

ヒト汗に存在する核酸分解酵素を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の推定

島根大学医学部法医学

竹下 治男

Human and porcine recombinant deoxyribonucleases I (DNases I) were expressed in COS-7 cells, and purified by a single-step procedure. Since affinities for concanavalin A (Con A) and wheatgerm agglutinin (WGA) were strong in these recombinant DNases I, purification using Con A-WGA mixture-agarose column was performed. By this method, the enzymes in culture medium could quickly be isolated to apparent homogeneity in approximately ten minutes. From 1 ml of culture medium, about 20-30 μg of purified DNase I with a specific activity ranging from 22000 to 41000 units/mg were obtained. The purified DNases I were subjected to enzymatic deglycosylation by either Peptide N-glycosidase F (PNGase F) or endoglycosidase H (Endo H). The recombinant enzyme was cleaved by PNGase F, not by Endo H, indicating that the recombinant enzymes are modified by N-linked complex-type carbohydrate moieties. In the human recombinant DNase I, activity was decreased by PNGase F-treatment, while that of the porcine DNase I remained unaffected. The thermal stability of the human enzyme was extremely susceptible to heat following PNGase F-treatment, as was the porcine enzyme to a lesser extent. This study suggests that N-linked complex-type carbohydrate moieties may contribute to the enzymatic activity and/or thermal stability of recombinant DNases I. Moreover, we developed a method for the simultaneous genotyping of SNP (A2317G) and 56-bp VNTR polymorphism within DNase I gene, and using this method, we determined the allele frequencies of both polymorphisms in Ovambo, Turk, Mongolian, Korean and Japanese populations and revealed wide differences between these ethnic groups.

1. 緒言

我々はヒトの核酸分解酵素である、デオキシリボ核酸分解 (DNase) およびリボ核酸分解酵素 (RNase) の生化学、酵素学、化学、人類遺伝学、分子生物学などに関する研究に従事してきた。両酵素は遺伝的多型形質であり、またヒト汗中には極めて活性の高い両酵素が存在することから、我々は、微量な汗からでも実施可能な個人識別法を確立して法医鑑識の実際に応用している。しかし、汗に含まれる高活性な核酸分解酵素の生理学および薬理学的作用は不明である。この研究では、汗に含まれる高活性な核酸分解酵素の生理学および薬理学的な役割や意義を解明したい。これによって、ヒト核酸分解酵素を含有させた医薬品軟膏 (化粧品等を含む) が有する生理作用や薬理作用を推定することができる。核酸分解酵素は、単なる消化酵素と考えられてきたので、多くの研究者の興味の対象ではなかった。しかし、最近になって、1) アポトーシスへの関与、2) 全身性エリテマトーデスとの関連性、3) 難治疾患の治療薬、4) 心筋梗塞の早期診断マーカー、5) 遺伝的多型の存在などが解明され脚光を浴びてきつつある。我々は、現在、ヒト核酸分解酵素 DNase および RNase の国際的な

標準定量法となっている、single radial enzyme diffusion (SRED) 法を開発した。この方法は極めて感度の高い微量定量法であり、各種臓器及び体液中の核酸分解酵素の活性測定が可能になり、この途上において、汗中に当該酵素が存在することを見出しえた。最近、発生や老化に深く関与しているアポトーシスの生化学的マーカーであるヌクレオソーム断裂化に DNase や RNase が関与するという報告が目立つが、皮膚組織の損傷再生機構等にも当該酵素が関わっているのではないかと考えられる。さて、哺乳類 DNase I は 3 型に分類され、膵臓型は、耳下腺型及び膵臓・耳下腺 (混合) 型に比して酸性下で不安定である。今回、耳下腺と膵臓の抽出物及び DNase I cDNA を哺乳類細胞に導入・発現させた組み換え型酵素のレクチン親和性精査を行い、これら試料より DNase I のワンステップ精製を行った。さらに、DNase I を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の個人感受性差異の調査を併せて行い、5 民族の血痕由来 DNA から、等電点電気泳動に基づく蛋白多型検出ではなく、新たな同時 PCR 法に基づく DNA 多型同時検出法を開発し、従来からある DNase I (*DNASE1*) 多型および最近新たに DNase I 遺伝子内に見い出された DNase I (*HumDNI*) 多型の頻度分布調査を行い、データベースの構築に着手した。

2. 実験

2・1 組み換え型酵素のレクチン親和性精査および DNase I のワンステップ精製

ラットの耳下腺・下顎腺、ウサギの耳下腺・膵臓及びブタの膵臓を用いた。さらに、ヒトおよびブタ DNase I



Fundamental study of the function on endonuclease (DNase I) in human sweat

Haruo Takeshita, M.D. Ph.D

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Shimane University

cDNA を発現ベクターに挿入し、得られた construct をリポフェクション法により、COS-7 細胞に導入・発現させた培養上清を用いた。親和性精査には、レクチンカラム 4 種 (Con A LCA RCA 120 WGA) を用い、DNase I のワンステップ精製には、Con A-WGA 混合カラムを用いて行った。

Recombinant peptide N-glycosidase F (PNGase F) と endoglycosidase (endo H) による脱グリコシル化について、各試料に希釈した PNGase F あるいは endo H を等量添加後 37°C で酵素反応を行い、DNA-casting PAGE により分析した。さらに、脱グリコシル化後の DNase I の安定性について精査した。

2・2 DNase I 多型データベースの構築

島根県の日本人 114 名、ブサンの韓国人 379 名およびウランバートルのモンゴル人 220 名の血液、ナミビアのオバンボス人 176 名およびトルコ北部アダナ地方のトルコ人 136 名の血痕から DNA を抽出した。DNASE1 多型について、1 型～4 型の検出は既法に従った。5 型の検出は、ARMS (amplification refractory mutation system) 法に拠り、6 型の判定は mismatched PCR-RFLP 法に拠った。今回調査した DNASE1 多型において、最初の検索からいずれのサンプルからも 3 型 - 6 型のマイナーアレルは検出されなかったため、DNASE1 多型の主要対立遺伝子 (*DNASE1*1* および *DNASE1*2*) と *HumDNI* 多型の同時検出を試みた。両多型を同一のゲル上で同時検出するため、次のような塩基配列の *DNASE1* プライマーを用いた。forward (5'-ATCGTGGTTGCAGGGATGCTGCCTC-3') および reverse (5'-AGTTCAACAGGTGTGGGAG-3')。他方 *HumDNI* プライマーには、forward (5'-GAGCGCTACCTGTTCGTGTACAG-3') および reverse (5'-CACCGCAGACACCTGGTCAGGC-3') を用いた。上記の PCR 産物は XhoI による制限酵素処理を行った。各サンプルを 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、銀染色によりバンドを検出した。

3. 結果と考察

3・1 レクチンカラム親和性

ラットとウサギの耳下腺、ラットの下顎腺では Con A、WGA 両方に強い親和性がみられた。一方、膵臓では、ウサギ、ブタともに Con A に親和性が認められたが、WGA 親和性は非常に低かった。これらから、唾液腺酵素と膵臓酵素の性状の相違はレクチンの認識する糖鎖構造に関連があるのではないかと考えられた。膵臓型酵素の親和性の低さはレクチンカラムを用いた精製に支障を来たす可能性が考えられた。そこで、ブタ及びヒト組み換え体酵素において親和性を精査したところ、native 酵素に比して、Con A、

WGA により強固な親和性が認められ、膵臓型酵素の精製には、組み換え体の利用が有用であると考えられた。

3・2 ワンステップ精製

ConA-WGA 混合カラムによりラットとウサギの耳下腺、ラットの下顎腺、ブタの膵臓の精製を行ったところ、いずれからも電気泳動上単一なバンドが得られた。また、ブタおよびヒトの組み換え体酵素は天然酵素と同一な移動度を示し、単一のバンドを形成する活性酵素が得られた。これら酵素の分子量、金属イオン要求性などは、既報の精製 DNase I のものと一致した。

3・3 脱グリコシル化を受けた DNase I の活性染色による検出

PNGase F はアスパラギン結合型糖鎖のうち、高マンノース鎖、混成型糖鎖、複合型糖鎖のアスパラギン残基と最も近い GlcNAc の間を切断し、Endo H は、アスパラギン結合型糖鎖の高マンノース鎖、混成型糖鎖の一部を切断する。すべての native 試料で PNGase F 処理により対照と比べて低分子の位置に一本のバンドがみられた。一方、Endo H 処理では、native 酵素において二つのパターンを示した。すなわち、ラットとウサギの耳下腺、ラットの下顎腺およびブタの膵臓では二本バンドが見られ (対照の位置と PNGase F のバンドより高分子の位置)、またラットの下顎腺、ウサギの膵臓では PNGase F 処理と同じ位置に一本のバンドがみられた。組み換え体酵素では、ブタ及びヒトともに PNGase F 処理により、脱グリコシル化を受けたが、Endo H 処理では脱グリコシル化は認められなかった。これらの結果から、DNase I には臓器特異的な糖鎖付加の相違が認められるとともに、native 酵素と組み換え体酵素においても糖鎖付加の相違が示唆された。

3・4 脱グリコシル化が DNase I 活性に及ぼす影響

活性染色像に強弱が認められたため、酵素による脱グリコシル化処理時間と DNase I 活性の関係を調べた。脱グリコシル化処理により、12 時間で、native 及び組み換え体のブタの膵臓では酵素の失活がみられ、ラットの下顎腺では約 60% 酵素活性が減少した。種/臓器特異的な DNase I の性状が示唆された。また、脱グリコシル化によってブタ膵臓に脆弱性が認められることから、脱グリコシル化を受けたブタ及びヒト組み換え体酵素において、熱安定性を調べたところ、やはり、ヒトに比してブタでは極めて高度の熱不耐性が認められた。レクチンカラムにより、哺乳類 DNase I の精製が初めてワンステップで可能となった。本法は、生体試料および培養上清中の組み換え体酵素の両方から、迅速・簡便に多量の酵素を得られる有用なものである。哺乳類 DNase I のレクチン親和性精査および

び脱グリコシル化の結果から、局在の異なる DNase I の性状の差異には糖鎖付加が関係しているのではないかと考えられた。

3・5 DNase I 多型データベースの構築

今回 *DNASE1* および *HumDNI* 多型同時検出法を新たに構築した。*DNASE1* に関して、これまでの日本人集団の調査では、9つの表現型が報告されているが、今回調査された5集団においては、いずれも主要表現型の1、1-2および2型のみが観察された。*HumDNI* 多型に関して、反復数が2回から6回に相当するアレル2からアレル6までが検出された。両多型とも、トルコ人集団では、*DNASE1*2*、*HumDNI*4* および *HumDNI*5* の出現頻度は他集団に比べ有意に高かった。アフリカオバンボス人集団では、*DNASE1*1* および *HumDNI*3* の出現頻度が他集団に比して有意に高かった。アジア人3集団においては、両多型とも類似した集団データを示した。DNase I 遺伝子に存在する *DNASE1* 多型と *HumDNI* 多型との間の相関について解析したところ、両多型の間に連鎖不平衡が認められた。いずれの集団においても、*HumDNI*3* は *DNASE1*1* と、*HumDNI*4* および *HumDNI*5* は *DNASE1*2* と有意に相関していた。

今回得られた DNase I 組み換え型酵素のレクチン親和性精査、DNase I のワンステップ精製、DNase I 型検出法および DNase I 多型データベースを基に、今後さらに酵素活性データを包含させ、ヒト汗に存在する核酸分解酵素を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の推定の一助にしたいと考えている。

(参考文献)

この研究を遂行するにあたり、ご援助いただきました貴財団に深謝致します。また、貴財団からのご援助により本研究に関連した以下の成果を達成しました。この事実を以下の文献に記載して謝意を表明しました。

1) Fujihara J, Okui I, Takeshita H ほか: Single-step purification by lectin affinity and deglycosylation

analysis of recombinant human and porcine deoxyribonuclease I expressed in COS-7 cells. *Biotechnology Letters*, 28, 215-221, 2006

2) Fujihara J, Yasuda T, Takeshita H ほか: Frequency of a single nucleotide (A2317G) and 56-bp variable number of tandem repeat polymorphisms within the deoxyribonuclease I gene in five ethnic populations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44, 1188-1191, 2006

3) Takatsuka H, Fujihara J, Takeshita H ほか: Analysis of genetic polymorphism of deoxyribonuclease I in Japanese from Shimane prefecture using genotyping method. *Shimane Journal of Medical Science*, 23, 1-6, 2006

4) Fujihara J, Yasuda T, Takeshita H ほか: Variation of *interleukin 8* -251 A > T polymorphism in worldwide populations and intra-ethnic differences in Japanese populations. *Clinica Chimica Acta*, 377, 79-82, 2007

5) Fujihara J, Xue Y, Takeshita H ほか: *CYP1A2* polymorphism (C>A at position-163) in Ovambos, Koreans and Mongolians. *Cell Biochemistry and Function*, 25, 491-494, 2007

6) Fujihara J, Takatsuka H, Takeshita H ほか: Two deoxyribonuclease I gene polymorphisms and correlation between genotype and its activity in Japanese population. *Legal Medicine*, 9, 233-236, 2007

7) Fujihara J, Kunito T, Takeshita H ほか: Frequency of two human glutathione-S-transferase omega-1 polymorphisms (E155 deletion and E208K) in Ovanbo and Japanese populations using the PCR-based genotyping method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45, 621-624, 2007

8) Takeshita H, Fujihara J, Soejima M ほか: Extremely high prevalence of *DNASE1*1* allele in African populations. *Cell Biochemistry and Function*, 26, 151-153, 2008