指摘している(未公表データ)。この事実を加味すると、日本人のHS家系におけるankyrin遺伝子異常の占める頻度は30~50%程度と推察される。

既報の欧米を中心としたankyrin遺伝子異常を伴ったHS症例では、frameshift変異やnonsense変異が大半を占めており、ankyrin蛋白は減少している<sup>4), 10), 12)</sup>。これらの遺伝子変異を有する症例では、極く一部の例外(ankyrin Saint-Etienne<sup>27)</sup>)を除いて、異常ankyrin蛋白は成熟赤血球膜上には発現しておらず、null mutationであると推定されている<sup>4), 5), 10)~12)</sup>。したがって赤血球膜におけるankyrin蛋白の発現は、基本的には他方の正常アレルのみに依存することになり、これらの症例ではankyrin蛋白は減少すると考えられる。

しかしながら、今回ankyrin遺伝子異常が同定された日本人20家系の症例では、欧米症例と同様に主としてframeshift変異およびnonsense変異が認められたにもかかわらず、いずれもankyrin蛋白減少は認められなかった。この原因として以下の要因が考えられる。まず最初に、reticulocytosisの関与である。reticulocytosisでは正常成熟赤血球に比べてankyrin蛋白量が相対的に増加していることが既に知られている。HSでは溶血亢進病態に対応してreticulocytosisが認められる。従って本症赤血球では、このreticulocytosisの故に相対的にankyrin量が増加し、ankyrin蛋白欠損が見かけ上是正されているものと推定される<sup>28), 29)</sup>。次に、第二の要因としてsplenic conditioningの影響が推察される。HS赤血球は、膜蛋白異常に伴って不安定となった脂質二重層がmicrovesicleを形成して遊離するために、膜表面積の減少をきたして球状化をきたすこととなる。この場合、ankyrin異常症では、ankyrin減少に伴って膜骨格との連結が断たれたband 3が脂質二重層と共にmicrovesicleを形成して遊離すると考えられている<sup>1), 5), 30)</sup>。

この際、脾臓の存在はこのmembrane lossを増強することから、band 3減少をきたして、相対的にankyrin量が減少していないかにも見ると推察される。前者、後者いずれの要因についても、HSの治療としての摘脾が大きく影響することから、欧米と日本人のHS症例におけるankyrin蛋白欠損の頻度の違いには、摘脾の施行頻度の違いも影響していることが示唆される。

一方、これらのankyrin遺伝子異常を有する20例のうち17例(85%)がP 4.2の部分欠損を呈していた。ankyrinは、P 4.2を赤血球膜上で安定化させているとされており<sup>31)</sup>、これらの症例ではankyrin異常に伴って二次的にP 4.2の減少をきたしているものと考えられる。今回ankyrin遺伝子解析をおこなったHS症例において、32家系がP 4.2単独部分欠損を呈しており、そのうち17家系からankyrin遺伝子異常が検出されたこととなる。よって、日本人のHS(特にnon-dominant type)で最も高頻度にみられているP 4.2単独部分欠損型の症例は、その多くがankyrin遺伝子異常に起因していると考えられる。しかしながら、SSCP法による遺伝子異常の検出感度を加味しても、P 4.2単独部分欠損とankyrin遺伝子異常の頻度には開きがあり、このP 4.2単独部分欠損の病因は、ankyrin遺伝子異常以外にも存在すると推定される。

今後、従来の赤血球膜蛋白分析からankyrin遺伝子異常の存在を推測するには、ankyrin 2.1欠損の有無だけでなく、isoformであるband 2.2やP 4.2の蛋白量を総合的にみて判断していく必要があると考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った川崎医科大学 八幡義人名誉教授、同血液内科 杉原 尚教授、有澤総合病院 神崎暁郎前講師に深甚なる謝意を表します。また、御援助を戴いた川崎医科大学血液内科 江田佐久良氏に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第62回日本血液学会総会(2000年、秋田)において発表した。



また、本研究は、以下の援助のもとで行われたものである。文部科学省科学研究費補助金 国際学術研究共同研究 (0944346, 10044329), 同基盤研究 (0940235, 09670164, 11670151, 12470206, 12671014), 日本学術

振興会日独科学協力事業共同研究, 厚生労働省厚生科学研究費補助金 (特発性造血障害に関する研究班), 川崎医科大学プロジェクト研究費 (10-111, 10-809, 11-106, 11-803, 12-206)。

