第２章　目的・解説（[解説] は冊子体テキストより詳しい）

2-1. 目　的（冊子体テキストとほぼ同じ）

身近な代謝過程の１つであるアルコールの代謝に関与する、アルデヒド脱水素酵素 2（Aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2, EC 1.2.1.10)）の**遺伝子型**を、毛髪から DNA を抽出し、PCR 法を用いて推定する。
また、これを通して、DNA や制限酵素の取り扱い、PCR 法、DNA の電気泳動法などについて学ぶ。
なお、今回の方法での推定結果は確定的な診断ではなく、あくまでおおよその判定であることに注意し、さらに、判定が正常型ホモ接合体と予想されても、大量飲酒が可能であるなどの誤解をしないよう留意すること。

2-2. 解　説（冊子体テキストより詳しい）

2-2-1 遺伝子と遺伝情報、遺伝子診断

遺伝子（Gene）の本体が DNA であることや、**DNA** が**二重らせん構造**をとっていることは今さら言うまでもないことであろう。DNA 中の連続した 3 塩基の配列（コドン）が１つのアミノ酸をコードすることによって**タンパク質**のアミノ酸配列が指定されており、これに基づいて合成されたタンパク質が機能することによって生物個体に種々の性質が表れる。また、個体中のどこで、いつ、どのタンパク質を合成するか（あるいは合成しないか）も DNA の塩基配列により決定されている。すなわち、DNA の塩基配列こそが**遺伝情報**である。

遺伝情報を担う DNA の塩基配列に**変異**（Mutation）が存在すると、時には正常な機能を持たないタンパク質が発現し、遺伝病を生じることがある。

近年、**ゲノム**解析の進展や細胞生物学的研究の進歩によって、遺伝子変異と疾患との関係の解明は、かなり進んできている。

しかしながら、**遺伝子診断**や、遺伝子治療は倫理的な面も含めて、多くの課題を残している。

[参 考]

1. 遺伝子、DNA、ゲノム、遺伝情報などの基本用語は、**芦田嘉之著「やさしいバイオテクノロジー カラー版」と「カラー図解でわかる高校生物超入門」にかなり詳しく**解説してある。
2. このサイトの[5-1. 参考]にも解説があるので参考に。

2-2-2 PCR(Polymerase Chain Reaction)法

PCR 法は、鋳型となる DNA、2 種類の Primer、耐熱性 DNA polymerase、および DNA の monomer である 4 種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dATP, dGTP, dCTP, dTTP）などを混合し、温度の上げ下げを繰り返すことによって**特異的**な領域のみを試験管内で効率よく**増幅**する技術であり、熱変性、アニーリング、伸長反応の 3 ステップを 1 サイクルとして、通常 20～30 サイクル繰り返す。

PCR 反応は通常の DNA 複製過程を模しており、**向かい合った一組の Primer** を使うことで、**特異的**領域のみ**増幅**することを実現している。

DNA 複製に関与する DNA polymerase は単独で DNA を合成することはできず、鋳型鎖に相補的に結合した Primer を頭にして、鋳型鎖の塩基に相補的な塩基を結合させる形で伸長反応を触媒する。

PCR 反応の**第 1 段階**は 2 本鎖の DNA を 1 本鎖に分離する**熱変性**で、通常 94℃から 96℃の熱をかける。

第 2 段階では、2 種類の特異的 Primer と 1 本鎖になった鋳型 DNA を**アニーリング**させる。

仮に 16 塩基の Primer を用いるとすると、その塩基配列は 4 の 16 乗（塩基は 4 種類ある）＝約 43 億通りある。Human Genome の場合、30 億塩基対の遺伝情報があることから、既知の配列情報に基づいて 16 塩基長の Primer を作ると、その Primer は計算上 Human Genome の特定の 1 ヶ所とのみアニーリングすることになる。

実際には Primer と鋳型 DNA とのアニーリングは溶液の温度や塩濃度などに依存することから、もう少し長い Primer を設計するが（本実験では 22 塩基長）、理論上、適切な Primer を設計するだけで特定の領域のみを増幅できることになる。

