

原 著

シックハウス症候群と *PON1* (パラオキシナーゼ1) 遺伝子多型

木村 穰¹⁾ 水谷 晃子¹⁾ 菊池イアーラ幸江¹⁾
猪子 英俊¹⁾ 坂部 貢²⁾ 青山 美子²⁾
角田 和彦³⁾ 石川 哲²⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系

2) 北里研究所病院臨床環境医学センター

3) 坂総合病院小児科

Genetic polymorphisms of *Paraoxonase 1* (*PON1*) gene and Sick Building Syndrome

Minoru Kimura¹⁾ Akiko Mizutani¹⁾ Yukie Y. Kikuti¹⁾
Hidetoshi Inoko¹⁾ Kou Sakabe²⁾ Yoshiko Aoyama²⁾
Kazuhiko Kakuta³⁾ Satoshi Ishikawa²⁾

1) Department of Basic Medicine, School of Medicine, Tokai University

2) Division of Clinical Ecology, Environmental Medical Center,
The Kitasato Institute Hospital

3) Department of Pediatrics, Saka General Hospital

要約

シックハウス症候群の発症には環境要因のみならず遺伝要因も少なからず関与していると思われる。このシックハウス症候群感受性遺伝子を同定するために、*PON1* (パラオキシナーゼ1) 遺伝子を候補遺伝子としてその遺伝的多型解析を行った。まず、*PON1* 遺伝子領域に存在する遺伝的多型部位の検索を行い、これらの中から *PON1* 遺伝子の翻訳領域および5'プロモーター領域に存在する単一塩基置換 (SNP) をそれぞれ2カ所および5カ所を選択して、一般健常者集団130名、シックハウス症候群集団59名を用いて、対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を求めた。各 SNP ごとに対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度について有意差検定を行ったところ、シックハウス症候群集団に特異的な対立遺伝子および遺伝子型は見い出されなかった。しかしながら、*PON1* 遺伝子の翻訳領域に存在する *PON1*-55M/L 多型部位においては、日本人集団がアメリカ人白人集団における遺伝子型頻度と異なる分布を示すことが明らかになった。今後は人種の違いを考慮した遺伝要因解析が重要である。

(臨床環境13: 55~59, 2004)

受付: 平成16年4月7日 採用: 平成16年4月26日

別刷請求宛先: 木村 穰

〒259-1193 伊勢原市望星台 東海大学医学部基礎医学系

Received: April 7, 2004 Accepted: April 26, 2004

Reprint Requests to Minoru kimura, Department of Basic Medicine, School of Medicine, Tokai University, Bohseidai, Isehara 259-1193 Japan

Abstract

It is considered that the development of Sick Building Syndrome might be related not only to environmental factors but also to genetic factors. To identify the Sick Building Syndrome-susceptibility gene, *Paraoxonase 1 (PON1)* gene was selected as one of the strong candidate genes responsible for the pathogenesis of Sick Building Syndrome and subjected to polymorphism analysis. Genetic polymorphisms were searched in the genomic sequences of the *PON1* gene using public database. Of those, two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the coding region of the *PON1* gene and five SNPs in the promoter region were selected to carry out direct sequencing analysis. A total of 59 unrelated Japanese patients with Sick Building Syndrome and 130 healthy Japanese controls were enrolled for the investigation of genetic association with seven polymorphic genetic markers around the *PON1* gene and provided allelic and genotypic distribution data. We found that there were no significant differences in allelic or genotypic distribution between the patients and healthy controls. However, the M55L polymorphism in the coding region of the *PON1* gene showed different allelic distributions between the Japanese and white American populations, suggesting that ethnicity-specific polymorphisms should be identified before association studies.

(Jpn J Clin Ecol 13 : 55~59, 2004)

《Key words》 *PON1*, association study, single nucleotide polymorphism (SNP), Sick Building Syndrome.

I. 緒言

PON1 (パラオキシナーゼ1) はアシルエステラーゼのひとつで、ヒト血清中において高密度リポタンパク質 (HDL) 分子と会合しており、低密度リポタンパク質 (LDL) の酸化保護や¹⁾、サリンやクロロピリフォスなどの有機リン化合物の加水分解に重要な役割を果たしている。*PON1* 遺伝子は、354アミノ酸からなる約43KDaのPON1タンパク質をコードする。このPON1タンパク質のアミノ酸配列は哺乳類において広く保存されており、この酵素が薬物代謝において重要な働きをしていることが考えられている。*PON1* 遺伝子の他に2個のパラオキシナーゼ遺伝子ファミリーのメンバーが現在までに同定されており (*PON2*、*PON3*)、3個のPON遺伝子は互いに、ヒト染色体7q12.3-q22.1上に並んで存在している²⁾ (図1)。*PON3* もまたPON1と類似の生物学的活性を持つHDL結合酵素であることが報告されている³⁾。また、PON1およびPON3とは違い、PON2はHDL上には局在せず、広く生体内で発現しているが、PON1およびPON3と同様に抗酸化作用を持っている⁴⁾。

また、PON1欠損マウスはHDLおよびLDL

に対して抗酸化作用がなく、有機リンに対して強い感受性を示すことが報告されており、この遺伝子の機能とシックハウス症候群発症の関連が予想された⁵⁾。一方、現在までにヒト*PON1* 遺伝子の翻訳領域^{6,7)} やプロモーター領域⁸⁾ においていくつかの多型部位が報告されている。これらのうち、PON1-192Q/Rのアミノ酸多型は有機リンに対する酵素活性や酸化脂質に対する加水分解に影響を与えることが知られ⁹⁾、また、PON1-55M/Lの

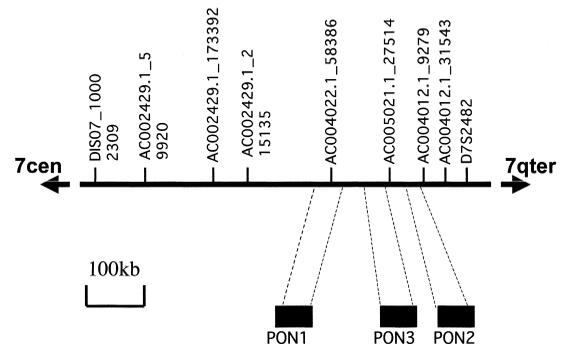


図1 ヒト第7染色体7q12.3-q22.1上のPON遺伝子クラスター

直線が染色体を示し、上部にマイクロサテライトマーカー、下部にPON1、PON2、PON3遺伝子を示した。

アミノ酸多型は、酵素活性には影響を与えないものの血清中の mRNA やタンパク質濃度に影響することが知られていることから、これまた本症候群への PON1 活性の関与が注目された¹⁰⁾。

そこで、我々は *PON1* 遺伝子の多型部位を含むヒトゲノム領域を PCR 法により増幅し、直接塩基配列決定法あるいは RFLP によって各個体の対立遺伝子を決定する実験方法を確立した。さらに、シックハウス症候群と *PON1* 遺伝子多型との関係を調べるために、有機リンとの関連が推測されるシックハウス症候群患者集団および一般健常者集団について *PON1* 遺伝子の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度について有意差検討を行った。

II. 方法

1. DNA の抽出

まずインフォームドコンセントの得られたボランティアより末梢血の採取を行った。DNA 抽出キットを用いてゲノム DNA の抽出を行い、得られたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の品質検定と半定量を行った。さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。

2. DNA 配列情報の検索

PON1 遺伝子領域内において SNPs の検出を行うため、GenBank DNA データベース (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より *PON1* 遺伝子領域を含むヒトゲノム領域の塩基配列を入手し、得られたゲノム配列上に、*PON1* 遺伝子領域のエクソン、イントロン、プロモーター領域をマップした。さらに、このゲノム領域に存在する SNPs を NCBI SNPs データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) を用いて検索して同様にゲノム上にマップした。

3. プライマーの設計および PCR 増幅

SNPs を含むゲノム DNA 領域の増幅に用いる PCR プライマーの設計は、PCR に適した条件を考慮するソフトウェア「Pimer Express」を活用した。ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー9700を用いて PCR 反応を行い、標的とするゲノム領域の増幅を行った。増幅断片をアガ

