

## 遺伝子検査学実習に応用するための multiplex-polymerase chain reaction による ALDH2 遺伝子多型 1 チューブ判定法の確立

行 正 信 康\*

**[要 旨]** ヒトや微生物の遺伝子を解析し診断・治療・予防に役立てる遺伝子検査の開発が進み、医療技術関連の学生教育に取り入れることが必須となった。今後はゲノム医療に対応できるレベルの臨床検査技師育成が必要になる。aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) 遺伝子一塩基多型検出は、polymerase chain reaction (PCR) により比較的簡単に行うことができるため、遺伝子多型の理解と PCR 技術の習得を目的に多くの施設で取り入れられている実習項目である。しかし、従来法では反応液準備の煩雑さ等が影響し、しばしば判定できないことがある。今回、筆者は、1 チューブの反応で ALDH2 遺伝子多型判定が可能な multiplex-PCR 検出法を構築した。本法では、1 チューブ反応にて多型特異的に増幅長の異なる PCR 産物が生じ、3 種類の遺伝子型を明確に判定することが可能であった。本法は実習効率ならびに結果判定確実性の向上により教育効果を高めることに貢献できる。

**[キーワード]** 遺伝子検査学実習、一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs)、aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2)、multiplex-polymerase chain reaction (PCR)、1 チューブ反応

### 諸 言

DNA を対象とする分子生物学と解析技術の進歩によりヒトゲノム全塩基配列が解読された。さらに、個人の体質差など遺伝的多様性を規定する一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) の情報が急速に集積された。このような状況の中で、ヒトや微生物の遺伝子を解析し診断・治療・予防に役立てる遺伝子検査の開発が進み、医学や医療技術関連の学生教育に取り入れることが必須となった。遺伝子検査に携わる技術者の責任は重く、基本的な技術・知識を確実に習得することが大切である。しかし、現在の臨床検査教育全般に共通することではあるが、測定法のキット化や自動化が進み、基本的な検査技術を習得させること

が困難となる傾向にある。基本的な検査技術の習得は、測定法上の問題点を明らかにし、問題解決の糸口となる観点から重要である。遺伝子検査としては最も広く浸透した技術として、その理論と操作を習得すべき項目に polymerase chain reaction (PCR)<sup>1)</sup> が挙げられよう。

ミトコンドリアに存在する aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) の遺伝子座は第 12 番染色体にあり、エクソン 12 における SNP (g104a) (rs 671) によるアミノ酸置換 (Glu487Lys) がアルデヒド分解活性に影響し、飲酒後のアルコール代謝能力に関与することが明らかになっている<sup>2)</sup>。活性型遺伝子産物から形成される酵素は N (normal) タイプで遺伝子型は ALDH2\*1、不活性型遺伝子産物から形成される酵素は D (defective) タイプで遺伝子型

\*埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科 検査技術科学専攻 yukimasa-nobuyasu@spu.ac.jp

は ALDH2\*2 と表現されている<sup>3)</sup>。この ALDH2 遺伝子 SNP 検出には、amplification refractory mutation system (ARMS) 法を用いる PCR により比較的簡単に行うことができる<sup>3,4)</sup>。そのため、学校教育の場において、自らの検体を用いた実習が可能で、表現型と遺伝子型、遺伝子多型の理解、PCR 原理および技術の習得を目的に多くの施設で取り入れられている遺伝子検査項目である。しかし、PCR 実施経験に乏しい学生においては、2種類のプライマーセットによる検出反応は、特に、学生の検出原理の理解が完全ではない状況で実習を開始せざるを得ない場合、反応試薬等の準備は煩雑な操作であり、反応試薬の不均一性に起因するようなトラブルがしばしば生じる。そこで、今回、1 チューブの反応で ALDH2 遺伝子多型判定が可能な multiplex-PCR 検出系を構築した。反応試薬調製の簡易化および結果判定の明確化を図ることにより遺伝子検査学実習の効率化をもたらす、PCR 理論・技術の確実な習得の一助とすることを目的とする。

### I. 対象と方法

対象は、2002～2007年の間に昭和医療技術専門学校における遺伝子検査学実習教育を目的に募った昭和大学病院臨床検査部職員ボランティア

(20名)から採取・抽出し、連結不可能匿名化して-20℃で保存してあったゲノム DNA を適宜使用した。ゲノム DNA の抽出は、EDTA 採血した血液を 0.2% (w/v) NaCl 溶液を用いた溶血法により白血球を分取し、白血球浮遊液から QIAamp DNA Blood Mini kit<sup>®</sup> (QIAGEN 社)を用いた。

