

トップガンジャーナル



Journal of TopGun

令和4年3月18日 第79号

トップガン教員研修会

第13回トップガン 理科自主研修会「お酒の強さは人それぞれ ALDH2 の遺伝子型を知る 種を判別しよう」が、令和3年12月11日（土）、19（日）、26（日）の3回に分けてそれぞれ 9:00～15:30、静岡大学浜松キャンパス 8号館1階生物実験室で行われ、小学校3校3名、中学校4校5名、高校1校2名、サイエンスデイズ教員1名、静大院生1名、合計12名が参加しました。

今回の参加校 静岡大学教育学部附属浜松小学校/同 附属中学校/磐田市立豊田中学
/磐田市立南部中学/浜松市立富塚中学校/浜松市立二俣小学校/浜松市立船越小学校/静岡県立浜松北高校/静岡大学院生（順不同）

講座概要

「お酒の強さは人それぞれ ～ALDH2 の遺伝子型を知る～」
頬粘膜から DNA を抽出し、PCR で正常型特異的増幅と変異型特異的増幅を行い、電気泳動でバンドを確認することにより ADH (ALDH1) と ALDH2 遺伝子の遺伝子型を決定する実験を行います。

活動レポート

1. 実験目的

口腔粘膜から DNA を抽出し、PCR で正常型特異的増幅と変異型特異的増幅を行う。次に、電気泳動でバンドを確認することにより ADH 遺伝子と ALDH2 遺伝子の遺伝子型を決定する。これらの実験を通して、アルコール代謝に関わる酵素 (ADH と ALDH2) の活性型を調べ、その組み合わせから、自分自身のアルコール代謝の遺伝子型を知り、自身が「お酒に強い体質」なのか「お酒に弱い体質」なのかを明らかにする。

2. 研修概要

(1) DNA (デオキシリボ核酸 Deoxyribonucleic acid)

DNA は、二本の鎖がからまった二重らせん構造となっており、それぞれの鎖は「A」(アデニン)「T」(チミン)「G」(グアニン)「C」(シトシン) の4種類の

物質(塩基)が連なった重合体で構成されている。人間の設計図にあたる DNA は、この 4 塩基の並びが、何回も何回も繰り返され、合計 30 億塩基にもなっている。この 4 つの塩基配列により、身体的特徴に関する情報を暗号化している。人間の身体の細胞には、核がある。核の中の 46 本の染色体の中に DNA の分子が入っている。「ゲノム」や「遺伝子」は概念的な用語であるのに対し、「DNA」はそれらを形作る物質であり実体を表す。DNA が二本鎖を形成する際、対合できる塩基の組み合わせは決まっており、A と T、G と C が必ずペアになる。これを、相補的結合という。

(2) PCR (ポリメラーゼ連鎖反応 Polymerase chain reaction)

DNA 鎖の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる相補鎖の合成を繰り返し行うことにより DNA を増幅する方法(図1)。1 サイクルごとに DNA が 2 倍、4 倍、8 倍と指数関数的に増幅する(図2)。この方法を用いると、DNA を数時間で 100 万倍に増幅できる。プライマーとは、DNA 複製の新しい DNA 鎖伸長時に DNA 合成の開始点となる数ヌクレオチドの RNA である。アニーリングとは、一本鎖の相補的な配列をもつ DNA 鎖同士が二本鎖を形成することである。二本鎖の DNA を加熱して一本鎖にしたあと、冷やすと相補鎖同士を認識してアニーリングが起こり、再び二本鎖が形成される。

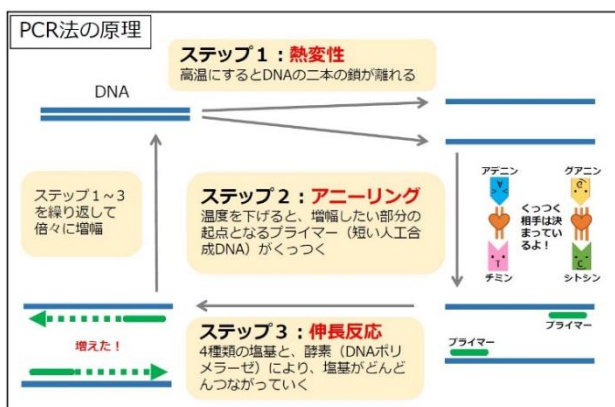


図1

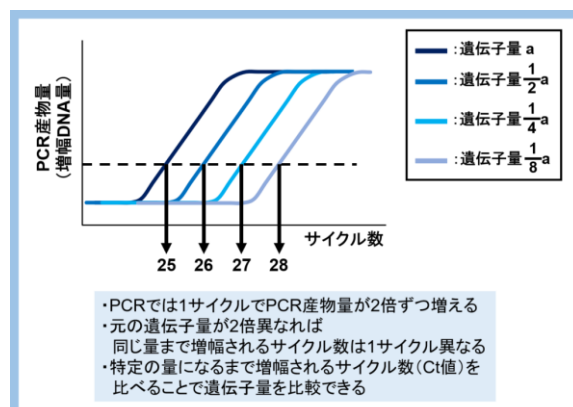


図2

(3) アルコールの代謝過程

アルコール代謝は図3のような過程をたどる。体内に入ったアルコール(エタノール)は、アルコール脱水酵素(ADH)の働きによってアセトアルデヒドに変化する。

アセトアルデヒドはアルデヒド脱水酵素(ALDH2)の働きによって酢酸に変化し、解毒され、エネルギー源あるいは脂肪合成の材料となる。アルコールは神経をマヒさせるので、酔った気分させる。アセトアルデヒドは、毒性は強く、フラッシング反応(顔面紅潮・吐き気・動悸・眠気・頭痛などの反応)の原因となる。

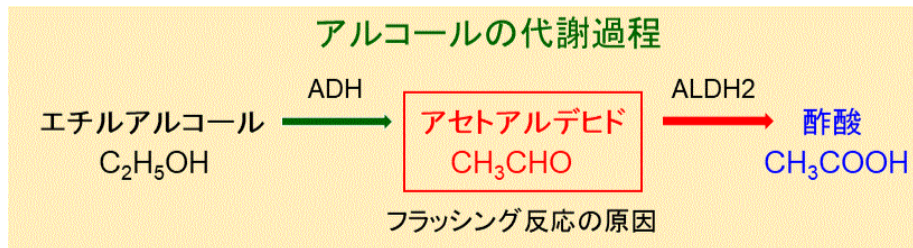


図 3

(4) ADH (アルコールデヒドロゲナーゼ Alcohol Dehydrogenase)

細胞においてエタノールをアセトアルデヒドに分解する酵素。アルコール脱水酵素とも呼ばれる。ADH 遺伝子は第 4 染色体に位置しており、塩基が A (アデニン) から G (グアニン) へ変異をおこしている。

(5) ALDH2 (アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 Aldehyde Dehydrogenase 2)

細胞においてエタノールの代謝産物であるアセトアルデヒドを含む反応性アルデヒドの酸化および無毒化に重要な働きをしている酵素。アルデヒド脱水酵素ともいわれる。

ALDH2 遺伝子は第 12 染色体長腕に位置し、塩基が G (グアニン) から A (アデニン) へ変異をおこしており、その結果、成熟タンパク質中の第 487 番目のアミノ酸がグルタミン酸 (GAA) からリジン (AAA) に置換されている。

(6) アルコール代謝の ADH と ALDH2 の遺伝子タイプによる分類

ADH と ALDH2 の活性型の組み合わせにより図 4 の A~E のように分類される。

ADH 遺伝子が低活性型の人では最初の 1 杯目のアセトアルデヒド発生が遅いため、フラッシング反応が弱いことが多くの研究で証明されている。また、大量に飲酒した場合は、低活性型では飲酒翌日までエタノールが残って酒臭い体質であることも報告されている。そのため低活性型 ADH1B の人はアルコール依存症になりやすい。

ALDH2 の活性が弱い「低活性型」は、お酒に弱い体質といわれている。さらに、ALDH2 の働きが全くない「不活性型」は、お酒を飲めない体質です。ALDH2 の欠損は ALDH2 遺伝子の点突然変異によるものと考えられており、対立遺伝子の組み合わせから、正常型ホモ接合体 (NN 型)、ヘテロ接合体 (MN 型)、変異型ホモ接合体 (MM 型) の 3 種類の遺伝子型が知られている。

