

Hb G Szuhu [β 80 (EF 4) Asn→Lys]

— 高松地区で発見された異常血色素 —

川崎医科大学 生化学教室

島崎 俊一, 井内 岩夫, 日高 和夫

倉敷中央病院

水 島 淳

香川県立中央病院

川 田 清 弥

(昭和57年6月29日受付)

Hb G Szuhu [β 80 (EF 4) Asn→Lys]

— A Hemoglobin Variant Discovered in
Takamatsu District —

Shunichi Shimasaki, Iwao Iuchi

and Kazuo Hidaka

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Jun Mizushima

Kurashiki Central Hospital

Kiyoya Kawada

Kagawa Prefectural Central Hospital

(Accepted on June 29, 1982)

香川県高松地区の異常血色素調査において、1980年10月に電気泳動的に遅く泳動される異常血色素を検出した。発端者は香川県立中央病院を訪れた24歳の妊婦で、血液学的諸検査に異常なく、異常血色素に由来する徴候も全く認められなかった。

一次構造解析の結果、この異常血色素は既報の Hb G Szuhu [β 80 Asn→Lys] と同定された。Hb G Szuhu の酸素運搬機能は正常であった。

本邦では既に3例の Hb G Szuhu の報告をみるが、現在のところ本家系は既報告のいずれの家系とも血縁的に無関係で、新しい突然変異によると思われた。

In October 1980 an electrophoretically slow-moving abnormal hemoglobin was detected by our hemoglobinopathy survey in Takamatsu district. The propositus was a 24-year-old pregnant housewife who was admitted to the Kagawa Prefectural Central Hospital in Takamatsu City. At the time of admission she showed neither hematological abnormalities nor clinical symptoms which might be associated with the presence of abnormal hemoglobin. Structural studies of this abnormal

hemoglobin demonstrated the substitution of $\beta 80$ Asn \rightarrow Lys identity with a previously reported Hb G Szuhu. Functional properties of this variant were within the normal range. Three other families with this variant have previously been reported in the Japanese. The present family was not related to these three families and is suggestive of a fresh mutation.

緒 言

1979年1月から高松地区の異常血色素 (abn. Hb) スクリーニングを始め, 1981年12月までの3年間に約22,000例を検査した. そして18例の異常血色素を認め, 構造解析の為の血液が入手不可能であった1例を除いてすべてその1次構造異常を確認した. 今回は同じ調査中に検出された Hb A 変異型について報告したい.

試料と方法

血液試料および機能テスト等

abn. Hb のスクリーニングは香川県立中央病院に来院した患者の全血を蒐集し, 1週間に1回本学に搬送して溶血液を作成し, アクリルアミドを支持体とする等電点電気泳動法¹⁾にかけて検査した. abn. Hb を検出したら被検者の溶血液 (10g Hb/dl) は Carrell の方法で調製し²⁾, 以後の検査の試料とした. まずセルロースアセテート膜電気泳動³⁾(pH 8.0) に向け, 分離した各 Hb 縞をハサミで切りとり, 緩衝液内に抽出し, 比色法で各血色素画分の比率を求めた. Hb F の比率は, アルカリ液を用いる Betke の方法⁴⁾に従って定量した. 不安定血色素試験はイソプロパノール変性を原理とする Carrell の方法⁵⁾に従い, 酸素平衡曲線は今井らの方法⁶⁾に従って検査した. 異常血色素の吸収スペクトルは Cary Type 118C 自記分光光度計を用い, 可視および紫外領域に亘り検査した.

Hb の構造解析

溶血液をドライアイスで冷した1.0%塩酸・アセトン溶液で処理してヘムを除き⁷⁾, 得られたグロビンを8M尿素を含むCMCカラムクロマトグラフィー⁸⁾にかけて異常 β 鎖($\equiv\beta^X$)を単離した. β^X 鎖をTPCK-トリプシンで消化⁹⁾

(pH 8.0, 2hr) し, シリカゲルプレートを用いたフィンガープリント法¹⁰⁾により異常ペプチドの有無を調べた. フィンガープリント上の異常ペプチドを抽出した後, その一部を酸加水分解し, アミノ酸残基数を知り¹¹⁾, 残りの部分はさらにサーモライシンで消化¹²⁾(pH 8.0, 16hr)した. この2次消化物を用いて同様にフィンガープリントを作成し, ここで得られた異常ペプチド断片について一部をアミノ酸分析, 残りをEdman法¹³⁾による逐次分解を行ないアミノ酸置換を確定した.

成 績

発端者は24歳の妊婦(1980年)で出産の為香川県立中央病院に入院した. 入院時の血液学的検査はHb 11.9g/dl, RBC $3.83 \times 10^{12}/l$, WBC $7.8 \times 10^9/l$, PCV 0.341/l, MCV 90 fl, MCH 31.1 pg, MCHC 34.6 g/dlであった. 発端者の溶血液をセルロースアセテート膜電気泳

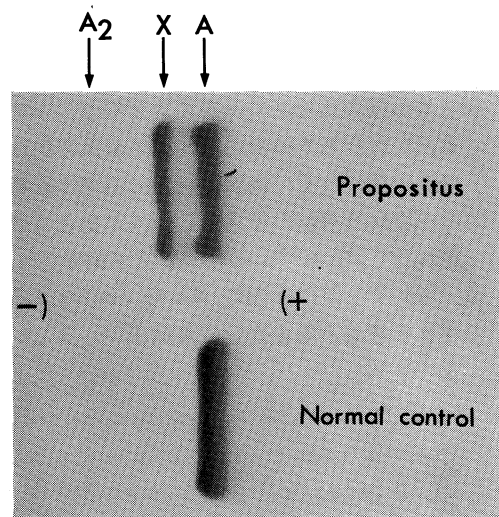
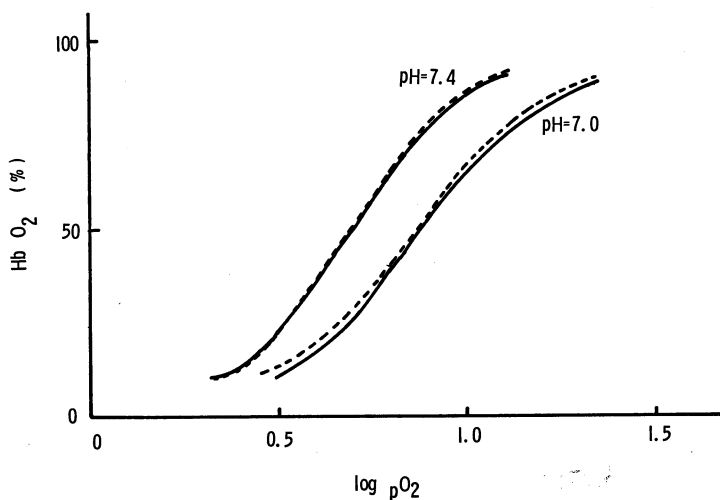


Fig. 1 Cellulose acetate membrane electrophoresis at pH 8.0. X=abnormal hemoglobin



pH	log P ₅₀	Hill's constant (n)
7.0	0.887 (0.871)	2.38 (2.38)
7.4	0.704 (0.714)	2.71 (2.82)
Bohr effect		-0.45 (-0.42)
2, 3-DPG effect		0.28 (0.27)

Fig. 2 Oxygen equilibrium curve and their indices of purified Hb G Szuhu (—) in comparison with those of normal adult hemoglobin (.....). The values of normal control were indicated in the parentheses.

動(pH 8.0)にかけると、陽極側から陰極側に向かって Hb A, 異常血色素(≡Hb X), Hb A₂ が観察された (**Fig. 1**). 各血色素画分の比率(%)は Hb A=54.7, Hb X=42.2, Hb A₂=3.0, Hb F=0.13 であった。精製した Hb X の血色素不安定試験は陰性であり、その吸収スペクトルは可視、紫外領域とも吸収峯の位置と高さにおいて Hb A と同じであった。Hb X の酸素平衡曲線は **Fig. 2** に示した如くで酸素運搬能に異常はみられなかった。

セルロースアセテート膜による溶血液の電気泳動において、異常な Hb A₂ が観察されなかった為、異常鎖は β 鎖と推定された。このことはグロブリンの CMC カラムクロマトグラフィーにおいて β^A 鎖のすぐうしろに β^X 鎖が溶出したことで支持された。 β^X 鎖のトリプシン消化物のフィンガープリントは、 β T-9 に該当するスポット S がその位置になく、代わりに3つの異常スポット A, B, C が観察された (**Fig. 3**)。これらのペプチド A, B, C は **Table 1** の如きアミノ酸残基数を示した。この成績をみるとスポット C のそれはスポット A と B の和で

