

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460868

研究課題名(和文) HRM解析による法医学に有用なSNPマルチゲノタイピング法の確立

研究課題名(英文) Application of HRM analysis to multiplex genotyping of useful SNPs for forensic investigations

研究代表者

中川 真由美 (NAKAGAWA, MAYUMI)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：00243410

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)：本研究は、法医学に有用なSNPの解析にHRM(High Resolution Melting)法を適用し、正確で簡便・迅速なゲノタイピング法を作ることとを目的とした。その結果、血小板血栓形成を制御するADAMTS13の遺伝子に存在するc.C1423T変異をHRM法で解析することが可能となった。また、ABO血液型遺伝子のc.G261delとc.G803Cについて同時にタイピングできるシステムを作った。これにより、ABO遺伝子型を一度の解析で同定することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to application of HRM analysis to genotyping of useful SNP for forensic investigations. We developed the procedure to determining the genotypes of c.C1423T of the ADAMTS13 gene by HRM analysis. And we have established a multiplex genotyping method for c.G261del and c.G803C of the ABO gene in a single reaction. The HRM analysis to genotyping of useful SNP for forensic investigations is an accurate and conventional method.

研究分野：DNA多型医学

キーワード：HRM解析 SNP マルチプレックス解析

1. 研究開始当初の背景

法医学分野の科学捜査における DNA 鑑定は STR (Short Tandem Repeat) が主流であるが、高度に変性・分解した DNA の場合は再現性のある結果が得られないという欠点を有する。これに対して一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) は、STR 検査に比し個々の個人識別能力は低いが、ゲノム上に最も多く存在する多型で変性に対しかなりの抵抗性を示し、法医学的試料の解析に適している。2011 年の東日本大震災をはじめ、今後地震や異常気象による災害の増加も懸念され、不幸にも多くの犠牲者が出る可能性もあり、多数のそれも変性した微量の試料を迅速に鑑定できる SNP をマルチプレックスに検査できる方法を確立しようと考えた。

2. 研究の目的

従来 SNP 解析には、PCR-RFLP 分析、PCR-SSCP 分析、APLP 分析などが用いられてきたが、PCR 後の解析に時間を要し、またサンプルの移し替えなどによるコンタミネーションの可能性が否めなかった。近年はプローブ法を原理としてリアルタイム PCR により解析されることが多いが、一部の SNP でタイピングが困難であるという短所がある。そこで、SNP をより迅速・簡便かつ正確に解析できる新しいシステムを確立することを目指した。

HRM (High Resolution Melting) 解析は、飽和型 DNA 結合色素を含む反応液で高解像度の融解曲線分析を行うシステムであり、解析にはリアルタイム PCR 装置を用いる。従来の融解曲線分析には検出に不飽和型色素が用いられていたが、HRM 解析は二本鎖 DNA に均一に飽和して含まれる飽和型色素を用いることにより、わずかな T_m 値の違いを認識することが可能となった。また、試薬として飽和型 DNA 結合色素と解析部位を増幅する非標識のプライマーを準備するだけで分析を行うことができるため、準備も容易で安価に行うことが可能である。以上より、本研究では、HRM 解析による SNP のマルチゲノタイピング法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究の実施については、鳥取大学倫理委員会の承認を得ている。

(1) 試料 DNA

日本人 120 名の血液から DNA を抽出し、解析に用いた。また、ADAMTS13 遺伝子 c.C1423T の集団解析には日本人 (鳥取) 103 名、中国のエベンキ 114 名およびオロチョン 81 名の計 298 名の DNA 試料を準備し解析に用いた。

(2) ADAMTS13 遺伝子 c.C1423T の HRM 解析

プライマーの作製

変異部を含む 95bp の領域を増幅するプ

ライマーを作製した。

HRM 解析

HRM 試薬として LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche) を用い、解析は LightCycler® 96 (Roche) で行った。

塩基配列の確認

RsaI を用いた制限酵素断片長多型 (RFLP)¹⁾ とダイレクトシーケンシングによる。

(3) ABO 遺伝子の HRM 解析

プライマー作製

ABO 遺伝子については c.G261del と c.G803C の 2 部位について解析を行った。c.G261del 解析用には、変異部を含む 47bp の領域を増幅するプライマーを作製した。また、c.G803C 解析用には、77bp の増幅産物が得られるプライマーを作製した。これら 2 箇所の多型部位をマルチプレックス解析できれば、その結果から ABO 血液型の遺伝子型が直ちに決定できる。そのためには、2 部位の融解曲線が重ならないようそれぞれの T_m 値を離さなければならぬ。そこで、c.G803C 解析の増幅産物の T_m 値を c.G261del 解析のそれより高くするため c.G803C 解析用プライマーの 5' 末端に付加配列をつけて作製した²⁾。

HRM 解析

解析試薬と機器は ADAMTS13 遺伝子 c.C1423T の解析と同じである。

ABO 遺伝子型の確認

Watanabe らの法³⁾により APLP 法で行った。

4. 研究成果

HRM 解析では、SNP 解析を行う際、変異部位を含む領域を PCR 増幅し増幅産物の HRM 解析を行う方法と、PCR 用のプライマーに加えて変異部位にハイブリダイズする非標識プライマーを 1 種加え、プローブと PCR 産物の融解曲線分析を行う方法がある。前者は増幅産物中の 1 塩基の違いによる T_m 値の変化を検出するため、増幅産物が長くなるほど識別能が低くなると考えられる。一方、後者の解析対象はプローブと PCR 産物のハイブリダイズした領域で長さが短い一塩基の違いを識別する能力が高いと思われるが、プローブを準備する必要がある。