1 チューブの反応で ALDH2 遺伝子多型判定が可能な multiplex-PCR 検出系を構築するため、ALDH2 遺伝子 SNP 配列に反応する新たなセンスプライマーと下流領域にアンチセンスプライマーを設定し従来法<sup>3)</sup>とは異なる別の増幅領域の PCR を設定した。さらに、この新 PCR プライマー (P-3G, P-3A and P-4) と従来法のプライマー (P-1 and P-2C, P-2T) を SNP 特異的に各々増幅産物が生じるような組合せで混合して 2 系列の multiplex-PCR を設定した。1 チューブ法 ① は、P-1 と P-3A の混合センスプライマーと P-2C と P-4 の混合アンチセンスプライマー、1 チューブ法 ② は、P-1 と P-3G の混合センスプライマーと P-2T と P-4 の混合アンチセンスプライマーの組合せで実施した。実際の学生実習にはいずれか 1 系列を採用すればよいが、2 系列実施できるように準備しておけば、再検査が必要な場合の判定に利用できる。これらの ALDH2 遺伝子 PCR 増幅領域を図 1 に、使用したプライマーの塩基配列

	P-1 ⇒		
42301	<u>ctcgtttcaa</u>	<u>attacagGGT</u>	CAACTGCTAT GATGTGTTTG GAGCCCAGTC ACCCTTTGGT
			P-3G or A ⇒
42361	GGCTACAAGA TGTCGGGGAG TGGCCGGGAG	TTGGGCGAGT	<u>ACGGGCTGCA</u> GGCATACACT
	⇐ P-2C or T		
42421	<u>GAAGTAAAA</u>	<u>Ctgtgagtgt</u>	gggacctgct gggggctcag ggcctgttgg ggcttgaggg
	<u>A</u>		
42481	tctgctggtg gctcggagcc tgctggggga	ttgggtctg	ttgggggctc ggggcctgcc
		⇐ P-4	
42541	agaggttcag gacctgccgg	ggactcaggg	<u>cctgctggaa</u> <u>gttcaggacc</u> <u>tgctgggat</u>

図 1 Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2) 遺伝子 エクソン 12 隣接領域塩基配列とプライマー  
下線：設定プライマー部位、大文字表示：エクソン 12、42421：G/A 多型部位  
ヌクレオチド番号：NCBI Reference Sequence; NG\_012250.1 より引用

とその組合せを表 1 に示し、判定パターンの簡略図を図 2 に示した。反応試薬には、TaKaRa Taq™(TaKaRa 社)を使用し、終濃度 0.2mmol/l dNTP 混合液、各 0.4mmol/l プライマー、1 U Taq DNA ポリメラーゼ、サンプル鋳型 DNA 量 100~500ng、反応液量 25 $\mu$ l の系で、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング (55~62°C) 30 秒、伸張反応 72°C 30 秒を 30 サイクルで実施した。アニーリング温

度と Mg 濃度 (0.75~1.5mmol/l) は適宜変更して反応条件の設定を行った。サーマルサイクラーは Quick Bath-0225A(ThermoGen 社)を使用した。増幅産物の検出には 5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動あるいは 3%アガロースゲル電気泳動を施し、エチジウムブロマイド染色、トランスイルミネーター下で観察し撮影記録した。

表 1 PCR プライマー塩基配列

従来法		
センスプライマー	P-1	5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3'
アンチセンスプライマー	P-2C P-2T	5'-CCACACTCACAGTTTTTCACTCC-3' 5'-CCACACTCACAGTTTTTCACTCT-3'
新法		
センスプライマー	P-3G P-3A	5'-GGCTGCAGGCATACACTG-3' 5'-GGCTGCAGGCATACACTA-3'
アンチセンスプライマー	P-4	5'-AGGTCCTGAACTTCCAGCA-3'
multiplex-PCR 1 チューブ法 ①		
センスプライマー	P-1 and P-3A (D type)	
アンチセンスプライマー	P-2C (N type) and P-4	
multiplex-PCR 1 チューブ法 ②		
センスプライマー	P-1 and P-3G (N type)	
アンチセンスプライマー	P-2T (D type) and P-4	

P-2C、P-2T 下線 (3'末端から 2 番目) : 選択性を高めるためのミスマッチ導入部

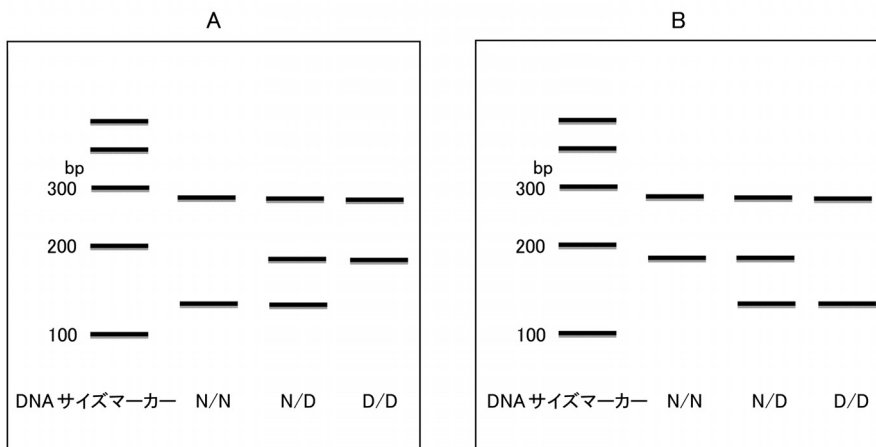


図 2 1 チューブ法判定パターン (略図)

- (A) 1 チューブ法 ① : N タイプ (P-1 - P-2C → 135 bp)、D タイプ (P-3A - P-4 → 188 bp)  
 (B) 1 チューブ法 ② : N タイプ (P-3G - P-4 → 188 bp)、D タイプ (P-1 - P-2T → 135 bp)  
 すべてのサンプルで P-1 と P-4 反応による 284 bp のコントロールバンドが出現

## II. 結 果

塩基配列特異的なアンチセンスプライマー (P-2C, P-2T) 反応の有無で判定する従来法の検出結果を図 3-A に、塩基配列特異的なセンスプライマー (P-3G, P-3A) 反応の有無で判定する新たに逆向きに設定した PCR の検出結果を図 3-B に示した。従来法ではアニーリング温度は 58°C が指示されているが、非特異的増幅バンドが多く認められるため (data not shown)、筆者はアニーリン

グ温度 60°C で実施している。しかし、依然として ALDH2 不活性タイプ のホモ接合体である D/D (\*2/\*2) タイプの検体に非特異的な増幅バンドがみられる場合がある (図 3)。

次に、従来法で ALDH2 活性型の N(\*1) タイプを検出するプライマーセット (P-1, P-2C) と、新法 PCR で ALDH2 不活性型の D(\*2) タイプを検出するプライマーセット (P-3A, P-4) との混合プライマーによる 1 チューブ multiplex-PCR (1 チューブ法 ①) を実施した結果、Mg 濃度 1.25mmol/l、

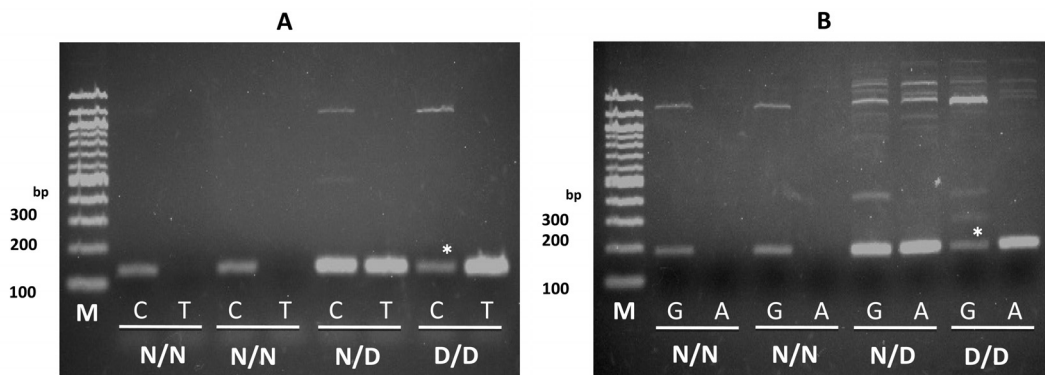


図 3 ALDH2 遺伝子多型判定結果

(A) 2 チューブ反応従来法 (135 bp) : C (P-1-P-2C → N タイプ)、T (P-1-P-2T → D タイプ)  
 (B) 2 チューブ反応新法 (188 bp) : G (P-3G-P-4 → N タイプ)、A (P-3A-P-4 → D タイプ)  
 M : DNA サイズマーカー (100 bp ladder)、\* : 非特異的反應、3% アガロースゲル電気泳動

