

サラセミア症群におけるヘモグロビン合成の
遺伝的調節

今村 孝

(九州大学医学部第一内科)

The Molecular Basis of the Thalassemia Syndromes

Takashi IMAMURA

First Department of Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University

Summary This symposium is concerned with recent studies that have attempted to define the molecular basis of the defects in globin synthesis which produce the hematologic manifestation of thalassemia. There have been two basic approaches to this problem. Analysis of the structure and synthesis of the various mutant globin chains in patients has permitted the formulation of a genetic hypothesis by which deletion of specific structural or regulator genes could produce the various forms of the thalassemia. The second approach involves direct search for defects in the biochemical processes by which each structural gene directs the synthesis of a specific globin chain. The recent developments of these studies are reviewed and discussed briefly.

The thalassemia syndromes are a heterogeneous group of inherited hematologic disorders characterized by reduced or absent synthesis of the α - and non- α -globin chains, which form the apoprotein portion of hemoglobin. The cumulative results of all the various studies lead to the conclusion that the underlying basic genetic defect in the nucleus causes the decreased production of a globin chain-specific messenger RNA (mRNA), which in turn leads to a decreased amount of the globin chain, resulting in the unbalanced synthesis of globins. Thus, the major defects in the regulation of hemoglobin synthesis are transcriptional.

In α -thalassemia, α -chain specific mRNA is deficient because of gene deletion which has been demonstrated by *in vitro* synthesis of the complementary DNA (cDNA), followed by hybridization experiments to mRNA and DNA. On the basis of these studies, a gene deletion model may be proposed to explain the various forms of α -thalassemia and the heterogeneity of the population for the number of α -chain loci.

In β -thalassemia, the basic defects for the deficient β mRNA production remain to be clear. Although the cDNA-DNA hybridization experiments do not show actual β -chain gene deletion, a partial gene deletion including regulator genes that are predicted to be linked to the structural loci could be the basis of some cases of β - and $\delta\beta$ -thalassemias.

異常ヘモグロビン症は、(1)グロビン部分の遺伝的な構造変異型、(2)ヘモグロビン産生の量的な調節異常に起因するサラセミア症群、(3)胎児性ヘモグロビンから成人ヘモグロビン産生系への変換が行われない遺伝性高胎児ヘモグロビン症の3つのカテゴリーに大別される¹⁾。この中で、第2のカテゴリーに属するサラセミア症群はヘモグロビンを構成する特定のグロビン鎖の部分的ないし完全な産生障害に基づく遺伝性溶血性貧血症群と定義される。産生障害が起っているグロビン鎖により、 α サラセミア、 β サラセミアなどに分類されるが、各型にはそれぞれいくつかの亜型が知られている。本シンポジウムではサラセミアにおけるヘモグロビン合成の調節異常について、タンパクレベルと核酸レベルの最近の研究知見に基づいて、病因論的な考察を試みたい。

1. ヒトのヘモグロビン遺伝子の重複

ヒトのヘモグロビンは単一な成分ではなく胎生早期から新生児期を経過して成人に達する間に、少なくとも7種類の構造の異なるヘモグロビンが産生される (Fig. 1)。各成分は発育の段階に応じて産生の調節が行われるのみでなく、 α および ζ 鎖とそのパートナーである非 α 鎖すなわち ϵ , γ , δ , β 各鎖は過不足なく産生され、両者の間には厳密な量的均衡が保たれている。このような事実は、グロビン構造遺伝子の他に、構造の類似した各座位の遺伝子活性を制御する調節遺伝子系の存在を示唆するものといえよう。 γ 鎖に関しては構造の異なる2種類のものが知られ、少なくとも2座位ないしはそれぞれ activity の異なる2座位から成る4座位説が提唱されている²⁾。 γ , δ , β 各 locus の間には linkage が認められているが、 α 鎖と非 α 鎖座位間には linkage は証明されていない。 α 鎖と β 鎖構造変異型のヘテロ接合型保因者にみられる異常ヘモグロビンの全ヘモグロビンに対する量比を調べると、一部の例外を除いて、大多数の β 鎖変異型は個体の全ヘモグロビン量の40~50%を占め、一方、 α 鎖変異型では15~20%である。

このような結果から、ヒト β 鎖遺伝子は単一座位、 α 鎖遺伝子は2座位説が提唱されている^{3~5)}。

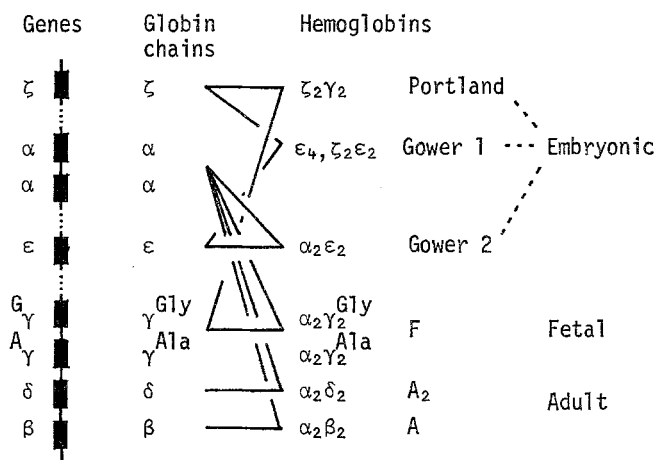


Fig. 1. Number and linkage of globin-chain genes.

構造変異型について得られた知見から推測すると、大多数の集団では 2 座位、合計 4 個の α 鎖遺伝子を保有し、 α 鎖構造変異型は全体の約 20~25% 量を占める。まれではあるが、同一の個体で Hb A の他に Hb J Buda と Hb G Pest^{6,7)} あるいは Hb Rumpa と Hb Koya Dora⁸⁾ と呼ばれる 2 種類の α 鎖変異型を保有する例が見出されているが、このような例は 2 座位説を裏づけるものである。一方、ホモ接合型で全く Hb A がみられない Hb Tongariki の例からは、単一座位が想定される^{9,10)}。この他に、Hb J Cape Town (33%) のような全体の約 1/3 量を占める変異型については 2 座位と単一座位 α -ヘテロ接合が想定される⁴⁾。ただし、このような推論は各座位の gene activity に差がないことを前提としている。

2. サラセミアの病態生化学

サラセミア患者の赤血球はヘモグロビン含有量が少なく、低色素性小球性貧血の像を呈する。これはヘモグロビンの産生障害を示唆するものであるが、また同時に赤血球の形態学的な変化が強く、平均赤血球寿命が短縮し、溶血亢進が認められる。このようにサラセミアでは低色素性小球性貧血とともに「無効造血」を伴う溶血性貧血の所見が特徴的である¹⁾。 β 鎖の産生が抑制されると Hb A の産生がみられず低色素性貧血を起すことになるが、一方、 β 鎖の産生が障害されると、結合するパートナーをもたない α 鎖は相対的に過剰となる。遊離の α 鎖は溶解度が低くきわめて不安定なため、容易に細胞内で沈澱し、細胞膜を損傷しその結果、溶血が亢進する。また、ヘムの過剰をもたらすため組織内への鉄沈着を促進することになる。 α サラセミアについては α 鎖の産生が低下し、Hb A とともに Hb F の産生も障害され、以下 β サラセミアと同様の病態生理学が考えられる。以上要約すると、サラセミアにみられる溶血性貧血は α 鎖と β 鎖の合成上の量的な不均衡 (unbalanced synthesis) に起因すると考えられる¹⁾。

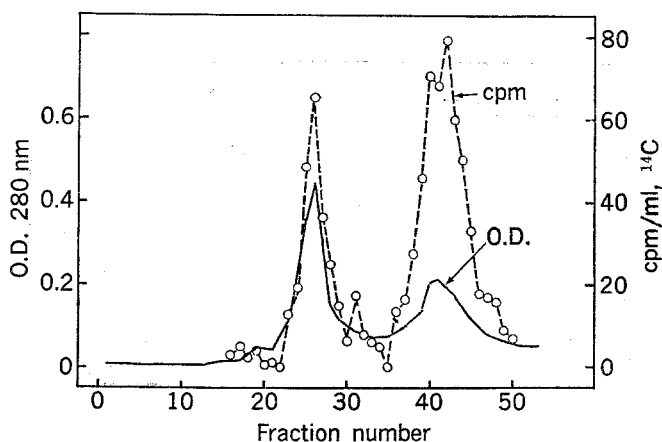


Fig. 2. Globin synthesis by intact reticulocytes from heterozygote for β -thalassemia; markedly decreased incorporation of leucine into β -chains relative to α -chains.

β サラセミアヘテロ接合患者の末梢血網赤血球をラベルしたアミノ酸とふ置した後¹¹⁻¹³⁾ 溶血液を作製し、さらにヘムを除いてグロビンを作製し、尿素の存在下にCMセルロースカラムクロマトグラフィーを用いて α 鎖と β 鎖とに分離した結果、Fig. 2のような溶出曲線が得られた。最初のピークは β 鎖、あとのピークは α 鎖に相当する。それぞれのピークにとりこまれた放射カウント数から得られる α 鎖と β 鎖の合成比を計算すると $\alpha : \beta = 1 : 0.5$ となり、 β 鎖の産生抑制が証明された。

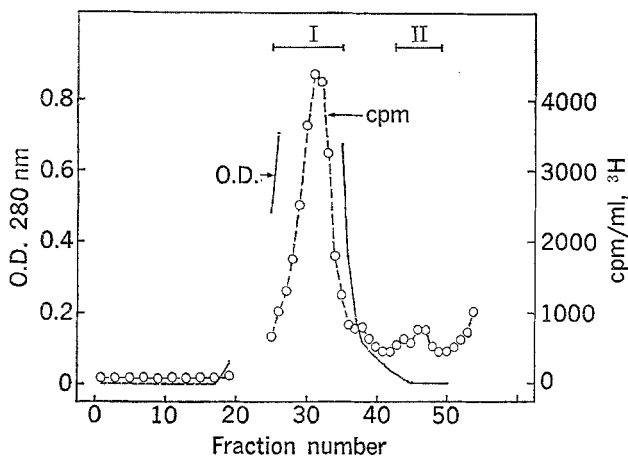


Fig. 3. Globin synthesis by bone marrow cells from the same patient as in Fig 2. After incubation in the presence of ^3H -leucine, hemolysate was prepared, followed by gel filtration on Sephadex G75 column.

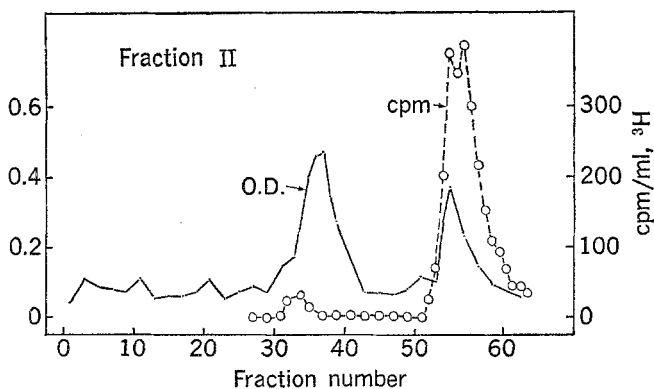


Fig. 4. CM-Cellulose column chromatography of globin from fraction II (Fig. 3) with normal carrier globins. Fraction II corresponds to monomeric α -chains.

次に同一患者の骨髓細胞を用いて同様の実験を行い、溶血液を作製したのち、セファデックス G-75 カラムを用いてゲル濾過を行うと、ヘモグロビンの主ピークに続いてそれより分子量の小さい別のタンパク成分が分離された (Fig. 3). この成分を集めてグロビンを作製し、前回同様 α 鎖と β 鎖に分離すると、放射活性をもったタンパクは α 鎖であることが証明された (Fig. 4). 以上の実験から β サラセミアでは β 鎖の産生が抑制され、その結果相対的に α 鎖の過剰産生が起り、遊離の α 鎖が一部骨髓細胞内にプールされていることがわかる^{14,15}. Hb H disease では、同様の実験により α 鎖の合成が障害されていることが証明された^{1,16}.

3. α サラセミア症群

主に東南アジア地域に見られる多数の症例の観察結果に基づいて α サラセミアの病型を分類すると、 α サラセミアは大別して2型、すなわち α -thal. 1 と α -thal. 2 に分けられる¹⁷. α -thal. 1 は α -thal. 2 に比較して重症な症状を起し、 α -thal. 1 の homozygote では Hb F や Hb A の産生が全くみられず、Hb Bart's-Hydrops fetalis を起し致死的である (Table 1).

Table 1. The α thalassemias

Gene	Homozygote	Heterozygote
α thal. 1	hydrops fetalis Hb Bart's & Portland and birth no Hbs A and F	mild anemia 5-10% Hb Bart's at birth
α thal. 2	—	no red cell changes 1-2% Hb Bart's at birth
Hb Constant Spring (CS)	mild anemia 5% Hb CS and 95% Hb A	no red cell changes Hb CS 0.5-1%
Hb H disease*	severe red cell changes 10-15% Hb H and 85-90% Hb A and/or 2-3% Hb CS	as α thal. 1 trait or α thal. 2 trait of Hb CS trait

* α thal. 1/ α thal. 2, or α thal. 1/Hb CS combination (Weatherall, 1974).

Hb Constant Spring と呼ばれる特殊な α 鎖構造変異型が α サラセミアに関して特に注目されている¹⁸. Hb Constant Spring は他の構造変異型と異なり、産生量が極端に少量であるため α -thal. 2 と同様のサラセミアを惹起する. 次に Hb H disease では α -thal. 1, α -thal. 2 のヘテロ接合型がそれぞれ単独ではほとんど silent carrier であるに反して、明らかな溶血性貧血がみられる. Hb H disease は保因者の家系の遺伝学的解析から α -thal. 1 と α -thal. 2 の2重ヘテロ接合型と考えられている.

東南アジア地域では、Hb Constant Spring gene が集団の4%にも達し、また高頻度に見られる Hb H disease 症例の約25~50%にこの変異型が関与していることが知られている¹⁷. Hb Constant Spring の α 鎖はC末端にさらに31個のアミノ酸残基が付加された

EXTENDED HEMOGLOBINS

α A	Thr - Ser - Lys - Tyr - Arg -Term.	140	141										(+ 31 residues)
α CS	Thr - Ser - Lys - Tyr - Arg - <u>Gln</u> - Ala - Gly - Ala - Ser - Val - Ala - -												
α Icaria	Thr - Ser - Lys - Tyr - Arg - <u>Lys</u> - Ala - Gly - Ala - Ser - Val - Ala - -												
α Koya Dora	Thr - Ser - Lys - Tyr - Arg - <u>Ser</u> - Ala - Gly - Ala - Ser - Val - Ala - -												
Normal Frame	ACU UCU <u>AAA</u> UAC CGU <u>UAA</u> GCU GGA GCC UCG GUA GCA												
Frame Shift	ACU <u>UCA</u> <u>AAU</u> ACC GUU AAG CUG GAG CCU CGG UAG CA												
	↓ (U) Deletion												
α Wayne	Thr - Ser - Asn - Thr - Val - Lys - Leu - Glu - Pro - Arg -Term.	141											146

Fig. 5. Partial amino acid sequence and proposed base sequence of the α -chain of hemoglobins A, Constant Spring (CS), Icaria, Koya Dora, and Wayne.

異常に長いペプチド鎖をもつが (β 鎖の構造は正常), α 鎖C末端の終末コドンの point mutation により, 通常は翻訳されないコドンが α 鎖の一部として翻訳されたものと解釈されている¹⁸⁾. Hb Icaria¹⁹⁾, Hb Koya Dora⁹⁾についても同様の変異が考えられている (Fig. 5). Hb Wayne ではコドンの一部が deletion を起し, frame shift を起したものと解釈されている²⁰⁾. このような残基付加によってもたらされる共通な点は, グロビン産生量がきわめて少量である点で, ヘテロ接合型ではそれらの産生量はわずかに全ヘモグロビンの1~3%を占めるにすぎない. このため, α サラセミア遺伝子 (α -thal. 2) と同様の効果を有すると解釈されている.

終末コドンの変異により, どのような機構によって遺伝子活性 (gene activity) が抑制されることになるのか, なお不明であるが, 以上の事実から α 鎖 mRNA の核酸配列には, 終末コドンに引き続いて通常は翻訳されない部分 (untranslational base sequence) があり, なんらかグロビン産生を制御していることが考えられ, mRNA の機能に関して興味ある問題と思われる.

α サラセミアの病型と遺伝子型を α 鎖の単一座位, 重複座位モデルにあてはめて図示すると, Fig. 6 のようになる^{21,22)}. まず, 単一座位説によれば α -thal. 1 と α -thal. 2 の2種類のサラセミアを想定しなければならないが, 2座位説では, 1種類の遺伝子を想定し, 病態の重症度は α サラセミア遺伝子の同一個体における保因数から説明される. α^{th^0} gene では α 鎖産生機能が全く停止していることを意味し, α^{th^+} gene は, わずかながら α 鎖の合成がみられるという意味であり, 表現型の上で α -thal. 1 と α -thal. 2 に相当するものである. Hb Constant Spring gene は α^{th^+} gene と同様の効果を有しているが, Fig. 6 の Hb H disease-Hb Constant Spring 例では Hb Constant Spring の他に

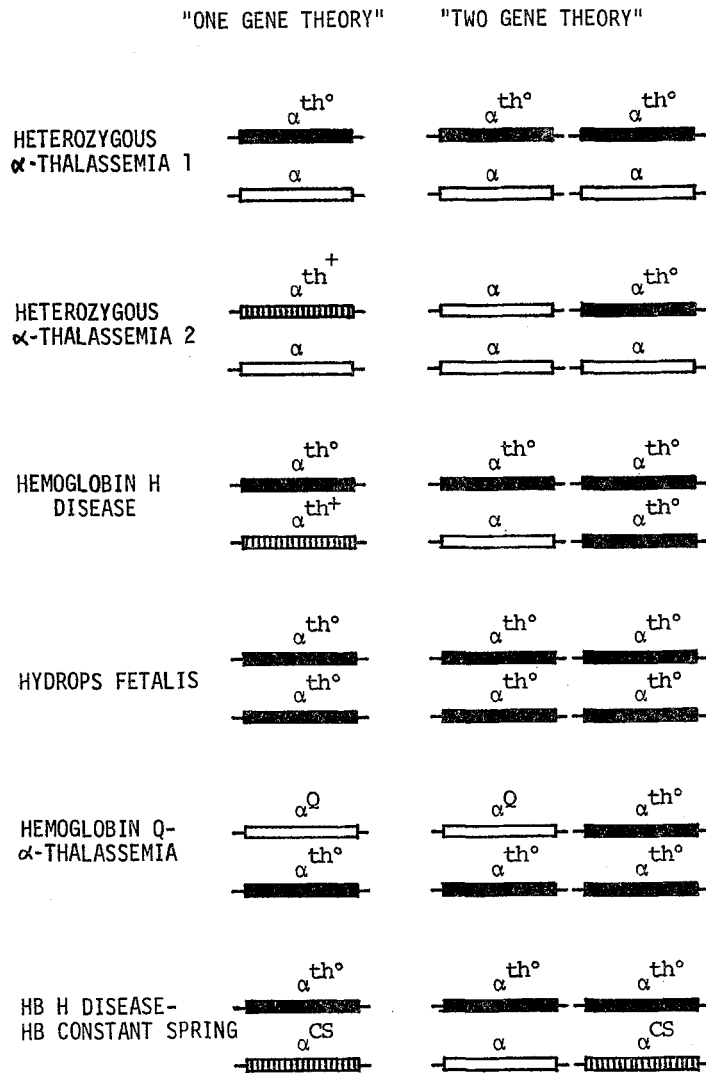


Fig. 6. One-gene and two-gene hypothesis for α -thalassemia (Wasi, 1973; Benz and Forget, 1975).

Hb A が存在しているので、2 座位説が適切と思われる。Hb Constant Spring と同様の変異型 Hb Koya Dora とともに Hb Rampa (α 鎖構造変異型)、Hb A が同一の個体に存在することも、この説をうらづける事実である。

最近、 α サラセミアの病因として gene deletion が実験的に証明されたが (後述)、2 座位説をとれば、*Hydrops fetalis* では完全な α 鎖 gene の deletion、Hb H disease では合計 4 座位のうち 3 座位の deletion、 α -thal. 1 では 4 座位のうち 2 座位の deletion が考えられる。すなわち、 α^{th^0} gene は α 鎖 locus の deletion ということになる。

核酸レベルの研究技法を使って、直接、遺伝子の変化を探る実験法が考案され、サラセミアの研究も次第にタンパクレベルの研究から核酸レベルの分野に入っていきつつある。

正常な網赤血球から α 鎖と β 鎖グロビン mRNA が分離され、ウイルスの reverse transcriptase を使って、それぞれの mRNA に相補的な complementary DNA (cDNA と略す) が合成される²⁸⁻²⁵。この際加える核酸塩基の一部をアイソトープでラベルしておく、ラベルされた cDNA が合成されるが、このようにして得られた cDNA は、 α 、 β -グロビン遺伝子と同じ核酸配列をもっていることになる。このようにして合成された cDNA を用い、molecular hybridization 試験によって mRNA を定量することができる。

Table 2. Comparison of the α/β globin synthesis ratio by intact cells and α and β mRNA content by hybridization (Ramirez *et al.*, 1975)

Source	α/β Ratios Globin synthesis	α mRNA/ β mRNA Hybridization
Normal		
Peripheral blood	1.0	1.0
Bone marrow	1.0	1.0
Heterozygous β^+ thalassemia		
Peripheral blood	2.0	3.8
Bone marrow	1.0	3.7
Homozygous β^+ thalassemia		
Peripheral blood	5.5	12.0
Bone marrow	1.9->20	5.0
Hemoglobin H disease		
Peripheral blood	0.55	0.29
Bone marrow	0.55	0.29

以上のような実験結果 (Table 2) から、正常網赤血球では β mRNA : α mRNA の比率は 1 : 1、Hb H disease では β mRNA に比して α mRNA は少量しか認められず、その比率は 1 : 0.3~0.1 に減少している。次に *Hydrops fetalis* では α mRNA はほとんど完全に消失していることが証明された^{26,27}。この結果、 α グロビン鎖の産生障害は α mRNA の量的な不足に起因していることが明らかにされた。Table 3 に、 α 、 β cDNA とサラセミア患者の肝、脾細胞核の DNA との間の hybridization 試験の結果を示す²⁸⁻³⁰。*Hydrops fetalis* 患者の細胞核 DNA には、 α cDNA に相補的な DNA sequence がほとんど完全に欠如している (飽和領域で30%内外の hybridization がみられるのは、主として β cDNA の contamination によると考えられている)。次に Hb H disease についてみると、 α 鎖 gene の deletion は *Hydrops fetalis* より軽く、ちょうど正常細胞核 DNA : *Hydrops* DNA (α 鎖 gene deletion) をそれぞれ 1 : 3 の割合で人工的に混合した DNA sample と同程度の hybridization がみられたことから、全 α 鎖 gene の 3/4 量の gene deletion を起していることが証明された³¹。さらに最近、 α -thal. 1 患者の細胞核 DNA

Table 3. Saturation hybridization values of cellular DNA to purified α and β cDNA

Source of DNA	To α cDNA % hybridization	To β cDNA % hybridization	Reference
Normal liver	70		(1)
<i>Hydrops fetalis</i> liver	40		
Normal liver	60	70	(2)
<i>Hydrops fetalis</i> liver	20	75	
Normal spleen	39-54	45-61	(3)
<i>Hydrops fetalis</i> liver	24-33	48-60	
β^+ Thalassemia homozygote spleen	35-49	40-59	

(1) Ottolenghi *et al.*, 1974; (2) Taylor *et al.*, 1974; (3) Ramirez *et al.*, 1975

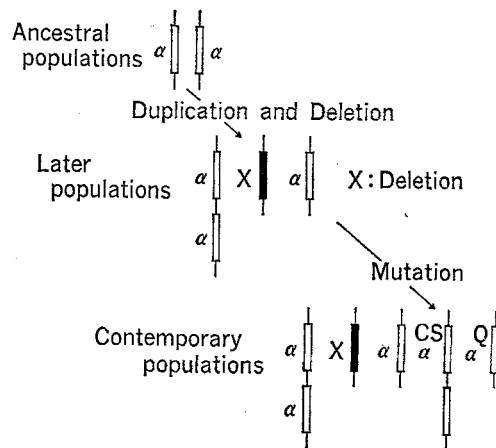


Fig. 7. Proposed scheme for the evolutionary development of human α -chain genes (Nute, 1974).

