

令和 6 年 4 月 10 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18991

研究課題名（和文）個人識別を目的とした試料の劣化に頑強な新規微生物叢解析法の開発

研究課題名（英文）Development of a new robust method for microbiome-based personal identification

研究代表者

豊間根 耕地（Toyomane, Kochi）

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号：70845362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らが開発した微生物叢解析法であるメタCRISPR解析法を用いて、DNA型鑑定が困難な超微量試料でも微生物叢解析による個人識別が可能か明らかにすることを目的として、模擬的な試料をヒトDNA型検査とメタCRISPR解析でそれぞれ解析した。その結果、ヒトDNA型検査で型情報を全く得られない試料において、メタCRISPR解析では対照と類似する結果が得られた事例が確認された。このことから、ヒトDNA型検査による個人識別が困難な試料でも、メタCRISPR解析を行うことで個人識別が可能になると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の表面にはヒトDNAより多量の微生物DNAが存在していると考えられており、ヒトDNAが十分に採れない場合の個人識別を目的として、これまでに各国で微生物叢の保持する遺伝情報を用いた個人識別法の開発が試みられてきた。しかし、試料中に含まれるDNA量が微量な場合に、微生物DNAを利用した個人識別が一般的なヒトDNA型検査と比較してより有効であることを実証した研究は例がない。本課題で検証した結果、前課題で開発したメタCRISPR解析はヒトDNAがほとんど含まれない試料でも個人識別が可能ながあることが明らかになり、微生物叢の保持する遺伝情報の有用性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：The mock forensic samples with low biomass were analyzed by using both metaCRISPR typing, a previously developed microbiome-based personal identification method, and human DNA typing. CRISPR sequences were similar to those of the donor for some mock samples, for which no information was obtained from human DNA analysis. These results indicate that metaCRISPR typing may provide additional information for personal identification of low-biomass samples that cannot be identified by conventional human DNA analysis.

研究分野：法科学

キーワード：個人識別 CRISPR 微生物叢

1. 研究開始当初の背景

犯罪捜査においては、犯罪現場に残された生体試料の由来する人物を特定するために、キャピラリー電気泳動を用いた DNA 型鑑定による個人識別が行われ、事件の解決に重要な役割を果たしている。一方、DNA 型鑑定では試料中に一定量のヒト DNA が必要であり、被疑者の接触痕などから採取される微量な DNA からは正確な判定が困難である。近年、超微量試料を用いた個人識別を目的として、試料中に含まれる微生物の DNA を解読する、微生物叢解析を利用した個人識別法の開発が進められている<sup>[1]</sup>。一方で、従来の DNA 型鑑定に用いることができない超微量試料において、実際に微生物叢解析による個人識別を試みた研究はなされていない。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、研究代表者らが開発した微生物叢解析法であるメタ CRISPR 解析法を用いて、DNA 型鑑定が困難な超微量試料でも微生物叢解析による個人識別が可能か明らかにすることである。

CRISPR はスペーサーと呼ばれる短い配列と、スペーサーを挟むリピートと呼ばれる配列を繰り返し単位とするゲノム上の繰り返し配列である (図 1)。CRISPR のスペーサー配列は各々ユニークであり、その配列は同一種内でも高い配列多型性を示すことが知られている。研究代表者らは、前研究課題「ヒト常在微生物叢における CRISPR の多型性を応用した新規個人識別法の開発」(研究活動スタート支援、19K24245) において、CRISPR 配列を指標とした微生物叢解析法であるメタ CRISPR 解析法を開発し、メタ CRISPR 解析法が従来の 16S rRNA 遺伝子配列を指標とした微生物叢解析法よりも個人識別において有用であることを示した<sup>[2]</sup>。本研究課題では前研究課題で開発したメタ CRISPR 解析法の最適化を行い、さらに従来の DNA 型検査法と比較し、超微量試料における有用性を検証した (図 2)。

なお、本研究課題では当初、腐敗等によって劣化した試料の解析を予定していたが、新型コロナウイルス感染症の流行に伴って採材計画に大幅な修正が必要になったため、模擬的な超微量試料の解析を行うこととした。

