

神経障害標的エステラーゼ遺伝子とシックハウス症候群

松坂 恭成¹⁾ 青山 美子²⁾ 角田 和彦³⁾
坂部 貢^{4,5)} 石川 哲⁵⁾ 木村 穰¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

2) 青山内科小児科医院

3) かくたこども&アレルギークリニック

4) 北里大学薬学部公衆衛生学

5) 北里研究所病院臨床環境医学センター

SNP in the promoter of *NTE*, encoding *Neuropathy Target Esterase*, is associated with Sick House syndrome

Yasunari Matsuzaka¹⁾ Yoshiko Aoyama²⁾ Kazuhiko Kakuta³⁾
Kou Sakabe^{4,5)} Satoshi Ishikawa⁵⁾ Minoru Kimura¹⁾

1) Department of Basic Molecular Science and Molecular Medicine,
Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa, Japan

2) Aoyama Internal Medicine Children's Clinic

3) Kakuta Children & Allergy Clinic

4) Department of Public Health and Molecular Toxicology,
Kitasato University School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Japan

5) Division of Environmental Medical Center, Kitasato Institute Hospital,
The Kitasato Institute, Tokyo, Japan

要約

神経障害標的エステラーゼ (*NTE*) は、セリンエステラーゼ活性をもつ神経系の膜タンパク質である。*NTE* 遺伝子は、ヒト第19番染色体19p13.3に位置し、35個のエクソンから構成されている。この遺伝子の一方の対立遺伝子を欠損させたノックアウトマウス (*Nte*^{+/-}) では野生型マウスに比べて脳における活性が約40%まで低下しており、多動性を示すことが報告された¹⁾。そこで、我々のデータを中心にマイクロサテライトおよび SNP マーカーを用いた (1) *NTE* 遺伝子多型とシックハウス症候群、(2) *NTE* ハプロタイプとシックハウス症候群との相関について検討した。その結果、対立遺伝子頻度に関しては、エクソン2の非翻訳領域に存在する遺伝マーカー (rs604959) においてシックハウス症候群との相関が見られ、

別刷請求宛先: 松坂恭成

〒259-1193 伊勢原市望星台 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

Reprint Requests to Yasunari Matsuzaka, Department of Basic Molecular Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193 Japan

さらにこの遺伝マーカーに加えて、これより上流に存在する遺伝マーカー (rs540516) の2個の遺伝マーカーともに遺伝子型頻度についてシックハウス症候群と相関が見られた。さらに、この2個の遺伝マーカーを含むハプロタイプ解析の結果、ハプロタイプ CC が健常者集団において0.3%のみであるのに対してシックハウス症候群患者集団では8.3%と有意にその頻度が増加していた。このことから、*NTE* 遺伝子の5'上流領域に存在するハプロタイプ CC がシックハウス症候群の感受性ハプロタイプであると考えられた。

Abstract

Neuropathy Target Esterase (*NTE*) is a neuronal, membrane bound protein with serine esterase activity. The *NTE* gene is located on human chromosome 19p13.3 and consisted of 35 exons. It was reported that mice heterozygous with respect to the *Nte* mutation (*Nte*^{+/-}), which had approximately 40% lower enzymatic activity of *Nte* in the brain compared with wild-type and have elevated locomotion activity.

Here we report using microsatellite and SNP markers, the association between a *NTE* gene polymorphism and Sick House Syndrome (SHS) and the relationship between a *NTE* haplotype and SHS.

《Key words》 *NTE*, SNPs, microsatellite, haplotype, Sick House Syndrome

I. はじめに

シックハウス症候群は、ホルムアルデヒドや有機リン系の殺虫剤等の様々な揮発性有機化合物がその発症に関与していることに疑いが無いが、この疾患のかかりやすさ(感受性)に個人差があることも事実である。このような疾患感受性は、現在では遺伝子型の違いによって説明することができる。

一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって規定されると考えられるが、現在までに進められてきたヒト疾患の遺伝要因の解析は、連鎖解析 (Linkage analysis) による単純なメンデル遺伝を示す単一遺伝性疾患に限定されていた。しかしながら、複数の遺伝的要因が関与する複合性遺伝疾患あるいは、人類集団中において高頻度で見出される通常疾患の感受性遺伝子についても、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた遺伝的相関解析 (Association study) を行うことによって、その疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示されている。

シックハウス症候群については、種々の揮発性化合物に対する症状が調べられているが、この疾患の場合も複数の遺伝的効果が複雑に作用している複合性遺伝疾患であると考えられる。したがって上記のように、高度に多型性を示す遺伝的マ-

ーカーをヒトゲノム上に高密度に配置し、これらの遺伝マーカーを用いた相関解析によってその遺伝的要因を明らかにすることができる可能性がある。

現在までに、使用されている遺伝的多型マーカーは、一塩基多型 (SNP) およびマイクロサテライトの大きく2つに分けられる。SNPは、ヒトゲノム上に平均1 kbに1個の割合で高密度に存在しており、対立遺伝子の数が通常2個で染色体上において維持される連鎖不平衡の距離は約3 kbである。一方、マイクロサテライトは、ヒトゲノム上に平均30 kbに1個の割合で存在しており、その対立遺伝子数は通常数個以上存在しており、SNPに比べて比較的多いこと、また維持される連鎖不平衡の距離も約100 kbと長いことから、疾患との関連を調べるには、第一にマイクロサテライトを用いた遺伝学的相関解析を行い、第二に相関の得られた領域においてSNPを用いた相関解析を行うことによって、効率的に疾患感受性遺伝子を同定できると予想される。

遺伝的相関解析には、全ゲノム領域を対象として位置的情報のみを手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法と、現在までにその遺伝子の機能が解明されており疾患との関連性を考慮して候補遺伝子を選定する。すなわち、機能的情報を手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法があるが、後

者の方法によってシックハウス症候群の遺伝要因に関する情報を蓄積することを目指した我々の例を中心に紹介したい。

シックハウス症候群の候補遺伝子として、*NTE* (Nueropathy target esterase) 遺伝子を選定した。ヒトにおいて、有機リンやその他の化学物質の曝露によって生ずる神経性の疾患が、湾岸戦争での兵士や慢性的に化学物質に曝露されたヒトにおいて報告されているが、これは有機リンが *NTE* と反応することによって引き起こされると考えられている²⁾。*Nte* 遺伝子欠損マウスは、ホモ型欠損マウスにおいては胎児期に死亡してしまう。一方、*Nte*^{+/-}マウスでは野生型マウスに比べて多動であることが報告された¹⁾。また、野生型マウスに *Nte* の阻害物質である EOPF (ethyl octylphosphonofluoridate) を少量加えた場合もまた同様に、多動性が著しく高くなることも報告された¹⁾。このようなことから、*Nte* 活性の阻害が遺伝的にも化学的にも神経毒性的効果に影響を与えていることが明らかにされた。

シックハウス症候群において有機リンはひとつの環境要因と目され、いくつかの神経症状を伴う例も知られることから、*NTE* 遺伝子をこの疾患発症関わる遺伝子として選定することは、それほど無理のないことと考えられた。

そこで、シックハウス症候群患者集団および健康者集団において、*NTE* 遺伝子領域に存在する遺伝的多型の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を解析することによって、*NTE* 遺伝子とシックハウス症候群との関連を明らかにすることを目的とした。

II. 手法とアプローチ法

DNA の抽出については、社団法人北里研究所・北里研究所病院の協力により、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。採血管はヘパリンがその後の酵素反応に影響を与えるためクエン酸主体のものを使用し、10ml の採血を行った。このうち0.4ml を用いて、カートリッジ (キアゲン社) による DNA の抽出後、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 の定性的判定を行い、さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。我々は、各試料についてコード化をはかり、特定の個人情報とは簡単に連結できないように配慮し、個人情報管理は東海大学医学部個人情報管理部で管理したが、倫理面の配慮も指針に従って行われた。

DNA 配列情報およびマイクロサテライト繰り返し配列および一塩基置換 (SNP) の検索については、まず *NTE* 遺伝子のゲノム領域内においてマイクロサテライト繰り返し配列および SNPs の検出を行うために、この遺伝子領域を含むゲノム DNA の配列情報が必要となる。ヒトゲノム配列は、GenBankDNADatabase (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より入手可能である。得られたゲノム配列について、*NTE* 遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター領域を明らかにしたが、種々のものが存在する。SNP のなかには、調節領域に存在する rSNP (regulatory SNP) やコーディング領域に存在する cSNP (coding SNP)、イントロン領域に存在する iSNP (intron SNP)、遺伝子間の介在領域に存在する gSNP (genomic SNP) があるが、データベースに登録されている *NTE* 遺伝子領域に存在する SNP についてもその位置を明らかにした (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)。

