

技術論文

遺伝子診断教育のための簡便な耳垢型遺伝子多型解析法

林田真梨子¹, 小泉(岩尾)恭子¹, 村田 成範¹, 木下 健司^{®1}

遺伝子解析研究の進歩とともに将来が期待される遺伝子診断の分野を高校・大学生に正しく理解させるために遺伝子診断実験の教材化の検討を行った。日本人ルーツ探訪のバイオマーカーとして話題の耳垢型 (*ABCC11*) 遺伝子の一塩基多型の遺伝子診断を行うこととした。生体試料は、個人情報保護の観点と非侵襲的なサンプリング方法である頭髮の毛根部を利用した PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を検討した。毛根部をダイレクトに PCR 反応液に挿入し、DNA 抽出を行わない上、特殊な機器も使用しない。実験時間の長さや実験機材の観点から一般的な高校の実験室での実施可能な有意義な教材であることが示唆された。

1 緒 言

近年、分子生物学が急速に発展し、遺伝子増幅装置 (サーマルサイクラー)、塩基配列解析装置や関連試薬等の汎用化、低価格化により一般の研究室でも比較的簡単に遺伝子に関連した実験を行うことが可能になった。これら分子生物学的手法を応用して、今日では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遺伝情報であり、その研究分野は幅広く、生物学並びに微生物学的研究をはじめとして、現在、遺伝子解析研究は医療や法医学、考古学、農学など様々な分野で行われ、遺伝子が関係した病気の診断や治療といった医学的研究等々に応用展開されている。特に、近年、一般市民の期待の高まっている分野が遺伝子診断であるが、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あげられる。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。特に、ヒトゲノムは多面的な生物学的意義を発見するための興味深くかつ首尾一貫した枠組みを持ったヒト遺伝子診断実習を提供することができる。

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。教育の場で行う実験であるから、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「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 の採取は安全に行えるか等を考慮しなくてはならない。

ヒトの耳垢^{あか}型は、古くから知られていた2つの形質をもつ有名な遺伝形質で、外見からも非常に分かりやすく、湿型と乾型の区別が容易に判断できるために長い研究の歴史がある。遺伝学的に、湿型が乾型に対して優性である。ところが、乾型は、日本では70~80%を占め、多数派であるが、ヨーロッパ人、アフリカ人はほとんどが湿型であって、乾型は、少数派である。乾型の頻度は、東北アジアを中心に最も高く、南下あるいは、東西に向かって頻度が低くなっている。日本人には湿型、乾型の両形質がそれなりの頻度で存在していることから、しばしば話題にされ、人類学的な興味をそそるものであるが、その決定遺伝子は不明であった。

新川昭夫 (現北海道医療大学教授) らは、ある疾患の連鎖解析の途中で、耳垢型を決定する遺伝子が16番染色体上の *ABCC11* 遺伝子の DNA 多型部位 (538G>A, rs17822931), (rs: ref SNP ナンバー), に存在することを発見した¹⁾²⁾。そこで、百数十名の耳垢を実際に観察しながら耳垢型を決定したところ、乾型全員が AA 型 (アデニン-アデニン型) で、湿型が GG 型 (グアニン-グアニン型) 又は GA 型 (グアニン-アデニン型) であり、湿型1人が AA 型であった。この結果は、湿型1人の AA 型を除いて、耳垢型が単一遺伝子によって決定され、おそらく、1人の祖先に由来するものであろうとする仮説に合致する。乾型耳垢型をもつヒトは全員、変化した *ABCC11* の対立遺伝子 (アレル) を2個持つことで、起こることが確認された。乾型の A の周囲

¹ 武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学研究室: 663-8179 兵庫県西宮市甲子園九番町 11-68

