

生後発育に伴う胎児ヘモグロビン γ 鎖異型体組成の 変化について——いわゆる A-F switching に関連して

奈良県立医科大学第2生理学教室

大賀好美

CHANGES OF THE γ ISOFORM COMPOSITIONS IN FETAL HEMOGLOBIN DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

YOSHIMI OHGA

Second Department of Physiology, Nara Medical University

Received September 29, 1992

Summary: An efficient procedure was developed for the enrichment of Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) in human adult hemolysate by an alkali denaturation-salting out. The method can be applied to small amounts of blood with less than 1% of Hb F, and provides a sufficient Hb F level to allow an accurate high-performance liquid chromatographic (HPLC) quantitation of the three γ chain isoforms, $^G\gamma$ (136 Gly, 75 Ile), $^A\gamma^1$ (136 Ala, 75 Ile) and $^A\gamma^T$ (136 Ala, 75 Thr). CM-Sephadex chromatography can be combined to attain a further enrichment. Hb F isolated from adult blood was essentially identical with the protein from cord blood in their physicochemical and physiological properties. Developmental changes in the γ isoform composition of Hb F were studied in 110 normal Japanese newborns, 297 infants within one year after birth and 121 adults, first by the γ CB-3 peptide procedure and then by HPLC method. The average ratio of $^G\gamma/^A\gamma$ changed from 7/3 at birth to 4/6 during the postnatal 4- to 5-month period, and thereafter settled down gradually to 3/7 in the adults. The most conspicuous finding was that the isoform composition and therefore the γ gene expression, which was kept within a strictly confined level in the neonatal period, was rendered gradually to show a highly extensive variation during postnatal development. The $^A\gamma^T$ gene frequencies in the newborns and the adults were estimated as 0.125 and 0.160, respectively, and the values were consistent with those previously reported for Japanese subjects, but quite different from those for Chinese and Afro-americans. The γ isoform compositions were also studied in multiple pregnancies. The results suggested the presence of an "external" factor affecting the expression of the γ globin genes and also the possibility of using the γ isoform compositions to determine the zygosity of twins, albeit under limited conditions.

Index Terms

γ chain isoforms, gene expression, Hb switching, Hb F, zygosity of twins

まえおき

出生時に血中ヘモグロビン(Hb)の約80%を占める胎

児ヘモグロビン(Hb F)は、生後急速に減少し、一年後には1%以下となり生涯このレベルを維持する。Hb Fは α 鎖と γ 鎖から成るが($\alpha_2\gamma_2$)、1968年 Schroederら¹⁾に

より、 γ 鎖にはN末から136番目がGlyの $^{\circ}\gamma$ 鎖と、Alaである $^A\gamma$ 鎖のあることが報告された。その後Riccoら²⁾により、更に $^A\gamma$ 鎖にはN末から75番目がIleの場合とThrの場合、すなわち $^A\gamma^I$ 鎖と $^A\gamma^T$ 鎖のあることが見出された。したがって、 γ 鎖には3種の異型体(isoform)、 $^{\circ}\gamma$ (136 Gly, 75 Ile)、 $^A\gamma^I$ (136 Ala, 75 Ile)および $^A\gamma^T$ (136 Ala, 75 Thr)が存在することになる。 $^{\circ}\gamma$ 鎖と $^A\gamma$ 鎖の存在比は生後しだいに変化し、新生児期における7:3から正常成人での2:3³⁾へと有意に移行することが観察されている。

しかしながら、正常成人血にはごく微量(1%以下)しかHb Fが存在しないため、その十分量を分離することがきわめて困難である。そのため、従来サラセミア、鎌状赤血球症、遺伝性高Hb F症など成人でもHb F含有量が比較的高い血液については $^{\circ}\gamma$ / $^A\gamma$ 鎖存在比について多くの報告があるものの^{4,5,6)}、正常成人血についての報告はごく僅かしかない⁷⁾。そこで今回まず、アルカリ変性、半飽和硫安塩析およびCM-Sephadexカラムクロマトグラフィの組み合わせにより、成人血中の微量Hb Fを高収率で単離、濃縮する方法を開発した。単離したHb Fについて、当初はシアノゲンブロマイド(CNBr)法による γ CB-3ペプチドのアミノ酸分析¹⁾により、 $^{\circ}\gamma$ 、 $^A\gamma$ 両鎖の生後変化を追跡した。さらにその後、逆相高速液体クロマトグラフィ法(RP-HPLC)により、 $^{\circ}\gamma$ 、 $^A\gamma^I$ 、 $^A\gamma^T$ 鎖の生後変化を検討した。その結果、正常なヒトでは胎児から成人への発育に伴い、Hb F生成(γ グロビン遺伝子発現)の低下が起こるだけでなく、当該遺伝子の発現制御にゆるみの生ずることを明らかにした。また双生児の臍帯血について γ 鎖異型体の組成を分析し、双生児における遺伝的背景(卵性)と γ 鎖組成との間の定量的関係を探る一方、 γ 鎖異型体分析結果から、双生児における卵性判定が可能か否かについても検討した。

実験材料および方法

1. 試料血液

新生児血は奈良県立医科大学附属病院産婦人科および聖バルナバ病院産婦人科において、分娩時に臍帯より採血した。乳幼児血としては、奈良県立医科大学附属病院中央検査部における血液検査残余末梢血を、成人血には奈良県赤十字血液センターにおける輸血不適格CPD保存血および特志者よりの静脈血を用いた。いずれの場合にも、血液疾患を有するものは除外し、抗凝固剤としてはヘパリンを用いた。

2. Hb試料の調製

血液は冷0.9% NaClで3回洗浄後、等量の脱イオン

水と1/2倍量のトルエンを加えて振盪し、溶血させた。さらに冷却遠沈(12,000 rpm, 20分, 0℃)によってstromaを除去し、澄明なHb溶液を得た。溶液にはCOを通気してHbCO溶液とし、使用するまで低温保存した(4℃)。

3. 正常成人血からのHb F分離

成人血から約10%のHbCO溶液を作製し、これに5 N NaOHを1/10量スターラーで攪拌しながら加え、20℃で2分間アルカリ変性を行う。この段階で、溶液中にあるほとんどのHb Aは変性する。2分後、0.233 N HClを含む半飽和硫安溶液を1.95倍量加えて中和一塩析し、変性Hbを濾紙(Toyo No 7)濾過、または冷却遠沈(15,000 rpm, 20分, 0℃)して除去した。この濾液(または上清)をViskingチューブに移し、CO飽和した冷却脱イオン水に対し一夜透析し、さらにコロジオンパック(Sartorius)で限外濾過濃縮した。

以上の操作によりRP-HPLC分析に十分なHb F含量となるが、さらにHb F含量を増す必要のある時には、Enokiらの方法⁹⁾により、0.04 M NaCl-0.05 M リン酸緩衝液で平衡したCM-Sephadex C-50(Pharmacia)カラムを用い、塩勾配溶出によりHb F画分を分離した。Hb F画分は上述のように透析、濃縮して用いた。

4. 新生児血および乳幼児血からのHb Fの分離

これらの場合、Hb F含量は十分高いので、上記EnokiらのCM-Sephadexクロマト法⁹⁾によりHb F画分を分離した。

5. γ CB-3法による γ 鎖異型体の定量

Hb F溶液から、-20℃下に塩酸-アセトン法⁹⁾によりグロビンを調製した。Nuteらの方法¹⁰⁾によりグロビンはそのまま70%ギ酸に溶かし、グロビンと等量のCNBrを室温下16時間反応させた。反応生成物を凍結乾燥後、1%ギ酸に溶かし(40 mg/ml)、同溶液で平衡させたSephadex G-75(Pharmacia)カラム(1×180 cmを直列2連-連結)に添加し、展開分離した(Fig. 5)。溶出した γ CB-3画分を集め凍結乾燥後、6 N HCl, 110℃で24時間加水分解し、日立KLA-3 B型アミノ酸分析計で分析した。

6. RP-HPLC法による γ 鎖組成の分析

CO型で冷蔵保存したHb溶液に、O₂を通気しながら光を照射してoxy型として(4℃)、Milliporeフィルター(SJHV 004 NS, 孔径0.45 μm)で濾過、試料とした。ふつう250 μg(2.5%, 10 μl)のHbを分析に使用した。RP-HPLC法はHuismanらの方法¹¹⁾にほぼ準じ、島津HPLC LC-4A装置により行った。カラムはBondapak C₁₈(Waters, 4.6×250 mm)を、溶媒は、(A):アセトニ

トリル/メタノール/リン酸緩衝液(49 mM KH_2PO_4 —5.4 mM H_3PO_4 , pH 2.84)(53/5/45, v/v), (B):アセトニトリル/メタノール/リン酸緩衝液(49 mM KH_2PO_4 —5.4 mM H_3PO_4 , pH 2.84)(38/9.5/52.5, v/v), (C):アセトニトリル/ H_2O (50/50)を使用した。溶媒(C)は、毎分析後のカラム洗浄に用いた。まずカラムを溶媒A/B(20/80)で30分間平衡した後、サンプルをHamilton マイクロシリンジで注入し、最初の10分はisocratic溶出、ついで134分後にA/B(63/37)となるよう直線勾配溶出を行った(Fig. 7)。溶出流速は1.5 ml/min, 溶出液の吸光度は220 nmで測定、連続記録した(Fig. 7)。3種の γ 鎖異型体%は、島津クロマトパック(C-R1B data processor)で計算した。

7. 血液 Hb F 含量の測定

Hb F 含量の高い臍帯血, 新生児血, および乳幼児血は Jonxis-Visser 法¹¹⁾により, Hb F 含量が10%以下の幼児および成人血については Betke らの方法¹²⁾により行った。

8. O_2 平衡測定および電気泳動

セル付きトノメータを用い, 複の分光学的方法¹³⁾により測定した。電気泳動は, デンプン・ゲルを担体とする Smithies の方法¹⁴⁾にほぼ準じ, Tris-EDTA-ホウ酸緩衝液(pH 8.6)およびギ酸緩衝液(pH 1.9)¹⁵⁾下に行った。

試薬類は市販特級(Nacalai Tesque)を用い, 特に RP-HPLC 用には高速液クロ用規格品を使用した。

9. 統計処理

有意差検定は unpaired t-検定を用い, $p < 0.05$ を以て有意と判定した。

結 果

1. 成人血中微量 Hb F の分離濃縮について

成人血中で微量にしか存在しない Hb F の γ 鎖組成を分析するためには, 試料中の Hb F 含量を増す必要がある。この目的のため, アルカリ変性—硫酸塩析法の組み合わせについて検討した。

まずアルカリ変性過程において, 処理時間が γ 鎖組成にどのような影響を与えるかを見たのが Fig. 1 である。3種の γ 鎖($^c\gamma$, $^A\gamma^I$, $^A\gamma^T$)から成る Hb F をもつ成人血の10% HbCO 溶液について, 変性時間を30秒から3分まで変化させ, 組成比に変化がみられるか否かを RP-HPLC 分析により比較した。図からわかるように, アルカリ変性処理時間による影響は少なくとも3分以内ではみられず, この結果から各3種 γ 鎖のアルカリに対する感受性は, 少なくとも今回の処理時間内では同じであることが判明した。変性時間は, 余り短か過ぎると Hb A

の残存が多くなり, また長過ぎると Hb F の収率が低下するため, 以下の実験では2分間とした。

次にアルカリ変性処理に供する Hb 溶液量の影響をみるため, Hb 溶液量を最大 50 ml から最少 1 ml まで変化させ, γ 鎖組成比を同様比較したのが Table 1 である。試料としては, 正常成人で $^c\gamma$ 鎖と $^A\gamma^I$ 鎖をほぼ等量を含む試料溶液と, 3種の γ 鎖をそれぞれもつ試料溶液を用い, アルカリ変性—塩析法により得た試料を RP-HPLC

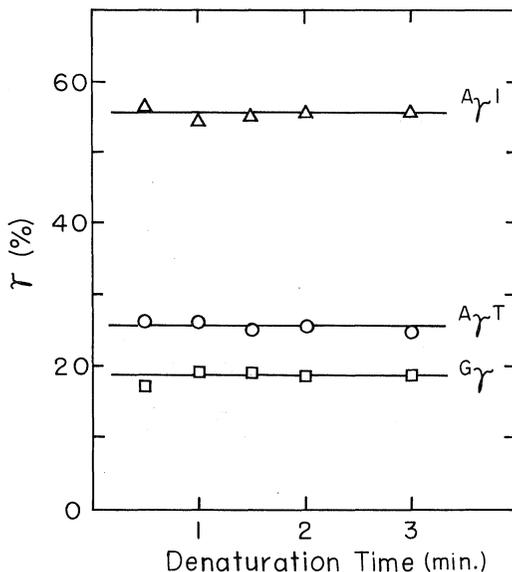


Fig. 1. The γ isoform composition of Hb F isolated from normal adult hemolysate by alkali denaturation(20°C) for various duration of time. Sample : 10gHb/dl-10ml.

Table 1. Percentages of the γ -chain isoforms of Hb F enriched by alkali denaturation-salting out of normal adult hemolysate. Starting volume of the hemolysate was varied

Sample 1			Sample 2 ^{b)}			
Vol.(ml)	$^c\gamma$ (%)	$^A\gamma^I$ (%)	Vol.(ml)	$^A\gamma^T$ (%)	$^c\gamma$ (%)	$^A\gamma^I$ (%)
50	52.5	47.5	50	20.4	17.3	62.3
10	51.9	48.2	10	20.8	15.3	63.9
5	54.9	45.1	5	20.3	16.0	63.7
2	52.6	47.4	2	20.3	15.7	64.0
1 ^{a)}	56.9	43.1	1	20.0	13.9	66.2
Average	53.8	46.3	Average	20.4	15.6	64.0
\pm SD	1.9	1.9	\pm SD	0.3	1.1	1.3
50-CMS ^{c)}	51.9	48.2	50-CMS	20.6	17.6	61.8

a; Sediment was washed with an appropriate amount of 50%-saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. b; Sediments were washed with 1 ml of 50%-saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per 1 ml of sample. c; Further enriched by CM-Sephadex chromatography.

分析した。表から明らかなように、試料溶液量により結果に差はなく、最少 1 ml でも充分分析できることがわかった。なお、アルカリ変性一塩析法の後、さらに CM-Sephadex クロマトグラフィにより標品中の Hb F 含量を上げて、結果には全く影響がなかった。

以上の結果から、正常成人血中に微量存在する Hb F の濃度を増す方法として、アルカリ変性(2分)一硫酸塩析法はきわめて有用であることが結論される。

2. 成人血中 Hb F の諸特性

次に、上記の方法により成人血から得られた Hb F 標品について、その諸特性を検討した。まず Tris-EDTA-ホウ酸緩衝液(pH 8.6)およびギ酸緩衝液(pH 1.9)によるデンプン・ゲル電気泳動特性をみた。ギ酸緩衝液下の泳動により、Hb はその構成サブユニットに解裂する¹⁵⁾。

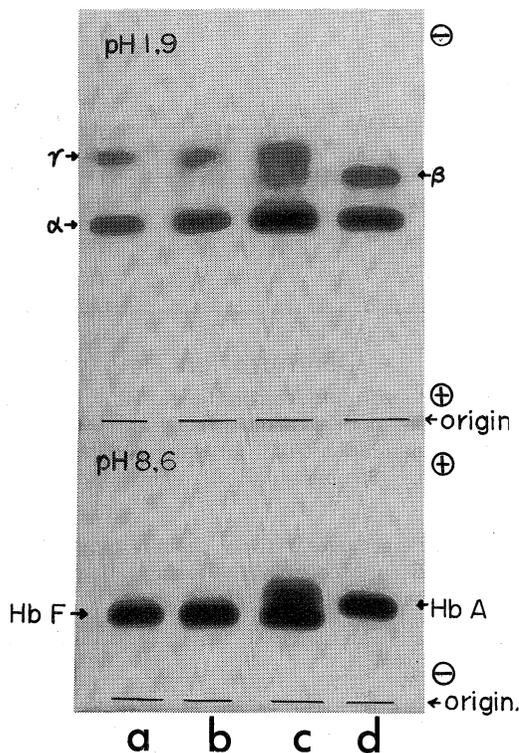


Fig. 2. Enrichment of Hb F in normal adult hemolysate as shown by starch gel electrophoresis. Top: formate buffer system (pH 1.9), bottom: 0.04M Tris-EDTA-borate buffer system (pH 8.6), Amido Black 10B stain. (a) cord hemolysate, (b) adult hemolysate treated by alkali denaturation-salting out-CM Sphadex chromatography, (c) adult hemolysate treated by alkali denaturation-salting out, (d) adult hemolysate.

