

学位論文の要旨

|  |    |    |      |
|--|----|----|------|
| 学位の種類  | 博士 | 氏名 | 水上 創 |
| 学位論文題目   |    |    |      |
| Molecular Evolution of Alleles of The Glycophorin A Gene<br>(グリコフォリン A 遺伝子の分子進化)   |    |    |      |
| 共著者名<br>赤根 敦、塩野 寛、小川 研人  |    |    |      |
| 掲載雑誌名<br>Legal Medicine Vol. 4 (2002) 掲載予定   |    |    |      |
| 研究目的   |    |    |      |
| <p>法医学において個人識別や親子鑑定は必須の実務・研究分野であり、従来の抗血清を用いた各種赤血球抗原型、赤血球酵素型、血清蛋白型および白血球型を用いる判定から、近年は DNA 多型を用いた診断法が行われている。</p> <p>MN、Ss 抗原は、それぞれ糖蛋白であるグリコフォリン A (GPA)、グリコフォリン B (GPB) による赤血球抗原型であり、これらをコードする GPA、GPB 遺伝子は第 4 染色体長腕上に GPA-GPB(-GPE)の順に並んで存在している。GP 遺伝子群は極めて相同性が高く、GPA 遺伝子を祖先として、進化の過程での duplication により重複遺伝子となったと考えられている。MNSs 式血液型は Miltenberger subsystem として分類される多数の低頻度抗原の遺伝子座が確認されており<sup>1)</sup>、これらは GP 遺伝子の塩基置換や欠失によるアミノ酸の変化、GP 遺伝子間の recombination によるものである。</p> <p>これまで通常の MN 抗原性を有する検体において、intron 1 の G/T 置換により M allele は M<sup>G</sup> および M<sup>T</sup> に分類できることが報告されており<sup>2)</sup>、さらに我々は M<sup>G</sup>、M<sup>T</sup>、N の各 allele の exon 1~7、intron 1 および 4 の一部、intron 2~3 の配列の解析から、各 allele 特異的な配列および M<sup>T</sup> allele の intron 2、M<sup>G</sup>、N allele の exon 7 に同一 allele 内で 1 塩基の置換 (いずれも G/A) を見出した<sup>3)</sup>。これにより各 allele はさらに細分類されることから、抗原性を示すアルファベットと 3 桁の数字を組み合わせた allele の命名法を提案した。この命名法では 1 文字目のアルファベット (M または N) が exon 2 の 3 塩基置換 (M: <sup>22</sup>C, <sup>34</sup>G, <sup>35</sup>T, N: <sup>22</sup>T, <sup>34</sup>A, <sup>35</sup>G) によりコードされる抗原性を、2 文字目の数字は各抗原の塩基配列における major variation (M<sup>G</sup>、M<sup>T</sup>、N) を、3~4 文字目の 2 桁数字は minor variation をそれぞれあらわす。この命名法により各 allele は M<sup>G</sup> (M101、M102)、M<sup>T</sup> (M201、M202)、N (N101、N102) と表わされる。</p> <p>本研究では、これらの 6 種類の allele について、残る intron 4 (1,764 塩基)、intron 5 (2,094 塩基)、intron 6 (3,281 塩基) の配列の解析を行い、allele の細分類について検討を行った。</p> |    |    |      |

## 材料・方法

材料：抗血清により MN 型判定を行った血液検体について、フェノール/クロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。M101、M102、M201、M202、N101、N102 の各 allele を有する試料は allele 特異的 PCR により M<sup>G</sup>、M<sup>T</sup>、N を、intron 2 および、exon 7 のシーケンスにより各 allele の minor variation をそれぞれ識別した。

シーケンス：各 intron の両端に設定した GPA 遺伝子特異的プライマーを用いて鋳型を作成し、ダイレクトシーケンスにより配列を決定した。Heterozygous な検体については MN 間もしくは変異部位に設定したプライマーにより allele 特異的 PCR を行い、変異部位の allele 属性を明らかにした。29 個の M101、1 個の M102、4 個の M201、1 個の M202、16 個の N102、2 個の N201 allele について変異部位の異同を、シーケンスおよび allele 特異的 PCR で確認した。

