

L-ficolin の遺伝子多型に関する研究

松下 操*

Studies on the L-ficolin gene polymorphism

by

Misao MATSUSHITA

Abstract

L-ficolin is a human serum protein with lectin activity towards *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and is involved in immunity. The L-ficolin gene (*FCN2*) contains a polymorphism (6424G > T) in the exon 8, which is associated with increased GlcNAc binding. To examine the polymorphism in the *FCN2* gene, PCR products treated with a restriction enzyme were analyzed by electrophoresis.

Key words: L-ficolin/ immunity/polymorphism/PCR/restriction enzyme

1. 緒言

ヒト血清中に存在する L-ficolin は生体防御レクチンの一つであり、セリンプロテアーゼの MASP と複合体を形成している。L-ficolin は病原体表面の *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を認識して結合すると、補体系を活性化して病原体を排除する⁽¹⁾。L-ficolin は、コラーゲン様ドメインと GlcNAc 結合部位を持つフィブリノーゲン様ドメインから成るサブユニットが結合したオリゴマーである。L-ficolin 遺伝子 (*FCN2*) の SNPs (single nucleotide polymorphisms) は数種類知られているが、exon 8 に存在する多型(6424G > T)は、翻訳される 258 番目のアミノ酸がアラニンからセリンへと変わり、合成される L-ficolin は GlcNAc に対する親和性が野生型よりも高い。現在、この多型の有無は PCR 産物をダイレクトシーケンシングすることにより解析されている^(2,3)。本研究では、PCR-RFLP を用いて、より簡便に当該多型を解析する方法を検討した。

2. 実験

1. PCR

目的の多型部分を含む DNA を増幅させる為に、白血球 DNA を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR 反応を行った⁽²⁾。フォワードプライマー 5'CTGTCTGTAATGATGTTACTG3' リバースプライマー 5'TACAAACCGTAGGGCCAAGC3'。PCR 反応液の組成と反応条件は以下の通り。cDNA PCR reaction buffer(BD Biosciences 社)、Taq-I DNA polymerase (BD Biosciences)、フォワードプライマーとリバースプライマー、dNTP (東洋紡績)、鋳型 DNA Sample 溶液。94°C、2 分の変性処理後、30 サイクル(94°C、30 秒、65°C、1 分、72°C、30 秒)。

2. PCR 産物の制限酵素処理

得られた PCR 産物、RE Buffer、アセチル化 BSA、Xmn I (Promega) を混ぜ、37°C で 18 時間反応させた。

* 工学部生命化学科 教授・薬博

3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PCR産物及びそのXmn I処理断片を8%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、SYBR Green I (タカラバイオ)で染色してバンドを検出した。

3. 結果と考察

PCRの結果、検討した10検体の全てに、予想された383bp付近にほぼ単一のバンドが確認された。そこで、多型部分を認識して切断する制限酵素としてXmn Iを選択し、これを用いてPCR産物を処理した。その結果、6検体では予想された255bpと128bp付近にバンドが認められた。また、383bp付近のバンドも確認されたことより、これらの検体は野生型と変異型のヘテロ接合体であると推定される。一方、残りの4検体はXmn Iで切断されなかった。従って、これらは野生型のホモ接合体であると推定される。今後、PCR産物とそのXmn I断片についてシークエンシングを行い塩基配列を確認する必要があるが、本方法はPCR産物のダイレクトシークエンシング法に比べて、より簡便に6424G>Tの多型を調べる方法として使えることが期待される。

謝辞

本研究は、2004年度学部等研究教育補助金の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) Matsushita, M. and Fujita, T. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.* 180, 78-85, 2001.
- 2) Hummelshoj, T., Munthe-Fog, L., Madsen, H.O., Fujita, T., Matsushita, M. and Garred, P. Polymorphisms in the *FCN2* gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1651-1658, 2005.
- 3) Herpers, B.L., Immink, M.-M., de Jong, B.A.W., van Velzen-Blad, H., de Jongh, B.M. and van Hannen, E.J. Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. *Mol. Immunol.* 43, 851-855, 2006.