

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590846

研究課題名(和文) 法医DNA多型検査における3対立遺伝子性SNPsの有用性に関する検討

研究課題名(英文) Utility of Tri-allelic SNP markers within the forensic field.

研究代表者

太田 正穂 (OTA, Masao)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：50115333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：一塩基多型(SNP)は法医DNA鑑定で利用価値が高い。本研究は識別能の高い3対立遺伝子性(Tri-allelic) SNPsを25種類選出し、ダイレクトシーケンスにより各アリルの遺伝子頻度を求めた。多型情報はPDが0.99999999999997、PEは0.99885を示し、高度な鑑定能力を示した。SNaPshot法によるmultiplexを用いた検出では、判定の条件設定、エレクトロフェログラムの判読の煩雑さから、法実務での実用性が得られなかった。また次世代シーケンサーを用いた混合試料のTri-SNPs解析は、定性・定量性において精度の高い結果を示し、混合試料解析における有効性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The single nucleotide polymorphism (SNP) provides the potential advantages in the forensic field due to the low mutation rates and the short sized products by PCR amplification. I investigated genetic information of 25 tri-allelic SNPs selected from the NCBI dbSNP database. Allele frequency for each tri-allelic SNP was calculated from direct allele counts using 96 sequenced Japanese individuals. The total discrimination power was 0.99999999999997 and the cumulative probability of exclusion was 0.99885. The allele determination of tri-allelic SNPs using SNaPshotTM was successful whereas multiplex SNaPshotTM assays resulted in ambiguous and required further optimization steps, especially for quantitative measurements of mixed samples. Fundamental experiments using the deep sequencing (NGS) technology and tri-allelic SNPs provided quantitative sensitivity for two mixed DNA sample. The current NGS technology showed usefulness to discriminate quantitatively in the mixed forensic DNA sample.

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：Tri allelic SNP Gene Frequency Criminal Investigation Identify Testing Discrimination Power DNA Mixtures

1. 研究開始当初の背景

個人識別や親子鑑定における法医学 DNA 検査では、2~6bp の縦列反復配列多型を示すマイクロサテライト(通称 STR: short tandem repeat)多型が通常用いられているが、マイクロサテライトは変異率が高い、遺伝子頻度の民族差が大きい、遺伝子のドロップアウト、劣化試料からの検出力に限界が有る等、新鮮な試料が得られない法医学領域での利用には適さない点も見られることから一塩基多型 (SNP:single nucleotide polymorphism) の利用の有用性が指摘されている。しかし、公表されている多くの SNP は 2 対立遺伝性 (bi-allelic) であり、多型性が乏しいため識別能力が低く、法医実務での利用価値が問われている。

2. 研究の目的

本研究では、2 対立遺伝性より多型性を示す 3 対立遺伝性 (tri-allelic) SNPs の検索と、検索した tri-allelic SNPs の日本人における遺伝子頻度を求め、法医 DNA 鑑定での利用価値について検討した。

3. 研究の方法

試料:

データ集積には、informed consent を得た健常日本人 96 名の DNA を用いた。

Tri-allelic SNPs の選出: tri-allelic SNPs は、第 1 番染色体から第 2 1 番染色体上にあり、NCBI データベース dbSNP (<http://www.liacs.nl/~jlaros/projects/snp/>) と Westen らの報告 (Forensic Sci. Int. Genet. 3:233-241, 2009) した SNPs から日本人で有用と思われる 25 種類を用いた。Tri-allelic SNPs の遺伝子頻度の算出:

Tri-allelic SNPs の確認は、標的 SNP を含む領域を増幅後、ダイレクトシーケンス法にて行った。遺伝子頻度は、観察されたアリル数から求めた。PCR に用いたプライマーは表 1 に示した。また、PCR に用いる反応液中のカクテル、条件は表 2 に示した通りである。ダイレクトシーケンスは、遺伝子増幅後、過剰のプライマーや dNTP を ExoSAP-IT (GEヘルスケア社)を用いて取り除き、さらに ExoSAP 活性を失活させ、Sequencing 反応を行った。シーケンス試薬は ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ABI)を用いて行った。SNaPshot 法 (一塩基伸長法)を用いた簡易 SNP 検出の検討:

特異的な非ラベルプライマーで増幅したテンプレートに長さの異なる tail 部分を持つようにデザインした伸長プライマー (extension primer: 表 3)と SNaPshot™ Ready Reaction Mix (ABI)を用いて伸長反応を行い、反応産物を ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (ABI)で電気泳導し、エレクトロフェログラムから、SNP 検出を行った。

