

## 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24年5月11日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590750

研究課題名（和文） ルイス式血液型合成に関与するFUT2とFUT3の多型  
および相関解析研究課題名（英文） Analysis of polymorphisms and association study of FUT2 and FUT3,  
regulating synthesis of Lewis blood group antigens.

研究代表者

副島 美貴子 (SOEJIMA MIKIKO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：80279140

研究成果の概要（和文）：糖転移酵素遺伝子 FUT2 と FUT3 は ABO 式及びルイス式血液型抗原の合成を制御している。これらは集団に特徴的なものを含む多型に富み、さまざまな生体内作用や疾患感受性に関与していることが示されつつある。当該研究では、こうした研究を推進するための多数検体解析を目的とし、一塩基多型のみならず遺伝子コピー数多型を検出する新規解析法を開発し新たな遺伝子多型を見出した。さらに培養細胞を用いた転写調節領域の解析と生活習慣病との相関解析を実施した。

研究成果の概要（英文）：The FUT2 and FUT3 regulate the synthesis of the ABO and Lewis blood group antigens. Recent studies have shown these genes were rich in polymorphisms with population-specific manner. We developed new methods to determine not only SNPs but copy number variations of the FUT2 to promote such studies. In addition, we performed analysis of the transcriptional region of the FUT2 and association study of polymorphisms and lifestyle-related diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：糖転移酵素、糖鎖、血液型、遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

近年、糖鎖構造は様々な生体内作用に関与することを示すデータが報告されており、血液型は血球、呼吸器、消化管粘膜に存在し、病原体あるいはそれに関連した生命現象への感受性の個人差の原因になりうる。ABO 式或いはルイス式血液型抗原の合成に関与する FUT2 と FUT3 は多型性に富むことが分かっている。さらに FUT2 には構造上組換え体が生

じやすく、我々は現在までに幾つかの組換え体アレルを報告している。一方で、近年遺伝子多型解析法の開発が進み、短時間で多検体を処理できる簡便で正確な多型解析が可能になった。また、FUT3 については、転写制御領域についてエピジェネティックな解析が行われているものの、FUT2 についてはなされていない。我々はこうした背景から、新規組換え体の探索を含む新たな多型解析法の開

発と、転写制御領域の解析、ならびに相関解析を実施したいと考えた。

## 2. 研究の目的

ABO、ルイス式血液型抗原の合成に関与する糖転移酵素遺伝子 FUT2 と FUT3 について、多型の成り立ちと転写調節機構を解明し、さらに多量解析を目的とした多型検出法の開発と疾患との相関解析をおこない、フコース転移酵素とその合成産物の生体内での機能について理解を深めることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) TaqMan 法を用いた FUT2 のコピー数多型 (Copy Number Variation, CNV) 検査法の確立と新規アレルの同定

#### ①試料

検査法を確立するための鋳型には FUT2 の遺伝子型が既に分かっている DNA サンプルを使用した。またスクリーニング用の鋳型には従来法で  $se^{fus}$ ,  $se^{del1}$ ,  $se^{del12}$  が検出されなかった中国 (瀋陽) 人の DNA91 サンプルを使用した。なお、本研究計画は久留米大学倫理委員会の承認を得ておこなった。

#### ②real-time PCR

FUT2 のプロモーター領域 (FUT2prom)、タンパクコード領域の約 100 bp 上流 (FUT2\_5')、コントロール領域としてアルブミン遺伝子 (Alb) にそれぞれプライマーとプローブをデザインしリアルタイム PCR 反応をおこなった。

#### ③FUT2 CNV 型の判定

従来法で CNV が検出されなかったサンプル群の、FUT2prom、FUT2\_5' とコントロール領域である Alb の閾値に達するまでに要するサイクル数の差の平均値 ( $\Delta Ct^{average}$ ) から、各サンプルの  $\Delta Ct^{sample}$  を減じ  $\Delta \Delta Ct$  とした。FUT2prom、FUT2\_5' の Alb に対する相対的コピー数は  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  により算出し遺伝子型を決定した。

#### ④新規欠失アレル同定のための PCR 増幅と DNA シークエンス解析

新たに検出された欠失アレル ( $se^{del13}$  と命名した) を同定するためにプライマー数セットを作成し、PCR 反応と DNA シークエンス解析をおこなった。

