

## 【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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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<sup>7)</sup>。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、健常人 (n=1752) から採取した血液試

料等から QIAamp DNA Mini kit (Qiagen 社製) を用いて DNA を分離した。すべての参加者から文章で同意を得ており、また、本研究は当該施設の倫理委員会で承認を得ている。58座位 SNPs について、PCR-RFLP 法または mismatched PCR-RFLP 法によってそれぞれの遺伝子型を判定した。使用した primer, 制限酵素等は既報に示した。

## 結果と考察

### 脊椎動物 DNase I amino acid sequence multiple alignment 解析と生化学的性状および臓器分布

クローニングを行った23種の脊椎動物およびデータベース上にあるその他の種合わせて36種についてアミノ酸配列(図1)を比較した<sup>3-10)</sup>。触媒活性及び構造安定化に関与すると考えられる Glu 78, His 134と Asp 212及び His 252, Cys 173 と Cys 209は全ての動物種由来 DNase I で保存されていた。他方、構造安定に寄与していると考えられていた Cys 101, Cys 104は硬骨魚類、軟骨魚類、無脊椎動物酵素では置換されていた。哺乳類 DNase I は中性域に至適 pH を持ち、2 価イオン要求性、G-actin 阻害を受ける。脊椎動物 DNase I 生化学的性状の比較を行った。臓器分布を調べたところ爬虫類、両生類、魚類では膵臓に分布していたのに対し、哺乳類では、膵臓で高い種(膵臓型)、耳下腺で高い種(耳下腺型)、両方で高い種(膵臓・耳下腺型)に3分類できた。膵臓型酵素は耳下腺型、膵臓・耳下腺型に比較して酸耐性が低く、耳下腺型酵素は酸性の胃を通過するため酸耐性を獲得したのと考えられた。またタンパク分解酵素(pepsin, trypsin および chymotrypsin) に対する感受性・抵抗性を精査したところ、耳下腺型酵素はいずれのタンパク分

解酵素に対しても感受性、膵臓・耳下腺型酵素は pepsin に対して抵抗性、ヒトなどの膵臓型酵素は pepsin に対しては感受性であるが、膵臓由来の trypsin および chymotrypsin には抵抗性を示した<sup>3)</sup>。膵臓型の酵素は、膵液中に共存するタンパク分解酵素に十分な抵抗性を有し、耳下腺型では口腔内で主に作用することからタンパク分解酵素の抵抗性を有しないと考えられる。脊椎動物の至適 pH は、哺乳類などの low-pH (pH 6.5-7.0) group と爬虫類、両性類、魚類などの high-pH group (pH 8.0) に分けられた。爬虫類、両生類では哺乳類に比較して、熱安定性が低く冷血動物から温血動物への進化の過程で熱安静性を獲得したと考えられた。

哺乳類 DNase I では二つの N-glycosylation site (Asn 18, Asn 106) があるが、Asn 18は全ての種で保存されていた。一方 Asn 106は哺乳類以上で分布しており哺乳類ではより安定な酵素タンパクが作られると考えられる。ウサギとブタ以外の哺乳類ではアクチン阻害を受け、鳥類、爬虫類、両生類では阻害されない。actin-binding site として重要な二つのアミノ酸残基 (Val-67および Ala-114) についてブタでは Ser-114に置換しており、爬虫類では Val-67に置換がみられた。

### 変異型酵素を用いた DNase I の性状解析について

野生型および変異型発現ベクターを COS-7 細胞に遺伝子導入し、発現した酵素を用いて酸耐性、熱安定性、至適 pH, N-linked glycosylation site の役割、actin による活性阻害について生化学的性状の比較生物学性解析を行った。

