

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	浅利 優
学位論文題目			
Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms using 3' nucleotide differences in ligase detection reaction probes. (プローブ3'末端塩基配列の違いに基づいた一塩基多型の識別)			
共著者名			
大村友博、間瀬田千香暁、塩野寛、田崎嘉一、松原和夫、清水恵子			
Molecular and Cellular Probes 24巻 381頁～386頁 平成22年12月			
研究目的			
法医学領域における個人識別には、試料中に残存するDNAから複数の遺伝子多型判定が利用される。大きな個人差があることからDNA鑑定的主流となっている繰り返し配列に加えて一塩基多型 (SNPs) も注目されており、血液型や性別、動物種などもSNPs解析により判定可能である。本研究では、最も身近な遺伝子多型の1つとして知られるABO式血液型のSNPsに着目し、リガーゼ検出反応においてプローブ3'末端塩基配列の違いによる検出効率への影響を詳細に明らかにした。さらに、微量DNAを用いた型判定におけるこれらの設計法の有用性について検討した。			
材料・方法			
1. 検査部位			
ABO式血液型に関連する5座位 (261G/delG、297A/G、703G/A、796C/Aおよび803G/C) のSNPsを対象とした。			
2. 試料			
リガーゼ検出反応にはSNPsを含む1本鎖の合成DNA断片を用い、アリル特異的増幅反応には口腔粘膜細胞より抽出したゲノムDNA、またはコントロールDNA9947A、9948を使用した。			
3. リガーゼ検出反応と検出効率の評価			
アリルを識別するプローブには、3'末端をSNPs部位とする鋳型DNAに相補的な20-25塩基を含む合成オリゴヌクレオチドをコントロールとした。さらにSNPs部位を3'末端から1または2塩基移動したもの、コントロールのプローブ内にミスマッチ塩基を挿入したものをあわせて作成した。なお、プローブは各SNPの2つのアリルにそれぞれ異なる蛍光色素 (FAMおよびHEX) で標識した。作成した計10種類のプローブ、1本鎖DNA、耐熱性リガーゼAmpligase (Epicentre) を用いて検出反応を行った。反応産物はABI 310 Genetic Analyzer (ABI) を用いて解析し、5座位のSNPsの各アリルは増幅断片のDNAサイズと、青、緑のシグナルにより決定した。			

検出効率は2つのアリルのピーク高（蛍光相対強度）とピークバランスで評価した。

4. アリル特異的増幅による一塩基多型解析

ゲノムDNA（1ng）、コントロールDNA（0.5, 0.2, 0.1 および0.05ng）を鋳型として5座位のSNPsを含むエクソン6（147 bp）および7（227 bp）をPCRにて増幅し、生成物をExoSAP-IT（GE Healthcare Bioscience）で精製した。各SNPに対してFAMまたはHEXで標識したプライマーを設計し、計10種類のプライマーと精製したPCR産物を用いて増幅反応を行った。反応産物はABI 310 Genetic Analyzer（ABI）を用いて解析した。なお、2種のコントロールDNAからの判定は異なる鋳型量（0.5、0.2、0.1、0.05ng）で5回ずつ実施した。

成 績

1. プローブ3'末端塩基配列の違いによる検出効率への影響

プローブの3'末端をSNPsとすることで5座位ともに検出可能であったが、プローブ内のSNPs部位を3'末端から1塩基移動することで、5座位すべてでピークバランスが上昇し、特に261G/delG、297A/G、703G/Aで顕著であった。さらに、261G/delGではピーク高も上昇し、その効果はSNP部位を1塩基よりも2塩基移動した場合に大きいものであった。これに対して、ミスマッチ塩基の挿入したプローブ判定ではピーク高は顕著に減少していた。

2. ゲノムDNAおよび微量DNA解析での判定精度への影響

796C/A、803G/Cでは3'末端をSNPsとするプライマーを、261G/delG、297A/G、703G/AはSNPs部位を一塩基移動したプライマーを用いてアリル特異的増幅により30検体のゲノムDNAを解析したところ、明瞭なアリルの識別が可能であった。微量DNAからの判定では、0.2 ngまでで分析可能であった。しかしながら、0.1 ng以下では正確な判定ができないか、検出されない割合が顕著に高い結果となった。さらに、アリルが欠失する（アリルドロップアウト）など正確な判定ができない場合での最も高いピークは261G/A、297A/Gよりも703G/A、796C/A、803G/Cで顕著に大きい値であり、後者でアリルドロップアウトが生じやすいことが明らかとなった。

考 案

プローブ（プライマー）3'末端の塩基配列はSNPs判定において極めて重要であり、SNPsを3'末端とする設計やミスマッチ塩基の挿入が知られている^{1,2)}。しかしながら、この設計は必ずしもピーク高やピークバランスが良好ではない場合も観察され、そのような場合にはSNPs部位の移動が有用であることが明らかとなった。特に261G/delGのような1塩基の欠失部位ではピーク高にも大きく影響しており、1または2塩基を移動することによってプローブと鋳型DNAとで複数塩基のミスマッチが形成されることが要因と考えられた。このような設計はゲノムDNAからのアリル特異的増幅においても有用であり、微量DNAからも解析可能であったことから法医鑑定にも適しているものと思われる。また、アリルドロップアウトの生じやすさはSNPsを識別する位置ではなく増幅断片長に関連しており、1塩基程度のSNPs識別部位の移動は判定精度自体に影響が少ないことが示唆された。

結 論

検出プローブ内のSNPs部位の移動はSNPs解析における検出効率を改善するための方法として有用であることが明らかとなった。さらに微量DNAから高精度のアリル識別が可能であり、法医鑑定にも適するものと思われた。




引 用 文 献

1. Ayyadevara S, Thaden JJ, Shmookler Reis RJ, Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by taq DNA polymerase during polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* 2000, 284 11-18.
2. Huang MM, Arnheim N, Goodman MF, Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: Implications for single nucleotide discrimination in PCR, *Nucleic Acids Res.* 1992, 20 4567-4573.

参 考 論 文

1. Asari M, Umetsu K, Adachi N, Azumi JI, Shimizu K, Shiono H. Utility of haplogroup determination for forensic mtDNA analysis in the Japanese population. *Legal Med*, 2007, 9, 237-240.
2. Asari M, Tan Y, Watanabe S, Shimizu K, Shiono H. Effect of length variations at nucleotide positions 303-315 in human mitochondrial DNA on transcription termination. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361, 641-644.
3. Asari M, Azumi JI, Shimizu K, Shiono H. Differences in tissue distribution of HV2 length heteroplasmy in mitochondrial DNA between mothers and children. *Forensic Sci Int*, 2008, 175, 155-159.
4. Asari M, Watanabe S, Matsubara K, Shiono H, Shimizu K. Single nucleotide polymorphism genotyping by mini-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification of degraded DNA. *Anal Biochem*, 2009, 386, 85-90.
5. Asari M, Omura T, Maseda C, Matsubara K, Shiono H, Shimizu K, A new method for human ABO genotyping using a universal reporter primer system. *J Forensic Sci*, 2010, 55, 1576-1581.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	浅利 優
<p>審査委員長 千石 一雄 </p> <p>審査委員 蒔田 芳男 </p> <p>審査委員 清水 恵子 </p>			
学位論文題目			
<p>Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms using 3' nucleotide differences in ligase detection reaction probes (プローブ 3'末端塩基配列の違いに基づいた一塩基多型の識別)</p> <p>法医学領域において試料中の微量 DNA から如何に効率的に個人識別を可能にするかは重要な課題の一つであり、試料中に存在する DNA から複数の遺伝子多型を判定する方法が用いられている。リガーゼ検出反応(LDR)は一塩基多型(SNPs)の同定に極めて有効な方法である。しかしながら、LDR解析においてより識別感をあげるためのプローブ設計に関する報告はほとんど存在しないのが現状である。 本研究は現在主に用いられている SNPs を 3' 末端とするプローブに対して、SNPs を 1 または 2 塩基シフトするプローブを作製し、その比較検討から、新たなプローブ設計法の法医鑑定における有用性を明らかにすることを目的としたものである。</p>			

本研究では、ABO式血液型に関連する5座位(261G/delG, 297A/G, 703G/A, 796C/A, 803G/C)のSNPsを対象とし、まずプローブ設計の違いによる検出効率への影響に関し検討した。アリルを識別するプローブとして3'末端をSNPs部位とする鋳型DNAに相補的な塩基を含む合成オリゴヌクレオチドをコントロールプローブとし、コントロールプローブ内にミスマッチ塩基を挿入したもの、さらに、SNPs部位を3'末端から1または2塩基移動したプローブを作成し、LDR反応を行った。その結果、プローブ内のSNP部位を3'末端から1塩基移動することにより全ての座位のピークバランスが上昇し、261G/delGではピーク高も上昇することを明らかにし、プローブ作製法が検出効率に影響することを証明した。

さらに、ゲノムDNAおよび微量DNAを試料とし、コントロールプローブとSNPs部位を1塩基移動したプローブを用いて判定精度を比較した結果、SNPをシフトさせたプローブを用いた場合、コントロールプローブでは検出不能であった、0.2ngの微量DNAからの分析も可能であることを明らかにした。

本研究は、従来のプローブ設計と比較しSNPsを1-2塩基シフトするプローブを設計する方法がSNPs解析による検出効率を改善し、微量DNAから高精度のアリル識別を可能とする重要な知見を示すものであり、DNA鑑定に大いに貢献するもので、学術的価値は極めて高いと判断される。

また、諮問審査においても適切かつ論理的な回答が得られ、提出者は十分な学問的知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が学位論文としてふさわしい内容であると判断する。