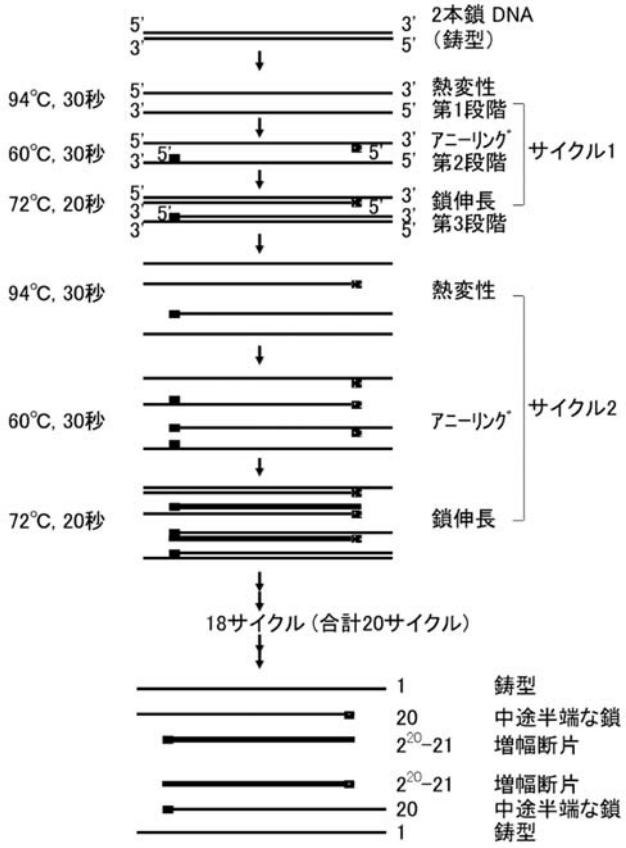

図2-1 PCR反応により増幅されるDNA断片

生きた細胞内の DNA 合成過程では生合成された RNA primer が使われ、複製後、RNA の部分は分解・修復され DNA に置き換えられる。PCR 反応では、より安定な DNA primer を用いる。

第 3 段階では DNA polymerase を用いて鋳型 DNA と相補的な DNA 鎖を合成する。

DNA polymerase による**伸長反応**を 1 種類の Primer で 20 回繰り返しても、DNA は 20 倍にしかならない。実際に PCR 反応でも、最初に反応のために加えた DNA が鋳型に使われたときは、いろいろな長さの断片がサイクル数倍合成される（**図 2-1** の「中途半端な鎖」）。

しかし、向かい合った 2 種類の Primer を使うと、前の反応で合成された DNA 断片も鋳型になるため、20 回反応すると Primer で挟まれた領域は計算上およそ 2 の 20 乗倍（約 10^6 倍）に増幅されることになる。

増幅された DNA 断片はアガロースゲル電気泳動法により分子量の違いで分離し、DNA を染色して可視化することができる。通常、鋳型 DNA、ふぞろいな DNA、Primer DNA は量が少ないため見えず、増幅された DNA 断片のみが可視化される。

このような PCR 法の原理は 1983 年に発見されていたが、当初は体温付近で働き、熱で失活する普通の DNA polymerase（Klenow fragment）を使っていたため、第 2 段階のアニーリングの後に新しい DNA polymerase（高価）を追加する必要があり、自動化が困難であった。

しかし幸いにも、米国イエローストーン国立公園の自噴泉に生息し、80℃の高温でも生育できる高度好熱菌（*Thermus aquaticus*）から熱に強い DNA polymerase（この細菌の学名から ***Taq*** **DNA polymerase** と呼ばれている）が発見されており、1988 年にこの *Taq* DNA polymerase を用いて自動化された機器が紹介されると、PCR 法はその迅速さと簡便さによって爆発的に普及した。

この PCR 法の原理を最初に思いついた Kary Banks Mullis は 1993 年にこの「発見」でノーベル「**化学賞**」を受賞しているが、実際に高度好熱菌の酵素を利用して PCR 法の自動化を成し遂げたのはアメリカのベンチャー企業シータス社の面々である（Mullis もシータス社の研究員だが 1986 年に退社していた）。

[参 考]

1. PCR 法とアガロースゲル電気泳動法は、「**やさしいバイオテクノロジー カラー版**」pp124-133 に詳しく解説してある。
2. PCR 法についてより詳しく理解するためには、次の書籍がためになる。
   ラビノウ著、渡辺政隆訳「ＰＣＲの誕生」（みすず書房）1998 年 10 月刊

PCR 反応における Primer のアニーリングに関する補足説明

DNA 鎖には方向があり、2 本の DNA 鎖は逆向きであり、DNA polymerase が触媒する伸長反応には方向がある。

2 本鎖 DNA を A 鎖、B 鎖とし、PCR primer を a、b とする。A 鎖に Primer a、B 鎖に Primer b がアニーリングするとする。

Primer b は A 鎖と同じ方向で、Primer a は B 鎖と同じ方向である。

したがって、A 鎖にアニーリングする Primer は Primer a だけで、A 鎖と同じ方向の Primer b はアニーリングしない。

同様に、B 鎖には Primer b だけがアニーリングし、Primer a はアニーリングしない（**図 2-2**）。

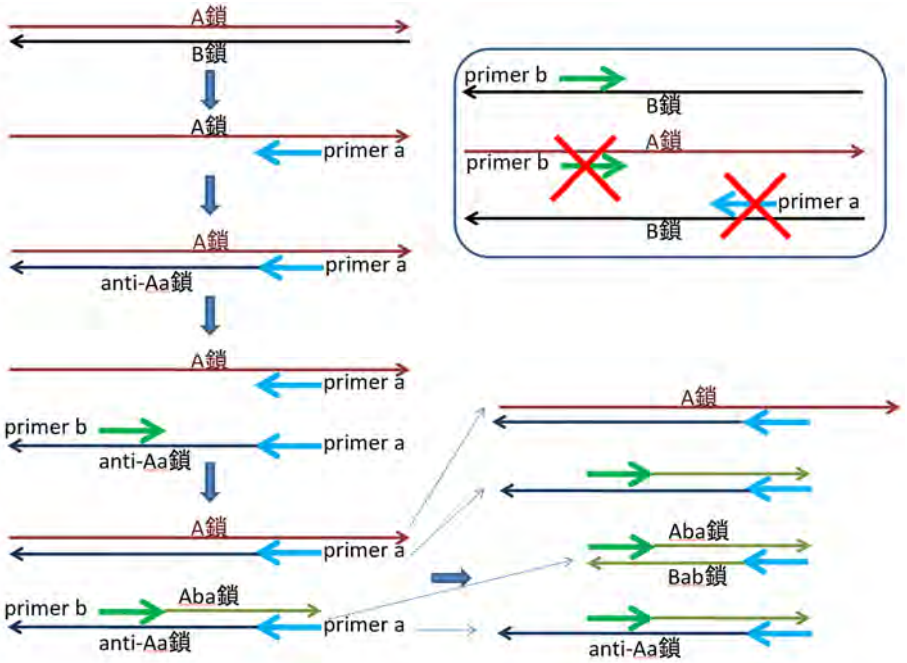

図2-2 PCR反応におけるPrimerのアニーリング その1

PCR の第 1 サイクルの時、A 鎖に Primer a がアニーリングして伸長する。新たに合成された鎖を anti-Aa 鎖とする。PCR 過程全体でこの anti-Aa 鎖ができるのは鋳型の A 鎖に Primer a がアニーリングしたときだけのため、anti-Aa 鎖は PCR のサイクル数分だけ合成される。

この anti-Aa 鎖は A 鎖の相補鎖で B 鎖と同じ方向のため、この鎖が鋳型となったとき、Primer b だけがアニーリングする。

新たに合成された鎖を Aba 鎖とする。この Aba 鎖は鋳型 DNA の A 鎖と同じ方向であり、Primer b から Primer a までの領域の断片である。

すなわち Aba 鎖は Primer b の塩基配列から始まり、Primer a の相補鎖の逆配列で終わる。

Aba 鎖は A 鎖と同じ方向のため、Primer a だけがアニーリングする。

新たに合成された鎖を Bab 鎖とする。

この Bab 鎖は鋳型 DNA の B 鎖と同じ方向であり、Primer a から Primer b までの領域の断片である。

すなわち、Bab 鎖は Primer a の塩基配列から始まり、Primer b の相補鎖の逆配列で終わる。

Aba 鎖と Bab 鎖はお互いに相補的で同じ長さである。

次に、B 鎖をみてみよう（**図 2-3**）。

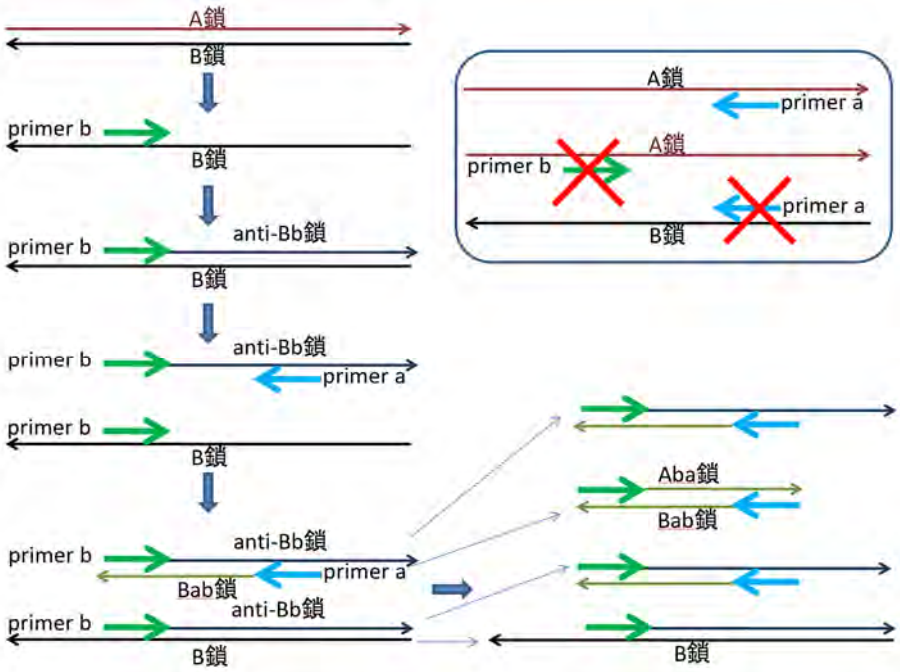

図2-3 PCR反応におけるPrimerのアニーリング その2

PCR の第 1 サイクルの時、B 鎖に Primer b がアニーリングして伸長する。新たに合成された鎖を anti-Bb 鎖とする。

この anti-Bb 鎖も上記 anti-Aa 鎖の時と同じような過程で PCR 反応が起こり、結果的に上記と同じ Aba 鎖、Bab 鎖が合成される。

PCR 反応を n 回繰り返すと、結果的に理想的には anti-Aa 鎖や anti-Bb 鎖は n 個合成され、2 種の Primer で挟まれた領域である Aba 鎖や Bab 鎖は約 2 の n 乗個合成されることになる。

anti-Aa 鎖や anti-Bb 鎖は不揃いであるが、Aba 鎖や Bab 鎖はすべて同じ長さである。

PCR 反応の前後で鋳型の A 鎖や B 鎖は変化しない。

2-2-3 ヒトにおけるアルコール代謝

ヒトにおけるアルコール代謝は以下の経路によっており、毒性のあるアセトアルデヒドの代謝能力が飲酒許容量に影響している。ヒトの**アルデヒド脱水素酵素**（Aldehyde dehydrogenase）ALDH は少なくとも ALDH1～ALDH6 の 6 種類あり、ALDH1(高 K_m)および ALDH2(低 K_m)の 2 種がアルコール代謝に関与している。

Ethanol → Acetaldehyde → Acetic acid → (TCA cycle) → CO_2 + H_2O

↑ alcohol dehydrogenase (ADH)

↑ aldehyde dehydrogenase (ALDH1 or ALDH2)

ALDH1 : high K_m enzyme (K_m; 30 μM)

ALDH2 : low K_m enzyme (K_m; 3 μM)

図 2-4 肝臓におけるアルコール代謝

ALDH2 欠損症では、*ALDH2* 遺伝子のエキソン 12 上にある 1 つのコドン（遺伝子全体では 487 番目のコドン）が正常型（*ALDH2-1*）の GAA に対し、変異型（*ALDH2-2*）では AAA になっているため、対応するアミノ酸がグルタミン酸から、リジンに変わっている。この 1 塩基置換による 1 アミノ酸置換の結果、アルデヒド脱水素酵素活性は劇的に消失する。そのため、**正常型と変異型のヘテロ接合体**(*ALDH2-1*/*ALDH2-2*)では、ALDH2 の弱い活性が存在する**部分欠損**となり、**変異型ホモ接合体**（*ALDH2-2*/*ALDH2-2*）では ALDH2 活性が**完全に欠損**する。