Phylogenetic Analysis：変異部位を含む exon 1 から exon 7 までの 10,704 塩基について、コンピュータプログラム PHYLIP 3.5 を用い解析を行った。塩基置換数による進化距離の評価から系統樹を作成し、各 allele の関係を比較・検討した。

## 成績

シーケンス：各 allele の解析により、intron 4 に 8 個所、intron 5 に 5 個所、intron 6 に 9 個所の塩基置換および 1~2 塩基の欠失部位が見い出された。

これらの変異部位は M101 に比較して M102 では 9 個所存在し、M102 の intron 4 より下流は intron 5 の連続する 3 塩基を除いて N101 と同配列であった。また、M201 では 10 個所、M202 では 20 個所存在し、このうち 5 個所は M201 と M202 で、10 個所は M202 においてのみ見い出された。さらに、N101 では 6 個所存在したが、N102 では M101 と全く同配列であった。

Phylogenetic Analysis：塩基置換数による進化距離の評価から rooted および unrooted の系統樹を作成した。系統樹では、M allele と N allele が共通の祖先遺伝子から分岐した後、M allele は M100 系統と M200 系統に分岐し、最終的に各 major allele が 2 つの minor allele に分岐したことが示された。

## 考察

これまで intron 1 の 1 塩基置換 (G/T) により M allele を M<sup>G</sup> (M100 系統)、M<sup>T</sup> (M200 系統) の識別を、intron 2 の 1 塩基置換 (A/G) により minor variation (M201、M202) の識別を行ったが<sup>3)</sup>、今回の intron 4~6 の解析では両 allele 間に多くの変異部位を見出した。M200 系統ではこれまでの結果とあわせて GPA 遺伝子全体で 14 塩基が M101 タイプ、10 塩基が N101 タイプ、15 塩基は M200 系統、1 塩基は M201、10 塩基は M202 にそれぞれ特異的であり、これらの変異は解析領域全体に混在していた。Phylogenetic Analysis の結果より M200 系統は M100 系統から分岐した後、N101 タイプおよび M200 系統独自の point mutation の積み重ねにより生じたことを示唆するものであった。また、M200 系統は M100 系統と N100 系統の分岐後、M100 系統から分岐しているにも関わらず、N101 タイプの塩基配列を持つことから、ABO 式血液型と同様に MN 式血液型においても parallel mutation が生じていることを示している。

M<sup>G</sup> (M100 系統)、N (N100 系統) は exon 7 の 1 塩基置換 (A/G) によりそれぞれの minor

variation (M101, M102, N101, N102) の識別を行ったが、intron 3 下流以降では M102 は N101 に、N102 は M101 に類似した配列であった。Intron 3 近辺の領域では Alu 配列が存在し、MN 関連の低頻度抗原発生の hot spot であることが知られており<sup>1)</sup>、これらの allele においても M102, N102 は M101/N101 間での recombination の結果生じた allele であると考えられた。

今回解析した領域から、各 allele に抗原性は同一であっても、異なる allele が複数存在し、これまで報告のある低頻度抗原と同様に point mutation の積み重ね、もしくは allele 間の recombination によって生じたものと考えられた。

### 結論

本研究において、通常の MN 抗原性を示す検体で、塩基配列に多型をもつ minor variation の塩基配列とその発生についての知見を得た。これらの allele の成因から、今後さらに MN allele が発見されることも予想される。このような allele はグリコフォリン遺伝子の進化を考える上で重要であり、また法医学や人類学上有用なマーカーに成り得ると考えられる。

### 引用文献

1. Blumenfeld OO, Huang CH: Molecular genetics of glycophorin MNS variants. *Transfus. Clin. Biol* 1997; 4: 357-365.
2. Akane A, Kobayashi T, Li Z-X, Yoshimura S, Okii Y, Yoshida M, Tokiyasu T, Watabiki T: PCR-based genotyping of MNSs blood group: Subtyping of M allele to M<sup>G</sup> and M<sup>T</sup>. *Jpn. J. Hum Genet* 1997; 42: 489-498.
3. Akane A, Mizukami H, Shiono H: Classification of standard alleles of the MN blood group system. *Vox Sang* 2000; 79: 183-187.

### 参考文献

1. Mizukami H., Shimizu K., Shiono H., Uezono T., Sasaki M.: Forensic diagnosis of death from cold. *Legal Med.* 1; 204-209 (1999)
2. 水上 創、高垣 実、清水恵子、高橋知行、小川研人、斉藤 修、上園 崇、塩野 寛：水中死体の体温降下速度。：法医学の実際と研究 43 ; 15~19 (2000)
3. 水上 創、清水恵子、佐々木雅弘、福島 亨、塩野 寛：シートベルト損傷の2例。法医学の実際と研究 41 ; 177~181 (1998)
4. 水上 創、清水恵子、上園 崇、小川研人、斉藤 修、塩野 寛：誤嚥の剖検例2例。犯罪学雑誌 66 ; 167~175 (2000)
5. 水上 創、赤根 敦、清水恵子、上園 崇、小川研人、斉藤 修、吉田将亜、塩野 寛：MN 式血液型の変異型の解析。DNA 多型 8 ; 213~218 (2000)

## 学位論文の審査結果の要旨

|   |        |    |      |
|---|--------|----|------|
| 報告番号  | 第 号    |    |      |
| 学位の種類   | 博士（医学） | 氏名 | 水上 創 |
| 審査委員長 羽田 明 ㊞<br>審査委員 塩野 寛 ㊞<br>審査委員 松原 和夫 ㊞   |        |    |      |
| 学位論文題目<br><br><b>Molecular Evolution of Alleles of The Glycophorin A Gene</b><br>（グリコフォリン A 遺伝子の分子進化）   |        |    |      |
| <p>                     MNSs 式赤血球抗原型をコードする GP 遺伝子群は極めて高い相同性を示し、塩基置換や欠失および GP 遺伝子間の recombination による多数の低頻度抗原が存在する。また、通常の MN 抗原性を示す allele においても、M<sup>G</sup> (M101、M102)、M<sup>T</sup> (M201、M202)、N (N101、N102) の 6 種類の allele の存在が報告されている。                 </p> <p>                     本研究では、これら 6 allele の未解析の intron 4、5、6 領域を解析し、既報の変異部位を含めた塩基配列の Phylogenetic Analysis により系統樹を作成、各 allele の関係を比較・検討した。                 </p> <p>                     各 allele の解析では、intron 4、5、6 にそれぞれ 8、5、9 個所の塩基置換および欠失が新たに見い出され、系統樹では M allele と N allele は共通の祖先遺伝子から分岐後、M allele は M100 系統と M200 系統に分岐し、最終的にそれぞれ 2 つの minor allele に分岐していることが示された。特に M200 系統は M100/N100 タイプの配列および M200 系統特異的変異が遺伝子全体に混在することから、独自の point mutation の積み重ねにより生じたと考えられた。一方、M100 系統と N100 系統では intron 3 下流以降の配列が、M102 は N101 に、N102 は M101 にそれぞれ類似することから、M102、N102 は intron 3 下流付近での M101/N101 間の recombination の結果生じたと考えられた。                 </p> |        |    |      |

以上の結果は、抗原性が同一の複数の変異型 MN allele では、point mutation の積み重ねや allele 間の recombination による MNSs 関連の低頻度抗原と同様の成立過程が存在することを示唆している。

本研究では、GPA 遺伝子の多型とその発生について法医学・人類学上有用な知見をもたらした点で意義深く、優れた論文である。

なお、各審査委員は論文提出者に試問を行い、本論文の内容およびその関連分野について適格な解答を得た。以上より、本審査委員は本論文が医学博士の学位論文に値するものと判定した。