

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09259

研究課題名（和文）ミトコンドリアDNAの多型・メチル化に基づいた混合試料の評価と年齢推定

研究課題名（英文）Mixture analysis and age estimation based on mitochondrial DNA polymorphisms and methylation pattern

研究代表者

浅利 優（Masaru, Asari）

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40360979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、塩基置換を含む配列や標準配列を使用したプローブによる増幅阻害に基づいて、混合試料からのミトコンドリアDNA型ハプロタイプ検出法を開発した。この方法により、混合試料に含まれる個々の塩基配列を効率よく検出できた。また、メチル化解析では、日本人集団において年齢推定に有用な部位を見出すことはできなかったが、一塩基伸長反応を用いることでメチル化率の低い領域が検出可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、きわめて微量な混合試料からのミトコンドリアDNA型解析法として法医実務へ利用可能である。特に検体数が多い場合においても、効率よく被疑者および被害者など含まれる個人のミトコンドリアDNA型が検出可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We developed a new method for discrimination of mitochondrial DNA haplotypes based on inhibition of amplification using designed probes including single nucleotide polymorphisms or reference sequences. Our method could effectively discriminate each haplotype from mitochondrial DNA mixtures. Although we did not find the useful methylation targets for age estimation of Japanese individuals, we confirmed that single base extension method would be useful to detect lower methylation rates.

研究分野：法医学

キーワード：個人識別 混合試料 ミトコンドリアDNA メチル化

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト DNA 鑑定は、犯罪現場の遺留試料の特定や災害犠牲者の身元確認などにきわめて有効な手段となっており、現在では核 DNA の繰り返し配列 (STR) の解析が主流となっている。STR の識別力はきわめて高く、近年は接触・汚染などにより生じた混合 DNA 型が検出されることも多くなっている。しかしながら、試料からの STR 型検出が困難であり、個人特定に至らない場合も少なくない。核 DNA に比べてミトコンドリア DNA (mtDNA) はコピー数が多いことから、一般に核 DNA よりも検出感度が高い。一方、日本人集団において高頻度で観察される mtDNA 型は識別力に乏しく、さらに混合試料では核 DNA ほど明確な評価法がないことが大きな課題である。このような理由から mtDNA 解析の利用は限定的となっており、混合 DNA に含まれる個々の型を効率よく決定することで得られる情報は混合試料からの mtDNA 解析の可能性を広げるものと期待される。

また、メチル化解析は核 DNA が主流であり、近年ようやく mtDNA についても報告がされてきている。さまざまな手法を用いて広範囲な領域からメチル化率の判定が行われている。また、核 DNA を中心としてメチル化率の測定による年齢推定法が報告されている。

2. 研究の目的

(1) 混合試料のミトコンドリア DNA 解析

熱安定性に優れた人工核酸 Locked Nucleic Acid (LNA) を用いた PCR クランプ法により混合試料の mtDNA 分離法を開発する。一塩基多型を含む特定の塩基配列に結合・増幅抑制するプローブを作成し、混合試料に含まれる個々の塩基配列を迅速な決定を行う。

(2) メチル化率に基づいた年齢推定

日本人集団の口腔内細胞から得た DNA を用いて、広範囲な領域のメチル化解析を行う。また、年齢に相関がみられるメチル化領域を明らかにすることで高感度な年齢推定法を確立する。

3. 研究の方法

(1) DNA サンプル

日本人から採取した口腔内細胞から市販の抽出キットを用いて DNA を抽出し、Quantifiler Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いて DNA 濃度を決定した。

(2) 多型部位の決定

高変異領域 1 または 2 を PCR で増幅後、BigDye Terminator v1.1 を用いてシーケンス反応を行った。精製物を 3500 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて解析した。

