

【第99回生涯教育講座】

自己免疫疾患と関連する Deoxyribonuclease II (DNase II)
遺伝子 SNP と酵素プロモーター活性の相関解析たけ した はる お
竹 下 治 男

キーワード：DNase II, 自己免疫疾患, 遺伝子多型, SNP, 酵素プロモーター活性

要 旨

自己免疫疾患との関連が示唆されている Deoxyribonuclease II (DNase II) 遺伝子内の非同義置換型 SNP 7 座位と RA 関連 SNP 5 座位について、広範な集団調査と遺伝子型—活性相関解析を実施した。その結果、非同義置換型 SNP 7 座位に関して、今回調査した集団では著しく遺伝的多様性が乏しいことが明らかとなった。さらに、これら SNP の minor allele に対応するアミノ酸置換型 DNase II の性状解析から、SNP A58 del, V284M, R298L 及び Q322Term における minor allele によって不活性な DNase II 酵素が産生されることが明らかとなった。一方、RA 関連 SNP 5 座位については、-1951G, -1066G, -390A, +2630T, 及び +6235G allele は低血清 DNase II 活性レベルと関連していることが明らかとなった。さらにこのうち遺伝子上流域に存在する SNP 3 座位が有意にプロモーター活性変化を惹起することから、これらのヒト DNASE2 内プロモーター領域の SNP はプロモーター活性低下によって血清 DNase II 活性を減少させることがはじめて示唆された。

は じ め に

従来より、細胞死に伴い産生される核抗原を含めた細胞残渣のクリアランスが systemic lupus erythematosus のような自己免疫疾患の発症阻止に寄与することが示されてきた。これに関連し、核抗原のうち DNA を分解・消去し、抗 DNA 抗

体の産生を抑える役割を果たすものとして DNase が想定されており、なかでもリソソーム酸性加水分解酵素である DNase II は食作用によって取り込まれた死細胞残渣に含まれる DNA 分解に関与することが報告されている¹⁾。近年、マウスにおける DNase II 欠損の誘導はヒトのリューマチ性関節炎に類似した慢性多発性関節炎を引き起こすことが示された²⁾。さらに、DNase II 欠損マウスではマクロファージ内の未分解 DNA の蓄積によって致死的な貧血が発症する³⁾。このよう

Haruo TAKESHITA

島根大学医学部法医学教室

連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

に、DNase II は自己免疫疾患などとの関連が示唆されてきたが、それを検証するための遺伝医学的解析は未だなされていない。

DNase II 遺伝子(DNASE2)には NCBI dbSNP database 上いくつかの SNP が同定されており、その内の 6 座位が非同義置換型 SNP である。さらに、SLE 患者に認められる腎不全との相関がある変異として SNP V190I が報告されている⁴⁾。しかしながら、これら SNP について未だ多型性の確認もなされておらず、広範な集団調査は実施されていない。特に、これら SNP に基づくアミノ酸置換の酵素活性への影響は明らかにされていない。DNase II 遺伝子が自己免疫疾患等の発症の遺伝的背景を形成する因子となりうるかを検証するためには、*in vivo* DNase II 酵素活性レベルの変動を生じる可能性のある非同義置換型 SNP と自己免疫疾患罹患との相関が明らかにされなければならない。これに関連して、Shin らは DNASE2 の SNP が韓国人 SLE 患者の腎障害に関与していることを⁴⁾、さらに、Rossol らはドイツ人において、プロモーター領域 SNP が RA と相関していること⁵⁾を報告している。しかし、これらの報告された SNP 5 座位についての広範な集団調査も実施されておらず、自己免疫疾患の発症機序に関与していると推測される血清 DNase II 活性との関連性も未だ明らかにされていない。

本研究では、自己免疫疾患との関連性が報告されている上記 SNP (図 1) に着目し、①アジア人、アフリカ人、ヨーロッパ人及びメキシコ人における集団調査、②血清 DNase II 活性と遺伝子型の相関の精査、③血清 DNase II 活性と有意な相関が認められた上流域 SNP 3 座位とプロモーター活性の相関の精査、を実施した⁶⁾。