PCR プライマーの設計については、PCR に適した条件を考慮するソフトウェアである「Primer Express」を用いて、SNP を挟み込むようにフォワードプライマーとリバースプライマーの2種類のプライマーを各 SNP ごとに設計した。このソフトウェアは PCR の適した条件の必要事項である T_m 値、GC 含量、プライマー配列の2次構造等を考慮してプライマー配列を選定できるが、反復領域やゲノム上に類似した配列がある場合あるいはプライマー配列内に多型がある場合には PCR 増幅が阻害されるため、できる限り配列情報の検索を行っておくことを心がけた。

PCR 増幅については、ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー9700 (ABI 社) を

用いて PCR 反応を行い、SNP を含むゲノム領域の増幅を行い、増幅断片を2.0%アガロースゲル電気泳動等によって確認する。条件設定と結果は、後述する。

塩基配列の決定は、増幅 DNA 断片を Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてサイクルシーケンシングを行った。反応後、シーケンシング産物を精製してシーケンサーによって塩基配列の決定を行うが、我々は ABI3100 を用いた。

ハプロタイプ解析、連鎖不平衡値の算出およびハプロタイプの推定は、Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) によって行った³⁾。

上記の解析で得られた多型データについて、患者集団および健常者集団における対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度、ハプロタイプ頻度を算出し、両集団間の各頻度についての有意差検定は χ^2 検定およびフィッシャーの Probability 検定により解析を行った。

Ⅲ. 遺伝的多型箇所の検索

シックハウス症候群の候補遺伝子である *NTE* 遺伝子について、遺伝的多型箇所をデータベース検索によって調べた。この遺伝子は27.6Kb のゲノム領域にわたり、現在までのところ、106個の SNP と7個のマイクロサテライトが存在していた。SNP に関しては、その対立遺伝子頻度の情報が全ての SNP について明らかにされていないため、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency の高い遺伝マーカーを実際に実験的に調べる必要がある。そこで、上記の検索によって検出された SNP についてランダムにいくつかの SNP について対立遺伝子頻度を求めることとした。

Ⅳ. PCR プライマーおよび PCR 条件の設定

遺伝的多型の解析方法を確立するために、a) DNA 抽出方法、b) PCR プライマーの設定と

PCR 条件の決定、c) PCR 産物の抽出方法、d) Sequencing 方法の決定を行うが、我々の手順と結果は以下の通りである。DNA の抽出方法については、0.4ml の末梢血試料をカートリッジ (キアゲン社) を使用して DNA の調製を行い、抽出されたゲノム DNA は、次ぎの PCR 反応条件に適切な DNA 濃度および品質を保っていることを確認した。PCR プライマーは、SNP 箇所を挟み込む形で設定してその増幅 DNA 断片が1.5kb 以下になるように設計し、PCR 反応条件は、94°C 30sec、56~60°C 30sec、72°C 2min のサイクルを30回繰り返すことで標的 DNA 断片の増幅が十分であることが確認できた。また、近接する SNP 箇所については1つの PCR 断片の中に複数の SNP が含まれるように PCR プライマーを設定し、多型解析の効率化を図った。PCR 増幅断片を含む PCR 産物には、PCR プライマーおよび dNTPs (デオキシリボヌクレオチド三リン酸) が含まれているため、これらを Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって除去し、1/100量を Sequencing 反応に使用した。

Ⅴ. マイクロサテライトマーカー解析

NTE 遺伝子の3'flanking 領域に存在するマイクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行った。このマイクロサテライトは、塩基配列 (ATT) の繰り返し配列であり、日本人対象者集団151人とシックハウス症候群患者59人におけるタイピングの結果、7個の対立遺伝子が存在していた。このうち2個の対立遺伝子 (allele 3 および4) において患者集団において数を増やしている正の統計学的な有意差を示した (表1)。これら2個の対立遺伝子頻度に関する有意差検定の結果を Bonferroni の補正によって補正した結果、一方の対立遺伝子においてのみ統計学的有意差が得られた (表1、 $P_c=0.040$)。

Ⅵ. DNA 多型解析 — SNP 解析

DNA 多型の解析方法が確立された SNP について、その対立遺伝子頻度を求め遺伝的多型マーカーとしての有用性を検討した。患者群10名、対

表 1 Allele frequencies of ATT repeat polymorphism of the *NTE* gene in patients with Sick house syndrome and controls

