

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670341

研究課題名(和文)核DNA挿入ミトコンドリアDNA配列の解析を利用した法医年齢推定法の確立

研究課題名(英文)Development of a novel method for forensic age estimation by NUMTS analysis

研究代表者

馬淵 正 (MABUCHI, Tadashi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80150308

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)：法医学において年齢推定は重要な鑑定項目の1つであるが、DNA解析による方法はまだ確立されていない。本研究では、染色体DNA上のミトコンドリアDNA(mtDNA)配列(NUMTS)の生成機構に着目して、DNA解析による年齢推定法の確立を目指した。そこで、時間依存的因子により生じる二本鎖切断の修復時に、新たなNUMTSが生じることを証明する実験系の構築を行った。染色体に組み込まれた時のみ蛍光が出るよう改変した遺伝子をもつmtDNAを導入した培養細胞の作製を試みた。また、染色体の特定部位を制限酵素で切断し、その修復時に取り込まれるDNAを解析可能な実験系の構築を行った。研究は現在も継続中である。

研究成果の概要(英文)：Estimation of human age is one of the most important problems to be solved in forensic sciences. However, DNA-based approaches are quite limited in this field. In this project we challenged to develop a new method for age determination using the analysis of nuclear insertions of mitochondrial sequences (NUMTS). We focused on the mechanism of NUMTS formation, i.e. insertions of mtDNA occur at the sites of DNA double strand breaks (DSBs) on chromosomal DNA (chrDNA) during the non-homologous end joining repair. Because the DSBs can be produced by reactive oxygen species, one of time dependent factors, newly formed NUMTS could be used for age prediction. Thus, we planned to construct cell lines by which we can detect newly appeared NUMTS using recombinant mtDNA carrying GFP gene expressed only inserted into chrDNA. Also, we tried to construct cell lines by which we can introduce DSBs at specific positions using the endonuclease I-SceI. We now go on with the project.

研究分野：分子生物学

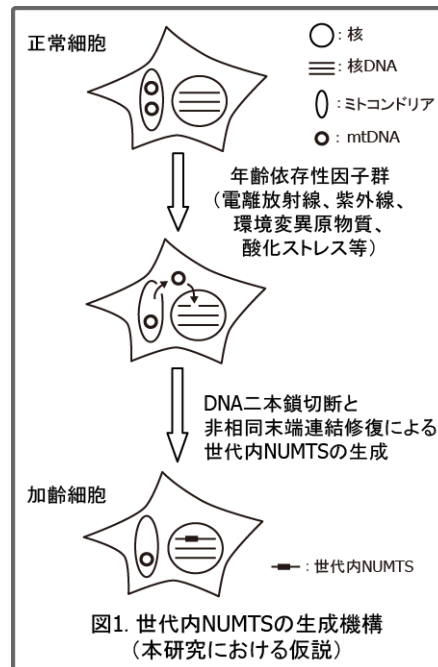
キーワード：法医学 年齢推定 NUMTS ミトコンドリアDNA DNA二本鎖切断 非相同末端連結修復 マイクロホモロジー DNA挿入

1. 研究開始当初の背景

法医学において、DNA 解析はすでに個人識別にとって必須の手法となっている。一方、身元不詳死体などの年齢推定は法医実務上重要な鑑定項目の1つであるにもかかわらず DNA 解析からのアプローチは少ない。現在、法医年齢推定は種々の解剖学的所見を総合的に判断して行われている。

DNA 解析からの年齢推定のためには、時間経過とともに蓄積する変異の解析が必要である。老化に伴う遺伝子変異の解析は、疾患に関与する遺伝子に関しては多くの報告がある。また、ミトコンドリア DNA (mtDNA) への時間依存的な変異の出現などの報告、テロメアの時間依存的短縮等も知られるが、問題も多く法医年齢推定への応用はまだ進んでいない。本研究代表者はこれまで山梨大学・法医学講座との共同研究を通して法医年齢推定法開発の重要性を認識し、これまで行ってきた分子生物学的方法を駆使した法医年齢推定法開発に着手した。

本研究代表者は、進化の過程で核 DNA 中に挿入された mtDNA 配列 (NUMTS; nuclear insertions of mitochondrial sequences、19bp から 14903bp を持つ) の生成機構に着目して本研究計画を立案した。この NUMTS は、(1)核 DNA の二本鎖切断の非相同末端連結による修復時に mtDNA が取り込まれる結果生じること、(2)核 DNA の切断は酸化ストレスにより発生した活性酸素種によりおこること、(3)活性酸素種にさらされる機会は年齢依存的に増加すると考えられること、等から、世代内で新たに生じた NUMTS は年齢依存的指標となり得るとの作業仮説をたてた(図1参照)。世代内 NUMTS に関しては、チェルノブイリ原子力発電所事故の高度汚染地域に住む住民から新たな NUMTS の生成が報告されている。また、動物実験であるが癌細胞で NUMTS の増加が報告されている。しかし、現在の技術では世代内 NUMTS のみを進化上の NUMTS と区別する



ことは出来ていない。世代内 NUMTS の解析法確立は、法医年齢推定のみならず、放射能被害の因果関係の証明、遺伝子疾患の進行レベルの解析など医学研究への寄与は大きい。

2. 研究の目的

本研究では、進化の過程で染色体 DNA 上に挿入されたミトコンドリア DNA 配列 (NUMTS) が世代内で生じ得ることを証明し、その選択的分析法を利用した法医年齢推定法の確立を目指す。

そのため、(1)人工的に生じさせた二本鎖切断の非相同末端連結修復の際に、mtDNA が取り込まれることで世代内でも NUMTS が生じ得ることを証明する。その実験系をヒト培養細胞を使って構築する。世代内 NUMTS の選択的分析法の開発することで法医年齢推定を目指す。(2)世代内 NUMTS の生成を蛍光の検出を利用することで簡便に選別できる系を構築する。(3)核 DNA 中の世代内 NUMTS 挿入部位の特異性を明らかにする。(4)世代内 NUMTS を選択的に分析する方法を開発する。(5)時間依存的因子(酸化ストレス等)の被曝量に依存して染色体内に世代内 NUMTS が蓄積することを証明する。これらの結果を利用して法医試料を使った法医年齢推定法

を確立する。

3. 研究の方法

(1) ヒト神経細胞をモデル系とした、世代内 NUMTS 生成実験系の構築:

mtDNA 欠損細胞の樹立

遺伝子改変 mtDNA を受容するため細胞内に mtDNA を持たない mtDNA 欠損細胞を作製する。ミトコンドリア輸送シグナルをもつ制限酵素遺伝子を構築し、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞及び対照としてヒト上皮細胞由来 HeLa 細胞へ導入する。制限酵素遺伝子を発現させ、mtDNA 欠損細胞を単離する。

mtDNA の欠損は mtDNA コントロール領域を標的としたプライマーを使用した PCR にて確認する。進化上の全ての NUMTS には mtDNA コントロール領域が含まれておらず、mtDNA の有無を確認できる。

遺伝子改変 mtDNA の構築

新たに生まれた NUMTS と進化上の NUMTS を区別するために、核 DNA 中に mtDNA が組み込まれた時のみに蛍光を発するように改変した mtDNA を構築する。

ヒト mtDNA に遺伝子暗号を改変した緑色蛍光タンパク質 GFP の遺伝子を挿入した改変ヒト mtDNA を構築する。GFP はミトコンドリア内で発現しないように、ミトコンドリアと核の遺伝暗号の違いを利用して遺伝暗号を改変する。

mtDNA 欠損細胞への改変 mtDNA の導入

本研究で当初予定した遺伝子銃を使ったミトコンドリアへの遺伝子導入が予算の関係で困難となった。ミトコンドリアへの簡便で効率の良い遺伝子導入法は遺伝子銃を使う方法以外に確立されていないため、新しい導入法の開発が必要となった。

本研究では、精製ミトコンドリア内へエレクトロポレーション法等で改変 mtDNA を導入し、それを細胞へ再導入する方法を試行する。

改変 mtDNA 導入細胞の単離

呼吸能の回復を指標に改変 mtDNA 受容細胞を選択・単離する。PCR にて改変 mtDNA の存在を確認する。

改変 mtDNA 導入細胞への酸化ストレスの負荷条件の検討

改変 mtDNA 導入細胞を薬剤で処理し活性酸素種を発生させる。緑色蛍光を指標に NUMTS が生じた細胞を選別する。

改変遺伝子が発現している細胞の単離と挿入部位の構造解析

世代内 NUMTS が生じた細胞から DNA を抽出し、GFP (NUMTS) が挿入された周辺領域の塩基配列を明らかにする。多くの細胞から、ゲノム上にある挿入部位周辺の塩基配列の特異性及び共通性を解析する。

法医試料を使った検討

世代内 NUMTS 挿入部位の特異的塩基配列をもとに設計した PCR プライマーを用い、PCR で世代内 NUMTS を簡便に検出可能な方法を確立する。これを用いて、法医試料を使い年齢依存的に世代内 NUMTS が増加していることを検討する。

(2) 染色体部位特異的二本鎖切断の非相同末端連結による修復系の構築

当初予定していた研究計画の変更のため、多くの基礎検討を行う必要が生じた。そこで、本研究課題を迅速に遂行するため、当初計画に加え、染色体部位特異的切断の修復モデル系を構築し、部位特異的な世代内 NUMTS の実験的生成を行う。このモデル系では、ゲノム上には存在しない制限酵素の認識配列とマーカー遺伝子を染色体上に挿入し、制御下に酵素を用いて二本鎖切断を行いその修復の際に世代内 NUMTS が生じることを証明する系である。

染色体部位特異的組換え部位の導入

染色体に組換え部位 (FR 標的部位) を 1 カ所のみ挿入した SH-SY5Y 細胞及び HeLa 細胞を作成する。染色体上 1 カ所、1 コピーのみ

FR 標的部位が挿入されたことをサザンブロット法で確認する。

FR 部位への制限酵素 I-SceI 切断部位とマーカー遺伝子の挿入

FR 標的部位導入細胞中の染色体 DNA 上に制限酵素 I-SceI 切断部位及びマーカー遺伝子として mtGFP を挿入した細胞を作製する。1 コピーの挿入は PCR で確認する。

制限酵素 I-SceI の発現

この細胞にテトラサイクリンで誘導される I-SceI 遺伝子を導入する。テトラサイクリンにより I-SceI を発現誘導し染色体 DNA を部位特異的に切断後、mtGFP 由来の緑色蛍光の消失を目安に修復された細胞（世代内 NUMTS 生成候補）を分離し、それらの DNA を解析し、新たな DNA 挿入部位の特異性及び共通性を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト神経細胞をモデル系とした、世代内 NUMTS 生成実験系の構築：

mtDNA 欠損細胞の樹立

遺伝子改変ヒト mtDNA を受容する mtDNA 欠損細胞の作製を行った。当初予定していた変異原性薬物を利用した mtDNA の欠損では核遺伝子への変異誘発が考えられたため、方法を変更した。今回、mtDNA 上に存在する制限酵素切断部位に着目した。ミトコンドリア輸送シグナルをもつ制限酵素遺伝子をプラスミド上に構築した。このプラスミドを細胞内へ導入し mtDNA を切断することで mtDNA 欠損細胞の作製を実施した。現在、制限酵素遺伝子が発現している細胞で mtDNA の欠損を確認しているところである。

遺伝子改変 mtDNA の構築

遺伝子改変ヒト mtDNA の構築については、複数の構造を設計した。ヒト mtDNA には遺伝子が隙間なくコードされており、また反対の鎖にも遺伝子がコードされているため、これらの遺伝子の発現を妨げないで新しい遺伝子を

