

アルツハイマー型痴呆症発症における遺伝子機能解明のための 新規DNA解析法の研究

Development of New Technology for Analysis of Function for Caused Gene of Alzheimer Disease

代表研究者 神戸薬科大学助教授

馬場嘉信

Associate Professor, Kobe Pharmaceutical University

Yoshinobu BABA

New technology based on capillary electrophoresis was developed for the analysis of apolipoprotein E (apoE) gene, which is one of causing genes for Alzheimer disease. Common apoE polymorphisms are determined by type 2, 3, and 4 alleles. This polymorphism results in six apoE genotypes (E2/2, E3/3, E4/4, E2/3, E2/4, and E3/4). Risk for Alzheimer's disease increased from 20 % to 90 % with increasing number of apoE4 alleles. The DNA sample for apoE genotyping was prepared by PCR amplification of apoE from human genomic DNA, cleavage with *Hha* I restriction enzyme, and applied to the new technology developed here. The result demonstrates that apoE genotyping is achieved within only 10 min by the separation and simultaneous detection of multicolor-labeled DNA fragments, that is, both 48- and 72-bp DNA fragments (apoE4/4 genotype), both 48- and 91-bp fragments (apoE3/3 genotype), and both 48-, 72-, and 91-bp fragments (apoE3/E4 genotype). In conclusion, new technology becomes a powerful tool for gene diagnosis of Alzheimer's disease through apoE genotyping with high-speed and high-resolution.

1. 研究目的

高齢化社会を迎えるにあたり、アルツハイマー病に代表される痴呆症の原因遺伝子を解明し、原因遺伝子の多型解析による遺伝子診断システムを開発することは、痴呆症を治療あるいは予防し、老後を快適に送るために極めて重要な課題である。

1991年のヒトゲノム解析計画の開始に伴いアルツハイマー病の原因遺伝子が解明されつつあり、既に、第21番染色体のβアミロイドタンパク質前駆体遺伝子および第19番染色体のアポリポ蛋白E遺伝子(APOE)などが原因遺伝子として同定されている。

これらの中でもAPOEは、その対立遺伝子の一つであるE4と、家族性および孤発

性晩期発症型アルツハイマー病(60才以上で発症)の発症との関連が1993年に証明され、さらに、1994年には孤発性早期発症型アルツハイマー病(60才以下で発症)の発症との関連も証明されるにいたり、アルツハイマー病の最も重要な原因遺伝子として一躍脚光をあびる存在となった。従って、APOEの多型解析による遺伝子診断が、高齢化社会における社会的要求である痴呆症の早期診断・早期予防を実現するものとして非常に注目を集めている。

本研究においては、APOEの多型解析を高速化・高感度化するためにキャピラリー電気泳動による新規DNA解析法を開発することを目的とする。本研究の特色は、高速DNA分析法であるキャピラリー電気

泳動と高感度DNA検出法であるレーザー誘起キャピラリー振動法およびレーザー蛍光検出装置とを結合し、従来法の10倍以上の高速化、RI法以上の高感度化を達成できるアルツハイマー病の原因遺伝子解析システムを開発するところにある。このようなシステムの開発は、我々が世界に先駆けて着手するものである。

2. 研究経過

本研究では、以下のような内容で研究を進めた。アルツハイマー病の原因遺伝子を解析するために、キャピラリー電気泳動によるAPOEの多型解析の条件を検討した。図1上図に示すように、APOEは、E2, E3, E4の3種類の対立遺伝子を持つので、下図に示す6種類の遺伝的多型を有することになる。これらのうち、特にE4/E4のホモ接合体がアルツハイマー病発症の危険率が高いことが報告されている。

