

機関番号 : 15201

研究種目 : 基盤研究 (A)

研究期間 : 2007 年度 ~ 2010 年度

課題番号 : 19209025

研究課題名 (和文) 疾患感受性遺伝子 DNase I の多型機構解明

研究課題名 (英文) The study of functional polymorphism within the deoxyribonuclease I gene associated with disease.

研究代表者竹下 治男 (TAKESHITA HARUO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号 : 90292599

研究成果の概要 (和文) :

心筋梗塞(MI)と病態生理学的な関連性を示すデオキシリボ核酸分解酵素 I (DNase I)は遺伝的多型形質であり、我々は以前 Gln222Arg と MI の関連について報告した。DNase I 遺伝子 exon 内には多数の SNP 部位が同定されているが、多型性の確認を含め、詳細な集団調査はなされていない。本研究では DNase I 遺伝子 exon 内の Gln222Arg 他 18SNP 部位の頻度分布を広範囲な民族について精査した。日本人、韓国人、中国人、モンゴル人、チベット人、ネパール人、スリランカ人、ベトナム人、トルコ人、ガーナ人、ナミビアオバンボス人および南アフリカコーサ人の DNA (計約 2500 人) を用いた。今回、NCBI Variation Database(dbSNP)で検索された DNASE1exon 内の 19SNP 部位について、PCR-RFLP 法などを用い、遺伝子型を判定した。我々は以前に、DNase I Gln222Arg 多型の頻度分布には民族間差が存在することを報告した。今回、初めて DNASE1exon 内 SNP19 部位 (非同義置換型 : 12 部位、同義置換型 : 7 部位) の多型検査を施行したところ、アジア人では 18SNP 部位全てで多型性を有さず、Gln222Arg のみ多型性を有することが明らかとなった。アフリカ人では、Gln222Arg 以外に多型性を有するものが 3 部位(Arg-19Ser ; Arg105Gly ; Leu186Leu)見出されたが、いずれも Gln222Arg との連鎖は認められなかった。従って、DNase I 遺伝子について、アジア人はアフリカ人に比して遺伝的多様性に乏しいことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) :

Using both the PCR-RFLP and multiplex single base extension techniques, genotyping of all the non-synonymous SNPs was performed in healthy subjects (n = 1,559) of three ethnic groups including 15 populations. Among them, only four SNPs, R-21S, Y95S, G105R, and Q222R, together with the synonymous SNP L186L, were polymorphic in all or some populations. The Asian group showed a relatively low genetic diversity of these SNPs, whereas the African group had the highest diversity. The distribution pattern of the common SNP Q222R was classified into three ethnic groups. Activity levels of the amino acid-substituted DNase I forms derived from SNPs R-21S, G105R, P132A, and P197S were significantly high compared with that of the wild type; the polymorphic SNPs R-21S (Africans and Mexicans) and G105R (Africans) gave rise to a high activity-harboring DNase I isoform. On the other hand, activity levels from Q35H, R85G, V89M, C209Y, Q222R, and A224P were significantly low, but these SNPs, except Q222R, were not distributed in any of the populations examined. However, since these SNPs may produce potentially low levels of in vivo DNase I activity, a minor allele in each SNP will be served as a genetic risk factor for autoimmune diseases. Therefore, information on the worldwide distribution of non-synonymous SNPs in DNASE1 and the effects of the corresponding amino acid substitution on the activity levels will provide a genetic basis for the clarification of a possible relationship between DNase I and diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
平成20年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
平成21年度	3,100,000	930,000	4,030,000
平成22年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
総計	25,700,000	7,710,000	33,410,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：DNase 疾患感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

これまでに、我々はDNase I 遺伝子内に SNP (一塩基置換多型) 部位 A2317G を見出し、さらにこの多型については民族間差異を認めた (1)。この多型は翻訳領域を構成する第 8 エキソンに位置し、この塩基置換によって DNase I タンパク上でアミノ酸置換 (Q222R) が生じ、2 個の置換型 (A2317 および G2317 型) はそれぞれ主要対立遺伝子、DNASE1*1 および DNASE1*2 に対応する。我々はこの DNase I 多型と各種疾患との間の相関について網羅的な検索を行い、その結果 G2317 型 (DNASE1*2) 対立遺伝子は胃がん、大腸がんおよび心筋梗塞罹患と有意な相関があることを見出した。がんや心筋梗塞などの生活習慣病は遺伝的要因と様々な環境要因との相互作用によって発症する。遺伝的要因を構成する多数の遺伝子群は疾患感受性遺伝子 (疾患の危険因子) と呼ばれ、これらの疾患感受性遺伝子の探索・同定は発症メカニズムの解明や予防医学的な措置などに有用な知見を提供するものである。DNase I 遺伝子は疾患感受性遺伝子のひとつであると考えられるが、これまでのところ A2317G 多型に基づくアミノ酸置換によって生じた DNase I 型 (Q222) および 2 型 (R222) の生化学的性状に顕著な差異を見出すことは困難であった。