の DNA 型も日本人においては、乾型の中では同一であって、乾型が 1 人の祖先に由来するものであろうとする仮説を強く支持した。

この耳垢の湿型と乾型の区別は外見から非常に判り易く、耳垢型 *ABCC11* 遺伝子の SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) タイピング結果の遺伝子型 (Genotype, アリルの組み合わせ型) と表現形 (Phenotype, 湿型・乾型) の合致は明瞭であり、本人に告知する必要は無く、遺伝情報を知らることにより不利益も被らない。以上の見地から、この耳垢遺伝子を実習対象遺伝子とし、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。生徒自身がサンプリングした毛根は、シャッフリングして完全匿名化し、不特定の他人由来の試料を実験に用いることとした。なお、簡便さと安全性・非侵襲性を配慮して毛根を生徒自身がサンプリングし、DNA 抽出を行わないダイレクト PCR 法を開発した³⁾。この耳垢型 (*ABCC11*) 遺伝子の SNP タイピング実験法は、高等学校の実験室でも行え、サンプリングから遺伝子診断結果を 4 時間以内に得られ、正確性の非常に高い PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を採用した。実験時間の長さ、実験機材及び判定の正確性の点から、一般的な高校の実験室で実施を目指した教材である事を確認した。将来的に、耳垢型 *ABCC11* 遺伝子を全国の生物 II を履修する高校生自身で遺伝子診断し、そのデータが蓄積されれば、高校生自身による「日本人のルーツを探る」というロマンのある研究に発展するであろう⁴⁾。

2 実 験

多人数からなる生徒実習に遺伝子解析を採用する場合、従来、主として次の点が障害になった。まず生体試料から DNA を抽出して PCR 法を適用することに困難が伴う点である。現状では、検体から全 DNA を抽出するためにフェノール・クロロホルム抽出法又は市販の抽出キットなどを採用している。しかし、これらの方法では、いずれも一連の操作に 1 日、一般的な抽出キットでも通常数時間を要し、抽出した全 DNA の後処理も必要になる。また液体窒素や高速回転能力を有する遠心分離器などが必要となり、生徒実習における安全面や設備面及び時間的制約の中での実施は困難が予想される。本研究ではこれらの問題点を踏まえ、生徒実習に採用できる遺伝子多型解析実験及び実施に伴う諸条件を検討した。検討するに当たり留意した点は次の通りである。

- 1) 生体試料採取から遺伝子多型解析に至る一連の実験ができること。
- 2) 生徒実習であることから確実な結果が得られること。
- 3) 過剰な生体試料は採取しないで、DNA 抽出工程を必要

としない遺伝子増幅方法であること。

- 4) 実習は一クラス 20 名～50 名で行い、時間的制約から実験内容の解説も含め、半日約 4 時間程度で完結できる実験内容であること。
- 5) 大型、特殊な機器を使用しない簡便な実験であること。
- 6) 使用する試薬類は、安全かつ安価であること。

上記の 6 点を踏まえ、実習に適した生体試料の選定、増幅条件の検討及び遺伝子多型解析法を検討した。

2.1 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 製, GeneAmp PCR System 9700), マイクロピペッター (ニチリョー製, NPX-1000, NPX-200, NPX-20, NPX-2), 遠心器 (WELTEC Corporation, E-CENTRIFUGE), マイクロチューブ (1.5 mL BIO-BIK, 0.2 mL Thermo-Tube ABgene), グリセロール (WAKO), アガロースゲル (AMRESCO)。

2.2 PCR-RFLP 法を用いた SNP タイピングの原理

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。本実験の場合、PCR で遺伝子増幅した耳垢型 *ABCC11* 遺伝子の SNP を含む部位は変異型アリル A の場合は制限酵素 *Dde* I (東洋紡績製) により認識され切断される。野生型アリル G の場合は切断されないため、酵素処理後のサンプルを電気泳動すれば SNP タイピングを行うことができる。RFLP とは Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素切断片長多型の略である。なお、本実験の場合 SNP を含む部位以外にも 1 箇所切断部位が存在するため、実際には変異型アリル A は酵素反応により 2 箇所切断され、野生型アリル G は 1 箇所切断される。

2.3 実験材料と方法

2.3.1 対象 あるボランティアファミリーに書面による説明を行い、同意が得られた 8 名を対象として生体試料 (毛髪, 全血, 唾液など) の提供を受け、遺伝子診断実験を実施した。この研究説明 (インフォームド Consent) 並びに同意取得は本研究代表者が行った。なお、本研究は武庫川女子大学倫理委員会の承認を得て実施した。

2.3.2 鋳型 DNA 毛根の採取 生徒実習には、安全で非侵襲的な鋳型 DNA の採取方法を考慮して、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、プレートヒータなどを使用して筒状に加工したプラスチックフィルム製 (特殊 PET/PE, 厚み 56 μm) のチューブを利用した。毛根部を下にして毛髪を

