

Agilent 2100バイオアナライザとDNA 500 ラボチップによるPCR増幅ミトコンドリア DNAの分析 アプリケーション

国土安全保障／法科学

著者

Mark Jensen
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要旨

PCR増幅ミトコンドリアDNA (mtDNA) の配列分析は、法的検査用のツールとして急速に受け入れられつつあります。これらのPCR増幅による生成物が正しいサイズ、純度、配列分析に適した濃度を持つようにすることは、法科学におけるmtDNAアプリケーションにとって重要な第1段階となります。Agilentの2100バイオアナライザとDNA500ラボチップは、DNAフラグメントのサイズと濃度を正確に測定できることが証明されています。このアプリケーションノートでは、ミトコンドリアDNAの配列を決定する前にPCR増幅されたフラグメントを、迅速かつ効率的に分析するバイオアナライザの能力を実地に説明します。

はじめに

mtDNA配列分析は、近年急速にその有効性を増してきました。1995年、米国国防総省はmtDNA分析が信頼できる法的検査ツールであると認定しました[1]。以降、米国の戦争犠牲者の身元確認は主にmtDNA配列分析によって行われています。9月11日のワールドトレードセンターへのテロ攻撃による犠牲者の確認もmtDNA配列によって行われています。このような法科学への応用に加え、mtDNAは歴史的サンプルや人類学的サンプルにも応用されてい

ます。これらの研究に含まれるものとしては、ルイ17世の心臓[2]、ロシア皇帝ニコライ2世の遺骨[3]、7000年前の脳組織、ネアンデルタール人の遺骨などのサンプルがあります。

ミトコンドリアは細胞内に含まれる構造で、ほぼすべての真核細胞の細胞質内に見られます。これらの構造は、太古の昔に真核細胞に取り込まれたバクテリア細胞の痕跡であると考えられています。このバクテリア細胞は、時間の経過とともに宿主との共生関係を確立し、最終的には宿主の生化学的機構に不可欠な存在となったのです。ミトコンドリアが、その構造内に見られる蛋白質のいくつかをコード化した独自のDNAを持っている理由はここにあると考えられています。

ミトコンドリアDNAの配列分析は、1981年にFredrick Sangerによって初めて行われました。人間のmtDNAは16569個の塩基対 (bp) を持つ環状ゲノムです。現在のヒトmtDNA標準配列はアンダーソン標準配列またはケンブリッジ標準配列 (CRS) と呼ばれます (ジーンバンク登録: M63933)。このゲノムには、酸化的リン酸化反応に必要な蛋白質の構成要素であるさまざまなポリペプチドがコード化されています。2個のリボソームRNAと22個の運搬RNAのヌクレオチド配列もこのゲノムに含まれています。ミトコンドリアゲノムにはこれらのコード配列に加えて、Dループあるいは制御領域と呼ばれるコード化されていない1100個のbpが含まれています。Dループには、人物の特定に使用できるだけの十分な配列多型が含まれています。この領域に含まれる配列の個人差は、



Agilent Technologies

1%~3%で、ほとんどの配列差は制御領域内の超可変領域1 (HV1) および超可変領域2 (HV2) と呼ばれる部分に含まれています。

ミトコンドリアDNA配列は母方から直接継承されます。突然変異が発生しない限り、兄弟や母方の親類はすべて同じmtDNA配列を持つこととなります。mtDNAでは組み替えが行われないので、母方の親類を何世代か遡れば有効な遺伝サンプルを得ることができます。このような配列情報は、多くの場合、行方不明者の確認などに非常に有効です。もっとも、法科学においては、mtDNA配列を容疑者の特定ではなく除外に使うケースの方が多くなります。同じ家系であればmtDNA配列はすべて同じになるからです。

ゲノムDNAのコピーが1つだけの細胞核とは異なり、細胞質には最大1000個のmtDNAのコピーが含まれています。このように、各細胞には複数のmtDNAコピーが含まれているので、配列分析に必要な細胞数はごくわずかで済みます。mtDNAによる配列分析を実行するにはまずDNAを抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって可変領域を増幅する必要があります。この増幅プロセスは、わずか数個の目的のDNAコピーからでも数十億個のコピーを作ることができるので、骨、歯、毛髪などといったごく限定的なサンプルや分解したサンプルからでも配列分析を行うことが可能です。

