

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893256

研究課題名(和文)劣化DNAにおける個人識別SNPsマーカーの探索

研究課題名(英文)Analysis of SNPs in artificially degraded DNA

研究代表者

町田 光世(Mitsuyo, Machida)

東京女子医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：60468692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：法医学で扱うサンプルの多くはDNAの断片化を生じて、従来のshort tandem repeat法ではDNA解析が困難になる場合もある。そこで劣化DNAサンプルにおいても解析可能な塩基多型(SNPs)を特定するために、既報SNPsリストに基づいたスクリーニングとamplified fragment length polymorphism法によるスクリーニングを行った。その結果、6SNPs(rs891700、rs2111980、rs1360288、rs2116020、rs1636218、rs12293045)が劣化サンプルでも検出可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：DNA in biological fluids at the scene is often degraded by many environmental factors. Short tandem repeats profiling, the most commonly used method for forensic DNA identification, is sometimes difficult to analyze degraded DNA samples. Here we focused on single nucleotide polymorphisms (SNPs) because the amplicon sizes are as short as those of degraded DNA in SNP analysis. To identify the SNPs that are resistant to degradation, we screened the SNPs from reported SNP lists and isolated the SNPs by amplified fragment length polymorphism analysis. Therefore six SNPs (rs891700, rs2111980, rs1360288, rs2116020, rs1636218, rs12293045) were demonstrated as detectable SNPs for degraded DNA samples.

研究分野：法医学

キーワード：SNP解析 劣化DNA

1. 研究開始当初の背景

法医学における個人識別は、一般的に short tandem repeat (STR)法が用いられている。STR とはゲノム上に存在する数塩基の反復配列であり、この反復配列を検出するには比較的長い塩基配列情報が必要とする。しかし、個人識別が必要なサンプルの多くは、高温多湿や紫外線、微生物による分解等によって物理的あるいは化学的に DNA の断片化が生じたものであり、解析が困難になる。例えば、犯罪捜査で採取された血液、毛髪、組織片の大部分は DNA 型の判定が極めて困難であるとの報告もある¹。ゆえに、損傷した DNA は著しい断片化を伴うため、従来の STR による多型検出法では限界があると予想される。そこで、一塩基多型(Single nucleotide polymorphisms; SNPs)解析による検出が有効であると考えられる。SNPs は二対立遺伝子であり、一カ所の SNP と STR を比較した場合、SNP は多様性が低く、個人識別という点では不利な側面もある。しかし、SNPs は非常に短い領域の DNA 由来の PCR 産物でも解析可能であり、特に人類学で用いられる陳旧 DNA² や遺留物中の著しく分解された DNA 分析³ に有効である。SNP は約 1000 塩基に 1 個の割合で存在し、出現頻度は STR 多型と比較して数百倍と予想されるため⁴、多くの SNPs を解析することで STR と同様、個人識別に役立つと考えられている。近年では、法医学における個人識別のための SNP 解析に関する報告も増えているが、損傷を受けた DNA に特異的な SNPs マーカーは未だ確立されていない。従って、DNA 損傷を受けても検出可能な SNPs を明らかにすることによって、劣化 DNA サンプルの個人識別の解析精度を向上させ、これまで DNA 型判定が困難だったサンプルに関して解析可能になることが期待される。

2. 研究の目的

法医サンプルでは、曝露された環境や保存状態の悪化によって DNA の断片化が生じ、解析精度を低下させることが問題となっている。近年、SNP解析は遺伝子増幅サイズが短く変異率が低い理由から、法医学分野でも注目されている。しかし、

現段階における SNP解析は、STR解析と比べて法医学での検査方法が確立しておらず、利用頻度は少ない。そこで劣化した DNA サンプルからでも個人識別可能な SNPs マーカーを探索し、解析精度を向上させることを目的とした。

3. 研究の方法

劣化 DNA でも検出可能な SNPs を明らかにするために、(1)人工的に劣化させた DNA サンプルを用いて劣化を受けにくい既報の SNPs の特徴を把握し、次に(2)フィンガープリント法の一つである Amplified Fragment Length Polymorphism(AFLP)法により劣化後でも検出できる SNPs をスクリーニングするという2つの視点からアプローチした。なお、本実験は東京女子医科大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を受けている(承認番号 250)。

- (1) ボランティアの口腔上皮細胞を採取し(n=11)、DNA 抽出精製後に 5、15、30、60 または 120 分間紫外線照射した 5 実験群を作成した(対照群は紫外線未照射)。紫外線照射は UV-C(254 nm)波長を用いた。紫外線照射後のサンプルを劣化 DNA サンプルとして既報の 24 種類のプライマー⁵ で PCR 反応を行った。PCR 産物は ExoSAP-IT(Affymetrix)で精製し、精製された増幅産物を鋳型として BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Life Technology)を用いてシーケンス反応を行った。増幅産物は Applied Biosystems ABI310 Genetic Analyzer を用いて BLAST 検索により塩基配列を決定した。得られたエレクトロフェログラムをもとに、検出された SNPs 数について各照射時間群で比較することで紫外線の影響を受けやすいあるいは受けにくい SNPs の特徴を調べた。なお、同劣化サンプルを用いて STR 解析 (AmpF/STR Identifiler PCR Amplification kit, Life Technology)も行った。
- (2) 次に、高度に変性した DNA サンプルにおいても検出可能な SNPs を探索

するために、AFLP 法によるスクリーニングを行った。始めにヒトゲノム DNA (K562 細胞、Promega) のコントロール DNA を熱処理により 200bp 以下の短い DNA 断片 (劣化サンプル) にした。AFLP 法は AFLP Analysis System I kit (Life Technology) を用い、反応液および反応条件はキット付属のプロトコルに従った。250 ng の未処理および熱処理したゲノム DNA を *EcoRI* と *MseI* で制限酵素処理し、得られた DNA 断片に *EcoRI* と *MseI* に対するアダプター配列を結合させた。続いてアダプターを結合した DNA 断片を用いて pre-amplification 反応を行い、最終的に 3' 末端に特定塩基が付加されたプライマーによるタッチダウン PCR 反応後、目的の DNA 断片を選択的に増幅させた。増幅された劣化前後の PCR 産物を 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、劣化前後で同じ断片長に存在するバンドを切り出した。AFLP バンドパターンや PCR 反応の再現性を得るために 3 回の繰り返し実験を試みた。切り出したバンドから抽出された DNA は目的のバンドが得られたプライマーペアで PCR 反応を行い、ExoSAP-IT で精製後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンス解析を行った。さらに、得られた DNA 断片中に含まれているか否かをデータベース SNP 検索 (dbSNP、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) により決定した。

4. 研究成果

(1) 紫外線照射時間に伴い検出される SNPs 座位数は減少したが、紫外線照射時間 60 分間では 24SNPs 座位中 22 座位 (92%) が検出され、120 分間でも 18 座位 (75%) が検出された。一方 STR 解析では、120 分間照射において既に STR が検出されなくなったことから、SNP は STR と比べて DNA 損傷に対して耐性を持つことが示唆された。次に、120 分間照射群の SNPs を用いて紫外

線照射前後で変異した SNPs 型のサンプル数を比較し、紫外線の影響を受けやすい SNP 型を調べた。その結果、AT ヘテロ接合型 SNPs が T へ、AG と GT がそれぞれ G へと変異するサンプル数が、他の SNPs の変異パターンと比べて多いことが示された。変異パターンの結果から A が紫外線によりドロップアウトしやすいと予想されたので、塩基別の紫外線に対する影響を調べた。SNPs は 120 分間の紫外線照射群のサンプルを用い、紫外線照射前後で変異した塩基数を比較した結果、A がドロップアウトされやすく、G はドロップアウトされにくい傾向となった。最終的に 120 分間の紫外線照射後においても全ての劣化サンプルで検出された SNPs は rs891700、rs2111980、rs1360288 であり、短時間の紫外線照射で検出できなくなる SNPs は rs1528460、rs1031825 と特定された。しかし、劣化 DNA サンプルでも検出可能な 3SNPs の SNP 型はそれぞれ A/G、A/G、C/T であり、A が含まれているにも関わらず、120 分間の紫外線照射後でもドロップアウトされずに正しく SNPs が判定された。従って紫外線に対する影響は必ずしも SNP 型や塩基に依存しているわけではないと考えられる。そこで、SNP に隣接する塩基に着目して検出される SNP 数の違いを調べた結果、SNP に隣接する塩基が SNP と同じ場合は検出される SNP 数が少なく、異なる場合は多い傾向が見られた。つまり、SNP と同じ塩基が隣接する場合は劣化の影響を受けやすく、異なる塩基が隣接する場合は劣化の影響を受けにくいことが示唆された。以上の結果は、今後の SNPs 解析や解釈を行う上で参考になり得ると考えられる。

(2) AFLP キットに含まれている 2 種類の制限酵素に対するプライマー (*EcoRI* (E)、*MseI* (M)) は 8 種類の特定付加塩基部位を持っており、全組み合わせで PCR 反応を試行すると 64 通りとなる。始めに DNA 増幅や劣

化前後で共通のバンドが検出される条件に適したプライマーペアを検討した。未処理サンプルでは64全てのプライマーペアにおいてバンドが確認されたが、劣化サンプルにおいては30のプライマーペアでしかバンドが確認されなかった。30ペアのうち未処理と劣化サンプルで共通の AFLP バンドが増幅されるプライマーペアは8ペア確認された。目的の AFLP バンド検出数に関して、E-AAC/M-CAG、E-ACA/M-CTG、E-AGG/M-CAAのプライマーペアでPCR反応を行った場合は各1セット(未処理サンプルで1バンド、劣化サンプルで1バンドの計2本のバンドで1セットと表す)、E-ACA/M-CTG、E-ACC/M-CAC、E-ACG/M-CAGでは各2セット、E-AAG/M-CAGでは4セットのバンドが検出された。15セット中7セットのバンドにおいては劣化前後で共通のDNA配列が得られたが、8セットは異なるDNA配列が得られた。その理由として、ゲル電気泳動で同じ断片長で検出されたバンドを選択したが、実際には同じ断片長でも異なる配列を含むバンドだった可能性が考えられる。さらに、劣化前後で共通のバンドに含まれるDNA配列については7セット中6セットに17の候補SNPsが含まれ、1セットには含まれていなかった。17SNPsの中でマイナー対立遺伝子頻度(MAF)が0.05以上の頻度の高いSNPsは3SNPs(rs2116020、rs1636218、rs12293045)であり、残りの14SNPsは0.05以下および頻度情報が記載されていなかった。検出された3SNPsは、ヒト個人識別に関するSNPsリスト^{5,6,7}や、劣化DNAのSNP解析に使用されたSNPsリストにも記載されていなかった^{1,8}。以上のように、本研究(2)で得られた候補SNPsは劣化DNAに特異的なSNPsであり、過去のリストには記載されていないことから、劣化DNA解析に有効な新規のSNPsである可能性が示唆された。現在は3SNPsが個人識別に利用できるかを確認するために、ボラ

ンティアから得られたサンプルを用いて解析を進めている。劣化条件は異なるが(1)で述べた紫外線照射と(2)熱処理サンプルにおいて、劣化後でも6SNPs(rs891700、rs2111980、rs1360288、rs2116020、rs1636218、rs12293045)は検出可能であることが明らかになった。今後もDNA解析精度を高めるために、様々な劣化条件下でも検出可能なSNPsを探索し、劣化DNAに特異的なSNPsマーカーリストの構築を行いたいと考えている。

<引用文献>

- 1 Feire-Aradas A, Fondevila M, Kriegel AK, et. al., A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA, *Forensic Science International Genetics*, Vol.6, 2012, 341-349
- 2 Larcombe LA, Nickerson P, Hoppa RD, et. al., Detection of a single nucleotide polymorphism in the IF-6 promoter region of ancient nuclear DNA, *Infection, Genetics and Evolution* Vol.5, 2005, 117-122
- 3 Fondevila M, Phillips C, Naveran N, et. al., Case report: Identification of skeletal remains using short-amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur, *Forensic Science International Genetics* Vol. 2, 2008, 212-218
- 4 Brookes AJ, The essence of SNPs, *Gene*, Vol.234, 1999, 177-186
- 5 Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, et. al., A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification, *Electrophoresis* Vol.27, 2006, 1713-1724.
- 6 Lou C, Cong B, Shujin L, et. al., A SNaPshot assay for genotyping 44 individual identification single nucleotide polymorphisms, *Electrophoresis* Vol.32, 2011, 368-378
- 7 Pakstis AJ, Speed WC, Fang R, et. al., SNPs for a universal individual identification panel. *Human Genetics* Vol.127, 2010, 315-324

8 Asari M, Watanabe S, Matsubara K, et. al., Single nucleotide polymorphism genotyping by mini-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification of degraded DNA, Analytical Biochemistry Vol.386, 2009, 85-90

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4件)

1 Mitsuyo Machida, Kazuhiko Kibayashi. Analyses of SNPs in artificially degraded DNA. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM2014), Jun 16-20, 2014, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan.

2 Mitsuyo Machida, Kazuhiko Kibayashi. Autosomal SNP genotyping of artificially degraded DNA by using UV irradiation. World Forensic Festival 2014. Oct 12-18, 2014, Coex, Seoul, Korea.

3 町田光世、木林和彦. 変性 DNA の SNPs 解析. 第 83 回日本法医学会学術関東地方集会、2014 年 11 月 8 日. 東京女子医科大学弥生記念講堂、東京都新宿区.

4 町田光世、木林和彦. 紫外線照射した劣化 DNA の SNPs 解析. 日本 DNA 多型学会第 23 回学術集会、2014 年 11 月 28 日-11 月 28 日. 愛知産業労働センターウィンク愛知、愛知県名古屋市.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

町田光世 (Mitsuyo Machida)
東京女子医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：60468692

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：