

ミトコンドリア DNA 多型解析ガイドンス (2022年)

日本 DNA 多型学会
DNA 鑑定の実施要綱検討委員会

I. 一般的推奨事項

ミトコンドリア DNA 解析は、法医実務である個人識別および血縁鑑定等において重要な解析である。ただし、母系遺伝であることやヘテロプラスミー等の問題もあることから、その頻度推定や塩基配列の解釈には注意を要する。また、核 DNA 分析と比べてコピー数が多いことから微量な資料からの検査が可能であるため、資料以外の DNA による汚染の可能性に特に留意して検査及び解析を行わなくてはならない。そのため、ミトコンドリア DNA 解析を行う際の実施環境、および手技等については Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM)、GHEP-ISFG、the US Quality Assurance Standards、FBI Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories (QAS) 等に従うことが望ましい。具体的には、以下のような点に特に留意する。また、鑑定に関わる全てのプロセスを求められれば、文書で示せるようにしておかなければならない。

1. 実験環境

PCR 以前の実験をおこなう場所と、PCR 産物を取り扱う場所を別室でおこなうことは必須である。これは、PCR 産物による資料汚染が結果に与える悪影響が極めて大きいことによる。PCR 以前の実験をおこなう場合でも、少なくとも

1) 資料の除染および破碎、2) 1) で得られた資料からの DNA 抽出、3) 2) で得られた DNA 溶液を用いた PCR 反応液のセットアップは、それぞれ別室でおこなうか、それができなければクリーンベンチなどを用いて実験スペースを空間的に隔離する必要がある。PCR 以前の実験を行う場所及び PCR 産物を取り扱う場所において、クリーンベンチを含む実験器具は、紫外線照射および DNA 除去液などを用いて、定期的に DNA の除染を行うべきである。また、液体のハンドリング時には、全てエアロゾル防止のフィルターつきチップを用いる。

2. DNA データ取得に関する注意事項

正確な塩基配列データの解釈を行うためには、データの品質が重要となる。そのためには、1) 資料が資料以外の DNA によって汚染されている可能性と、2) 資料の塩基配列データの信頼性の確認が重要である。1) については、① DNA 抽出時の陰性対照、② PCR 増幅時の陰性対照、③ PCR 増幅時の塩基配列既知の陽性対象を設置し、これらについて資料と同様に塩基配列決定までおこなって、陰性対照は陰性に、陽性対照については期待された塩基配列が得られたことを確認する。これによって、資料汚染がないことだけでなく、実験操作が確実におこなわれていることを確かめる。2) については、塩基配列決定の際に forward 側と reverse 側の双方を解析することが望ましく、また、PCR 増幅から塩基配列決定までのプロセスを複数回おこない、結果の一致を確認することが必要となる。

II. 塩基配列解析

1. 一般的推奨事項

個人識別や血縁鑑定で用いる場合、検査対象領域は基本的にコントロール領域の hyper variable region 1 (HVR1 : ISFG の指針によれば 16024-16365)、および hyper variable region 2 (HVR2 : 同指針 73-340) である。どの領域を用いる場合でも、鑑定に用いた領域は報告書に明記されなければならない。

塩基置換の有無を検索する際の基準配列としては revised Cambridge reference sequence (rCRS: Andrews et al., Nature Genetics, 1999, 23, 147) を用いる。資料から得られた塩基配列の決定は、プライマー部分を除いて rCRS との比較でなされる。

資料から得られた塩基配列と rCRS との間の違いの塩基位置は、アライメントの方法により複数の塩基位置を取ることが可能となる場合がある。このため、アライメントの方法が異なれば、同じ塩基配列であっても rCRS との違いとして表記された塩基位置が異なる場合もあり、単純な比較ができない場合がある。各検査機関においては、どのような表記方法でミトコンドリア塩基配列多型を表記しているかについては、求められれば、文書で示せるようにしておかなければならない。

塩基配列の決定にあたっては、同一資料から行った複数の塩基配列分析結果を Sequencher 等のソフトウェアを用いて並べ、エレクトロフェログラムの品質を確認するとともに、rCRS との塩基配列の違いは、目視ではなく、ソフトウェアによるアライメントを行い検出するべきである。また、最終的なミトコンドリア DNA の塩基配列を決定・報告するにあたっては、複数人の独立した検査者が当該データの解析を行い、その解析結果の一致をもって、ミトコンドリア DNA の塩基配列の決定・報告を行うことが望ましい。

また、得られた塩基配列に基づき、PhyloTree mt (Van Oven and Kayser, 2009: www.phyloTree.org) などの既報の系統樹を用いて資料のハプログループ

を推定することも、結果の妥当性を検証するために重要である。これは、多くのハプログループに固有の塩基置換パターン（モチーフ）が存在していることによる。このモチーフとの整合性が低い塩基配列については、結果の妥当性について特に慎重に判断する必要がある。

