

ABO 遺伝子のエンハンサー領域に GATA>GAGA 変異を認めた分泌型 B_m

山崎 久義¹⁾ 伊佐 和美²⁾ 小笠原健一²⁾ 渡邊 聖司¹⁾ 迫田 岩根¹⁾
 入田 和男^{1,3)} 清川 博之¹⁾

ABO 血液型亜型で日本人に最も多く認められる B_m型と AB_m型は、B 遺伝子イントロン 1 の部分欠失により生じることが報告された。この欠失は 5.8kb におよび、GATA 結合部位を有する転写エンハンサー領域が含まれる。一方、GATA>GAGA の点変異で生じたと考えられる B_m型も 1 例報告されているが、この変異と唾液中の型物質との関係は不明である。

今回、合計 49 例の B_m型と AB_m型を解析した結果、5.8kb の欠失がない 1 例を認めた。エンハンサー領域を調べた結果、2 つの GATA モチーフのうち 3' 側の GATA モチーフに GATA>GAGA 変異が認められた。発端者は、オモテ検査 O 型、ウラ検査 B 型で、抗 B 試薬による吸着解離試験で B 抗原が確認された。血漿中の B 型糖転移酵素活性はほぼ対照の B 型と同程度で、唾液中には B 型と H 型物質が認められ、Lewis 血液型は Le(a-b+)であった。以上の結果よりエンハンサー領域に GATA>GAGA 変異を生じた本邦初の分泌型 B_mと判定した。この変異は、赤血球 B 抗原の発現を低下させるが、唾液中の B 型物質には影響しないことが確認された。

キーワード：B_m型、エンハンサー領域、GATA>GAGA 変異、分泌型

はじめに

B_m型および AB_m型は ABO 血液型の中で日本人に最も多く認められる亜型である。B_m型が他の亜型と異なる点は、血漿中の糖転移酵素活性や、分泌型の場合、唾液中の型物質がほぼ正常に認められることである。最近、ABO 遺伝子のイントロン 1 に赤血球系細胞に特異的な転写制御（エンハンサー）領域が存在することが報告された¹⁾。さらに、B_m型と AB_m型は ABO 遺伝子のエキソン及びその周辺に変異は認められず、イントロン 1 に約 5.8kb の欠失を生じていることが明らかになった（図 1）。欠失した配列中にはエンハンサー領域が含まれており、B_m遺伝子に特異的であることが報告された。また、エンハンサー領域には GATA-1²⁾や RUNX1³⁾の転写因子が結合する配列があり、ゲルシフトアッセイによりこれらの転写因子が ABO 遺伝子の発現に関与すると報告されている。

一方、これまで 5.8kb の欠失を持たない B_m型が 2 例報告されており、1 例はやや規模の小さい 3.0kb の欠失を生じており⁴⁾、5.8kb 欠失と同様にエンハンサー領域を含んでいた。もう 1 例からはエンハンサー領域の GATA モチーフに GATA>GAGA 変異が認められ²⁾、

この点変異によってエンハンサー活性が消失することも示された。しかし、この点変異を有する例は非分泌型であったため B_m型に特徴的な唾液中の型物質は証明できなかった。今回、B_m型と AB_m型について ABO 遺伝子解析を実施したところ、同じ GATA>GAGA 変異をもつ分泌型の B_m型を検出したので報告する。

対象と方法**血清学的検査**

献血者を対象とし、自動輸血検査装置 PK7300(BECKMAN COULTER)と各種試薬（モノクロー抗 A 試薬・PK, モノクロー抗 B 試薬・PK, A 血球・PK, B 血球・PK; Wako 社）を用いて ABO 血液型を判定した。判定不能となった検体については、抗 A 及び抗 B 試薬(Wako 社, IMMUCOR 社, Ortho 社, Bio-Rad 社)と A 型及び B 型血球 (Wako 社)を用い、試験管法及びスライド法により精査を行なった。吸着解離試験は被検赤血球 1ml を 3 回以上洗浄し、抗 B 試薬 (Ortho 社)を 1 ml 加え、冷蔵庫で一晩反応させ、冷リン酸緩衝食塩液で 7 回洗浄後、等量の 6% アルブミン溶液を加え、52°C 10 分間混和し、得られた解離液を調べた。血漿中の糖

1) 日本赤十字社九州ブロック血液センター

2) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

3) 佐賀県赤十字血液センター

〔受付日：2016 年 4 月 12 日，受理日：2016 年 6 月 17 日〕

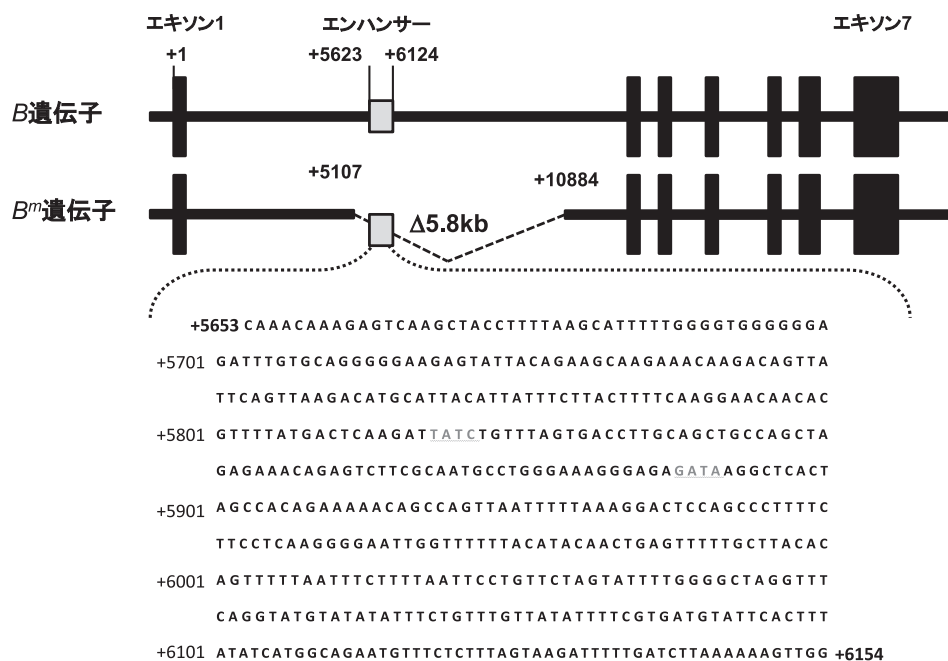
図1 B^m 遺伝子に特異的な 5.8kb の欠失

表1 PCR-SSP 法に用いたプライマーの塩基配列

PCR-SSP	プライマー名	塩基配列 (5'-3')
ABO-SSP	ABO-rpt-F	TCGGGGTCAGCTTAGATTAT
	ABO-rpt-R	TACAATCCCAAGAGCACACT
	GS-O-3F	GGAAGGATGTCCTTGTGGTA
	ABO-323R	TGCTCGTTGAGGATGTCCGATG
	GS-796AF	AAGGACGAGGGCGATTTCTACTACA
	GS-803CR	TTGCACCGACCCCGAAGAACGC
B _m -SSP	B _m SP	CTAATTATTTCTATCCATTACTGAAATGAA
	ABO+10807S	TACAGAAGCTTTGTTGCTAGTG
	ABO+11101AS	TACACATGTAATCACCCAG

転移酵素活性はガルサーブ AB(エーディア社)を用い、能書にしたがって測定し、B_m型 33 例、AB_m型 16 例を選択した。唾液中の型物質は、煮沸処理した唾液をリン酸緩衝食塩液で 2 倍連続希釈し、16~32 単位に希釈した抗 A、抗 B 試薬(IMMUCOR 社)または抗 H レクチン(Ulex europaeus; IMMUCOR 社)を等量加え、室温 20 分静置後、それぞれ A 型、B 型及び O 型 3% 赤血球浮遊液を加え判定した。

ABO 遺伝子解析

検体血液より DNA 抽出キット(QIAamp DNA Mini; QIAGEN 社)を用いて DNA を精製し、Luminex を使用した reverse sequence-specific oligonucleotide with polymerase chain reaction(PCR-rSSO)法(ジェノサーチ ABO; MBL 社)と PCR-sequence specific primer(SSP)法により ABO 遺伝子型を判定した。ABO 遺伝子型と B^m 遺伝子型を検出する 2 種類の PCR-SSP 法は伊藤ら⁵⁾

と伊佐ら⁶⁾の報告に従って行い、表 1 にプライマー配列を示した。PCR 条件は ABO-SSP では Platinum™ Taq (ThermoFisher Scientific 社)、B_m-SSP では rTaq(タカラバイオ社)を用い、熱変性 94℃ で 3 分、35 サイクルで熱変性を 94℃ で 15 秒、アニーリングと伸長を 60℃ で 30 秒または 1 分で行ない、72℃ で 5 分のインキュベーションを加えて増幅した。B 遺伝子の解析は、ペプチド核酸(PNA)プライマーを用いたクランピング PCR²⁾により増幅し、直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

結 果

B_m型と AB_m型の ABO 遺伝子型

PCR-rSSO 法と PCR-SSP 法により B_m型 33 例と AB_m型 16 例の ABO 遺伝子型を調べた結果を表 2 に示した。PCR-rSSO 法ではすべての B 遺伝子が ABO*B.01 と判

表2 PCR-rSSO法とPCR-SSP法によるB_m型とAB_m型のDNAタイピング結果

表現型	PCR-rSSO	ABO-SSP	B _m -SSP	
			+	-
B _m (n=33)	ABO*B.01/ABO*O01.01	B/O	16	1
	ABO*B.01/ABO*O01.02	B/O	16	0
AB _m (n=16)	ABO*A1.01/ABO*B.01	A/B	1	0
	ABO*A1.02/ABO*B.01	A/B	15	0

表3 イントロン1に5.8kb欠失を認めなかったB_m型の血清学的性状

検体	オモテ検査		ウラ検査		転移酵素		唾液試験		Lewis血液型
	抗A	抗B	A血球	B血球	A	B	B	H	
発端者	-	-	+	-	-	64	+	+	Le(a-b+)
対照B	-	+	+	-	-	128	+	+	Le(a-b+)

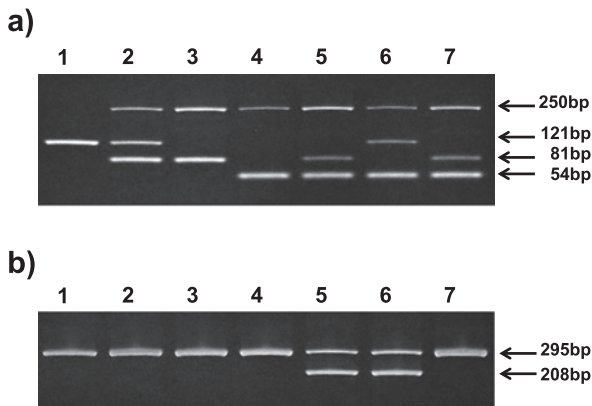


図2 PCR-SSP法による解析例

a) ABO-SSP, 1~6: コントロール (A/A, A/O, O/O, B/B, B/O, A/B). 7: B_m型発端者. b) B_m-SSP, 1~4: 通常表現型 (A/A, O/O, B/B, A/B). 5: 対照B_m型 (B^m/O), 6: 対照AB_m型 (A/B^m), 7: B_m型発端者

定され、既知のB型遺伝子は認められなかった。ABO-SSP法でもそれぞれB/OまたはA/Bと判定された。一方、B_m-SSP法ではB_m型32例、AB_m型16例に5.8kbの欠失を認めたが、PCR-rSSO法でABO*B.01/ABO*O1.01と判定された1例(以下発端者)に欠失は認められなかった。図2に発端者のPCR-SSP法による解析結果を示した。

血清学的精査

表3に発端者の血清学的精査結果を示した。オモテ検査O型、ウラ検査B型で、抗B試薬による吸着解離試験でB抗原が確認された。血漿中のB型糖転移酵素活性はほぼ対照のB型に近い値を示し、唾液中にはB型物質とH型物質が認められた。Lewis血液型はLe(a-b+)であった。以上の結果より発端者はB_m分泌型と判定された。

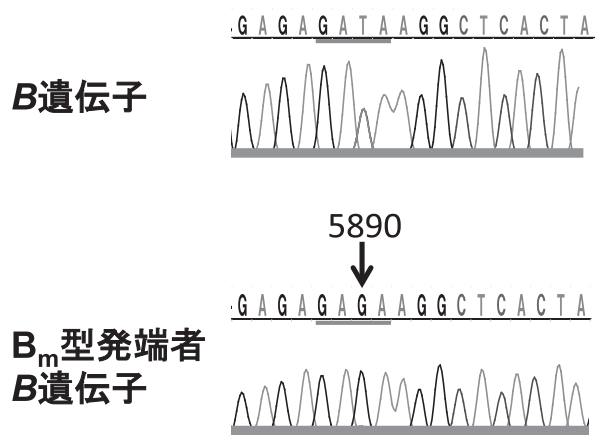


図3 B_m型発端者のB遺伝子に認められたGATAモチーフの変異

B遺伝子解析

直接シーケンス法により発端者のABO遺伝子を調べたところ、プロモーター⁷⁾、エキソンおよびエキソン-イントロン周辺には変異が認められなかった。一方、データは示さなかったが、直接シーケンスによりイントロン1の転写制御領域を調べた結果、エンハンサー配列に存在する2つのGATAモチーフのうち3'側のGATAモチーフがT/Gヘテロで認められた。そこで、PNAクラッピングPCRによりB遺伝子を特異的に増幅し塩基配列を調べた結果、B遺伝子にGATA>GAGA変異があることが確認された(図3)。

考 察

ABO血液型には多くの型が存在し、日本人ではB_m型が最も高い頻度で検出される。B_m型は1961年にLiottaら⁸⁾によって報告され、WienerとGordonにより報告されたA_m型⁹⁾に類似した型である。血清学的性状は他

の亜型と異なり、赤血球上の B 抗原は吸着解離試験でのみ証明されるほど微量であるにもかかわらず、唾液中の B 型物質は通常の B 型と同等に認められた。

1990 年に Yamamoto ら¹⁰⁾¹¹⁾によって ABO 遺伝子が単離されたことにより ABO 亜型遺伝子の解析が進み、今日まで主にエキソンやエキソン-イントロン周辺に変異を持つ 250 種類以上もの亜型遺伝子が報告されている¹²⁾。しかし、B_m 型については翻訳領域やスプライシング部位に変異は認められず、通常の B 遺伝子(ABO* B.01)と同じ塩基配列であり、表現型と遺伝子型の相互関係は不明であった。

最近、Sano ら¹⁾は ABO 遺伝子の DNase I 高感受性領域を調べ、ABO 遺伝子のイントロン 1 に赤血球系細胞に特異的な転写エンハンサー活性を示す領域があることを報告した。このエンハンサー領域は 502 塩基からなり、2 カ所に GATA モチーフを有する。さらに、ほぼすべての B_m 型や AB_m 型はイントロン 1 に約 5.8kb の欠失を生じており、エンハンサー領域も欠損していることが分かった。これらの結果から B_m 型の血清学的特性は、赤血球系細胞に特異的な転写エンハンサーの欠損に起因することが示された。一方、5.8kb の欠失を有しない B_m 型が 73 例中 1 例検出され、エンハンサー領域を調べたところ、GATA モチーフのうち 3' 側のモチーフが GAGA に変異していることが分かった²⁾。この変異によって転写エンハンサー活性が消失することが示されたが、非分泌型であったため、B_m 型に特徴的な唾液中の型物質の存在を確認することはできなかった。

今回、合計 49 例の B_m 型と AB_m 型を解析した結果、48 例にエンハンサー領域を含む 5.8kb の欠失を認めたが、1 例には認められなかった。この発端者は、唾液抑制試験を含む血清学的試験により、分泌型の B_m 型と判定された。さらに、B 遺伝子のエンハンサー領域を調べたところ、以前報告された 1 例と同様に 3' 側の GATA モチーフに GATA>GAGA 変異が認められた。したがって、この変異は赤血球 B 抗原の発現を低下させるが、唾液中の B 型物質には影響しないことが確認された。

ABO 遺伝子のエンハンサー領域に GATA 変異を有する B_m 型はまれであり、本邦 2 例目であるが、地域性については不明である。今後も B_m 遺伝子検査を継続し、九州地区における遺伝的背景を明らかにしたい。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Sano R, Nakajima T, Takahashi K, et al: Expression of ABO blood-group genes is dependent upon an erythroid cell-specific regulatory element, which is deleted in persons with the B_m phenotype. *Blood*, 119: 5301—5310, 2012.
- 2) Nakajima T, Sano R, Takahashi Y, et al: Mutation of the GATA site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in a B_m subgroup individual. *Transfusion*, 53: 2917—2927, 2013.
- 3) Takahashi Y, Isa K, Sano R, et al: Deletion of the RUNX1 binding site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in two individuals with the A_m phenotype. *Vox Sang*, 106: 167—175, 2014.
- 4) Sano R, Kuboya E, Nakajima T, et al: A 3.0-kb deletion including an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 of the ABO blood group gene in an individual with the B_m phenotype. *Vox Sang*, 108: 310—313, 2015.
- 5) 伊藤正一, 荻山佳子, 大場利香, 他: Multiplex-PCR 法を用いた ABO 遺伝子型タイピングシステム. *血液事業*, 27: 302, 2004.
- 6) 伊佐和美, 小笠原健一, 佐々木佳奈, 他: 日本人の B_m 型に関する遺伝子の解析. *日本輸血細胞治療学会誌*, 59: 281, 2013.
- 7) Kominato Y, Tsuchiya T, Hata N, et al: Transcription of human ABO histo-blood group gene is dependent upon binding of transcription factor CBF/NE-Y to minisatellite sequence. *J Biol Chem*, 272: 25890—25898, 1997.
- 8) Liotta I, Russo G, Gandini E: A sample of B_m blood. *Vox Sang*, 6: 698—705, 1961.
- 9) Wiener AS, Gordon EB: A hitherto undescribed human blood group. *Am. Brit J Haemat*, 2: 305, 1956.
- 10) Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, et al: Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuco1→2Galα1→3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem*, 265: 1146—1151, 1990.
- 11) Yamamoto F, Clausen H, White T, et al: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, 345: 229—233, 1990.
- 12) Blood Group Gene Antigen Mutation Data Base: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmutsystems_alleles&system=abo (2016 年 6 月現在).

DETECTION OF A GATA>GAGA MUTATION IN THE ERYTHROID CELL-SPECIFIC ENHANCER ELEMENT OF THE *ABO* GENE IN A SECRETOR EXHIBITING THE B_m PHENOTYPE

*Hisayoshi Yamasaki*¹⁾, *Kazumi Isa*²⁾, *Kenichi Ogasawara*²⁾, *Seishi Watanabe*¹⁾,
*Iwane Sakoda*¹⁾, *Kazuo Irita*¹⁾³⁾ and *Hiroyuki Kiyokawa*¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Kyushu Block Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Central Blood Institute

³⁾Saga Red Cross Blood Center

Abstract:

The B_m and AB_m phenotypes are the most prevalent ABO subgroups in Japanese and are produced via the partial deletion of intron 1 of the *B* gene. The deleted section is 5.8-kb long and includes a transcription enhancer element, which contains 2 GATA motifs. A case in which an individual who exhibited the B_m phenotype displayed a GATA>GAGA mutation, but not the abovementioned deletion in the transcription enhancer element, has been reported. The individual's serological properties were similar to those of the typical B_m phenotype, but B antigen could not be detected in their saliva because they were a non-secretor.

Here, we report a novel case in which a secretor who exhibited the B_m phenotype was found to be carrying a GATA >GAGA mutation in the *B* gene. This mutation reduced the expression of B antigen on red blood cells, but did not affect the amount of B antigen in the subject's saliva.

Keywords:

B_m phenotype, enhancer element, GATA>GAGA mutation, secretor