

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592663

研究課題名（和文） 新しい解析技術を応用した歯髄・歯石DNAからの迅速・簡便な遺伝子型判定

研究課題名（英文） Quickness, simple and easy genotyping from pulp・calculus DNA using the new analysis technology

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

研究成果の概要（和文）：ある種の蛍光色素にグアニン塩基が近づくと蛍光度が減少する「蛍光消光現象」を利用し、複数遺伝子の同時検出が可能である QP（Quenching Probe/Primer）法により SNP タイピングを行い、遺伝子型検出による血液遺伝子型判定法について検討した。さらに、ABO 式血液遺伝子型と性別の同時判定、ABO 式血液遺伝子型と Rh-D 遺伝子型の同時判定および RH 式血液遺伝子型の判定を試み、それらの検査法を確立した。

研究成果の概要（英文）：We used "quenching phenomenon" that a fluorescence degree decreased when a QProbe hybridize to a target gene, the fluorescence is quenched via the interaction between the dye and guanine base, and the detection typed SNP by the possible QP(Quenching Probe/Primer) method at the same time of the plural gene and examined the blood genotyping method.

Furthermore, we tried ABO blood group genotyping and sex determination, ABO blood group genotyping and Rh-D and RH-type blood genotyping by multiplex PCR and established those laboratory procedure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：歯科法医学、DNA 多型解析

1. 研究開始当初の背景

法医学分野における特定遺伝子領域の DNA 型判定には、対象とする遺伝子にのみに結合するプライマーを設定して Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により DNA 増幅を行い、スラブゲル電気泳動法やキャピラリー電気泳動法によって行っている。しかし、検査が終了するまでには煩雑な作業と時間を

要し、また複数の反応温度に対応する特殊な装置が必要であった。

近年、蛍光色素で標識されたオリゴ DNA プローブがターゲット DNA のグアニン塩基と特異的に作用しあい、蛍光が消光する現象が新たに発見され（蛍光消光現象）、このような特徴を持つ蛍光色素が複数見つかった。この現象は、増幅終了後に目的遺伝子と蛍光消光プローブ（Quenching Probe：Qprobe）の

結合を、温度上昇によって解離させ、消光していた蛍光機能を復元させることで（温度解離曲線解析）、目的遺伝子の増幅の可否について判定が可能となる。

この原理を利用して迅速・簡便な血液遺伝子型および性別の判定法について検討した。

2. 研究の目的

QP法を用いて、ABO式およびRh式血液遺伝子型判定を遂行するためのプライマーの設計およびPCR条件等について検討し、方法論を確立する。また、アメロゲン領域を指標とした性別判定、さらには性別と血液遺伝子型との同時判定法について検討する。これらのことが可能になれば、高度に腐乱した死体や白骨化した死体の個人識別に迅速に対応できることから、犯罪捜査や識別において非常に有益である。

3. 研究の方法

(1) 検査項目

申請期間中に迅速・簡便なQP法を用いて

- ① ABO式血液遺伝子型判定
- ② アメロゲン領域を指標とした性別判定
- ③ ABO式血液遺伝子型と性別の同時判定
- ④ ABO式血液遺伝子型とRh-D遺伝子の同時判定
- ⑤ RHCE遺伝子由来するRh-C、-c、-Eおよび-e遺伝子型とRh-D遺伝子型検査との同時判定について検討した。

(2) 試料

試料は、当教室に保存された血液型既知の血痕および日本大学医学部法医学教室で解剖時に血清学的に判定された血液から作製された血痕、計23例および室温で5~25年間保存された32歯から、フェノール・クロロホルム法により抽出されたDNAを用いた。

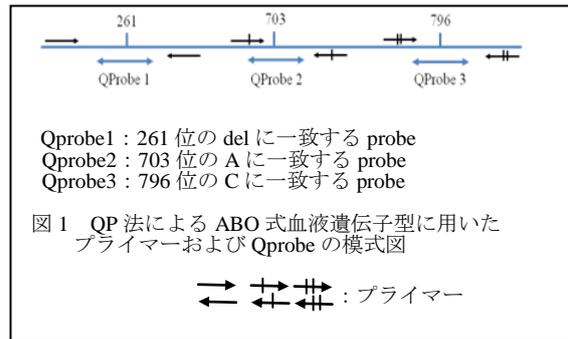
各検査法に用いた鋳型DNA量は15~20ng/ μ lに調整した。ABO式血液遺伝子型の正否については、加水分解型プローブPCR法によるABO式血液遺伝子型判定の結果と比較、検討した。また、RH式遺伝子型については、Tanakaら（Jpn J Leg Med 51, 32-38, 1997）のアリル特異的プライマーを用いて、スラブゲル電気泳動の結果と比較、検討した。