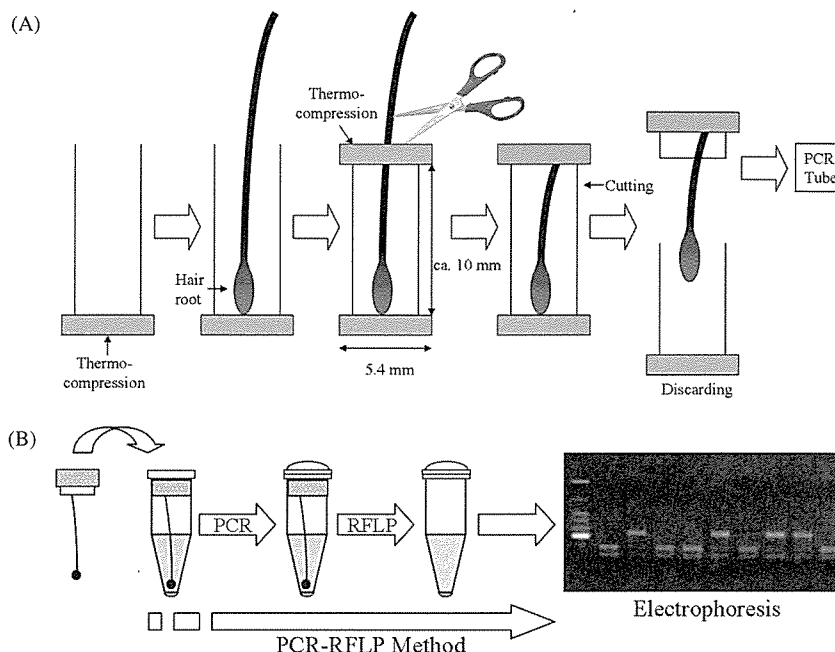


Fig. 1 Outline of the Genotyping Method for PCR-RFLP using a Human Hair Root

(A) Preservation method of a human hair root. (B) Procedure of direct PCR-RFLP method.

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. 1 (A) 参照). また, 長期保存も可能である (実績約 1 年).

2・3・3 PCR による耳垢型 *ABCC11* 遺伝子の増幅

1) DNA ポリメラーゼ及び PCR プライマー

遺伝子増幅は, 生体試料に含まれる PCR 反応を阻害する様々な物質に対して寛容な DNA ポリメラーゼキットの KOD FX (東洋紡績製) を採用した. PCR-RFLP 法のプライマーは, 参考文献 5) に記載されているプライマー配列を使用した.

Forward primer (*ABCC11*-RFLP-F):

5'-TGCAAAGAGATTCCACCAGTT-3'

Reverse primer (*ABCC11*-RFLP-R):

5'-AAGGTCTTCATTTTCTAGACAGC-3'

2) PCR 反応

PCR 反応は, DNA Polymerase KOD FX キット (東洋紡績製) を使用して行った. $2 \times$ KOD FX buffer 7.5 μ L, デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTPs) mixture (2 mM each) 1.5 μ L, *ABCC11*-RFLP-F (10 μ M) 0.6 μ L, *ABCC11*-RFLP-R (10 μ M) 0.6 μ L, KOD FX 0.3 μ L, 滅菌蒸留水 (DW) 4.5 μ L を加え, 反応液全量を 15 μ L とした. 反応サイクルは, 予備加熱 95°C 2 分の後, 変性 98°C 10 秒, アニール 55°C 30 秒, 伸長反応 74°C 30 秒のサイクルを 40 サイクル行い, 最後に 74°C 2 分で伸長反応を完成させた後, 16°C に

保った. サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 を用いた.

2・3・4 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

PCR 反応後の増幅産物 (326 bp) 6 μ L に $10 \times$ H Buffer 2 μ L, *Dde*I (東洋紡績製) 0.25 μ L, 滅菌蒸留水 (DW) 11.75 μ L を加え全量を 20 μ L の反応液とし, 反応は GeneAmp PCR System 9700 を使用し, 37°C で 1 時間インキュベートした.

2) 消化産物の確認

消化産物 10 μ L を EZ-VisionBPB (AMRESCO) 1 μ L と 60% グリセロール 1 μ L を混合し, 3% アガロースゲルにより 100 V 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 (Tris-acetate, EDTA) 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 結果と考察

3% アガロースゲル電気泳動を行ったところ, 各遺伝子型を明瞭に区別することができた (Fig. 2). レーン 1, 3, 4, 6 (被験者 HK, JY, AY, TYK) では, 146 bp, 111 bp, 69 bp の 3 本のバンドに切断され, そのうち 2 本 (146 bp, 111 bp) が明瞭に見られるが, これは乾型アリル (A/A) が制限酵素により切断されたものであると考えられる. この結果から, これらの被験者は A/A ホモ接合型と判定することができた. 一方, 湿型アリル (A/G) のレーン 2, 5, 7, 8 (被

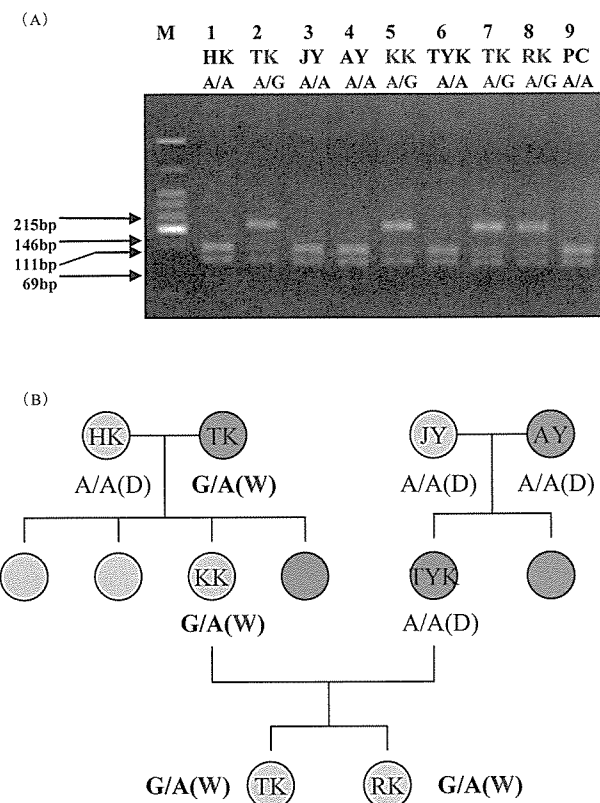


Fig. 2 (A) Electrophoresis Detection of *ABCC11* SNP Genotyping. Lane 1, 3, 4, 6, 9 (positive control), *ABCC11* A/A (146 bp, 111 bp, 69 bp). Lane 2, 5, 7, 8, *ABCC11* G/A (215 bp, 146 bp, 111 bp, 69 bp). (B) Family Genealogy. Genotype (Phenotype), Dry earwax: A/A (D), Wet earwax: G/A (W)

験者 TK, KK, TK, RK) の 4 名は, 146 bp, 111 bp, 69 bp の 3 本 (69 bp は判定困難) 以外に 215 bp バンドが察されるが, これは野生型アレル G の存在により, 制限酵素で切断されなかった増幅断片であると考えられる。これらの被験者は A/G ヘテロ接合体と判定することができた。これらの遺伝子診断結果は, 実際の表現形質の耳垢型 (表現型) と合致した。なお, 湿型アレル (G/G) の遺伝子型 (Genotype) を持つ被験者 (理論上では 215 bp, 111 bp のバンドが見られる) は, 現在のところ見つからないが, 耳垢型遺伝子 *ABCC11* の G タイプは, 耳垢の乾湿の表現型 (Phenotype) に対して優性して遺伝している事は明白である。

PCR-RFLP 法を用いて, *ABCC11* 遺伝子の SNP タイピングをすることができた。この方法で用いたプライマーでは, プライマーダイマーなどの不正な増幅がバンドとして検出されることも極めて少なく, 一般的なアレル特異的プライマーによる ASP (Allele Specific Primer)-PCR 法と比較して判定ミスはほとんどで起こらないと考えられた。PCR 反応液は 1 種類で簡潔であるが, その後の酵素切断処理並びにアガロースゲル電気泳動の場合は準備も含めて 1 時間

半ほど掛り, 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 (分子ふるい) など遺伝子研究の基礎技術を学ぶ事が出来る。毛根から DNA の抽出精製を行わないので, 直接, PCR 溶液チューブに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り, 鋳型 DNA が固体である事からコンタミネーションのリスクは非常に軽減できた。

4 結 言

高等学校生物での教材化を前提に, *ABCC11* 遺伝子の遺伝子診断を高校の理科実験室で可能な事を前提に PCR-RFLP 法で行ってみた。以下に PCR-RFLP 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 2 種類及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: PCR 反応: 1 時間半, 酵素切断: 1 時間, 電気泳動: 30 分, 合計時間約 3 時間。
- 6) SNP 判定の正確性: 制限酵素処理にきちんと時間をかければ非常に正確である。
- 7) 遺伝子診断実習 (PCR-RFLP 法) スケジュール:
 - 9:00 am ~ 実習導入講義
 - 10:00 am ~ 毛髪採取及び PCR 法による耳垢遺伝子 *ABCC11* の増幅
 - 11:30 am ~ 制限酵素による増幅遺伝子の切断
 - 0:00 pm ~ 昼食
 - 1:00 pm ~ 電気泳動法による遺伝子多型解析
 - 2:00 pm ~ 3:00 pm 考察及びまとめ
- 8) コスト: 一人当たりの費用は約 200 円と非常に安価である。

