

ヒト爪および唾液細胞内アルデヒド脱水素酵素遺伝子の同定

戸矢崎満美¹⁾, 矢野めぐむ²⁾, 瀧井 幸男^{2,3)}

¹⁾武庫川女子大学大学院家政学研究科食物栄養学専攻

²⁾武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科,

³⁾バイオサイエンス研究所)

Aldehyde dehydrogenase 2 gene fragment in human nail clippings

Mami Toyasaki¹⁾, Megumu Yano²⁾ and Yukio Takii^{2,3)}

¹⁾Graduate School of Home Economics,

Food Science and Nutrition Major,

²⁾Department of Food Science and Nutrition,

School of Human Environmental Sciences, and

³⁾Institute for Biosciences,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558

An individual genotype of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) was surveyed and detected when using nail clippings and saliva, respectively by the method consisting of DNA extraction, genomic DNA amplification by polymerase chain reaction, and gel electrophoresis of DNA fragment. Gene analysis using fingernail DNA was found to be effective in that they were easily to collect from human samples, in that they were kept storable at -80°C until use, and in that DNA of the sample was very stable after repeated treatment of freezing and thawing.

緒 言

2000(平成12)年度から、厚生労働省においてはアルコール関連問題対策の取組みとして「21世紀における国民健康づくり運動(健康日本21)」を実施している。この中で、アルコール問題を重要な課題の1つとして位置づけている。そこで、急性アルコール中毒や生活習慣病を発症させ、進行に影響を及ぼす生活習慣の「飲酒」に焦点をおき、だ液及び爪切りを用いた爪の断片から抽出した核酸を本研究の適切な材料として選択した。

同時に多量の被験者から試料を提供してもらい、保存するにあたりより安定したDNAを得られるかどうかを目的として、だ液と爪について冷凍・解凍を繰り返すとALDH2が検出できるかどうかを検討した。尚、実施前に被験者(健康な女子学生3名)と同意書を交した(資料1)。

アルコールの代謝経路は次の通りである。摂取したアルコールは肝臓の働きで、アルコール脱水素酵素(ADH)により分解され、アセトアルデヒドとなり、さらにアルデヒド脱水素酵素(ALDH)により分解され、酢酸になる。最終的には二酸化炭素と水に分解される。アルコール摂取後に各種の不快感を起す原因はアセトアルデヒドである¹⁾²⁾。このアセトアルデヒドが体内に蓄積されないようにアルデヒド脱水素酵素(ALDH)が働き、この酵素で分解されやすい体質か否かでアルコールに強いか弱いかが遺伝的に決定される。

肝臓で働くALDHは2種類ある。その1つは細胞中の細胞質にあるALDH1で、もう1つはミトコンドリア内にあるALDH2である。ALDH1はアセトアルデヒドの血中濃度が高い時に働く。アルコールに強いか弱いかは主にALDH2の活性の程度で決定される。通常、飲酒によって産生されるア

セトアルデヒドの大部分は ALDH2 で代謝される³⁾。

この ALDH2 は 12 番染色体上に存在している。ALDH2 はさらに 2 種類に分類される。その違いは ALDH2 遺伝子の特定部位の 1 塩基が変異(exson12)を構成する塩基内グルタミン酸のコードン GAA (Normal タイプ:N) がリジンのコードン AAA (Mutant タイプ:M) に変異していることである⁴⁾⁻⁶⁾。飲めるタイプ(活性が高い)遺伝子型を N 型、飲めないタイプ(活性が低い)遺伝子型を D 型とすると、2 つの遺伝子の、それぞれの組み合わせによって、NN 型(アルコールに強いタイプ)、ND 型(飲もうと思えばある程度飲めるが、アルコールに弱いタイプ)、DD 型(まったく飲めない人)の 3 つのタイプに分けられる⁷⁾。

方 法

1. だ液の DNA 調整 DNA の抽出には ISOHAIR キット(ニッポンジーン)を用いた。

滅菌済み容器にだ液を入れ、Extraction Buffer 200 μ l, Enzyme Solution 5 μ l, Lysis Solution 8 μ l を順に加え混合する。55 $^{\circ}$ C, 20 分インキュベート後、Enzyme Solution 5 μ l を加え、良く混合し、55 $^{\circ}$ C, 15 分インキュベート(3 分間ごとにゆるやかにタッピング)を行い、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)200 μ l 加え 5 分間緩やかに転倒混和する。14000 rpm 5 分間遠心し、上澄み(水相)を別のチューブに移す。上澄みに 3M Sodium Acetate(pH 5.2)20 μ l を加え、Ethachinmate 2 μ l を加え、良く混合し、100%エタノール 400 μ l を加え、-20 $^{\circ}$ C で 30 分間放置後、14000 rpm 15 分間遠心し、液体をすべて除去する。沈殿物に 70%エタノールを 1ml 加え、14000 rpm 2 分間遠心後、エタノールを除去後、真空乾燥し、TE(pH 8.0)10 μ l に溶解した。

2. (PCR 反応系)

調製した DNA は PCR 法を用いて、ALDH2 の検出を行なった。

検出用プライマー

Forward

(5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3')

Reverse N

(5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTC-3')

Reverse M

(5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTT-3')

Reverse N と Reverse M の違いは 3'末端の 1 塩

基が異なる点である。

鋳型 DNA 1 μ l に 10 \times PCR buffer for KOD Plus 5 μ l, MgSO₄(25mM)1 μ l, dNTP(2mM)5 μ l, プライマー Forward(20mM)1 μ l, プライマー Reverse (20 mM)1 μ l, KOD Plus(1U/ μ l)1.25 μ l, ddH₂O で トータル 50 μ l にし、98 度 1 分間保った後、98 $^{\circ}$ C 20 秒、60 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 45 秒 35 サイクル PCR を行い、72 $^{\circ}$ C 5 分間の後 4 $^{\circ}$ C で PCR 産物を保存した。PCR 産物 5 μ l を 3%アガロースゲル(Agarose 21)にて電気泳動を行い、マーカーは ϕ X174-Hae III を使用し ALDH2 を検出した。

3. だ液の冷凍・解凍回数別

滅菌済み容器に 10 μ l のだ液を入れ、-80 $^{\circ}$ C で凍結した。取り出した後、10 分間水に漬け、室温で 10 分間放置した。これを 1 サイクルとし、1 回、5 回、10 回、15 回、20 回繰り返した。これらの DNA を抽出し、PCR 法により、ALDH2 遺伝子の検出を試み遺伝子解析を検討した。

4. 爪の DNA 調整

採取した爪は、エタノールで洗浄し、10 分間放置後、爪切りを用い 1mm \times 2mm 角に切った。その細片を微量天秤ではかり、以下だ液の DNA 調整と同様の操作を行った。

(PCR 反応系)

調製した DNA は PCR 法を用い、ALDH2 の検出を行なった。以下だ液の PCR 反応系と同様の操作を行った。

5. 爪の冷凍・解凍回数別

滅菌済み容器に 0.005g の爪を入れ、-80 $^{\circ}$ C で凍結した。取り出した後、10 分間水に漬け、室温で 10 分間放置した。これを 1 サイクルとし、1 回、5 回、10 回、15 回、20 回繰り返した。これらの DNA を抽出し、PCR 法により、ALDH2 遺伝子の検出を試み遺伝子解析を検討した。

結 果

1. だ液の冷凍・解凍回数別

だ液の冷凍・解凍を繰り返し DNA が冷凍・解凍の繰り返しにより損傷をうけず、ALDH2 を検出できるかどうかを検討した。図 1 に示すように、レーン 4, 6, 8, 10, 12 の 135 bp 付近に ALDH2 遺伝子を確認することができた。レーン 2, 3 のネガティブコントロールで 135 bp 付近にバンドが確認されない為、コンタミネーションではないことがわかる。従って、だ液の冷凍・解凍を 20 回繰り返しても

ALDH2 遺伝子が検出可能であった。(Fig. 1.)

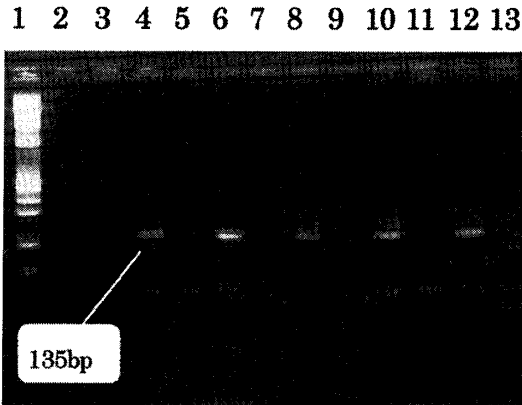


Fig. 1. Effect of repeated freezing and thawing on PCR production of a 135 bp DNA fragment containing ALDH2 exon 12 in saliva.

Lane 1, ϕ X174/ HaeIII; lanes 2 and 3, denoted the respective template DNA was omitted (negative control). Lanes 4 and 5 represent 1 cycle of freezing and thawing treatment of the template DNA. Lanes 6 and 7, 8 and 9, 10 and 11, and 12 and 13 demonstrated the repeated times of 5, 10, 15, and 20, respectively of freezing and thawing.

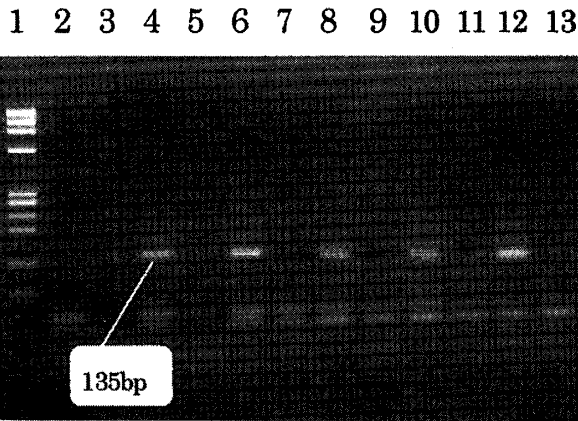


Fig. 2. Effect of repeated freezing and thawing on PCR production of a 135 bp DNA fragment containing ALDH2 exon 12 in nail clippings.

