

Aldehyde dehydrogenase 2 の遺伝子型決定

実習の目的

今回の代謝エピジェネティクス分野の実習では、アルコールの代謝に関わる酵素の一つである Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 の Single nucleotide polymorphism (SNP) の解析を通して、分子遺伝学的手法に実際に触れるとともに遺伝子変異と体質について学ぶことを目的とする。具体的には、口腔上皮細胞から Genome を抽出し、Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて ALDH2 の SNP 解析を行う。また、実験中に行う講義を通して、当分野が取り扱っているテーマである「遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構と疾患の発症機構」についても学ぶ。

分子生物学の基本知識

1. PCR 法

PCR 法は、Genome DNA や mRNA から合成された cDNA などの特定の塩基配列を持つ DNA を増幅する手法である。PCR では Primers, DNA polymerase, dNTP を利用し、Denature, Annealing, Extension の主に 3 つのステップで DNA の増幅を行う。Denature では反応液を 98°C の高温にすることで 2 本鎖 DNA を 1 本鎖 DNA に変性させる。次に、Annealing では急速に Primer により決定される温度（今回は 60°C）に冷却する。急速な冷却では長鎖 DNA 同士は結合しづらいが、約 20 塩基長のオリゴヌクレオチドである Primer は優先的に DNA と結合できる。その後、温度を 72°C まで上昇させ、DNA polymerase が Primer を起点に錆型 DNA と相補的な dNTP を錆型 DNA の 3' 末端に結合していくことで DNA 鎖を合成する。特定の遺伝子領域の sense 鎖および antisense 鎖に対する Primer を設計して Denature, Annealing, Extension のステップを繰り返すことで、図 1 のように目的遺伝子領域の塩基配列を増幅することができる。

1993 年 ノーベル化学賞 Kary Banks Mullis

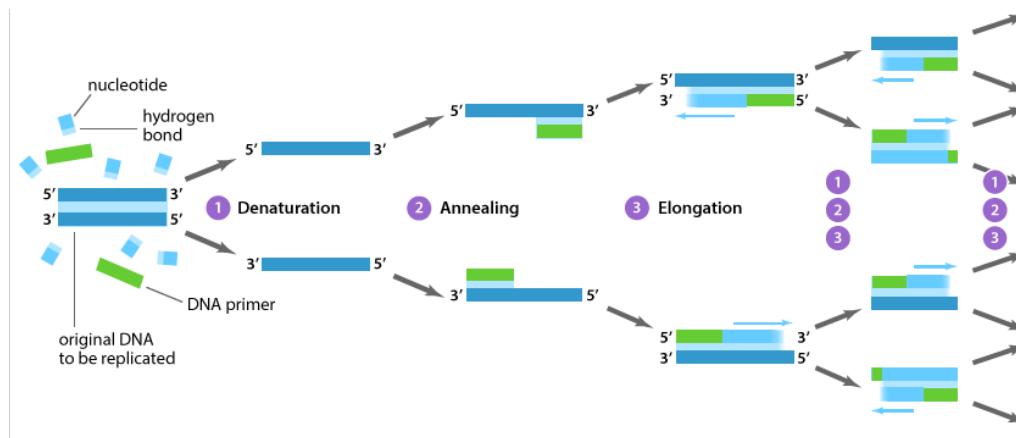


図 1. PCR による錆型 DNA 増幅の概念図

(https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php より引用)

2. ALDH2

アルコール飲料等を摂取して体内に取り込まれたエタノールは主に肝臓で代謝される。エタノールはまず細胞質の Alcohol dehydrogenase (ADH) またはペルオキシソームの Catalase の作用でアセトアルデヒドに変換される。次に、アセトアルデヒドはミトコンドリアに局在する Aldehyde dehydrogenase (ADH) によって代謝を受けて酢酸に変換される。この過程で生じるアセトアルデヒドは、吐き気・動悸・頭痛などの原因となる。一方、定期的に飲酒を行うことで、小胞体に局在する Cytochrome P450 酵素群の一つである CYP2E1 の発現が上昇する。CYP2E1

はエタノールをアセトアルデヒド、アセトアルデヒドを酢酸に変換することで無毒化される。そのため、「お酒に弱い人」でも定期的な飲酒を行うことで CYP2E1 を介するエタノール代謝の容量が増加することで一定量の飲酒を行うことができるようになる。