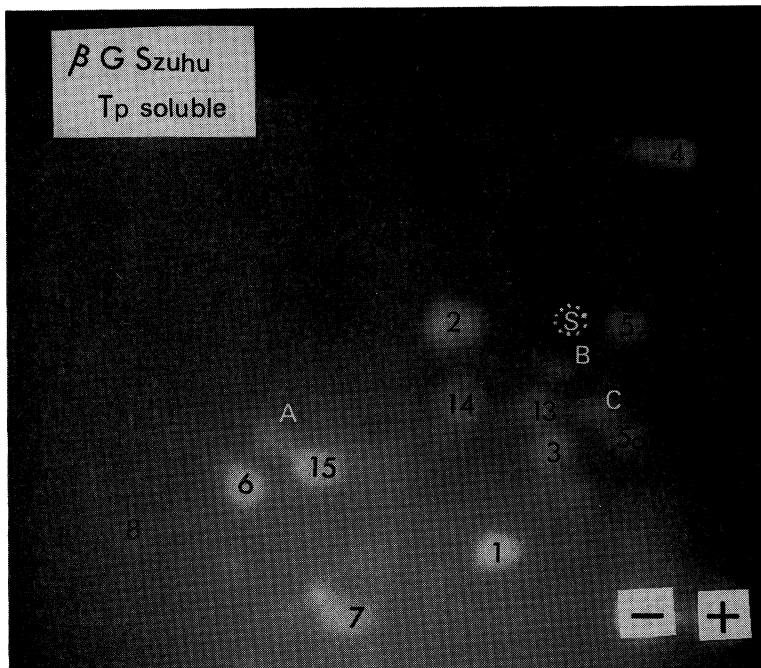


Fig. 3 Fingerprint of the tryptic digest of abnormal β^X chain. Note the appearance of three abnormal spots (A, B, C) and disappearance of β T-9 at usual site as indicated with a dotted line circle.

Table 1 The number of amino acid residues in three abnormal spots (A, B, C).

Amino acid	Spot		
	A	B	C
Lys	1.01	1.02	1.99 (1)
His		0.86	0.92 (1)
Asx		2.04	2.07 (3)
Ser		0.98	1.05 (1)
Gly		2.22	2.09 (2)
Ala		1.84	1.83 (2)
Val		1.10	1.16 (1)
Leu	0.99	2.83	3.78 (4)
Phe		0.84	0.97 (1)

(): the theoretical number of amino acid residues in normal β T-9

あり、しかもスポットCは β T-9のアミノ酸組成に於てAsx \rightarrow Lys置換を予想させるものに一致していた。即ち本例は異常 β T-9(=スポットC: β 67-82)を有し、しかも80番AsnがLysに置換しているため、トリプシンによりスポットA(β 81 Leu \sim β 82 Lys)とスポットB(β 67 Val \sim β 80 Lys)に切断されたと解釈しうる成績を与えた。そこでアミノ酸置換 β 80 Asn \rightarrow Lysを証明するためペプチドBを抽出

し、さらにサーモライシンで消化し、フィンガープリントを作成した(Fig. 4)。フィンガープリント上の全てのスポット(L...Q)をアミノ酸分析したところ、ペプチドPが β 80番のアミノ酸を含んでいるペプチド(β 78 \sim 80番)に該当し、コントロールのスポットP(Leu-Asp-Asn)に比べ左側(陰極側)下方に移動して、Leu, Asx, Lysのアミノ酸組成を与えた。またこのペプチドPについてEdman逐次解法で配列を調べるとN末よりLeu⁷⁸-Asp⁷⁹-Lys⁸⁰の配列をもつトリペプチドの成績を示し、 β 鎖80番めのAsnがLysに置換 [β 80 Asn \rightarrow Lys]していることを証明し得た。故にこのabn Hbは既報のHb G Szuhuと同定された。

考 察

Hb G Szuhuの発端者は異常血色素の存在に由来する臨床症状および血液学的異常所見は認められなかった。このことはこの異常血色素が酸素運搬機能、不安定性に於てコントロールのHb Aと差がなく正常範囲内であること等により支持される。

Perutzの3次元Hb分子モデル¹⁴⁾によると β 鎖80番(EF 4)は分子表面に突出しているアミノ酸残基であり、この位置でのアミノ酸置換はHb分子の立体構造に異常を与えず機能的に異常をもたらすことはないと考えられる。

Hb G Szuhuは1964年に台湾在住の中国人から初めて発見され¹⁵⁾、その後日本人¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、英国人¹⁹⁾と相次いで遺伝的ヘテロ型として発見されたが、いずれもこの異常血色素に由来する患者の臨床的および血液学的異常は認められていない。また1975年には、ユ

