

キャピラリー電気泳動による 老人性痴呆症の遺伝子診断

神戸薬科大学助教授

馬 場 嘉 信

キャピラリー電気泳動による老人性痴呆症の遺伝子診断

1 研究の背景と目的

高齢化社会を迎えるにあたり、アルツハイマー病に代表される痴呆症の原因遺伝子を解明し、原因遺伝子の多型解析による遺伝子診断システムを開発することは、痴呆症を治療あるいは予防し、老後を快適に送るために極めて重要な課題である。

1991年のヒトゲノム解析計画の開始に伴いアルツハイマー病の原因遺伝子が解明されつつあり、既に、第21番染色体のbアミロイドタンパク質前駆体遺伝子および第19番染色体のアポリポ蛋白E遺伝子(*APOE*)などが原因遺伝子として同定されている。

これらの中でも*APOE*は、その対立遺伝子の一つであるE4と、家族性および孤発性晩期発症型アルツハイマー病(60才以上で発症)の発症との関連が1993年に証明され、さらに、1994年には孤発性早期発症型アルツハイマー病(60才以下で発症)の発症との関連も証明されるにいたり、アルツハイマー病の最も重要な原因遺伝子として一躍脚光をあびる存在となった。従って、*APOE*の多型解析による遺伝子診断が、高齢化社会における社会的要求である痴呆症の早期診断・早期予防を実現するものとして非常に注目を集めている。

本研究においては、*APOE*の多型解析を高速化・高感度化するためにキャピラリー電気泳動による新規DNA解析法を開発することを目的とする。本研究の特色は、高速DNA分析法であるキャピラリー電気泳動と高感度DNA検出法である多色検出型レーザー蛍光検出装置とを結合し、従来法の10倍以上の高速化、RI法以上の高感度化、多色蛍光ラベ化による複数対立遺伝子の同時検出を達成できるアルツハイマー病の高性能遺伝子診断システムを開発するところにある。このようなシステムの開発は、我々が世界に先駆けて着手するものである。

2 研究方法・研究内容

本研究では、研究計画を以下のような3段階に分け、それぞれの段階での実験を綿密に計画し、確実に実行する。それぞれの段階が終了した時点でその結果を正確に評価し、次の段階の計画を立案・修正しながら実験を着実に進行し、最終的な研究目的の達成に向けて研究を進めるものである。

キャピラリー電気泳動による遺伝子解析：アルツハイマー病の原因遺伝子を解析するために、キャピラリー電気泳動による*APOE*の多型解析の条件を検討する。図1左図に示すように、*APOE*は、E2、E3、E4の3種類の対立遺伝子を持つので、右図に示す6種類の遺伝的多型を有することになる。これらのうち、特にE4/E4のホモ接合体がアルツハイマー病発症の危険率が高いことが報告されている。まず、*APOE*の多型部位をPCRにより増幅し、制限酵素(Hha I)により切断し、*APOE*の多型解析用サンプルを調製する。キャピラリー電気泳動により*APOE*多型を解析する際の最適条件決定のための基礎実験を行い、アルツハイマー病の原因遺伝子多型を迅速にかつ高い分解能で解析できる条件を確立する。

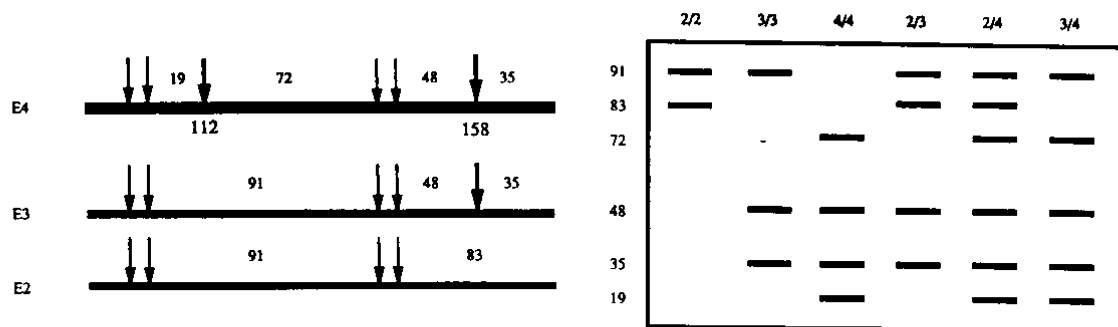


図1 アポリポ蛋白Eの対立遺伝子と多型解析

左図 *APOE*の3種類の対立遺伝子(E2, E3, E4)、矢印は制限酵素(Hha I)の切断部位

右図 *APOE*の6種類の遺伝的多型をゲル電気泳動により解析した模式図、横の数字は塩基対数

多色検出型レーザー蛍光検出装置の開発と遺伝子の高感度検出：上記のキャピラリー電気泳動で解析した遺伝子を高感度で検出するために、多色検出型レーザー蛍光検出装置を開発する。この方法は、異なる種類の蛍光試薬でラベル化したそれぞれの対立遺伝子を同時に高感度で検出可能な新規方法論である。まず、DNA検出に最適なレーザーを決定する。次に、レーザーにより誘起された蛍光を多波長同時に検出するための装置を開発する。これらの実験により、アルツハイマー病の原因遺伝子である*APOE*の多型を高感度で検出するための新規方法を確立する。

キャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出システムによるアルツハイマー病の遺伝子診断：上記で検討した遺伝子解析法であるキャピラリー電気泳動と遺伝子検出法である多色検出型レーザー蛍光検出装置を有機的に結合したシステムを構築する。このシステムを用いた、*APOE*多型解析における条件検討を行う。さらに、アルツハイマー病の遺伝子診断における速度・再現性・精度などについて検討する。この部分に関しては、三木哲郎講師（大阪大学医学部）と共同で研究を行う。以上の研究を基礎に、キャピラリー電気泳動-多色検出型レーザー蛍光検出システムの迅速性、高感度を兼ね備えたアルツハイマー病の高性能遺伝子診断システムを開発する。

3 研究結果

ヒト・ゲノムDNAをテンプレートとして、アポリポ蛋白E遺伝子の多型部分である112および158コドンを含む部分を増幅した。5'側プライマーは5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'を、3'側プライマーは5'-ACAGAATTTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3'を用いた。PCRは、最終体積を100 μLとして行った。1.0 mgのテンプレートDNAに、2種のプライマーをそれぞれ0.1 mM加えた。その他は上記と同様にして反応溶液を調製した。1サイクルの反応は、熱変性を95℃で1分、アニーリングを60℃で1分、伸長反応を70℃で2分とし、30サイクルの反応を繰り返し、244塩基対のDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片を含む溶液に、制限酵素Hha I (5 units)を加え、37℃で3時間反応させた。

アポリポ蛋白E遺伝子(*APOE*)は、第19番染色体の長腕に遺伝子座位があり、4

個のエクソンと3個のイントロンから成る。この遺伝子には、3種類のアイソフォーム（E2, E3, E4）が知られており、これらは、エクソン4領域に存在する112番コドン（E2, E3: TGC; E4: CGC）および158番コドン（E2: TGC; E3, E4: CGC）の塩基配列に違いがある。APOEの遺伝的多型は、6種類（E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4, E3/E4）存在しており、E4/E4の多型がアルツハイマー型痴呆症の危険因子であることが証明された。上記のようなPCRにより、APOEのエクソン4の112番および158番コドンをカバーする領域を増幅し、Hha I制限酵素を用いて切断し、キャピラリー電気泳動により解析した。Hha I制限酵素は、GCGC配列を認識し切断する酵素なので、E2, E3, E4のアイソフォームを識別するのに利用することができる。このような方法を制限酵素断片長多型（RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism）解析と呼ぶ。

アルツハイマー病の遺伝子診断のためのPCR反応生成物は、極微量しか得られないので、これを高感度で検出するために、キャピラリー電気泳動用のレーザー誘起蛍光検出装置を開発した。この装置は、レーザー光をキャピラリーの検出部に直接照射し、キャピラリー中を泳動するDNA断片の蛍光をフォトダイオードアレイ検出器で検出するものである。この装置が、アルツハイマー病の遺伝子診断に応用できるかどうかを調べるために、PCR反応生成物の分離条件の最適化について検討した。

図2に3人のヒト・ゲノムDNAから増幅したAPOEのRFLP解析によるアルツハイマー型痴呆症の遺伝子診断の例を示す。図から明らかなように、上図に示す人は、91 bpのDNAのみのピークを与えるのでE3/E3のホモ接合体であり、下図に示す人は、72 bpのDNAのみのピークを与えるのでE4/E4のホモ接合体であることがわかった。さらに、中図に示す人は、両方のピーク（72 bp, 91 bp）を与えるので、E3/E4のヘテロ接合体であると判定できる。このように、キャピラリー電気泳動により得られる、91 bp以下のDNAのパターンを識別することにより、APOEの遺

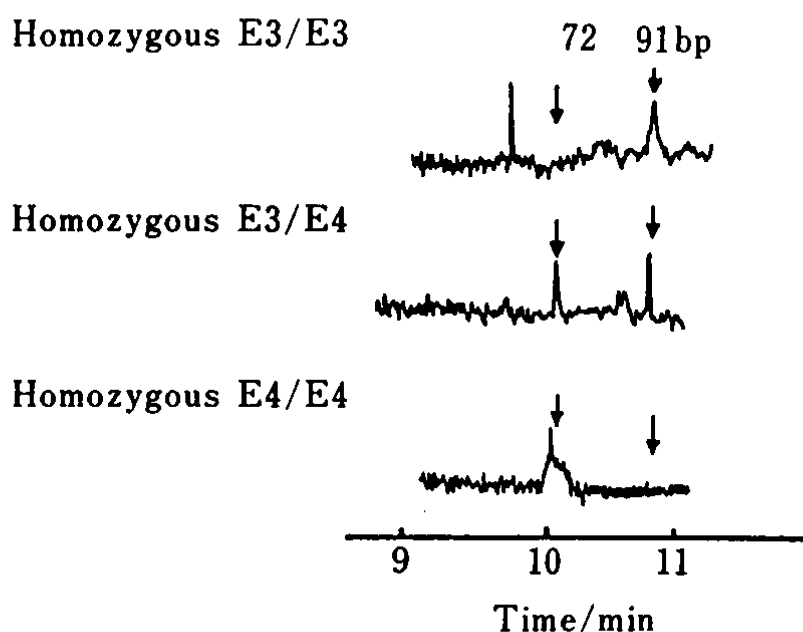


図2 キャピラリー電気泳動によるアポリポ蛋白Eの多型解析

伝的多型を解析することが可能になった。この多型解析の結果から、E3/E3の遺伝的多型を有する人のアルツハイマー型痴呆症に対する危険率は20 %、E3/E4の遺伝的多型を有する人のアルツハイマー型痴呆症に対する危険率は47 %、E4/E4の遺伝的多型を有する人のアルツハイマー型痴呆症に対する危険率は90 %、というように、アルツハイマー型痴呆症に関する遺伝子診断が可能になる。さらに、解析に要する時間は、わずか10分程度であり、従来のスラブゲル電気泳動と比べ大幅に時間を短縮することができた。

4 研究がもたらす効果および波及効果

この新しいシステムが開発されれば、アルツハイマー病の原因遺伝子であるAPOEの多型解析を短時間で行えるのみならず、アルツハイマー病の遺伝子診断を正確にかつ迅速に行うことが可能になる。しかも、情報量が1桁以上増えるので、アルツハイマー病の数種の原因遺伝子の多型を同時に検出することでさえも可能になり、総合的な新しいアルツハイマー病の診断法を確立することができる。コンピュータの分野で、1桁以上高速化したスーパーコンピュータが計算科学のみならず、分子生物学など他の様々な分野に革命的な進歩をもたらしたように、このシステムは、アルツハイマー病の原因解明および遺伝子診断のみならず、社会的要請である痴呆症の予防に計り知れない貢献をなすものと期待される。

