

口腔粘膜剥離細胞からのアルコール耐性遺伝子型判定実験

— 学生実験への適用 —

ALDH2 genotyping using oral mucosal DNA for testing alcohol tolerance

— Application to laboratory class —

常吉 俊宏*, 山田 英孝**, 後藤 正憲***, 金岡 繁****, 梶村 春彦**
Toshihiro TSUNEYOSHI, Hidetaka YAMADA, Masanori GOTO, Shigeru KANAOKA
and Haruhiko SUGIMURA

Abstract: Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene genotyping method using genomic DNA extracted from oral mucosa sample has been established in collaboration between Hamamatsu University, School of Medicine and Shizuoka Institute of Science and Technology (SIST). The method was successfully applied to life science laboratory class of Department of Materials and Life Science of SIST. Here we describe the educational and scientific background, and general outline of the method.

1. はじめに

物質生命科学科ではバイオ食品化学コースの3年次後期にコース必修の学生実験科目として「生命化学実験2」を実施している。実験時間としては平日午後の半日(現時点では水曜の午後1時から5時50分までの3コマ(1コマ90分と休憩10分)を連続)で実施している。

内容としては大きく2つに分かれ、前半を微生物2テーマ(微生物の取り扱い, 形質転換), 酵素実験1テーマ(酵素反応), の合計3テーマ, 後半で遺伝子工学系実験の3テーマ(DNA抽出, ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)・制限酵素消化(RFLP), 遺伝子塩基配列解読(DNAシーケンシング)), の総合計6テーマを, 1テーマについてそれぞれ2週間すなわち1週間をおいた2日間の午後全部(1テーマについて合計6コマ)を使って実施している。履修学生数は3年次バイオ食品化学コースの全学生30~40名を4班に分け上記6テーマについてローテーションを組んで移動させている。遺伝子工学系実験では最初に学生自身のDNAを抽出するテーマを実施しないと, 続く2テーマの遺伝子型判定と遺伝子解読が行えないため, DNA抽出, PCR-RFLP, DNAシーケンシング, の3つがこの順番で連続するようにローテーションを組んでいる。1班(8~10名)の中では2名から3名の学生を1チームとし3~5チームを同時に実験させている。現時点での担当者は前半を齋藤明広准教授と齋藤研究室の大学院生あるいは卒研生, 後半を常吉と山田, 常吉研究室の大学院生あるいは卒研生, がそれぞれの分野の個別テーマ実験を担当している。

遺伝子工学系実験の材料として用いるDNAは, 履修する学生自身が抽出する自分のDNAであり, 検出する遺伝子は, お酒すなわちアルコールに強いか弱いかの耐性を遺伝的に規定しているアルデヒド脱水素酵素遺伝子(ALDH2)で, 自分自身のDNAの遺伝子型を判定し自分がアルコールに強い(正常型)か弱い(変異型)かを判定する。さらには変異型か正常型かを規定しているALDH2遺伝子周辺の遺伝情報(塩基配列)の直接解読をおこなう。この実験については, ここ数年, 近隣や静岡県内の高校のスーパーサイエンスハイスクール(SSH), サイエンスパートナーシッププログラム(SPP)の実験講座としての依頼が来て実施したり, いろいろな面で実現は困難であるが一般社会人の体験実験の問い合わせが来るなど, さまざまな方面の反響があるので, 概要を実験立ち上げの経緯とともにここに記しておくこととした。

2. 学生実験誕生の経緯

当該実験のルーツは平成6年に遡る。開学直後の平成3年秋から常吉は浜松医科大学医学部外科学第2講座の故・馬場正三教授の大腸がん原因遺伝子解析プロジェクトに参加させて頂くことができ, 微力ではあったが開学直前まで勤務していた米国のトーマスジェファーソン医科大学分子医学研究所でのヒト遺伝子(骨形成不全症の原因遺伝子のコラーゲンCOL1A2変異)解析経験を生かしてプロジェクトに貢献することができると共に, 遺伝性大腸がんの家系構成員の口腔粘膜剥離細胞からのDNA抽出を実際