Lanes 4 and 5 represent 1 cycle of freezing and thawing. Lanes 6 and 7, 8 and 9, 10 and 11, and 12 and 13 demonstrate the repeated cycles of 5, 10, 15, and 20, respectively. The other experimental procedures and denotes in the figure were the same as described in figure 1.

2. 爪の冷凍・解凍回数別

爪の冷凍・解凍を繰り返し DNA が冷凍・解凍の繰り返しにより損傷をうけず, ALDH2 を検出できるかどうかを検討した。図 2 に示すように, レーン 4, 6, 8, 10, 12 の 135 bp 付近に ALDH2 遺伝子を確認することができた。2, 3 レーンのネガティブコントロールで 135 bp 付近にバンドが確認されない為, コンタミネーションではない。従って, 爪の冷凍・解凍を 20 回繰り返ししても ALDH2 遺伝子が検出可能であることが示された。(Fig. 2.)

考 察

だ液の冷凍・解凍回数別においては, 20 回冷凍・解凍を繰り返ししても ALDH2 遺伝子を検出できたという結果となり, これはかなり過酷な条件下でも DNA の損傷が認められなかったためと考えられる。この結果は, 等電点電気泳動法で, だ液試料のみの検討を行った Lillian E. Dyck の研究⁸⁾と同様の結果が得られた。

爪の冷凍・解凍回数別においては, だ液と同様, 20 回冷凍・解凍を繰り返ししても ALDH2 遺伝子を検出できたという結果となり, 爪においてもかなり過酷な条件下でも DNA の損傷が認められなかったためと考えられる。

以上のことから, 被験者に痛みを伴わせることなく, 簡易な方法で核酸をだ液や爪切りで切った爪から抽出できることが示された。また, より多くの試料を抵抗なく多量の被験者から収集するには, だ液より爪の方が適していると考えられる。今後, 100 名を超える本学学生より爪を採取し, 検体数を増やすことによってより詳細なアルコール耐性遺伝子と飲酒の意識調査との関連性を検討していく予定である。

参考文献

- 1) 中村希明, アルコール依存症を治す予防・治療・家族の心得 Q&A, 保健同人社, 東京, pp.24-31(2001)
- 2) 樋口進, 日本臨床 特別号, **55**, 582-587(1997)
- 3) 竹下達也, 森本兼曩, 日本臨床特別号, **55**, 111-116(1997)
- 4) Yoshida, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 258-261(1984)
- 5) 山川文徳, 崎山則征, 美濃宏信, 和歌山工業高等専門学校研究紀要, **36**, 69-72(2001)

- 6) Yoshida, A., Ikawa M., Hsu L.C., Tani K.,
Alcohol, **2**, 103-106(1985)
- 7) 原田勝二, 日本臨床 特別号, **55**, 35-39(1997)
- 8) Lillian E. Dyck, *Alcohol Clin. Exp. Res.*,
19, 420-426(1995)

(資料1) 遺伝子解析研究への協力の同意文書

私は遺伝子解析研究(研究題目)について、(説明をした者の使命)より以下の項について説明を受け、その方法、危険性、分析結果のお知らせの方法等について十分理解しました。ついては、次の条件で研究協力に同意します。

- | | |
|-------------|------------------|
| 1. 研究目的 | 4. 試料の他の研究への利用 |
| 2. 研究計画等の開示 | 5. 遺伝子解析を受ける人の権利 |
| 3. 個人情報の保護 | 6. 解析結果の報告 |

研究協力への同意(説明を受け理解した方は1の「はい」または「いいえ」に○をつけて下さい。)

1. 提供する試料等が、本遺伝子解析研究に使用されることに同意します。

はい いいえ 署名: _____

(1の「はい」と○を付け、署名した方は、2-1または2-2のどちらかを選択し、「はい」または「いいえ」に○を付け、署名してください。2-1と2-2の両方を記載する必要はありません)

- 2-1. 本研究が終了した時、速やかに試料等を破棄してください。

はい いいえ 署名: _____

- 2-2. 提供する試料等が、本遺伝子解析研究に使用されるとともに、長期間保存され、将来、新たに計画・実施される遺伝子の分析を含む医学研究に使用されることに同意します。

はい いいえ 署名: _____

平成 年 月 日

氏名 (試料等提供者本人または代諾者)

(代諾者の場合本人との関係)

住所 :

電話 :

署名または記名・捺印 : _____ 印

解析結果の報告を 希望する ・ 希望しない (いずれかを○で囲んでください。)