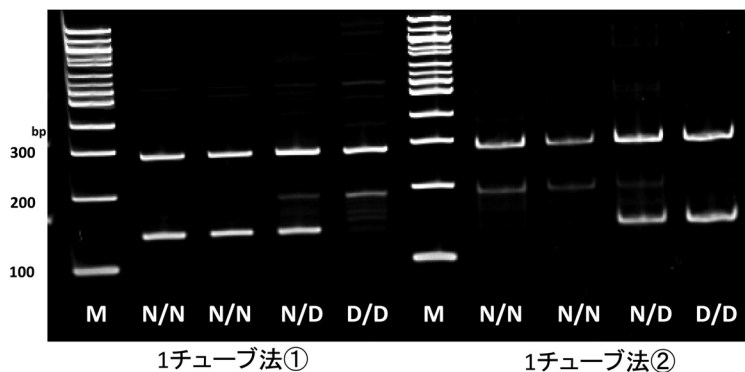


図 4 Multiplex-PCR 1 チューブ法 ALDH2 遺伝子多型判定結果

1 チューブ法 ① : N タイプ (P-1-P-2C → 135 bp)、D タイプ (P-3A-P-4 → 188 bp)  
 1 チューブ法 ② : N タイプ (P-3G-P-4 → 188 bp)、D タイプ (P-1-P-2T → 135 bp)  
 すべてのサンプルで P-1 と P-4 反応による 284 bp のコントロールバンドが出現  
 M : DNA サイズマーカー (100 bp ladder)、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動

アニーリング温度 55℃の条件で、非特異的増幅バンドはほとんどみられず、明確な判定が可能であった。さらに、従来法で ALDH2 不活性型の D(\*2)タイプを検出するプライマーセット(P-1, P-2T)と、新考案 PCR で ALDH2 活性型の N(\*1)タイプを検出するプライマーセット(P-3G, P-4)との混合プライマーによる 1 チューブ multiplex-PCR(1 チューブ法②)を実施した結果、Mg 濃度 1.25mmol/l、アニーリング温度 55℃の条件で、非特異的増幅バンドはほとんどみられず、明確な判定が可能であった(図 4)。

対象とした 20 検体の ALDH2 遺伝子型はすべて判定することができ、従来の 2 チューブ法の結果とすべて一致した。従来法では D/D(\*2/\*2)タイプに明らかな非特異的増幅がみられたが(図 3)、1 チューブ法では非特異的増幅が軽減した。

### III. 考 察

遺伝子を扱う検査として、病原微生物由来の DNA や RNA を特異的に検出する核酸検査はすでに定着しており、臨床検査の教育においても微生物学や免疫学の一部の項目として取り上げられることが多い。したがって、遺伝子検査学の到達目標としては、疾患の診断や治療段階において、ゲノムを解析する機会が確実に増加することを勘案すると、ゲノム医療に対応できるレベルの臨床検査技師育成が必要になる。これは、単に特定の核酸の存在を証明することにとどまらず、核酸塩基配列の違いを解析できることが重要である<sup>5)</sup>。特に、SNP を含む遺伝子多型ならびに遺伝子変異について理解し、検出できることが重要となる。しかし、すべての臨床検査技師養成施設に DNA シーケンサーなどを配備することは難しく、既存の設備で実施可能な項目と解析方法を選択する必要がある。また、大人数で行う学内実習においては、時間的な制約があり、教育経費の面での工夫も余儀なくされる。

このような事情を鑑みると、ALDH2 遺伝子の SNP 解析は、比較的簡単な ARMS 法による PCR を採用することが可能であり、多くの教育施設で採用される遺伝子解析項目となっている。同じ対

象遺伝子で PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP)や PCR-single-strand conformation polymorphism(SSCP)を実施することができる。さらに、次々と開発される新しい測定法への応用が可能である<sup>6)</sup>。いずれの方法も PCR がその基本であり、確実な PCR の実施が判定結果を左右する。しかし、ALDH2 遺伝子多型解析を PCR 経験未熟な学生が行うと、かなりの頻度で最終判定に至らないことを経験する。せっかく実施した検査の結果が判定できないと興味が半減するような事態にもなりかねない。従来の方法では、1 検体につき 2 種類(2 チューブ)の PCR を行うため、反応溶液の準備が 2 倍になり調製ミスの確率も 2 倍になる。そこで、今回、1 チューブの反応で ALDH2 遺伝子多型判定が可能な multiplex-PCR 検出系を構築した。