Fig. 2 は臍帯溶血液、成人溶血液、アルカリ変性一塩析法によって得られた成人 Hb F 標品、さらに CM-Sephadex クロマトグラフィを組み合わせて得た純化成人 Hb F 標品を泳動し、Amido Black 10 B 染色した結果である。アルカリ変性一塩析法に加え、カラムクロマトグラフィを組み合わせるにより、成人血中の Hb 主成分である Hb A は完全に除去できることがわかる。

Fig. 3 は、成人溶血液、およびその溶血液からアルカリ変性一塩析一カラムクロマト法の組み合わせで得られた Hb F 画分と、別途に得た Hb A 画分の紫外外部吸収スペクトルを示す。Hb F 画分には、 γ 鎖の分光特性である 290 nm を中心としたいわゆる tryptophan fine structure band が明らかに認められる。

ついで O_2 平衡特性を見るため、臍帯血および成人血より得た Hb F 溶液について、Bohr 効果(pH 6 ~ 8.5)と

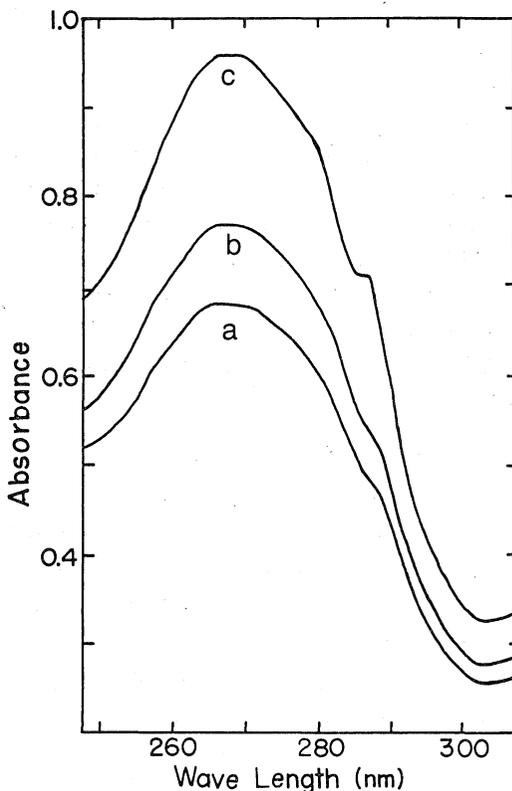


Fig. 3. Enrichment of Hb F in normal adult hemolysate as shown by ultraviolet spectroscopy. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). (a): adult hemolysate, (b): Hb A₀ from adult hemolysate, (c): Hb F isolated from adult hemolysate by alkali denaturation-salting out-CM Sphadex chromatography.

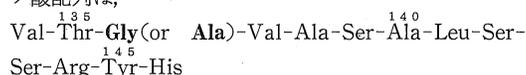
DPG 効果を比較してみた。Fig. 4-a は Bohr 効果を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液下(20°C)にみたもので、両 Hb F 間で全くアルカリ性 Bohr 効果に差はみられず、また Hb A に比較しても全く差がみられなかった。Fig. 4-b は DPG 効果を 0.05 M BisTris-0.1 M Cl⁻(pH 7.3), 20°C 下にみたもので、Hb A に比し明らかに DPG 効果の減弱を認めたものの、両 Hb F 間に差はみられなかった。

3. γ 鎖組成の生後変化について

1) γ CB-3 法による結果

Fig. 5 に CNBr 処理¹⁶⁾した Hb F グロビン を Sephadex G-75 カラムによってゲル濾過クロマトした結果を示す。Hb F を構成する α , γ 鎖にはそれぞれ Met 残基が 2 個ずつ存在し、したがって CNBr 処理によって両鎖それぞれについて 3 個のペプチドが生ずるはずである。1 x 180 cm カラムの直列 3 連-連結により、これら 6 個のペプチドはほぼ完全に分離溶出するが(Fig. 5-b)、目的とする γ CB-3 ペプチドの分離には、2 連-カラムで十分その目的を達しうることがわかる(Fig. 5-a)。したがって、以下の実験では、全て 1 x 180 cm カラムの直列 2 連-連結によりペプチド分離を行った。

Table 2 に、それぞれ臍帯血由来(n=10)および成人血由来(n=15)Hb F から分離した γ CB-3 ペプチドの アミノ酸分析結果を示す。 γ CB-3 ペプチドのアミノ酸配列は、



であるから、以下に論ずる 136 Gly および 136 Ala 残基を除き、アミノ酸組成の実測値は予想値と実験誤差内でよく一致している。換言すれば、 γ CB-3 ペプチドの分離は完全であると結論することができる。

Table 3 に、正常成人血(n=21)および新生児血(n=10)中の Hb F 含量、および、それぞれから調製した Hb F の γ CB-3 ペプチドにおける Gly, Ala 値、および (Gly+Ala)値を一括表示した。Schroeder¹⁷⁾によって明らかにされたように、 γ 鎖には Gly 残基が 1 個(γ 136)と Ala 残基が 2 個(γ 138, γ 140)含まれる場合(すなわち^c γ 鎖)と、Gly 残基が 0 個で Ala 残基が 3 個(γ 136, γ 138, γ 140)の場合(すなわち^A γ 鎖)の 2 通りがある。したがって、(Gly+Ala)値は常に 3 となるはずで、このことは Table 3 に示した結果からも実証できる(すなわち、成人 Hb F では 3.09 ± 0.04 , 新生児では 3.05 ± 0.05)。当然のことながら、 γ 136 Ala 値は、総 Ala 値から 2 を引いた値になる。また、このようにして得られた Gly, Ala 値はそれぞれ^c γ 鎖および^A γ 鎖の存在比を示すことになる。Table 3 の結果から、胎児血では^c γ /^A γ 鎖

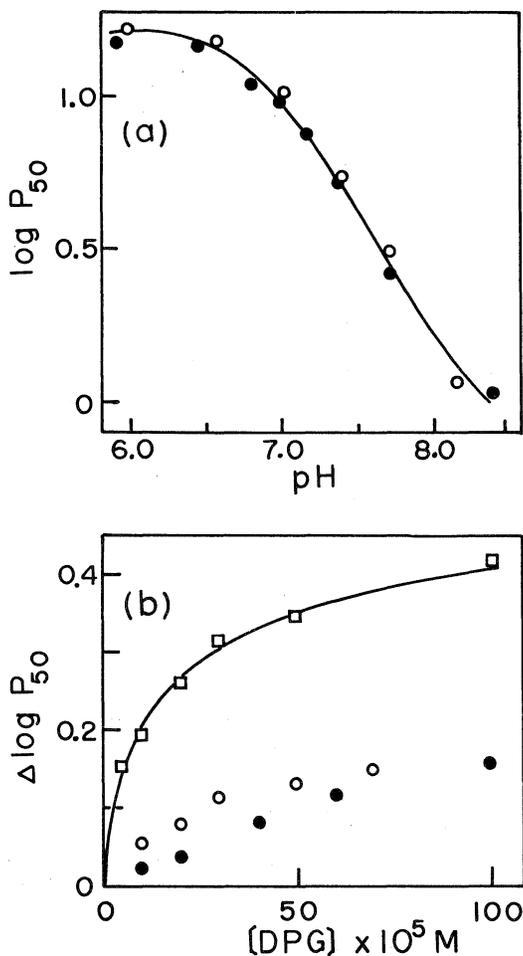


Fig. 4. Oxygenation properties of Hb F isolated from adult and newborn blood. (a) Bohr effects in 0.1 M potassium phosphate. Solid line represents the result for Hb A. (b) DPG effects in 0.05 M BisTris-0.1 M Cl⁻(pH 7.3). ○; Hb F from newborn blood, ●; Hb F from adult blood, □; Hb A. [Hb]: 4.5×10^{-5} M, 20.0°C. P₅₀: oxygen tension for half-oxygenation (torr).

