

遺伝子解析法による ABO 式血液型の判定法 — 学生実習のための簡易判定法 —

土井和子¹ 原野昭雄²

¹川崎医療短期大学 臨床検査科

²川崎医科大学 生化学

(平成9年9月17日受理)

Genetic Analysis of ABO Group Typing by Polymerase Chain Reaction (PCR) : A Simple Determination Method for the Students of Medical Technology

Kazuko DOI¹ and Teruo HARANO²

¹Department of Medical Technology,
Kawasaki College of Allied Health Professions

²Department of Biochemistry,
Kawasaki Medical School

(Accepted on Sep. 17, 1997)

Key words : ABO式血液型, ABO alleles (ABO 対立遺伝子), PCR (Polymerase Chain Reaction) 増幅, PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment length Polymorphism ; PCR-制限酵素断片長多型), PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism ; PCR-単鎖構造多型)

概 要

正常成人の ABO 式血液型を DNA 解析で決定するために, ABO alleles の PCR-RFLP 法と PCR-SSCP 法を行った。Yamamoto らの報告した primer を用いて261付近の PCR 増幅を行った。O allele は増幅領域に Kpn I 酵素の切断点を持ち, Kpn I で消化反応した後, PCR-RFLP を行うと O allele と A, B alleles を区別できた。同じ増幅物に PCR-SSCP 法を応用すると, A, B, O 各 allele をそれぞれ区別できた。O allele は2種類の SSCP パターンを示すことから, 増幅範囲に塩基置換 (polymorphism) による suballele が存在することが解った。今回の遺伝子による解析結果は, 従来の免疫反応による ABO 式血液型判定法の結果とよく一致し, ABO 式血液型の DNA 解析法の簡易判定法として適当と思われた。ABO 式血液型の遺伝子解析を学生実習に取り入れるために今回検討した遺伝子解析は, これまでに行っている免疫反応 (表現型) と比較して, 理解しやすいものであった。

はじめに

ABO 式血液型決定基は赤血球表面の糖鎖であり, 通常 ABO 式血液型判定用抗血清および標準血球を用いた被検血球, 血清との赤血球凝集で判定される。1990年 Yamamoto らは ABO

式血液型遺伝子のクローニングに成功し, ABO 遺伝子座の3つの主要対立遺伝子 [A, B, O 遺伝子 (alleles)] の DNA のそれぞれの allele の塩基配列を明らかにした。それによると O allele は A allele に対して261番目の塩基が欠失しているため, それ以後にフレームシフトを起こし,

コドン118に終止コドン (TAAの配列) が出現して117アミノ酸が翻訳されるにすぎない。酵素アミノ酸の配列が正常の配列 (A allele からの tansferase-A は355アミノ酸から成る) と異なるため、酵素活性を持たず、H 抗原 (O型) のままであると説明された (Fig. 1 参照)。そのほ

かは A allele と同様である。B allele は A allele よりも7ヶ所 (nt297, 526, 657, 703, 796, 803, 930) で塩基置換がみられ、アミノ酸では4アミノ酸の違い (Fig. 1 参照) があることがわかった^{1,2)}。Yamamoto らの報告した Primer (fy-46 と fy-57)³⁾ を用い nt261および nt297を含む範

