

食の嗜好性と遺伝子の関係について～第一報～

市丸雄平* 高田倫子* 長田直樹*.*2 阿部誠*.*3

Relationship between food palatability and SNP Typing

Ichimaru, Yuhei Takata, Michiko

Nagata, Naoki Abe, Makoto

キーワード：食の嗜好性 ASP – PCR SNP Typing

Key words : food palatability, ASP – PCR, SNP Typing

I. 緒言

1. はじめに

1990年に開始されたヒトゲノム計画の結果、2003年4月にはヒトの全ゲノムが解読され、全ての塩基配列(約30億塩基)が明らかにされた。さらに、2004年10月にはヒトゲノムの99%を100,000塩基に1つのエラー率で解析した信頼性の高い遺伝子配列が報告され¹⁾、ゲノム研究は単一遺伝子疾患の原因遺伝子の解明から生活習慣病をはじめとする多因子病の疾患感受性遺伝子や薬物応答性に関する遺伝子の網羅的遺伝子多型解析へ移りつつある。

遺伝情報はDNAの塩基配列、つまりアデニン(A)・グアニン(G)・シトシン(C)・チミン(T)の4種類の塩基の並び方によって決定されている。この遺伝情報の中に個人によって異なっている部分があるが、この個人の塩基配列の違いを「遺伝子多型(polymorphism)」とよび、人口中1%以上の頻度で存在しているものと定義されている。この「遺伝子多型」にはいくつ種類があり、遺伝子上のマーカースとして使用されてきた。この中で、現在注目されているヒト多型マーカースはSNP(Single nucleotide polymorphism)であり、1個の塩基が他の塩基に置き換わっている。SNPは数百塩基に1つ

の割合でゲノム中にあり、もっとも高密度に遺伝子上に存在する。そのため、疾患との関連がより見つけやすくなり、また、結果を信号化することができるため情報処理が容易であるなど、臨床応用に貢献度の高い多型マーカースといえる。また、SNPは人種、個人により、遺伝子頻度が異なる場合が多いため、人種差、個人差を検出するための有効な遺伝子マーカースである²⁾。

前述のようにSNP解析研究が進むと、①疾患を起こす仕組みが分子レベルで解明される。②疾患の原因(エビデンス)を標的分子とした、新規診断法や治療法、治療薬が開発される。③医療の個別化(オーダーメイド化)が可能となる。④疾患易罹性のリスク判定が可能となり、疾患の予防、発症の遅延、早期発見、早期治療が可能となる。

II. 目的

近年、SNP Typingの技術向上によって、個人の遺伝子型の選別が容易になり、代謝酵素欠損者などのスクリーニングが可能となってきた。CYP2C9やCYP2C19に代表される薬物代謝酵素のSNPがその一例である。

本研究では、SNPによる代謝酵素欠損により生じた未代謝物質の蓄積が、生体にどのような影響を及ぼすかを知るため、臨床医学的に代謝能が解明されている遺伝子多型を用いて、生化学臨床検査値との関連性を検討することを目的とした。

* 東京家政大学生生活科学研究所

* 2 JST

* 3 Ambion

III. 対象

2006 年度東京家政大学家政学部管理栄養士専攻 4 学年の健康女性 141 名を対象とした。年齢・身長・体重・BMI の平均値は、それぞれ 21.7±2.9 歳、158.7±5.2cm、51.4±7.1kg、20.4±2.4kg/m² である。対象者には、口頭また文書にて研究に関する説明を行い、同意を得た。

IV. 方法

1. ヒト DNA 回収

1-1 器具・試薬

DNA サンプルは、市販の歯間ブラシ（経験上、効率よく DNA が採取できるため）を用いてヒト口腔粘膜細胞より採取した。

試薬（1 人分）は、PBS1000 μ l \times 2、Lysis Buffer200 μ l、プロテナーゼ k1 μ l、Saturated NaCl 55 μ l、100%エタノール 1000 μ l、70%エタノール 500 μ l、TE50 μ l である。

1-2 手順

DNA 回収の手順を表 1 に示す。

2. 生化学臨床検査

生化学臨床検査は、財団法人愛世会愛誠病院に依頼し、対象者には検査値を本研究に用いることの同意を得た。

3. SNP Typing 方法

3-1 手順

SNP Typing は目的とする遺伝子を ASP-PCR 反応によって増幅した後、ポリアクリルアミド電気泳動によって確認した。今回は、マーカーとなる SNP を CYP2C9*3・CYP2C19*2・GST・ALDH2 の 4 種類とし、CYP2C9*3・CYP2C19*2・GST については PCR SNP Typing Kit Cytochrome P450 (TOYOBO CO.LTD.) を使用し、ALDH2 は、独自に設計したプライマーを用いた。

* GST (Glutathione-S-transferase)

* ALDH2 (Aldehyde dehydrogenase2)

表 1 DNA 回収方法

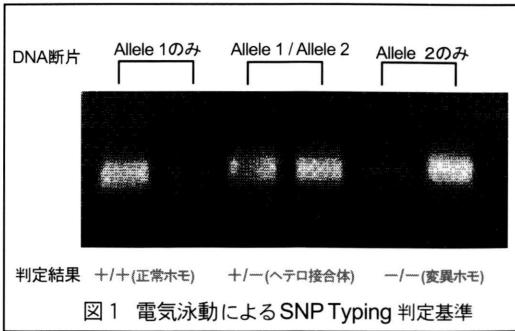
回収サンプル洗浄
↓ ← PBS 1000 μ l・4 $^{\circ}$ C 5000rpm 5min \times 2
沈殿物
↓ ← Lysis Buffer 200 μ l
↓ ← proteinaseK (20mg/ml) 1 μ l
55 $^{\circ}$ C、1h、incubate
↓ ← Saturated NaCl 55 μ l
転倒混和
↓
4 $^{\circ}$ C 15000rpm 30min
↓
上澄み
↓ ← 100% EtOH 1000 μ l
4 $^{\circ}$ C 15000rpm 30min
↓ ← 100% EtOH 除去
沈殿物
↓ ← 70% EtOH 500 μ
転倒混和
↓
4 $^{\circ}$ C 15000rpm 5min
↓
風乾
↓ ← TE 50 μ l
DNA 抽出

3-2 判定基準

ASP-PCR によって増幅した DNA を電気泳動によって確認する。判定基準は表 2・図 1 のとおりとする。

表 2 SNP Typing 判定基準

検出された増幅 DNA 断片	判定
Allele 1 のみ	+ / + 正常ホモ
Allele 1 / Allele 2	+ / - ヘテロ接合体
Allele 2 のみ	- / - 変異ホモ
何も検出されない	Non (PCR 反応が正常に行われていない)



4. アルコールの主観的感受性調査

対象者全員に、アルコール飲料を摂取すると体調が悪くなるか否かという主観的感受性調査を行った。アンケート用紙はマークシート方式とした。

5. 解析方法

生化学臨床検査とSNP Typing 判定結果との関連性を検討するため、相関関連解析 (Association study) を行った。また、今回の解析では、酵素活性の有無が明瞭である+ / +正常ホモ接合体と- / -変異ホモ接合体の両者についての比較検討を行った。+ / -のヘテロ接合体の場合、遺伝子型 (genotype) のみでは酵素の種類によって活性の有無あるいは強弱についての判定が不明瞭であるため。

V. 結果

1. 生化学臨床検査

対象者全体およびSNP Typing 別の生化学臨床検査結果の平均値 ± 標準偏差を示す (表3)。なお、今回は採血を実施した141名のうち132名を解析の対象とした。

対象者全体の生化学臨床検査結果は、各項目とも標準範囲内であった。また、SNP Typing 別では、CYP2C9*3・GSTの変異ホモ (- / -) は、対象者が2人と少ないため、他のSNP Typeと比較すると白血球数、単球 (%)、中性脂肪、Al-P、Ch-E、尿素窒素、不飽和鉄結合能

の平均値にばらつきがみられた。

2. SNP Typing 判定

SNP Typing 判定結果は、CYP2C9*3の正常ホモ接合体の割合が80% (112人)、変異ホモ接合体が1% (2人)であった。CYP2C19*2は、正常ホモ接合体が80% (112人)・変異ホモ接合体が8% (12人)、GSTは、それぞれ56% (79人)・1% (2人)であった。また、アルコール分解に関わるALDH2は、正常ホモ接合体が83% (117人)、酵素活性のない変異ホモ接合体は6% (9人)であった (表4)。

3. 相関関連解析

生化学臨床検査値とSNP Typing 判定との相関関連解析 (t検定、 $p < 0.05$) を行った結果、有意差が認められた検査項目を示す (表5)。CYP2C9*3、GSTについては、生化学臨床検査値と遺伝子型には有意な差は認められなかった。CYP2C19*2に関しては、遺伝子型がEM (Extensive Metabolizer) とPM (Poor Metabolizer) では生化学臨床検査項目の好塩基球について、統計学的に有意な差が認められた ($p = 0.041$)。また、ALDH2では総コレステロール、HDLコレステロール、リン脂質について、それぞれ統計学的に有意な差が認められた ($p = 0.029, 0.012$ and 0.022)。

VI. 考察

今回、ASP-PCR法を用いてSNP Typingを行い、各血液検査項目との関連性を検討し、CYP2C19*2と好塩基球、ALDH2と総コレステロール、HDLコレステロール、リン脂質の正常ホモ接合体、変異ホモ接合体について統計学的に有意な差が認められた。

CYP2C19*2は臨床的に代謝能が確認されている分子種で第10染色体に存在し、抗てんかん薬メフェニトインS体の代謝を行う酵素である。S-メフェニトイン4'水酸化活性をほと

んど示さないPM (Poor Metabolizer) と、活性が正常のEM (Extensive Metabolizer) の2群に分けられ、野生型ホモ接合体 (-/-)、ヘテロ接合体 (+/-) では、PMになる。

また、このPMの頻度には民族差があり、白人種では約3%であるが、日本人では18.0 - 22.5%と高頻度である³⁾⁴⁾。今回のSNP Typing判定結果については、PM頻度は16%であった。

CYP2C19*2 と好塩基球との関連性については、現在のところ報告はなく、今後の検討が期待される。好塩基球は、白血球中に0 ~ 2%に含まれる顆粒球であり、塩基性色素に染まる大型の細胞質顆粒を持ち、ヒスタミンやヘパリンを含む。機能としては、細胞内の肥満細胞と同じくIgEによって活性化されるとヒスタミンを放出し、即時型アレルギー反応を引き起こす。

ALDH2 と各臨床生化学検査値の関連性については、ALDH2 がPMである場合、HDL コレステロールの平均値は有意に低値である⁵⁾⁶⁾が、今回はHDL コレステロールの平均値は高値となった。また、これまでALDH2 と総コレステロール、リン脂質との関連性についての報告はない。

ALDH2 は、アルコールをアセトアルデヒドから酢酸に分解する酵素であり、この遺伝子多型はモンゴロイド系のみに見られ、日本人では4%がPM (Poor Metabolizer)である。また、このヘテロ接合体 (+/-) もEM (Extensive Metabolizer) の1/16の酵素活性しか示さず、その割合は40%である⁷⁾。今回のSNP Typing判定では、PM頻度は6%、ヘテロ接合体 (+/-) の割合は7%であり、ヘテロ接合体の割合は統計学上の数値と大きな差が見られた。

また、今回の研究では、アルコールの主観的感受性についてのアンケートも行い、SNP Typing判定との関連性についても検討したが、関連性は見られなかった (χ^2 検定、 $p < 0.05$ 、表6)。

これまで、数多くの遺伝子相関解析が行われ

てきたが、遺伝子型と表現型との関連が明らかにされたものは少ない⁷⁾。今回の結果からも、表現型(特異度)と遺伝子型(感度)とも高率を示すものは限られたものであり、症例数が少ないため生じる偽陽性や偽陰性なデータが得られる危険性が示唆された。つまりアルコール性障害などの多因子疾患では易罹病性遺伝子が相関解析により同定されても、その影響は限定されたものであり、その認識のもとデータを解析する必要があることが考えられる。

