第 5 章　参考・課題（冊子体テキストにない解説がかなりある）

5-1. 参　考（冊子体テキストにない解説がかなりある）

5-1-1 【遺伝子と遺伝のしくみ】（冊子体テキストにはない）

ヒトを含め、すべての生物の体は細胞からできている。生物は細胞核を持つ真核生物と細胞核を持たない原核生物に大別できる。ヒトの細胞は核を持つため、ヒトは真核生物の一種である。

ヒトの体細胞の細胞核には 23 対 46 本の染色体がある（第 1～第 22 染色体までの常染色体と 1 組の性染色体。2n）。1 本の染色体には 1 分子の DNA と多種・多数のヒストンタンパク質が含まれている。DNA は 4 種のヌクレオチド（アデニン、グアニン、シトシン、チミン）の重合体である。第 1～第 22 染色体と X および Y 染色体の遺伝情報（塩基配列）全体がヒトゲノムであり、約 30 億塩基対の遺伝情報を含む。

対になっている染色体の 1 本は母親から 1 本は父親から受け継いでいる。ヒトゲノムには 2 万数千の遺伝子があり、いずれの遺伝子も（男の性染色体を除く）対になって細胞核に存在する（遺伝子の**コピー数多型**の場合を除く）。遺伝子は、大ざっぱにいって、DNA の中の転写される領域のこと（いろいろな定義がある）。

2n の生殖細胞の前駆体から減数分裂によって n の配偶子が生じる。減数分裂により、対になっている染色体のうちいずれかが受け継がれる（相同染色体間で交叉しながら）。したがって、対になっていた遺伝子は配偶子ではそのうちいずれか 1 つの遺伝子になる（遺伝子の**コピー数多型**を除く）。

配偶子同士の受精により、すべての遺伝子は再び対になり（ゲノムも 2 セットになる）、新しい個体が誕生する。

DNA、遺伝子、ゲノム、染色体、減数分裂、交叉、遺伝子型、表現型などの基本用語は

「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」**に詳しく解説してある。

ALDH2 遺伝子には 2 種類の対立遺伝子がある（*ALDH2-1*［正常型］と *ALDH2-2*［変異型］。実際にはもっと多数あるが）。この 2 種類の対立遺伝子の組み合わせは 3 通りある。すなわち、遺伝子型が 3 通りある。それぞれの遺伝子型に対して、「お酒が飲める」、「お酒がたしなみ程度に飲める」、「お酒が全く飲めない」の 3 通りの表現型と対応している。

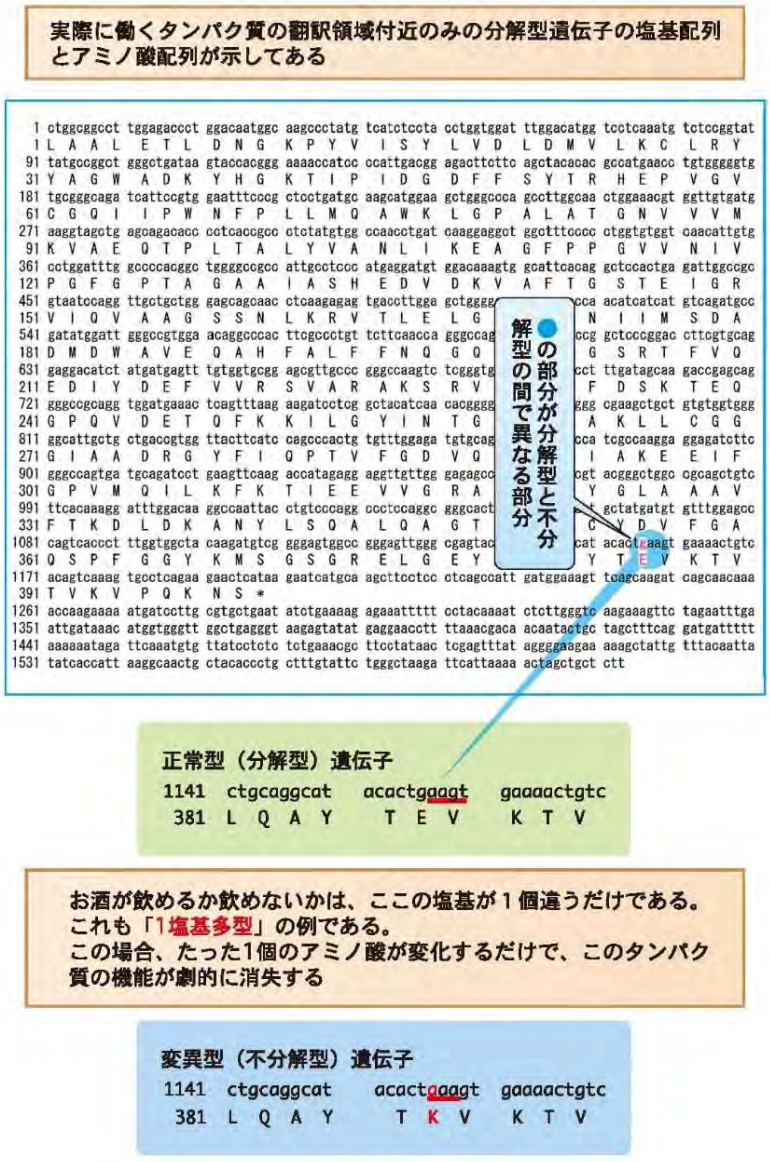
表 5-1 *ALDH2* の遺伝子型と諸性質

遺伝子型	表現型	日本人の分布	PCR 反応の鎖延長 Normal	PCR 反応の鎖延長 Mutant	*Mbo*II 切断	アルコールパッチテスト
ALDH2-1/ALDH2-1	お酒が飲める	54%	○	×	○	変化なし
ALDH2-1/ALDH2-2	お酒がたしなみ程度に飲める	40%	○	○	○×	時間がたてば赤くなる
ALDH2-2/ALDH2-2	お酒が飲めない	6%	×	○	×	赤くなる

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。

5-1-2 【Human aldehyde dehydrogenase 2 mRNA の塩基配列と予想されるアミノ酸配列】
「やさしいバイオテクノロジー カラー版」p107 より。

3 大データベースに Accession No. = K03001 で登録されている（冊子体テキストにはない）。
mRNA の塩基配列の一部。intron 部分は含まれていない。
塩基配列（上段）は見やすいように 10 塩基毎にスペース挿入。実際には連続している（以下同様）。
下段はアミノ酸配列。1 文字表記。



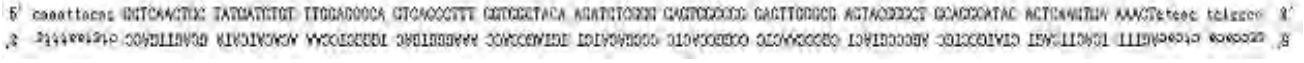
5-1-3 【*ALDH2* の遺伝情報】（冊子体テキストとほぼ同じ）

1） 正常型 ***ALDH2-1*** 遺伝子，exon 12 付近の塩基配列（センス鎖のみ、Accession No. = M20455）

1-->10 intron(小文字)　11-->125 exon(大文字)　126-->137 intron(小文字)

```
  1 caaattacag GGTCAACTGC TATGATGTGT TTGGAGCCCA GTCACCCTTT GGTGGCTACA
 61 AGATGTCGGG GAGTGGCCGG GAGTTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA
121 AAACTgtgag tgtggcc
```

ALDH-2-1 の exon12 付近を二本鎖で表すと、



2） 変異型 ***ALDH2-2*** 遺伝子； *ALDH2-1* の 114 塩基目の G が A に置換。他の塩基配列は *ALDH2-1* と同じ。

5-1-4 【Primer の塩基配列とアニーリング】(冊子体テキストより詳しい)

