

遺伝子診断の教材化

～ALDH2（アルデヒド脱水素酵素2）遺伝子におけるSNP（一塩基多型）タイピング～

Development of a teaching material for genetic diagnosis

—Single nucleotide polymorphism genotyping for ALDH2 gene—

伊左治錦司*・松本省吾**

Kinji ISAJI*・Shogo MATSUMOTO**

要 旨

DNA解析研究の進歩とともに将来が期待される遺伝子診断の分野を高校生に正しく理解させるために、遺伝子診断実験の教材化の検討を行った。検出する遺伝子はアルデヒドデヒドロゲナーゼ2（ALDH2）遺伝子のSNPとし、1. アリル特異的PCR法、2. PCR-RFLP法、3. LAMP法を応用した方法の3つの方法を検討した。1および2の方法は実験時間の長さや実験機材の点から、高校現場への適用には工夫が必要であると考えられた。一般的な高校の実験室での実施を目指した3の方法では、判定の正確性に問題が残ったが、どの方法も有意義な教材になりうることが示唆された。

キーワード：遺伝子診断実験, ALDH2, SNP, PCR法, PCR-RFLP法, LAMP法, 高校生物教材

I. はじめに

2003年のヒトゲノム解読完了の発表が世間に一大センセーションを巻き起こしたことは記憶に新しいが、このことは一般の人々の遺伝子研究およびその応用技術への期待の高さを示していると言える。遺伝子解析研究は医療や法医学、考古学、農学など様々な分野で行われ、実用的な応用技術が次々と開発されている。特に近年よく耳にし一般の人々の期待も高まっているのが遺伝子診断の分野である。遺伝子診断は遺伝子レベルでの遺伝病の確定診断はもとより、薬物代謝関連遺伝子や体質に関わる様々な遺伝子の多型を検出することで患者個々のレベルでの治療指針の策定を可能とする、すなわちオーダーメイド医療の到来をも予期している。遺伝子診断は近い将来、医療現場を根本から変えるかもしれないと言われている技術である。

一方、個々人の遺伝子解析は病気の治療や発症の阻止につながるメリットばかりではなく、遺伝子診断により現在の治療技術では直すことのできない難病に罹る可能性が示されたり、体質次第では治療方針が八方ふさがりになることもありうる。また、個々の遺伝子情報が悪用されるおそれがないともいえない。医療の世界ではインフォームドコンセントの重要性が叫ばれて久しいが、遺伝子診断のような両刃の剣ともなりうる新技術に対してこそ十分なされなくてはならない。新しい技術を正しく発達させていくのは、この場合、説明責任を負う医師だけではなく、実際に判断や同意をすることになる患者の側もまたその役割を担う。その正しい選択のために、あるいは新技術の正しい発展のためにも、高等学校教育の場で遺伝子診断を正しく理解させる機会、すなわち実際に遺伝子診断実験を体験することは大変有意義なことだと考える。

遺伝子診断実験を教材化する場合、いくつかの問題が生じる。まず第一に、どの遺伝子をターゲッ

* 岐阜大学大学院教育学研究科（東濃高校教諭）Graduate School Pedagogy Graduate Course

**岐阜大学教育学部 Department of Biology

トにするかということである。教育の場で行う実験であるから、病気に直結するような遺伝子は望ましくない。また、現時点では機能不明な遺伝子をターゲットとする遺伝子解析は、結果から具体的なことが示されないので興味がそがれる。第二に、遺伝情報は「究極の個人情報」とも言われるように、その取り扱いには慎重を期さねばならないことがある。特に生徒自身が被験者となる場合は細心の注意が必要となる。第三に安全性の問題がある。実験操作自体に危険はないか、DNAの採取は安全に行えるかなどを考慮しなくてはならない。以上のような問題を考慮して、本研究ではアルコール代謝関連遺伝子であるALDH2遺伝子の多型を、自分自身の口腔粘膜細胞から抽出したDNAを用いて調べることを目標とした。

飲酒後エタノールが代謝されてできるアセトアルデヒドを酸化し代謝する酵素であるALDH2 (aldehyde dehydrogenase 2) には遺伝的多型がある。ALDH2の対立遺伝子はALDH2*1 (活性型) とALDH2*2 (不活性型) の2つがあるが、ALDH2 活性の欠損はALDH2遺伝子の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) によるもので、不活性型の場合ALDH2遺伝子の第12エクソンの104番目の塩基がG (グアニン) からA (アデニン) へ変異をおこし、指定される487番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンに変化している¹⁾。遺伝子型によってALDH2は活性のあるタイプ (遺伝子型がALDH2*1/*1) と活性の低いもしくはないタイプ (ALDH2*1/*2およびALDH2*2/*2) に分けられる。遺伝子型が活性型ホモ接合体 (ALDH2*1/*1) の人では、飲酒後、血中アルコール濃度が高くなるにつれてアルコール代謝は早くなるが、ヘテロ接合体 (ALDH2*1/*2) や不活性型ホモ接合体 (ALDH2*2/*2) の人では、アセトアルデヒドの代謝が遅れて、その血中濃度が上昇し、顔面紅潮や不快症状 (フラッシング反応) が出現し、代謝速度は活性型ホモ接合体の人より遅くなる。特に不活性型ホモ接合体 (ALDH2*2/*2) の人は、アセトアルデヒドの代謝速度がヘテロ接合体の人より明らかに遅く、不快症状も激しくなる傾向があることがわかっている¹⁾。したがってALDH2に関してどの遺伝子型を持っているかを調べることで、酒に強いかわるか、非常に弱いかわかを判断することができる (活性型ホモ接合体はいわゆるお酒が飲めるタイプ、ヘテロ接合体はすぐに顔に出るが比較的飲めるタイプ、不活性型ホモ接合体はすぐに顔に出てほとんど飲めないタイプといえる)。自分がどのタイプに属するかはアルコールパッチテスト (エタノールをしみこませたパッチテープを皮膚に貼り、7分後にはがし皮膚の色を見る。直ちに赤くなる場合は、不活性型ホモ接合体、10分後に赤くなっていく場合はヘテロ接合体、変化が見られない場合は活性型ホモ接合体と判定できる検査、正確性は95%を越える) で簡単に知ることができるので、決して特別な診断ではない。また、未成年者である高校生にとって、遺伝子診断の結果がすぐに役に立つものではないが、将来、急性アルコール中毒やアルコールに関連する病気を未然に防ぐために自ら飲酒量を制限するのに役立つと考える。

