

令和元年5月23日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08060

研究課題名(和文) LC/高分解能MSによるアンプリコン分析法の開発と有毒生物の種判別への応用

研究課題名(英文) Genotyping of Toxic Animals and Plants by Liquid Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry

研究代表者

宮口 一 (Miyaguchi, Hajime)

科学警察研究所・法科学第三部・室長

研究者番号：10370884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：有毒生物が関係する事件や事故が発生した場合の鑑定や検査に応用するため、一般に低分子分析に用いられる市販の液体クロマトグラフ-高分解能質量分析装置を用いて100 base程度までの長さのDNAアンプリコンを分離・検出し、そのモノアイソトピック質量を高精度に測定する方法を開発し、代表的な有毒生物であるフグおよびドクゼリの種判別に応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有毒生物が関係する事件や事故が発生した場合の鑑定や検査においては、自然毒そのものやその代謝物をターゲットとした化学分析が主として行われる一方、原因生物の種判別についてはあまり行われてこなかった。本法によって、形態学の専門知識やDNAシーケンサーなどの装置がなくても迅速かつ正確な種判別が可能となり、より証拠価値の高い鑑定・検査の実施が可能となった。

研究成果の概要(英文)：For rapid and accurate genotyping for forensic purpose, we developed a method for determining the monoisotopic mass of a PCR product by LC/HRMS using a commercially-available reverse-phase silica monolith column and a high resolution mass spectrometer. The approach developed has been applied for the differentiation of toxic pufferfish species based on the use of the PCR-RFLP method, which is the first example for species differentiation of animals using MS. A major poisonous plant (*Cicuta virosa*) and the similar edible one (*Oenanthe javanica*) were also genotyped successfully.

研究分野：法中毒学

キーワード：生物種判別 高分解能質量分析 モノアイソトピック質量 フグ ドクゼリ モノリスカラム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

自然毒が殺人や傷害に使用された場合はもちろんのこと、毎年多数発生している自然毒による食中毒事案においても、採取した毒草を知人に譲り渡すなどして第三者に危害が及んだ場合には、科学捜査研究所などにおいて、犯罪の立件を前提とした鑑定が行われることとなる。また、自殺に用いられた場合においても、警察や大学の法医学教室において死因究明のための検査が行われる。

これら鑑定・検査においては、まず自然毒そのものやその代謝物をターゲットとして、主に液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) による化学分析が行われる。一方、原因生物の生物種判別については、専門家に鑑別を依頼する必要がある上、鑑定に供される試料は調理や加工によって形態からの識別が困難であることが多いため、従来実施されることは少なかった。ところが、DNA バーコーディング法の普及によって、形態学の専門知識がなくても微量の組織片から種判別の実施が可能となったことで、今後は有毒生物が関係する事件の捜査や公判維持において、生物種判別が客観証拠の重要な一角を占めるようになって考えられる。

2. 研究の目的

エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) による DNA 多型解析は、ゲル電気泳動やリアルタイム PCR 法など、分子生物学において一般的に用いられる配列非特異的な DNA 結合色素を用いた検出法より選択性が高く、サンガー法による塩基配列解析より迅速であることが期待される。さらに、分離手段と組み合わせた LC/ESI-MS に発展させることで、精製や脱塩などの煩雑な前処理が不要となり、鎖長を反映した保持時間の情報も得られるようになる。そこで我々は、法科学分析において必要不可欠な正確性と迅速性を共に兼ね備えた種判別法を実現するため、高分解能質量分析装置 (HRMS) を利用した迅速かつ高精度なアンプリコン分析法の開発を目的として研究を開始した。分析のターゲットとしては、種ごとに可食部位が異なるために種判別の必要性が高く、これまでに重過失による事故や殺人事件に関係しているフグと、食用に供される代表的な野草であるセリとの誤食事故が多く発生している有毒のドクゼリを選定した。

3. 研究の方法

【フグ】魚試料（ひれ、筋肉、肝臓など）から市販のキットにより DNA を抽出し、新たに開発したミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子特異的プライマーによる PCR を行った。得られたアンプリコン (86~115 bp) を制限酵素 (Dra I, Msp I) で切断し、得られたオリゴヌクレオチド (26~79 mer) を LC/MS により分析した。各ピークのマススペクトルをデコンボリューション解析して得られたモノアイソトピック質量（主同位体のみからなる精密質量）を塩基組成から得られる理論値と比較し、フグ種を判別した。