プローブを用いない方法でも、野生型・変異型両アレルの増幅産物の T_m 値が異なるように増幅できればより明確に識別できると考えた。APLP 法は、アレル特異的に増幅し、増幅産物の長さの違いでタイピングする方法である。APLP 法をもとにプライマーを作製すれば、長さも 5' 末端の配列も違う PCR 産物が得られる。その結果 T_m 値に差が生じ、両アレルのホモ型とヘテロ型の計 3 種類の融解曲線が明確に識別できるようになると考えた。しかし結果は、アレル特異的プライマーを用いてもわずかに非特異的産物が生じていて、期待した 3 種類以上に融解曲線が現れ解析ができなかった。この原因としては、

使用プライマーのアリル特異性の低さも考えられるが、通常の電気泳動では検出されない微量の非特異的増幅産物が APLP では産生されており、高感度の HRM 解析では解析を妨げたとも考えられた。以上の結果から、APLP 法を応用し各アリルの増幅産物の長さを変えて HRM 解析の識別能を上げることは困難であると考えた。プローブを用いる方法は、準備も必要でありコストもかかることから、プローブを用いず両アリルに共通な非標識のプライマーのみを用いた HRM 解析法で法医学に有用な SNP の解析ができるようシステムを考えられた。

(1) ADAMTS13 遺伝子 c.C1423T 解析

プローブは用いず、変異部を含む 95bp の領域を増幅する非標識のプライマー 1 対のみを用い PCR 増幅後、HRM 解析を行った。その結果 3 つのパターンに分かれ RFLP やダイレクトシーケンシングの結果から C/C 型、C/T 型、T/T 型と同定された (図 1)。

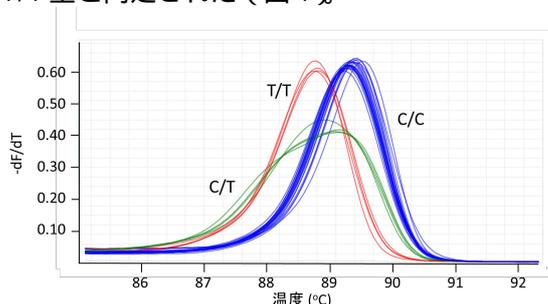


図1. HRM法によるADAMTS13遺伝子c.C1423T解析結果

鳥取、オロチョン、エベンキの3つの集団について c.C1423T を解析し分布頻度を調査した。多検体の解析も簡便・迅速に行うことができた。

(2) ABO 遺伝子の解析

A, B, O 型遺伝子を決定する c.G261del と c.G803C について、HRM 解析のシステムを確立した。

c.G261del について

ABO 遺伝子の 261 番の塩基は、A、B 型遺伝子では G で O 型遺伝子では欠失している。プローブは用いず、この変異を含む 47bp の領域を増幅する非標識プライマーを作製し、PCR 増幅と HRM 解析を行った。その結果、G/G 型、G/del 型、del/del 型が明確に区別できた。

c.G803C 解析について

ABO 遺伝子の 803 番の塩基は、A 型および O 型遺伝子では G で、B 型遺伝子では C である。この変異についても、非標識プライマーのみを用いて 77bp の PCR 産物を HRM 解析した。その結果、G/G 型、G/C 型、C/C 型が明確に区別された。

c.G261del と c.G803C のマルチプレックス解析について

2 箇所の塩基置換部位について同一チューブ内で PCR 増幅し、HRM 解析を行った。c.G261del と c.G803C の融解曲線は Tm 値が離れて重ならないことからそれぞれの野生ホモ型、ヘテロ型、変異ホモ型が明確に区別できた。この方法により 2 部位を同時にゲノタイピングすることが可能となり、迅速・簡便にタイピングすることが可能となった (図 2)。

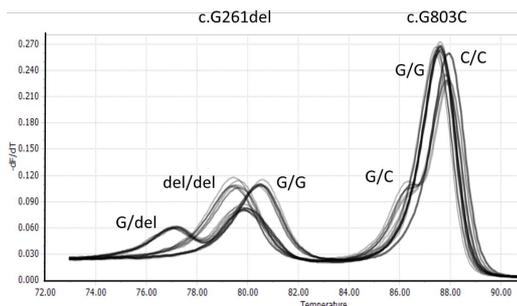


図2.HRM法によるABO血液型遺伝子c.G261delとc.G803Cのマルチゲノタイピング解析結果

<参考文献>

1) Jang MJ, Kim NK, Chong SY, et al: Frequency of Pro475Ser polymorphism of ADAMTS13 gene and its association with ADAMTS-13 activity in the Korean population. Yonsei Med J 49: 405-408, 2008.

2) Michel T. Seipp, David Pattison, Jacob D. Durtschi et al. Quadruplex genotyping of F5, F2, and MTHFR variants in a single closed tube by high-resolution amplicon melting. Clinical Chemistry 54: 1: 108-115, 2008.

3) Watanabe G, Umetsu K, Osawa M. Application of the PCR-APLP method to determine ABO genotypes in forensic samples. Nihon Hoigaku Zasshi. Aug; 54(2): 219-26, 2000.

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)

中川 真由美、湯浅 勲、High Resolution Melting (HRM) 法による ADAMTS13 遺伝子 c.C1423T(p.P475S) 多型の解析、DNA 多型、査読無、24 巻、2016 (掲載予定)

〔学会発表〕(計 1 件)

中川 真由美、High Resolution Melting (HRM) 法による ADAMTS13 遺伝子 c.C1423T(p.P475S) 多型の解析、日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会、2015 年 11 月 19 日、岡山大学創立五十周年記念館 (岡山県・岡山市)

〔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

中川 真由美 (NAKAGAWA, Mayumi)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：00243410

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

湯浅 勲 (YUASA, Isao)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：00093633