なお、本研究の倫理性の適否については日本大学医学部および同歯学部の倫理委員会にて承認を得た。

(3) 方法

① ABO式血液遺伝子型判定

ABO式血液遺伝子型検査に用いたプライマーとQprobe（蛍光消光probe：日鉄環境エンジニアリング）は、261番塩基の欠失および703番と796番の塩基置換をそれぞれ識別することができ、かつ、3種のSNPを同時にタイピングできるように設計した（図1）。



また、PCR反応溶液の組成を表1に示した。

表1 ABO式血液遺伝子型判定のためのPCR反応溶液の組成

LigtCycler480 Genotyping Master (Roche)	1x
ABO261 Forward primer	0.15 μ M
ABO261 Reverse primer	0.50 μ M
ABO261 Qprobe	0.20 μ M
ABO703 Forward primer	0.15 μ M
ABO703 Reverse primer	0.50 μ M
ABO703 Qprobe	0.20 μ M
ABO796 Forward primer	0.60 μ M
ABO796 Reverse primer	0.18 μ M
ABO796 Qprobe	0.20 μ M
Uracil-DNA-Glycosylase, heat labile	0.01U/ μ l
Reference Dye	0.05 μ M
	18 μ l
DNA Sample	2 μ l
Total	20 μ l

② アメロゲン領域を指標とした性別判定

性別判定のためのX・Y特異的プライマーおよびX・Y特異的Qprobeを作製した。なお、X・Yそれぞれ2種類のQprobeについては同時にタイピングできるように蛍光波長を変えて作製した（図2）。

```

AMELX 301 : aagaatagtg tggtagctt ttateccaga t- -gtt tctcaagtggt tctgatttt
AMELY 262 : aagaatagtg ggtgtagctt tcatcccaa taagtggtt tctcaagtggt tccaatttt
                Yフォワードプライマー
AMELX 355 : acagttccta ccaccagctt cccagtttaa gctctgatgg ttgacctcaa gctgtgtg
AMELY 322 : acagttccta ccatcagctt cccagtttaa gctctgatgg ttgacctCaa gctgtgttg
                YQprobe
AMELX 415 : tccagcagc ctcctgctg gcaactctga ctgactgctt cctctcaaat atggcctgaa
AMELY 382 : ctcagcagc ctcctgctg accattcga ttgactctt cctctcaaat atgctgttaa
                Yリバースプライマー
AMELX 590 : ttaaaactt ttcagctca aaaaactctt gattctaaaga tagtcaact Ctagtgtgt
AMELY 554 : -----
                Xフォワードプライマー XQprobe
AMELX 650 : ctctgtgt cctctgctga aatattagtg actaagtggt ataggagaga ctcgcagaa cage
AMELY 554 : -----
                Xリバースプライマー
  
```

図2 性別判定のためのX・Y特異的プライマーおよびQprobeの設計部位

また、PCR反応溶液の組成を表2に示す。

表 2 性別判定のための PCR 反応溶液の組成

LigtCycler480 Genotyping Master (Roche)	1×
X 特異的 Forward primer	0.30μM
X 特異的 Reverse primer	1.00μM
X 特異的 Qprobe	0.20μM
Y 特異的 Forward primer	0.15μM
Y 特異的 Reverse primer	0.50μM
Y 特異的 Qprobe	0.02μM
Uracil-DNA-Glycosylase, heat labile	0.01U/μl
Reference Dye	0.05 μ M
	18 μ l
DNA Sample	2 μ l
Total	20 μ l

③ ABO 式血液遺伝子型と性別の同時判定

ABO 式血液遺伝子型と性別との同時判定法については、ABO 式血液遺伝子型検査で 261 番塩基の欠失と 796 番塩基の置換を識別するプライマーと Qprobe の作製に加え、性別判定のための X・Y 共通プライマーに X 特異的 Qprobe を設計した (図 3)。なお、3 種類の Qprobe については SNP を同時にタイピングできるように蛍光波長を変えて作製した。

AMELX 181:	ccctgtaaaa gctaccacct catctgggaccctgggta tafcaacttc agctatgagg
AMELY 142:	ccctataaaa gctaccacct catctgggaccctgggta tafcaacttc agctatgagg
	XYフォワードプライマー
AMELX 241:	taattttctcttactaat ttgacacatt gttgctgta acaagccctgggctctgta
AMELY 202:	taattttctcttactaat ttgacacatt gttgctgta gcaagccctgggctctgta
AMELX 301:	aagaatagtg tgggtattct ttaaccagat1-----ggt tctcaagtg tccctgattt
AMELY 262:	aagaatagtg ggtgattct tcaaccagaa taagtggtt tctcaagtg tcccaatttt
	XYQProbe
AMELX 355:	acagttccta ccaccagctt ccagtttaa gctctgatgg ttggctcaa gcoctgtgag
AMELY 322:	acagttccta ccaccagctt ccagtttaa gctctgatgg ttggctcaa gcoctgtgag
	XYリバースプライマー

図 3 ABO 式血液遺伝子型検と性別の同時判定を行うための X・Y 特異的プライマーと Qprobe の設計部位

また、PCR 反応溶液の組成を表 3 に示す。

表 3 ABO 式血液遺伝子型と性別判定の同時判定のための PCR 反応溶液組成

LigtCycler480 Genotyping Master (Roche)	1×
ABO261 Forward primer	0.15 μ M
ABO261 Reverse primer	0.50 μ M
ABO261 Qprobe	0.20 μ M
ABO796 Forward primer	0.20 μ M
ABO796 Reverse primer	0.50 μ M
ABO796 Qprobe	0.0825 μ M
XY Forward primer	0.15 μ M
XY Reverse primer	0.50 μ M
XY Qprobe	0.20 μ M
Uracil-DNA-Glycosylase, heat labile	0.01U/μl
Reference Dye	0.05 μ M
	18 μ l
DNA Sample	2 μ l
Total	20 μ l

④ ABO 式血液遺伝子型と Rh-D 遺伝子型の同時判定

ABO 式血液遺伝子型は、261 番塩基の欠失と 703 番塩基の置換を識別するプライマーと Qprobe を作製したものに、Rh-D 遺伝子型判定のためのプライマーとエクソン 3 に位置する 380 番と 383 番塩基の置換を識別する Qprobe を作製した (図 4)。

NG_003255.2	
AATGAGTGGAGGACATCTCTCTCTCAGTCGTCTGGCTCTCCCTCTCTCCCCAGTAT	
TCGGCTGGCCACCATGAGTCTTTGTTCGGTGTCTGATCTCAGTGGATGCTGCTTGGGGAA	↓標的部
	380 383
RhCE.RhCE	-----A-----C-----
RhCe.Rhce	GGTGCTGATCTCAGTGGATGCTGT
	RhD Qprobe
GGTCAACTGGCGCAGTTGGTGGTGTGGTGGTGGAGGTGACAGC	
	RhD Reverse primer
	NG_003255.2: Homo sapiens Rhesu blood group cluster (RHD/RHCE?) on chromosome 1

図 4 Rh-D 遺伝子型検査のためのプライマーおよび Qprobe の設計部位

また、PCR 反応溶液の組成を表 4 に示す。

表 4 ABO 式血液遺伝子型と性別判定の同時判定のための PCR 反応溶液の組成

LigtCycler480 Genotyping Master (Roche)	1×
ABO261 Forward primer	0.15 μ M
ABO261 Reverse primer	0.50 μ M
ABO261 Qprobe	0.20 μ M
ABO703 Forward primer	0.15 μ M
ABO703 Reverse primer	0.50 μ M
ABO703 Qprobe	0.20 μ M
RhD Forward primer	0.15 μ M
RhD Reverse primer	0.20 μ M
RhD Qprobe	0.10 μ M
Uracil-DNA-Glycosylase, heat labile	0.01U/μl
Reference Dye	0.05 μ M
	18 μ l
DNA Sample	2 μ l
Total	20 μ l

⑤ Rh 式血液遺伝子型判定

RHCE 遺伝子に由来する Rh-C、-c、-E および -e 遺伝子型判定のためのプライマーは Tanaka らに従い、これに新たに Qprobe を作製した。また、Rh-D 遺伝子型判定に用いたプライマーと Qprobe は 4) で作製したものをを用いた。

