

第22回麻布環境科学研究会 講演 B5

アポリポ蛋白EとABOの遺伝子多型解析

太田 悦朗, 村山 洋, 西村 友美子, 小澤 裕昭, 今井 一絵,
石黒 香代, 藤田 和代, 木下 弥代美, 松田 基夫

麻布大学環境保健学部遺伝子生物学研究室

1. 序 文

一般的に疾患の発症要因には、環境的要因と遺伝的要因が密接に関わっている。痴呆症や精神障害では、両方の要因が複雑に関与する弧発型が多く、その発症メカニズムは未解明である。遺伝的要因には量的、質的に個人差があるとされ、その解明には、関連遺伝子を中心とした個人識別を行うことが、将来、病気の診断や治療への応用につながるのではないかと考えた。そこで、本研究では、代表的な痴呆症である弧発性アルツハイマー病の危険因子であるアポリポ蛋白 E (以下、apoE) 遺伝子と個人識別に利用される ABO 対立遺伝子に着目した。

apoE 遺伝子型は、112 番目と 158 番目のコドンに存在する多型性により、E2/E2・E2/E3・E2/E4・E3/E3・E3/E4・E4/E4 に型別され、E3/E4・E4/E4 がアルツハイマー病 (以下、AD) の危険因子であると報告されている¹⁾。また、個人識別に利用される ABO 血液型の遺伝子型は、AA・AO・BB・BO・OO・AB に型別され、1塩基欠失と置換で生じる制限酵素認識配列を利用した消化断片の違いで容易に判定できる²⁾。

今回、apoE 遺伝子と同時に個人識別という観点と解析の容易さから ABO 対立遺伝子について解析を進め、115 検体を解析したので、これについて報告する。

これに加えて、アミロイド前駆体蛋白質 (以下、APP) 遺伝子についても解析を行った。APP 遺伝子は、家族性 AD の原因遺伝子の一つであり、Aβ 領域に変位が集中して報告されている³⁾。また、家族性統合失調症においても Aβ 領域に変異が報告されている⁴⁾。よって、APP の Aβ 領域が中枢神経機能にとって重要

であると考えられるので、解析の対象として解析方法を検討した。その途中経過についても報告する。

また、多型解析には簡単かつ迅速な解析方法が良いと考え、試みとして、apoE と APP の 2 つの遺伝子について同時に増幅させる方法 (以下、同時 PCR 法) と同時多型解析法の開発についても検討した。

2. 材料と方法

1) 多型解析：成人 (健常者) 115 名の血液からゲノム DNA を抽出した。その DNA を鋳型とし、apoE 遺伝子の多型のある領域 (244 bp)、ABO 対立遺伝子の 1 塩基欠失により O 型を示す領域 (199 bp) と 1 塩基置換の有無により A 型と B 型を示す領域 (128 bp)、APP 遺伝子の Ab の一部を含む領域 (147 bp) を増幅した。PCR 産物に対して、apoE 遺伝子は制限酵素 Hha I、ABO 対立遺伝子は制限酵素 Kpn I、Alu I で処理し、ポリアクリルアミド電気泳動のパターンにより遺伝子型を判定した^{2,5)} (図 1)。APP 遺伝子の PCR 産物は、シークエンスにより変異の有無を調べた (図 2)。また、解析方法の検討として、APP の野生型と変異型 cDNA を用いて SSCP (single strand conformation polymorphism) を行った。

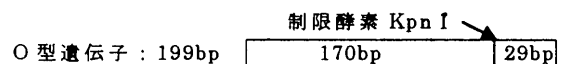


図 1 B 型遺伝子と O 型遺伝子の制限酵素による切断部位



図 2 APP 遺伝子の変異部位

2) 同時 PCR 法および同時多型解析方法：PCR で上記の apoE 遺伝子 (244 bp) と APP 遺伝子 (147 bp) を同時に増幅させるために、条件決めを行った。アニーリング温度とプライマー濃度、PCR のサイクル数について検討した。同時に増幅させた apoE 遺伝子と APP 遺伝子の PCR 産物を用いて、シーケンス、RFLP、SSCP で遺伝子解析を検討した。