ALDH2-1 由来の酵素にアセトアルデヒド分解活性があり、*ALDH2-2* 由来の酵素にその活性がないこと、および *ALDH2-1* を持つヒトの方が多いことから、一般的に上記のように *ALDH2-1* を正常型（野生型）、*ALDH2-2* を変異型と呼んでいるが、この呼称は 2 種類の遺伝子の優劣を決めるものではない。

アルデヒド脱水素酵素は 4 量体として働く。ヘテロ接合体の場合、ALDH2-1 タンパク質と ALDH-2-2 タンパク質が混在しているが、ALDH2-1 の 4 量体にのみ酵素活性がある。
4 量体のうち、1 分子でも ALHD2-2 が含まれる場合、酵素活性はなくなる。

ALDH2 の変異型(*ALDH2-2*)は**常染色体不完全優性遺伝**を示し、東洋人に多く見られる。日本人では、完全欠損型(*ALDH2-2*/*ALDH2-2*)が約 7%、部分欠損型(*ALDH2-1*/*ALDH2-2*)が約 40%と *ALDH2-2* 遺伝子の頻度が高い。欧米やアフリカの人々の 100%近くは *ALDH2-1* のホモ接合体である。

ALDH2-1 のホモ接合体の人は飲酒許容量が高いことからアルコール依存症や、アルコールが原因の多くの病気になりやすい。アルコール過飲による発病を予防できるという点では、半数近くの東洋人が持つ *ALDH2-2* 遺伝子のメリットは大きい。
ALDH2-2 を持つヒトに一気飲みなどを強要すると、急性の中毒などにより命を落とすこともある。このように、飲酒許容量は遺伝子によって決定されており、*ALDH2-2* が *ALDH2-1* に突然変異する可能性もほとんどないことなどから、完全欠損型(*ALDH2-2*/*ALDH2-2*)のヒトの飲酒許容量が訓練などにより増すことはない。

実は、ヒトのお酒に対する許容量と ALDH2 タンパク質の機能との関係は、これまでに解説したほど単純ではなく、*ALDH2* 遺伝子以外にも飲酒許容量に関与する遺伝子があるため（たとえば Alcohol dehydrogenase 1B）、*ALDH2* 遺伝子のみで単純に飲酒許容量を説明できるわけではない。 遺伝子型と表現型は、単純に対応しているように見えるが、ある遺伝子が特定の表現型を説明できる例は意外と少なく、多くの遺伝子は単純に表現型と対応しているわけではない。

[参 考]

1. アルデヒド脱水素酵素遺伝子については、**「やさしいバイオテクノロジー カラー版」** pp106-109 に解説してある。
2. 対立遺伝子、遺伝子型、表現型などは同著「**1-2 分子生物学の基礎と細胞生物学**」、「**1-3 ミクロな生物学**」、pp102-103 などに解説してある。
3. アルデヒド脱水素酵素 2　ALDH2 について
   - 対立遺伝子＝＞*ALDH2-1*、*ALDH2-2*　の 2 種類
     対立遺伝子 *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の具体的な違いは「**5-1. 参考**」に示してある。
   - 遺伝子型＝＞*ALDH2-1*/*ALDH2-1*、*ALDH2-1*/*ALDH2-2*、*ALDH2-2*/*ALDH2-2*　の 3 種類
   - 表現型＝＞お酒が飲める、お酒がたしなみ程度に飲める、お酒が飲めない　の 3 種類

2-2-4 本実験の戦略

本実験では、各自の頭髪細胞から Genome DNA を抽出し、PCR 法による DNA 型鑑定法によりアルデヒド脱水素酵素の遺伝子型を推定する。

ALDH2 遺伝子は**点突然変異による 1 塩基置換の対立遺伝子**が見つかっていることから、前ページの「参考」のように**3 通りの遺伝子型・表現型**があることがわかっている。

本実験では次の 3 通りの方法で *ALDH2* 遺伝子の遺伝子型を推定する。

1. 2 種類の *ALDH2* 対立遺伝子間で変異している部分を 3' 末端とする PCR primer を利用し、PCR 増幅の有無を調べることで遺伝子型を推定する。