一方、DNase I はアポトーシス (programmed cell death) の後期過程に関与するとされている。また、最近 DNase I は全身性エリテマトーデスの発症に大きく関与することが示唆された。さらに我々は急性心筋梗塞発症に伴い血中 DNase I 活性が急激に増加することを見出すなど、DNase I と疾患の病態生理学的観点から、アポトーシス機構が関与しているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

DNase I 遺伝子内には活性変動を惹起する可

能性のある多数の SNP が存在するが、その多くについては集団遺伝学的調査がなされていない。また、塩基置換が酵素活性に及ぼす影響が明らかにされていない。そこで、DNase I 遺伝子における自己免疫疾患感受性の病態遺伝生化学的基盤を確立するため、以下の項目について研究を実施した。

1. DNase I 遺伝子内 SNP の遺伝子型判定法の開発
2. 多集団における全ての SNP の遺伝子型判定 (集団調査)
3. SNP に相当するアミノ酸置換が酵素活性に及ぼす影響の精査
4. DNase I family 遺伝子における同様な解析

3. 研究の方法

1. MSBE (multiplex single base extension) 法による非同義置換型 SNP 12 座位の同時判定法

2. Mismatched PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法による SNP 28 座位の個別判定法を用いた。

すべての非同義置換型 SNP で構成されるハプロタイプのうち、最も出現頻度の高いタイプに由来する DNase I mRNA の翻訳領域を導入した哺乳類細胞発現ベクターを野生型として作製し、site-directed mutagenesis によって各 SNP の minor allele に相当するアミノ酸置換型 DNase I 発現ベクターを構築し、これらベクターを COS-7 細胞に導入後、発現する DNase I の活性を single radial enzyme diffusion 法によって測定した。

4. 研究成果

DNase I 遺伝子内非同義置換型 SNP など全ての SNP 遺伝子型判定法を確立した。異なる 15 集団における SNP の頻度分布解析の結果、Q222R はすべての集団で多型性を示し、R-21S、G105R および Y95S は一部の集団で多型性を

示した。Q222R の遺伝子頻度分布には、人種依存性が認められた。酵素活性の低下を惹起する SNP で多型性が認められるものは少数であったことから、DNase I family 遺伝子は、ヒト集団の進化の過程で酵素活性が維持されるように保存されていることが明らかとなった。多型性がみられ酵素活性が低下する SNP は DNase I の Q222R と DNase I L3 の C206R であった。従って、これらの塩基置換は自己免疫疾患罹患の遺伝因子の一つとなりうることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 52 件)

