

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10136

研究課題名(和文) 損傷微量DNAにおけるSTR解析に最適な前処理方法の開発

研究課題名(英文) Investigation of effectiveness of whole genome amplification prior to short tandem repeat analysis for degraded DNA

研究代表者

町田 光世 (Machida, Mitsuyo)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60468692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：法医学で扱う試料は様々な環境要因によりDNAが変性して採取量も少ないため、STR解析による個人識別が困難になることが多い。従って、変性した微量DNA試料を用いた時のSTR解析の成功率を高める方法について検討することは大変重要な課題である。全ゲノム増幅法の1つであるmIPEP法が変性DNAを用いたSTR解析に対して有効かを検討した結果、DNAが5ngあれば変性度0.2未満で、また、濾紙から抽出されたDNAが0.05ng場合は変性度0.7以上で、スライドガラス上の唾液痕から抽出されたDNAの場合は変性度0.4以上で、mIPEP処理を行うことでSTR解析が改善されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

事件現場等で採取された試料は様々な環境要因によりDNAが変性し、量も限られているため、通常のSTR解析による個人識別が困難になる場合が多い。法医学では量・質共に良い状態ではない試料に対し、個人識別の判定率を高める方法について検討することは重要な課題である。本研究ではSTR解析前に全ゲノム増幅法の1つであるmIPEP処理を行うことで、豊富なDNAの場合は高度な変性試料において、また微量なDNAの場合は軽度の変性試料であれば、STR解析成功率を高めることが明らかになった。つまり、今まで解析困難だった試料がmIPEP処理により解析可能となり、犯罪捜査への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Short tandem repeat (STR) analysis is prone to failure as DNA is frequently damaged by various environmental factors; hence, increasing the number of starting templates may constitute a feasible approach to improve STR profiling success. One approach to increase the number of DNA templates is whole genome amplification (WGA), however, few studies have demonstrated that WGA can be used on degraded samples in forensics. Therefore, we utilized modified improved primer extension preamplification (mIPEP) prior to STR analysis. For the 5 ng DNA sample on paper, at a DI < 0.2, the number of detectable STRs was greater with mIPEP than without it. The 0.05 ng DNA sample deposited on paper, at when DI was 0.7 or higher, and the 0.05 ng DNA sample deposited on glass, at when DI was 0.4 or higher, exhibited higher numbers of detectable STRs when prepared using mIPEP. These findings suggest that performing mIPEP in accordance with sample DNA condition may lead to increased success of STR analysis.

研究分野：法医学

キーワード：全ゲノム増幅法 DNA損傷 STR解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学において、DNA 鑑定を行うためには、試料中の DNA 量が豊富で新鮮であると仮定すると、汎用されている Short Tandem Repeat (STR) 法で充分間に合う。STR とはゲノム上に存在する数塩基の反復配列であり、通常は 2~4 塩基程度で、数回から数十回繰り返すこともある。この反復配列を検出するには、200~400bp 程度の比較的長い塩基配列情報を必要とする。犯罪現場に残された DNA 試料の多くは、放置された環境の影響でゲノム DNA の塩基配列や断片化が起り、DNA 量は細胞に換算すると 15 個相当の 100pg 以下である⁽¹⁾。つまり、法医学で扱う DNA 試料は損傷を受けてかつ微量であり、STR 解析による DNA 型判定が困難になる。その中でも汗や毛根のない毛髪の STR 解析は極めて困難とされており、従って、損傷を受けてかつ微量な DNA 試料の解析が可能になれば DNA 鑑定における精度の向上へと繋がる。

DNA の損傷にはいくつかのタイプが知られており、そのタイプは試料が曝露されていた環境に起因している。例えば、DNA の N グリコシド結合が切断されて糖リン酸結合が残って生じる apurinic・apyrimidinic 部位 (AP 部位) は、哺乳類では一日あたり 5~20 万カ所も起り、最終的にはニックを引き起こすようなもっとも不安定な反応である⁽²⁾。また、酸化により生成された 8 オキソグアニンはアデニンと塩基対をなして塩基置換変異を誘発し、紫外線は DNA 上に形成されたピリミジン二量体が DNA 構造変化を引き起こして、DNA の複製や転写を阻害する⁽²⁾。このように DNA が損傷を受けると、立体構造の変化や断片化が生じ、PCR 反応が阻害されて以降に行われる実験に大きな影響を及ぼす。