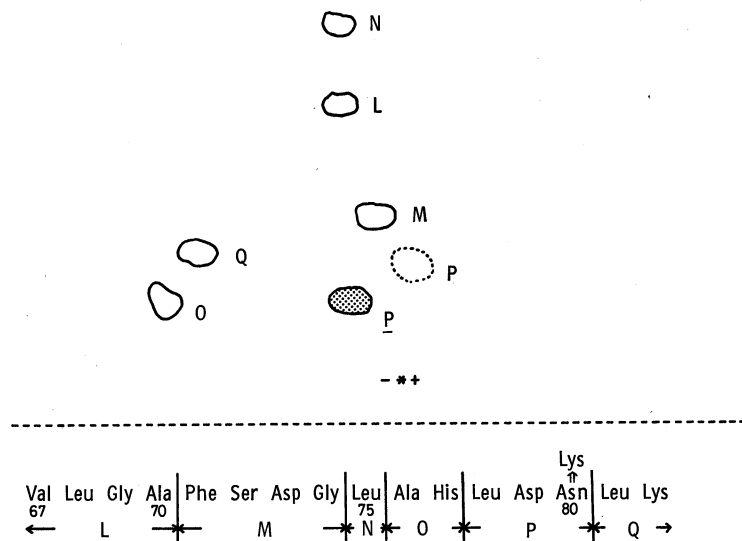


Fig. 4 Composite fingerprint of the thermolysin digest of abnormal spot B and normal β T-9. Note spot P which is normally located at dotted line circle is moved cathodewards. Spot Q was absent in the fingerprint of the thermolysin digest of abnormal spot B.

ダヤ人から本血色素のホモ接合体も発見された²⁰⁾. このホモ接合型保因者は無 β -リポ蛋白血症と、本症特有の恒常的有棘赤血球が認められている. しかし、このホモ接合型保因者の両親および子孫 (いずれも abn. Hb のヘテロ接合体) には無 β -リポ蛋白血症はみられていないことから、Hb G Szuhu の存在と本症との関係は究極的には明らかにされていない.

一次構造解析において、異常 β 鎖のトリプシン消化物のフィンガープリントでは β 鎖80番のLysのカルボキシル基側が切断されたもの(スポットAとB)とそのままペプチド結合として残存しているもの(スポットC)とが観察された. このことは80番のLysはAsp(79番)と隣接しているため、Aspの β -カルボキシル基がトリプシン消化を妨害²¹⁾したためと理解できる.

Hb G Szuhu は本邦においても既に3家系報告されていて本例が4家系めに相当するが、本家系の調査の結果は他の3家系との血縁関係を否定するものであった. 正常な β 鎖80番めのアミノ酸残基であるAsnは、 β 鎖m-RNAのトリプレットコドンでAACと報告されている²²⁾²³⁾²⁴⁾. この位置がLysに変異するにはmRNAのトリプレットコドンとしてAAA又

はAAGでなければならない²⁵⁾. 従ってHb G Szuhuの点突然変異はsingle base transversion型(C \rightarrow A or C \rightarrow G)として説明しうる. 一般にtransition変異に比べ、より起こりにくいtransversion変異がHb G Szuhuにおいて起こっていることに興味をもたれる. 本邦におけるHb G Szuhuの保因家系4例が独立した突然変異家系であるか否かを知るために、将来さらに β -mRNAの該当コドンを決定してみる必要がある.

ヒトヘモグロビン β 鎖にはAsnが6カ所にみられ、そのうちアミノ酸番号として19, 57, 80, 102, 108番の5カ所のトリプレットコドンはAACであり、他の1カ所(139番)はAAUであることが知られている²⁶⁾. 興味あることにAACのトリプレットコドンを有するAsnはすべてLysに置換した異常血色素が存在するのに²⁷⁾²⁸⁾¹⁵⁾²⁹⁾³⁰⁾ AACのトリプレットコドンを有する139番めのAsnがLysに置換された異常血色素は未だ発見されていない. このことは突然変異を起こすコドンの難易を示すものであるか、或いは β 139位はHb分子内部に位置するため極性アミノ酸であるLysに置換した場合、表現型としてのabn. Hbが出現し得ないのか疑問を残すところである.

文 献

- 1) Harano, T., Iuchi, I. and Shibata, S.: A simple isoelectric focusing 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) Schneider, R. G.: Developments in laboratory diagnosis. In *Sickle Cell Disease Diagnosis; Management, Education and Research*, H. Abramson, J. F. Bertles, and D. L. Weathers, Eds. C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo. 1973, p. 230
- 4) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I.: Estimation of small percentage of foetal hemoglobin. *Nature* 184: 1877—1878, 1959
- 5) Carrell, R. W. and Kay, R.: A simple method for detection of unstable hemoglobins. *Brit. J. Haemat.* 23: 615—619, 1972
- 6) 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
- 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. Med. Biol.* 19: 91—108, 1966
- 9) Ingram, V. M.: Abnormal human hemoglobins. 1. The comparison of normal human and sickle cell hemoglobin by "Fingerprint". *Biochim. Biophys. Acta* 28: 529—545, 1958
- 10) Hidaka, K., Iuchi, I., Shimasaki, S. and Aoba, H.: Studies on the abnormal hemoglobin VI: An improved method of fingerprinting with use of silica gel thin layer glass plate. *Kawasaki Igakkai Shi Liberal Arts & Science Course* 6: 29—36, 1980
- 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. *Biochim. 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) Sack, J. S., Andrews, L. C., Magnus, K. A., Hanson, J. C., Rubin, J. and Love, W. E.: Location of amino acid residues in human deoxy hemoglobin. *Hemoglobin* 2(2): 153—169, 1978
- 15) Blackwell, R., Yang, H. J. and Wang, C. C.: Haemoglobin G Szuhu: $\beta^{80\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}}$. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 188: 59—64, 1969
- 16) Matsutomo, K., Miyaji, T., Iuchi, I., Ueda, S. and Shibata, S.: Hb Gifu (beta 80 Asn—Lys), A new slow moving hemoglobin detected from two families of Japanese. *Acta Haem. Jap.* 34: 479—483, 1971
- 17) Matsutomo, K., Hayashi, M. and Inui, S.: On the hematological characteristics of Hb Gifu. *Acta Haem. Jap.* 30(5): 50, 1967
- 18) personal communication
- 19) Welch, S. G.: Haemoglobin G Szuhu $\beta^{80\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}}$ in an English family. *Humangenetik* 28: 231—233, 1975
- 20) Kaufman, S., Leiba, H., Clejan, L., Wallis, K., Lorkin, P. A. and Lehmann, H.: Haemoglobin G-Szuhu, $\beta^{80\text{Asn}\rightarrow\text{Lys}}$, in the homozygous state in a patient with abetalipoproteinaemia. *Hum. Hered.* 25: 60—68, 1975
- 21) Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Cormick, J. and Jones, R. T.: The amino acid sequence of the γ chain of human fetal hemoglobin. *Biochemistry* 2(5): 992—1008, 1963
- 22) Marotta, C. A., Forget, B. G., Cohen-Solal, M., Wilson, J. T. and Weissman, S. M.: Human β -globin messenger RNA. 1. Nucleotide sequences derived from complementary RNA. *J. Biol. Chem.* 252: 5019—5031, 1977
- 23) Marotta, C., Wilson, J., Forget, B. and Weissman, S. M.: Human β -globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *J. Biol. Chem.* 252: 5040—5053, 1977
- 24) Cohen-Solal, M., Forget, B., Prenskey, W., Marotta, C. and Weissman, S. M.: Human β -globin messenger RNA. II. Nucleotide sequences derived from ^{125}I -labelled globin messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 252: 5032—5039, 1977
- 25) Watson, J. D.: Molecular Biology of the Gene. 2nd ed. Reading, Mass., W. A. Benjamin, 1970
- 26) Winter, W. P., Hanash, S. M. and Rucknagel, D. L.: Genetic mechanisms contributing to the expression of the human hemoglobin loci. *Advances in human genetics.* 9: 229—292, 1979

- 27) Elion, J., Belkhdja, O., Wajoman, H. and Labie, D.: Two variants of hemoglobin D in the Algerian population: Hemoglobin D Ouled Rabah β 19(B1) Asn→Lys and Hemoglobin D Iran β 22(B4) Glu→Gln. *Biochim. Biophys. Acta* 310: 360—364, 1973
- 28) Giardina, B., Brunori, M., Antonini, E. and Tentori, L.: Properties of hemoglobin G Ferrara (β 57(E1) Asn→Lys). *Biochim. Biophys. Acta* 534: 1—6, 1978
- 29) Efremov, G. D., Huisman, T. H. J., Smith, L. L., Wilson, J. B., Kitchens, J. L., Wrightstone, R. N. and Adams, H. R.: Hemoglobin Richmond, a human hemoglobin which forms asymmetric hybrids with other hemoglobins. *J. Biol. Chem.* 244: 6105—6116, 1969
- 30) Moo-Penn, W. F., Wolff, J. A., Simon, G., Vacek, M., Jue, D. L. and Johnson, M. H.: Hemoglobin Presbyterian: β 108 (G10) Asparagine→Lysine. A hemoglobin variant with low oxygen affinity. *FEBS Letters* 92: 53—56, 1978