

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460895

研究課題名(和文)抽出・精製方法の違いがmRNAを指標とした体液の識別検査に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of RNA purification procedures on mRNA-based body fluid identification

研究代表者

阿久津 智子 (Akutsu, Tomoko)

科学警察研究所・法科学第一部・室長

研究者番号：50356151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：法科学的資料におけるRNA抽出・精製法の違いが、mRNAを指標とした体液の識別検査法に及ぼす影響について検討を行った。

RIN値によるRNA品質評価の結果、血液、唾液および精液において、磁気ビーズ法よりスピンカラム法のほうが高品質のRNAが精製された。一方、磁気ビーズ法では低分子RNAも抽出・精製されるため、リアルタイムRT-PCR法では高感度となった。dCt法により相対的定量を行う場合は、抽出・精製法およびコントロール遺伝子の選定が重要と考えられた。

つづいて、RNA抽出・精製法の影響を受けない堅牢なターゲットおよびハウスキープング遺伝子を選定し、マルチプレックスRT-PCR検出系を構築した。

研究成果の概要(英文)：To ascertain the effects of purification procedures on the mRNA-based body fluid identification, comparative analyses of the yield and quality of total RNA were performed between different purification procedures. As a result, silica column can purify higher-quality RNA; however, the sensitivity of the real-time RT-PCR analysis was higher in the magnetic beads-purified samples caused by the relative efficiency of extracting short-length RNA from degraded samples. We also show that the quantification of relative levels of body fluid-specific genes could be influenced by the purification procedure. Although use of high-quality RNA is generally required for gene expression analysis, the relevance of short RNA fragments cannot be ruled out in forensic samples. Then, a multiplex RT-PCR assay, which can be applied regardless of the purification procedure, was developed as a robust tool for body fluid identification. Each amplicon could be detected and quantified by chip electrophoresis.

研究分野：法生物学

キーワード：mRNA 抽出・精製方法 マルチプレックスRT-PCR

1. 研究開始当初の背景

体液の識別検査は、血液型検査や DNA 型検査による個人識別に先立って行われ、犯罪を立証する上で重要な検査の一つである。各体液に特徴的に発現する mRNA を指標とした体液の識別検査は、従来の検査法と比較して特異性及び検出感度が高く、鑑定実務への応用が期待されている。しかし、法科学的資料においては、試料中の RNA は高度に分解し、低分子化している可能性が高く、RNA の品質が検査結果に大きく影響を与えることが予想される。試料から得られる RNA の品質は、陳旧度等の資料の状態に加えて、抽出・精製法にも影響を受けると考えられるが (Fig. 1) 詳細な検討は行われていない。

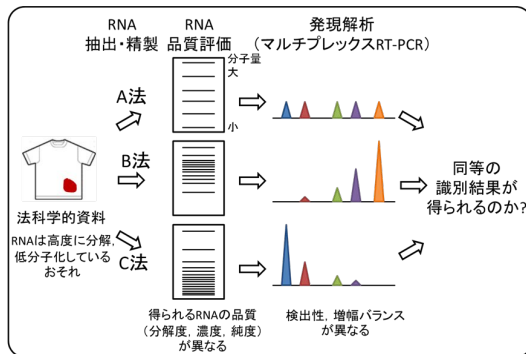


Fig. 1. RNA 抽出・精製方法が法科学的資料における mRNA 発現解析に及ぼす影響(イメージ図)

2. 研究の目的

本研究において、法科学的資料における RNA 抽出・精製法の違いが、mRNA を指標とした体液の識別検査法における検査結果に及ぼす影響について検討を行う。つづいて、mRNA を指標とした体液の識別検査におけるゴールドスタンダードと呼べる包括的な検査法の確立に向けて、異なる抽出・精製法で得られた RNA 間においても安定して検出される、堅牢性の高いターゲット遺伝子およびハウスキープ遺伝子を選定し、マルチプレックス RT-PCR 検出系を構築する。

3. 研究の方法

血液、唾液および精液 (各 n = 3) からスピнкаラム法 (RNeasy Mini Kit、キアゲン) ならびに磁気ビーズ法 (EZ1 RNA Tissue Mini Kit、キアゲン) により、各サンプルに対して 4 本ずつ RNA を抽出・精製した。得られた RNA について、Agilent 2100 バイオアナライザーおよび Agilent RNA 6000 Pico Kit (アジレント) を用いて RIN 値を算出することによりそれらの品質を評価し、抽出・精製法間で比較した。また、それらの RNA を cDNA に逆転写し、TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法により、コントロール遺伝子である β -actin (ACTB) を増幅長 139 bp および 77 bp にて増幅し、Ct 値を比較した。さらに、血液のターゲット遺伝子として

hemoglobin beta (HBB)、唾液のターゲット遺伝子として statherin (STATH) および histatin 3 (HTN3)、精液のターゲット遺伝子として semenogelin I (SEMG1) および protamine 2 (PRM2) をそれぞれ増幅し、dCt 法による相対的定量値を比較した。血痕、唾液斑および精液斑ならびに 1 μ l の血液および精液で作成した微量斑痕試料についても同様に検討を行った。

つづいて、マルチプレックス RT-PCR 法による体液の識別検査法の構築のため、血液、唾液および精液に対するターゲット遺伝子ならびにリファレンス遺伝子についてプライマー設計を行った。それらを用いてマルチプレックス RT-PCR 法による増幅を行い、RNA 抽出・精製法間で比較した。いずれの抽出・精製法においても検出性や増幅バランスが改善されるよう、検査対象遺伝子の再設定、プライマー濃度の検討等を行った。

4. 研究成果

(1) RNA 品質の比較

バイオアナライザーによる解析の結果、血液、唾液、精液いずれにおいても、スピнкаラム法で抽出・精製された RNA は、磁気ビーズ法と比較して高い RIN 値を示し、スピнкаラム法のほうが高品質の RNA が精製可能であることが示された (Fig. 2)。

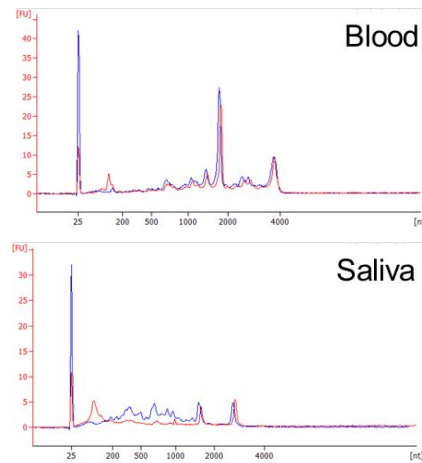


Fig. 2. バイオアナライザーによる RNA 品質の比較. 赤:磁気ビーズ法, 青:スピнкаラム法.

(2) 相対的定量値への影響

リアルタイム RT-PCR 法の結果、血液においては、磁気ビーズ法で抽出・精製された RNA は、スピнкаラム法と比較していずれの増幅長の ACTB も小さい Ct 値を示し、磁気ビーズ法のほうが高感度に検出可能であることが示された (Fig. 3)。一般に、遺伝子発現解析には高品質の RNA が必要とされているが、増幅長が短い解析方法の場合には、低分子 RNA も抽出・精製可能な磁気ビーズ法も有効であると考えられた。

唾液においては、増幅長 77 bp の ACTB で

は血液と同様の傾向が認められたが、増幅長 139 bp では抽出・精製法による Ct 値の差はほとんど認められなかった (Fig. 3)。また、dCt 法による唾液特異的ターゲット遺伝子の相対的定量に増幅長 77 bp の ACTB を使用した場合、抽出・精製法により異なる定量結果が得られた。

精液においては、リアルタイム RT-PCR 法による解析では、いずれの増幅長の ACTB においても、血液ほど顕著な抽出・精製法による Ct 値の差異は認められなかった (Fig. 3)。一方、ターゲット遺伝子である PRM2 においては、抽出・精製法間で Ct 値に差異が認められ、その結果、dCt 法による相対的定量において、異なる定量結果が示された。

このように、dCt 法によるターゲット遺伝子の相対的定量を行う場合は、抽出・精製法の選択およびコントロール遺伝子の選定が重要であると考えられた。

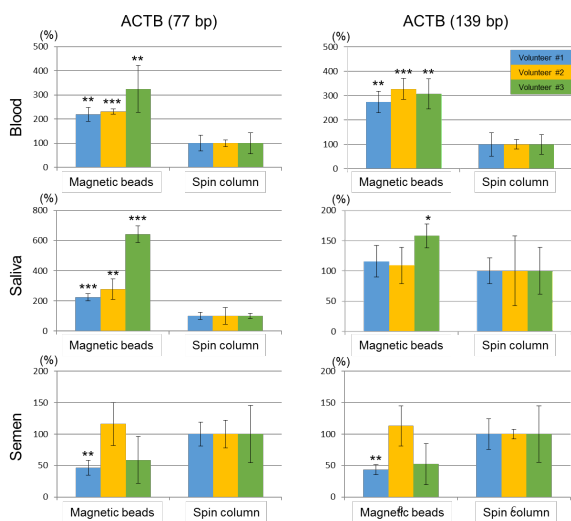


Fig. 3. 抽出・精製方法によるコントロール遺伝子の相対的定量値の違い。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's or Welch's t-test)。