VII. 文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Nature. 2004; 431: 931-945
- 2) 中村裕輔「SNP 遺伝子多型の戦略〜ゲノムの多様性と21世紀のオーダーメイド医療〜」株式会社中山書店(2000年)
- 3) Takahisa FURUTA, et al: Influence of CYP2C19 Pharmacogenetic Polymorphism on Proton Pump Inhibitor-based Therapies: Drug Metab. Pharmacokinet. 2005; 20 (3): 153-167
- 4) 久保田隆廣、千葉寛、伊賀立二: CYP2C19, CYP2D6, およびCYP2C9の遺伝子多型と人種差: 薬物動態, Xenobio. Metabol. and Dispos.. 2001; 16 (2): 69-74
- 5) Shuichi TAKAGI, et al: The Aldehyde Dehydrogenase 2 Gene Is a Risk Factor for Hypertension in Japanese but Does Not Alter the Sensitivity Pressor Effects of Alcohol: The Suita Study. Hypertens Res. 2001; Vol. 24, No. 4: 365-370
- 6) Shuichi TAKAGI, et al: Aldehyde Dehydrogenase 2 Gene Is a Risk Factor for Myocardial Infarction in Japanese Men. Hypertens Res. 2002; Vol. 25, No. 5: 677-681
- 7) 原田勝二: アルコールおよびアルデヒド代謝の日本人における特徴 - 遺伝的素因を中心に - : 治療. 2005; Vol. 87, No. 8: 2312-2317

食の嗜好性と遺伝子の関係について～第二報～

表3 SNPTyping 別 生化学検査値

M±SD

検査項目	(単位)	全体 (n=132)	CYP2C9*3		CYP2C19*2		GST		ALDH2	
			++ (n=106)	-- (n=2)	++ (n=106)	-- (n=12)	++ (n=75)	-- (n=2)	++ (n=112)	-- (n=8)
白血球数	(μ l)	5940±1412	6021±1447	5400±1414	5978±1426	6375±1596	6196±1410	3650±778	6007±1460	5838±1121
赤血球数	($\times 10^4/\mu$ l)	446±29	445±29	434±1	445±30	451±23	449±30	428±26	446±27	453±33
ヘモグロビン	(g/dl)	13.0±1.0	13.1±1.0	11.6±2.3	13.1±0.9	13.4±0.6	13.0±1.2	12.6±1.2	13.1±1.0	13.2±1.3
ヘマトクリット	(%)	41.2±2.8	41.3±2.7	37.5±5.8	41.3±2.5	42.0±1.8	41.3±3.0	39.7±2.1	41.3±2.7	41.8±3.6
血小板	($\times 10^4/\mu$ l)	24.5±4.9	24.8±4.8	22.8±6.9	25.1±8.3	21.5±3.2	25.9±9.3	19.7±10.4	25.2±8.1	24.3±5.4
好中球	(%)	60.4±9.9	61.0±10.1	51.0±2.8	60.7±9.9	64.1±9.9	60.7±9.3	54.2±1.4	61.0±10.2	62.6±6.7
リンパ球	(%)	32.4±8.1	32.1±8.0	40.4±6.4	31.9±7.6	30.6±9.6	32.4±8.8	36.6±0.6	31.9±8.0	28.9±7.2
単球	(%)	4.6±1.4	4.5±1.3	6.2±2.8	4.6±1.3	4.4±1.9	4.6±1.3	6.1±0.8	4.7±1.4	4.4±1.1
好酸球	(%)	2.0±1.8	1.8±1.4	1.7±0.1	2.2±1.9	1.8±1.2	2.1±1.9	2.0±0.9	2.0±1.6	3.3±3.6
好塩基球	(%)	0.6±0.4	0.6±0.4	0.9±0.8	0.6±0.4	0.4±0.2	0.6±0.4	1.2±0.3	0.6±0.4	0.8±0.6
血清総タンパク	(g/dl)	7.5±0.4	7.5±0.4	7.5±0.1	7.5±0.4	7.5±0.3	7.5±0.4	7.7±0.4	7.5±0.4	7.5±0.4
A/G比		1.8±0.3	1.8±0.3	1.7±0.1	1.8±0.3	1.9±0.3	1.8±0.2	1.8±0.0	1.8±0.2	1.9±0.2
アルブミン	(g/dl)	4.8±0.4	4.8±0.4	4.7±0.2	4.8±0.4	4.9±0.2	4.8±0.2	5.0±0.2	4.8±0.2	4.9±0.3
α -1グロブリン	(%)	2.5±0.2	2.5±0.2	2.4±0.1	2.5±0.2	2.4±0.2	2.5±0.2	2.4±0.1	2.5±0.2	2.5±0.2
α -2グロブリン	(%)	7.1±0.8	7.0±0.8	6.5±0.3	7.0±0.7	6.9±0.6	7.0±0.8	7±0.6	7.1±0.8	6.8±0.5
β グロブリン	(%)	8.8±0.9	8.8±0.9	9.4±0.6	8.8±0.9	8.5±0.7	8.8±0.9	9.3±1.0	8.7±0.9	8.9±1.0
γ グロブリン	(%)	15.2±1.8	15.2±1.9	17.0±0.2	15.2±1.8	15.1±2.1	15.4±1.8	15.6±0.5	15.3±1.8	14.8±2.5
プレアルブミン	(mg/dl)	24.1±3.4	24.3±3.3	23.4±1.9	24.2±3.2	25.2±4.6	24.1±3.5	24.6±4.3	24.4±3.4	23.2±2.1
レチノール結合タンパク	(mg/dl)	2.6±0.5	2.6±0.5	2.6±0.4	2.6±0.5	2.7±0.6	2.6±0.5	2.5±0.6	2.6±0.5	2.4±0.3
総コレステロール	(mg/dl)	179.4±31.8	180.0±34.4	178.5±6.4	180.7±32.4	176.8±28.4	179.0±35.8	180±60.8	179.1±32.4	205.0±21.7
HDLコレステロール	(mg/dl)	72.0±13.1	71.6±13.7	86.5±4.9	71.5±14.7	75.3±14.5	71.5±15.4	72.5±17.7	71.2±14.4	84.8±15.3
中性脂肪	(mg/dl)	56.1±25.5	57.3±26.9	38.5±2.1	57.2±27.3	47.6±18.7	55.8±27.4	68.5±24.7	55.7±26.9	56.6±16.1
リン脂質	(mg/dl)	198.7±25.0	200.0±27.0	208.5±2.1	200.4±25.2	196.9±23.8	201.1±25.8	203.5±44.5	198.6±24.6	219.4±21.1
遊離脂肪酸	(mEq/l)	0.7±0.3	0.7±0.3	0.7±0.0	0.7±0.3	0.7±0.2	0.8±0.3	0.75±0.4	0.7±0.3	0.8±0.3
LCAT	(nmol/ml)	57.7±16.9	58.8±17.1	44.0±15.6	57.1±17.2	58.3±17.1	57.6±17.7	58.5±2.1	57.7±16.9	58.5±18.1
グルコース	(mg/dl)	85.4±5.1	85.2±5.3	89.5±4.9	85.3±5.2	87.1±7.6	85.9±5.3	83.5±7.8	85.5±5.1	87.8±8.6
AST	(IU/l/37℃)	17.2±4.3	17.1±4.0	18.5±3.5	17.5±4.6	17.3±4.1	17.7±4.9	15±1.4	17.1±3.8	19.1±9.4
ALT	(IU/l/37℃)	12.7±6.7	13.0±7.2	10.5±2.1	12.9±7.3	13.6±4.3	13.5±8.1	14±2.8	12.9±7.0	12.0±6.5
LDH	(IU/l/37℃)	175.7±33.2	174.2±29.1	188.5±47.4	175.7±35.4	177.3±21.2	178.4±37.5	178.5±24.7	173.5±25.6	205.3±77.5
総ビリルビン	(mg/dl)	0.7±0.3	0.7±0.3	0.4±0.1	0.7±0.3	0.7±0.2	0.7±0.3	0.6±0.1	0.7±0.3	0.7±0.2
Al-P	(IU/l/37℃)	176.7±47.4	177.2±49.4	238.0±43.8	175.9±48.0	185.4±48.2	182.1±49.8	147.5±19.1	174.5±46.3	195.6±54.8
γ -GTP	(IU/l/37℃)	14.2±5.3	14.6±5.8	12.5±2.1	14.3±5.7	15.8±4.2	14.5±5.2	21±2.8	14.4±5.5	15.6±7.1
Ch-E	(IU/l/37℃)	290.2±58.1	293.1±59.2	359.0±103.2	292.7±61.4	287.0±60.0	298.2±59.1	310±21.2	292.9±57.2	274.9±45.6
血清アミラーゼ	(IU/l/37℃)	83.0±23.9	81.7±24.0	79.0±15.6	83.4±24.9	89.1±18.8	83.4±23.9	77.5±19.1	82.4±22.4	93.5±28.3
尿酸	(mg/dl)	4.1±1.1	4.0±1.0	4.5±0.7	4.1±1.0	4.1±1.3	4.0±1.0	4.7±0.1	4.1±1.1	4.0±1.1
尿素窒素	(mg/dl)	11.6±2.5	11.6±2.5	13.0±0.0	11.6±2.5	11.5±2.2	11.5±2.7	9.5±0.7	11.6±2.6	11.5±2.3
クレアチニン	(mg/dl)	0.63±0.08	0.63±0.08	0.57±0.04	0.64±0.07	0.68±0.12	0.63±0.08	0.60±0.00	0.64±0.08	0.67±0.07
ナトリウム	(mEq/l)	138.1±16.1	136.3±22.2	139.5±0.7	137.5±18.6	140.9±1.5	136.5±21.2	141±0.0	139.0±12.0	140.6±1.4
塩素	(mEq/l)	101.1±3.8	101.5±5.6	101.0±0.0	101.4±5.6	101.8±1.3	101.3±4.8	101.5±2.1	100.8±1.8	100.6±1.7
カリウム	(mEq/l)	4.0±0.3	4.9±9.6	4.3±0.4	5.0±9.6	4.1±0.3	4.0±0.3	3.85±0.4	4.0±0.3	4.2±0.4
カルシウム	(mEq/l)	9.7±0.8	9.7±0.8	7.2±4.0	9.6±1.0	9.4±1.6	9.6±1.2	9.7±0.3	9.8±0.7	9.8±0.4
CRP	(mg/dl)	0.08±0.33	0.10±0.37	0.01±0.00	0.07±0.32	0.06±0.14	0.08±0.38	0.00±0.00	0.09±0.36	0.01±0.01
血清鉄	(μ g/dl)	89.7±45.2	87.1±44.2	47.0±39.6	89.2±45.9	101.9±44.3	89.3±45.5	81±14.1	89.2±44.0	117.5±50.8
総鉄結合能	(μ g/dl)	357.7±51.2	355.6±55.5	402.0±55.2	353.8±58.4	361.6±44.8	363.8±41.1	371.5±13.4	356.5±49.1	356.3±76.4
不飽和鉄結合能	(μ g/dl)	270.4±66.5	271.8±63.0	355.0±94.8	270.0±66.2	259.7±58.8	273.3±64.1	290.5±27.6	268.0±65.0	267.1±57.2

表4 SNP Typing 判定結果

人数 (%)

指標 \ 判定	+ / +	- / -	+ / -	Non	合計
CYP2C9*3	112(80)	2(1)	25(18)	2(1)	141
CYP2C19*2	112(80)	12(8)	12(8)	5(4)	141
GST	79(56)	2(1)	56(40)	4(3)	141
ALDH2	117(83)	9(6)	10(7)	5(4)	141

表5 生化学臨床検査値と遺伝子型との関連

genotype		n(%)	好塩基球 (%)	総コレステロール (mg/dl)	HDLコレステロール (mg/dl)	リン脂質 (mg/dl)
CYP2C19*2	++	106(80.3)	0.61 ± 32.4			
	--	12(9.1)	0.37 ± 0.20			
ALDH2	++	112(84.8)		179.1 ± 32.4	71.2 ± 14.4	198.6 ± 24.6
	--	8(6.1)		205.0 ± 21.7	84.8 ± 15.3	219.4 ± 21.1

* p = 0.041 ** p = 0.029 *** p = 0.012 **** p = 0.022

表6 アルコール代謝感受性と遺伝子型との関連

	アルコール代謝の感受性		合計
	良好	不良	
ALDH2 ++ 度数	82	16	98
-- 度数	7	1	8
合計 度数	89	17	106