

【第116回生涯教育講座】

脊椎動物 DNase I の比較分子論的研究および
自己免疫疾患関連遺伝子としての SNPs の検索たけ した はる お ふじ はら じゅん こ
竹 下 治 男 藤 原 純 子
き むら かおり
木 村 かおり

キーワード：DNase I, 自己免疫疾患, SNPs

はじめに

デオキシリボ核酸分解酵素 I (DNase I, EC 3.1.21.1) は、エンド的に DNA に作用して 5' 末端にリン酸基をもつオリゴヌクレオチドを生成するエンドヌクレアーゼの一つである。ヒト DNase I は 260 個のアミノ酸残基から構成されている約 32 kD の糖蛋白質である。遺伝的多型形質性を有し、従来までは単なる消化酵素にすぎないと考えられてきたが、アポトーシスへの関与機序の解明、種々の癌のリスクファクターへの応用、急性心筋梗塞の超早期診断への応用、全身性エリテマトーデス (SLE) への関与などが報告されている。特に従来から、SLE のような自己免疫疾患の発症に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関与することが示唆されてきた。これに関連し、核抗原のうち高分子 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 I を含めた DNase family 蛋白遺伝子が想定されている。こ

の DNase family のうち original DNase である本稿詳述の DNase I はその *in vivo* 活性レベルの低下・消失と SLE 罹患の関連が報告されてきた。すなわち、DNase I-deficient mice は SLE 様病態を示すこと、SLE 患者より loss-of-function 型変異や活性を減弱する missense 変異が見出されたこと、健常者に比し、SLE 患者の血清 DNase I 活性レベルは有意に低下していたこと等である。従って、*in vivo* DNase I 活性レベルの低下や消失を惹起する DNase I 遺伝子 (DNASE1) 内の変異は自己免疫疾患の病因・病態に大きく関与する遺伝的リスクファクターとなることが想定された。そこで、我々は活性変動を惹起する可能性があるアミノ酸置換を引き起こす missense 変異、あるいは loss-of-function 型酵素を産生する非同義置換型 SNPs に着目し、DNase family 遺伝子について解析を行っている。DNase I 遺伝子には NCBI dbSNP database 上多数の SNP が登録されており、その内の 58 座位が非同義置換型 SNPs である。しかしながら、これら SNPs 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ものが散見される。特に、これら非同義置換型

Haruo TAKESHITA et al.

島根大学医学部法医学講座

連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部法医学講座

SNPsに基づくアミノ酸置換等の酵素活性への影響は明らかにされておらず、いわゆる functional SNPs としての検討は全くなされていない。そこで、*in vivo* DNase I 酵素活性レベルの変動を惹起する可能性のある非同義置換型 SNP と自己免疫疾患の病因・病態との関連を明らかにすることはこれら疾患の遺伝的リスクファクターを同定することに繋がると考えられた。

上記について、これまで我々は長らくヒトを含めた種々の脊椎動物由来 DNase I の比較分子論的研究を継続しており、最近の知見を含めて一次構造—生化学的性状相関解析を行った¹⁾成果をまとめた形で報告する。また、さらにヒト DNase I の非同義置換型 SNP 58座位に着目し、SNP に対応するアミノ酸置換型酵素の性状を解析するとともに、多集団について広範囲な集団調査を実施した²⁾結果もまとめて報告する。

材料と方法

脊椎動物 DNase I

ヒト、ウマ、イヌ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット、ニワトリ、爬虫類(シマヘビ、マムシ、アオダイショウ)、両生類(アフリカツメガエル、ウシガエル、ヒキガエル、イモリ)、硬骨魚類(ティラピア、ウナギ、コイ、タイ)、軟骨魚類(ドチザメ、ネコザメ)の腭臓や耳下腺から DNase I を精製し生化学的性状の解析に用いた。また、これらの種について既報に従い 5'-および 3'-RACE 法によって cDNA を構築した。上記の23種類の脊椎動物由来 DNase I に加え、database から検索された他の脊椎動物(ジャイアントパンダ、オポッサム、カモノハシ、七面鳥、キンセイチョウ、フグ、ゼブラフィッシュ)及び無脊椎動物(ナメクジウオ、ホヤ、ウ

ニ、イソギンチャク)を含めた36種について amino acid sequence multiple alignment 解析を行った。

脊椎動物 DNase I 変異体発現解析および生化学的性状精査

wild-type の DNase I cDNA を鋳型として、site-directed mutagenesis により種々の変異型発現ベクターを構築した。発現ベクターを COS-7 細胞に遺伝子導入後、培養上清に分泌された酵素を解析に用いた。酵素活性は single radial enzyme diffusion method (SRED) 法によって測定した。各種における臓器分布、pH 耐性、G-actin による阻害、タンパク分解酵素に対する感受性・抵抗性の精査を行った。

置換型ヒト DNase I 酵素の性状解析

日本人集団において主要ハプロタイプに由来する DNase I cDNA の coding region に相当する DNA 断片を pcDNA 3.1 vector (Invitrogen 社製) に挿入し、wild-type construct とした⁷⁾。次に、同 construct を鋳型として KOD-Plus Mutagenesis kit (Toyobo 社製) を用いた site-directed mutagenesis によって58種類の非同義置換型 SNP の minor allele に対応するそれぞれのアミノ酸置換型 DNase I 発現ベクターを作製した。

ヒト試料の由来および遺伝子型判定

アジア人集団(日本人110名、韓国人352名、中国人193名、モンゴル人112名、チベタン人153名、スリランカ Tamil 人35名および Sinhalese 人48名、ネパール Tamang 人40名)、アフリカ人集団(オバンボス人126名、コーサ人75名およびガーナ人105名)およびコーカソイド人集団(ドイツ人68名、メキシコ人199名およびトルコ人136名)について、健康人(n=1752)から採取した血液試