

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860486

研究課題名(和文) ABO式血液型遺伝子の発現制御に関わる転写ファクトリーの解明

研究課題名(英文) Elucidation of transcription factory that is associated with the transcriptional regulation of the ABO gene.

研究代表者

高橋 遥一郎 (TAKAHASHI, Yoichiro)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50640538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：1) 血液型亜型の一つであるAm型の原因となる遺伝子変異を特定し、転写因子RUNX1の関与を同定した。2) 他の血液型亜型であるA3型やB3型の原因となる遺伝子変異を特定した。3) ABO遺伝子のエンハンサー候補領域を同定した。4) ABO遺伝子がエピジェネティックな発現調節によって制御されていることが判明し、薬物による刺激でABO式血液型抗原量が変動する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1) We identified novel genetic mutation responsible for the blood group subtype Am, and clarified association of transcriptional factor RUNX1. 2) We identified novel genetic mutations responsible for the blood group subtype A3 or B3. 3) We identified candidate regions that possess potential enhancer activity for the ABO expression. 4) It was clarified that the transcription of the ABO gene is regulated by epigenetic mechanism, and some reagent could alter the expression level of ABO.

研究分野：法医学

キーワード：ABO 血液型 血液型亜型 転写調節

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て以降、抗原構造の解析、糖転移酵素の cDNA の構造の解明、プロモーターの同定、がん細胞での抗原欠落の原因解明などがなされてきた。

近年、エンコードプロジェクトによって、転写調節領域を示唆する領域 (DNase hyper sensitive 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るようになった。これを応用し、申請者らの研究室は、第 1 イントロンでエキソン 1 の下流 5.8kb(+5.8-kb site) に転写活性化領域を見出し、さらに +5.8-kb site は組織特異的転写因子により赤血球系細胞特異的に働くことを発見した (Sano R, et al. Blood, 2012)。またこの他に、細胞特異的、または非特異的に働くエンハンサー候補領域を複数同定した。

エンコードプロジェクトによって、あるエンハンサー候補領域は ABO 遺伝子のプロモーター部位を初めとして周辺の様々な遺伝子 (SURF6, MED22, RPL7A, SURF4 等) と会合・近接していることが示唆され、転写ファクトリーを形成していると推測された。ABO 遺伝子の発現機序を詳細に解明するために、周辺の様々な遺伝子の協調的転写に関わる転写ファクトリーのメカニズムの解明が必要となっている。

2. 研究の目的

(1) ABO 遺伝子の発現機序を解明する。より具体的には、エンハンサー候補領域の機能解析や、遺伝子編集技術、薬剤刺激による分化誘導等を通じて、ABO 遺伝子の転写調節について詳細な評価を行う。その過程において、ABO 遺伝子が近傍遺伝子と協調的に転写される機序を推測する。血球系細胞だけでなく、上皮系細胞における転写調節機序についても解明を試みる。

(2) これらの研究によって得られる知見を基に、亜型を含む血液型の正確な遺伝子診断法を確立する。これは、亜型の原因となる遺伝子変異を特定することにより達成される。

3. 研究の方法

エンコードプロジェクトの結果より推測されるエンハンサー候補領域に関して、赤白血病細胞を対象として、次に記す方法によりエンハンサー活性を調べる。また、働く転写因子やシグナルを同定し、ABO 遺伝子に特異的な転写メカニズムを特定する。同様の方法により、上皮系細胞における転写調節機序も解明する。血液型亜型における遺伝子変異と転写活性の関連を明らかにすることにより、血液型亜型の遺伝子診断法が確立される。

(1) エンハンサー候補領域の検索

公的に得られる DHS データベース等を基に

してエンハンサー候補領域を推定する。

推定された領域に関して、レポータープラスミドを作製し、プロモーターアッセイによりエンハンサー活性を調べる。

ゲルシフトアッセイや ChIP アッセイにより関与する転写因子の同定を行う。

転写因子が同定された場合には、必要に応じて、siRNA によるノックダウン実験、ドミナントネガティブ実験、強制発現実験等による確認作業を行う。

(2) Am, A3, Ael, Ax, Bw, Bx 等の血液型亜型における、転写調節領域の変異検索

日本赤十字血液センターにおいて亜型の診断がなされている血液サンプルから、同意の元で、ゲノム DNA を入手する。

ABO 遺伝子の全エキソン、プロモーター領域及びエンハンサー候補領域における遺伝子変異の検索を行う。変異が特定された場合には、赤白血病細胞を用いたレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、ChIP アッセイ等により、変異が与える影響や関与する転写因子の同定を行う。

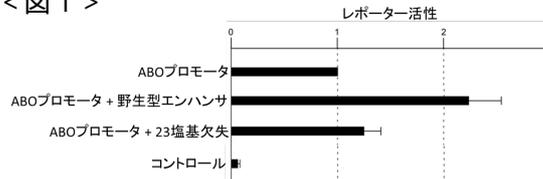
4. 研究成果

(1) レポーターアッセイにより、エンハンサー候補領域として +36.0-kb site を同定した。この領域はエンハンサー活性と共にプロモーター活性も持つことが示された。さらに、新規のゲノム編集法である CRISPR/Cas9 法により +36.0-kb site の欠損した細胞を作製し、ABO 遺伝子の発現量を測定したところ、+36.0-kb site は血球分化に伴って活性が変化することが示唆された。+36.0-kb site は転写ファクトリーまたは topology associating domain (TAD) の形成に関与することが考えられ、今後も詳細な検討を継続する予定である。なお、+36.0-kb site の働きとは別に、ABO 遺伝子の発現量はヒストン脱アセチル化酵素の刺激により減弱することが明らかとなった。この現象に、転写調節領域や転写因子が関与するか否か、またこの現象が輸血・移植医療に応用できるか否かは興味深いところであり、現在研究を継続して行っている。

(2) 血液型亜型の一つである Am 型において、その原因となる遺伝子変異を発見し、転写因子 RUNX1 の関与を証明した。即ち、Am 型 2 名のゲノム DNA から、peptide nucleic acid-mediated PCR clamping を用いたサイクルシーケンス法でアリル特異的に ABO 遺伝子の全エキソンと +5.8-kb site 及びプロモーターの塩基配列を決定したところ、A アリルの +5.8-kb site 内に新規の 23 塩基欠失 (g.5892_5914del) が同定され、プロモーターアッセイでは野生型に比べエンハンサー活性を約 70% 減弱した (図 1)。さらに、ゲルシフトアッセイにより、この欠失領域に転写因子 RUNX1 が結合することを示した。従って、Am 型ではエンハンサー内の RUNX1 結合配列の欠失による転写活性の低下が A 抗原量低

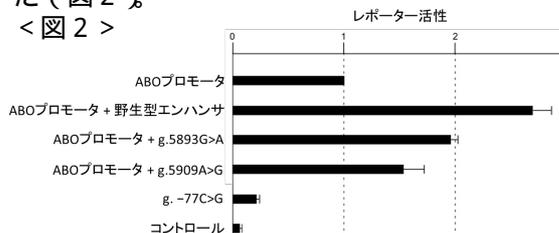
下の原因であることが示された。

< 図 1 >



(3) A3型7名, B3型またはAB3型12名のゲノムDNAから、上記のAmの場合と同様の方法でアレル特異的にABO遺伝子の全エキソン、+5.8-kb site、プロモーターの塩基配列を決定した。その結果、A3型7名においてAアレルの+5.8-kb site内に新規の1塩基置換(g.5893G>Aまたはg.5909A>G)が、B3型2名においてBアレルのプロモーター内に新規の1塩基置換(g.-77C>G)がそれぞれ同定され、プロモーターアッセイでこれらの変異がABO遺伝子の転写活性を減弱することを証明した(図2)。

< 図 2 >



(4) これらの研究成果により、今までその原因が不明であったAm型、A3型、B3型に関して、血液型の遺伝子診断が部分的に可能になった。同時に、亜型を含めた血液型の正確な遺伝子診断にはコーディング領域だけでなくエンハンサーやプロモーター等の転写調節領域の遺伝子検査が必須であることが示された。なお、転写因子RUNX1は急性骨髄性白血病の患者においてしばしば相互転座のために変異することが知られており、本研究結果から、白血病患者における血液型変換の新たな機構の解明が可能になると考えられる。

(5) 上皮系細胞におけるエンハンサー候補領域が同定され、関与する転写因子の存在が明らかとなってきた。現在、詳細な検討が行われている最中である。

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17件)

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 Sanguinis*. 査読有. 110, 2016, 90-92. DOI:10.1111/vox.12312.

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 Am 型、A3 型、B3 型が生じる. *DNA 多型*. 査読有. 23, 2015, 103-107.

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 Bm-derived CD34+ cells without an erythroid cell-specific regulatory element. *Vox Sanguinis*. 査読有. 108, 2015, 302-309. DOI:10.1111/vox.12220.

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 ABO blood group gene in an individual with the Bm phenotype. *Vox Sanguinis*. 査読有. 108, 2015, 310-313. DOI:10.1111/vox.12216.

Takahashi Y, Isa K, Sano R, Nakajima T, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Michino J, Masuo 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 A3 and B3, respectively. *Vox Sanguinis*. 査読有. 107, 2014, 171-180. DOI:10.1111/vox.12136.

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 peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping method. *Blood Transfusion*. 査読有. 12, 2014, 431-434. DOI:10.2450/2014.0162-13.

佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 高橋圭子, 久保谷江里, 小湊慶彦, 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 岸田哲子. ABO 遺伝子内血球系特異的エンハンサー内 GATA サイトの1塩基置換がB抗原量の低下をもたらしたBm型一症例. *DNA 多型*. 査読有. 22, 2014, 109-113.

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 Am phenotype. *Vox Sanguinis*. 査読有. 106, 2014, 167-175. DOI:10.1111/vox.12077.

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 Bm Subgroup individual. *Transfusion*. 査読有. 53, 2013, 2917-2927. DOI:10.1111/trf.12181.

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 Bm 型の原因である. DNA 多型. 査読有. 21, 2013, 122-126.
他 7 件.

[学会発表](計 26 件)

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. 日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会, 2015 年 11 月 20 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山).

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 年 6 月 11 日, 文化プラザかるぼーと(高知).

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 Am 型、A3 型、B3 型が生じる. 日本 DNA 多型学会第 23 回学術集会, 2014 年 11 月 26 日~27 日, 愛知県産業労働センターウインクあいち(名古屋).

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 年 6 月 16 日~20 日, Fukuoka.

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 年 6 月 16 日~20 日, Fukuoka.

Sano R, Nogawa M, Nakajima T, Takahashi Y, Kominato Y, Takeshita H, Yasuda T, Yokohama A, Yamao H, Kishida T, Isa K, Ogasawara K, Uchikawa M. Blood group B gene expression 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 年 6 月 1 日~5 日, Seoul.

Isa K, Ogasawara K, Ito S, Tsuneyama H, Yabe R, Takahashi Y, Sano R, Nakajima T,

Kominato Y, Uchikawa M, Satake M, 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 年 6 月 1 日~5 日, Seoul.

伊藤正一, 荻山恵子, 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 年 5 月 15 日, 奈良県文化会館・奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター(奈良).

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 年 5 月 15 日, 奈良県文化会館・奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター(奈良).

増田英敏, 常山初江, 伊佐和美, 小笠原健一, 矢部隆一, 内川誠, 南隆彦, 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 の欠失が見られた日本人 Am 型の 2 例. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 2014 年 5 月 15 日, 奈良県文化会館・奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター(奈良).

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 サイトの一塩基置換が B 抗原量の低下をもたらした Bm 型一症例. DNA 多型学会第 22 回学術集会, 2013 年 11 月 21 日~22 日, 仙台市戦災復興記念館(仙台).

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 遺伝子血球系特異的エンハンサー内 GATA サイトの一塩基置換が B 抗原量の低下をもたらした Bm 型一症例. 第 97 次日本法医学会学術全国集会, 2013 年 6 月 27 日~28 日, ロイトン札幌(札幌).

他 14 件.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 遥一郎 (TAKAHASHI, Yoichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 50640538