

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19301

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを利用した混合試料におけるミトコンドリアDNA分析

研究課題名(英文) Mitochondrial DNA typing in mixtures using next generation sequencing system

研究代表者

落合 恵理子(OCHIAI, Eriko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60760270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：複数人分のDNAが混入している「混合試料」の分析は、法医学領域における重要な課題のひとつであるが、各個人のDNA型を分離する技術的な方法は未だ確立されていない。そこで、次世代シーケンサー(NGS)を用いたミトコンドリア(mt)DNA解析を行い、1分子毎のDNA鎖(リード)の塩基配列の違いを比較することで複数人のDNA型の分離を試みた。増幅産物を350 bp程度にしてNGS解析したところ、HV1、HV2ともに増幅領域全体を1本のリードで検出することができた。得られたリード上には複数の塩基多型が確認され、その組み合わせからは異なるmtDNA型のパターンが区別でき、2名分のDNA型と判断できた。

研究成果の概要(英文)：Analysis of "DNA mixtures" in which DNAs of more than one person are mixed is one of important issues in forensic field, but no technical method for separating DNA types of individuals has been established yet. Therefore, mitochondrial (mt) DNA analysis using the next generation sequencer (NGS) was performed, and attempts were made to separate multiple DNA types by comparing differences in base sequence of DNA chain (read) for each molecule. When NGS analysis was performed with the amplification product of about 350 bp, the entire amplification region of both HV1 and HV2 could be detected with one read. A plurality of nucleotide polymorphisms was confirmed on the obtained read, and it was possible to distinguish different mtDNA type patterns from the combination and to be judged as a DNA type of two persons.

研究分野：法医学

キーワード：混合試料 ミトコンドリアDNA 次世代シーケンス DNA鑑定

1. 研究開始当初の背景

犯罪現場の遺留物などから DNA 鑑定を行う際、そこから抽出される DNA は 1 人分とは限らず、複数人の DNA が混入している場合がある。これは混合試料と呼ばれ、法医学領域における大きな課題のひとつである。混合試料に関する現状の研究では、核 DNA における short tandem repeat (STR) の分析結果を用いた数学的解釈が主流であり^{1,2)}、複数人分の DNA 型を直接的に区別する技術的な方法としては、精液を含んだ混合体液斑から精液由来 DNA を分離する方法を除き未だ確立されていない。

また、遺留物に存在する DNA は極微量であったり分解が進んでいることがあり、核 DNA での分析が困難となる場合がある。このようなケースでは、ミトコンドリア (mt) DNA が有用となる。mtDNA は核 DNA と異なり、1 細胞中に数百から数千コピー存在するため劣化試料での分析に用いられることが多い。また、母系遺伝し、高度の多型性をもつ hypervariable region (HV) があるため、遺伝子配列を比較することで個人識別や血縁関係推定が可能となる。

近年、欧米では次世代シーケンサーを用いた mtDNA の塩基配列解析が行われ始め、その解析法が確立しつつある^{3,4)}。本研究は、この次世代シーケンシング (Next generation sequencing; NGS) の技術を用いて混合試料から各個人の mtDNA 型を分離し個人識別を試みることで、混合試料における DNA 鑑定の問題を解決しようとするものである。混合試料中に何名分の DNA が含まれているか、また誰由来の DNA であるかを特定し、法医実務への応用を目指していく。

2. 研究の目的

混合試料から DNA 分析を行う際、従来のキャピラリー電気泳動型シーケンサーによる解析では各個人の DNA 型が混合された状態で検出され、分離することができない。一方、NGS では DNA 1 分子ごとに塩基配列解析を行うため、理論上では複数人由来の DNA 鎖がそれぞれ異なるリードとして検出される。

また、mtDNA の HV1 および HV2 の配列は各個人の特徴を表すハプログループを示しており、NGS 解析で混合試料から検出されるハプログループの種類は混合人数を反映することになる。しかし鎖長の短い増幅産物を用いた検出の場合、ハプログループの推定には複数のリードの組み合わせを考える必要がある。

そこで、本研究では NGS を用いて、1 本のリードが直接各個人のハプログループを示せるように、mtDNA の HV1 および HV2 領域を可能な限りカバーできるサイズの大きなリード長で配列解析を行い、混合試料中における複数人分の DNA 型の分離を試みた。