本研究の成果は、さらに以下のような波及効果が期待される。本研究において開発するシステムは、アルツハイマー病の遺伝子診断だけでなく、アルツハイマー病以外の痴呆症、がんおよび成人病などの疾患の原因遺伝子の多型および変異の解析に応用することが可能である。また、このシステムを応用することにより、これらの疾患についての高性能遺伝子診断法の開発を行うことも可能である。

さらに、このシステムは、アルツハイマー病およびその他の疾患の遺伝子診断のみならず、PCR生成物解析、遺伝子マッピング、疾患原因遺伝子の同定、ヒト・ゲノムDNAシーケンシングなど、遺伝子の解析法として非常に幅広い応用が考えられる。

論文・総説・著書・新聞発表

1. Y. Baba, R. Tomisaki, and M. Tsuhako, Three-Dimensional Electropherogram for the Separation of DNA Restriction Fragments Using Capillary Gel Electrophoresis with a Photodiode Array Detector, J. Liq. Chromatogr., 1995, 18(7), 1317-1324.
2. Y. Baba, R. Tomisaki, C. Sumita, M. Tsuhako, T. Miki, and T. Ogihara, Rapid Typing of Variable Number of Tandem Repeat Locus in the Human Apolipoprotein B Gene for DNA Diagnosis of Heart Disease by Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis, Electrophoresis, 1995, 16(8), 1437-1440

3. 馬場嘉信、キャピラリー電気泳動によるヒト・ゲノム解析と遺伝子診断
分析化学, 1995, 44(11), 883-893.
4. 馬場嘉信、クロマトグラフィーの基礎知識；キャピラリー電気泳動
ぶんせき, 1995(5), 342-349.
5. Y. Baba, Capillary Affinity Gel Electrophoresis: New Tool for
Detection of the Mutation on DNA, Mol. Biotechnol., in press.
6. 角田ちぬよ、馬場嘉信、DNA診断へのキャピラリー電気泳動の応用
生物物理化学, in press.
7. Y. Baba, Analysis of Disease-Causing Genes and DNA Based Drugs by
Capillary Electrophoresis: Towards DNA Diagnosis and Gene Therapy
for Human Diseases
J. Chromatogr. B., in press.
8. 馬場嘉信（分担執筆）
『キャピラリー電気泳動 基礎と実際』 本田、寺部編 講談社(1995)
9. 馬場嘉信（分担執筆）
『機器分析におけるコンピュータ利用』 日本分析化学会編 朝倉書店(1995)
10. 馬場嘉信（分担執筆）
『基礎化学コース 分析化学III』 井上、北森、小宮山、高木、平野編
丸善、印刷中
11. 馬場嘉信（分担執筆）
『薬学領域における機器分析』 中村編 朝倉書店、印刷中
12. 馬場嘉信（分担執筆）
『最新の分離・精製・検出法』 梅澤、澤田、中村編
エヌ・ティー・エス出版、印刷中
13. 馬場嘉信（分担執筆）
『医療におけるバイオテクノロジー』 木村編 医薬ジャーナル、印刷中
14. 馬場嘉信（分担執筆）
『ゲルハンドブック』 長田、梶原編 エヌ・ティー・エス出版、印刷中
15. 馬場嘉信、『アルツハイマー病発症の遺伝子 毛細管使い数分で識別』
毎日新聞, 1995, 3. 26.
16. 馬場嘉信、『遺伝子診断 短時間で 痴ほう症で確認』
日本経済新聞, 1995, 5. 22.
17. 馬場嘉信、『国際的プロジェクト 高性能DNA解析装置 目標達成に不可欠』
科学新聞, 1995, 10. 20.
18. 馬場嘉信、『新規DNA解析システムを開発 次世代の遺伝子診断法に』
科学新聞, 1995, 11. 10.