2. 置換部位を含まない Primer で増幅した *ALDH2* 遺伝子の断片を、置換部位を認識する制限酵素による切断の有無を調べることで遺伝子型を推定する。

3. 簡易推定法であるアルコールパッチテストで遺伝子型を推定する。

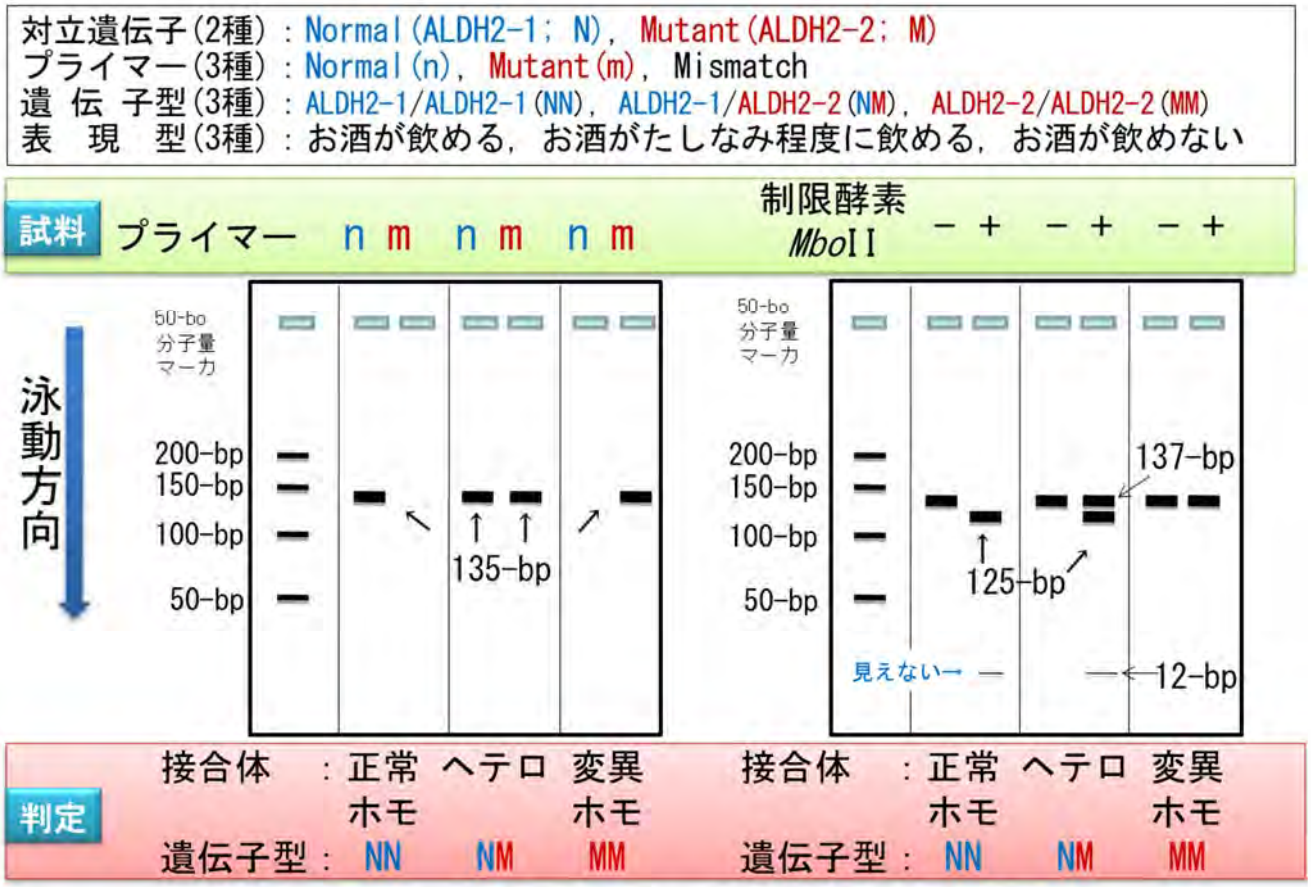

図2-5 本実験における理想的なアガロースゲル電気泳動像

[参 考]

Nakamura, K. *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, **31**, 439-445 (1993)

PCR プライマーの設計や制限酵素実験などはこの文献を参考にした。