

HEMOGLOBIN HIJIYAMA ( $\alpha_2\beta_2^{120\text{Glu}}$ )A RECENTLY DISCOVERED FAST-MOVING HEMOGLOBIN  
IN A JAPANESE FAMILY

日本人の一家族に最近発見された泳動度の大きい血色素

TAKAOKI MIYAJI, M.D. 宮地隆興

IWAO IUCHI, M.D. 井内岩夫

YUSO OBA, M.D. 大庭雄三

KIYOMI YAMAMOTO 山本きよみ

SUSUMU SHIBATA, M.D. 柴田 進

HOWARD B. HAMILTON, M.D.



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION

国立予防衛生研究所－原爆傷害調査委員会

JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

## TECHNICAL REPORT SERIES

### 業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory councils, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC業績報告書は、ABCCの日本人および米人専門職員、顧問、評議会、政府ならびに民間の関係諸団体の要求に応じるための日英両語による記録である。業績報告書集は決して通例の誌上発表に代るものではない。

# HEMOGLOBIN HIJIYAMA ( $\alpha_2\beta_2^{120\text{Glu}}$ )

## A RECENTLY DISCOVERED FAST-MOVING HEMOGLOBIN IN A JAPANESE FAMILY

日本人の一家族に最近発見された泳動度の大きい血色素

TAKAOKI MIYAJI, M.D.<sup>1</sup> 宮地隆興

IWAO IUCHI, M.D.<sup>1</sup> 井内岩夫

YUSO OBA, M.D.<sup>2</sup> 大庭雄三

KIYOMI YAMAMOTO<sup>2</sup> 山本きよみ

SUSUMU SHIBATA, M.D.<sup>2</sup> 柴田 進

HOWARD B. HAMILTON, M.D.<sup>3</sup>

*Approved 承認 31 August 1967*



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION  
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPAN

A Cooperative Research Agency of  
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES · NATIONAL RESEARCH COUNCIL  
and  
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE  
with funds provided by  
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION  
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH  
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

### 原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島および長崎

米 国 学 士 院 一 学 術 会 議 と 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所  
と の 日 米 共 同 調 査 研 究 機 関

米 国 原 子 力 委 員 会、厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所 お よ び 米 国 公 衆 衛 生 局 の 研 究 費 に よ る

*Department of Clinical Pathology, Kawasaki Hospital, Okayama City<sup>1</sup>; Third Department of Internal Medicine,  
Yamaguchi University Medical School<sup>2</sup>; and Department of Clinical Laboratories, ABCC<sup>3</sup>*

岡山市川崎病院臨床病理部,<sup>1</sup> 山口大学医学部第3内科,<sup>2</sup> およびABCC臨床検査部<sup>3</sup>

Presented in part at the Tenth Annual Meeting of the Japanese Society of Human Genetics,  
Kumamoto City, 9-10 October 1965

本報告の一部は、1965年10月9～10日に熊本市で開かれた第10回人類遺伝学会で発表された。

A paper based on this report was published in the following journal

本報告に基づく論文は下記の雑誌に発表した。

Science 159:204-6, 1968

# CONTENTS

## 目 次

Introduction	緒 言	1
Methods	実験方法	1
Results	実験成績	2
Discussion	考 察	5
Summary	要 約	8
References	参考文献	8

Table 1 Comparison of amino acid content of the abnormal peptide with  $\beta$  Tp-12B and  $\beta$  Tp-13 from Hb A  
表 (Amino-ethylated)

異常ペプチドとアミノエチル化によって作成したHb Aの $\beta$ Tp-12Bおよび $\beta$ Tp-13のアミノ酸組成の比較	6
---	---

Figure 1 Pedigree for hemoglobin Hijiya

図 Hb Hijiya の家系	3
2 Starch gel electrophoresis of Hb A, Hijiya and Hofu Hb A, Hb Hijiya, Hb Hofu のでんぶんゲル電気泳動	4
3 Starch block electrophoresis of Hb A and Hb Hijiya Hb A とHb Hijiya のでんぶんブロック電気泳動	4
4 Fingerprints of amino-ethylated beta chains of Hb A and Hb Hijiya Hb A とHb Hijiya のアミノエチル化 $\beta$ 鎖のフィンガープリント	5

# HEMOGLOBIN HIJIYAMA ( $\alpha_2\beta_2^{120Glu}$ )

## A RECENTLY DISCOVERED FAST-MOVING HEMOGLOBIN IN A JAPANESE FAMILY

日本人の一家族に最近発見された泳動度の大きい血色素

### INTRODUCTION

In a previous report from these laboratories, results of a survey for hemoglobinopathies in the Nagasaki area of Kyushu, Japan, were presented.<sup>1</sup> In over 5000 individuals, one abnormal hemoglobin, Hb E, was detected in a 33-year-old Japanese male, and subsequently in four other members of his family.

Reported here are the results of a similar survey among 9262 Japanese residents in the Hiroshima area of Honshu, Japan, conducted by the Department of Clinical Laboratories of ABCC in Hiroshima City, in cooperation with the Third Department of Internal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, Ube City and the Department of Clinical Pathology of Kawasaki Hospital in Okayama City.

Two abnormal hemoglobins, both  $\beta$  chain anomalies, were discovered in this survey. We describe here the chemical characterization of one of these abnormal hemoglobins which, on electrophoresis, migrates towards the anode faster than Hb-A. This abnormal hemoglobin, named Hb-Hijiyama, was first discovered in a 53-year-old housewife and later in her eldest son. The abnormal hemoglobin does not seem to be associated with any unusual clinical findings or hematological abnormalities.

