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
Division of Disease Genes, Institute of Genetic Information, Kyushu University

酒井, 保禎
Division of Disease Genes, Institute of Genetic Information, Kyushu University

小林, 茂
Department of Human Geography, Graduate School of Letters, Osaka University

古海, 弘泰
Division of Disease Genes, Institute of Genetic Information, Kyushu University

他

https://doi.org/10.15017/706

出版情報：健康科学. 22, pp.103-108, 2000-02-10. Institute of Health Science,Kyushu University
バージョン：
権利関係：

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** 遠藤敏廉***
Gopal P. ACHARYA**** 川崎晃一*****

Molecular Analysis of Thalassemia in Nepal

Yasuyuki FUKUMAKI, Yasuyoshi SAKAI, Shigeru KOBAYASHI*, Hiroyasu FURUUMI, Shinjiro HAMANO**, Toshiyasu ENDO***, Gopal P. ACHARYA**** and Terukazu KAWASAKI*****

Abstract

Thalassemia is a group of hereditary diseases caused by impaired synthesis of specific globin chains. The disease has a high frequency in regions endemic for malaria including the Mediterranean Basin, Africa, Middle East, Southeast Asia and South China. It has been suggested that the high frequency of thalassemia might reflect advantage due to reduced susceptibility to malaria. To evaluate this malaria hypothesis, we analyzed thalassemia mutations in two neighboring populations of Nepal, the Danuwar and the Tamang. The settlements of the former are located below the limit of the malarial zone (1,200 m in altitude), whereas those of the latter are found in the malaria-free uplands. We detected three heterozygotes for the β^E mutation generating HbE in the Danuwars. The haplotype analysis of the β-globin gene cluster harboring the β^E mutation suggested that the Danuwars and Southeast Asians share the same origin of the β^E mutation. We also detected the 3.7 kb deletion type of α-thalassemia with a high gene frequency, 0.63 in the Danuwars, while in the Tamangs the frequency is only 0.05. Haplotype analysis of the α-globin gene cluster showed that the α-thalassemia mutation has four different genetic backgrounds in the Danuwars. These results suggest that the high frequency of α-thalassemia in the Danuwars is due to the adaptation to malaria endemicity rather than a bottle neck effect.

Key words: thalassemia, malaria, Nepal, globin gene, HbE

(Journal of Health Science, Kyushu University, 22 : 103−108, 2000)

Division of Disease Genes, Institute of Genetic Information, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan
* Department of Human Geography, Graduate School of Letters, Osaka University, Toyonaka 560-8532, Japan
** Department of Parasitology, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka 812-8582, Japan
*** Kyushu Women's College, Kitakyushu 807-8586, Japan
**** Institute of Medicine, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal
***** Institute of Health Science, Kyushu University 11, Kasuga 816-8580, Japan

緒 言

マラリアは古来人類を悩まし続けてきたが、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、マラリア抵抗性が示唆されている。いわゆる「マラリア仮説」である。我々は人類のマラリアに対する適応をこのような生物学的観点とともに文化的観点からも検討し、多様な適応戦略の機構を総合的に理解することを目的として研究を進めている。今回の研究では、すでに小林らにより民族学的な調査研究の蓄積がある、カトマンズから東へ約25 kmはなれたコテン地区の集団に着目した[8]。この地域には主にTamang、Parbateそして Danuwarとよばれる三つの民族集団が居住している。またこの地域では高度1,200 m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、悪性マラリアが流行し住民の健康のみならず生活形態に重要な影響を与えてきた。上記の民族集団のうちTamangは高度1,200 m以上に居住し、低地で農業を営む場合は感染の危険度の低い昼間のみこれをおこない、文化的にマラリアに適応した集団と考えられる。一方Danuwarはマラリア感染危険地帯である高度1,200 m以下の谷沿いに居住し、農業や漁労に携わっており、生物学的な適応が示唆される。このように両集団はその居住地域が隣接しているものの、マラリア感染への適応機構が異なっている事が考えられ、マラリア仮説の実証や、マラリアへの適応機構の多様性を研究するうえで絶好の対象と考えられる。そこで本研究では上記2集団につきマラリア抵抗性因子としてのグロビン異常、特にサラセミアの全貌を明らかにすることを試みた。

