

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15776

研究課題名(和文) SureSelectシステムを用いた歯からの遺伝子解析による個人識別

研究課題名(英文) Personal identification by genetic analysis from teeth using SureSelect system

研究代表者

堤 博文 (TSUTSUMI, Hirofumi)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：30188594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：キャプチャライブラリキットSureSelectQXTを用いてNGS・MiseqでABO式血液遺伝子型、mtDNA型およびHaloPlex遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネル19遺伝子領域のSNP解析(遺伝性心疾患)の同時解析について検討した。

結果、ABO式血液遺伝子型、mtDNA型および19遺伝子領域の同時解析はすべて可能であった。ABO式血液遺伝子型判定では、エクソン6および7以外の領域にも変異を認めた。また、mtDNA型を解析したところ、13系統に分類され、遺伝性疾患におけるSNP数は193～245認められた。3種の同時解析により変異プロファイルが多く検出され、識別精度の向上が確認した。

研究成果の概要(英文)：The SNP of ABO blood genotype and mitochondrial DNA with the NGS system analyzed by using capture library kit SureSelectQXT. In addition, analyzing the HaloPlex hereditary arrhythmia-related heart trouble research panel (Human Panel: Ajilent).

Materials and Methods: DNA was extracted from blood stain samples. The experimental procedure was followed the protocol of the SureSelect QXT Reagents kit. Result and Discussion: SNP analysis of ABO blood genotype, mtDNA and Human Panel were done simultaneously and successful for all samples. By analyzing the entire sequences of the chromosome 9, observe the novel mutation sites other than Exon 6 and 7 which are satisfactory to determine the ABO genotype. Moreover, mtDNA analysis revealed that mtDNA could be classified into several systems. In addition to these results, numerous mutations were found in Human Panel. These results suggested that the NGS analysis used in this study is quite useful and can be applied to the personal identification

研究分野：歯科法医学

キーワード：ABO式血液遺伝子型 ミトコンドリアDNA型 HaloPlex NGS・Miseq SureSelect 異同識別

1. 研究開始当初の背景

法医学分野における DNA 型鑑定による個人識別は、PCR 法により型判定を行っているが、迅速かつ精度の高い個人識別を行うためには HLA、SNP、常染色体および X・Y 染色体 STR さらには mtDNA など、さまざまな遺伝子領域を同時に解析することが望ましいものの、これまではこれらの分析が多岐にわたるため、分析技術が煩雑になっている。

そこで、本研究はヒトゲノムの 3GB ~ 10MB の塩基配列から特定の部分を SNP (一塩基多型) 解析することができる SureSelect Target Enrichment システム (SSTE システムとする) に着目した。SSTE システムは、現在、各種の疾患の原因遺伝子の同定に幅広く応用されているが、法医学分野の個人識別に採用された例はない。

近年では容易に遺伝子配列を調べることができることから DNA 解析による識別精度は高くなっているが、法医学分野で取り扱う試料はごく微量な場合が多く、解析に十分な DNA 量を抽出することができない場合があり、遺伝子領域ごとに解析では DNA 量がなくなる可能性がある。これらの欠点を解消するために、SSET システムを応用し、複数の遺伝子情報を一度に解析し、それぞれの塩基配列における塩基置換部位の確認を行い、個人識別精度の向上を図る。

2. 研究の目的

鑑定実務の効率化を図るために次世代シーケンシング SureSelect Target Enrichment システムを応用し、これまで別個に解析を行っていたミトコンドリア DNA (mtDNA)、ABO 式血液遺伝子型、および HaloPlex 遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネル 19 遺伝子領域の SNP 解析 (遺伝性心疾患) を同時にかつ網羅的に解析し、塩基置換・欠失などから、それらの多型性について検討し、より識別精度の向上について検討した。

3. 研究の方法

(1) ABO 式血液遺伝子型および mtDNA 型の同時解析

ABO 式血液遺伝子型の判明している血痕 DNA 18 例を用いた。NGS・MiSeq システムを用いて ABO 式血液遺伝子型および mtDNA 型を解析するキャプチャプローブは、プローブ設計ソフト SureDesign (アジレント社) でカスタム設計した (図 1)。

ABO 式血液遺伝子型と mtDNA 型の DNA 増幅率を同程度にするために、それぞれのキャプチャプローブの比を 100:1 に調整した。Post-Capture PCR 産物の調整は SureSelect^{QXT} Reagents キットに従ってターゲット DNA をトランスポゼース方式によって濃縮し、NGS・MiSeq でシーケンシングを行った。

遺伝子型判定は、解析ソフト SuerCall (アジレント) を用いて行った。なお、解析の範囲は ABO 式血液遺伝子型では第 9 染色体の nt136131043 ~ nt136150615 とし、また mtDNA 型では全領域とした。



図 1 SureDesign によるキャプチャライブラリの設計

(2) ABO 式血液遺伝子型、mtDNA 型および HaloPlex 遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネル 19 遺伝子領域の SNP 解析 (遺伝性心疾患) の同時解析

試料は、ABO 式血液遺伝子型、mtDNA 型および 19 遺伝子の同時解析には 10 例用いた。NGS・MiSeq システムに用いる際の ABO 式血

液遺伝子型判定用および mtDNA の全領域解析用のキャプチャプローブは、(1)と同様に mtDNA の過剰増幅を避けるために、核 DNA と mtDNA のプローブ比を 100 : 1 とした。なお、遺伝性疾患のプローブは HaloPlex キットを使用した。DNA 試料の調整は SureSelect QXT Reagents キットのプロトコールに従い、ターゲット領域をトランスポゼース方式により濃縮した。遺伝子解析は NGS・Miseq を用い遺伝子型判定は、解析ソフト SureCall (アジレント) とウェブデータ解析ソフト VariantStudio (イルミナ) を用いて行った。なお、解析領域は(1)と同様に mtDNA 型では全領域とし、ABO 式血液遺伝子型では第 9 染色体の nt136131043~136150615 とし、遺伝性疾患の解析座位とその領域については表 1 に示す。

表 1 HaloPlex 遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネル

Target	ID	chr	Interval
CASQ2		1	116243852-116311172
RYR2		1	237205812-237995957
CAV3		3	8775553-8787563
GPD1L		3	32148194-32207412
SCN5A		3	38591802-38674808
ANK2		4	113825640-114309894
AKAP9		7	91570404-91739483
KCNH2		7	150642443-150675011
CACNB2		10	18429656-18828663
KCNE3		11	74168287-74168618
KCNQ1		11	2466319-2869243
SCN3B		11	123504841-123524519
SCN4B		11	118007732-118023398
CACNA1C		12	2162719-2800375
KCNJ2		17	68171171-68172474
SCN1B		19	35521715-35530615
SNTA1		20	31996303-32031436
KCNE1		21	35821533-35821942
KCNE2		21	35742768-35743159

(3) SureSelectQXT ターゲットエンリッチメントシステムを用いた mtDNA 型および ABO 式血液遺伝子型のサンプル調製

DNA の断片化およびアダプタータグの付加およびアダプター付き DNA ライブラリの精製キットの SureSelect QXT Buffer 17 μ l と DNA (25 ng/ μ l) 2 μ l の混合液に SureSelect QXT Enzyme Mix ILM 2 μ l を入れ、45 \cdot 10分、4 \cdot 1分 で DNA を断片化した後、4 \cdot で SureSelect

QXT Stop Solution 32 μ l を入れ、断片化反応を停止した。つぎに断片化 DNA を AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter) を用いて精製した。

② Pre-Capture PCR 産物の作製

精製したアダプタータグ付加断片化 DNA を表 2 に示した Pre-Capture PCR 反応液に入れ、表 3 に示すサーマルサイクラプログラムに従って DNA を増幅した。

表 2 Pre Capture PCR 反応溶液の組成

Nuclease-free water	25 μ l
5x Herculase Reaction Buffer	10 μ l
100 mM dNTP Mix(25mM each dNTP)	0.5 μ l
DMSO	2.5 μ l
SureSelect QXT Primer Mix	1 μ l
Helculase fusion DNA Polymerase	1 μ l
精製アダプター付加 DNA ライブラリ	10 μ l
Total	50 μ l

表 3 Pre Capture PCR のためのサーマルサイクラプログラム

Segment No.	Cycles	Temp	Time
1	1	68	2 min
2	1	98	2 min
		98	30 sec
3	8	57	30 sec
		72	1 min
4	1	72	5 min
5	1	4	Hold

Pre-Capture PCR 産物の精製および定量

Pre-Capture PCR 産物について、まず AMPure XP ビーズを用いて精製し、つぎにバイオアナライザ DNA 1000 アッセイ (アジレント) を用いて電気泳動を行い、DNA サイズのチェックおよび定量を行った。図 2 には、Sample No.1 の Pre-Capture PCR 産物のエレクトロフェログラムを示した。

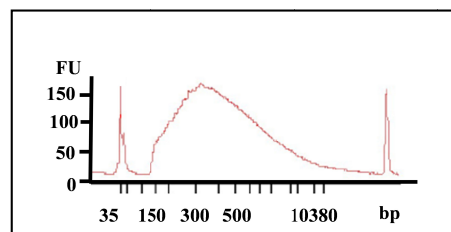


図 2 Pre-Capture PCR 産物の DNA サイズ

のチェックおよび定量 (Sample No.1) 245 ~ 325bp の位置に, シングルスメアピークを認める。

(4) ハイブリダイゼーションとキャプチャ

Post-Capture PCR産物の作製

ハイブリダイゼーションに用いる

Pre-Capture PCR産物 12 µl (40 ~ 60ng/µl) に, SureSelect QXT Fast Blocker Mix 5 µlを加え, 表3に示したハイブリダイゼーションのサーマルサイクラプログラムに従ってPCR増幅し, Post-Capture PCR産物を作製した。

表4 ハイブリダイゼーションのためのサーマルサイクラプログラム

Segment No.	Cycles	Temp	Time
1	1	95	5 min
2	1	65	10 min
3	1	65	1 min*
4	60	65	1 min
		37	3 sec
5	1	65	Hold

*: Pause

なお, プログラムの3段階目でPause状態とし, キャプチャライブラリハイブリダイゼーションMix溶液 13 µl を加えた後に, 4段階目以降をスタートさせた。

Post-Capture PCR産物の精製

ハイブリッドキャプチャを行うための前準備としてストレプトアビジン磁気ビーズ (ベリタス) を用いて精製した。

インデックス付加およびMultiplexing Sequencingのためのサンプル調製

精製したPost-Capture PCR産物にインデックスバーコードタグを付加するために, 表5に示した条件でPCR増幅を行った。その後, AMPure XPビーズを用いて精製し, バイオアナライザDNA 1000アッセイを用いて電気泳動を行い, DNAサイズのチェックと定量を行った。

表5 インデックス付加のためのサーマルサイクラプログラム

Segment No.	Cycles	Temp	Time
1	1	98	2 min
		98	30 sec
2	14	58	30 sec
		72	1 min
3	1	72	5 min
4	1	4	Hold

Post-Capture PCR 産物のシーケンシング
インデックスバーコード付きライブラリ (Post-Capture DNA) 4 nM を NGS・Miseq にアプライしてシーケンシングを行った。

4 . 研究成果

(1) ABO 式血液遺伝子型および mtDNA 型の同時解析

mtDNA 型判定

Sample No.1 を解析した結果では, 表 6 に示すように, 全領域のうち 37 箇所において塩基置換が認められた。そのうち網掛けで示した 12 箇所の置換によって mtDNA の系統は F1c と判定された。この他の試料 17 例の系統について検討し, 表 7 の下部に示した。

ABO 式血液遺伝子型判定

表 6 には血痕 18 例の結果を示した。例えば, Sample No.1 について, allele name 261 , 703 , 796 および 803 の塩基が G , A , A および C (いずれも Homozygous) に変異し B 型の Reference Allele と一致していたことから, 遺伝子型は BB 型と判定された。他の 17 例も同様に, すべて型判定された。

mtDNA 型判定

今回用いた試料 10 例について mtDNA の系統を検討したところ 9 系統に分類された(表 7)。

ABO 式血液遺伝子型判定

ABO 式血液遺伝子型と mtDNA の同時解析と同様にすべて型判定された(表 8)。

HaloPlex 遺伝性不整脈関連心疾患リサーチパネル 19 遺伝子領域の SNP 解析

遺伝性疾患における 19 座位の SNP 数の総数は 193~245 認められた。特に 19 遺伝子のうち、CASQ 2、RYR 2、ANK 2、AKAP 9、KCNH 2、CACNB 2、KCNQ1CA および CNA 1 C において SNP 数が多く検出された。

また、CAV3、KCNE 3、KCNJ2、SNTA1、SCN1B、KCNE 1 および KCNE 2 などでは SNP 数が少ない傾向であった(表 9)。

(3) まとめ

ABO 式血液遺伝子型, mtDNA 型および 19 遺伝子領域の SNP の同時解析はすべて可能であった。ABO 式血液遺伝子型判定では, 第9染色体のCoding領域すべてを解析し得たことで, 型判定に必要であるエクソン 6 および 7 以外の領域にも変異を認めた。また, mtDNA の全領域を解析したところいくつかの系統に分類された。さらに, 遺伝性不整脈関連心疾患領域を検査に加えることにより, 変異プロファイルが多く検出され, 識別精度は向上した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

堤 博文、丸山 澄、伊澤 光、小室歳信、SureSelect システムを用いた mtDNA 型および ABO 式血液遺伝子型の同時解析、DNA 多型、査読有、24 巻、2016,158-161

[学会発表](計 5 件)

堤 博文、丸山 澄、伊澤 光、小室歳信、SureSelect システムを用いた遺伝子解析(第 3 報)、第 101 次日本法医学会学術全国集会、2017 年 6 月 8 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

Tsutsumi H、Maruyama S、Izawa H、Komuro T、Simultaneous analysis of ABO blood genotype, mtDNA and HaloPlex hereditary、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 26 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

堤 博文、丸山 澄、伊澤 光、小室歳信、SureSelect システムを用いた遺伝子解析(第 2 報)、第 100 次日本法医学会学術全国集会、2016 年 6 月 17 日、きゅりあん(東京都品川区)

堤 博文、丸山 澄、伊澤 光、小室歳信、SureSelect システムを用いた mtDNA 型および ABO 式血液遺伝子型の同時解析、第 24 回 DNA 多型学術集会、2015 年 11 月 15 日、岡山大学創立五十周年記念館(岡山県岡山市)

堤 博文、丸山 澄、伊澤 光、小室歳信、NGS システムを用いた ABO 式血液遺伝子型および mtDNA 型の同時解析、第 99 次日本法医学会学術全国集会、2015 年 6 月 12 日、高知市文化プラザかるぽーと(高知県高知市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 博文

(TSUTSUMI, Hirofumi)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：30188594

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()