実験は不特定の他人由来のDNA試料を用いることも考えられるが、実験に対する興味関心をより強く喚起できると期待される自分自身のDNAを用いることとした。個人情報の保護という点を重視するならば、不特定他者の検体が望ましいことは言うまでもない。しかしながら、自分自身の検体を扱うが故に、実験の過程においても個人情報保護の重要性をより強く認識することになり、情報の取り扱いの重要性についての教育的効果も期待できる。なおDNA採取は簡便さと安全性に配慮して口腔粘膜細胞から行うこととした。

SNPの検出法としては様々な方法が開発されているが、比較的方法が簡便な3つの方法について教材化の可能性を検討してみたこととした。このうち2つは最近の教科書や資料集などでも紹介されることが多くなってきたPCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) 法を応用したもので、残りの1つは栄研化学株式会社が開発した全く新しい遺伝子増幅法であるLAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法²⁾を応用したものである。このうち、LAMP法では、増幅の原理こそ難解であるものの、増幅反応が等温条件下で進むことおよび増幅産物が極端に多いのでその検出がピロリン酸マグネシウムによる白濁の視認によって行える³⁾という特徴があることを生かし、

高等学校の実験室でも行える実験にすることを目標として検討を行った。

II. アリル特異的プライマーによるPCR法を用いたSNPの検出（方法1）

1. 原理

PCR法でプライマーを設計するときの注意事項の1つに、プライマーの3'末端の塩基配列が正確でなくてはならないというものがある。PCR法は遺伝子を増幅するだけでなく変異の導入や制限酵素切断部位の導入に使われることがあることからわかるように、プライマーの塩基配列は100%鋳型のDNAと一致していなくても、条件次第で増幅反応が起こる可能性がある。しかし、DNA合成の基点となるプライマーの3'末端が1塩基でも異なると*Taq*DNAポリメラーゼはDNA合成を開始しない。このことを応用し、PCRで用いられる2つのプライマーのうち、一方のプライマーにおいてその3'末端にSNPの1塩基がくるように設計することで、活性型アリルと不活性型アリルを区別することができる。

なお、この方法はALDH2遺伝子型決定方法としては最もポピュラーな方法であり、ニッポンジーン社のDNA抽出キット「ISOHAIR」の実験例としてwebページにも紹介されている。⁴⁾

2. 材料と方法

(1) DNAの抽出

DNAは以下に示す方法で被験者の口腔粘膜細胞より抽出した。

まず、清潔な綿棒を用いて口腔粘膜を15秒ほど擦り取り、これをPBS（リン酸緩衝化生理食塩水）を300 μ l 入れた1.5mlマイクロチューブ内に懸濁し、10000rpmで5分間遠心し、マイクロペッターで上澄みを取り除いた（沈殿は肉眼で確認できる）。

次に、この沈殿を試料として、ニッポンジーン社のDNA抽出キット「ISOHAIR」を用いてDNAを抽出した。ISOHAIRは、髪の毛からのDNA抽出を目的としたキットであるが、口腔粘膜細胞からでもDNAを抽出することができる。なおISOHAIRによるDNA抽出のプロトコルは以下の通りである。

試料

←Extraction Bufferを200 μ l, Enzyme Solution 5 μ l, Lysis Solution 8 μ lを加え混合する。

（指で軽くはじく）。

インキュベート（55℃, 20分間）する。

←Enzyme Solution 5 μ lを再び加える。

インキュベート（55℃, 10分間）する。

←フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)200 μ lを加える。

転倒混和後、5分間静置する。

遠心分離（15,000rpm, 室温, 5分間）後、水層を別の1.5ml μ チューブに移す。

水相（約200 μ l）

←3M Sodium Acetate (pH5.2) 20 μ lを加える。

←Ethachinmate 2 μ lを加え混合する。

←99%エタノール400 μ lを加える。

↓ 遠心分離（15,000rpm, 室温, 15分間）後、上澄みを除く。

沈殿

↓ 70%エタノール800 μ lで洗浄後、5分間減圧乾燥する。

↓ ←TE Buffer(pH8.0)20 μ l を加え、沈殿を溶かす。

↓ DNA溶液

得られたDNA溶液は紫外線分光光度計を用いて濃度測定を行い、DNA濃度が20ng/ μ lになるようにTEバッファー（10mM Tris-HCl 1mM EDTA）で希釈しDNA試料とした。

(2) PCR反応

①プライマー

プライマーはニッポンジーンのwebページにあるISOHAIR実験例「アルデヒドデヒドロゲナーゼ2遺伝子の遺伝子型決定」プロトコルに記載されていた3種類のプライマーを用いた。このプライマーは、SNPsの存在するALDH2遺伝子のエクソン12領域全体を増幅するもので、プライマー F (Foward) の塩基配列は5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3'であり、活性型アリルを増幅するプライマー RN (Reverse Normal) の塩基配列は5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTC-3'で、不活性型アリルを増幅するプライマー RM (Reverse Mutant) の塩基配列は5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTT-3'である。プライマー RNとプライマー RMはそれぞれの塩基配列の3'末端の一塩基（下線で示した）が、SNPに相当する。

②PCR反応

得られたDNA試料5 μ lに 10×PCR Buffer (Applied Biosystems) 5 μ l, dNTPs mixture (2mM each) 5 μ l, プライマーF (20pmol/ μ l) 1 μ l, プライマー RNまたはプライマー RM (20 pmol/ μ l) 1 μ l, AmpliTaq DNA Polymerase (5unit/ μ l) 0.5 μ l, 滅菌蒸留水32.5 μ lを加え、反応液全量を50 μ lとした。反応サイクルは、予備加熱95°C3分の後、変性95°C20秒、アニーリング X°C20秒、伸長反応72°C30秒のサイクルを30~40サイクルの範囲で行い、最後に72°C 7分で伸長反応を完成させた後、4°Cに保った。アニーリング温度 (X) に関しては、50°C~62°Cの範囲で試してみた。サーマルサイクラーはPERKIN ELMER社のGeneAmpPCR System 2400を用いた。

(3) 増幅産物の確認

増幅産物10 μ lをBPB 3 μ lと混合し、3%アガロースゲルにより100Vで約30分電気泳動を行った。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線トランスイルミネーター上で観察した。

3. 結果

様々な条件で検討を行ったが、アニーリング温度は62°C以上では増幅効率が低く、58°C以下の場合には不正な増幅（プライマーダイマーの形成など）が多く見られ、反応回数は35サイクルでは増幅効率が低く、40サイクルでは38サイクルの場合と大差なかったのでアニーリング温度は60°C付近が、反応回数は38サイクル前後が適当であると判断した。

図1は、アニーリング温度を60°C、反応回数を38サイクルに設定し、3人分のサンプルの増幅を行ったものの電気泳動写真である。被験者Aは活性型ホモ接合体、被験者Bは不活性型ホモ接合体、被験者Cはヘテロ接合体と判定した。レーン③でもわずかにバンドが認められるが、被験者Aはその他の方法（PCR-RFLP法、LAMP法、アルコールパッチテスト）でもすべて活性型ホモ接合体と判定されたので、レーン③程度の極薄いバンドの場合は、増幅なしと判断して良いと考えた。

なお、同じ試料を用いても、増幅が全く見られない場合とわずかに見られる場合があり、不正な増

幅（電気泳動像がスメアリングするなど）が見られることもあった。また、図1には見られないが、プライマーダイマー由来と考えられるバンドが観察されることもまれにあった。

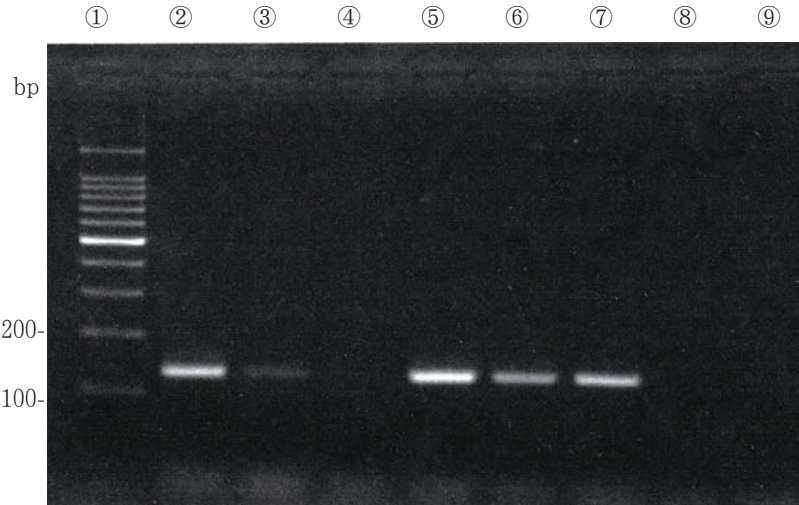


図1 PCR結果の電気泳動像。レーン①はサイズマーカー、レーン②、③が被験者A、レーン④、⑤が被験者B、レーン⑥、⑦が被験者Cレーン、⑧および⑨がネガティブコントロール（DNAを加えていない）である。また、レーン②④⑥⑧は活性型アリル増幅用プライマーを、レーン③⑤⑦⑨は不活性型アリル増幅用プライマーをそれぞれ用いたものである。

4. 考察

PCR法を用いて、ALDH2遺伝子のSNPタイピングをすることができた。しかし、プライマーの3'末端がミスマッチであっても増幅が見られたり、不正な増幅が生じるなど、実験の再現性にやや問題が残った。原因として試薬の攪拌が足りなかったりピペッティングによるコンタミネーションなど実験操作の乱雑なことが考えられるが、詳細は不明である。本法はプライマーの3'末端にSNPの一塩基を認識させる方法であることから、実験操作に十分熟練した実験者が操作を行わないと、判定ミスが生じることが危惧された。

III. PCR-RFLP法を用いたSNPの検出（方法2）

1. 原理

塩基配列に変異が起こっている部位が制限酵素認識部位となる場合、制限酵素により切断したDNA断片の長さが遺伝子型により変わってくることを利用した検出法である。本実験の場合、ALDH2遺伝子のSNPをふくむ部位は活性型アリルの場合は制限酵素Eco57Iにより認識され切断される（Eco57Iの認識配列を図2に示した。矢印が切断部位、下線部がSNPに相当する）が、不活性型の場合は切断されないで、酵素処理後のサンプルを電気泳動すればSNPタイピングを行うことができる。RFLPはrestriction fragment length polymorphism：制限酵素切断片長多型の略である。

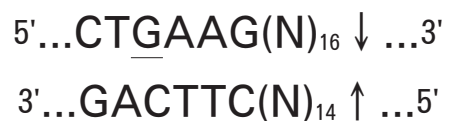


図2 Eco57Iの認識配列と切断部位

2. 材料と方法

(1) DNAの抽出

PCR法の場合と同様に、口腔粘膜細胞をニッポンジーンのDNA抽出キット、ISOHAIRを用いて抽出したものを試料とした。DNA濃度は20ng/ μ lに希釈した。

(2) PCR反応

①プライマー

Genbank AF164120を参考にALDH2のエクソン12を含む周辺領域を増幅するプライマーを設計した。プライマー F (Forward) の塩基配列は5'-GAGCCCAGTCACCCTTTG-3'であり、プライマー R (Reverse) の塩基配列は5'-CCCAACAGACCCCAATCC-3'である。なお、プライマーの認識部位および制限酵素の認識部位と切断部位、予想される増幅断片長を図3に示した。

ORIGIN

```

1 aaattacagg gtcaactgct atgatgtgtt tggagcccag tcaccctttg gtggctacaa
61 gatgtcgggg agtggccggg agttgggcga gtacgggctg caggcataca ctgaagttaa
121 aactgtgagt gtgggacctg ctgggggctc agggcctgtt ggggcttgag ggtctgctgg
181 tggctcggag cctgctgggg gattgggggc tgttgggggc tcggggcctg ccagggttca
//

```

図3 プライマーの認識部位および制限酵素Eco57Iの認識部位

10～124までがALDH2のエクソン12領域。

実線のアンダーラインがプライマーの認識部位。波線のアンダーラインが制限酵素の認識部位。赤色矢印が制限酵素切断部位。ただし、図に示されていない相補鎖では3'末端方向に2塩基ずれる。

予想される増幅断片長は活性型アリのルの場合、33～130までの98bpと133～217までの85bp、不活性型アリのルの場合33～217までの185bp。

②PCR反応

得られたDNA試料5 μ lに PCR Buffer (Applied Biosystems) 5 μ l, dNTPs mixture (2mM each) 5 μ l, プライマー F (20pmol/ μ l) 1 μ l, プライマー R (20pmol/ μ l) 1 μ l, AmpliTaq DNA Polymerase (5unit/ μ l) 0.5 μ l, 滅菌蒸留水32.5 μ lを加え、反応液全量を50 μ lとした。反応サイクルは、予備加熱95°C3分の後、変性95°C30秒、アニーリング50°C30秒、伸長反応72°C45秒のサイクルを40サイクル行い、最後に72°C 7分で伸長反応を完成させた後、4°Cに保った。サーマルサイクラーはPERKIN ELMER社のGeneAmp PCR System 2400を用いた。

③酵素切断処理

PCR 反応後の増幅産物 18 μ lに 10 \times BufferG (Fermentas)2 μ l, 0.5mM SAM (S-adenosylmethionine) 0.4 μ l, Eco57I (5unit/ μ l, Fermentas) 1 μ lを加え全量を21.4 μ lの反応液とし、37°Cで2時間インキュベートした。

(3) 増幅産物の確認

増幅産物10 μ lをBPB 3 μ lと混合し3%アガロースゲルにより100Vで約30分間、または6%ポリアクリルアミドゲルにより80Vで約1時間30分間の電気泳動を行った。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線トランスイルミネーター上で観察した。

3. 結果

6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行ったところ、各遺伝子型を明瞭に区別することができた(図4)。被験者A(レーン②)では、100bp以下の部分に2本のバンドが明瞭に見られるが、これは活性型アリルが制限酵素により切断されたものであると考えられる(上段が98bp、下段が85bpに相当すると考えられる)。200bp付近にわずかにバンドが観察されるが、これは制限酵素により消化しきれなかった増幅断片であろうと考えられる。この結果から被験者Aは活性型ホモと判定することができた。被験者B(レーン③)では、レーン②でも見られる制限酵素切断後の断片の他に200bp付近にも明瞭なバンドが観察される。これは、制限酵素による切断を受けなかった増幅断片、すなわち不活性型アリル(185bpに相当する)であると考えられるので、被験者Bはヘテロ型と判定することができた。被験者C(レーン④)では、被験者Bにも見られる不活性型アリルの増幅断片のみが観察されたので不活性型ホモと判定することができた。

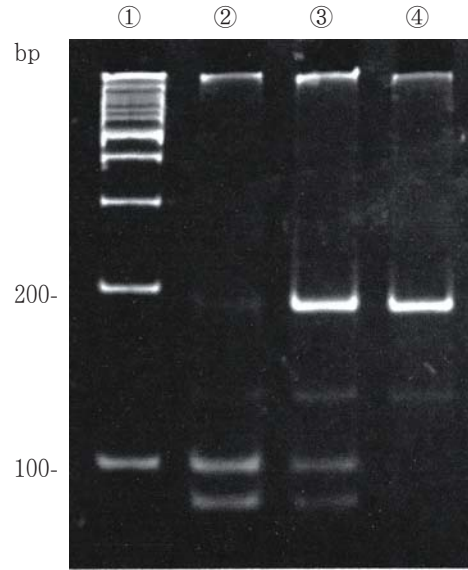


図4 増幅産物の酵素処理後の6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動像。レーン①はサイズマーカー、レーン②は被験者A(活性型ホモ)、レーン③は被験者B(ヘテロ型)、レーン④は被験者C(不活性型ホモ)である。