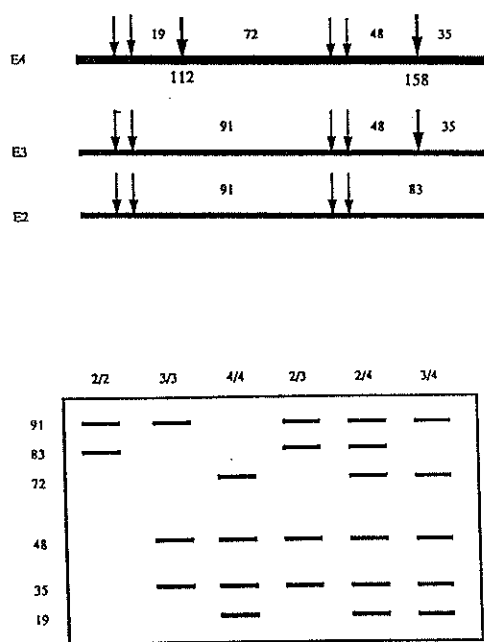


図1 アポリポタンパクE遺伝子の多型とゲル電気泳動による解析パターン

まず、APOEの多型部位をPCRにより増幅し、制限酵素(*Hha* I)により切断し、APOEの多型解析用サンプルを調製した。キャピラリー電気泳動によりAPOE多型を解析する際の最適条件決定のための基礎実験を行い、アルツハイマー病の原因遺伝子多型を迅速にかつ高い分解能で解析できる条件を確立した。

上記のキャピラリー電気泳動で解析した遺伝子を高感度で検出するために、レーザー誘起キャピラリー振動法およびレーザー蛍光検出装置を開発した。この方法は、それぞれの対立遺伝子を高感度で検出可能な新規方法論である。まず、DNA検出に最適なレーザーを決定する。次に、レーザーにより誘起されたキャピラリーの振動あるいは蛍光を検出するための装置を開発した。これらの実験により、アルツハイマー病の原因遺伝子であるAPOEの多型を高感度で検出するための新規方法を確立した。

上記で検討した遺伝子解析法であるキャピラリー電気泳動と遺伝子検出法であるレーザー誘起キャピラリー振動法およびレーザー蛍光検出装置を有機的に結合したシステムを構築した。このシステムを用いた、APOE多型解析における条件検討を行った。さらに、アルツハイマー病の遺伝子診断における速度・再現性・精度などについて検討した。以上の研究を基礎に、キャピラリー電気泳動の迅速性、高感度を兼ね備えたアルツハイマー病の高性能遺伝子解析システムを開発した。

3. 研究成果

ヒト・ゲノムDNAをテンプレートとして、アポリポ蛋白E遺伝子の多型部分である112および158コドンを含む部分を増幅した。5'側プライマーは

5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' を、3' 側プライマーは 5'-ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACA C-3' を用いた。PCRは、最終体積を100 μ Lとして行った。1.0 μ gのテンプレートDNAに、2種のプライマーをそれぞれ0.1 μ M加えた。その他は上記と同様にして反応溶液を調製した。1サイクルの反応は、熱変性を95 $^{\circ}$ Cで1分、アニーリングを60 $^{\circ}$ Cで1分、伸長反応を70 $^{\circ}$ Cで2分とし、30サイクルの反応を繰り返し、244塩基対のDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片を含む溶液に、制限酵素*Hha*I (5 units)を加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。

アポリポ蛋白E遺伝子(*APOE*)は、第19番染色体の長腕に遺伝子座位があり、4個のエクソンと3個のイントロンから成る。この遺伝子には、3種類のアイソフォーム (E2, E3, E4) が知られており、これらは、エクソン4領域に存在する112番コドン (E2, E3: TGC; E4: CGC) および158番コドン (E2: TGC; E3, E4: CGC) の塩基配列に違いがある。*APOE*の遺伝的多型は、6種類 (E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4, E3/E4) 存在しており、E4/E4の多型がアルツハイマー型痴呆症の危険因子であることが証明された。上記のようなPCRにより、*APOE*のエクソン4の112番および158番コドンをカバーする領域を増幅し、*Hha*I制限酵素を用いて切断し、キャピラリー電気泳動により解析した。*Hha*I制限酵素は、GCGC配列を認識し切断する酵素なので、E2, E3, E4のアイソフォームを識別するのに利用することができる。このような方法を制限酵素断片長多型 (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism)解析と呼ぶ。

アルツハイマー病の遺伝子診断のためのPCR反応生成物は、極微量しか得られ

ないので、これを高感度で検出するために、キャピラリー電気泳動用のレーザー誘起キャピラリー振動法およびレーザー誘起蛍光検出装置を開発した。ここの装置が、アルツハイマー病の原因遺伝子解析および遺伝子診断に応用できるかどうかを調べるために、PCR反応生成物の分離条件の最適化について検討した。