### METHODS

Blood samples were obtained from 9262 individuals who visited the ABCC clinic in Hiroshima between 23 June 1964 and 4 November 1966 as voluntary participants in the ABCC-JNIH Adult Health Study<sup>2</sup> and In Utero Study.<sup>3</sup>

Blood drawn in the clinic was transferred to the ABCC biochemistry laboratory, where the serum was separated from the clot. The cells, thoroughly washed in saline, were hemolyzed with water and toluene to obtain a hemoglobin concentration of approximately 10 g/100 ml. A week's accumulation of hemolysates, stored at 4°C were shipped to the Yamaguchi University Medical School

### 緒言

著者らの前回の報告では、九州の長崎地区で行なった異常血色素症の調査の結果について発表した。<sup>1</sup> 5000人以上を調査した結果33歳の日本人男性に異常血色素Hb Eが発見され、その後、家族員4人にもこの同じ血色素が発見された。

今回は、広島 ABCCの臨床検査部が、宇部市山口大学医学部第3内科および岡山市川崎病院臨床病理部と協力して、広島地区の日本人 9262人について行なった同様な調査の結果を報告する。

この調査では、 $\beta$ 鎖異常を有する異常血色素が2種類発見された。ここでは、この2種の異常血色素の1つについて、その化学的性状を報告する。この異常血色素は電気泳動法でHb Aよりは陽極へ速く泳動した。著者らはこれをHb Hijiyamaと名づけた。この異常血色素は最初に53歳の主婦に発見され、その後、彼女の長男にも検出された。Hb Hijiyamaは異常な臨床徴候または血液学的所見を伴わないように思われた。

### 実験方法

1964年6月23日から1966年11月4日までに、ABCC—予研成人健康調査<sup>2</sup>および胎内被爆児調査<sup>3</sup>で自発的に受診した者9262人から血液標本を入手して検査した。

外来で採取した血液をABCCの生化学検査室に送って凝血と血清を分離した。生理的食塩水でじゅうぶんに洗った赤血球を水とトルエンで溶血し、約10 g/100 mlの溶血液を得た。この溶血液を4°Cで保存し、1週1回、宇部市山口大学医学部へ送って寒天ゲル電気泳動法(pH8.6お



laboratories for preliminary screening for abnormal hemoglobins by agar gel electrophoresis at pH 7.0 and 8.6 using the method of Shibata and Iuchi.<sup>4</sup> When an abnormality was detected, a second sample of blood was obtained, hand-carried from Hiroshima to Ube, for confirmation and further characterization of the abnormality. Upon confirmation of the presence of an abnormal hemoglobin, family studies were initiated and blood was obtained from as many of the proband's relatives as possible.

Abnormal hemoglobin content was determined by scanning agar gel preparations (pH 8.6). Starch gel electrophoresis consisted of a discontinuous system of tris-EDTA-borate buffer (pH 8.6) and borate buffer (pH 8.48).<sup>5</sup> To estimate the magnitude of the negative charge of Hb Hijiya, Hb Hofu ( $\alpha_2\beta_2^{126\text{Glu}}$ ) was used as control. Singer's test<sup>6</sup> was used to quantitate the alkaline resistant hemoglobin and Goldberg's method<sup>7</sup> used to examine the solubility of reduced hemoglobin. Starch block electrophoresis was used to purify the abnormal hemoglobin.<sup>8</sup> A portion of the hemoglobin was treated with p-CMB parachloromercuribenzoate and subjected to carboxy-methyl-cellulose chromatography<sup>9</sup> in order to separate the  $\alpha$  and  $\beta$  chains. The chain location of the anomaly was determined by hybridization tests between Hb Hijiya and canine hemoglobin.<sup>10</sup> Globin was prepared by removing heme from the purified abnormal hemoglobin and the abnormal chain by the Anson-Mirsky method.<sup>11</sup> Urea dissociation paper electrophoresis was done using veronal buffer (pH 8.6) containing 7M urea.<sup>12</sup> Fingerprinting was performed by the method of Ingram<sup>13</sup> and Baglioni<sup>14</sup> and aminoethylation of the chain according to Jones.<sup>15</sup> Tyrosine was detected by spraying  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol and nitrous acid on the fingerprints followed by heating.<sup>16</sup> Fingerprints were lightly stained with 0.02% ninhydrin, the spots were cut out, and the peptides extracted with 6 N HCl and hydrolyzed at 105°C for 22 hours, after which the amino acid composition was determined by automatic amino acid analysis (Yanagimoto Automatic Amino Acid Analyzer, Model LC-5).<sup>17,18</sup>

## RESULTS

**Family Study** The proband, a 53-year-old Japanese housewife, was in good health when seen in the ABCC clinic. Her red blood cell count was 4.0 million/mm<sup>3</sup>; hemoglobin 12.1 g/100 ml; white blood cell count 6650/mm<sup>3</sup> (differential normal); hematocrit 37.5; erythrocyte sedimentation rate 14.0 mm/hr; erythrocyte morphology normal; erythrocyte fragility within normal limits.

よび7.0)による異常血色素の予備スクリーニングを柴田および井内の方法<sup>4</sup>を用いて、行なった。異常血色素が発見された場合は、あらためて採血を行なって、広島から宇部へ運んでその存在を確認し、さらに詳しく性状を調べた。異常血色素が確認されると家系調査を行ない、発端者の血縁者の可及的多数から血液を集め同じ血色素の有無を調べた。

異常血色素の含量は、寒天ゲル電気泳動法 (pH 8.6) における泳動縞のスキニングによって測定した。でんぶんゲル電気泳動は tris-EDTA-硼酸緩衝液 (pH 8.6) と硼酸緩衝液 (pH 8.48) の不連続系を用いて行なった。<sup>5</sup> Hb Hijiya の陰性電荷の大きさを推定するため、対照として Hb Hofu ( $\alpha_2\beta_2^{126\text{Glu}}$ ) を用いた。アルカリ抵抗性血色素の定量は Singer の方法<sup>6</sup> で、還元血色素の溶解度は Goldberg の方法<sup>7</sup> で測定した。異常血色素の精製は、でんぶんブロック電気泳動法<sup>8</sup> で行なったが、一部は溶血液を p-CMB Parachloromercuribenzoate 処理して CMC クロマトグラフィー<sup>9</sup> にかけて  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を分離した。また鎖異常を決定するために Hb Hijiya とイヌ血色素との雑種生成試験を行なった。<sup>10</sup> さらに精製した異常血色素およびこの異常血色素の異常  $\beta$  鎖を Anson-Mirsky の方法<sup>11</sup> で脱ヘムしてグロビンを調製した。グロビンの尿素解裂濾紙電気泳動法には 7 M 尿素を含む veronal 緩衝液 (pH 8.6) を用いた。<sup>12</sup> フィンガープリントは、Ingram 法<sup>13</sup> および Baglioni 法<sup>14</sup> で行なった。 $\beta$  鎖のアミノエチル化は Jones の方法<sup>15</sup> で行なった。フィンガープリント上でのチロジン検出は  $\alpha$ -ニトロソ- $\beta$ -ナフトールと亜硝酸を噴霧して加熱する方法<sup>16</sup> で行なった。0.02% ニンヒドリンで淡く発色させたフィンガープリントからスポットを切り出して、6 N HCl でペプチドを抽出し、105°C で22時間加水分解し、自動アミノ酸分析方法 (Yanagimoto Automatic Amino Acid Analyzer, Model LC-5)<sup>17,18</sup> でアミノ酸組成の分析を行なった。

## 実験成績

**家系調査** 発端者は、53歳の日本人主婦で、ABCC受診時に健康であった。赤血球数 400万/mm<sup>3</sup>; 血色素量 12.1g/100ml; 白血球数 6650/mm<sup>3</sup> (分類像正常)、ヘマトクリット 37.5%, 赤血球沈降速度 14.0 mm/時; 赤血球形態正常; 赤血球滲透圧抵抗試験正常範囲内。

FIGURE 1 PEDIGREE FOR HEMOGLOBIN HIJIYAMA

図1 Hb HijiYama の家系

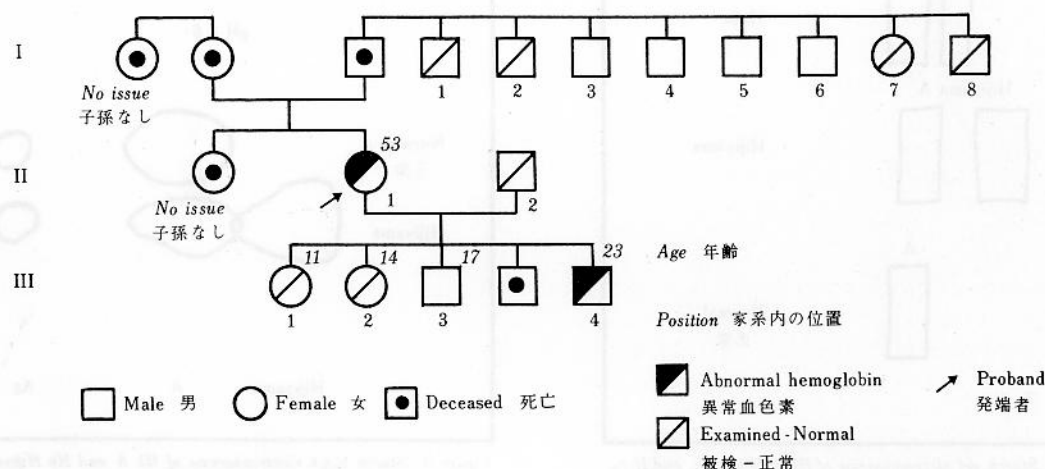


Figure 1 is a pedigree of the proband's kindred. One son, age 23, a university student in excellent health, was found to have the abnormal hemoglobin in roughly the same proportion as his mother. The son's red blood cell count was 5.5 million/mm<sup>3</sup>; hemoglobin 16.0 g/100 ml; erythrocyte morphology normal. Two daughters of the proband had normal hemoglobin; a second son was not available for study. The parents of the proband were dead. Blood samples from three paternal uncles and a maternal aunt, all living in Hawaii, were normal.\*

#### Chemical Characterization of Hemoglobin HijiYama

When a hemolysate of the proband's blood was subjected to agar gel electrophoresis at pH 8.6, an additional abnormal band appeared migrating more rapidly towards the anode than Hb A. The abnormal band was not apparent at pH 7.0. On starch gel electrophoresis at pH 8.6, the distance between Hb A and Hb HijiYama was approximately twice that between Hb A and Hb Hofu ( $\alpha_2\beta_2^{126\text{Glu}}$ ); the latter, also a fast-moving hemoglobin, was used in the electrophoresis at the same time for comparison (Figure 2).

The abnormal hemoglobin was readily separated from Hb A by starch block electrophoresis (Figure 3). The abnormal hemoglobin content of the proband's hemolysate was 58.4%. Alkaline resistance and solubility was normal, as was Hb A<sub>2</sub> content.

図1は発端者の家系図である。23歳の息子は健康な、大学生であるが、かれは母親とほぼ同じ含有率で異常血色素を有していることがわかった。息子の赤血球数は550万/mm<sup>3</sup>；血色素量16.0g/100ml；赤血球形態正常発端者の2人の娘の血色素は正常である。次男は調査できなかった。発端者の両親は死亡しており、ハワイにいる父方の叔父3人と母方の叔母1人からとった血液標本は正常であった\*。

Hb HijiYamaの化学的性状 発端者の溶血液の寒天ゲル電気泳動法(pH 8.6)において、Hb Aと、それよりも泳動の大きい血色素の異常泳動縞が明瞭に出現した。しかしpH 7.0の寒天ゲルでは異常な泳動縞を検出することができなかった。pH 8.6のでんぷんゲル電気泳動法でHb HijiYamaの泳動度を吟味するとHb Aの泳動縞からHb HijiYamaまでの距離は、Hb A縞と同時に対照として泳動した同じく泳動度の大きい血色素であるHb Hofu ( $\alpha_2\beta_2^{126\text{Glu}}$ )との距離間隔の約2倍であった(図2)。

この異常血色素は、でんぷんブロック電気泳動法で容易にHb Aから分離することができた(図3)。発端者の溶血液の異常血色素含量は58.4%であった。アルカリ抵抗試験および溶解度試験ならびにHb A<sub>2</sub>含量は正常であった。

\*We are indebted to Dr. Grant Stemmermann of Kuakini Hospital, Honolulu, Hawaii, for help in obtaining these four blood samples.