表 5 Rh 式血液各遺伝子型判定用プライマー

抗原		配列(5'→3')
Rh-C	forward primer *	cgctgctgcccctctg
	revers primer *	ggctctggtcatctatcaag
Rh-c	forward primer *	cttggcctctcaacctgag
	revers primer *	caatcctgctggacggctt
Rh-E	forward primer *	tgcccaagtgtcaactctc
	revers primer *	catgctgatctctctgg
Rh-e	forward primer *	tgcccaagtgtcaactctg
	revers primer *	catgctgatctctctgg
Rh-D	forward primer	tgagagcctcctctctc
	revers primer	accaactgcgccaagt

*: Okudaら(J Chin Invest 100, 373-379, 1997)

表 6 Rh 式血液遺伝子型判定用 Qprobe

種別	配列(5'→3')
Rh-C検出用Qprobe	tggagcagctctcattctctc
Rh-c検出用Qprobe	ctggagcagtggtggcctcaa
Rh-E,-e検出用Qprobe	aatgccgtgttcaacctactatctg
Rh-D検出用Qprobe	ggtgctgatctcagtgatgctgt

RHCE および Rh-D 遺伝子の型判定に共通する PCR 反応溶液の組成は、LightCycler480 Genotyping Master (最終濃度 1× : Roche)、Uracil-DNA-Glycosylase, heat labile (0.01units/μl : Roche)、Reference Dye (0.05 μ M)、Rh-D 型判定用プライマー (forward primer 0.5 μ M、reverse primer 0.15 μ M) および Qprobe (0.2

μ M) である。これらに表 5 および表 6 に示した Rh-Cc、Rh-E および Rh-e 判定用の各プライマーならびに各 Qprobe (最終濃度: 表 7) と DNA 試料 2 μ l を加え、計 20 μ l 系で行った。

表 7 PCR 反応溶液中における Rh-CcEe 遺伝子型判定用のプライマーおよび Qprobe の最終濃度

Rh-C	Forward primer	0.20 μ M
	Reverse primer	0.40 μ M
	Qprobe	0.10 μ M
Rh-c	Forward primer	0.20 μ M
	Reverse primer	0.40 μ M
	Qprobe	0.10 μ M
Rh-E	Forward primer	0.25 μ M
	Reverse primer	0.10 μ M
	Qprobe	0.20 μ M
Rh-e	Forward primer	0.20 μ M
	Reverse primer	0.40 μ M
	Qprobe	0.10 μ M

(4) 各検査による PCR 反応条件

ABO 式血液遺伝子型判定における PCR 反応条件は、95°C・10 分行った後、95°C・10 秒、59°C・20 秒、72°C・10 秒を 50 サイクル行い、性別判定ではアニーリング温度を 59°C・30 秒で行った。ABO 式血液遺伝子型と性別の同時判定ではアニーリング温度を 62°C・20 秒とし 50 サイクル行い、また、RHCE 遺伝子由来する Rh-C、-c、-E および -e 遺伝子型との Rh-D 遺伝子型判定の同時判定では、アニーリング温度を 69°C・20 秒で 40 サイクル行った。

(5) 各遺伝子型判定における解析

各判定の解析は、リアルタイム定量 PCR 解析システム Mx3000P (アジレント) を用い、融解曲線を作成して行った。

4. 研究成果

① ABO 式血液遺伝子型検査

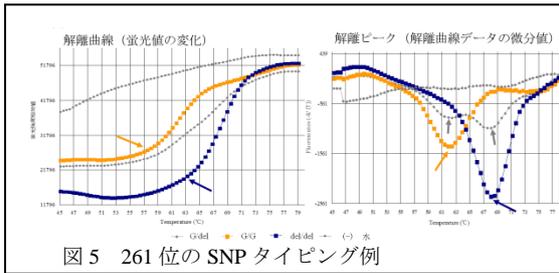


図 5 261 位の SNP タイピング例

図 5 には 261 番塩基の SNP タイピングの一例を示した。図の左側には解離曲線 (蛍光値の変化) を示した。261 番塩基に G/G を有する試料では 57°C 付近から Qprobe が解離して蛍光強度は増加したが (←)、del/del の場合は設計した Qprobe と完全に一致しているために、63°C 付近から蛍光強度は増加した (←)。また、G/del を有する場合は両者の中間に解離曲線 (蛍光強度) は描かれた。一方、図の右側には解離曲線の微分値を示した。ピークの頂点の温度は Qprobe が標的遺伝子から離れる温度を示している。Qprobe と標的遺伝

