

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号: 10107

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2010~2011

課題番号: 22790592

研究課題名(和文) RNA分解酵素Aのミスマッチ認識能を利用した新たな個人識別システムの構築

研究課題名(英文) Individual identification by discrimination of mismatch nucleotides using RNase A

研究代表者

浅利 優 (ASARI MASARU)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 40360979

研究成果の概要(和文):

ABO式血液型遺伝子に観察される遺伝子多型 261G/deletion、796C/A は、合成 RNA を鋳型として DNA/RNA キメラプローブおよび RNA 分解酵素 A を用いて鋳型-プローブ間に形成されるミスマッチに基づいて型判定が可能であった。プローブの鎖長および SNP に対応する RNA 塩基の位置は型判定時の検出感度および特異性に影響を与えた。さらに、プローブの鎖長を変えることで同時型判定が可能であった。

研究成果の概要(英文):

In 261G/deletion and 796C/A on the human ABO gene, we could genotype the SNP alleles based on the mismatches between template-probe duplexes using synthesized RNA, DNA/RNA chimeric probes, and RNase A. The lengths of probes and the positions of RNA bases corresponding to the SNP affected the sensitivity and specificity of genotyping. Furthermore, the genotypes in two loci were identified by probes designed with the different sizes.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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: 個人識別・一塩基多型・RNA 分解酵素 A

1. 研究開始当初の背景

1) 法医学領域においては個人識別法として遺伝子多型解析が利用されており、核ゲノムに広範囲に存在している繰り返し配列 (STR)

の解析が主流となっている。現在では複数の STR が判定可能なタイピングキットが市販されており、比較的簡便な操作で解析が可能となっている。しかしながら、STR の判定に

は複雑な多型構造を含んだ領域を正確に増幅する必要があり、しばしば試料の劣化に伴う DNA の低分子化が原因で STR 解析が困難である場合が少なくない。このことから、2000 年前後から個人識別を目的とした多型研究が核 DNA の STR からミトコンドリア DNA (mtDNA) の一塩基多型 (SNP) へとシフトしてきた。mtDNA は母系遺伝以外にも、1 細胞あたりに数百～数千コピー存在するなど、微量試料を多く扱う法医学分野の解析に魅力的な特徴を有しているが、世代間や一個体内でも異なる型を示す場合があるため、利用可能な範囲が限定されている。

(2) 近年では、常染色体上の SNP が STR と比べて短い領域が増幅標的となりうることから個人識別マーカーとして注目されている。より短い領域を対象とすることで高感度な検出、DNA の断片化が進行した試料からであっても良好な結果が期待できる。また、SNP は STR と比べて突然変異の発生頻度が低いことから、親子鑑定などの世代間の評価においてより使いやすいマーカーとなると考えられる。

(3) これまでに SNP 解析法として多くの検出技術が報告されている。法医学領域においても PCR-制限酵素法、一塩基伸長反応法やアレル特異的 PCR などが知られており、多くは PCR 法に基づいて行われる。しかしながら、これまでに知られている方法はある程度限定された SNP においては有効であるものの、必ずしも検査に適するものではないと考えられる。現在のところ、DNA アレイは非常に多くの情報を得られる遺伝子解析技術として知られているが、操作の煩雑さや解析時間、コスト面で広範囲な利用は難しいものと考えられる。さらに、法医学領域で扱うことの

多い劣化した試料や微量な DNA を用いた場合の有効性が明らかとなっていない。大量の SNP を対象として検出感度、低コスト化、操作の簡便さなど、考慮されるべき点が非常に多いことが法医学領域での個人識別法の発展に障害となっており、これらの問題を解決した法医鑑定に利用可能な SNP 解析法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

合成 RNA を鋳型として SNP に対応する位置に RNA 塩基を挿入した蛍光オリゴヌクレオチドからなる DNA/RNA キメラプローブおよび RNA 分解酵素 (RNase) A を用いて 2 本鎖の RNA-RNA 複合体のミスマッチを検出する新たな SNP 判定法の構築することを目的とする。

