

## ネパールにおける遺伝性ヘモグロビン E (HbE) の解析

遠藤敏廉 池田美知代<sup>1)</sup> 佐藤慶子<sup>1)</sup> 立山涼子<sup>1)</sup>  
濱野真二郎<sup>2)</sup> 服巻保幸<sup>2)</sup> 小林 茂<sup>3)</sup>

## Analysis of Hereditary Hemoglobin E (HbE) in Nepal

Toshiyasu Endo, Michiyo Ikeda, Keiko Sato,  
Ryouko Tateyama, Shinjiro Hamano,  
Yasuyuki Fukumaki and Shigeru Kobayashi

### Abstract

It has been suggested that a high frequency of abnormal hemoglobin might reflect an advantage due to a reduced susceptibility to malaria. To evaluate this malaria hypothesis, we analyzed abnormal hemoglobin in two neighboring populations of Nepal: the Danuwar and the Tamang. It was hypothesized that the settlements of the former were biologically adapted to the malarial environment, whereas those of the latter were customarily adapted. We detected nine heterozygotes for the  $\beta^E$  mutation generating HbE in four families in the Danuwar settlement by analysis of isoelectric focusing (IEF) and high performance liquid chromatography (HPLC).

### Key words

HbE, malaria, HPLC, IEF, Nepal

### 緒 論

マラリアは古来人類を悩まし続け、さらに近年、地球温暖化に伴い、その流行地域の拡大が懸念されているマラリア原虫による感染症である。一方、グロビン遺伝子の発現異常にもとづく遺伝性貧血症であるサラセミアは、地中海沿岸域、アフリカ、中近東、インド、東南アジアなどのマラリア流行地域に高い頻度で見られ、マラリアに対する感受性を減少させることから、ヘテロ接合体であるとの仮説が示唆されている（マラリア仮説）。

今回の研究では、すでに小林等により民俗学的な調査研究の蓄積がある<sup>1)</sup> カトマンズから

---

1) 九州女子短期大学 2) 九州大学 3) 大阪大学

東へ約 25km はなれたコテン地区の集団を対象とした。この地域には、主にタマン、パルパテ、そしてダヌワールと呼ばれる 3 つの民族集団が生活している。またこの地域の高度 1,200m 以下の地帯は、亜熱帯の酷暑に加えて、モンスーン季の夏には降雨が多く、ハマダラカが媒介する悪性マラリアが流行し、住民の健康だけでなく生活形態に重要な影響を与えている。一方、1,200m 以上の高地では、ハマダラカは生息せずマラリアの発生は認められない。

タマン民族は高度 1,200m 以上に生活し、低地での農業を営む場合は、ハマダラカが活動せず感染の危険度の低い昼間にこれをおこない、文化的、生活習慣的にマラリアに適応した集団とみられる。一方ダヌワール民族は、マラリア感染危険地帯である高度 1,200m 以下の谷沿いに生活し、農業や漁業を営んでおり、生物学的な適応が示唆された。このように 2 つの民族集団は、その生活地域が隣接しているものの、マラリア感染への適応能力が異なっていることが考えられ、マラリア仮説の実証やマラリアへの適応能力の多様性を研究するうえで適している<sup>2)</sup>。今回の研究では、上記の 2 つの集団についてマラリア抵抗性因子としてのグロビン鎖の異常、特にサラセミアの全貌を明らかにすることを目的とし、異常ヘモグロビンの検索を実施した。その結果、数例の遺伝性のヘモグロビン E (HbE ( $\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$ )) 症を見いだしたので報告する。なお、本異常ヘモグロビンは、ドットハイブリダイゼーションやダイレクトシーケンシング法により、グロビン  $\beta$  鎖の 26 番目のグルタミン酸がリジンに置換された HbE ( $\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$ ) であることを既に報告している<sup>3)</sup>。

## 実験方法

### 1. 検体

1998 年から 2001 年の間に健康診断に訪れたネパール中部のタマン 114 名およびダヌワール 437 名 (延べ人数) から採血した。現地で採血後、遠心分離により赤血球と白血球とに分離した。前者に関しては 3 回生理食塩水で洗浄後、後者に関してはそのまま別々に液体窒素で冷凍保存し日本に持ち帰った。