2. 材料と方法

(1) 試料

アジア人集団 (日本人310名, 韓国人381名, 中国人39名, モンゴル人191名, チベット人140名, タマン人42名, タミル人43名, シンハラ人43名), アフリカ人集団 (オバンボス人53名, ガーナ人73名, コーサ人57名), ヨーロッパ人集団 (ドイツ人86名, トルコ人189名), 及びメキシコ人集団 (ウイチョル人50名, ナワトル人82名, メスティーゾ人78名) について、少なくとも自己免疫疾患の罹患歴のない健常人から採取した血液試料から DNA を分離し, SNP 遺伝子型判定に使用した。すべての参加者から文章で同意を得ており, さらに, 本研究は当該施設の倫理委員会等で承認を得ている。

(2) SNP 遺伝子型判定

各 SNP について PCR-RFLP 法または mismatched PCR-RFLP 法⁷⁾によって, それぞれの遺伝子型を判定した。なお, 各 SNP の allele に相当する model construct を従前の方法に従い作製し, 遺伝子型判定の際のコントロールとして使用した。

(3) 血清 DNase II 酵素活性解析

日本人176人の血清中 DNase II 活性を single radial enzyme diffusion (SRED) 法⁸⁾によって定量した。

(4) レポーターアッセイ

上流域 SNP -1951G>A, -1066G>C, 及び -390A>C に関するハプロタイプ GGA に対応する 2301 bp の DNA 断片を増幅し, pGL3-basic vector (Promega) に挿入した。これを鋳型として, 日本人において認められたハプロタイプである ACC, GGC, ACA, 及び GCA の report

construct を KOD-Plus Mutagenesis Kit (Toyobo) を用いて作製した。これらの construct 及び pRL-TK (Promega) をヒト肝癌由来細胞株 HepG2 に導し, Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega) を用いて luciferase 活性を測定した。

(5) 置換型 DNase II 酵素の性状解析

wild-type DNase II cDNA の coding region に相当する DNA 断片をヒト脾臓由来 total RNA を鋳型として RT-PCR によって増幅した: primer として, 5'-TTCCTGGATCCCAGCCCC ATAGCAG-3' (sense) と 5'-CATACTCGAGCC ACTGCACCTGGCC-3' (antisense) を使用した。得られた DNA 断片を pcDNA3.1vector (Invitrogen 社製) に組み込み, wild-type construct とした。さらに, 同 construct を鋳型として site-directed mutagenesis によって 7 種類の SNP の minor allele に対応するそれぞれのアミノ酸置換型 construct を作製した。これら発現ベクターを COS-7 細胞に遺伝子導入後, 発現した DNase II 酵素の細胞抽出液及び培養上清中の活

性レベルを single radial enzyme diffusion (SRED) 法⁸⁾によって定量した。

結 果

(1) DNase II SNP 遺伝子型判定の確立

DNASE2 内の 7 座位の非同義置換型 SNP および今回着目した RA 関連 SNP 5 座位 (図 1) について, mismatched PCR-PFLP 法による遺伝子型判定法を確立した。各 SNP の allele に相当する model construct を用いたところ, 同法ではそれぞれの allele を再現性良く容易に識別できた。さらに, 遺伝子型判定結果の正確性は幾人かの被験者由来の DNA 試料の sequencing による結果によって検証された。

(2) 6 集団における DNase II 遺伝子内の 7 非同義置換型 SNP の遺伝子型分布

異なる 6 集団における DNase II 遺伝子内の 7 非同義置換型 SNP の遺伝子型分布を前項の遺伝子型判定法を用いて調査した。

日本人 (100名) 集団では, SNP R23I, A58del, H188R, V190I, V284M, R298L 及び Q322term

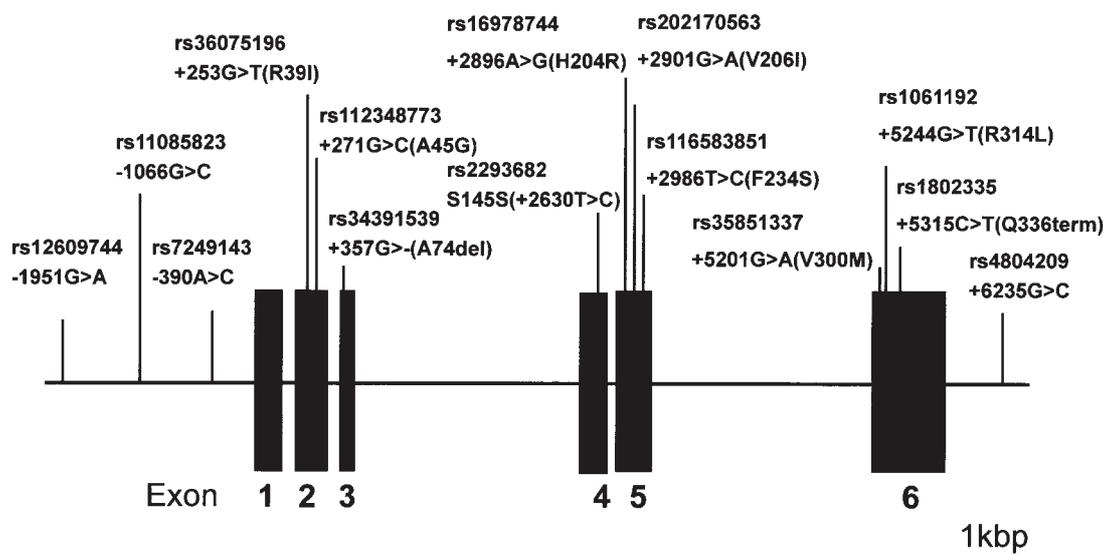


図 1 ヒト DNase II 遺伝子構造と非同義置換型 SNP の分布

について、それぞれ *G188*, *G292*, *A683*, *G688*, *G670*, *G1013* 及び *C1084* allele のホモ接合体のみが観察された。アフリカ人集団についてもオバンボス人100名及びガーナ人96名では、コーカソイド人集団についてもトルコ人96名及びドイツ人100名では、日本人集団と同様に、全てホモ接合体であった。一方、韓国人集団96名では、SNP *V190I* について *G688* ホモ接合体以外に *G688/A688* ヘテロ接合が2名に観察された：*G688/G688* と *G688/A688* の遺伝子型頻度はそれぞれ97.9%, 3.5%であった。なお、他の非同義置換SNP では他の集団と同様にすべて mono-allelic な分布を示した。従って、他の5集団では単一のハプロタイプ *G188/G292/A683/G688/G970/G1013/C1084* が観察されたが、韓国人集団の2%にはそれに加えハプロタイプ *G188/G292/A683/A688/G970/G1013/C1084* が分布していた。

(3) 16集団における DNase II 遺伝子内 RA 関連 SNP の遺伝子型分布

自己免疫疾患との関連性が報告されている SNP 5 座位について、異なる16集団において遺伝子型分布を調査した。アジア人集団においては、-1951G, -1066G, -390A, +2630T, 及び +6235G allele が、ヨーロッパ人集団およびメキシコ人集団では -1951A, -1066C, -390C, +2630C, 及び +6235C allele が優位であった。他方、アフリカ人集団においては、ヨーロッパ人集団やメキシコ人集団と同様、-1951A, -1066C, -390C, +2360C, 及び +6235C allele が優位である傾向が認められた。

(4) 非同義置換型 SNP に対応するアミノ酸置換の DNase II 酵素活性への影響

初めに、主要ハプロタイプに相当するアミノ酸

残基をもった DNase II を wild-type として、それぞれの SNP における minor allele に対応するアミノ酸置換型 DNase II を作製した。それぞれを COS-7 細胞で発現させ、細胞抽出液中の DNase II 活性を測定した (図2)。R23I, H188R 及び V190I は wild-type と同レベルの酵素活性を有し、DNase II タンパクにおける R23, H188 及び V190 のアミノ酸置換は酵素活性に影響ないものであった。他方、V284 及び R298 の Met 及び Leu への置換は酵素活性を著しく減弱させており、さらに、欠損変異型 A58del 及び Q322Term では酵素活性は検出されず、従って両アミノ酸残基及び酵素タンパクの C 末端側22残基は酵素活性発現に必須なものであることが明らかとなった。

次に、SNP に対応するそれぞれのアミノ酸残基の酵素活性への関与を明らかにするため、一連のアミノ酸置換型 DNase II を作製し、その酵素活性を測定した。R23を Ala (R23A) または His (R23H) に置換しても、酵素活性に変動なく、従って23番アミノ酸残基は酵素活性に関与してい

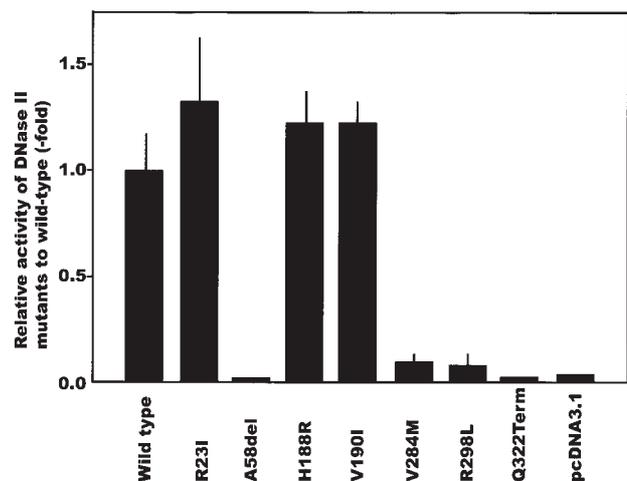


図2 非同義置換 SNP によるアミノ酸置換の DNase II 酵素活性への影響

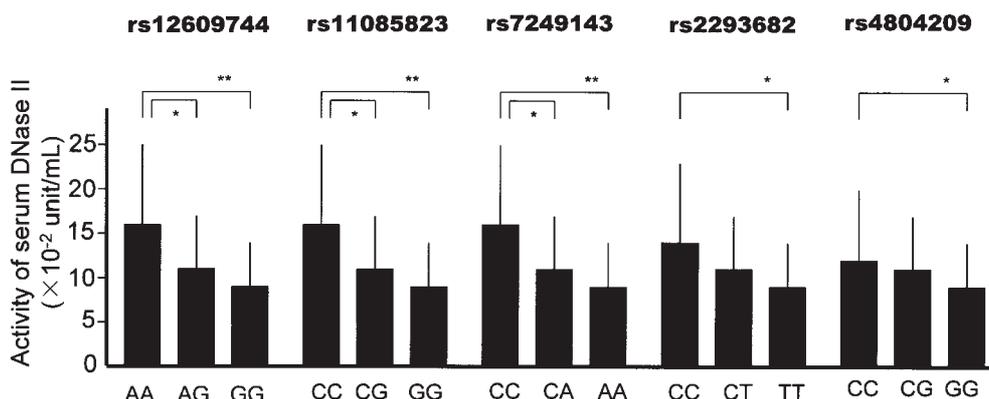


図3 プロモーター領域 SNP と酵素活性の相関

ない。また、H188 の Lys (H188K) または Ala (H188A) への置換は酵素活性に効果がなく、188番アミノ酸残基における塩基性アミノ酸は酵素活性発現に必須ではなかった。他方、V284を他の疎水性アミノ酸 Ala (V284A) または Leu (V284L) に置換しても、V284Mと同様に、低い酵素活性しか示さず、従って、284番アミノ酸残基として疎水性アミノ酸のうち Val が十分な酵素活性発現には必須であった。さらに、R298を他の塩基性アミノ酸に置換した場合 (R298H または R298K)、疎水性アミノ酸への置換 (R298L または R298L) と同様に、酵素活性は著しく減弱しており、298番アミノ酸残基は塩基性アミノ酸のうち Arg が十分な酵素活性発現には必須であることが明らかとなった。DNase II C末端領域に関して、C末端9残基を欠失した A335term では十分な酵素活性を有したことから、少なくとも酵素タンパクのC末端側9アミノ酸残基に相当する領域は酵素活性に関与しないことが明白である。なお、マウス及びラット DNase II ではヒト酵素のC末端側13残基が欠失しており、今回の結果を支持するものである。

(5) 遺伝子型の血清 DNase II 酵素活性への影響

血清を採取することができた日本人176人の遺

伝子型、及び血清中 DNase II 酵素活性を精査した (図3)。-1951G, -1066G, -390A, +2630T, 及び+6235G allele を有する対象群は、有意に DNase II 酵素活性が低下していることが明らかとなった。これらのうち、上流域に存在する SNP 3 座位は酵素活性により高い相関が認められた。また、韓国人 SLE 患者においては、腎障害を伴う患者群の -1066G, +2630T, 及び +6235G allele 保有率は腎障害がみられない患者群よりも高く⁴⁾さらに、ドイツ人では、日本人対象群において酵素活性低下がみられた -1951G, -1066G, -390A, +2630T, 及び +6235G allele は健常人よりも RA 患者群で高頻度に認められた⁵⁾。

(6) 上流域 SNP 3 座位のプロモーター活性への影響

日本人における遺伝子型の血清 DNase II 活性へのより強い影響が認められた上流域3座位について、日本人に多く認められたハプロタイプである GGA, ACC, GGC, ACA, 及び GCA のプロモーター活性への影響を調べた (図4)。主要ハプロタイプである GGA の全てが置換した ACC では約1.7倍のプロモーター活性が認められた。-390C への置換がみられる GGC や、-1951A 及び -1066C の置換体である ACA においてもプ

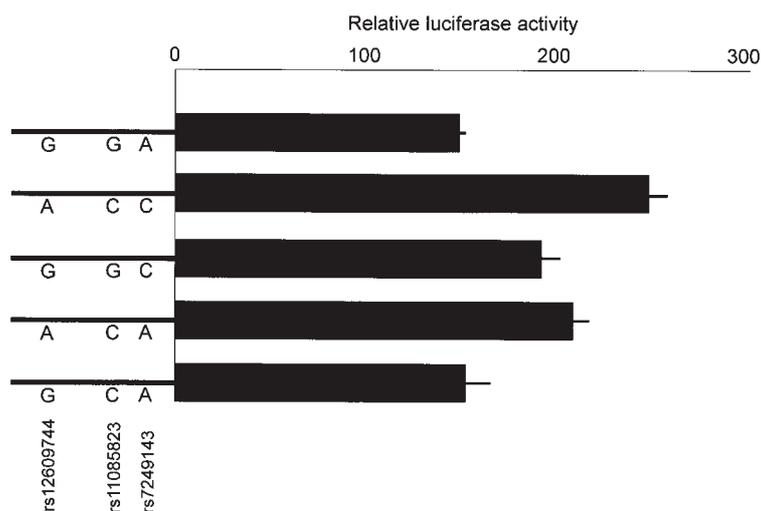


図4 SNP 3 座位のプロモーター活性への影響

ロモーター活性上昇が確認された。他方, -1066C のみが置換した GCA では, 主要ハプロタイプとほぼ同様のプロモーター活性が認められた。

考 察

本研究では, DNASE II 内の全ての非同義置換型 SNP 7 座位について, 新規に確立した genotyping 法によって広範囲な集団調査を実施し, その遺伝的背景を初めて明らかにした。今回調査した 3 大人種を含む 6 集団において, SNP R23I, A58del, H188R, V284M, R298L 及び Q322Term は全て mono-allelic であり, 多型性はないことが明らかとなった。他方, NCBI データベースでは, SNP R23I における T188 allele, H188R における G683 allele および V284M における A970 allele はそれぞれ 0.086, 0.022, 0.013 と低頻度で分布しているが, 今回調査した集団にはそれらのヘテロ接合体は認められなかった。また, Shin らは韓国人集団で新規な非同義置換型 SNP V190I を見出した⁶⁾; 今回調査した韓国人集団でも同様な遺伝子型分布を示した。なお, アジア人集団として, チベタン人, 中国人, スリラン

カ人, モンゴル人及びネパール人についても SNP V190I を解析したが, 韓国人で見られた A688 allele は認められなかった。従って, SNP V190I における A688 allele は韓国人特異な allele と考えられた。以上の結果より, DNase II 遺伝子内における非同義置換型 SNP 7 座位について, 遺伝的多様性は極めて低いことが明らかとなった。

DNase II 活性発現には, 一般酸塩基触媒として作用する H97 及び H295 とともにタンパクのフォールディングに参与する H113 が必須である⁹⁾。非同義置換型 SNP によって置換されるアミノ酸残基のうち, R298 のみが他生物種由来の全ての DNase II において保存されている¹⁰⁾。SNP R298L に対応したアミノ酸置換によって酵素活性は殆ど消失し, さらに他の塩基性アミノ酸 Lys または His では Arg の代替とならなかった。従って, 酵素タンパクにおける 298 番アミノ酸残基は負電荷ではなく Arg 残基自身が酵素活性発現に必須である。他方, SNP R23I, H188R 及び V190I が係るアミノ酸残基はすべて多生物種由来酵素には保存されていないことから酵素活性発現

には関与していないことが推測されるが、これらの置換体が wild-type と同レベルの酵素活性を示した今回の結果と一致する。DNase II には共同して活性部位を構成する二か所の phospholipase D motif (97HTK99 及び 279HSK281) が含有されており、後者に隣接する V284 はよく保存されている¹¹⁾。V284 の他アミノ酸への置換は活性部位への影響を介して活性レベルを変動させるものと推察されたが、今回の結果から活性発現に V284 が必須であることが確認された。

Kawane らは Poly(I)/poly(C) で処置した後、DNase II を欠損させるとマウスにヒトのリューマチ性関節炎に類似した慢性多発性関節炎が惹起されることを報告した²⁾。さらに、Drosophila において、DNase II と高分子 DNA のクリアランスが免疫能の維持に不可欠である¹²⁾。また、Rossol らは、DNase II 遺伝子発現調節領域における SNP がリウマチ性関節炎の発症と関連することを報告している¹³⁾。DNase II は細胞内に取り込まれた高分子 DNA の分解に直接関与しており、DNase II 活性の消失あるいは機能不全による、自己抗体産生の免疫原としての DNA のクリアランス障害は自己免疫疾患発症につながるものと推察されている¹³⁾。従って、DNase II 活性レベルの変動が自己免疫疾患発症に関与すると考えられ、その遺伝的背景としてアミノ酸置換を介して酵素活性変動を惹起しうる非同義置換型 SNP に着目した。今回 DNase II 遺伝子内の非同義置換型 SNP のうち、SNP A58del, V284M, R298L 及び Q322Term における minor allele が不活性な DNase II 酵素を産生することを明らかにした。特に、SNP V284M について、今回の調査集団では見出されなかったが、NCBI データベースでは minor allele A970 の分布が示されて

いる。A970/G970 ヘテロ接合体の *in vivo* DNase II 活性は低下していると考えられ、A970 allele は自己免疫疾患の危険因子となる可能性がある。

さらにこれまで、DNASE2 内における RA 関連 SNP 5 座位は自己免疫疾患との関連性が報告されており^{4,5)}、本研究では、新規に確立した genotyping 法によって広範囲な集団調査を実施し、その遺伝的背景を初めて明らかにした。これらの 5 座位では、今回調査した16集団すべてにおいて多型性が認められた。特に、アジア人集団はアフリカ人、ヨーロッパ人、及びメキシコ人集団とは異なる頻度分布を示すことが確認された。

日本人において、遺伝子型と血清 DNase II 活性を調査した結果、主要な -1951G, -1066G, -390A, +2630T, 及び +6235G allele を有する対象群は、-1951A, -1066C, -390C, +2630C, 及び +6235C を有する対象群より低い酵素活性を示すことが判明した。特に、上流域に存在する SNP 3 座位では、酵素活性に対する効果がより大きいことが示された。Shin らは、韓国人 SLE 患者において、-1066G>C, +2630T>C, 及び +6235G>C の遺伝子型頻度分布を分析し、-1066G, +2630T, 及び +6235G allele を保有する患者群は、保有しない患者群よりも高い頻度で腎障害を伴っていることを見出した⁹⁾。本研究においても -1066G, +2630T, 及び +6235G allele が血清 DNase II 活性を減少させていることが判明しており、これらの allele が SLE 腎障害発症に関与していることが推定される。特定の遺伝子型の SLE 発症頻度への影響を明らかにするため、SLE 発症に関する case-control study が必要である。さらに、Rossol らはドイツ人において、健常人群と RA 患者群について allele 及び遺伝子型頻度を調査し、-1951G, -1066G, -390A, +2630T, 及び +6235G

