

令和 4 年 4 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19478

研究課題名(和文) デジタルPCRによるmtDNAのハプログループ分類と混合度の定量評価

研究課題名(英文) Development of mixed sample analysis by digital PCR targeting mtDNA haplogroups

研究代表者

大内 司 (Ohuchi, Tsukasa)

東北大学・医学系研究科・技術一般職員

研究者番号：90712266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2人以上のDNAが混在する混合試料に対する解析手法として、デジタルPCRによるミトコンドリアDNA(mtDNA)のハプログループ分類と混合比解析法の構築を試みた。本システムはハプログループを規定する17箇所の一塩基多型並びに1箇所の欠損箇所を標的とするもので、異なるハプログループに分類された2試料から実験的に作製した混合試料に対して、作製した混合比と同等の値が算出されることが確認された。但し、混合比がどちらかに大きく偏った際に微量成分と非特異的シグナルとの判別が困難であることから、今後は検出限界について検討する必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

混合試料に対する有効な解析手法の確立は、法医実務において解決すべき課題の一つとなっている。実務上、二倍体の核DNAを対象に検査されるが、混合試料の場合、混合比の算出は極めて困難である。本研究で構築したシステムは一倍体のmtDNAをハプログループに応じて検出するため、混合試料中のmtDNAの混合比をダイレクトに算出可能であるという利点を有する。同システムは混合試料に関与する人数を特定することはできないが、ハプログループが異なれば3つ以上のmtDNAを識別できる可能性もある。検出限界の検討に加え、混合の組み合わせについて検討を重ねる必要があるが、同システムは混合試料解析の新手法となり得る。

研究成果の概要(英文)：We have constructed a method for mixture analysis targeting mitochondrial DNA haplogroups using digital PCR. The system utilizes the 17 single nucleotide polymorphisms and one deficient site that define the mtDNA haplogroup. A mixed sample was experimentally prepared using two samples classified into different haplogroups and applied to this system. As a result, the measurements were calculated with a value close to the estimates. However, it was difficult to distinguish between minor components and non-specific signals when the mixing ratio is largely biased to either side. Therefore, it was considered necessary to set the detection limit before implement into forensic practice.

研究分野：法医学

キーワード：混合試料 ミトコンドリアDNA ハプログループ デジタルPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 法医学実務における DNA 型鑑定では、性犯罪被害者の身体から直接採取した試料のように、複数人に由来する DNA が混在した、いわゆる混合試料が鑑定の対象となることがある。一般的に DNA 型鑑定は二倍体の核 DNA を検査対象として行われることが多く、複数人の DNA が混在する場合、結果の解釈が極めて困難になるため、混合試料に対する有効な解析手法の確立が求められている^{1, 2)}。

(2) 複雑な混合試料解析に対する有効な手段の一つとして、一倍体であるミトコンドリア DNA (mtDNA) を標的とすることが挙げられる。mtDNA は特定の位置に生じた一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) や欠損に基づいてハプログループに分類され³⁾、東アジア人は L3 から分岐したいずれかのグループに分類されることが報告されている^{4, 5)}。混合試料に含まれる mtDNA のハプログループを特定し、その混合比率を推定することが可能となれば、混合試料解析に寄与することができると考えられる。

(3) 近年、デジタル PCR の登場により、溶液中に含まれる目的分子の量を詳細に測定することが可能となった⁶⁾。この技術を用いることにより、混合試料であっても mtDNA のハプログループ分類と定量が可能になるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、二人以上の DNA が混在した所謂混合試料の解析を想定し、デジタル PCR を用いて混合試料に含まれる mtDNA のハプログループ分類と混合比率の算出を行うためのシステムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血縁関係のない日本人 (健康な成人) の血液由来の DNA 試料 5 試料を検査試料とした。なお、本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。

(2) 日本人集団の mtDNA ハプログループ頻度⁷⁾に基づき、ハプログループを規定する 17 箇所 (ハプログループ M、M7、M8、M9、M10、G、D*、D4*、D4a、D4b、D4e、D5、N、N9、A、Y、F) 及び 1 箇所の塩基欠損 (ハプログループ B) を選出し、それぞれプライマー及び Locked Nucleic Acid (LNA) プロープ (いずれも Integrated DNA Technologies; IDT) を設計した (図 1)。なお、野生型、変異型のプロープにはそれぞれ HEX、FAM 標識を施した。また、野生型及び変異型のコントロールとして二本鎖 DNA をそれぞれ合成した (IDT)。

