アルツハイマー疾患におけるアポＥの遺伝子多型に関する研究

日大生産工（院）　○秋　谷　佳　史
日大生産工　　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(Aβ)、タウ蛋白、アポリポ蛋白(ApoE)が関係しており、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ε2,ε3,ε4 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、ε4 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。この、ApoE4 は Aβと結合することで AD 発症の原因の一つである Aβの凝集性を増加させ、アミロイド繊維化を促進させることがわかっている。

そこで本研究では、AD の危険因子である E4 遺伝子に注目した。E4 遺伝子の検出薬を開発し、AD の迅速診断を可能とさせ、早期に治療を開始できるようにすることを目的とした。

本発表では、ApoE4 の遺伝子診断に用いるプライマーの特異性および PCR の条件検討と、Latex 試薬の作製について報告する。

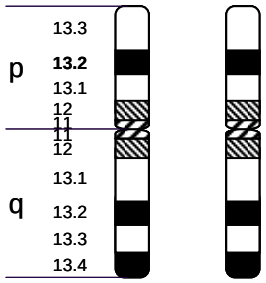

Fig. 1 Chromosome 19

【実験方法】

1. PCRによるTarget遺伝子の増幅とシークエンサーによる塩基配列の確認

血液から鋳型となる白血球 DNA の抽出を GFX Genomic Blood DNA Purification Kit(GE Healthcare)を用いて行った。抽出した DNA の吸光度を波長 260nm と 280nm で測定し、純度を以下の式(1)で求めた。

$$純度=A_{260}/A_{280} \quad (1)$$

この抽出 DNA より PCR を行い Target 遺伝子の増幅を行った。

PCR を行うにあたって、設計したプライマーの塩基配列を Table.2 に示す。

反応は 94℃：5min×1cyc→(94℃：1.5min, 62℃：1.5min, 72℃：1.5min)×30cyc→72℃：10min×1cyc の温度条件で PCR を行なった。得られた PCR 産物を 2.0%アガロースゲルで電気泳動を行った。EtBr で染色した後、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。得られたバンドには非得意的なバンドが見られたため、SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製した。精製前、と精製後

Study on ApoE4 gene and its application to diagnosis of Alzheimer disease

Yoshifumi AKIYA, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

の結果を Fig.1 に示す。その後、遺伝子解析システム CEQ8800(BECKMAN COULTER)でサンプルの塩基配列を確認した。

2.GMA(Glycidyl methacrylate)修飾 Latex の作製

DNA 感作にあたって、GMA-Latex が必要となるため、文献に従い作製した。作製した Latex を KBr 錠剤法にて FT-IR(Bruker Optics)で測定した。測定条件を以下に示す。測定レンジ 400-4000cm^{-1}、分解能 4cm^{-1}、積算回数 200 回で測定した。測定後、非修飾 Latex と GMA 修飾 Latex の違いについて検討した。[1)]

【結果及び考察】

1. 測定した吸光度の結果を Table.1 に示す。得られた吸光度の値から、DNA の純度を求めた。

$$A_{260}/A_{280} = 1.6$$

純度の高いものは、A_{260}/A_{280} = 1.8～2.0 であり、やや純度の低いものとなった。様々なプライマーを用いて検討した結果、PA1,PA2 の組み合わせで目的部位と思われるバンドを検出した。しかし、非特異的なバンドも検出されたため、精製を行いシークエンスしたところ、目的部位ではなく 5 番染色体の一部が増幅していることがわかった。そのため、再度条件の検討見直しが必要である。

2.文献 [1)]よりオキシランの吸収は 910cm^{-1} に現れることがわかっている。測定の結果、907cm^{-1} に吸収が得られた。さらに、3300cm^{-1} 付近にブロードな吸収が見られることから-OH 基の存在が考えられる。文献値よりわずかに低波数シフトしていることから、オキシラン環が、この-OH 基の影響を受けていると考えられる。また-OH 基の吸収が見られた原因として、反応系に水が残っており、この水分子がオキシラン環の活性メチレンに求核攻撃を行うことで起こるオキシラン環の解裂に伴いジオールの形として現れたものだと考えた。 また、シフトの幅が僅かなことから、全てのオキシラン環が解裂したわけではなく一部のものが解裂してしまったと考えられる。

Table 1. Determination of absorbance

	260(nm)	280(nm)
Blank	0.056	0.044
Sample	0.12	0.075

Table.2 Sequence of Primers

Primer	Sequence(5'-3')
PA1	CGCGGACATGGAGGACGTG
PA2	GCCCATCTCCTCCATCCGC
PA3	GGCCTGCTCCTCCAGCTTG
PA4	CACACTCGTCCTGGCTCTGTC
PA5	GCGGTACTGCACCAGGCGGC
NPE1	ATCCCCATCTCGCCCGCCCCATCCCAGCCCTTC
NPE2	CGTGGGGTCGCATGGCTGCAGGCTTCGGCGTTC

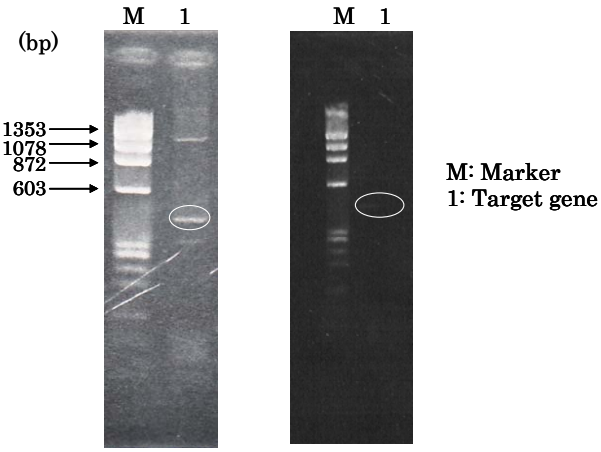

Fig. 2 Result of agarose gel electrophoresis and its purification

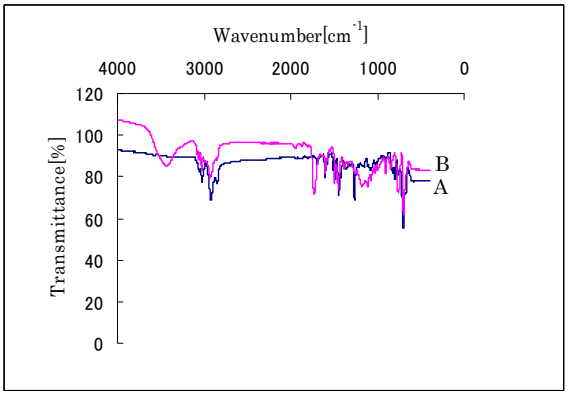

Fig. 3 FT-IR spectra of Latex particles
Spectra A Non-modified Latex particles
Spectra B GMA-modified Latex particles

【参考文献】

1) Evrim Banu Altintas *et al.*, International Journal of Biological Macromolecules 38 (2006) 99-106