### 2. ヘモグロビン (Hb) の解析

#### (1) 等電点電気泳動 (IEF) による解析

Basset らの方法に準じて行った<sup>4)</sup>。すなわち LKB multi-phor unit (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) を用い、Ampholine 添加により pH レンジを 5.5-8.5 に調整された acrylamide slab gel (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) 上にて泳動を行った。赤血球 (血漿を取り除いたもの) 5  $\mu\text{l}$  を 0.05% KCN 溶液 50  $\mu\text{l}$  に溶解し試料とし、コントロールとして成人正常抹消血の同希釈液を用いた。各々 20  $\mu\text{l}$  (Hb15~20  $\mu\text{g}$ ) を、5 mm  $\times$  10 mm のサンプルアプリケーションろ紙片 (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) にしみこませ電気泳動に付した。泳動後、12% のトリクロロ酢酸にて固定し、デジタルカメラ (ニコン製 COOLPIX5700) で撮影、コンピュータにより記録、印画した。また、デンストメトリック解析には、アプリケーション・ソフト ImageJ (NIH Image) を使用した。なお、スクリーニングの場合は、直径 3mm の円形ろ紙片にて、一度に 50 検体程度を電気泳動に付し

た。

## (2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による解析<sup>5)</sup>

赤血球分画  $15\mu\text{l}$  を  $1\text{ml}$  の  $30\text{mM}$  ビストリス - 酢酸 ( $\text{pH}6.4$ 、 $15\text{mM}$  KCN 含有) 緩衝液に溶解し、ミリポアフィルターでろ過後、吸光度計 (スペクトロホトメータ、UV-120-01、島津製作所) を用いて、 $415\text{nm}$  における吸光度  $0.45\sim0.48$  (Hb 濃度に換算して  $58\sim62\mu\text{g/ml}$ ) に希釈調製したものを検体とし、 $100\mu\text{l}$  を HPLC に供した。分析には、ダブルブランジャー式高速ポンプ CCPM (東洋ソーダ株式会社製)、検出器は紫外可視吸収計 UV8010 (東洋ソーダ株式会社製) および記録計はクロマトコーダ 12 (システムインストルメント株式会社製) から構成される HPLC 装置を用いた。Huisman らの方法に準じて、陽イオン交換カラム TSK-gel CM-3SW カラム ( $7.5\text{mm}\times7.5\text{cm}$ 、東洋ソーダ株式会社製) を用い、 $30\text{mM}$  ビストリス - 酢酸 ( $\text{pH}6.4$ 、 $15\text{mM}$  KCN 含有) 緩衝液下、酢酸ナトリウム  $0\sim150\text{mM}$  直線濃度勾配  $140\text{ml}$  で、室温下、流速  $1.0\text{ml/min}$  で展開溶出した。

## (3) ヘモグロビン濃度の測定

シアノメトヘモグロビン法 (ネスコートヘモキット - N、日本商事株式会社製) を用いて、成人の正常末梢血ヘモグロビン ( $14.5\text{g/dl}$ ) の希釈液と  $415\text{nm}$  における吸光度との検量線 ( $y=0.007x+0.046$ 、 $y$ : 吸光度、 $x$ : Hb 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )) を作成し、各々の試料の吸光度からヘモグロビン値を換算した。

## 結果

一度に 50 検体程度のスクリーニングの等電点電気泳動 (IEF) を行い (図 1 a)、異常と認められるかあるいは疑わしいと判断された検体については精査した。泳動の結果を図 1 b および c に示す。HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) と異常ヘモグロビン HbE ( $\alpha_2\beta_2^{29\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$ ) は、ほぼ同一の等電点を有しており、本法で分離することはできなかった。異常ヘモグロビンを保有するヒトの HbA<sub>2</sub> (-HbE) のバンドと正常なヒトのバンドを比較した場合、異常ヘモグロビンを保有するヒトの方が、HbE のバンドの重なりにより極めて明瞭に現れる。図 1 b に示す等電点電気泳動の泳動像を ImageJ (NIH Image) によりデンストメトリック解析を行った結果、HbA<sub>2</sub> に相当するバンドは、異常ヘモグロビン HbE 保有者の場合、単純面積百分率で 8 倍程度 ( $2.76\%\rightarrow22.76\%$ ) 高く、その分 HbA<sub>0</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) が低く ( $77.79\%\rightarrow55.10\%$ ) 現れている (図 2)。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の解析の結果を図 3 に示す。HbA<sub>2</sub> と異常ヘモグロビン HbE は、ほぼ同一の保持時間を有しており、本法では分離することはできなかった。図 3 a は、正常なヒトの場合で、単純面積百分率で数%以下の低いピークの HbA<sub>2</sub> がみられる。図 3 b は、異常ヘモグロビン HbE を有するヒトの解析結果で、単純面積百分率で 20~25% と非常に高いピークを示している。

図 4 は、1998 年時に判っている一家族の家系図であり、赤字のシンボルが HbE 保有者を示している。表 1 は、HPLC の解析の結果得られたこの家族の HbA<sub>2</sub> および HbE の状態を比較したもので、等電点電気泳動から得られた結果と完全に一致している。

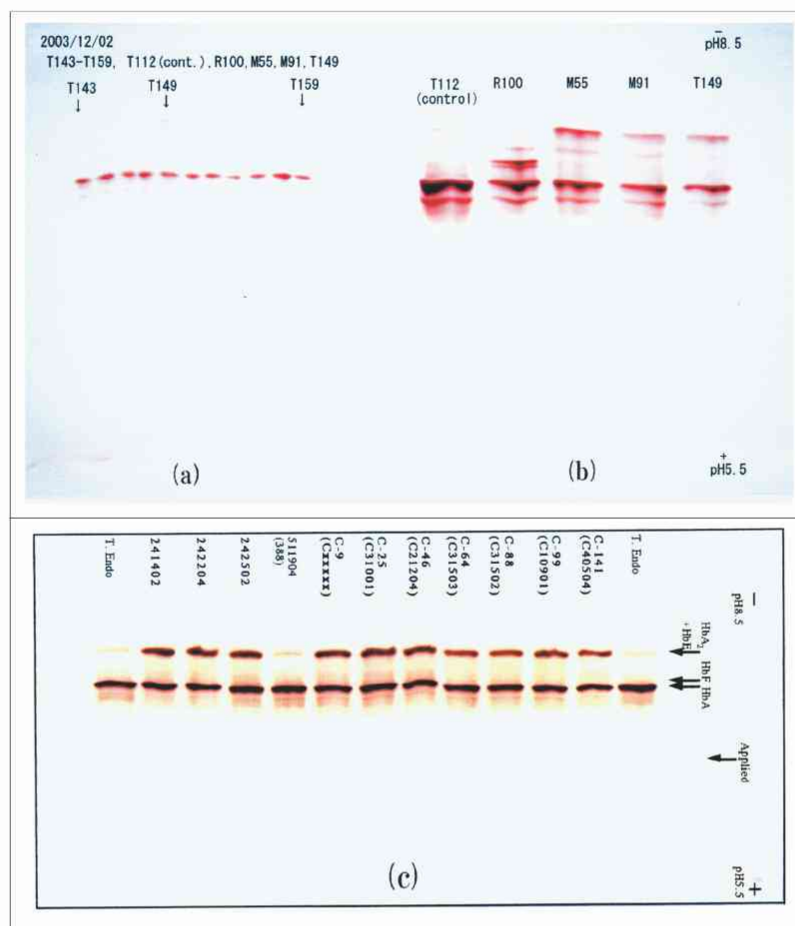


図1 等電点電気泳動 (IEF) 解析

- 異常ヘモグロビンのスクリーニング：T149 が異常ヘモグロビン (HbE) 保有者である。
- 異常ヘモグロビンの精査：Control の T112 は、凡そ倍のサンプル量の泳動像である。R100 は HbE ではない異常ヘモグロビン保有者と推測される。
- 異常ヘモグロビンの精査：511904 (388) は、HPLC で HbE ではない異常ヘモグロビン保有者と推測されるが、IEF では検出されない。

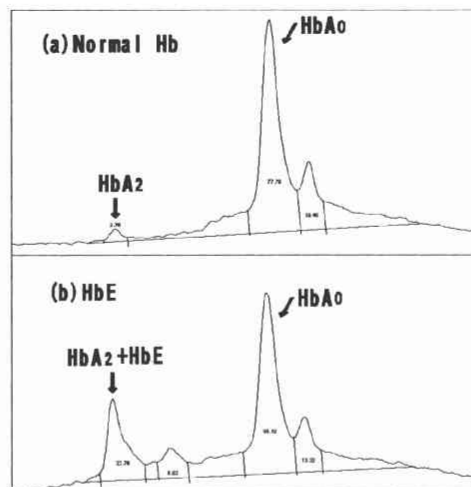


図2 等電点電気泳動像デンストメトリック解析  
図中の数字は、単純面積百分率を示す。

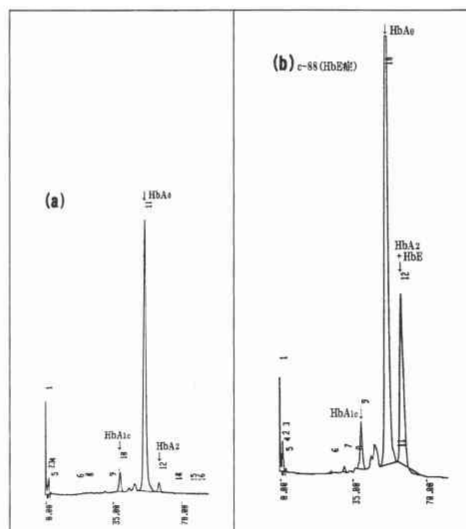


図3 高速液体クロマトグラフィー解析  
a 正常ヘモグロビン  
b 異常ヘモグロビン (HbA<sub>2</sub> (+HbE))

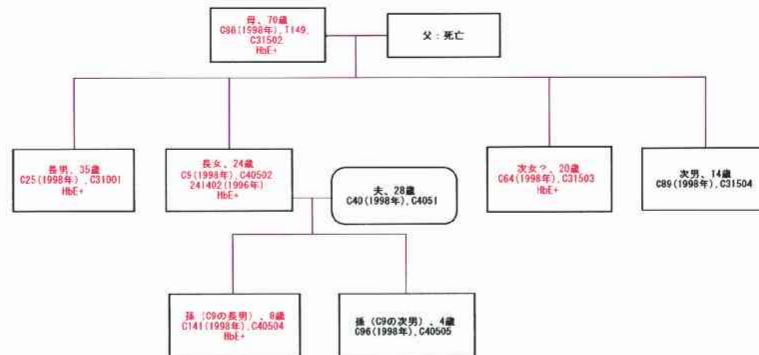


図 4 HbE 保有家族の家系図  
赤字シンボル：異常ヘモグロビン保有者

表 1 HbA<sub>0</sub>および HbA<sub>2</sub>(+HbE) の比較と異常ヘモグロビンの有無  
+：異常ヘモグロビン (HbE) 保有 -：正常ヘモグロビン

検体名(家族関係)	HbA <sub>0</sub>	HbA <sub>2</sub> (+HbE)	異常ヘモグロビンの有無
C-88 (母)	75.9	19.5	+
C-25 (長男)	74.1	21.4	+
C-9 (長女)	66.0	25.7	+
C-64 (次女)	76.4	19.4	+
C-89 (次男)	93.0	2.2	-
C-141 (長女の第1子)	72.4	24.0	+
C-96 (長女の第2子)	95.9	検出不能	-
C-40 (長女の夫)	95.6	検出不能	-
Control	90.6	0.15	-

死亡している父親の異常の有無を検証することはできないが、家族内の世代に渡って、異常ヘモグロビン HbE を保有する者と全く正常な者とが存在し、かつメンデルの法則に従って遺伝している。等電点電気泳動ならびに HPLC の解析の結果、異常ヘモグロビン HbE を保有するいずれの者も HbA<sub>0</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) を有している。以上のことから、染色体の片方に異常の有るヘテロ接合型遺伝子である。

2004 年現在、4 家族の 9 名が異常ヘモグロビン HbE を保有することが判明した。全て高度 1,200m 以下のマラリア発生帯に居住するダヌワール民族であった。さらに、同じくダヌワール民族で、1 例は HPLC の結果から、もう 1 例は等電点電気泳動の結果から、何らかの異常ヘモグロビンを保有していると推定される者 2 名が存在するが、グロビン鎖のどのような変異

であるかは不明であり、今後アミノ酸配列や遺伝子等を解析する必要がある。

## 考 察

ヒトヘモグロビンの構成単位としてのグロビン鎖は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\varepsilon$ 、 $\zeta$  が知られており、これらグロビン遺伝子は $\alpha$ 様遺伝子 ( $\zeta$ - $\phi$ - $\zeta$ - $\phi$   $\alpha$ - $\alpha$  2- $\alpha$  1) が 16 番染色体上に、 $\beta$ 様遺伝子 ( $\varepsilon$ -G  $\gamma$ -A  $\gamma$ - $\phi$   $\beta$ - $\delta$ - $\beta$ ) が 11 番染色体上に存在する。ヘモグロビンは 1 対の  $\alpha$  様グロビン分子と同じく 1 対の  $\beta$  様グロビン分子からなる 4 量体に 4 分子のヘムが結合した複合たんぱく質である。サラセミアを始め、これらグロビン遺伝子の変異による様々な異常ヘモグロビンの研究は広く行われている。

マラリア感染症に対する抵抗性は、後天的には主として細胞性免疫の獲得によって得られるが、先天的にもヘモグロビン異常者、たとえば鎌状赤血球を有する者では感染しにくいことが知られている。鎌状赤血球のヘモグロビンは、グロビン  $\beta$  鎖の 6 番目のグルタミン酸がバリンに置換されたもので、マラリア原虫の寄生を受けた結果、ヘモグロビンがゲル化し、マラリア原虫に利用されにくくなるとともに鎌状化した赤血球が血管壁に粘着し、細網上皮系の細胞に捕食される為であると考えられている。また、マラリア原虫がヘモグロビンを取り込んで消化するとき、その食胞内が酸性の為、鎌状赤血球のヘモグロビンは溶液に不溶性となって消化を受けにくくなる為であるとの説もある。いずれにせよ、これを支配する遺伝子がマラリア、とりわけ悪性マラリアの流行地帯に多く分布することは、上述の事実とよく符合する。

このことから、ヘモグロビンに異常が無く正常な赤血球を有する者はマラリアに感染しやすく死に至り易い。また、ヘモグロビン異常が重篤な者は、マラリアに感染しにくいものの、悪性の貧血症でこれまた死に至る。すなわち、比較的軽度の貧血症で済むヘテロ接合体のヘモグロビン異常者はマラリアに感染しにくく、長い世代を経て生存してきたと推定される（マラリア仮説）。

等電点電気泳動 (IEF) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による解析の結果、異常ヘモグロビン HbE を保有する 9 名の者は、全てマラリア発生帯の高度限界 (1,200 メートル) 以下に居住するダヌワール民族であり、この民族のマラリア感染症に対する生物学的適応、すなわち変異ヘモグロビンの保有によるマラリア感染に対する抵抗性の獲得を示唆している。しかしながら、ネパールに隣接するインドシナ半島においては、異常ヘモグロビン HbE の保有率は極めて高率である（カンボジア、タイ、ベトナムおよび中国の一部において 13~30%）<sup>3)</sup>。従って、長い歴史の間にインドシナ半島からネパールへの民族の移動、ないしは交流の可能性も否定できない。

## 謝 辞

英構文チェックを行っていただきました近畿大学九州短期大学 マルコム R. スワンソン講師に深謝します。

## 参考文献

- 1) a) 小林茂：ネパールにおけるマラリアに対する文化的・生物学的適応、比較社会文化（九州大学大学院比較社会文化研究科）、2:59-73,1996  
b) 小林茂（研究代表者）：ネパールにおけるマラリアに対する文化的・生物学的適に関する調査研究（課題番号：12575016 平成12年度～平成13年度科学研究費補助金（基盤研究 [B] [1] 海外学術調査）研究成果報告書、2002（平成14）年3月発行（大阪大学大学院文学研究科）、
- 2) Molecular analysis of  $\alpha$ -thalassemia in Nepal: Correlation with malaria endemicity, Sakai Y., Kobayashi S., Shibata H., Furuumi H., Endo T., Fucharoen S., Hamano S., Acharya G. P., Kawasaki T., Fukumaki Y., J. Human Genetics 45,127-132,2000
- 3) ネパールにおけるサラセミアの分子遺伝学的解析、服巻保幸、酒井保禎、小林茂、古海弘泰、濱野真二郎、遠藤敏康、Gopal P. ACHARYA、川崎晃一、健康科学、第22巻別冊：2000（平成12）年2月発行、九州大学健康科学センター
- 4) Basset P., Beuzard Y., Garel M. C., and Rosa J., Isoelectric focusing of human hemoglobin :its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins, Blood, 51:971-982, 1978
- 5) Wilson J. B., Headlee M. E., and Huisman T. H. : A new high-performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantitation of various hemoglobin variants in adult and newborn. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 102:174-186,1983
- 6) Dacie J. V., and Lewis S. M., Practical Haematology p.254, Churchill Livingstone Edinburgh Hong Kong London Madrid Melbourne New York and Tokyo 1995