3. 結果と考察

1) 多型解析：115 検体の apoE 遺伝子と ABO 対立遺伝子を解析した。各遺伝子型の頻度は、apoE 遺伝子では、E3/3 が 84 名 (73%)、E3/4 が 17 名 (14.8%)、E2/3 が 8 名 (7%)、E2/4 が 5 名 (4.3%)、E4/4 が 1 名 (0.9%)、E2/2 が 0 名 (0%)、ABO 対立遺伝子では、AA が 9 名 (7.8%)、AO が 41 名 (35.7%)、BB が 4 名 (3.5%)、BO が 22 名 (19.1%)、OO が 29 名 (25.2%)、AB が 10 名 (8.7%) であり、それぞれ日本人における頻度⁶⁾ とほぼ近似していた (表 1)。ApoE と ABO の遺伝子型頻度の相関については、現時点で、ABO 遺伝子型の BB では、4 名中 2 名 (50%) が E2/4 であり、頻度としては AO における E2/4 の頻度 (41 名中 2 名：約 4.9%) よりも高かった。このことから、ABO 遺伝子型の BB では、E2/7 の頻度が高い可能性が示唆される。しかし、apoE 遺伝子型の E3/3 以外の検体数が少ないため、検体を増やして再検討するこ

とが必要であると考えられる。また、ABO の亜型を取り入れた相関についても検討する必要がある。今後は、多型解析では多くの検体を扱うので、迅速な解析法の導入を考えている。APP 遺伝子は、24 検体をシーケンスしたが、変異は認められなかった。APP の cDNA を用いた SSCP では、変異型と野生型の SSCP パターンが異なった。従って、SSCP の導入により変異の有無をスクリーニングできる可能性が考えられた。

2) 同時 PCR 法および同時多型解析方法：PCR は、特異性の高い条件が決まり、目的である apoE 遺伝子 244 bp と APP 遺伝子 147 bp を同時に増幅できた。これらの解析について、RFLP では、遺伝子型の判定が可能であった。同様に予備実験で、ABO 対立遺伝子の RFLP を確認した。また、SSCP は検討中である。

参考文献

- 1) Strittmatter WJ, et al. 1993. Science 261: 921-923.
- 2) Lee JC-I and Chang J-G. 1992. J. Forensic. Sci. 37: 1269-1275.
- 3) 森島真帆, 井原康夫. 2001. 生化学 73: 1297-1307.
- 4) Jones CT, et al. 1992. Nature Genetics 1: 306-309.
- 5) Hixsan JE and Vernier DT. 1990. J. Lipid. Res. 31: 545-549.
- 6) Davignon J, Gregg RE and Sing CF. 1998. Arteriosclerosis 8: 1-21.

表 1 apoE 遺伝子型と ABO 遺伝子型の解析結果

apoE 遺伝子型 n	ABO 遺伝子型							apoE 遺伝子型頻度	日本人の apoE 遺伝子型頻度
	AA	AO	BB	BO	OO	AB			
115	9	41	4	22	29	10			
E3/3	84	7	28	1	18	21	9	73.0%	71%
E3/4	17	1	8	1	1	5	1	14.8%	15%
E2/3	8	1	2	—	3	2	—	7.0%	12%
E2/4	5	—	2	2	—	1	—	4.3%	1%
E4/4	1	—	1	—	—	—	—	0.9%	1%
E2/2	0	—	—	—	—	—	—	0.0%	約 0%
ABO 遺伝子型頻度	7.8%	35.7%	3.5%	19.1%	25.2%	8.7%			
日本人の ABO 遺伝子型頻度	8%	31%	3%	19%	29%	10%			