### 酸耐性

膵臓型 DNase I と耳下腺型 DNase I のアミノ酸配列を比較すると、ヒトでは Asn 110, Pro

	18	44	67	78
Human	1 LKIAAFNIQT FGETKMSNAT	LVSYIVQILS RYDIALVQEV	RDSHLTAVGK LLDNLNQDAP	DTYHYVISEP LGRNSYKERY
Horse	1 LRIAAFNIRT FGETKMSNDT	LSNYIVQILN RYDIALIQEV	RDSHLTAVGK LLDRLNQDDP	NTYHFVISEP LGRNSYKERY
Dog	1 LRMAAFNIRT FGETKMSNAT	LSKYIVQILS RYDVAVVQEV	RDSHLTAVGK LLDTLNQDDP	NAYHYVISEP LGRSSTKERY
Cow	1 LKIAAFNIRT FGETKMSNAT	LASYIVRIVR RYDIVLIQEV	RDSHLVAVGK LLDYLNQDDP	NTYHYVISEP LGRNSYKERY
Pig	1 LRIAAFNIRT FGETKMSNAT	LANYIVRILS RYDIALIQEV	RDSHLTAVGK LLNELNQDDP	NNYHHVISEP LGRSSTKERY
Sheep	1 LKIAAFNIRT FGETKMSNAT	LSSYIVRILR RYDIALIQEV	RDSHLVAVGK LLDLNLQDDP	NSYHYVISEP LGRNSYKERY
Rabbit	1 LKIAAFNIRS FGETKMSNAT	LTSYIVRILQ RYDIALIQEV	RDSHLTAVGK LLDKLNKRAA	DTYRFVISEP LGRSSTKERY
Mouse	1 LRIAAFNIRT FGETKMSNAT	LSVYFVKILS RYDIAVQEV	RDSHLVAVGK LLDLNLKRDK	DTYRFVISEP LGRSSTKERY
Rat	1 LRIAAFNIRT FGETKMSNAT	LSSYIVKILS RYDIAVQEV	RDTLVAVGK LLDLNLKRDIP	DNRYHISEP LGRSSTKERY
Hen	1 LRISAFNIRT FGDTSKMSNOT	VAGFVSIIV QYDITLVQEV	RDAALSSVKK LVSQNSASS	YPYFVISEP LGRNSYKERY
Rat snake	1 LRIGAFNIRA FGDKKSNOT	ISSSIVRILT TYDLVLIDEV	RDAALSAVKK LMQLVSGASP	DPFGYVISEP LGRNSYKERY
Viper snake	1 LRIGAFNIRA FGDKKSNOT	ISSSIVRILT TYDLVLIDEV	RDAALSAVKK LMHLVNWASP	NAFSYVISEP LGRNSYKERY
African clawed frog	1 FKIASFNIRQ FMSKVDDEPV	VLELLIRILS RYGIIEIEEV	MNAINTAIS LKVELSLATK	LNYNVISEP LGRSSTKERY
American bullfrog	1 LKIAGFNIER FSAKVDDEPV	VLNRLIQILR RYELIAVQEV	MNKDQTAIIR LVRELNKATG	LSYNLLSDH LGRSAYRERY
Newt	1 FKVASFNIR FMSKVDDEPV	VRDRLVQILR RYELISIQEV	MSALNEAIS LVRELNQATG	LPYNVISEP LGRSSTKERY
Toad	1 LKIASFNIER FAVGKVDDEPV	VLSLLIQILR RYELISIQEV	MSKQNTAIIR LVQELNAATG	LHYNLLSDH LGRSSTKERY
Fish	1 LLLGAFNIRS FGDTSKASNT	LMNIITKIVK RYDVIILQEV	RDSLSATQT LMNVNKNDSF	-QYKYVISEP LGASTYKERY
Carp	1 LRIGAFNIRS FGDTSKASNT	LMNIITKIVK RYDVIILQEV	RDSLSATQK LMQSVNKGSSP	PEYEQYVISEP LGASTYKERY
Eel	1 LFIAGFNIRS FGDTSKASNT	LVDIIVKIVH RYDVIILQEV	RDSLSATQK LMQSVNKGSSP	PKYKIVISEP LGRNTYKERY
Sea bream	1 LLLGAFNIRS FGDKKSNTT	LMNIITSTIVH RYDVIILQEV	RDSLSATKR LMEHVNKGSSP	FRYSHVISEP IGRSSTKERY
Japanese bullhead shark	1 IHSIAFNIRA FGDTSKMSHT	ITNIIVNLIQ RYDVIILQEV	RDAALSVVKI LMNKLNSASA	QAFSYVISEP LGRSSTKERY
Banded hounds shark	1 IQICAFNIFS FGDTSKMSNAT	IANIIVNLIQ RYDVIILQEV	RDENLSAVKA LMNKLNSPSA	HIYSYVISEP LGRSSTKERY

  

	106110114	130134	166	173
Human	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	RFTEVREFFA VPLHAAPGDA	VAEIDALYDV YLDVQEKWGL	EDVMLGDFN AGCSYVRSQP
Horse	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PFTQVKEFAI VPLHAAPSDA	LAEIDSLYDV YLDVQKQWDM	EDIMLGDFN AGCSYVTSQQ
Dog	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PLTEVKEFAI VPLHAAPLDA	VAEIDALYDV YLDVQHKADL	EDIVLGDFN AGCSYVAASQ
Cow	101 CESCNDSPFE REPEVRFSS	HSTQVKEFAI VALHAPSDA	VAEINSLYDV YLDVQKQWHL	NDVMLGDFN AGCSYVTSQQ
Pig	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PFTQVKEFAI VPLHAAPSDA	AAEINSLYDV YLNVQKQWDL	QDIMLGDFN AGCSYVTTSH
Sheep	101 CESCNDSPFE REPEVRFSS	PSTKVKAFAL VPLHAPSDA	VAEINSLYDV YLDVQKQWDL	NDIMLGDFN AGCSYVTSQQ
Rabbit	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PSTKVRFEFAI VPLHAPSEDA	VAEIDALYDV YLDVQKQKGL	QDVMLGDFN AGCSYVTSQQ
Mouse	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PYTEVQEFAL VPLHAAPTEA	VSEIDALYDV YLDVQKQWGL	EDIMLGDFN AGCSYVTSQQ
Rat	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PYTEVREFAI VPLHAPTEA	VSEIDALYDV YLDVQKQWGL	EDIMLGDFN AGCSYVTSQQ
Hen	101 CESCNDSPFE REPEVRFSS	PFTQVKEFAI VPLHAAPACA	PAEINALTQV YTDVINKWET	NNIFLGDFN AGCSYVTAEQ
Rat snake	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PLAAVEELV VPLHAAPAEA	VTEIDSLYDV YQDVKDRQWV	TDALLGDFN AGCNVQVED
Viper snake	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	PQAEVKELV VPLHAAPAEA	VTEIDSLYDV YQDVKGRSGA	TDALLGDFN AGCNVQVED
African clawed frog	101 CENCSDSFTF REPEVRFSS	LTTVVKDFAL ISHTSPDYA	IMEVDALYDA WVDAKQRLKM	ENILLGDFN AGCSYVGSARH
American bullfrog	101 CENCSDSFTF REPEVRFSS	LTTVVKDFAL AVMTSPDYA	VREVDALFDV WEDAKQRLLM	EDIFLGDFN AGCSYVKSAS
Newt	101 CENCSDSFTF REPEVRFSS	LTTVVKDLAL VSIHTSPDYA	VREVDALFDV WEDVQQRLLT	QNILLGDFN AGCSYVTKNH
Toad	101 CENCSDSFTF REPEVRFSS	LTTTELKDFAL VSIHTSPDYA	VREVDGLYDV WEDAKQRLLL	EDILLGDFN AGCSYVKTSH
Fish	100 PEETGDTFSE REPEVRFSS	KNTAVKDFAL IPEHTSPDLA	VRELNALYDV YLDVVRARWNT	NDIVLGDFN AGCSYVSGSA
Carp	102 CESCNDSPFE REPEVRFSS	NTAVQKFAI VPEHTSPEVA	VTEIDALHDV YLDVTRQRLNT	NNIMLGDFN AGCSYVNSGD
Eel	102 AEESGDTDFE REPEVRFSS	PHTRVPEFAI VPEHTSPEVA	VKVIDALYDV YLDVIRARWNT	DNILLGDFN AGCNVYVAGSD
Sea bream	101 CEPFGNDTFE REPEVRFSS	RYSAVKNFV IPEHTSPDSV	VKEVNALYDV YLDVVRTRWNT	NDIVLGDFN TDONVYVSGSD
Japanese bullhead shark	101 ASNTGDTFSE REPEVRFSS	PYSVIRDFV IPEHTSPSVA	VREIDALYDV YLDVAKKPKGT	DNMLLGDFN AGCSYVVKPTD
Banded hounds shark	101 SEDSGHDIFE REPEVRFSS	PYSAVHKELV IPEHTSPSLA	IKREIDALYDV YLDVAKKPKGT	DNMLLGDFN AGCSYVVKPAP

