

# ABO 血液型遺伝子多型の PCR-SSCP 法による解析とその応用

中村 貴子

筑波大学人間総合科学等支援室 (医学支援室)

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

## 概要

ABO 式血液型遺伝子型の Exon 6 領域 (Fragment I) および Exon 7 の二つの領域 (Fragment II, Fragment III) を ALF express DNA sequencer を用いた PCR-SSCP 法による遺伝子型解析の開発を行なった。

その結果 主要な 5 種類の対立遺伝子による 15 の遺伝子型を正確に判定することが可能となり日常の法医学業務に使用して成果を挙げている。

また、この方法で領域内の稀な塩基置換部位の検出ができるため、5 遺伝子の他の 16 種類の対立遺伝子を同定した。それらを使用して日本とその他の地域の allele 頻度の比較検討を行い、地域による差異があるという結果を得た。

**キーワード:** ABO 式血液型遺伝子、PCR-SSCP 法、塩基置換、allele 頻度

## 1. はじめに

ABO 式血液型多型はその他の遺伝子多型に比べあらかじめ個人の血液型がわかっている場合が多く、法医学鑑定をはじめ事故や犯罪の捜査上有用性が高い<sup>[1,2]</sup>。

ABO 式血液型を決定する糖転移酵素遺伝子<sup>[3,4]</sup>は第 9 染色体長腕上 (9q34) にあり、7 つの Exon で構成される<sup>[5]</sup>。これまでに Exon6 及び Exon7 に多数の塩基置換を伴う遺伝子型が報告されており<sup>[6,7]</sup>、現在までわかっている対立遺伝子 (allele) の数は 70 を超える<sup>[8,9]</sup>。その検出法も PCR-RFLP 法<sup>[10]</sup>、PCR-APLP 法<sup>[11]</sup>、PCR-SSCP 法<sup>[12,13]</sup>や、最近においてはマルチプレックス塩基伸長反応法<sup>[14]</sup>など多岐にわたり解析が行われているが、多数の primer や制限酵素を使用することや、得られた PCR 産物を精製しなければならないなど煩雑な操作があり、改善するべき点が多い。

そこで ABO 式血液型遺伝子多型を早く正確に判定でき、多数検体を処理する方法として ALF express DNA sequencer (Pharmacia Biotech) を用いた PCR-SSCP 法による解析方法を検討した。ABO 遺伝子の Exon 6 領域 (Fragment I) と Exon 7 の二つの領域 (Fragment II, Fragment III) を解析することにより ABO 遺伝子型を主要な allele により 15 種類に分類するばかりでなく、稀な塩基置換の解析によってさらに詳細な遺伝子型を同定した。

それらの方法を司法解剖時の日常業務に使用している他、分散して遺棄された死体からや体液からの血液型検出などの法医学鑑定の場においても使用し成果を挙げている。また日本各県および世界各地の、allele 頻度を比較検討した結果 A101 と A102 や O-101 型を主とする O<sup>A</sup> allele グループと O-201 型を

主とする O<sup>G</sup> allele グループに地域により特徴的な差異があることがわかった。

## 2. 試料と方法

### 2.1 試料

日本各県、中国上海、南米コロンビア、モンゴル、ミャンマー、アメリカミネソタ州白人の一般集団の血液から所定の方法で抽出した DNA を使用した。

### 2.2 PCR-SSCP (Single Strand Conformation Change)

一本鎖 DNA は分子内水素結合などにより一本鎖のまま安定しようとするため、その塩基配列に特異的な高次構造をとる。したがって一組の二本鎖 DNA allele に由来する 4 本の互いに相補的な一本鎖 DNA を電気泳動すると、それぞれの塩基配列が異なるため異なる位置に泳動される。一塩基置換によってもこの一本鎖 DNA の高次構造は変化し、電気泳動の際 易動度に影響を及ぼす。このような多型を一本鎖 DNA 高次構造多型 (single-strand conformation polymorphism: SSCP) という。PCR-SSCP 法の利点は既知の変異部位だけでなく、領域内の未知の変異部位についても検出が可能であることである。

Exon 6 の全領域および Exon7 の np703 をふくむ領域<sup>[15]</sup>を所定の primer で PCR 増幅を行った (図 1)。

PCR 反応には Hotster Taq DNA polymerase (QIAGEN) を使用し、denature 97°C : 30 秒 annealing 58°C : 30 秒 extension 72°C : 30 秒で 35 cycle を Gene Amp 9600 (Applied Biosystems) を用いて増幅した。得られた PCR 産物 1μl を Blue Dextran 色素の入った Formamide 液 14μl に加え、97°C で 5 分間 denature の後急冷し、サンプルとした。ALF express (Amersham Pharmacia Biotech) を用い、それぞれの検出条件に適した Polyacrylamide gel にて電気泳動を行い遺伝子型を検出した。

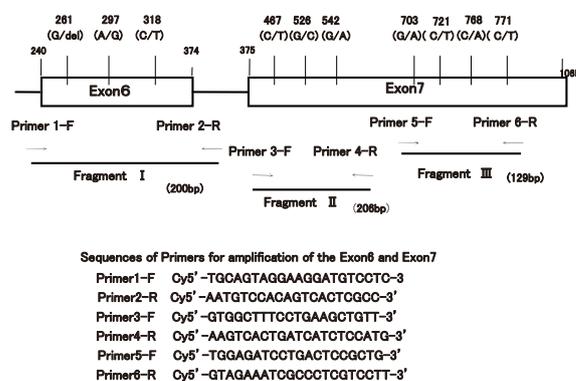


図 1. ABO 血液型遺伝子の PCR 増幅領域と Primer 配列

## 2.3 Sequencing

PCR-direct sequencing により PCR 産物から直接塩基配列を決定した。PCR と同一の primer を用いて、Forward 及び Reverse 方向からの cycle sequencing を行った後、Genetic analyzer (ABI,310)により分析した。

## 3. 結果

### 3.1 SSCP 法による ABO 遺伝子型のパターンと塩基置換部位

#### 3.1.1 Fragment I の SSCP パターン

図 2 は Fragment I の SSCP パターンである。np261 において O 型は塩基が欠損 (del) しているが A 型、B 型とも正常で G (Guanine) である (G/del)。np297 では A 型では塩基が A (Adenine) で B 型では G となっているが、O 型も塩基が A のグループと G のグループの 2 種類に大別され、O<sup>A</sup>、O<sup>G</sup> という。それぞれ数十種類のサブタイプの Allele を含んでいる。これらの塩基置換の組み合わせによる基本的な 10 種の遺伝子型 (AA, AO<sup>A</sup>, AO<sup>G</sup>, BB, BO<sup>A</sup>, BO<sup>G</sup>, O<sup>A</sup>O<sup>A</sup>, O<sup>A</sup>O<sup>G</sup>, O<sup>G</sup>O<sup>G</sup>, AB) が易動度の差により、10 種のパターンとして検出される<sup>[16]</sup>(Lane 1~10)。基本的なピークと易動度の異なるピークとして検出されたサンプル (Lane11,12) は Sequence の結果、一方の遺伝子上の np318 に C>T の塩基置換部位があることがわかり O<sup>A</sup> グループの O109 と同定できた。

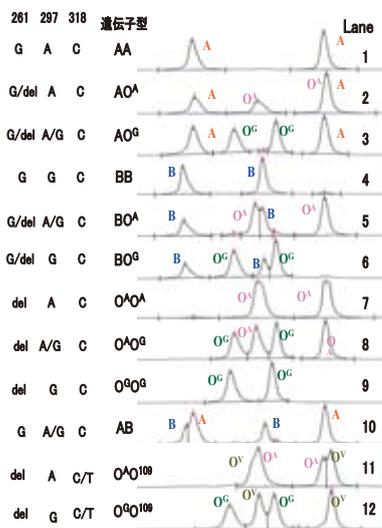


図 2. Fragment I 領域の塩基置換 SSCP pattern と遺伝子型

ピーク横に付けられた A,B,O<sup>A</sup>,O<sup>G</sup> は対立遺伝子の一本鎖 allele に対応しており、対立遺伝子がホモの場合は 4 本、ヘテロの場合は 2 本のピークが観察されるが、この gel 条件では A と O<sup>A</sup> の片方の allele が分離しないため遺伝子型が AO<sup>A</sup> の時は 3 本ピークとなる。

Acrylamide:Bis=49:1 7%gel にて泳動。

#### 3.1.2 Fragment II の SSCP パターン

図 3 は Fragment II の SSCP パターンである。A 型 allele グループの A101 と B 型および O 型の大部分は

np467 の塩基が C (Cytosine) であるが、A102 他、十数例の allele は np467 が T (Thymine) に置換している。双方の allele はピーク位置の違いにより容易に判別することができた。

3 レーンで右にシフトしたピークが見られるがこれは np526 に C>G の塩基置換がある B 型 allele にあらわれるパターンである。また、コロンビアのサンプルで主な allele と易動度の違うピークが検出され sequence の結果 np542 に G>A の塩基置換がある O209 allele であることがわかった。さらに np496 の A に deletion がある allele がモンゴルのサンプルで検出されたが、その allele もピーク易動度の違いによって検出が可能であった。

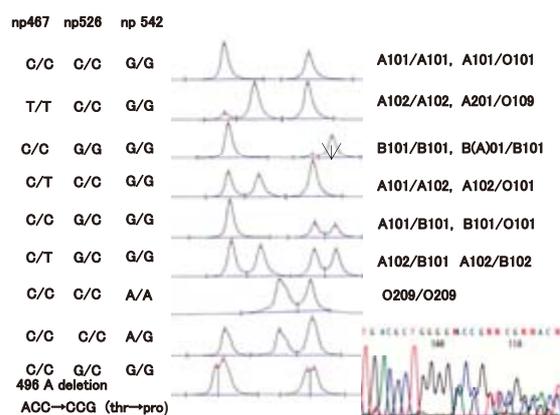


図 3. Fragment II 領域の塩基置換 SSCP pattern と変異に対する遺伝子型

np467 は A101 および B、O の大部分は C であるが、A102 他十数例 T に置換している。3 番目レーンの右側にシフトしたピーク (矢印) は np526 に C>G の塩基置換がある B にあらわれるパターンである。7 番目は np542 に G>A に塩基置換がある O209 allele の検出パターンである。

#### 3.1.3 Fragment III の SSCP パターン

図 4 は Fragment III のパターンである。パターンの中央にやや間が開いているがその左のピークがセンス鎖、右がアンチセンス鎖のピークである。ピークを識別するため数字の番号をつけた。大部分の遺伝子型は 1, 2, 3 のピークに相当する allele の組み合わせによって検出される。1 のピークに相当するのは np703 が G から A に置換している allele で、主なものは B101 である。2 のピークに相当するのは A allele と O<sup>A</sup> allele である。3 のピークは np771 が C から T に置換している O<sup>G</sup> allele で、主なものは O 201 である。

4, 5, 6, 7 のピークは稀な変異 allele によって出現するピークである<sup>[17]</sup>。4 のピークの allele は np771 が C から T に変異している他に np768 が C から A に置換している。5 の allele は np721 が C から T に、6 のピークは allele は np743 が G から C に、7 のピークの allele は np703 が G から A に置換している他、np771 が C から T に変異しているため易動度に変化を起している。

この allele は前半部が 4 塩基置換 (np297A>G, np526C>G, np657C>T, np703G>A) によって B allele の特徴をもち、後半部が 2 塩基置換 (np771C>T, np829G>A) によって O<sup>G</sup> allele の特徴を持つ hybrid allele である<sup>[18]</sup>。6 塩基置換のうち 3 塩基 (np526- Arg 176 Gly, np 703-Gly 235 Ser, np 829-Val277 Met) はアミノ酸置換をとまなう。そのうちの 176 と 235 が B 型転移酵素を転写するが 266 leu, 268 gly が A 型転移酵素を転写するキメラ構造を有し、A 型活性を呈する<sup>[19]</sup>。この allele は今回の結果では日本人において 0.5% 200 人に 1 人程度現われることがわかった。また A104 は Fragment I の np 297A.>G で B allele の特徴を持つが、他の部分は A 101 と同じで A 型活性を持ち、日本人の 0.75% に出現する。これらのことは exon 6 において遺伝子型で B allele を示すものであっても血液型の表現形では A 型であり、検査の上で注意を要する。

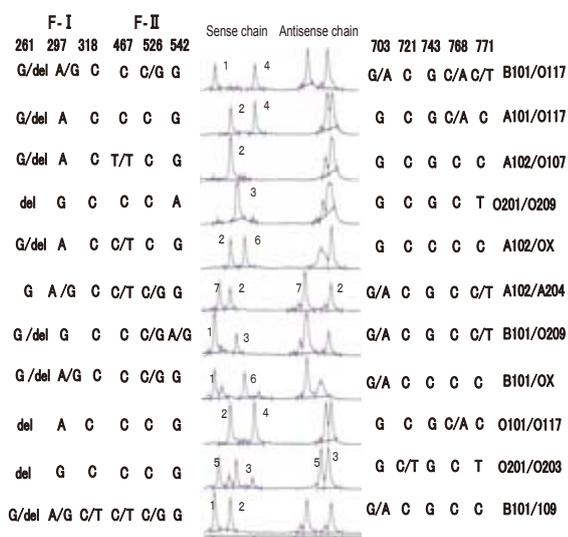


図 4. Fragment III 領域の塩基置換 SSCP pattern と変異に対する遺伝子型

ピークを識別するため数字の番号をつけた。大部分の遺伝子型は 1, 2, 3 のピークで表された allele の組み合わせであらわされる。ピーク 1 は np703 が G>A に置換しているもので 主なものは B101 型である。ピーク 2 は A 型 および O<sup>A</sup> 型で出現し、主なものは A101, A102, O101 型等である。ピーク 3 は np771 が C>T に置換している O<sup>G</sup> 型 で検出され主なものは O201 型 O209 型等である。ピーク 4, 5, 6, 7 は稀な allele によって出現する。ピーク 4 は np768 が C>A に置換している O117 型で検出される。

## 4. 考察

### 4.1 法医学分野への応用

#### 事件概要

①. 上腹部、下腹部、左右上肢、左右大腿、左右下肢が、つくば市内の別々の河川から発見されたもので、頭部は発見されていない。同一人物のものであるかが鑑定の対象になった。

Fragment I でどのサンプルも AB 型と判定、II でも np467C>T のピークが出現したためすべて A102/B101 型であると判定した。この形は日本人では 100 人のうち約 7~8 人にしか表れない血液型であることや、ABO 以外の遺伝子型検査結果を含め同一人の可能性が高いと鑑定された。

②. 女性屍。腔内に精液の痕跡があり、死亡前に関係した男性の血液型を検出することになった。Fragment I において被害者(血液)の遺伝子型は BO<sup>A</sup> であったが腔内容物から A 型であられるピークが検出され、Fragment II においても A102 型(467C>T)であられるピークが検出されて、被害者遺伝子型と異なる A102 型の存在が示唆された。後に逮捕された容疑者は A102/O101 であった。

同一の遺伝子型の場合は同一の波形を示すため、部分死体や遺留品などの DNA 検査において遺伝子型を視覚的にとらえることができる。また別の易動度のピークを検出することにより、他の DNA のコンタミネーションを容易に識別することができる利点がある。

### 4.2 人類学分野への応用

A101 allele と A102 allele はともに A allele グループに属し、np467 が C から T に置換しそれに伴いアミノ酸 156 コドンが proline から leucine に変化している。しかしアミノ酸置換に伴う糖転移酵素の活性には変化は見られない<sup>[20]</sup>。

図 5 は、A101 と A102 の出現頻度の比較を行った結果をグラフで示したものである。コロンビアは A 型 allele の数が 10 と少ないので統計から除いた。A101 と A102 の頻度に大きな人種による差が存在する。

今回の調査で Caucasian (米国白人) では遺伝子頻度が A101(0.25) > A102(0.083) で A101 の頻度が高かったが、Oriental(アジア人)では全体の平均では A101(0.054) < A102(0.199) と A102 の頻度が高く、Caucasian と逆転していた<sup>[21]</sup>。文献検索によるとペルシャ湾岸のクエートでも A101(0.112) > A102(0.018) で A101 の頻度が高く<sup>[22]</sup>、米国白人では A101 が A 型全体の 75% であるのに対しクエートでは 86% を占めている。

一方ミャンマーの A101 の頻度は 0.064 で A 型全体で A101 型の占める割合が 32% であるが、中国上海は 0.031 で 14% と低く、一方モンゴルでは 0.038、23%、日本全体では 0.057、21% とその中間の値であった。

太平洋ソロモン諸島では A101(0.180) > A102(0.130) で A101 が 58% と若干上回っている<sup>[23]</sup>。A101 を基準とした場合アジアでは古い地域に A101 遺伝子が多く残り、新たに変異した A102 遺伝子があとからアジア地域に広まっていったのではないかと示唆されるが、これにはさらに多くの民族の検証が必要である。

また日本各県の比較では最も A101 頻度の高い高知県と頻度の低い山口県の間 P < 0.03 の有意差があるが、これも日本列島に各地からの民族が移り住んだ結果かもしれない。

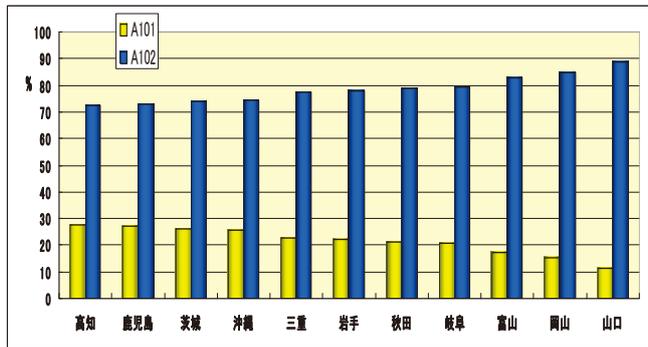
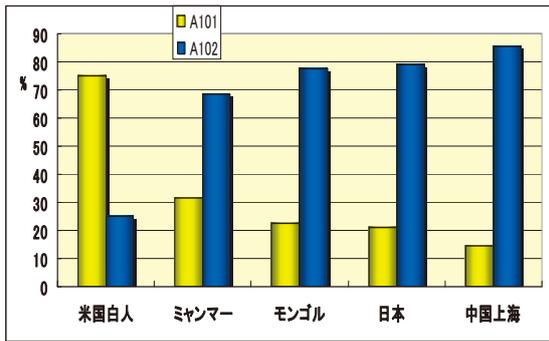


図 5. A101 と A102 の allele 頻度の A 型全体に対する割合の地域別比較  
米国白人とアジア人では頻度が大きく異なっている。またアジア各地域の他、日本各県の頻度にも差がある。

O allele は np261 が欠損している。そのためアミノ酸コドン 117 にフレームシフトをきたし、不完全なタンパク質しか合成されないため、糖転移酵素活性を有しない。

O 型には大きく 2 つのサブグループがある。O<sup>A</sup> allele group は O 型 allele のうち np297 が A のもので、O101 が主な allele である。O<sup>G</sup> allele group は np297 が G に置換したもので O201 が主な allele で、O101 と比較するとその他にも np646、np771 などに塩基置換がある<sup>[24]</sup>。

日本各県を比較すると岐阜県や高知県は O<sup>A</sup> allele group 頻度の高く、沖縄県や鹿児島県は O<sup>G</sup> allele group 頻度が高いなど日本各地において頻度の差がある (図 6)。

しかし高い有意差とは言えず日本全体においては O<sup>A</sup>(0.299) > O<sup>G</sup>(0.276) という結果で若干 O<sup>A</sup> allele group 頻度が高いがほぼ同率で、これは中国上海 O<sup>A</sup>(0.301) > O<sup>G</sup>(0.281) や ミャンマー O<sup>A</sup>(0.277) > O<sup>G</sup>(0.261) の結果と類似している。しかしモンゴルは O<sup>A</sup>(0.258) < O<sup>G</sup>(0.340) で O<sup>G</sup> allele group の頻度が高く、アジア各地域において頻度の差があることが示唆されたため今後他のアジア地域のデータを調査する必要がある。