Allele	PCR product length	Repeat	PATIENTS (2n = 118)	CONTROLS (2n = 302)	OR (90% CI)	²	P-value	P _c
Allele 1	286	10	0.17	0.18	0.94 (0.53 - 1.65)	0.05	0.822	1.000
Allele 2	292	12	0.07	0.06	1.22 (0.51 - 2.90)	0.20	0.654	1.000
Allele 3	295	13	0.13	0.06	2.44 (1.20 - 4.97)	6.05	0.014	0.084
Allele 4	298	14	0.14	0.06	2.63 (1.31 - 5.28)	7.37	0.007	0.040
Allele 5	301	15	0.34	0.42	0.70 (0.45 - 1.09)	2.55	0.111	0.664
Allele 6	304	16	0.16	0.17	0.92 (0.52 - 1.64)	0.08	0.784	1.000
Allele 7	307	17	0.00	0.06	-	-	-	-

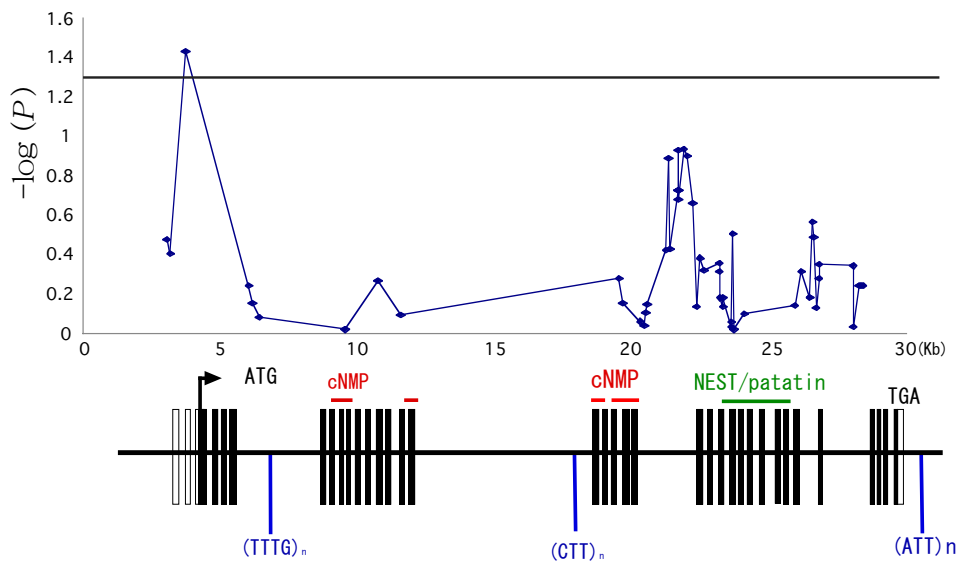


図 1 *NTE* 遺伝子構造と SNPs マーカーを用いたシックハウス症候群感受性領域のマッピング

照群10名について、*NTE* 遺伝子内に検出された遺伝的多型箇所のうちランダムに SNP を選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、SNP81箇所中66箇所において多型性が確認された。さらに、多型が確認されたこれらの SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が0.2以上の SNP、55箇所で同定した。