1. Agusa T, Kunito T, Kubota R, Inoue S, Fujihara J, Minh TB, Ha NN, Tu NP, Trang PT, Chamnan C, Takeshita H, Iwata H, Tuyen BC, Viet PH, Tana TS, Tanabe S. Exposure, metabolism, and health effects of arsenic in residents from arsenic-contaminated groundwater areas of Vietnam and Cambodia: a review. *Rev Environ Health*. 2010;25:193-220.
2. Ueki M, Fujihara J, Takeshita H, Kimura-Kataoka K, Iida R, Nakajima T, Kominato Y, Yuasa I, Yasuda T. Genetic and expression analysis of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease I-like 1 and 2 genes. *Electrophoresis*. 2010;31:2063-2069.
3. Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Kunito T, Takeshita H, Minh TB, Trang PT, Viet PH, Tanabe S. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase (GST) superfamily and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 242:352-362.
4. Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Kimura-Kataoka K, Soejima M, Koda Y, Kato H, Panduro A, Yuasa I, Takeshita H. Global analysis of single nucleotide polymorphisms in the exons of human deoxyribonuclease I-like 1 and 2 genes. *Electrophoresis*. 2010 ; 31:3552-3557.
5. Yasuda T, Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Iida R, Tsubota E, Soejima M, Koda Y, Kato H, Panduro A. A biochemical and genetic study on all non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the gene encoding human deoxyribonuclease I potentially relevant to autoimmunity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42:1216-1225.
6. Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Iida R, Yuasa Y, Nakajima T, Kominato Y, Yasuda T. Genetic and expression analysis of all 7 non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease II gene, with potential relevance to autoimmunity. *Clin Chim Acta*. 2010; 411:92-98.
7. Fujihara J, Soejima M, Yasuda T, Koda Y, Agusa T, Kunito T, Tongu M, Yamada T, Takeshita H. Global analysis of genetic variation in human arsenic (+ 3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 243:292-299.
8. Fujihara J, Agusa T, Yasuda T, Soejima M, Kato H, Panduro A, Koda Y, Kimura K, Takeshita H. Ethnic variation in genotype frequencies of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD). *Toxicol Lett*. 2009; 191: 236-239.
9. Fujihara J, Tsubota E, Iida R, Takeshita H. Allele frequencies and haplotypes for five Y-STRs (DYS441, DYS442, DYS443, DYS444, and DYS445) in Ovambo and Turks populations using multiplex PCR system. *Forensic Sci Int Genetics*. 2009; 3: 268-269.
10. Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Iida R, Yuasa I, Kato H, Panduro A, Nakajima T, Kominato Y, Yasuda T. Caucasian-specific allele in non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the gene encoding deoxyribonuclease I-like 3, potentially relevant to autoimmunity, produces an inactive enzyme. *Clin Chim Acta*. 2009; 407: 20-24.
11. Yasuda T, Iida R, Kawai Y, Nakajima T, Kominato Y, Fujihara J, Takeshita H. Serum deoxyribonuclease I can be used as a useful marker for diagnosis of death due to ischemic heart disease. *Legal Med*. 2009; 11: S213-S215.
12. Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Takatsuka H, Fujii Y, Takeshita H. Cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphisms in Ovambos and Mongolians. *Legal Med*. 2009; 11: S408-S410.
13. Nakajima T, Takagi R, Tajima Y, Makita C, Kominato Y, Kuribara J, Ohshima S, Tada H, Tsurugaya H, Kobayashi Y, Takeshita H, Kawai Y, Yasuda T. Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of DNase I in human serum. *Clin Chim Acta*. 2009; 403: 219-222.
14. Iida R, Ueki M, Takeshita H, Fujihara

J, Nakajima T, Kominato Y, Nagao M, Yasuda T. Genotyping of five single nucleotide polymorphisms in the OCA2 and HERC2 genes associated with blue-brown eye color in the Japanese population. *Cell Biochem Funct.* 2009; 27: 323-327.

15. Fujihara J, Yuasa I, Muro T, Iida R, Tsubota E, Nakamura H, Imamura S, Yasuda T, Takeshita H. Allele frequencies and haplotypes for 28 Y-STRs in Ovambo population. *Legal Med.* 2009; 11: 205-208.

16. Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Kunito T, Takeshita H, Minh TB, Trang PTK, Viet PH, Tanabe S. Genetic polymorphisms in AS3MT and arsenic metabolism in residents of the Red River Delta, Vietnam. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 236: 131-141.

17. Takeshita H, Fujihara J, Takatsuka H, Agusa T, Yasuda T, Kunito T. The diversity of the glutathione S-transferase omega 1 (A140D) and 2 (N142D) gene polymorphisms in worldwide populations. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009; 36: 283-286.

18. Xue Y, Tang M, Hieda Y, Fujihara J, Takayama K, Takatsuka H, Takeshita H. HPLC determination of chlorhexidine (CHX) in whole blood by solid phase extraction and kinetics following an intravenous infusion in rats. *J Anal Toxicol.* 2009; 33: 85-91.

19. Iida R, Tsubota E, Yuasa I, Takeshita H, Yasuda T. Simultaneous genotyping of eleven non-synonymous SNPs in the four glutathione peroxidase genes using the multiplex single base extension method. *Clinica Chimica Acta.* 2009; 402: 79-82.

20. Fujihara J, Agusa T, Tanaka J, Fujii Y, Moritani T, Hasegawa M, Iwata H, Tanabe S, Takeshita H.

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a possible marker of arsenic poisoning: a clinical case study on the relationship between concentrations of 8-OHdG and each arsenic compound in urine of an acute promyelocytic leukemia patient being treated with arsenic trioxide. *Forensic Toxicol.* 2009; 27: 41-44.

21. Takeshita H, Soejima M, Koda Y, Yasuda T, Takatsuka H, Fujihara J. Gln222Arg (A2317G) polymorphism in the deoxyribonuclease I gene exhibits ethnic and functional differences. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47: 51-55.