2. サンガー法による塩基配列解析

正確な塩基配列を得るため forward 側と reverse 側の双方の塩基配列を決定することが望ましい。帰属集団の推定が必要な場合には、少なくともコントロール領域全ての塩基配列を決定することが望ましい。得られた結果から、EMPOP (<https://empop.online/>) の EMMA というアルゴリズムを用いて、対象資料のハプログループ(アフリカを起源とする人類の、系統地理学的な進化過程で生じた分類単位)を推定することが可能である。なお、サンガー法による解析においては、混合資料からのミトコンドリア DNA 塩基配列解析は困難であり、原則的には避けることを推奨する。このような資料からミトコンドリア DNA 塩基配列解析を実施する場合には、その解析方法の妥当性の検証を行った上で慎重に実施されなければならない。

3. 次世代シーケンサーを用いた塩基配列解析

mtDNA の系統分類上重要な塩基置換の多くは、コントロール領域ではなくコーディング領域に存在している。よって、詳細な系統分類が必要な場合、あるいは、識別能力を高める目的で、必要に応じてコーディング領域の一塩基置換解析や、次世代シーケンサーを用いた全塩基配列解析をおこなってもよい。得られた情報を元に、先に述べた Phylotree mt などの既報の系統樹を用いてハプログループを詳細に決定することが出来る。この次世代シーケンサ

一解析については、鑑定機関ごとに実験方法やその結果の検証方法について、事前に十分に検討して実施しなければならない。

4. 表記方法

1) 塩基置換の記載方法

rCRS と資料の塩基配列の違いは多型として記録され、IUPAC 方式の大文字アルファベットを用いて、塩基の位置、および rCRS と違う軽鎖 (L 鎖) 側の塩基を 3' 側に並べて表記する。例えば、塩基番号 16189 を例にとると、rCRS ではこの部位の塩基配列は Thymine であり、これを記載する場合には ISFG のルールに従って「T16189」と記載する。この塩基が Cytosine に変異している場合、「T16189C」と記載する。

① 混合塩基

ヘテロプラスミーや混合塩基など、同部位に複数の塩基が一度に検出された場合には、SWAGDAM と同様に IUPAC 方式の大文字のアルファベットを用いて表記する。ただし、“N” は 4 塩基が同部位に一度に検出された場合、もしくは塩基が決定されなかった場合に使用される。

G/T= K	A/C= M	A/G= R	A/G/T= D
G/C= S	A/C/T= H	A/T= W	A/C/G= V
C/T= Y	C/T/G= B	A/C/G/T= N	

② 塩基の欠失および挿入

塩基の欠失および挿入は、L鎖の3'末端で起こっているものとして記載する。また、欠失および挿入を記録する際には、当該領域の配列が欠失および挿入ではなく塩基置換によって説明可能な場合には、塩基置換として記録する。また、塩基置換を選ぶ場合トランスバージョンよりはランジションを選ぶこととする。欠失や挿入が存在する場合でも、それ以降の塩基番号に変化はないものとして記録する。

欠失は”DEL”か”del”、または”-“を塩基位置の次に記す。小文字で表す時は欠失と非欠失、挿入と非挿入の混合の際に使用する（例えば299 cは299 Cと299delの混合）。塩基番号290もしくは291、および249における欠失については、系統分類上重要な意味を持つため存在した場合は必ずデータとして残す。

塩基の挿入については、挿入部位直前のL鎖の3'末端の塩基番号を基に記載する。〇〇番の塩基の後にn個の塩基が挿入される場合、「〇〇.n」と記載される。塩基置換の塩基番号位置、挿入・欠失の塩基番号等をどのように記載するかは、各検査機関で取り扱いを定める必要がある

③ ヘテロプラスミー

ヘテロプラスミーとは一個人に複数のミトコンドリア DNA 塩基配列が存在することである。検出される場合、ヘテロプラスミーは、同じ塩基位置に二種類の塩基が存在するポイントヘテロプラスミーとして観察される。また、同じ塩基が続く場合、長さの多型を見せる傾向がある。これをレンジスヘテロプラスミーと呼び、HVR1 や HVR2 の Cytosine 連続配列（C-stretch：HVR1 では16183-16194、HVR2 では302-310）として、しばしば観察される。ポイントヘ

テロプラスミー、およびレンジスヘテロプラスミーでは母系の関係性を否定することはできない。

検査機関はこれらポイントヘテロプラスミーおよびレンジスヘテロプラスミーの取扱いを定め、その解釈と報告のガイドラインを定める必要がある。

5. 塩基配列の比較

単独資料と考えられる資料の間のミトコンドリア DNA コントロール領域の塩基配列の比較にあたっては、一般的に SWGDAM の方針を基準として、各検査機関で取り扱いを定める。

- 1) 否定する場合：レンジスヘテロプラスミーを除き、2つのサンプル間で2箇所以上の違いがある場合は、同一資料由来または、同じ母系に由来する資料であることを否定できる。
- 2) 判断不能：HVR2の塩基番号302-310で同じレンジスバリエントを共有しているかどうかに関わらず、1箇所のみ塩基配列が異なる場合。
- 3) 排除できない：同じ塩基配列持っている場合、同一資料由来または、同じ母系に由来する資料であることを排除できない。

ただし、2) の場合には3) 排除できないという判断も成り立ちうることから、鑑定機関ごとに明確な基準を定めておく必要がある。