

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390140

研究課題名（和文） クロマチンリモデリングを介したABO式血液型遺伝子の発現調節機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of ABO blood group gene expression through chromatin remodeling

研究代表者

小湊 慶彦 (KOMINATO YOSHIHIKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30205512

研究成果の概要（和文）：

ABO式血液型は個人識別に重要な指標として法医学、犯罪鑑識において利用されている。しかし、ABO式血液型遺伝子の転写調節機構は不明である。そこで我々は ENCODE プロジェクトから明らかにされた赤白血病細胞 K562 における DNaseI 高感受性領域に基づき、レポータープラスミドを作製した。K562 細胞を用いたプロモーターアッセイから、*ABO* 遺伝子第1イントロン内に赤血球特異的エンハンサーを同定し、その領域に GATA 転写因子が結合することを証明した。また、 B_m 型および AB_m 型 112 例中 111 例に第1イントロンのエンハンサー領域を含む約 5.8kb の欠失を見出したが、通常の血液型 1005 人において欠失はなかった。また、欠失がない B_m 型一人ではエンハンサー内の GATA 結合サイトに一塩基置換があり、その一塩基置換によりエンハンサー領域への GATA 転写因子の結合を阻害され、エンハンサー活性が完全に消失していた。以上から、エンハンサーの欠失や塩基置換に基づくエンハンサーの機能喪失から転写活性が低下し、血球系細胞における B 抗原量の産生低下から B_m 型が生じたと考えられた。従って、上記の赤血球特異的エンハンサーが細胞内において機能することが推測された。一方、 B_m 型は血液型亜型の半数を占めるものであり、その遺伝子診断が可能となったことから、本研究は ABO 式血液型の遺伝子診断の実現に貢献したと考えている。

研究成果の概要（英文）：

The ABO blood group is of great importance in blood transfusion and personal identification. However, the mechanisms regulating human *ABO* gene expression remain obscure. On the basis of DNase I hypersensitive sites in and upstream of *ABO* in the human erythroleukemia cell line K562 in publicly available expression data from the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>), we prepared reporter plasmid constructs including these sites. Subsequent luciferase assays indicated a novel positive regulatory element in intron 1. This element was shown to enhance *ABO* promoter activity in an erythroid cell-specific manner. Electrophoretic mobility shift assays demonstrated that it bound to the tissue-restricted transcription factor GATA-1 and GATA-2. Mutation of the GATA motifs to abrogate binding of this factor reduced the regulatory activity of the element. Thus, GATA transcription factors seem to be involved in the cell-specific activity of the element. Furthermore, we found that B_m phenotypes were associated with a partial deletion in intron 1 involving the element as well as a single point mutation of GATA site leading to reduced activity of the element. Therefore, it is plausible that deletion or a single point mutation of the erythroid cell-specific regulatory element could down-regulate transcription in the B^m allele, leading to reduction of B antigen expression in cells of erythroid lineage, but not in mucus-secreting cells. These results support the contention that the enhancer-like element in intron 1 of *ABO* has a significant function in erythroid cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：ABO式血液型、転写調節領域、亜型、Bm型、輸血

1. 研究開始当初の背景

ABO式血液型は個人識別に重要な指標として法医学、犯罪鑑識において利用されている。ABO式血液型は20世紀初頭に発見され、1960年代に抗原構造の解析、1980年代後半から1990年代にかけて血液型合成に関わる糖転移酵素のcDNAの構造が明らかにされた。申請者らは、血液型抗原の組織特異的発現、細胞分化に伴う発現、癌細胞での抗原の欠落、血液型抗原の発現が弱い変異型等の現象を分子レベルで解明するために、ABO遺伝子の発現制御機構の研究を18年間にわたり進めてきた。

2. 研究の目的

ABO式血液型の細胞特異的発現、コード領域に変異を伴わない亜型等の原因は未だ解明されていない。これらを解明するため、ABO式血液型遺伝子の転写調節機構を調べた。

3. 研究の方法

近年、転写調節領域を示唆するDNase I hypersensitive site (DHS)やクロマチン修飾がゲノムワイドに示され、ABO遺伝子周辺にいくつかのエンハンサー候補が示唆されている。申請者らはABO遺伝子の周辺約35kbについて、DHSを含む6箇所の領域をPCR増幅若しくはゲノムDNAクローンHG-1から準備し、それらをプロモーター領域上流に組み込んだレポータープラスミドを作製した。それらを赤白血病細胞K562、胃癌細胞KATOIII、胚線維芽細胞OUMS-36T-1に遺伝子導入した。ルシフェラーゼアッセイにより各領域における転写活性を調べた。また、コード領域に変異を伴わない亜型であるBm型では、赤血球系細胞での発現減少が推測されていたので、転写調節領域の遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

