

痴呆性神経疾患鑑別の為の微量蛋白測定技術の開発研究

研究報告書

〔概要〕

本研究は、主題である「脳活動に伴う二次信号の計測とその発生機序に関する研究」に関連する事業として、遺伝子および微量蛋白を用いた研究がどのように貢献できるかについて検討を加えることを目的とした。主にアルツハイマー型痴呆(AD)を例にとり、以下の3項目について診断・治療経過および予後を測定する際の問題点を明らかにし、その有用性について検討した。

【1】PCR改良法開発に関する検討

熱伝導性を高め、遺伝子増幅(PCR)の時間短縮の可能性について検討した。

アルミ容器による直熱方式では時間短縮ができたが、遺伝子が増幅されないことが判明した。また、アルミ容器の表面をテフロンコーティングし、遺伝子の増幅を試みたが、こちらでも遺伝子の増幅は検出できなかった。

そこで、PCR時の温度設定、容器素材について検討し、直接方式での遺伝子増幅の際の温度変化を通常のマイクロチューブ使用時の温度変化と同じに調製したが、遺伝子の増幅は検出できなかった。次にマイクロチューブと同じ素材でシート状の容器を作製しPCRを行ったところ、遺伝子増幅を検出できた。

【2】痴呆症例の経時変化に関する検討

AD症例では脳脊髄液中のタウ蛋白が有意に高値であり、ADの鑑別のためのマーカーとして有用であることが示唆された。またAD症例ではApoE遺伝子型の4が高頻度に認められ、4を持つ人ではAD発祥年齢が早かった。ADの危険因子としての役割が示唆された。

しかし、剖検症例ではタウ蛋白がA以外の症例においても異常に高値を示しており、これについては今後の課題となった。

【3】痴呆症例の剖検所見の検討

アルツハイマー型老年痴呆例のアポトーシスについて

当初の計画では、脳脊髄液中のタウ蛋白濃度が剖検例での組織学的変化とどのように対応するかを検討する予定であったが、臨床例と異なり剖検例においては、タウ蛋白に各種の非特異的な要素が加わり、特に頭蓋内に出血を伴う例では異常高値を示す可能性があることが判明し、今後更に検討を要することが明らかになった。そこで、今回は典型的なアルツハイマー型痴呆例における神経細胞の変性消失を形態学的、生化学的に示されるアポトーシスによる細胞死を検討した。この結果、従来から示されているprogrammed cell deathの要素を残しながら、非典型的アポトーシスが示唆された。

以上から、微量蛋白および遺伝子の測定に関する研究から痴呆をきたす疾患の鑑別が可能となった。こうした研究は、主題である「脳活動に伴う二次信号の計測とその発生機序に関する研究」の研究促進の一助として有用であることが示された。

【1】PCR改良法開発に関する検討

はじめに

1988年に初めて報告されたPCR(polymerase chain reaction)法は微量のDNAから数時間で目的とするDNA領域を数十万倍のレベルまで増幅することを可能にした。現在では分子生物学のみならず、幅広い分野において応用がなされている。

PCR法の利点はアイソトープを使用せず、試料DNAは少量でよく、短時間で結果が得られるなどであり、具体例として乾燥した血液や⁽¹⁾、1個の精子⁽²⁾、1本の毛髪⁽³⁾でも試料として扱うことができ、またDNAの抽出法に関しても簡便化されている。このため、遺伝子に関係する疾患の研究にPCR法は欠かせない基礎技術であり、遺伝子診断は今後特にPCR法の影響下に発展していくものと考えられる。例えば、アルツハイマー型痴呆におけるアポリポタンパクE(apoE)⁽⁴⁾⁻⁽⁸⁾やフェニルケトン尿症におけるフェニルアラニン水酸化酵素の異常など、PCR法によるDNAの増幅によって診断が可能になった疾患が数多くあり、今後も増加するものと思われる。