Tri-allelic SNP をマーカーとして次世代シーケンサーを用いた混合試料の定量性に関する検討:

Tri-allelic SNP のアリル型が既知の 2 種類の DNA サンプルを各濃度比で混合した試料について次世代シーケンサー (Ion PGM, Life Technology Co)を用いてディープシーケンス解析を行い、定量性について検討した。

表1 Tri-allelic SNP 検索用のプライマー

No.	dbSNP(rs#)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
1	rs3091244	GCGAAATATGGGAAATGG	GGCTGAAGTAGGTTGGTGGAG
2	rs1630312	GAGCCACATGGAGATTAGGTC	GTTGTACCTATCCACGGACGAG
3	rs10045	TGGAAGTGGTTCTTTCTGTTG	CACCTAGGGTGAACCTCAATTT
4	rs356167	AAAACCATCACCACAGTTCC	CCAAATGTCCAGATACAAC
5	rs4540055	AACTTTCATCTTCCGTGTGGTA	AAGCTAGGTCGAAGCAAAAGT
6	rs2032582	CATATTTAGTTTGACTCACCTCC	TGTTGTCTGGACAAGCACTG
7	rs433342	CCAATCTTTCTCACCCCTC	ATGTCATGGAGCAACCA
8	rs10811897	TTACCCATAGGACAGGGTCA	GAAATTTTCTGCTGGTTTGTG
9	rs11141033	CAGGAGCCAGGCAGTACTAAAC	GTACAGCATTGAGGCTTAGAG
10	rs17287498	CGTGGGACACAGGATGAAT	TGACCCAGGACTGACCTTTC
11	rs5030240	CCCTTTGAGTGTCCACCACT	CCATGCCAGCTGATTTTTA
12	rs2298556	GTTCTATCTTGGCTTCTATTGG	ACTAGGGTGGGGCTAGAAATAG
13	rs2307223	TGCAAACTAATTTCTGAAAGCAC	GAAGGAGGCGAATGGAGAT
14	rs3812847	AGTAGTAAGTGGCTGCTGGAG	GCAATGAAAAGTTCTTGGAGG
15	rs140676	GGCATTAGCCATTCATTTTC	GCCATCAAAAACACAGAGCAA
16	rs3743842	AGACACCAGCCACCTCTCAG	TGCATTTTCTGGACCCTCA
17	rs11865501	CAAAGGATAGCCTAGCAGAGGA	TGGGTAGACTGGTAGGAAGGAG
18	rs941454	TTAATGAGGTAGGCGAGGCTA	CTTGGTTTGTGTTTGAAGCAA
19	rs3816662	CCTCATTAACTCCATGACACGA	AAACCCACTGTCACAACAG
20	rs1050528	GCCTTTTGCATCTGGAAITTC	CCCACCTGCGATGAAAAGG
21	rs1042229	AGCCATAACTGACAGCA	TGCCAGTTATCATTCGTGTG
22	rs385780	GGCCAGGGCTCTGTTTTAAG	GCAAGTTGGGAGAGATGG
23	rs2069945	CAGCATGAGGAATCCCACT	TAACCCCTCCCTTCTATTA
24	rs2278786	ACAAGTTCATGGCCACCTATCT	TTTCCCTATGATCAACAC
25	rs6001030	GGAAGGAAGGAGATCTCAACA	TTGTCAAGTACAGTGTTCAGC

表2 PCR用の反応組成と条件

	20 ml	Final	Reaction Condition
x10Ampli Taq Gold buffer II	2		94 ° C 10 min
25mM MgCl ₂	2	2.5mM	94 ° C 30 sec
2mM dNTP	2	0.2mM	54 ° or 58 30 sec 35 cyc
PCR AmpliTaq Gold	0.2	1.0 U	72 ° C 30 sec
F primer (10mM)	0.5	0.5mM	72 ° C 10 min
R primer (10mM)	0.5	0.5mM	
DNA (50ng/ml)		1	
H ₂ O		11.8	

表3 SNaPshot法に用いたExtension プライマー構造

SNP name	PCR Size (bp)	Extension primer
rs3091244	86	aaGGAAATGGTAACATATTAAC
rs35528968	86	ccaagtcgtgaaagtcgacaaTGGTGTGACTCTTATTAT
rs356167	91	gtccacgctgtagaaagtcgacaaCTGTTGTGTTCTTCTTCTT
rs2032582	72	cgtcgtgaaagtcgacaaAGATAGAAAAGCACTAGAAGGT

