

赤血球膜蛋白 protein 4.2 異常症の病態分析と病因解析に関する研究

賀来万由美

赤血球膜蛋白 protein 4.2 (P4.2) 異常症は、先天性溶血性貧血の原因となり得る事、そして、このP4.2異常症は日本人に多いという特徴が知られている。そこで、P4.2分子異常症を集積、分類し、その遺伝子解析を通じて得られる特徴を検索することとした。本研究では、先天性溶血性貧血80家系、179例を電気泳動法を用いて膜蛋白定量を行い、このうち臨床的に優性遺伝が確定されなかった球状赤血球症 (non-autosomal dominant hereditary spherocytosis (non-AD HS)), 表現型がHSとは異なるP4.2完全欠損症、P4.2 doublet等のP4.2異常症を、電気泳動所見上4型に分類した。このうち25症例についてP4.2及びその結合蛋白であるband 3の遺伝子解析を行い、P4.2異常症の病因遺伝子の同定を試みた。その結果、まずP4.2の質的異常症に関しては、異常蛋白を発現するtypeのP4.2 doublet Nagano 症例 (72/74 kD) においてP4.2遺伝子のR488Hが同定され、その病因となることが示唆された。次に、P4.2の量的異常に関しては、中等度~高度P4.2欠損症では、band 3遺伝子に病因を有する (実例: Band 3 Fukuoka: G130R) 事が多く、またP4.2の完全欠損症では、P4.2遺伝子の点変異、すなわちNippon type (A142T) がその実例であることが判明した。軽度P4.2欠損症では、その病因をP4.2又はband 3遺伝子に持たず、他の膜蛋白分子異常によってP4.2が二次的に欠損したものと推定された。

(平成10年10月27日受理)

Genotypic and Phenotypic Analyses of Protein 4.2 Anomalies

Mayumi KAKU

Anomalies of red cell membrane protein 4.2 (P4.2) have been considered in the possible pathogenesis of congenital hemolytic anemias. These P4.2 anomalies have been discovered almost exclusively in the Japanese population. In this study, the P4.2 anomalies which were found in patients with congenital hemolytic anemias were based on the results of protein chemistry and gene analysis. The P4.2 anomalies were identified by quantitative membrane protein analysis from 179 patients in 80 kindreds with congenital hemolytic anemias. Regarding P4.2 anomalies, patients with hereditary spherocytosis of non-autosomal dominant inheritance, P4.2 complete deficiencies, and P4.2 doublet Nagano were detected. These cases were divided into two type; i.e., (1) a qualitative anomaly (P4.2 doublet Nagano), and (2) a quantitative anomaly. The latter was further classified into three subgroups; i.e., (a) complete deficiency, (b) moderate~severe

deficiency, and (c) mild deficiency. To elucidate the pathogenesis of these disorders, gene analyses were carried out on the P4.2 gene and the band 3 gene in 25 patients with P4.2 anomalies.

In the qualitative P4.2 anomaly, a point mutation (R488H) was identified on the P4.2 gene in P4.2 doublet Nagano, in which abnormal proteins (72/74kD) were detected by protein chemistry.

In the quantitative P4.2 anomalies, mutant genes were detected; i.e., (1) Band 3 Fukuoka (G130R) in the patients with moderate to severe P4.2 deficiency, and (2) a P4.2 mutation of the Nippon type (A142T) in patients with complete P4.2 deficiency. No mutations were detected in patients with mild isolated deficiency of P4.2. Therefore, it was concluded that P4.2 abnormalities were derived from qualitative and quantitative anomalies detected by protein chemistry and molecular biology. (Accepted on October 27, 1998) *Kawasaki Igakkaishi* 24(4): 243-260, 1998

Key Words ① Erythrocyte membrane ② Protein 4.2 ③ Gene analysis
④ Band 3 ⑤ Membrane protein anomalies

はじめに

赤血球膜蛋白 protein 4.2 (P 4.2) は、電気泳動上 72 kD の分子量を持つ basic protein である¹⁾。また、integral protein と peripheral protein の両性質を有し²⁾、脂肪酸を結合する³⁾ 特異な性質を持つ。機能的には band 3 蛋白に結合し、ankyrin と共に骨格蛋白に対しアンカー的役割を有する¹⁾。

P 4.2 遺伝子は遺伝子座を 15 q 15-q 21 に置き、13 の exon から成り、その mRNA は 7 つの isoform を有している。SDS-PAGE 上検出される 72 kD 蛋白をコードする P 4.2 遺伝子は Type II と呼ばれ、P 4.2 遺伝子の exon 1 の 90 bp を alternative splicing によって欠いている。このほかにも exon 3, 5 が splicing を受けた型が検出され、どの exon の splicing も受けず全長をコードする Type I、前述の Type II の他に Type VII までの型に分類されている^{2), 4)}。

この特徴的な性質をもつ P 4.2 の異常症は先天性赤血球膜異常症の病因の一つと考えられており、その頻度は欧米人に比べて日本人に多い²⁾。この代表的な疾患として P 4.2 完全欠損症と、常染色体優性遺伝形式を示す遺伝性球状赤血球症 (hereditary spherocytosis: HS) で見ら

れる band 3-P 4.2 複合欠損症とが知られており⁴⁾、病因遺伝子が多数報告されている。また、我が国の先天性赤血球膜異常症全体から見た P 4.2 異常の頻度及び疾患特異性についても明らかにされている⁵⁾。ところで、HS には常染色体優性遺伝 (autosomal dominant: AD) 型を示す症候群と、非 AD (non-AD) 型 HS として常染色体劣性遺伝 (autosomal recessive: AR) 型を示す症候群、さらにいわゆる孤発群の存在が知られている。そこで本研究は、すでにほぼ病因遺伝子が解明されている AD 型-HS を除いた、non-AD 型 HS 症例およびその他の P 4.2 異常症を対象として P 4.2 異常を蛋白生化学的、分子遺伝学的に検索することにした。

対 象

当教室で経験した溶血性貧血症例から、先天性赤血球膜異常症: 80 家系、179 症例を選び、本研究の対象とした。また、膜異常症の診断は、臨床血液学的所見、赤血球膜蛋白電気泳動、膜脂質測定、Na 膜輸送能、走査電顕による赤血球形態などによった。なお、HS において溶血性貧血の遺伝歴が、臨床血液学的もしくは問診上明らかでない場合には non-autosomal dominant (non-AD) 型と表記した。

方 法

1. 赤血球膜蛋白 (ghost) の調製

Ghost の調製は Dodge らの方法⁶⁾ に準じたが、protease inhibitor として ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) と phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を溶血用緩衝液 (lysing buffer) に加えた。赤血球を 0.9% NaCl 溶液で 3 回洗浄後、1 容積の packed cell に対して 30 容積の lysing buffer [5 mmol/l Na_2HPO_4 , 1 mmol/l EDTA, 0.2 mmol/l PMSF (pH 8.0)] を用いて低張溶血を行った。10 分間、4℃ にて静置した後、遠心 (30,000 × g, 10 分, 4℃) し、ヘモグロビン成分から赤血球膜蛋白成分を分離し、上清のヘモグロビン成分を吸引除去した。この操作を 5 ~ 8 回繰り返すことにより、いわゆる白色 ghost を得、これを赤血球膜蛋白試料として以下の研究に使用した。

2. 赤血球膜蛋白の分離と定量

各赤血球膜蛋白分画の分離・同定は Fairbanks 法⁷⁾ (3.5 ~ 17 % exponential gradient gel : アクリルアミド容量比 3.5% : 17% = 35 : 8) による SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を用いた。各膜蛋白分画の同定は SDS-PAGE 泳動後、ゲルを coomassie brilliant blue R-250 で染色し、乾燥後、Protein + DNA Image Ware Systems (PDI-Toyobo Co., Tokyo, Japan) にて行った。各膜蛋白分画の定量法は、全膜蛋白分画 (band 1 ~ 7 分画の総和) に対する各膜蛋白分画と、 α -spectrin 分画 (band 1) もしくは band 3 分画に対する各膜蛋白分画の相対比を百分率として表し、最終的にそれら二者の平均値を各膜蛋白分画量とした。

電気泳動に用いる赤血球膜蛋白量は 25 μg /lane とし、蛋白濃度の測定は、Lowry 法⁸⁾ に基づく DC Protein Assay Kit (Bio Rad, CA) を使用し、655 nm で測定した。なお、標準曲線はウシ血清アルブミンを使用した。

3. Western blot 法による P 4.2 の同定

Western blot は Towbin らの方法⁹⁾ に従った。赤血球膜蛋白を Laemmli 法¹⁰⁾ による SDS-PAGE にて分離後、nitrocellulose membrane (BIO-RAD, CA) に 60 V, 2 時間で転写した。一次抗体として affinity 精製されたウサギ抗ヒト P 4.2 抗体 (epitope : exon 2, Asn²³ ~ Thr⁴⁰) を反応させ、標識二次抗体としてビオチン化ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体を反応させた。発色は Vectastain ABC Kit (Vector laboratories, Inc., CA) を用いた。

4. 白血球からの genomic DNA 抽出

ヘパリン加末梢血から buffy coat を採取し、0.9% NaCl 溶液で 3 回洗浄した。Poncz らの方法¹¹⁾ に従い、溶血試薬液 (0.131 mol/l NH_4Cl , 0.9 mmol/l NH_4HCO_3) を加え、赤血球を溶血させた後、白血球分画に STE 溶液 [0.1 mol/l Tris, 0.1 mol/l NaCl, 20 mmol/l EDTA (pH 7.5)] 9.5 ml, 10% SDS 0.5 ml, proteinase-K (10 mg/ml) 50 μl を加え、37℃ 1 晩静置した。等量の 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0) 飽和フェノール溶液を加え、フェノール層を除去後、クロロホルム (1/25 容積のイソアミルアルコール加) を等量加え、水層を回収し、3 mol/l sodium acetate (pH 5.2) を 1/10 容積を加え、エタノールで DNA を沈殿させた。70% エタノールで洗浄後、TE 緩衝液 [10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA (pH 8.0)] に溶解させ、試料とした。

5. 網赤血球からの total RNA の抽出

Total RNA の抽出は Goossens らの方法¹²⁾ に従い、全血を 0.9% NaCl 溶液で 4 回洗浄し、上清を除き、血球の 5 倍容積の 0.144 mol/l NH_4Cl と、dithiothreitol (DTT) 溶液を最終濃度が 3 mmol/l となるように加え、その 1/10 容積の 1 mol/l NH_4HCO_3 を加え、30 分間静置して赤血球を溶血させた。なお、原法では NH_4HCO_3 は 10 mmol/l であるが、溶血効率を高めるために 1 mol/l を使用した (J Delaunay 教授私信)。遠心 (3,500 rpm, 10 分) により白血球分画を除去し、上清の赤血球溶血液に、1/10 容積の 1.5 mol/l sucrose-0.15 mol/l KCl 溶液を加え、赤血球膜分画を遠心 (4,200 rpm, 60 分) 分離後、

上清を回収した。上清に10%酢酸を滴下して pH 5.15とし、遠心 (4,200 rpm, 40分)により、total RNA を沈殿回収した。その total RNA を溶解液 [0.1 mol/l Tris-HCl (pH 9.0), 0.1 mol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0.5% SDS] 0.5 ml に可溶化し、フェノール/クロロホルム抽出を行った。1/20容積の 3 mol/l sodium acetate (pH 5.2) 溶液を加え、2.3倍容積のエタノールを加えた後、一晚静置 (-20°C) 後、遠心 (14,500 rpm, 10分) して沈殿を回収し、70%エタノールで2回洗浄後、total RNA を H₂O に溶解し、試料とした。これらの操作はすべて 4°C で行い、使用する試薬はすべて 0.1% ピロ炭酸ジエチル (diethyl pyrocarbonate : DEPC) 処理を行った。

6. cDNA の調製と polymerase chain reaction (PCR)

cDNA の調製は、First Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech, USA) を用いて行った。即ち、65°C, 10分間熱処理後、急冷した total RNA 5 µl を 15 µl を反応系に加え、primer として 0.2 µg の random hexadeoxynucleotide を加え、37°C, 1時間加温した。

Template として cDNA を用いた場合には、PCR 反応系の全容量は 50 µl とする一方、

genomic DNA の場合では 25 µl とした。前者では、total RNA に換算して 0.5 µg 相当の cDNA を用い、後者では、genomic DNA を 0.2 µg 用いた。遺伝子の増幅は、両者とも primer は 0.2 p mol/µl, AmpliTaq Gold™ (Roche Molecular Inc., USA) を 0.03 U/µl を用い、GeneAmp PCR™ system (model 2400, Perkin-Elmer Co., USA) で、denaturation 95°C, 45 sec, annealing 55°C, 20sec, extension 72°C, 45 sec, 30~33 cycle の条件で行った。

7. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法

SSCP は Orita らの方法¹³⁾ に準じたが、以下の点を改良した。a) 電気泳動緩衝液：原液 61.4 mmol/l Tris, 89 mmol/l borate, 2.5 mmol/l Na₂EDTA (pH 7.9) を作成し、使用に際しては原液の 0.6 倍濃度で用いた。b) 電気泳動条件：300 V, 1時間, 500 V, 1時間, 700 V, 8 W を上限とし、14~16時間で、電気泳動板温度は 20~25°C で行った。c) ゲルサイズ：50cm 高×17 cm 幅, 0.4~1.2 mm の wedge spacer を用いた。d) 試料の調製：変性試薬 [47.5% formamide, 15 mmol/l EDTA, 20 mmol/l Tris (pH 8.0), 0.025% bromophenol blue, 0.01% xylene

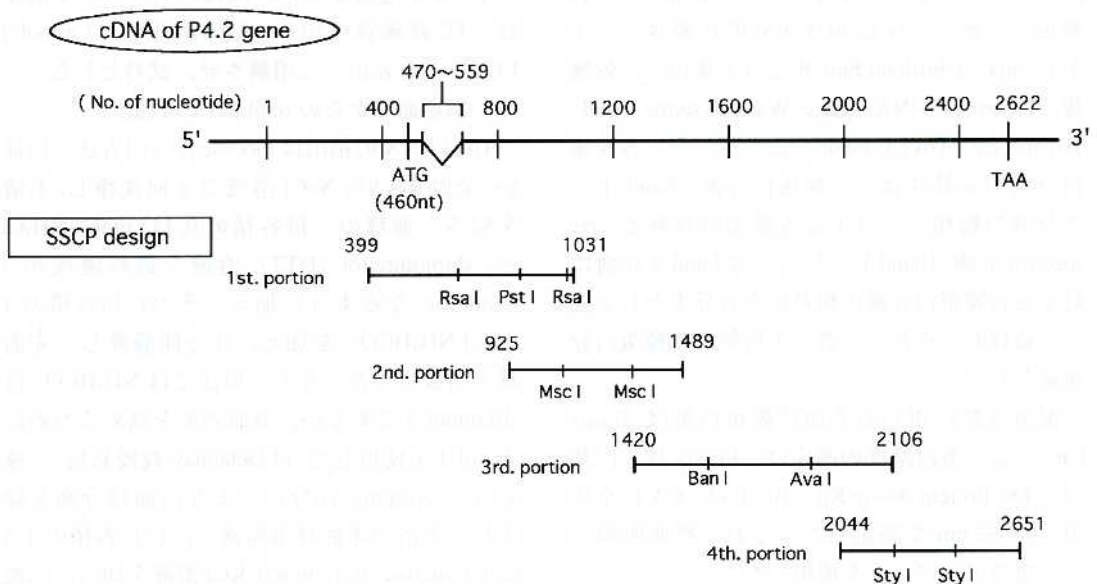


Fig. 1. Design for SSCP analysis for protein 4.2 cDNA.

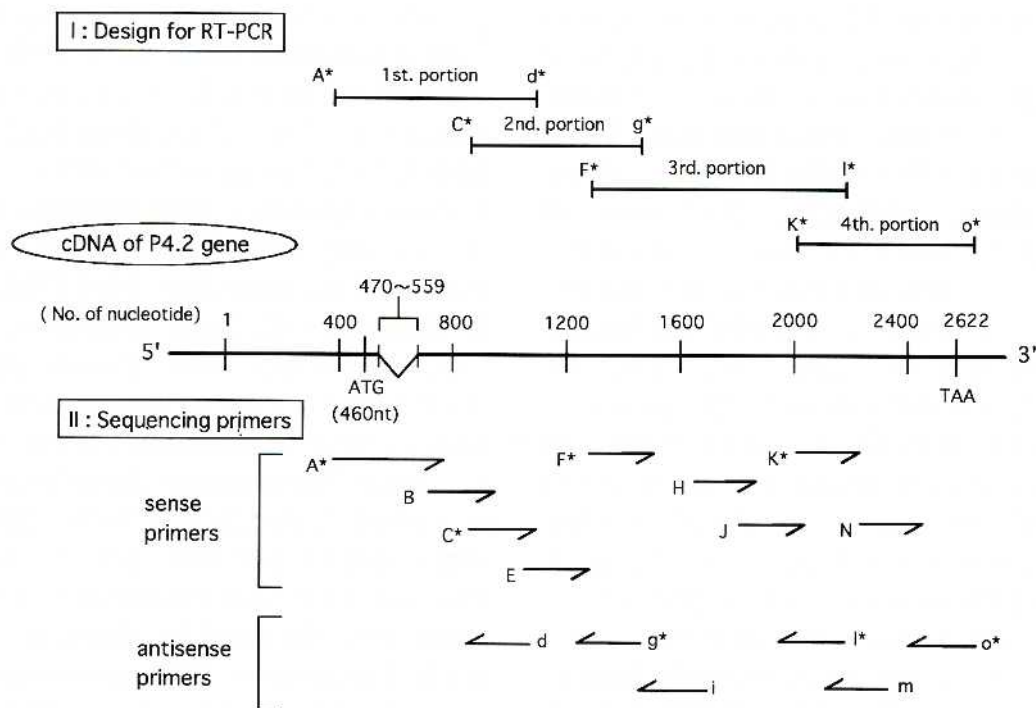


Fig. 2. Design for RT-PCR and sequencing primers for protein 4.2 cDNA.

Table 1. List of RT-PCR and sequencing primers for protein 4.2 cDNA.

primer	position (nt)	Tm (°C)	annealing (°C)
A* : AAGCAACAGTTTGAGAGAGG	:399-418	53.2	58
B : GCCCTCACTGCACAAACT	:727-744	55.6	58
C* : AGGAAGCAACTCCTCTTGG	:925-943	55.5	58
d* : TTCAACAAGTACTCCATGCG	:1012-1031	55.8	58
E : AAGGACAAGCAGGTAGAG	:1141-1158	48.4	58
F* : ACGTTTGCCCTCAGCACAGG	:1420-1438	60.8	62
g* : GAAGTCCCTCCTCATTATAG	:1470-1489	49.0	58
H : GGTCAGAGCAGTCAAGGAGG	:1650-1669	58.4	64
i : CCTCCTTGACTGCTCTGACC	:1650-1669	58.4	64
J : GAGAGGGACATCACTCAGAA	:1832-1850	53.5	58
K* : AATCACAGTGAGCAGGA	:2044-2063	48.0	58
l* : GTTGTAGTGTACAGCCTGG	:2088-2106	49.7	58
m : AGTCTAAGGAAGGTGTTCTCG	:2220-2240	53.8	60
N : TCTGAATCCAACCTTAGCTG	:2260-2279	54.4	58
o* : AGGAGAGTGGTGATAGAGC	:2633-2651	49.9	58

Tm: melting temperature

* : sequencing / RT-PCR primer

cyanole FF] 16 μ l に対し PCR 産物を 2 μ l 加え、100°C、10分間熱処理後、急冷した。泳動試料は 4 μ l (2~4 ngDNA) を用いた。e) 遺伝子

の検出には Bassam らの銀染色法¹⁴⁾を行った。

8. Protein 4.2 遺伝子の PCR/SSCP 解析

P 4.2 遺伝子 mRNA の解析は、その遺伝子の全 coding region を含む 2265 bp を 4 分画に分け reverse transcriptase (RT)-PCR を行い、増幅遺伝子を制限酵素で消化後、SSCP 法を行った。制限酵素反応は、20 μ l 系、約 75~100 ng DNA に対し、Msc I は 3 U、他の酵素は 10~20 U 使用し、至適温度にて 2 時間孵置した (Fig. 1)。

Genomic DNA では、459 bp の promoter 領域と 13 個の各 exon について解析した。Exon 領域の解析は、基本的には Takaoka ら¹⁵⁾ の primer を使用したが、exon 3 で

は sense primer : J5, antisense primer : K3 を用い¹⁶⁾, また exon 10 では exon を 2 分割し, 5' 側前半領域の antisense primer として primer-I* を, 3' 側後半領域の sense primer として primer-K を用いた (Fig. 2, Table 1). Promoter 領域は, 全体を 3 分割し以下の primer で解析した. Sense および antisense primer の順に,

(a) : 5'-TGG ATA TGG GAC TCC TGT TTG -3' (1~21 nt), 5'-TAC TGG GAG TAA CCC TGT TC-3' (216~234 nt), (b) : 5'-GGC TTC TCT AGT TGG CAG G-3' (120~138 nt), 5'-ACT ACT CCT GTG AGC ACC C-3' (288~306 nt), (c) : 5'-CAG GGT TAC TCC CAG TAA CTG G-3' (219~240 nt), 5'-CAT ACA GTC CAG CAA GCC CTG TC-3' (489~511 nt) (塩基番号は Korsgren ら¹⁷⁾の表記に基づいた).

9. Band 3 遺伝子の PCR/SSCP 解析

20個の全 exon と 482 bp の promoter 領域について genomic DNA を用いて Table 2 に示す primer と PCR 条件で解析した (塩基番号は Sahr ら¹⁸⁾の表記に基づいた.). なお, exon 7, 8, 19 では PCR の standard buffer に最終濃度として以下に示す formamide と MgCl₂ を加えた. Exon 7 : 2.5 mmol/l MgCl₂, exon 8 : 1% formamide, 2.5 mmol/l MgCl₂, exon 19 : 2 mmol/l MgCl₂ (塩基番号は Tanner ら¹⁹⁾の表記に基づいた).

10. クローニングとシーケンシング

クローニングには TA Cloning Kit (Invitrogen, CA) を用いて行った. 即ち, 増幅した DNA fragment を直接 pCRTM II vector へ T4 ligase (4 Weiss units) で, 14°C, 16時間孵置し組み込んだ. それを calcium 法²⁰⁾で competent cell (INV αF') を形質転換した. 2% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) を含む LB プレート [LB 培地 1 L : tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, bacto agar 15 g, ampicillin 50 mg (pH 7.0)] に塗布し, 37°C, 1晩孵置後, 白色コロニーを採取した. LB 培地で振盪 (225 rpm) しながら 37°C, 16時間培養し, plasmid を Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA) で回収・精製した.

シーケンスは Ampli CycleTM Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて 4 クローンを検討した. RT-PCR 法による P4.2 と band 3 遺伝子のシーケンスには, Figure 3 および Table 3 に示した primer を用いて解析した. 100 fmoles の plasmid に, primer を 18 p moles と, [^{α-33}P], deoxy-ATP (74 kBq, NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA) を加えて標識した (denaturation 95°C, 30 sec, annealing 58°C, 15 sec, extension 72°C, 30 sec, 22 cycle). 試料は 6% アクリルアミドゲル [8 mol/l urea 加 0.1 mol/l Tris-borate-20 mmol/l EDTA 緩衝液 (pH 8.3) / Sequagel Sequencing System : National Diagnostics, England] を用い定電圧 (1,700 V) で電気泳動 (2時間もしくは5時間) を行った. 10% 酢酸-10% メタノール液で固定後乾燥し, FUJI Imaging Plate (Fuji Photo Film : Tokyo) に一晩露光後, Fujix BAS2000 (BIO Imaging Analyzator System : Fuji Film Co., Tokyo, Japan) で解析を行った.

成 績

1) SDS-PAGE による先天性赤血球膜異常症での protein 4.2 異常について

膜蛋白スクリーニングを検討した先天性赤血球膜異常症, 80家系, 179症例で, その内訳は, AD 型 HS : 13家系, 33症例, Non-AD 型 HS : 29家系, 66症例, P4.2 doublet Nagano (72/74 kD) : 1家系, 4症例, P4.2 完全欠損症 : 2家系, 4症例, ankyrin 異常症 : 1家系, 3症例, hereditary stomatocytosis (HSt) : 8家系, 21症例, hereditary xerocytosis (HX) : 1家系, 4症例, hereditary elliptocytosis (HE) : 3家系, 5症例, hereditary ovalocytosis : 4家系, 6症例, hereditary high red cell membrane phosphatidylcholine hemolytic anemia (HPCHA) : 1家系, 1症例, band 6 欠損症 : 1家系, 1症例, chorea acanthocytosis : 2家系, 2症例, McLeod 症候群 : 1家系, 1症例, muscular dystrophy を伴う stomatocytosis : 1家系, 5症例, congenital dy-

Table 2. List of SSCP analysis for genomic DNA of the band 3 gene.

	SSCP primers	Position (nt)	T _m (°C)	Annealing (°C)	Size (bp)
Pro-1	GTGAGTGCTGAGCAGTTCCTGTGGAG	769	66	56.0	250
	GGTTCTCCTGACTCTTCCTTTGTGGATGAAGG	~1018	65		
Pro-2	AGAGGCAGGACAGGGACCTCTGGAG	910	66	56.0	230
	CTCCCACTGGGTGCCACGTA	~1139	62		
Pro-3	CCAGACTCACAGCTGTCCAGATG	1076	61	56.0	247
	AGCCTCAGGGTCCCTTGGTGAAGTCTGCAGC	~1322	70		
Ex-2	AGGACCAGGAGACCCCTGGGATG	6397	63	54.0	214
	CGAAGATAGGAGTCTAGGACC	~6610	58		
Ex-3	TGTTCCCTGGCATCAGCAGTGC	6543	61	56.0	260
	GTCTAGGGCTCAGCAGCTCATC	~6802	61		
Ex-4	GCTCACAGTGGATGGTGAAGAGC	7682	61	55.0	267
	CCTCACTCCTCTATCTGCTGCAGG	~7948	63		
Ex-5	CTATGCCTGATGAACAACTCAGGCG	8543	61	53.0	266
	ACAATCCTCATCTGCAGGAGGTCCAG	~8808	63		
Ex-6	TCTGGACCTCCTGCAGATGAGGA	8781	61	54.0	256
	CCCACTGGATATGGAATCCAGG	~9036	60		
Ex-7	TCAGCCTGAACAGCTTACTCAG	9420	58	54.5	291
	GCACAGGAGTGCTTCTGGTC	~9710	60		
Ex-8	CTCAGGTCTCCAGGTCAGACT	9761	61	57.5	218
	AGGCTGAGGGAAAGACAGGCTGAG	~9978	63		
Ex-9	TCCTCGGCTGGCCTGATCTTCT	10021	63	56.5	274
	AGCCACCATGCAGGTCCCAAGCT	~10294	63		
Ex-10	AGCTCTGACCCCTGTCTCCTG	10750	60	57.0	270
	CTCAGAAAGCCTCAGCTGGGA	~11019	60		
Ex-11	TCCAGCTACTCCCTCTGACCAT	11173	60	52.0	283
	CAGAGGGTCAGAGGCAAGAGT	~11455	60		
Ex-12	AGCCTGACCACTGGACTTGCTCTAT	11510	61	56.0	296
	AGGCACCATGCATCAGGCAGGTGGT	~11805	65		
Ex-13	CAAGAOCCTTTGACTGACCG	11811	58	54.0	280
	TACACAACCTCCCGTGTGCAT	~12090	58		
Ex-14	AGCCCAAGCCAAAGCTGGGAGAGAA	13498	63	57.0	270
	GGATAGGGCAGTGTTGGCAAGGACA	~13767	63		
Ex-15	GTGACTGGGCACTGACCACT	14062	60	55.0	245
	GTAGTCCAGCTGGCTTCAG	~14306	60		
Ex-16	CTGCCCTTGGCATTCTTAOCTGCTA	14698	61	46.0	285
	TCTTGCTGCCTGGGAGAAATGCCAG	~14982	65		
Ex-17	GAGAACCCTGCTTACCOCCTCACC	15994	56	55.0	328
	AGGAGGATGGTGAAGAAGCGAC	~16321	55		
Ex-18	TCGGGCAACCTGGGCTGAGAGT	17765	55	55.0	304
	GGTCTTCAOCTGCTGGCGGAGGC	~18068	56		
Ex-19	TTCTGGCTGCCAGCCTG	17987	60	57.5	292
	CGCATGCTCCAGCTCTTGT	~18278	60		
Ex-20	CAAGGTTCAAGACAGCCAG	18737	55	56.0	278
	GGTGCCATGAACTTCTGCT	~19014	62		

 T_m: melting temperature

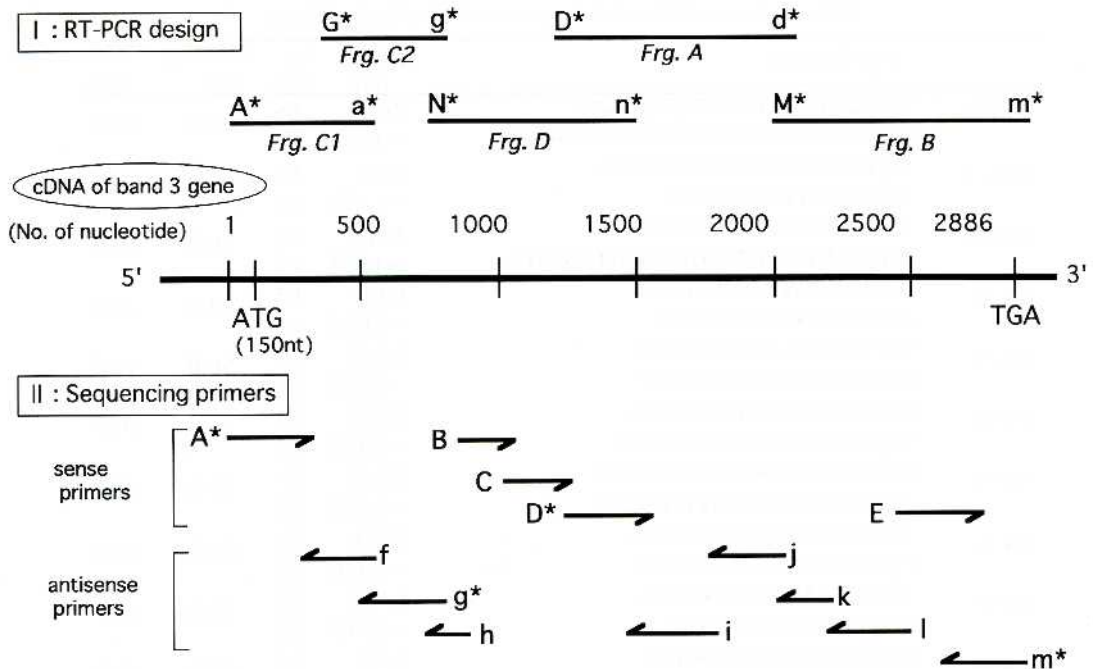


Fig. 3. Design for RT-PCR and sequencing primers of cDNA of the band 3 gene.

serythropoietic anemia : 2 家系, 4 症例, 病因不明 : 10 家系, 19 症例であった。

検索症例の中で, 発端者 (80 症例) について見ると, 何らかの膜蛋白欠損例は 35 症例, 44% に認められ, そのうち P 4.2 欠損が 26 症例 (蛋白欠損を有する症例の 74%) と最も頻度が高かった。そこで, P 4.2 異常の様式を SDS-PAGE を用いて検討した。この場合, 10% 以上の膜蛋白減少を認める場合を, 蛋白欠損として判定すると, まず, 量的異常として (1) 完全欠損型 (2 例), (2) 中等度から高度欠損型 (30% 以上減少 : 1 例), (3) 軽度欠損型 (10~30% 減少 : 23 例), 次に質的異常として (4) 異常 P 4.2 を発現する型 (P 4.2 doublet Nagano : 72/74 kD) の 4 型に分類することができる (Fig. 4)。

P 4.2 部分欠損はいずれも HS 症例に認められ, 特に Non-AD 型 HS 発端者 29 例では P 4.2 単独欠損 11 例 (38%), P 4.2 + band 3 複合欠損 3 例 (10%), 両者を併せて 48% と高い頻度を示した。

遺伝子解析の対象としては, Non-AD 型 HS

22 家系 22 症例, P 4.2 doublet Nagano 家系の発端者, P 4.2 完全欠損症例 2 家系 2 症例を遺伝子解析に供した。

2) Band 3 遺伝子解析

P 4.2 異常症の背景となりうる band 3 について, まず最初に band 3 遺伝子に関する変異の有無を検討した。

(a) Non-AD 型 HS

Genomic DNA を用いた PCR/SSCP スクリーニングによって, 以下の 4 種の病因遺伝子異常が発見された。Frameshift mutation 1 種 : Band 3 Kagoshima : exon 4, codon 56, AAG → AG, 166 nt もしくは 167 nt の一塩基欠失を認めた。Missense mutation 3 種 : Band 3 Nara : exon 18, codon 808, CGC → CAC (Arg → His), Band 3 Philadelphia²¹⁾ : exon 19, codon 837, ACG → ATG (Thr → Met) と, Band 3 Fukuoka²²⁾ : exon 6, codon 130, GGA → AGA (Gly → Arg) の変異が発見された (Fig. 5)。前三者は軽度 P 4.2 + band 3 複合欠損 3 例にヘテロ接合体で, 後者の Band 3 Fukuoka は中等度 ~ 高度 P 4.2

Table 3. List of RT-PCR and sequencing primers of cDNA of the band 3 gene.

RT-PCR primers		Position (nt)	Tm (°C)	Annealing (°C)
A*	5' GGAACGAGTGGGAACGTA 3'	1-18	55.3	
a*	AAACCTGTCTAGCAGTTGGT	548-567	52.5	46
G*	TCTATGTGGAGCTGCAGGA	320-338	56.4	
g*	TTCCAGATGGTGAGTGCC	779-796	56.3	58#
N*	CCAACACTCCTCACTGGAGAC	720-730	58.2	
n*	TCCGACACTCCCATCTGGTT	1447-1466	61.3	46
D*	CAGGACTCCAGTTCTACAAG	1211-1230	55.3	
d*	GTTGGACACCTTGAAGCCAT	2057-2076	58.4	56#
M*	CATTCAGGATACCTACACCC	2019-2038	52.9	
m*	GTGCCCATGAACCTTCTGCTT	2946-2965	58.7	58#

Sequencing primers		Position (nt)	Tm (°C)	Annealing (°C)
A*	5' GGAACGAGTGGGAACGTA 3'	1-18	55.3	58
f	AAACCTGTCTAGCAGTTGGT	548-567	52.5	58
g*	TTCCAGATGGTGAGTGCC	779-796	56.3	58
h	GCAACACAAGAGGAAGCGT	936-955	58.9	58
B	GGCACTCACCATCTGGAA	779-796	56.3	58
C	ACATCGATTACACCCAGCTTG	974-994	58.5	62
D*	CAGGACTCCAGTTCTACAAG	1211-1230	55.3	59
i	CACCATCAACAGTTGTAGTT	1810-1830	54.5	58
j	GTTGGACACCTTGAAGCCAT	2057-2076	58.4	59
k	TTGACCATCTTGCCTCAGG	2224-2243	63.2	60
l	GTAGAGGAAGATGCCAAACAGT	2510-2532	56.0	62
E	AAGAGCAGCGGATCAGTGGA	2420-2439	61.8	60
m*	GTGCCCATGAACCTTCTGCTT	2946-2965	58.7	60

Tm: melting temperature

A*,g*,D*,m*: sequencing/RT-PCR primers

a small letter indicates antisense primer

#: added to formamide

単独欠損症にホモ接合体で認められた。

中等度の P 4.2 単独欠損 (-55%) を伴う Band 3 Fukuoka 症例では、さらに RT-PCR 法により band 3 遺伝子の全 coding region を解析して、上述の点変異を同定・確認した。その点変異について制限酵素を用いた家系内 linkage study の結果 (Fig. 6) から、遺伝形式は常染色体劣性であることが判明した。なお、家系内ヘテロ接合体では臨床血液学的に異常を認めず、明らかな P 4.2 欠損も認められなかった。

(b) P 4.2 doublet Nagano 症例および P 4.2 完全欠損症例

Genomic DNA を用いた PCR/SSCP スクリーニング解析では、band 3 遺伝子の promoter 領域および全 exon には明らかな病因遺伝子異常は認められなかった。

(c) Exon 領域における polymorphism

次の polymorphism が発見された。すなわち、Darmstadt²³⁾: codon 38, GAC → GCC (Asp → Ala), Memphis I²⁴⁾: codon 56, AAG → GAG (Lys → Glu), Okayama: codon 72, GAG → GAT (Glu → Asp), Diego²⁵⁾: codon 854, CCG → CTG (Pro → Leu), codon 438, TCG → TCA (Ser → Ser) であった。

3) P 4.2 遺伝子解析

(a) P 4.2 doublet Nagano 症例

本症例では SDS-PAGE 上、正常 72 kD に加え、異常 74 kD の P 4.2 がほぼ等量に発現し、両者の総和は正常人における 72 kD の P 4.2 発現量とほぼ等しかった。RT-PCR/SSCP 解析と cDNA

のシーケンシング結果から、exon 10, codon 488, CGT → CAT (Arg → His) の点変異 (Fig. 7) が発現され、ヘテロ接合体であることが判明した。なお、P 4.2 のシーケンスで Korsgren¹⁷⁾ および Sung ら^{26), 27)} の報告と一部相違が認められたので、それを Table 4 に示した。家系内 linkage study の解析結果 (Fig. 8) では、その点変異と 74 kD の異常 P 4.2 発現との間に連鎖が認められ、遺伝形式は常染色体優性と考えられた。正常対照者、50 例 (100 alleles) の P 4.2 遺伝子には本例の点変異は認められなかった。

P 4.2 mRNA における isoform の発現を、RT-PCR 法を用いて解析した結果、その遺伝子増幅産物のサイズと発現パターンは正常であった。さらに、異常 74 kD 蛋白を誘導しえる遺伝子

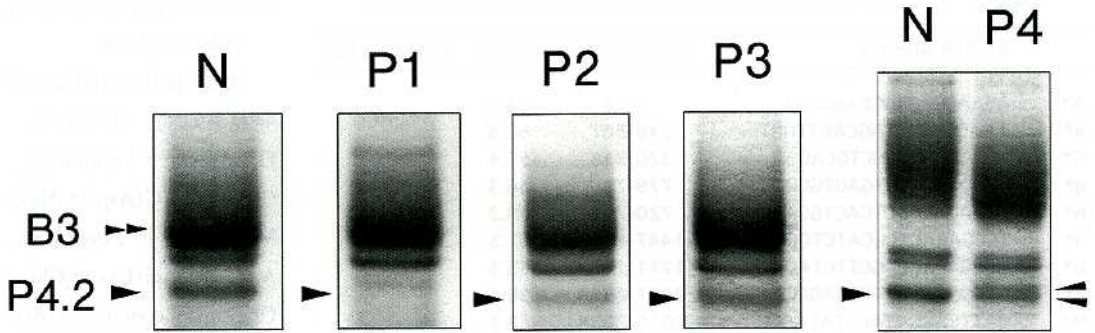


Fig. 4. Various abnormalities of protein 4.2 detected by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

N : control, P1 : complete deficiency of protein 4.2, P2 : partial, but moderate deficiency of protein 4.2, P3 : partial, but mild deficiency of protein 4.2, P4 : P 4.2 doublet Nagano

▶ : protein 4.2 ▶▶ : band 3

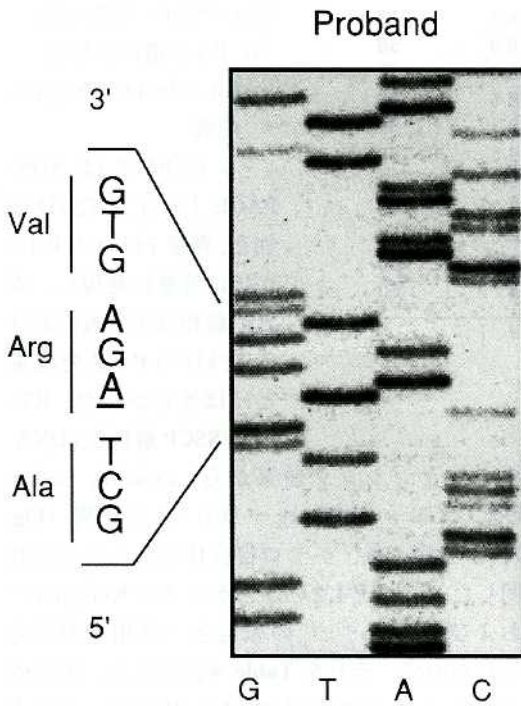


Fig. 5. Nucleotide sequence of cDNA of the band 3 gene in Band 3 Fukuoka.

A nucleotide substitution (G → A : codon 130 Gly → Arg in exon 6)

isoform Type I^{28), 29)}, すなわち exon 1 全長 (100 bp) を有する遺伝子の発現は認められなかった (Fig. 9).

(b) P 4.2 完全欠損症例

発端者 2 症例とも exon 3, codon 142 GCT →

ACT (Ala → Thr) のホモ接合体で、いわゆる Nippon type^{2), 28)}といわれている遺伝子異常であることが判明した。

(c) Non-AD 型 HS 症例

Genomic DNA を用いた PCR/SSCP スクリーニング解析では、P 4.2 遺伝子の promoter 領域および全 exon に明らかな病因遺伝子異常は認められなかった。Non-AD 型 HS である Band 3 Fukuoka 症例でも、さらに RT-PCR/SSCP 法にて解析を行ったが、P 4.2 遺伝子異常は認められなかった。

4) P 4.2 doublet Nagano 症例における P 4.2 の化学修飾

(a) SDS-PAGE (Laemmli 法) のゲル緩衝液に最終濃度が 3 ~ 7 mol/l の尿素を加え膜 ghost の電気泳動を行ったところ、二本みられた 72 kD / 74 kD の P 4.2 は、4 mol/l の尿素添加でその易動度を変え、正常と同じ一本に変化した (Fig. 10).

(b) アルカリ処理 (pH 11, 37°C 30分間孵置), 酸性処理 (10% trichloroacetic acid, 25°C, 30分間孵置), non-ionic detergent 処理 (Triton-X100, Tween-20, Nonidet P-40 : 各 1%. 25°C, 30分間孵置), 2 mol/l hydroxylamine (pH 7.0) 処理 [37°C, 30分間孵置], N-glycanase 処理 (0.3 U N-glycanase, 37°C, 16時間孵置), O-glycanase (4 mU O-glycanase, 37°C, 16時間孵置) 処理し、その前後での膜 ghost を SDS-PAGE で分析したが、異常 74 kD 蛋白の易動度及び 72/74 kD の量比に変化は認められなかった。

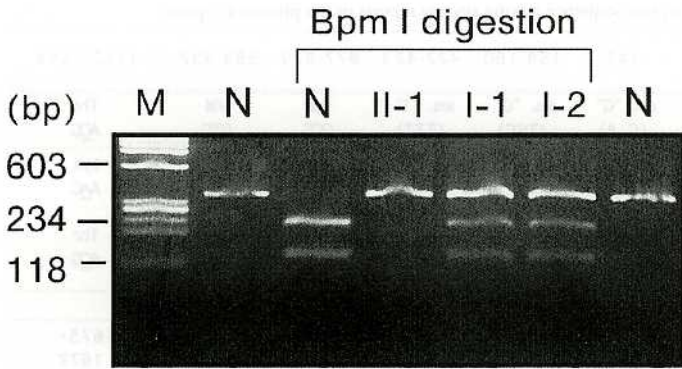


Fig. 6. The linkage study for a nucleotide substitution at exon 6 (codon 130, GGA → AGA) on the amplified band 3 cDNA by Bpm I digestion in an affected family with moderate protein 4.2 deficiency (Band 3 Fukuoka). The Bpm I restriction site of exon 6 in the band 3 gene was disappeared by the presence of a nucleotide substitution (codon 130, GGA → AGA). M : molecular weight markers, N : normal control, II-1 : proband(130 GGA → AGA ; homozygote), I-1 : Father(130 GGA → AGA ; heterozygote), I-2 : Mother (130 GGA → AGA ; heterozygote).

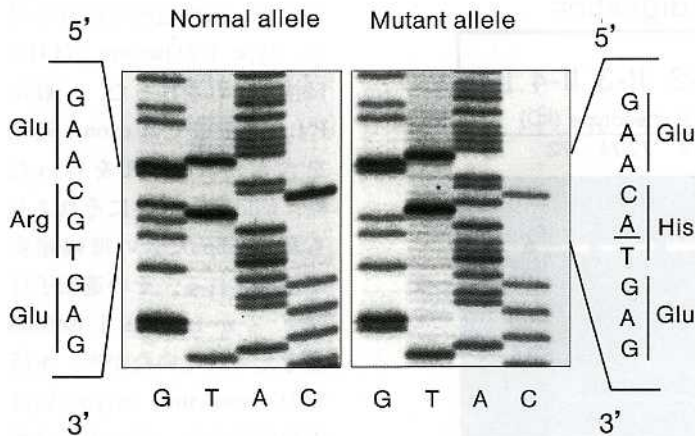


Fig. 7. Nucleotide sequence of cDNA of the protein 4.2 gene in P 4.2 doublet Nagano. A nucleotide substitution (G → A : codon 488 Arg → His in exon10)

更に、患者赤血球を ACD (acid citrate dextrose) 浮遊液として 4℃, 20日保存した後、膜 ghost を調製し、同様に SDS-PAGE を行ったが、異常 74 kD 蛋白の易動度に変化は認められなかった。

考 察

1. P 4.2 doublet Nagano (72/74 kD) 症例発端者に

ついて P 4.2 遺伝子の promoter 領域および、全 coding region のシーケンシングを行い、exon 10, codon 488 : CGT → CAT (Arg → His) (R 488 H) の点変異がヘテロ接合体で検出された。また、その点変異と異常 74 kD 蛋白発現との関連性について家系内 linkage study を行い、その遺伝子異常と異常蛋白発現の間に明らかな連鎖が証明され、遺伝形式は常染色体優性遺伝と考えられた。さらに、正常人 50 例にその点変異を認めないことから、R 488H 遺伝子異常は本症例における病因と推定された。そこで、実際に異常 74 kD 蛋白発現が R 488 H 遺伝子異常に起因した変化であるかどうかを以下の諸点を考慮し、検討した。

(1) P 4.2 遺伝子 mRNA の異常 splicing : 正常 72 kD の P 4.2 は、いわゆる wild type、即ち、その遺伝子の exon 1 における alternative splicing によって 90 bp を欠失した mRNA に由来している。正常 P 4.2 遺伝子では wide type も含め 7 種の isoform が報告されて

いる²⁹⁾が、Sung らは、正常人において exon 1 全長をコードする P 4.2 isoform (Type I) に由来すると考えられる 74 kD 蛋白がごく微量に発現すると報告している²⁶⁾。以上の成績から、本症例における異常 74 kD P 4.2 の発現病態としては、P 4.2 遺伝子の異常 isoform、もしくは、生理的な isoform である Type I の発現が考えられた。前者に関しては、P 4.2 遺伝子の全長を 4 分画し、それぞれについて RT-PCR を行い、増幅遺伝子産物のサイズを検討したが、異

Table 4. Difference of nucleotide sequence among several reports of the protein 4.2 gene.

No. of nucleotide	28	38-39	65	147	159-160	422-423	877-879	988-992	1552-1554
Our study	del. "G" (T C)	ins. "A" (CAG)	del. "G" (C A)	del. "G" (C A)	ins. "G" (TGC)	ins. "T" (TTT)	Ala <u>GCG</u>	Val <u>GTG</u>	Thr <u>ACG</u>
Sung et al ²⁷⁾ (1990)	del. "G" (T C)	CG	del. "G" (C A)	del. "G" (C A)	TC	ins. "T" (TTT)	Ala <u>GCA</u>	Val <u>GTG</u>	Lys <u>AAG</u>
Korsgren et al ¹⁷⁾ (1990)	TGC	CG	CGA	CGA	TC	TT	Ala <u>GCG</u>	Val <u>GTT</u>	Thr <u>ACG</u>

No. of nucleotide	1555-1557	1558-1560	1561-1563	1564-1566	1567-1569	1594-1596	1597-1599	1672-1674	1675-1677
Our study	Arg <u>CGG</u>	Pro <u>CCT</u>	Ala <u>GCC</u>	Leu <u>TTG</u>	Pro <u>CCC</u>	Leu <u>CTG</u>	His <u>CAC</u>	Thr <u>ACG</u>	Leu <u>CTG</u>
Sung et al ²⁷⁾ (1990)	Arg <u>CGC</u>	Gly <u>GGT</u>	Leu <u>CTG</u>	Pro <u>CCT</u>	Cys <u>TGC</u>	Leu <u>CTG</u>	His <u>CAG</u>	Thr <u>ACG</u>	Leu <u>CTG</u>
Korsgren et al ¹⁷⁾ (1990)	Arg <u>CGG</u>	Pro <u>CCT</u>	Ala <u>GCC</u>	Leu <u>TTG</u>	Pro <u>CCC</u>	Leu <u>CTC</u>	Asp <u>GAC</u>	Thr <u>ACC</u>	Leu <u>GTG</u>

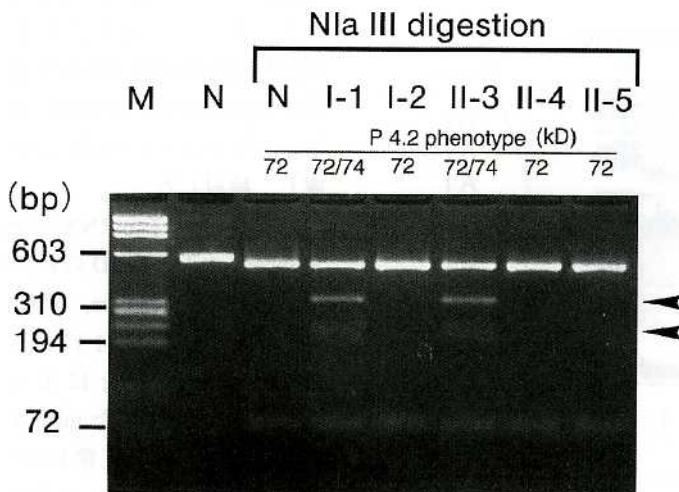


Fig. 8. The linkage study of a nucleotide substitution at exon10 (codon 488 CGT → CAT) by Nla III digestion in the amplified protein 4.2 cDNA in a family with protein 4.2 doublet Nagano (72/74kD).

◀: The Nla III restriction site of exon10 in the protein 4.2 gene was created by the presence of a nucleotide substitution (codon 488CGT → CAT)

M: molecular weight markers, N: normal control, I-1: proband (72/74kD), I-2: brother of proband (72kD), II-3: the first daughter of proband (72/74kD), II-4: the second daughter of proband (72kD), II-5: the third daughter of proband (72kD).

常 isoform は認められなかった。後者では、exon 1 の alternative splicing 領域を含んだ RT-PCR により増幅し、restriction enzyme によって

消化後、銀染色法で検討したが、Type I の isoform (74 kD) は検出されなかった。一般に P 4.2 遺伝子では exon 1 領域を含んだ RT-PCR を行った際、wild type と共にそれよりも約 100 bp 大きい増幅産物が検出される。その遺伝子はサイズから Type I isoform と考えられていたが²⁸⁾、本研究の restriction enzyme 処理実験成績から、その大半は他の isoforms の二本鎖混合物と推定された。本症例における異常 74 kD の P 4.2 発現量は正常 72 kD の P 4.2 発現量とほぼ等量であり、かつ、その両者の総和は正常人における P 4.2 発現量とほぼ等しいことから、本症例の異常 74 kD 蛋白に対応する mRNA の

発現量は、正常 72 kD 蛋白の mRNA、即ち、wild type の発現量とほぼ等しいと考えられる。したがって、restriction enzyme 処理実験の成績

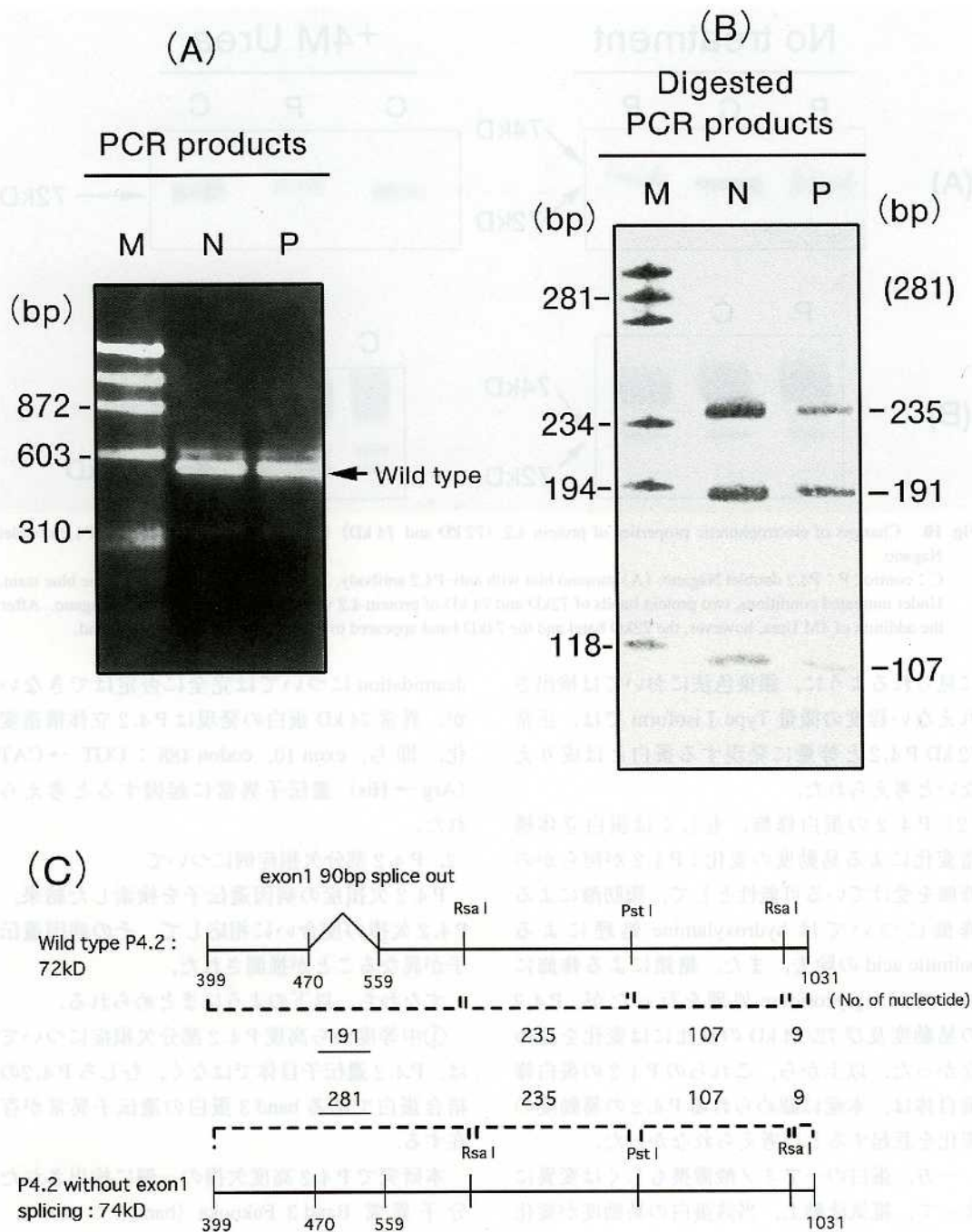


Fig. 9. No expression of protein 4.2 full length of mRNA corresponding to 74kD protein in P4.2 doublet Nagano (72/74kD). The experiments were carried out under these conditions : (A) 1.5% agarose gel stained by ethidium bromide. (B) non-denaturing 7% polyacrylamide gel stained by silver. M : molecular markers, N : control, P : P4.2 doublet Nagano. (C) When full length of exon 1 is translated, a 281 bp band expected to appear in non-denaturing 7% polyacrylamide gel. The 281bp band, however, was not present in P4.2 doublet Nagano.

