

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16249

研究課題名(和文) 血液型D抗原の相互作用分子との分子間ネットワークとスプライシング機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the intermolecular network and splicing mechanism between blood group D antigen and interacting molecules

研究代表者

三島 由祐子 (Mishima, Yuko)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：90815771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：RhDの各アイソフォーム(RhD DEL7, DEL9, DEL79, DEL89, DEL789)、RhDとRhCEのハイブリッドアリル(3-9CE)、正常RhCEの強制発現系と、相互作用が想定されるRhAD, ankyrin, protein 42, spectrin, band3の強制発現系を、様々な組み合わせで反応させ免疫沈降を行った結果、band3のみRhDとの結合が確認された。しかし、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た。しかし、band3とRhDのスプライシングバリエーションの結合能に差を認めなかった。この結果は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いことと一致しており、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)：RhD isoform (RhD DEL7, DEL9, DEL79, DEL89, DEL789), 3-9CE hybrid allele, and normal RhCE forced expression models, as well as forced expression protein of RhAD, ankyrin, protein 42, spectrin, and band3, which are expected to interact with RhD were reacted in various combinations and subjected to immunoprecipitation. The band3 was 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. This is consistent with the results showing no difference in the expression levels among the full-length RhD protein and splicing variants that lacking exons 7-9 in various patterns.

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わっている。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 末端が短縮・変異した RhD 蛋白のみ産生されている。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ため、スプライシング異常により C 末端が変化すると RhD 蛋白は赤血球膜上に安定して発現できず、抗原性が著しく減弱することが推測される。実際に造血幹細胞を赤芽球に分化させたさいの選択的スプライシングの変化を遺伝子横断的に調べた研究では mRNA のスプライシングパターンに変化が起きることが報告されている。未分化な造血幹細胞が赤血球に分化する過程で選択的スプライシングが、すべてのエクソンを含む全長 mRNA 優位にシフトすることで、D 抗原が相互作用分子とともに提示、結果的に赤血球特異的な発現を認めるものと考えられる。ところが、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が ESE (exonic splicing enhancer) 配列の消失による可能性が研究代表者により示された以降、具体的なスプライシング制御機構に関する報告はなく、RHD の選択的スプライシングの具体的な制御機構はほぼ未解明である。

## 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、RhD を中心とした分子間ネットワークを明らかにすることを目的とした。さらには血液型抗原の発現制御のみならず、血球分化や赤血球の形態維持にかかわる有用な基礎的知見を得ることが期待される。本研究はスプライシング制御や相互作用分子に関する情報を分子生物学的アプローチを駆使して取り組むべく立案した。

## 3. 研究の方法

### (1) 相互作用分子の機能解析 (既知分子)

RhD の既知の相互作用分子、候補分子について蛋白・蛋白間相互作用が具体的にどの蛋白間で起きているのか検討した。まず RhD の各アイソフォーム (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 を組み込んだ N 末端 GFP, Myc, Flag-tag 付の強制発現ベクターを作成、これと相互作用分子 RhAG の全長・各機能ドメインの強制発現ベクターを 293 細胞に同時導入した。抗 HA 抗体、抗 Myc 抗体を用いた免疫沈降で RhD 蛋白と直接相互作用するか確認した。

## (2) 相互作用分子の機能解析 (候補分子)

RhDの各アイソフォーム、RhDとRhCEのハイブリッドアリル、正常RhCEを組み込んだN末端GFP, Myc, Flag-tag付の強制発現ベクターと、相互作用分子の全長・各機能ドメイン(ankyrin, protein 42, spectrin, spectrin, band3)の強制発現ベクターを293細胞に同時導入した。抗HA抗体、抗Myc抗体を用いた免疫沈降でRhD蛋白と直接相互作用するキー分子を絞り込んだ。ついでこのキー分子をもとに具体的にどのような分子間ネットワークが構成されているか、同様に免疫沈降法やツーハイブリッドアッセイによる検討をおこなって順次解明した。

## 4. 研究成果

### (1) 相互作用分子の機能解析 (既知分子)

初めに RhAG との強制発現系を用いて免疫沈降し RhD の発現を確認したところ RhD 蛋白の発現減弱は見られず、直接相互作用するキー分子であるとはいえないことがわかった。

### (2) 相互作用分子の機能解析 (候補分子)

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 でうまくワークした。Spectrin は 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用いた。これらの強制発現系で免疫沈降して RhD の発現を確認すると、Band3 でのみ RhD 蛋白との特異的な共沈を認めた。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、その局在を確認するため、膜蛋白と細胞質蛋白をそれぞれ抽出し、免疫沈降したところ、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わかった。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、band3 と RhD のスプライシングバリエーションの結合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してい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
---------	---------