は α 鎖遺伝子の 50% deletion が証明されたので、 α 鎖 2 座位説をうらづける事実である³²⁾。一方、Table 3 に示すように、 α サラセミア患者の細胞核 DNA には β 鎖 gene は存在しているように見える。このことは α 鎖 gene のみの deletion を意味する。このような結果は、ヒトの遺伝病について、実験的に gene deletion が証明された最初の成果であり、きわめて画期的な研究である。

生物学的に gene deletion が起るしくみは、いくつかあげられるが、中でも染色体の不均衡交叉による遺伝子の乗り換え現象が最も考えやすく、同様のしくみで gene duplication が起ることも、容易に理解される (Fig. 7)。Hb H disease や *Hydrops fetalis* が高頻度に見られる東南アジア地域では、Fig. 7 の最下段に示すように、 α 鎖 gene の deletion を含めて α 鎖遺伝子が多型性を示し、これらの組合せによって、 α -thal. 1, Hb H disease, *Hydrops fetalis* などを発現するものと考えられる。

4. β サラセミア症群

β サラセミア遺伝子は、大別して β° -thal. gene と β^{+} -thal. gene に分けられている³³⁾. β 鎖座位に関しては、重複遺伝子を示唆する結果は得られてない. β^{+} -thal. ホモ接合体で Hb F と Hb A₂ とともに少量ながら構造の正常な Hb A が証明されることから γ , δ , β などの非 α 鎖構造遺伝子は intact な形で存在していることが推定される (Table 4). β° -thal. については β 鎖構造遺伝子の部分的ないし全体の deletion が起っている可能性がある³⁴⁾. 表に示す高 Hb A₂ 型 β サラセミアには特殊な構造変異型はみられず、タンパクレベルの研究からは遺伝子の変化を知る確実な手がかりは得られない. $\delta\beta$ サラセミアは β サラセミアの亜型であるが、Hb F 高値を示し、かつ Hb A₂ レベルが正常である点を特徴とする (Table 5). この中に Hb Lepore 症候群が含まれる³⁵⁾. Hb Lepore は特殊な非 α 鎖構造変異型であるが、産生量が β 鎖に比べて少ないために臨床的に β サラセミア類似の症状を惹起する. Hb Lepore 遺伝子のホモ接合型では Hb A と Hb A₂ が欠損していることから、 β 鎖と δ 鎖 gene の deletion ないしは完全な抑制が起っていると考えられる.

Table 4. The β thalassemias

Type	Homozygote	Heterozygote
β thal ^o	Cooley's anemia Hb F+A ₂	mild anemia* raised Hb A ₂
β thal ⁺	Cooley's anemia Hb F+A+A ₂	as above*
β thal ⁺ (African)	thalassemia intermedia Hb F+A+A ₂	as above*
β thal ⁺ (high Hb F)	thalassemia intermedia Hb F+A+A ₂	as above Hb F in 5-10% range
Excess α chain production	not described	thalassemia intermedia dyserythropoiesis inclusion bodies

* Found in association with β chain mutants, Hbs S, C, E, D, etc. (Weatherall, 1974).

Table 5. The $\delta\beta$ thalassemias

Type	Homozygote	Heterozygote
$\delta\beta$ thal ^o	Cooley's anemia or thalassemia intermedia Hb F only	mild anemia Hb F 5-15%, Hb A ₂ normal
$\delta\beta$ thal ⁺	—	mild anemia Hb F 8-9%, Hb A ₂ normal
$\delta\beta$ Lepore*	Cooley's anemia Hb F+Lepore	middle anemia Hb Lepore 5-10%, Hb A ₂ normal

* Three molecular varieties (Weatherall, 1974).

FUSION HEMOGLOBINS

		9	12	22	50	86	87	116	117	124	126
δ Chain	→→→→→	Thr	Asn	Ala	Ser	Ser	Gln	Arg	Asn	Gln	Met
β Chain	→→→→→	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Thr	His	His	Pro	Val
Lepore-Hollandia		_____ δ _____ β _____									
Lepore-Baltimore		_____ δ _____ β _____									
Lepore-Washington (Boston)		_____ δ _____ β _____									
Miyada		_____ β _____ δ _____									
P Congo		_____ β _____ δ _____									
P Nilotic		_____ β _____ δ _____									
		1			80	81	86	87			
γ Chain	→→→→→	Gly			Asp	Leu	Ala	Gln			
β Chain	→→→→→	Val			Asn	Leu	Ala	Thr			
Kenya		_____ γ _____ β _____									

Fig. 8. Structure of fused globin chains.

Hb Lepore の非α鎖の構造は、N端側がδ鎖、C端側がβ鎖と同様のアミノ酸配列をもっていて、δ鎖とβ鎖遺伝子間の交叉に基づく融合ペプチド鎖である (Table 8)。このような遺伝子間の交叉現象は、太田ら⁸⁶⁾によって発見された Hb Miyada や Hb P-Nilotic⁸⁷⁾の非α鎖が Lepore 鎖と逆の構造をもっていることが同定された結果、さらに確実なものとなった。Hb Miyada や Hb P-Nilotic の非α鎖はN端側がβ鎖、C端側がδ鎖より成り、このため anti-Lepore 型ヘモグロビンと呼ばれている。Hb Lepore はヘテロ接合での産生量は全体の5~10%であり、β鎖変異型に比し著しく少量である。Hb Miyada や Hb P-Nilotic もやはりその産生量は少なく全ヘモグロビン量に対する比率は12~20%にすぎない。

δ鎖とβ鎖は146個のアミノ酸配列中、わずかに10か所の残基に違いがみられるのみで、実際にgeneのどの部分で交叉が起っているか正確には決められない。この点はまた、交叉部位は異なっても同一の構造を有する Hb Lepore gene が産生されることを意味するものである。またN端から1~9番目までの残基間で交叉が起れば Lepore 鎖は正常β鎖、anti-Lepore 鎖は正常δ鎖と全く同一のアミノ酸構造をもち、しかも産生量は正常のβ鎖に比べて低いという結果が予想される。

Fig. 9 に Baglioni⁸⁵⁾ による交叉モデルを示す。図から理解されるように Hb Lepore のホモ接合型では Hb A₁, Hb A₂ が産生されず、intact なδ鎖、β鎖遺伝子の deletion が考えられるが、このモデルはまたδ鎖遺伝子とβ鎖遺伝子の配列順序も図に示されるよ

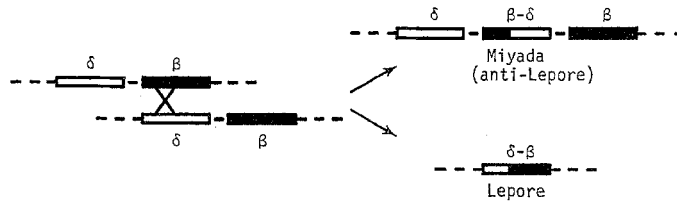
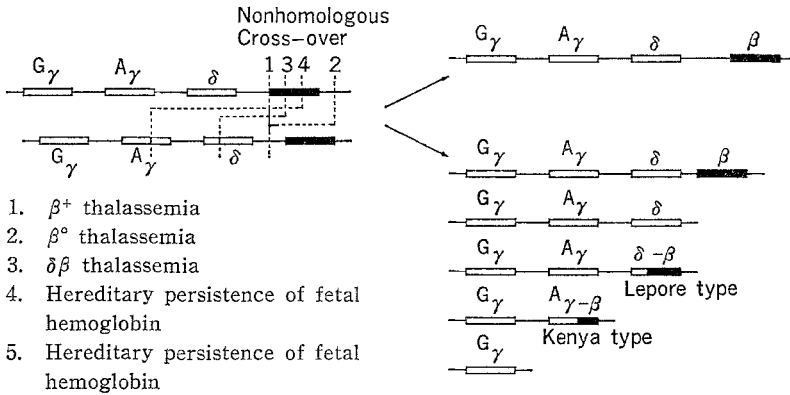


Fig. 9. Proposed scheme for the formation of Lepore and anti-Lepore genes, and deletion of δ - and β -loci by unequal cross-over (Baglioni, 1962).



1. β^+ thalassemia
2. β^0 thalassemia
3. $\delta\beta$ thalassemia
4. Hereditary persistence of fetal hemoglobin
5. Hereditary persistence of fetal hemoglobin

Fig. 10. Regulator genes and a deletion model. Regulator genes are assumed to be intercalated among structural loci indicated. It is possible to derive genotype entirely consistent with the findings in β^0 -, β^+ -, $\delta\beta$ -thalassemia, various forms of hereditary persistence of fetal hemoglobin, Hb Lepore, and Hb Kenya by deletion of the appropriate regulator and/or structure genes.

うなものであることを意味する。Lepore 鎖も anti-Lepore 鎖も合成様式はよく似ており、その産生は骨髓細胞に限られていて、網赤血球では産生されないことが証明されている³⁸⁻⁴⁰。anti-Lepore 遺伝子はN端側にあるグロビン合成の initiation に関与する部分の核酸配列は β 鎖 gene のものであり、Lepore gene ではこの調節系が δ 鎖 gene のものであることは図から理解されるが、このような融合遺伝子では、その両者とも δ 鎖にも β 鎖にも似ていない、いわばその中間の産生様式を示すことが注目される。以上の事実から、 δ 鎖 gene と β 鎖 gene の間の不均等交叉 (nonhomologous crossover) によって生じた融合遺伝子ではグロビン産生が障害されていることが理解される。

詳細なメカニズムについては今後の問題であるが、交叉の際に失われる β 鎖 gene の核酸配列が産生障害の主な要因であるとも考えられる。Hb Lepore, Hb Miyada, Hb Kenya (γ - β 融合遺伝子) などに関する知見をもとにして非 α 鎖遺伝子間における不均等交叉のメカニズムや、調節遺伝子の存在を前提にすると、Fig. 10 に示すような gene

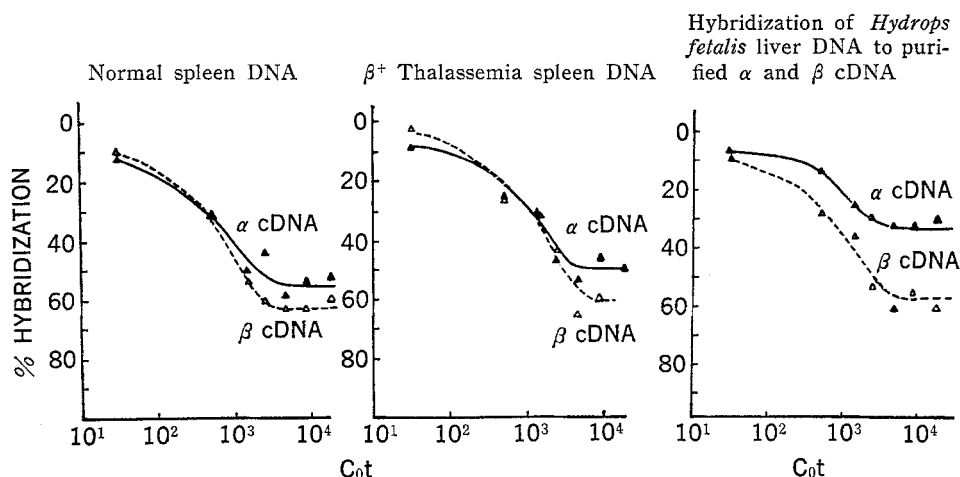


Fig. 11. Hybridization of (A) normal and (B) β -thalassemic spleen, and (C) *hydrops fetalis* liver DNA to purified α and β cDNA (Ramirez *et al.*, 1975, with permission).

deletion モデルによって β サラセミアの遺伝病因の説明が可能である。図に示されるような deletion model によると β^+ thal. では β 鎖の構造遺伝子は intact であるが、その調節遺伝子の deletion が推定される。 β^0 -thal. では調節遺伝子とともに β 鎖構造遺伝子の一部または全体の deletion が起り、 β 鎖の合成は開始されない。

$\delta\beta$ サラセミアについては Hb Lepore と同様のメカニズムにより、 β 鎖、 δ 鎖 gene の deletion、最後の遺伝性高胎児ヘモグロビン症は γ 鎖遺伝子の一部と β 、 δ 鎖各遺伝子の deletion が考えられる。

網赤血球から注意深く分離された mRNA は formamide-acrylamide gel 電気泳動法で 2 分画に分けられる^{41,42}。この 2 つの成分を分離抽出し、cell free system を用いてその機能が調べられた結果、速い易動度を示す F 分画は α 鎖グロビン mRNA、遅い易動度を示す S 分画は β 鎖グロビン mRNA であることが証明された。正常網赤血球には α mRNA と β mRNA とがほぼ同量認められるが、 β -thal. ホモ接合型では β mRNA がほとんどみられず、逆に Hb H disease では前述の α cDNA-mRNA hybridization 結果と同様、 α mRNA の著明な減少が明らかである。

Fig. 11 は cDNA と β サラセミアの脾細胞核 DNA の hybridization 試験の結果であるが³⁰、 β^+ -thal. homozygote の細胞核 DNA には β cDNA に相補的な DNA sequence は、正常と有意差なく認められることが示されている (Table 3)。すなわち、 β -thalassemia には明らかな β mRNA の低下が認められるにもかかわらず、 β -gene の deletion は証明されなかったことになる。このような β thal. における DNA から mRNA への転写過程での欠陥はまだ明らかにされていない。一方、 β 鎖と δ 鎖の構造上の類似性から推定されることは β 鎖遺伝子と δ 鎖遺伝子の核酸配列にも大差なく、 β cDNA と δ 鎖遺伝子との交叉反応 (cross hybridization) の可能性が否定できない。さらに、probe として使用される cDNA の構造が推定されるグロビン構造遺伝子の約半分位の大きさで完全なもの

でなく、グロビンのN端側に相当する gene の構造の変化を感知し得ない可能性なども考慮されるので、 β 鎖遺伝子の partial deletion の可能性は必ずしも否定できない²²⁾。以上のように β サラセミアでは、gene deletion は明らかでないが、 β 鎖遺伝子の partial deletion の可能性は残されているものと解釈したい。また、この他になんらか transcriptional level の異常に起因するものもあると思われる。今後この種の核酸レベル、とくに mRNA や DNA の構造の研究の進展によりこれらの点が明らかにされると思われる。

5. むすび

サラセミア症群に共通の病態生化学は、(1)各々グロビン鎖に特有の mRNA の不足、(2)それに基づくグロビン鎖の産生不足、さらには、 α 鎖と非 α 鎖の量的不均衡に要約できる。

α サラセミアでは明らかな gene deletion が証明されたが、 β サラセミアに関してはこの点なお明確でない。一つの可能性として、調節遺伝子を含む、構造遺伝子の deletion model を示した。

また、 α サラセミアや β サラセミアの一部については特殊な構造遺伝子変異に起因するものがある。

なお、今回討論から省略したが、サラセミア遺伝子の表現型発現を修飾するものとして translational level における種々の要因が考えられる。これらもまた個体の遺伝的背景に基づくもので、サラセミア症群の病態を複雑にしている要因と考えられるので、今後の重要な課題と思われる。

REFERENCE

- 1) Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. 1972. *The Thalassemia Syndromes*, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 2) Schroeder, W.A. and Huisman, T.H.J. 1974. Multiple cistrons for fetal hemoglobin in man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 241: 70-79.
- 3) Lehmann, H. and Carell, R.W. 1968. Differences between α - and β -chain mutants of human hemoglobin and between α - and β -thalassemia. Possible duplication of the α -chain gene. *Brit. Med. J.* 4: 748-750.
- 4) Nute, P.E. 1974. Multiple hemoglobin α -chain loci in monkeys, apes, and man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 241: 39-60.
- 5) Rucknagel, D.L. and Winter, W.P. 1974. Duplication of structural genes for hemoglobin α and β chains in man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 241: 80-92.
- 6) Hollan, S.R., Szelenyi, J.G., Brimhall, B., Duerst, M., Jones, R.T., Koller, R.D. and Stocklen, Z. 1972. Multiple alpha chain loci for human hemoglobins: Hb J-Buda and Hb G-Pest. *Nature* 235: 47-50.
- 7) Bernini, L.F., De Jong, W.W. and Meera Khan, P. 1970. *Atti. Assoc. Genet. Ital.* 15: 191-194 (cited by Nute, P.E. 1974).
- 8) De Jong, W.W., Meera Khan, P. and Bernini, L.F. 1975. Hemoglobin Koya Dora: high frequency of a chain termination mutant. *Am. J. Hum. Genet.* 27: 81-90.
- 9) Abramson, R.K., Rucknagel, D.L., Schreffler, D.C. and Saave, J.J. 1970. Homozygous Hb J Tongariki: evidence for only one α -chain structural loci in Melanesians. *Science* 169: 194-196.
- 10) Beaven, G.H., Hornabrook, R.W., Fox R.H. and Huehns, E.R. 1973. Occurrence of heterozygotes and homozygotes for the α -chain haemoglobin variant Hb J (Tongariki) in New Guinea. *Nature* 235: 46-47.