2015年2月27日受理

* 理工学部 物質生命科学科

** 浜松医科大学 医学部 腫瘍病理学講座

*** 国立がん研究センター 研究所

**** 浜松医療センター 消化器内科

に行い、がん抑制遺伝子 MLH1 の変異型キャリアーを特定するなどして実戦的な解析を行った¹⁻³⁾。これらの経験をもとに、金岡と常吉の共同で本学と浜松区大の両方の学生実験に適用可能な ALDH2 遺伝子型判定のための実験手順の検討を行った。そして、平成6年から9年まで、物質科学科の旧カリキュラムの「応用化学実験」の中で「学生自身のヒト ALDH2 遺伝子型判定」を試行した。この時には毛根あるいは、糖尿病検査用の自己採血キットを用いて微量血液を採取し DNA 抽出を行った。さらに平成12年度に物質科学科内にバイオ・環境コースを立ち上げたのに伴い、学科内議論により内容を吟味し平成14年度後期から「学生自身のヒト ALDH2 遺伝子を読みに行く」実験として「生命化学実験」の中で「ヒト ALDH2 遺伝子型判定・組換え・解読実験」を行うこととなった。ここでは遺伝子工学技術の4要素として DNA 抽出、PCR-RFLP、遺伝子組換え、DNA シークエンシング、を精選し、実施することとなった。なお学科名を物質生命科学科と改称したのはこの1年後の平成15年春である。

当時はちょうど遺伝子組み換え、特に遺伝子組換え作物などの環境影響等に対する不安や、遺伝子解読における個人情報に対する意識も高まりつつあった社会情勢を考慮して、遺伝子組換えについては、別途、研究実験における必要性から学内に立ち上げた組換え DNA 実験安全委員会に諮り、学生実験において匿名化した学生の DNA からの ALDH2 遺伝子の PCR 産物をベクター DNA に組換えて大腸菌に形質転換することについての承認を申請した。また、個人情報保護については文部科学省、厚生労働省、経済産業省、の3省合同で平成13年3月にまとめられた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」があり、この中では ALDH2 遺伝子のような良くわかっていない遺伝子の情報を学生実習として解析する場合には指針の対象からはずれることにはなっている。また、文部科学省・研究振興局・ライフサイエンス課に問い合わせたところ「小さな大学であれば組換え DNA 実験安全委員会が規定の追加(審議内容)と構成要件(人文社会科学系・女性委員の参加)を満たしていれば、遺伝子解析研究倫理審査委員会を兼ねて良い」とのことで、本学の学生実験計画は「指針からは問題がないが、逆に学生に個人情報管理の実例を学ばせる機会としてほしい」とのコメントを頂いた。これらの検討を背景に組換え DNA 実験安全委員会に学生実験計画を審査申請したが、計画承認の可否について、同委員会として結論が出なかったため、学長判断の結果、①対象学生に事前に1時間の説明を行い、自らの DNA 採取を希望する学生に、自由意志による同意書への記入・署名をさせる。各学生のヒト ALDH2 遺伝子型判定結果についての個人情報と採取 DNA を実験終了後にすべて廃棄する。②DNA 採取を希望しなかった学生も実験に参加させ、単位認定に不利ならぬよう配慮する。③問題が生じた場合は対策・措置を講じるか実験差し替えもある。④実験承認の可否については

委員会が最終判断せよ、とのことであった。これを受けて当実験としては、事前説明1時間と同意書を作成する、各学生の個人情報は各学生しか知ることのできないように実験を組替える、実験終了後は全 DNA を廃棄する、DNA 不採取学生もチーム実験として各処理に参加させ、レポートも同じように提出させ、単位認定でも不利には扱わない、ことなどを決定した。

3. 科学的背景

お酒の主成分のエタノール(エチルアルコール)は口から摂取後、大半(80%)は小腸で吸収され、栄養を運ぶ門脈を通過して肝臓で分解される。肝臓ではまず最初に主としてアルコール脱水素酵素(遺伝子は ADH、酵素活性の最も高いのが ADH1B(旧称 ADH2 とも呼ぶ))によりアセトアルデヒドに酸化される(Fig.1)。このアセトアルデヒドは細胞毒で、なおかつ WHO(世界保健機関)が2007年に認定した発がん物質(アルコールそのものも認定)であり、大量に飲酒したりアルコールに弱い人が飲酒すると体内にアセトアルデヒドが一時的に高濃度に蓄積して「フラッシング」反応と呼ばれる、顔だけでなく体表面全体が赤くなる症状を呈し気分が悪くなる、二日酔いの原因物質とされている。続いてこのアセトアルデヒドは主としてアルデヒド脱水素酵素(遺伝子 ALDH、酵素活性の最も高いのが ALDH2)により酢酸に酸化され無毒化される。食道は他の組織に比べて ALDH2 の発現が少なくアセトアルデヒド発がんの標的となりやすいと考えられている。さらにこの後、酢酸は補酵素 A とアセチル CoA を生成し、ミトコンドリア内で TCA 回路を経て二酸化炭素と水に酸化される。



