

平成22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790460
 研究課題名（和文） MiniSTR および MiniPCR-SNPs 構築と劣化試料への応用に関する研究
 研究課題名（英文） MiniSTR and MiniPCR-SNPs systems for analysis of degraded DNA samples
 研究代表者
 浅村 英樹 (ASAMURA HIDEKI)
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号：80324250

研究成果の概要（和文）：今日、STR型を用いた個人識別技術は法医学鑑定において欠くことのできないものとなっている。今回、この個人識別技術のさらなる向上を目的とし、X染色体上に位置するSNPsについてMiniPCR-SNPsシステムの構築を試み、このシステムの劣化DNA試料に対する有効性を検討した。その結果、X染色体上の16SNPsを解析するマルチプレックスシステムの構築に成功し、このシステムが日本人集団において識別能力が高く、かつ、劣化DNA試料の分析に有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Analyses of short tandem repeat (STR) markers are an essential component of forensic genetics. MiniPCR-SNPs (X-chromosome) system for 16 SNPs was newly devised in a present study. As a result of test on degraded DNA samples using the system, it proved to be a quite effective tools for analyzing degraded DNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学、法医学

キーワード：個人識別

1. 研究開始当初の背景

近年の大規模災害や米国同時多発テロなどに際して、犠牲者を対象としたDNA型による個人識別が社会的に注目された。しかしな

がら、犠牲者の多くで高度の損傷を呈し、さらには死後経過時間の長期化などによって、必ずしもDNA型分析に適した状態の良好なDNAが得られず、未だに身元が判明しない御

遺体が多数存在している。一方、司法解剖において DNA 型による個人識別が必要な事例の多くは、顔貌や指紋などの所見が得られない高度腐敗死体や損壊死体であり、必然的に DNA の保存状態は不良となる。

STR 型分析による個人識別法がほぼ確立された今日、前述のような劣化 DNA 試料分析が解決すべき最も重要な課題の一つとなっており、その分析技術の向上は国際的にも社会貢献度が非常に高いものといえる。これまでに我々は、劣化 DNA 試料を対象にした DNA 型分析法として、MiniSTR を用いた STR 型分析を中心に研究してきた。その成果として、常染色体および性染色体上の STR 型を分析する MiniSTR multiplex system を考案し、劣化 DNA 試料への有効性を実証してきた。この結果、実務面においても、これまでに市販の STR キットによる分析で型判定が困難であった事例に対して、MiniSTR 分析を施行した結果、個人識別が可能となったものも少なくない。DNA の劣化とは、主に DNA の断片化および PCR 阻害物質の混入が本体と考えられる。理論上、分析する STR 座位の PCR 産物をより短鎖化することで、その STR 座位中に断片化が生じている鋳型 DNA の割合を減じることが可能となる。これが MiniSTR 分析の劣化 DNA 試料に有効である所以である。

今回、この理論をさらに応用し、MiniPCR に基づく一塩基多型マルチプレックス法が劣化 DNA 試料分析に有効であるという仮説を立てた。これは、鋳型 DNA に対して、一塩基多型を含む 100 塩基対前後の非常に短鎖化した PCR 産物を得たのちに、一塩基伸長反応を利用して一塩基多型を解析しようとするものである。さらに、この分析においては、より複数の多型を同時に型判定するためにマルチプレックスの構築の可能性も示唆される。このようなシステムの分析を MiniSTR 分析に加えることによって、劣化 DNA 試料の個人識別の精度を飛躍的に向上させ、これまで解析不能であった試料に対しても個人識別が可能となるものと考えられる。

2. 研究の目的

DNA を用いた個人識別法としての STR 解析は今日までにほぼ確立されている。本研究では、現在、最も解決すべき課題とされている劣化 DNA 試料に対する解析法の確立を目的としている。一方、この劣化 DNA 試料の分析法に関する研究は、諸外国に比して本邦ではほとんどなされていないと言わざるを得ない。我々は、ここ数年間にわたって、劣化 DNA 試料の分析法、あるいは本邦における X 染色体

STR の個人識別への有効性などを研究してきた。本研究では、これまでの実績を基に劣化 DNA 試料のより一層精度の高い個人識別を可能とするシステムの構築を目的としている。その予想される成果は、これまで困難であった劣化 DNA 試料の分析技術を飛躍的に向上させ、未だに身元確認の困難な様々な事例の個人同定への可能性が期待できるという社会的意義を有する。さらには、古代人の遺伝子解析技術にも適用することで、考古学的意義も示唆される。実際に、現在実務として行っている法医鑑定業務において、これまでに考案した MiniSTR 法を応用することで身元が判明した事例も少なくない。本研究は、さらに信頼度の高い個人識別を可能とし、国際的にも注目される劣化 DNA 試料に対する分析法となることが期待される。

現在までに我々が報告している MiniSTR 法に基づいた STR 座位は、常染色体 8 座位、Y 染色体 24 座位、X 染色体 8 座位に達している。これらの STR 座位の分析によって、劣化 DNA 試料の個人識別技術はかなり向上したものの、確率計算上、未だ必要十分な個人識別ができない事例も少なからず存在する。

そこで、今回、SNPs を解析するシステムの構築を試みる。ゲノムプロジェクトなどにおいて明らかにされたヒトゲノムにおける一塩基多型を検索し、個人識別への応用として適した複数の一塩基多型箇所を同定する。すでに常染色体や Y 染色体上の一塩基多型の個人識別への応用は国際的に若干の報告もなされているが、MiniPCR に基づく分析の可能性や本邦における多型性について研究された報告はほとんどない。特に、特異な血縁関係を鑑定する場合、X 染色体の分析が有効なことが少ないものの、これまでの STR8 座位のみでは十分な識別能を有しているとは言えない現状を鑑み、これを補うべく、X 染色体上の一塩基多型 (SNPs) に着目し、劣化 DNA 試料分析における X 染色体上の SNPs 解析法として、MiniPCR-SNPs システムの構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) MiniPCR に基づいて分析可能な常染色体および性染色体上の一塩基多型部位の抽出と遺伝子頻度の算出

今回想定したシステムでは、標的の一塩基多型部位を含む 100 塩基対以下の PCR 産物を増幅し、その後蛍光標識したオリゴヌクレオチドを用いて一塩基伸長反応を行い型判定するものである。従って、ヒトゲノム全域を

対象に、タンパク質をコードせず、かつ連鎖不平衡を考慮した部位で、さらにプライマーの設計によって標的箇所を増幅する PCR 産物が 100 塩基対以下で得られるものに限定して抽出した。選択された一塩基多型箇所においては、日本人集団試料を用いて遺伝子頻度を算出し、多型に富んだものを最終的に一塩基伸長反応マルチプレックス解析に用いる。この際、現在、HapMap 計画などによって母集団は極めて少ないが日本人集団を用いた膨大な数の一塩基多型部位が報告されている。よって、これを参考して一塩基多型部位を抽出した。一方、本システムの構築にあたっては、効率的な分析を考慮し、最初の段階で一塩基多型部位を含む領域を増幅するプライマーの T_m 値を同一に調節することで、同時に PCR 増幅できるマルチプレックスシステムの構築を考慮した。

(2) 一塩基伸長反応マルチプレックスの構築

(1) において抽出した一塩基多型部位を同時に解析するマルチプレックスシステムを構築した。一塩基伸長反応のためのオリゴヌクレオチドの塩基数を調節することで同時に 16 箇所の一塩基多型部位を解析するシステムを構築した。Polymerase chain reaction (PCR) condition は 1×GeneAmp PCR buffer、200 mM dNTP (GeneAmp dNTP MIX)、1.5 mM MgCl₂、Each primer set、1.5 U AmpliFaq Gold DNA polymerase、Template DNA 5 ng を混合して、total volume 15 µl とする。PCR 反応は、GeneAmp 9700 (Applied Biosystems 社) を用いて、9600 mode で施行し、predenaturing を 95°C で 11 分施行した後、denaturing を 94°C で 1 分間、annealing を 60°C で 1 分間、extension を 72°C で 1 分間行い、これを 1 サイクルとして合計 35 サイクル施行した後、final extension を 72°C で 7 分間とした。SNPs 解析には一塩基伸長反応に基づいたキットである ABI PRISM[®] SNaPshot[™] Multiplex Kit (Applied Biosystems 社) を用いて、そのプロトコールに従った。泳動は ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて Hi-Di formamide 10.0 µl、GeneScan-120 Liz Size standard 0.5 µl、PCR product 1.0 µl を混合しアプライした。結果の解析には GeneMapper ID v3.2.1 ソフト (Applied Biosystems 社) を使用した。尚、各プライマーセットの 5' 末端には poly GACT を付加することによってマルチプレッ

クスシステムでの解析が可能となるように調節した。

(3) MiniSTR および MiniPCR 一塩基多型マルチプレックスシステムの劣化 DNA 試料への有効性の検討

構築した MiniPCR 一塩基多型マルチプレックスシステムについて、日本人集団 400 人 (男性 200 人、女性 200 人) を解析し、その遺伝子頻度などを算出した。一方、実務試料などを用いて劣化 DNA 試料の分析を行い、その有効性を検討した。分析する劣化試料としては、法医実務試料および酵素によって人工的に低分子化した DNA、ホルマリン固定後のパラフィン包埋された臓器である。

4. 研究成果

X 染色体上に位置する 16 の SNPs (rs4827155, rs471205, rs7884160, rs16982419, rs985251, rs3813932, rs6630351, rs4132871, rs5966270, rs7471388, rs6641116, rs6521038, rs5990560, rs5959408, rs414960, rs3006142) を解析する MiniPCR-SNPs システムの構築に成功した。日本人集団の解析の結果、いずれの SNP でもハーディ・ワインベルグからの乖離は認められなかった。また、解析した 16 SNPs の各組み合わせについて Pair-wise LD (D') を算出したところ、いずれも連鎖不平衡が極めて弱いことが判明した。さらに、日本人集団 400 人の解析の結果、Combined PD は 0.999942 と算出され、その識別能の高さを実証することができた。

一方、劣化 DNA 試料の解析実験では、本システムの有効性を実証することができた。例えば、死後直後に解剖し、ホルマリン固定の後にパラフィン包埋した肝臓組織から QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、市販のキットである Yfiler kit (Applied Biosystems 社) と本システムとで解析能の比較検討をした。その結果、Yfiler kit では型判定可能である座位が 8 座位 (全 16 座位中) であったものの、本システムでは解析した 16 SNPs の全てでタイピング可能であった。これは、ホルマリン固定によってより低分子化した DNA 試料からも本システムでの高い解析能を実証したものとと言える。

以上から、劣化した DNA 試料の個人識別においては、市販されているキットでの分析に加えて、本システムを併用することによって、より精度の高い個人識別が可能になることが示唆される。さらに、今後、解析できる SNPs

の数を増やすことによって、さらなる個人識別技術の向上に繋がるものと判断され、未だに身元確認の困難な様々な事例の個人同定への可能性が期待でき、さらには、古代人の遺伝子解析技術にも適用することで、考古学的意義も示唆される。

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)

[学会発表] (計1件)

①沖貴仁、林徳多郎、太田正穂、浅村英樹 (劣化試料に対する MiniX-STR 法及び MiniXPCR-SNPs法の有効性) 第18回日本DNA多型学会、2009.11.20、久留米

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅村 英樹 (ASAMURA HIDEKI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80324250