(1) ゲノム DNA からインビトロ転写反応により大量の RNA が合成可能であるか (2) DNA/RNA キメラプローブおよび RNase A を用いることで明確な SNP 判定が可能であるかについて検討する。これらをもとに、個人識別に利用可能な多座位 SNP 判定法への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 鋳型 RNA の調製

健康な日本人から採取した口腔内細胞より市販のキットを用いてゲノム DNA を抽出した。この DNA から SNP を含む領域を PCR にて増幅後、T7RNA ポリメラーゼを用いたインビトロ転写反応により RNA 合成を行った。増幅領域はヒト ABO 式血液型糖鎖抗原に関連するトランスフェラーゼ遺伝子のエクソン 5、6 および 7 とし、220C/T、261G/deletion、297A/G、703G/A、796C/A および 803G/C の計 6 座位を含む部位のプライマーをそれぞれ設計した。

なお、フォワード、リバースの両方向から転写合成を行った。

(2) DNA/RNA キメラプローブの設計

SNP に対応する部位 261deletion (A) および 796A について DNA オリゴヌクレオチドの代わりに RNA 塩基を含む 20~30 塩基を合成し、5' 末端側を蛍光色素 Fam で標識した。

(3) RNase A 反応

合成 RNA および DNA/RNA キメラプローブを 85°C で 5 分処理し、さらに 4°C で 10 分以上ハイブリダイゼーションさせたのち RNase A を添加しインキュベーションを行った。

(4) シグナル検出

反応液を精製後、サイズスタンダードとして 120LIZ を添加した最終生成物は蛍光検出器を備えたシーケンサー (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) を用いて相対蛍光強度および DNA サイズを確認した。

4. 研究成果

ゲノム DNA から PCR を用いてエクソン 5、6 および 7 を増幅し、精製した PCR 産物を鋳型としたインビトロ転写反応を行うことで、非常に多くの RNA 転写産物を合成可能であった。この結果から、微量な試料からの高い増幅効率が期待できる分析手法であると考えられた。ただし、増幅領域内の塩基配列が RNA 転写効率に大きく影響するため、分析領域の選択も重要であると考えられた。増幅領域として選択したエクソン 6 ではフォワード側からの転写では少量の RNA しか得られないことが明らかとなった。

261G/deletion および 796C/A を標的とした

SNP 検出はシーケンサーを用いて行い、鋳型 RNA とプローブ内の RNA 塩基がミスマッチを形成する場合には目的とする位置にシグナルが観察されないことを確認した。明確な SNP の識別には、鋳型となる合成 RNA、蛍光 DNA/RNA キメラプローブおよび RNase A の濃度を厳密に調整する必要があり、濃度比率によっては異なる遺伝子型であっても同一のシグナルとなる場合が観察された。なお、蛍光 DNA/RNA キメラプローブの鎖長は 20 塩基に比べて 30 塩基程度の長い場合に顕著に大きなシグナル強度が得られた。また、SNP を識別する RNA 塩基は 5' あるいは 3' 末端から数塩基の位置にある場合に比べて、プローブ中央付近に設定した場合でより明瞭にアリルを識別することができた。さらに 2 種類のプローブについて鎖長を変えることで両者を同時に型判定することが可能であった。RNase A のミスマッチ認識能に基づく SNP の識別はプローブの反応性および鋳型となる RNA などの濃度が大きく影響していることが明らかになった。より多くの部位を同時に判定する場合にはこれらの反応条件の最適化、特に RNA 塩基の位置などプローブ設計が極めて重要になるものと思われた。

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 1 件)

M. Asari, T. Omura, K. Oka, C. Maseda, Y. Tasaki, H. Shiono, K. Matsubara, M. Matsuda, K. Shimizu, Multiplex PCR-based Alu insertion polymorphisms genotyping for identifying individuals of Japanese

ethnicity, Genomics, 2012, 99, 227-232.
doi:10.1016/j.ygeno.2012.01.004

〔学会発表〕（計 1 件）

浅利 優 他. 21 座位 STR 判定に基づく身元
確認のための DNA 鑑定. 第 95 次日本法医学
会学術全国集会. 2011 年 6 月. 福島.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅利 優 (ASARI MASARU)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 40360979

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし