

原 著

## 日本人の RhD<sub>e1</sub> アリルとその遺伝子タイピング法

石川 善英 常山 初江 内川 誠 佐竹 正博

東京都赤十字血液センター

(平成 16 年 3 月 24 日受付)

(平成 16 年 5 月 28 日受理)

### THE RhD<sub>e1</sub> ALLELE IN THE JAPANESE POPULATION

Yoshihide Ishikawa, Hatsue Tsuneyama, Makoto Uchikawa and Masahiro Satake  
Japanese Red Cross Tokyo Blood Center

The *RHD* gene of D-negative Japanese individuals was analyzed to determine the causes of the D-negative phenotype. cDNAs prepared from reticulocytes were used for the sequencing of full length *RH* transcripts. Although the complete *RHCE* sequence was obtained from the cDNA clones of D-negative and *RHD* gene-positive (D-*RHD*+) individuals, the complete sequence of *RHD* was not. The longest sequence derived from *RHD* had exon 9 deleted. A synonymous one-point mutation, G1227A, at the 3'-end of exon 9 was found in the genomic DNA. The allele was shared by more than 90% (28/31) of D-*RHD* + individuals, most of whom had the D<sub>e1</sub> phenotype. To distinguish the D<sub>e1</sub> allele from D-positive alleles, a multiplex PCR-SSP (sequence specific primer) method was designed.

**Key words** : *RHD*, D-negative, D<sub>e1</sub>, point mutation

#### 緒 言

RhD 抗原陰性 (D 陰性) のほとんどは *RHD* 遺伝子の欠失によるが、日本人では D 陰性者の約 10% が *RHD* 遺伝子を持っている。この *RHD* 遺伝子を持つ D 陰性 (D-*RHD*+) は RhCe 陽性の D 陰性者で頻度が高く、また血清学的に精査すると D-*RHD* + は D 陰性ではなく、極めて弱い D 抗原性を示す D<sub>e1</sub> 型である可能性が高いことも報告されている<sup>1)</sup>。Rh 抗原の遺伝子タイピングは、血清学的には困難な抗原の同定や精度の向上に有益であるが、確度の高い遺伝子タイピング法を確立するためには D-*RHD* + が D 抗原を発現しない原因を明らかにする必要がある。

今回日本人の D-*RHD* + 検体から頻度の高い遺伝子変異を見つけ、その簡便な DNA タイピング法を開発したので報告する。

#### 検体および方法

Rh 抗原の血清学的判定、cDNA、genomic DNA の調整、*RHD* の検出、塩基配列の決定法はすでに報告した方法<sup>2)</sup>を用いた。D<sub>e1</sub> 型の判定はモノクローナル抗 D 抗体 (Ortho Diagnostic KK) と Elu-kit II (Gamma Biologicals) を用い、吸着解離法にて行った。

今回用いた Ce 陽性 D 陰性 68 検体のうち、31 検体は *RHD* intron 4, exon 7, 10 特異的プライマーを用いた PCR-SSP 法<sup>3)</sup>により *RHD* を持つ (D-*RHD*+) と判定された。吸着解離法の結果 25 検体は D<sub>e1</sub> 型と判定された。D<sub>e1</sub> 型と判定された検体はすべて *RHD* 陽性であった。

#### 結 果

##### D-*RHD* + 検体の cDNA の塩基配列の解析

D-*RHD* + の 1 検体から調整した cDNA を *RH* 遺伝子の 3'-5' 非翻訳領域に設定したプライ

Table 1 Phenotypes and genotypes of D-negative individuals

Phenotype	n	RHD		n.t.1227		Del
		-	+	G	A	
C + c + E-e +	37	18	19	3	16	16
C + c + E + e +	21	16*	5	0	5	5
C + c-E-e +	9	3†	6	0	6‡	4
C + c-E + e +	1	0	1	0	1	0
Total	68	37	31	3	28	25

\* One individual who was negative in exon 7-specific PCR is included.

† One individual who was negative in exon 4-specific PCR is included.

‡ G/A heterozygote (n = 1) is included.

Table 2 Oligonucleotide primers used for the PCR-SSP

Name	Nucleotide Sequence	Final Conc.
Ex2f	5'-CACCCCTAAATCTCGTCTGCT-3'	100nM
Ex2r	5'-CAGATCTTCTGGAACCTGTC-3'	100nM
E9A	5'-ATGACCAAGTTTTCTGGAAA-3'	250nM
I9D56r	5'-CAAGTCAACATATATACTCAGGTA-3'	250nM
E9Df	5'-ATATGGAAAGCACCTCATGA-3'	150nM
I9DMr	5'-CACGTTAATAGGTGAAAAATCTTAGC-3'	250nM

マーで増幅し、完全長と予想される約 1.3kb の PCR 産物をクローニングして塩基配列を解析した<sup>3)</sup>。無作為抽出した 13 クローンの塩基配列はすべて *RHCE* 由来であり、*RHD* 由来の配列は得られなかった。cDNA の PCR 増幅により、1.3kb の産物以外に数種類のサイズの産物が得られる。そこで 1.3kb の次に長い約 1.2kb の PCR 産物を同様に調べたところ、*RHD* 由来の配列を持つ 4 クローンが得られたが、いずれも exon 9 を欠失していた。

### *RHD* exon 9 の塩基配列の解析

cDNA の塩基配列解析の結果、exon 9 を欠失していた検体の genomic DNA を用いて、exon 9 の前半(forward : 5'-CTGTCGTTTTGACACACA-CA-3', reverse : 5'-AAACTTGGTCATCAAA-ATATTTAACCT-3')および後半(forward : 5'-AATATGGAAAGCACCTCATGA-3', reverse : 5'-TACTCATAAACAGCAAGTCAACA-3')を intron 8, intron 9 をそれぞれ含んで *RHD* 特異的に増幅し、増幅したプライマーを用いて直接塩

基配列を決定した。exon 9 の 3'端(1,227 番目)の 1 塩基が G から A に変異(G1227A)していたことを除き、*RHD* の配列が得られた。その他の D-*RHD* + 検体を同様の方法で調べた結果、31 検体のうち、28 検体は G1227A 変異を持っていた(Table 1)。またこの 28 検体中 25 検体は D<sub>el</sub>型であった。31 検体のうちの残り 3 検体は 1,227 番目が、D 陽性の *RHD* と同じ G であり、血清学的には D<sub>el</sub>ではなく D 陰性と判定された。

### G1227A 判定用 PCR-SSP (sequence-specific primer) 法

1227A 特異的 forward プライマー(E9A)と *RH* intron 9 特異的 reverse プライマー(I9D56r)で 1227A を検出し、*RHD* exon 9 特異的 forward プライマー(E9Df)と 1227G 特異的 reverse プライマー(I9DMr)で 1227G を検出する PCR-SSP 法をデザインした。PCR 反応の確認用内部標準として *RH* exon 4 を増幅するプライマーセット(Ex2f, Ex2r)を用いた。これらの反応が 1 本の PCR チューブで行えるようプライマー濃度(Table

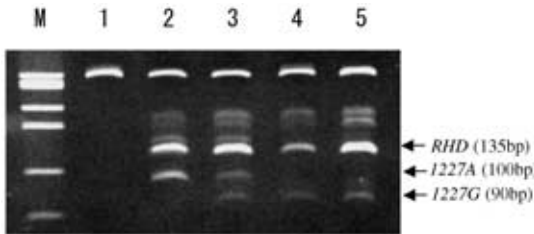


Fig. 1 Multiplex PCR-SSP method for *RHD* exon 9 substitution.

1. D-*RHD* - (C+c+E-e+)
2. 1227A (C+c-E-e+)
3. 1227A/G (C+c-E-e+)
4. 1227G (C+c+E-e+)
5. RhD+ (C+c+E+c+)
- M. size marker.

2) を調整した。PCR は 95 °C, 30 秒; 61 °C, 40 秒; 72 °C, 30 秒を 1 サイクルとし, 33 サイクル行った。

この方法では 1227G, 1227A にそれぞれ特異的なサイズ (90bp, 100bp) の PCR 産物が得られる (Fig. 1)。また *RHD* からの E9Df と I9D56r プライマーによる 135bp の産物が得られるが, *RHD* 遺伝子をまったく欠失している場合は内部標準に由来する PCR 産物のみが得られる (Fig. 1, lane 1)。

### 考 察

*RHD* 由来の cDNA クローンが exon 9 を欠失していたことから, スプライシングシグナルの変異を疑い, genomic DNA の exon 9 を含む塩基配列を解析した。しかし, スプライシングシグナルに変異はなく, 唯一 exon 9 の 3' 端の G → A 変異 (G1227A) が見つかった。

日本人の D 陰性者の約 10% が *RHD* 遺伝子を持つにもかかわらず D 抗原を発現しない原因はこれまで明らかではなかった。今回これら *RHD* 遺伝子を持つ D 陰性者のほとんどは G1227A 変異を共有しており, この変異と D<sub>el</sub> 型が強く関連することが確認された。

G1227A 変異はすでに Wagner ら<sup>4)</sup>, および Shao ら<sup>5)</sup>により, D<sub>el</sub> 型に共通の変異として報告されている。しかし, G1227A 変異はアミノ酸変異を伴わず, またスプライシングシグナルでもないため, D 陰性あるいは D<sub>el</sub> 型となる原因は説明されていない。

今回我々の解析で, G1227A 変異は mRNA の exon 9 欠失を引き起こすことが明らかとなった。Shapiro ら<sup>6)</sup>はスプライシング効率がスプライシングシグナルだけでなく, スプライシングシグナル近傍の配列にも影響されることを報告している。Huang ら<sup>7)</sup>は glycophorin A 遺伝子の exon 3 の 3' 端の G から A への変異により, スプライシング効率が低下して, エクソンスキップが起こり, 完全長の mRNA 量が約 1/2 になることを報告している。また, *RH* 遺伝子はアルターネイティブスプライシングにより, サイズの異なる mRNA が産生されることが報告されており<sup>8)</sup>, 我々の今回の解析でも cDNA を PCR 増幅するとサイズの異なる何本かの PCR 産物が得られた。これらの報告および我々の今回の結果から, G1227A 変異の D 抗原発現への影響は次のように考えられる。

*RH* 遺伝子はエクソンスキップを起こしやすい性質があり<sup>8)</sup>, G1227A 変異によりスプライシング効率が大きく低下し, 生成した mRNA のほとんどは exon 9 を欠損しているものと考えられる。exon 9 はちょうどコドン単位で構成されているため, exon 9 が欠失してもフレームシフトは起こらず, exon 9 に相当する部分が欠けたペプチドが産生される。しかし glycophorin A 遺伝子において報告<sup>7)</sup>されているように, G1227A 変異により完全長の mRNA が全く生成されなくなるとは考えられず, 微量の完全長 mRNA および完全長の RhD ペプチドが産生されると推測される。したがって D<sub>el</sub> 型の D 抗原性は微量の完全長 RhD ペプチドによる可能性がある。一方, Chan 等<sup>9)</sup>は D<sub>el</sub> 型の原因として genomic DNA での exon 9 を含む 1013bp の部分欠失を報告している。今回我々が D<sub>el</sub> 型として報告しているアリルは genomic DNA から *RHD* 特異的に exon 9 が増幅されるため, 部分欠失型とは異なる。この部分欠損型では完全長の mRNA, 完全長のペプチドは産生されないため, exon 9 部分を欠いたペプチドが D 抗原性を示す可能性は否定できない。

今回解析した 31 検体の D-*RHD* + のうち 3 検体は G1227A 変異を持っていなかった。我々はすでに exon 1 から exon 3 が *RHCE* に置き換わっ

たD陰性アリル, *RHCD* (1-3)-*RHD* (4-10)を報告している<sup>2)</sup>。しかしこの3検体は*RHD* exon 3特異的PCRにより増幅が見られたため, *RHCD* (1-3)-*RHD* (4-10)である可能性は低く, 現在のところ, D陰性となる原因は不明である。このため今回報告したPCR-SSP法でも原因不明のD陰性型 (Fig. 1, lane 4)とD陽性型 (lane 5)は区別できない。血清学的手法を必要とせず, 独立して使えるDNAタイピング法を開発するためには, さらにこれらD陰性型の原因を明らかにする必要がある。

G1227A変異によるD<sub>el</sub>型は頻度は異なるがヨーロッパ人<sup>4)</sup>, 中国人<sup>5)</sup>でも報告されており, 人種を超えて広く共有されていると考えられる。

#### 文 献

- 1) Fukumori, Y., Hori, Y., Ohnoki, S., Nagao, N., Shibata, H., Okubo, Y., Yamaguchi, H. : Further analysis of D<sub>el</sub> (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with *RHD* gene-specific primers. *Transfusion Medicine*, 7 : 227-231, 1997.
- 2) 石川善英, 常山初江, 内川 誠, 佐竹正博 : 日本人RhD抗原陰性検体から見つかった*RHD*-*RHCE*ハイブリッドアリル. *日本輸血学会誌*, 49 : 565-567, 2003.
- 3) Kashiwase, K., Ishikawa, Y., Hyodo, H., Watanabe, Y., Ogawa, A., Tsuneyama, H., Toyoda, C., Uchikawa, M., Akaza, T., Omine, M., Juji, T. : E variants found in Japanese and c antigenicity alteration without substitution in the second extracellular loop. *Transfusion*, 41 : 1408-1412, 2001.
- 4) Wagner, F.F., Frohmajer, A., Flegel, W.A. : *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics*, 2 : 10, 2001.
- 5) Shao, C.P., Maas, J.H., Su, Y.Q., Kohler, M., Legler, T.J. : Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D<sub>el</sub> and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sanguinis*, 83 : 156-161, 2002.
- 6) Shapiro, M.B., Senaphthy, P. : RNA splice junctions of different classes of eukaryotes : sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Research*, 15 : 7155-7174, 1987.
- 7) Huang, C.H., Reid, M., Daniels, G., Blumenfeld, O. O. : Alteration of splice site selection by an exon mutation in the human glycophorin A gene. *J Biol. Chem.*, 268 : 25902-25908, 1993.
- 8) Le Van Kim, C., Cherif, Z.B., Raynal, V., Mouro, I., Lopez, M., Cartron, J.P., Colin, Y. : Multiple Rh messenger RNA isoforms are produced by alternative splicing. *Blood*, 80 : 1074-1078, 1992.
- 9) Chan, J.G., Wang, J.C., Yang, Z.Y., Tsan, K.W., Shih, M.C., Peng, C.T., Tsai, C.H. : Human RhD<sub>el</sub> is caused by a deletion of 1,013 bp between introns 8 and 9 including exon 9 of *RHD* gene. *Blood*, 92 : 2602-2604, 1998.