allele が有意に RA と関連することを報告した⁵⁾。本研究においても, これらの allele が血清 DNase II 活性減少を誘発していることが証明された。DNase II 欠損マウスではヒトの RA に類似する慢性多発性関節炎を引き起こすことが示されており²⁾, これらの知見は血清 DNase II 低下が RA のような自己免疫疾患発症に関係することを示唆している。したがって, 血清 DNase II 活性減少が自己免疫疾患発症の分子学的要因の一つではないかと考えられる。この推測を検証するためには, 今後, 健常人および自己免疫疾患患者における DNase II 酵素活性を分析する必要がある。

上記の RA 関連 SNP 遺伝子型と血清 DNase II 活性の調査より, 上流域のハプロタイプ GGA は低酵素活性型, また ACC は高酵素活性型に相当すると考えられる。しかし, これらの SNP は遺伝子上流域に座位し, 酵素活性の変化した

DNase II タンパクを直接産生させることはない。これらの上流域 SNP 3 座位は DNASE2 のプロモーター活性の変動によって惹起される遺伝子発現を介して酵素産生量の変化によって血清 DNase II 活性の変化が引き起こされたと考えるのが妥当である。そこで, 我々は上流域 SNP 3 座位のプロモーター活性への影響を調査した。その結果, 日本人において優位に認められたハプロタイプ GGA は最も低いプロモーター活性を示し, ACC は最も高いプロモーター活性を示した。この結果は, 血清 DNase II 酵素活性レベルと一致しており, RA 関連 SNP が関与する DNASE2 プロモーター活性が有意に血清酵素活性に影響していることが明らかとなった。また, 各ハプロタイプのプロモーター活性の比較から, RA 関連 SNP のうち主としてプロモーター領域の SNP -1951G>A が DNASE2 プロモーター活性変化に関与しているであろうと推測された。

文 献

- 1) McIlrory D, Tanaka M, Sakahira H., et al.: An Auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev*, 14: 549-558, 2000.
- 2) Kawane K, Ohtani M, Miwa K., et al.: Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes for degradation in macrophages. *Nature*, 443: 998-1002, 2006.
- 3) Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G., et al.: Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292: 1546-1549, 2001.
- 4) Shin HD, Park BL, Cheong HS., et al.: DNase II polymorphism associated with risk of renal disorder among systemic lupus erythematosus. *J Hum Genet*, 50: 107-111, 2005.
- 5) Rossol M, Pierer M, Arnold S., et al.: Homozygosity for DNASE2 single-nucleotide polymorphism in the 5'-regulatory region is associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68: 1498-1503, 2009.
- 6) Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Fujihara J, et al. Genetic and expression analysis of SNPs in the human deoxyribonuclease II: SNPs in the promoter region reduce its in vivo activity through decreased promoter activity. *Electrophoresis*, 33: 2852-2858, 2012.
- 7) Yasuda T, Nadano D, Tenjo E., et al.: Genotyping of human deoxyribonuclease I polymorphism by the polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 16: 1889-1893, 1995.
- 8) Yasuda T, Nadano D, Awazu S., et al.: Human urine deoxyribonuclease II (DNase II) isoenzymes. *Biochim Biophys Acta*, 119: 185-193, 1992.
- 9) Cheng Y-C., Hsueh C-C, Liao T-H.: Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. *Biochem J*,

- 398: 177-185, 2006.
- 10) Kreiser FJ, MacLea KS, Park JP., et al.: The cloning, genomic structure, localization, and expression of human deoxyribonuclease II β . *Gene*, 269: 205-216, 2001.
- 11) Schafer P, Cymerman IA, Bujbicki JM., et al.: Human lysosomal DNase II α contains two requisite PLD-signature (HxK) motif. *Protein Sci*, 161: 82-91, 2007.
- 12) Seong CS, Varela-Ramirez A, Aguikera A. DNase II deficiency ompairs innate immune function in *Drosophila*. *Cell Immunol*, 7: 1-8, 2006.
- 13) Kawane K, Fukuyama H, Yoshida H., et al.: Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nature Immunol*, 4: 138-144, 2003.