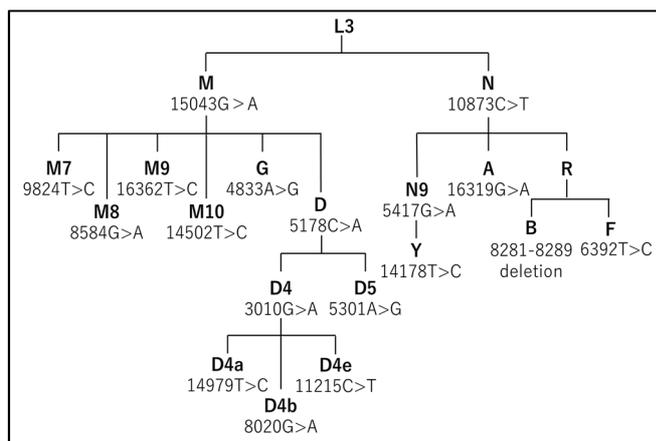


図 1 標的としたハプログループと検査箇所

(3) PCR の反応条件 (アニーリング及び伸張反応の至適温度) を設定するため、野生型及び変異型コントロールを鋳型とし、ddPCR Multiplex Supermix 及び QX200 Droplet Digital PCR システム (Bio-Rad) を使用し、グラジエント PCR を行った。

(4) 反応条件を設定した後、実際のヒト由来の試料を単独試料として適用し、適正に型判定が可能であるか確認した。その後、異なるハプログループに分類された 2 試料を用いて実験的に 1 組の混合試料を作製した (100 : 0、80 : 20、60 : 40、40 : 60、20 : 80、0 : 100)。この混合試料を鋳型とし、混合した 2 試料で異なる型を示す箇所、並びに対象として同じ型を示した箇所を標的としてデジタル PCR を行い、混合比解析を行った。

4. 研究成果

(1) アニーリング及び伸長反応の温度を 50 から 60 に設定したグラジエント PCR により、18 箇所を同条件で検査する場合に至適な温度は 52 であることが示された。

(2) ヒト由来の 5 試料を単独試料として検査した結果、若干の非特異的なシグナルが認められたものの、型判定は可能であることが確認された (図 2)。また、18 箇所から得られた測定値から平均値を算出し、各試料の mtDNA の濃度とした (表 1)。

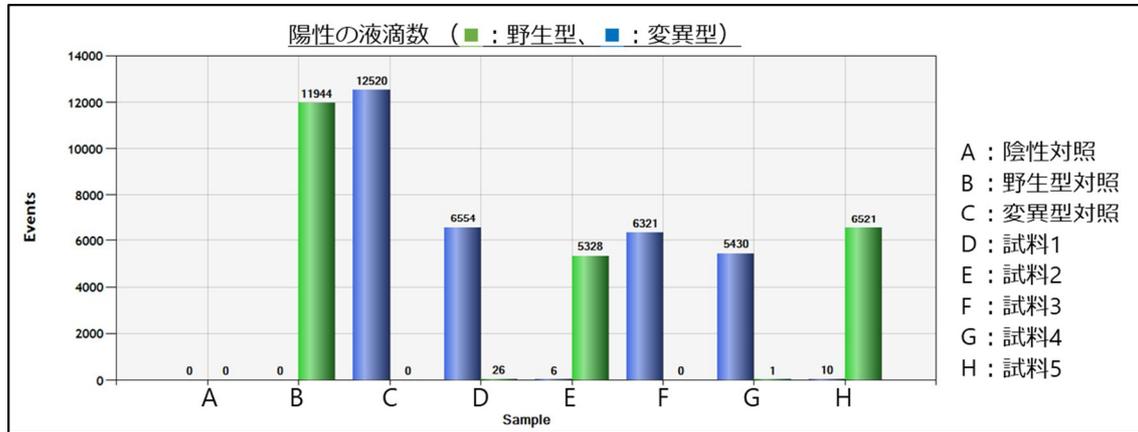


図2 ハプログループ M における検査結果

(3) ハプログループ M7 と Y に分類された 2 試料を用いて混合試料を作製した後、これら試料で異なる型を示す 5 箇所 (M、M7、N、N9、Y) 並びに同じ型を示す 1 箇所 (D*) を加え、計 6 箇所についてデジタル PCR を行った。その結果、作製した混合比と同等の値が算出された (表 2)。但し、非特異的のシグナルが検出されることから、混合比がどちらかに大きく偏った場合に微量成分と非特異的のシグナルとの判別が困難となることが予想された。

表 1 検査試料のハプログループと濃度

試料	ハプログループ	定量値(平均値) copies / μ l
試料1	M7	19,562
試料2	Y	17,064
試料3	A	14,372
試料4	G	11,879
試料5	A	14,977

表 2 混合試料の解析結果

混合試料 試料1 : 試料2	M (15043) A : G	M7 (9824) C : T	N (10873) C : T	N9 (5417) G : A	Y (14178) T : C	D (5178) C : A
100 : 0	99.6 : 0.4	99.9 : 0.1	99.5 : 0.5	100 : 0	99.9 : >0.1	99.9 : >0.1
80 : 20	80.8 : 19.2	82.2 : 17.8	80.3 : 19.7	81.6 : 18.4	82.1 : 17.9	99.9 : >0.1
60 : 40	59.6 : 40.4	60.3 : 39.7	59.2 : 40.8	60.4 : 39.6	60.8 : 39.2	99.9 : >0.1
40 : 60	39.4 : 60.6	38.9 : 61.1	39.4 : 60.6	38.7 : 61.3	40.6 : 59.4	99.9 : >0.1
20 : 80	19.5 : 80.5	19.7 : 80.3	20.2 : 79.8	20.0 : 80.0	21.5 : 78.5	99.9 : >0.1
0 : 100	0.2 : 99.8	0.2 : 99.8	0.2 : 99.8	0.2 : 99.8	1.6 : 98.4	99.9 : >0.1

(4) 本研究で構築したシステムは一倍体の mtDNA をハプログループに応じて検出するため、混合試料中の mtDNA の混合比をダイレクトに算出可能であるという利点が見られた。一方で非特異的なシグナルの影響を排除するために検出限界を設定することが必要であることが指摘された。

同システムは混合試料に関与する人数を特定することはできないが、ハプログループが異なれば 3 つ以上の mtDNA を識別できる可能性もある。検出限界の検討に加え、検査試料の追加と混合の組み合わせについて検討を重ねる必要があるが、同システムは混合試料解析の新手法となり得ると考えられた。

< 引用文献 >

Forensic molecular biomarkers for mixture analysis. Oldoni F, Podini D. Forensic Sci Int Genet. 41 (2019) 107-119.

The advances in DNA mixture interpretation. Yang J, Lin D, Deng C, Li Z, Pu Y, Yu Y, Li K, Li D, Chen P, Chen F. Forensic Sci Int. 301 (2019) 101-106.

Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. van Oven M, Kayser M. Hum Mutat. 30 (2) (2009) E386-94.

A new strategy for the discrimination of mitochondrial DNA haplogroups in Han population. Yang Y, Zhang P, He Q, Zhu Y, Yang X, Lv R, Chen J. J Forensic Sci. 56 (3) (2011) 586-90.

Multiplex APLP System for High-Resolution Haplogrouping of Extremely Degraded East-Asian Mitochondrial DNAs. Kakuda T, Shojo H, Tanaka M, Nambiar P, Minaguchi K, Umetsu K, Adachi N. PLoS One. 11 (6) (2016) e0158463.

Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical

applications. Cao L, Cui X, Hu J, Li Z, Choi JR, Yang Q, Lin M, Ying Hui L, Xu F. *Biosens Bioelectron.* 90 (2017) 459-474.

Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. Tanaka M, Cabrera VM, González AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. *Genome Res.* 14 (10A) (2004) 1832-50.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大内司、Guan Xueting、舟山真人
2. 発表標題 デジタルPCRによるミトコンドリアDNAのハプログループ分類法の構築
3. 学会等名 日本DNA多型学会第29回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内司、Guan Xueting、舟山真人
2. 発表標題 デジタルPCRによるmtDNAハプログループ分類法の混合試料解析への適用
3. 学会等名 日本DNA多型学会第30回学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------