

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590687

研究課題名（和文）損傷 DNA の修復とその DNA 多型の検出

研究課題名（英文）Repair of damaged DNA and detection of its DNA polymorphisms

研究代表者

鉄 堅 (TIE JIAN)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：40277439

研究成果の概要（和文）：

40 年経過した血痕 DNA および UV 照射による損傷 DNA に対して AP (apurinic/aprimidinic) sites を指標としてアルデヒド反応性プローブ (Aldehyde Reactive Probe:ARP) を用い、その損傷の評価ができた。修復酵素を用い、損傷を修復することにより、STR 多型を検出することができた。破壊能力の高い UVC 照射 DNA が AP sites の増加を確認され、2 日間以内に照射された試料では修復酵素で一定の修復効果があり、修復後に AP sites が回復し、STR 多型の検出が可能であった。

研究成果の概要（英文）：The polymorphisms of short tandem(STR) repeat were successfully amplified from human bloodstain collected over the past 40 years and UV irradiated DNA by DNA repair. The damage of DNA was referenced by Aldehyde reactive probe, AP site of human cell DNA was increase after treated by UVC and DNA repair was performed for two days UV damage DNA, the AP site was decrease after DNA repair and STR was detected for all damaged samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、損傷、修復、多型、個人識別

1. 研究開始当初の背景

(1) 法科学試料の中では陳旧な血痕、また、UV 照射した上皮細胞などダメージを受けた試料中にも DNA シーケンサ情報は存在しているが、その情報を取り出すことは現在の技術ではしばしば困難を伴う。ダメージを受けた様々な試料に含まれている DNA が、どのようなタイプの損傷を受けやすいかについて

て研究を行わなければならない。

(2) 生体では多様な DNA 修復酵素の働きにより、随時に損傷 DNA の修復を行っている。法科学試料でこれらの酵素より損傷を修復することが可能かどうか、まだ研究されていない。

2. 研究の目的

DNA 多型の解析はすでに法医学で最もポ

ピュアな個人識別の手段である。遺伝子操作技術が発達するにつれ、保存状態の悪い血液や組織などの法科学試料から遺伝子情報を取り出すような、より困難なケースにも対応しなければならなくなった。このような試料から、シーケンス情報を取り出すことは法医学における個人識別において必須である。こうした研究は、試料から抽出できるDNAの質と量による制約を受ける上に、微量のDNAを精製する際にDNAのPCR増幅を阻害する物質がしばしば混入することがあり、解析を一層困難にしている。そして、法医学における個人識別でDNA損傷が問題となっているのである。我々は法科学試料より全ゲノム法やPCR増幅にExonuclease IIIを加えるなどの方法を用い、これらの試料からDNA多型の研究を行ってきた。しかし、試料に残存された高分子ゲノムは増幅可能なテンプレート量に制約されて、効率には限界がある。

DNAポリメラーゼによる正確な複製を阻害するDNA損傷には、いくつかのタイプが知られている。損傷のタイプと損傷による影響は、試料の種類と試料がさらされていた環境に依存しており、あるタイプの損傷はあらゆるDNA試料に認められるが、他のタイプの損傷は特殊な環境においてのみ起こる。DNA分子を形成する共有結合のうち、生理的条件下で最も不安定なものは、塩基とデオキシリボースを結合するN-グリコシル結合である。これは、RNAにおいてはホスホジエステル結合が最も不安定であることと大きく異なっている。N-グリコシル結合が加水分解されると、プリン/ピリミジン欠失(apurinic/aprimidinic:AP)部位が生じ、最終的にニックを生じる。この反応は水分子による反応であるため、AP部位が生じる可能性がある。凍結乾燥された試料でも、DNAに最も接近して結合している水分子層は取り除くことが困難であるため、AP部位が生成すると考えられる。試料中に酵素活性が残存しているような条件では、ヒト細胞一個に含まれる全ゲノムDNAあたり、一日およそ2,000~10,000箇所のAP部位が生じると考えられる。AP部位の生成頻度は試料によって異なり、特に犯罪現場から採取された試料では、おかれていた環境によるばらつきが大きい。DNA中のAP部位は次の二つの理由によって問題となる。第一に、塩基が失われているために複製時に塩基対を形成できないこと。第二に、PCRに用いられるほとんどのポリメラーゼによる伸長反応がAP部位で停止してしまうことである。したがって、AP部位が有る程度以上の数になると、PCRやシーケンス反応がうまくいかなくなる。AP部位がニックまで進行すると、DNAの断片化が起こるため、事態はさらに悪化する。

生体で起こりやすいDNA損傷のもう一つはシトシンの加水分解(脱アミノ化)によるウラシルの生成である。古代試料から抽出されたDNAをシーケンスする研究によって、古代試料における主要なDNA損傷はこのタイプであることが分かった。

