

アルツハイマー病における危険因子 ApoE4 遺伝子の検出と診断法への応用

日大生産工(院) ○秋谷 佳史

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 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 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。本研究では、アルツハイマー病の危険因子を早

期に診断し、治療を可能とするために迅速にアイソフォームの診断を可能とすることを目的とした。そこで、本学術講演では、遺伝子診断に用いるプライマーの特異性および PCR の条件検討を行なった結果を報告する。

【実験方法】

1. DNA 抽出

GFX Genomic Blood DNA Purification Kit(GE Healthcare)を用いて DNA の抽出を行った。まず、1.5 ml チューブにサンプルの 3 倍量の RBC Lysis Solution を添加し、室温で 5 分間インキュベートした。インキュベート後、16,000 rpm で 30 秒間遠心分離し、上精を約 20 μ l 残して除去し、ボルテックスにて沈殿物(白い血液細胞)を再懸濁させた。直ちに 500 μ l Extraction Solution を加え、再度ボルテックスにて再懸濁した。懸濁液を GFX Column に添加し、8000 rpm で 1 分間遠心分離した。新しいコレクションチューブに残留物の残った GFX Column をセットし、500 μ l Wash buffer を添加した。次いで、16,000 rpm で 3 分間遠心分離し、残留物の残った GFX Column をコレクションチューブにセットし、予め 70°C に温めておいた抽出バッファー(TE buffer)を 100 μ l 添加し、8000rpm で遠心分離し、抽出 DNA 得た。

2. 遺伝子増幅法

0.5 ml マイクロチューブ中で調製した PCR 反応溶液 100 μ l をサーマルサイクラーを用いて、1min, 72°C : 1min) \times 30cyc \rightarrow 72°C : 10min \times いて、94°C : 5min \times 1cyc \rightarrow (94°C : 1min, 64°C :

Study on ApoE4 gene analysis and its application to Alzheimer disease

Yoshifumi AKIYA, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

1cyc の温度条件で PCR を行なった。得られた増幅産物を 2.0%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、EtBr により染色した後、紫外照射用ポラロイドカメラを利用してゲルを撮影した。³⁾

3. PCR-RFLP 解析

サンプルのアイソフォームを決定すべく、Restriction fragment length polymorphism (RFLP)法を用いて実験した。RFLP 法とは制限酵素によって切断された DNA 断片の長さが、同一種内の個体間で異なる (多型を示す) ことを検出する手法である。まず、0.1 ml マイクロチューブ中で調製した PCR 反応溶液 50 μ l をサーマルサイクラーを用いて、94°C : 5min \times 1cyc \rightarrow (94°C : 1min, 60°C : 1min, 70°C : 2min) \times 30cyc の温度条件で PCR を行なった。次いで、増幅産物に制限酵素 *Hha* I を添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート終了後、7.5%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動(80 mA, 1h)を行い、EtBr により染色した後、紫外照射用ポラロイドカメラを利用してゲルを撮影した。⁴⁾⁵⁾

【結果及び考察】

(1)PCR-RFLP 解析

文献に従い primer (Table1)を設計し実験方法で記述した操作を行った。制限酵素 *Hha* I で処理を行った後、SDS-PAGE による電気泳動を行った。

(2)PCR における条件の検討

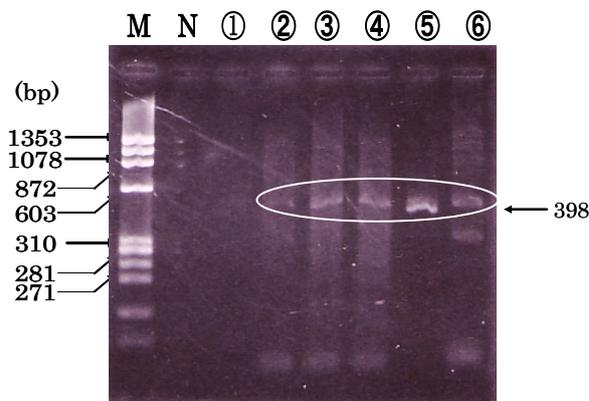
ApoE2,E3,E4 における変性部位(112 位と 158 位のアミノ酸の塩基配列)を含む 398bp ほど増幅させることをターゲットとした primer を設計(Table1)し、PCR における反応溶液および温度条件の検討を行ないアガロースゲル電気泳動を行なった。その結果を Fig.1 に示す。Lane⑤で目的とする位置(398 bp)に単一のバンドを検出した。

Table 1 Primers used for PCR amplifications in RFLP method

Primers	Primer sequence(5'-3')
ApoE (FOR)	ACAGAATTCGCCCGGCTGGTACAC
ApoE (REV)	TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA

Table 2 Primers used for PCR amplifications

Primers	Primer sequence(5'-3')
PA1	CGCGGACATGGAGGACGTG
PA3	GGCCTGCTCCTCCAGCTTG



Lane M : Marker

Lane N : Negative control

Lane ① : Containing DNA sample 0.5 μ l in PCR Reaction Mix

Lane ② : Containing DNA sample 1.0 μ l in PCR Reaction Mix

Lane ③ : Containing DNA sample 1.5 μ l in PCR Reaction Mix

Lane ④ : Containing DNA sample 2.0 μ l in PCR Reaction Mix

Lane ⑤ : Containing DNA sample 2.5 μ l in PCR Reaction Mix

Lane ⑥ : Containing DNA sample 3.0 μ l in PCR Reaction Mix

Fig.1 Result of agarose gel electrophoresis

【参考文献】

1)柳澤勝彦, 老年精神医学雑誌 第 11 巻第 7 号, (2000), 783-789

2)松下正明 総編集 臨床精神医学講座 S9 アルツハイマー病 中山書店

3)水谷英理子, 修士論文, 日本大学大学院生産工学研究科, (2004)

4)James E, Hixson and Daniel T, *Journal of Lipid Research*, 31, (1990), 545-548

5)日本臨床化学界関東支部 監修 遺伝子操作技術マニュアル 医学書院