Forward primer;	5' - CAAATTACAGGGTCAACTGCT -3'	Tm=60.6℃
Reverse primer;		
Normal primer;	5' - CCACACTCACAGTTTTCACTTC -3'	Tm=61.2℃
Mutant primer;	5' - CCACACTCACAGTTTTCACTTT -3'	Tm=60.6℃
Mismatch primer;	5' - GGCCACACTCACAGTTTTCTCTT -3'	Tm=65.5℃

Primer は 1 本鎖の合成 DNA で相補鎖はない。

Mismatch することを考慮して Mismatch primer だけ Tm 値が高めの Primer を設計した。

4 種の PCR primer が鋳型 DNA に対してどのようにアニーリングするかを次の図で解説してある。

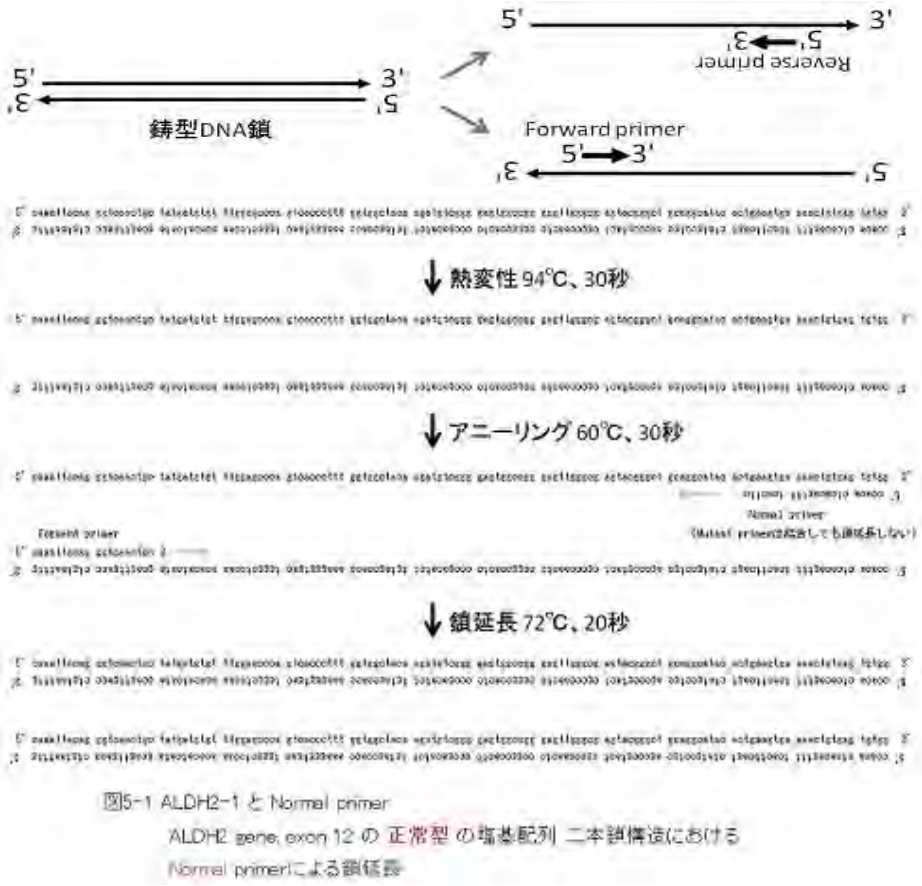


図5-1 ALDH2-1 と Normal primer
ALDH2 gene, exon 12 の 正常型 の塩基配列 二本鎖構造における
Normal primerによる鎖延長

図 5-1 *ALDH2-1* と Normal primer

図 5-2 *ALDH2-2* と Mutant primer

図 5-3 *ALDH2-1* と Mismatch primer

5-1-5 【鋳型 DNA にアニーリングする各種下流側 Reverse primer のまとめ】

```
ALDH2-1       101 5'- GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Normal primer                 3'- cttcact tttgacactc acacc   -5'

ALDH2-2       101 5'- GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Mutant primer                 3'- tttcact tttgacactc acacc   -5'

ALDH2-1       101 5'- GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
ALDH2-2       101 5'- GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Mismatch primer               3'-  ttctct tttgacactc acaccgg -5'
```

1) センス鎖とアンチセンス鎖

DNA は二重らせん構造をしており、二本の鎖は逆向きである。mRNA（一本鎖）と同じ方向の配列をセンス鎖、その相補鎖（転写の時の鋳型になる鎖）をアンチセンス鎖とする。

Forward primer はセンス鎖と同じ方向であり、アンチセンス鎖とのみアニーリングし、センス鎖とはアニーリングしない。Forward primer は *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の両方の遺伝子と完全にアニーリングする。

Reverse primer である Normal, Mutant Mismatch の各 Primer はアンチセンス鎖と同じ方向であり、センス鎖とのみアニーリングし、アンチセンス鎖とはアニーリングしない。

2) 完全なアニーリング -> 鎖延長

Normal primer は *ALDH2-1* と Mutant primer は *ALDH2-2* と完全にアニーリングし、その後、伸長反応が起こる。

```
ALDH2-1       101 5'- GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Normal primer               3'- ← cttcact tttgacactc acacc   -5'

ALDH2-2       101 5'- GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Mutant primer               3'- ← tttcact tttgacactc acacc   -5'
```

3) 不完全なアニーリング -> 鎖延長なし

ALDH2-1 遺伝子が鋳型の場合、Mutant primer は 60℃のアニーリング温度において、おそらくアニーリングする。しかし伸長反応の先端の塩基対 1 対が相補的でないため、伸長反応は起こらないと思われる。

```
ALDH2-1       101 5'- GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Mutant primer               3'- × tttcact tttgacactc acacc   -5'
```

同様に *ALDH2-2* 遺伝子が鋳型の場合、Normal primer がアニーリングするが伸長反応が起こらないと思われる。

```
ALDH2-2       101 5'- GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Normal primer               3'- × cttcact tttgacactc acacc   -5'
```

4) Mismatch primer

Mismatch primer は *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の両方の遺伝子とアニーリングする。この場合、ゲノム DNA の塩基配列と 1 塩基異なるが、本実験のアニーリング温度は 60℃のため、Mismatch primer は両方の遺伝子とアニーリングすると思われる（なぜ Mismatch にしているかは「**5-1-6【制限酵素 *Mbo*II の認識配列と切断部位】**」参照）。

```
ALDH2-1       101 5'- GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
ALDH2-2       101 5'- GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACTGTGAG TGTGGCC -3'
Mismatch primer             3'- ← ttctct tttgacactc acaccgg -5'
```

このような Mismatch primer による Mismatch アニーリングはゲノム DNA が鋳型になった場合だけで、PCR 反応により新たに合成された DNA 鎖が鋳型になった場合は Mismatch primer は完全にアニーリングする（Mismatch アニーリング部位の塩基配列は Mismatch primer 配列に置き換わっている）。

5-1-6 【制限酵素 *Mbo*II の認識配列と切断部位】（冊子体テキストより詳しい）

制限酵素は二本鎖 DNA のある特定の塩基配列を認識し、ある特定の二本鎖 DNA の部位を 1 カ所切断する酵素（例外もある）。制限酵素は二量体の場合が多く、回文構造の認識配列をそれぞれのサブユニット酵素が 1 本の DNA を切断するものが多い。すべての制限酵素は細菌由来で、制限酵素の名前には由来細菌の学名の一部がつけられている。（属名の頭文字を大文字で書き、種名の最初の 2 文字、合計 3 文字をイタリック体で示す。その後菌株名を記すこともある。最後のローマ数字は同じ菌株から見つかっている制限酵素の順番を表している。本実験に使用する *Mbo*II は ***M****oraxella* ***bo****vis* 由来で、この細菌は *Mbo*I と *Mbo*II の二種類の制限酵素をつくる）

制限酵素は細菌が外来 DNA から守るための防衛機構の一つとして存在している。自身の DNA は制限酵素と同じ認識配列をもつメチル化酵素（DNA メチラーゼ）により保護しているため、制限酵素は外来 DNA のみ切断し、自身の DNA は切断しない。このように、細菌では、DNA のメチル化は自身の DNA と外来の DNA を区別に使われ、外来の DNA から自身の DNA を守ることに役立っている。

多数の制限酵素が、さまざまな試薬メーカから市販されている。しかし、市販の制限酵素の中に *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の相違部分を含む塩基配列を認識する制限酵素がないため、本実験では、Mismatch primer により制限酵素認識配列を導入する方法をとっている。

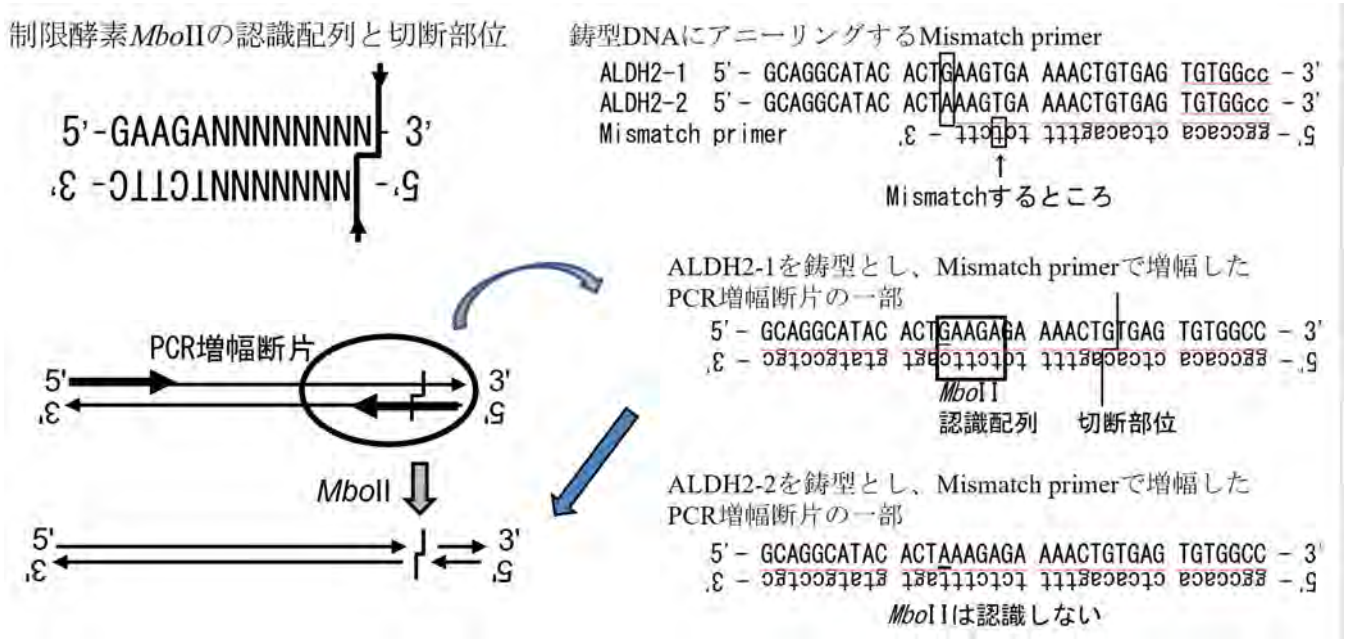


図 5-4 制限酵素 *Mbo*II の認識、切断サイトと制限酵素による PCR 増幅断片の切断様式

【*Mbo*II メチラーゼについて】

本実験で使用する制限酵素 *Mbo*II は *Moraxella bovis* 由来で、二本鎖の 5’-GAAGA- 3’ 配列を認識する。同じ *M. bovis* は Modification methylase *Mbo*II（Adenine-specific methyltransferase *Mbo*II、DNA メチラーゼ *Mbo*II）を合成している。この DNA メチラーゼ *Mbo*II は制限酵素 *Mbo*II と同じ二本鎖の 5’-GAAGA- 3’ 配列を認識し、5 塩基目の A をメチル化する。

多くの制限酵素認識配列は回文構造になっているため、制限酵素の認識配列内に切断部位やメチル化部位があり、相補鎖も同じ位置にある。しかし、制限酵素 *Mbo*II の認識配列は回文構造ではないため、切断部位も認識配列にはなく、5’-GAAGA- 3’ 配列からみて下流側にある。DNA メチラーゼ *Mbo*II のメチル化部位は 5’-GAAGA- 3’ 配列の 5 塩基目の A だけが確認されており、相補鎖の C をメチル化するかどうかは確かめられていない。メチル化された配列 5’-GAAGmA- 3’ を制限酵素 *Mbo*II は認識できないため、*M. bovis* のゲノムやプラスミドの DNA は DNA メチラーゼ *Mbo*II によるメチル化により保護されている。

［参 考］

1. http://beta.uniprot.org/uniprot/P23192/

5-1-7 **【エタノールパッチテスト】**（冊子体テキストと同等、置かれている場所が違う）

実際の飲酒の場合、摂取したエチルアルコールは主に肝臓において代謝され、最終的には二酸化炭素と水にまで分解されることから、肝臓で発現している関連酵素の有無が重要である。

エタノールパッチテストでは、皮膚の色の変化により、アセトアルデヒド分解の有無を判定している。皮膚の細胞においてアルコールの代謝に関連している遺伝子群の発現と肝臓のそれらとは異なるため、皮膚を使うエタノールパッチテストの結果が必ずしも肝臓におけるアルコール代謝の強弱を反映するとは限らない。したがって、エタノールパッチテストによりアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 の遺伝子型が正確に判定できるとは限らない（参考にはなる）。遺伝子型が *ALDH2-1* と *ALDH2-2* のヘテロ接合体、あるいは *ALDH2-2* のホモ接合体が疑われる場合は、ドラッグストアなどで買える「アルコール体質試験パッチ」（ライフケア技研）などを併用してみるとよい（3 枚入り）。「アルパッチ」、「ASK アルコール体質判定セット」などのキットも市販されている（高価；いずれもサンプルや資料が用意してある）。

ガーゼ付き絆創膏を使ってパッチテストを行う場合、エタノールが絆創膏の隙間から蒸発しやすいため、エタノール保持に工夫を要する。ガーゼ付き絆創膏のガーゼ部分に余計な薬剤が使われている場合はパッチテストに使えない。

5-1-8 **【毛髪からの DNA 抽出について】**（冊子体テキストとほぼ同じ）

毛髪や爪は皮膚の一種であって上皮細胞が角質化によって生じたものである。角質化にともない、正常な細胞形態は破壊され死滅しているが、核の中にあった DNA は比較的安定で、角質化組織の中の DNA は高分子状態のまま存在している。抜け落ちた頭髪や死体に付着した頭髪中の DNA は、他の組織の死滅した細胞内の DNA と比べて、比較的安定して存在している。

DNA は角質化した組織に残っているため、毛根部だけでなく、毛根より先端側数センチの毛幹部や爪にも DNA が含まれている（毛髪の先端部分は毛先部と呼ぶ）。角質化組織の主成分はケラチン等のタンパク質である。したがって、毛根部、毛幹部、爪などからタンパク質を分解することで DNA を抽出することができる。

本実験では Proteinase K によるタンパク質の部分分解のみで毛根部から DNA を抽出している。DNA 抽出効率を高めるためには、Proteinase K 溶液の中にタンパク質を変性させる尿素、SDS、DTT（ジチオスレイトール）などを加える。Proteinase K も酵素タンパク質であるため、タンパク質変性剤の存在下で機能しないように思えるが、Proteinase K は尿素、SDS、DTT などに対して耐性を示すため、組織のタンパク質分解酵素として Proteinase K がよく用いられる。

一般には、この DNA 抽出物に含まれるタンパク質等の不純物を除くため、**フェノール抽出法**により**除タンパク質**し、さらに、**エタノール沈殿法**により DNA は**精製**される。

フェノールは強力なタンパク質変性剤である。水溶液に弱アルカリ性の緩衝液（約 pH 8）で平衡化したフェノールを加えて攪拌した後遠心分離すると、水層（上層）とフェノール層（下層）に分かれる。中間層に見られる白い沈殿物が変性したタンパク質である。DNA はフェノールにより変性せず、水溶性のため、水層に溶けている。

この水層中 DNA 以外の成分を除き、DNA の水溶液として精製するために、あるいは濃縮するためにエタノール沈殿法が用いられる。DNA 溶液中に適切な塩の存在下で 2.5 倍量のエタノールを加えると DNA は凝集し、遠心分離によって沈殿として得ることができる。この沈殿物を 75%エタノールで洗って塩を除去し、エタノールをとばした後、Nuclease-Free 滅菌水などに溶かすことで精製 DNA を得ることができる。

［参 考］

1. Sambrook, J. and Russell, D. W.：Molecular Cloning 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)

5-1-9 【アガロースゲル電気泳動像について】(冊子体テキストにはない)

PCR 反応により、理想的には 1 本のバンドが確認できるはずだが、実際には複数のバンドが確認できる。

まず、DNA 分子量マーカーの位置を参考にして、目的の増幅断片を推定する。

この実験では Normal primer と Mutant primer を用いた増幅断片の有無と Mismatch primer を用いて増幅した PCR 断片の制限酵素による切断の有無の 2 種類の実験で ALDH2 の遺伝子型の推定を行っている。