3. 研究の方法

(1) 試料 DNA および混合試料モデルの作成
血液と口腔粘膜細胞から抽出した 2 名分の DNA を試料とし、それぞれ試料 A, B として以下の実験に使用した。本研究は東海大学医学部医の倫理委員会の承認を受け実施した。混合試料モデルの作成は、以下の 2 通りの条件で行った。また、試料 A と B について、mtDNA の HV1 および HV2 領域の塩基配列をサンガー法で確認した。

試料 A と B の mtDNA のコピー数の比をリアルタイム PCR による相対定量で算出し、2 つの試料を 1:1 の割合で混合した。混合試料中の total DNA 濃度を吸光度で測定し、その 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 ng を鋳型としてライブラリ作成に用いた。異なる DNA 量を鋳型とした時の、増幅領域がカバーできる長さのリードの検出効率について検討した。

一定の DNA 量 (1 ng) 中の試料 A と B の混合比率を変化させた試料モデルを作成した。試料 A と B の mtDNA コピー数が 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:2, 1:4, 1:8 となるように混合し、ライブラリ作成に用いた。

(2) プライマーの検討

mtDNA の HV1 および HV2 領域をカバーできる長さの増幅産物を作成するために、HV1 の増幅領域が 16021 から 16401 の 381 bp、HV2 が 15 から 386 の 372 bp となるようプライマーを設計した。また、HV1 が 16021 から 16375 の 355 bp、HV2 が 36 から 386 の 351 bp となる、350 bp 程度の増幅産物が得られるプライマーも同様に作成した。

(3) ライブラリ作成

上記の混合試料モデルとプライマーを組み合わせて、NGS のライブラリを作成した。HV1 と HV2 を duplex PCR で増幅した後、Agilent 2100 バイオアナライザと Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) で増幅産物を定量し、その内の 100 ng もしくは増幅産物が 100 ng に満たない場合は全量をライブラリ作成に用いた。

ライブラリは Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、断片化の工程は行わず増幅産物の全長を利用して作成した。増幅産物にアダプターとバーコードを付加したのち精製し、定量した。

(4) シーケンシングおよびデータ解析

100 pM に希釈したライブラリを複数試料分プールし、Ion OneTouch 2 Instrument と Ion PGM Hi-Q OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific) で 400 bp-read のプロトコルを用いて emPCR (emPCR) を行った。emPCR 産物はエンリッチメント後、Ion PGM シーケンサーと Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Ion 314 Chip Kit v2 上でシーケンスした。

得られた配列は、mtDNA の rCRS 配列をリファレンスとしてマッピングし variant 解析を

行ったマッピングとvariant解析はTorrent Suite Software 5.2.2 (Thermo Fisher Scientific)を用い、リード長のフィルタリング等はCLC Genomic Workbench 10 (CLC bio)を用いた。また、Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute)でマッピング結果とリードの配列を確認した。

4. 研究成果

(1) プライマーの検討

HV1 および HV2 の増幅産物長をそれぞれ 381, 372 bp とした時のシーケンスでは、目的の増幅産物長より短いリードしか得られず、増幅領域の全長を1本のリードで読むことができなかった。

そこで増幅産物の大きさを 350 bp 程度に短くしたところ、HV1・HV2 とともに増幅領域全体を1本のリードで検出することが可能となった。以降の研究成果は、HV1 を 16021 から 16375、HV2 を 36 から 386 の範囲で増幅した場合における解析結果を示す。

(2) NGS 解析結果

シーケンス解析で得られたリード上には複数の塩基多型が確認され、HV1, HV2 共にその組み合わせから異なる mtDNA 型のパターンを区別することができた (図 1)。

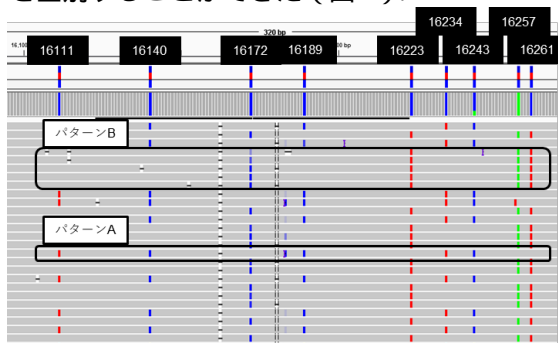


図 1 混合試料における mtDNA HV1 領域のマッピング結果 混合比 1:1 鋳型 DNA 量 0.01 ng. 灰色の横線が1本のリードで、一塩基多型が色で示されている。