		アルデヒド分解遺伝子ALDH2		
		活性型	低活性型	不活性型
アルコール分解遺伝子ADH1B	低活性型	Aタイプ 3.0% お酒に強いが、アルコールが抜けにくいタイプ。アルコール依存症に最もなりやすい体質です	Cタイプ 1.6% お酒に弱いのに、顔に出にくいタイプ。飲酒による食道がんのリスクが最も高い体質です	Eタイプ 6.2% お酒をまったく飲めないタイプ。ごく少量のお酒でも、すぐに顔が赤くなり気持ち悪くなったりします
	活性型	Bタイプ 53.1% お酒に強いので酒好きになりやすいタイプ。アルコールを速く分解するので、肝臓の病気に注意しましょう	Dタイプ 36.1% お酒に弱く、すぐに顔が赤くなるタイプ。大球性貧血に特になりやすく、また食道がんのリスクも高い体質です	
	高活性型			

図 4

電気泳動法

PCRで増幅したDNAは、アガロースゲル電気泳動により増幅サイズに応じて分離した後、エチジウムブロマイド等で染色してバンドとして可視化する。（図5）

① アガロースゲルによる分離

DNAは負の電荷を帯びており、電圧をかけるとプラス極の方向へアガロース中を移動する。その際、アガロースゲルは細かい網目状の構造となっているので、小さいDNA程速く移動し、DNAのサイズによって分離することができる。

② エチジウムブロマイドによる検出

エチジウムブロマイドは、二本鎖のDNAに結合して、紫外線照射により強い蛍光を発するインターカレーターの一種。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色すると、紫外線照射によりDNAをバンドとして可視化することができる。今回の実験では、発ガン性のあるエチジウムブロマイドは使用せず、青色LEDで反応する色素を使用する。

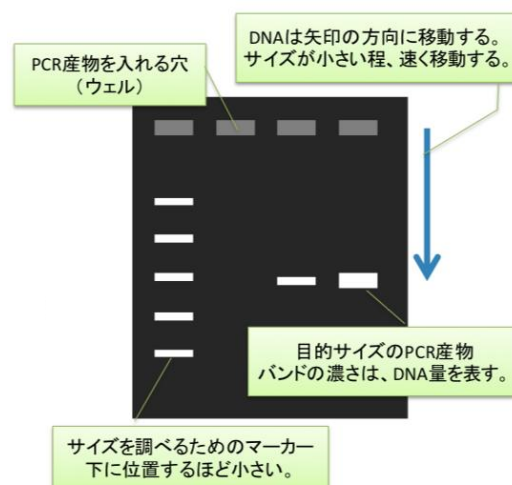


図 5

実験方法

(7) 器具の使い方

① ピペットマンの使用方法

ピペットマンの基本操作を理解するために、1000 μ Lを取り、パラフィンフィルムに100 μ Lの水滴を10個つくる。さらに、100 μ Lの水滴から、10 μ Lの水滴を10個つくる。

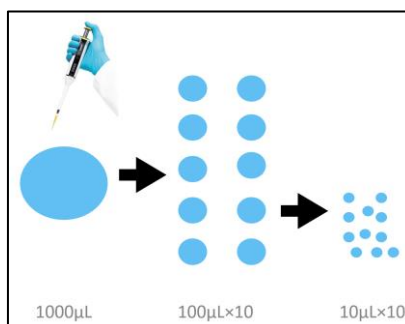


図 6



図 7

② マイクロチューブ内の液体を混ぜる方法（タッピング・ピペッティング・転倒混和）

ごく少量のマイクロチューブ内の液体（図8）を混ぜるときに、チューブを指で叩くようにして混ぜる方法をタッピングという。また、チューブ内の液体をピペットマンで液を吸うことと吐出を繰り返して混ぜる方法をピペッティングという。この時、空気が入らないように、液体を吸うことが大切である。転倒混和は、チューブを逆さまに傾けて液体を混ぜる方法である。以上の基本的な操作を身に付けることで、正確な実験結果を得ることができる。



図8

(8) サンプルの調整（口腔粘膜の採取）

- ① 数回水道水でうがいをして口腔内を清潔にする。
- ② 綿棒を用いて内ほほの粘膜をこすり取る。（少し強目に回すようにするとよい）
- ③ DNA抽出液（400 μ l）の入ったマイクロチューブに綿棒を入れ馴染ませる。
- ④ はさみで軸を切り落とし、蓋をする。
- ⑤ 60°Cにセットした恒温槽内のヒートブロックで15分間加温する。
- ⑥ 15分後、取り出し、約3分氷上で冷却する。
- ⑦ フェノ/クロ（200 μ l）沈殿する。（危険なため担当者が加える）
- ⑧ 約2分間ゆっくり転倒混和（フェノ/クロに注意。綿棒は取り出さなくてよい。）
- ⑨ 遠心分離（11,000 x g 室温、10分）
- ⑩ 上清 200 μ l を新しい 1.5ml チューブに移す。（下層のフェノール層を吸わないように注意）
- ⑪ イソプロパノールを 200 μ l 加え、よく転倒混和。
混和前に、界面にDNAが析出するので注意！
- ⑫ 遠心分離（11,000 x g 室温、10分）（図10）
- ⑬ 上清を捨てる（廃棄物入れに）
- ⑭ 冷70%エタノールを 400 μ l 加え、緩やかに転倒混和して沈殿の洗浄をする。
- ⑮ 遠心分離（11,000 x g 室温、10分）
- ⑯ 上清を捨てる。（廃棄物入れに）
- ⑰ スピンドアウン（数秒遠心）上清を捨てる
- ⑱ キムワイプの上にキャップを開けたまま逆さまで約5分乾燥させる。
- ⑲ TE（pH8.0）40 μ l に溶解しDNA溶液とする。（ピペッティングなどで積極的に溶かす）



図9

(9) PCR

- ① 氷上で PCR 反応溶液を調整する。DNA 溶液以外の試薬分注済み 8 連 PCR チューブに(1)で調整した DNA 溶液を $8\mu\text{l}$ ずつ分注する。(ADH : G 用、A 用 ALDH2 : N 用、M 用図 10)



図 10

PCR 溶液組成	
dd.H ₂ O	11 μl
Enzyme	25 μl
Primer forward	3 μl
Primer Reverse	3 μl
template	8 μl
Total	50 μl / 反応

図 11

- ② PCR チューブのふたをしっかりと閉めスピンドウンする。
- ③ サーマルサイクラーにセットする (図 12、図 13)



図 12

PCR 条件	
Denaturation	98°C 10sec
Annealing	60°C 5sec
Extension	68°C 20sec

図 13

(10) バンドの観察

3%アガロースゲルの作成

- ① 100ml 三角フラスコに TAE バッファーを 50ml 加える。
- ② アガロースを 1.5g 量り取る。
- ③ 三角フラスコの TAE バッファーにアガロースを投入する (図 14)。
- ④ 口にラップをかけ数カ所穴を開け、電子レンジで溶解する。(透明になる)
- ⑤ 手で触れるくらいまで冷ます。

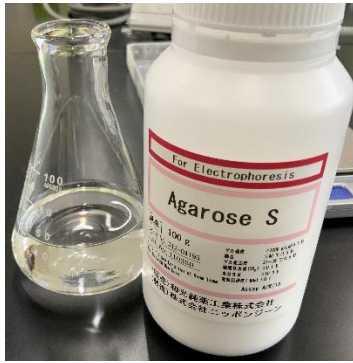


図 14

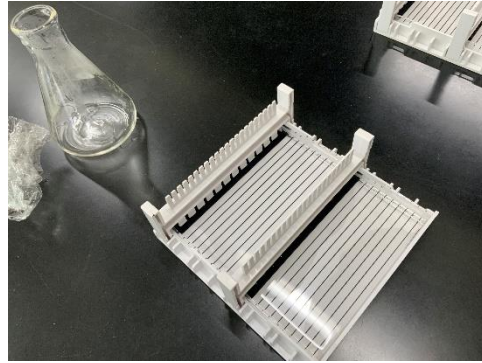


図 15

- ⑥ ゲルメーカーに流し込む (図 15)。(1枚は本番用、もう一枚はアプライの練習用)
- ⑦ 12本コームをセットし、かるくラップをかけておく。固まったらコームを抜く。
- ⑧ 乾燥しないように TAE バッファーをそそぐ。

電気泳動

- ⑨ 本番用ゲルを電気泳動装置にセットする (一側にウェルが来るように)
- ⑩ ウェルが浸る程度に TAE バッファーを満たす。
- ⑪ 練習用ゲルを使ってアプライの練習をする。
- ⑫ PCR チューブにローディングバッファー $2 \mu\text{l}$ を分注する (図 16)。

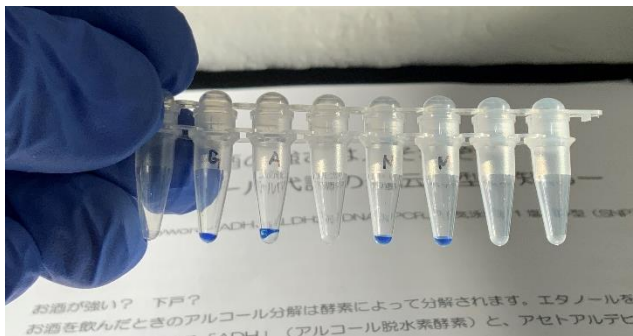


図 16 ローディングバッファー

- ⑬ PCR 産物を $8 \mu\text{l}$ 加え、ピペッティングで混合する。スピンドウンし、3分静置。
- ⑭ 調整したサンプルとサイズマーカーを $10 \mu\text{l}$ ずつゲルにアプライする。

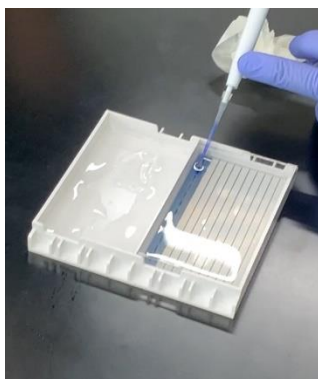


図 17 ゲルへのアプライ



図 18 電気泳動

- ⑮ 約 30 分泳動する (図 18)。(色素が半分くらい移動する)
- ⑯ LED イルミネータで観察する

3. 結果

ADH 酵素については、Aの反応がやや見られが、Gについては、はっきりとみられる（図19-①）。

ALDH2 は、NとMの反応が両方見られる（図19-②）

表 1

	G	A	N	M
①ADH	○	△		
②ALDH2			○	○

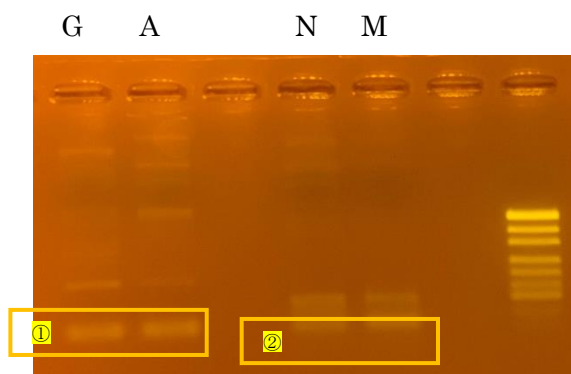


図 19 電気泳動の結果

4. 考察

ADH については、A の反応が全く見られないわけではないが、G の反応が強くみられるため、低活性型であると考えられる。よって、アルコールを分解するのが遅いため、酔った状態が続きやすいが、フラッシング反応が出にくいと考えられる。また、ALDH2 については、MN 型のヘテロ接合体で、低活性型であると考えられる。不活性型ではないため、アセトアルデヒドの解毒作用は、働く。つまり、顔は赤くなりにくいですが、酔いやすく、二日酔いにはなりにくいという体質であり、図4の中のCタイプにあたりと考えられる。

5. 感想

今回の研修によって、自分自身がお酒に強いかわ弱いかは、今までの経験から捉えていた部分が大きかったが、実験によって、遺伝子レベルの分析により自分の体質を正しく理解することができた。それにより、自分の体質に合った適切な対応として、加水分解によるアセトアルデヒドの分解を促進するために水を飲むことを意識することや、食道がんのリスクが大きいことも知ることができた。今回の実験のように、科学的な根拠によって、自分自身を知ることの意義は大きいと感じる。また、「PCR」という言葉は、新型コロナウイルスの流行により、広く知られている。しかし、実際どのような方法で、何を目的としている方法なのかを今回の研修で理解できた。

さらに、今回の実験のような「 μL 」の単位を用いるような溶液を扱う際の基本的な混和方法や器具の使い方を実践を通して理解することができた。ピペットマンなどは、普段の授業における実験試薬の準備にも十分役に立つ実験道具であるため、今後積極的に使用していきたい。

最後に、新型コロナウイルス感染予防のため、少人数での実験の講師をしてくださった静岡大学工学部化学バイオ工学科技術専門職員大橋和義先生並びに、このような学び多き機会を設けてくださった、静岡大学教育学部特任教授山本仁先生に感謝の意を表す。

6. 参照

- ・研修配布資料（大橋和義 / 静岡大学工学部化学バイオ工学科）

文責：静岡大学教育学部附属浜松中学校 中澤祐介