

野外生物学分析実習

DNA 抽出・型判定・データ解析

氏名：西本千夏

所属：京都大学大学院理学研究科生物科学専攻
京都大学野生動物研究センター

実施期間：2023年10月24日～27日（4日間）

提出日：2023年11月10日

提出期限：2023年11月10日

1. 要約

1～2 日目は、アンドロゲン受容体 (AR) の遺伝子について PCR 法と DNA シーケンサーを用いて解析を行った。AR 遺伝子は、様々な生物種で性格と関連していることが報告されている。本実験では、各自の口腔内の頬側の DNA を使用して、AR 遺伝子の個体差と性格を調査した。また、チンパンジーの性格評価も使用し、両者の関連性を調査した。その結果、AR 遺伝子の個体差と性格に関連性を見出すことができなかった。チンパンジーの性格診断ではヒトの性格を正確に診断することはできないことが示唆された。3～4 日目は、1 日目に抽出した DNA を用いて、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の酵素活性を調べた。アルデヒドデヒドロゲナーゼの活性は ALDH2 遺伝子の一塩基置換に影響を受ける。この一塩基多型 (SNP) を調べるために、PCR を用いて SNP を増幅、電気泳動を行い、遺伝子多型を調べた。加えて、DNA 解析だけでなく簡易的なパッチテストも行い、パッチテストの結果と比較した。その結果、DNA 解析では 5 人はグルタミン酸のホモ接合体、1 人はグルタミン酸 - リシンのヘテロ接合体をもっており、アルデヒドデヒドロゲナーゼの酵素活性があることを確認できた。パッチテストでも、ヘテロ接合体保有者の皮膚のみ変化がおきた。これらからパッチテストでもアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性を調べることが可能であることが示唆された。

〈1 日目～2 日目〉

2. 序論

DNA 解析とは、生物の遺伝情報を総合的に解析することである。解析には、PCR 法や DNA シーケンサーなどが用いられる。PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) は、特定の DNA 断片を増幅するための手法である。この方法では、DNA の二本鎖を分離し、特定の配列に対応するプライマーと呼ばれる短い DNA 断片を使用し、DNA ポリメラーゼが新しい DNA 鎖を合成する。これにより、目的の DNA 断片を増幅することができる。DNA シーケンサーは、DNA の塩基配列を決定するための技術である。Sanger 法や次世代シーケンシング技術 (NGS) などの手法が利用され、これにより DNA 断片の塩基配列を得ることができる。[1] これらの解析方法を用いて、口腔内のアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の解析を行った。

AR 遺伝子はヒトやさまざまな生物種において、性格と関連していると報告されている。[2, 3, 4] AR は組織内で広く発現しており、生殖に関連するだけでなく、攻撃性や感情などの非生殖行動パターンにも影響を与えられている。この AR 遺伝子は X 染色体に位置しており、N 末端ドメインにグルタミンをコードする CAG とグリシンをコードする GGN の 2 つの多型トリヌクレオチドリピート領域を含んでいる。[2, 5] この CAG リピートの長さは、アンドロゲン関連行動に影響している可能性があり、ヒトとイヌの研究より、短い CAG リピートは攻撃性が高いことが示されている。[3, 4]

そこで本実験では、AR 遺伝子の DNA 抽出から PCR 法および DNA シーケンサーによ

る解析方法を学ぶとともに、AR 遺伝子の個体差と性格の関連性をみることを目的とした。

3. 方法

【材料】

各自の口腔内 DNA、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)、0.9%生理食塩水、脱イオン水、99.5%エタノール、LA Taq with GC buffer、Primers、Control DNA、Size standard、Hi-Di Formamide、

1 サンプルの PCR mixture: 2x GCl buffer 5 μ l, H₂O 1.8 μ l, sNTP 1.6 μ l, Primer1(20 μ M), Primer(20 μ M), LA Taq 0.1 μ l