4. 考察

PCR-RFLP法を用いて、ALDH2遺伝子のSNPタイピングをすることができた。この方法で用いたプライマーでは、プライマーダイマーなどの不正な増幅がバンドとして検出されることも極めて少なく、前述の方法(アリル特異的プライマーによるPCR法)と比較して判定ミスはほとんどで起こらないと考えられた。一方、PCRの段階こそ反応液は1種類で簡潔であるが、その後に酵素切断処理(2時間)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(準備も含めて3時間強)と続くので、実験操作も煩雑となり、時間もかかることが難点であるように思われた。

IV. LAMP法を応用した方法を用いたSNPの検出(方法3)

1. 原理

LAMP法では、増幅を目的とする遺伝子の塩基配列(塩基数は300bp前後)に6つの領域を認識する4種のプライマーを設計し、増幅反応を進めるという新しい遺伝子増幅法であり、その反応は等温条件下(65°C付近)で進み反応時間は30分程度で完了し、さらに反応産物が極端に多く増幅の有無をピロリン酸マグネシウムの白濁で検出できるという特徴がある(詳細は、栄研化学のWebページまたはNotomiら(2000)²⁾)。

LAMP法を応用したSNPタイピングについては、Iwasakiら(2003)⁵⁾の方法に準じた。Iwasakiらは、薬物代謝関連酵素であるチトクロームP450の合成を司る遺伝子であるCYP2C遺伝子のSNPタイピングにおいて、LAMP反応の増幅サイクルの起点構造となるダンベル様の構造を作らせるときにアニールする領域(F1およびB1領域)の5'末端側より1塩基内側にSNPの1塩基を設定して、ミスマッチの場合はダンベル様構造をとらせないようにすることで増幅反応を止める(あるいは遅延させる)

という方法をとっている。本研究においても、ALDH2遺伝子のSNPの1塩基をF1およびB1領域の5'末端より1塩基内側に設定するという方法で、SNPタイピングを試みた。

2. 材料と方法

(1) DNAの抽出

PCR法の場合と同様に、口腔粘膜細胞をニッポンジーンのDNA抽出キット、ISOHAIRを用いて抽出したDNA試料をTEバッファーで様々な濃度に希釈したものを試料として用いた。

(2) LAMP反応

①プライマーの設計

まず図5に示すように、ALDH2遺伝子の第12エクソンとその周辺の領域（GenBank AF164120）に、6つの領域（F1, F2, F3, B1, B2, B3）を設定した。領域の設定に当たっては、インターネットに公開されているLAMP法プライマー作成ソフト（Primer explorer Ver.3）を用いて得られたものを、若干変更するとともに、F1領域とB1領域については、その5'末端側から1塩基内側にSNPsの1塩基が来るように設定した。

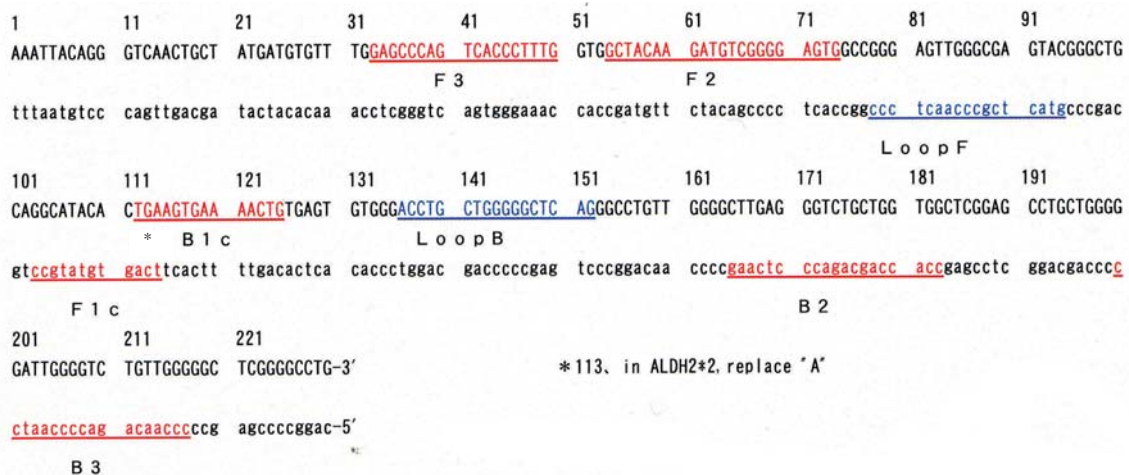


図5 ALDH2遺伝子、第12エクソン領域（10～124）とその周辺の塩基配列および、LAMP法におけるプライマー認識部位（6カ所+ループプライマー認識部位2カ所）の設定位置。*がSNPの1塩基。

そして、この6つの領域を認識する4種類のLAMPプライマー（FIP, BIP, F3, B3）を作成した。このうちFIPとBIPについては、SNP部分の塩基を変えることによって、活性型アレル増幅用のFIP-N, BIP-Nおよび不活性型アレル増幅用のFIP-M, BIP-Mを作成し、合計で6種類のプライマーを用意した。

さらに、LAMP反応の速度を高めるためにF1とF2の間、およびB1とB2の間にそれぞれLoopFおよびLoopBの領域を設定し（図5）、それぞれの領域を認識するLoopプライマー2種も作成した（図6）。

プライマーの精製度については、B3, F3, LoopF, LoopBプライマーの4つについてはOPC (oligonucleotide purification cartridge column: 簡易カラム) 精製グレードとし、FIP-N, BIP-N, FIP-M, BIP-MプライマーについてはHPLC (high performance liquid chromatography: 高速液体クロマトグラフィー) 精製グレードとした。

N (Normal) 型増幅用プライマーセット

FIP	5' 「F1c」 「F2」 3'	<u>T</u> CAGTGTATGCC-GCTACAAGATGTCTGGGGAGTG (33mer)
BIP	5' 「B1c」 「B2」 3'	<u>T</u> GAAGTAAAACTG-CCACCAGCAGACCCTCAAG (33mer)
F3	5' 「F3」 3'	GAGCCAGTCACCCTTTG (18mer)
B3	5' 「B3」 3'	CCCAACAGACCCCAATCC (18mer)
Loop-F	5' 「LoopF」 3'	CCCTCAACCCGCTCATG (17mer)
Loop-B	5' 「LoopB」 3'	GACTCGGGGGTCTCCA (17mer)

M (Mutant) 型増幅用プライマーセット

FIP	5' 「F1c」 「F2」 3'	<u>T</u> IAGTGTATGCC-GCTACAAGATGTCTGGGGAGTG (33mer)
BIP	5' 「B1c」 「B2」 3'	<u>T</u> AAGTAAAACTG-CCACCAGCAGACCCTCAAG (33mer)
F3	5' 「F3」 3'	GAGCCAGTCACCCTTTG (18mer)
B3	5' 「B3」 3'	CCCAACAGACCCCAATCC (18mer)
Loop-F	5' 「LoopF」 3'	CCCTCAACCCGCTCATG (17mer)
Loop-B	5' 「LoopB」 3'	GACTCGGGGGTCTCCA (17mer)

図6 LAMP法で用いるプライマー アンダーラインがSNPの1塩基。

②LAMP反応

得られた試料DNAをTEバッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) で様々な濃度に希釈したものを5 μ lおよび蛍光目視検出試薬 (栄研化学) 1 μ l, F3 プライマーおよびB3 プライマー 5pmoles, FIP-N プライマーおよびBIP-N プライマー 40pmolesまたはFIP-M プライマーおよびBIP-M プライマー 40pmoles, *Bst* DNA polymerase (New England BioLabs) 8unitを含む2種類の反応液 (表1にその組成を示す) 25 μ lを, 反応温度は55 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ Cの範囲, 反応時間は25分から60分の範囲の様々な条件下でインキュベートした後, 反応停止 (酵素失活) の為に80 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベートした。インキュベートにはPERKIN ELMER社のサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 2400を用いた。なお, 反応液AはIwasakiら (2003) の論文に記載されている反応液組成, 反応液Bは栄研化学のDNA増幅試薬キットの反応液組成を参考に若干の改変を行ったものである。

表1 LAMP反応液の組成

試薬など	反応液A	反応液B
Tris-HCl(pH8.8)	20mM	
(NH ₄) ₂ SO ₄	10mM	
KCl	10mM	
MgSO ₄	4mM	8mM
Betaine (Sigma)	1.0M	0.8M
Tween 20 (Sigma)	0.1%	
dNTPs mixture	0.5mM each	1.25mM each

(3) 増幅産物の確認

①電気泳動による確認

増幅産物3 μ lをBPB 2 μ lと混合し, 3%アガロースゲルにより100V, 約30分の電気泳動を行った。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し, トランスイルミネーター上で観察した。

②白濁による確認

LAMP法の特徴である増幅の副産物であるピロリン酸マグネシウムによる反応後の白濁の度合いを肉眼で観察した。

③蛍光目視検出試薬による確認

LAMP反応後の反応チューブをトランスイルミネータ上または携帯式の長波長紫外線ランプ (Bio-Rad社) を用いて観察した。

3. 結果

まず、反応液Aを用いた場合の結果について述べる。

遺伝子型のわかっている3人の被験者（A：活性型ホモ，B：ヘテロ型，C：不活性型ホモ）の試料を様々な条件で増幅を試みた結果，増幅時の温度については60℃～63℃の範囲で，増幅時間については40分，試料のDNA濃度についてはISOHAIRの標準プロトコルで得られたDNA溶液を100倍に希釈したもの（DNA濃度は個人差もあるが1ng/μl前後）を用いたときに，SNPタイピングを正確に行うことができた。図7はその時の反応後の溶液を電気泳動したものである。アリルがプライマー

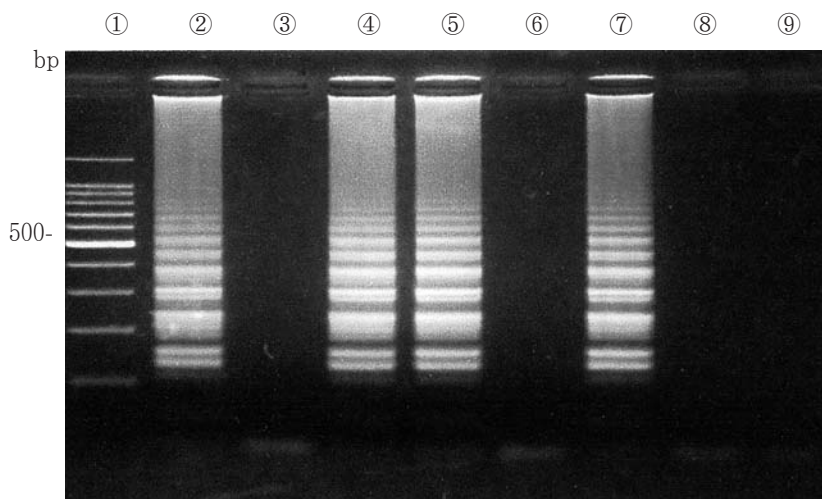


図7 LAMP反応後の電気泳動像。レーン①はサイズマーカー、レーン②、③が被験者A、レーン④、⑤が被験者B、レーン⑥、⑦が被験者C、レーン⑧、⑨がネガティブコントロール（DNAを加えていない）である。また、レーン②④⑥⑧は活性型アリル増幅用プライマーを、レーン③⑤⑦⑨は不活性型アリル増幅用プライマーをそれぞれ用いたものである。

の塩基配列とミスマッチとなるレーン③やレーン⑥ではLAMP反応は全く進行していないことがわかる。また増幅の見られた試料での泳動像は，LAMP法による増幅産物に特有のラダーパターン（様々なサイズの増幅産物が含まれるため）が観察され，LAMP反応が正常に進行したことを示した。被験者Aは活性型アリル増幅用プライマーでのみ，被験者Bでは活性型アリル増殖用プライマー，不活性型アリル増殖用プライマーの両方で，被験者Cでは不活性型アリル増殖用プライマーでのみ増幅が起こったので，SNPタイピングが正確に行われた判断した。

蛍光目視検出試薬による検出では，増幅反応の有無は紫外線トランスイルミネーター上での蛍光観察（携帯式の簡易紫外線ランプでも可能）についてはもちろんのこと，蛍光灯下において特に紫外線を照射しなくても試薬の変色が肉眼で観察され，増幅の有無を判定することができた（図8）。しかし，LAMP法に特有のピロリン酸マグネシウムによる白濁については，増幅の見られた反応チューブでもわずかな白濁しか観察されず増幅の判定に用いることはやや困難ではないかと思われた。

なお，試料DNAの濃度については，5 ng/μlや20ng/μlに調整したものについて増幅テストを行ったが，結果にやや揺らぎ（ミスマッチでも増幅が起こる）が見られた。

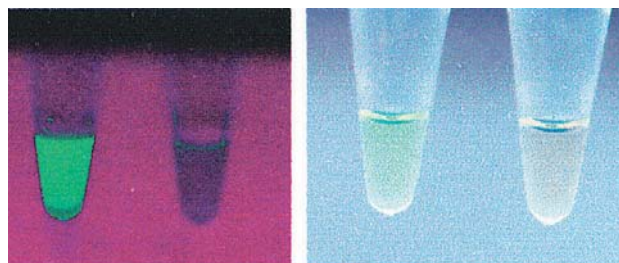


図8 蛍光目視検出試薬による増幅の検出。
左：トランスイルミネーター下で観察したもの。
右：蛍光灯下で観察したもの。どちらも左側のチューブが増幅+、右側が-。

次に反応液Bを用いた場合の結果について述べる。反応液Bを用いること以外の条件は上記反応液Aを用いた場合と同じ条件で実験を行ったが、安定した結果を得ることができなかった。すなわち、増幅が見られる場合は白濁が強く観察され、肉眼でも判定可能かと思われたのだが、結果に揺らぎが多く（ミスマッチでも増幅反応が見られることがたびたび観察された）、SNPタイピングを行うことはできなかった。

4. 考察

LAMP法でALDH2遺伝子の活性型および不活性型の各アレルに特異的なプライマー（F1領域およびB1領域の5'末端側より1塩基内側にSNPの1塩基を設定する）を設計することでALDH2遺伝子のSNPタイピングをすることができた。LAMP反応の最適温度は60℃～63℃付近であり、反応時間は40分が適当であることが示唆された。また、増幅の確認は、蛍光目視検出試薬を用いれば煩雑な電気泳動などの操作によらなくても、紫外線を当てるだけあるいは肉眼でも行うことが可能であると思われた。

一方、LAMP反応で正確にSNPを判定するためには、試料DNAの純度や濃度、温度や時間などの反応条件の正確な設定が必要となることも示唆された。また反応溶液中のdNTPs濃度およびMgイオン濃度が高すぎるとSNPがうまく認識できないことが多くなった。一般にDNAポリメラーゼの反応は反応液中のdNTPs濃度やMgイオン濃度が高くなっていくと正確性が低下すると言われているので、このこととの関連性が示唆された。白濁による検出を可能とするためには、Mgイオン濃度を高めに設定する必要があるが、SNP検出においては正確性が低下するので、残念ながら白濁の視認による検出は断念せざるを得なかった。

LAMP法は非常に簡易ではあるが、今回の方法でのSNPの認識に関しては反応液の組成、反応条件のわずかな違いにより揺らぎが見られ、判定ミスも起こりうるので、初心者が行うのに適しているとは言い難い。揺らぎの主な原因としては、ミスマッチのアレルでも増幅がまったく起こらないのではなく、遅れて起こることもあることがあげられる。リアルタイムでDNAの増幅をモニターすることにより、より正確にSNPタイピングを行うことは可能になると思われるが、今回の研究の目的（高等学校でも行える実験とすること）からそれるので行わなかった。

V. まとめ

高等学校生物での教材化を前提に、ALDH2遺伝子の遺伝子診断を3種類の方法で行ってみたが、それぞれに利点や困難点があった。以下の表2は、それぞれの実験方法の特徴などをまとめたものである。

表2 ALDH2遺伝子診断実験の比較

	方法1 (PCR)	方法2 (PCR-RFLP)	方法3 (LAMP)
原理のわかりやすさについて	PCRはわかりやすいが、原理はDNAポリメラーゼの性質にまで言及する。	PCRの原理、制限酵素など高校の範囲内で理解できる。	LAMP法の原理自体が複雑。SNPの認識については平易。
実験に必要な主な器具	遠心分離器 サーマルサイクラー 電気泳動装置 紫外線トランスイルミネーター	遠心分離器 サーマルサイクラー 恒温槽 電気泳動装置 紫外線トランスイルミネーター	遠心分離器 恒温槽

実験に必要な試薬など	一般的なPCR関連試薬（市販）とプライマー3種類	一般的なPCR関連試薬（市販）とプライマー2種類および制限酵素切断実験関連試薬（市販）	LAMP法関連試薬（市販品と違う組成につき自作が必要）と蛍光目視検出試薬（市販）プライマー8種類
実験にかかる時間	DNA抽出：1時間 PCR反応：3時間 電気泳動：1時間 合計 約5時間	DNA抽出：1時間 PCR反応：3時間 酵素切断：2時間 電気泳動：2時間 合計 約8時間	DNA抽出：1時間 LAMP反応：1時間 合計 約2時間
SNP判定の正確性	正確であるが、僅かな実験ミスが不正な増幅を引き起こす。	制限酵素処理にきちんと時間をかければ非常に正確である。	条件が僅かに異なるだけで、不正な増幅が起きるなど、やや不正確。

PCR法を応用した2法については、必要な器材や実験にかかる時間などから考えて、実際に生徒が取り組んでみる実験としては考えにくい。しかし、PCR法はDNA研究を根本から変えるきっかけとなった技術でもあり、高等学校の生物の教科書や資料集にも紹介されるようになってきたので、設備次第では是非とも行ってみたい実験である。また、DNA抽出から電気泳動に至るまでの一連の過程の中では、図9に示すように、高校レベルの化学や生物の知識で説明される内容が目白押しであるので、それらの総復習的な実習として取り扱うこともできると思われる。2004年7月には、岐阜大学教育学部生物学教室の実験室にて、岐阜県立東濃高等学校の生徒6名の参加により「先端科学体験講座、遺伝子診断に挑戦」と題しての実験講習会を開催し、方法1に示す流れで実際に遺伝子診断実験を行った。診断実験自体は、操作の未熟さもあってか明瞭な結果を得ることができなかった生徒もいたが、事後のレポートや感想では、実験自体の流れが大変勉強になったという声が聞かれた。実験としては1日丸ごとかかる内容になるのだが、生徒は非常に興味をもって取り組めたようであった。

今回の研究における最大の目標は、高等学校の実験室でも行うことのできる平易な遺伝子診断実験の開発であり、その可能性をLAMP法に託したわけであるが、現時点では判定に揺らぎの出る可能性が残され、教育現場で初心者が行うのには問題が残された。しかしプライマーの改良や実験条件の最適化次第では、判定がさらに正確になる可能性も残されており、アルコールパッチテストを実験の誤判定を防ぐためのコントロール実験として熟練した教員が主体となって同時に行えば、現時点でも十分有効な遺伝子診断実験になりうるのではないかと考えている。将来的には、高等学校の1時間の授業でも行えるような実験とされ、より多くの生徒が遺伝子診断を体験できるようになるものと期待したい。一方、LAMP法自体の原理は非常に難解なので、実験過程全体が教材となりうるPCR法と比較すると教材としての学習内容は豊富とはいえない。本来の実験目的である遺伝子診断に焦点を絞って授業を進める必要性が生じるとと思われる。

今回の研究を通じて、遺伝子診断実験が高等学校生物において、非常に有益な教材になりうることが感じられた。しかし現時点では、設備や費用そして生徒の実験技能など様々な問題が山積されており、すぐに現場で役立つには難しい部分も残されている。一方、日本でもSNPsの影響を調べる大規模な疫学調査が始まり、短時間でSNPs検出が可能な機器が開発されたこと等を考えると、遺伝子

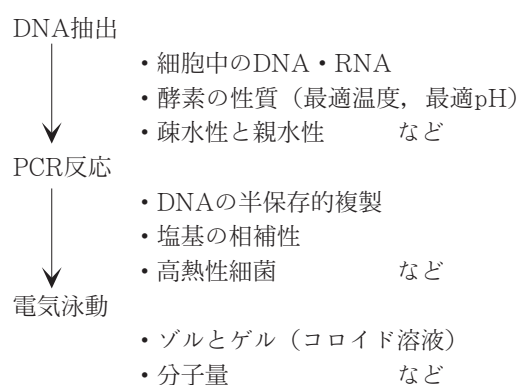


図9 PCR法と高等学校の生物・化学

診断が日常的に医療の現場で用いられるようになる日は意外と近いかもしれない。高等学校でも可能な実験教材の開発は、そのような未来を生きる為に必要な知識や技能を身につけさせていくためにも、より一層の研究が必要になってくるだろうと考えている。

VI. 謝辞

実験に際してDNAサンプルの採取に協力して頂きました岐阜大学教育学部の皆様、および岐阜県立東濃高等学校の皆様に深く感謝いたします。

VII. 文献・参考資料

- 1) 上野易弘(1999)：飲酒に影響を与える遺伝子 遺伝, 53(10), 51-56
- 2) Notomi,T., Okayama H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T.,(2000) : Loop-mediated isothermal amplification of DNA *Nucleic Acid Research*, 2000,28,e63
- 3) Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T., (2001) : Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity delived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289,150
- 4) ニッポンジーン (株) web ページ : ISOHAIR 実験例 (<http://www.nippongene.jp/pages/protocols/aldh2.html>)
- 5) Iwasaki, M., Yonekawa, T., Otsuka, K., Suzuki, W., Nagamine, K., Hase, T., Tatsumi, K., Horigome, T., Notomi, T., and Kanda, H.(2003) : Validation of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping with Whole Blood. *GENOME LETTERS* 2003,2,119-126