  

	205209212	252
Human	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGML	LRGAVVPDPA LPFNQAAQY
Horse	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGTL	LQEAVPDSPA VPFDQAAQY
Dog	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGSQ	LQHAVPESA APFNQAAQY
Cow	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGSL	LQSSVVPGSA APFDQAAQY
Pig	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGPL	LQRAVVPDPA APFDQAAQY
Sheep	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGSL	LQSSVVPGSA VPFDQAAQY
Rabbit	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGPL	LQDAVVPNSA APFNQAAQY
Mouse	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGAL	LQAAVVPNSA VPFDQAAQY
Rat	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGAL	LQAAVVPNSA VPFDQAAQY
Hen	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGSA	LQAAVEYGSA TVDVFQETHL
Rat snake	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGSK	LRESILPATA KVDNFQKTLK
Viper snake	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGSK	LRESILPATA KVDNFQKTLK
African clawed frog	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGGEE	LQGIIVPDTA KAFNVHAYD
American bullfrog	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGGSR	LQDSVVPGSA KAFNVQEAQY
Newt	201 DTTVPSHTCA YRIVVAGSV	MLNAIFPETA TAFNVHEAYG
Toad	201 DSTVPSHTCA YRIVVAGGAR	FQDIVIPGTA KAFNVHAYD
Fish	200 DTTVPSHTCA YRIVVTTDM	MRG-VVQNSA KAFNVMTDLN
Carp	202 DTTVPSHTCA YRIVVATSDM	MKG-VSAGSA QVDFDMQAHG
Eel	202 DTTVPSHTCA YRIVVATTTM	MEA-VVPHSA SVYDVTMSTL
sea bream	201 DSTVPSHTCA YRIVVTTDM	LKG-VLQGSA QVNFMTDLK
Japanese bullhead shark	202 DSTVPSHTCA YRIVVAVGSE	MKNAIIDGSA AIYNFTSVLN
Banded hounds shark	201 DTTVPSHTCA YRIVVAVGSE	MKNAIVIDGST AIYNFGKVFV

  

African clawed frog	302 RCGASGRYTP CNCNASCNTN	--CCVDYTSK CKL
American bullfrog	302 RCGANSSSYP CNCNATCSSS	KKCCADYAAV CKI
Newt	302 RCGAYSKTLP CNCNASCQGY	GSCCADYKHA C
Toad	302 RCGANSSSYP CNCNASCSSS	NKCCADYGAS CKV

図1 Alignment of amino acid sequences of vertebrate DNases I

178であるのに対し、ラットでは Ser 110, Ser 178であった。置換体 (ヒト Asn 110 Ser, Pro 178 Ser およびラット Ser 110 Asn, Ser 110 Ala, Ser 178 Prp) を作成し酸耐性を精査したところ、アミノ酸178の置換体では変化はみられなかった

が、ヒト Asn 110 Ser はラットと、ラット Ser 110 Asn, Ser 110 Ala はヒトと同様の酸耐性を示した。このことから Asn 110 Ser 置換は酸耐性に寄与することが明らかとなった。

