

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17870

研究課題名（和文）血液型D抗原の発現制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the expression control mechanism of blood group D antigen

研究代表者

三島 由祐子（MISHIMA, YUKO）

杏林大学・保健学部・助教

研究者番号：90815771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：RhDのスプライシングによる発現量の変化を強制発現系のWestern blottingで検討したところ、単量体のバンドよりも300 kDa以上の複合体を形成したバンドが強く検出されたが、全長のRhD蛋白とエクソン7-9を様々なパターンで欠くバリエーションの発現量に差を認めなかった。RhDとの相互作用が想定されるankyrin, protein 42, spectrin, band3の強制発現系を用いてRhDの各アイソフォームとの免疫沈降を行った結果、band3のみRhDとの結合が確認されたが、全長RhD蛋白と他のスプライシングバリエーションの間に明らかな結合能の差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異の表現型からRhDとの相互作用が想定されている分子のうち、band3とRhDが直接結合することを実験的に検証しえた。一方RhDのスプライシングバリエーションのmRNAレベル、蛋白レベルの発現量に差がなく、かつband3とRhDのスプライシングバリエーションの結合能にも差を認めなかったことから、RhDの発現制御には選択的スプライシングのほか、未知の結合分子を含めたより複雑な分子間ネットワークが関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The expression changes of RhD protein caused by the alternative splicing were examined by Western blotting using the forced expression models. Large complexes of 300 kDa or more containing RhD protein were detected more strongly than the RhD monomer. There were no differences on the expression levels among the full-length RhD protein and splicing variants that lacked exons 7-9 in various patterns. The results of immunoprecipitation of each RhD isoform and the forced expression protein of ankyrin, protein 42, spectrin, and band3, which are expected to interact with RhD, showed that band3 is the only molecule that bound to RhD. However, there were no apparent differences in the binding ability among the full-length RhD protein and the other splicing variants.

研究分野：輸血

キーワード：RhD 発現制御メカニズム

1. 研究開始当初の背景

輸血療法において RhD 抗原 (以下 D 抗原) は ABO とならぶ主要血液型抗原である。D 抗原の発現は赤血球特異的である上、D 抗原関連分子群が正常に働かなくなると赤血球は正常な形態を保てなくなり、球状赤血球症を発症する。したがって D 抗原の発現制御メカニズムを解明することは、未分化造血幹細胞が赤芽球をへて赤血球に分化したり、赤血球が正常な形態や機能を保ったりするメカニズムを解明する上でもきわめて重要である。

D 抗原を構成する RhD 蛋白は 12 回膜貫通型の膜蛋白であり、それ自体がエピトープとして作用する。赤血球で重要な RhD のファミリー分子として RhCE や RhAG が知られている。RhCE は RhD の相同分子で Rh 血液型のうち C/c, E/e 抗原のエピトープとして作用、一方 RhAG 遺伝子変異により正常な RhAG 蛋白の発現が消失すると D, C/c, E/e すべての Rh 抗原の発現がなくなり (Rh null) 球状赤血球症になる。このさい CD47/IAP, glycophorin B, LW, Duffy など他の血液型関連糖タンパクの発現も消失または著しく減弱するため、Rh ファミリーとこれら糖タンパクは互いに赤血球膜上で複合体を形成するものと推測される。RhAG 以外の球状赤血球症原因遺伝子として ankyrin, spectrin, band3, protein4.2 が知られており、これらと Rh ファミリーの相互作用も強く疑われる。しかしながら、これら相互作用分子が互いにどのような関係性をもって分子間ネットワークを形成し、細胞膜上で具体的にどのような生理機能を有するのか、その詳細なメカニズムは不明である。

D 抗原の赤血球膜上への発現制御には選択的スプライシングがかかっている。RhD 遺伝子は 10 個のエクソンからなり、通常 D 抗原を形成する RhD 蛋白はこれら 10 個のエクソンすべてを含む転写・翻訳産物である。一方 RhD の exon 7, 8, 9 については多様なスプライシングバリエーションが存在することが知られている。D 抗原の発現が著しく減弱する WeakD や Del という RhD 亜型のうち、日本人に多い c.960 G>A, c.1227 G>A というふたつの synonymous SNP ではそれぞれエクソン 7 および エクソン 9 が正常に転写されないスプライシング異常が生じるため、C 末端のアミノ酸配列が変異する。したがって選択的スプライシングによる C 末端のペプチド構造の変化が、D 抗原の発現に大きな影響を与えることが推測される。この機序として、RhD の C 末端に前述の相互作用分子群が結合して複合体を形成するとされていることをあわせて考えると、スプライシング異常により C 末端のペプチド構造が変化することで RhD 蛋白と相互作用分子の結合能に変化を生じるという仮説が成り立つが、前述のようにその詳細は未解明である。

D 抗原の発現が赤血球特異的であることから、赤血球の分化過程において RhD 遺伝子では、すべてのエクソンを含む全長 mRNA 優位に選択的スプライシングのパターンがシフトする変化が生じているものと推測される。我々の先行研究から、Weak D c.960G>A 変異によるエクソン 7 のスプライシング異常は ESE (exonic splicing enhancer) 配列の消失による可能性が高いと推測されるが、ESE に実際に結合するスプライソソーム蛋白は何かなどその詳細は不明である。

2. 研究の目的

いまだほとんど解明されていない RhD の相互作用分子とその機能、選択的スプライシングの制御機構について検討することで、D 抗原の発現制御機構、さらには赤血球の形態維持や分化のメカニズムを解明することを目的に本研究を実施した。

とくに RhD 蛋白の C 末端に直接結合し、exon 7, 8, 9 の選択的スプライシングによりその結合能に影響を受ける相互作用分子は存在するのか、明らかにすることを主目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) RhD アイソフォームの発現量の確認

全長の RhD (RhD Wild) とエクソン 7-9 を様々なパターンで欠く 5 種類のスプライシングバリエーション (RhD DEL7, DEL9, DEL79, DEL89, DEL789)、RhD と RhCE のハイブリッドアレル (3-9CE) (RhD のエクソン 3-9 が RhCE に置換、日本人の RhD 陰性アレルの約 10% をしめる) 正常 RhCE をそれぞれ Myc-tag, Flag-tag, GFP-tag ベクターに組み込むことで N 末端 Myc, Flag, GFP-tag 付の強制発現ベクターを作成した。60 mm dish で培養した 293 細胞に各 RhD アイソフォームのプラスミド 3 μ g をリン酸カルシウム法にて transfection した。48 時間後に蛋白を回収し、4-20% の SDS-PAGE ゲルで電気泳動後、PVDF メンブレンに blotting した。各 Tag に対する抗体を一次抗体、抗マウスまたはラビット IgG-HRP を二次抗体とし、ECL plus を用いた発光アッセイにて RhD 蛋白を検出した。

(2) RhD 相互作用分子の検索のための基礎検討

次に、RhD との相互作用が想定される ankyrin, protein 42, spectrin, spectrin, band3 の HA/Myc-tag, Flag-tag, GFP-tag いずれかの強制発現ベクターを作成した。これと Myc-tag, Flag-tag, GFP-tag 付の RhD アイソフォームを様々な組み合わせで 2.5 μ g ずつ合計 5.0 μ g、293 細胞に co-transfection し、発現を確認した。

(3) RhD 相互作用分子との免疫沈降法による結合の確認

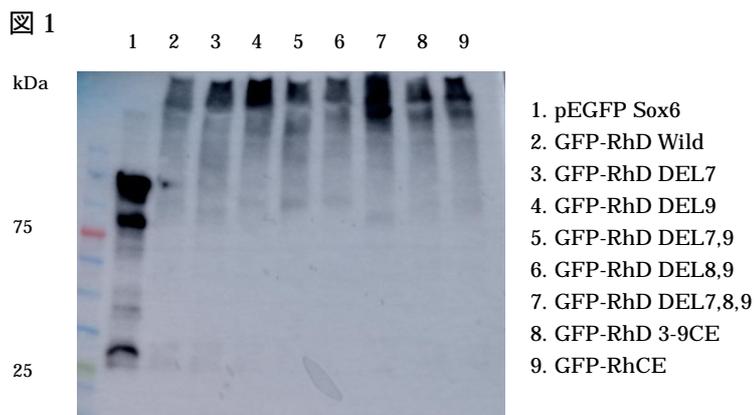
(2) で得られた候補相互作用分子と RhD アイソフォームを 293 細胞に同時導入し、抗 Myc 抗

体、抗 Flag 抗体、抗 GFP 抗体結合アガロースゲルを用いた免疫沈降で RhD 蛋白と直接結合するキー分子を絞り込んだ。また co-transfection した 293 細胞の膜蛋白と細胞質蛋白をそれぞれ抽出し、同様に RhD アイソフォームと band3 の結合性を確認することで RhD の局在を確認した。

4. 研究成果

(1) RhD アイソフォームの発現量の確認

Western blotting では単量体のバンドも確認できたが、300kDa 以上のバンドが強く検出され、RhD が複合体を形成していると推測された。Flag-tag、Myc-tag に比べ、GFP-tag で最も強い発現が確認できた。また、全長の RhD 蛋白とスプライシングバリエーション蛋白の発現量に差を認めなかった。(図 1)

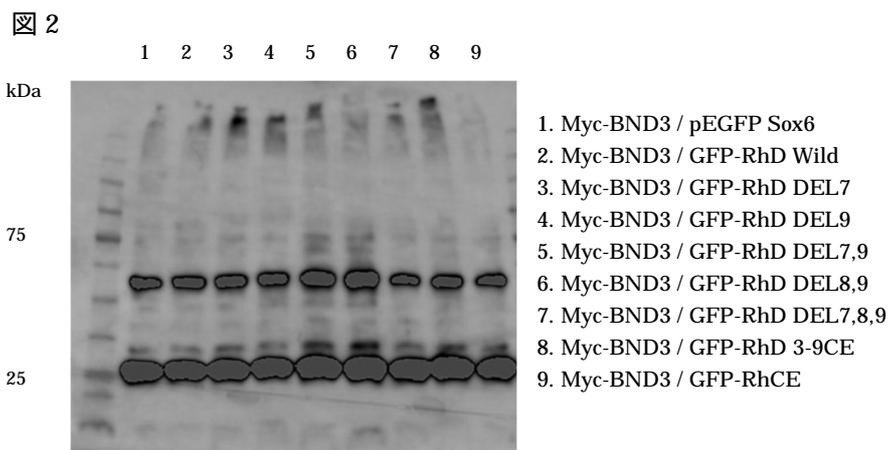


(2) RhD 相互作用分子の検索のための基礎検討

Protein 42 は N 末 Flag-tag、ankyrin は N 末 HA/Myc-tag, spectrin は N 末 HA/Myc-tag, band3 は C 末 Myc-tag を用いた強制発現系が RhD との co-transfection でうまくワークすることを確認した。Spectrin については tag 付の強制発現系がうまくワークせず、native protein の強制発現系を蛋白特異的 monoclonal 抗体を用いて同定する系を作成した。

(3) RhD 相互作用分子との免疫沈降法による結合の確認

Band3 以外の相互作用の候補分子では RhD 蛋白との特異的な共沈を認めなかった。抗 GFP 抗体結合アガロースで免疫沈降し、抗 Myc 抗体で検出したところ、バンドが確認されたことから、band3 は RhD に直接結合していることが確認された。また、膜蛋白の免疫沈降では whole protein と同様に RhD と band3 の結合が確認できたが、細胞質蛋白では確認されなかったことから、その発現は膜に局在していることが確認できた。(図 2) この結合は RhCE では認められず RhD 特異的と考えられたが、スプライシングバリエーション間で band3 との結合能に大きな差を認めなかった。



RhD のスプライシングバリエーションの mRNA レベル(先行研究で確認済み) 蛋白レベルの発現量に差がなく、かつ band3 と RhD のスプライシングバリエーションの結合能にも差を認めなかったことから、RhD の発現制御には選択的スプライシングのほか、未知の結合分子を含めたより複雑な分子間ネットワークが関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------