表4 SNaPshotの反応組成と反応条件

	5.0 µl	Final	Reaction Condition
SNaPshot			96 ° C 2 min
SNaPshot Ready Reaction Mix	2.5		96 ° C 10 sec
SNaPshot ExoSAP-IT treated PCR Primers E	1.0		50 ° C 5 sec 40 cyc
	1.5	30 mM	60 ° C 30 sec
Shrimp Alkaline Phosphatase	1.5 µl		37 ° C 60 min
Shrimp buffer	0.7µl		72 ° C 15 min

4. 研究成果

1) 日本人における 25 種類の tri-allelic SNP の遺伝情報

25 種類の各 rs (reference SNP)を含む領域を日本人 86 人について direct sequencing を行い、アリル頻度を求めた結果を表 5 に示す。PIC(polymorphic information content), PM(matching probability), PD(power of discrimination) と PE(power of exclusion)値は PowerStats V12 ソフト (Promega Co.)を用いて算出した。PIC が 0.50 以上を示した各 SNP (rs356157, rs2032582, rs11141033, rs2298556, rs2307223, rs3812847, rs941454, rs3816662, rs1050528, rs1042229)アリル頻度は、何れも 10%以上を示している。表

5 から総合識別能 (PD) と総合排除率 (PE) を計算すると、PD=0.9999999999997、PE=0.99885 と高値を示し、法医 DNA 検査において高度な鑑定能力を有することが示唆された。

表5 Tri-allelic SNPs の遺伝子頻度と遺伝子情報

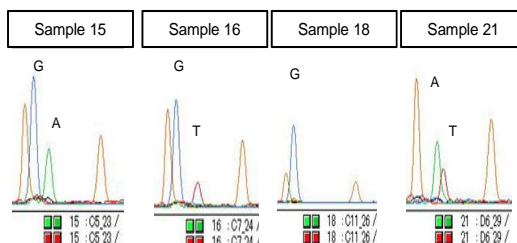
No.	dbSNP(rs#)	Chr	Allele frequency for SNPs				PIC	PM	PD	PE
			A	T	G	C				
1	rs3091244	1	0.09	0.15	0.76	0.36	0.40	0.60	0.14	
2	rs1630312	1	0.25	0.72	0.03	0.35	0.41	0.59	0.11	
3	rs10045	3	0.53	0.07	0.40	0.46	0.29	0.72	0.24	
4	rs356167	4	0.48	0.35	0.17	0.54	0.25	0.75	0.32	
5	rs4540055	4	0.65	0.29	0.06	0.42	0.33	0.67	0.14	
6	rs2032582	7	0.18	0.48	0.34	0.54	0.23	0.77	0.32	
7	rs433342	8	0.42	0.56	0.02	0.39	0.35	0.65	0.18	
8	rs10811897	9	0.42	0.06	0.53	0.45	0.28	0.72	0.18	
9	rs11141033	9	0.40	0.47	0.13	0.52	0.25	0.75	0.27	
10	rs17287498	10	0.07	0.12	0.81	0.30	0.48	0.52	0.08	
11	rs5030240	11	0.07	0.07	0.34	0.59	0.45	0.33	0.67	0.33
12	rs2298556	11	0.39	0.44	0.18	0.55	0.21	0.80	0.30	
13	rs2307223	12	0.31	0.44	0.25	0.58	0.19	0.81	0.29	
14	rs3812847	13	0.38	0.16	0.46	0.54	0.21	0.79	0.26	
15	rs140676	15	0.60	0.36	0.04	0.41	0.34	0.66	0.20	
16	rs3743842	16	0.58	0.28	0.14	0.49	0.26	0.74	0.25	
17	rs11865501	16	0.30	0.12	0.58	0.48	0.26	0.74	0.19	
18	rs941454	17	0.44	0.27	0.30	0.58	0.21	0.79	0.41	
19	rs3816662	17	0.12	0.48	0.40	0.51	0.27	0.73	0.32	
20	rs1050528	17	0.39	0.20	0.41	0.56	0.20	0.80	0.30	
21	rs1042229	19	0.47	0.38	0.15	0.53	0.23	0.77	0.37	
22	rs385780	19	0.10	0.18	0.72	0.39	0.37	0.63	0.12	
23	rs2069945	20	0.04	0.24	0.72	0.36	0.40	0.60	0.15	
24	rs2278786	20	0.12	0.73	0.15	0.39	0.36	0.64	0.14	
25	rs6001030	22	0.12	0.69	0.19	0.42	0.33	0.67	0.19	

Chr: Chromosome, PIC: polymorphic information content, PM: matching probability, PD: power of discrimination, PE: power of exclusion