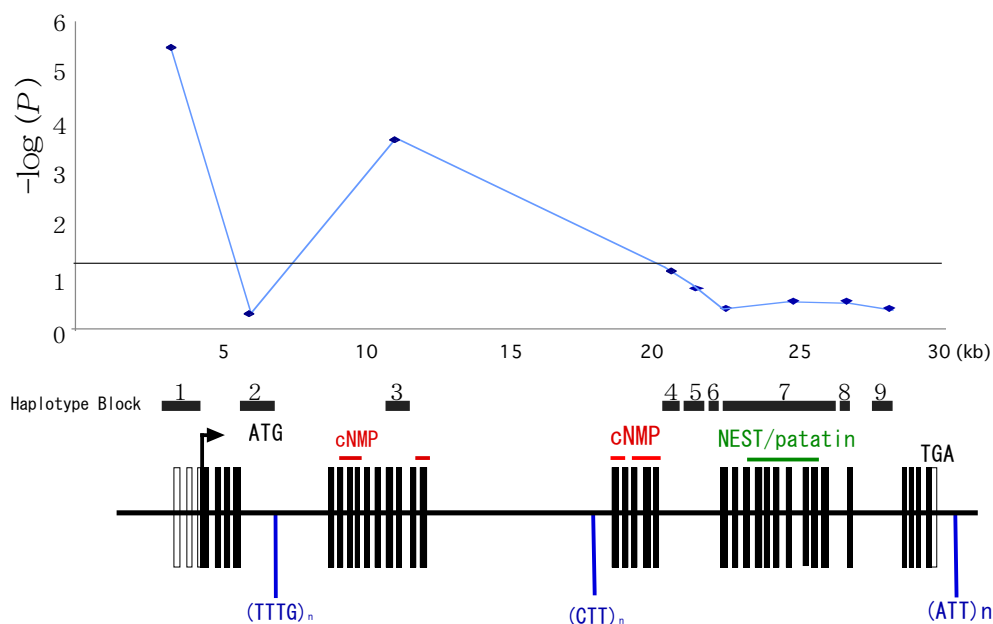
VII. 相関解析

上記において遺伝マーカーとしての有用性を確

認された55個の SNP のうち53個の SNP およびエクソン9における SNP について、シックハウス症候群患者集団において特異的な対立遺伝子を解析するために、シックハウス症候群集団60名および健常者集団152名を用いた相関解析を行った。その結果、エクソン2における非翻訳領域に存在する遺伝マーカー (rs604959) において、統計学的有意差を示す対立遺伝子が見出された (図1、 $P=0.037$)。同様に、遺伝子型頻度についても有意差検定を行った結果、上記の対立遺伝子頻度において有意差の得られた遺伝マーカーに加えて、プロモーター領域 (rs560849)、イントロン1領

表2 Genotype association between SNPs in the *NTE* gene and Sick house syndrome

No.	rs No.	Location	Genotype	Genotype frequency		OR (90% CI)	²	P-value	Pc-value
				Patients (n = 60)	Controls (n = 152)				
1	rs560849	Promoter	C/C	0.305	0.151	2.46(1.23 - 4.94)	6.419	0.011	0.068
			C/T	0.390	0.592	0.44(0.24 - 0.81)	6.991	0.008	0.049
			T/T	0.305	0.257	1.27(0.66 - 2.47)	0.507	0.476	1.000
2	rs540516	intron 1	C/C	0.390	0.375	1.06(0.57 - 1.97)	0.040	0.842	1.000
			C/T	0.407	0.526	0.62(0.34 - 1.13)	2.430	0.119	0.714
			T/T	0.203	0.099	2.33(1.04 - 5.25)	4.176	0.041	0.246
3	rs604959	exon 2	A/A	0.317	0.375	0.77(0.41 - 1.46)	0.637	0.425	1.000
			A/C	0.417	0.520	0.66(0.36 - 1.21)	1.829	0.176	1.000
			C/C	0.267	0.105	3.09(1.46 - 6.53)	8.744	0.003	0.019

図2 *NTE* 遺伝子構造とハプロタイプブロックにおけるシックハウス症候群感受性領域のマッピング

域 (rs540516) において統計学的有意差を示す遺伝子型が見出された (表2)。これら3個の遺伝マーカーの遺伝子型頻度に関する有意差検定の結果を Bonferroni の補正によって補正した結果、エクソン2における遺伝マーカー (rs604959) においてのみ統計学的有意差が得られた (表2、 $P=0.019$)。

VIII. ハプロタイプ解析

上記の遺伝学的相関解析に使用した53個の遺伝マーカー間の連鎖不平衡値 D' を解析ソフトウェア「Haploview」によって算出し、 $D' > 0.94$ を満たすハプロタイプを推定した。その結果、53個の遺伝マーカーは9個のハプロタイプブロックに分けられた (図2)。9個のハプロタイプブロック

