PCR-RFLP 法を用いた ABO 式血液型の遺伝子解析

岩崎 誠¹⁾ 小林 賢¹⁾ 鈴木 洋司²⁾

関口 進¹⁾ 太田 正穂³⁾

¹⁾防衛医科大学校検査部, ²⁾同 輸血部, ³⁾信州大学医学部法医学教室

(平成 4 年12月28日受付)

THE GENOTYPING OF ABO-BLOOD GROUP BY PCR-RFLP METHOD

Makoto Iwasaki¹⁾, Ken Kobayashi¹⁾, Hiroshi Suzuki²⁾, Susumu Sekiguchi¹⁾ and Masao Ohta³⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine and ²⁾Department of Blood Transfusion, National Defense Medical College

³⁾Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine

We analysed ABO genotype by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) at the four points of coding region (261, 526, 703 and 796 at cDNA). In 1990, Yamamoto et al, reported that nucleotide position 261 is the deletion site for O allelic cDNA and nucleotide position 526, 703 and 796 are the site where nucleotide substitutes take place between the coding regions of cDNA for A and B transferases.

We collected blood samples from 90 Japanese healthy adults consisted of 25 A-type, 23 B-type, 25 O-type, and 17 AB-type.

In 88 cases of 90, we could define the ABO genotype utilizing PCR-RFLP at the deletion position (nucleotide position 261) and at the nucleotide position 526 corresponding to the first amino acid substitution.

In the rest of 2 cases, A alleles showed the B allelic pattern at the nucleotide position corresponding both to the first and second amino acid substitution (nucleotide position 526 and 703, respectively).

But all A alleles showed the identical pattern at the nucleotide position 796 corresponding to the third amino acid substitution as Yamamoto et al. showed. A single base deletion was recognized in O allelic cDNA without exception so far.

These results suggest that it is necessary to test not only the first amino acid substitution but also the second and third amino acid substitutions for the precise diagnosis of ABO genotype.

序 言

ABO 式血液型は、1900年に Landsteiner¹⁾によって発見されて以来、血清反応によって決定されている。しかし、亜型、疾患等による型変異においては判定が困難な場合もあり、現在の検査法においては限界がある。ところが、1990年に Yamamoto らにより A 型糖転移酵素の cDNA がクローニングされ²⁾、さらに B、O についても cDNA の全塩基配列が報告された³⁾。その報告によると A、B 各 alleles の cDNA では、7 カ所の塩基置換と 4 カ所のアミノ酸置換が、O alleles の cDNA においては、単一塩基の欠失が示されてい

る。これらの多形性を用いることにより、血液型の遺伝子診断が可能になるものと思われる。そこで今回我々は、Yamamoto らの報告とは異なる独自の primers を作成し、PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) を用いて ABO 式血液型の遺伝子解析を試み、その有用性について検討したので報告する。

対象と方法

1) 対象

健康成人 A 型25名、B 型23名、O 型25名、AB 型17名の計90名を対象とした。

2) DNA の抽出

健康成人のヘパリン加血10mlを10mM Tris HCl (pH 7.6), 5mM MgCl₂, 10mM NaClを用いて溶血しPBSで洗浄後, 10mM Tris HCl (pH 7.6), 50mM NaCl, 10mM EDTA (pH 8.0), 0.1%SDS と100μg/ml proteinase Kを加え42℃で一晩反応させた。次にフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを加えて蛋白を除去した後, イソプロピルアルコールを加えて, DNAを析出させた。

3) PCR

高分子DNA 500ngをテンプレートとし, Taq DNA polymerase (BioTech) 1単位を用いてPCR法で増幅した。PrimerとしてはA, Bで異なる526番目をはさむABO52NとABO32N, さらにA, Bで塩基配列の異なる703, 796番目をはさむABO57とABO38は独自に作成したものであり, cDNAの塩基配列においてOで1塩基の欠失がみられる261番目をはさむABO56とABO36については, Yamamotoらの報告⁴⁾におけるfy57とfy46のprimersを改変したものである。以上計3組のprimersを用いた(表1)。反応混合物は上記のTaq DNA polymeraseおよびprimersにdNTP 200μM, MgCl₂ 2.0mMを加えて50μlとした。増幅条件は, denaturation 96℃, 1分, annealing 57℃, 1分, extension 72℃, 1分で30 cyclesとし, アステック社製PC-700を用いて実施した⁵⁾。反応産物は限外濾過膜(Ultrafree C3LTK Millipore社製)を用いて精製した。

4) 制限酵素による切断

増幅したDNA反応液5μlを制限酵素 *Ban* I, *Bss* H II, *Kpn* I, *Bst*E II, *Msp* I, *Alu* Iそして

Mva I (Boehringer Mannheim, New England Bio Labs)を用いて切断した。制限酵素は5単位を用い, 37℃で一晩反応させた。尚 *Bss* H IIに関しては至適反応温度は50℃とされているが, 我々の基礎実験で切断効果の良好だった37℃で実施した。切断後1×TBE緩衝液(100mM Tris, 100mM boric acid, 2mM EDTA・2Na)を用いて3% NuSieve agarose+1%agarose上で, ミューピッド泳動装置を用いて電気泳動した。臭化エチジウムを用いて染色した後, 切断パターンを検討した。

結 果

1) PCR 産物

ABO56とABO36のprimersを用いてPCRを実施した結果, cDNAの塩基配列から予想される255bp(ただしO allelesの場合は254bp)の単一のフラグメントが, すべての血液型において増幅された。同様にABO52NとABO32Nのprimersを用いた場合は, 285bpの単一のフラグメントがそしてABO57とABO38のprimersを用いた場合は, 242bpの単一のフラグメントが, すべての血液型において観察された。

2) 制限酵素による切断パターン

(a) primers ABO56とABO36を用いた場合

増幅したDNAを制限酵素 *Kpn* Iで切断すると, O allelesのみが167と88bpの2つのフラグメントに切断された(図1a)。同じく制限酵素 *Bst*E IIで切断した結果, A, B各 allelesは172と83bpの2つのフラグメントがそれぞれ観察された(図1b)。

(b) primers ABO52NとABO32Nを用いた場合

増幅されたDNAを制限酵素 *Bss*H IIで切断し

表1 Primers一覧

Primers	Sequences	PCR products
ABO52N	GTGGCTTTCCTGAAGCTGTTC	285 bp
ABO32N	GCCACGTGGTCCCGGAATC	
ABO56	CACCTGCAGATGTGGGTGGCACCTGCCA	255 bp (ただし O allele は 254 bp)
ABO36	GTGGAATTCACTCGCCACTGCCTGGGTCTC	
ABO57	TTCCTCAGCGAGGTGCATTAC	242 bp
ABO38	AGCCGCTGCACCTCTTGCAC

図1 各種制限酵素による切断パターン (1)

a. *KpnI* で切断した場合. b. *BstE II* で切断した場合. c. *BssH II* で切断した場合. d. *BanI* で切断した場合.

lane 1: pUCBM21 DNA/*Hpa II* + *Dra I* + pUCBM 21 DNA/*Hind III*, lane 2: PCR した DNA (a.b.は Primers ABO56, ABO36を, c.d.は Primers ABO52N, ABO32N を使用), lane 3: AA type, lane 4: BB type, lane 5: OO type.

た結果, A, O 各 alleles では147及び138bp の2つのフラグメントがそれぞれ見られた(図1c). 制限酵素 *Ban I* で切断したところ, AA, AO, OO は189と96bp の2つのフラグメントが, BB は137, 96と52bp の3つのフラグメント, また AB 及び BO では189, 137, 96と52bp の4つのフラグメントが得られた(図1d).

A, B alleles において塩基526番目(アミノ酸の第一置換点に相当)をはさむ primers ABO52N と ABO32N で PCR により増幅された DNA を, *BssH II* あるいは *Ban I* で切断したところ, A 型, AB 型において A alleles が B alleles の切断パ

ターンを示すものが, 各1例ずつ発見された.

(c) primers ABO57と ABO38を用いた場合
制限酵素 *Msp I* で切断した場合, A, O alleles のみアミノ酸配列の第二置換点(塩基703番目)で切断された, A, B, O 各 alleles 共通の切断部位を含め, A, O 各 alleles では104, 95, 24と19bp の4つのフラグメントが, B alleles では123, 95と24bp の3つのフラグメントが得られた(図2a). また制限酵素 *AluI* で切断した場合には, B alleles のみアミノ酸配列の第二置換点で切断され, 135と107bp の2つのフラグメントが得られた(図2b). しかし第一置換点において B alleles の切断パ

図2 各種制限酵素による切断パターン (2)

a. *Msp*I で切断した場合. b. *Alu* I で切断した場合. c. *Mva*I で切断した場合.
lane 1 : pUCBM21 DNA/*Hpa* II + *Dra* I + pUCBM21 DNA/*Hind* III, lane 2 : PCR した DNA
(Primers ABO57, ABO38 を使用), lane 3 : AA type, lane 4 : BB type, lane 5 : OO type.

ターンを示した A alleles は, 第二置換点においても同様に B alleles のパターンを示した.

次に第三置換点 (塩基796番目)を確認するために制限酵素 *Mva*I で切断すると, A, O 各 alleles は第三置換点で切断された. A, B, O 各 alleles 共通の切断部位を含めて, A, O 各 alleles は138, 43,

39と22bp の4つのフラグメントが, B alleles では138, 82と22bp の3つのフラグメントが得られた (図2c). 第一, 第二置換点において B alleles の切断パターンを示した A alleles は, 第三置換点においては予想される通りの A alleles パターンを示した (図3).

図3 新たに見出された制限酵素による切断パターン

a. 通常パターンを示している AO type. b. 通常パターンを示している BO type. c. 塩基523, 700番目 (アミノ酸の第一, 二置換点に相当) において A alleles が B alleles のパターンを示した AO type.
lane 1 : pUCBM21 DNA/*Hpa* II + *Dra* I + *Hind* III, lane 2 : PCR した DNA (Primers ABO52N, ABO32N を使用), lane 3 : *Ban* I, lane 4 : *Bss*H II, lane 5 : PCR した DNA (Primers ABO57N, ABO38 を使用), lane 6 : *Msp* I, lane 7 : *Alu* I, lane 8 : *Mva* I.
▽ : アミノ酸の第一置換点において AO が BO パターンを示している. ▼ : アミノ酸の第二置換点において AO が BO パターンを示している.

考 察

1990年に, Clausen らは肺からヒトの A 型糖転移酵素と思われる蛋白質を精製し⁶⁾, Yamamoto らはそのアミノ酸配列に基づき, この蛋白質の cDNA のクローニングを行っている. その結果 A 型糖転移酵素の cDNA は, 354 アミノ酸残基をコードする 1065 塩基対からなることが判明している. さらに Yamamoto らは, クローン化した A 型糖転移酵素 cDNA をプローブとして, B 型抗原と H 型抗原を発現している培養細胞系の mRNA より作成した cDNA ライブラリーをスクリーニングし, 各 alleles の cDNA をクローニングしている. それによると A 型糖転移酵素と B 型糖転移酵素の cDNA 塩基配列では 7 カ所の塩基が異なっており (297, 526, 657, 703, 796, 803, 930 番目), アミノ酸配列では 176, 235, 266 及び 268 番目のアミノ酸が, それぞれ, Arg → Gly, Gly → Ser, Leu → Met 及び Gly → Ala に置換されていることが推定されている. 一方 O 型の cDNA 塩基配列では A 型糖転移酵素 cDNA の 261 番目の 1 塩基が欠失し, よって frame-shift が起こりコドン 118 に TAA (終止コドン) が出現し, 117 アミノ酸残基の蛋白が翻訳されている. 以上の塩基置換の存在を Yamamoto らは, PCR-RFLP 法及び Southern Hybridization 法を用いて, ABO 式血液型の判明している DNA で確認している.

今回我々は, Yamamoto らが報告した A, B 型糖転移酵素と O 型の cDNA の塩基配列をもとに, 効率の良い exon 上の primers を作成した. ただし O の欠失部位については, exon 上で効率の良い primer が認められなかったため, Yamamoto らの primers を改変した. まず O alleles において 1 塩基の欠失が認められる 261 番目の塩基配列と, A, B alleles においてアミノ酸配列の第一置換点である 526 番目の塩基配列の違いについて PCR-RFLP 法を用いて実施し, O alleles における 1 塩基の欠失は, 我々が実施し得たすべての samples において確認された. しかし, A, B alleles の 526, 703 番目の塩基配列の違いについては, 一部の samples において異なる配列が認められた.

また Yamamoto ら⁴⁾は, 4 カ所あるアミノ酸置換の内いずれが A 型転移酵素と B 型転移酵素の活性に関与しているかを DNA 形質導入法で調べた結果, 最後の 2 カ所が糖供与体への特異性に重要な役割を果たしているらしいと報告している. 我々が PCR-RFLP 法を用いて血液型の遺伝子診断を実施した結果でも A alleles の第一, 第二置換点では例外が認められているが, 第三置換点では今までのところ例外が認められていない. 以上のことより O における欠失部位と A, B におけるアミノ酸の第一置換点を確認すれば, 血液型の遺伝子診断は多くの症例では可能であるが⁷⁾, より正確な遺伝子診断を実施するためにはさらに第二, 三置換点を確認することが必要になると思われる. また Johnson ら⁸⁾がヨーロッパ人においては, 四種類の O alleles 及び二種類の B alleles が認められることを報告していることから, 血液型においてもかなりの多形性が存在することが考えられるので, 今後は塩基配列を確認すると共に, 亜型との関連性についても検討する予定である.

文 献

- 1) Landsteiner, K.: Zur Kenntnis der antimentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Zentralbl. Bakteriologie, 27: 357-362, 1900.
- 2) Yamamoto, F., et al.: Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-Gal NAc: Fuc α 1 → 2 Gal NAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. J. Biol. Chem., 265: 1146-1151, 1990.
- 3) Yamamoto, F., et al.: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. Nature, 345: 229-233, 1990.
- 4) Yamamoto, F., et al.: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferase is based on amino acid substitution. J. Biol. Chem., 265: 19257-19263, 1990.
- 5) Saiki, R.K., et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230: 1350-1354, 1985.
- 6) Clausen, H., et al.: Isolation of homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined Fuc α 1 → 2 Gal α 1 → 3 N-acetylgalactosaminyl-transferase from human

- lung tissue. J. Biol. Chem., 265: 1139—1145, 1990.
- 7) 島 正幸, 他: Polymerase Chain Reaction (PCR)を用いた ABO 血液型判定の試み. 日輸血会誌, 38: 542—547, 1992.
- 8) Johnson, P.H., et al.: Detection of ABO blood group polymorphism by denaturing gradient gel electrophoresis. Hum. Mole. Genet., 1: 341—344, 1992.
-