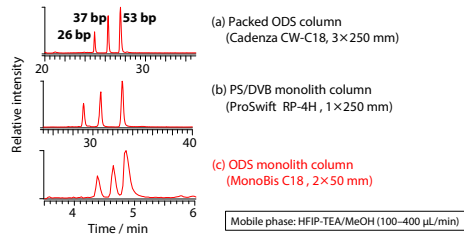
【ドクゼリ】植物組織（約 50-100 mg）から市販のキットにより DNA を抽出し、新たに開発したセリ/ドクゼリ特異的プライマーを用いた PCR により、葉緑体 *trnL* intron P8 loop (61 bp) を増幅し、LC/MS により分析した。フグと同様にデコンボリューション解析を行い、得られたモノアイソトピック質量からセリ及びドクゼリの識別を行った。

【分析条件（共通）】MS 装置：Q Exactive (Thermo Fisher)、分解能：140,000、分析カラム：MonoBis C18 (京都モノテック 2.0×50 mm)、カラム温度：20℃、移動相：400 mM HFIP-TEA (pH 7.9)-MeOH (0.4 mL/min)、イオン化法：加熱 ESI-、注入量：1 µL、分析サイクル：8 min、デコンボリューション解析ソフト：Protein Deconvolution 3.0 (サーモフィッシャー)

4. 研究成果

【LC/ESI-MS によるアンプリコン分析】LC/ESI-MS を用いた従来の DNA アンプリコン分析法は、自作のキャピラリーカラムを分離カラムに用いたナノ LC が一般的であり、煩雑かつ数居が高いものであった。そこで本研究では、一般的な低分子用の LC/MS 装置を用いた分析法の開発を試みた。カラム等の分離条件を検討した結果、市販の疎水性シリカモノリスカラム（京都モノテック製 MonoBis C18）を低温（20℃）かつ高流量（0.4 mL/min）で用いることで、DNA 二重鎖のまま、鎖長に応じた分離が 8~9 分の分析サイクルで可能であった（図 1）。また、加熱 ESI のインターフェース部では、移動相に高濃度（400 mM）添加したヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）が加熱により急速に気化することで移動相の pH が急激に上昇して DNA のリン酸基がアニオン化し、加熱そのものの効果と相まって DNA が一本鎖の多価イオンとしてアナライザーに導入されることが明らかとなった（図 2）。

Evaluation of commercially-available semi-micro columns



Taking rapid analysis rather than separation power into consideration, the ODS monolith column was chosen for our purposes.

図1 分離条件の検討

HFIP-Mediated Heated Electrospray Ionization of DNA

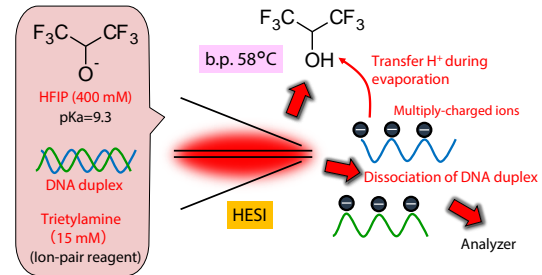


図2 加熱ESIによるDNAのイオン化

【モノアイソトピック質量の測定】生体高分子をESIでイオン化した場合、さまざまな価数を有する多価イオンが生成する。さらにHRMSにおいては、個々の多価イオンピークが異なる同位体組成を持つ多数のピークに分離して検出される(図3)。質量分析において、これらのピークから質量を導出するための計算操作をデコンボリューションと呼ぶ。また、生体高分子の質量分析で取り扱う物質として、平均分子量とモノアイソトピック質量の2種類がある。平均分子量は安定同位体の存在比によって変動し、セントロイド処理を行った場合は実際の平均分子量から負にシフトするという問題点を有する一方、モノアイソトピック質量(構成する各元素の主同位体のみからなる同位体の精密質量)は安定同位体の存在比に実用上影響されないことから、文献値と高精度に比較することが可能である。生体高分子においては、モノアイソトピック分子より質量が大きい同位体の存在比が圧倒的に大きくなるため、モノアイソトピックピークが他の同位体ピークに埋もれて検出不可能となる。そうしたマススペクトルからモノアイソトピック質量を導出するため、本研究では、核酸をモデルとした同位体パターンを利用したフィッティングを行い、従来の研究で利用されていた平均分子量に代えて、モノアイソトピック質量を導出した(図3)。それにより、例えばトラフグ由来アンプリコン(15296.75 Da)とショウサイフグ由来アンプリコン(15295.75 Da)のわずかな違いを明確に識別することが可能となった。また、多価イオンピークや同位体ピークなど多数のピークを計算に利用することで、きわめて正確な値を得ることが可能であった(例: 26 mer DNAの質量誤差 0.73 ± 0.43 ppm, $n = 30$)。

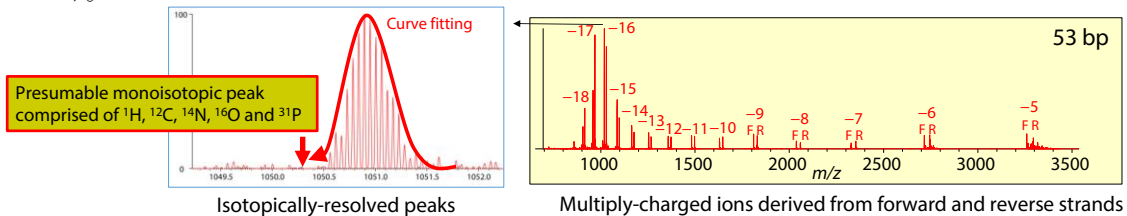


図3 高分解能マススペクトルからのモノアイソトピック質量の導出

【フグ種判別への応用】合成DNAをテンプレートとしたコントロール実験の結果、厚労省通知法が対象とする各フグ種から得られたDNAフラグメントについて、理論値ときわめてよく一致した。実際のフグ29試料および他の魚種10試料について同様に分析した結果、フグでは通知法による判別結果と一致し、他の魚種ではフグに該当するピークが観測されなかった。

【セリとドクゼリの識別】葉緑体 *trnL* intron P8 loop において、種間のSNPを含む対象種特有の配列を見いだしたため、当該座位を増幅するプライマーを設計した(図4)。プライマーの特異性を評価するため、セリとドクゼリ以外の50種以上の植物についてPCRを行った結果、セリ科のオオバセンキュウについては、今回利用した *Pfu* DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によってミスマッチが解消されて増幅が起こることが確認されたが(図5)、他の植物では増幅が起こらなかった。また、LC/MSによるモノアイソトピック質量測定の結果、サンガー法で決定した塩基組成から得られた理論値と1 ppm以内の真度及び精度で一致した。野生及び市販の対象種を収集して本法で種判別を行った結果、外観などの特徴やDNA barcoding法による判別結果とすべて一致し、オオバセンキュウについても識別可能であった。

Target Locus and Primer Design

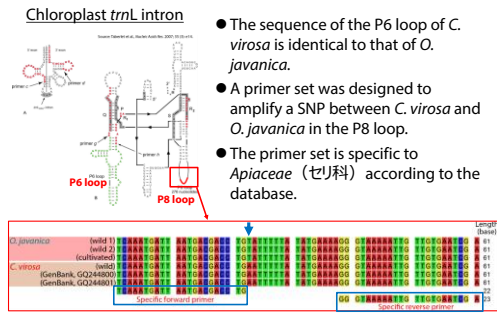


図4 セリノドクゼリ解析マーカーの選定

Result

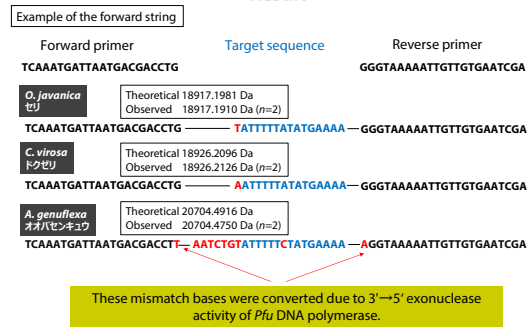


図5 観測されたアンプリコン

【モノアイソトピック質量から塩基組成を求めるソフトウェアの作成】これまで行ってきた、モノアイソトピック質量に基づく LC/HRMS による種判別においては、アンプリコンの塩基組成からモノアイソトピック質量の理論値を計算し、得られた測定値との比較を行ってきたが、モノアイソトピック質量から該当する塩基組成を求めることはできなかった。これが可能となれば、配列未知のアンプリコンの塩基組成を明らかにできるため、本法の応用範囲が向上すると考えた。ところが、塩基組成は整数値の組み合わせであり、これを計算によって求めるためには整数計画問題を解決する高度な技術と計算リソースが必要であると考えられた（整数計画問題）。

そこで、120 base までの全ての塩基の組み合わせをデータベース化し、モノアイソトピック質量の測定値と許容誤差を入力すると該当する塩基組成を出力する Microsoft Access ベースのソフトウェア「mass2basecomp」を作成した（図6）。これにより、未知のアンプリコンについても塩基組成候補の提示が可能となったことで、本法の応用範囲が広がると期待される。一方、許容誤差 1 ppm で検索した場合でも、入力値によっては多数の候補がヒットし、本法によってアンプリコンの塩基組成を一義的に決定するのは期待に反して困難であることが明らかとなった。

Monoisotopic mass (ppm)	Base composition				Length (base)	Trueness (ppm)
	A	T	G	C		
18926.19767	17	6	7	33	63	0.98
18926.20125	20	11	25	4	60	0.79
18926.20139	23	21	5	13	62	0.78
18926.20591	18	5	14	25	62	0.54
18926.20962	24	20	12	5	61	0.35
18926.21414	19	4	21	17	61	0.11
18926.21428	22	14	1	26	63	0.10
18926.22237	20	3	28	9	60	-0.33
18926.22251	23	13	8	18	62	-0.33
18926.23060	21	2	35	1	59	-0.76
18926.23074	24	12	15	10	61	-0.77

図6 開発した「mass2basecomp」

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

① H. Miyaguchi, T. Yamamuro, H. Ohta, H. Nakahara, S. Suzuki
Genotyping of toxic pufferfish based on specific PCR-RFLP products as determined by liquid chromatography/quadrupole-Orbitrap hybrid mass spectrometry
J. Agric. Food Chem. 63(42) 9363–9371 (2015)

② H. Miyaguchi
Improved Polymerase Chain Reaction-restriction Fragment Length Polymorphism Genotyping of Toxic Pufferfish by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
J. Vis. Exp. (115) e54402 (2016)

③ T. Minatani, H. Ohta, E. Sakai, T. Tanaka, K. Goto, D. Watanabe, H. Miyaguchi
Analysis of toxic Veratrum alkaloids in plant samples from an accidental poisoning case
Forensic Toxicol. 36 (1), 200–210 (2018)

〔学会発表〕（計6件）

① 液体クロマトグラフィー／高分解能質量分析による PCR-RFLP 法の開発とフグ種判別への応用 宮口 一、山室匡史、太田彦人、中原弘明、鈴木真一 日本 DNA 多型学会第 24 回学術

集会 (2015)

② 液体クロマトグラフィー／質量分析によるオリゴヌクレオチドの迅速分析法の開発と生物種判別への応用 宮口 一、山室匡史、太田彦人、中原弘明、鈴木真一 第 14 回表示・起源分析技術研究懇談会講演会 (2016)

③ Genotyping of poisonous pufferfish by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, H. Miyaguchi, T. Yamamuro, H. Ohta, H. Nakahara, S. Suzuki, 54th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (2016)

④ Rapid genotyping of *Oenanthe javanica* and *Cicuta virosa* by polymerase chain reaction followed by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry, H. Miyaguchi, T. Yamamuro, D. Watanabe, H. Ohta, 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (2017)

⑤ LC/MS を用いた塩基組成解析によるセリとドクゼリの種判別 宮口 一、山室匡史、渡邊大助、太田彦人 日本法科学技術学会第 23 回学術集会 (2017)

⑥ LC/MS によるアンプリコン分析とフグなどの有毒生物種判別への応用 宮口 一 第 66 回質量分析総合討論会 (2018)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：太田 彦人

ローマ字氏名：(OHTA, Hikoto)

所属研究機関名：科学警察研究所

部局名：法科学第三部

職名：室長

研究者番号 (8 桁)：40392261

(2)研究協力者

なし。

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。