2) SNaPshot 法を用いた tri-allelic SNP のタイピング

表3に示した extension primer を用いて 4 種類の SNPs のタイピングを SNaPshot 法にて解析した。図1に示したように、4 種類の蛍光色素でラベルした ddNTP terminator (青: ddGTP, 黒: ddCTP, 赤: ddUTP, 緑: ddATP) により PCR 鋳型 (template) とマッチしたプライマーは、一塩基の伸展を示して PCR 反応が停止し、付加したピークで判定可能となる。図1は rs3091244 のタイピング例である。試料 15 は G/A のヘテロ接合体、試料 16 は G/T のヘテロ接合体、試料 18 は G/G のホモ接合体、試料 21 は A/T のヘテロ接合体を示している。SNaPshot 法を用いた SNP タイピングは direct sequencing 法に比べ、容易に SNP タイピングが可能である。しかし、今回 4 種類の tri-allelic SNP を一度に検出可能で有るか (multiplex SNaPshot 法) を検討したが、Tri-allelic SNPs の簡易検出法の試みとして SNaPshot 法を用いたタイピングでは、判定の条件設定、エレクトロフェログラムの判読の煩雑さから、法医実務での実務性が低いことが示唆された。SNaPshot 法を用いた 2 種類の混合試料の検出能力について検討したところ、総量 5ng の型の異なる 2 種類の DNA 混合サンプルでは、混合比 1:4 までが判定可能であった。

図1 SNaPshot法による rs3091244 アリル判定パターン



3) 次世代シーケンサーを用いた混合試料の定量性に関する検討

法医鑑定試料が、複数人の痕痕を含んだ混合試料であるかを判定する技術は今日の DNA 鑑定では重要な課題となっている。

現在、STR に基づいた DNA 検査方法が用いられているが、回収量が微量な DNA や、温度・湿度・紫外線等の環境要因により劣化した DNA では、アリル脱落 (allele drop-out) 現象、アリル挿入 (allele drop-in) 現象、アリル不均衡現象などが原因で、自動シーケンサーを用いた型判定のエレクトロフェログラムのピークの鑑別が極めて困難な現象が見られることがある。また、アリルピークの高さの不均衡や不安定性から STR を用いた従来の方法では、混合試料の定量性も不確かである。

精度の高い定量性を得る新たな方法として、次世代シーケンサー (NGS) を用いて人工的に混合した試料の定量を試みた。NGS では、限られた遺伝子 (PCR 増幅) 領域について数多くのカバレッジを調べるディープシーケンスにより目的とするアリル数を測定することが可能である。NGS での資料作成および解析には、繰り返し構造を示す STR よりも、SNP マーカーの方が適していることから、識別能力が高い tri-allelic SNP を用いた。

試料は、表6に示したように、rs941454 についてホモ接合体、ヘテロ接合体を含む 5 種類の遺伝子型 (A/A, C/C, G/G, A/C, A/G) を示す DNA を用いた。PCR に用いた DNA 量は何れも総量 10ng であり、単独の試料、混合比 1:1、混合比 4:1、混合比 9:1、混合比 19:1、混合比 99:1 の試料を使用した。PCR に供する試料は PicoGreen を用いた Bioanalyzer で測定し濃度調整をしたものである。

表6に実際 NGS で測定した結果を示した。収集したシーケンス総数 (coverage) のなかで、アリル数とその頻度を示している。2 種類のサンプルの混合比と測定された rs941454 のアリル数の比率を比較すると、19:1 の混合までは、概ね 2 種類の試料の混合比を反映していた。特にヘテロ接合

体の混合を持つサンプル (A/C と A/G) では、混合比 9:1 と 19:1 で A のアリル数が最も多く観察され、それぞれ、12 倍、19 倍のアリル数が実際検出されていた。今後再現性、血痕等の試料からの基礎実験が必要であるが、Tri-allelic SNP を用いた次世代シーケンサーによる混合試料からの定性・定量解析は法医 DNA 鑑定に有用であることが示唆された。

表6 次世代シーケンサーを用いたrs941454 tri-allelic SNPのアリル解析

DNA (10ng)	Sample	Genotype	Detected Allele	Allele Counts	Ratio of Allele	Coverage
original	210	A/A	A	9071		9293
	228	C/C	C	5347		5490
	244	G/G	G	9829		10109
	154	A/C	A/C	11346/8343	1.4 : 1	21343
	195	A/G	G/A	5191/4825	1.1 : 1	11190
DNA mix 1:1	210/228	A/A : C/C	A/C	3126/3126	1 : 1	7035
	228/244	C/C : G/G	G/C	3806/3477	1.1 : 1	7317
	154/195	A/C : A/G	A/G/C	3669/2358/1369	2.7 : 1.7 : 1	8306
DNA mix 4:1	210/228	A/A : C/C	A/C	3857/690	5.6 : 1	4846
	228/244	C/C : G/G	C/G	15158/4274	3.5 : 1	20470
	154/195	A/C : A/G	A/C/G	3450/2244/732	4.7 : 3.1 : 1	7165
DNA mix 9:1	210/228	A/A : C/C	A/C	6198/856	7.2 : 1	7083
	228/244	C/C : G/G	C/G	6415/870	7.4 : 1	7323
	154/195	A/C : A/G	A/C/G	11936/9500/981	12.3 : 9.8 : 1	23164
DNA mix 119:1	210/228	A/A : C/C	A/C	18315/846	21.6 : 1	19698
	228/244	C/C : G/G	C/G	22422/852	26.4 : 1	23548
	154/195	A/C : A/G	A/C/G	8652/8346/455	19.0 : 18.3 : 1	17562
DNA mix 99:1	210/228	A/A : C/C	A/C	26778/2943	9.1 : 1	30399
	228/244	C/C : G/G	C/G	16374/516	31.6 : 1	17292
	154/195	A/C : A/G	A/C/G	14850/12972/318	46.5 : 40.5 : 1	29073

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 2 件)

Harayama Y, Kamei S, Sato N, Hayashi T, Shiozaki T, Ota M, Asamura H. Analysis of Y chromosome haplogroups in Japanese population using short amplicons and its application in forensic analysis. Leg Med (Tokyo). 2014;16:20-25.

Okii T, Hayashi T, Ota M, Asamura H. Development of multiplex assay with 16 SNPs on X chromosome for degraded samples. Leg Med. 2012; 14: 11-16.

〔学会発表〕(計 6 件)

太田正穂、林徳多郎、塩崎哲也、佐藤紀子、布谷美弥、原山雄太、浅村英樹：日本人における 3 対立遺伝子性 SNPs 遺伝子頻度、第 97 次日本法医学会学術集会、2013 年 6 月 26 日～28 日、roit ロイトン札幌、札幌
亀井佐矢子、佐藤紀子、原山雄太、布谷美弥、林徳多郎、塩崎哲也、太田正穂、浅村英樹：KCNQ1 SNP may pose sudden death risk for patients administered psychoactive medication. 第 97 次日本法医学会学術集会、2013 年 6 月 26 日～28 日、ロイトン札幌、札幌

太田正穂、沖貴仁、林徳多郎、浅村英樹：個人識別における 3 対立遺伝子性 SNPs 有用性の検討、第 96 次日本法医学会学術集会、2012 年 6 月 7 日～9 日、アクトシティ浜松、浜松

亀井佐矢子、佐藤紀子、原山雄太、林徳多郎、太田正穂、浅村英樹：Short amplicon に基づいた SNP 解析法による Y 染色体系統分類-Haplogroup D,0 の細分化、第 96 次日本法医学会学術集会、2012 年 6 月 7 日～9 日、アクトシティ浜松、浜松

太田正穂、沖貴仁、林徳多郎、浅村英樹：法医 DNA 検査における 3 対立遺伝子性 SNPs 解析、第 95 次日本法医学会学術集会、2011 年 6 月 15 日～17 日、コラッセ福島、福島

原山雄太、塚田和彦、沖貴仁、林徳多郎、太田正穂、浅村英樹：性染色体上の SNPs 解析法に関する比較検討、第 95 次日本法医学会学術集会、2011 年 6 月 15 日～17 日、コラッセ福島、福島

〔図書〕(計 3 件)

原山雄太、亀井佐矢子、佐藤紀子、林徳多郎、塩崎哲也、太田正穂、浅村英樹：Short amplicon に基づいた SNP 解析による Y 染色体系統分類法と法医実務試料への応用、DNA 多型、21:193-196, 2013.

原山雄太、沖貴仁、塚田和彦、林徳多郎、太田正穂、浅村英樹：性染色体上 SNPs 解析法に関する比較検討、DNA 多型、20:187-189, 2012.

沖貴仁、林徳多郎、太田正穂、浅村英樹：Y 染色体系統分類への MiniPCR-SNPs 法の応用 (第 2 法)、DNA 多型、19:221-222, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田正穂 (OTA, Masao)
 信州大学・医学部・准教授

研究者番号：23590846