

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

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

研究代表者の専門分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：DNase I、多型、疾患感受性遺伝子

1. 研究計画の概要

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 I1 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。DNase I1 型 (Q222) および 2 型 (R222) の病態生化学的な差異に関して論じた報告は国内外において皆無である。DNase とアポトーシスについて、アメリカのジェネンティク社のグループがヒト DNase I をバイオ・エンジニアリング生産し、嚢胞性線維症などの治療薬として市販しているという報告、ドイツのマルブルグ大学グループによる、DNase I とアポトーシスに関する生化学的、組織学的、細胞生物学的研究から DNase I の SLE 発症への関与を示唆した報告等があるが、アポトーシス誘導による疾患感受性遺伝子 DNase I の多型機構解明に言及した報告はない。そこで本研究では、アポトーシス誘導による DNase I1 型 (Q222) および 2 型 (R222) の病態生化学的な差異を精査し、疾患感受性遺伝子 DNase I の多型機構を解明することを最終的な研究目的とする。

2. 研究の進捗状況

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 Q222R と MI の関連について報告した。本研究では SNaP Shot 法による同時遺伝子型判定法を用い DNase I 遺伝子 exon 内の Q222R 他 12 部位の非同義置換 SNP 部位の頻度分布を広範囲な民族について精査した。さらに各

SNP に対応する組み換え変異型の酵素活性および熱耐性を解析した。今回、アジア人では 11SNP 部位で多型性は認められず、Q222R のみ多型性を有することが明らかとなった。一方、アフリカ人では、Q222R 以外に多型性を有するものが 2 部位 (R-19S,G105R)、ドイツ人では Y95S、メキシコ人では R-19S に多型性がそれぞれ見出されたが、いずれも Q222R との連鎖は認められなかった。G105R において変異型に高い活性が認められることから、R 以外の置換体の活性を調べたところ、G105K は G105R と同等の活性上昇が認められたが、G105A は全く活性上昇が認められず、アミノ酸 105 番残基における + 電荷の導入が活性変異に寄与しているものと考えられた。また、R85G に相当する置換の導入によって活性が消失し、さらに G 以外の置換体を作成して活性をみたところ、R85A には R85G と同様活性の消失が認められたが、R85K はわずかに活性が低下するのみであり、活性の消失はアミノ酸 85 番残基における + 電荷の消失に寄与しているものと考えられた。その他、Q35H, V89M, C209Y, A224P, A224del でも活性低下が認められていた。変異型酵素、E13D, P132A, P197S, G240D では wild type の活性との間に顕著な差異は認められなかったが、E13D, P132A 以外はいずれも熱に対して不安定な酵素が産生されていた。

3. 現在までの達成度

疾患感受性遺伝子 DNase I の多型機構解明について当初のデータベース検索は予定以上に幅広い多検体について精査することができ、統計解析結果から有用な知見を見出せた。このデータをもとにして分子生物学的アプローチを予定していたよりも明瞭な方向で行えております。

4. 今後の研究の推進方策

DNase I 1 型 (Q222) および DNase I 2 型 (R222) をはじめアポトーシスに関与されると考えられてきたヌクレアーゼ群について DNA チップ解析装置を用いてアポトーシス前後の細胞に関してマイクロアッセイを実施し、関連する遺伝子の変動を体系的に解析する。培養細胞への construct の導入に成功しなかった場合、DNase I 1 型 (Q222) および DNase I 2 型 (R222) をそれぞれ呈する哺乳類実験動物を選別し、各種哺乳類実験動物由来 DNase I construct を導入する試みも用意している。DNase I 1 型 (Q222) および DNase I 2 型 (R222) 以外でアポトーシスに関与すると考えられてきたヌクレアーゼ群 (DNase I L1, DNase II, DNase γ , L-DNase II) について、その発現ベクターを細胞に導入し、精製

標品を調整する。得られた標品を抗原として、それぞれに対するモノクローナルおよびポリクローナル特異抗体を作製する。前項で得られた各種の特異抗体を用いて、アポトーシス前後におけるこれらの DNase I 1 型 (Q222) および DNase I 2 型 (R222)、DNase I L1, DNase II, DNase γ , L-DNase II の変動をプロテオーム解析する。

また、DNase I 1 型 (Q222) および DNase I 2 型 (R222) の活性を調節する因子を見出すため、酵母 two-hybrid システムを利用して DNase I 1 型 (Q222) および DNase I 2 型 (R222) と相互作用するタンパク質を検索する。当該タンパクを同定し、両酵素に対する調節作用を検討する。

5. 代表的な研究成果 (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 15 件)

① 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.

② 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.

③ 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.

④ Fujihara J, Yasuda T, Kunito T, Fujii Y, Takatsuka H, Moritani T, Takeshita H: Two N-linked Glycosylation Sites (Asn18 and Asn106) are Both Required for full enzymatic activity, thermal stability and resistance to proteolysis in the mammalian Deoxyribonuclease I. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2008; 72: 3197-3205

[学会発表] (計 12 件)

① 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: DNASE I 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。2009年5月16日, 大阪. 日本法医学雑誌. 63: p91,