## 文 献

- 1) Palek J, Jarolim P : Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol* 30 : 249 – 283, 1993
- 2) Peters LL, Lux SE : Ankyrins : structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. *Semin Hematol* 30 : 85 – 118, 1993
- 3) Tse WT, Lux SE : Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* 104 : 2 – 13, 1999
- 4) Gallagher PG, Foget BG, Lux SE : Disorders of the erythrocyte membrane. *In Hematology of Infancy and Childhood*, ed by Nathan DG, Orkin SH, Philadelphia, Saunders. 1998, pp 544 – 664
- 5) Gallagher PG, Jarolim P : Red cell membrane disorders. *In Hematology : Basic Principles and Practice*, ed by Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, New York, Livingstone 2000, pp 576 – 610
- 6) Gallagher PG, Tse WT, Scarpa AL, Lux SE : Structure and organization of the human ankyrin-1 gene. *J Biol Chem* 272 : 19220 – 19228, 1997
- 7) Lux SE, John KM, Bennett V : Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 344 : 36 – 42, 1990
- 8) Jarolim P, Murray JL, Rubin HL, Taylor WM, Prchal JT, Ballas SK, Snyder LM, Chrobak L, Melrose WD, Brabec V, Palek J : Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. *Blood* 88 : 4366 – 4374, 1996
- 9) Dhermy D, Galand C, Bournier O, Boulanger L, Cynober T, Schismanoff PO, Bursaux E, Tchernia G, Boivin P, Galbarz M : Heterogenous band 3 deficiency in hereditary spherocytosis related to different band 3 gene defects. *Br J Haematol* 98 : 32 – 40, 1997
- 10) Eber SW, Gonzalez JM, Lux ML, Scarpa AL, Tse WT, Dornwell M, Herbers J, Kugler W, Ozcan R, Pekrun A, Gallagher PG, Schroter W, Foget BG, Lux SE : Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat Genet* 13 : 214 – 218, 1996
- 11) Jarolim P, Rubin HL, Brabec V, Palek J : Comparison of the ankyrin (AC)<sub>n</sub> microsatellites in genomic DNA and mRNA reveals absence of one ankyrin mRNA allele in 20% of patients with hereditary spherocytosis. *Blood* 85 : 3278 – 3282, 1995
- 12) Miraglia del Giudice E, Francese M, Nobili B, Morle L, Cutillo S, Delaunay J, Perrotta S : High frequency of de novo mutations in ankyrin gene (ANK1) in children with hereditary spherocytosis. *J Pediatr* 132 : 117 – 120, 1998
- 13) Inoue T, Kanzaki A, Yawata A, Wada H, Okamoto N, Takahashi M, Sugihara T, Yamada O, Yawata Y : Uniquely higher incidence of isolated or combined deficiency of band 3 and/or band 4.2 as the pathogenesis of autosomal dominantly inherited hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int J Hematol* 60 : 227 – 238, 1994
- 14) Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Doerfler W, Ozcan R, Eber S : Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population *Int J Hematol* 71 : 118 – 135, 2000
- 15) 神崎暁郎 : 遺伝性赤血球膜異常症の分子解析 ; 特に遺伝性球状赤血球症について. *臨床血液* 39 : 130 – 131, 1998
- 16) 賀来万由美 : 赤血球膜蛋白 protein 4.2 異常症の病態分析と病因解析に関する研究. *川崎医学会誌* 24 : 243 – 260, 1998
- 17) Lux SE, Palek J : Disorders of the red cell membrane. *In Blood : Principles and Practice of Hematology*, ed by Handin

- RI, Lux SE, Stossel TP, Philadelphia, Lippincott. 1995, pp 1701–1818
- 18) Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem* 100 : 119–130, 1963
  - 19) Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH : Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 : 2606–2617, 1971
  - 20) Orita M, Iwahara H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-stranded conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2766–2770, 1989
  - 21) Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM : Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annal Biochem* 196 : 80–83, 1991
  - 22) Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM : The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16 : 325–332, 1993
  - 23) Liu Q, Sommer SS : Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP. *PCR Meth Applic* 4 : 97–108, 1994
  - 24) Hayashi K, Yandell DW : How sensitive is PCR SSCP? *Hum Mutat* 2 : 338–346, 1993
  - 25) Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G : Strand-separating conformational polymorphism analysis : efficacy of detection of point mutations in the human ornithine  $\delta$ -aminotransferase gene. *Genomics* 13 : 389–394, 1992
  - 26) Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS : Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP) : comparison with DNA-SSCP. *Nucl Acids Res* 20 : 871–878, 1992
  - 27) Hayette S, Carre G, Bozon M, Alloisio N, Maillet P, Wilmotte R, Pascal O, Reynaud J, Reman O, Stephan JL, Morle L, Delaunay J : Two distinct truncated variants of ankyrin associated with hereditary spherocytosis. *Am J Hematol* 58 : 36–41, 1998
  - 28) Miraglia del Giudice E, Francese M, Polito R, Nobili B, Iolascon A, Perrotta S : Apparently normal ankyrin content in unsplenectomized hereditary spherocytosis patients with the inactivation of one ankyrin (ANK1) allele. *Haematologica* 82 : 332–333, 1997
  - 29) Lanciotti M, Perutelli P, Valetto A, Di Martino D, Mori PG : Ankyrin deficiency is the most common defect in dominant and non dominant hereditary spherocytosis. *Haematologica* 82 : 460–462, 1997
  - 30) Ingrosso D, D'Angelo S, Perrotta S, D'Ulzo G, Iolascon A, Perna AF, Galletti P, Zappia V, Miraglia del Giudice E : Cytoskeletal behaviour in spectrin and in band 3 deficient spherocytic red cells : evidence for a differentiated splenic conditioning role. *Br J Haematol* 93 : 38–41, 1996
  - 31) Rybicki AC, Musto S, Schwartz RS : Decreased content of protein 4.2 in ankyrin-deficient normoblastosis (nb/nb) mouse red blood cells : Evidence for ankyrin enhancement of protein 4.2 membrane binding. *Blood* 86 : 3583–3589, 1995