

博士論文（要約）

Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for
human identification using universal fluorescent PCR

（ユニバーサル蛍光PCR法を用いた38座位の挿入欠失多型解析
に基づく個人識別法の開発）

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

岡 久美子

（ 浅利 優、大村 友博、吉田 将亜、間瀬田 千香暁、
矢島 大介、松原 和夫、塩野 寛、松田 光悦、清水 恵子 ）

学位論文題目 : Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR
(ユニバーサル蛍光PCR法を用いた38座位の挿入欠失多型解析に基づく個人識別法の開発)

著 者 名 : 岡 久美子
(浅利 優、大村 友博、吉田 将亜、間瀬田 千香暎、
矢島 大介、松原和夫、塩野寛、松田光悦、清水恵子)

掲載雑誌名 : Molecular and Cellular Probes 28(2014)13-18

研究目的

法医学領域におけるDNA多型マーカーを用いた個人識別では、常染色体のSTR解析が利用されているが、劣化試料からの検出の限界や突然変異などの問題点が指摘されている。近年では一塩基多型 (SNPs) やAlu配列の挿入など、他のマーカーを併用することで識別精度が向上することが明らかになっている。これらに加えて、数塩基の短い挿入欠失 (Insertion/deletion, Indel) 多型は個人差を容易に区別できることから、個人識別への利用が期待されている。本研究では、日本人集団における常染色体Indel多型37座位のアリル頻度を明らかにし、アメロゲニンを含む38座位に対してユニバーサル蛍光PCRを用いた二色蛍光のジェノタイピング法を新たに開発した。

材料・方法

1. Indel多型の選択と特異的プライマーの設計

UCSC genome browser、NCBI dbSNPから2-6 bpで、非コーディング領域、同一染色体上では約50Mb離れ、日本・東アジア集団におけるマイナーアリル頻度が0.30-0.50であるものを選択した。常染色体のIndel多型37座位と性別判定のためのアメロゲニンの計38座位を9-10座位 (セットA-D) の4組に分類し、Indel多型特異的プライマーを設計した。

2. 日本人集団におけるアリル頻度の算出

ユニバーサル蛍光PCR法を用いたMultiplexPCRで日本人100名におけるアリル頻度を算出した。DNA試料は血縁関係のない健常な日本人100名より口腔粘膜を採取後、抽出・定量して使用した。ユニバーサル配列はM13(-47) (5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') を使用し、Indel多型特異的プライマーのフォワード側5' 末端に付加した。FAMで標識したM13(-47) を蛍光ユニバーサルプライマーとし、検出にはABI310 Genetic Analyzer(ABI) を使用した。鋳型DNA量は1ngとした。

3. ユニバーサル蛍光PCR法を用いた二色蛍光ジェノタイピング法の開発

3.1. 新たなユニバーサル配列の設計と増幅効率の評価

M13 (-47) の3' 末端に1-3の塩基置換を有する配列を計9種類設計した。これらの5' 末端をHEXで標識し、アメロゲニン領域を増幅するSingleplexPCRを行った。FAM・HEXで標識したM13 (-47) プライマーを比較対照として増幅効率・特異性を検討した。増幅効率はRelative Fluorescence Units (RFUs) で評価した。

3.2. 二色蛍光ジェノタイピング

二色蛍光ジェノタイピングには、3.1の結果からM13(-47) とM13 (-47)tt (5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGtt-3') を使用した。M13 (-47) 、M13 (-47)tt をセットB・D、セットA・Cのフォワードプライマー5' 末端にそれぞれ付加し、ユニバーサルプライマーはFAM・HEXでそれぞれ標識した。鋳型DNAは1ngとし、更に1-0.0625ngまでのDNA希釈系列を作製して感度試験を行い、法医学的有用性を評価した。

4. 統計解析

ABI PRISM® genotyper 2.5 software (ABI) を用いて型判定した後、PowerStats v12 software (Promega) を用いて他人同士のDNA情報が偶然一致する確率である、総合同値確率を算出した。

成 績

1. 日本人集団におけるアリル頻度

37座位のマイナーアリル頻度の平均は0.39で、ハーディワインベルグ平衡・連鎖不平衡解析は全ての座位で有意差を認めなかった。

2. ユニバーサル蛍光PCR法を用いた二色蛍光ジェノタイピング

新たなユニバーサル配列の増幅効率の比較では、M13(-47)ttが最も高い増幅効率を示したことから、M13(-47)に加えて使用した。M13(-47)ttは、M13(-47)に対して偽陽性反応を示さず、二色蛍光ジェノタイピングでは、38座位全てでFAM・HEXのシグナルが正確に検出された。

3. 法医学的有用性

常染色体37座位の総合同値確率は 2.12×10^{-15} で、他の報告と比較して低い値を示した。微量試料からの検出では0.25 ngの鋳型DNAを用いた場合でも完全なプロファイルが得られた。

考 案

Indel多型のような2アレル型マーカーを用いた個人識別法の確立には、頻度の偏りが少ない座位の選択が重要である。本研究では37座位のIndel多型のマイナーアレル頻度の平均が0.39と0.50に近い値であった。さらに総合同値確率が 2.12×10^{-15} と低い値を示したことから、選択した座位およびその数は適切であると考えられた。ユニバーサル蛍光PCR法を用いた二色蛍光ジェノタイピングにおいて、選択した2つのユニバーサル配列であるM13(-47)及びM13(-47)ttに交差反応はみられなかった。一般的なユニバーサル配列のわずか2塩基の置換によって高い特異性と増幅効率をもつ新たなユニバーサル配列の設計が可能であることが示された。蛍光色素を用いた解析では多額の解析費用がかかることが危惧されるが、二色蛍光ジェノタイピングは費用対効果の高い解析法であり、STR解析の問題点を補う手段として有用であると考えられた。

結 論

常染色体Indel多型37座位の日本人集団におけるアレル頻度を調査し、アメロゲンinを加えた38座位に対して二色蛍光標識に基づいた識別法を開発した。新たに設計した塩基置換をもつユニバーサル配列は高い増幅効率・特異性を持ち、2つの独立した反応においてFAM・HEXのシグナルをそれぞれ識別することが可能であった。さらに、0.25ngの微量なDNAからでも完全なプロファイルが得られたことから、本研究の方法は法医学分野の個人識別において高い信頼性・感度を持ち、費用対効果が高い方法であることが示された。

引用文献

1. M. A. Jobling, P. Gill. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 2004; 5: 739-751.
2. J. J. Sanchez, C. Phillips, C. Borsting, K. Balogh, M. Bogus, M. Fondevila et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*, 2006; 27:1713-1724.
3. M. Schuelke. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol*, 2000; 18: 233-234.

参考論文

1. 岡久美子, 坂上和弘, 浅利優, 大村友博, 吉田将亜, 間瀬田千香暁, 松原和夫, 塩野寛, 松田光悦, 清水恵子. 頭蓋骨からの帰属集団判定 ; Fordisc®3.0の法医学実務への応用. *法医学の実際と研究*, 2011;54 :17-23.
2. 岡久美子, 浅利優, 大村友博, 吉田将亜, 間瀬田千香暁, 塩野寛, 松原和夫, 松田光悦, 清水恵子. 多座位挿入欠失多型解析に基づく個人識別法の開発. *DNA多型*, 2013; 21 :214-217.
3. M. Asari, T. Omura, K. Oka, C. Maseda, Y. Tasaki, H. Shiono, K. Matsubara, M. Matsuda, K. Shimizu. Multiplex PCR-based Alu insertion polymorphisms genotyping for identifying individuals of Japanese ethnicity. *Genomics*, 2012; 99: 227-232.