

DNA 固定化粒子によるアルツハイマー因子 ApoE4 の検出に関する研究

神野 英毅 (応用分子化学科)

1. 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、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罹病期間も様々だが、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 β)、タウ蛋白、アポリポ蛋白(ApoE)が関係しており、「脳内に A β 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)にコードされており、その遺伝子は 4 つのエクソンから構成されている(Fig. 2)。

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¹⁾²⁾。

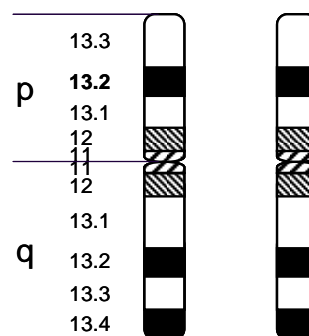


Fig. 1 Chromosome 19

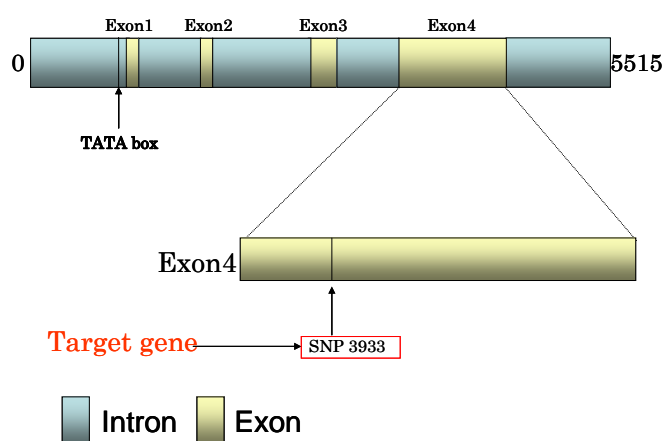


Fig. 2 Gene of Apolipoprotein E4

2. 実験

2-1 GMA(Glycidylmethacrylate)-Latex の検討

DNA 固定化 Latex の作製の前段階として、当研究室で作製した GMA-Latex の検討を行った (Scheme 1)。

赤外線吸収スペクトル法より GMA-Latex の構造確認を行った。

(Bruker Optics 社製 FT-IR(IFS-125HR)で、分解能 4 cm^{-1} , 積算回数 100 回, KBr 錠剤法で測定した。

さらに、滴定法で Latex 表面のエポキシ基を定量した³⁾⁴⁾。

2-2 DNA 固定化 Latex 粒子の作製

当研究室で作製した GMA-Latex を使用して

DNA-Latex を作製した(Scheme 2)。

2 ml のマイクロチューブに GMA-Latex 粒子 (10.0 mg) を入れた。この粒子を 10 mM KPB(Potassium phosphate buffer)(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 $200 \mu\text{l}$ 加え懸濁した。そこに、Table 1 に示す塩基配列のプライマー を $60 \mu\text{l}$ 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、1M Tris-HCl(pH 7.9) 1 ml で懸濁した。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。

凍結乾燥を一晩行い FT-IR(Bruker Optics) で、分解能 4cm^{-1} 、積算回数 100 回、KBr 法で構造確認した^{5)~8)}。

2-3 DNA 固定化 Latex 粒子の反応性

作製した DNA 固定化 Latex の反応性の検討を行った。

1.0 ml マイクロチューブに 2 種類の DNA-Latex ①,②を入れた。さらに、TE Buffer, Sample DNA(70 mer オリゴヌクレオチド)をいれ Total $550 \mu\text{l}$ とし、室温で 20 分間インキュベートした。

インキュベート後、サブミクロン粒子アナライザー N5(Beckman Coulter)にて粒径測定及び分光光度計による吸光度測定を行った。

2-4 Latex 凝集反応における特異性の確認

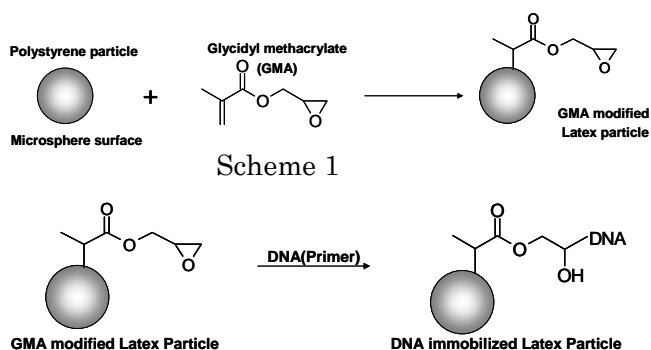
Latex 凝集反応における特異性の確認をインターカラーである SYBR Green I を利用して行った。

SYBR Green I は二本鎖の DNA に特異的に結合し、発色する。

まず、0.5ml のマイクロチューブに Latex①, ②, SYBR Green I, Sample DNA(70 mer オリゴヌクレオチド)を加え、室温で 20 分インキュベートした。

インキュベート後、それらを 96well の蛍光測定用のプレートに移し、マイクロプレートリーダー

で励起波長 519 nm の光を照射して蛍光強度を測定し特異性の有無を確認した。



Scheme 2

Table 1. DNA sequences used, from the 5' end to the 3' end

strand name	sequence	T _m (°C)
G10-c20M	5'-GGG GGG GGG GGG CGG CCG CGC ACG TCC TCC-3'	80.1
c20M-G10	5'-CAG CCG GGC CTG CGC CGC CTG GGG GGG GGG-3'	80.1

T = thymine, A = adenine, C = cytosine, G = guanine

3. 結果および考察

3-1 GMA-Latex の検討

3-1-1 IR による構造確認

GMA-Latex およびポリスチレンの IR 結果を Fig. 3 に示す。

GMA-Latex のスペクトルから、 1729cm^{-1} にカルボニル基の吸収が見られ、 $1117, 1150\text{cm}^{-1}$ にはエステルの逆対称伸縮の吸収が見られた。さらに、 1258cm^{-1} にはエポキシ基の環の対称伸縮が見られたことから、GMA が修飾されていると判断した。

3-1-2 エポキシ基の定量

滴定法の結果を Fig. 4 に示す。pH10.5 を当量点とし、下記の(1)式に代入し計算した。

$$[\text{Ep}] = \frac{(B - S)N}{10W} \quad (\text{当量}/100\text{g}) \quad (1)$$

[Ep] : エポキシ基の濃度

B : ブランクに対する滴定量

S : 試料溶液に対する滴定量

N : 滴定溶液の規定度

W : 試料重量

DNA を加えると強度が大幅に増加することから、プライマー同士による非特異的な反応はほとんどおこっておらず、粒径の変化及び吸光度の変化は、DNA を架橋とした凝集反応によるものだと考えられる。

4. 結言

IR スペクトルより、GMA-Latex の構造を確認し、滴定法により Latex 表面のエポキシ基の濃度は 1.60×10^{-2} [当量/100 g] であることが確認された。また、IR により DNA-Latex の構造を確認した。その結果、プライマーが感作されていることが確認された。

凝集反応により粒径の増大及び、吸光度の値の増加が見られた。また、反応の特異性の確認により、粒径及び吸光度の変化は、Latex に感作させたプライマー同士による非特異的な反応ではなく、DNA が架橋となった凝集反応によるものだと示唆された。

5. 参考文献

- 1) 松下 正明(編)：臨床精神医学講座 S9 アルツハイマー病，中山書店，(2000)，346
- 2) 柳沢 勝彦：老年精神医学雑誌，第 11 巻第 7 号 (2000)，783-790
- 3) Evrim Banu Altintas, Adil Denizli : *International Journal of Biological Macromolecules* ,38 (2006),99-106
- 4) 新保 正樹(編)：エポキシ樹脂ハンドブック，日刊工業新聞社，(1987)，248
- 5) M.Hatakeyama, et al. : *Colloids and Surface B*, 10 (1998),161-169
- 6) M.Hatakeyama, et al. : *Colloids and Surface B*, 10 (1998),171-178
- 7) M.Hatakeyama, et al. : *Colloids and Surface A*, 10 (1999),445-451
- 8) 中西 香爾：赤外線吸収スペクトル - 定性と演習 - ，南江堂，(1983)，42

Table. 2 Reaction Condition

Sample No.	Composition
1	DNA-Latex①
2	DNA-Latex②
3	DNA-Latex①+②
4	DNA 4 μ l
5	DNA 8 μ l
6	DNA 12 μ l
7	DNA 16 μ l
8	DNA 20 μ l

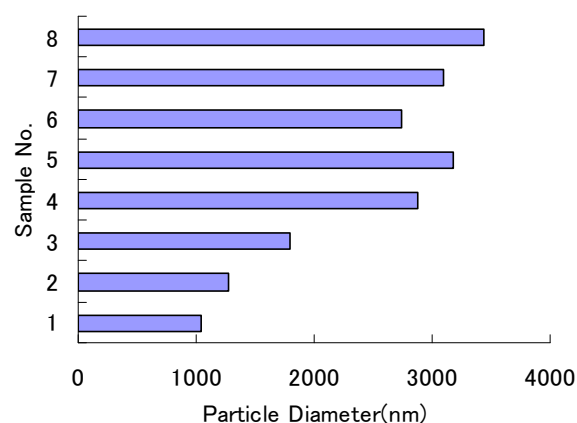


Fig. 6 Result of particle size determination by N5 submicron particle size analyzer

Table 3. Reaction Condition

Sample No.	Composition
1	Latex + SYBR Green I
2	Latex + SYBR Green I + DNA(2 μ l)
3	Latex + SYBR Green I + DNA(4 μ l)
4	Latex + SYBR Green I + DNA(8 μ l)
5	Latex + SYBR Green I + DNA(12 μ l)
6	Latex + SYBR Green I + DNA(20 μ l)

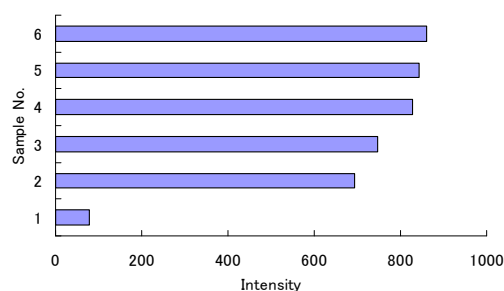


Fig. 7 Result of determination of absorbance ($\lambda = 1000$ nm) in Latex agglutination assay

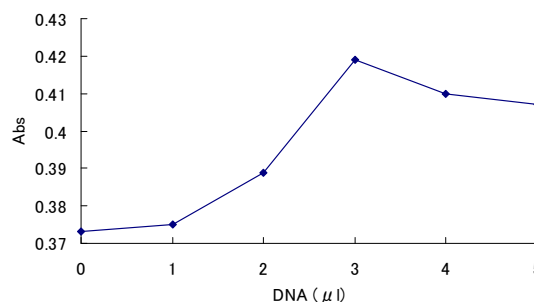


Fig. 8 Result of constation of nonspecific reaction