

論文内容の要旨

論文提出者氏名 杵渕 貴子

論文題目

The genome profiling method can be applied for species identification of biological materials collected at crime scenes

論文内容の要旨

犯罪現場で見つかる血痕等の生物試料はヒトだけでなく他の生物のものもある。

そして、①家の前に糞が置かれていた、②食品加工工場で髪や骨片が製品に混入していた、③農場が野生生物の被害に合った等、生物種を同定する必要がある時がある。

現状では PCR で種特異的な遺伝子座を増幅させる方法が一般的に用いられているが、これは予想される生物種のみを対象とする方法である。

また、ユニバーサルプライマーを使って多数の生物種の遺伝子座を増幅させる方法は多数あるが、単一の遺伝子座から生物種を特定するには限界がある。対象の遺伝子座を追加し、分子系統学的な解析をする必要があるが、それには費用がかかり、専門的技術、設備も必要である。

今回我々は、Genome profiling (以下 GP) 法が法医学に導入可能かを検証した。GP 法とは 1991 年に Nishigaki らが生物工学の分野で開発した、生物の遺伝子型から種の分類、同定を行う方法である。

その特徴として、通常試料に含まれる全ゲノムの完全な解析には費用がかかるほか、実際に解析可能なゲノムの量はわずかであり、分類精度の面からも得たゲノム全てを解析するのは難しいが、GP 法では全ゲノムの一部をランダムにサンプリングすることで、ゲノム全体から情報を得られることが挙げられる。

GP 法は主に①試料作成、②ランダム PR、③温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE: Temperature gradient gel electrophoresis)、④クラスター解析の 4 つの工程からなる。

まず今回の検証のための試料には、家の中や台所で見える身近な 13 種類の生物(哺乳類:ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ラット、ブタ、ヒツジ、鳥類:ニワトリ、魚類:アジ、ヒラメ、マグロ、サーモン、カンパチ)を用いた。頬粘膜あるいは筋肉組織を採取し、DNA を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) のプロトコールに従って抽出し、全ての試料で 4.0ng/μL の DNA 量を使った。

次に、各試料に既に報告されている 3 種類のランダムプライマー SP-1(pfm12)(5' - AGAACGCGCCTG-3'), SP-2(pfm19)(5' - CAGGGCGCGCGTAC-3'), SP-3(hunt)(5' - TGCTGCTGCTGC-3')を用いて、それぞれ PCR 増幅を行った。また、解析の際の基準にする Reference DNA 液 2 種類 (Ref1, Ref2) を全ての溶液に加え、TGGE を行った。

TGGE の設定は左端が 15°C、右端が 65°C、電圧は 100V、電流は 10mA、泳動時間は 10 分

とした。

DNA 断片が熱により融解すると、左から右への移動は止まる。また、DNA 断片は(-)電荷を帯びているため、(+)極側、つまり上から下へと移動する。そしてゲルに含まれる網状のアクリルアミドに引っかかった時点で DNA の移動は止まる。DNA が小さいほど引っかからずに下側まで移動する。試料に含まれる DNA の融解温度や移動距離は生物種により異なり、最終的な泳動像として、複数の V 字型の曲線(バンド)が形成される。バンドの屈曲部に Spiddos(species identification dots)を打ち、リファレンスを基準に位置を補正し、各試料の spiddos pattern を作成した。

そしてそれぞれの spiddos pattern の類似度 (PaSS :the Pattern Similarity Scores)を求め、Ward 法にて系統樹を作成した。

その結果、SP1~3 の PaSS の平均値から作成した系統樹で、全ての生物で同種からなるクラスターが形成されていた。プライマー1 だけではクラスター形成は不完全だった。

今回の検証で生物種の正確な分類を行うにはランダムプライマーが 3 種必要だった。この結果から、GP 法はランダムサンプリングの質と量を増やせば簡単に安価に生物種の正確な分類を行えることが分かった。

今後の課題としては、GP 法で種の分類を行うには分類が可能になる各々の種に特異的な spiddos をあらかじめ特定しておく必要がある。

このような課題はあるが、今回の検証から生物工学で種の分類に使用されている GP 法は時間、労力、費用を節約できて犯罪捜査に有用な手法でありうると考える。