子の塩基配列が完全に一致すれば高温で解離 (del/del : ←) し、ミスマッチの場合は低温で解離 (G/G : ←) する。また、ヘテロの場合は高温と低温で解離 (G/del) する。従って、この原理を用いることによって一塩基の違いを判別することが可能である。そこで、melting peak と SNP タイピングの関係から表 8 を参考に ABO 式血液遺伝子型を判定した。

表 8 ABO 式血液遺伝子型検査における melting peak と SNP タイピングの関係

標的遺伝子多型	低温ピークのみ		高温ピークのみ		ピーク2本 (低温+高温)	
	Type	Tm (°C)	Type	Tm (°C)	Type	Tm (°C)
261位 G/del	G/G	57-63	del/del	64-69	G/del	57-63, 64-69
703位 G/A	G/G	62-67	A/A	69-75	G/A	62-67, 69-75
796位 C/A	A/A	57-61	C/C	62-67	C/A	57-61, 62-67

今回用いた血痕 23 例を試料として、3 種の SNPs について melting peak の温度を解析し、ABO 式血液遺伝子型について検討したところ、表 9 に示すように、これまで研究代表者ら行ってきたリアルタイム PCR 法による血液遺伝子型検査の成績とすべて一致した。また、研究の方法 (1) 検査項目で示した②~⑤の検査項目について今回用いた試料すべてにおいて判定が可能であった (図 6~8)。

表 9 QP 法による血痕試料 23 例の ABO 式血液遺伝子型判定

標的遺伝子 解離温度	261		703		796		QP 法による 遺伝子型	リアルタイム PCR 法 による遺伝子型	ABO 式 血液型
	低温	高温	低温	高温	低温	高温			
1		○	○				OO 型	OO 型	O 型
2	○	○	○				AO 型	AO 型	A 型
3	○						AA 型	AA 型	A 型
4		○					OO 型	OO 型	O 型
5	○			○		○	AB 型	AB 型	AB 型
6		○					OO 型	OO 型	O 型
7	○	○					AO 型	AO 型	A 型
8		○					OO 型	OO 型	O 型
9	○	○					AO 型	AO 型	A 型
10		○					OO 型	OO 型	O 型
11	○			○		○	AB 型	AB 型	AB 型
12		○					BB 型	BB 型	B 型
13	○						AA 型	AA 型	A 型
14		○					OO 型	OO 型	O 型
15		○					OO 型	OO 型	O 型
16	○	○					AO 型	AO 型	A 型
17	○	○					AO 型	AO 型	A 型
18	○	○					AO 型	AO 型	A 型
19	○	○					AO 型	AO 型	A 型
20	○	○		○		○	BO 型	BO 型	B 型
21	○	○		○		○	BO 型	BO 型	B 型
22	○	○					OO 型	OO 型	O 型
23	○						AB 型	AB 型	AB 型

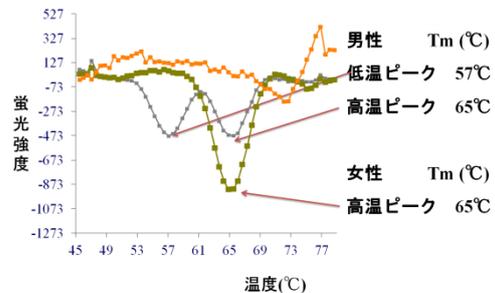


図 6 ABO 式血液遺伝子型と性別の同時判定 - 性別判定 -

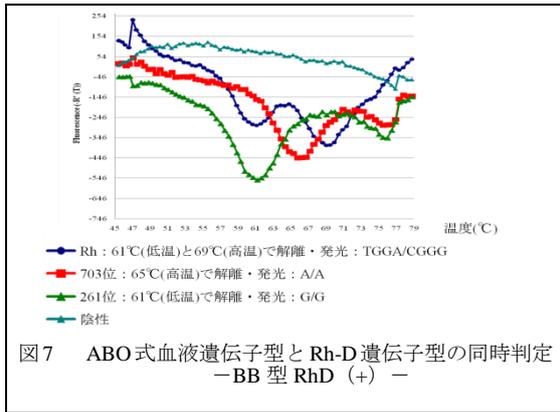


図7 ABO式血液遺伝子型とRh-D遺伝子型の同時判定
 -BB型RhD(+)-

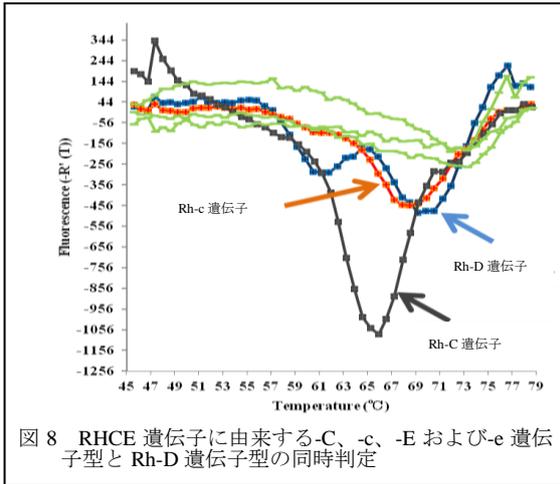


図8 RHCE 遺伝子由来する-C、-c、-E および-e 遺伝子型とRh-D 遺伝子型の同時判定

今回用いた試料について、QP 法による ABO 式血液遺伝子型、性別および RH 遺伝子型の判定は可能であった。従来の TaqMan 方式の ABO 式血液遺伝子型判定では 1 SNP に 2 つの probe の設計が必要であり、なおかつ PCR が 2 回必要なのに対し、今回用いた QP 法は 1 SNP に 1 つの probe の設計でかつ PCR1 回で済む利点がある。また、性別判定では LAMP 法や SMAP 法に比べて PCR においてわずかに多くの反応時間を要するものの、プライマーの数が少なく済み、後二者に認められた非特異的反応が観察されなかったことから判定精度は高いと思われた。これまでに、ABO 式血液遺伝子型と Rh-D 遺伝子型の同時判定法に関する報告は見当たらず、今回同時判定を可能としたことは、有用性は高いと思われる。さらに、本法は「蛍光消光現象」を利用した QP 法により SNP タイピングを行い、ABO 式血液遺伝子型、性別および Rh 遺伝子型の判定を確立したことは、従来法に比べて非常に簡便・迅速であることから、今後、血液遺伝子型を判定する方法として法医学分野のみならず他の領域においても有用性は高いと思われる。

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 3 件)

- ① 堤 博文、伊澤 光、丸山 澄、小室

歳信: Quenching Probe 法による Rh 式遺伝子型検査. DNA 多型 Vol. 20 (日本 DNA 多型学会編). 2012. 印刷中. 東洋書店. (査読有).

- ② 堤 博文、伊澤 光、丸山 澄、小室 歳信、鉄 堅、内ヶ崎西作: Quenching Probe 法による ABO 式血液遺伝子型検査および RhD 遺伝子型検査. DNA 多型 Vol. 19 (日本 DNA 多型学会編). 2011. 東洋書店. 200-204. (査読有)
- ③ 堤 博文、伊澤 光、小室 歳信、鉄 堅、内ヶ崎西作: Quenching Probe 法による ABO 式遺伝子型検査. DNA 多型 Vol. 18 (日本 DNA 多型学会編). 2010. 東洋書店. 219-222. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 堤 博文、Quenching Probe 法による RH 遺伝子検査. DNA 多型学会第 20 回学術集会. 2011.11/30 (はまぎんホールヴィアマーレ. 神奈川県).
- ② 堤 博文、Quenching Probe 法による ABO 式血液遺伝子型検査および性別判定. 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 2011.6/16 (コラッセふくしま. 福島県).
- ③ 堤 博文、Quenching Probe 法による ABO 式遺伝子型検査および RhD 遺伝子検査. DNA 多型学会第 19 回学術集会. 2010.11/18 (三島市民文化会館. 静岡県).
- ④ 堤 博文、Quenching Probe 法による ABO 式遺伝子型検査. DNA 多型学会第 18 回学術集会. 2009.11/20 (筑水会館. 福岡県).
- ⑤ 堤 博文、Quenching Probe 法による歯髄 DNA からの性別判定. 第 32 回日本法医学会学術中部地方集会. 2009.10/23 (富山県民会館. 富山県).

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

小室 歳信 (KOMURO TOSHINOBU)
 日本大学・歯学部・教授
 研究者番号 : 50139200
伊澤 光 (IZAWA HIKARU)
 日本大学・歯学部・助教
 研究者番号 : 30514103
丸山 澄 (MARUYAMA SAYAKA)
 日本大学・歯学部・助教
 研究者番号 : 40059902