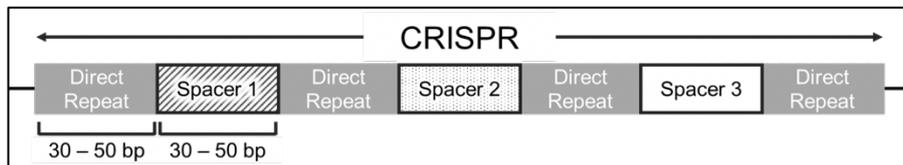


図 1 CRISPR の構造

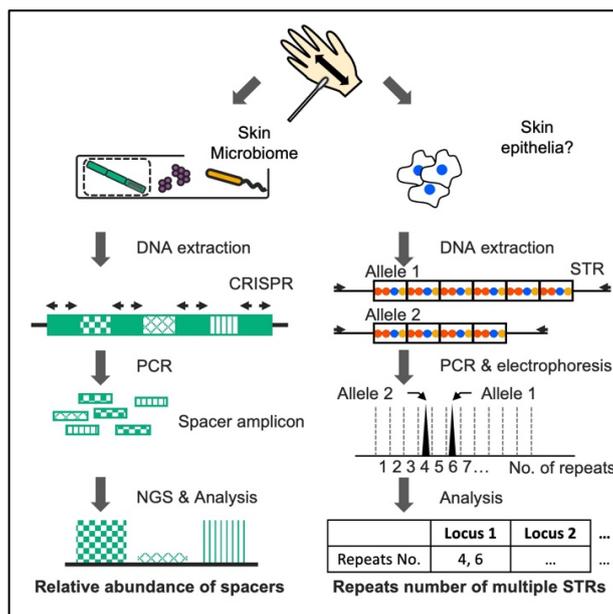


図 2 本研究課題の概要

### 3. 研究の方法

#### (1) DNA 抽出法の最適化

前研究課題においては DNA の抽出に微生物 DNA の抽出に汎用される DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen 社、以下 PS) を使用していた。一方、法科学領域においては同社製の自動 DNA 抽出装置である EZ1 Advanced XL 及び抽出試薬である EZ1 DNA Investigator kit が DNA 抽出に用いられる (以下 EZ1)。法科学領域で用いられる EZ1 がメタ CRISPR 解析における微生物 DNA の抽出にも使用できるか検討するため、同一人の手から皮膚スワブを同時に 2 つ採取し、それぞれ PS 及び EZ1 を用いて DNA 抽出を行った。二つの DNA 抽出試薬を利用して皮膚スワブから抽出した DNA について、qPCR 法による細菌 DNA 濃度の定量を行った。また、同 DNA を試料として、次世代シーケンサー MiSeq を用いて 2 種類のレンサ球菌 CRISPR 配列のアンプリコンシーケンス解析を実施し、微生物叢データ解析環境である QIIME2 によるデータ解析を行って、Bray-Curtis 指数による試料間の多様性の類似度について評価を行なった。

#### (2) 超微量試料による個人識別

CRISPR 配列解析の個人識別における有用性を検討するために、ヒトの皮膚スワブから抽出した DNA について、水で希釈した上でレンサ球菌 CRISPR の配列解析とヒト DNA 型検査を実施し、結果を比較した。レンサ球菌 CRISPR の配列解析については、(1)と同様に CRISPR 配列のアンプリコンシーケンス解析を実施し、同一人の唾液試料 (対照試料) との Bray-Curtis 指数が 0.8 を下回った場合に類似性があると判定した。DNA 型検査については、法科学領域で一般に使用される DNA 型検査試薬である GlobalFiler kit を用いた PCR 増幅を行い、キャピラリー電気泳動法によるフラグメント解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) DNA 抽出法の最適化

PS と EZ1 について細菌 DNA の抽出効率を比較したところ、いずれの手法を用いた場合でも DNA の抽出量に大きな差はないと考えられた (図 3)。また、CRISPR 配列の多様性解析を実施し、得られたスペーサー配列多様性の類似度を Bray-Curtis 指数によって評価したところ、PS と EZ1 についていずれの手法を用いた場合でもスペーサー配列多様性は影響を受けないと考えられた。

このことは、前研究課題で用いた PS を EZ1 に変更することで、DNA 抽出の自動化が可能であること、DNA 型検査用に抽出した DNA をそのままメタ CRISPR 解析にも使用可能であることを意味する。

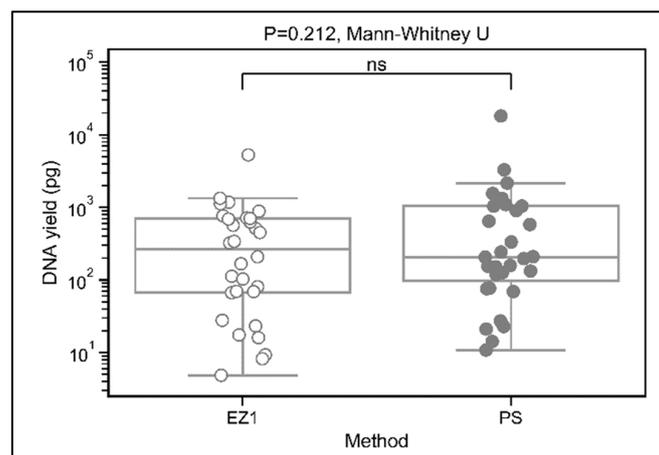


図 3 DNA 抽出効率の比較 (文献<sup>[3]</sup>より引用)

#### (2) 超微量試料による個人識別

ヒトの皮膚スワブから抽出した DNA (n=8) について、水で希釈した上でレンサ球菌 CRISPR の配列解析とヒト DNA 型検査を実施した。DNA 型検査を行ったところ、8 試料中 6 試料では全座位において DNA 型が観察できず、個人識別が不可能であった。同 6 試料についてレンサ球菌 CRISPR の配列解析を行ったところ、8 試料中 3 試料において、2 種類のレンサ球菌 CRISPR のうち 1 種類で対照試料との Bray-Curtis 指数が 0.8 を下回る結果が得られ、類似性があると判定された。

このことは、メタ CRISPR 解析を実施することで、DNA 型検査が不可能な超微量試料においても個人識別が可能になることを示唆するものである。

### (3) 総括

以上の結果から、超微量試料におけるメタ CRISPR 解析による個人識別の有効性が示唆された。微生物叢解析を利用した個人識別法の開発研究は各国で進められているが、これまでにヒト DNA 型検査と比較を行った研究は、次世代シーケンサーを用いたヒト DNA 型検査と微生物叢解析の比較を行った Schmedes ら<sup>[4]</sup>による報告のみである。実務において汎用されているキャピラリー電気泳動法によるヒト DNA 型検査を微生物叢解析と比較した研究は例がなく、本課題において初めて実施された。

ヒト DNA 型検査と比較した際にも一定の優位性があると期待されることから、集団規模の調査等の今後の検証を加えることで、今まで良好な結果が得られなかった試料についても個人識別が可能になると期待される。

### [引用文献]

1. T. H. Clarke, et al., Integrating the microbiome as a resource in the forensics toolkit. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2017. **30**: 141-147.
2. K. Toyomane, et al., Evaluation of CRISPR Diversity in the Human Skin Microbiome for Personal Identification. *mSystems*, 2021. **6**(1): e01255-20.
3. K. Toyomane, et al., Optimization of microbial DNA extraction from human skin samples for CRISPR typing. *Forensic Science International: Reports*, 2022. **5**: 100259.
4. S. E. Schmedes, et al., Targeted sequencing of clade-specific markers from skin microbiomes for forensic human identification. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2018. **32**(August 2017): 50-61.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toyomane Kochi, Akutsu Tomoko, Watanabe Ken, Yamagishi Takayuki, Kubota Satoshi	4. 巻 65
2. 論文標題 Potential application of Staphylococcus species detection in the specific identification of saliva	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102320 ~ 102320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2023.102320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toyomane Kochi, Yokota Ryo, Watanabe Ken, Akutsu Tomoko, Asahi Ai, Kubota Satoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Optimization of microbial DNA extraction from human skin samples for CRISPR typing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forensic Science International: Reports	6. 最初と最後の頁 100259 ~ 100259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fsir.2022.100259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toyomane Kochi, Yokota Ryo, Watanabe Ken, Akutsu Tomoko, Asahi Ai, Kubota Satoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Evaluation of CRISPR Diversity in the Human Skin Microbiome for Personal Identification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.01255-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 豊間根耕地, 木村有里, 深川貴志, 山岸孝幸, 渡邊賢, 阿久津智子, 旭愛, 窪田聡, 関口和正
2. 発表標題 メタCRISPR型別はDNA型検査による個人識別を補完可能か
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊間根耕地、横田亮、渡邊賢、阿久津智子、旭愛、窪田聡
2. 発表標題 CRISPRの多様性解析による個人識別法の開発
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 豊間根耕地	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 80
3. 書名 生物の科学 遺伝 2023年5月発行号 (Vol.77 No.3)	

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関