(3) 人工核酸 LNA 導入プローブの作製

塩基置換に対するプローブおよび標準配列に対するプローブは 20 塩基までの DNA に、人工核酸 LNA を導入して作製した。塩基置換に対するプローブは、1 または 2 塩基の置換 (16209C、16217C、16243C、16257A/16261T、16297C/16298C、16278T、16290T、16304C、16362C) を含む範囲を用いた。標準配列に対するプローブは塩基番号 16175-16192、同 16238-16254、同 16283-16299、同 16316-16333、同 16354-16370 および同 140-157 を用いて作製した。プローブの名称は塩基置換では塩基番号と種類、標準配列では範囲とした。

(4) フラグメント解析による阻害効果の検討

PCR 反応液にプローブを添加し、プローブと完全に一致する配列または一部が不一致となる配列を鋳型として増幅を行った。プローブ未添加のものをコントロールとした。蛍光標識した HV1 または HV2 プライマーを使用して、反応産物を 3500 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて解析し、相対蛍光強度に基づいて阻害効果を決定した。

(5) シークエンス解析による阻害効果の検討

(4)と同様に PCR 反応液にプローブを添加し、プローブと完全に一致する配列および一部が不一致である配列を鋳型として増幅し、プローブ未添加をコントロールとした。標識していない HV1 または HV2 プライマーを使用して増幅後、BigDye Terminator v1.1 を使用してシークエンス反応を行った。反応産物を 3500 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて解析し、多型部位の波形を確認した。

(5) メチル化率の検出

DNA は市販のキットを用いてバイサルファイト処理を行った。ミトコンドリア DNA の CpG 配列のうち、8 領域についてメチル化特異的な増幅によりメチル化率を解析した。メチル化特異的な増幅ではメチル化配列および非メチル化配列を標的とするプライマーの設計を行い、フォワードおよびリバースプライマーの両方向に CpG 部位を含むようにプライマーを作成した。なお、メチル化率はリアルタイム PCR を用いた独立した増幅により得られた Cq 値を使用して計算した。1%以上の比較的高いメチル化が確認された部位を対象として、日本人 50 名(年齢 20 - 86 歳、平均 43.6 歳)のメチル化率を測定した。この部位を含む領域を増幅した後、一塩基伸長反応を用いてメチル化率を 2 回測定し、その平均値を計算した。

4. 研究成果

(1) PCR クランプ法によるミトコンドリア DNA 型解析

塩基置換に対するプローブの検討結果のうち、特異的な阻害効果が観察された部位について図 1 に示した。16209C、16217C、16304C、16362C、16362T、16257A/16261T、16297C/16298C の 7 部位について特異的な阻害効果が確認された。なお、これらの塩基置換の出現頻度から、混合する 2 つの配列のうち約 70%に対して適応可能と推定された。さらに、この 7 部位について、塩基置換を持つ配列と持たない配列を一定の割合(9:1、4:1、1:1、1:4、1:9)で混合したものを試料として 1 種類のプローブを加えて PCR 増幅を行い、ダイレクトシークエンス解析を行った。その結果、7 部位の塩基置換をもつ配列が検出されず、塩基置換をもたない配列を決定できた。さらに、3 種類の配列を混合したものを試料として、2 種類のプローブを加えて阻害効果を検討したところ、1 種類の配列が決定可能であった。

標準配列に対するプローブの検討結果を図 2 に示した。塩基番号 16175-16192 を用いた場合、プローブ配列内に 16189C のみ多型をもつ鋳型では期待された阻害効果が認められず、1 塩基の識別が困難であった。それに対して、残りの 4 種類のプローブでは 1 塩基の違いを明確に識別することが可能であった。このことから、選択したプローブを用いた増幅は、日本人集団の高頻度で出現するハプロタイプを効率よく阻害可能な方法であると考えられた。以上より、日本人集団において高頻度で観察される塩基置換を標的とした 7 種類のプローブを用いることで、効率よく 2 名の混合試料に含まれる個々の配列が決定可能であった。また、混合試料が 3 名以上であっても、選択した 7 部位を含む場合には個々の配列や人数の推定が可能であることが明らかとなった。

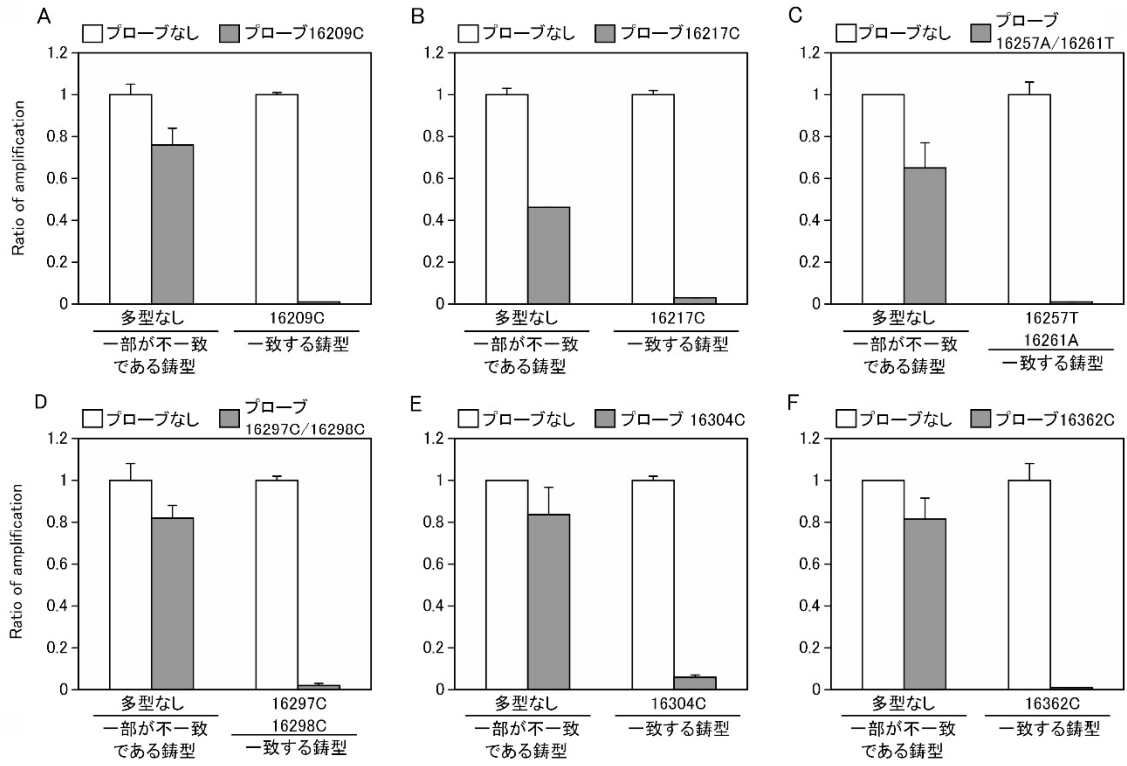


図1 塩基置換プローブによる阻害効果の検討
 プローブと結合する配列に多型を含まない、または多型を含む鑄型を用いて阻害効果を検討した。

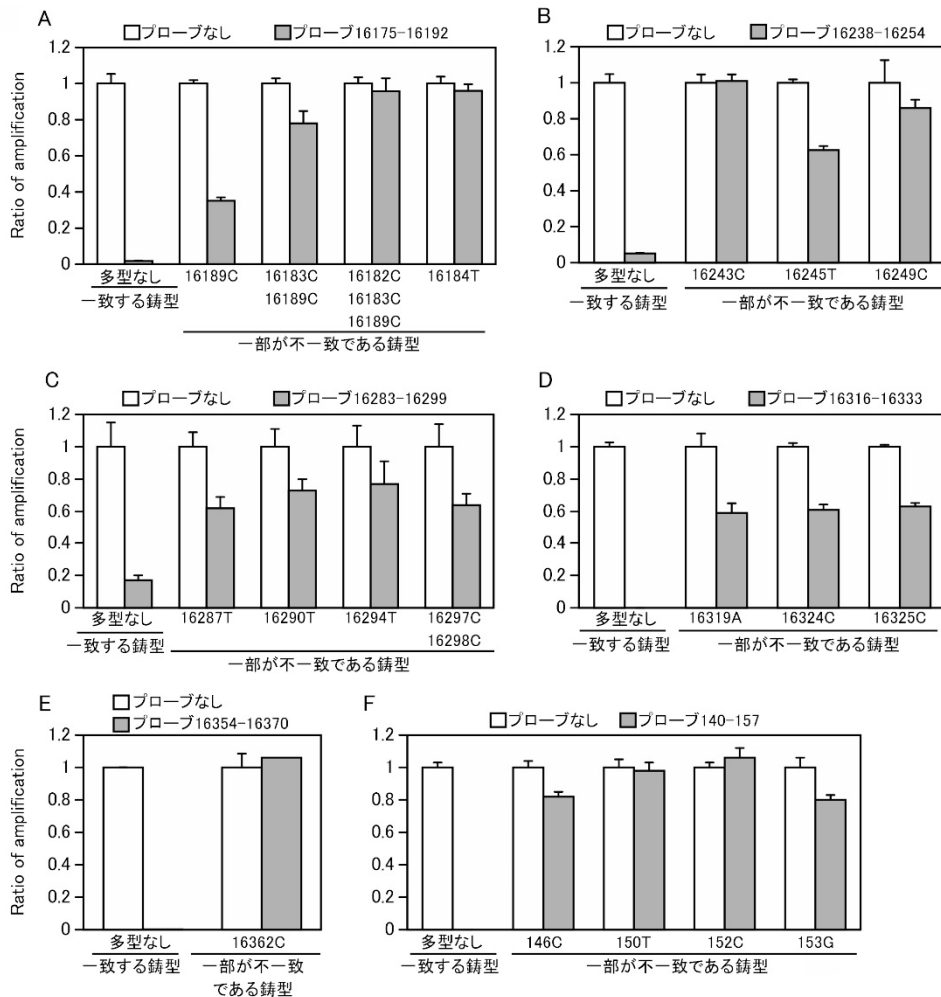


図2 標準配列プローブによる阻害効果の検討
 プローブと結合する配列に多型を含まない、または多型を含む鑄型を用いて阻害効果を検討した。

(2) メチル化率測定と年齢推定

メチル化率が1%以上であったものは、2領域(塩基番号16453および塩基番号91を含む領域、塩基番号1216と塩基番号1322を含む領域)であり、他の6領域についてはメチル化率が1%以下あるいは定量に十分な増幅が認められなかった。メチル化率が1%以上のものが観察された2領域(4か所)についてメチル化率を詳細に検討するため、一塩基伸長反応を用いて50名のDNAからメチル化率を決定した。4か所のCpG部位のうち、明確な判定が可能であったものは塩基番号16453および塩基番号1322のCpG部位であった。また、観察されたメチル化率は塩基番号16453では平均値±標準偏差が $1.7\% \pm 0.9\%$ であった。一方、塩基番号1322のメチル化率は塩基番号16453よりも高く $2.7\% \pm 0.8\%$ であった。メチル化率が高いものでも5%以下であるため、複数回測定するなど判定精度を高める工夫が必要であると考えられた。また、年齢と塩基番号1322のメチル化率の関連では、相関係数が低く年齢に依存した傾向を見出すことはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asari M, Isozaki S, Hoshina C, Okuda K, Tanaka H, Horioka K, Shiono H, Shimizu K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Discrimination of haplotype in mitochondrial DNA mixtures using LNA-mediated PCR clamping.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Forensic Sci Int Genet.	6. 最初と最後の頁 58-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsigen.2019.03.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅利 優, 磯崎翔太郎, 保科千里, 奥田勝博, 田中宏樹, 北村麻奈, 島津雅子, 堀岡希衣, 塩野 寛, 清水恵子
2. 発表標題 PCRクランピング法を用いた混合試料からのミトコンドリアDNA型解析
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅利 優, 奥田勝博, 保科千里, 田中宏樹, 堀岡希衣, 塩野 寛, 清水恵子
2. 発表標題 配列特異的な増幅阻害に基づいた混合試料からのミトコンドリアDNA型解析
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----