本法では、1 チューブ反応において増幅長の異なる PCR 産物(Nタイプ、Dタイプ特異的に 188 bp あるいは 135 bp)が生じ、バンドの有無で 3 種類の遺伝子型を判定することが可能であった。しかし、多型判定に重要な中間サイズ(188 bp)産物の増幅効率が弱く改善の余地は残されている。本法は Nタイプと Dタイプ判定のプライマーセットを変えることにより、2 種類の PCR 系列を組み立てることができる。1 回の実施で判定ができないような場合に再検査として別の組合せで実施することにより確実な結果判定を下すことが可能である。本法はすべての検体で PCR 増幅されるバンド(284 bp)が出現するため、PCR 評価のためのコントロールを用いる必要がない。大人数で実施する必要がある学内実習においては、反応チューブの数が従来法の 1/2 になることは、実習効率ならびに結果判定確実性の向上とコストパフォーマンスの面においても有利となる。さらに、教育上の利点として、本法開発過程で行った反応条件(アニーリング温度、Mg 濃度など)設定のための実験データを学生に提示することで、遺伝子検査に重要な PCR 技術を深く理解させることができると考えている。新しい遺伝子検査法を開発したり、既存の方法を改良したりすることができる臨床検査技師を目指した教育を到達目標とする場合、

遺伝子解析において基本中の基本である PCR の反応条件設定やプライマー設計の習得など身を持って体験することは非常に有用であり、筆者が考案した本法の理論的考察と反応条件による反応性の違いなどを併せて考察させることにより、一歩進んだ遺伝子検査教育が可能になると考えている。

本校では、保健医療福祉学部 1 年次の旧カリキュラム共通科目「共に学ぶ保健医療福祉」において、「飲めない体質」という課題についてテュートリアル学習が行われていた。この中では、ALDH2 遺伝子と飲酒行動との関連<sup>7)</sup>や、アルコール関連障害<sup>8)</sup>について言及したが、ALDH2 遺伝子解析は他学科・他専攻の学生にも実施させることのできる内容である。遺伝子多型による酵素活性の相違を、アルコールパッチテストによる表現型と遺伝子検査による遺伝子型との対応で指導することができ、今後の保健医療福祉科目の教育として、本法を利用した実習が役に立つと思われる。

#### IV. 結 語

新しく構築した 1 チューブの反応で ALDH2 遺伝子多型判定が可能な multiplex-PCR 検出系を遺伝子検査学実習の初期導入項目として採用することは、安定した検査判定結果を導き、実習時間の短縮とコストパフォーマンスの面において有用と思われる。また、遺伝子解析に重要な PCR 技術の習得に貢献するような教育が可能であり、既存の方法を自ら改良することができる臨床検査技師を目指した教育を到達目標とする場合、実際の検査法改良例として提示することが可能である。

#### 文 献

- 1) Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
- 2) Harada S, Agarwal DP, Goeede HW. Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese. *Lancet* 1981; 318: 982.
- 3) 石橋徳雄, 原田勝二, 谷村修也, 田口文子. アルデヒド脱水素酵素 2 の遺伝子型とアルコール飲用量との相関. *Jpn J Alcohol & Dependence* 1994; 29: 527-35.
- 4) 奥宮敏可. VII 遺伝子検査の応用. 3 核酸の塩基配列の変化(遺伝子変異・多型)を検出する方法. 監修 日本臨床検査学教育協議会, 編集 岩谷良則, 遺伝子検査学実習書. 東京: 医歯薬出版 2010: 79-97.
- 5) 行正信康. Polymerase chain reaction を用いた B 型肝炎ウイルス遺伝子簡易解析法の考案. *日本臨床検査自動化学会誌* 2012; 37: in-press.
- 6) 糸賀 栄, 内本高之, 根津雅彦, 朝長 毅, 野村文夫, 原田勝二, その他. アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) 遺伝子型判定法の比較検討. *アルコールと医学生物学* 2003; 23: 1-6.
- 7) 原田勝二. 飲酒行動と遺伝子. *公衆衛生* 1999; 63: 234-7.
- 8) 原田勝二. アルコール関連障害とアルコール依存症 アルコール依存症の成因論 アルコール代謝酵素(主に ALDH) 遺伝子との関連. *日本臨牀* 1997; 55: 346-50.