

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790650

研究課題名(和文)リアルタイムPCRを用いたDNA脱メチル化部位を指標とする精液鑑定法の確立

研究課題名(英文)Development of a realtime PCR-based semen identification method using the semen-specific hypomethylated DNA region

研究代表者

渡邊 賢(Watanabe, Ken)

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号：20532047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：精液特異的な脱メチル化領域として報告されているDACT1遺伝子領域について、バイサルファイトシーケンス法により、各種陳旧体液斑のメチル化状態の解析を行ったところ、陳旧によっても精液特異的な脱メチル化状態が保存されていることが確認され、法医学的精液検査の指標としての有用性が示唆された。さらに、実務を想定したより簡便な検査法として、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCRによる、本領域のメチル化状態の検出系を確立した。本検査法は、精液証明の補助的検査法として、特に陳旧化した試料からの精液証明に有効な検査法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed aged stains of various body fluids by bisulfite sequence analysis for the methylation status in the previously reported semen-specific hypomethylated region, DACT1. The results indicate that the methylation status is stable in each old stain and that this can be a useful marker for forensic semen identification. We further developed a TaqMan realtime PCR detection method to make it easier to analyze the methylation status of DACT1 region. This method can be a useful supplementary tool for semen identification, especially from aged stains.

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：物体検査 人体液斑の同定 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

事件現場から採取された体液試料の鑑定は、STR 型検査などに代表される DNA 型検査技術の発達にともない、今日の科学捜査を行う上で必要不可欠なものひとつとなっている。DNA 型による個人の同定に先立って行われる体液種証明は、解析した試料がどの体液由来のものであるのか明らかにするという点から、その事件における犯罪事実を裏付けるうえで重要な検査項目であり、これまでに血清学的手法や生体酵素反応などを利用した様々な体液種証明法が確立されている。体液検査の中で、精液の証明は、強姦あるいは強制わいせつなどの性犯罪の捜査における重要な検査項目である。現在主に鑑定で行われている精液検査は、精液に特に強い活性があることが知られている酸性ホスファターゼの活性を指標とした予備検査、さらには精液中に特異的にみられるタンパク質である前立腺特異抗原 (PSA) やセミノジェリンを指標とした血清学的検査、顕微鏡によって精子を観察する形態学的検査によって構成されている。

近年、新たな体液検査法として、Frumkin ら (Forensic Sci Int Genet. 2011) 及び Lee ら (Int J Legal Med. 2012) により、組織特異的な DNA メチル化可変領域 (Tissue-specific differentially methylated region) を指標とした、DNA 試料を用いた体液種識別法が相次いで報告された。これらの報告では、血液や唾液などの体液に特異的なメチル化パターン領域は同定されていないものの、精液特異的な脱メチル化を示す領域が複数同定され、この領域を指標とした精液の証明が可能であることが示唆されていた。DNA メチル化を指標とした精液証明は、従来のタンパク質や酵素活性、顕微鏡検査による証明法や、近年報告が相次いで行われている RNA を用いた検査法とは異なり、DNA そのものから検査するため、DNA 型検査との試料の共有が可能となり、試料消費量の節約等による検査効率の向上が期待された。また、陳旧化によるタンパク質等の分解などにより従来の検査法では証明ができない試料からでも検査できる可能性があり、有効な検査法になるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、精液特異的な DNA 脱メチル化領域を用いた精液証明について、実務への応用可能性を検証するため、はじめに、個体差や陳旧試料における安定度の検証を行った。さらに、より鑑定実務に応用可能な検査法とするため、定量的で感度の高い検査法であるリアルタイム PCR 法を用いた、精液特異的な DNA 脱メチル化領域による精液証明法の確

立を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、Lee らによって報告された精液特異的な脱メチル化領域の一つである DACT1 遺伝子領域における複数の CpG サイト (脊椎動物で DNA メチル化が起きるシトシンとグアニンが隣り合う場所) を解析対象とした。

