

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	岡 久美子
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>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)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>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</p> <p>Molecular and Cellular Probes 掲載予定</p> <p>研 究 目 的</p> <p>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。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1. Indel多型の選択と特異的プライマーの設計</p> <p>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50 Mb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。</p>			

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Multiplex PCR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ABI 310 Genetic Analyzer (ABI)を使用した。鋳型DNA量は1 ng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Singleplex PCR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1 ngとし、更に1-0.0625 ng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、アメロゲニンを加えた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、0.25 ng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.

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	岡 久美子
審査委員長 蒔田 芳男  審査委員 千石 一雄  審査委員 清水 恵子 			
学 位 論 文 題 目 <p style="text-align: center;">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)</p>			
<p>法医学領域において、DNA 多型マーカーを用いた個人識別として、常染色体上に存在する STR(Short Tandm Repeat)マーカー解析が利用されている。しかしながら STR マーカーは、劣化試料からの解析の限界や突然変異率が比較的高いことなどの問題点が指摘されている。この問題点を克服するために、近年では、一塩基多型(SNPs)や Alu 配列の挿入多型などのマーカーを併用されるようになり、識別精度の向上が見られることが明らかにされている。その他の多型マーカーをしての短い挿入欠失 In/Del (Insertion/Deletion) 多型も判定が容易であることから個人識別への応用が期待されてきた。しかしながら、一座位 2 アレル型の多型をもって個人識別に応用する場合には、その座位数が 40 程度必要になり、従来型の蛍光直接標識プライマーの応用では解析費用が高額になる。この解決には、ユニバーサル蛍光 PCR 法の応用が有用と考えられるが日本人を対象にした検討は未だない。本研究では、常染色体 In/Del 多型 37 座位のアレル頻度を明らかにし、性染色体のアメロゲニンを含む 38 座位に関してユニバーサル蛍光 PCR 法を用いた二色蛍光遺伝子型判定を開発し個人識別への応用を検討したものである。</p>			

常染色体 In/Del 多型 37 座位の日本人集団におけるアレル頻度を検索した結果、選択した In/Del 多型のマイナーアレル頻度の平均は 0.39 で Hardy-Weinberg 平衡状態にあることが明らかになった。その結果、他人同士の DNA が偶然一致する確率である総合同値確率は 2.12×10^{-15} であり、高い個人識別能をもつことが明らかになった。また、二色蛍光遺伝子型判定のためにユニバーサル配列内に新たな塩基置換を導入したプライマーを数種類作成した。これらの中から高い増幅効率・特異性を保持し、2 つの独立したマルチプレックス PCR において蛍光色素 FAM・HEX のシグナルをそれぞれ識別することが可能なプライマーを選ぶことが可能であった。さらに、これらのプライマーを利用することで、わずか 0.25ng の微量な DNA からでも完全なプロファイルを得られることが明らかになり、法医学領域で解析対象とされる微量試料からの DNA 条件をクリアするものであった。以上のことから、本研究で開発された方法は、法医学領域の個人識別において高い信頼性と感度をもち費用対効果が高い方法であることが示された。

また、申請者に対して口頭試問を行ったところ、本論文の内容および関連領域である法医学、人類遺伝学、集団遺伝学、DNA 解析技術などの試問に対し適切な解答が得られ、十分な知識とともに適切に説明できる能力を有することが示された。

以上から、本論文は、学位（医学博士）論文に値するものと判断した。