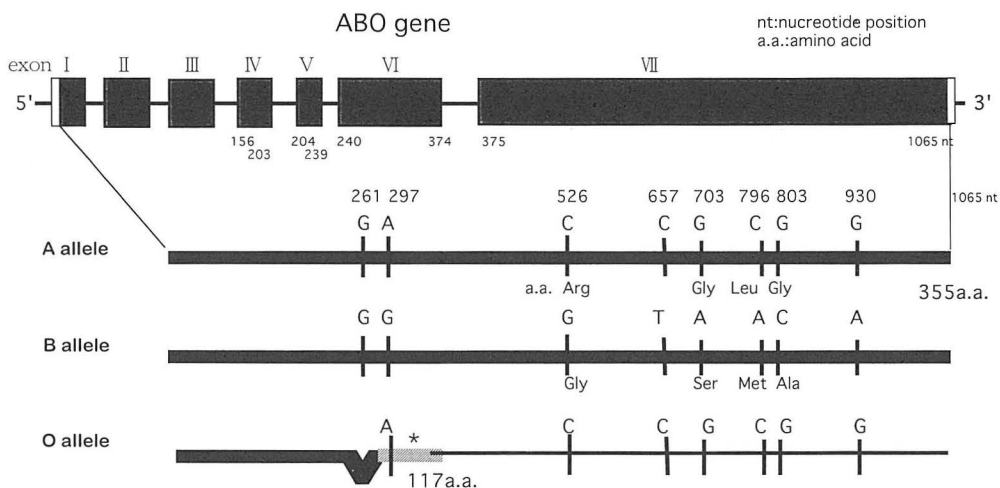


Fig. 1 The structure of the ABO gene locus¹³⁾ and nucleotide sequences of the A, B and O alleles.

* entirely different deduced amino acid sequencing of O allele due to frame-shifting caused by a single base deletion.

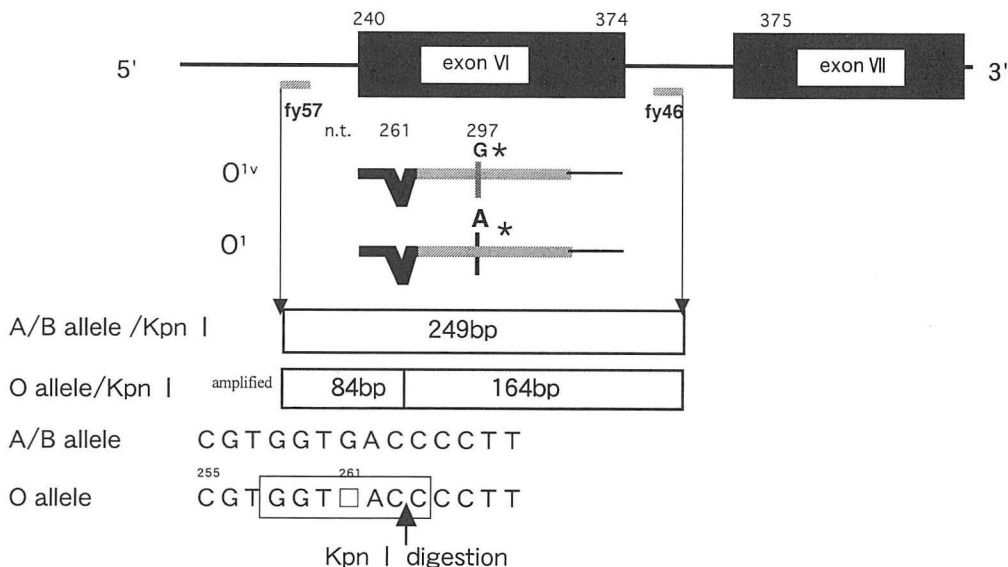


Fig. 2 Restriction site of Kpn I to the product including 261 region of ABO alleles, which amplified by using the primer fy46 and fy57, and the size of the DNA fragments produced by the digestion

* Position of Polymorphic site^{2),8)-10)} on O allele which was amplified by PCR. (See Fig. 1.)

囲の DNA を Polymerase Chain Reaction (PCR) 増幅すると、A および B alleles は 249 bp, O allele は 248 bp の増幅物が得られ、Kpn I 酵素で消化すると A, B alleles は未消化で 249 bp の、O allele は 84bp と 164bp に切断 (Fig. 2 参照) される^{2,4,5)}。消化物を Polyacrylamide gel (PAG) 電気泳動-銀染色 (silver stain) を行うか⁵⁾または、アガロースゲル電気泳動-エチジウムブロミド染色^{4,6)}をして、各 fragment を検出する (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法)。また、B allele では同様の増幅物では 297bp が A allele と異なる (Fig. 1 参照) ため、Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法で、各 allele の確認を行うことにした。SSCP 法では、電気泳動条件 (温度、泳動時間およびゲル濃度) の調節で A, B, O 各 allele の区別が可能であった。O allele には増幅領域に polymorphism が存在する⁷⁻¹²⁾ ため、複数のパターンが認められた。正常人の血液について PCR-RFLP 法と PCR-SSCP 法による DNA 解析と通常の免疫反応による血液型決定法とでよい一致がみられ、DNA 解析は簡易な ABO 血液型決定法として有用であった。学生実習に採用することは学生にとって DNA (遺伝子) に対する知識を身につける上でよい機会となると考えられた。

材料と方法

用いた血液は通常の ABO 式血液型の判定法 (おもて、うら反応) で血液型の判定を行った。

1. DNA の抽出: DNA は EDTA-2 Na 抗凝固血液 2ml より Protease-K-フェノール、クロロホルム抽出法で抽出し、TE (10mmol/l Tris-1 mmol/l EDTA pH 7.4) 溶液に溶解した。DNA 濃度は 260nm での吸光度を測定して求めた。

2. DNA の PCR 増幅と増幅物の単離:

1) primer の作成: Yamamoto らの実験を参考にし、fy 57 (5'-GAATTCATGTGG-GTGGCACCCTG CCA-3') と fy 46 (5'-GAATTCACCTCGCCACTGC CTGG-GTCTC-3') の 2 種類の primer 作成した³⁾。

2) PCR 増幅: 500 μ l エッペンチューブに、

抽出した DNA 溶液 (150~300pg/ μ l) 1 μ l, dNTPs (各 1.25nmol/ μ l) : 8 μ l, 10 \times buffer : 5 μ l, fy 57 Primer (10pmol/ μ l) : 2.5 μ l, fy 46 Primer (10pmol/ μ l) : 2.5 μ l, Taq 酵素 : 0.3 μ l (1.5unit), H₂O (30.7 μ l) を加えて合計 50 μ l にし、mineral oil (Sigma 社製) を重層した。増幅反応は Thermal Controller を用い、94 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 2 min を 30 サイクル行い、さらに 72 $^{\circ}$ C 10min 反応を行った。

3) 増幅物の単離: oil をクロロホルムで除いた後、4 mol/l 酢酸アンモニウム溶液 (0.5 倍量: 25 μ l) とイソプロパノール (2.5 倍量: 187 μ l) を加えて -20 $^{\circ}$ C に置いた。遠心して沈殿物を集め、80% エタノールで洗浄し、TE 溶液 20 μ l に溶解した。

3. PCR-RFLP 法と PCR-SSCP 法による A, B, O alleles の判定:

1) Kpn I 消化による PCR-RFLP 法: 増幅精製した PCR 産物 0.5 μ l, H₂O 3.5 μ l, 10 \times buffer 0.5 μ l, Kpn I 酵素 0.5 μ l (25unit) を 37 $^{\circ}$ C 1~2 hrs 反応させた。

2) Polyacrylamide gel (PAG) 電気泳動: 6%, 0.75mm 厚, PAG を作成した。40% Acrylamide (アクリルアミド: ビス = 49: 1; C 2%) 溶液 1.5ml, 1 \times TEA 溶液 (5 \times TEA 緩衝溶液: Tris 24.2g, 酢酸ナトリウム (CH₃COONa \cdot 3 H₂O) 13.6g, EDTA 3.65g を H₂O に溶解し、酢酸で pH 8.3 に調整後 1000ml に調整し、滅菌した。滅菌 H₂O で希釈して 1 \times あるいは 0.5 \times 溶液等を調整して使用する。) 5ml, H₂O 3.5ml に TEMED 溶液 20 μ l, 25% 過硫酸アンモニウム溶液 20 μ l を混和してゲル作成キットに流し込み、重合させた (30~60min 静置)。M 4 marker (Wako Co.) を基準分子量マーカーとし、PCR 産物の酵素消化物 5 μ l に BTB 色素溶液 1 μ l を加えた溶液を PAG の各ウエルにロードした。0.5 \times TEA buffer を使用して、室温で 100 V, 60~75 min 通電した。泳動後は銀染色し、判定した [ラビダス・ミニスラブ電気泳動装置 (ATTO 製) と定電圧装置 (~1000 V) を使用した]。



Fig. 3 PCR-RFLP patterns of A, B and O alleles
 M : Maker4, Sample 1~5 (AO and BO type), Sample 6 : OO type,
 Sample 11 : AB type

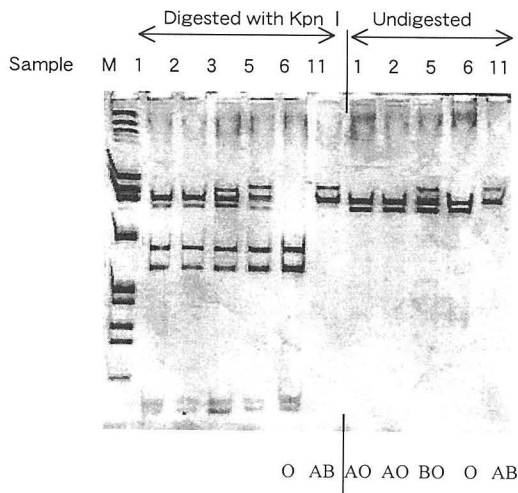


Fig. 4 PCR-SSCP patterns of A, B and O alleles
 Sample 6 : OO type, Sample 11 : AB type, Sample 1 & 2 : AO type,
 Sample 5 : BO type, Sample 6 : OO type, Sample 11 : AB type

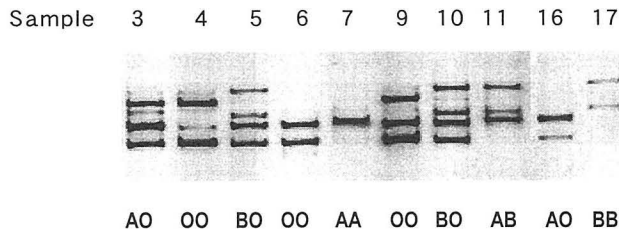


Fig. 5 SSCP patterns of A, B, O, alleles on the PAG Silver staining
 Sample 3, 16 : AO type, Sample 4, 6, 9 : OO type, Sample 5 : BO type,
 Sample 7 : AA type, Sample 10 : BO type, Sample 11 : AB type,
 Sample 17 : BB type

3) PCR-SSCP 法：CPR 産物0.2~0.25 μ lにホルムアミド色素溶液 5 μ l (10~20倍)を加え、沸騰水中で10分加熱し、水中で冷却した。8 %PAG で電気泳動(200 V, 70~90 min)し、銀染色した。電気泳動装置にはレゾルマックス・二連ミニスラブ電気泳動装置 (AE-6410型；ATTO 製)と循環冷却装置 (AB-1600；スーパースタットミニ；ATTO 製)を使用し、温度調整した。

結果および考察

1. O alleleとA, B allelesの PCR-RFLP 法での判別：先の primer で O 261を含む範囲

の DNA を増幅し、制限酵素Kpn I で処理した後、6 % PAG 上で泳動すると、すでに報告のあるように酵素処理の結果249 bp, 184 bp と64 bp^{4,5)}が認められた(Fig. 3)。Sample 1, 2, 3, 5は A allele または B allele と O allele とのヘテロ接合体、Sample 6は O allele のホモ接合体、Sample 11は A allele か、または B allele のホモ接合体、あるいは A allele と B allele のヘテロ接合体と考えられた。これにより通常の ABO 式血液型判定法では判別できない O allele の関与 (A 型や B 型に対する AO 型や BO 型) が簡単に判定できた。

Table 1 The list of DNA analysis of ABO Blood Groups and the ABO Blood Typing by Serological Test

Sample NO.	Sample	DNA analysis of ABO Blood Group	Kpn I digestion	ABO Blood Typing by Serological Test	counts
11	N. T.	AB	-	AB	1
1	Y. Y.	AOf	±	A	6
2	K. O.	AOf	±		
3	T. T.	AOd	±		
7	R. T.	AA	-		
8	M. A.	Undetected	Undetected		
16	K. I.	AOf	±	B	5
5	M. S.	BOf	±		
10	E. I.	BOf	±		
12	A. Y.	BOf	±		
15	R. M.	BOf	±		
17	A. Y.	BB	-	O	3
4	K. D.	OdOd	+		
6	E. F.	OfOf	+		
9	Y. S.	OdOf	+		

ABO group type or other groups	Counts
Od	3
Of	9
Numbers of O allele (heterozygote)	11(1)
AO	4
BO	4
AA, BB, AB	3
O	3
Total No. of detected sample	14
Undetected sample	1

2. PCR-SSCP 法での判定：8% PAG で 15°C, 200 V, 75分での SSCP の結果を Fig. 4 に示した。A allele と B allele は nt 297 の塩基の違い (A→G) のため、泳動像が明らかに異なり、SSCP 法での判別が可能と考えられる。通常の抗原抗体反応での判定 (A型, B型, O型, AB型) と照し合せて、A allele, B allele および O allele の泳動像を判定した。また、実際に、AA, BB 型を SSCP 法で解析すると A 型は B 型よりも泳動距離は長く、両者ははっきり区別された (Fig. 5. Sample 7 ; AA, Sample 17 ; BB)。しかし、O 型は泳動像が異なる 2 種類が存在した (Fig. 5. Sample^{4,6,9})。O allele には増幅した O 261 付近に polymorphic site (A 297 G) を持つ変異体が^{7,8,11}最近報告されており、普通の O allele (O¹ allele) に対して O^{variant} (O^{1v}) allele と呼ばれている。さらに、O^{1v} よりも 1/10 と出現率は低いが、261 に欠失がなく A 297 G 置換のある O² 変異体^{9,10} も知られている。これらの事実から、O allele の泳動像に複数例があったことは、suballele の存在が影響していると考えられた。Fukumori ら¹²) によれば日本人にも O¹ および O^{1v} が存在しており、SSCP では 2 種類の O suballele を対照にして、泳動縞の判定の必要性を感じた。Olsson らは O^{1v} は 261 G の欠失以外に O¹ allele に比べて 9 ヶ所の塩基置換 (対照領域では O^{1v} は A 297 G) を報告⁸) している。使用した primer は exon VI とその前後の intron を含んで増幅^{4,8})、O¹ と O^{1v} が存在する可能性が考えられる場合、nt 261 は欠失し、nt 297 は A または G の配列を持つ 2 種類が考えられ、このため 2 種類の SSCP 像が出現したと考えられる (Fig. 2, 5 参照)。また、O allele は 261 に G の欠失を持たない変異 O² allele も報告⁹⁻¹¹) されているが、今回用いた Sample は全て Kpn I で消化される O allele であった。A allele は今回は 1 種のみであったが、O 型と同様な polymorphism も考えられる。学生実習を目的とした簡易判定法であるため、primer の作成部位の変更などにより、これらの影響のない部位を作成し、明瞭な解析の出来る方法に改良すべきと感じた。SSCP の結

果は PAG 濃度、電気泳動時の温度、泳動時間にも影響されるため、実際に SSCP 結果が解っている OO (2 種)、AA, BB 型の DNA をコントロールとして判定する必要があった。さらに 10, 12, 15, 17°C で泳動して SSCP を判定すると各 A, B, O alleles の泳動縞は区別されたが、室温での泳動像ではその区別は困難であった。また、10% グリセリンを加えて同様な実験を行ったが、全て明瞭に区別される泳動縞は得られなかった。これらの結果を総合すると 261 付近の CPR 増幅物の最適な PCR-SSCP 条件は、8% PAG (0.75mm), 15°C, 200 V, 75分~90分泳動し、銀染色する方法であった。Fig. 5 に本条件での結果を示した。左より AO (A 型)、OO (O 型)、BO 型 (B 型)、OO (O 型)、AA (A 型)、OO (O 型)、BO (B 型)、AB (AB 型)、AO (A 型)、BB (B 型) [() 内は表現型] と判定された。また、暫定的に Fig. 5. 中の Sample 4 (O 型の SSCP 像) を Od とし、Sample 6 のそれを Of として Table. 1 にまとめた。O allele 保因者は 14 人のうち 11 人に認められ、Od 型：3, Of 型：9, Od 型と Of 型の hetero 接合体 1 であった。また、Od 型 Of 型は先に述べた O¹ 型、O^{1v} 型に相当すると思われるが、どちらに相当するか検討していない。AB 型：1, AA 型：1, AO 型：4, BB 型：1, BO 型：4, O 型：3 であった。Sample 8 は抽出が不完全で要再検査とした。

