

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25年 5月31日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590627

研究課題名（和文）SNP タイピングのための簡便な蛍光 APLP 法による DNA 鑑定法の確立

研究課題名（英文）Establishment of personal identification method using a simple fluorescence APLP method for SNP testing

研究代表者

梅津和夫（UMETSU KAZUO）

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：10091828

研究成果の概要（和文）： 科学捜査における DNA 鑑定は STR (Short Tandem Repeat) が主に利用されている。しかし、この方法は高度に変性した DNA の場合、再現性が悪かった。これに対して SNP (Single Nucleotide Polymorphism) は変性 DNA にも適合可能であるが、判定法はより煩雑という欠点があった。

今回、APLP 法 (Amplified Product-Length Polymorphism analysis) を応用し、多数の SNP の判定を試みた。最初に HapMap のデータベースから 4 集団で高度の多型性を示す 47 個の SNP を選択した。これらを 4 回に分けた PCR と 4 レーンでのポリアクリルアミドゲル電気泳動での簡便な検出法を確立した。

データベースに記されている各集団および日本の集団の遺伝子頻度から個人識別における総合同値確率を求めた。アフリカ、ヨーロッパ、中国、日本のいずれの集団においても 5×10^{-20} 程度の総合同値確率が得られた。今回確立された方法は迅速で安価に行なえるので、今後の活用が期待される。

研究成果の概要（英文）： A total of 47 SNPs reported to be highly polymorphic in European, Chinese, Japanese, African populations (HapMap database) were selected. We developed a reliable, rapid, and economical multiplex amplified product-length polymorphism (APLP) method for analyzing the 47 SNPs. We could safely be genotyping by using four 12-multiplex PCR and subsequent 10% polyacrylamide gel electrophoresis. The amplicons ranged from 40 to 100 bp in length. The mean match probability was about 5×10^{-20} in all populations studied. Our APLP assay is an only two-step process that requires just multiplex amplification reaction and a subsequent run on native polyacrylamide gel electrophoresis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：DNA鑑定、SNP、APLP法、個人識別、総合同値確率

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム配列の完全解読以降、大規模な探索により人類集団における疾患遺伝子の解明も進み、さらに SNP チップの普及により人類集団間における遺伝的多様性も急速に明らかになりつつある。これにたいして、犯罪捜査などにおける個人識別のための DNA 鑑定は、依然として市販の STR キットが使用されている。しかしながら、法医学資料を STR キットによる判定を行なうと、分解の進んだサンプルでは再現性の乏しいデータに時々遭遇する。このような場合には DNA 鑑定を放棄せざるを得ないが、より短い鎖長をターゲットにした SNP による個人識別に変更すればかなり信頼性の高い結果が期待される。現在、SNP の判定法としては DNA チップ、蛍光ビーズ、SNaPshot、TaqMan、DigiTaq、融解曲線分析やインベーター法などの多彩な解析の試薬が発売、あるいは考案されているが、しかし、いずれの方法もコストや利便性の点で大きな問題点があった。そこで従来広く用いられている器機（シーケンサ）を活用でき、ごく微量な分解 DNA にも対応できる SNP による新たに簡便な DNA 鑑定法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

現在、科学捜査における DNA 鑑定は STR (Short Tandem Repeat) が主流である。この方法は高度に変性した白骨などの DNA の場合は時として再現性のある結果が得られないという致命的な欠点があった。これに対して SNP (Single Nucleotide Polymorphism) は変性に対してかなりの抵抗性を示すが、STR 検査に比し個人識別能力は低く、判定法はより

複雑である。いずれにしても DNA 鑑定の主流は STR から SNP に移行するのは必然の流れで、統一された SNP による DNA 鑑定法が早急に確立され、市販キットの発売が望まれる。そこで今回、我々が約 15 前に SNP タイピングのために開発した APLP 法 (Amplified Product-Length Polymorphism analysis) を蛍光対応に改良し、従来ある機器を活用した一度に多数の SNP を判定できるシステムを構築することにより、ごく微量の変性試料からでも正確に DNA 鑑定を行えるようにするのが当初の目標であった。

3. 研究の方法

DNA 鑑定として性別と 47 個の SNP を DNA データベース (HapMap) から選抜した。選抜基準は、(1) すべての民族で高度の多型性を示すこと (2) 互いの連鎖を防ぐために同一染色体の場合は 50 M bp 以上はなれていること (3) トランスバージョン変異であることとし、増幅鎖長は 40-100 bp になるようにプライマーを設計した。試行錯誤を繰り返し、次に示す 47 個の SNP と性別を判定する 4 セット (A/B/C/D) の部位を決定した。

No.	rs 番号	染色体	変異	サイズ
A1	(SRY)	Y	+/-	40
	(AR)	X	-	42
A2	4846620	1	C>G	44/46
A3	12479309	2	C>A	48/48
A4	9289748	3	G>T	52/54
A5	701760	4	G>C	56/56
A6	1061310	5	C>G	60/63
A7	9382515	6	C>A	66/69
A8	6966595	7	A>C	72/75