リード上の多型のパターンは2種類確認可能で、HV1 で検出されたパターン A は 16111T-16140C-16183C-16189C-16234T-16243C で mtDNA のハプログループ B5b2a1b に属し、パターン B は 16172C-16223T-16257A-16261T でハプログループ N9a2a に属するものであった。また HV2 では 73G-131C-204C-207A-263G および 73G-150T-263G の2種のハプロタイプが確認でき、前者は B5b2a1b に属し、後者は N9a2a の特徴と共通していた。このことから、HV1 および HV2 のシーケンス結果によって2名分の DNA 型として判断することができた。

今回の NGS 法では、サンガー法では識別できない 16189C 個体の C 連続に続く配列を reverse 鎖のリードで検出することが可能であった。しかし 286 や 16162 から始まる 6 および 5 個の A の連続配列以降で forward 鎖の

カバレッジが大きく減少したり、HV1 の C 連続領域や HV2 の 303 以降の C 連続数の判定が難しいことなど、連続配列付近の多型の判定は注意を要した。

(3) 鋳型 DNA 量の検討

混合試料モデルのうち 鋳型 DNA 量 0.01 ng から作成したものにおいては増幅産物の濃度が 100 ng に満たなかったが (48.5 ng), IGV で確認する限りは2名分の多型パターンを区別することが可能であった (図 1)。しかし、得られたリードのうち、増幅領域と同一の長さのものを数えたところ、HV2 においては十分なリード数が得られたが、HV1 においては 98 と少数であった (表 1)。HV1 のリードは使用 DNA 量 0.05 ng 以下で極端に減少し、ここが分析可能な限界濃度と考えられた。

表 1 鋳型 DNA 量とリード数

鋳型 DNA 量 (ng)	総リード数	増幅領域と同一長のリード数	
		HV1 (355 bp)	HV2 (351 bp)
5	35,260	1,025	2,837
1	46,501	1,288	2,356
0.5	76,520	2,085	7,781
0.1	62,732	1,155	8,392
0.05	43,289	250	6,844
0.01	34,008	98	4,587

(4) 混合比についての検討

混合比を変化させたモデルについて、今回多型が認められた領域 (16111-16261 (HV1), 73-263 (HV2)) で被験者2名それぞれのハプロタイプ配列と一致するリードを数えた。配列を確認する際、HV1 の 16164-16193 の範囲は連続配列が多く塩基数が正しく検出できていない可能性があるため除外した。HV1 と HV2 における試料 A B のリードの割合は、1 ng 中に含まれる A, B それぞれの DNA 量の増減に比例して上下し、混合試料に含まれるそれぞれの mtDNA の割合を反映していた (図 2)。しかし、HV1 では試料 A と配列が一致するリードの数が試料 B に比べて低かった。これは、試料 A が 16189C による C 連続配列を有するところから、連続配列の特徴がシーケンス解析における検出効率に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

(5) 結語

今回、混合試料中に含まれる複数人分の DNA 型の分離を目的として、NGS を用いて mtDNA のハプログループの推定が可能となる長さのリードを得ようと試みたところ、HV1

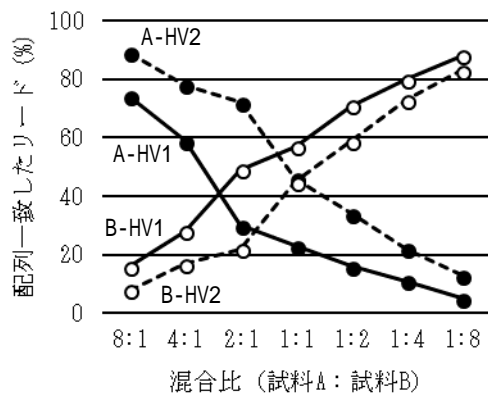


図2 mtDNAの混合比と、試料A, Bと配列が一致したリードの割合との関係

およびHV2領域でそれぞれ355および351bpの増幅産物を断片化することなく解析できた。本研究で用いたNGSキットはバーコード付加時で最大385bpの増幅産物の解析が可能とされているが、約380bp前後のHV1, HV2の増幅産物を使用した際は良い結果が得られず、上記の長さが最適であった。

得られたリード上には混合した2人のハプロタイプのすべての変異がそれぞれ確認され、各増幅産物におけるハプログループを決定することが可能であった。また、混合試料中に16189Cがある場合でもreverse配列で増幅産物の全長を1本のリードとして読むことができたため、仮にC連続配列を有する2人の試料が混合する場合が生じて、サンガー法の場合と異なり、それぞれの変異の組み合わせを仮定することなく解析可能だと考えられた。しかし、連続配列付近ではカバレッジの減少が確認されており、混合比に大きな偏りが想定される場合はマイナーアレルが検出できるよう十分量の鋳型DNAが必要となる。

本法ではHV1, HV2領域内でPCR産物を200bpほどに細分化する処理をしていないため、得られたリードから多型の組み合わせを考慮せずmtDNAのハプロタイプを決定できるという利点がある。法医学領域において、特に日本では次世代シーケンサーを利用している研究室はまだ多くなく、本研究は新技術を用いた従来法の改善策として発展が期待されるものである。本法の改良点としては、日本人に多くみられる16362の変異が本研究ではプライマー領域に含まれているため、HV1の増幅領域を再検討する必要がある。

今後はヘテロプラスミーや混合人数について更なる検討をし、実際の法医混合試料で応用していきたいと考えている。

<引用文献>

Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, et. al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. Forensic

Sci Int, 160: 90-101, 2006.

Kelly H, Bright J-A, Buckleton JS, et. al. A comparison of statistical models for the analysis of complex forensic DNA profiles. Sci Justice, 54: 66-70, 2014.

Parson W, Strobl C, Huber G, et. al. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). Forensic Sci Int Genet, 7: 543-549, 2013.

King JL, LaRue BL, Novroski NM, et. al. High-quality and high-throughput massively parallel sequencing of the human mitochondrial genome using the Illumina MiSeq. Forensic Sci Int Genet, 12: 128-135, 2014.

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 5件)

落合恵理子, 松島裕, 水口清, 垣内康宏, 垣本由布, 大澤資樹. 混合試料のミトコンドリアDNA型判定における次世代シーケンサーの応用. DNA多型. 査読無. Vol.26. 2018. 印刷中

落合恵理子, 松島裕, 垣本由布, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いた死後遺伝学的検査: 突然死例に対する循環器系疾患関連遺伝子解析. DNA多型. 査読無. Vol.25. 2017. 164-166

落合恵理子, 宮下京子, 水口清, 垣本由布, 佐藤文子, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いたY染色体ハプログループ解析. DNA多型. 査読無. Vol.24. 2016. 169-171

Ochiai E, Minaguchi K, Phrabhakaran Nambiar, Kakimoto Y, Satoh F, Nakatome M, Miyashita K, Osawa M. Evaluation of Y chromosomal SNP haplogrouping in the HID-Ion Ampliseq™ Identity Panel. Legal Medicine. 査読有. 22. 2016. 58-61

DOI:10.1016/j.legalmed.2016.08.001

[学会発表](計 9件)

Ochiai E, Matsushima Y, Minaguchi K, Kakiuchi Y, Kakimoto Y, Osawa M. Mitochondrial DNA typing in mixtures using massive parallel sequencing. 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine. 2018

落合恵理子, 松島裕, 水口清, 垣内康宏, 垣本由布, 大澤資樹. 混合試料のミトコンドリアDNA型判定における次世代シーケンサーの応用. 日本DNA多型学会第26回学術集会. 2017

Ochiai E, Kakimoto Y, Seto Y, Tsuboi A, Matsushima Y, Osawa M. Postmortem genetic testing using the next generation sequencing system: Evaluation of cardiovascular disease analysis panel. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine. 2017

落合恵理子, 垣本由布, 瀬戸良久, 坪井秋男, 松島裕, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いた死後遺伝学的検査: 循環器系疾患解析パネルの評価. 第101次日本法医学会学術全国集会. 2017

落合恵理子, 水口清, 垣本由布, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いた Y-SNP 解析とハプログループ判定. 日本法科学技術学会第22回学術集会. 2016

Ochiai E, Miyashita K, Minaguchi K, Kakimoto Y, Satoh F, Osawa M. Y chromosome haplogrouping using the next generation sequencing system. ICHG2016 The 13th International Congress of Human Genetics. 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 恵理子 (OCHIAI, Eriko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号: 60760270