(3) 斑痕試料・微量斑痕試料への適用

斑痕試料においては、磁気ビーズ法で抽出・精製した RNA は低い RIN 値を示したが、スピナラム法で抽出した場合は 5~7 と中程度の RIN 値であったことから、スピナラム法を用いることで、斑痕試料のように試料中の RNA が低分子化していることが思料される試料からも、中程度の品質の RNA を精製可能であることが示された (Fig. 4)。

血液あるいは精液 1 μ l で作成した斑痕試料においては、抽出された RNA 量が、RIN 値算出のための定性下限値を下回っていたため、バイオアナライザーによる RNA 品質評価を実施することができなかったが、いずれの抽出・精製法においても、リアルタイム RT-PCR 法によりハウスキープ遺伝子およびターゲット遺伝子の十分な増幅が認め

られ、スピナラム法だけでなく磁気ビーズ法も、微量斑痕試料にも適用可能であることが示された。

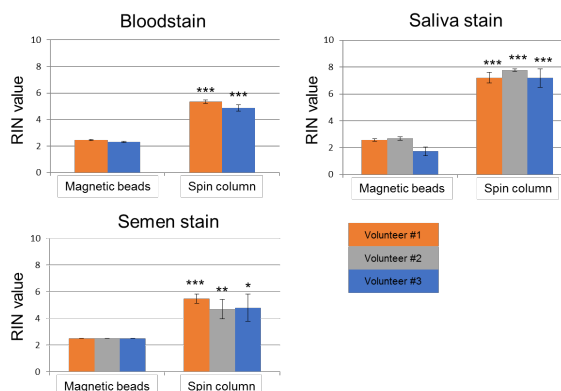


Fig. 4. 斑痕試料における抽出・精製方法による RNA 品質の比較。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's or Welch's t-test)。

(4) マルチプレックス RT-PCR 系の構築

設計した血液、唾液および精液に対するターゲット遺伝子ならびにリファレンス遺伝子のプライマーについて、増幅確認、増幅バランスの調整、ターゲット遺伝子の再選定等を行い、ターゲット遺伝子 3 種類およびリファレンス遺伝子 1 種類から成るマルチプレックス RT-PCR 系を、それぞれの体液種に対して構築することができた。

体液、体液斑および微量体液斑からスピナラム法ならびに磁気ビーズ法で抽出・精製した RNA について、構築したマルチプレックス RT-PCR 法により増幅を行い、チップ電気泳動 (Agilent 2100 バイオアナライザーおよび Agilent DNA 1000 Kit) により分離・検出を行ったところ、抽出・精製法の間で検出性や増幅バランス目立った差異はなく、いずれの抽出・精製法で得られた RNA もマルチプレックス RT-PCR 法による体液の識別検査に適用可能と考えられた。

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)

Tomoko Akutsu, Tetsushi Kitayama, Ken Watanabe, Koichi Sakurada. Comparison of automated and manual purification of total RNA for mRNA-based identification of body fluids. *Forensic Sci. Int.: Genet.*, 14, 11-17, 2015. (査読有)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.007>

Tomoko Akutsu, Ken Watanabe, Ayari

Takamura, Koichi Sakurada. Quantitative evaluation of candidate genes and development of a multiplex RT-PCR assay for the forensic identification of vaginal fluid. Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. 6, e211-213, 2017. (査読無)
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.078

Tomoko Akutsu, Ken Watanabe, Ayari Takamura, Koichi Sakurada. Evaluation of skin- or sweat-characteristic mRNAs for inferring the human origin of touched contact traces. Legal Med., 33, 36-41, 2018. (査読有)
DOI:https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.05.003

〔学会発表〕(計3件)

阿久津智子, 渡邊賢, 高村彩里, 櫻田宏一. mRNA を指標とした腭液証明法に関する基礎的検討. 日本法科学技術学会第 22 回学術集会, 2016.

Tomoko Akutsu, Ken Watanabe, Ayari Takamura, Koichi Sakurada. Quantitative evaluation of candidate genes and development of a multiplex RT-PCR assay for the forensic identification of vaginal fluid. 27th Congress of International Society for Forensic Genetics, 2017.

阿久津智子, 渡邊賢, 高村彩里, 櫻田宏一. リアルタイム RT-PCR 法による法科学的資料の汗垢証明 mRNA マーカーの評価. 第 86 回日本法医学会学術関東地方集会, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿久津 智子 (AKUTSU, Tomoko)
科学警察研究所・法科学第一部・室長
研究者番号: 5 0 3 5 6 1 5 1

(2)研究分担者

櫻田 宏一 (SAKURADA, Koichi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 1 0 3 3 4 2 2 8

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし