

# ヒト mtDNA 多型から見た

## 静岡県における生活習慣病罹患患者数推移の予測

静岡県立掛川西高等学校

自然科学部 二年 丸山海成 薄田隼弥 夏目翔太郎

### 1. 研究背景

ヒト mtDNA の 5178 番目の塩基には多型が存在し、C と A の 2 パターンが存在する。統計的な調査から、5178A/C の多型は 40 代以降での生活習慣病のなりやすさ、なりにくさを示すとされている。5178C は 5178A に比べて生活習慣病に罹患しやすいということが明らかになっている（田中雅嗣氏ら：1998 年）。私達は mtDNA が母系遺伝であることに着目し、サンプル DNA と対象者の母親の出身地情報からそれぞれの多型をもつ集団がどの地域から移住しているかを調査することで、特定の地域における生活習慣病罹患患者数の推移を予測することができるのではないかと考えた。

本研究は昨年度から行っている。今年度は、昨年度の課題の解決策をたて、より実験規模を拡大して実施することを目的として活動している。

### 2. 昨年度の研究

#### 2-1 結果

昨年度は本校理数科生徒 30 人、教員 5 人の計 35 人のデータ解析に成功した。結果を表-1 に示す。この結果から、「静岡県では 5178C 型が他地域から流入し、増加しているのではないだろうか」という仮説が立てられる。もしこの仮説が正しいとするならば、「静岡県では今後生活習慣病が増加する可能性を示唆する」ことになる。真実なら非常に大きな発見だろう。これが真実であるかどうか確かめることが、今年度の研究の目的となった。

| 母親の出身地 | 5178C | 5178A |
|--------|-------|-------|
| 静岡県内   | 10    | 13    |
| 静岡県外   | 5     | 2     |
| 出身地不明  | 2     | 3     |
| 合計     | 17    | 18    |

表-1 出身地別の結果(サンプル数)

#### 2-2 今年度の研究にむけた目的及び改善点

改善点として、変化の予測にはサンプル数が大きく足りないため、サンプル数を増やしてデータの信憑性を上げること、より長期的な変化を予測するため母方の祖母の代まで調査することなどが挙げられた。同時に、サンプル数増加に伴って徹底した個人情報の管理やより安価で迅速な実験方法の構築も必要となった。

また、10398 多型 A/G もミトコンドリアの pH 及びカルシウム濃度の変化に関与していることが明らかになっている（理化学研究所脳科学総合研究センター・精神疾患動態研究チームら）。10398 G は日本人の長寿者に多くみられることが理研の研究で明らかになっている。反対に、10398A はパーキンソン病、アルツハイマー病、躁うつ病などとの関連が指摘されている。研究主題から外れるがこちらも 5178 多型と同様の方法で識別可能であるため、今後のことを考えてともに調査する計画を立てた。

### 3. 今年度の研究

#### 3-1 実験方法

##### (1) DNA サンプル回収

本校全校生徒に耳垢，腕毛もしくは爪のサンプルと生徒と生徒の母親，生徒の母方の祖母の出身地情報の提供の依頼をするために校内に校長先生を責任者とする倫理委員会を設置した．サンプル提供の依頼，収集方法，収集日時，実験の範囲などを記した保護者あての文書を作成し，委員会に提出して了解を得た．全校生徒に提供依頼の文書とサンプル採取キットを配布し，耳垢の場合は綿棒を用いて採取し，1.5ml または 0.5ml のエッペンドルフチューブに入れてもらった．キットには出身地記入用紙を折りたたんで同封してもらうようにした．記入の方法は，個人を特定しうる筆跡が残らないよう地域名に丸を付けるだけという方式をとった．サンプルは全部で 183 個回収することができた．

##### (2) サンプルからの DNA の抽出と増幅

タンパク質を分解し，DNA のみを取り出すために，タンパク質分解酵素のプロテイナーゼ K を用いた．サンプルが爪の場合はコンタミ防止のためにビーズ入りのエッペンドルフチューブで攪拌し，表層を削った後インキュベートを行った．

##### (3) DNA の増幅

DNA 増幅には PCR 法を用いた．サーマルサイクラーを使用し，94℃で 2 分間の熱変性を行い，98℃で 30 秒間の DNA 鎖の解離，53℃で 30 秒間のアニーリング，68℃で 1 分間の伸長反応を 35 回繰り返した．PCR 法に用いた溶液は以下に示す．

| 溶液等                                     | 添加量 (μl) (1 サンプルあたり) |
|-----------------------------------------|----------------------|
| Quick Taq HS Dyemix                     | 12.5μl               |
| 各 DNA                                   | 1μl                  |
| 混合プライマー                                 |                      |
| F primer : R primer : 滅菌水 = 1 : 1 : 8 で | 1μl                  |
| 混合                                      |                      |
| 滅菌水                                     | 11μl                 |
| 合計                                      | 25.5μl               |

表-4 PCR 溶液の組成

##### (4) 電気泳動

PCR 後，DNA の増幅を確認するために 1.5% のアガロースゲルを用いて 100V で約 30 分間電気泳動にかけ泳動が十分に行われていることが確認された後，10000 倍に薄めた蛍光色素 (GelRed、Biotium 社製) で 30 分間染色し紫外線蛍光装置で

増幅を確認した.

(5) 制限酵素による DNA の切断処理

今回は制限酵素 Alu-1 を用い, 多型の識別を行った. Alu-1 は塩基配列 AGCT を認識し切断する酵素で, 目的の 5178 番周辺の塩基配列が AGCT と AGAT であるため, 5178C なら 221bp と 186bp と 408bp に, 5178A なら 221bp と 594bp に切断される.

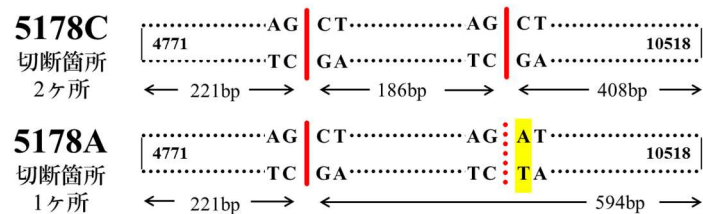


図2 制限酵素による処理の様子 (5178A/C)

生じる DNA 断片長のうち, 長さの差が最も大きい 5178C の 408bp と 5178A の 594bp を電気泳動で判別する.

増幅した DNA と Alu-1 混合液を PCR 用 0.2ml エッペンドルフチューブに入れ, 攪拌して遠心分離した後, 37℃で一時間インキュベートした. 溶液の組成を表2に示す

| 溶液等                                      | 添加量       |
|------------------------------------------|-----------|
| Alu-1 混合液                                |           |
| (Alu-1 : L Buffer : 滅菌水= 1 : 2 : 17 で混合) | 5 $\mu$ l |
| 各 DNA                                    | 5 $\mu$ l |

表2 制限酵素反応液の組成

(6) DNA バンドの確認

PCR 後と同様の方法で, 切断した DNA バンドの確認を行った.

### 3-3. 結果

図-7 は電気泳動結果の一部である．ラダーマーカの 400bp に近い位置にバンドが現れれば 5178C, 600bp に近ければ 5178A となる．図-7 では右から 5178C, 5178C, 5178C, 5178A …となる．

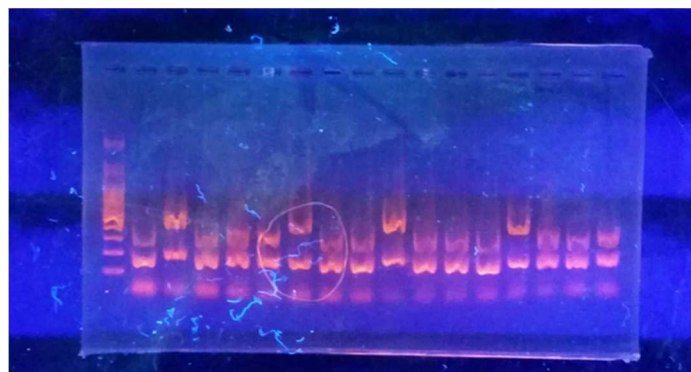


図-1 電気泳動結果の一部

結果を表-9 に示す．最終的に 183 サンプル中 171 サンプルの解析に成功した．

| 多型<br>出身地 | 生徒の世代 |       | 母親の世代 |       | 祖母の世代 |       |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 5178C | 5178A | 5178C | 5178A | 5178C | 5178A |
| 静岡県内      | 85    | 81    | 65    | 68    | 57    | 57    |
| 静岡県外      | -     | -     | 20    | 14    | 26    | 20    |
| 出身地不明     | 4     | 1     | 4     | -     | 6     | 5     |
| 合計        | 89    | 82    | 89    | 82    | 89    | 82    |

表 9 出身地別の結果

### 3-4. 考察

結果より，出身地が静岡県内のものだけを選び出し，グラフにしたものを図-8 に示す．

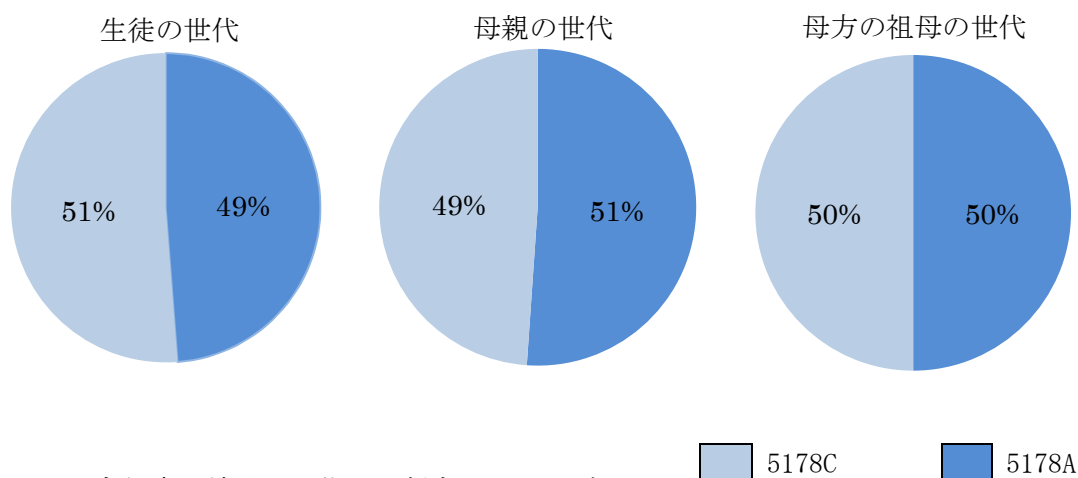


図-8 今年度の結果を世代別に割合で示したグラフ

5178C 5178A

この結果より、生徒、母親、母方の祖母の3世代において、5178Cと5178Aの割合はほとんど変化せず、同じであると考えられる。このことは、世代を経るにしたがって5178A/Cの割合にほとんど変化はみられないだろうということも示している。

昨年度は、前述のとおり母親世代で5178Cが57%、Aが43%であり、生徒世代では5178A/Cともに50%という結果であり、母親世代では5178Aの割合のほうが高かったが、これは今年度の結果と異なっている。しかし、今年度の実験の方がサンプル数が5倍ほど多く信憑性が高いため、今回の結果の方が実際の5178A/Cの割合に近いのではないかといえる。

結論として、この遺伝子に起因する生活習慣病罹患者数はここ20~30年の間変化しないと予想される。

全国的には5178Cが約60%、5178Aが約40%の存在比率である（東京都健康長寿医療センター 田中雅嗣氏）。全国比でみると、今回の結果から掛川市周辺地域は5178Aの割合が10%程多い。さらに3世代にわたって同じような傾向が見られることから、全国平均より生活習慣病になりにくい状態が続いており、この先何十年かは変化しないと予想される。

### 3-5. 反省・課題と今後の展望

反省すべき点は、予定していた10398多型の実験に全く手がつけられなかったことである。残りの時間を使って、10398多型についても研究を続けたいと思っている。

## 5. 謝辞

今回の研究にあたり、サンプルを提供してくださった生徒とご家族の皆様、校長先生をはじめとする倫理委員会の先生方、また、様々な助言をしていただいた静岡県立大学河原崎泰昌准教授、資金提供して下さった山崎自然科学教育振興会様に御礼申し上げます。

今年度は科学技術振興機構中高生の科学研究活動推進プログラムに参加しています。

## 6. 参考文献

- ・H27. 静岡県高等学校理科教育研究会 日本生物教育会静岡県支部夏期研修会資料  
掛川西高校教諭 松下保男
- ・ヒトミトコンドリアDNAの比較による多型分析（青森県・三沢高校）  
<http://www.misawa-h.asn.ed.jp/topdadta/DNA.pdf>
- ・東京都健康長寿医療センター研究所ホームページ ミトコンドリア遺伝子と長寿  
[http://www.tmig.or.jp/J\\_TMIG/kouenkai/koza/62koza\\_3.html](http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/kouenkai/koza/62koza_3.html)
- ・Homo sapiens haplotype M\*1 mitochondrion, complete genome  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/af382012.1>
- ・DNAで語る日本人起源論 篠田謙一 著（岩波現代全書）
- ・日本人になった祖先たち DNAから解明するその多角的構造 篠田謙一 著（NHK BOOKS）
- ・細胞の働きに影響するミトコンドリアDNAの個人差を特定
  - 日本人が長寿である要因に関連する可能性 -[www.riken.jp/~media/riken/pr/press/2006/20060811\\_1/20060811\\_1.pdf](http://www.riken.jp/~media/riken/pr/press/2006/20060811_1/20060811_1.pdf)
- ・人類の足跡 10万年全史 Stephen Oppenheimer 著 仲村明子 訳（草思社）