PCR法は以下の3ステップの反応を繰り返し行うことにより、目的のDNAを増幅する方法である。

- 1) 熱変性：2本鎖の検体DNAを高温(95℃程度)で1本鎖DNAに変性させる。
- 2) アニールング：対象となる鋳型DNAの増幅領域の5'末端側にプライマーと呼ばれるDNA短鎖を結合させる(通常、55~60℃)。
- 3) 伸長：プライマーの尾部(3'末端側)を起点としてDNAポリメラーゼの働きにより、鋳型DNAに相補的なDNA鎖を合成する。

3ステップが1サイクル行われるとDNAのコピー数は2倍になるので、理論的にはこれらのステップをn回繰り返すと対象DNAコピー数は 2^n 倍になる。PCRのこの反応ステップは30~40サイクル行われるので検体DNAは $2^{30} \sim 2^{40}$ 倍に増幅されることになるが、実際はポリメラーゼの失活、反応に伴う基質(テンプレート・プライマー複合体)の増加など種々の因子の影響で、1サイクル当たりの反応効率100%にはならない。増幅倍率は10~100万倍程度が限界である。

この一連の反応は温度の上昇、下降によりコントロールされる単純な反応であり、温度コントロールを自動的に行うさまざまな装置が販売されている⁽⁹⁾⁻⁽¹⁵⁾。これらの装置によりPCR法にかかる時間が短くなったとはいえ、遺伝子の取り扱いが、多数の検体を頻繁に行う必要性から、更なる時間短縮が望まれている。

そこで我々は、マイクチューブを使用せずにアルミブロックに直接サンプルを添加することでサンプルに加わる熱の伝導性を高め、DNAの増幅サイクルに要する時間を短縮させることを目的とした。

A. 薄型アルミブロック使用による時間短縮の検討

薄型アルミブロックに直接サンプルを入れることにより、熱伝導を高めPCRに要する時間の短縮が可能であるかを検討する。

【実験方法】

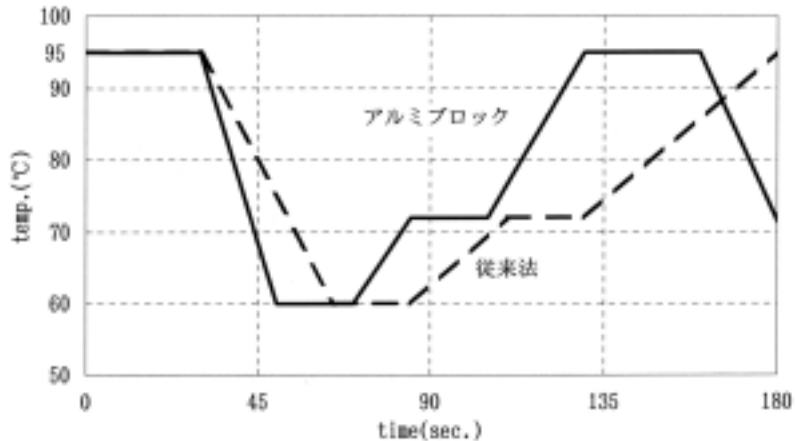
サンプルとして水を使用し、PCRの増幅サイクルに必要とする時間を計測した。

【結果】

従来法では、1サイクル当たり約180秒かかっていたが、薄型アルミブロックに

直接サンプルを入れる場合、1サイクル当たり約135秒であった(図1)。従って、反応全体で30サイクル行うとすると、約20分の時間短縮が可能となる。

図1 従来法とアルミブロック使用時における1サイクル当たりの所要時間



B. 薄型アルミブロック使用によるDNA増幅効率の検討

薄型アルミブロックに直接サンプルを入れることにより、時間短縮の可能性を見出したため、実際にDNAの増幅を試みた。

【実験方法】

マイクロチューブを使用したPCR(従来法)

増幅用チューブ(滅菌済み)を9本用意する。

各チューブにApo E Amplification KITに含まれている以下の試薬を添加する。

- ・増幅用バッファー 10 μ l
- ・ApoE プライマーミックス 10 μ l
- ・MgCl₂溶液 10 μ l
- ・50%グリセロール溶液 10 μ l

Taq DNAポリメラーゼ5 μ lにポリメラーゼ希釈液50 μ lを加え希釈し、各チューブに5 μ lずつ添加。

あらかじめ抽出してあったDNAを各チューブに2.5 μ lずつ添加。

ミネラルオイルを1滴重層する。(蒸発を防ぐため)

サーマルサイクラーのチューブセット位置にもミネラルオイルを滴下しておく。(伝導効率を上げるため。)

以下のサイクルで増幅を行う。2.3.4のサイクルを20、22、24、26、28、30、32、34、36回繰り返した後、サーマルサイクラーからチューブを取り出し、72の恒温槽にてインキュベートする。

1.変性	95	5 min.	
2.変性	95	30sec.	2.3.4.を所定の回数 繰り返す
3.アニーリング	60	20sec.	
4.プライマーの伸長	72	20sec.	
5.伸長	72	10min.	

増幅した DNA は -20 で保存する。

薄型アルミブロックを使用しての PCR

滅菌したアルミブロックに上記の で調製したサンプルを添加し、ミネラルオイルを滴下し、増幅を行う。所定のサイクル回数終了後、ピペットでサンプルを取り出し、72 の恒温槽にて 10 分間インキュベート、-20 で保存する。

増幅された DNA の電気泳動

< 試薬類 >

NuSieve GTG Agarose (TAKARA) 低(10-1000)bp 分析用

エチジウムブロマイド

× 6 泳動マーカー (0.25% プロモフェノールブルー / 40% サッカロース)

× 10 TAE (トリス酢酸緩衝液)

	添加量/500ml
Tris	24.2g
酢酸	5.71ml
0.25M EDTA-NaOH pH8.0	20ml

分子量マーカー X174/Hae digest (TOYOBO)

< 操作手順 >

TAE に 4 % 濃度になるようにアガロースを添加し、沸騰したお湯で加熱。アガロースが全体に溶けたことを確認してから 40 程度まで温度を下げる。

エチジウムブロマイドを 500 µg/l になるように添加し、ゲルトレイに流し込む。

ゲルが固化した後、一極側にウェルがくるようにゲルを泳動槽にセットし、500 µg/l になるようにエチジウムブロマイドを添加した TAE を流し込む。

泳動マーカーを添加した試料及び分子量マーカーを 15 µl ずつウェルに注入する。

電圧を 70V とし、泳動マーカーがゲルの端に移動するまで泳動を行う。

暗下で UV ライトにより、バンドを検出する。

【結 果】

マイクロチューブを使用して行った PCR の結果を図 2 に、アルミブロックに直接サンプルを添加したときの結果を図 3 に示す。マイクロチューブを使用した場合には、増幅サイクルの繰り返しが 28 回以上で DNA のバンドが検出された。アルミブ

ロックに直接サンプルを添加した場合、増幅サイクルを 36 回まで繰り返したが、DNA のバンドは検出されなかった。

図2 マイクロチューブを使用して増幅した DNA の電気泳動
(増幅サイクルの回数による差)