DHSを含む6箇所の領域を調べたところ、ABO遺伝子第1イントロン内の+5.8 kb siteに転写活性化領域を見出した。また、その活性は赤血球系細胞

特異的であった。そこで、赤血球上では抗原量が減少しているが、分泌液中ではその量に変化がない、血液型亜型Bmにおいて第1イントロンの構造を解析することとした。Bm及びABm型112人及び正常血液型1005人から、同意を得てDNAを採取した。本研究は群馬大学医学部倫理委員会で承認済である。Bm型の+5.8 kb siteの転写活性化領域周辺を数種類のプライマーでPCR増幅した結果、Bm型では+5.8 kb siteを含む約5.8 kbが欠損していることが判明した。Bm及びABm型112例中111例に同様の欠損が認められ、1例にはその欠損が認められなかった。その例外の1例においては、エクソン1-7に変異はなく、Bアレル+5.8 kb site内のGATA結合サイトに一塩基置換を同定した。ゲルシフトアッセイにおいて一塩基置換によりGATA転写因子は+5.8 kb siteへの結合が阻害された。プロモーターアッセイでは一塩基置換により+5.8 kb siteのエンハンサー活性が完全に消失した。以上から、例外のBm型においては、血球系特異的エンハンサーにおけるGATA結合サイトの一塩基置換がGATA転写因子の結合を阻害し、血球系細胞におけるB抗原量の低下をもたらしたと考えられた。以上より、+5.8 kb siteが赤血球系細胞においてエンハンサーとして機能している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

1. Sano R, Nakajima T, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Tsukada J, Takeshita H, Yasuda T, Ito K, Maruhashi T, Yokohama A, Isa K, Ogasawara K and Uchikawa M: Expression of ABO blood-group genes is dependent upon an erythroid cell-specific regulatory element that is deleted in persons with the B_m

- phenotype. *Blood*, 119: 5301-5310, 2012. (査読あり)
2. Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Fujihara J, Toga T, Ono R, Otsuka Y, Ueki M, Iida R, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Kato H and Takeshita H: Genetic and expression analysis of SNPs in the human deoxyribonuclease II: SNPs in the promoter region reduce its in vivo activity through decreased promoter activity. *Electrophoresis*, 33: 2852-2858, 2012. (査読あり)
 3. Soejima M, Fujimoto R, Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Takeshita H, Minh TB, Trang PT, Viet PH, Nakajima T, Yoshimoto J, Tanabe S and Koda Y: Genetic variation of FUT2 in a Vietnamese population: identification of two novel Se enzyme-inactivating mutations. *Transfusion*, 52: 1268-1275, 2012. (査読あり)
 4. Fujihara J, Takeshita H, Kimura-Kataoka K, Yuasa I, Iida R, Ueki M, Nagao M, Kominato Y and Yasuda T: Replication study of the association of SNPs in the LHX3-QSOX2 and IGF1 loci with adult height in the Japanese population; wide-ranging comparison of each SNP genotype distribution. *Leg Med*, 14: 205-208, 2012. (査読あり)
 5. Takeshita H, Fujihara J, Ueki M, Iida R, Koda Y, Soejima M, Yuasa I, Kato H, Nakajima T, Kominato Y and Yasuda T: Nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms of the human apoptosis-related endonuclease--DNA fragmentation factor beta polypeptide, endonuclease G, and Flap endonuclease-1--genes show a low degree of genetic heterogeneity. *DNA Cell Biol*, 31:36-42, 2012. (査読あり)
 6. Sano R, Hirasawa S, Kobayashi S, Shimada T, Awata S, Takei H, Otake H, Takahashi K, Takahashi Y and Kominato Y: Use of postmortem computed tomography to reveal an intraoral gunshot injuries in a charred body. *Legal Medicine*, 13(6): 286-288, 2011. (査読あり)
 7. Tsukada J, Kominato Y and Auron PE: The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*, 54(1): 6-19, 2011. (査読あり)
 8. Sano R, Nakajima T, Takahashi K, Kubo R, Yazawa S and Kominato Y: The 3' flanking region of the human ABO histo-blood group gene is involved in negative regulation of gene expression. *Legal Medicine*, 13(1): 22-29, 2011. (査読あり)
 9. Sano R, Takahashi K, Kominato Y, Araki T, Yamamoto K, Takei H, Otake H, Awata S, Akuzawa H, Tago Y and Aoki H: A case of fatal drug intoxication showing a high-density duodenal content by postmortem computed tomography. *Legal Medicine*, 13(1): 39-40, 2011. (査読あり)
 10. Tajima Y, Yamaguchi T, Takagi R, Nakajima T, Kominato Y. Comparison of methods of detecting bacterial biofilm. *Clin Lab*. 56: 143-147, 2010. (査読あり)
 11. Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Iida R, Yuasa I, Nakajima T, Kominato Y, Yasuda T. Genetic and expression analysis of all 7 non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease II gene, with potential relevance to autoimmunity. *Clin Chim Acta*. 411: 92-98, 2010. (査読あり)
 12. Ueki M, Fujihara J, Takeshita H, Kimura-Kataoka K, Iida R, Nakajima T, Kominato Y, Yuasa I and Yasuda T. Genetic and expression analysis of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease I-like 1 and 2 genes. *Electrophoresis*. 31: 2063-2069, 2010. (査読あり)
 13. Tasaki M, Nakajima T, Imai N, Nakagawa Y, Saito K, Takahashi K, Yazawa S. Detection of allogeneic blood group A and B enzyme activities in patients with ABO incompatible kidney transplantation. *Glycobiology*. 20: 1251-1258, 2010. (査読あり)

〔学会発表〕（計 14 件）

1. 佐野利恵, 高橋圭子, 中島たみ子, 小湊慶彦. 死後 CT 検査において十二指腸内に高吸収域が認められた薬物中毒死亡例. 第 95 次日本法医学学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2011; 65: p72, 福島.
2. 矢澤 伸, 田崎正行, 中島たみ子, 小湊慶彦, 高橋公太. ABO 式血液型不適合腎移植における AB 型抗原と AB 合成酵素. 第 95 次日本法医学学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2011; 65: p61, 福島.
3. 安田年博, 飯田礼子, 竹下治男, 小湊慶彦. 年齢依存性を示す新規なマウス転写抑制因子 Rhit の同定. 第 95 次日本法医学学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2011; 65:p62, 福島.
4. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋圭子, 窪理英子, 矢澤 伸, 小湊慶彦. The 3' flanking region of the human *ABO* gene is involved in negative regulation of gene expression. 第 95 次日本法医学学会学術全国集会. 日本法医学雑誌. 2011; 65: p97, 福島.
5. 飯田礼子, 安田年博, 植木美鈴, 竹下治男, 藤原純子, 木村かおり, 小湊慶彦, 中島たみ子, 佐野利恵. 自己免疫疾患に関与するヒト deoxyribonuclease I (DNase I) 遺伝子の分子論的基盤—全非同義置換型 SNP の集団調査および発現解析—. 日本 DNA 多型学会第 20 回学術集会. 抄録集. 2011; p34, 横浜.
6. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋圭子, 窪理英子, 矢澤 伸, 小湊慶彦. ABO 式血液型遺伝子 3' 領域は遺伝子発現の抑制に関与する. 日本 DNA 多型学会第 20 回学術集会. 抄録集. 2011; p81, 横浜.
7. 村上 徹, 多鹿友喜, 上野仁之, 小湊慶彦, 遠藤啓吾, 依藤 宏. 人体解剖と CT の統合による先駆的医学教育. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. Physiological Sciences. 2011; p S248. (誌上発表のみ)

8. 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦. 火災現場から発見された焼損死体で射創が見出された 4 例における死後 CT 画像の比較検討. 第 80 回日本法医学学会学術関東地方集会. 講演要旨集. 2011; p43, 宇都宮.
9. 中島たみ子, 佐野利恵, 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 小湊慶彦: サンドイッチ ELISA 法による血清 DNase I 蛋白質量の測定: 第 94 次日本法医学学会総会. 日本法医学雑誌. 2010; 64: p56, 東京.
10. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋圭子, 小湊慶彦: 群馬大学における Ai の実際. 第 94 次日本法医学学会総会. 日本法医学雑誌. 2010; 64: p79, 東京.
11. 藤原純子, 木村かおり, 竹下治男, 安田年博, 飯田礼子, 小湊慶彦, 佐野利恵, 中島たみ子: 哺乳類 DNase I における N-グリコシド型糖鎖解析. 第 94 次日本法医学学会総会. 日本法医学雑誌. 2010; 64: p93, 東京.
12. 佐野利恵, 高橋圭子, 小湊慶彦: 火災現場から発見された高度焼損死体で射創が見出された一例. 第 79 次日本法医学学会学術関東地方集会. 講演要旨集 p43, 2010, 東京.
13. 藤原純子, 木村かおり, 竹下治男, 中島たみ子, 小湊慶彦, 湯浅 勲, 飯田礼子, 植木美鈴, 安田年博: DNase II 遺伝子に座位する非同義置換型に SNP には不活性な酵素を産生する minor allele が分布する. 日本 DNA 多型学会 19 回学術集会. 抄録集. 2010; p77, 三島.
14. 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 植木美鈴, 神田芳郎, 飯田礼子, 中島たみ子, 小湊慶彦: 動物種特異的臓器分布から明らかにされた DNase I の分子進化. 日本 DNA 多型学会 19 回学術集会. 抄録集. 2010; p44, 三島.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小湊 慶彦 (KOMINATO YOSHIHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30205512

(2) 研究分担者

中島 たみ子 (NAKAJIMA TAMIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40008561
佐野 利恵 (SANO RIE)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70455955
浅尾 高行 (ASAO TAKAYUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40212469