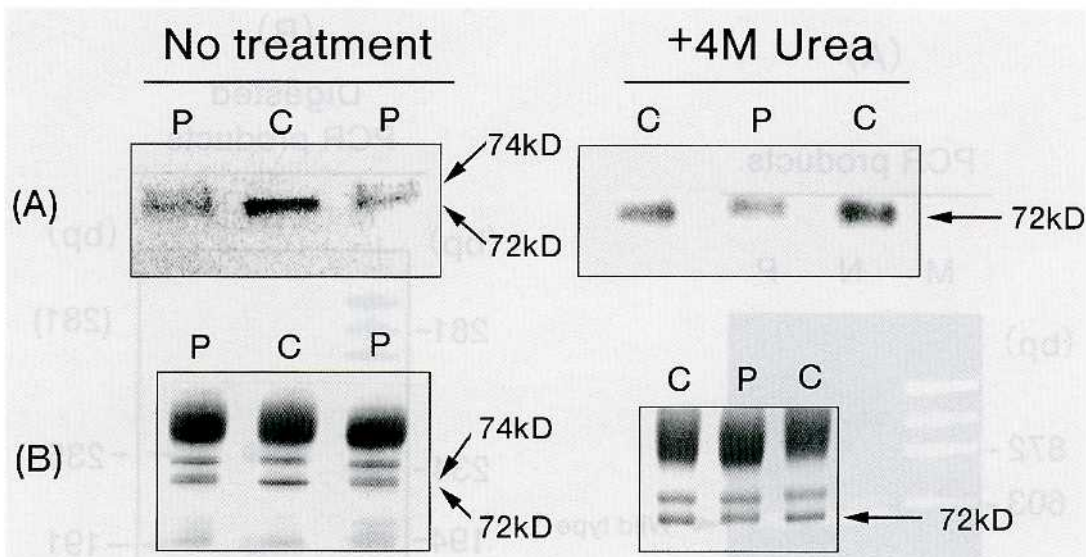


Fig. 10. Changes of electrophoretic properties of protein 4.2 (72 kD and 74 kD) in the presence of 4M urea in P4.2 doublet Nagano.

C : control, P : P4.2 doublet Nagano. (A) immunoblot with anti-P4.2 antibody. (B) SDS-PAGE with coomassie blue stain. Under untreated conditions, two protein bands of 72kD and 74 kD of protein 4.2 were present in P4.2 doublet Nagano. After the addition of 4M Urea, however, the 72kD band and the 74kD band appeared to merge together to form one band.

に見られるように、銀染色法においては検出されえない程度の微量 Type I isoform では、正常 72 kD P 4.2 と等量に発現する蛋白とは成りえないと考えられた。

(2) P 4.2 の蛋白修飾、もしくは蛋白立体構造変化による易動度の変化：P 4.2 が何らかの修飾を受けている可能性として、脂肪酸による修飾については hydroxylamine 処理による palmitic acid の除去、また、糖鎖による修飾については、glycosidase 処理を行ったが、P 4.2 の易動度及び 72/74 kD の量比には変化を認めなかった。以上から、これらの P 4.2 の蛋白修飾自体は、本症に認められる P 4.2 の易動度の変化を惹起するとは考えられなかった。

一方、蛋白の一アミノ酸置換もしくは変異によって、電気泳動上、当該蛋白の易動度が変化する現象はいくつか報告されている^{41,30)}。これらの現象は尿素加電気泳動により、その易動度が正常に復帰することから、一アミノ酸変異に伴う蛋白立体構造変化が主因と考えられている。本症例において、尿素加電気泳動にて、72/74 kD の二本の P 4.2 が一本に変化したことは、

deamidation については完全に否定はできないが、異常 74 kD 蛋白の発現は P 4.2 立体構造変化、即ち、exon 10, codon 488 : CGT → CAT (Arg → His) 遺伝子異常に起因すると考えられた。

2. P 4.2 部分欠損症例について

P 4.2 欠損症の病因遺伝子を検索した結果、P 4.2 欠損の度合いに相応して、その病因遺伝子が異なることが推測された。

すなわち、以下のようにまとめられる。

①中等度から高度 P 4.2 部分欠損症については、P 4.2 遺伝子自体ではなく、むしろ P 4.2 の結合蛋白である band 3 蛋白の遺伝子異常が存在する。

本研究で P 4.2 高度欠損の一例に検出された分子異常 Band 3 Fukuoka (band 3 : exon 6, codon 130 Gly → Arg, ホモ接合体) は、band 3 蛋白の細胞質ドメインに相当する³¹⁾、これまでに、細胞質ドメインの分子異常は Band 3 Tuscaloosa³²⁾、Band 3 Montefiore³³⁾ の 2 症例が報告されている。Band 3 Tuscaloosa は 30% P 4.2 欠損を呈する HS で、band 3 遺伝子 codon 327

CCC → CGC (Pro → Arg) と Band 3 Memphis と名付けられた polymorphism である codon 56 AAG → GAG (Lys → Glu) の二重ヘテロ接合体である。また、Band 3 Montefiore は88% P4.2 欠損を呈する HS で、Band 3 遺伝子 codon 40 GAG → AAG (Glu → Lys) ホモ接合体である。いずれもホモ接合体もしくは二重ヘテロ接合体として発症し、ヘテロ接合体では臨床血液学的に異常を認めない。

これらの症例では inside-out vesicle 上の band 3 蛋白と P4.2 の re-binding study が行われ^{31)~33)}、その結果 P4.2 欠損割合に相応した band 3 に対する P4.2 の結合能の低下が証明されている。これらの結果が、band 3 遺伝子上の遺伝子異常が病因であることの裏付けとなっている。

P4.2 欠損の機序の一つとして、以下のような推測ができる。すなわち、Band 3 蛋白は N 末端から codon 404 までの細胞質ドメインに様々な蛋白との結合部位を有する⁴⁾。その中でも N 末端から45アミノ酸までのマイナス荷電を有する部位をはじめ、プラス荷電を持つ P4.2 とのレセプター部位が複数存在すると考えられている^{34)~36)}。我々が解析を行った codon 130 変異例³¹⁾、Band 3 Tuscaloosa³²⁾、および Band 3 Montefiore³³⁾ は、その変異のためにアミノ酸の電気的特性をプラス荷電に変化させる。このことが P4.2 との結合に障害を及ぼし、結果として P4.2 の赤血球膜への組み込みを障害する可能性が考えられる。

②軽度 P4.2 部分欠損症については P4.2 遺伝子および band 3 遺伝子のいずれにも遺伝子異常が存在しない例が存在する。

Band 3 欠損症に伴う軽度 P4.2 部分欠損症においては、band 3 遺伝子上の分子異常が報告されているが、軽度 P4.2 単独欠損の10症例の解析において、P4.2 および band 3 遺伝子のいずれにも分子異常は認められなかった。一方、軽度 P4.2 欠損に band 3 欠損を伴う3例においては、いずれも band 3 遺伝子上に病因遺伝子異常が認められた。

これらの結果から軽度 P4.2 単独部分欠損症

の病因は P4.2 または band 3 遺伝子以外に存在することも考えられた。

これらの P4.2 部分欠損症の多くが、臨床的に HS の病態を呈している。現在のところ、HS の病因分子異常として、spectrin, ankyrin, band 3, P4.2 等が知られている。よって、今回明らかな分子異常を band 3 および P4.2 遺伝子に検出しなかった P4.2 部分欠損例についても spectrin, ankyrin に分子異常を有する可能性は否定できない。すなわち、P4.2 は band 3 以外にも spectrin³⁷⁾ もしくは ankyrin にレセプターを持つ可能性があると考えられた。

3. P4.2 完全欠損症

P4.2 完全欠損症の2家系は、いずれも P4.2 遺伝子の Nippon type (codon 142 Ala → Thr) であり、発端者はそのホモ接合体であった。現在までに P4.2 完全欠損症の病因遺伝子は7種の P4.2 遺伝子異常が報告されており、いずれも常染色体劣性遺伝形式を示し、Nippon type のホモ接合体が最も高頻度である²⁾。その他に、二重ヘテロ接合体を示す症例が報告されている²⁾が、現在までのところいずれも Nippon type が一方の allele に認められている。Nippon type が関与しない症例も報告されているが、その数は極めて少ない。P4.2 完全欠損症は日本人に特徴的に多いが、その理由として、日本人における Nippon type をヘテロ接合体に保有する頻度は約2~3%⁵⁾で、polymorphism としては比較的高頻度であることが考えられている。本研究において発見された症例の如く、日本人において P4.2 完全欠損症を発見した場合には、まず Nippon type を考慮すべきであろう。

ま と め

本研究における P4.2 異常症の phenotype と genotype の成績を、自験例と諸家の報告について検討した (Table 5)。

(1) P4.2 の質的異常では、病因遺伝子は P4.2 遺伝子自体であり、それに由来する異常蛋白が相当量発現していた。P4.2 doublet Nagano 症

Table 5. Characteristics of phenotypic and genotypic features of protein 4.2 anomalies in hereditary red cell membrane disorders.

