

Hb Mizushi [$\alpha_2^{75\text{Asp}\rightarrow\text{Gly}}\beta_2$]

— 日本で発見された新しい異常血色素 —

川崎医科大学 生化学

島 崎 俊 一

(昭和55年11月5日受付)

Hb Mizushi [$\alpha_2^{75\text{Asp}\rightarrow\text{Gly}}\beta_2$]

—A New Hemoglobin Variant discovered in Japan—

Shunichi Shimasaki

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,
Kurashiki 701-01, Japan

(Accepted on Nov. 5, 1980)

高松地区での異常ヘモグロビンスクリーニング検査中、1979年5月に **slow moving** の異常ヘモグロビンを発見した。一次構造解析の結果、このヘモグロビンは α 鎖の75番目のアスパラギン酸がグリシンに置換された。これまでに記載されたことのない新しい異常ヘモグロビンであることを確定し、発端者の居住地名に因んで、**Hb Mizushi** と命名した。

患者は44歳の主婦で、1979年5月に子宮筋腫の摘出術を受けるため高松市の香川県立中央病院に入院したが、血液学的検査においては全く正常であり、溶血傾向試験も陰性であった。家族調査を行なったところ、発端者の2人の娘のうち1人(18歳)が、母親と同様に **Hb Mizushi** のヘテロ接合体であることが確認された。

In May 1979 an electrophoretically slow-moving abnormal hemoglobin was detected by our hemoglobinopathy survey in Takamatsu district.

Structural studies of this abnormal hemoglobin demonstrated a previously undescribed substitution of α 75 (EF 4) Asp→Gly. Hence, it was called Hb Mizushi after the name of the village where its carrier lived.

The propositus was a 44-year-old housewife who was admitted to the Kagawa Prefectural Central Hospital (Takamatsu City) for surgical operation of myoma uteri in May 1979. She showed neither hematological abnormalities nor increased hemolytic tendencies.

A study of the family showed that one of her two daughters (18-year-old) was an heterozygote for the Hb Mizushi gene as her mother showed.

はじめに

1979年1月から、香川県高松地区における異常ヘモグロビンのスクリーニングを開始し

た。このスクリーニングは等電点電気泳動法¹⁾によるもので、1980年4月末日までに12341検体を検査して、11例の異常血色素を検出した。このうち α 鎖異常は3例で、 β 鎖異常は8例で

あった。

Hb Mizushi は電気泳動で Hb A よりもやや陰極側に見られ、はっきりと slow moving 異常ヘモグロビンであることが観察された。

構造解析の結果、このヘモグロビンは、これまで報告されたことのない新しい α 鎖異常のヘモグロビンであることがわかったのでそれをここに報告することにしたい。

方 法

抗凝固剤としてヘパリンを使用した全血を通常の方法²⁾で溶血させ、約 10 g/dl の Hb 溶液を得た。溶血液は、0.1 M トリス-EDTA-ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を用いたセルロースアセテート膜電気泳動にかけ、異常ヘモグロビン画分を分離した。その異常バンドを切りとり、0.05 M ビスートリス緩衝液 (pH 7.4) で抽出し、約 10 μ M の Hb 濃度に調製した。酸素平衡曲線測定は、このヘモグロビン溶液を冷室 (4°C) 中で、0.05 M ビスートリス緩衝液にむかって透析し、目的 pH 値 (7.0~7.4) に調整したのち測定した。測定方法は今井らの確立した方法³⁾を使用した。

吸収スペクトルは、Cary タイプ 118C 自記分光光度計で測定し、異常鎖は PCMB 処理した溶血液⁴⁾をでんぷんゲル電気泳動にかけ観察した。

熱変性およびイソプロパノール沈殿試験は、それぞれ Dacie らの方法⁵⁾および Carrell と Kay の方法⁶⁾に従って行なった。グロビンの一次構造解析は以下の方法により行なった。

1) 溶血液を Anson と Mirsky 法⁷⁾でグロビンにした。

2) グロビンは、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーで β^A 鎖、 α^A 鎖、異常鎖に分離した⁸⁾。展開液は、8M 尿素、3.5 ml/l メルカプトエタノールを含むリン酸緩衝液 (pH 6.7, 濃度勾配: 0.008M→0.045M) を使用した。