図2に3人のヒト・ゲノムDNAから増幅した*APOE*のRFLP解析によるアルツハイマー型痴呆症の原因遺伝子解析および遺伝子診断の例を示す。図から明らかなよ

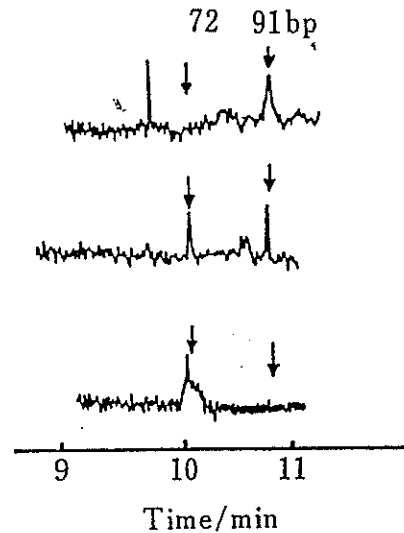


図2 キャピラリー電気泳動によるアポリポタンパクE遺伝子の解析

うに、上図に示す人は、91 bpのDNAのみのピークを与えるのでE3/E3のホモ接合体であり、下図に示す人は、72 bpのDNAのみのピークを与えるのでE4/E4のホモ接合体であることがわかった。さらに、中図に示す人は、両方のピーク (72 bp, 91 bp) を与えるので、E3/E4のヘテロ接合体であると判定できる。このように、キャピラ

リー電気泳動により得られる、91 bp以下のDNAのパターンを識別することにより、APOEの遺伝的多型を解析することが可能になった。この多型解析の結果から、E3/E3の遺伝的多型を有する人のアルツハイマー型痴呆症に対する危険率は20%、E3/E4の遺伝的多型を有する人のアルツハイマー型痴呆症に対する危険率は47%、E4/E4の遺伝的多型を有する人のアルツハイマー型痴呆症に対する危険率は90%、というように、アルツハイマー型痴呆症に関する遺伝子診断が可能になる。さらに、解析に要する時間は、わずか10分程度であり、従来のスラブゲル電気泳動と比べ大幅に時間を短縮することができた。

4. 今後の課題と発展

本研究の成果は、以下のような波及効果が期待される。本研究において開発したシステムは、アルツハイマー病の原因遺伝子解析および遺伝子診断だけでなく、アルツハイマー病以外の痴呆症、がんおよび成人病などの疾患の原因遺伝子の多型および変異の解析に応用することが可能である。また、このシステムを応用することにより、これらの疾患についての高性能遺伝子診断法の開発を行うことが可能である。

さらに、このシステムは、アルツハイマー病およびその他の疾患の遺伝子診断のみならず、PCR生成物解析、遺伝子マッピング、疾患原因遺伝子の同定、ヒト・ゲノムDNAシーケンシングなど、遺伝子の解析法として非常に幅広い応用が考えられる。

5. 発表論文リスト

1. Y. Baba, R. Tomisaki, and M. Tshako, Three-Dimensional Electropherogram for

the Separation of DNA Restriction Fragments Using Capillary Gel Electrophoresis with a Photodiode Array Detector, *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, 18(7), 1317-1324.

2. Y. Baba, R. Tomisaki, C. Sumita, M. Tshako, T. Miki, and T. Ogihara, Rapid Typing of Variable Number of Tandem Repeat Locus in the Human Apolipoprotein B Gene for DNA Diagnosis of Heart Disease by Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis*, **1995**, 16(8), 1437-1440
3. 馬場嘉信、キャピラリー電気泳動によるヒト・ゲノム解析と遺伝子診断、*分析化学*, **1995**, 44(11), 883-893.
4. 角田ちぬよ、馬場嘉信、DNA診断へのキャピラリー電気泳動の応用、*生物物理化学*, **1996**, 40, 161-165.
5. Y. Baba, Capillary Affinity Gel Electrophoresis: New Tool for Detection of the Mutation on DNA, *Mol. Biotechnol.*, in press.
6. Y. Baba, Analysis of Disease-Causing Genes and DNA Based Drugs by Capillary Electrophoresis: Towards DNA Diagnosis and Gene Therapy for Human Diseases, *J. Chromatogr. B.*, in press.
7. 馬場嘉信、「アルツハイマー病発症の遺伝子 毛細管使い数分で識別」*毎日新聞*, **1995**, 3. 26.
8. 馬場嘉信、「遺伝子診断 短時間で痴ほう症で確認」*日本経済新聞*, **1995**, 5. 22.
9. 馬場嘉信、「新規DNA解析システムを開発次世代の遺伝子診断法に」*科学新聞*, **1995**, 11.10.