法医学で扱う試料の DNA 型判定が困難とされるもう一つの理由に、試料中に含まれる DNA が極めて少ないことが挙げられる⁽³⁾。事件現場などで採取された試料は量が限定されており、再検査のために一部を保管する必要もあるため、法医学ではどれだけの量の DNA を鑑定に用いるのかは重要な課題である。微量 DNA 試料を用いて STR 解析を成功させるためには、PCR サイクル数の増大や DNA 抽出を伴わない直接 PCR 法等の検討を推奨しているが⁽⁴⁾、近年では全ゲノム増幅 (Whole genome amplification: WGA) と呼ばれる手法も検討されている⁽⁵⁾。

WGA 法とは、ランダムおよび縮重 (degenerate) プライマーを用いてゲノム DNA 全体を複製し、解析に用いる DNA 量を増やす方法である⁽⁵⁾。もともと着床前遺伝子診断等の臨床分野で利用され⁽⁶⁾、法医学分野へと応用された⁽⁵⁾。WGA には、multiple displacement amplification (MDA)、degenerate oligonucleotide-primed (DOP)、primer extension preamplification (PEP) 法があり、数種類のキットが使用可能である⁽⁵⁾。MDA 法は等温反応でゲノム DNA を増幅する方法に対し DOP、PEP 法は PCR 法を利用した増幅方法である。MDA 法はシングルセルや損傷をあまり受けていない試料で高い STR 解析成功率を示し⁽⁷⁾、DOP 法はホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出した試料で MDA 法よりも高い解析成功率を示した⁽⁸⁾。つまり、MDA 法は微量 DNA 試料に、DOP 法は変性試料に適していると考えられる。

PEP 法は、変性試料に対して STR 解析を行う時には多量の DNA が必要であるため、Barber と Foran は PEP 法に改良を加え improved-PEP (I-PEP) 法を開発した⁽⁹⁾。しかし、I-PEP 法で処理後に陳旧血液、骨、毛幹を用いて STR 解析を行った結果、部分的な STR 型しか得られず、陳旧試料のような高度変性試料においては利用困難であることが明らかになった⁽⁹⁾。さらに Hanson と Ballantyne は I-PEP 法を改良し、15-mer のランダムプライマーを用いることで、様々な長さの DNA 断片が増幅される方法 (modified I-PEP: mIPEP) を開発した⁽¹⁰⁾。変性した血液試料や接触 DNA の STR 型判定が mIPEP 処理を行うことで改善されたことから、mIPEP は変性微量 DNA に適し

ていることが示唆された⁽¹⁰⁾。また、我々は UVA 照射後の変性試料の DNA5ng を用いて mIPEP 処理を行った結果、行わない時よりも STR 解析成功率が高まることを報告した⁽¹¹⁾。従って、mIPEP 法は限定された量の DNA や変性した DNA に有効であると予想される。

2. 研究の目的

法医学で扱う試料は多くの環境要因により DNA が変性して採取量も少ないため、STR 解析による個人識別が困難になることが多い。従って、変性した微量 DNA 試料に対し、STR 解析の成功率を高める方法について検討することは大変重要な課題である。STR 解析の成功率を高める方法には、PCR 増幅条件や DNA 抽出法の最適化等が一般的であるが、近年では WGA 法も検討されている。現在まで法医学分野において様々な試料を用いた WGA に関する研究が報告されているが、試料がどのような状態の時に WGA 処理を行えば STR 解析の改善がみられるかについては明確ではない。そこで本研究では、紫外線照射して人工的に変性させた唾液試料を作成し、mIPEP 処理により STR 解析の精度が高まる条件を決定した。さらに自然環境下で変性させた試料においても本研究で決定した条件が適用可能かについて検討した。

3. 研究の方法

(1) DNA 試料と変性方法

4 名の実験協力者の唾液を採取し、擬似実務試料を作成した。実務試料において唾液は、吸い殻や切手、封筒、衣服、ティッシュペーパー、アルミ缶やグラスに付着していることが多い⁽¹²⁾。本研究では紙とガラスの異なる素材に着目し、唾液を濾紙に染み込ませた試料とスライドガラスに滴下した試料の 2 種類を準備した。各物体に付着させた唾液痕は一晩室温で放置し、これを未処理試料とした。DNA の変性には UVA 照射 (365nm、CL-1000UV crosslinker、UVP) 12 時間オン、12 時間オフの照射サイクルを使用し、6、14、28、60 サイクルで照射した。各照射サイクルは 3、7、14、30 日間照射に対応する。なお、本研究は東京女子医科大学研究倫理委員会の承認を得て実施された。

(2) DNA 抽出・定量・可視化

濾紙に染み込ませた唾液痕は一晩乾燥後に濾紙ごと PBS に懸濁し、スライドガラス上に滴下した唾液痕は PBS で湿らせた 4N6 FLOQSwab (4520CS01; Copan Diagnostics) を用いて回収後 PBS で懸濁した。ゲノム DNA は QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) により DNA を抽出した。抽出したヒト DNA の定量は KAPA hgDNA quantification and QC kit (Kapa Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った (StepOne Plus Real-Time PCR System; Thermo Fisher Scientific)。mIPEP 処理前後の DNA の状態は、High Sensitivity D5000 Screen Tape を用いて Agilent 4150 TapeStation (Agilent) で電気泳動・バンドの検出を行った。

(3) DNA 変性度 (Degradation Index: DI) の評価

UVA 照射した DNA の変性度は Kapa hgDNA Quantification and QC Kit (Kapa Biosystems) に付属の 41bp と 129bp のプライマーで増幅されたアンプリコンの量をリアルタイム PCR により定量し、41bp に対する 129bp の DNA 量比を算出した。未変性試料の場合、41bp と 129bp の DNA 量が同じと考えられるので値は 1 に近いが、変性が進行すると 129bp の DNA 量が減少して 1 より小さな値になる。つまり値が小さい程、変性が進行していることを意味する。

(4) modified Improved Primer Extension Pre-amplification (mIPEP)

5ng、0.5ng と 0.05ng に調整した各ゲノム DNA に 最終濃度 1mM dNTP、1x Expand High Fidelity buffer (Sigma-Aldrich)、7U Expand High Fidelity Enzyme Mix (Sigma-Aldrich)、40 μ M 15-mer random primer (5' -NNNNNNNNNNNNNN-3') を含む反応溶液を加えて合計 12.5 μ l とした。

PCR 反応条件は 94°C-1 分、37°C-2 分、アニーリング温度を 37°C から 55°C まで毎秒 0.1°C ずつ上げる反応 4 分を 1 セットとして 50 サイクル行った。

(5) AmpFISTR Identifiler PCR amplification kit を用いた STR 解析

mIPEP 処理前後の DNA は AmpFISTR Identifiler PCR amplification kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、PCR 反応の反応液および反応条件はキット付属のプロトコルに従った。増幅産物は ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて GeneScan 3.1.2 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) で解析した。

(6) 自然環境下で変性させた試料

唾液を濾紙に染み込ませた試料とスライドガラスに滴下した試料を 50 mL チューブに入れ、ガーゼで蓋をした後室外に放置した。放置期間は 2018 年 4 月から 2019 年 4 月にかけて、3 日、7 日、14 日、30 日、6 ヶ月、1 年間とした。

4 . 研究成果

UVA 照射後のゲノム DNA の変性度 (DI 値) について、mIPEP 処理前は UVA 照射時間に伴いゲノム DNA 断片の長さは短くなったが、mIPEP 処理後はゲノム DNA 断片の長さは長くなった。また、DI 値も UVA 照射時間に伴い減少し、UVA 照射後において濾紙とスライドガラス上の唾液痕から抽出した DNA 試料間の DI 値に差がみられなかった。