P4.2 anomaly		Mutant gene	Phenotype	Heredity
Qualitative anomaly [Expression of abnormal P4.2]		P4.2 [missense mutation]	P4.2 doublet Nagano (72/74 kD)	AD
Quantitative anomaly [Isolated P4.2 deficiency]	complete defect	P4.2 [homozygous missense mutation: mostly Nippon type]	P4.2 complete deficiency	AR
	moderate defect	Band 3 (missense mutation)	HS: Band 3 Fukuoka	AR
	mild defect	unknown	HS	Sporadic (non-AD)

AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive, P4.2: protein 4.2
HS: hereditary spherocytosis

例その実例であり、異常74 kD 蛋白が正常の約50%まで発現し、その病因はP4.2遺伝子の点変異でヘテロ接合体であった。

(2) P4.2の量的異常症、即ち、異常蛋白はほとんど発現せず、正常P4.2のみが減少する場合である。表現型であるP4.2の欠損度合から分類すると、P4.2完全欠損症では病因遺伝子はP4.2遺伝子自体であり、中等度以上の欠損ではP4.2結合蛋白であるband 3の遺伝子異常と考えられた。一方、軽度P4.2単独欠損では、P4.2または結合蛋白であるband 3の遺伝子異常は認められなかった事から、それ以外の蛋白の遺伝子異常の存在も考えられた。

今回、病因遺伝子が明らかにされなかった軽度のP4.2単独欠損については、さらにankyrin等の赤血球膜蛋白の遺伝子検索、そして詳細な家系内linkage study等が必要であろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った川崎医科大学血液内科 八幡義人教授、神崎暁郎講師、川崎医科大学生化学教室 原野昭雄助教授に深甚なる謝意を表します。また、御援助を頂いた川崎医科大学血液内科 江田佐久良氏に深く感謝いたします。

本研究は、以下の援助のもとで行われたものである。
文部省科学研究費補助金 国際学術研究 (06044212, 08044328, 09044346, 10044329), 同一般研究 (B) (07457236), 同基盤研究 (B) (2) (09470235), 同一般研究 (C) (2) (07670180, 09670164), 同基盤研究 C (09670164), 日本学術振興会日独科学協力事業共同研究, 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班 (平成7-9年), 厚生省血液系難病疾患調査研究班 (平成10年), 川崎医科大学プロジェクト研究費 (7-104, 8-107, 9-109, 9-310, 9-809, 10-111, 10-305, 10-809)。

文 献

- 1) Cohen CM, Dotimas E, Korsgren C: Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (pallidin). *Semin Hematol* 30: 119-137, 1993

- 2) Yawata Y : Red cell membrane protein band 4.2 : Phenotypic, genetic and electron microscopic aspects. *Biochem Biophys Acta* 1204 : 131 – 148, 1994
- 3) Das AK, Bhattacharya RB, Kundu M, Chakrabarti P, Basu J : Human erythrocyte membrane protein 4.2 is palmitoylated. *Eur J Biochem* 224 : 575 – 580, 1994
- 4) Gallagher PG, Forget BG, Lux SE : Disorders of the erythrocyte membrane. *In Hematology of infancy and childhood*, ed by Nathan DG, Orkin SH, Philadelphia, Saunders. 1998, pp 544 – 664
- 5) Yawata Y, Kanzaki A, Inoue T, Ata K, Wada H, Okamoto N, Higo I, Yawata A, Sugihara T, Yamada O : Red cell membrane disorders in the Japanese population : Clinical, biochemical, electron microscopic, and genetic studies. *Int J Hematol* 60 : 23 – 38, 1994
- 6) Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem* 100 : 119 – 130, 1963
- 7) Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH : Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10 : 2606 – 2617, 1971
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265 – 275, 1951
- 9) Towbin H, Steahelin T, Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 4350 – 4354, 1979
- 10) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227 : 680 – 685, 1970
- 11) Poncz M, Solowiejczyk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S : Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood : Analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin* 6 : 27 – 36, 1982
- 12) Goossens M, Kan YY : DNA analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders. *Methods Enzymol* 6 : 805 – 817, 1981
- 13) Orita M, Iwahara H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-stranded conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2766 – 2770, 1989
- 14) Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM : Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196 : 80 – 83, 1991
- 15) Takaoka Y, Ideguchi H, Matsuda M, Sakamoto N, Takeuchi T, Fukumaki Y : A novel mutation in the erythrocyte protein 4.2 gene of Japanese patients with hereditary spherocytosis (protein 4.2^{Fukuoka}). *Brit J Haematol* 88 : 527 – 533, 1994
- 16) 岡本直人 : ヒト赤血球膜蛋白 Band 4.2 Codon142 (GCT → ACT : Ala → Thr) 変異の検索. *川崎医学会誌* 19 : 371 – 379, 1993
- 17) Korsgren C, Lawler J, Lambert S, Speicher D, Cohen CM : Complete amino acid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 613 – 617, 1990
- 18) Sahr KE, Taylor WM, Daniels BO, Rubin HL, Jarolim P : The structure and organization of the human erythroid anion exchanger (AE 1) gene. *Genomics* 24 : 491 – 501, 1994
- 19) Tanner MJA, Martin PG, High S : The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem J* 256 : 703 – 712, 1988
- 20) Hanahan D : Techniques for transformation of E coli. *DNA infection*. *J Mol Biol* 53 : 159 – 162, 1970
- 21) Jarolim P, Murray JL, Rubin HL, Taylor WM, Prchal JT, Ballas SK, Snyder LM, Chrobak L, Melrose WD, Brabec V, Palek J : Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. *Blood* 88 : 4366 – 4374, 1996
- 22) Ideguchi H, Okubo K, Nishimura J, Eto T, Fukumaki Y : Abnormal band 3 protein (band 3 Fukuoka) found in two cases of erythrocyte band 4.2 deficiency. *Int J Hematol* 59 : 255, 1994
- 23) Eber SW, Gonzalez JM, Lux ML, Scarpa AL, Tse WT, Dornwell M, Herbers J, Kugler W, Ozcan R, Pekrun A,

- Gallagher PG, Schroter W, Forget BG, Lux SE : Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nat Genet* 13 : 214 - 218, 1996
- 24) Jarolim P, Rubin HL, Zhai S, Sahr KE, Liu SC, Mueller TJ, Palek J : Band 3 Memphis : A widespread polymorphism with abnormal electrophoretic mobility of erythrocyte band 3 protein caused by substitution AAG → GAG (Lys → Glu) in codon 56. *Blood* 80 : 1592 - 1598, 1992
- 25) Bruce LJ, Anstee DJ, Spring FA, Tanner MJ : Band 3 Memphis variant II. Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Dia) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation Pro854 → Leu. *J Biol Chem* 269 : 16155 - 16158, 1994
- 26) Sung LA, Chien S, Fan YS, Lin CC, Laembert K, Zhu L, Lan JS, Chang L-S : Human erythrocyte protein 4.2 : Isoform expression, differential splicing, and chromosomal assignment. *Blood* 79 : 2763 - 2770, 1992
- 27) Sung LA, Chien S, Chang LS, Lambert K, Bliss SA, Bouhassira EE, Nagel RL, Schwartz RS, Rybicki AC : Molecular cloning of human protein 4.2 : A major component of the erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 955 - 959, 1990
- 28) Bouhassira EE, Schwartz RS, Yawata Y, Ata K, Kanzaki A, Qiu JJ, Nagel RL, Rybicki AC : An alanine-to-threonine substitution in protein 4.2 cDNA is associated with a Japanese form of hereditary hemolytic anemia (protein 4.2 NIPPON) . *Blood* 79 : 1846 - 1854, 1992
- 29) Wada H, Kanzaki A, Yawata A, Inoue T, Kaku M, Takezono M, Sugihara T, Yamada O, Yawata Y : Late expression of red cell membrane protein 4.2 in normal human erythroid maturation with seven isoforms of the protein 4.2 gene. *Exp Hematol* 27 : 1 - 9, 1999
- 30) Inaba M, Gupta KC, Kuwabara M, Takahashi T, Benz EJ Jr, Maeda Y : Deamidation of human erythrocyte protein 4.1 : Possible role in aging. *Blood* 79 : 3355 - 3356, 1992
- 31) Inoue T, Kanzaki A, Kaku M, Yawata A, Takezono M, Okamoto N, Wada H, Sugihara T, Yamada O, Katayama Y, Nagata N, Yawata Y : Homozygous missense mutation (band 3 Fukuoka : G130R) : A mild form of hereditary spherocytosis with near-normal band 3 content and minimal change of membrane ultrastructure despite moderate protein 4.2 deficiency. *Br J Haematol* 102 : 932 - 939, 1998
- 32) Jarolim P, Palek J, Rubin HL, Prchal JT, Korsgren C, Cohen CM : Band 3 Tuscaloosa : Pro327 → Arg327 substitution in the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein 4.2. *Blood* 80 : 523 - 529, 1992
- 33) Rybicki AC, Qiu JJ, Musto S, Rosen NL, Nagel RL, Schwartz RS : Human erythrocyte protein 4.2 deficiency associated with hemolytic anemia and a homozygous 40 glutamic acid → lysine substitution in the cytoplasmic domain of band 3 (band 3 Montefiore). *Blood* 81 : 2155 - 2165, 1993
- 34) Yu J, Steck TL : Isolation and characterization of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 250 : 9170 - 9175, 1975
- 35) Korsgren C, Cohen CM : Purification and properties of human erythrocyte band 4.2 : Association with the cytoplasmic domain of band 3. *J Biol Chem* 261 : 5536 - 5543, 1986
- 36) Korsgren C, Cohen CM : Associations of human erythrocyte band 4.2 : Binding to ankyrin and to the cytoplasmic domain of band 3. *J Biol Chem* 263 : 10212 - 10218, 1988
- 37) Golan DE, Corbett JD, Korsgren C, Thatte HS, Hayette S, Yawata Y, Cohen CM : Control of band 3 lateral and rotational mobility by band 4.2 in intact erythrocytes : Release of band 3 oligomers from low-affinity binding sites. *Biophys J* 70 : 1534 - 1542, 1996