表3 Haplotype association between SNPs in the NTE gene and Sick house syndrome

Block	No.	Haplotype	Haplotype frequency		²	P-value	P _c -value
			Patients (2n = 120)	Controls (2n = 304)			
2-3							
1	1	CA	0.508	0.639	6.12	0.013	0.080
	2	TC	0.392	0.357	0.43	0.512	1.000
	3	CC	0.083	0.003	21.53	0.000003	0.000021
4-5-6							
2	1	GCT	0.483	0.500	0.098	0.755	1.000
	2	ATC	0.424	0.388	0.449	0.503	1.000
	3	GCC	0.093	0.102	0.073	0.788	1.000
7-8							
3	1	CC	0.534	0.562	0.281	0.596	1.000
	2	GT	0.398	0.434	0.448	0.503	1.000
	3	CT	0.059	0.003	14.308	0.0002	0.004
10-13							
4	1	AGGA	0.450	0.411	0.529	0.467	1.000
	2	GGCG	0.358	0.372	0.066	0.797	1.000
	3	AAGA	0.133	0.197	2.398	0.122	1.000
	4	GGGA	0.042	0.013	3.357	0.067	1.000
14-25							
5	1	TCCAGAGTCCG	0.431	0.354	2.154	0.142	1.000
	2	CTGGCTCGAGA	0.226	0.242	0.121	0.728	1.000
	3	TTCGCTCGAGA	0.108	0.146	1.027	0.311	1.000
	4	CTCGCTCGAGA	0.112	0.087	0.609	0.435	1.000
	5	TTGGCTCGAGA	0.020	0.044	1.393	0.238	1.000
	6	TTCAGAGTCCG	0.034	0.017	1.206	0.272	1.000
26-27							
6	1	GC	0.491	0.446	0.693	0.405	1.000
	2	GT	0.259	0.284	0.264	0.608	1.000
	3	TT	0.250	0.270	0.176	0.675	1.000
28-43							
7	1	GGCCACCCAAAAGCT	0.396	0.389	0.021	0.885	1.000
	2	ACTTGGGTGAAGATC	0.198	0.245	1.063	0.303	1.000
	3	AGTCACCCACGGATC	0.203	0.232	0.407	0.524	1.000
	4	GGTCACCCACGGATC	0.041	0.027	0.602	0.438	1.000
	5	ACTTGGGTGAAGATC	0.017	0.013	0.081	0.776	1.000
44-46							
8	1	GTC	0.559	0.579	0.134	0.715	1.000
	2	ACA	0.415	0.391	0.201	0.654	1.000
	3	ATC	0.009	0.023	0.964	0.326	1.000
47-52							
9	1	TGCCTT	0.448	0.408	0.562	0.453	1.000
	2	CGTTCC	0.293	0.319	0.264	0.607	1.000
	3	CATTCC	0.259	0.263	0.009	0.925	1.000

それぞれについて、ハプロタイプ頻度を推定し、有意差検定を行った。その結果、ハプロタイプブロック1および3において、統計学有意差が示された(図2、表3)。ハプロタイプブロック1においては、遺伝子型頻度についての有意差検定において相関の得られたイントロン1(rs540516)およびエクソン2(rs604959)が含まれているが、イントロン1(rs540516)およびエクソン2(rs604959)における2個の遺伝マーカーについてハプロタイプの推定を行った結果、3個のハプロタイプ(TA、TC、CC)が推定された。これらのハプロタイプ頻度について患者群および健常者群において有意差検定を行った結果、ハプロタイプCCにおいて統計学的有意差が見られた($P=0.000003$ 、表3)。

IX. まとめ

ヒト *NTE* 遺伝子領域において合計53個の遺伝マーカーに関して、シックハウス症候群患者集団および健常者集団における対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度さらにハプロタイプ頻度に関する有意差検定を行った。

一般に *NTE* タンパク質は、生体内において有機リンと結合し、エステルを生成する。このエステルは有毒であるが、炭化水素基を解離しエステラーゼ活性を有する「Aged Esterase」に変化し、次なるエステル化反応を行う。シックハウス症候群患者においては、この有機リン代謝経路の中間生成物である有毒なエステルの生成量が健常者に

比べて変動し、慢性的な神経毒性が表われる可能性があることも考えられるが、まだまだ推測の域をでない。

我々はこれまでにパラオキシナーゼ遺伝子(*PONI*)、グルタチオンSトランスフェラーゼP(*GSTP1*)遺伝子、チトクローム1A1(*CYP1A1*)遺伝子について、遺伝子多型とシックハウス症候群との関連を調べてきたが、*GSTP1*については、有意差が認められたものの、*PONI*、*CYP1A1*については、今のところ有意な結果は得られていない。今回、*NTE* 遺伝子については2つのアプローチから、疾患候補遺伝子に値する結果が得られた。

今後、この遺伝子の転写レベル、翻訳レベルでの遺伝子発現量、あるいは酵素活性量との関連を調べていくことにより、シックハウス症候群発症の病因学あるいは発症の分子メカニズムに迫ることができるものと考えている。

文献

- 1) Winrow CJ, et al: Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. *Nature genetics* 33: 477-485, 2003
- 2) Glynn P. *NTE*: One target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms? *Bioessays* 25: 742-745, 2003
- 3) Barrett JC, et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-265, 2005