〔シンポジウム：遺伝子を追う〕

血液型抗原の発現とその遺伝子

梶 井 英 治

はじめに

ABO システム血液型の発見 (Landsteiner¹⁾, 1901 年) を端緒とした赤血球型研究は、約 1 世紀を経た現在、大きい転換期を迎えている。1980 年代に急速な進歩を遂げた分子生物学は、人類の研究史上に類を見ないスピードで各研究分野へ浸透していった。赤血球型研究の分野でも例外ではなく、MN システム血液型抗原をコードするグリコフォリン A-cDNA のクローニング成功 (Siebert & Fukuda²⁾, 1986 年) は、まさに新時代の幕開けといえよう。そして、1990 年 Yamamoto ら^{3,4)} により、A 型転移酵素の cDNA はクローニングされ、それに基づき ABO システムの遺伝子座における多型の分子機構も明らかにされた。この ABO システムに関する分子生物学的知見は、各種 ABO 亜型の遺伝子解析に応用され、それらの遺伝学背景も次々とベールを脱ぎはじめた⁵⁾。しかし、他の多くの赤血球型遺伝子の解析は、必ずしも順調に展開しているとはいえない。その最大の原因は、核をもたないヒト赤血球から mRNA を抽出できないことに由来すると考えてよからう。

さて、赤血球膜物質は、未分化な前駆細胞を経て成熟赤血球に至る間にダイナミックな変容を示す。かつて、赤血球型物質に関する研究は、おもに末梢血の膜物質を対象としていた。しかし、Wada ら⁶⁾ の開発した選択的液体培養法は、赤血球前駆細胞における多様な赤血球型抗原の継時的モニターを可能にし、赤血球型研究に新しい展開をもたらした。同時に、この新培養法の開発により、赤血球型遺伝子解析の最大の障害となっていた赤血球関連 mRNA の入手難にも解決の兆しは見えた。

本稿では、赤血球前駆細胞の選択的液体培養法を用いた赤血球型の新しい分子生物学的解析システムの概要に

ついて、Rh システムを素材として紹介する。

赤血球前駆細胞の選択的液体培養法

ヒト末梢血中に存在する赤血球前駆細胞の BFU-E を培養し分化成熟させる選択的液体培養法は、Wada ら⁶⁾ の方法に従い行った。

単核細胞は、ヘパリン化末梢血液 25 ml を 15 ml のリンホセパール I (免疫生物研究所) 上に重層し、室温にて 500 g, 30 分間遠心した後、その中間層より分離した。得られた単核細胞は、Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; GIBCO 社, 米国) にて 2 回洗浄後、5% phytohemagglutinin 刺激ヒト白血球培養上清 (PHA-LCM), 10% ウシ胎児血清 (FCS; Flow 社, 豪州) を含む IMDM に浮遊させた。細胞数は $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、25 cm² の組織培養フラスコ (岩城硝子) を用いて、5% CO₂, 37°C 下に 5 日間培養した (培養第 1 相)。なお、PHA-LCM は、末梢血単核細胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) を 1% PHA と 10% FCS を含む IMDM に浮遊させ、5% CO₂, 37°C 下に 7 日間培養して得られた上清を用いた。培養第 1 相終了後、培養細胞を IMDM にて $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整し、カルボニル鉄により貪食細胞を除去した。

培養第 2 相では、培養細胞中の非貪食細胞を細胞数 $1 \times 10^6/\text{ml}$ となるように 30% FCS, 1% ウシ血清アルブミン (Sigma 社, 米国), 10^{-5} M 2-メルカプトエタノール, トランスフェリン (Sigma 社) 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, エリスロポエチン (雪印乳業) 2 U/ml を含む IMDM に浮遊させ、5% O₂, 5% CO₂, 37°C 下で再培養した。培養細胞はサイトスピン後、ライト・ギムザ染色を行った。

培養第 2 相の培養細胞を継時的に観察した結果、Fig. 1 に示すように、赤血球への分化成熟が観察された。培養

Molecular identification of blood group antigens.

Eiji Kajii; 自治医科大学法医学人類遺伝学講座

Correspondence address: Eiji Kajii, Department of Legal Medicine and Human Genetics, Jichi Medical School, 3311-1, Yakusiji Minami Kawachi, Tochigi 329-04, Japan.

Fig. 1. Erythroid differentiation at the second phase of the liquid culture.

The cultured cells were stained with Wright-Giemsa stain solution. (A) Proerythroblast on day 1 of the second phase; (B) basophilic erythroblasts on day 3; (C) basophilic and polychromatic erythroblasts on day 5; and (D) orthochromatic erythroblasts and denatured erythrocytes on day 8.

第二相 day 0 においては、芽球が 99.9% を占め、一方、赤血球系細胞は day 1 に前赤芽球と好塩基性赤芽球、day 4 に多染性赤芽球、day 5 に正染性赤芽球、そして day 6 に赤血球の出現を認めた。培養第二相 day 2, 4, 6, 8 における赤血球系細胞の比率は、それぞれ 5.5 ± 1.0 , 31.4 ± 8.0 , 66.2 ± 8.1 , 88.0 ± 3.9 (%) であった。

赤血球型抗原の発現

培養第二相の培養細胞は、各赤血球型に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用い、橋本ら⁷⁾の方法に従い、フローサイトメトリー解析を実施した⁸⁾ (Fig. 2). A, B, Rh (D) 抗原陽性者由来の A, B, Rh (D) 抗原は、Fig. 3 に示すように day 2 に若干出現し、A, B 抗原は day 6 に、Rh (D) 抗原は day 8 にほぼプラトーに達した。O (H) 抗原は、day 4 にピークを形成し、その後漸減した。なお、A 型赤血球と B 型赤血球に反応し、O 型赤血球とは反応しないモノクローナル抗 A + B 抗体により検討すると、A + B 抗原は A, B 抗原とほぼ同様の発現カーブを描いた。

MN システムの M, N 抗原、Kell システムの k 抗原

は、いずれも Rh (D) 抗原と類似の発現カーブを示した。一方、Duffy システムにおいて Fy (a+b-) を示す健康人由来の培養細胞では、Fy^a 抗原のみならず、Fy^b 抗原の発現も認められた。すなわち、まず Fy^b 抗原が出現し day 6 にピーク形成後、漸減消失した。そして、Fy^b 抗原の減少と交差するように Fy^a 抗原の急速な増加を認めた。この現象は、抗原発現の化学的背景を暗示するものかもしれない。

このように、各種赤血球型抗原の発現を検討した結果、それぞれの抗原に特徴的な発現カーブを認めた⁸⁾。これらの抗原発現カーブのパターンを認識することは、各抗原の発現機序を解析していくうえにきわめて重要と思われる。

A 抗原ならびに B 抗原陽性者由来の培養液中にそれぞれ抗 A 抗体、抗 B 抗体を添加すると、赤血球前駆細胞の分化、成熟は著しく抑制され、A, B 抗原の細胞分化への関与が強く示唆された。今後、選択的液体培養法は血液型と赤血球前駆細胞の分化、増殖との関係について、重要な情報を提供してくれるものと期待される。

Fig. 2. Analysis of monoclonal anti-RhD antibody against erythroid cultured cells on days 0, 5, and 9 of the second phase by indirect immunofluorescence on the spectrum III. Antibody-reactive cells are divided into two populations: unreactive (1) and reactive (2).

Fig. 3. Expression of A, B, H, and Rh (D) antigens on the cultured cells in the second phase of liquid culture.

赤血球型遺伝子の解析システム

赤血球型抗原物質の遺伝子解析を目的に、各種の抗原が発現する選択的液体培養第二相の day 5 に、培養細胞から全 RNA を抽出した⁹⁾。得られた全 RNA 中に、赤血球型物質をコードする mRNA が存在するか否かを確認するために、すでに cDNA のクローニングされているグリコフォリン A について検討した。まず、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)¹⁰⁾を行った。すなわち、全 RNA から oligo-d (T)₁₆ を用いて cDNA を合成した後、PCR 法により増幅した。得られた二本鎖 DNA に対して、インナー・プライマーによる非対称 PCR¹¹⁾を行い、一本鎖 DNA を作製した。得られた一本鎖 cDNA を鋳型として、ジデオキシ法¹²⁾による直接塩基配列決定法を実施した結果、グリコフォリン A をコードする 2 種類の cDNA が同定された。これらの cDNA は、Siebert & Fukuda²⁾の報告したグリコフォリン A-cDNA のクローニングデータと比較したところ、それぞれ MN システム血液型の M 抗原と N 抗原をコードするクローンと判明した。

そこで、選択的液体培養法により得られる培養細胞の mRNA を基礎とした赤血球型遺伝子解析システムを開発した^{9,13)}。このシステムは、RT-PCR の系と、cDNA ライブラリースクリーニングの系より構成される。前者は、培養細胞の mRNA に対する RT-PCR、そして増幅された cDNA に対するサブクローニング、塩基配列決定、制限酵素マッピング、一本鎖高次構造多型などの系統的赤血球型多型分析である。後者で使用する培養細胞由来 cDNA ライブラリーは、ZAP II ベクターにより作製した。この cDNA ライブラリー中には、グリコフォリン A、後述の Rh ポリペプチド、バンド 4.2 蛋白な

どをコードする cDNA が確認され、さらに他の血液型物質をコードする cDNA のクローニングを進めている。

Rh ポリペプチド-cDNA のクローニング

Rh システムの抗原系は、かつては各種の蛋白分解酵素に対する抵抗性から推論し、糖脂質系抗原群に属すると考えられていた。しかし、免疫沈着法により、Rh (D) 抗原分子は分子量約 30~32 kDa のポリペプチド分画に、他の Rh 抗原もほぼ同一の分画に回収されたことにより、蛋白系抗原と判明した^{14,15)}。Blanchard ら¹⁶⁾は、ペプチドマッピングにより、Rh 抗原系は互いに類似した基本構造を有することを示した。そして、Bloy ら¹⁷⁾は Rh ポリペプチドの N 末端アミノ酸配列を 32 位まで決定し、さらにこの配列は Rh (D), Rh (E), Rh (c) 抗原などのポリペプチドに共通であることを提示した。

Chérif-Zahar ら¹⁸⁾は、この N 末端配列をもとに、Rh ポリペプチドをコードする cDNA クローンのクローニングに成功した。また、Avent ら¹⁹⁾も、ほぼ同時期に同一の cDNA クローンを発表した。

ついで、著者ら²⁰⁾も Rh ポリペプチドをコードする二つの cDNA クローンをクローニングし (Fig. 4)、それぞれを仮に RhP I, RhP II cDNA と名づけた。これらのクローンは、1251 塩基からなる蛋白コード領域を有し、Chérif-Zahar ら¹⁸⁾、Avent ら¹⁹⁾の報告した Rh ポリペプチド-cDNA に比べ、RhP I cDNA は 1 塩基置換、RhP II cDNA では 41 塩基の置換を認めた (Fig. 5)。前者にはアミノ酸置換はなく、後者に 31 個のアミノ

Fig. 4. Demonstration of the characteristic sequence differences of two subcloned cDNAs encoding Rh polypeptide.

```

ATGAGCTCTAAGTACCCGCGGTCTGTCCGGCGCTGCCTGCCCTCTGGGCCCTAACACTG 60
GAAGCAGCTCTCATTCTCTCTTCTATTTTTTTTACCCACTATGACGCTTCCTTAGAGGAT 120
CAAAGGGGCTCGTGGCATCCTATCAAGTTGGCCAAGATCTGACCGTGATGGCAGCCGTT 180
GGCTTGGGCTTCCTCACCTCAGATTTTCCGGAGACACAGCTGGAGCAGTGTGGCCTTCAAC 240
CTCTTCATGCTGGCGCTTGGTGTGCAGTGGGCAATCCTGCTGGACGGCTTCCTGAGCCAG 300
TTCCCTCCTGGGAAGGTGGTCACTCACACTGTTTCAGTATTCCGGCTGGCCACCATGAGTGTCT 360
ATGTGCGGTCTGATCTCAGCGGATGCTGTCTTGGGGAAGGTCAACTTGGCGCAGTTGGTG 420
GTGATGGTCTGGTGGAGGTGACAGCTTTAGGCACCCTGAGGATGGTCATCAGTAATATC 480
TTCAACACAGACTACCACATGAACCTGAGGCACTTCTACGTGTTGCGAGCCTATTTTGGG 540
CTGACTGTGGCCTGGTGCCTGCCAAGCCTCTACCCAAGGGAACGGAGGATAATGATCAG 600
AGGGCAACGATACCCAGTTTGTCTGCCATGCTGGGCGCCCTCTTCTGTGGATGTTCTGCG 660
CCAAGTGTCAACTCTCCTCTGCTGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGAATGCCATGTTCAAC 720
ACCTACTATGCTCTAGCAGTCAGTCTGGGTGACAGCCATCTCAGGGTCATCCTTGGCTCAC 780
CCCCAAAGGAAGATCAGCATGACTTATGTGCACAGTGGGTGTGGCAGGAGGCGTGGCT 840
GTGGGTACCTCGTGTACCTGATCCCTTCTCCGTGGCTTGCCATGGTGTGGGTCTTGTG 900
GCTGGGCTGATCTCCATCGGGGGAGCCAAGTGACCTGCCGGTGTGTTGTAACCGAGTGTCTG 960
GGGATTCACCACATCTCCATCACTCCATCTCAGCTTGTCTGGGTCTGCTTGGAGAG 1020
ATCACCTACATTGTGTCTGCTGGTGTGATACTCTCTGGAAGAGCGCGGCAATGGCATGATTGGC 1080
TTCCAGGTCCTCCTCAGCATTGGGGAACCTCAGCTTGGCCATCGTGATAGCTCTCACGTCT 1140
GGTCTCCTGACAGGTTTGTCTCCTAAATCTTAAAATATGAAAGCACCTCATGTAGGCTAAA 1200
TATTTTGATGACCAAGTTTTCTGGAAGTTTCTCATTTGGCTGTTGGATT 1251

```

Fig. 5. The nucleotide sequences of the RhP I (upper) and RhP II (lower) cDNA clones.

Numbers refer to the number of nucleotides counting from the proposed initiation ATG codon of the cDNAs. The RhP I cDNA demonstrates a single nucleotide substitution of A for G at nt174 with no amino acid substitution in comparison with the previously published sequence. Compared with the RhP I cDNA, the Rhp II cDNA expresses 41 nucleotide substitutions, resulting in 31 amino acid substitutions.

Fig. 6. Proposed topology of the RhP I polypeptide.

The schematic diagram suggests 12 transmembrane domains with short connecting regions either protruding outside the plasma membrane or remaining inside the cytoplasm. The different amino acids of the RhP I polypeptide from the RhP II polypeptide are shown by small open articles.

酸置換が推測された。

なお、RhP I および RhP II cDNA クローンはいずれも Rh(D) 陰性者にも認められ、おそらく Rh(C)/(c) あるいは Rh(E)/(e) 抗原系をコードしているものと推定される²¹⁾。これら二つのクローンの発現実験ならびに Rh(D)-cDNA クローンのクローニングは現在進行中である。

Rh ポリペプチドの構造

RhP I および RhP II cDNA クローンにコードされる RhP I および RhP II ポリペプチドの予想されるトポロジーは、Fig. 6 に示すように N 末端、C 末端ともに細胞質に位置し、12 個の膜貫通ドメインを有し、両者間の細胞外リーフレット部には 8 個のアミノ酸置換を認める²⁰⁾。

Rh ポリペプチドの構造は、赤血球膜に存在するバンド 3, バンド 4.5 蛋白にきわめて類似している。すなわち、バンド 3, バンド 4.5 蛋白はいずれも N 末端, C 末端を細胞質に有し、それぞれ 14 個, 12 個の膜貫通ドメインをもち、バンド 3 蛋白は陰イオン輸送、バンド 4.5 蛋白は糖輸送を担っている²²⁾。したがって、Rh ポリペプチドも、何らかの赤血球膜輸送に関与しているのかもしれない。

Rh システム表現型の中には、すべての Rh 抗原を欠損しているタイプもあり、Rh_{null}²³⁾ と呼ばれている。Rh_{null} 赤血球は、口唇状ないし球状形態を呈し、慢性溶血所見を有する²⁴⁾。また、Rh_{null} 赤血球には、浸透圧抵抗の減弱、細胞内陽イオン、水分量の減少なども認められ²⁴⁾、Rh ポリペプチドの機能としては赤血球膜の安定化、赤血球の水分調整などが考えられよう。

著者らは、Rh_{null} 発端者にも、RhP I および RhP II ポリペプチドの mRNA を健常者と同様に確認した。したがって、赤血球膜への Rh ポリペプチド発現には、他の蛋白との結合による膜固定を必要とし、Rh_{null} 発端者ではこの結合蛋白の異常ないし欠損により Rh 抗原は欠失するのかもしれない。

今後の展望

赤血球系遺伝標識に係わる研究は、従来の血清学的アプローチに加え、分子生物学的手法の導入により新しい展開を迎えた。今後、赤血球型物質の遺伝子や構造も次々と解明されるに違いない。そして、赤血球型物質に備わった生物学的機能の意義づけられる日も遠くはないと信ずる。

文 献

- 1) Landsteiner K. Uler Agglutination-erscheinungen normalen menschlicher Blutes. Klin Wschr 1901; 14: 1132-4.
- 2) Siebert PD, Fukuda M. Isolation and characterization of human glycophorin A cDNA clones by a synthetic oligonucleotide approach: Nucleotide sequence and mRNA structure. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 1665-9.
- 3) Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S. Cloning and Characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc α 1 $\rightarrow$ 2 Gal α 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. J Biol Chem 1990; 265: 1146-51.
- 4) Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of

the histo-blood group ABO system. Nature 1990; 345: 229-33.

- 5) Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S, Human histo-blood group A² transferase coded by A² allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 366-74.
- 6) Wada H, Suda T, Miura Y, Kajii E, Ikemoto S, Yawata Y. Expression of major blood group antigens on human erythroid cells in a two phase liquid culture system. Blood 1990; 75: 505-11.
- 7) 橋本好一, 中木陽子, 雨宮洋一. フローサイトメトリーによる赤血球膜抗原, 抗体の測定法. 免疫と血液 1986; 8: 457-61.
- 8) 梶井英治, 近江俊徳, 小山田隆, 須田年生, 雨宮洋一, 池本卯典. 赤血球前駆細胞の分化に伴う赤血球型抗原の挙動. 医学のあゆみ 1991; 159: 457-58.
- 9) Kajii E, Ikemoto S. A new method for isolation of Rh polypeptide mRNAs using a liquid culture system. Proc Jpn Acad 1992; 68: 51-6.
- 10) Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 9717-21.
- 11) Gyllenstein UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQ locus. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 7652-6.
- 12) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-7.
- 13) 梶井英治, 岩本禎彦, 土田修一, 池本卯典. 血液系標識遺伝子の遺伝子解析システム開発に関する研究. DNA 多型 1993; 1: 122-6.
- 14) Moore S, Woodrow CF, McClelland BL. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh (D), (c), (E) and Fy^a. Nature 1982; 295: 529-31.
- 15) Gahmberg CG. Molecular identification of the human Rho (D) antigen. FEBS Letters 1982; 140: 93-7.
- 16) Blanchard D, Bloy C, Hermand P, Cartron J-P, Saboori AM. Two-dimensional iodopeptide mapping demonstrates (that erythrocyte RhD, c, and E polypeptides are structurally homologous but nonidentical). Blood 1988; 72: 1424-7.
- 17) Bloy C, Blanchard D, Dahr W, Beyreuther K, Salmon C, Cartron J-P. Determination of the N-terminal sequence of human red cell

- Rh (D) polypeptide and demonstration that the Rh (D), (c), and (E) antigens are carried by distinct polypeptide chains. *Blood* 1988; 72: 661-6.
- 18) Chérif-Zahar B, Bloy C, I.e Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, Salmon C, Catron J-P, Colin Y. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6243-7.
- 19) Avent N, Ridgwell K, Tanner MJA, Anstee DJ. cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression. *Biochem J* 1990; 271: 821-5.
- 20) Kajii E, Umenishi F, Iwamoto S, Ikemoto S. Isolation of a new cDNA clone encoding a Rh polypeptide associated with the Rh blood group system. *Hum Genet* 1993; 91: 157-62.
- 21) Kajii E, Umenishi F, Ikemoto S. A cDNA clone encoding a Rh polypeptide detected in RhD-negative erythroid cells. *Vox Sang* 1993; 64: 196.
- 22) Gahmberg CG. Red cell membrane proteins carrying the MN, ABH, and RH antigen activities. In: Agre PC, Cartron J-P. Protein blood group antigens of the human red cell. Baltimore and London: The Jones Hopkins University Press, 1992: 3-19.
- 23) Levine P, Celano MJ, Falkowski F, Chambers JW, Hunter OB Jr, English CT. A second example of .../... blood or Rh_{null}. *Nature* 1964; 204: 892.
- 24) Agre P, Cartron J-P. Molecular biology of the Rh antigens. *Blood* 1991; 78: 551-63.