

## 遺伝子診断教育のための簡便な 毛髪形態(*EDAR*)及び耳垢型(*ABCC11*)遺伝子多型解析法

林田真梨子, 大田 智子, 増見 恭子, 村田 成範  
(武庫川女子大学薬学部)

### Simple SNP Genotyping of Hair Thickness-determining Gene *EDAR* and Human Earwax-type Gene *ABCC11* for Education of Genetic tests

Mariko Hayashida, Tomoko Ota, Kyoko Iwao-Koizumi, Shigenori Murata

*School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University  
Kyuban-cho, Koshien, Nishinomiya, 663-8179, Japan*

Recently, progress in molecular biology is being made in various fields such as biology, agriculture and medical and pharmaceutical sciences. Students graduating from not only pharmaceutical departments but also general high schools will be required to have knowledge of molecular biology techniques for understanding prevailing technologies. However, it is difficult to include such experiments in a curriculum for students at general high schools and universities because of safety aspect, expensive materials and experimental equipment and time consumed. This report introduces the convenient experimental methods on human DNA polymorphisms for the genotyping of the hair thickness-determining gene *EDAR* on the chromosome 2 and the earwax type gene *ABCC11* on the chromosome 16 using a PCR-RFLP method. This experiment enables each student to handle DNA safely. The total experiment time is less than 6 hours. The PCR-RFLP experiment proposed here is a suitable genotyping method to acquire molecular biological knowledge and techniques.

#### 緒 言

今日、あらゆる生命科学分野で遺伝子解析が適用されるようになってきた。遺伝子は生物に共通した情報であり、その研究分野は幅広く、生物学をはじめとして医療や法医学、考古学、農学など様々な分野で扱われ、病気の診断や治療といった医学的研究等に应用展開されている。しかし遺伝への知識不足から遺伝子差別、治療への過剰な期待などの誤解を招くことがある。その理由の一端として、中等教育において「遺伝」についての学習が十分ではなく、ゲノム科学の基礎が理解されていないことが挙げられる。その解決策として、中・高等教育の場で遺伝子診断を正しく理解させる機会、すなわち実際に遺伝子診断実験を体験するこ

とは大変有意義なことだと考える。

遺伝子診断実験を教材化する場合、いくつかの問題が生じる。まず第一に、どの遺伝子をターゲットにするかということである。教育の場であるため、病気に直結するような遺伝子は好ましく無い。また、現時点では機能不明な遺伝子をターゲットとする遺伝子解析は、結果から具体的なことが示されないので興味がそがれる。第二に、遺伝情報は「究極の個人情報」とも言われるように、その取り扱いには慎重を期さねばならない。特に生徒自身が被験者となる場合は細心の注意が必要である。第三に安全性の問題がある。実験操作自体に危険はないか、鋳型 DNA の採取は非侵襲的に安全に行えるか等を考慮しなくてはならない。以上の問題点を考慮して、本研究では毛髪形態(*EDAR*)

遺伝子及び耳垢型(*ABCC11*)遺伝子の二種の遺伝子を実習対象遺伝子に選定した。毛髪形態遺伝子は毛髪の太さに影響を与える遺伝子であり、2番染色体上の*EDAR*遺伝子のDNA多型部位(Val 370 Ala (T → C), rs3827760)に存在することが徳永らにより報告されている<sup>1),2)</sup>。この一塩基多型はアジア人特有であり、変異型アレルCは毛髪を太くさせることが示唆されている。耳垢型遺伝子は耳垢の湿型、乾型を決定する遺伝子であり、16番染色体上の*ABCC11*遺伝子のDNA多型部位(Gly 538 Ala (G → A), rs17822931)に存在することが新川らにより報告されている<sup>3),4)</sup>。さらに、乾型がAA型(アデニン-アデニン型)、湿型がGG型(グアニン-グアニン型)またはGA型(グアニン-アデニン型)であり、乾型耳垢型をもつヒトは全員、変異型アレルAを2個持つことが確認されている。DNA試料は簡便さと安全性・非侵襲性を配慮して毛髪を用いることとし、生徒自身の試料を用いることで、実験に対する興味・関心をより強く喚起できることを期待した。生徒自身がサンプリングした毛根は、ナンバリングして完全匿名化した後、シャッフリングして不特定の他人由来の試料を実験に用いることにより、ヒトの遺伝子を扱ううえで個人情報保護の重要性をより強く認識させることを重視した指導を行う。遺伝子多型解析法は比較的方法が簡便でかつ正確性の高いPCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素切断片長多型)法を採用することとした。PCR-RFLP法とは、塩基配列に変異が起こっている部位が制限酵素認識部位となる場合、制限酵素により切断したDNA断片の長さが遺伝子型により変わることを利用した検出法である。従来のPCR-RFLP法による遺伝子解析の流れは、①生体試料からのDNA抽出②PCR③制限酵素反応④電気泳動となる。しかし①生体試料からのDNA抽出の過程では操作が複雑かつ作業に長時間を要し、また高速回転能力を有する遠心分離器など特別な機器が必要となり、実施が困難となる。そこで本研究では以前開発したDNA抽出を行わないダイレクトPCR法<sup>5),6),7)</sup>を使用し、検討することとした。DNA抽出を省略することにより生体試料採取から遺伝子多型解析に至る一連の実験を半日で行うことができ、高校生対象の実習には非常に有益である。

以上の条件のもとで、高等学校における遺伝子

診断実験の教材化を目標とし、検討を行った。

## 実 験

### 1. 実験機器及び試薬

一連の実験に使用した器具及び機器：サーマルサイクラー (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700), 遠心器(WELTEC Corporation, E-CENTRIFUGE), マイクロピペッター (ニチリョー), マイクロチューブ(BIO-BIK), グリセロール (WAKO), アガロースゲル(AMRESCO)

### 2. 実験材料と方法

#### 2.1 毛根の採取

生徒実習には、安全で非侵襲的な鑄型DNAの採取方法として、毛根を採用した。頭部より注意深く毛髪を抜き、毛根部分がついていることを確認する。毛根をPCRチューブに直接挿入しても反応は出来るが、筒状に加工したプラスチックフィルム製(特殊PET/PE, 厚み56µm)のチューブを利用した。毛根部を下にして毛髪を内装することにより保存が容易となり、PCR反応時にはプラスチックチューブから取り出し、PCRチューブに直接差し込み使用できるので非常に簡便である(Fig. 1A参照)。また、長期保存も可能である(実績約1年)。

#### 2.2 PCRによる毛髪形態*EDAR*遺伝子及び耳垢型*ABCC11*遺伝子の増幅

##### 1) DNAポリメラーゼ及びPCRプライマー

生体試料にはPCR反応を阻害する様々な物質が含まれていることが知られている。本実験では阻害物質の影響を受けにくいDNAポリメラーゼであるKOD FX (東洋紡績社製)キットを遺伝子増幅に用いた。PCR-RFLP法のプライマーは、*EDAR*においては新たに作成し、*ABCC11*においては参考文献8)に記載されているプライマー配列を使用した。

・毛髪形態*EDAR*遺伝子(増幅断片長: 256 bp)

Forward primer (EDAR-RFLP-F):

5'-AGGTCTTAGCCCCACGGAAGTCCAT-3'

Reverse primer (EDAR-RFLP-R):

5'-GGACTCCACAGCATCCAACCGCTC-3'

・耳垢型*ABCC11*遺伝子(増幅断片長: 326 bp)

Forward primer (ABCC11-RFLP-F):

5'-TGCAAAGAGATTCCACCAGTT-3'

Reverse primer (ABCC11-RFLP-R):

5'-AAGGTCTTCATTTTCTAGACAGC-3'

## 2) Duplex PCR 反応

PCR 反応は、二種の遺伝子を同時に行った。2x KOD FX buffer 12.5 $\mu$ l, dNTPs mixture (2mM each) 2.5 $\mu$ l, *EDAR*-RFLP-F (10  $\mu$ M) 1 $\mu$ l, *EDAR*-RFLP-R (10  $\mu$ M) 1 $\mu$ l, *ABCC11*-RFLP-F (10  $\mu$ M) 1 $\mu$ l, *ABCC11*-RFLP-R (10  $\mu$ M) 1 $\mu$ l, KOD FX 0.5 $\mu$ l, 滅菌蒸留水(DW) 5.5 $\mu$ l を加え、反応液全量を 25 $\mu$ l とした。反応サイクルは、予備加熱 95 $^{\circ}$ C 10 分の後、変性 98 $^{\circ}$ C 10 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長反応 74 $^{\circ}$ C 30 秒のサイクルを 40 サイクル行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 2 分で伸長反応を完成させた後、16 $^{\circ}$ C に保った。

## 2.3 制限酵素処理及び電気泳動法による消化産物の確認

### 1) 制限酵素処理

二種の遺伝子の増幅産物が混在した PCR 反応液を用いて、制限酵素反応を行った。この反応では、それぞれの遺伝子ごとに反応液を調製する。

毛髪形態 *EDAR* 遺伝子：PCR 反応液 6 $\mu$ l に 10  $\times$  Buffer4 2 $\mu$ l, *Fnu4H I* (New England Biolabs) 0.25 $\mu$ l, 滅菌蒸留水(DW) 11.75 $\mu$ l を加え全量を 20 $\mu$ l の反応液とする。

耳垢型 *ABCC11* 遺伝子：PCR 反応液 6 $\mu$ l に 10  $\times$  H Buffer 2 $\mu$ l, *Dde I* (東洋紡績) 0.25 $\mu$ l, 滅菌蒸留水(DW) 11.75 $\mu$ l を加え全量を 20 $\mu$ l の反応液とする。

反応は GeneAmp PCR System 9700 を使用し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。

### 2) 消化産物の確認

消化産物 10 $\mu$ l を EZ-VisionBPB (AMRESCO) 1 $\mu$ l および 60% グリセロール 1 $\mu$ l と混合し、3% アガロースゲルにより 100V で約 30 分間の電気泳動を行った。泳動バッファーは 1  $\times$  TAE バッファーを使用した。泳動後のゲルは、直接、紫外線トランスイルミネーター (Bio-Rad Laboratories) 上で観察した。

## 3. 表現型の測定法

### 1) 毛髪形態

デジマチックインジケーター (Mitutoyo) を使用し、毛髪の太さを測定する。毛髪を 3 本抜き、毛根から 2cm 離れた部位の太さを測定し、平均値を取る。

### 2) 耳垢型

表現型は湿型および乾型の二種類がある。外見

から判断が可能のため測定する必要はなく、自己判断により決定する。

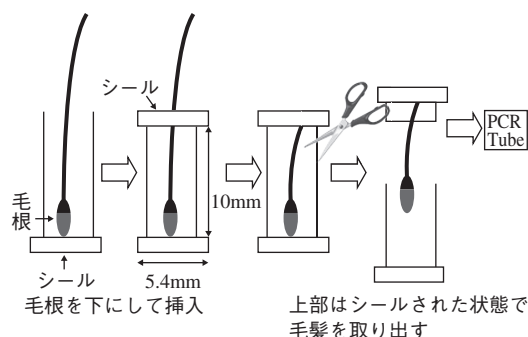


Fig. 1A

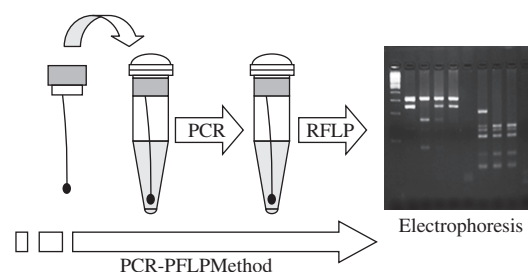


Fig. 1B

Fig. 1. Outline of the Genotyping Method for PCR-RFLP using a Human Hair Root. A) Preservation method of a human hair root. B) Procedure of direct PCR-RFLP method.

## 結果

*EDAR* 遺伝子及び *ABCC11* 遺伝子において PCR 産物、制限酵素消化産物ともに明瞭なバンドが確認された(Fig. 2)。PCR 産物は上から *ABCC11* (326 bp), *EDAR* (256 bp) である。以下に、各遺伝子の結果解析を述べる。

### 1) 毛髪形態(*EDAR*)遺伝子

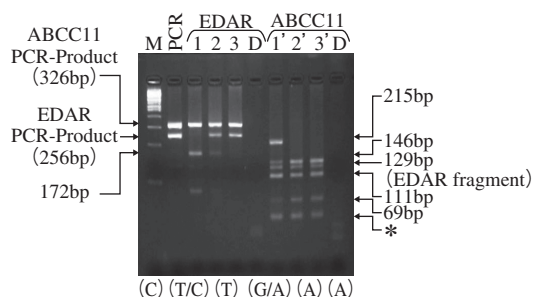
PCR 増幅産物 256 bp は変異型アリル C が存在すると 172 bp と 84 bp に切断される(Fig. 2)。電気泳動を行うと、256 bp の上に別のバンドが見られるが、これは *ABCC11* の増幅産物(326 bp)であるため *EDAR* の遺伝子型判定には考慮しないよう注意する。84 bp を確認することはゲルの分解能のため困難であるが、256 bp と 172 bp の有無を確認すれば判定は可能である。被験者 1 は 256 bp のバンドが見られず 172 bp のみバンドが



見られるため、制限酵素により切断されており、太型ホモ C/C であると判定できる。被験者 2 は 256 bp, 172 bp の両方にバンドが見られるため、太型アリルと細型アリルの両方が存在することがわかり、ヘテロ T/C であると判定できる。また被験者 3 は 256 bp のみにバンドが見られるため、制限酵素により切断を受けなかった増幅断片であり、細型ホモ T/T であると判定できる。表現型においては、被験者 A は平均 0.087 mm, 被験者 B は平均 0.080 mm, 被験者 C は平均 0.063 mm であり、遺伝子型とほぼ一致することが確認できた。

## 2) 耳垢型 (*ABCC11*) 遺伝子

PCR 増幅産物 326 bp は制限酵素により SNP サイト以外の部位で 1ヶ所切断され、215 bp と 111 bp となる (Fig. 2)。乾型アリル A が存在するとこのうち 215 bp の断片が 146 bp と 69 bp に切断される。湿型アリル G は SNP サイトでは切断されないため、215 bp の断片はそのままとなる。よって、湿型ホモ G/G は 215 bp, 111 bp, 湿型ヘテロ G/A は 215 bp, 146 bp, 111 bp, 69 bp, 乾型ホモ A/A は 146 bp, 111 bp, 69 bp のバンドが見られると予想される。これより、被験者 1' は湿型ヘテロ G/A, 被験者 2', 3' は乾型ホモ A/A と判定できる。*EDAR* の遺伝子増幅産物の *Dde* I による制限酵素消化物 (129 bp) も混在しているの、考慮しないよう注意が必要となる。もし仮に全てのバンドを明瞭に確認することが出来なくても、215 bp が見られれば湿型、見られなければ乾型と判定できるため、遺伝子型の判定は容易である。表現型を調べたところ被験者 1' は湿型、被験者 2', 3' は乾型であったため、遺伝子型と一致することが確認できた。



**Fig. 2.** Electrophoresis Detection of PCR products and SNP Genotyping of *EDAR* and *ABCC11* genes. M : Marker, PCR : PCR product, D : DW, 1 : C/C, 2 : T/C, 3 : T/T, 1' : G/A, 2' : A/A, 3' : A/A., \* : primer-dimer.

## 考 察

今回 Duplex PCR-RFLP 法を用いて、毛髪形態 *EDAR* 遺伝子及び耳垢型 *ABCC11* 遺伝子の SNP タイピングをすることができた。PCR 液は一種類で簡潔であるが、その後の酵素切断処理は各遺伝子ごとに反応液を調製しなければならず、それによりアガロースゲル電気泳動のサンプル数も多くなるため、多少、実験操作も煩雑と感じられる。しかしながら、遺伝子診断を理解するうえで、DNA の増幅原理、制限酵素反応、電気泳動など遺伝子研究の基礎技術を一度に学ぶ事が出来るという利点もある。直接、PCR 溶液チューブに毛根を挿入して反応を進めることから、迅速・簡便・安価な遺伝子診断法であることを実証できた。さらに、鋳型 DNA を操作するステップがないため、高校生の実習においてもコンタミネーションのリスクは非常に軽減できたと考えられる。

以下に実験法について要約した。

- 1) 遺伝子診断実験原理の理解：PCR の原理、制限酵素など高校の範囲内で理解できる。
- 2) 実験に必要な器具類：簡易遠心分離器、サーマルサイクラー、電気泳動装置、紫外線トランスイルミネーター、デジタルカメラ(電気泳動画像の記録用)
- 3) 実験に必要な試薬類：PCR 関連試薬とプライマー 4 種類および制限酵素切断実験関連試薬など一般的なキットを使用する。
- 4) エチジウムブロマイド (EtBr) など発がん性の危険性がある蛍光試薬を使用していない。毒性の無い EZ-Vision BPB を使用
- 5) 実験時間：6 時間程度 (Fig. 3)。 (PCR 反応：1 時間半, 酵素切断：1 時間, 電気泳動：30 分)
- 6) SNP 判定の正確性：制限酵素処理を正確に行えば正しい結果が出る。
- 7) コスト：一人当たりの費用は約 300 円と非常に安価である。

以上のことより、今回開発したダイレクト Duplex PCR-RFLP 法は設備面や実施時間において高校での実施に最適であり、遺伝子教育を行ううえで非常に有益ではないかと考えられる。生徒自身により全ての実験操作が可能なおえに一連の流れがわずか半日で可能なため、遺伝子解析法について理解しやすいのではないだろうか。さらに解析した遺伝子型と表現型を比較することで遺伝