Fig.1 体内でのアルコール代謝経路

この代謝経路の ADH1B、ALDH2、にはそれぞれ活性型と不活性型が存在し、日本人、中国人、朝鮮人を含むモンゴル系民族は ALDH2 の不活性型が約 20~40% 存在する⁵⁻⁷⁾。ALDH2 は 12 番常染色体長腕上に存在しメンデル型の遺伝を経て継承され、この遺伝子のエクソン 12 番のほぼ最後に近いところの 487 番目のコドンは正常型であれば「GAA」でアミノ酸のグルタミン酸をコードする (ALDH2*1, N(正常)型)。しかしながら同コドンの最初の 1 塩基 G だけが今から 2.5~3 万年前に中国大陸南部の最初のひとりの人で突然変異して A となり、コドン「AAA」はリジンを指定するために酵素活性が失われることとなった (ALDH2*2, D(欠損)型)。父親と母親が「正常」すなわち「酒豪」型 (ALDH2*1/*1(父親・母親から共に正常型(*1)を受け継ぎ(*1/*1)となる)、N(正常)N(正常)型、地域によって異なるが日本人の約 55% 程度がこの型とされる。) であれば子供

は必ず酒豪となる。このように遺伝子塩基配列の1塩基だけが変異し、さまざまな遺伝子型を形成し、その変異遺伝子が人口の1%以上を占める場合には「多型」と呼び、その変異を1塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP, 「スニップ」) と称する。変異型を持つ古代中国の集団の一部は突然変異後、中国大陸北部に移動し、今から2300~1700年前の弥生時代になって朝鮮半島を経て日本列島中部に弥生人として進出し、今の日本人、中国人、朝鮮人という「新モンゴル系民族」を作ったと考えられている。その結果、縄文時代から日本国内に住んでいた縄文人の子孫は北海道、東北と南九州、沖縄に分断されたが、その結果、それぞれの地で酒に強い遺伝子が多い。ALDH2で生成されるポリペプチドは正常型のホモ4量体でのみ酵素活性を示すため、遺伝子型がヘテロ型 (ALDH2*1/*2, ND型, 日本人の約40%程度がこの型とされる。弥生人は本州中部の関西, 中部, 中国地方を中心に住みつき, それぞれの地で酒に弱い遺伝子が多い。) であると4量体の全サブユニットに正常型が入る確率が $(1/2)^4=1/16$ になるので酵素活性はほんのわずかになってしまう。もちろんDD型 (ALDH2*2/*2, 日本人の約4~5%) ではアセトアルデヒドを酸化できず酒に極めて弱く, 事実上アルコールが飲めない体質となる。

一方ADH1B遺伝子は欧米人の90%で見出された型がADH1B*1/*1とされたが, 実際にはこれはこの酵素の不活性化型であり, のちに見出され, 逆に日本人の90%などに見出されるADH1B*2/*2が正常の高活性化型であった。ADH1Bは4番染色体長腕にあり, エクソン3番のはじめの方にある47番目のコドンは欧米で主流の低活性化型であれば「CGC」で, アルギニンをコードする (ADH1B*1, D (欠損型))。このコドンの中央のGが, Aに変異し「CAC」がヒスチジンをコードすると高活性化型 (ADH1B*2, N (正常型)) になる。この変異は興味深く不思議なことに, ALDH2とは存在する染色体が異なるにも関わらず, 前述とほぼ同じ地域の中国南部や朝鮮半島, 日本でAになりこの地域だけでのみ高活性化を示す。この活性化への「変異」の誕生はALDH2変異より新しく, 10000~7000年前とされている。これがALDH2と共に移動したと考えられる。

欧米人の90%以上のようにADH1BがDD型で, ALDH2がNN型の人にはアルコールを分解しにくいために, アルコールが体内に長く存在しお酒の快感を長く享受できる。さらに分解した後の細胞毒であるアセトアルデヒドはすぐに分解して不快感がほとんどない。これに対し日本人の40%程度の人のようにADH1BがNN型で, ALDH2がDD型やND型の人たちはアルコールがすぐに分解してしまいアルコールの快感を長く享受できないうえに, 分解産物の細胞毒であるアセトアルデヒドは分解できずに不快感に苦しむという損な遺伝子型である。しかしながら欧米人の中にはアルコールの快感におぼれてしまい, アルコール依存症になる人が多いと考えられている。本実験では現在のとこ