- 11) Weatherall, D.J., Clegg, J.B. and Naughton, M.A. 1965. Globin synthesis in thalassemia: an *in vitro* study. *Nature* **208**: 1061-1065.
- 12) Heywood, J.D., Karon, M. and Weissman, S. 1965. Asymmetrical incorporation of amino acids into the alpha and beta chains of hemoglobin synthesized in thalassemic reticulocytes. *J. Lab. Clin. Med.* **66**: 476-482.
- 13) Bank, A. and Marks, P.A. 1966. Excess α -chain synthesis relative to β -chain synthesis in thalassemia major and minor. *Nature* **212**: 1198-1200.
- 14) Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. 1972. Haemoglobin synthesis during erythroid maturation in β -thalassemia. *Nature New Biol.* **240**: 190-192.
- 15) Wood, W.G. and Stamatoyannopoulos, G. 1975. Globin synthesis in fractionated normoblasts of β -thalassemia heterozygotes. *J. Clin. Invest.* **55**: 567-578.
- 16) Kan, Y.W., Schwartz, E. and Nathan, D.G. 1969. Globin chain synthesis in the α -thalassemia syndromes. *J. Clin. Invest.* **47**: 2515-2522.
- 17) Pootrakul, S., Wasi, P., Pornpathul M. and Na-Nakorn, S. 1970. Incidence of alpha thalassemia in Bangkok. *J. Med. Assoc. Thailand* **53**: 250-264.
- 18) Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. 1974. Hemoglobin Constant Spring, an unusual α -chain variant involved in the etiology of hemoglobin H disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **232**: 168-178.
- 19) Clegg, J.B., Weatherall, D.J., Contopolou-Griva, I., Caroutsos, K., Pougouras, P. and Tseveris, H. 1974. Haemoglobin Icaria, a new chain termination mutant which causes α -thalassemia. *Nature* **251**: 245-247.
- 20) Medi Seid-Achavan, Winter, W.P., Abramson, R.K. and Rucknagel D.L. 1976. Hemoglobin Wayne: a frameshift mutation detected in human hemoglobin alpha chains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**: 882-886.
- 21) Wasi, P. 1973. Is the human globin α -chain locus duplicated? *Br. J. Haematol.* **24**: 267-273.
- 22) Benz, E.J., Jr. and Forget, B.G. 1975. The Molecular Genetics of the Thalassemia Syndromes, Progress in Hematology (Brown, E.B., ed.), Grune and Stratton, New York, pp. 107-156.
- 23) Verma, I.M., Temple, G.F., Fan, H. and Baltimore, D. 1972. *In vitro* synthesis of DNA complementary to rabbit reticulocyte 10S RNA. *Nature New Biol.* **235**: 163-167.
- 24) Ross, J., Aviv, H., Scolnick, E. and Leder, P. 1972. *In vitro* synthesis of DNA complementary to purified rabbit globin mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**: 264-268.
- 25) Kacian, D.L., Spiegelman, S., Bank, A., Terada, M., Metafora, S., Dow, L.W. and Marks, P.A. 1972. *In vitro* synthesis of DNA components of human genes for globin. *Nature New Biol.* **235**: 167-169.
- 26) Housman, D., Forget, B.G., Skoultchi, A. and Benz, E.J., Jr. 1973. Quantitative deficiency of chain specific globin messenger ribonucleic acids in the thalassemia syndromes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**: 1809-1813.
- 27) Kacian, D.L., Gambino, R., Dow, L.W., Grossbard, E., Natta, C., Ramirez, F., Spiegelman, S., Marks P.A. and Bank, A. 1973. Decreased globin messenger RNA in thalassemia detected by molecular hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**: 1886-1890.
- 28) Ottolenghi, S., Lanyon, W.G., Paul, J., Williamson, R.W., Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Pritchard, J., Pootrakul, S. and Boon, W.H. 1974. The severe form of α -thalassemia is caused by a haemoglobin gene deletion. *Nature* **251**: 389-392.
- 29) Taylor J.M., Dozy, A., Kan, Y.W., Varmus, H.E., Lie-Injo, L.E., Ganeson, J. and Todd, D. 1974. Genetic lesion in homozygous α -thalassemia (hydrops foetalis). *Nature* **251**: 392-393.
- 30) Ramirez, F., Natta, C., O'Donnell, J.V., Canale, V., Bailey, G., Sanguensermisri, T., Mamiatis, G.M., Marks, P.A. and Bank, A. 1975. Relative numbers of human globin

- genes assayed with purified α and β complimentary human DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 1550-1554.
- 31) Kan, Y.W., Dozy, A.M., Varmus, H.E., Taylor, J.M., Holland, J.P., Lie-Injo, L.E., Ganesan, J. and Todd, D. 1975. Deletion of α -globin genes in hemoglobin H-disease demonstrates multiple α globin structural loci. *Nature* **255**: 255-256.
 - 32) Dozy, A.M., Kan, Y.W., Golbus, M.S. and Todd, D. The molecular defects of the α -thalassemia syndromes (Abstracts). 1976. The 16th Internatl. Congr. Hematol., Kyoto, Japan.
 - 33) Weatherall, D.J. 1974. Potential molecular mechanism of thalassemias and related disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **241**: 132-141.
 - 34) Ottolenghi, S., Lanyon, W.G., Williamson, R., Weatherall, D.J., Clegg, J.B. and Pitcher, C.S. 1975. Human globin gene analysis for a patient with $\beta^0/\delta\beta^0$ -thalassemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 2294-2299.
 - 35) Baglioni, C. 1962. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **48**: 1880-1886.
 - 36) Ohta, Y., Yamaoka, K., Sumida, F. and Yanase, T. 1971. Haemoglobin Miyada, a β - δ fusion peptide (anti-Lepore type) discovered in a Japanese family. *Nature New Biol.* **234**: 218-220.
 - 37) Badr, F.M., Lorkin, P.A., Lehmann, H. 1973. Haemoglobin P-Nilotic containing a β - δ chain. *Nature New Biol.* **242**: 107-110.
 - 38) Gill, F., Atwater, J. and Schwartz, E. 1972. Hemoglobin Lepore trait: globin synthesis in bone marrow and peripheral blood. *Science* **178**: 623-625.
 - 39) White, J.M., Lang, A., Lorkin, P.A., Lehmann, H. and Reeve, J., 1972. Synthesis of haemoglobin Lepore. *Nature New Biol.* **235**: 208-210.
 - 40) Roberts, A.V., Clegg, J.B., Weatherall, D.J. and Ohta, Y. 1973. Synthesis *in vitro* of anti-Lepore haemoglobin. *Nature New Biol.* **245**: 23-24.
 - 41) Forget, B.G., Housman, D., Benz, E.J., Jr. and McCaffrey, R.P. 1975. Synthesis of DNA complementary to separated human alpha and beta globin messenger RNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 984-988.
 - 42) Kazazian, H.H., Jr., Cinder, G.D., Synder, P.G., Van Benden, R.J. and Woodhead, A.P. 1975. Further evidence of a quantitative deficiency of chain-specific globin mRNA in the thalassemia syndromes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 567-571.