コロンビアは O<sup>A</sup>(0.368) < O<sup>G</sup>(0.560) という結果で O<sup>G</sup> allele group 頻度が高く、そのうち np542 に G から A に塩基置換がある O209 が、O allele 全体の 15% を占める。この allele は日本人と中国上海のサンプルでは検出されず、今回の調査でモンゴル、ミャンマー、米国白人に数例見られる程度であった。

文献によるとヨーロッパのバスク地方やアフリカのアイボリーコーストでは検出されず、エクアドルで O allele 全体の 4%、ボリビアで 12% ブラジルで 43%<sup>[25]</sup> など、南米地域で多く観察されることがわかった。この結果は人種の特定に利用できるものではないかと考えられる。今後さらに地域、民族の調査地点を増やし検証を続けていく必要があると考える。

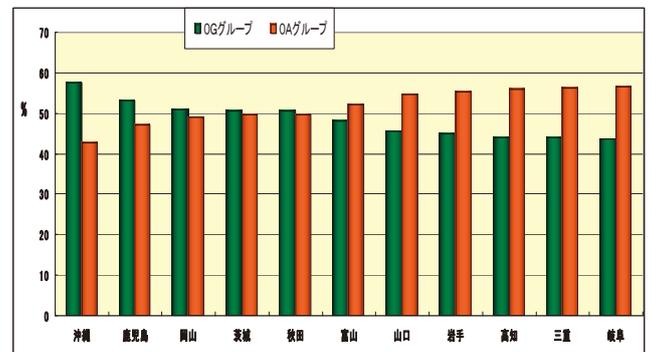
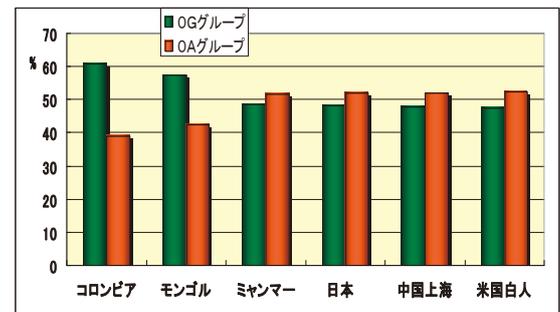


図 6. O<sup>A</sup> グループと O<sup>G</sup> グループの allele 頻度の O 型全体に対する割合の地域別比較  
アジア各地域で O<sup>A</sup> と O<sup>G</sup> の頻度が異なる他 日本各県においても異なり沖縄県と岐阜県では P < 0.04 の有意差があった。

## 5. 謝辞

本研究を行うにあたり、手厚くご指導を賜りました人間総合科学研究科法医学教授本田克也先生に深く感謝いたします。

本研究は平成 15 年度独立行政法人日本学術振興会科学研究費(奨励研究)課題番号 15922051、平成 16 年度研究費(奨励研究)課題番号 16922159、平成 17 年度科学研究費(奨励研究)課題番号 17927024 の補助を得て行われました。よって関係者の方々に篤く御礼いたします。