方法と材料

1．検 体

健康診断に来た、ネパール中部のTamang 114名、およびDanuwar 110名から採血した。現地で採血後遠心し、赤血球層と白血球層とに分離した。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．DNA抽出

LahiriとNurnbergerの方法[9]により末梢血リンパ球からDNAを抽出した。

3．ヘモグロビン解析

全血球数、Hb, Htの測定とともに、以下の方法によりHPLCを用いてHbの分画を行った。赤血球分画15 μlを1 mlの30 mMビス-トリス-酢酸（pH 6.4、15 mM KCN含有）緩衝液に溶解し、ミリポアフィルターでろ過後、Hb濃度に換算して58～62 μg/mlに程度になるように希釈調製したものを検体とし、100 μlを高速液体クロマトグラフィーに供した。分析には、ダブルプランジャー式高圧ポンプ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）から構成される高速液体クロマトグラフィー装置を用いた。Wilsonらの方法[11]に準じて、陽イオン交換体カラムTSK-gel CM-3SWカラム（7.5 mm × 7.5 cm、東洋ソーダ株式会社製）を用い、30 mMビストリス-酢酸（pH6.4、15 mM KCN含有）緩衝液下、酢酸ナトリウム0～150 mM直線濃度勾配140 mlで、室温下、流速1.0 ml/minで展開溶出した。

4．PCR法による解析

1）HbEの検出

HbE変異に関するアレル特異的なオリゴヌクレオチド5'-AAGTTGGTGGTAAGGCCCT-3'、および正常アレル特異的なオリゴヌクレオチド5'-AGGGCCTCACCACCAACTT-3'を用いて、既に報告したドットブロッテイング法を用いて検出した[2]。またダイレクトシークエンシング法を用いてHbE変異の確認を行った[12]。

2）βグロビン遺伝子群のハプロタイピング

εグロビン遺伝子の上流*Hin*c Ⅱ部位、Gγ、Aγグロビン遺伝子内の*Hin*d Ⅲ部位、Ψβグロビン遺伝子内と下流の*Hin*c Ⅱ部位、βグロビン遺伝子内の*Ava* Ⅱ部位、下流の*Bam*HI部位の多型を先に報告したPCR法で決定した[5,6]。

3）αサラセミアの検出

αサラセミアのなかでも高い頻度で見いだされる3.7 kbと4.2 kb欠失型を以下のような方法で検出した[7]。PCRは、0.3 μgのヒトゲノムDNAに0.2 μMのプライマーペアー、0.2 mMのdNTP、PCR反応バッファー（Toyobo）を加え行った。用いたプライマーは以下の通りである。

A: 5'-CCCAGAGCCAGGTTTGTTTATCTG-3'

B: 5'-GAGGCCCAAGGGGCAAGAAGCAT-3'
C: 5'-GCTAGAGCATTGGTGGTCATGCC-3'
D: 5'-TTCTGACTCTGCCCACAGCCTGA-3'
α G1: 5'-GCTGACCTCCAAATACCGT-3'
α G2: 5'-CTCTGCCTCCTTGGTTAAAA-3'

反応条件は94℃1分間熱変性し、1単位のKOD Dash*Taq* DNA polymerase (Toyobo) を加えた後、94℃30秒の変性、プライマーのアニーリングは以下に示したようにプライマーペアーに応じた温度で2秒、74℃30秒の伸長反応のステップを30サイクルの条件で行った。プライマーのアニーリング温度は、プライマーAとB、プライマーCとD、プライマーα G1、α G2のペアーでは、それぞれ61℃、66℃、60℃で行った。

3.7 kb欠失型はプライマーA,Bで1,779bpの、4.2 kb欠失型はプライマーC,Dで1,529bpの、また正常アレルからはプライマーα G1、α G2により1,395 bpのDNA断片が増幅される（図1）。

4）αグロビン遺伝子群のハプロタイピング

ζ 2グロビン遺伝子上流の*Xba*I部位、下流の*Sac*I部位、*Bgl*I部位、Ψζ 1グロビン遺伝子内の遺伝子変換による配列の多型、α2上流の*Rsa*I部位と下流の*Pst*I部位、θ1グロビン遺伝子上流の*Pst*I部位の多型をPCR法で決定した[7]。

結　果

1．異常ヘモグロビンとβグロビン遺伝子群のハプロタイプ解析

まずMCV、MCHおよびMCHCの異常が見られるサンプルにつきHb解析をおこなった。上記Danuwarの3例においてHbA₂の高度な上昇を認めた。βサラセミアヘテロ接合体ではHbA₂レベルが4～8%程度に上昇することが知られているが、3例は26.9, 27.8, 20.8%と高度に上昇しており、HbA₂と電気泳動上移動度が類似しているHbEの可能性が考えられた。そこでHbE変異に特異的なオリゴヌクレオチドを用いたドットブロットハイブリダイゼーションにより検討したところ、3例ともHbEのヘテロ接合体であることが分かった。さらにダイレクトシークエ

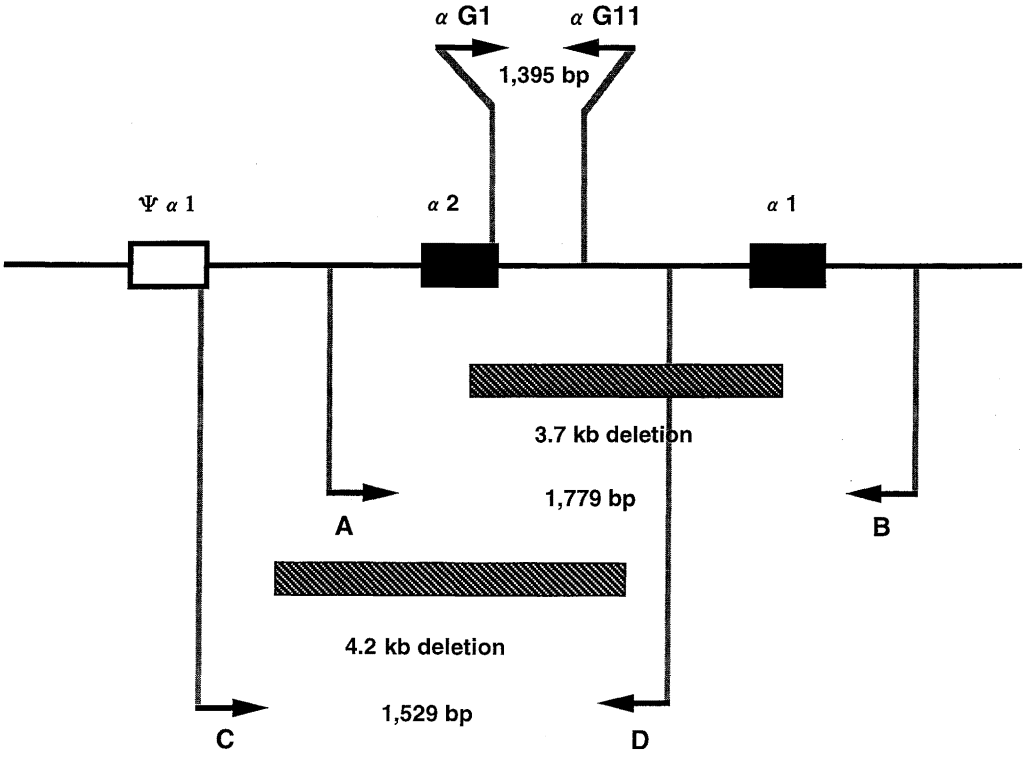

図1　αサラセミアの検出

αグロビン遺伝子群の一部を示している。α1,2グロビン遺伝子は同一のαグロビン鎖をコードしている。Ψα1グロビン遺伝子は偽遺伝子であり、グロビン鎖は産生しない。3.7 kbおよび4.2 kb欠失領域とPCR法に用いたプライマーを→で示した。また欠失がある際生じるPCR増幅産物のサイズもbpで記した。
なお、欠失がない場合は、αG1とαG2のプライマーを用いたPCRにより、1,395bpの増幅産物が得られる。

表1 αサラセミア（3.7 kb欠失型）の頻度

集団	Danuwar	Tamang
ホモ接合型	41（ 37%）	1（ 1%）
ヘテロ接合型	57（ 52%）	9（ 8%）
正常型	12（ 11%）	104（ 91%）
合計	110（100%）	114（100%）

各遺伝子型の人数と割合（%）を示している。

表2 Danuwar集団におけるαグロブリン遺伝型とハプロタイプとの関係

ハプロタイプ	Ⅰa	Ⅰb	Ⅱa	Ⅱc
3.7kb欠失型	14	3	9	3
正常型	5	0	10	0
合計	19	3	19	3

ハプロタイプは文献7）分類によった。

ンシング法により本変異を塩基レベルで確認した。これらHbEのヘテロ接合体のβグロビン遺伝子群のハプロタイプを決定したところ（+,−,−,−,−,+,−）であった。

2．αサラセミアとαグロビン遺伝子群のハプロタイプの解析

αサラセミアの有無を検討するために、PCR法を用いた。その結果、表1に示すようにDanuwarのサンプルでは、3.7 kb欠失型αサラセミア（16番染色体上に本来2個存在するαグロビン遺伝子の一個の欠失）を高頻度に見出した。つまり37%が3.7 kb欠失型のホモ接合体であり、52%がヘテロ接合体であった。αサラセミア遺伝子の頻度は0.63であった。一方Tamangのサンプルではホモ接合体、ヘテロ接合体はそれぞれ1%、9%であり、遺伝子頻度は0.05と明らかに低かった。また両集団とも4.2 kb欠失型αサラセミアは見いだされなかった。

Danuwarのαサラセミアの中で、家族のサンプルが入手可能な例につきαグロビン遺伝子群の多型に基づくハプロタイプを決定し表2に示した。αサラセミア欠失は4つの異なるハプロタイプと連鎖していることがわかった。

考 察

今回ネパールの中部に居住する二つの民族集団、DanuwarとTamangの検体を用いて、異常ヘモグロビンの検討をおこなった。血球数やHb量、またHb A_2のレベルからはβサラセミアは見出されなかった。Danuwarではヘモグロビン E（Hb E）のヘテロ接合体つまり保因者を3名見出した。Hb Eは東南アジア諸国において最も頻度の高い異常Hbである[3]。特にタイにおいて頻度が高く保因者の率は13%であり、東北部では50〜70%にも及ぶ[4]。この変異はコドン26のGAG（Glu）からAAG（Lys）へのミスセンス変異である。このアミノ酸置換はHbの機能にはそれほど影響を及ぼさない。むしろ塩基置換により潜在スプライスサイトが活性化される。これにより異常スプライシングが起きるため、正常のスプライシングを受けたβグロビンmRNA量が低下し、サラセミア変異との複合ヘテロ接合体でサラセミアをきたす[10]。本研究での遺伝子頻度はコテン地域で1.4%に過ぎない。しかしTamangでは全く見られず、このことからもマラリア感染により選択された可能性も考えられる。本変異を有するβグロビン遺伝子群内の多型解析によれば、東南アジアのHb Eで見いだされたハプロタイプと同一であり、東南アジア集団と起源を共にしている可能性が考えられた。

一方、αサラセミアについてはDanuwarにおいて3.7 kb欠失をホモおよびヘテロ接合体に合わせ89%と極めて高い頻度で見出した。この変異はホモ接合体でもディプロイド当たり正常では4個存在するαグロビン遺伝子が2個は存在するために、貧血症状は呈さず健常者と変わらない。一方Tamangでのホモおよびヘテロ接合体の合計は9%であり、Danuwarに比べると明らかに低いものであった。この頻度の差はαサラセミアによりマラリア抵抗性が生じていることを示唆する。

Flintらにより[1]メラネシアにおいてαサラセミアの頻度がマラリア危険地域と高度ならびに緯度依存的に関連していることが示されている。これに対し本研究の対象であるDanuwarとTamangは相互に隣接して居住する。しかし前者がマラリア感染危険地帯（高度1,200 m以下）に常住するのに対し、後者は安全地帯に住居をもち、危険地帯に行くのは昼間にかぎるなど、感染を避けてきた。その差がαサラセミアの頻度の差を発生させたと推定される。

αグロビン遺伝子群のハプロタイプの解析から、変異の起源は複数存在することが考えられた。このことはボトルネックによりαサラセミアが集団内で固定化した可能性を否定するデータと考えられ、サラセミアのマラリアによる選択を支持する結果と考えている。この点をさらに明らかにするとともにDanuwarの遺伝的な多様性を検討するために、現在ミトコンドリアDNAの多型を解析している。

謝　辞

本研究で用いたサンプルの一部を提供していただきました横浜市立大学梅村敏教授と石上友章博士、および現地での調査で御尽力をいただきました九州大学川島健治郎名誉教授、大柿哲朗教授、石井博司氏と中村学園大学伊藤和枝教授、ならびにトリブバン大学医学部S. Sharma医師、S. B. Khadka医師、ネパール医科大学P. Baral医師、R. B. Rai、H. B. Rai両氏、およびK. B. Tamang夫妻に深謝致します。またαグロビン遺伝子群のハプロタイプ解析で御教示をいただきましたオックスフォード大学J. B. Clegg教授、そして集団遺伝学的解析で御助言を賜りました九州大学舘田英典教授と荒木仁志氏に深謝致します。

この研究は一部文部省科学研究費補助金（No.08041178, No.09041186：川崎；No.10115211, No.11112215：服巻）による支援を受けた。

引用文献

1）Flint. J., Hill, A. V., Bowden, D. K., Oppenheimer, S. J., Sill, P. R., Serjeantson, S. W., Bana-Koiri, J., Bhatia, K., Alpers, M. P., Boyce, A. J., Weatherall, D. J. and Clegg, J. B.: High frequencies of α-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. Nature, 321: 744-750, 1986.

2）Fucharoen, S., Fucharoen, G., Sriroongrueng, W., Laosombat, V., Jetsrisuparb, A., Prasatkaew, S., Tanphaichitr, V., Suvatte, V., Tuchinda, S. and Fukumaki, Y.: Moleclular basis of β-thalassemia in Thailand: analysis of β-thalassemia mutations using polymerase chain reaction. Human Genetics, 84: 41-46, 1989.

3）Fucharoen, G., Fucharoen, S. Jetsrisuparb, and Fukumaki, Y.: Molecular basis of HbE-β-thalassemia and the origin of HbE in northeast Thailand: Identification of one novel mutation using amplified DNA from buffy coat specimens. Biochemical and Biophysical Research Communications, 170: 698-704, 1990.

4）Fucharoen, S. and Winichagoon, P.: Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin, 11: 65-88, 1987.

5）Fukumaki, Y. and Fucharoen, S.: Generation and spread of globin gene mutations in population: β-thalassemia in Asian countries. In Kimura, M. and Takahata N. (Ed), New Aspects of the Genetics of Molecular Biology (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1991, pp.153-176.

6）Furuumi, H., Firdous, N., Inoue, T., Ohta, H., Winichagoon, P., Fucharoen, S. and Fukumaki, Y.: Molecular basis of β-thalassemia in the Maldives. Hemoglobin, 22: 141-151, 1998.

7）Higgs, D. R., Wainscoat, J. S., Flint, J., Hill, A. V., Thein, S. L., Nicholls, R. D., Teal, H., Ayyub, H., Peto, T. E., Falusi, A. G., Jarman, A. P., Clegg, J. B. and Weatherall, D. J.: Analysis of the human α-globin gene cluster reveals a highly informative genetic

locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83：5165–5169, 1986.

8）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.

9）Lahiri, D.K. and Nurnberger, J.I. Jr. : A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Research, 19: 5444, 1991.

10）Orkin, S.H., Kazazian, H. Jr., Antonarakis, S.E., Ostrer, H., Goff, S.C. and Sexton, J. P. : Abnormal RNA processing due to the exon mutation of β^{E}-globin gene. Nature, 300: 768–769, 1982.

11）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.

12）Winichagoon, P., Fucharoen, S., Wilairat, P., Chihara, K., Fukumaki, Y. and Wasi, P.: Identification of five rare mutations including a novel frameshift mutation causing β^{0}-thalassemia in Thai patients with β^{0}-thalassemia / hemoglobin E disease. Biochimica et Biophysica Acta, 1139: 280–286, 1992.