

ALF express DNA sequencer を用いた DNA fragment SSCP 解析法と法医学への応用

人間総合等教育研究支援室（法医学） 中村貴子

1. 個人識別と DNA 鑑定

個人識別という領域は法医学にとって不可欠な研究分野である。司法解剖している遺体が本当にまわりが認識している被害者その人なのかということから、現場に残されている骨、血痕、毛髪、体液が誰のものであるかを特定するということがふくまれる。

遺伝学に立脚した生物化学的な個人識別法は 1900 年カール・ランドスタイナーが ABO 式血液型を発見しこれを使い各個人の識別が可能であることを示したのが最初で、以後血清蛋白質、赤血球酵素群や白血球にもきわめて多様な遺伝形質があるのが明らかになった。このような方法で 1980 年代の前半までこれらの遺伝形質を網羅すれば、個人識別のレベルはほぼ完璧と思われた。しかしこれらは、親子鑑定や集団遺伝学の調査など新鮮な血液が多量に存在するときのみ可能であって、刑事事件のように わずかな血痕であったり、サンプルが古いなどの場合どうにか ABO 式血液型の判定のみ可能という状態でとても犯人や被害者を特定できるというレベルではなかった。

1985 年イギリスの分子遺伝学者ジェフリースが DNA フィンガープリント法を発表し、これを転機に DNA 多型に対する関心が法医学や犯罪学の分野で急速に高まり、DNA 鑑定という言葉が登場し、その後の PCR 法（遺伝子増幅法）の導入後 個人識別のレベルが飛躍的に向上した。（図 1）

2. DNA 鑑定の多型領域と検出方法

①. VNTR 多型

人のゲノム DNA における exon 部以外の領域には一定の長さの塩基配列（コア配列）による繰り返し配列がある。その繰り返しの数は個人によって異なっており、高変異反復配列（variable number of tandem repeat : VNTR）とよばれている。数十塩基程度を 1 単位とする比較的短い配列の繰り返しはミニサテライト DNA といい反復数の違いにより数十種類の対立遺伝子をもとめる。ゲノム DNA 中にはよく似たコア配列を有する VNTR は多数存在するためこのコア配列をプローブに用いたサザンブロット法を実施すると目的の VNTR 以外にも多く座位に存在する VNTR（マルチローカス VNTR）と結合し多くのバンドが検出されることになる。この方法で得られるパターンにおいて他人同士で偶然に一致する確立は 10^{-11} とされ指紋と同様 万人不同であることから DNA フィンガープリント法といわれる。

またコア配列に隣接した特異的な DNA 領域をプローブとして使用すれば目的とする単一の VNTR（シングルローカス VNTR）のみが検出できる。シングルローカス VNTR 多型の検出方法としてはサザンブロット法以外に PCR 法も多用されている。

ミニサテライトよりさらに短い 2～4 塩基を 1 単位とする配列はマイクロサテライト DNA、あるいは STR(short tandem repeat)とよばれ、その繰り返し多型は STR 多型とよばれている。今回は詳細にふれないが、PCR 増幅した STR 領域も ALF express で検出可能である。

②. 点突然変異多型

点突然変異がたん白質をコードしている領域に生じた場合アミノ酸に変化をきたさないサイレント変異、アミノ酸置換を生じるミスセンス変異そしてストップコドンとなるナンセンス変異、1塩基挿入あるいは欠損によるフレームシフト変異がある。人のゲノム中には平均 200~500 塩基対に 1 個の割合で塩基置換に伴う多型が存在すると推定されている。

これらの大多数は遺伝子情報をになわない DNA 領域にあるため、健常なひと集団にもみとめられる。点突然変異の検出には 次のような手法がとられる。

1. PCR-APLP 法・・・PCR 増幅の鎖長を検出する。
2. PCR-RFLP 法・・・PCR 増幅後塩基置換部位を認識し切断。その断片の鎖長を検出する。
3. PCR-SSCP 法・・・一本鎖 DNA の高次構造変異のゲル易動度の差を検出する。

3. SSCP 法の原理

一本鎖 DNA は分子内水素結合などにより、その塩基配列に特異的な高次構造をとるため互いに相補的な一本鎖 DNA アリルを電気泳動すると、異なる位置に泳動される。DNA 断片内の塩基置換によってもこの一本鎖 DNA の高次構造は変化し、電気泳動の際 変化のないものと異なる易動度をしめす。このような多型を一本鎖 DNA 高次構造多型 (single-strand conformation polymorphism: SSCP) という。

PCR-SSCP 法では、PCR 産物を一本鎖としたのち、ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い DNA バンドシフトの違いを対照と比較することにより変異の有無を判定する。PCR-SSCP 法の利点として既知の変異部位だけでなく、未知の変異部位についても迅速かつ容易にスクリーニングできることである。(図 2)

4. SSCP 法による検出法

従来の方法は 5'末端を放射性標識した Primer や標識なしの Primer で PCR を行い、PCR 産物をホルムアミド色素溶液で希釈し加熱、変性させる。それを 20cm×40cm×0.03cm のアクリルアミドゲルで泳動した後、ゲルをろ紙に移し乾燥させオートラジオグラフィーでバンドを得るか、直接ゲルをエチジウムブロマイド染色するなどして検出している。しかし、これらの方法にはいろいろ問題点や応用に際しての不便な点がある。以下その点を述べる。

- 1、放射性物質の扱いは煩雑な上、実験上の危険がある。同様にエチジウムブロマイドも発癌性が指摘されている。
- 2、ゲルを作成するとき、厚さが薄いゲルほど作るのが難しい。薄いゲルを作らなければならない理由は泳動バンドのゲルの厚みによる誤差を少なくする等である。
- 3、目的の DNA 断片が 30cm くらい泳動する頃合いをはかる必要がある。一本鎖 DNA の易動度は塩基配列に依存し、必ずしも分子量によらないので、各断片ごとに最適な泳動時間を予備実験によって求めておく必要がある。
- 4、ゲルをガラス板から取り外し、染色等を行うときゲルの歪みが生じ、微妙な移動度の差や、ゲルの端と端の読み取りの整合性が難しいことがある。
- 5、ゲルは使い捨てで一回しか泳動できない。

ALF express DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いた SSCP 法はそれらを改善した方法である。それらの点を次に示す。

- 1、合成の段階で 5'側に cy5 を化学標識した Primer を用い PCR 増幅を行っているので放射性物質は必要としない。
- 2、比較的厚いゲルなので作成が容易である。検出方法はガラス板の間のスペーサーが石英でできているので、それを通過してレーザーが脇からゲルの厚みの中心を通過する。そのためゲルの表側と裏側の泳動誤差を考えなくてよい。(図3)
- 3、DNA バンドがレーザーを通過するとき検出され記録されるため、泳動時間を気にすることがない。スイッチを入れた後オーバーナイトで泳動することも可能である。
- 4、ゲルを染色のため取り外す必要がないので、歪みによる読み取りのミスは少ない。
- 5、これは我々の研究室で試して実際に応用しているのであるが、ゲルを何度でも使え(7回まで使いまわしたことがある)、時間をずらしてサンプルをアプライして一定時間内に2段の読み取りが可能である。これは多量のサンプルを処理できるということである。

5. SSCP 解析応用例

I. 方法

(図4)に示す条件でPCR反応を行い産物を Formamide 液で 97℃ 5分間熱変性させ急冷し、DNA を一本鎖にする。専用のカセットゲル板に厚さ 0.05cm のゲルを作り、機械本体にセットする。電圧や泳動時間をパソコン上で入力し、サンプルをゲル孔に入れ、泳動を開始する。泳動時間終了後イメージアナライザーにより処理され波形としてパソコン画面上に結果が表示される。

II. ABO 式血液型遺伝子多型

血液型個人識別において最も重要な ABO 式血液型遺伝子多型はその他の多型に比べ、その表現型である個人の血液型が明らかな場合が多く、事故や犯罪の捜査上有用性が高い。現在 ABO 式血液型を決定する遺伝子の Exon 6 及び Exon 7 に多数の塩基置換を伴う遺伝子型が報告されており対立遺伝子の数は主なもので5本、稀なものを含めると70本を超える。

2002年のDNA多型学会において我々は Exon 6 と Exon 7 の一領域の SSCP 分析を本法で行い ABO 血液型遺伝子型を大きく10種類に分類しさらにその他少数の多型を簡単に検出することができることを発表した。その primer の配列と PCR 領域を(図5)に示す(図6)は SSCP パターンである。O allele は Exon6 の 261 番目の塩基が欠損し、3塩基のアミノ酸にフレームシフトができ途中でストップコドンを生ずるため糖転移酵素が作られず、抗原が出現しない。A allele では 297 番目の塩基は A であるが B allele では G となっている。O allele のなかでも A と G の塩基置換がみられ、O^Aまたは O^Gallele とあらわされる。それぞれ sense 鎖 antisense 鎖とも分離がよく血液型対応遺伝子型が正確に判別される。また A ピークより遅い未知の塩基置換が検出され、シーケンスの結果 318 番目に CT の変異と同定された。(図7)

(図8)はこの方法が大量検体を効率よく処理できることを示すものである。約400検体ほどのサンプルを4~5日で検出し血液型遺伝子を判定することができる。表に示すとおり3つの集団間においてそれぞれの血液型の占める割合が大きく異なっていることがわかる。

7. 最適な SSCP パターンを得るポイント

最後に最適な SSCP のパターンを得るまで考慮しなければならない要因を示す。

(図9)のIはExon6をふくむ192bp増幅したもので、IIはforwardのprimerのみを上流へ32bp移動し224bp増幅したもので、そして(図6)は(図9)のIをほんのわずかに上流方向にprimerを伸ばしたSSCPパターンである。型の並び方の順序は多少ちがっているが、全体的にピークパターンの形イメージが異なってきている。またB alleleのピークはIではA alleleの左側で時間でいうと移動度の早い位置に出ているが、IIでは右がわの移動度が遅い位置にシフトしている。またOAのピークもAピークより早い移動をするなど、ほぼ同じ領域を増幅しているのに、わずかな鎖長の違いなどでパターンが大きくなりがちになる。これは1塩基でもちがえば高次構造が変化するSSCPの特徴をよくあらわしているが、事前にどのようなピークになるか予測がつかないので、primerの位置をいくつか選んで試行してみるほかない。

その他の要素として、ゲルの濃度と組成の違いが大きい。(図10)は(図9)のIと同じPCR産物を組成の違うゲルで流したものである。複雑なピークは見えなくなり2ピークのみになってしまった。よく観察すると、山がなだらかなピークと細身のピークがあり、変異の可能性を感じさせるが変異がないサンプルの場合もサンプルの量によってこのような変化が見られることがあり、適当なゲルとはいえない。(図6)のゲルの条件は7%のnativeゲルで、これはAcrylamideとBisacrylamideの割合を49:1に調整したゲルである。

(図10)のパターンは7%Acrylamide溶液中に10%のGlycerolが含まれたゲルで泳動したものである。Glycerol含有のゲルは高分子がとおりやすくなる傾向があり、分離するはずのDNA分子がまとまって通り抜けてしまうため、2ピークになってしまったのではないかと推測するが、サンプルによってはこのゲルの条件が分離をよくするときもある。(図10)に通常我々の研究室で使われるゲルの組成を列挙する。

ゲルの組成と組み合わせで分離に影響するのは、泳動時における電圧である。一般的に高電圧であれば、バンドが押され気味になり前のバンドとかさなってしまうことがある。しかし、10%以上のゲルで700ボルト以上をかけることにより、ピークパターンがシャープになり比較しやすいということもある。反対に電圧を低めにしてゆっくり流すと、分離がよくなることもあるが、ピークがだらだら出てしまい特徴が表れにくいということもある。

以上のように判定しやすく変異がわかりやすいパターンを検出するためには、primerの位置、ゲルの組成、電圧の3つを上手にくみあわせる必要がある。

6. 謝辞

この研究を進めるにあたり、社会医学系法医学の本田克也教授にすべてにわたりご指導、ご助言賜りましたことを、深く感謝いたします。またご親切なご援助をいただきました、法医学の田中栄之介助教授と小澤廣恭技官に厚く御礼申しあげます。

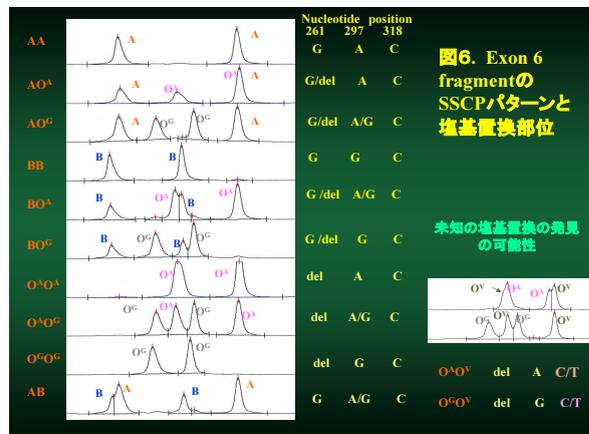
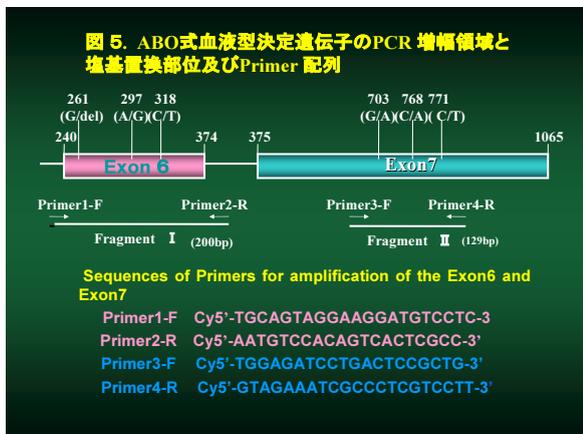
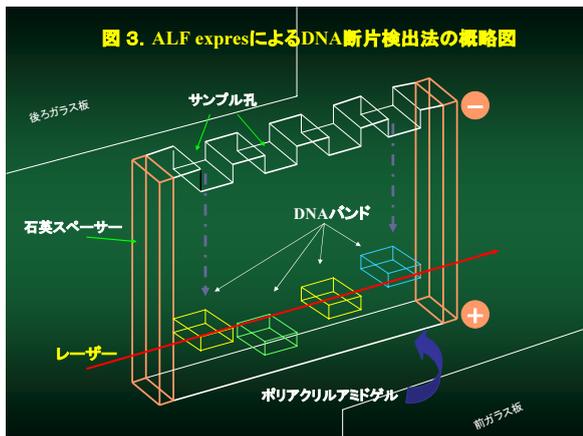
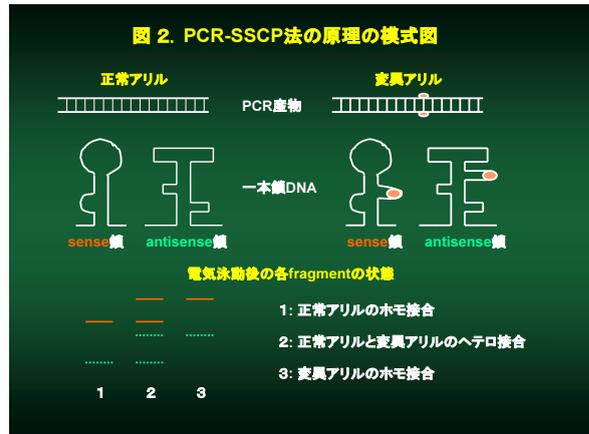


図7. Exon6 変異部位のSequencing Pattern

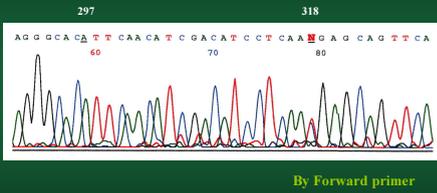
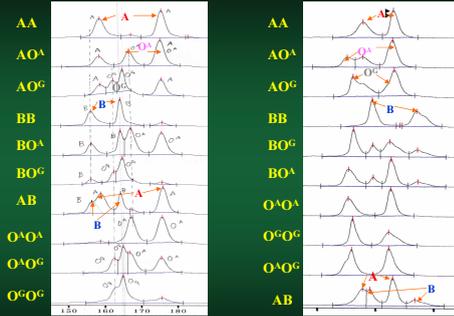


図8. Exon 6 における遺伝子型の比較

	genotype	茨城県	モンゴル	コロンビア
A	AA	10	2	0
	AO ^A	16	19	6
	AO ^G	20	13	4
B	BB	2	12	0
	BO ^A	8	11	3
	BO ^G	7	22	3
	BO ^V	0	1	0
O	O ^A O ^A	6	12	15
	O ^A O ^G	9	27	44
	O ^G O ^G	5	22	40
	O ^A O ^V	0	0	1
	O ^G O ^V	0	0	1
AB	AB	17	14	0
	n	100	155	117

* O^V: Nucleotide position 318 C→T (O115,O109,O116)

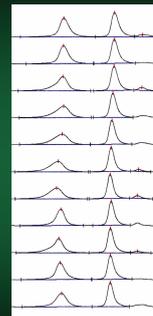
図9. Primerの設定部位とSSCPパターン



I. Exon6を含む192bpを増幅

II. Exon6を含む224bpを増幅。IのForward primerより32塩基上流にprimerを設定

図10. 実験条件の差異によるSSCPパターンの違い



Gelの組成と電圧の違い

- 7% 49:1
(Acrylamide : Bisacrylamide)
300V, 400V
- 7% 49:1 + 10% Glycerole
400V
- 8% 49:1 + 5% Glycerole
400V, 500V
- 10% 99:1
400V, 500V, 700V
- 10% 99:1 10% glycerole
500V, 700V