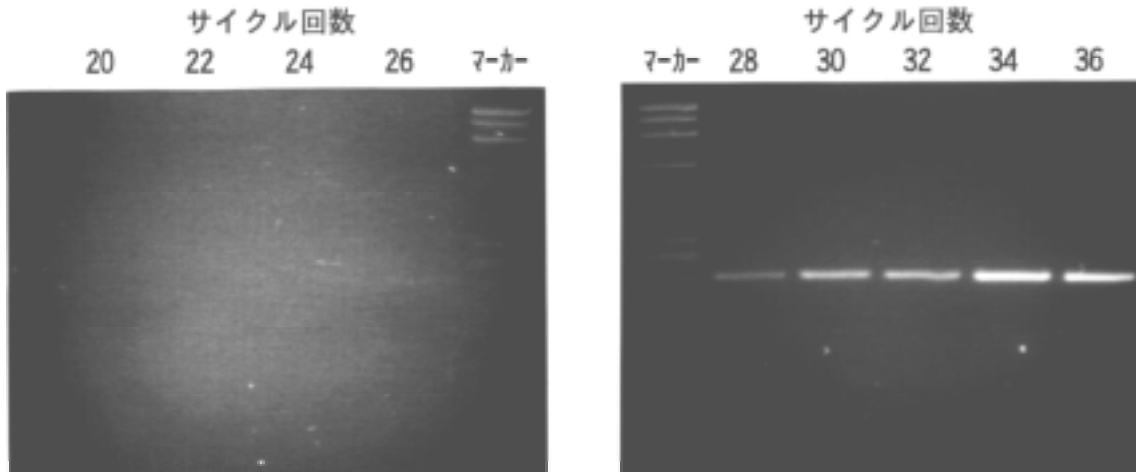
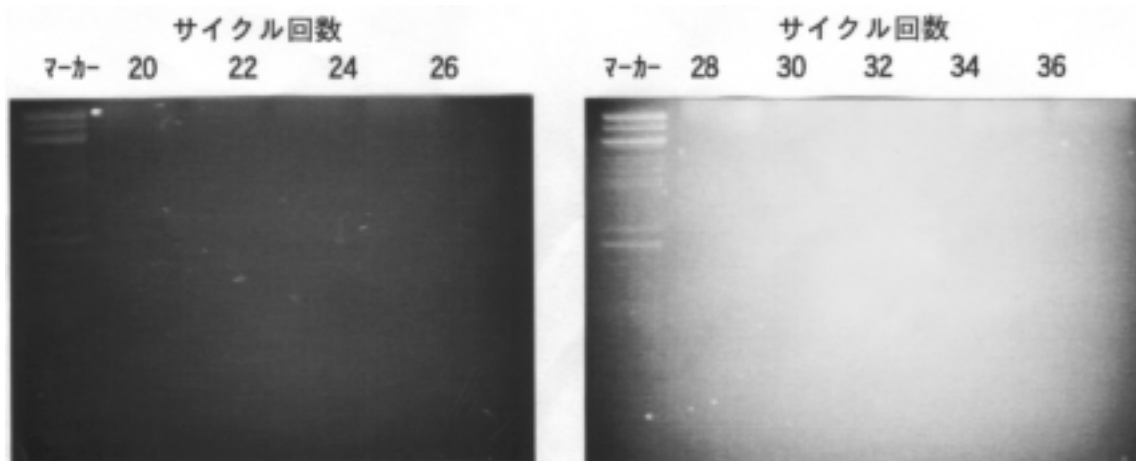


図3 アルミブロックを使用して増幅した DNA の電気泳動
(増幅サイクルの回数による差)



C. サーマルサイクラーの温度変化の検討

マイクロチューブ使用時とアルミブロックに直接サンプルを入れた時とではサンプルの温度変化が異なることを確認したため、サーマルサイクラーの温度設定を変更した。

従来の設定		変更後の設定	
95	30sec.	94.5	30sec.
60	20sec.	58.5	10sec.
72	20sec.	72.5	25sec.

【実験方法】

アルミブロックを洗浄、滅菌し、サーマルサイクラーにセットする。
増幅用チューブ(滅菌済み)に Apo E Amplification KIT に含まれている以

下の試薬を添加する。

- ・増幅用バッファー 70 μ l
- ・ApoE プライマーミックス 70 μ l
- ・MgCl₂ 溶液 70 μ l
- ・50%グリセロール溶液 70 μ l

Taq DNA ポリメラーゼ 3.5 μ l にポリメラーゼ希釈液 35 μ l を加え希釈し、のチューブに 35 μ l 添加。

あらかじめ抽出してあった DNA を 17.5 μ l 添加。

アルミブロック 5 カ所 (1 カ所には温度センサーを入れる。) に 50 μ l ずつ分注する。

ミネラルオイルを 1 滴重層する。(蒸発を防ぐため)

以下のサイクルで増幅を行う。2.3.4 のサイクルを 30、32、34、36 回繰り返した後、サーマルサイクラーからサンプルを取り出し、72 の恒温槽にて 10 分間インキュベートする。なお、残りの 1 カ所には温度センサーを入れ、サンプルの温度変化をモニターする。

1 . 変性	93.5	5min.	
2 . 変性	94.5	30sec.	2.3.4.を 繰り返す
3 . アニーリング	58.5	10sec.	
4 . プライマーの伸長	72.5	25sec.	
5 . 伸長	72	10min.	

増幅終了後のサンプルは 2 . と同様に電気泳動を行い、増幅したサンプルの検出を行う。

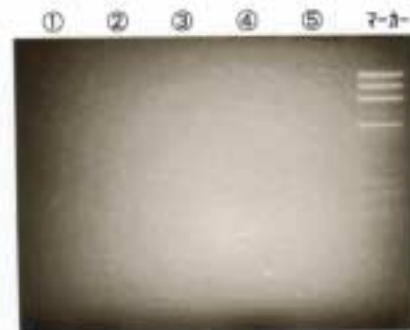
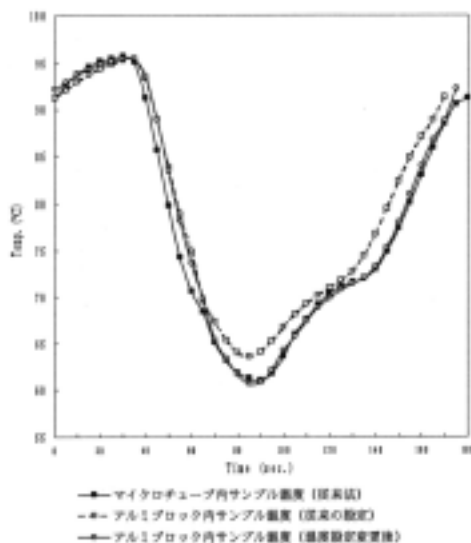
【結 果】

結果を図 4 に示す。増幅サイクルを最大 36 回まで行ったが、バンドの検出はできなかった。

図 4 (a) サンプルの温度変化と (b) 増幅した DNA の電気泳動

(a) サンプルの温度変化

(b) 増幅した DNA の電気泳動



- ① : 30 サイクル
- ② : 32 サイクル
- ③ : 34 サイクル
- ④ : 36 サイクル
- ⑤ : 36 サイクル (温度センサーを入れたもの)

D. アルミニウムの DNA 増幅に与える影響の検討

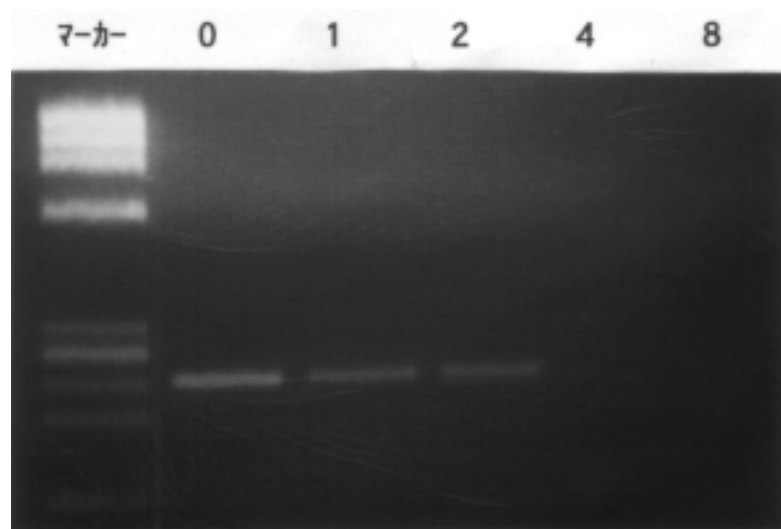
【実験方法】

サンプルは必要量調整後、マイクロチューブ 5 本に分注し、アルミホイル片 (5 mm × 5 mm) 0、1、2、4、8 枚をサンプル中に浸した。PCR はサイクル回数を 30 回とし、増幅後のサンプルは前述 B と同様に電気泳動を行った。

【結 果】

結果を図 5 に示す。アルミホイル片が増えるに従い、バンドが薄くなり、4 枚以上ではバンドは検出されなかった。

図 5 DNA 増幅に与えるアルミニウムの影響
アルミホイル片数



E. テフロン製ブロック使用による PCR

アルミブロックを用いた PCR では DNA の増幅が検出できなかったことから、ブロックの素材 (すなわちアルミニウム) に原因がある可能性から、テフロン製のブロックを作製した。しかし、DNA の増幅サイクル (95 60 72) がアルミブロックでは 1 回当たり約 2 分であるのに対し、テフロン製ブロックでは約 15 分必要とするため、テフロン製ブロックの使用は断念した。

F. テフロンコーティングアルミブロック使用による PCR

アルミブロックをテフロンでコーティングしたものを作製し実験を行った。

【実験方法】

テフロンコーティング・アルミブロックを洗浄、滅菌し、サーマルサイクラーにセットする。

増幅用チューブ (滅菌済み) に Apo E Amplification KIT に含まれている以下の試薬を添加する。

- | | |
|-----------------------|--------|
| ・増幅用バッファー | 60 μ l |
| ・ApoE プライマーミックス | 60 μ l |
| ・MgCL ₂ 溶液 | 60 μ l |
| ・50%グリセロール溶液 | 60 μ l |

Taq DNA ポリメラーゼ 3 μ l にポリメラーゼ希釈液 30 μ l を加え希釈し、のチューブに 30 μ l 添加。

あらかじめ抽出してあった DNA を 15 μ l 添加。

マイクロチューブ (2 種類 : 容量 0.6ml、1.5ml)、テフロンコーティング・アルミブロック 2 カ所 (片方には温度センサーを入れる。) に 50 μ l ずつ分注する。

ミネラルオイルを 1 滴重層する。(蒸発を防ぐため)

以下のサイクルで増幅を行う。

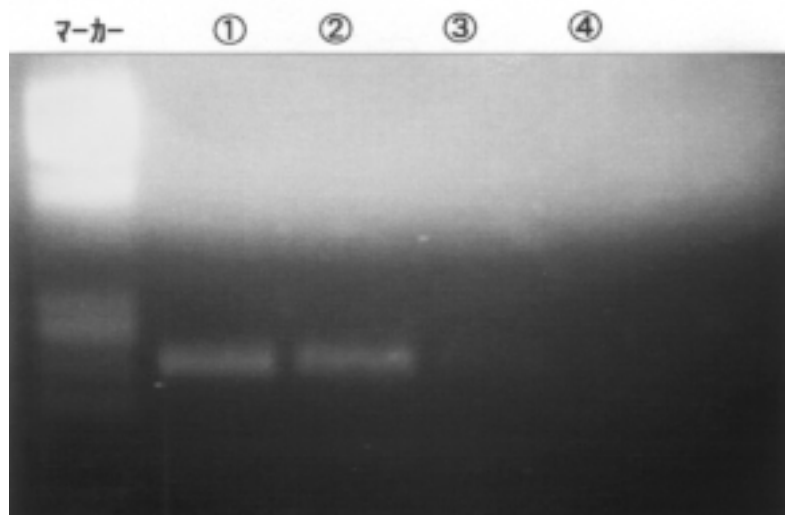
1 . 変性	95	5min.	2.3.4.を 30 回 繰り返す
2 . 変性	95	30sec.	
3 . アニール	60	20sec.	
4 . プライマーの伸長	72	20sec.	
5 . 伸長	72	10min.	

増幅終了後のサンプルは 1 . と同様に電気泳動を行い、増幅したサンプルの検出を行う。

【結 果】

結果を図 6 に示す。マイクロチューブにサンプルを入れて PCR したものではバンドが検出されたが (、)、テフロンコーティング・アルミブロックに直接サンプルを入れたものではバンドが検出されなかった (、)。

図 6 テフロンコーティングアルミブロックを使用して増幅した DNA の電気泳動



: マイクロチューブ (0.6ml) に入れて PCR したもの

: マイクロチューブ (1.5ml) に入れて PCR したもの

: テフロンコーティングアルミブロックに直接サンプルを入れて PCR したもの

: テフロンコーティングアルミブロックに直接サンプルを入れて PCR したもの (温度センサーを入れたもの)

G. シート状容器での PCR

マイクロチューブと同じ素材であるポリプロピレンをアルミブロックにコートすることを試みた。しかしポリプロピレンは金属と溶着しにくく、アルミブロックの形状が平板ではなく凹凸しているためコートすることはできなかった。そこでアルミブロックに密着するようにシート状の多連容器を作製し

PCR を行った。

【実験方法】

マイクロチューブ、シート状容器（共に滅菌済み）を用意する。

各容器に Apo E Amplification KIT に含まれている以下の試薬を添加する。

- ・ 増幅用バッファー 10 μ l
- ・ ApoE プライマーミックス 10 μ l
- ・ MgCl₂ 溶液 10 μ l
- ・ 50%グリセロール溶液 10 μ l

Taq DNA ポリメラーゼ 1 μ l にポリメラーゼ希釈液 10 μ l を加え希釈し、各容器に 5 μ l ずつ添加。

あらかじめ抽出してあった DNA を各チューブに 5 μ l ずつ添加。

ミネラルオイルを 1 滴重層する。（蒸発を防ぐため）

サーマルサイクラーのチューブセット位置にもミネラルオイルを滴下しておく。（伝導効率を上げるため。）

以下のサイクルで増幅を行う。

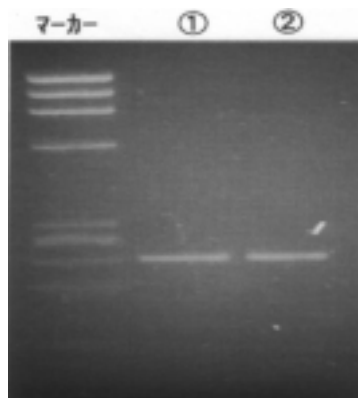
1. 変性	95	5 min.	2.3.4. を所定の 30 回 繰り返す
2. 変性	95	30sec.	
3. アニール	60	20sec.	
4. プライマーの伸長	72	20sec.	
5. 伸長	72	10min.	

増幅した DNA を電気泳動にてバンドを検出する。

【結果】

結果を図 7 に示す。ポリプロピレン素材のシート状の容器では、従来のマイクロチューブと同様の DNA 増幅が検出された。

図 7 増幅した DNA の電気泳動



：マイクロチューブ使用
：プレート状容器使用

考察とまとめ

通常のマイクロチューブを使用した PCR では、増幅サイクルの回数が 26 回以下では増幅 DNA の検出ができず、28~34 回では増幅サイクルの回数の増加と共に DNA 量が増加し、34 回と 36 回では DNA 量の差は判断できなかった。(図 2)。

ところが、アルミブロックに直接サンプルを添加した場合(以下、直熱方式)、増幅サイクルを 36 回まで繰り返したが、20~36 回のいずれもバンドの検出はできなかった。(図 3)。従って、単純にアルミブロックにサンプルを添加しても、DNA は増幅されないことが分かった。

この原因がアルミニウムというブロックの材質にあるのかを確かめるため、アルミブロックの代替物としてアルミホイルをサンプル内に浸して PCR を行った。その結果、アルミホイル片が増えると、PCR の効率が低下し、DNA の増幅ができないことが明らかになった(図 4)。従って、直熱方式で DNA が増幅されない原因として、アルミニウムによる DNA の増幅阻害(*Taq polymerase* の阻害)の可能性が考えられた。

アルミニウムは生体、ことに脳神経系で重要な二価イオン Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の作用を競合的に阻害することから、70 以上もの多くの機能性タンパク質、酵素の作用を *in vitro* で阻害することが報告されている⁽¹⁶⁾。さらに、 Al^{3+} イオンは PO_4^{3-} (リン酸基) と強く結合するため、リン酸化、脱リン酸化などの反応を阻害し、リン酸化タンパク質の増加・蓄積を起こす⁽¹⁷⁾。また、核酸のリン酸基と強く結合して Mg と置換し、核内に蓄積して cross-link を起こすことも知られている。

そこで、アルミブロックの表面をテフロンでコーティングし、これにサンプルを添加して PCR を行った。PCR に要する時間は短縮されたが、ここでも DNA の増幅は確認されなかった(図 5)。この結果から、アルミニウムと同様にテフロンも DNA の増幅を阻害する可能性が考えられた。また、増幅サイクル中のサンプル温度がマイクロチューブ使用時と異なるために DNA が増幅されないということも考えられた。

まず温度の設定について検討した。PCR は温度によりコントロールされ、その反応は温度の上昇や下降中にも進行しているので、温度変化に要する時間には注意が必要である。このために、DNA 増幅装置の温度設定が各メーカーによって異なり、慎重に設定されている。

熱の伝導性が異なると DNA の増幅にも影響が及ぶことから、DNA 増幅時の温度変化を直接モニターしたところ、マイクロチューブ使用時と直熱方式とではサンプルの温度変化が異なる事が判明した。そこで、マイクロチューブ内サンプルと同様の温度変化となるように、サーマルサイクラーの設定を変更した。しかし、この設定でも直熱方式では DNA の増幅は確認されなかった(図 6)。

次いでマイクロチューブと同じ素材のポリプロピレンでアルミブロックをコートすることを試みたが、溶着しなかった。そこで、ポリプロピレンでアルミブロックに密着するようなシート状の容器を作製し、DNA の増幅を試みたところ、DNA の増幅が検出され(図 7)。

今回の検討では、厳密な意味での直熱方式での DNA 増幅をすることはできなかったが、ポリプロピレンを素材に用いることで、DNA 増幅の時間短縮が可能であることが示唆された。しかし、増幅の対象となる遺伝子、用いる試薬・機器等の条件によって、変わることも予想され、普遍化するためには更に検討をする必要があると思わ

れた。

文 献

1. Huang S, Zhou X, Zhu H, Ren Z, Zeng Y : Detection of α -thalassemia mutations in the Chinese using amplified DNA from dried blood specimens. Human Genetics 84: 129-131,1990
2. Li H, Gyllensten UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N: Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature 335: 414-417, 1988
3. Higuchi R, Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA: DNA typing from single hairs. Nature 332: 543-546, 1988
4. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell GW, Small AD, Roses AD, Haines JL, Pericak-vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 261: 921-923, 1993
5. Saunderson AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, St George-Hyslop PH, Pericak-vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Goldgaber D, Roses AD: Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. Neurology 43: 1467-1472,1993
6. Ueki A, Kawano M, Namda Y, Kawakami M and Ikeda K: A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. Neurosci Lett163: 166-168,1993
7. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P and Gauthier S: Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. Lancet 342: 697-699, 1993
8. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK and Bradley T: Apolipoprotein E in Sporadic Alzheimer's Disease: Allelic variation and receptor interactions. Neuron 11: 575-580,1993
9. 「ポリヌクレオチド検出方法および PCR 反応装置」公開番号 平 03 - 262499 出願人 (株)コスミック
10. 「デオキシリボ核酸の増幅装置」公開番号 平 04-325080 出願人(株)日立製作所
11. 「核酸の検出方法およびその装置」公開番号 平 04-346800 出願人(株)島津製作所
12. 「温度制御を用いたポリメラーゼ連鎖反応の自動実施装置」公開番号 平 06-233670 出願人バーキン エルマー
13. 「DNA 増幅方法及び DNA 増幅装置」公開番号 平 06-30776 出願人 理化学研究所
14. 「遺伝子解析装置」公開番号 平 06-327476 出願人 (株)日立製作所
15. 「遺伝子解析方法及び装置」 公開番号 平 07-107999 出願人 (株)日立製作所
16. McLachlan DR, Kruck TP, Lukin WJ, Krishnan SS: Would decreased aluminum

ingestion reduce the incidence of Alzheimer 's disease ?. Can Med Assoc J 145: 793-804, 1991

17. Yamamoto H, Saitou Y, Yasugawa S, Miyamoto E: Dephosphorylation of factor by protein phosphatase 2A in synaptosomal cytosol fractions and inhibition by aluminum. J. Neurochem 55: 683-690, 1990