## 参考文献

- [1] Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al. :Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood* :88, 2732-2737,1996.
- [2] 土井裕輔, 山本雄二, 稲垣幸代, 他. :SNaPshot Kitを用いたSNP解析による新しいABO遺伝子型判定法. *DNA多型* :Vol.9, 254-257, 2001.
- [3] Yamamoto F, Clausen H, White T, et al. :Molecular genetic basis of the hist-blood group system. *Nature*: 345, 229-233, 1990.
- [4] Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, et al.:Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem* :265, 1146-1151,1990.
- [5] Bennett E P, Steffensen R, Clausen H, et al. :Genomic cloning of the human hist-blood group ABO locus. *Biochem.Biophys.Res.Commun* :206,318-325,1995.
- [6] Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, et al. :Extensive polymorphism of ABO blood group gene:three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Hum. Genet* :97, 777-783, 1996.
- [7] Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al.:Different alleles cause an imbalance in A2 and A2B phenotypes of the ABO blood group.*Vox Sang*: 74, 242-247,1998.
- [8] Yip S. P :Sequence variation at the human ABO locus. *Ann. Hum. Genet.* :66, 1-27, 2002.
- [9] Yamamoto F :Molecular genetics of ABO. *Vox Sang.* :78 (suppl 2) ,91-103,2000.
- [10] Lee J.C.I, Chang J.G :ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci*, 37, 1296-1275,1992.
- [11] Watanabe G, Umetsu K, Yasuda I, et al. :Amplified product length polymorphism (APLP) :a novel strategy for genotyping the ABO blood group. *Hum. Genet.* :99, 34-37, 1997.
- [12] Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al. :Recombination and gene conversion-like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes. *Immunogenetics*: 53, 190-199, 2001.
- [13] Suzuki K, Iwata M, Tsuji H, et al.:A de novo recombination in the ABO blood group gene and evidence for the occurrence of recombination products. *Hum. Genet.* :99, 454-461,1997.
- [14] 橋谷田真樹, 那谷雅之, 舟山真人 :SNPsによるABO式血液型遺伝子の多型解析. *DNA多型* :Vol.9, 249-253, 2001.
- [15] 橋本良明, 中西祥徳 :ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によるABO式血液型の遺伝子型判定とその親子鑑定への適用. *日法医誌*, 47(6),481-485,1993
- [16] 中村貴子, 及川明奈, 本田克也 他. :フラグメント解析による高精度 ABO 式遺伝子型検出. *DNA多型* :Vol.11,150-156,2003.
- [17] 中村貴子, 本田克也, 三澤章吾. :電気泳動パターン解析による ABO 遺伝子多型頻度分布. *DNA多型* :Vol.12, 166-169,2004
- [18] Koichi Suzuki.:ABO blood group allele and genetic recombination. *Legal Medicine*:vol 7,205-212,2005
- [19] Yamamoto F, Hakomori S. :Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B trnsferases is bases on amino acid substitutions. *Biol.Chem*: 265, 19257-19262, 1990.
- [20] Seltam A, Blasczyk R. :Missense mutations outside the catalytic domain of the ABO glycosyltransferase can cause weak blood group A and B phenotypes. *Transfusion* 45,1663-1669,2005
- [21] Yip S.P :Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO allele and readily indentifies new alleles. *Blood* 95, 1487-1492, 2000
- [22] Yip S p, Choi P S. :ABO blood group in Kuwaitis: detailed allele frequency distribution and identification of novel alleles. *Transfusion* 46 (5):773-779, 2006
- [23] Ohashi J, Naka,I. : Polymorphisms in the ABO blood group gene in three populations in the New Georgia group of the Solomon Islands.*J Hum Genet* 51:407-411,2006
- [24] Roubinet F, Kermarec N, Despiau S, et al.:Molecular polymorphism of O alleles in five populations of different ethnic origins. *Immunogenetics* :53, 95-104, 2001.
- [25] Olsson L, Santos B, Chester A, et al.:Heterogeneity of the O alleles at the blood group ABO locous in Amerindians. *Vox Sang*: 74, 46-50, 1998.

# PCR-SSCP analysis of ABO blood genotypes polymorphism and its application

Takako Nakamura

Institute of Medical Science, Academic Service Office for Comprehensive Human Science, University of Tsukuba  
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

We developed a new analyzing system of one region of Exon6 (Fragment I ) and two regions of Exon7 (Fragment II, Fragment III) in ABO blood genotypes using ALF express DNA sequencer. The system made it possible to discriminate 15 major genotypes including combination of five kinds of main alleles accurately it is useful for practical forensic examination. The rare single base substitutions can be detected with the system. We identified 16 kinds of rare alleles besides five main alleles. Using these results we compared the allele frequency of Japanese population with other five countries populations. It showed that there are significant differences among these populations.

**Keywords:** ABO blood genotypes; PCR-SSCP analyze; single base substitutions; allele frequency