

アルツハイマー病における危険因子 ApoE4 遺伝子の検出試薬の研究

日大生産工(院) ○秋谷 佳史 根本 浩史

日大生産工 小森谷 友絵 神野 英毅

【緒言】

アルツハイマー病(Alzheimer disease ; AD)は、脳が次第に萎縮していくに従い、知能、身体全体の機能が衰えていき、ついには死に至る病である。初発症状は、いわゆる「物忘れ」や、意欲が乏しくなったり、周囲への興味や関心がなくなるといった人格変化であり、末期になると言語の疎通も日常生活も障害され、寝たきり状態となる。発病年齢によってその羅病期間も様々だが、約 10~15 年の経過で、合併症が直接的な死因となる。

AD は、 β アミロイド($A\beta$)、タウ蛋白、アポリポ蛋白(ApoE)が関係しており、「脳内に $A\beta$ 蓄積→老人斑形成→脳神経細胞中のタウ蛋白のリン酸化および変性→神経細胞の死滅→発病」という過程で発症する。中でも、ApoE は主にコレステロールや他の脂質の輸送に関する血漿蛋白であり、その遺伝子は 19p13.2(Fig.1)にコードされている。

ApoE 遺伝子には ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 の 3 つの対立遺伝子(アリル)(蛋白質では E2, E3, E4 のアイソフォーム)があり、その中でも、 ϵ 4 アリル(E4)がアルツハイマー型痴呆症の危険因子であることが明らかとなっている。E2, E3, E4 の違いは、112 位と 158 位のアミノ酸である。ApoE をコードする遺伝子の遺伝子型は、ホモ接合体、ヘテロ接合体の各組み合わせとして、(E2/E2), (E2/E3), (E2/E4), (E3/E4), (E4/E4)となり、ヒトはこれらのいずれかに分類される。

長寿に伴う孤発性のアルツハイマー病患者は (E4/E4), (E3/E4)型に多く発症している。

そこで、本研究では、アルツハイマー病発症に大きく寄与する SNP(Single Nucleotide Polymorphisms) 検出を目的とした、DNA 感作

Latex 試薬の作製を行っている。

本学術講演では、遺伝子診断に用いる、DNA 感作 Latex 試薬の作製および、その凝集反応の結果について発表する。

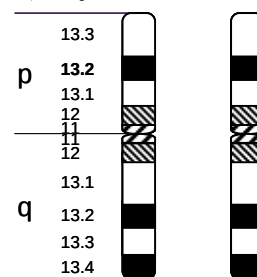


Fig.1 Chromosome 19

【実験方法】

1. DNA 感作 Latex 粒子の作製

2 ml の エ ッ ペ ン に GMA(Glycidyl-methacrylate)-Latex 粒子(10.0 mg)を入れた。この粒子を 10 mM KPB(pH 8.0)で $400\mu\text{l} \times 3$ 回洗浄した。遠心分離後、10 mM KPB(pH 8.0)を $200\mu\text{l}$ 加えた。さらに、プライマー $60\mu\text{l}$ を加え 25°C で 6 時間カップリング反応を行った。

反応終了後、ラテックス表面における未反応のエポキシ基を不活性化するために過剰量のグリシン溶液を加え 30 分間反応させた。

その後、2.5 M NaCl を含んだ 10 mM KPB(pH 8.0)で $200\mu\text{l} \times 3$ 回洗浄した。その後、1M Tris-HCl(pH 7.9) 1 ml で懸濁させ 24 時間、室温でインキュベートし、DNA 感作 Latex 粒子を完成させた。¹⁾²⁾

このラテックス試薬を凍結乾燥一晩行い FT-IR(Bruker Optics)を使用し、分解能 4cm^{-1} 、積算回数 100 回、KBr 法で IR スペクトルを測定した。(Fig. 2)

Study on Development of Reagent for Detection of Alzheimer disease using ApoE4 gene

Yoshifumi AKIYA, Hiroshi NEMOTO, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

2. DNA 感作 Latex 試薬の反応性の検討

作製した DNA-Latex 試薬を 70 mer 程度の短い DNA 鎖を用いて反応性を確認した。反応原理は Fig.3 に示す。200 μ l のエッペン中に Latex 試薬①(プローブ),②、DNA、TE Buffer を加え、10 分ほどインキュベートした後、サブミクロン粒子アナライザーにて測定した。(Fig.4)

【結果及び考察】

1. DNA 感作 Latex 粒子の作製

GMA-Latex を IR で測定したところ、エポキシ環に特徴的なスペクトルを得た。3059 cm^{-1} にエポキシ環のメチレン基、3000 cm^{-1} にエポキシ環のメチレン基、1255 cm^{-1} にエポキシ環の対称伸縮の振動が見られたことから、ラテックス表面に GMA が被覆していることを確認した。

さらに、DNA を感作させた Latex を IR で測定した。エポキシ環の対称伸縮である吸収が見られなくなり、エポキシ環の開裂の際に見られる水酸基と思われる幅広い吸収が 3000~3300 cm^{-1} に見られたことから、DNA 感作 Latex 試薬の作製を確認した。³⁾

2. DNA 感作 Latex 試薬の反応性の検討

テンプレートする DNA の量を 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ l とし、DNA-Latex と反応させた。その結果、Latex の粒径が増大していることから、DNA を介して凝集が起きたものと考えられる。

【参考文献】

1)H. Kawaguchi *etal.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 10 (1998) 161-169

2) H. Kawaguchi *etal.* Colloids and Surfaces A: Physiochemical and Engineering Aspects 153(1999) 445-451

3)赤外線吸収スペクトル - 定性と演習 -

中西 香爾 著 南江堂

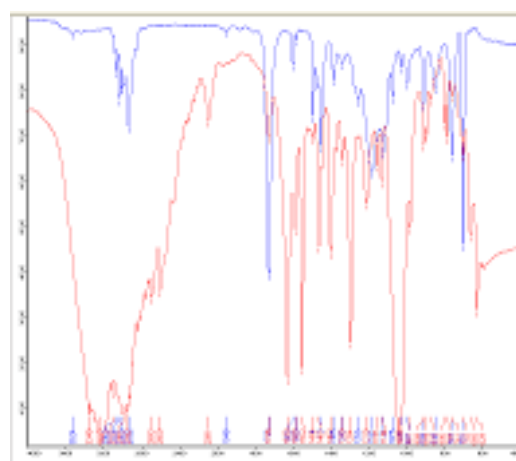


Fig.2 FT-IR spectra of GMA-Latex Particles and DNA-Latex particles

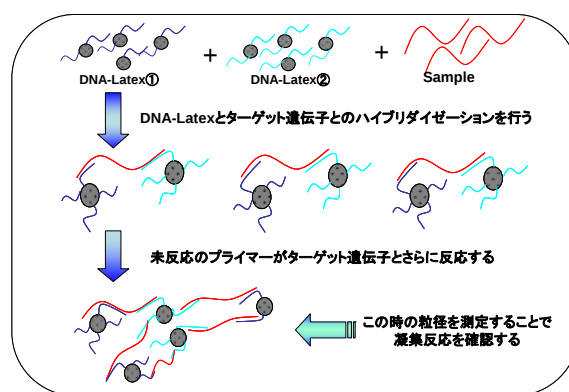
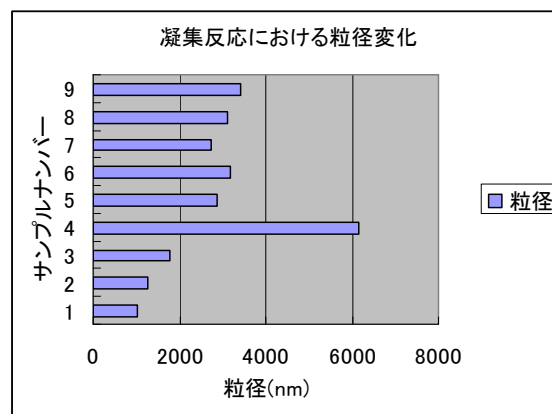


Fig.3 Reaction principle



Sample No.	Sample name	粒径(nm)
1	DNA-Latex①	1035.8
2	DNA-Latex②	1277.2
3	Blank	1789.8
4	DNA 2 μ l	6150
5	DNA 4 μ l	2877.8
6	DNA 8 μ l	3182
7	DNA 12 μ l	2745.3
8	DNA 16 μ l	3101.6
9	DNA 20 μ l	3434.8

Fig.4 Result of Change Particle diameter in agglutination reaction