ろALDH2の遺伝子型 (NN, ND, DDの区別) と, この遺伝子型を規定するSNP部位を含むエクソン12番の一部と上流と下流のイントロン11番および12番の一部の塩基配列を解読して遺伝子型の確認をおこなっている。

4. 実験手順

4.1 口腔粘膜剥離細胞からのDNA抽出

最初の週の初めに学生達に, 使い捨て歯ブラシと紙コップを渡し, 実験台流しを使い通常の歯磨きを行わせる。ここでは実験直前の昼食時間に食べた食品の残りが口内や歯の間に残っているのを洗い流すことを目的とし, せっかく抽出したDNAが食品由来のものでないようするためにおこなう。続いて, 歯ブラシと紙コップを水道水で充分洗浄後, 歯ブラシを使って口内の頬の裏側 (左・右両面) と上顎の裏側を充分擦り, 生理食塩水 (食卓塩を0.9%, 水道水に混合する) の約40~50ml程度を口に含んで口を漱ぎ, 口腔粘膜剥離細胞を生理食塩水と共に, 使い捨てのプラスチックチューブ (50ml容量) に吐き出す。さらに歯ブラシもこのチューブの中で漱ぎ, 口腔粘膜剥離細胞を充分に回収する。

このチューブを室温で毎分3000回転10分間程度の遠心分離を行い, 口腔粘膜剥離細胞を沈殿させる。上清をデカンテーションで除去し, STE緩衝液 (強力な界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムとトリス緩衝液 (pH 7.4), エチレンジアミン4酢酸ナトリウム, とNaClの混合) 1mlで分散後, タンパク質分解酵素Proteinase Kを400 μ g添加, 混合しProteinase Kの反応至適温度である56 $^{\circ}$ Cで1時間保温して, 細胞膜をバラバラにし, タンパク質を一部分解する (DNA分解酵素等を失活させる)。

反応後のチューブを冷却高速遠心分離機で毎分12000回転・3分程度遠心し, 上清から600 μ Lを2回別々の新チューブに採取する。それぞれにフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールの混合液 (体積比25対24対1) の2層分離した下層部を等量 (600 μ L) ずつ添加し, 15秒程度振動撹拌する。その後, 再び冷却高速遠心分離機で毎分12000回転・5分程度遠心, 液々抽出をおこなう。

この2本の各チューブ内で2層分離した層のうち, DNAの抽出 (「フェノクロ抽出」) された上層の水層を境界層のタンパク質をとらないように気をつけながら500 μ L採取し, 新しい2本のチューブに移す。これらに, 150 μ molのNaClと冷凍 (-20 $^{\circ}$ C) エタノールを1ml混合しフタを閉めて緩やかにチューブを転倒撹拌する。この段階で, 最初の口腔粘膜剥離細胞が大量に採取できていればDNAが充分量抽出されているため, 各学生自身のDNAが糸くず状の沈殿 (エタノール沈殿) となってチューブの中に浮遊するのが確認できる (Fig. 2)。ここでのポイントとしては学生自身のDNAを現物のものとして観察できるように口腔粘膜剥離細胞を大量に採取させている。また, 同時に2本のチューブでDNAを抽出させているが, 2本共にDNAの

糸くずが見えた場合には、最初に抽出したチューブの中の DNA を後続の反応に適用できるように処理し、他の 1 本については 70%エタノールを満たした 2 mL のミニチューブに DNA を移し「標本」として持ち帰りができるように、またチューブにはストラップもつけてケータイやスマホに飾りとして付けられるようにしてある。

最初のチューブについては-80℃の冷凍庫で 20 分間冷凍し沈殿をより多く生成させる。続いて冷却高速遠心分離機で毎分 15000 回転 10 分間遠心し液層を捨てて、冷凍 70%エタノール 500 μL を入れ毎分 15000 回転 2 分間の遠心、洗浄を行う。チューブを取り出し液層をピペッターで取り去り、15 分間遠心真空乾燥し、約 50 μL の滅菌水で溶解して 4℃で冷蔵保存する。

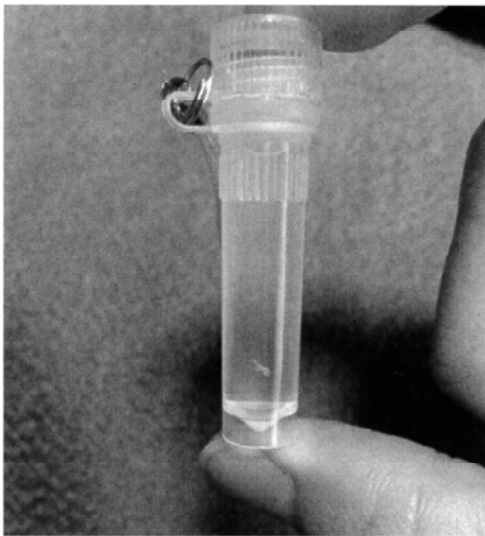


Fig.2 DNA ストラップ標本。
チューブの底近くに糸くず状の DNA が浮遊している。

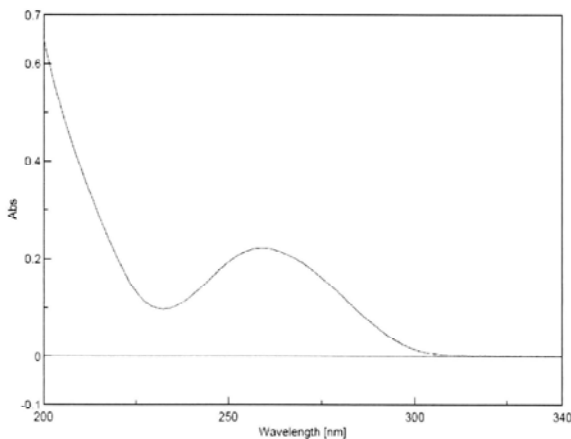


Fig.3 抽出した染色体 DNA の紫外吸光スペクトル。
260 nm にピークを持つ。

翌週は DNA の定性・定量実験等を行っている。冷蔵保存していた染色体 DNA 原液約 50 μL から 20 μL を採取し、イオン交換水で 50 倍希釈して石英製の分光セルに入れ、紫

外可視分光吸光度計で 200nm から 340nm の波長の間の吸光スペクトルを取り、260nm に吸光ピークを持つ DNA の特徴的なスペクトル (Fig. 3) を観察させる。そして同時に 260nm と 280nm の吸光度を記録させ、260nm の吸光度から DNA の濃度を求め、280nm の吸光度との比から DNA の純度の指標を計算させる。また純粋のタンパク質の代表として牛血清アルブミン (BSA) を微量、イオン交換水に溶解させ、同じように紫外スペクトルをとらせ、280nm のピークを観測させて純度指標が DNA の特徴的ピークの吸光度と、タンパク質の特徴的ピークの吸光度の比率をとる意味を納得させる。また並行して、原液の DNA を希釈して 95℃で 20 分ほど加熱する前後の吸光度の変化を記録させ、2 本鎖 DNA が 1 本鎖に熱解離した時の吸光度の増加を観測させる。

4.2 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) -制限酵素断片長多型法 (RFLP)

2 つ目のテーマの第 1 週の最初に、学生自身の ALDH2 遺伝子型個人情報を保護するための匿名化をおこなう。それには各学生が抽出した染色体 DNA 入りミニチューブの表面に書かれたマジックインクによる学籍番号の下 2 ケタを各自に消させる。教員は 2 枚ペアの小さなシールに 1 から学生数 (例えば 8 名の 8) までの各番号を書いた 8 ペアを裏を向けてランダムに学生に取らせる。学生は秘かにそのシールの番号を覚えると共に 1 つのシールをマジックインクの消えたミニチューブのフタに他の学生にわからないように貼りつけ、フタをしっかりと締めて、投入口の狭い箱 (ブラックボックス) の中に番号を見せないようにして入れる。同時に残りの 1 枚のシールは実験ノートなどに、忘れた場合の記録および証拠となるよう保存しておく。このようにすると自分のチューブはどの番号のチューブかを本人だけしか知ることはなく、他の学生はもちろん、教員もどれが誰の DNA かわかることもなく匿名化が完成する。

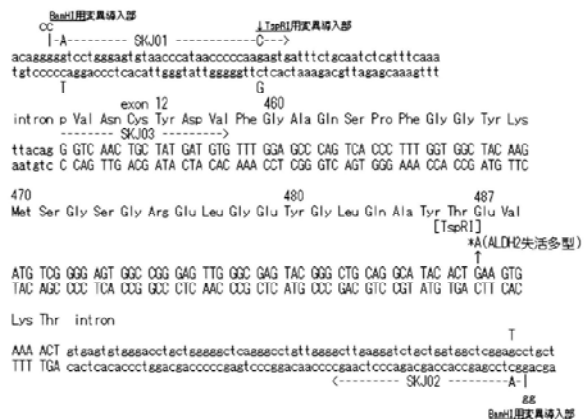


Fig.4 ALDH2 遺伝子の PCR 増幅周辺領域。
イントロン 11 と 12 に PCR プライマー、エクソン 12 にシークエンシングプライマーを設定した。

続いて、ALDH2 遺伝子エクソン 12 番の後ろの方の多型塩基 G/A をはさむようにイントロン 11 番とイントロン 12 番にそれぞれ設定したフォワードプライマー (SKJ01) 5' -CCGGATCCTGGGAGTGTAAACCCATAACCCCAACAGTG-3' とリバースプライマー (SKJ02) 5' -GGGGATCCGAGCCACCAGCAGACCCCTCAAGC-3' を用い (Fig. 4), 匿名化した学生自身の染色体 DNA 約 0.1 ~1μg を鋳型として, PCR

95℃・8分
[94℃・30秒, 60℃・30秒, 72℃・30秒]×40 サイクル
72℃・2分
4℃・10分

を行う。

PCR 産物は DNA サイズマーカーと並行してアガロースゲル電気泳動をおこない, 目的サイズの位置にエチジウムブロマイドの蛍光バンドを視認させて PCR の成功を確認させる (Fig. 5).

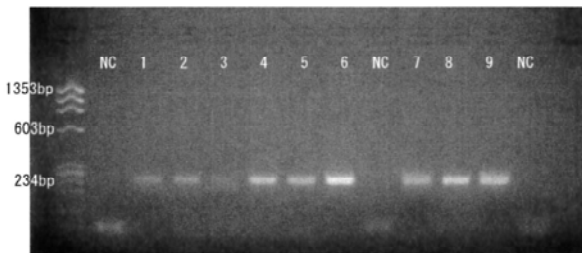


Fig.5 電気泳動による PCR 産物生成の確認。
9サンプルについて目的の長さ251bp(塩基対)のバンドを確認。NC: ネガティブコントロール。

フォワードプライマーは後の制限酵素の反応活性をチェックするための内在性コントロールとして *Tsp* RI の認識配列「CAGTG」を作成できるよう 3' 末端側にこの配列と似たような場所を選び 1 塩基の変異導入を行ってある (Fig. 4)。制限酵素はかつての実験開始当初には金岡によりリバースプライマーを上記同様に 3' 末端側に 1 塩基変異導入を行い *Mbo* II の認識配列「GAAGA」の最初の G の部分に多型を合わせ, 多型により消化, 非消化を判断でき

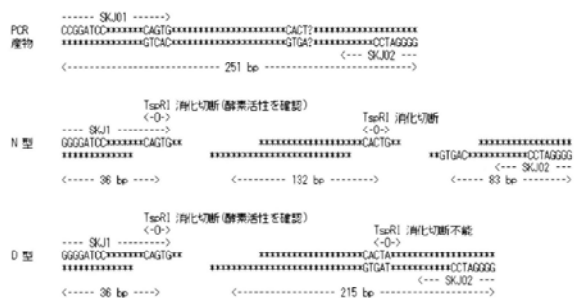


Fig.6 ALDH2・PCR 産物の *Tsp* RI 消化による遺伝子型判定。

るようにしていた⁴⁾。その後, 5 年前に山田により, 新規に上市された *Tsp* RI に変更した。 *Mbo* II だと, プライマーのすぐ 3' 末端近くで消化されるため, プライマーを長くしておかないと RFLP で断片の長さの違いの判別が難しかった。これに比べ *Tsp* RI では多型判定の消化部位を PCR 産物の真中にも設定できるので判定が容易になった (Fig. 6, Fig. 7).

翌週は, PCR 産物を限外ろ過チューブあるいはゲルろ過スピナカラムで精製した後, 制限酵素 *Tsp* RI で 65℃, 1 時間の消化をおこない, アガロースゲル電気泳動での消化断片長パターンから遺伝子型を判定する (Fig. 8).

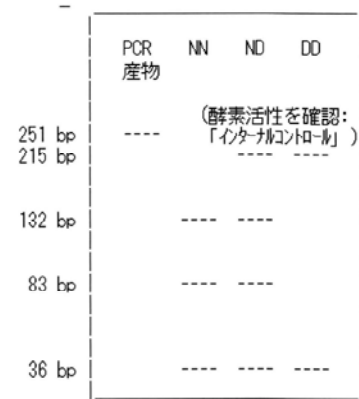


Fig.7 ALDH2 多型の RFLP パターン。

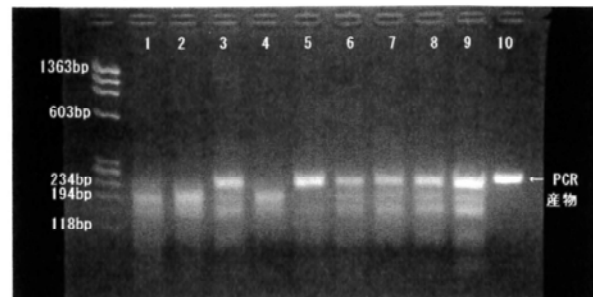


Fig.8 *Tsp* RI による ALDH2 の PCR-RFLP。
1,2,4: NN 型, その他: ND 型, 5 は DD 型に近いが消化バンドがあり ND。酵素活性があるので消化物は PCR 産物より全て短くなっている。

また, PCR の際に用いる各プライマーの 5' 末端には制限酵素 *Bam* HI の認識配列が添付してあり, 初期の頃は遺伝子型が ND 型と判定された PCR 産物を *Bam* HI で消化して pUC19 ベクターに消化物をインサートとして遺伝子組換えをおこない, 大腸菌を形質転換した。その後ブルーホワイトカラーセレクションによりインサートの入ったと思われるコロニーを直接 (コロニー) PCR にかける。PCR 産物の長さからインサートの有無を判定すると共に, 後続の DNA シークエンシングでベクター上のユニバーサルプライマーを用いた遺伝子解読を行い, N 型か D 型かどちらかの配列しか読めないことから, 大腸菌 1 個に 1 個のベクターしか入っていないことを確認させていた。

4.3 DNA シークエンシング

最後のテーマは, PCR 産物の直接シークエンシングを行

い、PCR 増幅した領域の ALDH2 遺伝子の塩基配列を解読する。学内に導入した DNA シークエンサー（ジェネティックアナライザー、Applied Biosystems 社 3100-Avant）は ddNTP に塩基ごとに各色の蛍光色素を合計 4 色標識したキャピラリータイプであるが、キャピラリーは同時に 4 本しか泳動できないため、前テーマで判定した NN 型、ND 型、DD 型、の PCR 産物の中で産物量が多そうで純度も高そうなサンプルを選別して合計 3 サンプルをシークエンシング反応に適用する。残り 1 サンプルは ND 型の産物に、PCR に用いたリバースプライマーをシークエンシングプライマーにし、反応をおこない前記 3 サンプルがセンス鎖を読めるのに対して 1 サンプルは苦勞をしてアンチセンス鎖を読ませるようにしている。このようにして 2 名 1 チームで共同して 1 サンプルずつのシークエンシング反応と精製の実験を進めてゆく。

第 1 週は、蛍光標識した ddNTP と（インナー）フォワード・シークエンシングプライマー（SKJ03）
5' - GGTCAACTGCTATGATGTG-3'
と PCR 用リバースプライマー（SKJ02）をシークエンシングプライマーに用い（Fig. 4）、各 PCR 産物にそれぞれシークエンシング反応

95°C・3 分

[95°C・30 秒, 50°C・30 秒, 60°C・30 秒]×25 サイクル
4°C・10 分

を行なう。その後、エタノール沈殿によりシークエンシング反応物を精製し、シークエンサーで 2 時間程度の電気泳動・蛍光検出を自動で行う。

第 2 週は出来上がってきたデータを各学生手持ちのノートパソコンにダウンロードさせ、データ読み取りソフトを学内のサーバーからダウンロード・インストールさせて、4 種類のデータを読み取りソフトで解析、多型部分の塩基変異を確認させる（Fig. 9）。

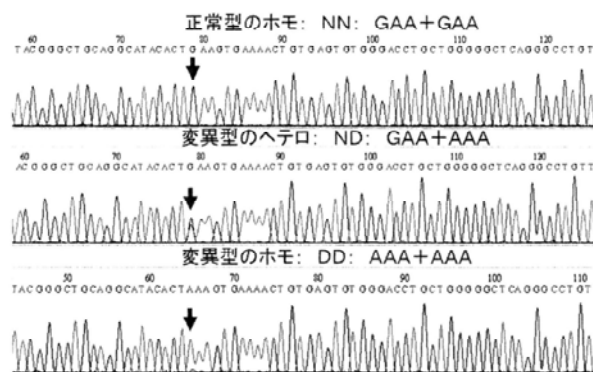


Fig.9 各遺伝子型 DNA のシークエンシング結果。

5. おわりに

このように、全体を通して「キット」を極力使わずに遺

伝子工学の基本に沿った実験操作によってでも最初の口腔粘膜剥離細胞を十分に採取できていれば、学生自身の染色体 DNA が充分量抽出でき、PCR 反応に用いることができると同時に、標本として自らの DNA ストラップを作ることができる（実質約半数の学生がストラップ作成に成功する）。また、対象学生は 3 年次の後期授業であるのでちょうど全員が 20 歳を迎えて何らかの形で飲酒の機会に接し始めているところであり、アルコールに対する耐性に関心が高まっているところで、ALDH2 の遺伝子型についてはかなり興味を持ちながら実験を行い、判明した自分の遺伝子型情報を他の学生に知らせてしまう学生も多い。

さらに他大学ではほとんど行っていない PCR 直接シークエンシングを ALDH2 遺伝子の解読に適用することで、遺伝子塩基配列が実際に自分の目で確認できるという貴重な経験になるようにしている。特に約半数の学生は一部ではあるが自らの染色体 DNA の ALDH2 遺伝子の解読ができたということで感動したという声を聞く。これについては筆者も留学時代にその頃市場に出回り始めた PCR 装置を用いて研究所内で初めて直接シークエンシングを成功させることができ、自らの DNA ではなかったが、解読できた時の感動を今でも昨日のここのように思い出すことができる。DNA シークエンシングを実験に組み入れたのも、学生達と同じ感動を是非味わってもらいたいと考えたのがひとつの原因である。

謝辞

浜松医科大学名誉教授の故・馬場正三先生（外科学第二講座）、同じく故・瀬典夫先生（化学講座）、同じく故・菅野剛史先生（臨床検査医学講座）、名誉教授の藤田道也先生（生化学第二講座）、現・学長の中村達先生（外科学第二講座）、臨床検査医学講座教授の前川真人先生をはじめ、浜松医科大学でご協力・ご支援を頂きました多くの先生に深く感謝申し上げます。また本学の実験でご協力を頂いた齋藤明広准教授、ティーチングアシスタントやステューデントアシスタントとしてお手伝い頂いた遺伝子工学（常吉）研究室の大学院修士課程修了生、学部卒業生の多くの方々に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) H. Terunuma, T. Hayakashi, T. Tsuneyoshi, M. Fujita, I. Kino and S. Baba, "Mutational heterogeneity among individual tumors in a case of multiple primary malignancy of the colon", *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23** (1993) 350.
- 2) 中村稷志, 小里俊幸, 川上和彦, 馬場正三, 中村祐輔, 常吉俊宏, "HNPCC 腫瘍の分子生物学的特性と臨床応用", *日本消化器外科学会誌*, **28** (1995) 1316.
- 3) C. F. Quesada, H. Kimata, M. Mori, M. Nishimura, T.

- Tsuneyoshi and S. Baba, "Piroxicam and acarbose as chemopreventive agents for spontaneous intestinal adenomas in APC gene 1309 knockout mice", *Jpn. J. Cancer Res.*, **89** (1998) 392.
- 4) S. Harada and S. Zhang, "New strategy for detection of ALDH2 mutant", *Alcohol Alcohol Suppl.*, **1A** (1993) 11.
 - 5) S. Higuchi, S. Matsushita, M. Murayama, S. Takagi and M. Hayashida, "Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism", *Am. J. Psychiatry.*, **152** (1995) 1219.
 - 6) A. Tamakoshi, N. Hamajima, H. Kawase, K. Wakai, N. Katsuda, T. Saito, H. Ito, K. Hirose, T. Takezaki and K. Tajima, "Duplex polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for genotyping alcohol dehydrogenase beta subunit (ADH2) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2)", *Alcohol Alcohol.*, **38** (2003) 407.
 - 7) 太田博樹, "アルコール代謝に関連する遺伝子の多様性の起源", *遺伝*, **67** (2013) 353.