

新生児異常ヘモグロビン症のマス・スクリーニング；構造決定をめぐる

林 昭
和田 芳直
藤田 富雄
木戸 公一
(大阪府立母子保健総合
医療センター)

現在、わが国で全国的規模で実施されている新生児先天性代謝異常マス・スクリーニングに用いられる沱紙乾燥血の有効利用の一端として、新生児ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニングを計画してきたが、昨年度までに特定の変異種に対するマス・スクリーニング方法を確立し、その試行にも成功した（昭和57年度研究報告書113頁参照）。しかしながらこの成果をさらに発展させて、ヘモグロビン変異種を対象とするモニタリングに結びつけるには、どうしても発見された変異種の構造決定が必要である。しかも、方法論的には従来の構造決定法と較べてはるかに感度、精度ともに高い方法が要求され、いずれは沱紙乾燥血をそのまま試料として構造決定しうる方法の開発が大きな目標である。この要求に応えうる技術は現在のところ限られており、その一つはわれわれ自身の開発した質量分析を用いる構造解析法である¹⁾²⁾。

今年度は、この方法を用いて昨年度の試行で見出された構造未知の γ 鎖変異種の構造解析をおこなうとともに、沱紙乾燥血をそのまま試料とする構造解析法の可能性について検討をおこなった。

試料および方法

昨年度実施された新生児ヘモグロビン変異種マス・スクリーニングの試行により発見されたヘモグロビン変異種を有する新生児のうち、当大阪府立母子保健総合医療センターで出生した新生児の静脈血（1ml），および変異種の存在の確認されている沱紙乾燥血を試料とした。

型のごとく溶血し、変異種は DEAE-セルローズ、異常グロビン鎖は CM-セルローズを用いてそれぞれ分離精製し、アミノエチル化後トリプシン消化をおこない、その消化物をそのまま試料として分子2次イオン質量分析法³⁾により構造解析をおこなった。

研 究 成 績

(1) 異常ヘモグロビンのクロマトグラフィー

この異常ヘモグロビンは、DEAE-セルローズカラムにより容易に分離され、図1のごとく

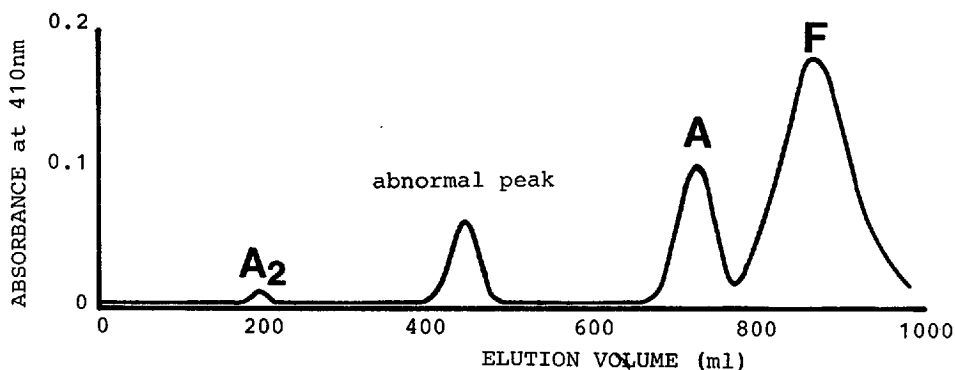


図1 患者溶血液の DEAE-セルローズカラムクロマトグラム

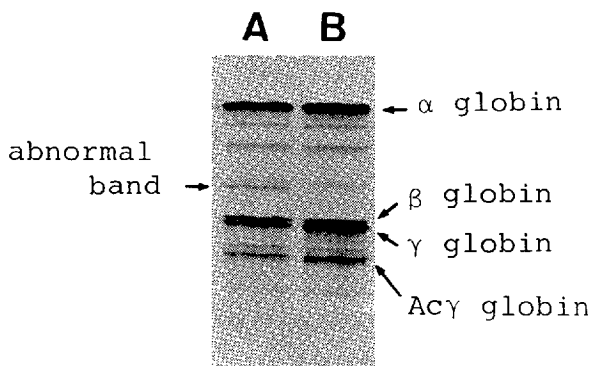


図2 患者(A)および正常人(B)溶血液を試料とするグロビン鎖の等電点電気泳動
Ac γ globin: N-アセチル化 γ 鎖

HbA₂ と HbA の間に溶出される。

(2) 異常グロビンの等電点電気泳動

8 M 尿素およびアンフォライト (pH 5-8) 添加アクリルアミドゲル平板による等電点電気泳動をおこなうと、図2のごとく、異常グロビンは正常 α 鎖と非 α 鎖(β および γ 鎖)の間に出現し、その等電点は非 α 鎖より一電荷高い所にある。

(3) 異常グロビントリプシン消化物のマス・スペクトラム

図3は、グロビン鎖のトリプシン消化混合物の分子2次イオンマス・スペクトラムを示したもので、各トリプシン消化ペプチドは陽イオン化分子イオン ($M+H$)⁺ のピークとして出現する。異常グロビン鎖のマス・スペクトラム(図3-B)は、正常 α および β 鎖のスペクトラム(図示せず)とは明らかに異なり、正常 γ 鎖(図3-A)に酷似していることが明らかになった。表1は、正常 γ 鎖の各トリプシン消化ペプチドの質量数を示したものであるが、質量数500以上のペプチドはすべて図3-A上に見ることができる。この図3-Aおよび-Bを詳細に比較すると、異常グロビン鎖は、T-15G (m/z 1,178) および T-1,2 (m/z 1919) を欠き、 m/z

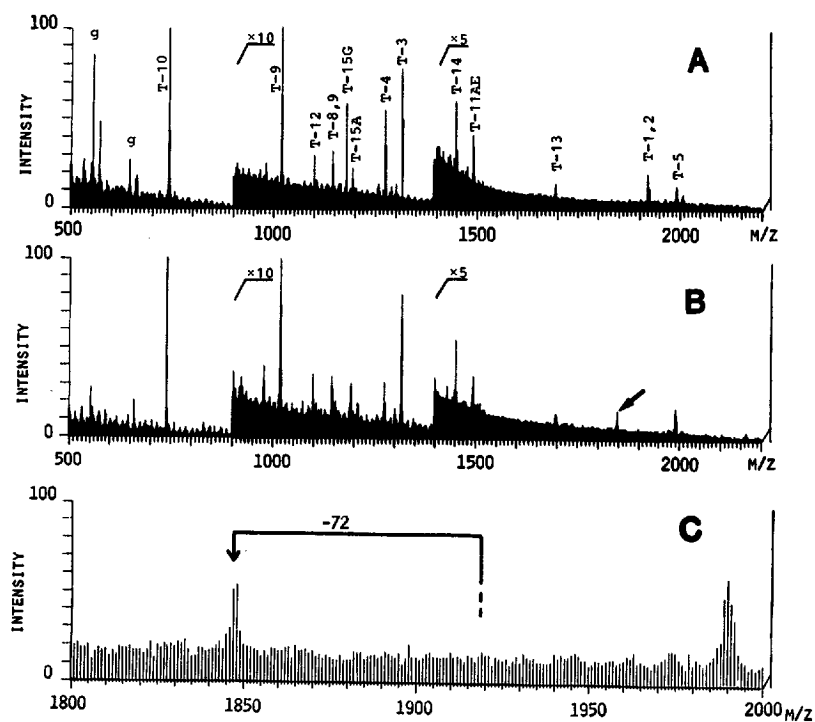


図3 正常 γ 鎖 (A), 異常 Hb の非 α 鎖 (B) および (B) の m/z 1800~2000領域の拡大図
矢印: 異常ピーク

表1 正常 γ 鎖トリプシン消化ペプチドの質量数

Tryptic peptide No.	M_r	Tryptic peptide No.	M_r
1	961	9	1,015*
2	975	8+9	1,143*
1+2	1,918*	10	739*
3	1,315*	11	1,490*
4	1,273*	12	1,097*
5	1,988*	13	1,692*
5ox	2,004*	14	1,448*
6	245	15G	1,177*
7	411	15A	1,191*
8	146	16	318

*: 図3-Aに見出されるペプチド

1847に新しいピークの出現をみた (図3-Bおよび-C)。すなわち、この変異種は、 γ 鎖しかも $A\gamma$ 鎖変異種で、T-1,2 に構造異常を有することが明らかになった。さらに、この変異種が単一アミノ酸置換があるとすれば m/z 1919から m/z 1847への質量数72の減少は、グルタミン酸からグリシン、またはトリプトファンからアスパラギンへのアミノ酸置換の可能性しか

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
A	Gly	His	Phe	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Lys
	718						1218										
B	Gly	His	Phe	Thr	Gly	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Lys
	646						1218										
C	Gly	His	Phe	Thr	Glu	Gly	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Lys
	589						1275										

図4 正常 γ T-1,2 (A), γ 5 Glu→Gly のアミノ酸置換を有する γ T-1,2 (B) および γ 6 Glu→Gly のアミノ酸置換を有する γ T-1,2(C) の各アミノ酸配列
下線の切れ目：ブドウ球菌プロテアーゼの働く場所

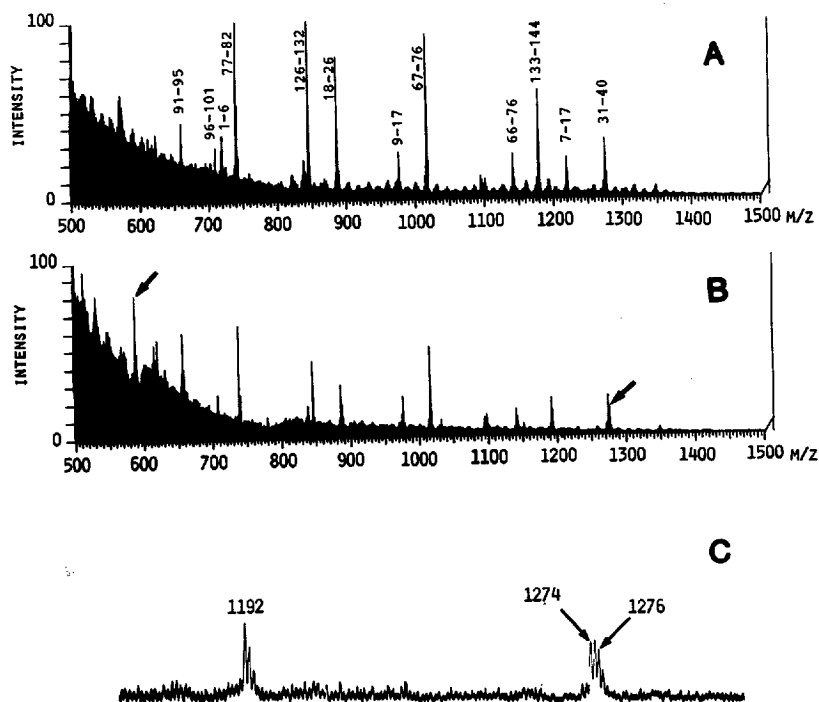


図5 正常 γ 鎖 (A) および異常 γ 鎖 (B) のトリプシン分解後、ブドウ球菌プロテアーゼで処理した消化混合物、および (B) の m/z 1150~1300 領域の拡大図
矢印 (B) : m/z 590 および 1276

ありえない。しかも異常グロビンの等電点は、そのアミノ酸置換がグルタミン酸からグリシンへの置換であることを示している。ところが、正常 T-1,2 には、図4-Aに示すごとく、グルタミン酸残基は、N末端から第5、および第6番目に並んで存在しており、このままではそのいずれがグリシン残基に置換しているのが明らかではない。これを解決するためにわれわれが用いた方法は、