ALDH2 は 2 種類あるため、遺伝子型は 3 種類ある。それぞれの遺伝子型と増幅断片や制限酵素切断には次のような関係がある。

図 2-4 も参考に。

1) Normal primer または Mutant primer を用いた PCR 実験

PCR 反応により primer の 3’末端がアニーリングした場合、135-bp の増幅断片が生じる。

ALDH2-1/ALDH2-1(NN)遺伝子型：正常型ホモ接合体

Normal primer で増幅するが Mutant primer では増幅しない

ALDH2-1/ALDH2-2(NM)遺伝子型：正常型と変異型のヘテロ接合体

Normal、Mutant 両方の Primer でそれぞれ増幅する

ALDH2-2/ALDH2-2(MM)遺伝子型：変異型ホモ接合体

Normal primer では増幅しないが Mutant primer で増幅する

2) Mismatch primer を用いて増幅した PCR 断片の制限酵素による切断実験

いずれの遺伝子型も PCR 反応により 137-bp の増幅断片が生じる。

ALDH2-1/ALDH2-1(NN)遺伝子型：正常型ホモ接合体

両増幅断片に *Mbo*II 認識サイトがある。

*Mbo*II により 137-bp のバンドは消え、125-bp と 12-bp に切断される

実際には 12-bp バンドは薄いため確認できない。

ALDH2-1/ALDH2-2(NM)遺伝子型：正常型と変異型のヘテロ接合体

増幅断片に *Mbo*II 認識サイトを含むものと含まないものが理想的には等量含まれる

*Mbo*II により 125-bp に切断される断片と切断されない断片が等量含まれる

ALDH2-2/ALDH2-2(MM)遺伝子型：変異型ホモ接合体

両増幅断片に *Mbo*II 認識サイトがないため、*Mbo*II により切断されない

137-bp のまま変化なし

［参 考］

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

5-2. 課　題（冊子体テキストより詳しい）

1. 肝臓で機能する酵素の遺伝子型が、なぜ、頭髪を用いて決定できるのか解説せよ。

   ヒント：『**カラー図解でわかる高校生物超入門**』に同様の項目で詳しく解説してある

2. ヒトゲノムにおける *ALDH2* 遺伝子の位置を図解せよ。また、ヒト *ALDH2* の構造（エキソンとイントロンの配置など）を調べ、遺伝子の全体像を図示し、実験に使用した Primer がアニーリングする位置を考察せよ。

   ヒント：遺伝子の構造を問うている。タンパク質のアミノ酸配列、mRNA の塩基配列ではない。
   「5-1-2」の塩基配列は翻訳領域の一部のみ。この塩基配列はエキソンの一部のみでイントロンは含まれていない。エキソン（exon）をエクソンともいう。
   この PCR 実験では鋳型にゲノム DNA を使っているので、イントロンが含まれている。「5-1-3」に示した塩基配列は 12 番目のエキソンとその前後 10 塩基分のイントロンの配列である。これらの配列を考慮して、この**遺伝子**のどの部分に Primer がアニーリングするか、あるいは Primer がアニーリングする位置の**意味**を考察する。

塩基配列やアミノ酸配列等は日米欧の三大データベースで検索可能。

- DDBJ: DNA Data Bank of Japan (http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html)
- NCBI: National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- EMBL: European Molecular Biology Laboratory (http://www.ebi.ac.uk/)

その他のデータベース

- *ALDH2-1* の全 mRNA 塩基配列は **Accession No. NM_000690** に登録されており、すべての exon の配列が示される。intron を含む *ALDH2-1* 遺伝子の構造は「Entrez gene の GeneID:217」など。
- NCBI の Entrez Gene から「ALDH2」をキーワードに検索すると、最初にヒットする「ALDH2 aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)」に詳しい情報がリンクされている。また、Ensembl Human Gene View にも詳細な情報がリンクされている。
- H-InvDB の H-Invitational Database (http://www.h-invitational.jp/) も使いやすい。ヒトの遺伝子に膨大な注釈が加えてあり、他生物とのマルチプルアライメントなど使いやすいツール満載。「ALDH2」なら「H-Inv cluster ID: HIX0011002」。
- HUGO Gene Nomenclature Committee 「http://www.genenames.org/」も便利(「ALDH2」で検索)。

上記データベースなどから、ヒト以外の遺伝子構造の情報も簡単に得ることができる。
ヒトと他生物とのあいだで、総塩基数やエキソンの数を比べるとおもしろい。

3. **PCR 法を応用**した以下の実験技術について調べよ（PCR 法との関連部分を述べるように）。
   a. DNA シーケンス（サイクルシーケンス）

      ヒント：『**やさしいバイオテクノロジー カラー版**』の「塩基配列を決定する方法 ジデオキシ法」参照。PCR 装置を塩基配列の決定にどのように利用しているかを考える。単なる塩基配列決定法を問うているわけではない。
      さらに、今回の実験方法で増幅した PCR 断片の塩基配列が PCR 装置を使って決定できるかどうかも考える。できるのなら、どのような方法（Primer など）があるか？

   b. 定量 PCR 法（リアルタイム PCR 法など）

      ヒント：「リアルタイム PCR 法」をキーワードに調べるとよい。リアルタイム PCR 法以外にもいくつか定量 PCR 法がある。リアルタイム PCR 法で用いられる蛍光試薬を調べ、なぜ定量できるのかを考える。
      また、何の定量に利用されているかを調べ、今回の実験方法で DNA の定量が可能かどうか、その意味があるかどうかも考える（新型コロナウイルスの PCR 検査でも採用されている）。