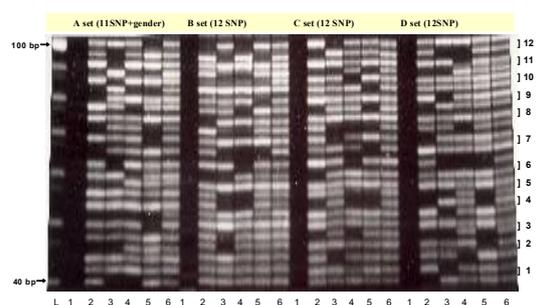
A9	10866988	8	C>G	78/81
A10	12551452	9	C>G	84/87
A11	2503086	10	G>C	90/93
A12	6483898	11	G>C	96/100
B1	682833	11	A>C	40/42
B2	2070759	12	C>A	44/46
B3	3864997	13	G>T	48/48
B4	4983332	14	G>C	52/54
B5	7164801	15	G>T	56/56
B6	4780335	16	G>C	60/63
B7	4790307	17	C>G	66/69
B8	526989	18	C>A	72/75
B9	3760629	19	A>C	78/81
B10	445251	20	C>G	84/87
B11	10470220	21	G>T	90/93
B12	5754463	22	C>A	96/100
C1	2117159	1	G>C	40/42
C2	2788749	1	C>G	44/46
C3	1415960	1	A>C	48/48
C4	593668	2	A>T	52/54
C5	6709313	2	T>G	56/56
C6	1995402	3	A>C	60/63
C7	583509	3	A>T	66/69
C8	13145414	4	C>A	72/75
C9	2167373	4	T>G	78/81
C10	418364	5	C>G	84/87
C11	417852	5	C>G	90/93
C12	506430	6	A>C	96/100
D1	397638	6	G>C	40/42
D2	10247632	7	G>C	44/46
D3	1485310	8	T>A	48/48
D4	2809402	9	C>G	52/54
D5	4423117	10	T>A	56/56
D6	10846014	12	G>T	60/63
D7	9507577	13	G>T	66/69
D8	12431440	14	G>C	72/75
D9	8039459	15	G>C	78/81
D10	13380666	16	C>G	84/87

D11	9889546	17	G>C	90/93
D12	8098016	18	G>C	96/100

今回用いた APLP 法に適するプライマーはプライマーダイマーなどを作りにくい配列を選んだ。最初に蛍光プライマー法を検討したが、上記のプライマーを一本のチューブで増幅するとプライマーダイマーの反応と思われる多数のバンドが出現した。特に鎖長を短くしたことにより、余分な低鎖長のバンドをゼロに抑えることはできなかったため、蛍光色素の使用を断念した。それで原法に準じた4回のPCRと4レーンの10%ポリアクリルアミドゲルを用いた判定法に切り替えた。

4. 研究成果

われわれの開発した APLP 法(Amplified Product-Length Polymorphism analysis)を応用し、多数の SNP の同時判定を試みた。最初に HapMap のデータベースから高度の多型性を示す 47 個の SNP と性別を加えた 48 個の遺伝形質は予備実験を通して選択した。これらを4回に分けた PCR と4レーンでの10%クリルアミドゲル電気泳動での簡便な検出法を確立した。下図に5名分の明瞭なバンドパターンを示した。



データベースに記されている各集団および今回分析したの日本の集団の遺伝子頻度から個人識別における総同値確率を求めたところ、アフリカ、ヨーロッパ、中国、日本のいずれの集団においても10のマイナス

20 乗レベルの個人識別には充分すぎる値が得られた。

理論的には、今回用いた 145 個のプライマーをワンチューブにいれて、共通プライマーに 4 色の蛍光プライマーをラベルすれば、一度の PCR と一度のシーケンサによる自動判定が可能となることが予想されたが、プライマー間での非特異的なバンドの出現などの問題点が生じ、この方法の適用は断念した。しかし、従来の安価な機器で行なえる本システムは試薬代も蛍光プライマー法の一割程度であるので、非常に安価で簡便な方法として今後の活用が期待される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 梅津和夫ら Semi-nested multiplex APLP 法を用いた個人識別 日本法医学会 2012 年 6 月 8 日 アクトシティ浜松 浜松市
- ② 梅津和夫ら マルチプレックス APLP 法を用いた個人識別用キットの作製 日本法医学会 2011 年 6 月 17 日 コラッセふくしま 福島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 和夫 (UMETSU KAZUO)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号：10091828

(2) 研究分担者

湯浅 勲 (YUASA ISAO)
鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：00093633

(3) 連携研究者

渡辺 剛太郎 (WATANABE GOTARO)

山形県警本部・専門研究員

研究者番号：なし