



Molecular genetic analysis of a B3 allele in a rare subtype A1 B3 blood-type individual.

土井, 和子

(Degree)

博士 (保健学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2009-04-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3981

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003981>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 2 0 0 】

氏 名・（本 籍） 土井 和子 （ 山口県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（保健学）

学 位 記 番 号 博い第40号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Molecular genetic analysis of a B³ allele in a rare subtype A₁ B₃
blood-type individual.

(稀な血液型A₁ B₃ に認められたB³ 対立遺伝子の遺伝子解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 西山 馨

教 授 伊藤 光宏

教 授 松村 末夫

論文内容の要旨

氏名 土井和子

Molecular genetic analysis of a B^3 allele in a rare subtype A_1B_3 blood-type individual

稀な血液型 A_1B_3 に認められた B^3 対立遺伝子の遺伝子解析

神戸大学大学院医学系大学院保健学専攻 病因・病態解析学領域 病因解析学専攻

指導：西山 馨教授

【概要】

稀な血液型 A_1B_3 の分子遺伝学的解析を行った。 ABO 遺伝子の DNA シーケンス解析によって、2 種の一塩基置換、467C>T および 547G>A を検出した。この 547G>A は Cho らが 2004 年に報告した B^{var} と一致した。変異体に特異的プライマー (ASP) を用いた ASP-PCR-RFLP 法の応用によって、同定操作に必須なクローニングを行わずに簡単に同定が可能で、変異点は B 遺伝子側に局在していることが明らかになった。さらに nt 467, nt 547 位周囲の PCR-SSCP 解析からこの A_1B_3 型は $A^{1v}B^3$ と同定できた。

【はじめに】

1990 年血液型に関係する A^1 転移酵素遺伝子がクローニングされ、 A^1, B および O^1 遺伝子の塩基配列が明らかとなり、1993 年には亜型の変異配列が報告された。 B^3 遺伝子に関する遺伝子解析の例としては Yamamoto が A_1B_3 に 1054C>T を最初に報告した。Ogasawara

らは $B101$ と $O201$ が gene conversion により、646 T>A を有し、 B の特徴の 657C>T を欠いたと報告した。また、Yu らは [IVS3]+5 G>A, と 247G>T の例を報告した。また A_1B_3 型に B^{var} 遺伝子 547G>A が報告された。本研究では A_1B_3 の遺伝子型を解析し、現在までに報告されている B^3 遺伝子と比較した。

【材料と方法】

亜型は兵庫血液センターから、正常血液は健康な成人ボランティアから得た。DNA は常法により抽出し、各種のプライマーを用いて目的範囲を PCR 増幅した。シーケンス、SSCP, RFLP, ARMS, ASP-PCR-RFLP 法などを利用して解析した。

【結果と討論】

Exon 7 の直接シーケンス解析: 本 A_1B_3 型は正常 AB 型と比較すると 2 箇所に一塩基置換、467C>T と 547G>A を検出した。これらはそれぞれ A^{1v} と B^3 に起因すると考えられた。

Exon 6 および 7 の SSCP 解析: Exon 6 の PCR-SSCP 解析では A_1B_3 型は A と B 遺伝子のヘテロ体を示した。Exon 7 の SSCP は 5'-端 2 種 (272 bp; nt 430-701, 257bp; nt 455-701) で行い、272bp は 11 % polyacrylamide gel (PAG)-SSCP 解析では A^{1v} の特異バンドは認められないが A と B 鎖とは異なる変異バンドが認められた。257 bp の 9 % PAG-SSCP 解析では、 A^{1v} を検出できただけでなく、通常 B とは明らかに異なる変異バンドを示した。SSCP では条件の差が顕著で B^3 に特異的バンドは 9 % PAG-SSCP の場合にのみ認められた。3'-端の nt 847-1079 の SSCP パターンは正常であった。

ARMS での 467C>T および 547G>A の確認: 467C/T, 547G/A の特

異的プライマー(ASP)を用いた ARMS 法でそれぞれ 467C>T と 547G>A を確認できた。

A₁B₃ の 547G>A 変異の局在性:ASP(547G)-PCR(nt 529-792)後に PCR 産物を用いて RFLP(A₁u I)を行った。解析では,AB は切断され, A₁B₃ は非切断であった。通常,B 遺伝子には 703G が配列するため,A₁u I で切断されるが, A₁B₃ の非切断は 547G が A 遺伝子に局在するためと理解できた。逆に, ASP(547A)-PCR-RFLP(A₁u I)は正常 AB 型は当然増幅しないが,A₁B₃ 型は増幅するだけでなく, A₁u I で切断された。すなわち nt547 位の A は B³ 鎖に,G は A^{1v} 鎖に局在していることが明白になった。

現在までに B³ 変異体の報告として nt1054, nt 646 と nt 657, nt 247, IVS3+5 があるが,本例はこれらの配列は正常を示し,B 鎖に 547G>A を持つ A₁B₃ 型で Cho らの示す A₁B₃ での B^{var} と同配列を示した。世界で 2 例目である。A 遺伝子は日本人の A と AB 型の約 88.2% が 467C>T の A^{1v} である。本 A₁B₃ 型も A 遺伝子は A^{1v} を所有し, B³ とのヘテロ体と同定できた。これらの同定操作は APS-PCR/RFLP を用い,迅速かつ簡便にこれらの変異を同定した。SSCP 法では PCR 部位,DNA 鎖長,ゲル濃度,泳動時間,buffer 温度を調整することが重要であった。

nt547 付近は活性に必須な保存部位 RWQDVSM として知られる。本例は 183Q>N 置換が予想され,領域内では 539G>A (R180H), 548A>G (Q183G), 556A>G (M186V) がそれぞれ Bweak として報告されている。

氏 名	土 井 和 子		
論文題目	Molecular genetic analysis of a B ³ allele in a rare subtype A ₁ B ₃ blood-type individual (稀な血液型 A ₁ B ₃ に認められた B ³ 対立遺伝子の遺伝子解析)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	西 山 馨
	副 査	教 授	松 村 末 夫
	副 査	教 授	伊 藤 光 宏
	副 査		
要 旨			
本研究は、献血に訪れた健常者の中から古くから ABO 血液型の稀な亜型として知られていた亜型 A₁B₃ が見つかったことが端緒となって、その 1 検体について遺伝子レベルから解析し報告した論文である。 筆者は、血液型を決定している糖転移酵素遺伝子の多型の解析において基本的には各種の PCR と電気泳動法を駆使してその亜型の遺伝子検索を行った。例えば、PCR-SSCP 法では検索に最適な泳動条件を確立することは容易ではなかったが、それらの泳動パターンをよく吟味する態度が必須で、最終的に正常型と比較して特徴的な泳動パターンが nt547 と nt467 を含む領域に認められることおよび他に変異箇所は認められないことを確認した。この亜型 A₁B₃ の実際の変異箇所はいずれも一塩基変異 (SNPs) で 547G>A と 467C>T とシーケンサーで同定された。さらに、それらの変異がどの allele に局在するかについては nt547 の A は B allele に、G は A allele にあることをやはり電気泳動法を応用して決定した。この種の遺伝子検索研究法として通常行われるクローニング操作を行うことなく同定を完成させたことは「臨床検査技師」が容易に行える実験法として意義深いと思われる。 本研究で示された亜型 A₁B₃ の 547G>A 変異は、最近 Cho らによって報告された B_{al} 変異と同一であった。従って本論文は世界で B_{al} の 2 番目の報告であり、本例は 3 例目となった。 以上の知見、ならびに副査の 2 名の教授による審査結果を総合的に判断し、本研究は稀な血液型 A₁B₃ について、その遺伝子変異箇所を研究したものであり、それらの同定結果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。 よって、学位申請者の土井和子は、博士 (保健学) の学位を得る資格があると認める。			
なお主論文以下に掲載。			
K. Doi, K. Nishiyama. Molecular genetic analysis of a B ³ allele in a rare subtype A ₁ B ₃ blood-type individual Bulletin of Health Sciences Kobe, vol.22, 57-65, 2006			