#### ⑤ 新規欠失アレル $se^{del13}$ のスクリーニング

$se^{del13}$  のスクリーニングプライマーを合成し、PCR 反応をおこない、産物をアガロースゲル電気泳動に供し増幅を確認した。

### (2) FUT2, FUT3 多型とモンゴル人集団における生活習慣病の関連解析

#### ①試料

モンゴル人集団 946 サンプルについて、採血、各種測定、検査を実施した。本研究計画は、モンゴル科学大学、自治医科大学、久留米大学各大学の倫理委員会の承認を得た上

で実施した。

#### ②多型解析

モンゴル集団の FUT2、FUT3 の主要な不活性化責任 SNPs を TaqMan 法により判定した。FUT2 の 385A>T ならびに 216C>T の解析には TaqMan predesigned SNP genotyping assay を用いた。FUT3 の 58T>G、202T>C の解析は、Bioserch technologies 社にデザインと合成を依頼した TaqMan probe と primer を用いておこなった。

#### ③統計解析

有意差検定には、Fisher's exact test を用いた。

### (3) FUT2 の発現調節機構の解析

#### ①発現解析

ヒト腫瘍細胞 COLO201, HT29, MCAS, WiDr, HEL, HeLa 細胞から抽出した total RNA から cDNA を合成し、FUT2 とコントロール領域として GAPDH を選び、それぞれの TaqMan Gene Expression Assays を用いて比較定量法により発現解析をおこなった。

#### ②メチル化解析

上述の細胞からゲノム DNA を抽出し、Bisulfite 変換をおこなった。塩基の変化を考慮しデザインしたプライマーセットにより、転写開始点から 294 bp 上流から 33 bp 下流までを増幅した。増幅産物をベクターに組み込み、得られたクローン各 12~16 個についてシーケンス解析をおこない 8 つの CpG サイトのメチル化の程度を調べた。

### (4) ベトナム人集団における FUT2 の多様性と High-resolution melting (HRM) 法による多型解析法の開発

#### ①試料

ベトナム人 DNA294 サンプルを使用した。研究計画は、愛媛大学ならびに久留米大学倫理委員会の承認を得ておこなった。

#### ②蛋白コード領域の多型解析

94 サンプルについて蛋白コード領域を増幅し、シーケンス解析をおこなった。主な不活性化アレルである 385A>T は前述と同じ方法で解析した。

#### ③HRM 解析

新たに見出された低頻度の多型を検出する方法として FUT2 のタンパクコード領域の、545~687 bp 及び 778~893 bp を増幅するプライマーセットを作成し HRM 解析をおこなった。

#### ④ハプロタイプ解析

新たに見出された多型のハプロタイプは PCR クローニングにより決定した。

#### ⑤FUT2 アレルの一過性発現

新規多型を含むアレルを真核細胞発現ベクターに組み込み、COS-7 細胞に導入した。2 日後に細胞を回収し、細胞表面の H type 1

の発現を免疫染色し、フローサイトメーターで調べた。導入効率は、同時に導入し発現させたルシフェラーゼの活性で確認した。

⑥ソフトウェアによる SNPs の酵素活性に与える影響の予測

新たに見出されたアミノ酸置換の影響を、PolyPhen-2 ならびに SIFT を用い推定した。

(5) SEC1 との duplex PCR によるハイブリッドアリのスクリーニング

#### ①試料

これまでに FUT2 の遺伝子型判定を行っている既存試料を用いた。

#### ②duplex PCR の条件検討

FUT2 の組換え体に共通の領域と SEC1 の両方を増やすプライマーセット、両者を区別するそれぞれに特異的なプローブをデザインした。

#### ③組換え体の同定

se<sup>fus</sup> 同定用の PCR をおこない、さらに FUT2、SEC1 のコード領域を増幅し、シーケンス解析をおこなった。ハプロタイプを決定するために、プラスミドに組み込んで得られたクローンについてシーケンス解析をおこなった。

### 4. 研究成果

(1) TaqMan 法を用いた FUT2 の Copy Number Variation (CNV) 検査法の確立と新規アリの同定

①既に FUT2 の表現型と遺伝子型の分かっている日本人 50 サンプル、バングラディッシュ人 50 サンプル、サモア人 24 サンプル合計 124 サンプルのゲノム DNA について解析をおこない、Alb に対する FUT2<sub>prom</sub> および FUT2<sub>5'</sub> の相対的コピー数を推定した。なお実験は 4 回繰り返しおこなった。その結果、表 1 に示すように、3 種の CNV (se<sup>fus</sup>, se<sup>del1</sup>, se<sup>del12</sup>) のヘテロ接合体の FUT2<sub>5'</sub> は全例で 0.45-0.50 となり、se<sup>fus</sup> のヘテロ接合体では FUT2<sub>prom</sub> の相対的コピー数も 0.45-0.52 となった。また se<sup>del1</sup>, se<sup>del12</sup> のヘテロ接合体では FUT2<sub>5'</sub> の FUT2<sub>prom</sub> に対する相対コピー数が