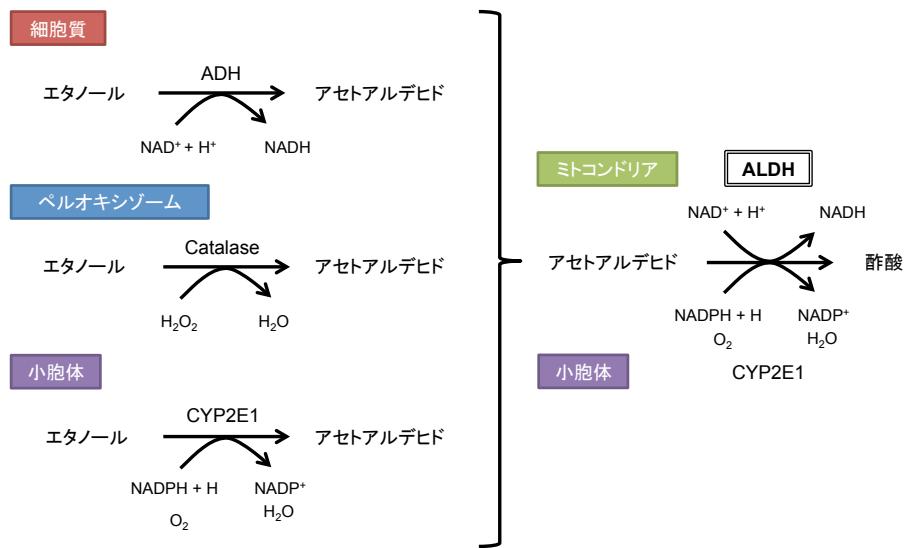


図 2. エタノールの代謝経路

それでは、「お酒に弱い人」とはどのようなヒトをさすのであろうか。ALDH には ALDH1 と ALDH2 の二つのサブタイプが存在する。ALDH2 はアセトアルデヒドの濃度が低いときでも酵素活性を示すが、ALDH1 はアセトアルデヒドの濃度が高くなないと酵素活性を示さない。ALDH2 は 517 アミノ酸からなるタンパク質であり、日本人を含めたモンゴロイドでは野生型 ALDH2*1 の 487 番目のグルタミン酸 (E) がリシン (K) に変わる SNP 変異 (変異型 ALDH2*2) が認められる (図 3)。ALDH2 は主に 4 量体を形成することで酵素活性を発揮するが、野生型 ALDH2*1 は一つでも変異型 ALDH2*2 に変換されると NAD⁺との結合能が低下して酵素活性が失われる [1]。そのため、ALDH2*1 をホモで持つヒトと比べ、ALDH2*1 と ALDH2*2 をヘテロで持つヒトは $(1/2)^4 = 1/16$ の酵素活性を示し、ALDH2*2 をホモで持つヒトはほとんど酵素活性を示さない。日本人を対象とした調査では、ALDH2*1 ホモ型が 56.9%, ALDH2*1/ALDH2*2 ヘテロ型が 36.6%, ALDH2*2 ホモ型が 5.6% と報告されている [2]。

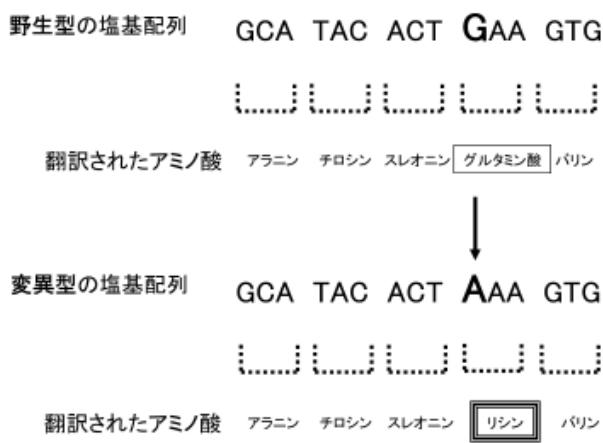


図 3. ALDH2 の SNP 変異 (Ref. [3])

実験方法

1. アルカリボイル法による口腔上皮細胞からの Genome 抽出

Protocol:

- ① 純棒で口腔内の頬の内側を 20 秒ほど擦り付けて口腔上皮細胞を回収する。
- ② 1 mL PBS を分注した 1.5 mL チューブに回収した細胞を懸濁する。

- ③ 2,000 rpm, 5 分間, 室温で遠心する。
- ④ 上清を除去し, 100 μ L 50mM NaOH を加えて vortex.
- ⑤ 95°Cヒートブロックで 20 分間加温する。
- ⑥ サンプルを回収し, 10 μ L 1 M Tris-HCl (pH 7.4) を加えて vortex
- ⑦ 15,000 rpm, 5 分間, 4°Cで遠心する。