PCRによって増幅したmtDNAの分析

mtDNAのHV領域の増幅に必要なPCRの回数は、サンプルの経年数と状態によって異なります。mtDNAの分解が最小限に抑えられていれば、各HV領域は1回のPCRで増幅可能です。これらの反応により、一般的には長さにして約450bpの生成物を得ることができます。湿度や熱、バクテリアなどに長期間曝された場合はDNAの分解が大きく進み、DNAはいくつもの小片に分断されます。このように分解したサンプルにおける平均的mtDNAフラグメントサイズは450bpよりもはるかに小さくなってしまいます。増幅により生成するDNAのサイズを元々のDNAサイズより大きくすることはできないので、分解が進んだサンプルの場合には、100~200bpといった短いPCRステップを何度も繰り返して実行します。

PCR産物の分析は、通常、アガロースゲルまたはアクリルアミドゲルを使用して行われます。これらの既成ゲルを使用する場合、実験者は未知PCRサンプルの横に、濃

度が分かっている標準サンプルを並べて分析する必要があります。実験者はPCRサンプルのバンド強度を標準サンプルの中の1つと比較することによって評価します。意図せぬPCRの副産物を定量することも必要になるので、通常、これらの標準サンプルの濃度範囲は少なくとも3桁程度に及びます。この手法による濃度予測の誤差は100%を超えることも少なくないので、最もうまく行った場合でも分析の精度は必要最低限のレベルに止まります。このような理由から、目的の目的のPCR生成物と副産物目的の比率評価に既成ゲルを使用することには大きな問題があります。

このようなゲルの電気泳動の問題点は、初の市販マイクロチップ型核酸分離システムであるAgilent 2100バイオアナライザによって解消することができます。Agilent 2100バイオアナライザは、マイクロ加工されたチャンネルの中で核酸フラグメントを分離して自動的に検出を行い、データ評価もオンラインで行います。Agilent 2100バイオアナライザは、分析制御とデータ分析の自動化のためにPCに接続されています。

Agilent 2100バイオアナライザを使用したPCR生成物の分析には、従来のゲル電気泳動に比べていくつかの大きな利点があります。短い分離チャンネルと高電場の応用により、電気泳動に比べて分析速度が劇的に向上しています。また、蛍光検出システムを採用することで優れた検出感度を実現しています。キットの中には調製済みの試薬と標品が入っており、操作手順書と組み合わせることによって、より再現性の高いデータを得ることができます。これらのキットは、異なる分析方法や異なるチップ間、あるいは装置間における全体的な再現性の向上にも役立ちます。ゲルスキャンニングシステムによるデータ評価と比べると手動による作業が大幅に減っており、データ分析も自動化されています。サンプルおよび試薬の消費量は1 μ Lから数 μ Lの範囲なので有害物質への曝露を最小限に抑えることができ、廃棄物質の量も少なくすることができます。

バイオアナライザのDNA分析ではいくつかのキットが用意されており、さまざまな大きさの核酸サンプルの分析が可能です。mtDNAのRCP生成物の測定は、サイズ範囲が25~500bpであるため、DNA 500ラボチップ (LabChip®) が最適です。DNA 500を使用すれば、25~100bpの間のフラグメントに対して5bpの分離能で検定が可能です。さらに、100~500bpの場合は5%の分解能です。

サイズの測定誤差は全領域で10%未満です。これまでの研究によって、バイオアナライザを使用すれば、アガロースゲルでは確認できなかったDNAフラグメントも検出できることがわかっています。また、他の方法で染色されたゲルとの比較でも、バイオアナライザはSYBRゴールドによる染色に対して5倍、エチジウムブロマイドに対しては25倍も感度が高いことが実証されています。バイオアナライザは、常に20pgレベルでDNAを検出することができます[4]。

バイオアナライザの定量性能を表1に示します。定量時の精度確認には、100、200、400bpのサイズを持つ3つのフラグメントを含むDNAマスタダラーを使用しました。ラダー成分の濃度はメーカーによって保証されています (Low DNA Mass™ラダー、米国Life Technologies社)。濃

	100 bp	200 bp	400 bp
平均 [ng/μL]	0.73	1.53	3.02
表示濃度 [ng/μL]	0.80	1.60	3.20
誤差率 (%)	-8.28	-4.56	-5.62
STDV	0.08	0.11	0.20
CV	10.73	7.46	6.73

度測定誤差は3個のフラグメントすべてについて10%未満で、変動計数 (CV) は15%未満でした[5]。

PCR増幅されたmtDNAに対する要求

高品質の配列データを得るには、濃度範囲が10～100ng/mLの均質なPCR生成物が必要になります。各地域のFBIラボで使用されている手順書では、増幅された目的のmtDNAは、意図せぬ副産物の10倍以上なければならないと規定されています。純度に関するこの要求が満たされていない場合は、副産物が原因で生じるノイズ配列によって目的の配列が読めなくなったり、読み取った配列が誤ったものとなったりするという結果を招くことになります。このような理由から、PCRサンプルの品質評価においては、すべてのPCR生成物の濃度を正確に求めることが不可欠です。

図1に、HV1領域から作られた増幅mtDNA配列の例を示します。低分子量マーカーの隣にあるのはプライマーダイマーのピークですが、これを除いて、PCR生成物に含まれるのは、濃度44.1 ng/μL、273bpの均質なPCR生成物が1つだけです。このような生成物がmtDNA配列分析に適していることは明らかです。

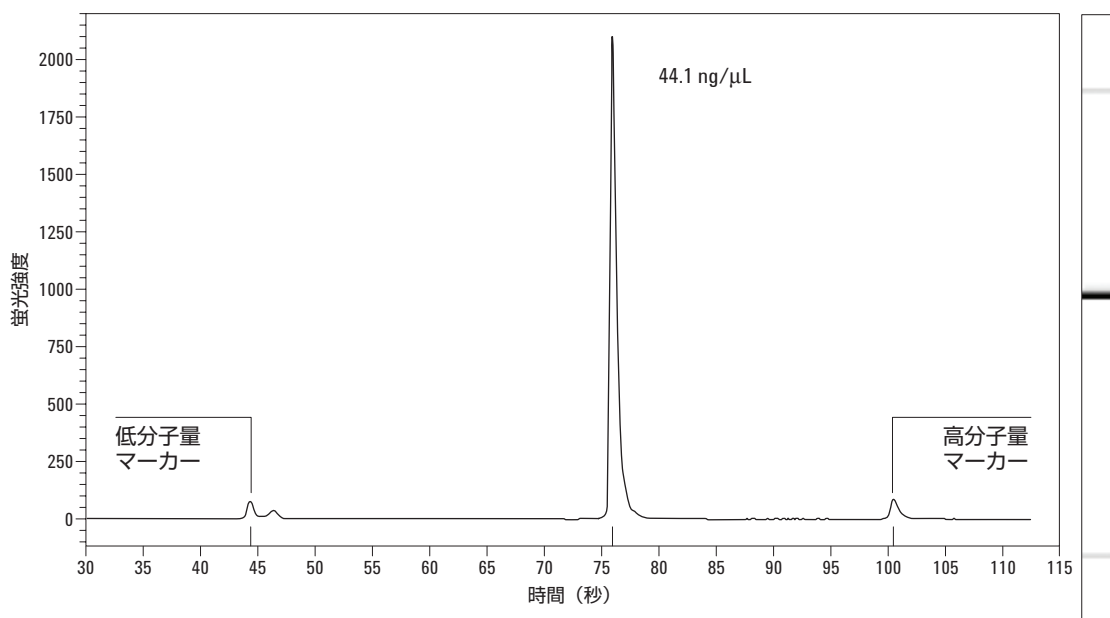


図1. HV1領域からPCR増幅したmtDNAのエレクトロフェログラム。Agilent 2100バイオアナライザで分析

図2は、副生成物で汚染されたmtDNAの生成物を示したものです。目的のPCR生成物は、濃度48.8ng/μLの222bpフラグメントです。意図せぬ副産物の濃度は10.2ng/μL、サイズは69bpです。副産物の濃度が目的のフラグメントの10%よりも大きいので、このPCR増幅は10:1という現行のFBIガイドラインからするとDNA配列分析に適していないことになります。

mtDNA配列の増幅に関するもう1つの問題は、グアニン (G) の長い連続の後にアデニン (A) とチミン (T) の多い領域が続くときに発生します。このような配列をPCR増幅した場合、DNAストランドが部分的に融解してから再アニールされることがあります。n個からなるGの長い連続がある場合は、再アニールしたDNAが基本フレームを失い、さらに多くのGが組み込まれることがあります。増幅プロセスにおいてこのような現象が何度も発生すると、n+1またはn+2個のGを含む増幅産物が高い濃度で生成されます。この現象はG-stutterと呼ばれます。このG-stutter現象が見られるPCR生成物を配列分析反応に使用すると、大概、G連続配列以降のデータが読めなくなります。

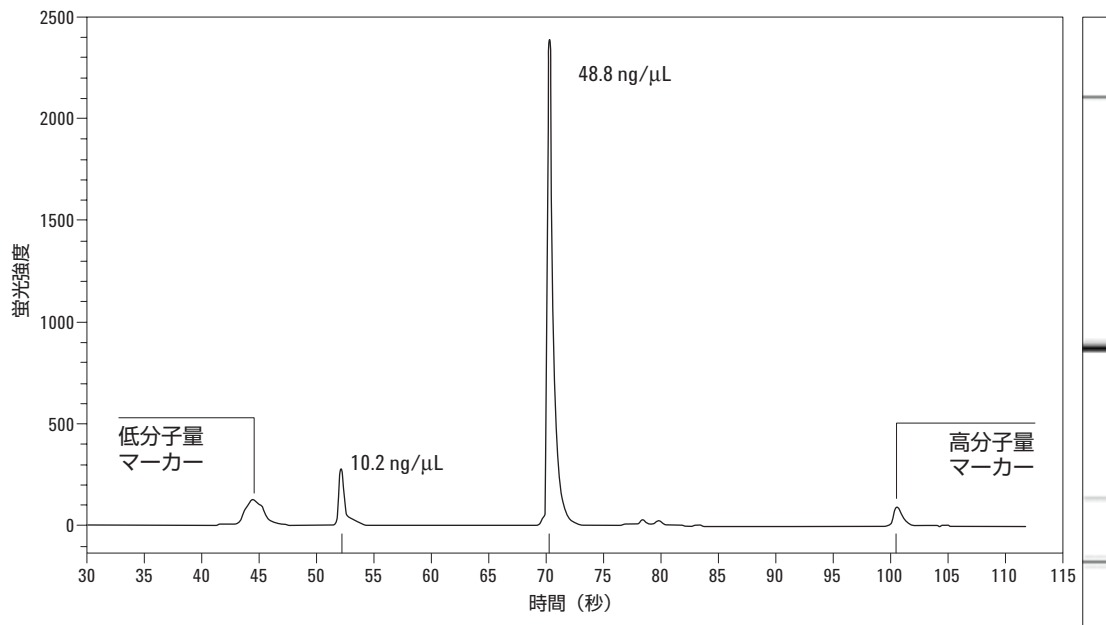


図2. HV1領域からPCR増幅したmtDNAのエレクトロフェログラム。もう1つの意図せぬPCR生成物が表れている。Agilent 2100バイオアナライザで分析

図3AはPCR増幅されたHV1配列のエレクトロフェログラムで、このG-stutter現象が示されています。このPCR生成物をもとに作製した配列解析用のラベル化産物には、n、n+1、n+2のグアニン（G）を持つフラグメントが多数混在しています。このような配列が混在することによって、G領域のダウンストリーム側配列データの読み取りはほぼ不可能になってしまいます。図3Bは、配列データの分解の様子を示した例です。Nで示された箇所は、配列情報が得られなかったことを示します。

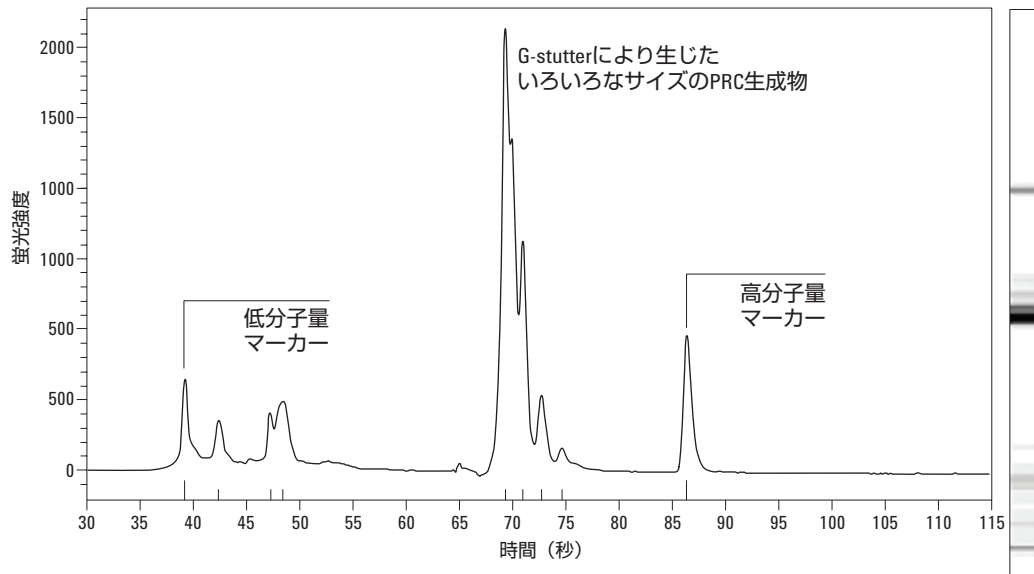


図3A. HV1領域からPCR増幅したmtDNAのエレクトロフェログラム。多極的なG-stutter生成物が表れている。
Agilent 2100/バイオアナライザで分析

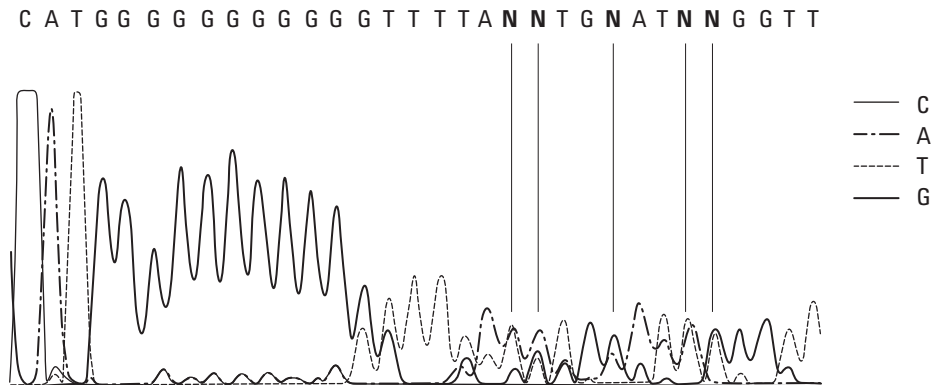


図3B. G-stutterを持つ生成物を使用したmtDNA PCR生成物の代表的な配列データ出力。
Gが続いた後に読み取り可能な配列がない点に注意

図4Aは同じHV1配列で、比較的副産物の少ないPCR増幅のエレクトロフェログラムです。このRPC産物は単一のサイズからなる均質生成物で、DNA配列分析に問題ありません。図4BはこれらのPCR生成物から作成された配列データの一部です。図3Bの配列とは異なり、GのG連続鎖以降の配列でも出力は明確で、曖昧なところがありません。

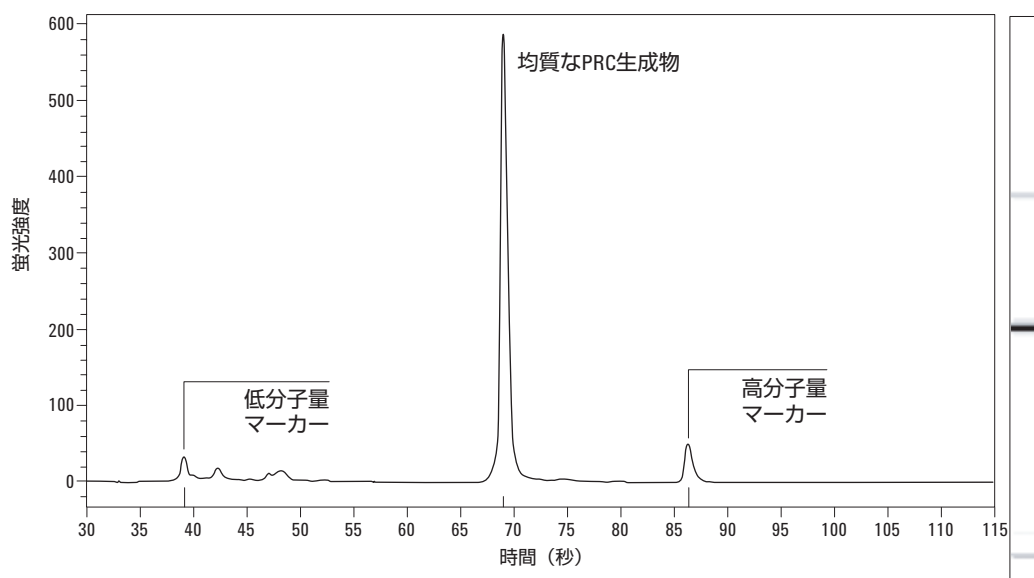


図4A. HV1領域からPCR増幅したmtDNA配列のエレクトロフェログラム。均質なPCR生成物が1つ表れている。

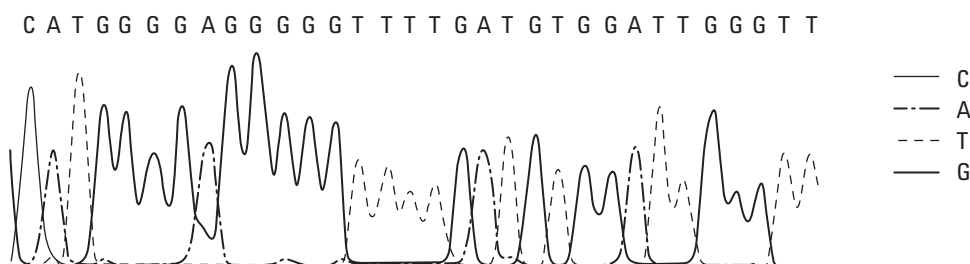


図4B. 単一の均質生成物を持つ増幅DNAを使用したmtDNA PCR生成物の代表的な配列データ出力。配列データ出力には、Gが続いた後でも読み取り可能な配列が失われている箇所がない。

結論

ミトコンドリアDNA分析が急速に普及していることは、法科学においてこの手法が広く使用されていることからも分かります。Agilent 2100バイオアナライザは、mtDNAのRCP産物の正確なサイズと濃度に関するプロファイルを迅速に割り出すことによって、この分析の失敗を防ぎます。また、キットに含まれる内部標準DNAおよび分子量標準DNAを使うことによって、高い精度で各フラグメントの定量分析とサイズ決定を行うことも確認されました。このことによって、高品質の増幅mtDNAフラグメントの識別を可能にするとともに、その後の配列分析における結果の信頼性を表す指標を算出することにも役立ちます。DNA 500で検定を行えば、25~500塩基ペアの範囲で信頼できるDNA分離を行うことができますし、優れた感度と分離能によって副産物の定量化も可能にします。このような特徴は、意図せぬ副産物に対して、目的のPCR生成物が10倍以上存在することを確かめる場合のように、客観的な数値が求められるケースには特に不可欠です。

参考文献

1. B. Budowle, M. Allard, M. Wilson and R. Chakraborty, "Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates and Foundations" (2003) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **4**, 119–141.
2. B. Jehaes, K. Toprak, N. Vanderheyden, H. Pfeiffer, J. Cassiman, B. Brinkmann and R. Decorte, "Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII" (2001) *Int. J. Legal Med.*, **115**, 135–141.
3. N. Rudin, and K. Inman, "An Introduction to Forensic DNA Analysis", CRC Press LLC, New York, 2002, pp. 59–60.
4. D. Vitale, "Comparing the Agilent 2100 Bioanalyzer performance to traditional DNA analysis techniques", Agilent Technologies publication 5980-0549E www.agilent.com/chem
5. O. Mueller, "High resolution DNA analysis with the DNA 500 and DNA 1000 LabChip® kits", Agilent Technologies publication 5988-3041E www.agilent.com/chem

さらに詳しくは...

Agilentの製品およびサービスの詳細についてお知りになりたい場合は、弊社ウェブサイトをご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

お問い合わせは：0120-477-111

横河アナリティカルシステムズ株式会社

〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

この資料に含まれる誤りや、この資料の提供、内容の実行、または使用に伴って生じる二次的損害または結果的損害については責任を負いかねます。

この文書に含まれる情報、記述、仕様は予告なく変更されることがあります。

Low DNA Mass™はLife Technologies社の商標です。

LabChip®はCaliper Technologies Corporationの米国登録商標です。

© Agilent Technologies, Inc. 2004

Printed in the USA

April 14, 2004

5989-0985JAJP

