



インドネシアに多発するサラセミアの分子疫学ならびに分子遺伝学的研究：ヘモグロビンMサスカートの1例（助成研究報告）

松尾, 雅文
竹島, 泰弘
成田, 奈緒子
プルノモ, スリヤントロ

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 10:151-153

(Issue Date)

1994-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCDOI)

<https://doi.org/10.24546/81007354>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007354>



助成研究報告

インドネシアに多発するサラセミアの分子疫学ならびに
分子遺伝学的研究——ヘモグロビンMサスカートンの1例——

神戸大学医学部附属医学研究国際交流センター

松尾 雅文 (47年卒)

竹島 泰弘 成田 奈緒子

ガジャマダ大学小児科

ブルノモ スリヤントロ

はじめに

サラセミアは血色素の構成成分の2種のグロビン鎖（アルファ鎖とベータ鎖）の合成率に差があるため生ずる。サラセミアは遺伝病であるが、マラリア感染に対してヒトに抵抗性を付与するため、マラリア汚染地帯である東南アジア地域諸国で高頻度に発生している。

一方、異常ヘモグロビン血症に分類されるヘモグロビンMサスカートンはベータグロビン蛋白の第63番目のヒスチジンがチロシンに遺伝的に変化し発症する。1961年にカナダで報告が(3)されて以来我が国をはじめ数ヶ国でその報告がなされてきた。しかし、その報告例は未だ世界で十数例に過ぎない。また、全ての報告はアミノ酸の変化を明らかにしたのみで、遺伝子の解析を行なった例はない。

今回、私達はインドネシアにおけるベータサラセミアの遺伝子異常の分子疫学的研究の過程で、ヘモグロビンMサスカートンと一致した遺伝子変化を有した1例を発見したので報告する。

方法

インドネシアのガジャマダ大学医学部小児科を受診したサラセミア患者より末梢血を採取し、フェノールクロロホルム法を用い、DNAを抽出した。そして、抽出したDNAを材料として、ベータグロビン遺伝子をポリメラーゼチェーンリアクション法（PCR）を用い増幅した。ベータグロビン遺伝子は2052塩基の大きさであるが、これをエクソン1、2および3に対応した3種の領域に分けそれぞれ増幅した（図1）。3セットのプラマーはDNA合成装置を用い合成した。PCRの条件は、94℃変性1分間、60℃アニーリング1分間、72℃DNA合成3分間を1サイクルとして30サイクルのDNA合成を行なった。増幅産物の確認は、2%アガロース電気泳動を行ない、エチジウムブロマイド染色にて行なった。

PCRで増幅したDNA断片をpT7Blue-Tベクター（Novagen）にサブクローニングし、その塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の自動塩基配列決定装置を用い行なった。

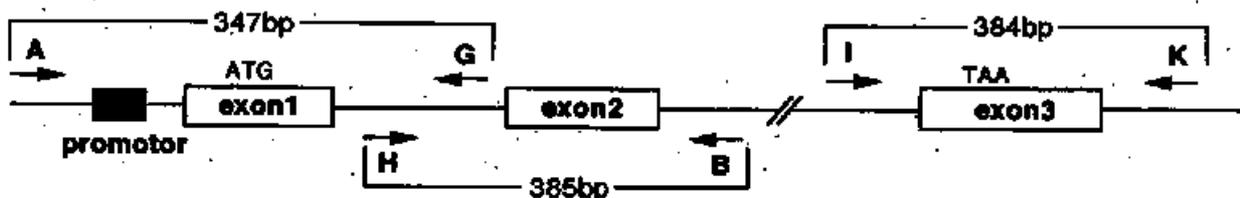


図1 ベータグロビン遺伝子のPCRによる増幅
増幅した領域は5'側から、347bp、385bpおよび384bpのサイズで、プライマーはAとG、HとB、そしてIとKをそれぞれ用いた。各プライマー（A、G、H、B、I、K）の5'位置は、それぞれベータグロビン遺伝子の塩基番号1、347、286、670、1387と1770である。

結果および考察

ベータグロビン遺伝子は11番染色体の短腕に位置し、その大きさは2052塩基で、3エクソンと2イントロからなる。そして、この遺伝子は146個のアミノ酸からなるベータグロビン鎖をコードしている。この遺伝子上に発見された異常は100種以上が報告されている。その異常部位は蛋白質の情報を記憶しているエクソンに限らずイントロンの配列の異常も少なからず報告されている。これらの遺伝子異常は、その表現型の違いにより大きくサラセミアと異常ヘモグロビン血症に分類される。

サラセミア多発地帯である東南アジア諸国では、タイを中心としてベータサラセミア患者の遺伝子解析が行なわれ、各地域において発見される遺伝子異常の種類が異なっていることが明らかにされてきた。各地域それぞれに比較的高頻度に発見される遺伝子異常の種類が限られていることから、サラセミアの発症に何らかの創始者効果の存在が示唆されている。

一方、インドネシアでもサラセミアが多発していることが知られており、これらの患者のベータグロビン遺伝子に発見される異常は他の民族と異なっていることが推測される。

また、私達の大まかなサラセミア患者の発症頻度の地域毎の分布調査でも、インドネシア国内においてさえその頻度が大きくことなることを示唆する結果を得つつある。そこで、インドネシアでのベータグロビン遺伝子の異常を明らかにするため、サラセミア患者の遺伝子の異常の解析をおこなった。その結果、ベータグロビン遺伝子の塩基配列を解析したサラセミア症例の中に、極めて特異なベータグロビン遺伝子の異常を見いだした。

本患者では、血液より抽出したDNAからPCRにより増幅された3種のDNAのサイズには異常は認められず、大きな遺伝子異常の存在は否定された(図2)。ところが、これらの増幅DNAの塩基配列を解析したところ、エクソン1および3の領域に一致する増幅断片には異常は発見されなかったが、エクソン2の領域に

一致する増幅産物の塩基配列に異常を見いだした。その異常は、ベータグロビン遺伝子の塩基番号472が本来シトシン(C)であるのに対し、患者ではチミン(T)に変化する1塩基置換がみられた(図3)。この塩基配列の異常は、塩基配列を決定した7クローン内の4クローンで認められた。残りの3クローンでは正常と同じ配列が見られた。このことは、この遺伝子の異常が2つの染色体に存在する遺伝子のなかの片方のみが存在することを示し、患者がこの遺伝子異常のヘテロの個体であることを示した。この塩基置換は、アミノ酸を指令する3塩基コドンからCATからTATに替え、63番目のアミノ酸のヒスチジンをチロシンに変える結果となった。

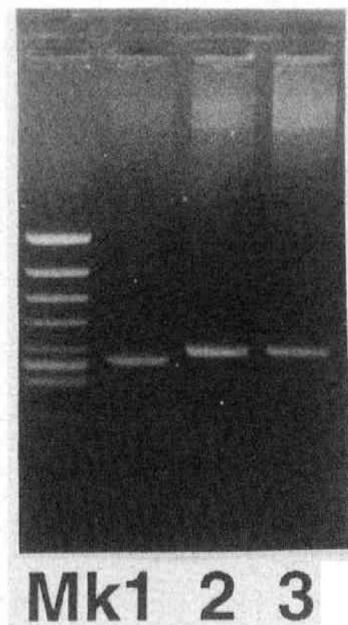


図2 PCRによる遺伝子増幅断片患者DNAから増幅した3種の増幅産物の電気泳動結果。各レーン(1, 2, 3)に夫々、347bp, 385bpおよび384bpの増幅DNAバンドが明瞭に認められる。

このヒスチジンからチロシンへのアミノ酸の変化(His63Tyr)はヘモグロビンMサスカトーンとしてすでにカナダで報告されているものと一致した。しかし、文献的に調べると、いままでのヘモグロビンMサスカトーンの報告はいづれもベータグロビンのアミノ酸の解析から同定

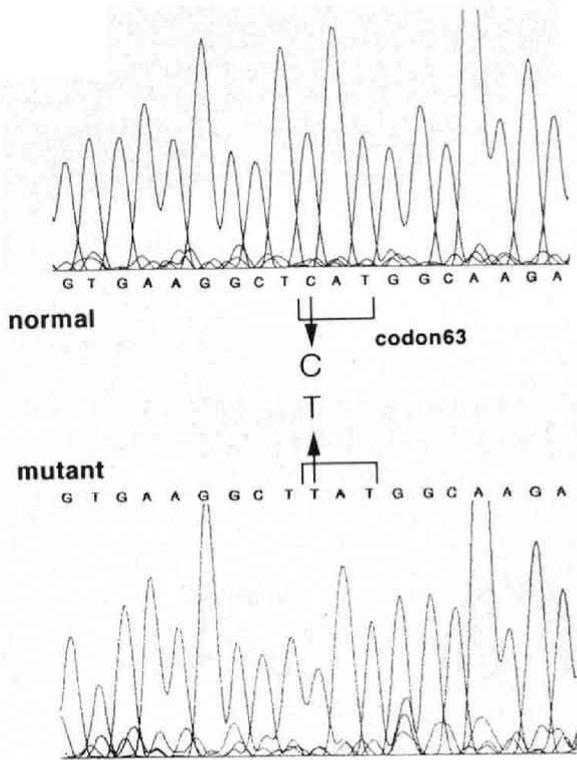


図3 ベータグロビン遺伝子の塩基解析結果
正常で GCTCATG となっているが、患者では GCTTATG となっており、第473番目の塩基のCがTに変化していた。

されたもので、DNA レベルでこのアミノ酸異常を同定した報告は見られず、これが最初の報告と考えられる。

ヘモグロビンMサスカトーンの報告の見られた国を調べると、カナダ(3, 6)を初めとし

て日本(4)、アルジェリア(1)、アメリカ(2)などがある。しかし、サラセミア多発地帯である東南アジア諸国において発見された初めての例である。このことは、このヘモグロビンMサスカトーンが必ずしもサラセミアの発生と結びつくものでないことを示した。私達は、赤血球膜蛋白の1種であるバンド3蛋白の遺伝子異常の解析の結果、東南アジア地域一円に同じ遺伝子の異常が広く分布していることを明らかにした(5)。これは、ヒトの移動とともに同じ遺伝子変異が広く分布したことを示し、今回報告したヘモグロビンMサスカトーンも東南アジア諸国で発見される可能性が強く示唆された。

文 献

- 1) Arbane-Dahmane, M; et al. (1985)
Hemoglobin 9 : 509-511.
- 2) Baine, R.M. et al. (1980)
Hemoglobin 4 : 201-207.
- 3) Gerald, P.S. et al. (1961); Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 47 : 1758-1767.
- 4) Nagai, M., et al. (1989);
Biochemistry 28 : 2418-2422.
- 5) Takeshima, Y. et (1944) Jpn. J.
Hum. Genet. 39: 181-185.
- 6) Vella, F. et al. (1974) Clin.
Biochem. 7 : 186-191.