

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590847

研究課題名(和文)人工核酸LNAを用いた高感度な挿入欠失多型解析法の確立と個人識別への応用

研究課題名(英文) Genotyping of insertion/deletion polymorphisms using locked nucleic acids for human identification

研究代表者

浅利 優 (ASARI, Masaru)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40360979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ユニバーサルプライマーを用いたPCR産物の蛍光標識において、人工核酸LNAが検出効率へおよぼす影響を明らかにした。T_m値の高い24塩基の蛍光標識ユニバーサルプライマーにLNAを導入することで、18塩基のものより検出効率が向上した。さらに日本人集団に適した常染色体上の37座位挿入欠失多型を選択して頻度解析を行った。出現頻度に基づいた総合同値確率は 2×10^{-15} と低い値となり、個人識別に有効であることが示された。挿入欠失多型の同時判定において、LNAを含む蛍光標識ユニバーサルプライマーはLNAを含まないものに比べて、低濃度(0.1 μM)では特に効率的な蛍光標識に有用であった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of locked nucleic acids (LNAs) for the efficiency of fluorescent labeling of PCR products. When the 24-base universal sequence with a higher T_m value was used, the introduction of a few LNAs significantly improved the efficiency, compared to the results from the 18-base universal sequence. We also selected 37 autosomal insertion/deletion (Indel) polymorphisms, and calculated the frequencies of alleles from 100 Japanese individuals. The matching probability was 2×10^{-15} , and the combination of selected Indels would be useful for individual discrimination. In multiplex Indel genotyping, fluorescent universal primers with LNAs produced higher signals than non-LNA fluorescent universal primers, and the increasing effects were identified especially in the low concentration (0.1 μM) of these primers.

研究分野：法医学

キーワード：個人識別 挿入欠失多型 人工核酸LNA ユニバーサルプライマー

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 鑑定は、犯罪現場試料の特定や災害犠牲者の身元確認などにきわめて有効である。DNA 鑑定では繰り返し配列 (STR) の解析が一般的であり、繰り返し回数の違いに基づいて識別できる。一度の PCR で 20 座位前後の STR について型判定可能なキットが市販されており、簡便な操作で解析が可能となっている。しかしながら、判定には STR を含んだ 400 bp 程度までの領域を増幅する必要があり、試料の劣化が原因で STR 解析が困難である場合が少なくない。必要に応じて増幅産物のサイズを短くした MiniSTR などを追加して解析することが重要となる。また、2-5 塩基の短い挿入欠失多型は STR と比較して突然変異の発生率が低く、増幅領域を短く設定できることから有用性が高いと考えられる。これらを STR と組み合わせることでより精度の高い個人識別が実現可能になるものと思われる。

(2) 現在では非常に多くの多型検出技術が報告されているが、これまでに確立されている方法をそのまま個人識別法として利用することは困難である。多座位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分析法の開発が期待されている。

(3) 蛍光標識ユニバーサルプライマーを用いた PCR 産物の蛍光標識は、複数の領域を効率良く標識可能な方法として知られている (図 1)。

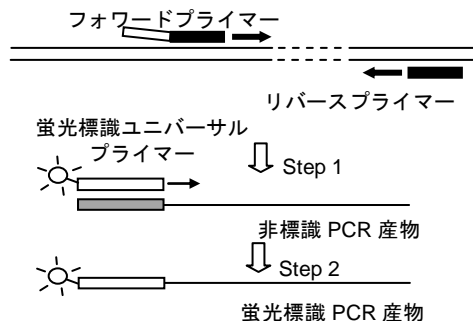


図 1 蛍光標識ユニバーサルプライマーを用いた蛍光標識産物の増幅メカニズム

また、DNA の一部が架橋された人工核酸 Locked nucleic acid (LNA) は DNA に比べて熱安定性に優れることから (図 2)、PCR に基

づいた一塩基多型の識別に有用であり、さらに検出感度への影響が報告されている。

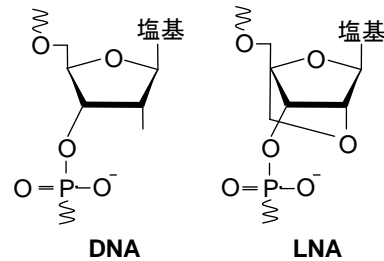


図 2 核酸の分子構造

2. 研究の目的

(1) 蛍光標識ユニバーサルプライマーを用いた PCR 産物の蛍光標識における蛍光標識ユニバーサルプライマーの配列長や LNA 有無の影響を明らかにする。

(2) 日本人集団において挿入欠失多型の頻度解析を行い、個人識別に適した領域を選択する。一般的に利用されている STR の頻度解析もあわせて行い、識別能を比較する。

(3) 挿入欠失多型を対象とした同時解析において、蛍光標識ユニバーサルプライマー内の LNA 有無の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試料と DNA

日本人 100 名より口腔内細胞を採取し、QIAamp DNA Blood Mini Kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した。DNA 濃度は Quantifiler Human DNA Quantification Kit (ABI) を使用して決定した。

(2) 蛍光標識ユニバーサルプライマーの設計

18 塩基の M13(-21)および 24 塩基の M13(-47)に 1~4 塩基を含む配列を合成し、さらに 5'末端に FAM を標識した(表 1)。

表 1 蛍光標識した M13(-21)および M13(-47)配列

Type	LNA(n)	Sequence (5'-3')*
M13(-21)	0	FAM-tgtaaacgacgccagt
	1	FAM-tGtaaacgacgccagt
	2	FAM-tGtaaaaCgacgccagt
	3	FAM-tGtaAaaCgacgccagt
	4	FAM-tGtaAaaCgaCgccagt
M13(-47)	0	FAM-cgCaggggtttcccagtcacgac
	1	FAM-cgCaggggtttcccagtcacgac
	2	FAM-cgCcaGgggtttcccagtcacgac
	3	FAM-cgCcaGggTttcccagtcacgac
	4	FAM-cgCcaGggTttCccagtcacgac

*大文字は LNA 塩基

(3) 蛍光標識ユニバーサルプライマーを用いた蛍光標識

FGA を標的としてフォワードプライマーの 5'末端に蛍光標識されていないユニバーサルプライマーを付加した。蛍光標識ユニバーサルプライマーと共通するユニバーサルプライマーを付加したフォワードプライマー、リバープライマーを用いて PCR を行い PCR 産物は 310 Genetic Analyzer (ABI) を用いて検出した。

(4) 挿入欠失多型解析

① 挿入欠失多型の選択

UCSC ゲノムブラウザおよび dbSNP よりアジア集団でのマイナーアレル頻度が 0.3-0.5 に近い部位を検索した。また、同一染色体上にある部位では互いに 50 cM 程度離れた位置にあるものを選択した。増幅サイズが 40~150 bp の範囲となる領域特異的なプライマーを設計した。なお、領域間の増幅産物は少なくとも 3 塩基以上離れるように設計した。

② 挿入欠失多型の蛍光検出

領域特異的なフォワード、リバープライマーのうち、フォワード側の 5'末端に M13(-47)を付加した。1 反応あたり 9 または 10 座位のフォワードリバープライマーおよび 1 種類の蛍光標識ユニバーサルプライマー FAM-M13(-47)を添加してマルチプレックス PCR を行った。DNA は 1 ng を用いて QIAGEN Multiplex PCR Kit (キアゲン) を使用した。95°C15 分ののち、94°C1 分-62°C1 分-72°C1 分を 30 サイクル行い 72°C60 分の伸長を追加した。PCR 産物は 310 または 3500 Genetic Analyzer (ABI) を用いて検出した。100 名の DNA から、1 名あたり 4 反応行い 38 座位の型を決定した。

③同時判定での LNA の影響

LNA を含むあるいは含まない蛍光標識ユニバーサルプライマー M13(-47)の濃度を 0.1、0.2、0.5 または 1 μM とした。挿入欠失多型は 10 座位を選択して、フォワード、リバープライマーの濃度は 0.1 μM とした。反応液の調製および PCR 産物の検出は方法(4) ②と同様に行った。変更は PCR の時間であり、95°C15 分ののち、94°C20 秒-62°C20 秒-72°C20 秒を 30 サイクル行い 72°C60 分の伸長を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識ユニバーサルプライマーの検出感度への影響

蛍光標識ユニバーサルプライマーの違いによる蛍光強度を比較した。M13(-21)では M13(-47)よりも顕著に増幅効率が低く、3 個の LNA を含む M13(-47)で最も高い蛍光強度が得られた。この結果より LNA の増強効果は Tm 値の高いユニバーサルプライマーで顕著であることが明らかとなった。また、LNA の位置および数が極めて重要であることが示された。

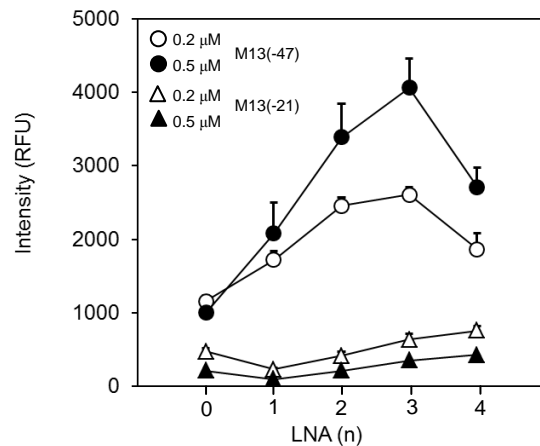


図 3 蛍光標識効率への LNA の影響

(2) 挿入欠失多型の解析

① 多型部位の選択と頻度解析

選択条件を満たす 40 座位を選択した。10 座位を含む 4 セットに分類し、各セットには 10 座位の 40-150 bp の異なる長さの増幅断片を設計できた。各領域の増幅では、予想された位置に検出されることを確認した。蛍光強度が顕著に低いものがいくつかの座位で観察された。最終的に 38 座位の挿入欠失多型を選択した (表 2)。なお、常染色体から 37 座位、性染色体から 1 座位を含んでいる。

表 2 選択した 38 座位の挿入欠失多型

Chr.	rs number	Alleles	rs number	Alleles
1	rs2308039	-/cca	rs56114292	-/ga
2	rs16347	-/tga	rs16624	-/gt
3	rs2308187	-/cat	rs2307754	-/aagt
	rs3030957	-/gtt		
4	rs2308292	-/taagt	rs3039276	-/ca
5	rs1160981	-/cag	rs2308196	-/attg
6	rs2308137	-/ga	rs16678	-/tct
7	rs1160898	-/aca	rs2307978	-/ga
8	rs80241925	-/acta	rs10633116	-/cct
9	rs75179261	-/gatg	rs2307850	-/ggtg

10	rs1160896	-/aaac		
11	rs2307976	-/gaa		
12	rs1610919	-/at	rs2307806	-/tca
13	rs3058720	-/ac	rs2308079	-/ta
14	rs2308153	-/gaa		
15	rs16416	-/acag		
16	rs3069988	-/atc	rs1610863	-/gaa
17	rs3051300	-/gtat		
18	rs61675257	-/ca	rs16428	-/agag
19	rs2043422	-/ctc	rs1160945	-/agg
20	rs3053708	-/at		
21	rs1610995	-/ga		
22	rs2307700	-/tcac		
X/Y	M55418	-/gat		
	/M55419			

② 法科学パラメーターの算出

常染色体 37 座位はハーディーワインベルグ平衡から乖離は認められず、同一染色体にある座位では連鎖不平衡は観察されなかった。各座位の同値確率は 0.347 から 0.507 の範囲にあり、37 座位を合わせた総合同値確率は 2×10^{-15} であった(表 3)。Combined DNA Index System (CODIS) を含む Identifiler キットにより得られる 15 座位のものと近い値であった。個々の識別力が低い non-CODIS STR では 18 座位と近い値となった。

表 3 総合同値確率の比較

種類	領域数	総合同値確率
挿入欠失	38	2×10^{-15}
STR (Identifiler)	15	1×10^{-16}
STR (Non-CODIS)	18	5×10^{-16}

(3) LNA を導入した蛍光ユニバーサルプライマーを用いた蛍光標識

次に 10 座位の挿入欠失多型を対象とした同時増幅において反応時間の短縮を試み、94°C で 20 秒、62°C で 20 秒、72°C で 20 秒を 1 サイクルとした 30 サイクルで十分な蛍光強度のシグナルが検出可能であった。

さらに蛍光標識プライマー内の LNA の影響を明らかにするために、蛍光標識ユニバーサルプライマーの濃度を 0.1、0.2、0.5 または 1 μM 、LNA を 3 塩基含む配列と、LNA を含まない配列での蛍光標識効率を比較した。なお、フォワード (リバーズ) プライマーの濃度は 0.1 μM とした。蛍光標識ユニバーサルプライマーの濃度が 0.1 μM において、LNA の効果が最も大きく、LNA を含まない配列に対して 2.0-3.1 倍 (平均 2.6 倍) の蛍光強度であ

った。それに対して 1 μM では LNA の効果が最も小さく、1.1-2.3 倍 (平均 1.7 倍) であった。また、10 座位間の蛍光強度バランスは 0.2-2.0 の範囲にあり、蛍光標識プライマー濃度の影響は、極めて少ないものであった。

LNA を含む蛍光標識プライマーは低濃度領域で効率的な蛍光標識に有用であることが示された。さらに、蛍光標識ユニバーサルプライマーとフォワード (リバーズ) プライマーとの濃度差が大きくなることで、LNA の効果が減弱することが示唆された。

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 3 件)

- ① M. Asari, K. Okuda, D. Yajima, C. Maseda, C. Hoshina, T. Omura, H. Shiono, K. Matsubara, K. Shimizu, Rapid genotyping of 25 autosomal STRs in a Japanese population using fluorescent universal primers containing locked nucleic acids, J Forensic Legal Med, 査読有, Vol. 36, 2015, pp. 36-41. DOI: 10.1016/j.jflm.2015.01.004.
- ② K. Oka, M. Asari, T. Omura, M. Yoshida, C. Maseda, D. Yajima, K. Matsubara, H. Shiono, M. Matsuda, K. Shimizu, Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR, Mol Cell Probes, 査読有, Vol. 28, 2014, pp. 13-18. DOI: 10.1016/j.mcp.2013.09.002.
- ③ 岡 久美子, 浅利 優, 間瀬田 千香暁, 塩野 寛, 清水 恵子, 松田 光悦, 大村 友博, 松原 和夫, 吉田 将亜, 多座位挿入欠失多型に基づく個人識別法の開発, DNA 多型, 査読無, 21 巻, 2013, pp. 214-217.

[学会発表] (計 3 件)

- ① M. Asari, Fast PCR-based genotyping of 25 short tandem repeats using fluorescent universal primers, 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine, 2014 年 6 月 18 日, Fukuoka.
- ② K. Oka, Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR, 9th

International Symposium on Advances in
Legal Medicine, 2014年6月17日, Fukuoka.

- ③ K. Oka, A new multiplex system for 38
insertion-deletion polymorphism analysis in
Japanese individuals, 日本法医学会全国集
会, 2013年6月27日, 札幌.

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・准教授

研究者番号 : 40360979

(2)研究分担者

大村 友博 (OMURA, Tomohiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号 : 00430935

岡 久美子 (OKA, Kumiko)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 60571891