

総 説

Rh 血液型の分子レベルでの考察

Molecular insights into the Rh blood group

陶 山 公 太

ニューヨーク血液センター

Key words : Rh protein family, Rh-related glycoproteins, Rhnull syndrome, Rh genetic polymorphism, Rh 50 mutation, D epitope mapping

はじめに

Rh (Rhesus) 蛋白質ファミリーは赤血球系細胞上に認められ, Rh 30 (RhD 及び RhCE) 蛋白質と Rh 50 に極めて高い相同性を示す Rh 50 糖蛋白質からなると考えられている. 歴史的には, Rh 血液型の存在は 1939 年に Levine と Stetson¹⁾ によって初めて報告され, その後, 血清学的研究が急速に進み, 現在までに約 50 種類の Rh 血液型が発見されている. 1982 年に Moore ら²⁾ 及び Gahmberg³⁾ によって Rh 血液型の本体が分子量 32,000 の蛋白質であることが知られ, これを機に分子生物学的手法を用いて, その構造特に遺伝子構造の研究が精力的に行なわれることになった. その結果 1990 年にフランスのグループ⁴⁾ とイギリスのグループ⁵⁾ により RhcE cDNA 構造が報告されるなど, 現在まで多くの研究者により詳細な Rh 遺伝子のポリモルフィズムの解明がなされてきた. 従ってこの総説においては, 1982 年の Moore らの報告から今日までの Rh 血液型及び関連糖蛋白質, 特に Rh 50 糖蛋白質の分子レベルでの解析を中心に述べ, 今後の研究方向も含めて考察する.

Rh 蛋白質ファミリー (Rh protein family)

1. Rh 30 蛋白質

Rh 血液型は Rh 30 蛋白質上に存在し, D 抗原の存在の有無によって大きく Rh⁺ (RhD) と Rh⁻ (RhCE) の 2 種類に分けられ, その発現には 2 種類の Rh 遺伝子 (D 遺伝子, CE 遺伝子) が関与している. 広く共通に存在する 3 種類の対立形質 (C/c, D/d, E/e) のほか, 極めてまれな Rh 抗原性

のない, 又はほとんど Rh 抗原性を示さない Rhnull や Rhmod など存在し, 前述のように約 50 種類の Rh 血液型が存在している.

Rh 30 蛋白質 (RhD 蛋白質, RhCE 蛋白質) は 417 個のアミノ酸残基から成り, 分子量 46,000 の蛋白質である (Fig. 1). 極めて疎水性が高く, SDS - ポリアクリルアミドゲルにおいては, 分子量 30,000~32,000 の蛋白質として観察される. 多くの膜蛋白質と異なり, 糖鎖はなく⁶⁾, リン酸化部位も存在しない⁶⁾. RhD 蛋白質はシスチン-ロイシン-プロリン (CLP) モチーフの存在により, 2 カ所でシスチンを通してアシル化された脂肪酸を持ち, RhCE 蛋白質では 3 カ所でアシル化脂肪酸を保有する⁷⁾. アミノ酸配列のコンピューター解析及び蛋白質化学的研究により, N 末端及び C 末端は共に細胞質側に存在し, 12 個の膜通過部位 (ヘリックス構造) を持ち, イオン透過等に関わる膜蛋白質と類似した構造を持つことが確認されているが, Rh 50 蛋白質を除き, 他の蛋白質との相同性は見られていない. RhD 蛋白質と RhCE 蛋白質との間には 35 個のアミノ酸の相違が認められているが, 極めて高い相同性 (84%) を示す. 両抗原は赤血球のプロテアーゼ処理によってもなくなることなく, むしろ抗原性は増加する. 現在のところ, Rh 30 蛋白質は赤血球系細胞 (K 562 細胞も含む) にのみ認められており, ヒトのほか, ギリラやチンパンジーなどの霊長類⁸⁾, さらにマウスや下等動物の Rh 30 蛋白質の研究も進行中である^{9)~11)}.

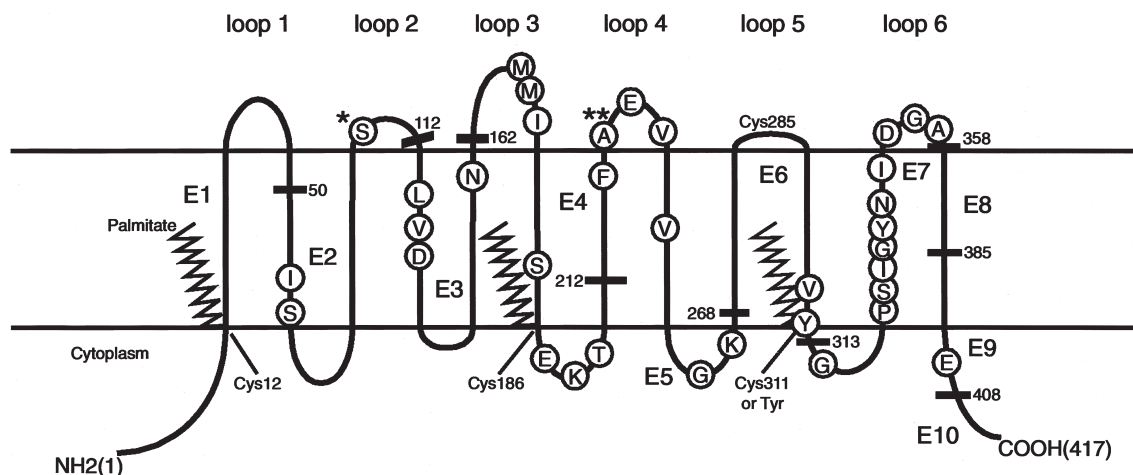


Fig. 1 Membrane topology of the Rh 30 proteins. The 35 positions in open circles correspond to substitutions differentiating polypeptide RhD from RhcE. Letters in open circles correspond to amino acids observed in RhD protein. The approximate limits of externally exposed loops are : loop 1, amino acids (aa) 31—44 ; loop 2, aa 102—113 ; loop 3, aa 154—175 ; loop 4, aa 226—240 ; loop 5, aa 283—287 ; loop 6, aa 349—358 ; black bars, limits of the exons ; black zig zag line, palmitate linked to the cysteine (CLP motif) ; gray zig zag line, palmitate linked only to RHCE-encoded proteins ; * position 103 is determinant for the expression of antigens C, c and G ; * * position 226 is determinant for the expression of antigens E and e⁽⁵⁸⁾.

2. Rh 50 糖蛋白質

1992年イギリスのグループにより、ヒトモノ又はポリクローナル抗D抗体を用いた免疫沈澱法により赤血球膜からRh 30蛋白質とともに得られるRh 50糖蛋白質のcDNA構造が報告¹²⁾され、最近フランスのグループにより、Rh 30蛋白質の発現に深く関わっていることが報告¹³⁾された。Rh 50糖蛋白質は409個のアミノ酸より成り37番目のアスパラギン残基における糖鎖の長さにより分子量は45,000～100,000と広範囲にわたり、peptide-N-glycanase Fによる消化によって分子量30,000の単一バンドとしてSDS-ポリアクリルアミドゲル上に観測される¹⁴⁾。Rh 30蛋白質同様、Rh 50糖蛋白質は高い疎水性を保有し、N末端及びC末端は細胞質側に存在し、12個の膜透過部位を持っている(Fig. 2)。Rh 50糖蛋白質は5個のシスチン残基を持つがC-L-Pモチーフを持たずアシル化脂肪酸は存在していない。又、リン酸化部位も存在していない。Rh 50糖蛋白質とRh 30蛋白質は36%と、相同性は低いものの明らかに同じ蛋白

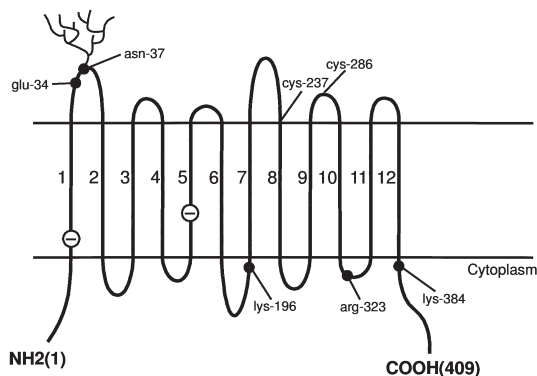


Fig. 2 Schematic representation of the membrane topology of the Rh 50 glycoprotein. The predicted glycosylation (Asn-37) is shown. The *S. aureus* V8 protease (Glu-34) and trypsin (Lys-196, Arg-323, and Lys-384) cleavage sites are also shown. Two (Cys-237, Cys-286) of five cysteines are on extracellular loops⁽¹⁶⁾.

質ファミリーに属している。Rh 50糖蛋白質はマウスモノクローナル抗体2D10によりRhnull U+赤血球上に存在するがRhnull U-赤血球上に

は存在しないことから Rh 50 糖蛋白質の発現に Rh 30 蛋白質は直接関与していない¹⁴⁾。プロメリンによる赤血球の処理は、糖鎖の結合したアミノ酸部位を切断し、これが D 抗体の反応の増加を引き起こすという報告もある¹⁵⁾。Rh 30 蛋白質と Rh 50 糖蛋白質は赤血球膜上で、それぞれ 2 個からなる 4 量体として存在すると仮定され、N 末端部位を通して共に反応しあっているとされている¹⁶⁾。これらについては今後の詳細な研究が待たれる。糖鎖の役割も含めて、Rh 50 糖蛋白質の Rh 抗原性への直接的又は間接的な関与の有無についてはまだ明らかではない。Rh 50 糖蛋白質の 1 番目と 5 番目における膜通過部位のセンターにおいて 2 個の酸性アミノ酸残基 (Glu-13, Glu-146) の存在が認められ、同様に Rh 30 蛋白質においても Glu-21, Glu-146 の存在が認められている。このことが、2 つの蛋白質が陽イオン透過に関与していると考えられるもう一つの理由である¹⁰⁾。

Rh 蛋白質ファミリーのクローニング

1990 年フランスのグループにより Rh 30 cDNAs の一つである RhcE cDNA が、ヒトの骨髓 cDNA ライブラリーより単離され、その核酸組成 (1251 bp) が報告された⁴⁾。又この遺伝子は染色体 1 p 34.3-p 36.1 上に存在することが確認された¹⁷⁾。データバンクの検索によって相同性を有する蛋白質は後述の Rh 50 糖蛋白質を除き存在しないことが判明した。さらに、成人の肝臓や脾臓には発現せず、胎児の肝臓、HEL や K 562 細胞など赤芽球系細胞にのみ存在することが立証された。その後 RhD cDNA が単離され、全配列の 96.5% が RhcE cDNA と同一の核酸からなり、わずか 41 個の核酸の違いが認められ、アミノ酸にして 35 個の違いが認められるのみであった^{18)~20)}。1992 年にイギリスのグループにより、Rh 50 cDNA がヒトの骨髓 cDNA ライブラリーより単離され、409 個のアミノ酸よりなり Rh 50 糖蛋白質と名付けられた¹²⁾。Rh 50 遺伝子は染色体 6 p 11-p 21.1 上にあることが報告され、Rh 遺伝子座位によって作られる蛋白質ではないが同じ Rh 蛋白質ファミリーと考えられている¹²⁾。Rh 30 蛋白質同様、Rh 50 mRNA は赤芽球細胞にのみ存在することが確

認された。

Rh 遺伝子の構造

Rh 遺伝子は、ヒト染色体 1 p 34-p 36 上に位置し、赤血球膜の骨格を構築している 4.1 蛋白質の欠損によって引き起される遺伝的橢円球症の遺伝子座位に近接している²¹⁾。southern blot による遺伝子の解析によってヒト Rh+ は 2 種類の類似した遺伝子 (RHD と RHCE) からなり、Rh- は RhCE 遺伝子だけを有し、RhD 遺伝子の対立遺伝子を持っていない。d 抗体が見つけれなかったのはこのためである。RhD 遺伝子は D 蛋白質を、RhCE 遺伝子は CcEe 蛋白質を作り出す²²⁾。現在この 2 つの遺伝子モデルが一般的に受け入れられているが²³⁾、3 つの遺伝子モデルも仮説として出されており²⁴⁾、霊長類 (チンパンジー) においては 3 つの遺伝子が確認されている²⁵⁾。又、オーストラリア人の CCee Rh 型の中には、いわゆる RhD 遺伝子の欠損した人、RhD 遺伝子の部分的欠損した人や正常だが不活性な RhD 遺伝子を持つ人なども確認されている²⁶⁾。RhCE 遺伝子の詳細な構造は不明だが、75 kb の DNA からなり、10 個のエクソンから成っている²⁷⁾。RhD 遺伝子の詳細な構造も不明だが、4 番目のイントロンにおける 600 bp の欠損を除き、RhCE 遺伝子と類似した構造を持っている¹⁹⁾。2 種類の mRNA (1.5 kb, 3.0-3.5 kb) が存在し、他にも DmRNA のアイソフォーム、例えばエクソン 7 の欠損やエクソン 7~9 の欠損など、が見つかっており、CE mRNA においても同様なアイソフォームが見つまっている^{28) 29)}。一方、それらに相当する蛋白質はまだ同定されていない。Rh 50 糖蛋白質の遺伝子構造も詳細は不明だが、染色体 6 p 11-p 21.1 上に位置し、Rh 30 遺伝子と極めて類似したエクソン/イントロン構造を持ち、10 個のエクソンからなっている。さらに、Rh 50 遺伝子は 5' region において RhD や RhCE 遺伝子の両方に見られなかった TATA ボックスを持っている³⁰⁾。一方、サイズや核酸配列もよく似ていることから、Rh 50 遺伝子と Rh 30 遺伝子は共通の祖先を持つことが想定され、別々の染色体に組み込まれることによって 2 つの別個の遺伝子座位を占めるようになったと考えられている。

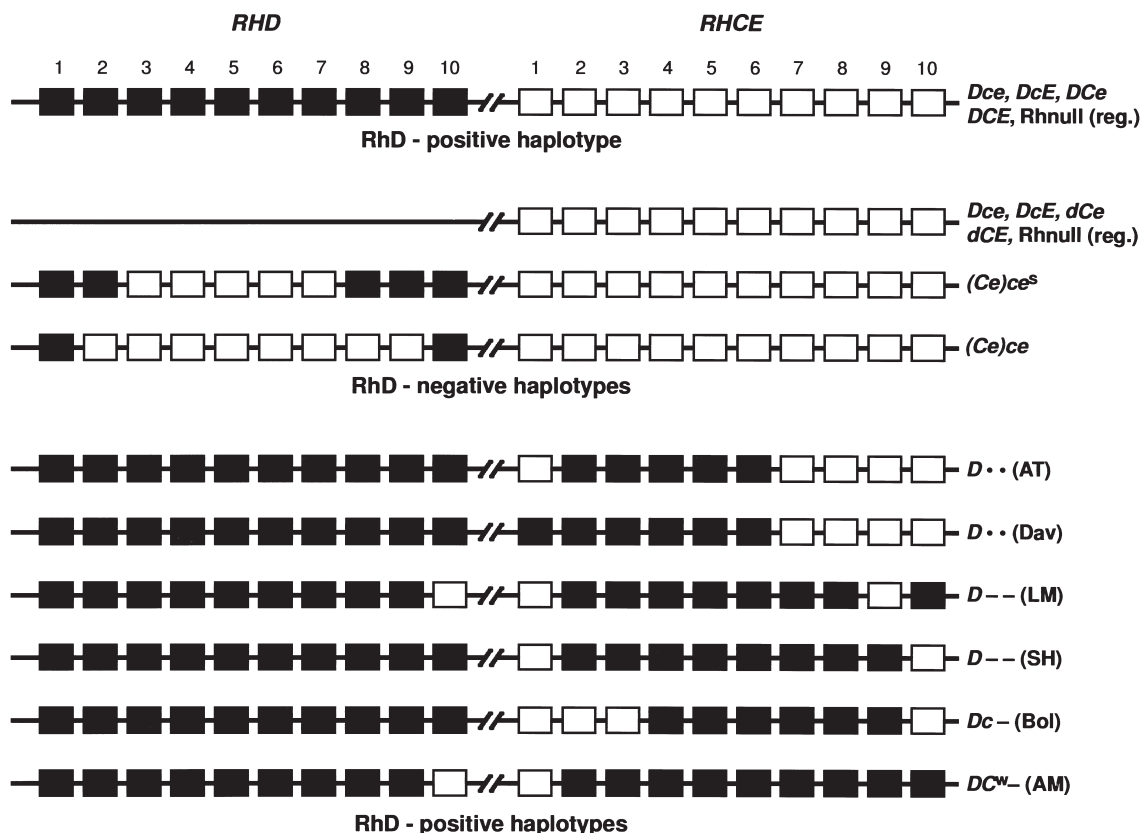


Fig. 3 Normal Rh haplotype, and structure and arrangement of RhD-negative and RhCE variant haplotypes. Solid boxes represent RhD exons and open boxes represent RHCE exons. Straight line shows total deletion of *RHD*³¹⁾.

Rh 遺伝子のポリモルフィズム

血清学的手法により確立された約 50 種類の Rh 血液型は今日までにその大半が分子遺伝学的レベルにおいて明らかになっている³¹⁾。つまり Rh 遺伝子座位における遺伝子の組換え, Rh 遺伝子フラグメントの転換やハイブリッド遺伝子の形成などによって説明出来るようになって来た。正常なヒト Rh+ の遺伝子, 例えば Dce, DcE, DCE, DCE などは RhD 遺伝子と RhCE 遺伝子からなり, Rh- の遺伝子 (dce, dcE, dCe, dCE) は RhD 遺伝子の欠損により引き起こされる (Fig. 3)。一方, ヒトの Rh- のゲノムにおいて, RhD 遺伝子又は RhD 遺伝子フラグメントが存在することも見つかっている。例えば, (Ce)ce^S 型³²⁾においては, RhD 遺伝子のエクソン 3~7 までは欠損しており, 正確な遺

伝子構造は不明であるが (Ce) Ce 型³³⁾の構造を見ると, 対応する RhCE 遺伝子によって置き換えられていることが推論できる。つまり (Ce) Ce においては RhD 遺伝子のエクソン 2~9 までは対応する RhCE 遺伝子によって置き換えられ, C 及び e 抗原を持つ RhD-Ce-D ハイブリッドからなると考えられている。RhD 遺伝子において 1 個の核酸の違いがフレームシフトなどを引き起こすことにより D- を引き起し, 明らかに RhD 遺伝子を持つ D- の例が存在している³⁴⁾。weak D 型は定量的な D 抗原表現のポリモルフィズムであり, weak D 型をコードする遺伝子の分析により, 正常な遺伝子を持つが, RhD mRNA の発現は著しく抑えられており転写レベルでの欠陥と考えられている³⁵⁾。CE 遺伝子の欠損は白人やアジア系人種に

まれに見られ、CcEe 抗原の完全な欠損や部分的欠損を引き起こす原因となる。例えば、D⁺・⁺や D⁻・⁻は全ての CcEe 抗原を欠き、Dc⁻、DC^W・⁻や D^{IV}(C)・⁻は E/e 抗原のみを欠いている。さらに正常な RhCE 遺伝子を持つにもかかわらず RhCE 遺伝子の発現において未知の抑制機構が働いた結果の産物として考えられている D⁻・⁻や D^N(C)・⁻がある。これ以外の CE 遺伝子の変異種では遺伝子構造も明らかになっている。これらの特長として RhD 遺伝子のエクソンの 5~9 個の大部分の複製と、それに対応する RhCE 遺伝子の欠損が挙げられる。CcEe 抗原の発現が欠損し、D 抗原の発現が増幅されるのはこのためである。以前 RhCE 遺伝子が欠損していると考えられた D⁻・⁻においても、欠損部位は現在 RhD 遺伝子で置き換えられていると考えられている。D⁺・⁺(AT) は RhCE 遺伝子座位において RhCE-D-CE のハイブリッド構造を持ち、強められた D 抗原性を持ち、同時に新たに Evans 抗原を持っている³⁶⁾。Evans 抗原は D エクソン 6 と CE エクソン 7 の結合部位における新たな核酸配列によって引き起されると定義されている。別の D⁺・⁺(Dav) においては D エクソン 1~6 と CE エクソン 7~10 とが融合することにより引き起される³⁷⁾。他の D⁺・⁺(HD) も RhCE-D-CE ハイブリッドからなることが報告されている³⁸⁾。Dc⁻(BoI) も DC^W・⁻(AM) も又ハイブリッドからなる³³⁾³⁹⁾。しかしながら、何故 D 抗原が C/c や E/e 抗原より免疫原性が強いのかはまだ判明していない。K 562 細胞と RhD cDNA の変異種をはこぶベクターを用いての種々の D エピトープの発現又は抑制の実験が現在進行中である。RhCE における変異種(R^N, Ro^{Har}, r^G, E^U, VS, C^X, C^W) も遺伝子レベルでの解析が行なわれ、CE-D-CE のハイブリッド構造や point mutation などからなることが明らかになっている³¹⁾。

30 種類の D エピトープ

D 抗原には、部分的抗原を持つ 6 種類のカテゴリー赤血球(D^I~D^{VII})と多くのヒトモノクローナル抗 D 抗体を用いた血清学的研究により、9 個の D エピトープ(epD 1~epD 9)が存在することが

判明している⁴⁰⁾。又、新しく部分的 D 抗原を持つ DFR, HMi, HMii, DBT や Ro^{Har} が見つかり、D 抗原は現在 30 種類の D エピトープが存在することが明らかになっている⁴¹⁾。RhD 蛋白質は 6 個の細胞膜外ループよりなり Fig. 4 に示すように、ループ 2, 3, 4 そして 6 が D 抗原に関与しており、エピトープのいくつかは 1 つのループ上に存在し、残りは 2 つ又は 3 つのループ上のアミノ酸残基を必要としている。一方これらの部分的 D 抗原を持つ細胞(D^I, D^{IIIa}, D^{IIIb}, D^{IIIc}, D^{IVa}, D^{IVb}, D^{Va}, D^{VI}, D^{VII}, DFR, DBT, D^{HM}, DNU) の遺伝子構造も解析された結果、これらの細胞のほとんどが、D^I における最小の point mutation から D^{VI} における最大の 3 個の D エクソン 4~6 の CE エクソンによる置き換えによって生じる D-CE-D ハイブリッドの形成による D 変異種であることが報告されている³¹⁾。Rh 30 蛋白質は Rh 関連糖蛋白質と複合体を形成していると考えられていることから、D 抗原はこれらの蛋白質との 4 次構造も考慮されなければならない。

Rh 欠損症征群

全 Rh 抗原の欠損した赤血球(Rhnull 型)には 2 種類あり、amorph 型と regulator 型に分けられる。amorph 型は Rh 遺伝子座位において silent な対立形質がホモ接合によって引き起こされ、regulator 型は Rh 遺伝子座位に位置しない体染色体の抑制遺伝子(X⁰r)がホモ接合によって引き起される⁴²⁾。又、わずかに Rh 抗原が観察できる赤血球(Rhmod 型)もある抑制遺伝子(X⁰)によって制御されている。これら 3 種類の型のいずれかの赤血球を持つヒトは、常に先天性慢性溶血性貧血を示し、球状赤血球症の患者である。患者の赤血球膜は浸透圧の増加によってこわれやすく、陽イオンの透過性が増加している⁴³⁾。又、ATPase 活性の増加、膜安定性の低下、膜脂肪の異常配列そして Rh 関連糖蛋白質と呼ばれる膜糖蛋白質(Rh 50, LW, CD 47, GPB, Duffy)の欠損などが観察されている⁴⁴⁾。これらの膜糖蛋白質の欠損から、Rh 30 蛋白質はこれらの糖蛋白質と複合体を形成することにより、Rh 抗原性を維持し生理的な機能を表わすと考えられている。しかしながら、

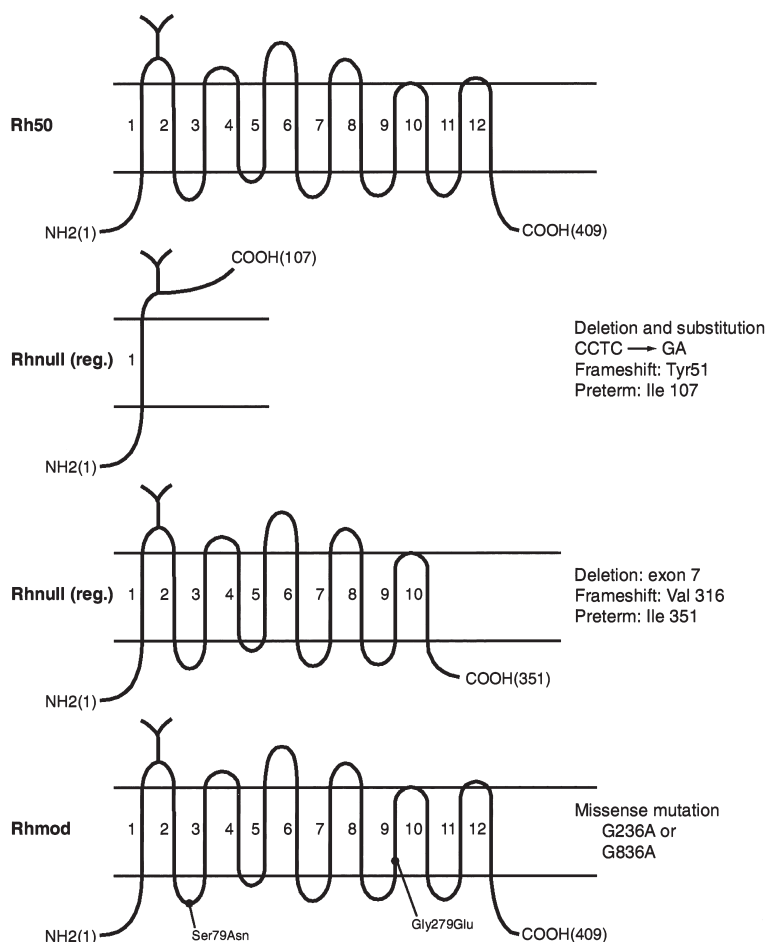


Fig. 4 Rh 50 mutations associated with the regulator Rhnnull and Rhmod phenotypes. "Y" indicates the N-glycan at position 37. The respective gene defects, including their location, nature, and consequence, are briefly described on the right side of each diagram. "Preterm" refers to premature chain termination³¹⁾.

Rh 50 糖蛋白質を除き、他の糖蛋白質が直接的に Rh システムに関与しているという証拠はまだ見つからない。Rh 欠損症と先天性球状赤血球症の間の臨床医学的類似性については、それぞれ別の蛋白質に起因すると考えられている。例えば、先天性球状赤血球症の赤血球は正常な Rh 30 蛋白質を持つが膜蛋白質 7.2 b が欠損しており、Rh 欠損症では、7.2 b は正常に存在する⁴⁵⁾。以上のように、Rh 30 蛋白質や Rh 50 糖蛋白質の生物学的機能は依然不明でこれらの研究はまだ始まったばかりである。

Rh 50 遺伝子による Rh 30 蛋白質発現の制御

southern blot 分析により、Rhnnull regulator 型又は amorph 型のヒトにおいては、不活性な Rh 遺伝子が存在することが明らかとなり、amorph 型では RhD 遺伝子が欠損することも認められている⁴⁶⁾。Rh 転写物は cDNA PCR によって容易に正常な配列が得られることから、不活性は遺伝子レベルではなく、蛋白質レベルで起っている⁴⁷⁾。従って Rhnnull 型は Rh 遺伝子の転写を支配する調整機構の欠損によって引き起こされる。1996 年にフランスのグループは、Rh 30 蛋白質欠損を引き起こす Rh 遺伝子制御因子として Rh 50 遺伝

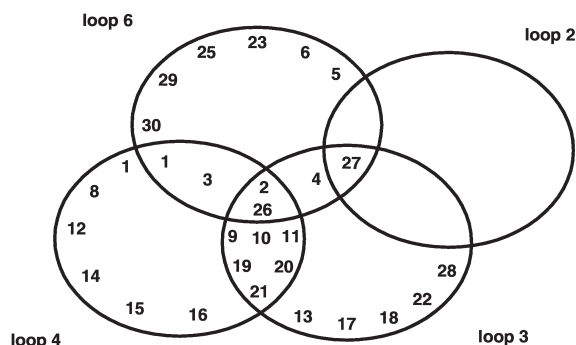


Fig. 5 Proposed position of D epitopes relative to extracellular loops of RhD polypeptide. Thirty RhD epitopes are shown. Some epitopes are contained within one extracellular loop, whereas others require interactions between loops⁴¹⁾.

子の関与を明らかにした⁴⁸⁾。又, Rh 50 糖蛋白質は細胞膜において Rh 30 蛋白質と複合体を作り, Rh 50 糖蛋白質の欠損は Rh 抗原の欠損を引き起こし, 他の Rh 関連糖蛋白質とは本質的に異なると考えられている。例えば, GPB, LW, Duffy は Rh 抗原の発現に関与せず, CD 47 も種々の細胞に存在し, Rh 複合体への直接的関与よりは Rh 欠損の結果引き起こされる CD 47 の欠損と考えられている^{49), 50)}。従って, Rh 50 糖蛋白質は Rh 30 蛋白質の発現と深く関わっている。Fig. 5 に見られるように, Rh 50 遺伝子の解析により, Rhnull regulator 型と Rhmod 型においては, 様々な変異が見られ, 引いては Rh 30 蛋白質発現に異常が見られると考えられている。例えば, Rhnull regulator 型において, エクソン 7 の離脱や, Val-316 以後のフレームシフトが起こり, 不完全な 351 個のアミノ酸残基からなる Rh 50 糖蛋白質を生じる⁵¹⁾。Rh 30 蛋白質や Rh 関連の CD 47 糖蛋白質をコードする mRNA には異常は見られていない。他にも, 4 個の核酸, 154-157 番目の CCTC が GA で置き変わり, フレームシフトを引き起こし, わずか 107 個のアミノ酸残基からなる Rh 50 変異種を生じる。又, Rh 30 蛋白質, LW, CD 47 の mRNA の存在は PCR によって確認出来るにもかかわらず, Rh 50 mRNA の存在しないケースも報告されている³¹⁾。Rhmod 型における Rh 50 遺伝子の異常

は 2 つのケースが報告されており, 共に 1 個のアミノ酸の異常, つまり Ser 79 Asn, 又は Gly 279 Glu がそれぞれ報告されている⁵²⁾。この point mutation がどのようにして, Rh 30 蛋白質の発現に関与しているかは不明である。

Rh 蛋白質ファミリーの発現

1993 年ニューヨークのグループによって Rh 30 蛋白質の発現に関する最初の報告がなされた⁵³⁾。彼等は PBC 12 B 1 PL ベクターによって RhD cDNA を挿入した COS-1 細胞を用いて RhD 蛋白質の発現を試み, flow cytometry により RhD 抗原を測定する方法とウサギのポリクローナル抗 Rh 30 抗体を用いた免疫沈澱法により RhD 蛋白質の同定を行う方法で調べている。その結果 RhD 蛋白質の細胞内存在は同定されたが, 膜表面における RhD 抗原は認められず, 他のファクター, 例えば Rh 50 糖蛋白質の関与が考えられている。Rh 30 蛋白質が赤血球系細胞に特異的であることから, K 562 細胞を用いる試みも行なわれている。彼等は K 562 細胞自体がすでに Rh 30 蛋白質と Rh 50 糖蛋白質を持つことを報告し⁵⁴⁾, K 562 細胞が Rh 蛋白質ファミリーの発現に適当な細胞でないことを示している。一方, 1996 年にイギリスのグループにより, レトロウイルスベクターによって, RhD cDNA 及び RhcE cDNA をそれぞれ K 562 細胞に挿入し, 各々の Rh 抗原を発現させることに成功している⁵⁵⁾。赤血球以外の細胞を用いての Rh 30 蛋白質の発現実験はまだ成功していないことから, Rh 関連糖蛋白質の関与も考えられている。Rh 50 糖蛋白質の発現もニューヨークのグループにより, レトロウイルスベクターによって Rh 50 遺伝子が挿入された COS-1 細胞とマウスモノクローナル抗 Rh 50 抗体 (2 D 10) を用いて行われ, Rh 50 抗原の発現が認められた^{56), 57)}。Rh 50 糖蛋白質の発現には Rh 30 蛋白質及び他の Rh 関連糖蛋白質は関与しないと考えられる。このことは Rhnull U⁺ 赤血球上には Rh 50 蛋白質は存在するが, Rh 30 蛋白質は存在しないことから裏づけられる。Rh 30 蛋白質の赤血球系以外の細胞における発現に関して, Rh 50 遺伝子も挿入した種々の細胞 (COS-1 細胞, CHO 細胞等) において

も Rh 30 抗原の発現は認められず、未知の蛋白質の関与も考えられている。

おわりに

1990 年に RhcE 遺伝子構造が報告されて以来、現在までに多くの研究者によって、約 50 種類の Rh 遺伝子のほとんどの構造が明らかになっている。しかしながら、現在のところ、完全に信頼できる分子遺伝学的方法がないために、正確な遺伝子構造は依然として不明であるが、ヒトのゲノム解析プロジェクトの進展は Rh 遺伝子座位のより詳細な構造解明を持たらすことが考えられ、現在の Rh 遺伝子構造の再考が必要となるかもしれない。Rh 型遺伝子の種々な生物における存在の有無や、赤血球系以外の細胞における Rh 型遺伝子の有無などの報告も近い将来行なわれるものと思われる。まだ未解決の分野として、Rh 30 蛋白質及び Rh 関連糖蛋白質の構造と機能があり、詳細な解明にはまだ多くの時間を必要とするであろう。例えば、D 抗原が何故 C/c 抗原や E/e 抗原に比べより免疫原性が強いのか？ という疑問があるが、これを解決するには、細胞膜上における Rh 30 の詳細な 4 次構造やエピトープ mapping が求められる。又、Rh 30 蛋白質の発現には未知の蛋白質の関与も考えられ、新たな Rh 複合体構造の解明も必要になって来る。これらの事が明らかになるにつれて、Rh ファミリー蛋白質の機能も明確になるであろう。さらに研究が進めば、コンピューター解析による現在の Rh ファミリー蛋白質構造に基づくイオンチャネルやイオントランスポートへの関与についても再考する必要が出て来るかも知れない。これらの理由から、Rh 研究は依然として多くの事が未解決のままであると言って良い。

文 献

- Levine, P., Stetson, R.E. : An unusual case of intragroup agglutination. *JAMA*, 113 : 126—127, 1939.
- Moore, S., Woodrow, C.F., McClelland, D.B.L. : Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh. (D), (c), (E), and Fy^a. *Nature*, 295 : 529—531, 1982.
- Gahmberg, C.G. : Molecular identification of the human Rho (D)-antigen. *FEBS Lett.*, 140 : 93—97, 1982.
- Cherif-Zahar, B., Bloy, C., Le Van Kim, C., Blanchard, D., Bailly, P., Hermand, P., Salmon, C., Cartron, J.-P., Colin, Y. : Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 : 6243—6247, 1990.
- Avent, N.D., Ridgwell, K., Tanner, M.J.A., Anstee, D.J. : cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression. *Biochem. J.*, 271 : 821—825, 1990.
- Gahmberg, C.G. : Molecular characterization of the human Rho (D) antigen. *EMBO J.*, 2 : 223—227, 1983.
- de Vetten, M.P., Agre, P. : The Rh polypeptide is a major fatty acid acylated erythrocyte membrane protein. *J. Biol. Chem.*, 263 : 18193—18196, 1988.
- Salvignol, L., Calvas P., Socha, W.W., Colin, Y., Le Van Kim, C., Bailly, P., Ruffie, J., Cartron, J.-P., Blancher, A. : Structural analysis of the RH-like blood group gene products in nonhuman primates. *Immunogenetics*, 41 : 271—281, 1995.
- Agre, P., Cartron, J.-P. : Molecular biology of the Rh antigens. *Blood*, 78 : 551—563, 1991.
- Cartron, J.-P., Agre, P. : Rh blood groups and Rh-deficiency syndrome. *Blood Cell Biochem.*, 6 : 189—225, 1995.
- Tanner, M.J.A. : Advances in the molecular biology of erythrocyte antigens. *Curr. Opin. Hematol.*, 2 : 139—145, 1995.
- Ridgwell, K., Spurr, N.K., Laguda, B., Macgeoch, C., Avent, N.D., Tanner, M.J.A. : Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (Rhesus) blood-group antigen expression. *Biochem. J.*, 287 : 223—228, 1992.
- Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Gane, P., Mattei M.-G., Bailly, P., Gibbs, B., Colin, Y., Cartron, J.-P. : Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nature Genetics*, 12 : 168—173, 1996.
- Ridgwell, K., Eyers, S.A.C., Mawby, W.J., Anstee, D.J., Tanner, M.J.A. : Studies on the Glycoprotein Associated with Rh (Rhesus) Blood Group Antigen Expression in the Human Red Blood Cell Membrane. *J. Biol. Chem.*, 269 : 6410—6416, 1994.
- Avent, N.D., Liu, W., Warner, K.M., Mawby, W.J., Jones, J.W., Ridgwell, K., Tanner, M.J.A. : Immunochemical analysis of the Human Erythrocyte Rh Polypeptides. *J. Biol. Chem.*, 271 :

- 14233—14239, 1996.
- 16) Evers, S.A.C., Ridgwell, K., Mawby, W.J., Tanner, M.J.A. : Topology and Organization of Human Rh (Rhesus) Blood Group-related Polypeptides. *J. Biol. Chem.*, 269 : 6417—6423, 1994.
 - 17) Cherif-Zahar, B., Mattei, G., Le Van Kim, C., Bailly, P., Cartron, J.-P., Colin, Y. : Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosomal region 1 p 34.3-p 36.1 by in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 86 : 398—400, 1991.
 - 18) Le Van Kim, C., Mouro, I., Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Cherrier, C., Cartron, J.-P., Colin, Y. : Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 10925—10929, 1992.
 - 19) Arce, M.A., Thompson, E.S., Wagner, S., Coyne, K. E., Ferdman, B.A., Lublin, D.M. : Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD positive, but not RhD-negative individuals. *Blood*, 82 : 651—655, 1993.
 - 20) Kajii, E., Umenishi, F., Iwamoto, S. : Isolation of a new cDNA clone encoding an Rh polypeptide associated with the Rh blood group system. *Hum. Genet.*, 91 : 157—162, 1993.
 - 21) McGuire, M., Smith, B.L., Agre, P. : Distinct variants of erythrocyte protein 4.1 inherited in linkage with elliptocytosis and Rh type in three Caucasian families. *Blood*, 72 : 287—293, 1988.
 - 22) Colin, Y., Cherif-Zahar, B., Le Van Kim, C., Raynal, V., Van Huffel, V., Cartron, J.-P. : Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism. *Blood*, 78 : 2747—2752, 1991.
 - 23) Tippett, P. : A speculative model for the Rh blood groups. *Ann. Hum. Genet.*, 50 : 241—247, 1986.
 - 24) Fisher, R.A., Race, R.R. : Rh gene frequencies in Britain. *Nature*, 157 : 48—49, 1946.
 - 25) Salvignol, I., Blancher, A., Calvas, P., Socha, W.W., Colin, Y., Cartron, J.-P., Ruffie, J. : Relationship between chimpanzee Rh-like genes and the R-C-E-F blood group system. *J. Med. Primatol.*, 32 : 19—28, 1993.
 - 26) Hyland, C.A., Wolter, L.C., Saul, A. : Three unrelated RhD gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus CCee (r'r') phenotypes. *Blood*, 84 : 321—324, 1994.
 - 27) Cherif-Zahar, B., Le Van Kim, C., Rouillac, C., Raynal, V., Cartron, J.-P., Colin, Y. : Organization of the gene encoding the human blood group Rh CcEe antigens and characterization of the promoter region. *Genomics*, 19 : 68—74, 1994.
 - 28) Le Van Kim, C., Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Lopes, M., Cartron, J.-P., Colin, Y. : Multiple Rh mRNAs isoforms are Produced by alternative splicing and poly (A) site choice. *Blood*, 80 : 1074—1078, 1992.
 - 29) Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Ambrosio, A.M., Cartron, J.-P., Colin, Y. : Molecular analysis of the structure and expression of the RH locus in individuals with D⁻ -, Dc⁻ -, and DC^W - gene complexes. *Blood*, 84 : 4354—4360, 1994.
 - 30) Huaug, C.-H. : The human Rh 50 glycoprotein gene. *J. Biol. Chem.*, 273 : 2207—2213, 1998.
 - 31) Huang, C.-H. : Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Curr. Opin. Hematol.*, 4 : 94—103, 1997.
 - 32) Blunt, T., Daniels, G., Carritt, B. : Serotype switching in a partially deleted RhD gene. *Vox Sang.*, 67 : 397—401, 1994.
 - 33) Huaug, C.-H. : Alteration of RH gene structure and expression in dCCee and DC^W red blood cells : phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. *Blood*, 88 : 2326—2333, 1996.
 - 34) Hyland, C.A., Wolter, L.C., Saul, A. : Three unrelated RhD gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus CCee (r'r') phenotypes. *Blood*, 84 : 321—324, 1994.
 - 35) Beckers, E.A.M., Faas, B.H.W., Overbeeke, M.A.M., von dem Borne, A.E.G.Kr., van Rhenen, D.J., van der Shoot, C.E. : Molecular aspects of the weak-D phenotype. *Transfusion*, 35 : 50 S (S 198), 1995.
 - 36) Huang, C.-H., Chen, Y., Reid, M., Ghosh, S. : Genetic recombination at the human RH locus : a family study of the red-cell Evans phenotype reveals a transfer of exons 2-6 from the RhD to the RHCE gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 59 : 825—833, 1996.
 - 37) Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Cartron, J.-P. : Lack of RHCE-encoded protein in the D⁻ - phenotype may result from homologous recombination between the two RH genes. *Blood*, 88 : 1518—1520, 1996.
 - 38) Kemp, T.J., Poulter, M., Carritt, B. : A recombination hot spot in the Rh genes revealed by analysis of unrelated donors with rare D⁻ - phenotype. *Am. J. Hum. Genet.*, 59 : 1066—1073, 1996.
 - 39) Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Cartron, J.-P. : Lack of RHCE-encoded protein in the D⁻ - phenotype may result from homologous recombination between the two RH genes. *Blood*, 88 : 1518—1520, 1996.
 - 40) Tippett, P., Lomas-Francis, C., Wallace, M. : The Rh antigen D : partial D antigens and associated

- low incidence antigens. *vox Sang.*, 70 : 123—131, 1996.
- 41) Scott, M.L., Voak, D., Jones, J.W., Avent, N.D., Liu, W., Hughes-Jones, N., Sonneborn, H. : A structural model for 30 RhD epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes. *TCB*, 6 : 391—396, 1996.
 - 42) Race, R.P., Sanger, R. : *Blood Groups in Man*, 6 th ed. Oxford : Blackwell, 1975.
 - 43) Sturgeon, P. : Hematological observations on the anaemia associated with blood type Rhnull. *Blood*, 36 : 310—320, 1970.
 - 44) Nash, R., Shojania, A.M. : Hematological aspect of Rh deficient syndrome : a case report and review of the literature. *Am. J. Hematol.*, 24 : 267—275, 1987.
 - 45) Bailly, P., Cartron, J.-P., Wang, D., Johnson, R.M. : Hereditary stomatocytosis and Rh-deficient patients exhibit distinct molecular defects. *Blood*, 50 : 1624—1626, 1992.
 - 46) Carritt, B., Blunt, T., Avent, N., Daniels, G., Steers, F. : Rhnull phenotypes are not due to a gross deletion and can occur on different Rh genetic background. *Ann. Hum. Genet.*, 57 : 273—279, 1993.
 - 47) Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Le Van Kim, C., D' Ambrosio, A.-M., Bailly, P., Cartron, J.-P., Colin, Y. : Structure and expression of the RH locus in the Rh-deficiency syndrome. *Blood*, 82 : 656—662, 1993.
 - 48) Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Gane, P., Mattei, M.-G., Bailly, P., Gibbs, B., Colin, Y., Cartron, J.-P. : Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nat. Genet.*, 12 : 168—173, 1996.
 - 49) Hermand, P., Le Pennec, P.Y., Rouger, P., Cartron, J.-P., Bailly, P. : Characterization of the gene encoding the human LW blood group protein in LW⁺ and LW⁻ phenotypes. *Blood*, 87 : 2962—2967, 1996.
 - 50) Lindberg, F.P., Gresham, H.D., Schwarz, E., Brown, E.J. : Molecular cloning of integrin-associated protein : an immunoglobulin family member with multiple membrane spanning domains implicated in $\alpha_v\beta_3$ -dependent ligand binding. *J. Cell Biol.*, 123 : 485—496, 1993.
 - 51) Huaug, C.-H. : The human Rh 50 glycoprotein gene : structural organization and associated splicing defect resulting Rhnull disease. *J. Biol. Chem.*, 273 : 2207—2213, 1998.
 - 52) Hyland, C.A., Cherif-Zahar, B., Cowley, N., Raynal, V., Parkes, J., Saul, A., Cartron, J.-P. : A novel single missense mutation identified along the RH 50 gene in a composite heterozygous Rhnull blood donor of the regulator type. *Blood*, 91 : 1458—1463, 1998.
 - 53) Suyama, K., Roy, S., Lunn, R., Goldstein, J. : Expression of the 32-kd polypeptide of the Rh antigen. *Blood*, 82 : 1006—1009, 1993.
 - 54) Suyama, K., Lunn, R., Haller, S., Goldstein, J. : Rh (D) antigen expression and isolation of a new Rh (D) cDNA isoform in human erythroleukemic K 562 cells. *Blood*, 84 : 1975—1981, 1994.
 - 55) Smythe, J.S., Avent, N.D., Judson, P.A., Parsons, S. F., Martin, P.G., Anstee, D.J. : Expression of RHD and RHCE gene products using retroviral transduction of K 562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. *Blood*, 87 : 2968—2973, 1996.
 - 56) Suyama, K., Lunn, R., Smith, B.L., Haller, S. : Expression of the Rh-related glycoprotein (Rh 50) . in press.
 - 57) Suyama, K., Li, H. : Rh 50 glycoprotein expression in non-erythroid cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9 : 211 a, 1998.
 - 58) Blaucher, A., Socha, W.W. : The Rhesus system. in *Molecular biology and evolution of blood group and MHC antigens in primates*. Blancher/klein/Socha (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.