これら4例の血液標本を得る上にいただいた米国Hawaii州Honolulu市Kuakini病院のGrant Stemmermann博士の協力を感謝する



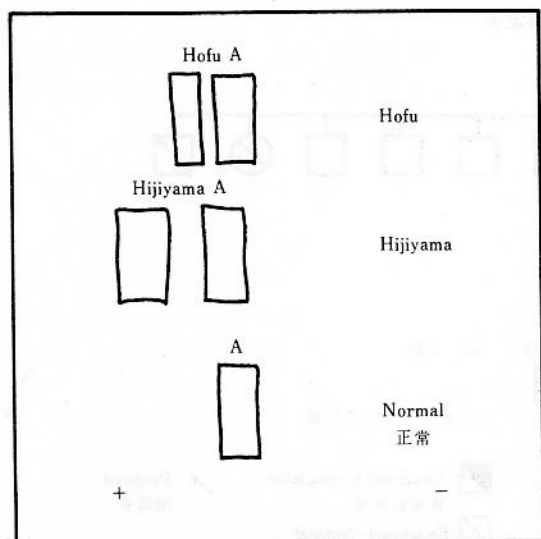


Figure 2 Starch gel electrophoresis of Hb A, Hijiya, and Hofu. pH 8.6. The distance between Hb A and Hb Hijiya is approximately twice that between Hb A and Hb Hofu

図2 Hb A, Hb HijiyaとHb Hofu のでんぶんゲル電気泳動. PH 8.6. Hb AからHb Hijiyaまでの距離は, Hb AからHb Hofu までの距離の約2倍である

In hybridization tests with canine hemoglobin, the hybrid ( $\alpha_2^{\text{Can}} \beta_2^{\text{Hijiya}}$ ) migrated more rapidly towards the anode than ( $\alpha_2^{\text{Can}} \beta_2^{\text{A}}$ ), and the migration rate of ( $\alpha_2^{\text{Hijiya}} \beta_2^{\text{Can}}$ ) was the same as that of ( $\alpha_2^{\text{A}} \beta_2^{\text{Can}}$ ).

On urea dissociation paper electrophoresis of globin,  $\beta$  chain migration toward the anode was in the following order:  $\beta$  Hijiya,  $\beta$  Hofu,  $\beta$  A. On CMC chromatography of hemolysates treated with p-CMB,  $\beta$  Hijiya was eluted more rapidly than  $\beta$  A so that the pure abnormal chain was easily separable from the normal chain.

Fingerprints of globin of Hb Hijiya appeared to be almost identical to those of normal Hb A globin. No peptide spots seemed to be missing and no abnormal spots were noted. However, specific staining of the fingerprints for tyrosine showed that the spot normally formed by an overlapping of  $\beta$  Tp-1 and  $\beta$  Tp-13, though tyrosine positive in Hb A, was negative in Hb Hijiya. Aside from this single difference, staining of fingerprints for tyrosine and histidine was identical for Hb A and Hijiya.

When fingerprints were prepared after amino-ethylation, the pattern for Hb Hijiya showed a definite abnormal spot directly above  $\beta$  Tp-10,11, and the peptide spots in the positions of  $\beta$  Tp-12B and  $\beta$  Tp-13 were absent (Figure 4). Amino acid assay of this abnormal spot, extracted with 6 N HCl was compared with the amino acid composition of  $\beta$  Tp-12B and  $\beta$  Tp-13 obtained from

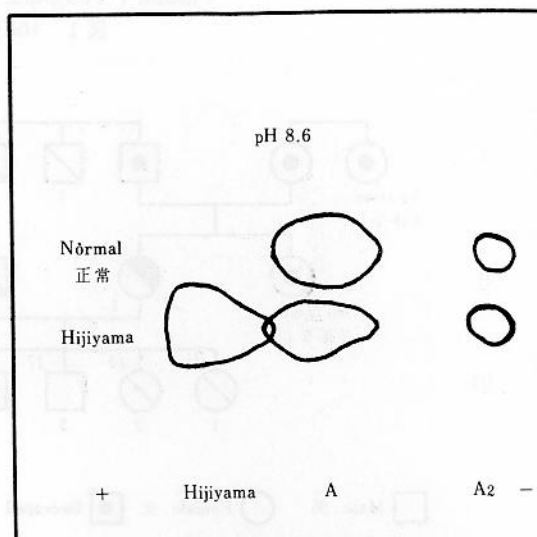


Figure 3 Starch block electrophoresis of Hb A and Hb Hijiya. Hb Hijiya is readily separated from Hb A, migrating more rapidly towards the anode. Both samples contain about equal amounts of Hb A<sub>2</sub>

図3 Hb AとHb Hijiya のでんぶんブロック電気泳動 Hb Hijiya は陽極へ速く泳動し, 容易にHb Aから分離できた. 両者のHb A<sub>2</sub>含量はほぼ等量である.

イヌ色素ととの雑種生成試験において, 雑種色素 ( $\alpha_2^{\text{Can}} \beta_2^{\text{Hijiya}}$ ) は ( $\alpha_2^{\text{Can}} \beta_2^{\text{A}}$ ) よりもずっと速く陽極側に泳動し ( $\alpha_2^{\text{Hijiya}} \beta_2^{\text{Can}}$ ) の電気泳動度は ( $\alpha_2^{\text{A}} \beta_2^{\text{Can}}$ ) と同じであった.

グロビンの尿素解裂濾紙電気泳動法においても,  $\beta$  鎖の泳動度は陽極側より  $\beta$  Hijiya,  $\beta$  Hofu および  $\beta$  A の順であった. p-CMB 処理溶血液のCMCクロマトグラフィーでは,  $\beta$  Hijiya は  $\beta$  A よりも先に溶出され, 容易に純粋な異常鎖を得ることができた.

Hb Hijiya のグロビンのフィンガープリントは, 一見したところでは正常Hb Aグロビンのそれとほとんど変わらず, ペプチドスポットの欠除も異常スポットの出現も認められなかった. しかしフィンガープリントにチロジンの特異的呈色反応を行なってみると,  $\beta$  Tp-1 と  $\beta$  Tp-13 が重なって作るスポットはHb Aではチロジン陽性であるにもかかわらず, Hb Hijiyaでは陰性であった. その他の点では, Hb AでもHb Hijiyaでも, フィンガープリント上のチロジンおよびヒスチジンの呈色はまったく一致した.