DI 値の減少に伴い、平均アリルピーク高と STR ローカスの検出数が減少する傾向がみられた。DI 値を DI 0.7 (ほとんど変性していない) $0.7 > DI$ 0.4 (軽度の変性) $0.4 > DI$ 0.2 (中程度の変性) $0.2 > DI$ (高度に変性) の 4 グループに分け、グループ毎に mIPEP 処理前後のアリルピーク高と STR ローカスの検出数について比較検討した。濾紙に染み込ませた唾液痕から抽出された DNA を用いた場合、アリルピーク高と STR ローカスの検出数について、DNA5ng かつ $0.2 > DI$ の時は mIPEP 処理後に増加し、DNA0.5ng を用いた時は mIPEP 処理前後で差がみられなかったが、DNA0.05ng を用いて mIPEP 処理を行うと DI 0.7 の時に増加した。また、スライドガラス上の唾液痕から抽出された DNA を用いた場合は、アリルピーク高は DNA5ng かつ $0.2 > DI$ の時と DNA0.05ng かつ DI 0.2 の時に mIPEP 処理後で増加し、STR ローカスの検出数は DNA5ng かつ $0.2 > DI$ の時と DNA0.05ng かつ DI 0.4 の時に mIPEP 処理後で増加した。一方、DNA0.5ng を用いた時は mIPEP 処理前後で差は認められなかった。

変性が進行することで長い STR ローカスの増幅が困難になるため、どの STR ローカスの増幅に偏りがあるのかについて mIPEP 処理前後のアリルピーク高を比較検討した。濾紙から抽出された DNA を用いた場合、mIPEP 処理後では DNA5ng かつ DI 0.7 の時に長い STR ローカスのアリルピーク高が減少し、DI > 0.4 の時に短い STR ローカスのアリルピーク高が増加した。mIPEP 処理後、 $0.2 > DI$ の時に D19S433、D3S1358、D8S1179、TH01 が増加し、DNA0.05ng かつ DI 0.7 の時には D19S433、D3S1358、D8S1179、TH01、vWA、D21S11、TPOX、D16S539 が増加したが、 $0.7 > DI$ の時はほとんどのローカスが増幅されなかった。スライドガラス上の唾液痕から抽出した DNA を用いた場合、mIPEP 処理後では 5ng かつ DI 0.7 の時に FGA、D7S820、D18S51、D2S1338 の長い STR ローカスのアリルピーク高が増加し、 $0.2 > DI$ の時には短い STR ローカスのアリルピーク高が増加した。また、DNA0.05ng かつ DI 0.4 の時には D19S433、D3S1358、D8S1179、TH01、D16S539 が増加した。以上の結果から、STR 解析の成功率を高めるためには、濾紙から抽出された DNA5ng かつ $0.2 > DI$ の時と DNA0.05ng かつ DI 0.7 の時、スライドガラス上の唾液痕から抽出された DNA5ng かつ $0.2 > DI$ の時と DNA0.05ng かつ DI 0.4 の時に mIPEP 処理を行うと効果的であることが明らかになった。

自然環境下で変性させた試料に対して、濾紙から抽出した DNA の DI 値は 0.25~0.92、スライドガラス上の唾液痕から抽出した DNA の DI 値は 0.003~0.83 になった。濾紙から抽出された DNA5ng かつ 0.2>DI の時と DNA0.05ng かつ DI 0.7 の時、スライドガラス上に滴下した唾液痕から抽出された DNA5ng かつ 0.2>DI の時と DNA0.05ng かつ DI 0.4 の時に mIPEP 処理を行うことにより、D8S1179、D3S1358、D19S433 の短いローカスは増幅された。アリルピーク高についても、濾紙から抽出された DNA5ng かつ 0.2>DI の時と DNA0.05ng かつ DI 0.7 の時、スライドガラス上の唾液痕から抽出された DNA5ng かつ 0.2>DI の時と DNA0.05ng かつ DI 0.4 の時に mIPEP 処理を行うことで増加した。また、濾紙から抽出された DNA0.05ng かつ DI 0.7 と、スライドガラス上の唾液痕から抽出した DNA0.05ng かつ DI 0.4 を用いて mIPEP 処理を行った結果、D19S433、D3S1358、D8S1179、TH01、vWA、D16S539 のアリルピーク高が増加した。従って、自然環境で変性させた試料においても、UVA 照射によって人工的に変性させた試料と同等の結果が得られることが示唆された。

以上の結果から、STR 解析前に DNA 量や DI 値を求めることで、mIPEP 処理が必要か否かを決定することが可能であり、豊富な DNA の場合は高度に変性した試料で、また微量の DNA の場合は軽度に変性した試料であれば、mIPEP 処理によって STR 解析成功率が高まることを明らかにした。また、本研究で確立した mIPEP 処理条件は紫外線照射下で人工的に変性させた試料だけでなく、自然環境下で変性させた試料においても適用可能であることも示唆した。従って、本研究で決定された条件に基づいて mIPEP を行うことにより、今まで解析困難な試料でも解析可能になることが十分考えられ、今後の法医学における個人識別の解析精度の向上に貢献できるのではないかと期待される。

<引用文献>

- (1) R. Alaeddini, et. al., Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-A review, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) 148–157.
- (2) N. Chatterjee, et. al., Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen.* 58 (2017) 235–263.
- (3) B. Budowle, et. al., Validity of low copy number typing and applications to forensic science, *Croat. Med. J.* 50 (2009) 207–217.
- (4) P. Gill, et. al., An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, *Forensic Sci. Int.* 112 (2000) 17–40.
- (5) G. Sun, R. et. al., Whole genome amplification: relative efficiencies of the current methods, *Leg. Med. Tokyo (Tokyo)* 7 (2005) 279–286.
- (6) R.S. Lasken, et. al., Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 531–535.
- (7) K.N. Ballantyne, et. al., Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples, *Forensic Sci. Int.* 166 (2007) 35–41.
- (8) C.I.P. Lee, et al., An isothermal method for whole genome amplification of fresh and degraded DNA for comparative genomic hybridization, genotyping and mutation detection, *DNA Res.* 13 (2006) 77–88.
- (9) A.L. Barber, et. al., The utility of whole genome amplification for typing compromised forensic samples, *J. Forensic Sci.* 51 (2006) 1344–1349.
- (10) E.K. Hanson, et. al., Whole genome amplification strategy for forensic genetic analysis using single or few cell equivalents of genomic DNA, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 246–257.
- (11) M. Machida, et. al., Investigation of the efficiency of whole genome amplification prior to short tandem repeat analysis using degraded DNA, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series 7* (2019) 587–588.
- (12) M.N. Hochmeister, et. al., PCR analysis from cigaret butts, postage stamps, envelope sealing flaps, and other saliva-stained material, *Methods Mol. Biol.* 98 (1998) 27–32.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 町田光世、木林和彦	4. 巻 28(1)
2. 論文標題 変性試料に対するmIPEP法の有効性の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 51-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuyo Machida, Kazuhiko Kibayashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Effectiveness of whole genome amplification prior to short tandem repeat analysis for degraded DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Genetics	6. 最初と最後の頁 102373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsigen.2020.102373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 町田 光世、木林 和彦	4. 巻 27
2. 論文標題 変性試料に対する全ゲノム増幅法の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 100-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuyo Machida, Kazuhiko Kibayashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Investigation of the efficiency of whole genome amplification prior to short tandem repeat analysis using degraded DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Genetics Supplement Series	6. 最初と最後の頁 587-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsigss.2019.10.100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 町田 光世、多木 崇、木林 和彦	4. 巻 26
2. 論文標題 微量DNAを用いた全ゲノム増幅法の条件検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 86-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 町田光世、木林和彦
2. 発表標題 変性試料に対する全ゲノム増幅 (mIPEP法) の有効性
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 町田光世、木林和彦
2. 発表標題 変性試料に対するmIPEP法の有効性の検討
3. 学会等名 第28回日本DNA多型学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuyo Machida, Kazuhiko Kibayashi
2. 発表標題 Investigation of the efficiency of whole genome amplification prior to short tandem repeat analysis using degraded DNA
3. 学会等名 The 28th Congress of the International Society for Forensic Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田光世、木林和彦
2. 発表標題 変性DNAを用いた全ゲノム増幅法 (mIPEP法) の検討
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuyo Machida, Kazuhiko Kibayashi
2. 発表標題 Evaluation of the Efficacy of Whole Genome Amplification for Degraded DNA
3. 学会等名 71st American Academy of Forensic Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町田 光世、木林 和彦
2. 発表標題 変性DNAに対する全ゲノム増幅法の有効性の検討
3. 学会等名 第87回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 町田 光世、木林 和彦
2. 発表標題 変性試料に対する全ゲノム増幅法の検討
3. 学会等名 第27回日本DNA多型学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------