22. Iida R, Tsubota E, Takeshita H, Yasuda T. Multiplex single base extension method for simultaneous genotyping of non-synonymous SNPs in the three human SOD

genes. *Electrophoresis.* 2009; 29: 4788-4794.

23. Fujihara J, Fujii Y, Agusa T, Kunito T, Yasuda T, Moritani T, Takeshita H. Ethnic differences in five intronic polymorphisms associated with arsenic metabolism within human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) gene. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 234: 41-46.

[学会発表] (計 63 件)

1. 藤原純子, 竹下治男, 藤田恭久. 法医学的個人識別を応用したしじみ等食品判別技術開発 日本分析化学会 表示・第4回起源分析技術研究懇談会 抄録集 2010, p.77 東京

2. 安田年博, 植木美鈴, 飯田礼子, 竹下治男. ヒト SOD1、SOD2 および SOD2 遺伝子内の非同義置換型 SNP の同時解析—血清 SOD 活性と多型性 SNP との相関について

日本 DNA 多型学会 抄録集 2010, p.91 三島

3. 藤原純子, 木村かおり, 竹下治男, 中島たみ子, 小湊慶彦, 湯浅勲, 飯田礼子, 植木美鈴, 安田年博. DNase II 遺伝子に座位する非同義置換型 SNP には不活性な酵素を産生する monor allele が分布する。日本 DNA 多型学会 抄録集 2010, p.77 三島

4. 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 植木美鈴, 飯田礼子, 中島たみ子, 小湊慶彦. 動物種特異的臓器分布から明らかにされた DNase I の分子進化 日本 DNA 多型学会 抄録集 2010, p.44 三島

5. 大塚 洋輔, 藤原 純子, 大野 怜一朗, 木村 かおり, 頓宮 美樹 2, 山田 高也 2, 福井 裕, 藤田 恭久, 竹下 治男: メタロチオネイン MT2A (-209A/G) 多型の頻度分布とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性との相関解析. 第 27 回日本法医学会中四国地方会. 講演要旨集, 2010; p.9-11, 徳島.

6. 大野 怜一朗, 藤原 純子, 植木美鈴, 安田年博, 木村かおり, 大塚洋輔, 頓宮 美樹, 山田 高也, 飯田 礼子, 竹下 治男: DNase I の動物種別臓器分布からの分子進化的考察. 第 27 回日本法医学会中四国地方会. 講演要旨集, 2010; p.8-9, 徳島.

7. 藤原純子, 阿草哲郎, 金井理恵, 長谷川正紀, 山口清次, 竹下治男: 亜ヒ酸製剤を投与された急性前骨髄球性白血病 (APL) 患者の血清および尿中ヒ素化合物濃度と尿中 8-OHdG 分析 日本法中毒学会第 29 年会 講演要旨集 p 126-127 東京.

8. 藤原純子, 竹下治男, 藤田恭久: 酸化亜鉛ナノ粒子によるエチジウムブロマイド発光強度上昇の検討. ナノ学会第 8 回大会. ナノ学会講演予稿集 2010 ; p212, 岡崎.

9. 中島たみ子, 佐野利恵, 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 小湊慶彦: サンドイッチ ELISA 法による血清 DNase I 蛋白質量の測定. 第 94

次日本法医学会総会. 日法医誌 64 (補冊) 2010; p.56, 東京.

10.木村かおり, 藤原純子, 竹下治男, 飯田礼子, 安田年博, 副島美貴子, 神田芳郎, 加藤秀章: DNase I 及び DNase II 遺伝子 exon 内 SNP 検索: 集団調査及び酵素活性に及ぼす変異の影響. 第 94 次日本法医学会総会. 日法医誌 64 (補冊) 2010; p.54, 東京.

11.藤原純子, 木村かおり, 竹下治男, 安田年博, 飯田礼子, 小湊慶彦, 佐野利恵, 中島たみ子: 哺乳類 DNase I における N-グリコシド型糖鎖解析. 第 94 次日本法医学会総会. 日法医誌 64 (補冊) 2010; p.93, 東京.

12.阿草哲郎, 岩田久人, 藤原純子, 國頭 恭, Tu Binh Minh, Pham Thi Kim Trang, Pham Hung Viet, 竹下治男, 田辺信介: ベトナム人のヒ素汚染地域住民における AS3MT 遺伝子多型とヒ素代謝の関係. 第 15 回ヒ素シンポジウム. プログラム・抄録集, 2009; p52, 大阪.

13.阿草哲郎, 岩田久人, 藤原純子, 國頭 恭, Tu Binh Minh, Pham Thi Kim Trang, Pham Hung Viet, 竹下治男, 田辺信介: ベトナム人における AS3MT 遺伝子多型とヒ素代謝能の関係. 日本 DNA 多型学会第 18 回学術集会. 抄録集, 2009; p29, 久留米.

14.阿草哲郎, 岩田久人, 藤原純子, 國頭 恭, 竹下治男, Tu Binh Minh, Pham Thi Kim Trang, Pham Hung Viet, 田辺信介: ベトナム人における GST スーパーファミリーの遺伝子多型と尿中ヒ素化合物プロファイルの関係. 第 20 回日本微量元素学会. プログラム・抄録集, 2009; p163, 東京.

15.阿草哲郎, 岩田久人, 藤原純子, 國頭 恭, Tu Binh Minh, Pham Thi Kim Trang, Pham Hung Viet, 竹下治男, 田辺信介: ベトナム人のヒ素曝露とその代謝遺伝子多型. 第 18 回環境化学討論会. 講演要旨集, 2009; p222-223, つくば.

16.藤原純子, 竹下治男, 阿草哲郎, 藤田恭久, 中村幹雄, 鴛海智佳, 細澤豪志, 植木美鈴, 飯田礼子: mtDNA 配列による迅速簡便なヤマトシジミの同定および産地判別の検討. 日本 DNA 多型学会第 18 回学術集会, 2009.

17.梅とも子, 丸山理留敬, 仁尾義則, 高橋節典, 高山公子, 木村かおり, 藤原純子, 高塚尚和, 竹下治男: MIB 算出のための免疫染色手法と画像解析半自動カウント法. 第 26 回日本法医学会中四国地方会. 講演要旨集, 2009; p12-13, 山口.

18.木村かおり, 藤原純子, 高塚尚和, 梅とも子, 植木美鈴, 飯田礼子, 安田年博, 竹下治男: DNase II 遺伝子 exon 内 SNP 検索: 酵素活性に及ぼす変異の影響. 第 26 回日本法医学会中四国地方会. 講演要旨集, 2009; p10-11, 山口.

19.藤原純子, 安田年博, 植木美鈴, 飯田礼子,

木村かおり, 高塚尚和, 神田芳郎, 副島美貴子, 加藤秀章, 竹下治男: DNase I exon 内非同義置換 SNP 検索: 酵素性状に及ぼす置換の影響. 第 26 回日本法医学会中四国地方会. 講演要旨集, 2009; p8-9, 山口.

20.阿草哲郎, 岩田久人, 藤原純子, 國頭恭, Tu Binh Minh, Pham Thi Kim Trang, Pham Hung Viet, 竹下治男, 田辺信介: ベトナム人のヒ素曝露とその代謝遺伝子多型. 第 18 回環境化学討論会 筑波.

21.藤原純子, 阿草哲郎, 田中順子, 長谷川正紀, 守谷珠美, 岩田久人, 田辺信介, 竹下治男: ヒ素中毒の指標としての尿中 8-OHdG の有用性: 亜ヒ酸製剤を投与された APL 患者における検討. 日本法中毒学会第 28 年会講演要旨集, 2009; p 50-51, 金沢.

22.藤原純子, 高塚尚和, 竹下治男, 神田芳郎, 副島美貴子, 小湊慶彦, 田島 裕, 中島たみ子, 飯田礼子, 安田年博: DNASE1 exon 内 SNP 検索: アジア人において DNase I Gln222Arg のみが多型性を有する. 日本法医学雑誌. 2009; 63: p91, 大阪.

23.安田年博, 飯田礼子, 藤原純子, 竹下治男, 中島たみ子, 小湊慶彦, 湯浅勲: RNase I superfamily 遺伝子における分子多様性: 非同義置換型 SNPs 解析. 日本法医学雑誌. 2009; 63: p89, 大阪.

24.竹下治男, 守谷珠美, 藤原純子, 阿草哲郎, 藤井由己, 高塚尚和: DNA 修復酵素 (hOGG および XRCC1) 多型における酸化ストレスとの相関. 第 93 次日本法医学会総会. 日本法医学雑誌. 2009; 63: p73, 大阪.

[その他]

ホームページ等

http://www.med.shimane-u.ac.jp/legal_med/Legal%20Med%20index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 治男 (TAKESHITA HARUO)

(島根大学・医学部・教授)

研究者番号: 90292599