

# 大阪府における新生児ヘモグロビン 変異種のマス・スクリーニング

分担研究者 林 昭  
和田 芳 直  
藤 田 富 雄  
木 戸 口 公 一  
(大阪府立母子保健総合  
医療センター)

昭和52年以来、わが国では国家事業として5種類の先天性代謝異常症、およびクレチン症について新生児マス・スクリーニングが実施され、現在ではわが国で出生する新生児の98%以上をカバーするに至っている。この数年来、われわれはこのマス・スクリーニングの試料として用いられる沓紙乾燥血の多目的利用に注目していたが、昭和57年、当大阪府立母子保健総合医療センターが新生児先天性代謝異常マス・スクリーニング事業の大阪府における指定機関になったのをきっかけに、新生児ヘモグロビン変異種を対象とするマス・スクリーニングの研究を開始した。

本年度は、すでに本格的作業に入ったマス・スクリーニングの成績とともに、とくに乾燥血を試料とするヘモグロビン変異種の超微量構造解析法のあらましについて報告する。

## 計画のあらまし

この沓紙乾燥血を試料とする計画のあらまちは図1に示すごとくで、2つの流れに大別される。すなわち、その1つはヘモグロビン変異種のマス・スクリーニングであり、他の1つは見出された変異種の1次構造の解析である。この流れは合流して、それぞれの成果をもとに両親についてヘモグロビン変異種を調べるとともに患者について臨床医学的な検査が実施される。

以上の結果は、一方では遺伝疫学的な立場からヘモグロビン変異種を対象とする突然変異のモニタリングに結びつき、他方では遺伝子変異のアミノ酸置換を介する個体への病的な影響の把握につながるもので、これが完全にシステム化されれば、その意義はきわめて大きいと考えられる。

## 試料および方法

### (1) 試 料

現在わが国において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

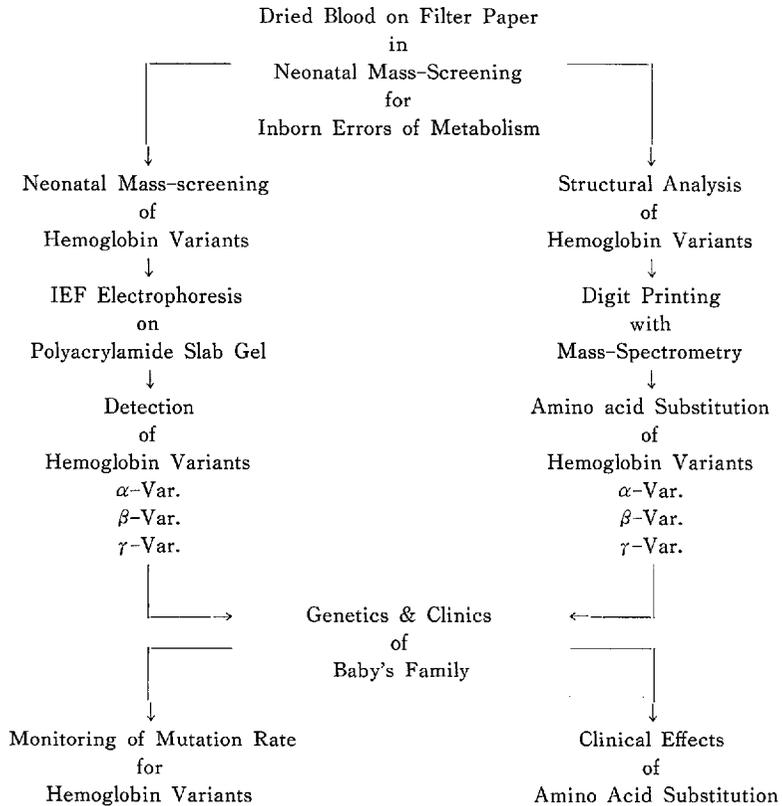


図1 新生児ヘモグロビン変異種のモニタリング計画

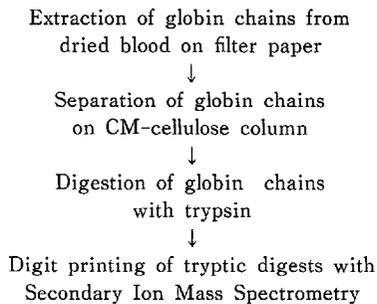


図2 ヘモグロビン変異種の構造解析

グの試料である沔紙乾燥血をそのまま用いた。

## (2) 方 法

1. ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニング：すでに昭和57年度研究報告書<sup>1)</sup>に記載したごとく、8 M 尿素および3%アンホライト含有アクリルアミド平板ゲル上での等電点電気泳動によりおこなう。

2. ヘモグロビン変異種の構造解析：方法のあらまはは図2に示すごとくである。すなわち、まずマス・スクリーニングに用いた濾紙乾燥血の残りを切抜き、8 M 尿素を含む緩衝液によりヘモグロビン蛋白を抽出した後、CM-セルローズカラムクロマトグラフィーにより異常グロビン鎖の分離をおこなう。次いでアミノエチル化後トリプシンで消化し、最後に、トリプシン消化物をそのまま2次イオン質量分析法 (SIMS) により解析する。この質量分析による解析法はわれわれが始めて確立したもので、従来のフィンガープリント法とは異なり各ペプチドが質量数、すなわち数字として表現されるため、とくに digit print 法<sup>2)</sup> と呼んでいる。

## 研究 成 果

### (1) 大阪府における新生児ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニング

昭和57年度の試行に引き続き、昭和58年9月以降大阪府で出生した全新生児について本格的なヘモグロビン変異種のマス・スクリーニングを実施しており、昭和60年1月末現在でその数は70,000人に達した。このマス・スクリーニングの結果見出されたヘモグロビン変異種を有する新生児の数は63人にのぼり、1,100人に1人の割合で見出される。

この63人の内訳は、 $\alpha$ -グロビン鎖変異種14人、 $\gamma$ -グロビン鎖変異種49人で、 $\alpha$ -鎖変異種の頻度は約5,000人に1人の割合であり、従来の報告とほぼ一致していた。また、 $\gamma$ -鎖変異種の方は約1,400人に1人の割合で、従来の報告と比較して著しく高い頻度を示している。

これに対して $\beta$ -鎖変異種は1例も発見されなかったが、その理由として考えられることは、この出生直後の新生児期では $\beta$ -鎖の産生が $\gamma$ -鎖と比較して少なく、見落され易いこと、 $\alpha$ -鎖や $\gamma$ -鎖の修飾、変性物質と泳動上重複するためであると考えられる。

### (2) 見出されたヘモグロビン変異種の構造解析

検出された63例のヘモグロビン変異種について、とくに世界的にも情報量の乏しい $\gamma$ -鎖変異種を目標に解析が進められており、現在までに32例についての解析が終った。その成果のあらまはは表1に示すごとくで、Hb F Yamaguchi が異常に多く32例中22例を占め、次いでHb F Fuchu が3例、Hb F Izumi および Hb F Minoo が各1例となっている。その他試料不足のため最終構造の決定にまで至らなかったものが5例含まれている。

表1 32例のヘモグロビン $\gamma$ -鎖変異種の構造異常

Hb F Yamaguchi	: A $\gamma$ T	80 Asp→Asn	; 22 cases
Hb F Fuchu	: G $\gamma$	21 Glu→Gln	; 3
Hb F Izumi	: A $\gamma$ I	6 Glu→Gly	; 1
Hb F Minoo	: G $\gamma$	72 Gly→Arg	; 1
Hb F —	: A $\gamma$	?	; 3
Hb F —	: G $\gamma$	?	; 2

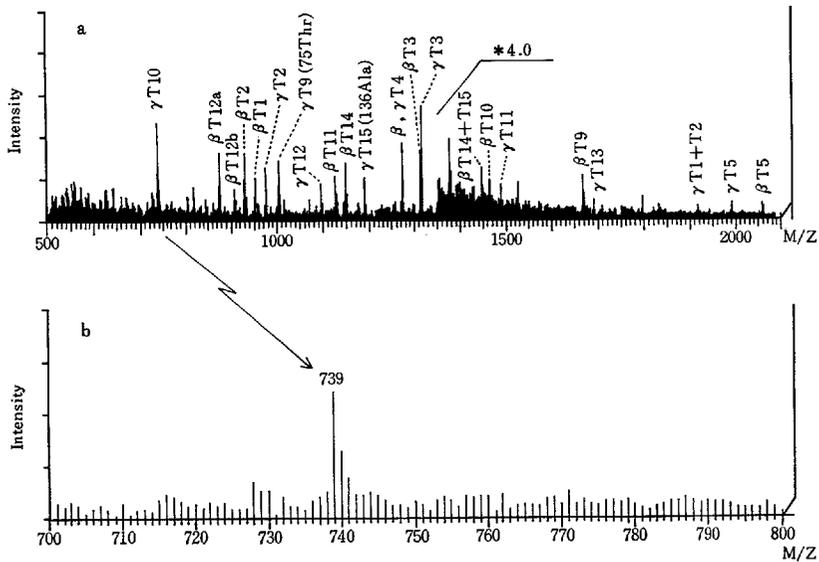


図3  $\gamma$ -鎖変異種の質量分析法による構造解析  
 a : 異常 $\gamma$ -鎖トリプシン消化物の digit print  
 b : 異常 $\gamma$ T-10 の拡大図

図3-aおよび-bには、Hb F Yamaguchi について行われた質量分析法による1次構造解析の結果を示す。すなわち、沓紙乾燥血から抽出したグロビン鎖をCM-セルローズカラムクロマトグラフィーにより $\alpha$ -鎖および非 $\alpha$ -鎖に分離すると、異常 $\gamma$ 鎖は正常 $\beta$ 鎖と重複して溶出される。この異常 $\gamma$ -鎖をアミノエチル化後トリプシン消化して得られるペプチド混合物のdigit printが図3-aである。正常 $\beta$ -鎖が混入しているためかなり複雑であるが、この図の $\gamma$ T-15の質量数は、異常鎖がA $\gamma$ -鎖(N末端から第136番目にアラニン残基を有する $\gamma$ -鎖)であり、またT $\gamma$ -9の質量数は、このA $\gamma$ -鎖がT-多型(N末端から第75番目にスレオニン残基を有するA $\gamma$ -鎖)であることをそれぞれ示している。さらに、 $\gamma$ T-10は、拡大した図3-bからも明らかなように、正常 $\gamma$ T-10(m/z 740)から質量数が1だけずれたm/z 739に存在していることが明らかになった。しかし、その他のペプチドの質量数は完全に正常のペプチドと一致することから、この $\gamma$ T-10が異常ペプチドで、質量数1の変化をともなうアミノ酸置換を有すると考えられた。最終的に、質量数1のずれをきたすアミノ酸置換の組み合わせと、Edman分解法により、図4のごとく、 $\gamma$ -鎖第80番目のアスパラギン酸がアスパラギ

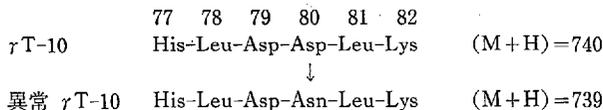


図4 異常 $\gamma$ T-10のアミノ酸置換

ンに置換した構造が決定された。この構造異常を有する  $\gamma$ -鎖変異種としては、すでにわが国で Hb F Yamaguchi<sup>3)</sup> が報告されている。

その他、昨年度報告した Hb F Izumi (A $\gamma$ I 6 Glu→Gly) をはじめ、Hb F Fuchu (G $\gamma$  21 Glu→Gln) および Hb F Minoo (G $\gamma$  72 Gly→Arg) の構造異常が決定されたが、いずれも世界最初の変異種であった。

## 考 按

従来からのヘモグロビン変異種の1次構造の決定は、患者血液から変異種の分離、異常グロビン鎖の精製、アミノエチル化に続くトリプシン分解、異常ペプチドの分離精製、アミノ酸配列およびアミノ酸置換の決定という順序を経て行われる。したがって、この一連の作業を正確に進めるためには、最近かなり微量化されてきたとはいえなお数 *ml* の新鮮血が必要で、生後間もない新生児には大きな負担になるし事実上不可能に近い。しかも両親との接触は行政的にも許されていない。このような状況から、われわれは沓紙乾燥血そのものを試料とするヘモグロビン変異種の超微量1次構造解析法を開発した。これに要する試料は、事実上1 mg 以下であり、ヘモグロビン変異種だけでなくあらゆる変異蛋白の構造解析にも広く応用が可能である。

この超微量構造解析法の開発は、マス・スクリーニングそのものの内容を画期的に向上しつつある。すなわち、われわれの新生児ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニングでは、 $\gamma$ -鎖変異種が1,400人に1人という異常に高い頻度で見出されている。しかし、この内容を1次構造レベルにまで広げて評価すると、実はこの  $\gamma$ -鎖変異種の約70%近くを同一の変異種、すなわち Hb F Yamaguchi が占めていることが明らかになった。このように、特定の変異種に頻度が偏る理由は明らかでないが、構造異常にともなう Hb F Yamaguchi の機能的特徴に関係があるかも知れない。いずれにしても、現在では  $\gamma$ -鎖変異種に関する情報はきわめて乏しいので、今後このような1次構造レベルでの新生児ヘモグロビン変異種のマス・スクリーニングへの期待は大きく、大阪地区だけでなくわが国の他の地区でも、また外国でも同じ基準で実施される日も遠くないと考えている。

## 文 献

- 1) 林 昭, 和田芳直, 藤田富雄, 木戸口公一: 新生児異常ヘモグロビン症のマス・スクリーニング; 方法の確立とその試行, 厚生省「先天異常のモニタリングに関する研究」昭和57年度研究報告書, p. 113~119.
- 2) Wada, Y., Hayashi, A., Fujimura, M., Katakuse, I., Ichihara, T., Nakabushi, H., Matsuo, T., Sakurai, T. and Matsuda, H.: Characterization of a new fetal hemoglobin variant, Hb F Izumi A $\gamma$  6 Glu→Gly, by molecular secondary ion mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **749**: 244~248, 1983.
- 3) Fuyuno, K., Horigoe, T., Ohba, Y., Matsuoka, M. and Miyaji, T.: Survey of cord blood hemoglobin in Japan and identification of the new  $\gamma$  chain variants. *Hemoglobin*, **5**: 139~151, 1981.



## 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



昭和52年以来,わが国では国家事業として5種類の先天性代謝異常症,およびクレチン症について新生児マス・スクリーニングが実施され,現在ではわが国で出生する新生児の98%以上をカバーするに至っている。この数年来,われわれはこのマス・スクリーニングの試料として用いられる炉紙乾燥血の多目的利用に注目していたが,昭和57年,当大阪府立母子保健総合医療センターが新生児先天性代謝異常マス・スクリーニング事業の大阪府における指定機関になったのをきっかけに,新生児ヘモグロビン変異種を対象とするマス・スクリーニングの研究を開始した。

本年度は,すでに本格的作業に入ったマス・スクリーニングの成績とともに,とくに乾燥血を試料とするヘモグロビン変異種の超微量構造解析法のあらましについて報告する。