## 熱耐性

両生類は、C末端に Cys-rich な配列を持ち、Ca<sup>2+</sup>-binding site (205) に Ser の挿入がみられる。Ser 挿入の置換体 [哺乳類-ins (S 205)] と、欠損置換体 [両生類-del (S 205)] を作成し、熱安定性を精査したところ、哺乳類 ins (S 205) は、両生類と同様、熱不安定になり、両生類-del (S 205) は活性が失活した。これにより、Ser 205 の挿入は哺乳類において熱安定性の低下をもたらすが、両生類においては活性発現に必要であることが明らかとなった。爬虫類 (シマヘビ、マムシ、アオダイショウ) 酵素は、哺乳類や鳥類と比較して、熱に対して不安定である。アミノ酸配列を比較すると、哺乳類や鳥類では Ile 130, Met 166 であるのに対し、爬虫類では Leu 130, Leu 166 であった。置換体 (哺乳類 Ile 130 Leu, Met 166 Leu および爬虫類 Leu 130 Ile, Leu 166 Met) を作成し熱安定性を精査したところ、哺乳類 Met 166 Leu および爬虫類 Leu 166 Met は野生型と同様の結果であった。一方、哺乳類 Ile 130 Leu は爬虫類野生型と爬虫類 Leu 130 Ile は哺乳類野生型と同様の熱安定性を示し、Ile 130 は熱安定性に寄与することが明らかになった。

## 中性域での至適 pH の獲得, N-glycosylation site および G-actin 阻害

脊椎動物の至適 pH は、哺乳類などの low-pH (pH 6.5-7.0) group と爬虫類、両性類、魚類などの high-pH group (pH 8.0) に分けられる。魚類のアミノ酸配列は、哺乳類と比較すると Asp 44, Met 118, Gln 134, Glu 190, Met 236 が異なっている。魚類について哺乳類ヒト型変異体 (Asp 44 His, Met 118 Arg, Gln 134 Leu, Glu 190 Ser, と Met 236 Gln) を作成し、至適 pH を精査した。魚類両方で、Asp 44 His でのみ至適 pH が pH

6.5-7.0 にシフトし、爬虫類、両生類においても同様の結果が得られた。これらのことから His 44 は中性域での至適 pH を保持することが示された。DNase I は糖タンパクであり、哺乳類 DNase I では二つの N-glycosylation site (Asn 18, Asn 106) が知られている。Asn 18 Gln, Asn 106 Gln, Asn 18 Gln/Asn 106 Gln, の3つの変異体を作成したところ、全ての変異体で熱安定性が低下し、Asn 18, Asn 106 は熱安定性に寄与することが明らかとなった。G-actin はヒトやウシ DNase I の酵素活性阻害物質として知られるが、種々の脊椎動物 DNase I の比較研究からブタおよびシマヘビ DNase I は G-Actin によって全く阻害されず、一方マムシ DNase I は阻害効果は約10%程度であることが示された。actin-binding site として重要な二つのアミノ酸残基 (Val-67 および Ala-114) の組み換え体を作製し G-actin 阻害の機構を調べた<sup>12)</sup>。その結果、シマヘビの置換体 ((Ile 67 Val: マムシ型) は G-actin により活性が阻害され、マムシの置換体 (Val 67 Ile: シマヘビ型) は G-actin による活性阻害はみられなかった。このことから脊椎動物 DNase I のアミノ酸残基67番が Val であることが G-actin 阻害に必須であることが明らかとなった。また、114番アミノ酸残基について、シマヘビとマムシは Phe であり、G-actin 活性阻害を受けるウシとヒト DNase I は Ala であるので、ヒト型の置換体・シマヘビ (Phe 114 Ala) とマムシ (Phe 114 Ala) を作成したが、これらの組み換え型酵素は活性が検出されず、さらに western blot 発現解析からもバンドが検出されなかった。このことから、爬虫類 DNase I の Phe 114 は G-actin の結合には寄与せず、むしろタンパクの発現に関与しているのではないかと考えられた。さらにブタでは114番アミ

ノ酸残基が Ser であり, ブタ (Ser 114 Ala: ヒト型) とブタ (Ser 114 Phe: ヘビ型) を作成し, 野生型および組み換え型の活性阻害を精査した。その結果, Ser 114 Ala 置換では G-actin により活性が阻害されたが, Ser 114 Phe 置換では G-actin 活性は阻害されなかった。このことから哺乳類 DNase I では, アミノ酸残基114が Ala であることが G-actin 阻害において必須であることが示された。

#### 非同義置換型 SNPs によるアミノ酸置換のヒト DNase I 酵素活性への影響および各 SNP 関連アミノ酸残基に関する動物 DNase I アミノ酸配列 multiple alignment 解析

主要ハプロタイプに相当するアミノ残基をもった DNase I を鋳型として, それぞれの SNP における minor allele から産生されるアミノ酸置換型 DNase I 発現ベクターを site-directed mutagenesis 法によって作製し, 導入 COS-7 細胞抽出液および培養上清中の酵素活性を測定した。Wild-type DNase I の活性と比較したところ, それぞれのアミノ酸置換型 DNase I には wild-type のそれと同レベルの活性を示すもの以外に, 活性の増加, 減弱または消失を示すものが認められた。なお, それぞれのアミノ酸置換型 DNase I の培養細胞中の活性は培養上清中のそれとはほぼ同レベルであった。

そこで, それぞれの SNP によるアミノ酸置換による酵素活性への影響から, 非同義置換型 SNPs 58座位は酵素活性への影響を示さないもの (SNPs not affecting the activity), 活性を増加させるもの (SNPs elevating the activity), 活性を減弱させるもの (SNPs reducing the activity), および活性を消失させるもの (SNPs abolishing the activity) に分類できた; SNPs not

affecting the activity 23座位, SNPs elevating the activity 9座位, SNPs reducing the activity 14座位, SNPs abolishing the activity 12座位であった。さらに, SNPs reducing the activity 14座位のうち, 活性レベルが wild-type のそれに比べほぼ20%以下になる “SNPs markedly reducing the activity” として5座位が同定された。したがって, SNPs abolishing the activity 12座位のうち missense 変異に相当するアミノ酸残基, Gln 60, Arg 107, Arg 133, Phe 140, Asp 190, Asn 192, Cys 231, Tyr 233 および Arg 235 は DNase I 酵素活性発現に必須であり, さらに SNPs markedly reducing the activity 5座位に相当するアミノ酸残基, Arg 53, Val 111, Arg 207, Thr 229 および Ala 246 は活性発現に大きくかわることが明らかとなった。また, 各 SNP 関連アミノ酸残基の役割を推定するため, database から検索できた40種類の動物 DNase I のアミノ酸配列について multiple alignment 解析を行った。動物 DNase I のアミノ酸配列上, 27残基のアミノ酸が全ての動物種で保存されていた。特に, SNPs abolishing the activity 12座位に相当するアミノ酸残基のうち, Arg 133, Phe 140, Asp 190, Asn 192, Cys 231, Tyr 233 および Arg 235, は全ての動物種で完全に保存されており, 他方 Gln 60 および Arg 107 残基も38種の動物 DNase I で同一のアミノ酸が位置しており高度に保存されていることは特記される。この知見はこれら残基が酵素活性発現に必須であることを支持するものであった。さらに, SNPs markedly reducing the activity 5座位に相当するアミノ酸残基も比較的よく保存されたものであり, これとは対照的に SNPs not affecting the activity 23座位に相当する残基にはよく保存されたア

ミノ酸は見出されなかった。従って、これらアミノ酸の置換が酵素活性レベルに影響を示さないことは合理的なものと考えられた。なお、DNase Iの活性部位に關与する Glu 100, His 156, Asp 234および His 274残基, 構造的安定化に必須な Cys 195および231残基には非同義置換型 SNPは見出されなかった。

### ヒト DNase I SNP 遺伝子型判定の新規確立および14集団における DNase I 遺伝子内非同義置換型 SNPs 58座位の遺伝子型分布

DNASE 1内の非同義置換型 SNPs 58座位のうち, 30座位について PCR-PFLP 法による遺伝子型判定法を確立した。他方, 28座位については多型部位においていずれの制限酵素の認識部位とならないため mismatched PCR-PFLP 法を導入した。これら新規な判定法によって, 各 SNPs のそれぞれの 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した。そして, 3 大人種を含む異なる14集団における DNase I 遺伝子内の非同義置換型 SNPs 58座位の遺伝子型分布を前項の新規に確立した遺伝子型判定法を用いて解析した。SNPs 58座位のうち, p.Arg 244 Gln は全ての集団で遺伝的多型性が, さらに p.Arg 2 Ser および p.Gly 127 Arg にはアフリカ人集団で, p.Tyr 117 Ser には白人集団で遺伝的多型性が認められた。なお, 従前の研究から, 全ての集団で多型性が認められた p.Arg 244 Gln には人種特異的な分布が見られた。他方, 他の54座位は全ての集団で mono-allelic な分布を示した。これら mono-allelic な分布を示した非同義置換型 SNPs の minor allele frequency は0.0003以下であると推定され, 非同義置換型 SNPs について DNase I 遺

伝子は極めて遺伝的多性に乏しいことが明らかとなった。NCBI SNP database に登録された非同義置換型 SNPs には集団調査がなされていないものが散見され, 本研究は DNase I 遺伝子の SNPs 分布について 3 大人種を含む包括的な解析をなしたものであることは特記される。今回の結果は DNase I 遺伝子内のすべての非同義置換型 SNPs の遺伝的多性に関する貴重な知見を提供するものである。特に, SNPs abolishing the activity および SNPs markedly reducing the activity に分類される SNPs は全て mono-allelic な分布を示し, したがってヒト集団において DNase I 遺伝子の coding region は高度に保存されており, もって *in vivo* 酵素活性レベルが減弱することが避けられているものと考えられた。

### DNase I SNPs の自己免疫疾患病因・病態への想定される関与および非同義置換型 SNPs に関する DNase family 内の比較

従前の研究から, DNase I は細胞死に伴う細胞残渣のクリアランスに關与すると考えられており, *in vivo* DNase I 活性の低下あるいは消失によって抗核抗体産生の免疫原となることが想定される細胞残渣クリアランスに不全が生じ, もって自己免疫疾患が発症あるいは病態進行に至ることは容易に想定できる。そこで, 活性の顕著な減弱あるいは消失を惹起する functional SNPs は自己免疫不全に關連する有意な遺伝因子として考慮することができる。本研究では, 12座位の SNPs abolishing the activity および 5 座位の SNPs markedly reducing the activity を遺伝的多性は乏しいものの DNase I 遺伝子の functional SNPs として検索・同定した。DNase I-deficient mice が SLE 様病態を示すこと, SLE 患者から null 型 DNase I が見出されたことを鑑みると,

前者 SNPs のホモ接合体および複合ヘテロ接合体では *in vivo* DNase I 活性が消失しており, 自己免疫疾患発症につながると推定できる。従って, loss-of-function 型 DNase I を産生する SNPs abolishing the activity の minor allele は自己免疫疾患の遺伝的リスクファクターとして働くものと考えられた。また, SLE 患者より見出された新規な missense 変異 p.Val 111 Met<sup>11)</sup> は SNPs markedly reducing the activity に属しており, 上記を支持するものであった。我々はこれまで DNase I をふくめヒト DNase family 遺伝子内に座位する非同義置換型 SNPs について, functional SNPs の検索および集団調査を継続している<sup>10)</sup>。それによって明らかにされた DNase family 遺伝子の SNPs の性状を表 1 に示す。DNase I 遺伝子には family 内で最も多くの非同義置換型 SNPs が座位し, さらに多型性を示す SNPs も多い。特に, DNase I 遺伝子には全ての集団で多型性がみられる p.Gln 244 Arg が存在するが, 他の DNase にはそのような高度に多型性を示すものは見出されない。他方, 全 SNPs 中活性を消失する functional SNPs は DNase I, DNase I-like 2, DNase II において約 2 ~ 3 割を占める

