

# 新生児異常ヘモグロビン症を対象とする 新しいマス・スクリーニング法および1 次構造決定法の開発

林 昭  
木戸口 公一  
藤田 富雄  
和田 芳直  
(大阪大学医学部第三内科)

異常ヘモグロビン (Hb) 症は、周知のごとく病気の中で最も素姓の明らかな病気の一つで、臨床医学はもとよりのこと、基礎的にも蛋白質化学、遺伝学、分子生物学などの各分野でモデル疾患として取り上げられている。

臨床医学的にその表現型は、健康な状態から病的な状態、すなわち、溶血性貧血、チアノーゼ、多血症など実に多彩な形をとり、さらに致死的な状態に至るまでの幅広いスペクトラムを示している。したがって、欧米諸国では古くから分子病モデルとして重要視され、さらに最近ではとくに数の多いサラセミア、鎌型赤血球貧血などは遺伝子工学による治療の第1目標とされている。

一方、わが国では、サラセミアや鎌型赤血球貧血が少ないこともあってこの疾患に対する関心は比較的うすく、異常 Hb 症についてこれまでに得られた知識は断片的で、世界との比較も困難というのが実情であった。

このような状況下でわが国における新生児異常 Hb 症のモニタリングがこれからの大きな課題となることは当然で、この趣旨に沿って異常 Hb 症のマス・スクリーニングと構造決定に最新の技術を導入し、われわれ独自の手法を確立した。

## 試料および方法

### I. マス・スクリーニング法<sup>1)</sup>

1) 試料：ホワットマン 3 MM, または No. 1 の沓紙に血液をしみこませた後風乾し、乾燥剤とともに冷蔵庫に保存する。測定にはこの沓紙を直径 1 mm (グロビン量にして数  $\mu\text{g}$  程度) に切り取って試料とする。

### 2) 試料溶解液

{ 尿素 7.0 M  
2-メルカプトエタノール 10%

を含む溶液 0.1 ml に試料を含む濾紙片をつけ、十分浸み出した後これに 3×4 mm のホワットマン 3 MM の濾紙を浸し、これを実際の試料とする。

### 3) ゲルの組成

{ アクリルアミド + Bis 6.2%  
アンフォライト (pH 5~9) 1.0% (W/V)  
尿素 7.0 M

### 4) ゲル化

{ 過硫酸アンモニウム (10%) 50  $\mu$ l  
TEMED 50  $\mu$ l

### 5) 泳動条件

調製した平板ゲル (厚さ 1 mm) に試料を含む濾紙片をのせ、4 °C に冷却しつつ 1,500 V の定電圧下で 90 分間泳動する。

### 6) ゲルの染色、脱色および乾燥

泳動を終ったゲルは、型のごとく 15% TCA で固定後クマシーブルー溶液に浸して染色し、ついで酢酸加エチルアルコールで脱色した後結果を判定する。また、一夜かけて十分に脱色したゲルについては、ゲル乾燥器でセロファン上に乾燥し、デンストメーターにより各バンドを定量することも可能である。

## II. 構造決定法<sup>2)</sup>

### 1) 試料

正常成人、新生児、および Hb M Boston, Hb S, Hb Genova を有する各患者からの血液を試料とし、Hb A, Hb F および各異常 Hb は DEAE-セルローズ、またはアンバーライト CG-50 を用いるカラムクロマトグラフィーで分離精製した。これらの方法により分離の不可能な Hb Genova は PCMB により異常  $\beta$  鎖を特異的に沈澱せしめ精製した。

### 2) ヘムの離脱およびグロビン鎖の分離

-20 °C の低温下で酸性アセトンによりヘムを離脱した後、8 M 尿素存在下で CM-セルローズにより各グロビン鎖を分離し、その一部をアミノエチル化した。

### 3) トリプシン消化

室温で 10 mM 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.8) を用い、トリプシン (trypsin-TPCK,  $1/100$  量) により 6 時間消化し、可溶化したペプチドは凍結乾燥した。

