

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460861

研究課題名(和文) ABO式血液型遺伝子のエンハンサーの同定に基づく統合的転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the transcriptional regulation based on identification of the ABO gene enhancer

研究代表者

中島 たみ子 (Nakajima, Tamiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40008561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ABO式血液型亜型のうち日本人に最も多いB<sub>m</sub>型では、血球系細胞特異的エンハンサー(+5.8-kb site)内に約5.8kbの欠失がある(B<sub>m</sub>5.8)事を既に報告したが、本研究ではB<sub>m</sub>型の原因がB遺伝子の転写低下であることを明らかにした。さらに、異なる欠失領域に基づく新たなB<sub>m</sub>遺伝子(B<sub>m</sub>3.0)を同定し、他の亜型のA<sub>m</sub>やA<sub>3</sub>型でも、この領域内のRUNX1, GATA-1 and GATA-2等の認識配列に欠失や塩基置換があることを発見した。また、通常のABO式血液型で+5.8kb siteに6種のハプロタイプを見出しABO遺伝子型と特異的なリンクを見出した。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have identified an erythroid cell-specific regulatory element (+5.8-kb site) in the first intron of the human ABO blood group gene. In this study, we have concluded that B<sub>m</sub> is caused by a reduction of B gene expression in bone marrow cells by in vitro erythroid culture of B<sub>m</sub>-derived CD34+ cells. A 5.8-kb or 3.0-kb deletion including the +5.8-kb site was observed B<sub>m</sub> and A<sub>m</sub> individuals. Moreover, RUNX1, GATA-1 and GATA-2 are bound to the site through their recognition motifs, deletion or mutation of which were involved in subgroups A<sub>m</sub>, B<sub>m</sub> and A<sub>3</sub>. Genetic studies of common ABO phenotype of Japanese have demonstrated six haplotypes of the +5.8-kb site consists of six SNPs. Each haplotype was mostly linked with specific ABO alleles with a few exceptions, possibly as a result of hybrid formation between common ABO alleles.

研究分野：法医学分野

キーワード：ABO遺伝子 転写因子 転写調節 エンハンサー 血液型亜型 遺伝子発現 ハプロタイプ

### 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、ABH 抗原生合成にかかわる糖転移酵素の cDNA の構造が明らかにされた。我々は、ABO 式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の現象を分子レベルで解明するために、ABO 式血液型遺伝子の発現制御機構の研究を進めてきた。これまで、ABO 式血液型遺伝子の上流域についての解析がなされ、プロモーターと上皮細胞におけるエンハンサーが同定された。近年、転写調節領域を示唆する DNase I hypersensitive site(DHS)やクロマチン修飾状況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た。最近我々は、赤白血病細胞 K562 を用いて、ABO 遺伝子の周辺約 54Kb について、DHS を基に検索を行い、第 1 イントロン内の +5.8-kb site に血球系特異的な転写活性化領域を見出した。更に、ABO 式血液型変異型 B<sub>m</sub> 型では、第 1 イントロン内で +5.8-kb site を含む約 5.8kb の塩基が欠損していることを発見し、+5.8-kb site が生体の血球系細胞において機能している事が推測された。

### 2. 研究の目的

ABO 式血液型は個人識別や輸血等でもっとも重要な血液型であり、その遺伝子構造は解明されたが、血液型抗原の発現が弱い変異型 B<sub>m</sub>、A<sub>m</sub>、B<sub>3</sub>、A<sub>3</sub> 等にはエキソン部分に変異の認められない型が存在することから、血液型の遺伝子診断は実用困難である。その一つの原因として、転写調節機構、特に転写活性化領域についての知見が欠けていることが指摘されてきた。最近我々は、血液細胞において、第 1 イントロン内にエンハンサー +5.8-kb

site を見出した。これらがどのようなメカニズムで働いているのかを転写因子の同定やシグナル伝達系を調べることにより、ABO 式血液型遺伝子の発現調節機構を統合的に解析することが、本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

本研究においては、分子生物学的、細胞生物学的手法を用いてエンハンサーに作用する転写因子やシグナル伝達機構を特定し、それらがどのように統合されて ABO 遺伝子の発現に至るかを調べる。

(1)血清学的に変異型や亜型と判定された血液からゲノム DNA を抽出し、エクソン 6、7 の塩基配列を調べ、ABO 遺伝子型を検査する。次にエンハンサー領域の +5.8kb site の塩基配列を調べる。また、日本赤十字血液センターや、他機関からの提供された A<sub>3</sub>、A<sub>e1</sub>、A<sub>x</sub>、B<sub>w</sub>、B<sub>x</sub> 等の変異型のゲノム DNA を用いて、同様に ABO と +5.8-kb site の塩基配列を調べる。更に、変異型特異的プライマーを設定し、変異型検出用の PCR-SSP 法を開発する。

(2)Peptide nucleic acid (PNA) -mediated PCR clamping 法を用いて、ABO アリル特異性を同定する。これらのデータをもとに、DNA から ABO 式血液型の変異型、亜型を遺伝子判定出来るよう工夫する。

(3)ルシフェラーゼベクターにプロモーター領域と目的領域を導入したプラスミドを複製し、これらを血球系細胞 K562 や上皮系細胞 KATOIII, MKN や繊維芽細胞等に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行って、プロモータ活性を測定することにより、転写活性の強さを測定した。

(4)ABO 遺伝子の発現に関与する転写因子の同定は、ゲルシフトアッセイや ChIP アッセイ等を用いて行った

(5)転写因子の同定に、転写因子発現阻害実験として、siRNA を用いたノックダウン、ドミナントネガティブ及びゲノム編集などを行った。更に、コトランスフェクションを行い、

強制発現実験を行うことによって、転写因子の関与を調べた。

(6) 培養細胞に試薬を用いた細胞刺激実験を行い、プロモーター活性の変化や RT-PCR 法で、ABO 遺伝子発現の変化を調べた。

#### 4. 研究成果

近年我々は、ABO 遺伝子第 1 イントロン内 5.8kb (+5.8kb site) に血球系特異的な転写活性化領域 (エンハンサー) を見出し、この領域には GATA 転写因子が関与している事を報告した。また、日本人に最も多い ABO 式血液型の亜型 B<sub>m</sub> 型では、領域内の約 5.8kb の塩基が欠損 (B<sup>m</sup>5.8 遺伝子) している事を発見し、通常の ABO 式血液型 1005 例にこの欠損は認められず、調べた B<sub>m</sub> 型及び AB<sub>m</sub> 型 112 例中 111 例に同じ欠損が認められ、この欠損は B<sup>m</sup> 遺伝子に特異的であることが推測された。

(1) 今回の研究で、欠損のない B<sub>m</sub> 型には、+5.8kb site 中の GATA 転写因子結合サイトに一塩基置換 (B<sup>m</sup>+5890T>G 遺伝子) が認められ、これによって +5.8kb site への GATA1、2 転写因子の結合が阻害され、転写活性が消失することが確認された。

(2) B<sub>m</sub> 型と同じ性状を持つ A<sub>m</sub> 型では、エンハンサー内の Runx1 結合配列を含む 23bp の欠損が認められ、Runx1 結合部位が欠損しているため、Runx1 が結合できず、転写活性が消失している事が、ゲルシフトアッセイ及びトランスフェクションによって確認された。また A<sub>3</sub> 型では、A アリルの +5.8-kb site 内に新規の 1 塩基置換 (5893G>A または 5909A>G) が、B<sub>3</sub> 型では B アリルのプロモーター内の転写因子 Sp1 認識配列近傍に新規の 1 塩基置 (-77C>G) がそれぞれ同定され、レポーターアッセイの結果から、これらの変異が ABO 遺伝子の転写活性を低下させている事が確認された。

(3) ABO 遺伝子の A や B アリルのみをそれぞれ特異的に増幅する Peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR clamping 法を開発した

事により、B<sub>m</sub> 型や A<sub>m</sub> 型の一塩基置換が、其々 B や A アリルに存在することが証明できた。また、この方法を用いて、通常のダイレクトシーケンス法では判定が不可能であった B (0.3%)、O (99.7%) のキメラ型の DNA から、B 遺伝子の型を判定することに成功した。

(4) B<sub>m</sub> 型を 500 例以上調べると、殆どが B<sub>m</sub> 型の +5.8kb 欠損 (B<sup>m</sup>5.8) であるが、新たに +5.8kb site 内に 3.0kb の欠損をもつ B<sub>m</sub> 型 1 例 (B<sup>m</sup>3.0) を同定し、家族で遺伝していることを確認した。B<sup>m</sup>5.8 と B<sup>m</sup>3.0 について ABO 遺伝子第 1 イントロンの全塩基配列を比較した結果、この 2 つの遺伝子は共通の欠損領域をもつ 1 つの遺伝子から生じたものでなく、独立した由来であると考えられた。

(5) B<sub>m</sub>、B、O 型の赤血球系前駆細胞 (CD34 陽性細胞) の分化培養実験の結果、ABO 遺伝子の発現はより未分化な細胞で最も強く、以後減少し、FUT1 遺伝子は分化に伴い強く発現している事が確認された。B<sub>m</sub> 型ではいずれの分化段階においても、アリル特異的 RT-PCR にて O 遺伝子は発現しているが、B 遺伝子の発現は認められず、細胞培養上清の B 合成酵素活性も検出出来なかったことから、B<sub>m</sub> 型の原因が B 遺伝子の転写低下であることを明らかにした。一方、FUT1 遺伝子は分化に伴い強く発現している事から、分化に伴い H 抗原の発現が増強するとともに、A/B 抗原の合成が進むと考えられた。また、B 型赤血球系前駆細胞を用いた ChIP assay で、+5.8-kb site に Runx1、GATA-1/2 が共に結合すること、GATA-1 は成熟に伴い発現が増強するが、GATA-2 と Runx1 は成熟に伴い発現が減少することを明らかにし、ABO 遺伝子の細胞分化に伴う発現は GATA-1/2 と Runx1 の増減によると考えられた。

(6) 通常の ABO 式血液型で、+5.8kb site には 6 箇所の SNPs が存在し、そのため 6 種のハプロタイプが見出された (ABOInt1\*01-06)。調べた 228 アリル中、218 アリルで、

*ABOInt1\*04* は A 遺伝子と、*ABOInt1\*06* は B 遺伝子と *ABOInt1\*01-03* 及び *ABOInt1\*05* は O 遺伝子とリンクしていると推測された。A および、B 遺伝子のアリル特異性は PNA-clamping PCR と、クローニングにより、直接証明された。例外のアリルも存在したが (8/226 アリル)、遺伝子組み換えにより生じたものと考えられた。

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 26 件)

1. Isa K, Yamamuro Y, Ogasawara K, Yabe R, Ogiyama Y, Ito S, Takahashi Y, Kominato Y, Sano R, Uchikawa M. Presence of nucleotide substitutions in the *ABO* promoter in individuals with phenotypes A<sub>3</sub> and B<sub>3</sub>. *Vox Sang*. 査読有 110.2016.285-287. doi: 10.1111/vox.12363
2. Nakajima T, Sano R, Takahashi Y, Watanabe K, Kubo R, Kobayashi M, Takahashi K, Takeshita H, Kominato Y. ABO alleles are linked with haplotypes of an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 with a few exceptions attributable to genetic recombination. *Vox Sang*. 査読有 11.2016.90-92. doi: 10.1111/vox.12312
3. Sano R, Kuboya E, Nakajima T, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Takeshita H, Yamao H, Kishida T, Isa K, Ogasawara K, Uchikawa M. A 3.0-kb deletion including an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 of the ABO blood group gene in an individual with the B<sub>m</sub> phenotype. *Vox Sang*. 査読有108. 2015.310-313. doi: 10.1111/vox.12216
4. Sano R, Nogawa M, Nakajima T, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Yokohama A, Tsukada J, Yamao H, Kishida T, Ogasawara K, Uchikawa M. Blood group B gene is barely expressed in in vitro erythroid culture of B<sub>m</sub>-derived CD34<sup>+</sup> cells without an erythroid cell-specific regulatory element. *Vox Sang*. 査読有 108.2015. 302-309. doi: 10.1111/vox.12220
5. Sano R, Takahashi Y, Nakajima T, Yoshii M, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Takeshita H, Yasuda T, Tsuneyama H, Uchikawa M, Isa K, Ogasawara K: ABO chimerism with a minor allele detected by the PNA-mediated PCR clamping method. *Blood Transfusion*. 査読有 12.2014. 431-434. doi: 10.2450/2014.0162-13
6. Takahashi Y, Isa K, Sano R, Nakajima T, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Michino J, Masuno A, Tsuneyama H, Ito S, Ogasawara K, Uchikawa M: Presence of nucleotide substitutions in transcriptional regulatory elements such as the erythroid cell-specific enhancer-like element and the *ABO* promoter in individuals with phenotypes A<sub>3</sub> and B<sub>3</sub>, respectively. *Vox Sang*. 査読有 107.2014.171-180. doi: 10.1111/vox.12136
7. Takahashi Y, Isa K, Sano R, Nakajima T, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Tsuneyama H, Ogasawara K, Uchikawa M: Deletion of the RUNX1 binding site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in two individuals with the A<sub>m</sub> phenotype. *Vox Sang*. 査読有 106.2014.167-175. doi: 10.1111/vox.12077
8. Nakajima T, Sano R, Takahashi Y, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Tsukada J, Takeshita H, Yasuda T, Uchikawa M, Isa K, Ogasawara K. Mutation of the GATA site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in a B<sub>m</sub> subgroup individual. *Transfusion*. 査読有

- 53.2013.2917-2927. doi: 10.1111/trf.12181
9. Ogasawara K, Isa K, Tsuneyama H, Saito M, Okazaki H, Satake M, Tadokoro K, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Maruhashi T, Yokohama A, Uchikawa M. MOLECULAR BASIS FOR JAPANESE INDIVIDUALS WITH Bm AND Am. Vox Sang. 査読有 105(s1).2013.44.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.2013.105.issue-s1/issuetoc>  
〔学会発表〕(計35件)
  1. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 小湊慶彦: Bm型では赤血球系細胞においてB遺伝子の発現が極めて低下している - CD34陽性細胞を用いた赤血球系細胞への分化培養実験 - . 日本DNA多型学会第24回学術集会. 2015.11.20 岡山.
  2. 中島たみ子, 佐野利恵, 高橋遥一郎, 窪理英子, 高橋圭子, 小林もも子, 渡邊華帆, 小湊慶彦, 竹下治男, 安田年博: ABO式血液型遺伝子エンハンサーハプロタイプの特異性. 日本DNA多型学会第24回学術集会. 2015.11.20 岡山.
  3. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 竹下治男, 安田年博, 岸田哲子, 小湊慶彦: Bm型では赤血球系細胞においてB遺伝子発現が極めて低下している-CD34陽性細胞を用いた分化培養実験-. 第99次日本法医学会学術全国集会. 2015.6.11 高知
  4. Takahashi Y, Sano R, Nakajima T, Takeshita H, Yasuda T, Kominato Y. Mutations were found in the transcription-regulatory elements such as the promoter and the erythroid cell-specific enhancer of ABO in individuals with phenotypes Am, A3 and B3. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 2014.6.17 Fukuoka.
  5. Sano R, Takahashi Y, Nakajima T, Yoshii M, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Takeshita H, Yasuda T. ABO chimerism with a minor allele detected by the PNA-mediated PCR clamping method. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 2014.6.17 Fukuoka.
  6. Sano R, Nogawa M, Nakajima T, Takahashi Y, Kominato Y, Yokohama A, Yamao H, Kishida T, Isa K, Ogasawara K, Uchikawa M. Blood group B gene is sharply reduced in the erythroid-lineage progenitor cells of a Bm individual with deletion of an erythroid cell-specific enhancer. 33rd International Congress of the International Society of Blood Transfusion. 2014.6.3 Seoul.
  7. Isa K, Ogasawara K, Ito S, Tsuneyama H, Yabe R, Takahashi Y, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Uchikawa M, Satake M and Tadokoro K. MUTATION OF THE TRANSCRIPTION REGULATION REGIONS IN THE ABO GENE ACCOUNTING FOR A3 AND B3 PHENOTYPES. 33rd International Congress of the International Society of Blood Transfusion. 2014.6.3 Seoul.
  8. 伊藤正一, 荻山佳子, 高橋美都保, 小原健良, 伊藤孝, 常山初江, 伊佐和美, 小笠原健一, 内川誠, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦. 赤血球系細胞特異的な転写制御領域に一塩基置換を認めたA3型. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 2014.5.15 奈良.
  9. 伊佐和美, 小笠原健一, 佐竹正博, 田所憲治, 伊藤正一, 常山初江, 矢部隆一, 内川誠, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦. ABOプロモーター領域に変異を認めたB3型 - ABO遺伝子全長PCR法による解析 -. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会. 2014.5.15 奈良.

10. 増田英敏, 常山初江, 伊佐和美, 小笠原健一, 矢部隆一, 内川誠, 南孝彦, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦. A 遺伝子イントロン 1 の転写制御領域に 23bp の欠失がみられた日本人 A<sub>m</sub> 型の 2 例. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会. 2014.5.15 奈良.
11. 須佐梢, 丸橋隆行, 西本奈津美, 堀越晃輔, 横手恵子, 春山千夏, 関上智美, 滝沢牧子, 小湊慶彦, 横濱章彦. 抗 B 抗体を保有しない A 型の例. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会. 2014.5.16 奈良.
12. 高橋遥一郎, 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦. ABO 遺伝子の転写調節領域の変異により血液型亜型 A<sub>m</sub> 型, A<sub>3</sub> 型, B<sub>3</sub> 型が生じる. 日本 DNA 多型学会第 23 回学術集会. 2014.11.27 名古屋.
13. 伊佐和美, 小笠原健一, 佐々木佳奈, 岡崎仁, 田所憲治, 國井七絵, 小野寺孝行, 斎藤昌子, 常山初江, 矢部隆一, 内川誠, 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦, 丸橋隆行, 横濱章彦. 日本人の B<sub>m</sub> 型に関する遺伝子の解析. 第 61 回日本輸血・細胞治療学会総会. 2013.5.17 横浜.
14. Ogasawara K, ISA K, Tsuneyama H, Saito M, Okazaki H, Satake M, Tadokoro K, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Maruhashi T, Yokohama A, Uchikawa M. MOLECULAR BASIS FOR JAPANESE INDIVIDUALS WITH B<sub>m</sub> AND A<sub>m</sub>. The 23rd Regional Congress of the ISBT. 2013.6.2-6.5 Amsterdam.
15. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 高橋圭子, 竹下治男, 安田年博, 小湊慶彦. ABO 式血液型遺伝子のエンハンサーの同定に基づく B<sub>m</sub> 型の遺伝子解析. 第 97 次日本法医学会学術全国集会. 2013.6.28 札幌.
16. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 小湊慶彦. ABO 式血液型遺伝子エンハンサー欠損が B<sub>m</sub> 型の原因である. 第 9 回麒麟塾(血液学若手研究者勉強会). 2013.7.13 東京.
17. 佐野利恵. ABO 式血液型の転写調節機構の解明と血液型亜型の解析. 第 60 回北関東医学会総会. 2013.9.27 前橋.
18. 高橋遥一郎, 中島たみ子, 佐野利恵, 高橋圭子, 小湊慶彦. 死後 CT 検査が創洞内の凶器破片の検索・回収に有用であった一例. 第 82 回日本法医学会学術関東地方集会. 2013.10.19 横浜.
19. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 高橋圭子, 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 小湊慶彦, 岸田哲子. ABO 遺伝子血球系特異的エンハンサー内 GATA の一塩基置換が B 抗原量の低下をもたらした B<sub>m</sub> 型一症例. 日本 DNA 多型学会第 22 回学術集会. 2013.11.21 仙台.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中島 たみ子 (NAKAJIMA, Tamiko)  
群馬大学・大学院医学系研究科・研究員  
研究者番号：4 0 0 0 8 5 6 1

### (2)研究分担者

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：3 0 2 0 5 5 1 2

### (2)研究分担者

佐野 利恵 (SANO, Rie)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：7 0 4 5 5 9 5 5