あらかじめアミノエチル化してからフィンガープリントを行なうと, Hb Hijiya の  $\beta$  Tp-10, 11 のスポットの真上に明瞭に異常スポットが現われ,  $\beta$  Tp-12B と  $\beta$  Tp-13 の位置のペプチドスポットが欠けていた (図4). この異常スポットを 6 N HCl で抽出し, アミノ酸分析を行なうと正常  $\beta$  A 鎖のフィンガープリントから得た  $\beta$  Tp-12B およ

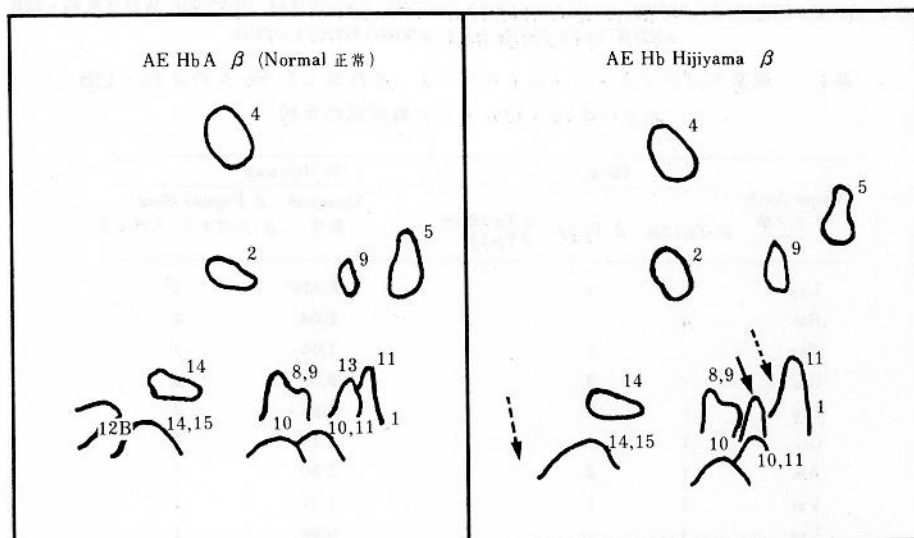


Figure 4 Fingerprints of amino-ethylated beta chains of Hb A and Hb Hijiya. In Hb Hijiya  $\beta$  Tp-12B and 13 are absent (dotted arrow) and an abnormal spot appears immediately above  $\beta$  Tp-10, 11 (solid arrow).

図4 Hb A と Hb Hijiya のアミノエチル化 $\beta$ 鎖のフィンガープリント。Hb Hijiya ではTp-12B と13が欠如し（点線の矢印）、Tp-10, 11の真上（矢印）に異常スポットが現われていた。

fingerprints of normal  $\beta$  A (Table 1). The abnormal spot contained one more glutamic acid or glutamine and one less lysine residue than the two normal peptides, but otherwise was similar to them.

## DISCUSSION

It is clear from the results of electrophoresis and hybridization tests that Hb Hijiya is a fast-moving abnormal hemoglobin with a  $\beta$  chain anomaly. The migration rate of the abnormal hemoglobin and the urea denatured abnormal chain suggests that the abnormal hemoglobin carries a negative charge four times greater than Hb A and twice that of Hb Hofu, the latter, in turn, having a negative charge twice that of Hb A, and that a difference in the primary structure of the  $\beta$  polypeptide chain is responsible for the difference in the migration rate.

The amino acid composition of the abnormal spot appearing on the finger print of the amino-ethylated  $\beta$  chain of Hb Hijiya is identical with  $\beta$  Tp-12B +  $\beta$  Tp-13 of  $\beta$  A, in other words, corresponds to the residues from  $\beta$  113 to  $\beta$  132 of  $\beta$  A,<sup>19</sup> except that there is one less lysine and one more glutamic acid or glutamine residue. Thus, substitution could occur at either  $\beta$  120 or  $\beta$  132, the two positions occupied by lysine in the normal  $\beta$  A chain in this region. The evidence indicates that the substitution is in fact at  $\beta$  120. The C-terminal lysine at  $\beta$  120 is normally subject to tryptic hydrolysis, but in

び $\beta$  Tp-13のアミノ酸組成と比較した（表1）。この異常スポットは、正常な2つのペプチドと比べて、リジン残基が1つ欠け、グルタミン酸またはグルタミンが1つ多い。他の点では正常なものと同じであった。

## 考 察

電気泳動法および雑種生成試験の結果から、Hb Hijiyaは $\beta$ 鎖異常を有する泳動度の大きい血色素であることは明白である。また異常血色素および尿素変性した異常 $\beta$ 鎖の電気泳動度の観察から、この異常血色素はHb Aよりも4倍の陰性荷電を有しており、Hb Aよりも2倍も陰性荷電の大きいHb Hofuの2倍の陰性荷電をもっている。しかも、 $\beta$ ポリペプチド鎖の一次構造の違いが電気泳動度の差となって現われていることが推定される。

アミノエチル化したHb Hijiyaの $\beta$ 鎖のフィンガープリントに現われた異常スポットのアミノ酸組成は、リジンが1個少なく、グルタミン酸またはグルタミン残基が1個多いことだけを除けば、 $\beta$  A鎖（正常 $\beta$ 鎖）の $\beta$  Tp-12B +  $\beta$  Tp-13、すなわち $\beta$  A鎖の $\beta$  113から $\beta$  132までの残基にまったく一致する。<sup>19</sup>したがって $\beta$  A鎖のこの部分にある $\beta$  120または $\beta$  132のリジンが置換されているものと考えられる。実際には置換は $\beta$  120のリジンであることがわかった。普通は $\beta$  120のリジンのC末端がトリプシン加水分解を受けるが、異常鎖の場合には、リジンが置

TABLE 1 COMPARISON OF AMINO ACID CONTENT OF THE ABNORMAL PEPTIDE WITH  $\beta$  Tp-12B AND  $\beta$  Tp-13 FROM Hb A (AMINO-ETHYLATED)

表1 異常ペプチドとアミノエチル化によって作成した Hb A の  $\beta$  Tp-12B および  $\beta$  Tp-13 のアミノ酸組成の比較

Amino Acids アミノ酸	Hb A			Hb Hijiya	
	$\beta$ Tp-12B	$\beta$ Tp-13	$\beta$ Tp-12B + $\beta$ Tp-13	Abnormal 異常	$\beta$ Peptide Spot $\beta$ ペプチド スポット
Lys	1	1	2	0.870*	1†
His	2	-	2	2.03	2
Thr	-	1	1	1.04	1
Glu	-	3	3	3.58	4
Pro	-	2	2	1.95	2
Gly	1	-	1	1.19	1
Ala	1	2	3	2.80	3
Val	1	1	2	1.77	2
Leu	1	-	1	0.96	1
Tyr	-	1	1	0.86	1
Phe	1	1	2	2.27	2
Total 計	8	12	20		20

\*Residues estimated from amino acid analysis アミノ酸分析による残基の推定

†Nearest whole residue 丸めた残基数。

the abnormal chain, in the absence of lysine, hydrolysis at this point apparently could not occur resulting in a combined abnormal peptide corresponding to  $\beta$  Tp-12B and  $\beta$  Tp-13. A further consequence of this substitution would be that the acid-insoluble "core" of  $\beta$  Hijiya would extend from  $\beta$  83 to  $\beta$  132, in contrast to the "core" of  $\beta$  A which includes residues from  $\beta$  83 to  $\beta$  120. Such an assumption is borne out by the fact that, in ordinary fingerprints of non-aminoethylated Hb Hijiya, although  $\beta$  Tp-13 was missing, an abnormal spot did not appear, presumably because it was combined with the insoluble "core". Arguing against substitution at  $\beta$  132, on the other hand, is the fact that  $\beta$  Tp-14, the tryptic peptide adjacent to  $\beta$  132 (and  $\beta$  Tp-13), was in its expected position in the fingerprint of  $\beta$  Hijiya, which may be taken to indicate that tryptic digestion had hydrolyzed the C-terminal of lysine at  $\beta$  132.

Therefore, it seems most likely that at  $\beta$  120, lysine has been replaced either by glutamic acid or glutamine. In view of the rapid migration rate described above, replacement is most probably glutamic acid, since its additional negative charge would contribute towards the enhanced electrophoretic mobility of the abnormal hemoglobin towards the anode, in contrast to glutamine, which, being a neutral substituent, would exert less or no effect on this property of the molecule.

換されて存在しないため、この点での加水分解が起こらず  $\beta$  Tp-12B および  $\beta$  Tp-13 に相当する結合異常ペプチドが生ずるのであろう。そのほか、 $\beta$  A 鎖の酸不溶性 "core" は  $\beta$  83 から  $\beta$  120 までの残基を含むのに対して、 $\beta$  Hijiya では、この置換の結果、その不溶性の "core" は  $\beta$  83 から 132 までとなる。この推定は、普通のアミノエチル化していない Hb Hijiya グロビンを材料にしたフィンガープリントでは  $\beta$  Tp-13 が欠けているにもかかわらず、異常スポットは現われなかったことと符合する。すなわち、それは不溶性の "core" と連結しているためと考えられる。一方  $\beta$  132 における置換を否定する所見としては、 $\beta$  132 (および  $\beta$  Tp-13) に隣接している  $\beta$  Tp-14 が、 $\beta$  Hijiya のフィンガープリント上の予想された位置にあることがあげられ、このことは、トリプシン消化により  $\beta$  132 リジンの C 末端を加水分解したことを示すものと考えられる。

したがって、 $\beta$  Hijiya 鎖では  $\beta$  120 のリジンがグルタミン酸またはグルタミンによって置換されていると推定される。上述のごとく陽極への泳動度が大きい点を考えると、これを置換したのはおそらくグルタミン酸であろう。グルタミンは中性基であるから、置換によって  $\beta$  鎖または色素分子の陰性荷電をわずかに増加させない。Hb Hofu の  $\beta$  鎖における置換がそれである。ところがグルタミン酸は酸性アミノ酸でその付加的陰性電荷がグルタミンより 2 倍大きく異常色素の陽極への電気泳動度をずっと大きくするはずである。Hb Hijiya の  $\beta$  鎖の置換はそれに一致する。

At least two other abnormal hemoglobins have been reported in which glutamic acid is substituted for lysine. In Hb I, the substitution is in the  $\alpha$  chain at the 16th residue,<sup>20,21</sup> and in Hb N $\beta$ \* in the  $\beta$  chain at the 95th residue.<sup>22</sup> Thus, Hb Hijiya is yet another example to be added to the expanding list of abnormal hemoglobins. According to present conventions Hb Hijiya is designated as  $\alpha_2\beta_2^{120\text{Glu}}$

Whether the abnormality has any clinical effect is not clear. The proband has occasionally suffered from mild iron deficiency anemia, readily corrected with short-term iron therapy. Her son, on the other hand, has a high normal hemoglobin and red blood cell count, which could conceivably represent a polycythemic reaction similar to that reported for Hb Chesapeake.<sup>23</sup> Unfortunately blood samples are not available to test this supposition. Individuals homozygous for the trait would offer convincing evidence one way or the other regarding clinical effects, but considering the rarity of the gene, it is extremely unlikely that such individuals will be found, even in Japan with its relatively high frequency of consanguinity.

The trait is apparently mediated by a gene at the  $\beta$  chain locus, allelic to the normal gene. Beale and Lehmann<sup>20</sup> noted that, according to the generally accepted concepts of the genetic code,<sup>24</sup> single base mutations in the triplet codons for amino acids in proteins account for all currently known hemoglobin variants. Hb Hijiya is no exception. Thus, in messenger RNA, where either AAA or AAG codes for lysine, substitution of G in the first position produces GAA or GAG, either of which specifies glutamic acid (G-guanine, A-adenine in RNA).

The fact that the hemolysate of the proband contains 58% of the abnormal hemoglobin raises some intriguing questions. Hb Hijiya, in fact, stands at the top of the list of  $\beta$  chain variants with respect to the relative proportion in the heterozygote blood.<sup>25</sup> Lehmann and Huntsman<sup>26</sup> pointed out that in an individual heterozygous for an abnormal hemoglobin, the proportion of Hb A might be taken as an indication of the functional ability of the variant. That this might be expressed in terms of relative affinities of the two globins for heme is suggested by recent observations in sickle cell anemia carriers with iron deficiency anemia, in whom the excess of Hb A over Hb S can be obliterated by iron therapy. One might then infer a slight superiority of Hb Hijiya over Hb A with respect to affinity for heme, but arguing against this is the fact that the son of the proband, with a normal or slightly elevated red blood cell count and hemoglobin, has, nonetheless, an excess of the abnormal hemoglobin.

リジンがグルタミン酸によって置換されている異常血色素の例はほかに少なくとも2例報告されている。Hb Iにおいては、置換は $\alpha$ 鎖の16番目にあり<sup>20,21</sup> Hb N $\beta$ \*では $\beta$ 鎖の95番目にある。<sup>22</sup> したがって、Hb Hijiyaは増大している異常血色素のリストに加えられるべき、新しい異常血色素である。現在の規約によれば、Hb Hijiyaを $\alpha_2\beta_2^{120\text{Glu}}$ と表わすことができる。

この異常が臨床上、影響があるかどうかは不明である。発端者は、ときどき軽い鉄欠乏性の貧血をわずらったがこれは短期間の鉄療法で容易に軽快した。一方、彼女の息子の血色素量および赤血球数は正常値上限近くにあった。これはHb Chesapeake<sup>23</sup>について報告されているような多血球血症反応の可能性を示すように思われる所見である。不幸にして、この可能性を調べるための血液標本は入手できなかった。この形質をもっているホモ接合体を調べると、その臨床的影響の有無について、明確な所見が得られるであろうが、この遺伝子が非常にまれであることを考えると、日本で血族結婚の頻度が比較的高いとはいえ、ホモ接合体の人がみつかることはほとんど考えられない。

この形質は、正常遺伝子とは対立遺伝子の関係にある $\beta$ 鎖座位における遺伝子が介在しているように思える。BealeおよびLehmann<sup>20</sup>は、現在広く承認されている遺伝コード (Genetic code)<sup>24</sup>の概念によれば、現在知られている血色素の変異はいずれも蛋白質中のアミノ酸に対するコードン (codon) の3個の塩基の中の1つにおける突然変異によって説明できると述べている。Hb Hijiyaも例外ではない。したがって、mRNAにおいてAAAあるいはAAGで表わされるリジンのcodonについてその第一番目の位置のAがGによって置換されると、GAAまたはGAGの記号に変化し、これはともにグルタミン酸を指すcodonとなり、リジンの代わりにグルタミン酸を取り違えることになる (RNAにおけるG=グアニンおよびA=アデニン)。

発端者の溶血液中の異常血色素含量が58%であることは興味深い問題を提起する。すなわち、ヘテロ接合体の血液中的異常血色素含量率からみれば、Hb Hijiyaは $\beta$ 鎖変異の中で第1位を占めている。<sup>25</sup> LehmannおよびHuntsman<sup>26</sup>は、異常血色素のヘテロ接合体である人においては、Hb A含量の割合は、その変異の機能的能力の指標と考えられるであろうと指摘している。これはヘムに対する2つのグロビンの相対的親和性によって表わすことができるのではないかということが、鉄欠乏性貧血を有する鎌型赤血球貧血保有者に関する最近の観察で示唆されている。すなわち、鉄欠乏性貧血を有する鎌型赤血球貧血保有者では、Hb A含有率がHb Sのそれより大きい、それは鉄材投与によって消滅することがありうる。したがって、ヘムに対する親和性は、Hb Hijiyaの方がHb Aより大であると推定される。しかし、この想像に対する反証もある。たとえば発端者の息子の赤血球数と血色素量が正常またはその上限であるにもかかわらず、かれの溶血液の異常血色素含有率はHb Aのそれを上回っているのである。

\*Also known as Hb N Baltimore or Hb N Memphis Hb N Baltimore またはHb N Memphis としても知られている。



Another explanation for the high proportion of the variant hemoglobin, and one that seems more likely, may be that the production of the  $\beta$  chain variant is more efficient than normal. Given the degeneracy of the DNA triplet code, Lehmann and Huntsman<sup>26</sup> suggested that of two or more codons specifying an amino acid, one may be more efficient than the others in protein synthesis. Plainly we cannot choose between these and other alternatives now, but recent rapid progress in biochemical genetics may well provide answers to some of these questions in the near future.

## SUMMARY

An abnormal hemoglobin found in two generations of a Japanese family residing in Hiroshima has been named Hb Hijiya. The individuals with this variant are asymptomatic and have no abnormal hematologic findings. Hybridization test with canine hemoglobin and urea dissociation paper electrophoresis of the globin showed the abnormality to be in the  $\beta$  chain. Fingerprints were prepared of trypsin digested globin and of the  $\beta$  chain, both directly and after amino-ethylation. An abnormal peptide which appeared in the amino-ethylated fingerprint was extracted, hydrolysed and analysed for amino acid content. The 120th residue of the  $\beta$  chain of Hb Hijiya, lysine, was replaced by glutamic acid. Thus, the notation for Hb Hijiya, a newly discovered variant hemoglobin, is  $\alpha_2\beta_2^{120\text{Glu}}$ .

正常血色素Hb Aよりも異常血色素の含有率の方が高いことに関しては、もう一つもっと可能性のある原因が考えられる。すなわち、 $\beta$ 鎖変異血色素は正常血色素よりも効果的に産出されるのではあるまいか。Lehmann および Huntsman<sup>26</sup> は、DNA triplet code の degeneracy があるものとして、特定の1種のアミノ酸に対してそれを指定する2つまたはそれ以上のcodonが存在し、その中の1つが他のものより有効に蛋白質合成を行なうことがあるかもしれないと述べている。著者らは、これらの仮説のいずれが正しいか断定できないが、最近の遺伝生化学のめざましい進歩によりこれらの疑問の1部が、近い将来に解決されるであろうと期待している。

## 要 約

広島在住の1家系2世代に異常血色素を発見し、これをHb Hijiyaと命名した。この変異を有していた者は、無症状で、血液学的にも異常な所見は呈していなかった。イヌ血色素との雑種血色素生成試験およびそのグロビンの尿素解裂濾紙電気泳動法により $\beta$ 鎖に異常を検出した。グロビンおよび $\beta$ 鎖を直接および前もってアミノエチル化してトリプシン消化しフィンガープリントを作った。アミノエチル化フィンガープリントにみられた異常ペプチド斑点を抽出し、加水分解してアミノ酸分析を行った。その結果、Hb Hijiyaにおいては $\beta$ 鎖の120番目のリジンがグルタミン酸によって置換されていると認めた。Hb Hijiyaは $\alpha_2\beta_2^{120\text{Glu}}$ と表わされる新しい異常ヘモグロビンである。

## REFERENCES

### 参考文献

1. SHIBATA S, IUCHI I, HAMILTON HB: The first instance of hemoglobin E in a Japanese family. *Proc Jap Acad* 40:846-51, 1964  
(日本人家系にみいだされたわが国最初のヘモグロビンE)
2. HOLLINGSWORTH JW, BEEBE GW, et al: Medical findings and methodology of studies by the Atomic Bomb Casualty Commission on atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki. In *The Use of Vital and Health Statistics for Genetic and Radiation Studies: Proceedings of the Seminar sponsored by the United Nations and the World Health Organization, Geneva, 5-9 September 1960*. New York, United Nations, 1962. pp 77-100  
(広島および長崎におけるABCC被爆者調査の医学的所見と方法。遺伝学および放射線学研究における人口動態統計の使用について)
3. BURROW GN, HRUBEC Z, FINCH SC: Background and status of clinical study to determine effects of in utero exposure, Hiroshima and Nagasaki. ABCC TR 17-61  
(臨床研究の背景と現況)
4. SHIBATA S, IUCHI I: A simple technique of agar gel electrophoresis for rapid separation of hemoglobins. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi-Acta Haemat Jap* 24:51-8, 1961  
(血色素を迅速に分離する寒天ゲル電気泳動簡便法)



5. SMITHIES O: Zone electrophoresis in starch gels; group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* 61: 629-41, 1955  
(でんぶんゲル支持体電気泳動法: 正常成人の血清蛋白における群変異)
6. SINGER K, CHERNOFF AI, SINGER L: Studies on abnormal hemoglobins. 1. Their demonstration in sickle cell anaemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood* 6:413-28, 1951  
(異常血色素の研究. 1. 鎌状赤血球貧血およびその他の血液障害における異常血色素のアルカリ性変性による証明方法)
7. GOLDBERG CAJ: The ferrohemoglobin solubility test, its accuracy and precision together with values found in the presence of some abnormal hemoglobins. *Clin Chem* 41:146-9, 1958  
(還元血色素溶解度試験およびその正確性・精度と二, 三の異常血色素の存在下におけるその検査数値)
8. UEDA S: Starch electrophoresis. *Rinsho Ketsueki—Jap J Clin Haematol* 3:26-30, 1962  
(でんぶんブロック電気泳動法)
9. BUCCI E, FRONTICELLI C: A new method for the preparation of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of hemoglobin. *J Biol Chem* 240:PC551-2, 1965  
(ヘモグロビンの $\alpha$ および $\beta$ 半量体の新しい調製方法)
10. SHIBATA S, IUCHI I, et al: Agar gel electrophoresis of the hybrid of canine and human hemoglobins: A simple convenient means for the detection of chain anomaly. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi—Acta Haemat Jap* 25:675-81, 1962  
(イヌおよびヒト血色素のhybridの寒天電気泳動法. 異常血色素の鎖異常の簡便な決定方法)
11. ANSON ML, MIRSKY AE: Protein coagulation and its reversal: The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J Gen Physiol* 13:469-76, 1930  
(蛋白質凝固とそのリヴァーサル. 不溶性グロビン, 溶解性グロビンおよびヘムの調製法)
12. TAKE T: On the dissociation of hemoglobin under the action of urea. *J Biochem* 49:206-10, 1961  
(尿素の作用による血色素の解離について)
13. INGRAM VM: Abnormal haemoglobins. 1. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by "Fingerprinting." *Biochim Biophys Acta* 28:539-45, 1958  
(異常ヒト血色素. 1. 正常人血色素と鎌状赤血球血色素の「フィンガープリント」による比較)
14. BAGLIONI C: An improved method for the fingerprinting of human hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* 48:392-6, 1961  
(ヒト血色素のフィンガープリント改良法)
15. JONES RT: Structural studies of aminoethylated hemoglobins by automatic peptide chromatography. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 24:297-308, 1964  
(自動的ペプチドクロマトグラフィーによるアミノエチル化血色素の構造の研究)
16. ACHER R, CROCKER C: Cited in BAILEY JL: *Techniques in Protein Chemistry*. New York, Elsevier, 1962  
(蛋白質化学の手法)
17. MOORE S, SPACKMAN DH, STEIN WH: Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Anal Chem* 30:1185-90, 1958  
(アミノ酸の硫酸ポリスチレン樹脂クロマトグラフィー改良法)
18. SPACKMAN DH, STEIN WH, MOORE S: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal Chem* 30:1190-206, 1958  
(アミノ酸のクロマトグラフィーのための自動記録装置)
19. BRAUNITZER G, HILSE K, et al: The hemoglobins. *Advances Protein Chem* 19:1-71, 1964  
(血色素)
20. BEALE D, LEHMANN H: Abnormal hemoglobins and the genetic code. *Nature* 207:259-61, 1965  
(異常血色素およびその遺伝的暗号)
21. SCHNEIDER RG, ALPERIN JB, et al: Hemoglobin I in an American negro family: Structural and hematologic studies. *J Lab Clin Med* 68:940-6, 1966  
(アメリカ黒人の1家族にみられるHemoglobin I. その構造および血液学的研究)
22. CLEGG JB, NAUGHTON MA, WEATHERALL DJ: An improved method for the characterization of human haemoglobin mutants: Identification of  $\alpha_2\beta_2^{95\text{Glu}}$ , haemoglobin N (Baltimore). *Nature* 207:945-7, 1965  
(ヒトの血色素変異の特性決定の改良法.  $\alpha_2\beta_2^{95\text{Glu}}$ , Hb N (Baltimore) の同定)
23. CHARACHE S, WEATHERALL DJ, CLEGG JB: Polycythemia associated with hemoglobinopathy. *J Clin Invest* 45:813-22, 1966  
(異常血色素症に伴う多血症)

24. NIRENBERG M, LEDER P, et al: RNA codewords and protein synthesis. 7. On the general nature of the RNA code. Proc Nat Acad Sci 53:1161-8, 1965  
(RNA codewords と蛋白質合成. 7. RNA 暗号 (code) の一般的性質について)
25. SHIBATA S, IUCHI I, MIYAJI T: Abnormal hemoglobins in Japan. Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi - Acta Haemat Jap 29:115-27, 1966  
(日本における異常血色素)
26. LEHMANN H, HUNTSMAN RG: Man's Hemoglobins. Amsterdam, North-Holland, 1966. pp 144-7  
(ヒトの血色素)