2. PCR による ALDH2 遺伝子型決定

表 1. Primer 配列

Primer 名称	配列
Oli-TS-20 (共通 Forward primer)	5'-TCAAATTACAGGGTCAACTGCT-3'
Oli-TS-21 (野生型 Reverse Primer)	5'-CACACTCACAGTTTCACT GCA -3'
Oli-TS-22 (変異型 Reverse Primer)	5'-CCCACACTCACAGTTTCACT ATA -3'

Primer 配列は Ref [4]を参考にした。

表 2. サンプルのラベル対応表

サンプル名称	野生型検出 Primer 用ラベル	変異型検出 Primer 用ラベル
WT DNA	1	2
Mutant DNA	3	4
#1	5	6
#2	7	8
#3	9	10
#4	11	12
#5	13	14
#6	15	16
#7	17	18
#8	19	20

Protocol:

- ① 1-④の間に下記の PCR mix を作製する。

表 3. PCR mix 組成

試薬	野生型検出用	\times () samples	変異型検出用	\times () samples
10x PCR Buffer-Mg ²⁺	2.5 μ L		2.5 μ L	
10 mM dNTP	0.5 μ L		0.5 μ L	
50 mM MgCl ₂	0.75 μ L		0.75 μ L	
10 μ M Oli-TS-20	0.5 μ L		0.5 μ L	
10 μ M Oli-TS-21	0.5 μ L		-	
10 μ M Oli-TS-22	-		0.5 μ L	
Taq polymerase (ATaq-TS2 2 倍希釈)	0.5 μ L		0.5 μ L	
滅菌水	18.75 μ L		18.75 μ L	
Mix1 24 μ L		Mix2 24 μ L		

- ② 8 連チューブに Mix1 と Mix2 をそれぞれ 24 μ L ずつ分注する。

- ③ サンプルを 1 μ L ずつ添加する。
 ④ GeneAmp にて下記 PCR 反応を行う。

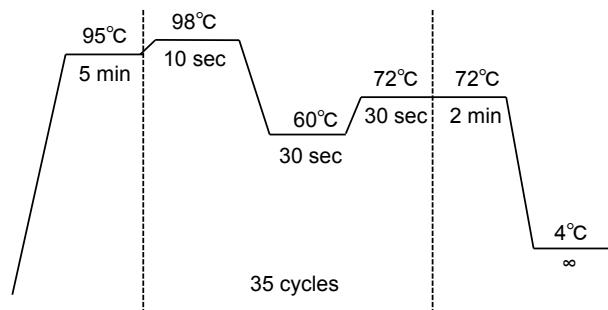


図 4. PCR

3. 電気泳動

- ① Agarose S を 0.8 g 計量し、TAE Buffer 80 mL を加える。
- ② 突沸に注意しながら電子レンジで 3 回沸騰させる。
- ③ エチジウムプロマイドを 1 μ L 加えてよくかき混ぜる。
- ④ ゲルトレイに流し込んでコームを差し込み、室温で固める。ある程度固まった時点で冷蔵庫に移す。
- ⑤ Marker 4 (Nippone Gene, 318-05791) を一番左のレーンに 10 μ L アプライし、Loading Buffer を 2.5 μ L 加えたサンプルを左から順にラベル 1 からアプライする。
- ⑥ 100 V で 10~15 分間 TAE Buffer で電気泳動を行う。
- ⑦ UV ランプでゲルの写真を撮影する。

実験結果 1



4. パッチテスト

- ① 紋創膏に 75%エタノールをしみ込ませ、上腕の内側に張る。
- ② 7 分後にはがし、はがした直後に紋創膏を張った部分の色を確認する。
- ③ はがしてからさらに 10 分後にもう一度肌の色を確認する。
- ④ 判定法:

肌の色に変化が無い場合は ALDH2*1 ホモ型

肌の色が 10 分後に赤くなる場合は ALDH2*1/ALDH2*2 ヘテロ型

肌がはがした直後に赤くなる場合は ALDH2*2 ホモ型

実験結果 2



考察

参考文献

- [1] Larson HN, Weiner H, Hurley TD. Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "Asian" variant. *J Biol Chem* 2005;280(34): 30550-30556.
- [2] Takeshita T, Morimoto K, Mao X, Hashimoto T, Furuyama J. Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. *Hum Genet* 1994;94(3): 217-223.
- [3] 野村純, 松本絵里子, 田村充子, 川島聰子, 野崎とも子, アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 遺伝子におけるシングルヌクレオチドポリモルフィズム検出法の実習教材化と授業実践, 千葉大学教育学部研究紀要 2005; 53: 359-366
- [4] 林田真梨子, アルコール代謝酵素 ALDH2 および ADH1B 遺伝子型 の迅速かつ正確な SNP タイピング実験法の研究 および遺伝子検査を用いた教育への応用, 武庫川女子大学 修士論文 2015.