

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10515

研究課題名(和文) 一歩踏み込んだSTR検査：近接するSNPとの同時検査法の開発

研究課題名(英文) Single nucleotide polymorphism-short tandem repeat analysis system for Japanese people

研究代表者

大内 司 (Ohuchi, Tsukasa)

東北大学・医学系研究科・技術専門職員

研究者番号：90712266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：法医実務においてDNA型鑑定は個人差のあるShort Tandem Repeat (STR)を対象に実施されているが、STRに隣接する一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) と合わせて識別することでさらなる精度向上が見込まれる。本研究では日本人のDNA多型情報から9座位のSTRとそれらに隣接するSNPを標的とし、広く普及しているキャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis; CE) 法により反応系の構築を試みた。結果、8座位で正しく型判定でき、同法によりDNA型鑑定の精度向上を図ることが可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のCE法によるSTR検査はSTRの反復数(長さ)のみが対象で、STRの塩基配列そのもの並びにSTRに隣接するSNPを識別できない点で改善の余地が残されている。近年開発された超並列シーケンシング (Massively Parallel Sequencing; MPS) 法は同問題を一挙に解決可能だが、コスト面から各鑑定機関で運用することは現実的でない。

本研究では各鑑定機関で実施可能なCE法を利用して精度向上を図るため、STRの反復数に加えSNPを同時に識別する反応系の構築を試みた。結果としてSNP情報を追加した検査が可能となり、実務レベルでより詳細なDNA型鑑定が可能となると期待された。

研究成果の概要(英文)：In forensic practice, DNA typing is mainly performed targeting highly polymorphic short tandem repeats (STRs). However, it is expected that the discrimination ability can be improved by adding information on single nucleotide polymorphisms (SNPs) adjacent to STRs. In this study, we targeted nine STR loci and their adjacent SNPs based on DNA polymorphism information of Japanese and attempted to construct a reaction system using the widely used capillary electrophoresis (CE) method. As a result, correct typing was possible at eight loci. It was suggested that this method could contribute to improving the accuracy of DNA typing.

研究分野：法医学

キーワード：個人識別 SNP-STR Compound marker

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 法医学実務における DNA 型検査は、一般に核 DNA の Short Tandem Repeat (STR) を標的とした STR 型検査法によって行われ、キャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis; CE) により塩基長に応じて型判定される。現在では 21 の STR 座位を対象とした検査キットが実務導入され広く用いられている¹⁾。しかし、同法は 2 種の塩基配列情報が欠落している点で改善の余地がある (図 1)。1 つは STR 領域内のイソアレル (長さが同じでも配列が異なるアレル) であり、もう 1 つは STR 領域外のフランキング領域に存在する一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) である。STR 型検査の精度をより向上させるにはこれら情報を補完することが求められる。

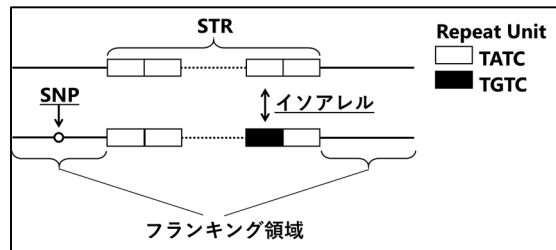


図 1 イソアレルと SNP の例

(2) 上記問題を同時に解決する方法として我々は超並列シーケンシング (Massively parallel sequencing; MPS) を適用し、日本人で頻出するイソアレル及び SNP を報告した²⁾。しかし、高額な MPS を日常的に各検査機関が運用するのは困難であることが指摘される。実務的に導入可能な代替法を考慮したところ、イソアレルは MPS に頼らざるを得ない一方、STR に隣接する SNP については、中国のグループにより報告されている手法で検査可能であると考えられた (図 2)^{3,4)}。同手法は各検査機関が保有する CE 装置を用いて SNP と STR を同時に検出する方法であり、本研究では現在実務に導入されている 21 の STR 座位のうち、日本人で頻出していることが確認された STR に隣接する SNP を標的とし、CE による SNP と STR の同時検出法の構築を試みた。

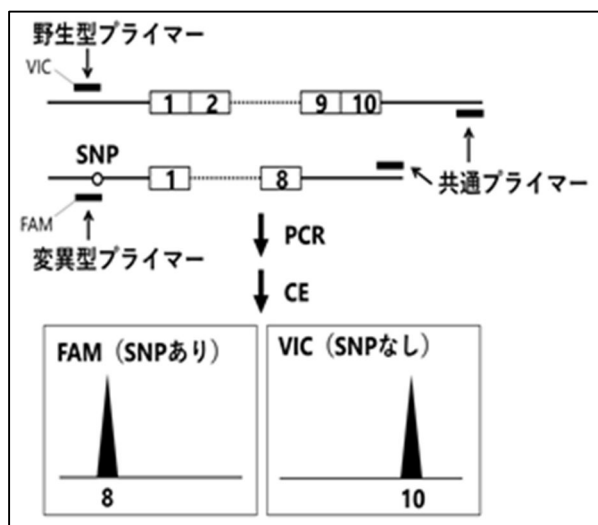


図 2 本研究で利用した SNP と STR の同時検出法: STR のフランキング領域の SNP 位置にて野生型及び変異型でそれぞれ異なる蛍光標識を施したプライマーを設計する。一方、STR を挟んだ対側では共通のプライマーを設計する。従来法と同様に PCR 増幅と CE により STR の塩基長に応じて型判定されるが、蛍光標識によって SNP の有無が判別可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、従来の STR 型検査では判別不能なフランキング領域の SNP 情報を補完するため、各鑑定機関が保有する CE 装置を用いて SNP と STR の同時検出法を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 既に MPS による STR 型解析にて DNA 型が判明している、血縁関係のない日本人 (健康な成人) の血液由来の DNA 試料から、標的とする SNP でヘテロ接合体となっているものを中心に 8 試料を選別し試料とした。なお、本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。

(2) 日本人 DNA 多型データベース²⁾ から 9 組の SNP 及び STR を抽出した (表 1)。塩基配列情報に基づき SNP 位置にて野生型及び変異型特異的プライマー (野生型には FAM または NED 標識、変異型には SUN または PET 標識を施した。) を、また STR 領域を挟んで対側に共通プライマーを設計した。

(3) 鋳型 DNA (1ng) と各プライマー (終濃度 0.15 μ M) 及び PlatinumTM Multiplex PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific; TFS) を混合し PCR 増幅を行った (マルチプレックスにより実施)。増幅産物 1 μ L に Hi-DiTM Formamide (TFS) 9 μ L 及び GeneScanTM 600 LIZTM dye Size Standard v2.0 (TFS) 0.8 μ L を混合し、CE で分離した後、GeneMapperTM ID-X Software v1.6 (TFS) を用いて 175RFU を閾値として型判定を行った。

表 1 標的とした STR 及び SNP

STR座位	染色体	rsID ¹	野生型	変異型	STRからの距離 ² (bp)
D1S1656	1	rs4847015	C	T	+6
D2S441	2	rs74640515	G	A	-25
D3S4529	3	rs149466976	G	A	+10
D5S2800	5	rs12187142	C	T	+12
D5S818	5	rs25768	A	G	+16
D7S820	7	rs16887642	G	A	+9
vWA	12	rs75219269	A	G	-7
D13S317	13	rs9546005	A	T	+1
D16S539	16	rs11642858	A	C	+19

¹ NCBI (National Center for Biotechnology Information)で付される SNP の ID。

² STR から上流方向を -、下流方向を + で示す。bp は base pair の略。

4. 研究成果

本研究では 9 組の SNP と STR を効率的に検出・解析するため、2 種のマルチプレックスによる反応液 (SetA 及び SetB) を作製して検討を行った (図 3)。

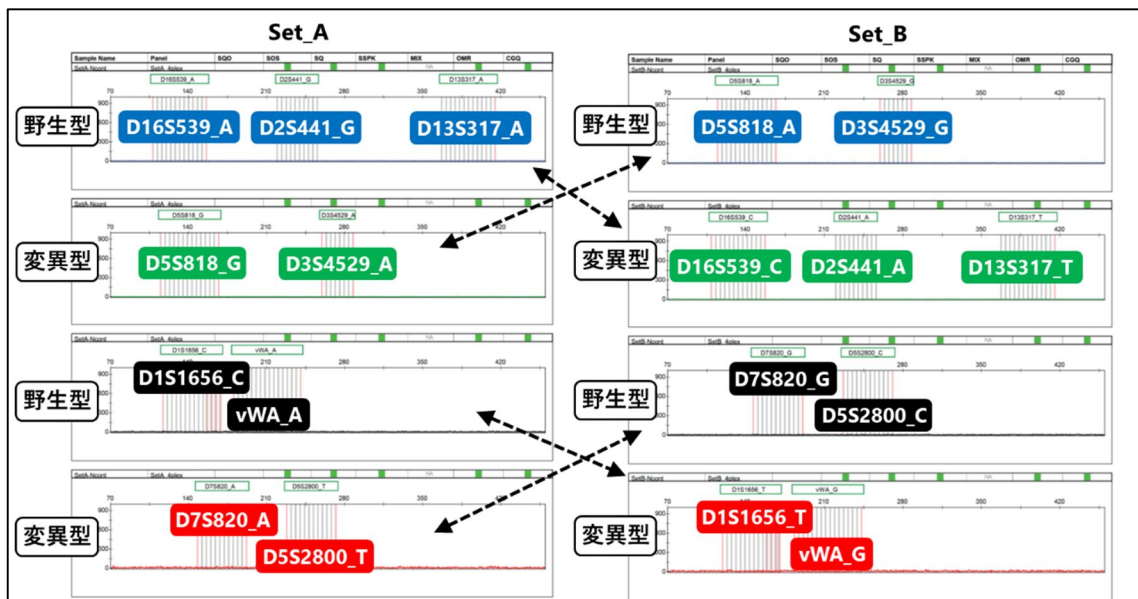


図 3 SetA は 5 組の野生型アレル (青及び黒) と 4 組の変異型アレル (緑及び赤) を検出し、逆に SetB は 5 組の変異型アレル (緑及び赤) と 4 組の野生型アレル (赤及び黒) を検出する系とした。

検討の結果、9 組の組み合わせの内 rs149466976-D3S4529 を除く 8 組で、一部スタターと呼ばれる副産物が検出された座位も確認できたが、既知の DNA 型と一致する結果が得られた (図 4a、b)。残る rs149466976-D3S4529 については複数のプライマーを設計して検討したが、変異型アレルの検出が困難であった (図 4c)。引き続きプライマーの再設計あるいは PCR 条件の再検討が必要であると考えられた。

以上より、本研究では対象とした 9 組中 8 組で SNP と STR の同時検出を可能とする反応系を構築できた。今後は残る 1 組について再検討すると共に、検査試料の数を増やし同検査法の正確性や再現性等について検証する予定である。

最後に、従来の CE による STR 型検査では STR に隣接する SNP 情報を利用することができなかったが、本研究により少なくとも 8 組の SNP と STR で検査可能であることが確認できた。よって、本検査法により高額な MPS に頼ることなく STR 型検査の精度向上が可能であることが示され、実務導入に向けて引き続き検討を行うことが必要であると考えられた。

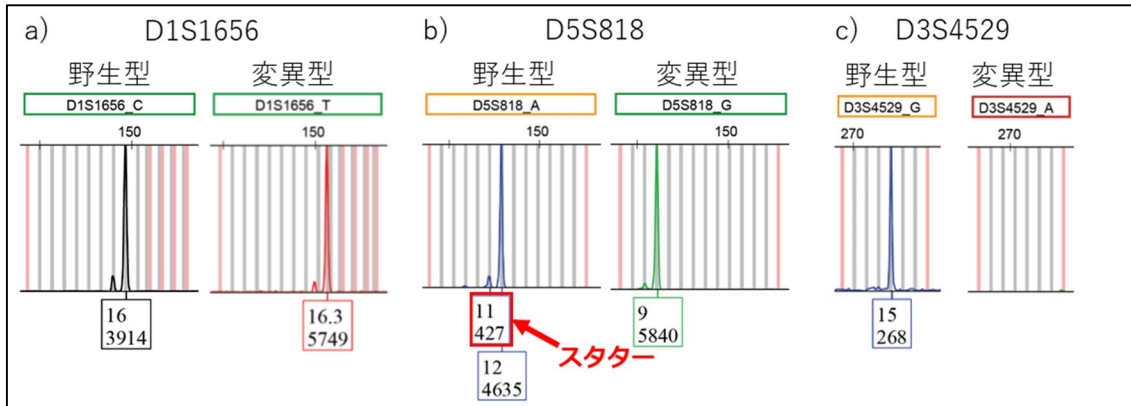


図 4 a) SNP と STR の同時検出が可能であった座位の例。野生型及び変異型アレル共に既知の DNA 型が得られた。b)野生型及び変異型アレル共に既知の DNA 型が得られたが、野生型アレルでスタターが検出された。c)野生型アレルでは既知の DNA 型が得られたが、変異型アレルでは既知の型「16」が検出されなかった。

<引用文献>

Allele frequencies for 21 autosomal short tandem repeat loci obtained using GlobalFiler in a sample of 1501 individuals from the Japanese population. Fujii K, Watahiki H, Mita Y, Iwashima Y, Kitayama T, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K. Leg Med (Tokyo). 17 (2015) 306-308.

Allele frequencies of 31 autosomal short tandem repeat (auSTR) loci obtained using the Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 in 322 individuals from the Japanese population. Ohuchi T, Guan X, Hirai E, Hashiyada M, Manabe S, Akane A, Adachi N, Tamaki K, Funayama M. Leg Med (Tokyo). 59 (2022) 102151.

A novel multiplex assay of SNP-STR markers for forensic purpose. Wei T, Liao F, Wang Y, Pan C, Xiao C, Huang D. PLoS One. 13 (2018) e0200700.

Two-person DNA mixture interpretation based on a novel set of SNP-STR markers. Tan Y, Bai P, Wang L, Wang H, Tian H, Jian H, Zhang R, Liu Y, Liang W, Zhang L. Forensic Sci Int Genet. 37 (2018) 37-45.

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 Tsukasa Ohuchi, Xueting Guan, Eriko Hirai, Masaki Hashiyada, Sho Manabe, Atsushi Akane, Noboru Adachi, Keiji Tamaki, Masato Funayama	4. 巻 59
2. 論文標題 Allele frequencies of 31 autosomal short tandem repeat (auSTR) loci obtained using the Precision ID GlobalFiler NGS STR Panel v2 in 322 individuals from the Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102151	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 1件）

1. 発表者名 大内司、GuanXueting
2. 発表標題 従来のSTR型検査を補完するSTRと一塩基多型の同時検出法の開発
3. 学会等名 日本DNA多型学会第32回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsukasa Ohuchi、Sohtaro Mimasaka
2. 発表標題 Single nucleotide polymorphism-short tandem repeats analysis system for Japanese people
3. 学会等名 the 30th Congress of the International Society for Forensic Genetics（国際学会）
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------