この領域におけるメチル化状態の個体差や陳旧試料における安定度を詳細に解析するため、バイサルファイトシーケンスにより解析を行った。この方法では、バイサルファイト処理により、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、各 CpG サイトがシトシンあるいはチミンとしてシーケンスされる。各種体液試料 (精液、血液、唾液、膿液、各 3-5 検体) から抽出した DNA 20ng 及び陳旧斑痕 (2 年及び 29 年経過精液斑、1.5 年及び 29 年経過血痕) から抽出した DNA のほぼ全量について、EpiTect Bisulfite kit (キアゲン) を用いてバイサルファイト処理を行い、これを鋳型として、DACT1 遺伝子における 14 個の CpG サイトを解析した。なお、29 年経過陳旧斑痕については、1 回目の PCR では増幅産物が検出されなかったため、フォワードプライマーをさらに内側に設計した Semi-nested PCR を行い、11 個の CpG サイトについて解析を行った。また、陳旧精液斑に関しては、陳旧度の指標として、従来の精液証明検査である酸性ホスファターゼ検査 (SM 試薬、和光純薬) 及びバエツキー染色法による精子の顕微鏡検査を行った。

リアルタイム PCR による検出系には、TaqMan プローブを用いた定量的 MSP (Methylation Specific PCR) 法を採用した (Eads et al., Nucleic Acids Res. 2000, Zeschnick et al., Nucleic Acids Res. 2004)。この方法は、バイサルファイト変換後の鋳型 DNA を用いて、特定の CpG サイトに対して設計したメチル化検出プローブ及び非メチル化検出プローブにより、それぞれメチル化あるいは非メチル化 DNA を検出する方法である。

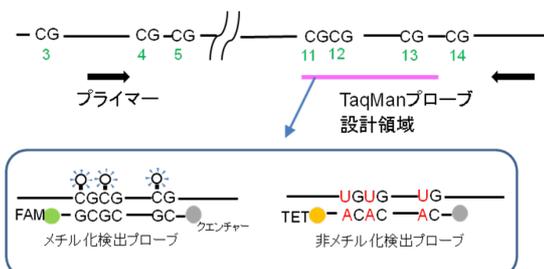


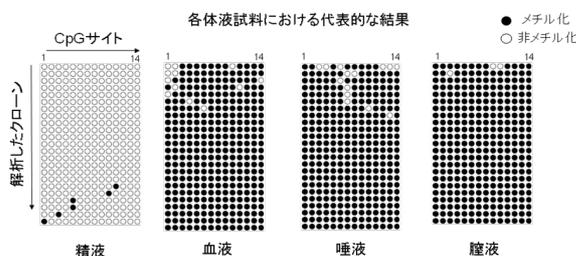
Fig.1 リアルタイム PCR による精液特異的な脱メチル化領域の検出

バイサルファイトシーケンスで解析を行った DACT1 遺伝子領域の 14 箇所の CpG サイトのうち、3 個の CpG サイトに対応する蛍光標識プローブ (メチル化検出: FAM, 非メ

チル化検出：TET)を合成した。さらに、それを挟む形で CpG サイトを含まない位置にプライマーを設計し、EpiTect MethyLight PCR Kit (キアゲン) 及びリアルタイム PCR 装置 (Smart Cycler®, Cepheid) を用いて 114bp を増幅、蛍光検出した (Fig.1)。

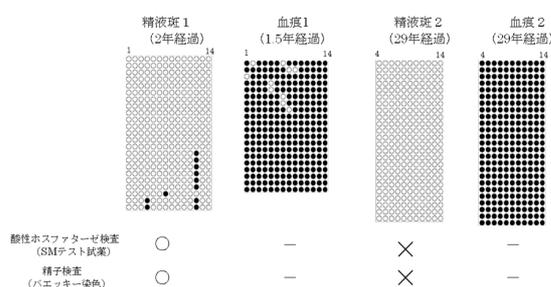
#### 4. 研究成果

精液、血液、唾液、膣液由来のゲノム DNA を用いて、バイサルファイトシーケンス法により、DACT1 遺伝子における 14 箇所の CpG サイトのメチル化様態について解析を行ったところ、精液では極めて低いメチル化率 ( $4.5 \pm 3.5\%$  (平均 $\pm$ 標準偏差))、それ以外の体液では高いメチル化率 (血液:  $95.8 \pm 2.7\%$ , 唾液:  $97 \pm 1.3\%$ , 膣液:  $94.7 \pm 3.8\%$ ) を示し、精液証明に有効な指標であることが示唆された (Fig.2)。



**Fig.2 各体液DNAのバイサルファイトシーケンス解析の結果**

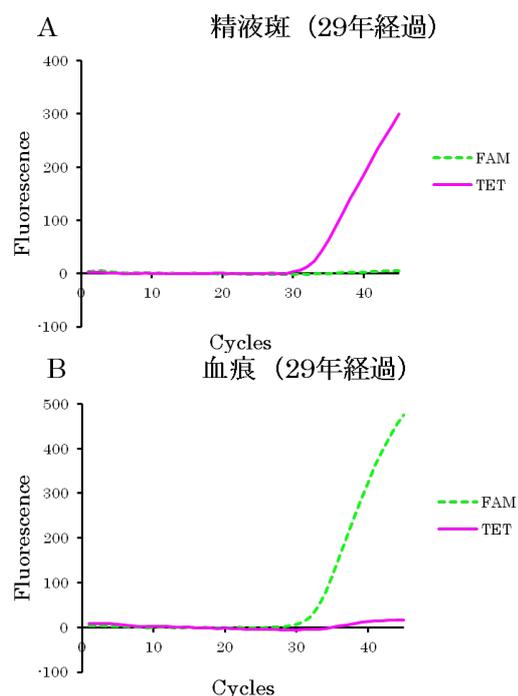
さらに、作製後約 2 年及び 29 年経過した精液斑並びに約 1.5 年及び 29 年経過した血痕からそれぞれ DNA を抽出し、各 DNA について、バイサルファイトシーケンスにより解析を行った。その結果、精液斑由来 DNA では低メチル化状態が観察された一方で、血痕由来 DNA では高いメチル化率が観察され、新鮮な液体試料を用いた際の結果と同様の結果となった (Fig.3)。これらの結果から、法科学分野で通常解析対象となる陳旧化した試料においても、メチル化状態が安定的に保存されていることが示唆された。特に、陳旧により従来の精液検査である酸性ホスファターゼ検査で陰性となり、顕微鏡検査でも完全な形をした精子が同定されなかった精液斑でも、脱メチル化状態が保存されており、精液証明における有用性が示された。



**Fig.3 陳旧斑痕の解析結果**

一方で、高度に陳旧化した試料においては、メチル化解析に過剰な PCR 増幅が必要であり、バイサルファイト反応の副作用として知られる DNA 分解の影響が原因として考えられた。実務を想定した場合、検査の手間やコンタミネーションの危険性等の観点から、より DNA への影響の少ない、簡便で高感度な検査法の確立が必要であると考えられた。

そこで、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR による検出系の確立を試みた。DACT1 遺伝子領域における 3 つの CpG サイトのメチル化 (FAM) 及び非メチル化 (TET) 状態に対応するプローブを設計し、バイサルファイト処理した各種体液 DNA (精液 8 検体、血液 5 検体、唾液 6 検体、膣液 5 検体) 及び陳旧斑痕 DNA (29 年精液斑及び血痕) をリアルタイム PCR で解析した。その結果、陳旧斑痕を含め (Fig.4)、ほぼすべての試料で精液試料からは TET シグナルのみが、それ以外の体液試料で FAM シグナルのみが検出された。精液試料 2 検体及び血液試料 1 検体で、もう一方の蛍光がより大きなサイクル数で検出されたものの、 $\Delta Ct$  値 ( $Ct(FAM) - Ct(TET)$ ) を指標とすることで、精液の証明が十分可能であると考えられた。リアルタイム PCR による検査法は、簡便・迅速で高感度な検査系であり、本検査法は、精子証明の補助検査法として有効な鑑定手法となることが期待される。また、他の体液種に関しても、より特異的なメチル化領域を同定することから、平成 26 年度からの新規研究課題 (課題番号 26860472) において取り組んでいく予定である。



**Fig.4 リアルタイム PCR による精液特異的脱メチル化の検出 (A 陳旧精液斑, B 陳旧血痕)**

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

渡邊賢, 阿久津智子, 櫻田宏一. DNA 脱メチル化部位を指標とした精液証明法に関する予備的検討. 第 82 回日本法医学会学術関東地方集会, 神奈川 (2013.10.19.)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 賢 (WATANABE, Ken)

科学警察研究所・法科学第一部・研究員

研究者番号: 20532047