遺伝子解析 (PCR-RFLP 法と PCR-SSCP 法) による ABO 式血液型の判定は従来からの血清学的な検査法と良く一致していた。正確な A 型 B 型 allele を解析するには数種類の Primer を使用してさらに 526, 703, 796, 803 付近の解析を行う必要がある。

学生が、多くの遺伝子解析技術法を学ぶことは限られた実習時間内では困難である。狭い領域での PCR-RFLP 法と PCR-SSCP 法の両法を応用して、A, B, O alleles の同定と ABO 式血液型判定を目的とした実習内容に組み立てた。ABO 式血液型の決定因子に Suballeles が存在するので、精密な検査が必要な型式もあるが、従来の家系調査によらなければ決定できない AO, BO, AA, BB 型

の簡易的な型区分が可能と考えられる。今後は primer の設定部位等に一部改良を加えて、学生の学習に役立つ方法としてゆきたい。免疫反応による ABO 式血液型の決定は、臨床検査科学生にとって大切なテーマであり、遺伝子解析法の応用によっても ABO 式血液型の判定が出来る、遺伝子およびその解析法の理解の一助としたい。

謝 辞

最後に本研究のご援助、ご指導を賜った臨床検査科主任教授・中央検査部部長 松田信義教授、中桐逸博副主任技師、輸血部の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) 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, The Journal of Biological Chemistry, 265(2), 1146-1151, 1990.
- 2) Yamamoto F., Clausen H., White T., Marken J., Hakomori S. : Molecular Genetic Basis of the Histo-Blood Group ABO System, Nature, 345, 229-233, 1990.
- 3) Yamamoto F. Hakomori S. : Sugar-Nucleotide Doner Specificity of Histo-Blood Group A and B Transeferase is Based on Amino Acid Substitutions, The Journal of Biological Chemirstry, 265(31), 19257-19262, 1990.
- 4) 細井英司 : ABO 式血液型の遺伝子解析とその臨床検査への応用, 臨床病理, 45(2), 148-156, 1997.
- 5) 島 正幸, 西村拓也, 吉岡 章, 福井 弘, 西田幸世, 辻内智美, 藤村吉博 : Polymerase Chain Reaction (CPR) を用いた ABO 血液型判定の試み, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 38(4), 542-547, 1992.
- 6) 岩崎 誠, 小林 賢, 鈴木洋司, 関口 進, 太田正穂 : PCR-RFLP 法を用いた ABO 式血液型の遺伝子解析, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 39(3), 575-580, 1993.
- 7) Yamamoto F., McNeill P. D., Yamamoto M., Hakomori S., Harris T. : Molecular Genetic Analysis of the ABO Blood Group System : 3. A^x and B^(A) Alleles, Vox Sang, 64, 171-174, 1993.
- 8) Olsson M. L. Chester M, A. : Frequent Occurrence of a Variant O¹ Gene at the Blood Group ABO Locus, Vox Sang, 70, 26-30, 1996.
- 9) Yamamoto F., McNeill P. D., Yamamoto M., Hakomori S., Bromilow I. M., Duguid J. K. M. : Molecular Genetic Analysis of the ABO Blood Group System : 4. Anothger Type of O Allele, Vox Sang, 64, 175-178, 1993.
- 10) Grunnet N., Steffensen R., Bennett E. P., Clausen H. : Evaluation of Histo-Blood Group ABO Genotyping in a Danish Population : Frequency of a Novel O allele Defined as O², Vox Sang, 67, 210-215, 1994.
- 11) Kang S. H., Fukumori Y., Ohnoki S., Shibata H., Han K. S., Nishimukai H., Okubo Y. : Distribution of ABO Genotypes and Allele Ferequencies in a Korean Popolation, Japanese Journal of Human Genetics, 42, 331-335, 1997.
- 12) Fukumori Y., Ohnoki S., Shibata H., Nishimukai H. : Suballeles of the ABO Blood Group System in a Japanese Popuration, Human Heredity, 46, 85-91, 1996.
- 13) Bennett E. P., Steffensen R., Clausen H., Weghuis D. O., Kessel A. G. : Genomic Cloning of the Human Histo-Blood Group ABO Locus, Biochemical and Biophysical Research Communications, 206(1), 318-325, 1995.