PCR 法を応用した PCR-RFLP 法については, 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最適と考える。更に, PCR 法は DNA 研究を根本から変革を与える切っ掛けとなった技術でもあり, 高等学校の生物学の教科書や資料集にも紹介されるようになってきたので, 設備次第では是非とも行ってみたい実験である。本法は, DNA 抽出工程を含まないため, 1 日ですべ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平易な遺伝子診断実験の開発であり、その可能性を PCR-RFLP 法に託した。現時点では、SNP 判定の正確性は非常に高く、教育現場で化学・生物学の担当教員が主体となって初学者を指導すれば、より多くの生徒・学生が遺伝子診断を体験できるようになるものと期待したい。

今回の研究を通じて、遺伝子診断実験が高等学校生物学並びに大学の基礎科学実習などにおいて、非常に有益な教材になりうること感じられた。設備、操作性や費用面においても、耳垢型 *ABCC11* 遺伝子の SNP タイピング実験は実用的なプロトコールとなる事が示唆された。一方、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く、高等学校でも可能な実験教材の開発は、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、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。

謝 辞

本論文を投稿するにあたり、査読頂いた北海道医療大学 個体差健康科学研究所所長新川詔夫先生のご厚意に感謝いたします。

文 献

- 1) K. Yoshiura, A. Kinoshita, T. Ishida, A. Ninokata, T. Ishikawa, T. Kaname, M. Bannai, K. Tokunaga, S. Sonoda, R. Komaki, M. Ihara, VA. Saenko, GK. Alipov, I. Sekine, K. Komatsu, H. Takahashi, M. Nakashima, N. Sosonkina, CK. Mapendano, M. Ghadami, M. Nomura, DS. Liang, N. Miwa, DK. Kim, A. Garidkhuu, N. Natsume, T. Ohta, H. Tomita, A. Kaneko, M. Kikuchi, G. Russomando, K. Hirayama, M. Ishibashi, A. Takahashi, N. Saitou, JC. Murray, S. Saito, Y. Nakamura, N. Niikawa : *Nature genetics*, **38**, 324 (2006).
- 2) M. Nakano, N. Miwa, A. Hirano, K. Yoshiura, N. Niikawa : *BMC Genetics*, 10:42, doi:10.1186/1471-2156-10-42 (2009).
- 3) M. Hayashida, K. Iwao-Koizumi, S. Murata, K. Kinoshita : *Anal. Sci.*, **25**, 1487 (2009).
- 4) Super Science High School Consortium : *J Hum Genet.*, **54**, 499 (2009).
- 5) K. Oshima, H. Fujii, K. Eguchi, M. Otani, T. Matsuo, S. Kondo, K. Yoshiura, T. Yamamoto : *Tropical Medicine and Health*, **37**, 121 (2009).

Simple SNP Genotyping of Human Earwax-Type Gene *ABCC11* for Genetic Education

Mariko HAYASHIDA¹, Kyoko IWAO-KOIZUMI¹, Shigenori MURATA¹ and Kenji KINOSHITA¹

¹ School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University, 11-68, Kyuban-cho, Koshien, Nishinomiya-shi, Hyogo 663-8179

(Received 21 January 2010, Accepted 24 March 2010)

Recently, progress in molecular biology is being made in the fields of science, medicine, and pharmacy. Therefore, the majority of students graduating from pharmaceutical university departments will be required to have knowledge of molecular biology techniques. However, it is difficult to include such experiments in the curriculum for students at general high schools and universities because of safety concerns, the expensive materials and experimental equipment and time consumed. Therefore, this report introduces the convenient experimental materials on human DNA polymorphism for the genotyping of 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 time required for the experiments is less than 4 hours. The PCR-RFLP experiment proposed here is a suitable genotyping method to acquire molecular biological knowledge and techniques.

Keywords : human genome DNA polymorphism ; *ABCC11* ; SNP (single nucleotide polymorphism); genotyping ; PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism); experimental protocol.