### 4) FD (field desorption)-MS (mass spectrometry)

FD イオン化には特殊なシリコンエミッターを、MS には松田型二重収束装置を用いてトリプシン消化ペプチド混合物の質量分析をおこなった。

## 研究成績

### I. Hb グロビン鎖の等電点電気泳動<sup>1)</sup>

最も代表的な泳動像を図 1 に示す。左側の 3 つのバンドは、それぞれ CM-セルローズカラ

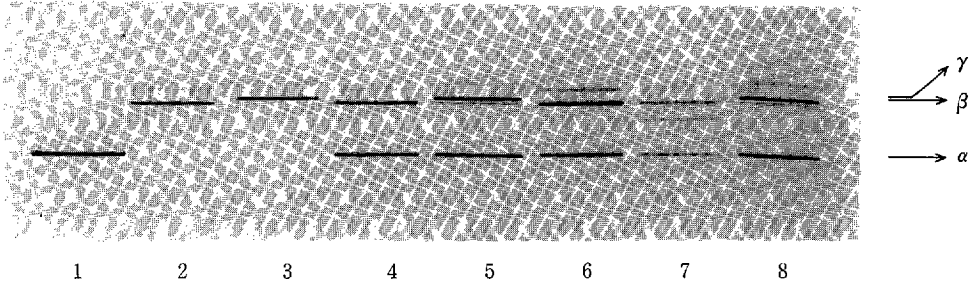


図1 Hb グロビン鎖等電点電気泳動<sup>1)</sup>

1. 単離 $\alpha$ 鎖, 2. 単離 $\beta$ 鎖, 3. 単離 $\gamma$ 鎖, 4. 正常成人溶血液, 5. 正常新生児溶血液,  
6. 正常成人乾燥血, 7. Hb AS 症乾燥血, 8. 正常新生児乾燥血

ムで分離精製した  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  鎖である。中央の2つのバンドはそれぞれ溶血液を試料としたもので、左が正常成人、右が正常新生児からの溶血液であり、いずれも  $\alpha$  鎖を共通にもち、成人血では  $\beta$  鎖、新生児血では  $\beta$  と  $\gamma$  両鎖を有する。右側の3つのバンドは、マス・スクリーニング用に濾紙にしみ込ませて保存した試料を用いたもので、左から正常成人(1ヵ月保存)、

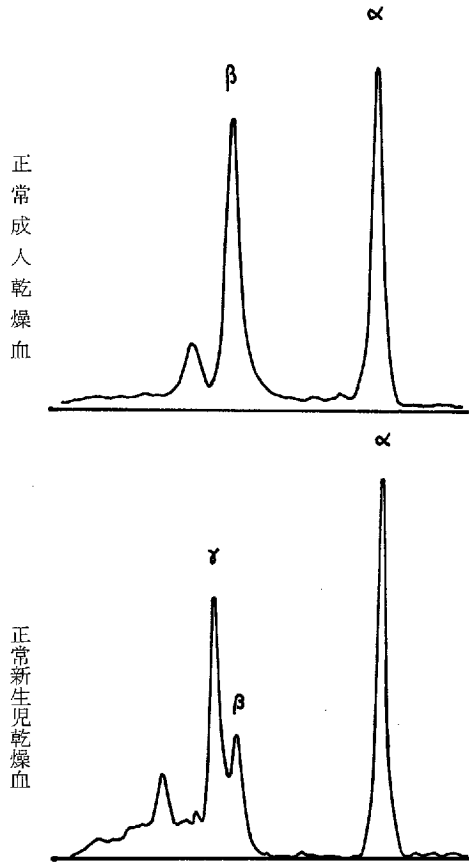


図2 Hb グロビン鎖の等電点電気泳動乾燥ゲルのデンストグラム<sup>1)</sup>

鎌型赤血球貧血症保因者（同 2 ヶ月）および新生児（同 1 ヶ月）で、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  各鎖は標準の各鎖および新鮮溶血液と同様で、異常  $\beta$  鎖 ( $\beta^S$ ) も明瞭に分離される。この図には明示していないが、 $\delta$  鎖も同様に分離され、条件を変えれば  $\gamma^G$  および  $\gamma^A$  の分離も容易である。

図 2 は、乾燥したゲルをデンストメーターで測定したもので、正常成人および正常新生児では、 $\beta/\alpha$ 、あるいは  $\beta+\gamma/\alpha$  はいずれも略 1.0 であり、正常人での non- $\alpha/\alpha$  の合成比と一致する。

## II. FD-MS 法による異常グロビン鎖の解析<sup>2)</sup>

各グロビン鎖は、アミノエチル化して可溶化した後トリプシンで消化すると、理論的にそれぞれ  $\alpha$  鎖は 15、 $\beta$  鎖は 16、 $\gamma$  鎖は 18、 $\delta$  鎖は 17 個のペプチドを生ずる筈である。実際にこれら正常グロビン鎖のトリプシン消化物を FD-MS でしらべると、すべてのペプチドをイオン化した形、あるいは水のとんだ形での質量数の部に正確に証明することができた。

一方、Hb 変異種については、その大部分が所謂点変異、すなわちアミノ酸 1 個の置換に由来することが知られている。したがって、こういう Hb 変異種のグロビン鎖トリプシン消化物の FD-MS では、置換したアミノ酸の質量数のちがいに基づく変化のみがみられるはずである。たとえば、Hb M Boston は  $\alpha$  鎖の第 58 番目のヒスチジンがチロジンに置換した構造を有するからそのトリプシン消化物では  $\alpha T_7$  が異常となる。事実、図 3 に示すように Hb M

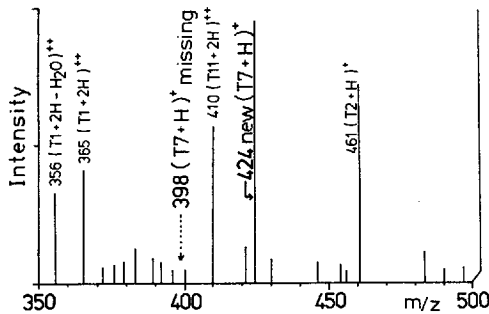


図 3 Hb M Boston ( $\alpha_2^{58\text{His}\rightarrow\text{Tyr}}\beta_2$ ) の異常  $\alpha$  鎖の FD-MS<sup>2)</sup>

Boston の異常  $\alpha$  鎖の FD-MS では  $\alpha T_7$  のピークは消失し、そのかわりヒスチジンとチロジンの質量数の差に相当する部分に新しいピークが出現していた。 $\beta$  鎖異常の Hb S の場合も同様で、 $\beta 6 \text{ Glu}\rightarrow\text{Val}$  のアミノ酸置換を反映して  $\beta T_1$  が消失し、グルタミン酸とバリンの質量数の差に対応する新しいピークを見出すことができた。

さらに、通常の方法では分離することのできない所謂サイレント異常 Hb の代表である Hb Genova についても図 4 のごとく正常および異常混合試料のままでも容易に正常と異常の  $\beta T_3$  を証明することができ、その質量数の差は、ロイシンとプロリンの質量数の差に正確に一致した。

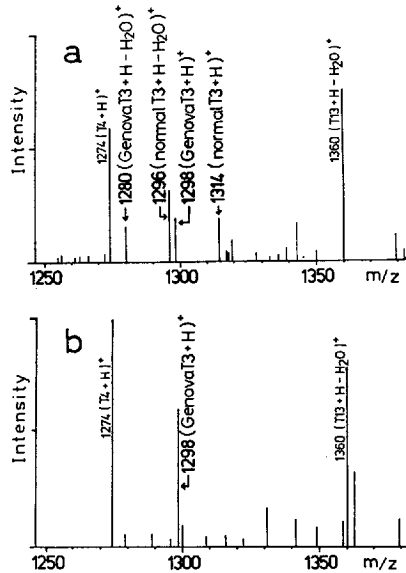


図4 Hb Genova ( $\alpha_2\beta_2^{28\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}}$ ) のFD-MS  
 a. 正常および異常 $\beta$ 鎖混合試料  
 b. 単離異常 $\beta$ 鎖<sup>2)</sup>

## 考 按

先天性代謝異常を最も正しくモニターするには、その先天性代謝異常をひきおこす特定の遺伝子そのもの、またはその遺伝子の直接産物をマーカーとしてとり上げることが必要である。しかしながら、遺伝子そのものへのアプローチがなお困難な現在、遺伝子の直接産物である蛋白質をマーカーとして研究を進めることのできる異常 Hb 症は、研究対象としては最も理想的で、えられたデータはきわめて信頼度の高いものと考えられる。

今回われわれの開発した異常 Hb マス・スクリーニング法の利点を挙げると、

### 1. 試料について

ガスリー法<sup>3)</sup>と同様に乾燥した超微量(グロビンとして数  $\mu\text{g}$  程度)の血液を試料として用いることができ、少なくとも2ヵ月以上保存してもデータに影響のないことを確認している。

