

論文の内容の要旨

氏名：野 上 宏 明

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Quenching Probe 法による歯髄 DNA からの性別判定

DNA 鑑定による個人識別の精度は、今や4兆 7000 億人に一人にまで絞り込むことができるほどに向上し、その鑑定方法は国際的に統一化され、常染色体、X 染色体および Y 染色体 STR (short tandem repeat: 短鎖縦列反復配列) 型の判定結果は全世界で共有も可能となった。すなわち、自国の犯罪者に加え、国際的なテロリストを検挙することもできるようになったのである。

法医学領域における性別判定は、常染色体 STR 15 ローカスの解析用キットに組み込まれた、X および Y 染色体上に位置するアメロゲニン遺伝子領域の capillary gel electrophoresis (CGE) 法による検索がほぼ定着している。しかしながら、鑑定試料の遺棄された環境によっては DNA に対する影響が避けられず、X および Y 特異塩基配列の両者が検出された場合は男性と判定できるものの、X 特異塩基配列のみが検出された場合は女性として良いのか、あるいは男性にもかかわらず DNA が断片化されたために Y 特異塩基配列が検出されないのかなど、性別判定に苦慮することもある。鑑定結果の正当性を評価するためには、別の DNA 型解析技術による鑑定が強く望まれる。

蛍光標識したシトシン塩基を末端に持ち、標的遺伝子に特異的に結合するような配列に設計した Qprobe は、標的遺伝子と結合するとグアニン塩基の影響を受けて蛍光が著しく減少する。この蛍光消光現象を利用し、その際の蛍光強度を測定することで、標的遺伝子の SNP (single nucleotide polymorphism: 一塩基多型) タイピングを行うことができる Quenching Probe (QP) 法が 2004 年に開発された。法医学領域において QP 法を性別判定に応用し報告したのは著者が所属する研究室が初めてである。

著者は、白骨死体や高度に腐乱した死体の性別判定に資することを目的に、陳旧歯髄から抽出した DNA を試料とし、性染色体上のアメロゲニン遺伝子領域に位置する X および Y 特異塩基配列を指標とした QP 法による性別判定の可否について検討した。

試料は、室内にて 5 年～26 年間保存された血縁関係のない 32 例 (女性 12 例, 男性 20 例) の歯から採取した歯髄を用い、フェノール・クロロホルム法およびエタノール沈殿により DNA を抽出した。抽出 DNA 量は 10～40 ng/μl であった。

PCR 増幅のための Y 特異的フォワードプライマーは 5'-tggattct tcatccaaa taaagtg-3' (nt274-298) および同リバープライマーは 5'-tcgga ttgactcttt cctcct-3' (nt407-427) とし、Y 特異的 Qprobe (YQprobe) は 5'-cagtttaa gctctgatgg ttggcctc-3' (nt344-369) の 5' 末端に蛍光標識 FAM を付加し、3' 末端をリン酸化させた。また、X 特異的フォワードプライマーは 5'-tcct gattctaaga tagtcacact-3' (nt616-639) および同リバープライマーは 5'-aga ctccgcagaa cagc-3' (nt697-713) とし、X 特異的 Qprobe (XQprobe) は 5'-ctatgtgtgt ctcttgcttg cctctg-3' (nt640-665) の 3' 末端に蛍光標識 HEX を付加した。なお、各プライマーおよび各 Qprobe は著者が設計し、合成を依頼した。また、本検査法の結果については、Identifiler キット (ライフテクノロジーズジャパン) に組み込まれたアメロゲニン遺伝子領域の CGE 法による検査結果と比較して判定した。

PCR 反応液は、PCR チューブに 1× LightCycler480 Genotyping Master (ロッシュ), X 特異的フォワードプライマー 0.3 μM, X 特異的リバープライマー 1.0 μM, XQprobe 0.2 μM, Y 特異的フォワードプライマー 0.15 μM, Y 特異的リバープライマー 0.5 μM および YQprobe 0.05 μM を注入し、さらにウラシル-DNA グリコシラーゼ (熱感受性, 最終濃度 0.01 units/μl) およびリファレンス dye (最終濃度 0.05 μl) を注入した後、試料 DNA を加え、さらに滅菌水を加えて 20 μl とした。Identifiler キットに組み込まれたアメロゲニン遺伝子領域の検査についてはキットの方法に従った。