子の役割を認識することができ、生物への理解も深まると考えられる。ただし、現段階では *EDAR* の遺伝子型と表現型の比較は多少困難であるという問題点があげられる。実際の測定結果より、太型ホモ C/C (被験者 1, 表現型 0.087mm) と細型ホモ T/T (被験者 3, 表現型 0.063mm) の表現型の差は認められたものの、ヘテロ T/C (被験者 2, 表現型 0.08mm) の表現型は太型ホモ C/C と非常に近く、ヘテロ T/C の表現型の位置付けが曖昧であることがわかる。さらに、毛髪の太さは測定部位や測定した毛髪により大きな誤差がみられるため、遺伝子型と表現型を明確に一致させることは多少困難であると言える。今後はさらにデータを収集し、*EDAR* の遺伝子型と毛髪の表現型との相関性を明らかにする必要があると考えられる。

9:00	実習導入講義
10:00	毛髪採取及び PCR 法による遺伝子の増幅
11:30	制限酵素による増幅遺伝子の切断
0:00	昼食
13:00	電気泳動法による遺伝子多型解析
14:00	考察およびまとめ
15:00	

Fig. 3. Experiment Schedule

## 結 言

今回の研究における最大の目標は、高等学校・大学の実習室でも行うことのできる簡便な遺伝子診断実験の開発であり、ダイレクト Duplex PCR-RFLP 法による毛髪形態 *EDAR* 遺伝子及び耳垢型 *ABCC11* 遺伝子の遺伝子診断実験は実用的なプロトコールとなる事が示唆された。PCR-RFLP 法による SNP 判定の正確性は非常に高く、必要な器材や実験にかかる時間などから考えて、実際に生徒・学生が取り組んでみる実験として現時点で最適と考える。本法は、DNA 抽出工程を含まないため、1 日で全ての実験操作が可能である点に非常にメリットがある。PCR 反応から電気泳動に至るまでの一連の過程の中では、高校レベルの化学や生物の知識で説明される内容が目白押しであ

るので、それらの総復習的な実習として取り扱うこともできる。今回の研究では毛髪形態 *EDAR* 遺伝子及び耳垢型 *ABCC11* 遺伝子の二種類の遺伝子型を同時に解析する方法を開発したが、それ以外の学生の興味のある遺伝子を選び、解析することも可能である。解析する遺伝子を選定する過程でディスカッションを行うことで、より遺伝子解析に対する意義や理解も深まるのではないだろうか。

日本でも SNPs の影響を調べる大規模な疫学調査が始まり、短時間で SNPs 検出が可能な機器が開発されたこと等を考えると、PCR 法を応用した遺伝子診断が日常的に医療の現場で用いられるようになる日は意外と近いかもしれない。そのような未来を生きる為に必要な知識や技能を身につけさせていくためにも、高等学校で可能な実験教材の開発は、より一層の研究が必要になってくるだろうと考えている。

## 文 献

- 1) Fujimoto, A., Kimura, R., Ohashi, J., Omi, K., Yuliwulandari, R., Human Molecular Genetics, 17(6), 835-843 (2008)
- 2) Fujimoto, A., Ohashi, J., Nishida, N., Miyagawa, T., Morishita, Y., Tsunoda, T., Kimura, R., Tokunaga, K., Hum Genet, 124, 179-185 (2008)
- 3) Yoshiura K., Kinoshita A., Ishida T., Ninokata A., Ishikawa T., Kaname T., Bannai M., et al., Nature genetics, 38, 324-330 (2006)
- 4) Nakano, M., Miwa, N., Hirano, A., Yoshiura, K., Niikawa, N., BMC Genetics, 10 : 42, doi : 10. 1186/1471-2156-10-42 (2009)
- 5) M. Hayashida, K. Iwao-Koizumi, S. Murata, K. Kinoshita: Anal. Sci. , 25, 1487-1489 (2009)
- 6) M. Hayashida, K. Iwao-Koizumi, S. Murata, A. Yokoyama, K. Kinoshita: Anal. Sci. , 26, 503-505 (2010)
- 7) 林田真梨子, 小泉(岩尾)恭子, 村田成範, 木下健司: 分析化学, 59, 613-617 (2010)
- 8) K. Oshima, H. Fujii, K. Eguchi, M. Otani, T. Matsuo, S. Kondo, K. Yoshiura, T. Yamamoto: Tropical Medicine and Health, 37, 121-123 (2009)