(4) ブドウ球菌プロテアーゼによる限定分解とマス・スペクトラム

この酵素は、グルタミン酸ペプチドを特異的に分解するという性質を有する。これを利用し

て、トリプシン消化した上でさらにこの酵素を働かせると、どちらのグルタミン酸残基がグリシンに置換したかにより大きさの異なるペプチドを生ずることが予測される。すなわち、第6番目のグルタミン酸がグリシンに置換したとすれば、図4-Bのごとく、T-1,2 は m/z 647と1219の2つのペプチドに、また、第5番目で置換がおこっておれば、 m/z 590と1276のペプチドを生ずるはずである。その結果は図5に示す如く、正常 γ -グロビン鎖では m/z 719 (残基番号1~6) および m/z 1219 (残基番号7~17) を示すのに対して (図5-A), 異常グロビン鎖では m/z 590と1276にそれぞれピークがみられる (図5-B)。正常グロビン鎖にも m/z 1270付近にピークがみられるが、これは T-4 (m/z 1274) に由来するもので、図5-Cの如く拡大してみると異常グロビン鎖では m/z 1270付近のピークはこの T-4 と新しく生じた m/z 1276のピークの混じたものであることがわかる。

したがって、この変異種は、 $A\gamma$ 鎖のN末端から第6番目のグルタミン酸がグリシンに置換した新しい γ 鎖変異種であることが確定し、これを HbF Izumi と名付けた³⁾。

考 案

ここに詳述した成績は、1 ml という少量ではあるが、あくまで患児から採血した全血を出発点として構造決定に成功したものである。出発点を沕紙乾燥血におきかえた場合に果してどうであろうか？ 予備的な実験結果では決定的な障害はなく見通しは明るい。ただし、今回の変異種のごとく、特定のペプチドの中に同じアミノ酸残基がいくつかあり、そのいずれが置換しているかというような場合にはなお試料の絶対量に問題が残りそうであるが、これも高速液体クロマトグラフィーを組合せることにより解決の見通しはついている。

むしろこのヘモグロビン変異種のマス・スクリーニングを本格的な変異源物質のモニタリングにまで発展させる上での障害は、異常新生児の両親との接触に関する各方面、とくに行政の壁である。今後、この問題についての理解を深めることに全力をつくしていきたい。

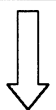
文 献

- 1) Wada, Y., Hayashi, A., Fujita, T., Matsuo, T., Katakuse, I. and Matsuda, H. : Biochim. Biophys. Acta, **667** : 233, 1981.
- 2) Matsuo, T., Matsuda, H., Katakuse, I., Wada, Y., Fujita, T. and Hayashi, A. : Biomed. Mass Spectrom., **8** : 25, 1981.
- 3) Wada, Y., Hayashi, A., Fujimura, M., Katakuse, I., Ichihara, T., Nakabushi, H., Matsuo, T., Sakurai, T. and Matsuda, H. : Biochim. Biophys. Acta, **749** : 244, 1983.



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



現在,わが国で全国的規模で実施されている新生児先天性代謝異常マス・スクリーニングに用いられる炉紙乾燥血の有効利用の端として,新生児ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニングを計画してきたが,昨年度までに特定の変異種に対するマス・スクリーニング方法を確立し,その試行にも成功した(昭和 57 年度研究報告書 113 頁参照)。しかしながらこの成果をさらに発展させて,ヘモグロビン変異種を対象とするモニタリングに結びつけるには,どうしても発見された変異種の構造決定が必要である。しかも,方法論的には従来の構造決定法と較べてはるかに感度,精度ともに高い方法が要求され,いずれは炉紙乾燥血をそのまま試料として構造決定しうる方法の開発が大きな目標である。この要求に応えうる技術は現在のところ限られており,その一つはわれわれ自身の開発した質量分析を用いる構造解析法である。

今年度は,この方法を用いて昨年度の試行で見出された構造未知の γ 鎖変異種の構造解析をおこなうとともに,炉紙乾燥血をそのまま試料とする構造解析法の可能性について検討をおこなった。