



Title	Fetal hemoglobin variants in 80,000 Japanese neonates : high prevalence of Hb F Yamaguchi (A γ T80Asp \rightarrow Asn)
Author(s)	和田, 芳直
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36851
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍) 和田 芳直
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 第 8873 号
 学位授与の日付 平成元年10月5日
 学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当
 学位論文題目 Fetal hemoglobin variants in 80,000 Japanese neonates : high prevalence of Hb F Yamaguchi (^Aγ^T80Asp→Asn)
 (日本人における胎児型ヘモグロビン変異種 : Hb F Yamaguchi はきわめて高頻度である)
 論文審査委員 (主査) 教授 岸本 進
 (副査) 教授 志賀 健 教授 和田 博

論文内容の要旨

(目的)

構造変異蛋白質のうちで変異の実態や構造機能関係など最も解明の進んでいるのがヘモグロビン (Hb) である。

Hb 変異種はこれまでに世界で400種以上報告されているが、その変異の内容はほとんどの場合、Hb を構成する 2 種類のグロビンサブユニットのうちの一方における 1 個のアミノ酸置換である。Hb には成人型 [Hb A : $\alpha_2\beta_2$, Hb A₂ : $\alpha_2\delta_2$] と胎児型 [Hb F : $\alpha_2\gamma_2$] があるが、胎児型 Hb 変異種 (正しくは γ 鎖変異種) は40種ほどしか発見されておらず、その頻度に関するデータは少ない。これは胎児型 Hb が生後約 6 ヶ月で全ヘモグロビンの 1 %以下に減少してしまうために、数的にも量的にも多くの試料を集めることが難しいからである。

この論文では γ 鎖変異種に関するこれらの困難を解決するための分析方法の開発と、かつてない大きな規模で実施した胎児型 Hb 変異種スクリーニングの結果を報告する。

(方法ならびに成績)

まず、数的な困難に対しては、代謝異常症等新生児マスクリーニングに使用している乾燥濾紙血液を試料とする異常 Hb 検出法を考案した。即ち、乾燥濾紙血液を 3 mm 径に切抜きメルカプトエタノール 10% を含む 7.5M 尿素溶液中に 1 時間静置する。これでヘモグロビンのサブユニットは互いに解離し、ヘムもはずれる。その溶出液を薄層ポリアクリルアミドゲル (尿素を含む) 等電点電気泳動により分析し、蛋白染色する。115 × 230 mm の薄層ゲル 1 枚で 100 検体、1 日 600 検体以上の分析が可能である。この方法は荷電変化を持つ変異種を移動度の違いによって検出するのであるが、尿素によってグロビンはそ

の高次構造を失っているので、移動度の変化は置換アミノ酸残基の荷電の違いを正確に反映する。

この方法によって80,000人の新生児をスクリーニングしたところ、18人に α 鎖変異種、55人に γ 鎖変異種が見つかった。その頻度はそれぞれ $1/4,444$ 、 $1/1,455$ であった。 α 鎖変異種の頻度は成人を対象とした日本人に関する過去のデータとほぼ一致していた。一方、 γ 鎖変異種の頻度についてはこれまで最大規模の検索に基づくデータを提出できた。

次に、変異種の一次構造解析を行ったが、量的な困難を解決するために、1979年より大阪大学教養部物理学教室との間で共同開発してきた「質量分析による変異蛋白質構造解析法」を用いた。その原理は次のようなものである。蛋白質を構成する20種類のアミノ酸の分子量はロイシンとイソロイシンを除いて互いに異なっている。一方、ペプチド混合物をソフトイオン化法を用いて質量分析すれば、各成分ペプチドの分子量を表わす分子イオンを検出できる。従って、変異蛋白質を酵素などにより分解したペプチド混合物を分析すれば、アミノ酸置換を含む異常ペプチドをその分子量変化によって検知できる。そのうえ、その分子量変化量に相当するアミノ酸置換の組合せは限られているから、正常ペプチドの配列を見ればアミノ酸置換の部位とタイプまで決定できる可能性がある。これは少ない試料で短時間にアミノ酸置換を解析できる方法である。

上記のスクリーニングにおいて γ 鎖変異種を検出したうち36人の乾燥滌紙血液の残りからヘモグロビンを抽出し質量分析法で一次構造解析を行った結果、25人にHb F Yamaguchi、2人にHb F Iwata、4人にHb F Fuchu（新種）、1人にHb F Minoo（新種）、1人にHb F Kotobuki（Hb F Izumi）（新種）を同定した。（残りの3人については未決定）そしてHb F Yamaguchiが日本人においては $1/2,100$ という高頻度であることがわかった。

〔総括〕

この研究は異常ヘモグロビンの新しいスクリーニング法の開発、日本人における γ 鎖変異種の実態解明、質量分析による構造解析手法の実用性の証明という成果をあげた。

論文の審査結果の要旨

胎児型ヘモグロビンは出生後数カ月で成人型ヘモグロビンに置きかわられ激減する。本研究は胎児型ヘモグロビンを特徴づける γ グロビン鎖の変異種の頻度を明らかにする目的で、まず多数検体処理を可能にする検出法を開発し、次に質量分析を用いた新しい手法によってその構造を解析した。その結果、日本人にはHb F Yamaguchiが高頻度に存在することを明らかにし、さらに2種の新しい変異種を発見した。これは胎児型ヘモグロビン変異種の実態に新知見を加えたものである。