シトシン脱アミノ化は、AP部位の生成と同じく、加水分解によって起こるため、ほとんどの試料から抽出されたDNAで生じていると考えられる。興味深いことに、DNA脱プリン化とは異なり、シトシンの脱アミノ化は、一本鎖DNAに比べ二本鎖DNAではゆっくりとしか起こらないことが知られている。DNA増幅とシーケンスへのシトシン脱アミノ化の影響は、ポリメラーゼの種類によって異なる。いくつかのポリメラーゼ(例えばTaq DNAポリメラーゼ)は、脱アミノ化したシトシンがあっても伸長反応が進行するが、その際、相補鎖のウラシルの位置にグアニンではなくアデニンを挿入する。これによって、たとえポリメラーゼが100%正確であったとしても、新たに合成させた鎖に塩基置換変異(G→A)が導入されてしまう。一方、いわゆる古細菌ポリメラーゼをProof Readingポリメラーゼ(例えばVent、Pfu、9N DNAポリメラーゼ)は、テンプレートにデオキシウラシルがあるとそこで停止してしまう。これらのポリメラーゼの活性中心には、脱アミノ化したシトシンを特異的に認識する結合ポケットがある。新たに合成された鎖に塩基置換変異が導入されるのを防いでいる。シトシンの脱アミノ化は、結果として、PCRの阻害か、PCR産物への変異の導入につながるため、DNAのシーケンスが重要な場合に特に問題となる。これに対して、シーケンスよりもPCR産物の長さが重要な場合には(例えばSTRを用いた個人識別)シトシンの脱アミノ化は大きな問題にはならない。問題となるDNAの損傷の三番目は酸化である。加水分解による損傷と同様、ほとんどのDNA試料は保存中酸素にさらされており、酸化による損傷を受けていると考えられる。酸化によって様々な塩基の修飾が起こるが、最も多いのはグアニンから8-オキソグアニンの生成である。8-オキソグアニンはアデニンと塩基対を形成するため、塩基置換変異の原因となる。このタイプの損傷はミトコンドリアで高頻度に発生し、老化の一因とも考えられている(7)。酸化の損傷を定量的に調べた研究では、DNA抽出操作だけでも酸化の損傷が起こることが明らかになり、抽出方法を慎重に検討すべきであることが示唆された。

その他のDNA損傷は特殊な環境下で起こると考えられる。DNA-タンパク質、DNA-DNA間の架橋反応は、膨大な数の試料アーカイブを用いた遺伝子解析において、解

析を阻む重大な問題となる。ホルマリンによる架橋反応は、組織の形態を保存するためには有効だが、架橋された塩基がポリメラーゼ反応を停止させたり、DNA 同士の架橋反応によって DNA 変性が阻害されるため、DNA の分析にとってはきわめて有害である。さらに、ホルマリン溶液中では、時間とともにギ酸が生成して pH が徐々に低下するため、AP 部位と断片化の発生頻度を高める。特殊な条件で生じる DNA 損傷としてもう一つの例は、ピリミジン二量体の生成である。ピリミジン二量体は DNA が紫外線にさらされたときに生成し、DNA ポリメラーゼの伸長反応を簡単に停止させてしまう。

以上のことからダメージを受けた試料中にも DNA シーケンサ情報は存在しているが、その情報を取り出すことはしばしば困難を伴う。DNA の抽出効率、試料中の PCR 阻害物質、そして DNA 損傷のうち、どれが最大の問題なのかははっきりとは決められない。むしろ、試料ごとに問題の原因が異なるため、これらの三つの問題の全てを解決するためのテクニックが求められているといえよう。ダメージを受けた様々な試料に含まれている DNA が、どのようなタイプの損傷を受けやすいかについて研究を行わなければならない。それらの損傷を修復する方法を研究することが可能となれば、これまでは法科学試料から取り出すことが困難だった遺伝子情報を手に入れて個人識別や犯罪捜査に役立つようになる。

3. 研究の方法

(1) 試料およびその処理

当教室で保存されているヒト陳旧血痕と志願者から採取した口腔上皮細胞、および抹消血を採取して作成した血痕を試料として、UVC ランプ（波長 230～280nm）で照射し、定期的に DNA の精製を行った。

(2) DNA の精製

血痕による DNA の抽出は通常フェノール・クロロホルム法が使用されている。しかし、この方法では DNA の損傷をもたらすと報告されているので本研究では上述した試料からそれぞれ QIAamp DNA Mini Kit を用いて添付されているマニュアルに従って丁寧に DNA の抽出を行うこととする。抽出されたこれらの DNA を使用するまで -20℃ で保存する。

(3) アガロースゲル電気泳動による損傷 DNA の確認

分光光度計（ND-1000 スペクトロフォトメーター）を用い、血痕および UV 照射口腔上皮細胞から抽出された DNA の濃度を測定する。さらに 1.2% アガロースゲルを作成し、DNA サイズマーカーと一緒に電気泳動して損傷 DNA の分子サイズを確認する。

(4) DNA ダメージ部位の検出

アガロースゲル電気泳動でそれぞれ損傷 DNA の分子サイズを確認した上、さらに N-グリコシル結合が加水分解されるため、プリン/ピリミジン欠失 (AP) 部位が生じ、加水分解アルデヒド反応性プローブ (ARP) を用い、損傷 DNA の脱塩基部位 (AP sites) を測定した。

(5) 酵素によるダメージ DNA の修復

DNA 修復酵素として APE1、Endo III、Endo IV、Endo V、Endo VIII、T4PDG、Fpg、hOGG1、T7Endo I および Afu UDG などの 10 種類を用い、DNA 損傷のタイプにより、対応して損傷 DNA の修復を行った。そのほかに市販されている Pre CRTM Repair Mix はポリメラーゼトリガーゼの組み合わせにより、ニックなどの DNA 損傷にも使用した。

(6) 修復された DNA より STR 多型の検出

損傷前と損傷 DNA 鎖を修復した後の STR 検出結果を比較するため、試料から AmpFLSTR Identifiler Kit により D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA) の 15 ローカス常染色体 STR 及び X・Y 性染色体の Amelogenin 型について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 陳旧血痕

室温に長く放置した血痕は AP sites の増加が確認されたが、40 年経過した血痕 DNA から直接に STR 多型を検出できないに対して損傷を修復した後、すべての STR 多型を検出された。これにより、実際の刑事事件の際に通常で残される現場の血痕では個人識別が可能になると考えられる。

(2) UVC 照射血痕

自然光の中に UVC のエネルギーが最も強く生物試料に対する破壊も激しいと報告されている。本研究では 3 日間以上にわたってヒト血痕を続けて照射していくと、AP sites が通常自然 40 年間に放置する血痕より、多く確認され、DNA 修復酵素により、修復を行ってみたいところ、困難な試料が多く観察された。そのほかに、UVC によるヒト上皮細胞の損傷も激しく、短時間の照射でも AP sites の増加が著しく、ヒト DNA に対するダメージが大きかった。12 時間以上照射すると多くの STR ローカスの検出はできなくなった。修復酵素で一定の修復効果があったものの、3 日間以上にわたって照射し続けると、修復して AP sites が回復しても STR 多型の検出ができなかった。詳しい原因がわからないが、AP sites 以外の原因も考えられる。今後さらに研究し続ける必要がある。

(3) 試料 DNA 濃度の変化

UV 損傷生物試料より、抽出された DNA について次の実験を行う前に分光光度計と

RT-PCR 法にて、抽出される DNA の濃度を確認した。その結果、分光光度計での値では、明確の変化がなかったに対して、RT-PCR で測定された値は遥かに減少していくことが明らかになった。STR 多型を検査を行うために正確の RT-PCR 値が重要であることがわかった。

(4) 修復された DNA の個人識別

UV 損傷により、DNA に対して様々なダメージを与えられ、単純の酵素修復では、STR 多型を検出できないことがあつたとしても、性別識別の Amelogenin ローカスでは、検出でき、個人識別に一定の効果があると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 鉄 堅、内ヶ崎西作、押田茂實、堤 博文、小室歳信 血痕からの AP site の検出と修復について、DNA 多型、査読なし、Vol.17、2009、203-205.
- ② Tie J, Uchigasaki S, Direct PCR Amplification from Extracted Tissues for Individual Identification. International Medical Journal. 17(4), 2010, 285-288. 査読あり
- ③ Tie J, Uchigasaki S, Direct and rapid PCR amplification using digested tissues for the diagnosis of drowning. Electrophoresis. 31, 2010, 2411-2415. 査読あり
- ④ Tie J, Uchigasaki S, Genetic polymorphisms of Eight X-chromosomal STR Loci in the population of Japanese. Forensic Sci Int: Genetics, 4, 2010, e105-108. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tie J, Uchigasaki S, Oshida S. Direct PCR Amplification from Extracted Tissues for Individual Identification. 62th Annual scientific meeting of American academy of forensic sciences. Seattle. -USA. 22 February, 2010.
- ② 鉄 堅、内ヶ崎西作、押田茂實：血痕からの AP site の検出と修復について、第 17 回 DNA 多型学術集会、東京、2008. 11. 6

[図書] (計 1 件)

- ① 押田茂實・岡部保男、鉄 堅、Q&A 見てわかる DNA 鑑定 (DNA 型鑑定の実際と問題点)、現代人文社、2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鉄 堅 (TIE JIAN)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：40277439

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし