—技術報告—

ミトコンドリア DNA 検査のマルチプレックス化および高速化に関する研究

三田裕介, 北山哲史, 深川貴志, 綿引晴彦,
藤井宏治, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正

科学警察研究所
〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

Study of multiplex PCR and high-speed PCR of mitochondrial DNA analysis

Yusuke Mita, Tetsushi Kitayama, Takashi Fukagawa, Haruhiko Watahiki, Koji Fujii,
Hiroaki Nakahara, Natsuko Mizuno and Kazumasa Sekiguchi

*National Research Institute of Police Science
6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan*

*(Received 31 August 2017; accepted 21 May 2018;
Published online 9 July 2018 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.742)*

Mitochondrial DNA (mtDNA) analysis is a useful tool to analyze forensic samples. MtDNA exists as numerous molecules in a single cell in contrast to nuclear DNA, therefore mtDNA analysis can provide successful results in analyzing minute DNA samples. In our current PCR protocol of mtDNA analysis, hypervariable region 1 (HV1) and hypervariable region 2 (HV2) are divided into 5 regions (region A to E), and each region is amplified separately. It requires labor and long PCR time. In this paper, we study multiplex PCR of mtDNA and high-speed PCR using high-speed DNA polymerase to reduce labor and time of mtDNA analysis.

Key words: Mitochondrial DNA, mtDNA, Multiplex PCR, High-speed PCR

緒 言

ミトコンドリア DNA 検査は細胞内小器官であるミトコンドリアが持つ DNA の塩基配列を解析する手法であり, 法科学分野において広く用いられている手法である¹⁾. ミトコンドリア DNA は母系遺伝であり母系親族間では同じ配列を持つため, ミトコンドリア DNA 検査は, 核 DNA を用いた STR 型検査に比べて識別力が制限される. しかし核 DNA とは異なり, ミトコンドリア DNA は一細胞あたり

に多くのコピーが存在する²⁾ため, STR 型が得られない自然脱落毛や白骨, 歯牙などのサンプルにおいても, ミトコンドリア DNA 配列が得られる場合もあり有用である. また塩基配列解析による異同識別では, 現場資料と対照資料から得られた塩基配列が一致するか否かを調べるが, ミトコンドリア DNA は母系親族間では同一配列となるため, 本人資料が得られない場合でも, 対照資料を母系親族から採取することが可能である. このため母系親族の確認にも用いられ, 白骨死体等の身元確認のためにも利用

されている。科学警察研究所では、平成8年より刑事事件や変死事案における法科学資料に対してミトコンドリア DNA 検査を行っており、陳旧化が進んだ資料の検査や母系親族の確認をする場合において、ミトコンドリア DNA 検査を活用してきた。また日本人1366人のミトコンドリア DNA 配列の集団データを報告³⁻⁴⁾している。

現在、科学警察研究所で実際の検査に用いられている現行手法⁵⁾では、hypervariable region 1 (HV1, 16040–16375) と hypervariable region 2 (HV2, 64–339) の領域を、A～E の5つの領域に分けてPCRを行っている (Fig. 1)。通常の検査では HV1 領域に対応する A 領域、および HV2 領域に対応する D 領域の塩基配列の解析を行う。一方で、HV1 領域および HV2 領域には、シトシン (C) が連続して存在し、その下流の配列が読めなくなる C-stretch^{6,7)}が知られている。C-stretch が存在すると塩基配列分析を双方向で行えなくなるため、HV1 に C-stretch が存在した場合は B および C 領域を、HV2 に C-stretch が存在した場合は E 領域を

追加で検査することによって、各領域の塩基配列を双方向で分析し、塩基配列を決定している。現行手法では一つのサンプルを解析するにあたって、多くの PCR を必要とし、またその PCR に必要な時間も長い。また、現在では改良された試薬が多数市販されている一方で、古い試薬は販売中止になるリスクを含んでいるため、ミトコンドリア DNA 検査を安定的に維持するためには、ミトコンドリア DNA 検査手法の研究開発を継続的に行っていく必要がある。そこで本論文では、ミトコンドリア DNA 検査における PCR の簡便化・迅速化を目指すにあたって、PCR のマルチプレックス化を検討し、また新試薬を用いた PCR 時間の短縮についても検討したので報告する。

材料および方法

1. 用いたサンプル

実験に用いたサンプルは、成人男性5名に由来する、血痕 (約10ヶ月間室温保存)・口腔内細胞 (使用日当日に採取)・自然脱落毛毛幹部 (採取から数

Fig. 1 Design of region A to E and multiplex PCR.

Light grey color boxes represent HV1 region (16040–16365) and HV2 region (64–339) of mitochondria DNA. Dark grey color boxes represent C-stretch. Two-way arrows represent region A to E. See table 3. for sequences of primers. Multiplex PCR are designed as region AD to amplify region A and D, and region CE to amplify region C and E. Singleplex PCR is applied to region B.

日間室温保存)をそれぞれ用いた。DNA の抽出は EZ1 DNA Investigator kit (キアゲン),あるいは QIAamp DNA Investigator Kit で行った。DNA の抽出に当たっては各キットのプロトコールに従った。またコントロール DNA として 2800M control DNA (プロメガ)を用いた。なお本研究は科学警察研究所倫理審査委員会の承認を得て行った。

2. 定量

DNA 溶液中のミトコンドリア DNA コピー数の定量は, Smart Cycler II System (セフィード)を用いたリアルタイム PCR で定量を行った。プライマーは論文⁸⁾記載の C 領域 (231bp)を増幅するプライマーからタグ部分を除いた配列である 5'-CCCCATGCTTACAAG-3'および 5'-TGATTT CACGGAGGATGGTG-3'を用いた。反応系は 25 μ L 系とし, 各試薬 (カッコ内は最終濃度)として, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) ($\times 1$), プライマー (各 0.5 μ M) に DNA 溶液 2 μ L と水を加えて 25 μ L とした。PCR 条件は, 95°C 10秒の熱変性後, (95°C 5秒・60°C 20秒)の PCR サイクルを 35回に設定し, SYBR Green I による検出を行った。ミトコンドリア DNA のコピー数の算出には, 文献⁸⁾記載の手法でミトコンドリア DNA のコピー数を算出した K562

DNA (プロメガ)を用いて検量線を作成し, その検量線に従ってコピー数を概算した (K562 DNA 1 ng/ μ L $\equiv$ MtDNA 1 $\times 10^6$ copies/ μ L)。核 DNA の定量は論文⁹⁻¹⁰⁾に従って D17Z1 領域の 207 bp を用いた。

3. PCR

3-1. AmpliTaq Gold[®]を用いたシングルプレックス (現行手法)

文献⁵⁾の手法に従い, 抽出 DNA を用いて, ミトコンドリア DNA の HV1 領域および HV2 領域を PCR 増幅した。用いたプライマーは Table 1 に示した。サーマルサイクラーは GeneAmp[®] PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ)を用い, ランプスピードは 9600 エミュレーションモードで運転した。なおアニーリング時のランプレートは文献⁵⁾記載の 50%から 60%に変更している (Table 2)。これはランプレートを 1°C/秒に設定するため, サーマルサイクラーごとにバリデーションを行った結果に基づくものである。

3-2. AmpliTaq Gold[®]を用いたマルチプレックス

抽出 DNA を, AD 領域, B 領域, CE 領域の 3 つの反応に分けてマルチプレックス PCR (B 領域のみシングルプレックス PCR)を行った。反応系は 25 μ L 系とし, 各試薬 (カッコ内は最終濃度)と

Table 1 Singleplex PCR primers.

	position	name	Sequence ^{a)}	tag/tail	T _m (°C) ^{b)}	Description
A	AF	L15997F	tgtaaaacgacggccagtCACCATTAGCACCCAAAGCT	M13Fwd	58.45	
	AR	H16401R	caggaacacagctatgaccTGATTTACGGAGGATGGTG	M13Rev	57.60	
D	DF	L00029F	tgtaaaacgacggccagtGGTCTATCACCCCTATTAACCAC	M13Fwd	55.41	
	DR	H00438R	caggaacacagctatgaccGGGAAAATAATGTGTTAGTTG	M13Rev	50.75	
B	BF	L15997F	tgtaaaacgacggccagtCACCATTAGCACCCAAAGCT	M13Fwd	58.45	This primer was the same as AF primer.
	BR	H16174R	caggaacacagctatgaccGGGGGTTTTGATGTG	M13Rev	47.73	This primer was added for PCR of C-strech samples.
		H16173R	caggaacacagctatgaccGGGGGGGTTTTGATGTGG	M13Rev	57.03	
C	CF	L16208F	tgtaaaacgacggccagtCCCCATGCTTACAAGCAAG	M13Fwd	56.57	
	CR	H16401R	caggaacacagctatgaccTGATTTACGGAGGATGGTG	M13Rev	57.60	
E	EF	L00029F	tgtaaaacgacggccagtGGTCTATCACCCCTATTAACCAC	M13Fwd	55.41	This primer was the same as DF primer.
	ER	H00290R	caggaacacagctatgaccGGGGGGGTTTTGGTGGAAATT	M13Rev	60.47	

a) Small letters (a, t, g and c) were tag or tail sequences.

b) T_m was calculated with Primer-BLAST. These T_m of primers were calculated as original primers without tags or tails.

Table 2 PCR condition.

	Enzyme	single/ multi	Activation	Denaturation	Annealing	Elongation	Ramp speed	Cycles	Total time
Our conventional method	AmpliTaq Gold®	single	95°C, 9 min	95°C, 45 sec	60°C (60% ^a), 1 min	72°C, 2 min	9600 emulation	33 times	2 h 45 min
Multiplex with Taq Gold	AmpliTaq Gold®	multi	95°C, 9 min	95°C, 45 sec	60°C (60% ^a), 1 min	72°C, 2 min	9600 emulation	33 times	2 h 45 min
High speed single plex	TaKaRa Taq™ Fast Detect	single	—	94°C, 5 sec	60°C (60% ^a), 1 sec	68°C, 10 sec	max	33 times	45 min
High speed single plex	AmpliTaq Gold® Fast Master Mix	single	95°C, 10 min	96°C, 3 sec	60°C (60% ^a), 3 sec	68°C, 10 sec	max	33 times	60 min

^a) Ramp rate between denaturation and annealing was 60%.

Table 3 Multiplex PCR primers.

	Position	name	Sequence ^{a)}	Tag/tail	T _m (°C) ^{b)}	Description
AD	AF	mL15997F	CACCATAGCACCCAAAGCT	—	58.45	
	AR	mH16401R + CA	accaggaacagctatgaccTGATTTCACGGAGGATGGTG	AC + M13Rev	57.6	
	DF	mL00030F	tattattattattattGGTCTATCACCTATTAACCACT	(tat)6	56.85	
	DR	mH00438R	ttattattattattattaGGGAAAATAATGTGTAGTTG	(tta)6	50.75	
B	BF	L15997F	tgtaaacgacggccagtCACCATAGCACCCAAAGCT	M13Fwd	58.45	
	BR	H16174R	caggaacagctatgaccGGGGGTTTGTATGTG	M13Rev	47.33	
		H16173R	caggaacagctatgaccGGGGGGTTTGTATGTG	M13Rev	57.03	This primer was added for PCR of C-strech samples.
CE	CF	L16208F	tgtaaacgacggccagtCCCCATGCTTACAAGCAAG	M13Fwd	56.57	This primer was the same as CF primer in Table 2.
	CR	mH16401R + CA	accaggaacagctatgaccTGATTTCACGGAGGATGGTG	AC + M13Rev	57.6	This primer was the same as AR primer.
	EF	mL00030F	tattattattattattGGTCTATCACCTATTAACCACT	(tat)6	56.85	This primer was the same as DF primer.
	ER	mH00285R	attaaccctcactaaagggaGGGGTTTGGTGGAAATTTTTTG	T3	57.09	<i>Int. J. Leg. Med.</i> , 1995, 108, 68

^a) Small letters (a, t, g and c) were tag or tail sequences.

^b) T_m was calculated with Primer-BLAST. These T_m of primers were calculated as original primers without tags or tails.

して、dNTP (200 μ M) (サーモフィッシャーサイエンティフィック), GeneAmp® 10× PCR Gold Buffer (×1) (サーモフィッシャーサイエンティフィック), AmpliTaq Gold® (0.05 unit/ μ L) (サーモフィッシャーサイエンティフィック), MgCl₂ (2.5 mM) (サーモフィッシャーサイエンティフィック), BSA (0.2 μ g/ μ L) (シグマアルドリッチ), 各プライマー (各0.5 μ M) (ユーロフィンジェノミクス) を加え、これに抽出 DNA (ミトコンドリア DNA コピー数 $10^3 \sim 5 \times 10^4$ copies/reaction) と水を加えて25 μ L に調製を行い、PCR 反応を行った。用いたプライマーは Table 3 に示した。PCR 条件は、95°C 9 分の熱変性後、(95°C 45 秒・60°C (60%) 30 秒・72°C 2 分) の PCR サイクルを33回に設定した (Table 2)。なお、サーマルサイクラーは

GeneAmp® PCR System 9700を用いて、ランプスピードは9600エミュレーションモードで運転を行い、アニーリング時のランプレートは60%とした。

3-3. 高速 PCR 試薬を用いたシングルプレックス

高速 PCR 試薬として、TaKaRa Taq™ HS Fast Detect (タカラバイオ), および AmpliTaq Gold® Fast Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた PCR を行った。反応系はそれぞれ20 μ L とし、各試薬 (カッコ内は最終濃度) として、TaKaRa Taq HS Fast Detect Premix (×1), もしくは AmpliTaq Gold® Fast PCR Master Mix, UP (×1) に対して、各プライマー (各0.625 μ M) (ユーロフィンジェノミクス), 抽出 DNA (ミトコンドリアコピー数 $10^3 \sim 5 \times 10^4$ copies/reaction) と水を加えて20 μ L に調製を行い、PCR 反応を行っ

た。プライマーは 3-1 と同様のものを用いた。

TaKaRa Taq™ HS Fast Detect の PCR 条件は、(94°C 5 秒・60°C (60%) 1 秒・68°C 10 秒) の PCR サイクルを 33 回に設定した (Table 2)。なお、サーマルサイクラーは GeneAmp® PCR System 9700 を用いて、ランプスピードは Max モードで運転を行い、アニーリング時のランプレートは 60% とした (Table 2)。

また、AmpliAq Gold® Fast Master Mix の PCR 条件は、95°C 10 分の熱変性後 (96°C 3 秒・60°C (60%) 3 秒・68°C 10 秒) の PCR サイクルを 33 回に設定した。なお、サーマルサイクラーは GeneAmp® PCR System 9700 を用いて、ランプスピードは Max モードで運転を行い、アニーリング時のランプレートは 60% とした (Table 2)。

4. PCR 産物確認

シーケンス反応を行う前の PCR 産物増幅確認として、アガロースゲル電気泳動を行った。SeaKem GTG™ アガロース (ロンザ) を SYBR® Safe DNA Gel Stain in 1×TAE (サーモフィッシャーサイエティフィック) に溶解してアガロース濃度は 2% (w/w) とし、TAE バッファー中で、100 V あるいは

120 V で 10 分間泳動を行った。

5. マルチプレックス PCR 産物解析

マルチプレックス PCR 産物の解析には Agilent DNA 1000 キット (アジレント・テクノロジー) を用い、2100 バイオアナライザ (アジレント・テクノロジー) で解析した。試料の調製はマニュアルに従い、PCR 産物 1 µL を解析に用いた。

6. シーケンス反応と電気泳動

PCR 産物の精製には、現行手法では QuickStep™2 PCR Purification kit (エッジバイオシステムズ) を用いて、マニュアルに従って精製 PCR 産物を得た。また、高速 PCR 試薬を用いた PCR 産物の精製には、ExoSAP-IT® (アフィメトリクス) を用いて、マニュアルに従って精製 PCR 産物を得た。Taq Gold を用いたマルチプレックス PCR で得た PCR 産物は、両方の精製法で精製 PCR 産物を得た。シーケンス反応には BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (サーモフィッシャーサイエティフィック) を用いた。1 反応あたり、Ready Reaction Premix 2 µL, BigDye Sequencing Buffer 3 µL, 精製 PCR 産物 1–2 µL, 各シーケンスプライマー (Table 4) (最終濃度 0.16

Table 4 Sequence primers.

single/ multi	position		name	Sequence ^{a)}	T _m (°C) ^{b)}	Description
singleplex	forward		M13FWD	tgtaaaacgacggccagt	56.82	M13 forward primer
	reverse		M13REV	caggaaacagctatgacc	52.34	M13 reverse primer
multiplex	AD	AF	mL15997F	CACCATTAGCACCCAAAGCT	58.45	This primer was the same as PCR primer
		AR	M13REV	caggaaacagctatgacc	52.34	M13 reverse primer
		DF	sL00029F	GGTCTATCACCTATTAACCAC	55.41	
		DR	sH00438R	GGGAAAATAATGTGTTAGTTG	50.75	
	B	BF	M13FWD	tgtaaaacgacggccagt	56.82	M13 forward primer
		BR	M13REV	caggaaacagctatgacc	52.34	M13 reverse primer
	CE	CF	M13FWD	tgtaaaacgacggccagt	56.82	M13 forward primer
		CR	M13REV	caggaaacagctatgacc	52.34	M13 reverse primer
		EF	sL00029F	GGTCTATCACCTATTAACCAC	55.41	This primer was the same as DF sequence primer
		ER	T3_seq_primer	attaaccctcactaaagggaa	53.82	T3 primer

^{a)} Capital letters (A, T, G and C) were sequences of original mitochondria DNA and small letters (a, t, g and c) were sequences of sequencing tags.

^{b)} T_m was calculated with Primer-BLAST. These T_m of primers were calculated as original primers without tags or tails.

μM) に水を加えて $20\ \mu\text{L}$ とし, (95°C 15 秒・ 50°C (60%) 5 秒・ 60°C 2 分) を 25 サイクルでシーケンス反応を行った. 得られたシーケンス産物を Gel Filtration Cartridge (エッジバイオシステムズ) を用いて, マニュアルに従って精製を行い, 得られた精製産物を濃縮乾燥した. 濃縮乾燥後, Hi-DiTM Formamide (サーモフィッシャーサイエンティフィック) $10\ \mu\text{L}$ に溶解し, 電気泳動サンプルとした. 電気泳動は 3130x^l Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) を用いて, 泳動条件は 36 cm キャピラリー, 3130 POP-4TM, UltraSeq36_POP4 で行った. データの解析は Sequencing Analysis Software 6 (v6.0) (アプライドバイオシステムズ) および, SEQUENCHERTM 5.0 (ジーンコード) を用いて解析した.

結 果

1. マルチプレックス PCR の設計と結果

ミトコンドリア DNA 検査の簡便化を目指して, マルチプレックス PCR 系の構築と検討を行った. 現行手法における 5 つの A~E 領域のうち, BCE 領域を 1 反応にまとめたマルチプレックス PCR 系を検討したが, 予備検討の段階で B 領域の増幅効率が極端に悪かった (data not shown) ため, マルチプレックス PCR 系では, AD 領域, B 領域, CE 領域の 3 反応に分けてそれぞれ PCR を行うように設計した (Fig. 1). プライマー配列を Table 3 に示し, 以下本条件で行う PCR をマルチプレックス法と表記する. なお Table 3 中に示した T_m の値は, 各プライマーにおいて, タグ配列 (シーケンス用プライマー結合部位) あるいはテイル配列 (PCR 産物長調整のために付加された配列) を除いた部分の配列に対して, Primer-BLAST¹¹⁾ を用いて計算を行った. プライマーの設計に当たっては, 現行の科警研で使用しているプライマー (Table 1) を基本に, 一部の配列を変更したものを設計した. なお設計に当たっては, PCR 産物長の調節を目的として 3 塩基の繰り返し配列¹²⁾ を付加し, また CE 領域においては, マルチプレックス時における各領域の PCR 増幅のバランスを改善するため, ER プライマーを近傍領域の文献既知のプライマー¹³⁾ に変更した.

Fig. 2 Analysis of multiplex PCR with AmpliTaq Gold by Agilent2100.

Lanes of AD, B, and CE represent analysis of PCR products of region AD (multiplex), region B (singleplex), and region CE (multiplex), respectively. Lanes of NAD, NB, NCE represent analysis of each negative controls.

設計したマルチプレックス法を実施し, PCR 産物を Agilent DNA 1000 キットで解析した結果を示す (Fig. 2). AD 領域では, 二本のバンドが観察され, PCR 産物長から, 短いバンドを A 領域の PCR 産物 (463 bp), 長いバンドを D 領域の PCR 産物 (487 bp) と帰属した. B 領域では B 領域の PCR 産物長 (246 bp) に相当するシングルバンドが得られた. CE 領域では二本のバンドが検出され, 短いバンドを C 領域の PCR 産物 (268 bp), 長いバンドを E 領域の PCR 産物 (338 bp) と帰属した. マルチプレックス PCR で増幅した PCR 産物からでも各シーケンスプライマーにより, ノイズのない単独のシーケンスが得られた. シーケンスを行った成人男性 5 名の血痕, 口腔内細胞, 自然脱落毛毛髪毛幹部の計 15 サンプルにおいては, マルチプレックス法にて得られた HV1 領域および HV2 領域の配列と, 現行法で得られた HV1 領域および HV2 領域の配列は, C-stretch 領域の C の数を除きすべて一致した.

2. 高速 PCR 試薬を用いたシングルプレックスの検討と結果

2-1. TaKaRa TaqTM HS Fast Detect の検討

TaKaRa TaqTM HS Fast Detect, および現行法のプライマー (Table 1) を用いて PCR 増幅を行った

Fig. 3 A representative electropherogram of region A of blood stain DNA amplified by *TaKaRa Taq*TM HS Fast Detect.

Major peaks were target sequence of region A of mitochondrial DNA. Minor peaks were detected when region A of blood stain DNA was amplified by *TaKaRa Taq*TM HS Fast Detect.

ところ、PCR 反応時間は現行法の 2 時間 45 分から、45 分に短縮された (Table 2)。口腔内細胞由来 DNA および自然脱落毛毛幹部由来 DNA からは、A～E 領域のいずれの領域の PCR 増幅産物から良好なシーケンス結果を得た (data not shown)。一方で血痕由来 DNA では、A 領域以外の PCR 増幅産物では良好なシーケンスが得られたものの、A 領域増幅時において目的とする配列に加えて、目的配列以外の配列がバックグラウンドノイズとして検出された (Fig. 3)。

2-2. AmpliTaq Gold® Fast Master Mix の検討

AmpliTaq Gold® Fast Master Mix, および現行法のプライマー (Table 1) を用いて PCR 増幅を行ったところ、PCR 反応時間は現行法の 2 時間 45 分から、60 分に短縮された (Table 2)。PCR 産物増幅確認の結果を Fig. 4 に示す。血痕由来 DNA、口腔内細胞由来 DNA、自然脱落毛由来 DNA のいずれから、良好なシーケンス結果を得た (Fig. 5)。シーケンスを行った成人男性 5 名の血痕、口腔内細胞、自然脱落毛毛幹部の計 15 サンプルにおいては、得られた HV1 領域および HV2 領域の配列と、現行法で得られた HV1 領域および HV2 領域の配列は、C-stretch 領域の C の数を除きすべて一致した。

考 察

1. PCR の簡便化と迅速化

ミトコンドリア DNA 検査の簡便化のために、マルチプレックス法の開発を行った。その結果、マルチプレックス法では AD 領域、および CE 領域の

Fig. 4 PCR amplification of singleplex with AmpliTaq Gold® Fast Master Mix.

Lane A to E represent amplicon of region A to E amplified with AmpliTaq Gold® Fast Master Mix. Lane NC means negative control.

PCR をマルチプレックス化することに成功し、工程数の削減を達成した。また、ミトコンドリア DNA 検査のさらなる迅速化を目指し、高速 PCR 試薬を用いた PCR 時間の短縮化を検討した結果、大幅に PCR 所要時間を短縮させた (Table 2)。さらにプレミックス化された高速 PCR 試薬を使用することによって、試薬調製の簡便化が図れるためコンタミリスクの低減が期待される。なお C-stretch 領域におけるシトシン (C) の数は、個人内でも変動があることが知られており⁷⁾、今回の評価において、C-stretch 領域の C の数が一致しなかったものに関しては、個人内変動に由来するものと考察している。また、高速 PCR 試薬を用いたマルチプレックス法の開発も検討したが、AD 領域のマルチプレックス PCR において、AmpliTaq Gold® を用いたマルチプレックス PCR と比較して D 領域の増幅効率が悪く、感度の低下が認められた (data not shown)。

Fig. 5 A representative electropherogram of region A of blood stain DNA amplified by AmpliTaq Gold® Fast Master Mix.

2. TaKaRa Taq™ HS Fast Detect における非特異増幅産物について

常染色体上には、ミトコンドリア DNA の偽遺伝子が存在しており、それらは NUMTs (Nuclear mitochondrial pseudogenes) として知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。TaKaRa Taq™ HS Fast Detect を用いた PCR では、血液由来 DNA を鋳型にした時のみ、目的となるミトコンドリア配列以外に非特異増幅産物が確認された。また PCR に用いたプライマーと非特異増幅産物の解析から、ヒト17番染色体上にフォワードプライマーおよびリバースプライマーに対して1塩基ずつミスマッチが存在する領域が確認され、また非特異増幅産物由来のマイナーピークとして推定される配列がその領域内に存在していた (22520807 to 22521251 of Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p7 Primary Assembly (NCBI Reference Sequence: NC_000017.11); data not shown)。さらにこの領域は17番染色体上に存在する NUMT として文献報告された領域¹⁴⁾と、同一の塩基配列を有する。このことから TaKaRa Taq™ HS Fast Detect で観察された非特異増幅産物はヒト常染色体上の配列に由来する可能性がある。

3. 検査手法の評価

本論文では、新規のミトコンドリア DNA 検査手法として、AmpliTaq Gold® を用いたマルチプレックス PCR、および高速 PCR 試薬を用いたシングルプレックス PCR 法の報告を行った。いずれの手法についても使用可能であると考えているが、PCR の非特異増幅産物の有無、コンタミネーションリスクの低さ、試薬の継続性、作業の簡便性などを考慮すると、AmpliTaq Gold® Fast Master Mix を用いた

高速 PCR 法が、総合的に最も優れていると著者らは考えている。

結 語

著者らはミトコンドリア DNA 検査の簡便化・迅速化を図るため、マルチプレックス化の検討を行い、従来 A～E の5領域をシングルプレックス PCR していた現行法を基に、AD 領域、B 領域、CE 領域の3領域からなるマルチプレックス法を構築した。また高速 PCR に対応した PCR プレミックス試薬を用いることで、PCR の簡便化・迅速化を達成した。これらは PCR に必要な時間を短縮するだけでなく、作業の簡便化に伴いコンタミネーションリスクの低減も期待できると考えられる。今後は総合的に最も優れていると考えられる AmpliTaq Gold® Fast Master Mix を用いた高速 PCR 法について、バリデーション¹⁷⁾を実施する予定であるが、STR に関するバリデーションの報告¹⁸⁻²²⁾がある一方で、我々の知る限り、ミトコンドリア DNA 検査のバリデーション手法の報告はない。ゆえに、ミトコンドリア DNA 検査のバリデーション項目およびパラメータの妥当性も含めて、検証を行い、法科学的ミトコンドリア DNA 分析の手法の確立を進めていきたい。

文 献

- 1) Melton T., Holland C., Holland M., Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current Practice and Future Potential, *Forensic Sci. Rev.*, **24**, 101-122, 2012.
- 2) Parson W., Gusmao L., Hares D. R., Irwin J.

- A., Mayr W. R., Morling N., Pokorak E., Prinz M., Salas A., Schneider P. M., Parsons T. J., DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **13**, 134–142, 2014.
- 3) Sekiguchi K., Imaizumi K., Fujii K., Mizuno N., Ogawa Y., Akutsu T., Nakahara H., Kitayama T., Kasai K., Mitochondrial DNA population data of HV1 and HV2 sequences from Japanese individuals, *Leg. Med. (Tokyo)*, **10**, 284–286, 2008.
- 4) Imaizumi K., Parsons T. J., Yoshino M., Holland M. M., A new database of mitochondrial DNA hypervariable regions I and II sequences from 162 Japanese individuals, *Int. J. Legal Med.*, **116**, 68–73, 2002.
- 5) Sekiguchi K., Imaizumi K., Matsuda H., Mizuno N., Yoshida K., Senju H., Sato H., Kasai K., MtDNA Sequence Analysis Using Capillary Electrophoresis and Its Application to the Analysis of MtDNA in Hair, *Jpn. J. Sci. Tech. Iden.*, **7**, 123–130, 2003.
- 6) Bendall K. E., Sykes B. C., Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region, *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 248–256, 1995.
- 7) Stewart J. E., Fisher C. L., Aagaard P. J., Wilson M. R., Isenberg A. R., Polanskey D., Pokorak E., DiZinno J. A., Budowle B., Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region, *J. Forensic Sci.*, **46**, 862–870, 2001.
- 8) Nakahara H., Sekiguchi K., Imaizumi K., Mizuno N., Kasai K., Heteroplasmies detected in an amplified mitochondrial DNA control region from a small amount of template, *J. Forensic Sci.*, **53**, 306–311, 2008.
- 9) 中原弘明, 藤井宏治, 水野なつ子, 吉田日南子, 笠井賢太郎, 法生物学的試料由来の DNA に対する定量法の検証, 日本法科学技術学会誌, **12**, 13–26, 2007.
- 10) Kitayama T., Fujii K., Nakahara H., Mizuno N., Kasai K., Yonezawa N., Sekiguchi K., Estimation of the detection rate in STR analysis by determining the DNA degradation ratio using quantitative PCR, *Leg. Med. (Tokyo)*, **15**, 1–6, 2013.
- 11) Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134, 2012.
- 12) Kim N. Y., Lee H. Y., Park S. J., Yang W. I., Shin K. J., Modified midi- and mini-multiplex PCR systems for mitochondrial DNA control region sequence analysis in degraded samples, *J. Forensic Sci.*, **58**, 738–743, 2013.
- 13) Wilson M. R., DiZinno J. A., Polanskey D., Replogle J., Budowle B., Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis, *Int. J. Legal Med.*, **108**, 68–74, 1995.
- 14) Parr R. L., Maki J., Reguly B., Dakubo G. D., Aguirre A., Wittrock R., Robinson K., Jakupciak J. P., Thayer R. E., The pseudo-mitochondrial genome influences mistakes in heteroplasmy interpretation, *BMC Genomics*, **7**, 185, 2006.
- 15) Tsuji J., Frith M. C., Tomii K., Horton P., Mammalian NUMT insertion is non-random, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 9073–9088, 2012.
- 16) Dayama G., Emery S. B., Kidd J. M., Mills R. E., The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12640–12649, 2014.
- 17) SWGDAM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods, 2016.
- 18) 藤井宏治, 綿引晴彦, 三田裕介, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, GlobalFiler による STR 型検査の法科学的評価, 日本法科学技術学会誌, **21**, 1–23, 2016.
- 19) 藤井宏治, 岩島泰樹, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, PowerPlex Fusion System による STR 型検査の法科学的評価, 日本法

- 科学技術学会誌, **20**, 15–40, 2015.
- 20) Martin P., de Simon L. F., Luque G., Farfan M. J., Alonso A., Improving DNA data exchange: validation studies on a single 6 dye STR kit with 24 loci, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **13**, 68–78, 2014.
- 21) Oostdik K., Lenz K., Nye J., Schelling K., Yet D., Bruski S., Strong J., Buchanan C., Sutton J., Linner J., Frazier N., Young H., Matthies L., Sage A., Hahn J., Wells R., Williams N., Price M., Koehler J., Staples M., Swango K. L., Hill C., Oyerly K., Duke W., Katzilierakis L., Ensenberger M. G., Bourdeau J. M., Sprecher C. J., Krenke B., Storts D. R., Developmental validation of the PowerPlex((R)) Fusion System for analysis of casework and reference samples: A 24-locus multiplex for new database standards, *Forensic Sci. Int. Genet.*, **12**, 69–76, 2014.
- 22) 綿引晴彦, 藤井宏治, 深川貴志, 三田裕介, 北山哲史, 中原弘明, 水野なつ子, 関口和正, Yfiler Plus PCR Amplification Kit を用いた Y-STR 型検査の法科学的評価, 日本法科学技術学会誌, **23**, 13–34, 2018.