が, DNase I は最も多くの SNPs abolishing the activity を有している。このように, DNase I family 遺伝子には多型性を示す SNPs はごくわずかであり, 特に大きな活性変動を惹起する SNPs には多型性は見られない。したがって, DNase family は, ヒト集団の進化過程でたんぱく質レベルにおいて酵素活性レベルを維持するようによく保存されたものであることが明らかとなった。

## 結 語

以上のことから, 脊椎動物 DNase I の生化学的性状はいくつかのアミノ酸変異により規定され, 分子進化の過程でより高活性で安定な酵素の性状を獲得したのではないかと考えられた。さらに, 自己免疫疾患との関連が示唆されている DNase I 遺伝子内の全ての非同義置換型 SNPs 58座位について, 酵素活性レベル変動を惹起する functional SNPs を検索し, 3 大人種を含む14集団について広範な集団調査を実施した。その結果, SNPs abolishing the activity および SNPs markedly reducing the activity をそれぞれ12座位および5座位同定した。他方, これら SNP に

表 1 Classification of non-synonymous SNPs in the human genes encoding DNase family with regard to effect on the activity

DNase family	non-synonymous SNP (n)					
	total	not affecting the activity	reducing the activity	abolishing the activity	elevating the activity	showing a genetic heterogeneity
DNase I	61	27	14	9	11	9
DNase 1L1	21	14	4	2	1	0
DNase 1L2	35	10	15	9	1	0
DNase 1L3	41	26	7	6	1	1
DNase II	32	11	14	7	0	1

関して、今回調査した14集団では遺伝的多様性が著しく乏しいことが明らかとなった。従って、これら SNPs の loss-of-function を産生する minor allele は、遺伝的多様性は乏しいものの、*in vivo* DNase I 活性レベルを消失させるものであり、

自己免疫疾患病因・病態の遺伝的リスクファクターとなることが示唆された。今後も DNase I をはじめとした DNase family における functional allele と自己免疫疾患等の疾患の相関についてさらなる精査が必要であると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) Fujihara J et al. Rapid measurement of deoxyribonuclease I activity with the use of microchip electrophoresis based on DNA degradation. *Anal Biochem* 413: 78-79, 2011.
- 2) Kimura K et al. Identification of the functional alleles of the nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms potentially implicated in systemic lupus erythematosus in the human deoxyribonuclease I gene. *DNA Cell Biol*, 33: 492-502, 2014.
- 3) Fujihara J et al. Functional and genetic survey of all known the SNPs within human deoxyribonuclease I gene in wide-ranging ethnic groups. *DNA and Cell Biol* 30: 205-217, 2011.
- 4) Fujihara J et al. Comparative biochemical properties of vertebrate deoxyribonuclease I. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 163:263-273, 2012.
- 5) Takeshita H et al. Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 481-484, 2000.
- 6) Takeshita H et al. Amphibian DNases I are characterized by a C-terminal end with a unique, cysteine-rich stretch and by the insertion of a serine residue into the Ca<sup>2+</sup>-binding site. *Biochem J* 357: 473-480, 2001.
- 7) Takeshita H et al. A single amino acid substitution of Leu 130 Ile in snake DNases I contributes to the acquisition of thermal stability. *Eur J Biochem* 270: 307-314, 2003.
- 8) Takeshita H et al. Amphibian DNases I are characterized by a C-terminal end with a unique, cysteine-rich stretch and by the insertion of a serine residue into the Ca<sup>2+</sup>-binding site. *Biochem J*, 357: 473-480, 2001.
- 9) Fujihara J et al. Two N-linked glycosylation sites (Asn 18 and Asn 106) are both required for full enzymatic activity, thermal stability, and resistance to proteolysis in mammalian deoxyribonuclease I. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 3197-3205, 2008.
- 10) Fujihara J et al. Actin-inhibition and folding of vertebrate deoxyribonuclease I are affected by mutations at residues 67 and 114. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 143: 70-75, 2006.
- 11) Kimura-Kataoka K et al. Seven non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding human deoxyribonuclease II may serve as a functional SNP potentially implicated in autoimmune dysfunction. *Electrophoresis* 34: 3361-3369, 2013.