### 2. 操作について

1枚の平板ゲルで30検体の解析が可能であり、ゲルの作成から結果の判定まで約6時間を要するのみである。経済性も高く、概算によると人件費を除き1検体当たり僅か100円程度ですむ。

### 3. データについて

正確で再現性が高く、しかも情報量がきわめて多い。すなわち、とくに新生児を対象とした場合、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  各鎖の構造変異種および $\alpha$ ,  $\beta$ -サラセミア(高胎児 Hb 血症を含めて)のマス・スクリーニングが可能である。また、データの内容も、異常児のみをスクリーニングし、遺伝的異質性、表型模写を区別できないガスリー法とちがって、健康な状態から病気に至るまでの自然の分布を知ることができその意味でもすぐれている。

しいて欠点といえば、量のきわめて少ない $\delta$ 鎖変異種や等電点分割法で分離出来ない構造変異種は見逃されることになるが、この中臨床的に明らかな病状を呈するものは、酸素平衡機能の測定<sup>4)</sup>により容易にスクリーニングすることができる。

一方、FD-MSによるHb変異種の構造解析法もまたわれわれ独自の方法で、その特色を挙げると、

### 1. 試料について

上述のマス・スクリーニング法と同様に超微量（1回の測定にトリプシン消化ペプチド混合物として1~2 $\mu$ g程度）の試料や、サイレント変異種について正常、異常混合試料でも解析が可能である。

### 2. 操作について

比較的容易で短時間ですみ、しかも1回の測定にあまり量を必要としないので測定を反復してデータの精度を高めることができる。

### 3. データについて

精度はきわめて高く、質量数の差としてデータがえられるためにあいまいさがなく、適当なプログラムを組むことにより完全自動化も可能である。

この方法の泣き所は、装置が高価なことと点変異以外の変異蛋白や質量数の差をともなわなないアミノ酸置換、たとえば、ロイシンとイソロイシンの置換などの場合で、いずれもこの方法による解析が困難である。

## む す び

1. 乾燥した超微量の血液を試料とする異常Hb症（構造変異種およびサラセミア）のマス・スクリーニング法を開発した。
2. 超微量のトリプシン消化グロビンペプチド混合物を試料とするFD-MSによるHb変異種の一次構造決定法を開発した。

## 文 献

- 1) Wada, Y., Hayashi, A., et al. : in preparation.
- 2) Wada, Y., Hayashi, A., Fujita, T., Matsuo, T., Katakuse, I. and Matsuda, H. : Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **667** : 233~241, 1981.
- 3) Guthrie, R. : Blood screening for phenylketonuria. *J. Amer. Med. Ass.*, **178** : 863, 1961.
- 4) Hayashi, A., Kidoguchi, K., Suzuki, T., Yamamura, Y., Miwa, S. and Imai, K. : Application of an automatic oxygenation technique to analysis of oxygen equilibrium curves for hemoglobinopathic red cells and functional screening of clinically important hemoglobinopathies. *Hemoglobin*, **3** : 429~450, 1979.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



異常ヘモグロビン(Hb)症は、周知のごとく病気の中で最も素姓の明らかな病気の一つで、臨床医学はもとよりのこと、基礎的にも蛋白質化学、遺伝学、分子生物学などの各分野でモデル疾患として取り上げられている。

臨床医学的にその表現型は、健康な状態から病的な状態、すなわち、溶血性貧血、チアノーゼ、多血症など実に多彩な形をとり、さらに致死的な状態に至るまでの幅広いスペクトラムを示している。したがって、欧米諸国では古くから分子病モデルとして重要視され、さらに最近ではとくに数の多いサラセミア、鎌型赤血球貧血などは遺伝子工学による治療の第1目標とされている。

一方、わが国では、サラセミアや鎌型赤血球貧血が少ないこともあってこの疾患に対する関心は比較的うすく、異常 Hb 症についてこれまでに得られた知識は断片的で、世界との比較も困難というのが実情であった。

このような状況下でわが国における新生児異常 Hb 症のモニタリングがこれからの大きな課題となることは当然で、この趣旨に沿って異常 Hb 症のマス・スクリーニングと構造決定に最新の技術を導入し、われわれ独自の手法を確立した。