加えることは非常に困難である。現在これらの条件を満たす変異遺伝子を構築中である。

mtDNA 欠損細胞への改変 mtDNA の導入

改変 mtDNA の構築が済み次第、これを導入した細胞を作製する。改変 mtDNA の細胞内ミトコンドリアへの導入は当初遺伝子銃を使う予定であった。しかし、予算の関係でその購入が困難となったため別の方法へ変更した。現在、ミトコンドリアへの遺伝子導入は遺伝子銃以外に簡便な方法がないため、新たな方法開発が必要であった。また、ミトコンドリアへの簡便で効率よい遺伝子導入法の開発はそれ自体非常に重要でインパクトのある研究といえる。ここでは、精製ミトコンドリア内へ、エレクトロポレーション法等で改変 mtDNA を導入する方法を試みた。そのためのミトコンドリアは遠心法ではなく、外膜タンパクの抗体を使ったアフィニティークロマト法で精製した。現在、これを使ってエレクトロポレーション法の実験条件を検討中である。

改変 mtDNA 導入細胞の単離

改変 mtDNA 導入細胞への酸化ストレスの負荷条件の検討

改変遺伝子が発現している細胞の単離と挿入部位の構造解析

法医試料を使った検討

改変 mtDNA の構築が遅れたため、現在はまだ遺伝子改変 mtDNA を受容した細胞の作製がすすんでいないためこれらの実験項目はまだ行っていない。

(2) 染色体部位特異的二本鎖切断の非相同末端連結による修復系の構築

染色体部位特異的組換え部位の導入

部位特異的に染色体 DNA の切断を誘導するためのモデル細胞として、FR 標的部位を染色体上に組み込んだ SH-SY5Y 細胞及び HeLa 細胞を作製した。染色体に組換え部位（FR 標的部位）を 1 カ所のみ、1 コピーのみ挿入された細胞をサザンブロット法により選別した。プ

ローブと反応する DNA 断片の大きさから FR 標的部位が挿入された部位が異なる複数の細胞の単離に成功した。

FR 部位への制限酵素 I-SceI 切断部位とマーカー遺伝子の挿入

FR 標的部位導入細胞 (SH-SY5Y 細胞及び HeLa 細胞) を用いて染色体部位特異的切断のモデル系を構築するため、これらの細胞の FR 部位に I-SceI 切断部位とマーカー遺伝子を F1p recombinase を用いて導入した。初めにマーカー遺伝子として mtGFP 遺伝子を組み込み、ミトコンドリアが光る細胞を得た。しかし、これらの細胞は全てミトコンドリアの形態が異常であった。これは、mtGFP の発現量が過剰であるか、あるいは FR 標的部位に問題があることが考えられた。現在マーカー遺伝子のプロモータを弱いものに交換したものを構築中である。また、原因が後者であれば、FR 標的部位をランダムに挿入する方法ではなく、ゲノム編集で特定部位へ挿入することも検討項目としてあげられる。この問題が解決した後、I-SceI 切断部位を挿入する予定である。

制限酵素 I-SceI の発現

テトラサイクリンで誘導されるプロモータをもつ I-SceI 遺伝子を構築した。今後、細胞の作製が完了した後、I-SceI 遺伝子の導入を行う予定である。その後、テトラサイクリンにより I-SceI を発現誘導し染色体 DNA を部位特異的に切断した後、修復された (世代内 NUMTS 生成候補) 細胞の DNA を解析し、新たな NUMTS の存在の確認、NUMTS 挿入部位の塩基配列特異性及び共通性を解析する予定である。

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)

[学会発表](計 1 件)

猩々英紀、馬淵正 : 頭部外傷によるシクロ

オキシゲナーゼの発現変化、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1-4, 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

馬淵 正 (MABUCHI, Tadashi)

山梨大学・総合研究部・

助教

研究者番号 : 80150308

(2) 研究分担者

猩々 英紀 (SHOJO, Hideki)

山梨大学・総合研究部・

准教授

研究者番号 : 60284626