3) 得られた異常鎖は、TPCK-トリプシンで消化 (37°C, pH 8.0, 3時間) し、次いで 0.1M-HCl で pH を 6.4 に下げ、不溶性沈殿物

(core) を遠心分離した⁹⁾。そして、その上清を凍結乾燥した。

4) Baglioni 法¹⁰⁾に従ってトリプシン消化物のフィンガープリントを作成した。

5) フィンガープリント上での異常スポットは 40% 酢酸で抽出し、凍結乾燥後 105°C, 20 時間, N₂ 下 6M-塩酸で加水分解し、自動アミノ酸分析機 (YANACO, LC-7) でその構成アミノ酸残基を同定した¹¹⁾。

6) トリプシン消化で得られた異常ペプチドは、さらにサーモライシンで消化 (40°C, pH 8.0, 16時間) し¹²⁾、その消化物のフィンガープリントを作成した。異常スポットは 40% 酢酸で抽出し、凍結乾燥した。

7) この異常ペプチドは、一部を 6M-塩酸で加水分解しその構成アミノ酸残基を同定し、残部は Edman の逐次分解法¹³⁾によりアミノ酸配列を決定した。

結 果

発端者は血液学的検査において全く異常なく、溶血の傾向も見られなかった (Hb 13.7 g/dl, PCV 0.42 l/l, RBC 4.94×10^{12} /l, MCV 8.4 fl, MCH 28.2 pg, MCHC 34 g/dl, 網赤血球数: 正常範囲内)。

溶血液をセルロースアセテート膜電気泳動し

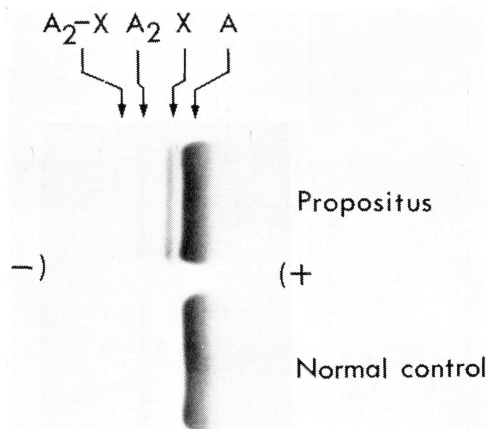


Fig. 1. Cellulose acetate membrane electrophoresis at pH 8.0. X=abnormal hemoglobin

たところ、陽極側から陰極側に向って Hb A, 異常ヘモグロビン (=Hb X), Hb A₂, Hb A₂-X の4本の縞が見られた (Fig. 1) 各々の縞を切りとり、電気泳動で使用した同じ緩衝液で抽出し、それらの含量を測定すると、Hb X=14.0%, Hb A=82.9%, Hb A₂ (A₂+A₂-X)=3.1%であった。また、Hb Fは Betke の方法¹⁴⁾で測定し、0.3%であった。熱度性試験および Carrell のイソプロパノール変性試験はいずれも陰性であった。

オキシヘモグロビン型の Hb X の吸収スペクトルを紫外および可視領域にわたって測定すると、等濃度の Hb A のそれと吸収峯の高さおよび位置において全く一致した。

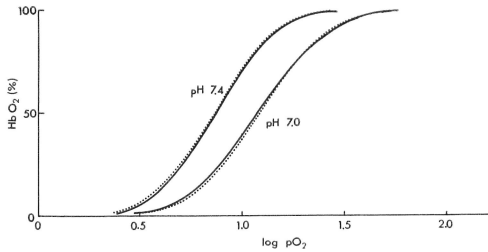


Fig. 2. Oxygen dissociation curve of purified Hb Mizushi (—) in comparison with that of normal adult hemoglobin (.....).

精製した Hb X の酸素平衡曲線は Hb A のそれとよく一致した (Fig. 2)。即ち、pH 7.0 で $\log P_{50}=1.076$ (Hb A=1.090), pH 7.4 では $\log P_{50}=0.877$ (Hb A=0.870) であり、アルカリポーア効果および Hill's *n* 値はそれぞれ $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}=-0.50$ (Hb A=-0.55) およ

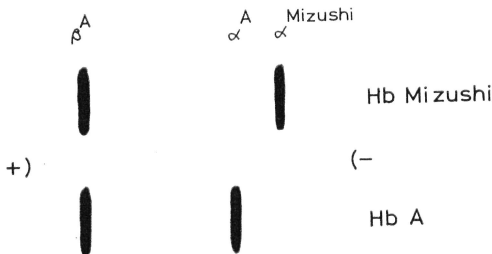


Fig. 3. Starch gel electrophoresis of the preliminarily PCMB treated hemolysate.

び $n=2.9$ (Hb A=2.9) となり正常値とよく一致した。また、2,3 DPG 効果 $\Delta \log P_{50}/\Delta [\text{DPG}]$ にも Hb A とのくい違いはなかった。

PCMB で前処理した Hb X¹⁵⁾ をでんぷんゲル電気泳動すると、 α 鎖に泳動の遅れがみられ、 α 鎖異常であることが確認された (Fig. 3)。

異常 α 鎖のトリプシン消化物のフィンガープリントでは、正常な α Tp-IX が存在する位置にスポットが見られず、代わりに新しく2つの異常スポット S と Sox がそれよりやや陰極側

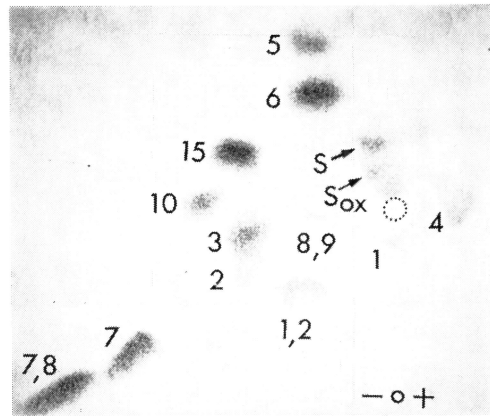


Fig. 4. The fingerprint of the tryptic digest of the abnormal α^X chain. Note the appearance of two abnormal spots (S and Sox) and the disappearance of α Tp-IX at usual site as indicated with a dotted circle.

の上方に偏移して見られた (Fig. 4)。この異常スポット S の組成は次の様なアミノ酸残基であった。

| | | | | | |
|-----|---------|-----|---------|-----|---------|
| Lys | 1.28(1) | His | 2.72(3) | Asx | 5.13(6) |
| Thr | 0.90(1) | Ser | 2.04(2) | Pro | 2.04(2) |
| Gly | 1.14(0) | Ala | 7.11(7) | Val | 3.28(3) |
| Met | 0.68(1) | Leu | 3.89(4) | | |

(括弧内の値は正常な α Tp-IX に存在するアミノ酸残基数である。)

この成績は異常スポット S が異常 α Tp-IX であることを示し、しかも、正常な α Tp-IX には 2 残基の Asn と 4 残基の Asp が含まれているが、この異常スポットには、Asx とし

て5残基分しかなく、代わりに Gly が新たに1残基分存在していることから Asp または Asn が Gly に置換されていることが判明した。さらに、異常 α 鎖や異常 Hb がそれぞれのコントロールに比べ電気泳動で slow moving であることと考え合わせ、Gly に置換されたアミノ酸は Asp であることを示唆している。

また異常スポット Sox のアミノ酸組成も S と同様であったことから、Sox は同じ異常ペプチド内の Met が酸化され、スポット S から分離しているものと考えられた。

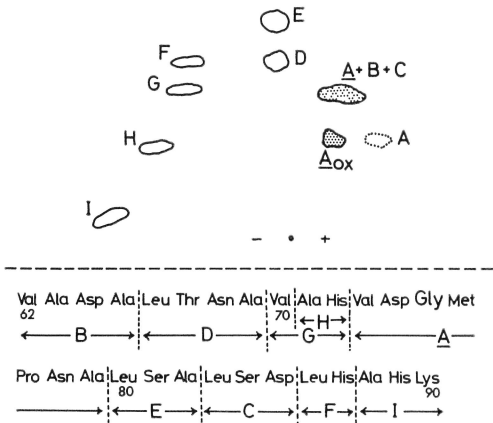


Fig. 5. Composite fingerprint of the thermolysin digest of α^X Tp-IX and α^A Tp-IX. Note spot A which is normally located at dotted line circle is moved cathodwards in the digest of α^X Tp-IX.

異常ペプチド S のサーモライシン消化物のフィンガープリントは、 α 73~79 に該当するペプチドが正規の位置に見られず、その陰極側に新たなスポット A_{ox} が観察された (Fig. 5)。このペプチド A_{ox} は次の様なアミノ酸残基組成であった。

Asp 2.11(3) Pro 0.72(1) Gly 0.98(0)
Ala 1.07(1) Val 0.93(1) Met 0.51(1)

(括弧内の数は正常な α 73~79 のアミノ酸残基数を示す。)

このことから Gly に置換された Asp は、 α 73~79 のペプチド中の 74 番目か 75 番目の

うちのいずれかであることが判明した。

そこでこの異常スポット A_{ox} を抽出し、さらに Edman 分解法による逐次配列決定を行なった結果、N 末から Val-Asp-Gly-Met-の順であることが確認された。

また α^X 鎖の core 画分はキモトリプシン消化¹⁶⁾し、フィンガープリントにかけたが α^A 鎖のそれと同様であり異常を認めなかった。

以上の構造解析の結果から、この異常ヘモグロビンの一次構造は $\alpha_2^{75}Asp-Gly\beta_2A$ であることを確定した。

考 察

Hb Mizushi の発端者は、この異常ヘモグロビンに由来すると思われる臨床症状および血液学的異常を有していなかった。この異常ヘモグロビンの無症状性は正常な酸素親和性を持つことおよびイソプロパノール沈殿試験に対して陰性であることでも支持される。

Perutz の 3 次元ヘモグロビン分子モデル^{17,18)}によると、 α 75 の位置は EF non helical 部の 4 番目であり、そのアミノ酸残基は分子表面に突出していて、各鎖間の接触部とか、ヘムとの接触部には関与していない。従って、この場所でのアミノ酸置換は単に Hb 分子に荷電的变化を与えるのみで、分子を歪ませることもなく、機能的には正常な働きをしているものと思われる。

これまでに知られている α 75 の Asp が置換された異常ヘモグロビンは、Hb Q Iran (Asp→His)¹⁹⁾、Hb Winnipeg (Asp→Tyr)²⁰⁾、Hb Matsue-Oki (Asp→Asn)²¹⁾ 等があるが、いずれもヘモグロビンの機能異常は観察されていない。

発端者の 2 人の娘のうち 1 人が母親と同様に Hb Mizushi のヘテロ接合体 (含量 15.8%) であったが、彼女も血液学的には全く異常はみられていない。

Hb Mizushi の一次構造解析において、 α Tp-IX のサーモライシン消化物のフィンガープリントは Fig. 5 の様になった。Edman 法によ

る逐次配列決定に使用したペプチドはこのうち \underline{Aox} であるが、その真上にあるスポットはアミノ酸分析の結果ペプチド B と C の等モル混合物であることに加えて、異常ペプチド \underline{A} もその約 1/2 モルの割合で含まれていることがわかった。このことから Edman 分解に使用したペプチドは、その後の処理中に異常ペプチド \underline{A} の中の Met 残基の一部が酸化され、 \underline{Aox} を生じ、それを分析したことが判明した。

この様にして Hb Mizushi の一次構造は $\alpha_2^{75\text{Asp}\rightarrow\text{Gly}}\beta_2^{\text{A}}$ であることを決定した。ヒト α グロビン mRNA のヌクレオチド配列において、 α 鎖の 75 番目の Asp のトリプレットコドンは GAC と確定されている²²⁾。Gly のト

リプレットコドンには GGU, GGC, GGA, GGG の 4 種が明らかにされていることから²²⁾、Hb Mizushi の点突然変異は single base transition (A \rightarrow G) で説明して矛盾しない。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始数多くの有益な御教示、御指導を賜りました本学・井内岩夫教授、日高和夫先生に謝意を表します。また、血液試料の採取に御世話いただいた香川県立中央病院・水島淳先生、久保信夫先生、本学・上田智教授、原野昭雄助教授に感謝致します。なお研究費の一部は本学プロジェクト研究助成金 (54—106) によるもので併せて謝意を表します。

文 献

- 1) Harano, T., Iuchi, I. and Shibata, S.: A simple isoelectric focussing procedure for screening human hemoglobin components on polyacrylamide gel. *Kawasaki Med. J.* 4: 53—56, 1978.
- 2) Huisman, T. H. J. and Jonxis, J. H. P.: *The hemoglobinopathies; techniques of identification.* New York, Marcel Dekker, 1977.
- 3) Imai, K., Morimoto, H., Kotani, M., Watari, H., Hirata, W. and Kuroda, M.: Studies on the function of abnormal hemoglobins. 1. An improved method for automatic measurement of the oxygen equilibrium curve of hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 200: 189—196, 1970.
- 4) Ohba, Y., Miyaji, T. and Shibata, S.: A simple method for detection of chain anomaly of an abnormal hemoglobin in hemolysate without preliminary purification. *Acta Haemat. Jap.* 29: 14—20, 1966.
- 5) Dacie, J. V., Grimes, A. J., Meisler, A., Steingold, L., Hemested, E. H., Beaven, G. H. and White, J. C.: Hereditary Heinz-body anaemia. A report of studies on five patients with mild anaemia. *Brit. J. Haemat.* 10: 388—402, 1964.
- 6) Carrell, R. W. and Kay, R.: A simple method for detection of unstable hemoglobins. *Brit. J. Haemat.* 23: 615—619, 1972.
- 7) 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.
- 8) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, D. J.: Abnormal human haemoglobins, separation and characterization of the α and β chains by chromatography, and determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). *J. Mol. Biol.* 19: 91—108, 1966.
- 9) Ingram, V. M.: Abnormal human hemoglobins. 1. The comparison of normal human and sickle cell hemoglobins by "Fingerprint." *Biochim. Biophys. Acta* 28: 529—545, 1958.
- 10) Baglioni, C. and Lehmann, H.: Chemical heterogeneity of haemoglobin O. *Nature* 196: 229—232, 1962.
- 11) Jonxis, J. H. P. and Huisman, T. H. J.: *A laboratory manual on abnormal hemoglobins.* Blackwell, Oxford and Edinburgh, 1968.
- 12) Matsubara, H., Singer, A. and Sasaki, A. O.: Effect of proline residue on the hydrolysis of

- substrates by thermolysin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 34: 719, 1969.
- 13) Gray, W. R.: Method in *Enzymology*, vol. 11, edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. New York and London, Acad. Press. 1967, p. 469.
 - 14) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I.: Estimation of small percentages of foetal hemoglobin. *Nature* 184: 1877—1878, 1959.
 - 15) Ohba, Y., Miyaji, T. and Shibata, S.: A simple method for detection of chain anomaly of an abnormal hemoglobin in hemolysate without preliminary purification. *Acta Haemat. Jap.* 29: 14—20, 1966.
 - 16) Carrell, R. W. and Irvine, D.: Characterization of the α chain core of human haemoglobin variants. *Biochim. Biophys. Acta* 154: 78—88, 1968.
 - 17) Perutz, M. F.: Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228: 726—739, 1970.
 - 18) Perutz, M. F.: The haemoglobin molecule. *Proceedings of the Royal Society B* 173: 113—140, 1969.
 - 19) Lorkin, P. A., Charlesworth, D., Lehmann, H., Rahbar, S., Tsuchida, S. and Lie Injo, Luan Eng: Two Haemoglobins Q, $\alpha 74(\text{EF}3)$ and $\alpha 75(\text{EF}4)$ Aspartic acid \rightarrow Histidine. *Brit. J. Haemat.* 19: 117—125, 1970.
 - 20) Vella, F., Wiltshire, B., Lehmann, H. and Galbraith, P.: Hemoglobin Winnipeg $\alpha_2^{75\text{Asp}}\beta_2^{\text{Tyr}}$. *Clin. Biochem.* 6: 66—70, 1973.
 - 21) Ohba, Y., Miyaji, T., Matsuoka, M., Takeda, I., Fukuda, Y., Shibata, S. and Ohkura, K.: Hemoglobin Matsue-Oki: α 75(EF4) Aspartic acid \rightarrow Asparagine. *Hemoglobin* 1: 383—388, 1977.
 - 22) Stamatoyannopoulos, G. and Nienhuis, A. W.: Cellular and molecular regulation of hemoglobin switching. New York, Grune and Stratton. 1979.