0.47-0.56 であった。なお、今回は、領域のコピー数のみを解析しているため Se (分泌型アリ) には nondeleted se (遺伝子組換えタイプ以外の非分泌型アリ)、すなわち SNPs や数 bp の欠失の多型を原因変異とする不活性型アリも含まれている。

定量 Real time PCR により推定した遺伝子型の結果は、従来法の PCR 解析により得られた結果と完全に一致した。これらの結果から本法を用い FUT2 の相対的コピー数の推定により CNV の有無の判別が可能なが示唆された。

表 1 さまざまな遺伝子型のサンプルを用いた比較 Ct 法による FUT2 の 2 領域の CNV 解析結果

遺伝子型	サンプル数	PROM/ALB	5' / ALB	5' / PROM
		平均値 ± SD	平均値 ± SD	平均値 ± SD
se <sup>del12</sup> /se <sup>del12</sup>	1	0.93	0	0
Se/se <sup>del1</sup> Se/se <sup>del12</sup>	12	0.97 ± 0.06	0.48 ± 0.02	0.51 ± 0.03
Se/se <sup>fus</sup>	9	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.01	1.00 ± 0.03
Se/Se	102	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.04	1.02 ± 0.05

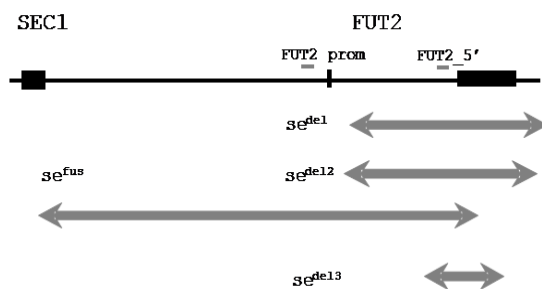
#### ②Triplex PCR による FUT2 の CNV の検出

従来法で se<sup>fus</sup>, se<sup>del1</sup>, se<sup>del12</sup> が検出されていない中国 (瀋陽) 人の DNA91 サンプルについて比較 Ct 法による FUT2 の CNV 検査法を実施したところ、se<sup>del1</sup> あるいは se<sup>del12</sup> のヘテロ接合体と同様の結果を示す、つまり FUT2<sub>5'</sub> シグナルが Alb のシグナルの半分になっているサンプルを 1 つ認めた。4 回の解析で、このサンプルの Prom/ALB 比は 1.02 ± 0.01、FUT2<sub>5'</sub> /ALB 比は 0.51 ± 0.02 であった。なお、他の 90 サンプルの平均値は Prom/ALB 比が 0.70 から 1.17 で、FUT2<sub>5'</sub> /ALB 比は 0.77 から 1.17 であった。同サンプルについては、以前の解析では 3 つの組換え体アリを検出しなかったため、遺伝子型を se<sup>357,385</sup>/se<sup>357,385</sup> と判定していた。このサンプルに見出された新規欠失アリは、プロモーター領域は存在していることから se<sup>fus</sup> タイプではなく se<sup>del1</sup> や se<sup>del12</sup> タイプであるものと予想され、se<sup>del13</sup> と命名した。

#### ③se<sup>del13</sup> の接合領域の同定

幾つかのプライマーセットを用いた PCR 増幅とシーケンス解析により、新規アリの欠失は、FUT2 のイントロン 1817 bp とエクソン 2 の 2136 bp (エクソン 2 の全長は 2984 bp) からなる 3953 bp の領域であることが分った (図 1)。また、5' と 3' の両欠失点は Alu 配列内にあることから、この欠失は Alu 間相同組換えによって生じたものであることが示唆された。

図 1 FUT2、SEC1 の構造、se<sup>del13</sup> を始めとする組換え体アリの欠失領域



#### ④ $se^{del13}$ のスクリーニング

接合領域を挟むプライマーセットを用い  $se^{del13}$  のスクリーニングをおこなった。 $se^{del13}$  を同定したサンプルには予想される 589 bp の産物が検出されたが、他の 90 サンプルには検出されず頻度の低いアリルであるものと考えられた。

今回見出された  $se^{del13}$  を含め、これまでに報告された FUT2 の組換え体アリルはゲノム領域の減少を伴うものであるが、本法を用いれば、従来法の PCR では検出不可能であったコピー数の増加も検出可能である。FUT2 の構造を考慮すると、さらに他の組換え体アリルが存在する可能性があり、FUT2 は遺伝的多様性を生み出す原動力である遺伝子組換えを理解するために適したモデル遺伝子であるということが出来る。また、スリランカのタミル人集団では、 $se^{del1}$  が 28.5% と無視できない頻度であり、集団遺伝学的な解析を行う上で、本法は有用であるものと考えられる。

#### (2)FUT2, FUT3 多型とモンゴル人集団における生活習慣病の関連解析

モンゴル人集団の主な FUT2, FUT3 の不活性化多型 (あるいはそれとリンクした多型)、遺伝子型から推定されるルイス式血液型、分泌型と、2 型糖尿病の罹患率、その他体脂肪率、血圧、コレステロール値、血糖値等の生化学的検査結果の間には有意な関連を認めなかった。一方、これらの多型は他の集団では関連が認められており、より多検体、多集団での検討に加え、関連解析の対象となる疾患、検査値の再考の余地があるものと考えられる。

#### (3)FUT2 の発現調節機構の解析

培養腫瘍細胞の FUT2 mRNA の発現のレベルと Bisulfate 変換によって検出した CpG site のメチル化レベルの関係を検討した結果、発現が高い細胞株ではプロモーター領域のうち、転写開始点に近位の CpG サイトがメチル化されていないことがわかった。この結果から、FUT2 の発現にプロモーター領域のメチル化が関係している可能性が示唆された。今後、メチル化の人為的な制御や、メチル化による転写因子の動向、あるいは、がん関連抗原との関連を調べることにより、さらに理解を深めたいと考えている。

#### (4)ベトナム人集団における FUT2 の多様性と High-resolution melting (HRM) 法による多型解析法の開発

##### ①ベトナム人集団における FUT2 の多様性

94 サンプルのシーケンス解析により、2 つのアミノ酸の変化を伴う SNPs (818C>A, 853G>A) を見出し、ハプロタイプ解析の結果、818C>A は  $Se^{357}$  アリル上に、853G>A は野生型

アリルに存在することが分かった。

##### ②多型解析における HRM 解析の有用性

今回設定したプライマーセットと反応条件では、 $se^{853}/Se$ 、 $se^{357,385}/se^{849}$  (図 2、領域 2、グループ A)、 $se^{357,818}/se^{357}$  (グループ B)、reference の 3 つのグループにグループ分けが可能であったが、853G>A と 849G>A の 2 つを区別することはできなかった。この解析により、200 のベトナム人サンプルの中にグループ A に分類されるものが 2 つあったので、シーケンス解析をおこなったところ、いずれも  $se^{849}$  のヘテロ接合であり、628C>T も見出された (図 2、領域 1)。そこで、この多型を検出可能なプライマーセットを用い HRM 解析をおこなったところ、628C>T を検出することが可能であった。このことから、特に頻度の低い SNPs のスクリーニングを目的とした HRM 解析は有用であるものと考えられる。

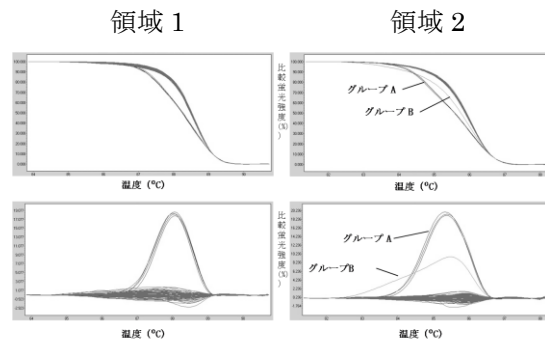


図 2 FUT2 の 2 領域 (545~687 bp、778~893 bp) の HRM 解析による多型検出

##### ③新規 SNPs の機能解析

コンストラクトを導入した細胞の H type I の発現の検出系により 818C>A, 853G>A の産物の酵素活性への影響を調べた結果、いずれのアリルもベクターのみを導入したものと同レベルの発現を呈するのみであり、両塩基置換が産物である酵素の活性に大きく影響することが示唆された。これらの結果は、2 つのソフトウェアを用い置換の影響を *in silico* で予想した結果と矛盾がなかった。

ベトナム人の FUT2 の遺伝的多様性は、地理的に近隣の集団に類似しており、これまで示唆されていた FUT2 の帰属集団マーカーとしての有用性を更に裏付けるものとなった。一方、HRM 解析は多検体が対象の場合の変異スクリーニング法として、FUT2 のような GC 含量の高い遺伝子座においても有用であることがわかった。

##### (5) SEC1 との duplex PCR によるハイブリッドアリルのスクリーニング

##### ①duplex PCR 法の確立とスクリーニング

デザインした duplex PCR により、 $se^{fus}$  を

含む既知の遺伝子型を正確に判定することが可能であった。そこで、これまでに解析をおこなった既存試料を対象にスクリーニングをおこなった結果、南アフリカ在住のヨーロッパ人を祖先とする1サンプルのヘテロ接合を認めた。

## ②組換え体の同定

Se<sup>FUS</sup>同定用のPCRを行った結果、同サンプルは、以前モンゴル人サンプルに同定されたSEC1-FUT2-SEC1と同様であったため、FUT2、SEC1を増幅し、シーケンス解析をおこなった。FUT2の遺伝子型はSe<sup>357</sup>/se<sup>428</sup>であり、SEC1の中央部にヘテロ接合領域を認めた。ハプロタイプを決定するために、プラスミドに組み込み配列を決定した結果、その領域はFUT2に置き換わるSEC1-FUT2-SEC1と同様のハイブリッドであるが、その領域は短く別のアリルであった(図3)。

	4	444	44	4	4	4
SEC1	1	333	44	4	4	5
組換え体	7	678	01	6	8	3
FUT2		<b>G-----CGC-GT-----A-C-----G</b>				
		<b>G-----GAG-AC-----G-T-----G</b>				
		<b>A-----GAG-AC-----G-T-----C</b>				
	3	333	33	4	4	4
	7	999	99	0	0	1
	5	456	89	4	6	1

図3 新たに見出されたSEC1-FUT2-SEC1ハイブリッドと、SEC1、FUT2の配列の比較

本アリルの頻度は低いものの、こうしたアリルによりFUT2の遺伝子型を誤判定する可能性があり、今回開発した方法を導入すれば、その危険を軽減することができる。なお、FUT2はその遺伝子構造から、PCRによる組換え体を生じやすい、つまり、本来組換え体が存在しないサンプルに再現性に乏しい増幅産物が検出されることがある。本法はサイクル数を50サイクルに増やしてもこうした現象を経験せず、信頼性の高い方法である。さらに、新たなハイブリッドアリルを同定したことにより、この領域が組換えを起こしやすいホットスポット領域であるというエビデンスが蓄積する結果となり、またその領域の範囲を狭めることになった。

## 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25件)

- ① Soejima M, Fujimoto R, Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Takeshita H, Minh TB, Trang PT, Viet PH, Nakajima T, Yoshimoto J, Tanabe S, Koda Y. Genetic variation of FUT2 in a Vietnamese

population: identification of two novel Se enzyme-inactivating mutations. Transfusion. 2011 Dec 21. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03485.x. [Epub ahead of print] 査読有

- ② Soejima M, Koda Y. TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for detection of FUT2 copy number variations: identification of novel Alu-mediated deletion. Transfusion. 2011 Apr;51(4):762-769. 査読有

[学会発表] (計22件)

- ① 副島美貴子, 神田芳郎. TaqMan法を用いたFUT2 CNV検査法を用いた新規Alu mediated deletionの同定. 日本DNA多型学会第19回学術集会抄録集, 2010, p40, 三島.
- ② 副島美貴子, 神田芳郎. TaqMan法を用いたFUT2のCopy Number Variation (CNV)検査法の確立. 日本DNA多型学会第18回学術集会抄録集, 2009, p82, 久留米.

[図書] (計3件)

- ① 副島美貴子, 神田芳郎: TaqMan法を用いたFUT2 CNV検査法を用いた新規Alu mediated deletionの同定. DNA多型(日本DNA多型学会編). 2011; 19, 148-150.
- ② 副島美貴子, 神田芳郎: TaqMan法を用いたFUT2のCopy Number Variation (CNV)検査法の確立. DNA多型(日本DNA多型学会編), 2010; 18: 223-226.

[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  
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/foren>

/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

副島 美貴子 (SOEJIMA MIKIKO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：80279140

(2) 研究分担者

神田 芳郎 (KODA YOSHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90231307