【DNA 抽出、濃度測定】

口腔内の左右の頬側から綿棒を使用し、粘膜を採取した。綿棒を生食で洗い、遠心分離 (14000rpm, 1 分) にかけて沈殿物のみ回収した。沈殿物が入ったチューブに生理食塩水 100 μ l とプロテアーゼ 20 μ l を加え、さらに、Buffer AL を 200 μ l 加え混ぜ、インキュベート (56°C、10 分) し、DNA 以外を分解した。なお、インキュベート中は 3 分ごとに取り出し、ボルテックスを行った。インキュベート後に、エタノールを加え、溶液をスピニングカラムチューブに移し、DNA のみフィルターにトラップし 2 回洗った。洗う度に遠心分離にかけた (1 回目: 8000rpm、1 分、2 回目: 14000rpm、4 分)。洗浄後、予め温めておいた脱イオン水 50 μ l 加え DNA を溶解させ、再びインキュベート (56°C、5 分) を行った。最後に遠心分離 (8000rpm、1 分) をかけ、上澄みのみを捨て DNA を回収、4°C で保存した。また、回収した DNA 濃度を測定するため、Nano Drop を用いて濃度測定も行った。

【PCR】

PCR の 1 チューブに PCR mixture 9 μ l と回収した DNA 1 μ l を入れ、サーマルサイクラーにて増幅した。

【DNA シーケンサー】

Hi-Di Formamide 160 μ l と Size Standard 1 μ l を混ぜ、調製した溶液を 10 μ l ずつシーケンサー用のプレートに入れた。PCR で増幅させたサンプル 1 μ l に脱イオン水 100 μ l を加え希釈し、希釈液 1 μ l を上記のプレートに加えた。プレートを温めた (95°C、5 分) のち、すぐに 5 分間 ice box 上で冷やし、シーケンサーにかけ解析を行った。グルタミン酸とグリシンのリピート数は表 1 を参照し解析を行った。

表1

ARQ	ARQ Repeat Number	ARG	ARG Repeat Number
273	23	314	17

【性格診断】

チンパンジーの性格評価は 54 の形容詞と記述で構成された Hominoid Personality Questionnaire (HPQ)³ の日本語版を使用し評価した。[6]

4.結果

DNA 解析を行ったところグルタミン酸およびグリシンのリピート数が最も多い人で 26 回、23 回であった (表 1)。グリシンのリピート数は 6 人中 5 人が 23 回であった。

表2. AR遺伝子のグルタミン酸およびグリシンのリピート数

ID	Sex	ARQ_1	ARQ_2	ARG_1	ARG_2	ARQ_1_Repeat_Number	ARQ_2_Repeat_Number	ARG_1_Repeat_Number	ARG_2_Repeat_Number	ARQ average	ARG average
1	F	279	285	323	332	25	27	20	23	26	21.5
2	M	276	-	332	-	24	-	23	-	24	23
3	F	276	276	332	332	24	24	23	23	24	23
4	F	279	282	332	332	25	26	23	23	25.5	23
5	F	276	288	332	332	24	28	23	23	26	23
6	M	276	-	332	-	24	-	23	-	24	23

チンパンジー性格診断では、攻撃性の項目となる優越性 (Dominance) と神経質 (Neuroticism) のみ計算を行い、AR 遺伝子のリピート数と比較した (表 2)。グリシンのリピート数は個人差があまりでなかったため、グルタミン酸のリピート数を用いて比較を行った。AR 遺伝子短い (リピート数が少ない) 人は、長い人より神経質のスコアが高めであったが、優越性ではスコアが低かった。

表3. AR遺伝子の長さとは性格

	Dominance	Neuroticism
Short gene 2,3,6	1.84	-0.11
Long gene 1,4,5	2.22	-0.22

5.考察

CAG リピートと攻撃性との関連性はヒトで既に証明されており、CAG リピートが短い個体はリピートが長い個体より攻撃的であることが報告されている。しかし、今回の実験では、AR 遺伝子の CAG リピートが短い人は、長い人と比較し優越性が低く、神経質が高かった。このような結果となった要因として 2 つ考えられる。まず、1 つ目は、チンパンジーの性格診断のやり方を統一していなかったことである。自身で性格診断を行った人 (主観的) もいれば、他人に評価してもらう人 (客観的) もいたためである。主観的にみた自身と客観的にみられた自身は必ずしも同じとは限らない。また、他人に評価してもらうには、それなりに親しい仲でないと自身の性格と大きなずれが生じる可能性がある。2 つ目は、チンパンジー用の性格診断を使用したことである。チンパンジーの性格診断には行動によって表現される感情の項目が多く、ヒトではあまりみられない項目が多々あった。

人は、外面は良くても内ではそうでない人がいる。例えば、怒ってなさそうに見えて内面ではものすごく怒っている人など、客観的にみて分からない。そのため、他人に評価してもらうことは難しい。また、自身で評価した場合も、チンパンジーのように強い縦列社会ではないため、診断項目のような場面を容易に想像しづらく、評価を正しく行うことができない。このような 2 つの要因から、CAG リポートが短くても優越性が低いという結果になったと考えられる。これらより、チンパンジーの性格診断はヒトの性格診断には使用できないことが示唆される。

一方、人間の性格診断である Temperament and Character Inventory (TCI) で行った結果はリポートが短い人が攻撃的であるという結果が得られたが、1 項目しか比較しておらず、加えて同じ TCI 診断を使用していないため得られた結果は正確とは限らないと考えられ、診断方法を統一して行う必要があると思われる。

〈3 日目～4 日目〉

1.序論

アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) は生体機能維持のために様々な役割を果たしている。そのうちの 1 つである ALDH2 は、アルデヒド代謝に関与しており、細胞障害の抑制を担う。この ALDH2 遺伝子の一塩基多型 (SNP) は、ALDH の酵素活性に大きな影響を与える。グアニンがアデニンに置き換わると 487 番目のアミノ酸であるグルタミン酸がリシンに置き換わる。このグルタミン酸は酵素活性に重要な役割を果たしており、グリシンに置換すると ALDH の活性が欠損しエタノールを代謝することが難しくなる。[7]そこで本実験では、簡易に行えるパッチテストと各自の口腔内 DNA を使用して、ALDH2 遺伝子の SNP を PCR で増幅し、遺伝子多型をみた。

2.方法

【パッチテスト】

コットンをそれぞれ 70%エタノールと水に浸した。それらを腕に 5 分間のせた後、外し 10 分後に腕の皮膚の変化を観察した。

【PCR】

グルタミン酸、グリシンのコドンに対応する配列を増幅するために 2 種類のプライマーセットの PCR mixture を調製した (表 4)。PCR mixture 8 μ l と抽出した DNA 2 μ l を混ぜ合わせ、サーマルサイクラー (65°C、35 サイクル) にて増幅した。

表4. PCR Mixture (μ l)

A primer set		B primer set	
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	5	AmpliTaq Gold 360 Master Mix	5
H ₂ O	2.5	H ₂ O	2.5
F primer	0.25	F primer	0.25
R primer	0.25	R2 primer	0.25

A はグルタミン酸、B はグリシンのプライマーセット

【電気泳動】

・ 1.5%アガロースゲル作成

1 \times TBE 60ml に 0.9g アガロースゲル加え、電子レンジで溶かし、ミリ Q 水で全量 60g にメスアップした。その後、60°Cで冷ました。冷やすと全量が変わるため、ミリ Q 水を加え、60g になるように調製した。型に調製したゲルを流し込み、固まるまで待ち、固まったら少量の 1 \times TBE を加えゲルを取り出した。

・ 電気泳動

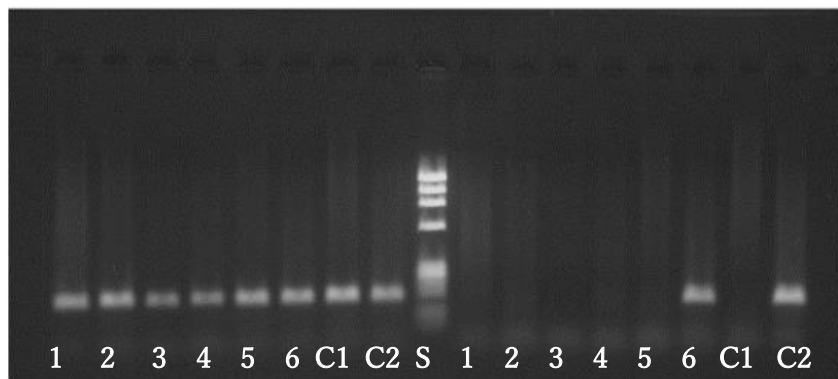
電気泳動装置に 1 \times TBE 400ml を入れ、ゲルを入れセットした。パラフィルム上で染色液 1 μ l と PCR で増幅した DNA 5 μ l を混ぜ、ゲルに入れた。サイズマーカーは染色液 1 μ l に 3 μ l を混ぜ合わせゲルに流し込んだ。色素がゲルの中央に移動するまで 100V で 30 分間反応させ、反応後ゲルを UV トランス照射機の上に置き、写真を撮った。

3.結果

パッチテストでは ID 6 の人は皮膚が赤く変化した。ID 6 以外の人は、皮膚変化はみられなかった。電気泳動では、皮膚変化があった ID 6 の人のみ genotype B のバンドが見られたが、それ以外は見られなかった (表 5、写真)。

表5. パッチテストと電気泳動結果

ID	patch test	genotype A	genotype B	酵素活性
1	—	+	—	strong
2	—	+	—	strong
3	—	+	—	strong
4	—	+	—	strong
5	—	+	—	strong
6	+	+	+	medium
C1	—	+	—	strong
C2	—	+	+	medium



4.考察

パッチテストと ALDH2 遺伝子の遺伝子多型解析より ID 6 は、ALDH の酵素活性が低活性だと考えられる。ID 6 のパッチテストでは皮膚に変化が見られた。変化がみられた要因として 2 つ挙げられる。1 つは、皮膚が弱いという仮説だ。エタノールは脂質を溶解し、皮膚の保湿機能を低下させる。加えて、タンパク質も変性させることもある。そのため、ID 6 の皮膚は弱く、これらの影響により、刺激に対して過敏に反応し赤くなった可能性が考えられる。この仮説は、皮膚の保湿度や皮膚のバリア機能に関わる遺伝子を調べることで判断できるだろう。2 つ目は、ALDH の酵素活性が低活性あるいは非活性であるという仮説だ。エタノールは、皮膚に貼るとカタラーゼという酵素によって分解され、アセトアルデヒドに変化する。アセトアルデヒドは、血管拡張作用をもっており分解されずに残っていると毛細血管が拡張し、皮膚が赤くなる。そのため、皮膚変化した ID 6 はアセトアルデヒドを分解する ALDH2 の酵素活性が低活性あるいは非活性の可能性が考えられる。この仮説は、ALDH2 の遺伝子検査で判断することができ、今回 ALDH2 の SNP 解析を行い、ID 6 からグルタミン酸 - グリシンのヘテロ接合体を検出することができた。そのため、2 つ目の仮説が支持でき、かつ酵素は低活性であると考えられる。

ID 6 以外は、パッチテストでは変化がみられなかった。ALDH2 の SNP 解析では、グルタミン酸 - グルタミン酸のホモ接合体が出たことから ALDH2 の酵素活性が強くアセトアルデヒドを速やかに分解できたため、皮膚に何も変化がおきなかったと考えられる。今回、グリシン - グリシンのホモ接合体を持つ人はいなかったため、このタイプのパッチテストがどのような変化を起こすのか不明だが、恐らくヘテロ接合体の人と同じ反応になると思われる。そのため、パッチテストではヘテロ接合体とグリシンのホモ接合体を見分けることはできないと考えられる。これらのことからパッチテストは ALDH2 の酵素活性が強い弱いのみでの簡易的に調べる手段として利用できる可能性があるとし唆される。

参考文献

1. Essential 細胞生物学原書第4版 著者 Bruce Alberts et al 出版社 南江堂
2. Hideyuki Ito, Tanya Langenhorst, Rob Ogden, Miho Inoue-Murayama. Androgen receptor gene polymorphism in zebra species. *Meta Gene, Volume 5:120-123, 2015.*
3. Hans Vermeersch, Guy T'Sjoen, Jean Marc Kaufman, John Vincke, Mieke Van Houtte. Testosterone, androgen receptor gene CAG repeat length, mood and behaviour in adolescent males. *European Journal of Endocrinology, Volume 163:319-328, 2010.*
4. Akitsugu Konno, Miho Inoue-Murayama, Toshikazu Hasegawa. Androgen receptor gene polymorphisms are associated with aggression in Japanese Akita Inu. *Biol Lett, 7(5):658-660, 2011.*
5. Chihiro Hiramatsu, Annika Paukner, Hika Kuroshima, Kazuo Fujita, Stephen J. Suomi, Miho Inoue-Murayama. Short poly-glutamine repeat in the androgen receptor in New World monkeys. *Meta Gene, Volume 14:105-113, 2017.*
6. King JE, Figueredo AJ. The Five-Factor Model plus Dominance in chimpanzee personality. *J Res Pers 31:257-271, 1997.*
7. Akiko Matsumoto. Importance of an Aldehyde Dehydrogenase 2 Polymorphism in Preventive Medicine. *日衛誌, 73:9-20, 2018.*
8. Hideaki Komiya, Emi Sasaki, Naoyuki Kurokawa. Reliability of ethanol patch tests for assessment of alcohol tolerance based on alcohol-related genetic polymorphisms The influence of season and operator subjectivity. *Japan J. Phys. Educ. Hlth. Sport Sci. 61: 29-42, 2016.*