PCR 増幅は予備加熱 95°C で 10 秒間行った後、熱変性を 95°C で 10 秒間、アニーリングを 59°C で 30 秒間、伸長を 72°C で 15 秒間を 50 サイクル行った。ついで、解離曲線解析のために増幅液を 95°C で 15 秒間作用させた後に温度を 45°C に下げて 60 秒間作用させ、1 秒間に 0.2°C ずつ昇温させて Qprobe が解離し蛍光が徐々に増加する反応を 80°C まで行い、その後 10 秒間維持した。なお、PCR 増幅および解離曲線解析は

Stratagene Mx3000P (アジレントテクノロジーズ) を用いて行った。

性別の判定は、X および Y 特異的プライマーにより増幅された PCR 産物に結合した XQprobe のみを昇温することで蛍光強度が増加して解離ピークが出現した場合を女性、XQprobe および YQprobe を昇温させることで蛍光強度が増加してそれぞれの解離ピークが出現した場合を男性とした。また、Identifiler キットによる性別判定はアプライドバイオシステム 3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン) を用いた CGE 法により行い、キットで使用されている X 特異的プライマーによる増幅ピークのみが認められた場合を女性、X および Y 特異的プライマーによる 2 つの増幅ピークが認められた場合を男性とした。なお、本研究はその遂行にあたり、日本大学歯学部倫理委員会に申請し、承認を得た。

まず、男女各 1 例の歯髄 DNA について、女性の鋳型 DNA 量を 5 ng、男性については 1, 2, 5, 10 および 20 ng とし、X および Y 特異的プライマーならびに XQprobe および YQprobe を用いて PCR を行い、PCR 産物と鋳型 DNA 量との関係について検討した。その結果、鋳型 DNA 量の最終濃度は 2 ng に調整して用いることにより、安定した PCR 産物が得られることが判明した。なお、女性試料では Y 特異塩基配列が検出されることはなく、増幅曲線として認められることはなかった。

つぎに、男女試料各 4 例の歯髄 DNA 2 ng を鋳型として、各プライマーと各 Qprobe を用いて PCR を行い、PCR サイクル数と DNA 増幅との関係について増幅曲線で確認したところ、男女各試料の X 特異塩基配列および男性試料の Y 特異塩基配列のいずれも PCR サイクルを 35 サイクル以上で行えば、安定した PCR 産物を得ることが可能であった。なお、非特異的な反応を認めることはなかった。

また、同じく男女各 4 例の歯髄 DNA を試料として得られた増幅曲線をもとに解離曲線を作成し、Qprobe が解離して蛍光強度を増す温度について検討したところ、男女各試料の X 特異塩基配列および男性試料の Y 特異塩基配列のいずれも 65°C 付近から Qprobe の解離が認められた。すなわち、女性試料の場合は Y 特異塩基配列を有していないことから、XQprobe による蛍光強度のみが増加する一方で、男性試料の場合は XQprobe および YQprobe による蛍光強度の増加が認められた。

さらに、解離曲線の微分値データを求めて解離ピークを描出したところ、男女各 4 例いずれも解離ピークは 69°C 付近を示していた。解離ピークは、Qprobe が X および Y 特異塩基配列、すなわち標的遺伝子から離れる温度を示している。

最後に、室内にて 5 年～26 年間保存された女性 12 例および男性 20 例、計 32 例の歯から採取した歯髄 DNA を試料として、本法により XQprobe および YQprobe の解離ピーク温度による性別判定を検討した。その結果、女性試料では XQprobe の解離ピーク温度が 67.0～69.5°C を示し、YQprobe の解離ピーク温度は認められないことから、12 例すべての試料において女性と判定することが可能であった。女性試料については CGE 法により検討し、すべてにおいて X 特異塩基配列のピークのみが検出され、Y 特異塩基配列のピークが検出されなかったことを確認した。一方、男性試料では XQprobe の解離ピーク温度は 67.0～69.5°C を、また YQprobe については 68.0～69.5°C を示し、20 例すべての試料において男性と判定することが可能であった。男性試料についても CGE 法により検討し、X および Y 特異塩基配列の両ピークが検出されることを確認した。なお、本法の解析時間は 50 分程度であり、迅速性に優れた解析法であることが判明した。

以上のことから、従来の CGE 法による解析は高額なシーケンサーを必要とするが、QP 法は安価なりアルタイム PCR 装置があれば検査は可能であり、また検査は 50 分ほどで結果を導き出すことが可能であることから、QP 法による性別判定は迅速性、特異性および検出感度にきわめて優れた解析法であると思われる。さらに、当研究室では本法を ABO 式および Rh 式血液遺伝子型検査に応用し、その方法論を確立していることから、両者を併せて行うことで高度に腐敗した、あるいは白骨化した身元不明死体の個人識別精度をより一層向上させることができるものと期待される。