比が約 7/3 であるのに対し、成人血では約 3/7 と全く逆転していることがわかる。なお、ここで胎児血^c γ 鎖が比較的狭い範囲の変動(65-81%)しか示さないのに対し、成人血ではきわめて大きな変動(9-65%)を示す事実が注目される。

Fig. 6 は、生後 180 日未満の健康乳幼児血 28 例について、同上の如く測定、算出した^c γ , ^A γ % および Hb F % の生後推移を図示した結果である。健康成人 21 例および健康新生児 10 例についての結果も、同時に示してあ

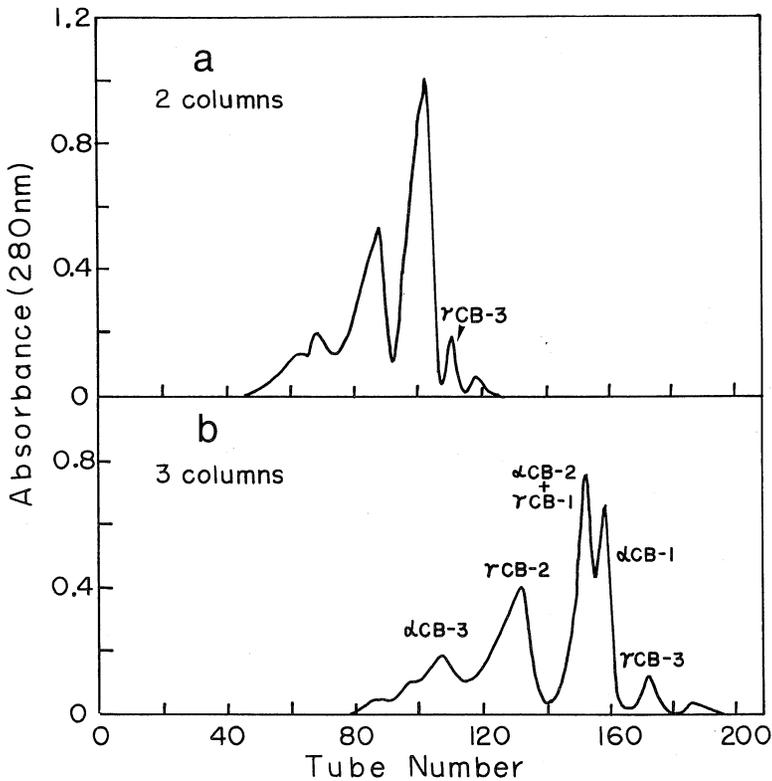


Fig. 5. Separation of peptides from CNBr-treated globin F(60mg) on Sephadex G-75 columns. Two (a) or three (b) columns of 1×180cm each in series were developed with 1% formic acid. γ CB-3 peptide comprises γ 134Val-147His residues.

Table 2. Amino acid composition of γ CB-3 peptide isolated from Hb F in normal cord and adult hemolysates

Amino acid	Cord (n=10)	Adult (n=15)	Anticipated
HIS	0.98±0.02	0.98±0.03	1
ARG	0.94±0.07	0.94±0.04	1
THR*	1.00±0.05	0.98±0.02	1
SER*	3.17±0.10	3.03±0.06	3
GLY	0.72±0.05	0.32±0.18	
ALA	2.33±0.05	2.76±0.19	
VAL	1.94±0.12	2.02±0.08	2
LEU	1.01±0.02	1.01±0.02	1
TYR	0.91±0.03	0.94±0.02	1

* : Corrected values from the 24h-hydrolysis results.

る。Hb F %の低下と平行して、 $\epsilon\gamma$ %の低下と $\Delta\gamma$ %の上昇が起こり、やがて上述した $\epsilon\gamma/\Delta\gamma$ 鎖比の逆転に至る時間経過がよく理解できる。なお、Hb Fを種々の程度の高レベル(3.0~66.9%)にもつ体質性再生不良貧血の一異

型4例¹⁷⁾および再生不良性貧血1例からのHb Fについても、同様に γ CB-3ペプチドのGly値を測定してみた。いずれも生後4年以降の成人であるにもかかわらず、それぞれ0.73, 0.74, 0.68, 0.61, 0.58となり、 $\epsilon\gamma$ 鎖は新生児レベルにあった。

2) RP-HPLC法による結果

先に述べた γ CB-3法は、 $\epsilon\gamma$ 鎖と $\Delta\gamma$ 鎖の2種しか分離定量することができない上、分析に要する血液量も正常成人では約200 ml, また全操作完了に数日を要する。一方、RP-HPLC法では、 $\Delta\gamma$ 鎖を更に $\Delta\gamma^1$ (136 Ala, 75 Ile), $\Delta\gamma^T$ (136 Ala, 75 Thr)鎖に分離定量することができ(Fig. 7), かつ正常成人の場合でも血液量が最少約1 mlで分析可能であった(Table 1)。Fig. 8は新生児100名, 生後1年までの乳幼児269名, 成人100名(16~55歳)について、 $\epsilon\gamma$ 鎖%とHb F%の推移を示したものである。乳幼児については、一ヶ月毎に平均値と標準偏差を算出し、成人については、年齢が16才から55才までの広範囲の結果を、20年毎に一括して示した。Hb Fは新生児

Table 3. Numbers of glycy and alanyl residues in γ CB-3 peptides from Hb F in adult and newborn blood

Adult blood					Newborn blood				
Sample No.	Hb F (%) ^{a)}	Gly	Ala	Gly+Ala	Sample No.	Hb F (%) ^{b)}	Gly	Ala	Gly+Ala
1	2.30	0.24	2.84	3.08	1	89.5	0.81	2.27	3.08
2	0.37	0.15	2.83	2.98	2	80.9	0.78	2.20	2.98
3	0.56	0.51	2.51	3.02	3	72.4	0.74	2.35	3.09
4	0.41	0.33	2.77	3.10	4	81.3	0.69	2.35	3.04
5	0.37	0.60	2.50	3.10	5	78.2	0.65	2.35	3.00
6	0.43	0.46	2.62	3.08	6	78.5	0.70	2.37	3.07
7	0.40	0.13	2.97	3.10	7	85.1	0.79	2.36	3.15
8	0.50	0.37	2.71	3.08	8	91.2	0.69	2.31	3.00
9	0.28	0.09	3.01	3.10	9	88.5	0.69	2.32	3.01
10	0.36	0.52	2.56	3.08	10	74.1	0.69	2.37	3.06
11	0.32	0.43	2.67	3.10	Mean	81.97	0.72	2.33	3.05
12	0.44	0.09	3.00	3.09	\pm S. D.	6.1	0.05	0.05	0.05
13	0.17	0.13	3.03	3.16	a : by the method of Betke et al. ¹¹⁾				
14	1.07	0.63	2.45	3.08	b : by the method of Jonxis and Visser ¹²⁾				
15	0.27	0.17	2.89	3.06					
16	0.34	0.12	2.98	3.10					
17	0.22	0.11	2.97	3.08					
18	0.22	0.10	3.00	3.10					
19	0.12	0.20	2.91	3.11					
20	0.13	0.17	2.98	3.15					
21	0.13	0.10	2.95	3.05					
Mean	0.45	0.27	2.82	3.09					
\pm S. D.	0.46	0.18	0.19	0.04					

期には、総Hbのはば80%を占めるが、生後4ヶ月までに急速に減少し、その後は徐々に成人値(平均)0.5%に近づく。一方 γ 鎖%は、新生児期には約70%であるが、Hb F%の変化に伴い生後4~5ヶ月までに急速に低下して約40%となり、生後1年まではほぼこの値を維持する。さらに注目されるのは、すでに γ CB-3法による結果でもみたように(Fig. 6, Table 3), 生後の日数経過につれて γ レベルの低下だけでなく、個体差が著しく大きくなることである(13.3~66.2%)。生後1年以降も γ レベルの低下は徐々に進行し、しだいに成人値26%に収斂していく。成人値についても大きな個体差がみられ、最低5%から最高65%にわたって大きな変動を示した。

また、新生児と成人における γ 鎖分布を比較してみると、前者では平均値70%を中心にごく狭い範囲ではば正規分布を示すのに対し、後者では全体として20%以下に分布範囲が低下するだけでなく、正規分布から大きなずれ(left-skewed)を示した。 γ 鎖が50%を下まわる例は、新生児では僅か1.2%に過ぎないが、生後1年の乳幼児では39%に増加し、成人においてはその過半(88%)を占めるに至る。

以上の結果、生後のHb F消失経過と γ 鎖減少経過のよく似ていることがわかったので、生後におけるHb F%と γ 鎖%の相関を見てみた。まず、Hb Fが急速に減

少する生後1日目から4ヶ月までの乳児における両者の相関をみるに(Fig. 9-a), 両者間には明かな相関があった($r=0.68, n=155$)。次に、生後4ヶ月(Hb F%が約20%以下)から1年までの期間についてみると、 $\gamma=0.16(n=133)$ と両者間にはほとんど相関はない(Fig. 9-b)。以上の事実は、生後Hb F生成が急速に減少しHb Aに置換されるのと、 $A\gamma$ 鎖による γ 鎖の置換とはほぼ同時に起こること、また、 γ 鎖(Hb F)生成が高レベルにある時には、 γ グロビン遺伝子の発現に厳密な制御が働いているが、 γ 鎖生成が低下するときには、この制御に「ゆるみ」が生ずることを示唆する。

次に成人について、年齢と γ 鎖%との間の関係を見ると、両者間には全く有意の相関がみられなかった($r=0.01, n=100$)。すなわち、生後、Hb FがHb Aに置換された時点では、 γ 鎖%と年齢との関連は無くなることわかった。

今回、新生児血および成人血について得られた結果を各フェノタイプ別に分け、各 γ 遺伝子の発現%を一括表示したのがTable 4である。標準偏差によって、両者における γ 遺伝子の発現幅を比較してみると、後者においては前者の約4倍に達している。また、新生児血および成人血における $A\gamma^T$ 鎖%の頻度分布をみると、 γ 鎖%に関してみられたのと同様に、新生児では分布がごく狭い

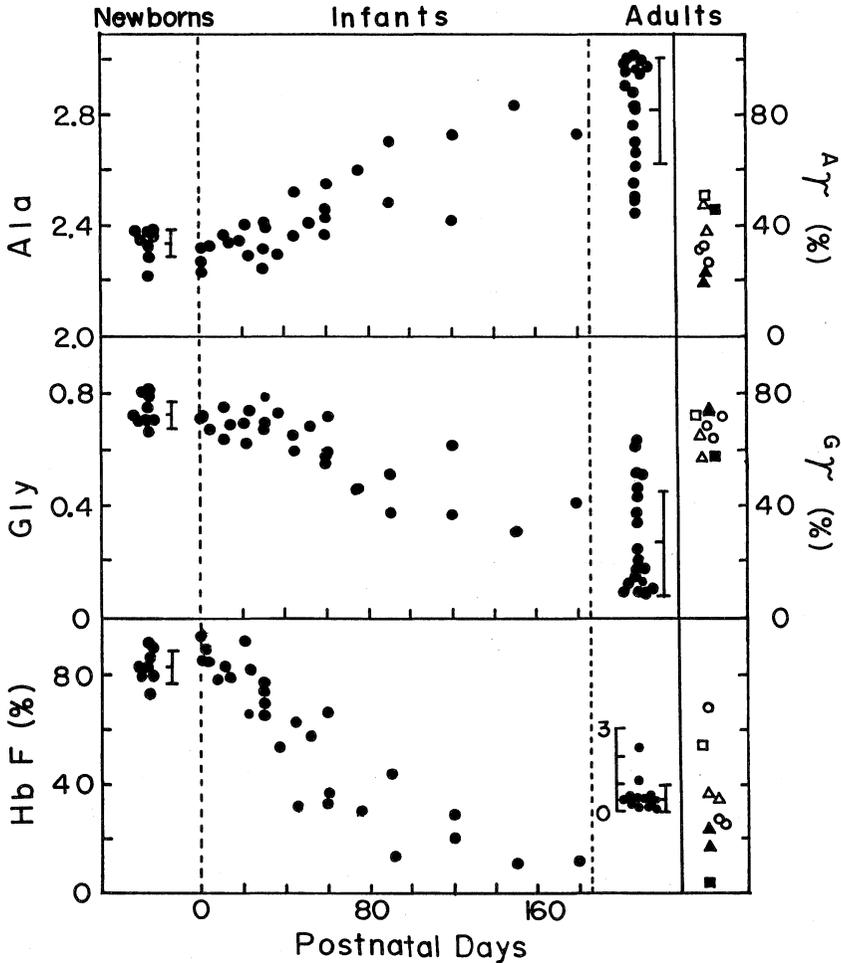


Fig. 6. Postnatal changes in the percentages of Hb F and the number of glycine and alanine residues of the γ CB-3 peptide of Hb F from newborns ($n=10$), infants ($n=28$) and adults ($n=21$). The number of the residues represents the $^G\gamma$ and $^A\gamma$ %, respectively. ●; Normal individuals, ○, □, △, ▲; Four cases of a variant of Fanconi's anemia¹⁵⁾, ■; aplastic anemia.

範囲に限局されるのに対し、成人にあっては比較的広い範囲にわたって分布していた。また、 $^A\gamma$ 鎖の遺伝子頻度 (gene frequency) を計算すると、新生児と成人でそれぞれ 0.125, 0.160 となった。今回分析に供した血液試料が、成人と新生児のちがいはあっても、何れも同一地域の住民集団に由来するものであることからすれば、本来両者の値は一致するはずである。

なお、新生児血の場合、ごく僅少ながら ($n=2$)、Huisman のいう low $^G\gamma$ 例⁸⁾ がみられた。当該例が、遺伝的に特異なグループを形成するのか、あるいは単に集団の下限に位置する個体にすぎないのかは必ずしも定かでないが、ここでは Huisman¹⁸⁾ に従い、一応 low $^G\gamma$

グループとして記載した。

4. 双生児における γ 鎖異型体組成について生体内たんぱくの生成は、いうまでもなく、各個体のもつ遺伝情報の指令下に行われる。したがって、各個体の示す γ 鎖異型体パターンは、それぞれのもつ遺伝基盤の反映であるということが出来る。そこで、一卵性と二卵性の双生児の場合、各個体ペア間で γ 鎖異型体組成にどのような定量的関係がみられるか、さらにこのことから、 γ 鎖異型体の分離、定量結果に基づいて双生児の卵性決定が可能か否かを検討してみた。得られた結果 (Table 5) から、一般に一卵性双生児の場合には、ペア間で予想通り良好な一致がみられたが、時に M 10-10' のように両者間で大き

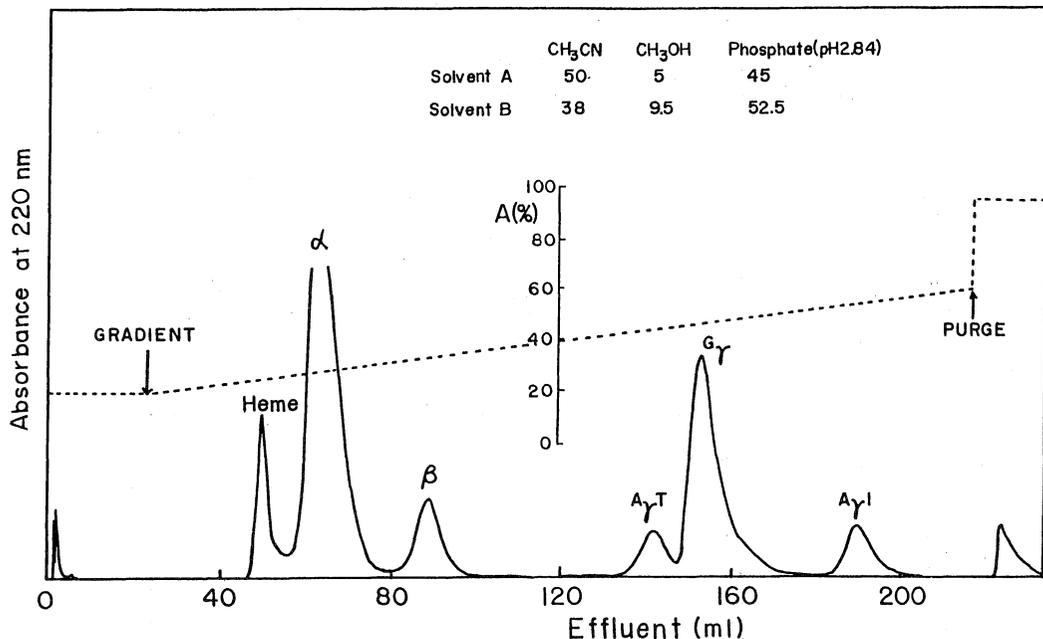


Fig. 7. Separation of the $A\gamma^T$, $G\gamma$ and $A\gamma^I$ chains by reversed phase HPLC. Sample is Hb F isolated from the cord hemolysate. See text for details.

Table 4. The γ chain isoform composition and the $A\gamma^T$ gene frequency, $f(A\gamma^T)$, in normal Japanese newborns and adults

Newborn Blood					
Phenotypes	n	$G\gamma$ (%)	$A\gamma^T$ (%)	$A\gamma^I$ (%)	$f(A\gamma^T)$
$A\gamma^I/G\gamma$	75	67.7±2.9	0	32.1±3.0	
low $G\gamma$	2	40.3±0.7	0	59.7±0.7	
$A\gamma^I/A\gamma^T/G\gamma$	21	70.4±3.7	12.9±2.2	16.7±5.0	0.125
$A\gamma^T/G\gamma$	2	73.1±0.1	26.9±0.1	0	
Total	100	67.8±5.1			
Adult Blood					
$A\gamma^I/G\gamma$	71	24.9±18.3	0	73.7±18.9	
$A\gamma^I/A\gamma^T/G\gamma$	26	27.0±14.9	24.0±8.5	48.6±13.6	0.160
$A\gamma^T/G\gamma$	3	32.6±3.7	67.4±3.7	0	
Total	100	25.7±17.2			

Table 5. Percentage of the three γ -chain isoforms and Hb F% in hemolysates of newborn monozygotic and dizygotic twins

	MONOZYGOTIC TWIN				DIZYGOTIC TWIN			
	Hb F(%)	$A\gamma^T$ (%)	$G\gamma$ (%)	$A\gamma^I$ (%)	Hb F(%)	$A\gamma^T$ (%)	$G\gamma$ (%)	$A\gamma^I$ (%)
M1	89.1	26.9	73.1	—	D1	82.4	—	67.4
1'	77.9	26.8	73.2	—	1'	84.3	12.5	70.8
M3	85.3	10.0	68.7	21.3	D8	85.9	13.3	71.1
M3'	81.3	14.1	68.2	17.7	8'	85.7	13.2	72.5
M6	86.4	—	66.3	33.7	D5	79.2	—	70.4
6'	83.0	—	66.8	33.2	5'	83.4	—	80.3
M10	90.8	—	66.6	33.4	M14	87.3	—	70.5
10'	89.8	—	69.8	30.2	14'	85.8	—	69.5

な差のみられる場合もあることがわかった。二卵性双生児にあっては、D 1-1', D 5-5'のようにペア間で明白な差を示すものがある一方、D 8-8', D 14-14'の場合のように、一卵性の場合に変わらぬ良好な一致を示す例もみられた。したがって、少なくとも現時点では、D 1-1'のように両者間で明らかな異型体組成の差がある場合、あるいはD 5-5'のように両者間に歴然とした量的差のみられる場合を除けば、 γ 鎖異型体分析だけから卵性の判定を行うことには困難があるように思われる。最終的な

結論を得るためには、今後さらに例数を集積して、統計的検討を加えることが必要である。なお今回、一卵性-二卵性の判定は、在来の産科学的規準(胎盤数、胎盤の循環態様、両胎児間の隔膜等)に基づいて行われた。この場合、実際には、時にかなり判定に苦しむ例のあったことも指摘しておかねばならない。一卵性、二卵性を通じ、Hb F%はペア間でさまざまな変動を示した(Table 5)。

考 察

生体には、個体発生に伴い遺伝子発現に変化の生ずるものが多くみられる。胚子-胎児-成人間で造血にみら

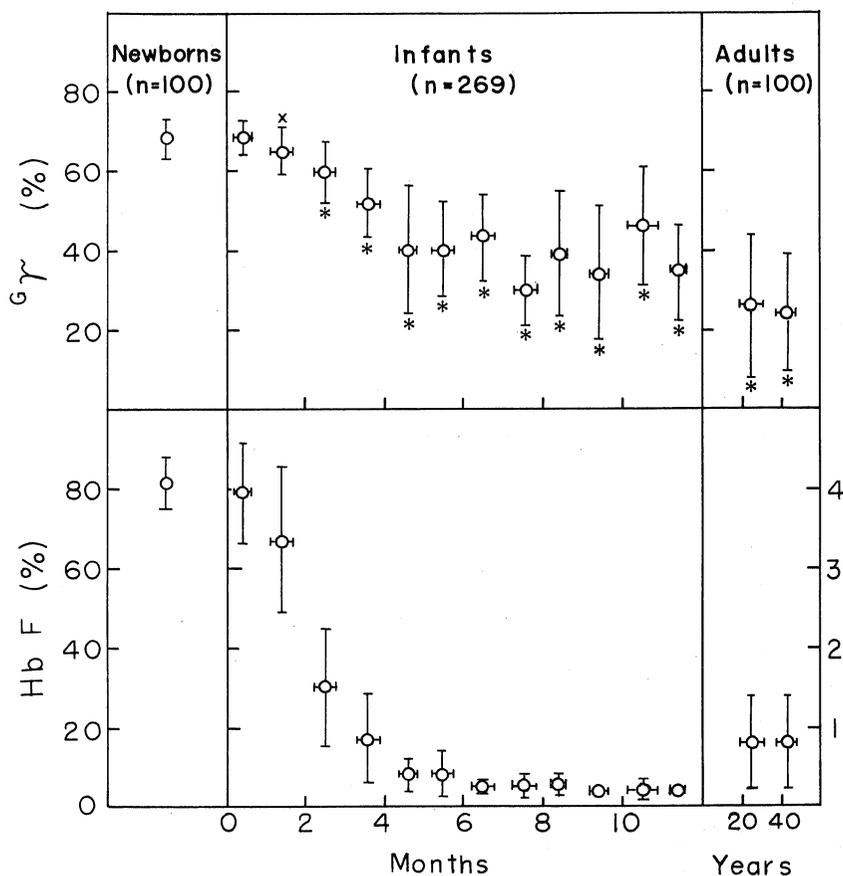


Fig. 8. Postnatal changes in the percentages of Hb F and $G\gamma$ chain of Hb F from normal newborns ($n=100$), infants ($n=269$) within one year after birth and adults ($n=100$). Individual points for normal infants and adults are means and standard deviations at intervals of 30 days and 20 years, respectively. x ; $P < 0.01$, * ; $P < 0.001$ vs. newborns.

れる一連の変化¹⁹⁾などは、その典型的な一例である。このような発育依存変化、いわゆる switching の分子機構については、いまだ基本的理解にはほど遠い現状にある。ところで、造血における switching に伴い、生成する赤血球中の Hb にも switching が生じ、順次、胚子 Hb ($\zeta_2\epsilon_2$, $\alpha_2\epsilon_2$, $\zeta_2\gamma_2$)-胎児 Hb ($\alpha_2\gamma_2$)-成人 Hb ($\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\delta_2$) が生成される²⁰⁾。したがって、Hb switching の研究は、ひろく生体における発育依存性遺伝子発現機構の解明に好個のモデルを提供するものといえる。

Hb switching の中、胚子 Hb に関するものは試料入手に難があり、従来からさほど検討の対象とはなっていない²¹⁾。胎児期の末期から成人期にかけては、胎児 Hb ($\alpha_2\gamma_2$) から成人 Hb ($\alpha_2\beta_2$) への switching がみられ、試料の入手し易さもあって従来から研究報告も多々ある^{3,4,7)}。

ところでこの場合、Hb F は成人期においても完全に消失するわけではなく、生涯にわたりごく微量ながら生成し続けられる¹²⁾。その後、Schroeder ら¹⁾、Ricco ら²⁾により γ 鎖には 3 種の異型体のあることが見出され、さらに各異型体の発現に発育依存性変化のあることが明らかにされた^{3,4,7)}。しかしここに一つの困難は、成人血中に Hb F が微量しか存在せず、そのため switching の定量的な検討が容易でないことである。その結果、正常成人に関しては従来不十分なデータの蓄積しかない⁷⁾。

今回、成人血中の微量 Hb F を単離、濃縮する確実、有効な方法を開発し、これを用いて上記の問題に検討を加え、従来の知見にさらに新知見を加えることができた。

1. 成人血微量 Hb F の単離、濃縮法について

成人血中の微量 Hb F を単離する方法としては、

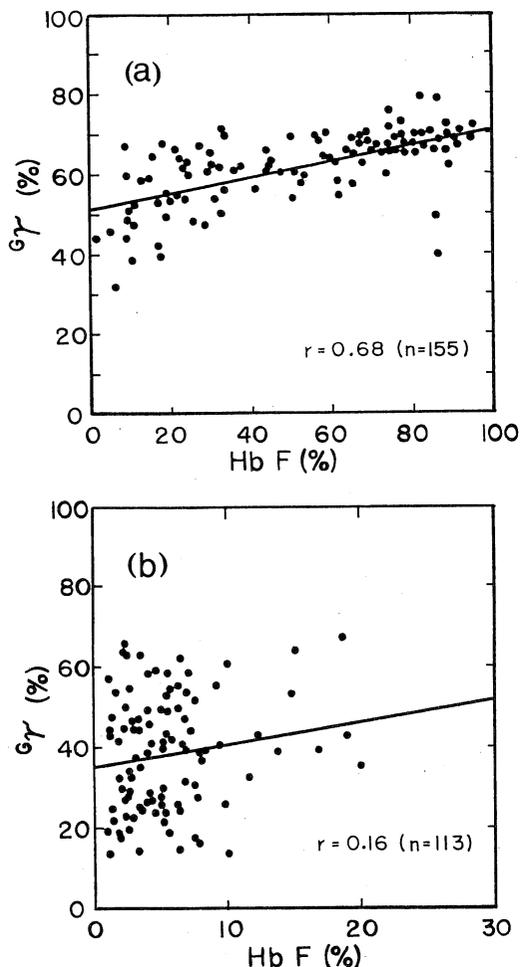


Fig. 9. Relationship between the percentages of $\gamma\gamma$ chain and Hb F in infant blood. Infants from postnatal one day to four months (a), and from postnatal four months to one year (b).

Abraham らのイオン交換クロマト法²²⁾, Tsuchiya らのアルカリ変性法⁷⁾, Manca らの等電点電気泳動(IEF)法⁶⁾などが報告されている。しかしながら、これらはいずれも血液量, 所要時間, 分離効率, 確実性, 経済性などの点で問題がある。Bakioglu ら²³⁾は最近, Abraham らの方法²²⁾と Tsuchiya らの方法⁷⁾を比較して, 両法とも時に収率ゼロの場合のあることを報告しているが, 著者らも両法を実際に用いてこのことを確認した。今回の方法は, Tsuchiya らの方法⁷⁾と同様, Hb F と Hb A のアルカリ抵抗性差に依拠し, 当教室で以前から常用, その有用性については既に実証済みの方法である^{24,25)}。今回, アルカリ変性のみならず, 塩析, 中和操作も加味して, 収率, 確実性に関しさらに一段の改善がみられた(Table 1,

Figs. 1&2)。特に成人 Hb 溶液 1 ml についても, 確実に RP-HPLC 法による分析に十分な Hb F を得ることができた(Table 1)。

2. 成人血より単離した Hb F の諸特性

デンプン・ゲル電気泳動(Fig. 2)および紫外外部吸収スペクトル(Fig. 3)の結果からみて, アルカリ変性—硫酸塩析—CM-Sephadex クロマト法により, 成人血中に微量存在する Hb F が, 十分に単離, 濃縮されていることがわかる。O₂平衡機能についてみると, 新生児血と成人血とではその Hb F の γ 鎖組成に関し明らかな差があるにかかわらず(Figs. 6&8), 両者間で Bohr 効果および DPG 効果(Figs. 4-a&b)に差はみられなかった。このことは, 今回研究対象とした γ 136 位における Gly-Ala 置換, γ 75 位における Ile-Thr 置換が, いずれも Hb の機能に関しては“中立”であることを反映している。

3. γ 鎖異型体分析法について

当初用いた γ CB-3 ペプチド法は, 多量の血液試料と長時間を要するうえ, $\gamma\gamma$, $\gamma\alpha$ 両鎖の分析しかできない。その後 RP-HPLC 法の導入により, これらの難点は全て克服され, ごく少量の血液試料につき短時間で測定することが可能となったため, 今回, 多数例について分析することができた。

4. Hb F および γ 鎖異型体の生後変化

加齢につれ γ 鎖(Hb F)の生成が減少し, β 鎖の生成が増加するのに伴って, $\gamma\gamma/\gamma\alpha$ 比は 7/3 から 3/7 へと全く逆転する(Figs. 6&8, Tables 3&4)。これらの結果は, 既報のいずれも少数例についての観察結果^{3,4,7)}と, 大筋において一致した。ただし, 生後 1 年以内で, 日数を追うての推移を追求したのは, 著者の知る限りこれが最初の報告である。また, これまで論じられなかった点として, 加齢にしたがい, γ 鎖組成(γ -遺伝子発現)の変動幅が著るしく大きくなる事実(Figs. 6&8)が目される。この変動幅を標準偏差で示せば, 成人では新生児の約 4 倍となる(Figs. 6&8, Tables 3&4)。かつまた, 成人における γ 鎖異型体の分布様式は, 正規分布からの大きなズレを示した。このような事実は, 従来の少数例の結果では全く認識されることなく, Schroeder ら³⁾の得た $\gamma\gamma/\gamma\alpha$ 比 2/3 がひろく考察の基礎として引用されてきた。

今回の集団における $\gamma\gamma^T$ 鎖遺伝子頻度は, 新生児 0.125, 成人 0.160 で, 白人(0.224)に比し明らかに低く, 中国人(0.079), 黒人(0.099)よりは明らかに高い値を示したが¹⁸⁾, 日本人新生児について従来報告されている値(0.128~0.190)^{7,26)}とはよく一致した。なお, 今回測定対象とした新生児, 成人は, とともに同一地域の同一集団に

属する個体である。したがって、本来、両者間に遺伝子頻度の差はないはずで、僅差ながらみられた0.125, 0.160という値は、標本サンプリングの偏りによるものと思われ、標本数をさらに増すことにより解消できると考えられる。

γ 鎖遺伝子発現にみる生後変化の原因は、現時点では不明といわざるをえない。近年、 β グロビン-遺伝子クラスター($\epsilon \sim \gamma \sim \delta \sim \beta$)およびその周辺の遺伝子構造と γ 鎖遺伝子発現との関連について、急速な知見の進歩がみられる^{26,27,28,29}。たとえば、遺伝性高胎児Hb症(HFPFH)においては、遺伝子内特定部位での塩基置換、たとえば、 $^{\circ}\gamma$ 遺伝子の5'側202 bp位でのC→G置換³⁰、 $^{\Delta}\gamma$ 遺伝子の5'側117 bp位でのG→A置換³¹などがみられることから、この塩基置換と γ 鎖遺伝子発現との関連が示唆される。また、新生児についての遺伝子マッピング結果から、遺伝子間の交差やハイブリッド形成により遺伝子構造の配列変化が起こり、 $^{\circ}\gamma/^{\Delta}\gamma$ 比にも変化の生ずる可能性が報告されている²⁶。しかしながら、正常なヒトの発達段階で、グロビン遺伝子の構造に変化が生ずるとい証拠はない³²。また、Economouら³³は、正常成人および鎌状赤血球症成人において、Hb F産生と γ プロモータ領域での塩基置換との間に関連はないことを報告している。いずれにせよ、これまでに得られている結果は、「発現-遺伝子構造」関連を示すものではあっても、最も必要なる点、すなわち「なぜ発育のある時点で、特定遺伝子のswitch-offと他の遺伝子のswitch-onが起こるのか」については、何ら語るどころがないと断ぜざるをえない。一方また、発育依存性の γ 鎖遺伝子発現変化の原因を、遺伝子構造そのものではなく、何らかの“外因”(液性因子)に求めようとする考え方もあるが^{34,35}、確実なことは何一つとして明らかにはされていない。このような状況下、「 γ 鎖遺伝子の発現低下時に、 $^{\circ}\gamma/^{\Delta}\gamma$ 鎖遺伝子発現比変化と発現制御精度の低下が同時に起こる」という今回の結果は、問題解決に向けての一つの手がかりを与える事実であるといえる。

4. 双生児における γ 鎖異型体生成

今回、遺伝的に等価なはずの一卵性双生児においても、 γ 鎖異型体組成(γ 鎖異型体遺伝子発現)に二卵性の場合と同様な量的差のみられる例のあることを示した(Table 5)。このことは、遺伝子の構造そのもの以外にも、その発現に対し影響する“外因”の存在する可能性を示すものといえる。事実、Youngら³⁶は、一卵性双生児において、G syndromeの症状発現程度に、ペア間で差のある症例を報告し、発現段階における環境要因の遺伝子発現に対する影響を指摘している。これとは逆に、二

卵性双生児でありながら、一卵性の場合と同様に良好な異型体組成の類似を示す例もみられた(Table 5)。もともと、新生児にあっては、 γ 鎖異型体組成の個体差変動がきわめて小さいこと(Figs. 6&8)、および両親の遺伝子構造が良く類似する例であったこと、等によると思われる。しかし、従来の産科学的規準による限り、卵性の判定には専門家を以てしても時に困難な場合のあることから考えて、今後、より“definitive”な判定法(たとえばDNAフィンガープリント法^{36,37})を用い、再検討を計画中である。しかしながら、フィンガープリント法によったとしても、たまたま両親が良く似た遺伝子構造のケースでは、稀に判定困難な例のある³⁷ことからして、今回の方法も、場合によっては有用な補助判定手段となりうるであろう。

結 語

正常成人血中の微量Hb F分離法を確立し、日本人新生児、乳幼児および成人血中Hb Fの γ 鎖異型体組成の生後変化について検討した。

1. アルカリ変性(2分)-半飽和硫酸塩析法により、最少1 mlの溶血液(10 g/dl Hb)から、逆相HPLCによる γ 鎖異型体分析に必要なHb Fを分離することができた。
2. 成人血中微量Hb Fのゲル電気泳動特性、紫外外部吸収スペクトルおよび O_2 平衡特性(Bohr効果およびDPG効果)は、新生児血中Hb Fと差がなかった。
3. γ CB-3ペプチド法と逆相HPLC法による γ 鎖異型体組成分析結果はよく一致した。生後の発育に伴い、 γ 鎖(Hb F)から β 鎖(Hb A)へのswitchingのみならず、 $^{\circ}\gamma$ 鎖から $^{\Delta}\gamma$ 鎖へのswitchingを認めたが、生後4~5ヶ月以降においては、新生児期の4倍に及ぶ大きな γ 鎖異型体組成変動がみられた。これらの結果より、発育に伴って γ 鎖遺伝子発現低下とともに、遺伝子発現制御精度に低下の起こることが推定される。 $^{\Delta}\gamma^T$ 鎖遺伝子頻度の値は、邦人についての既報値と一致した。
4. 双生児における卵性と γ 鎖異型体組成について検討し、 γ 鎖遺伝子発現における“外的”要因関与の可能性を示唆した。また、限定された場合については、 γ 鎖異型体分析が双生児の卵性判定に有用であることを示した。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲いただきました榎泰義教授に深甚の謝意を表しますとともに、終始、御援助いただきました教室諸兄姉に深謝いたします。また、血液試料の入手に際し御助力いただいた本学病態検査学教室中野博教授、産婦人科学教室一條元彦教授および聖パルナバ病院植田充治博士、奈良県赤十字血液センタ

一に深謝いたします。

本論文の一部は、第56回日本生理学会大会(1979年4月、東京)、第66回日本生理学会大会(1989年4月、岡山)において発表した。

文 献

- 1) Schroeder, W. A., Huisman, T. H. J., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Kleihauer, E. F., Dozy, A. M. and Robberson, B. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60 : 537, 1968.
- 2) Ricco, G., Mazza, U., Turi, R. M., Pich, P. G., Camaschella, C., Saglio, G. and Bernini, L. F. : Hum. Genet. 32 : 305, 1976.
- 3) Schroeder, W. A., Huisman, T. H. J., Brown, A. K., Uy, R., Bouver, N. G., Lerch, P. O., Shelton, J. R., Shelton, J. B. and Apell, G. : Pediat. Res. 5 : 493, 1971.
- 4) Huisman, T. H. J., Schroeder, W. A., Brown, A. K., Hyman, C. B., Ortega, J. A. and Sukumaran, P. K. : Pediat. Res. 9 : 1, 1975.
- 5) Huisman, T. H. J., Altay, C., Webber, B., Reese, A. L., Gravely, M. E., Okonjo, K. and Wilson, J. B. : Blood 57 : 75, 1981.
- 6) Manca, L. and Masala, B. : HEMOGLOBIN 14 : 517, 1990.
- 7) Tsuchiya, T., Nozawa, Y., Igarashi, Y. and Kajita, A. : Dokkyo J. Med. Sci. 10 : 13, 1983.
- 8) Enoki, Y. and Maeda, N. : J. Mol. Biol. 31 : 613, 1968.
- 9) Rossi-Fanelli, A., Antonini, E. and Caputo, A. : Biochim. Biophys. Acta 30 : 608, 1958.
- 10) Nute, P. E., Pataryas, H. A. and Stamatoyannopoulos, G. : Amer. J. Hum. Genet. 25 : 271, 1973.
- 11) Jonxis, J. H. P. and Visser, H. K. A. : Amer. J. Dis. Children 92 : 588, 1951.
- 12) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I. : Nature 184 : 1877, 1959.
- 13) 榎 泰義 : 奈医誌. 10 : 345, 1959.
- 14) Smithies, O. : Biochem. J. 61 : 629, 1955.
- 15) Muller, C. J. : Molecular evolution — A comparative study on the structure of mammalian and avian haemoglobins. Van Gorcum, Assen, 1961.
- 16) Gross, E. and Witkop, B. : J. Biol. Chem. 237 : 1856, 1962.
- 17) 田川徳治, 村上義樹, 高瀬俊夫 : 奈医誌. 27 : 317, 1976.
- 18) Huisman, T. H. J., Reese, A. L., Gardiner, M. B., Wilson, J. B., Lam, H., Reynolds, A., Nagle, S., Trowell, P., Zeng, Y.-T., Huang, S.-Z., Sukumaran, P. K., Miwa, S., Efremov, G. D., Petkov, G., Sciaratta, G. V. and Sansone, G. : Amer. J. Hematol. 14 : 133, 1983.
- 19) Tavassoli, M. : Blood Cells 1 : 269, 1991.
- 20) Huehns, E. R. and Beaven, G. H. : The Biochemistry of Development (Benson, P. F., eds.). Heineman Medical Books, London, p 175, 1971.
- 21) Peschle, C., Mavilio, F., Care, A., Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Salvo, G., Samoggia, P., Petti, S., Guerriero, R., Marinucci, M., Lazzaro, D., Russo, G. and Mastroberardino, G. : Nature 313 : 235, 1985.
- 22) Abraham, E. C., Reese, A., Stallings, M., Garver, F. A. and Huisman, T. H. J. : HEMOGLOBIN 1 : 547, 1977.
- 23) Bakioglu, I., Reese, A. L. and Huisman, T. H. J. : J. Chromatogr. 295 : 171, 1984.
- 24) Ikawa, Y., Enoki, Y., Tomita, S. and Nagai, K. : J. Physiol. Soc. Jpn. 41 : 280, 1979.
- 25) Enoki, Y., Ohga, Y., Nagano, R. and Matsumura, K. : J. Chromatogr. 533 : 63, 1990.
- 26) Harano, K., Harano, T., Kutlar, F. and Huisman, T. H. J. : FEBS Lett. 190 : 45, 1985.
- 27) Gilman, J. G. and Huisman, T. H. J. : Blood 66 : 783, 1985.
- 28) Tuan, D., Feingold, E., Newman, M., Weissman, S. M. and Forget, B. G. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 : 6937, 1983.
- 29) Harano, T., Harano, K., Ukita, M., Wada, Y., Hayashi, A., Ohba, Y., Miyaji, T., Kutlar, F. and Huisman, T. H. J. : HEMOGLOBIN 12 : 723, 1988.
- 30) Collins, F. S., Boehm, C. D., Waber, P. G., Stoeckert, C. J., Weissman, S. M., Forget, B. G. and Kazazian, H. H. : Blood 64 : 1292, 1984.
- 31) Collins, F. S., Metherall, J. E., Yamakawa, M., Pan, J., Weissman, S. M. and Forget, B. G. : Nature 313 : 325, 1985.
- 32) Weatherall, D. J. : J. Cell. Sci. Suppl. 4 : 319,

- 1986.
- 33) **Economou, E. P., Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H., Serjeant, Jr, G. R. and Dover, G.J.** : Blood 177 : 174, 1991.
- 34) **Dillon, N. and Grosveld, F.** : Nature 350 : 252, 1991.
- 35) **Young, I. D., Dagleish, R., MacKay, E. H. and MacFadyen, U. M.** : Amer. J. Med. Genet. 29 : 863, 1988.
- 36) **Derom, C., Bakker, E., Vlietinck, R., Derom, R., Berghe, H. V., Thiery, M. and Pearson, P.** : J. Med. Genet. 22 : 279, 1985.
- 37) **Azuma, C., Kamimura, S., Nobunaga, T., Negoro, T., Saji, F. and Tanizawa, O.** : Amer. J. Obstet. Gynecol. 160 : 734, 1989.