ロース電気泳動等によって確認した。このとき、予想される長さの DNA 断片が検出されなかったり、非特異的 DNA 断片が検出された場合は、PCR 増幅サイクルのうち、アニーリング温度あるいは伸長反応の時間を検討することによって特異的な DNA 増幅を検討した。

4. 塩基配列の決定

増幅 DNA 断片を DNA 精製キットによって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてシーケンシングサイクルを行った。反応後、シーケンシング産物を精製して3100シーケンサーによって塩基配列の決定を行った。

5. 統計解析

各 SNPs における対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度は、各個体の対立遺伝子を直接カウントすることによって算出した。シックハウス症候群と *PON1* 遺伝子多型との相関解析は、カイ二乗検定およびフィッシャーの P 検定によって行った。

III. 結果

PON1 遺伝子領域に存在する SNPs を検索した結果、プロモーター領域に存在する 5 個の rSNPs (regulatory SNPs) および 2 個の cSNPs (coding SNPs) が現在までに見い出されており、これらの SNPs を遺伝的多型マーカーとした。5 個の rSNPs は *PON1* 遺伝子の転写開始点よりそれぞれ上流 -909, -832, -162, -126, -108, に位置し、各塩基多型は、(G/C)、(A/G)、(A/G)、(C/G)、(C/T) であった (図 2)。また、2 個の

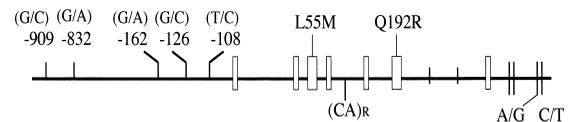


図 2 *PON1* 遺伝子構造と遺伝的多型箇所

直線は *PON1* 遺伝子のゲノム領域を示し、長方形は *PON1* 遺伝子のエクソンを表している。-108、-126、-162、-832、-909はそれぞれプロモーター領域における一塩基置換を示している。エクソンの上部の数字は *PON1* タンパク質のアミノ酸位置を示し、左右のアルファベットは非同義置換のアミノ酸を示す。直線下部の (CA)_n はマイクロサテライトの位置を示している。

cSNPs はそれぞれエクソン 3 とエクソン 6 に位置しており、各塩基置換は (T/A) および (A/G) であった。さらに、この 2 個の cSNPs はアミノ酸置換を伴い、それぞれ Leu→Met (コドン55) および Gln→Arg (コドン192) であった (図 2)

PON1 遺伝子多型とシックハウス症候群の関係調べるために、上記 7 個の SNPs についてシックハウス患者 59 名、健常者 130 名を用いて対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を算出した。各 SNPs は全てハーディワインベルグ平衡にあった。しかしながら、シックハウス症候群集団において、有意に対立遺伝子頻度が上昇している遺伝子座は見い出されなかった (表 1)。

また、一般健常者集団 130 名において *PON1*-55M/L 多型部位の MM 遺伝子型は見い出されなかった。

IV. 考按

PON1 翻訳領域は広く知られている 2 個のアミノ酸置換をとともなう多型を含んでいる。1 つはコドン 55 のロイシン (L) からメチオニン (M) で、もうひとつはコドン 192 のグルタミン (Q) からアルギニン (R) の置換である。Q192R 多型は種々の有機リンに対する血清 *PON1* 活性に影響を与え⁵⁾、生体内で酸化脂質の加水分解を左右することが知られている⁶⁾。また、L55M 多型は、種々の有機リンに対する酵素活性に影響は与えないが、

55M 対立遺伝子は mRNA およびタンパク質レベルの減少に関連することが知られている⁷⁾。

PON1 遺伝子多型の対立遺伝子頻度は、人種間で異なることが知られている (表 2)。例えば、*PON1* 192Q 対立遺伝子の頻度はいくつかの白人集団において約 0.70 であるが^{8,11)} アジア人種では約 0.40 であり、今回我々が解析した日本人集団においても約 0.30 である。また、55M 対立遺伝子については白人集団においては約 0.35 であるが、本研究では約 0.09 であった。さらに、中国のハン民族においては 949 名の集団において M55L 多型は存在しなかったと言われている¹²⁾。対立遺伝子頻度の他にも、各 SNPs 間の連鎖様式についても人種間で異なることが知られている。例えば、アメリカ白人集団においては、-108C 対立遺伝子と 192R 対立遺伝子が連鎖不平衡にあることが報告されているが¹¹⁾、スイス白人集団においては、連鎖しないことが知られている¹⁰⁾。さらに、中国ハン民族においては、-108C 対立遺伝子と 192Q 対立遺伝子が連鎖不平衡にあることが報告されている¹²⁾。このような *PON1* 遺伝子多型の対立遺伝子頻度や多型間において見られる連鎖様式などの人種における違いは、人種特異的なゲノム形成を推定することができ、さらには相関解析において人種特異的な多型を見い出すことの重要性を示唆している。

表 1 *PON1* 遺伝子多型とシックハウス症候群の相関解析

Position	Allele	Patients (n=59)		Controls (n=130)		Odds Ratio	Fishe's Exact P-value	Bonferroni's Correction
		Count	Frequency	Count	Frequency			
-909	G	50	0.42	123	0.47	0.82	0.4356	1.0000
	C	68	0.58	137	0.53	1.22		
-832	A	33	0.28	65	0.25	1.16	0.6126	1.0000
	G	85	0.72	195	0.75	0.86		
-162	A	12	0.10	27	0.10	0.98	—	
	G	106	0.90	233	0.90	1.02		
-126	C	13	0.11	27	0.10	1.07	0.8580	1.0000
	G	105	0.89	233	0.90	0.94		
-108	C	50	0.42	127	0.49	0.77	0.2668	1.0000
	T	68	0.58	133	0.51	1.30		
55	T	108	0.92	237	0.91	1.05	0.9999	1.0000
	A	10	0.08	23	0.09	0.95		
192	A	39	0.33	80	0.31	1.11	0.7201	1.0000
	G	79	0.67	180	0.69	0.90		

表2 人種間における *PON1* 遺伝子の対立遺伝子頻度の違い

position and Allele	Brophy et al. (2001)n=376	Motti et al. (2001)n=49	Leviev et al. (2000) n=374M/F184/190	James et al.(2000)		Suehiro et al. (2000)n=132	Kimura et al.	
				+CHD M/F(104/33)	-CHD (175/98)		P	C
-909 G	.46		.41				.42	.47
C	.54		.59				.58	.53
-162 A	.23					.10	.10	.10
G	.77					.90	.90	.90
-108 C	.50		.46	.44	.51	.48	.39	.48
T	.50		.54	.56	.49	.52	.61	.52
55 L	.64	.52	.65	.62	.60	.94	.93	.91
M	.36	.48	.35	.38	.40	.06	.07	.09
192 Q	.73	.694	.69	.67	.73	.40	.30	.29
R	.27	.306	.31	.33	.27	.60	.70	.71

文献

- Mackness MI, Arrol S, et al: Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 286 : 152-154, 1991
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, et al: The human serum paraoxonase/arylesterase gene is one member of a multigene family. *Genomics* 40 : 133-139, 1996
- Reddy ST, Wadleigh DJ, et al: Human Paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 542-547, 2001
- Ng CJ, Wadleigh DJ, et al: Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276 : 44444-44449, 2001
- Shih DM, Gu L, et al: Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394 : 284-287, 1998
- Humbert R, Adler DA, et al: The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3 : 73-76, 1993
- Adkins S, Gan KN, et al: Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes/*Am J Hum Genet* 3 : 73-76, 1993
- Leviev I, James RW: Promoter polymorphisms of human paraoxonase *PON1* gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 516-521, 2000
- Mackness MI, Arrol S, et al: Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet* 349 : 851-852, 1997
- Leviev I, Franco N, et al: Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amount of mRNA : an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 516-521, 2000
- Brophy VH, Jampsa RL, et al: Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (*PON1*) expression. *Am J Hum Genet* 68 : 1428-1436, 2001
- Wang X, Fan Z, et al: Extensive association analysis between polymorphisms of *PON* gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 : 328-334, 2003