Barocycler®を用いた古代骨からのDNA抽出とゲノミックDNA解析

○炭山　大輔[1)]、吉川　枝里[1)]、横沢　佑弥[2)]、谷口　貴信[2)]、永倉　貢一[3)]、猪子　英俊[1)]

1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、　2) 株式会社　ベリタス、　3) 東海大学医学部基礎医学系生体防御学

【背景】

＊古代骨や化石試料、または派生物（唾液や糞便、爪、毛髪 etc.）からのDNA抽出は細胞数が少ないことやDNAの断片化などの問題により困難である。

＊ミトコンドリアDNAにおいては種々の解析が行われているが、母系のみの結果であり、父系の解析が求められている。しかしコピー数の少ないゲノミックDNA解析はきわめて難しく、これまでも様々な方法が開発されているが有効なものは少ない。

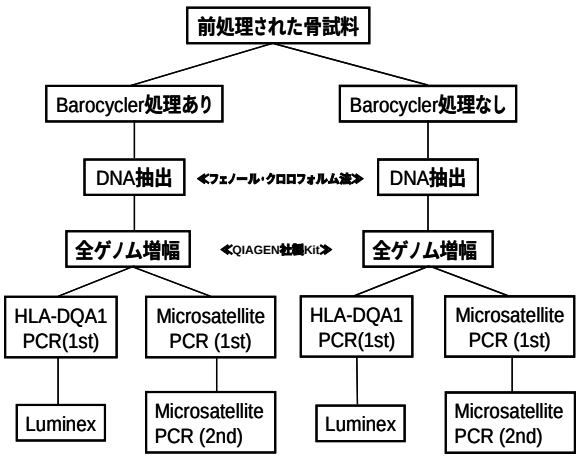
【目的】

＊今回我々は、株式会社ベリタスの協力のもと、Barocycler®（Pressure BioSciences社）を用いて、約1400年前の古代骨より効率的にDNAの抽出・精製を行い、効果的なゲノミックDNA解析を行うこと。

＊DNAの抽出・精製を行ったのち、全ゲノム増幅を行ったもの、行わずそのままのものの2種類のDNAを鋳型として、PCR-SSO法を用いたSNPsの検出（Luminex法によるHLA-DQA1タイピング）、およびマイクロサテライト多型解析の2種類を行うこと。　以上2点を目的とした。

【材料と方法】

＊試料として、茨城県水海道所在の大塚戸森山古墳群第5号古墳石室から出土された約1400年前の古代骨、約100mgを4サンプル使用した。



≪前処理≫
各骨試料は、ドリルを用いて骨髄部分を削り取り使用した。
各々およそ100mgに分け、1mlの1%SDS・TENバッファーおよびproteinase K (10mg/ml) 15 µlを加え、55℃で1時間反応の後、室温で24時間可溶化を行った。

≪専用チューブ≫

VERITAS

【結果】

1. マイクロサテライト多型（TNF-α：97bp-121bp）の検出

○マイクロサテライト多型の検出では、

- Barocycler処理無しのものよりも、処理を行ったものが高い検出結果を得た。
- PCRは2回行ったものの方が高い検出結果を得た。
- 全ゲノム増幅を行ったものはバックグラウンドが乱れ、検出が困難であった。

2. Luminex法によるSNPsの検出（HLA-DQA1）

HLA-DQA1						Positive Cont	Negative Cont						Predicted
Sample	probe no,1	no,2	no,3	no,7	no,11	no,34	no,35	no,42	no,48	no,54	no,55	Total Events	HLA Type
6-A	19.4	23.6	21.3	24.3	18.3	19.2	23.4	24.3	28.5	28.0	26.0	1450	
6-B	332.0	20.1	19.0	19.8	588.4	51.6	27.6	27.1	30.7	58.4	45.9	1842	01/01
6-C	211.1	25.2	20.6	17.9	1001.8	51.3	19.7	29.0	25.0	35.3	23.4	1714	01/01
11-A	21.8	22.0	20.6	21.4	22.7	22.7	24.7	25.4	28.9	26.8	22.0	1764	
11-B	25.5	31.4	22.1	19.4	104.8	31.6	31.0	29.3	33.2	29.0	24.5	1528	
11-C	26.2	22.7	21.3	24.5	22.3	26.5	26.7	21.0	30.2	26.3	24.3	1526	
50-A	25.7	21.7	20.7	25.5	24.6	25.0	30.4	49.0	34.3	25.8	23.9	1747	
50-B	166.6	20.4	22.2	20.7	338.5	32.1	27.1	29.4	32.3	37.7	38.9	1636	01/01
50-C	21.0	21.3	20.4	20.6	21.6	24.0	27.7	25.1	26.3	23.3	22.0	1877	
Cont-S	1385.1	22.9	1012.5	22.4	1654.4	1933.7	27.0	26.0	30.6	88.4	167.5	1889	0106/03MN
Cont-Y	439.8	21.0	201.8	23.5	104.2	374.9	29.8	29.8	28.7	30.2	40.3	1890	0106/03MN
Cont-T	21.2	27.3	1456.2	1491.8	151.9	2144.9	27.8	36.1	33.7	30.9	32.6	1870	03MN/05AVM

Luminex法は蛍光ビーズを用いたPCR-SSOである。この方法では、プローブを用いてSNPsを検出し、タイピングを行う。

- Barocycler処理の有無に関しては、総体的に有りのほうが高い蛍光値を示した。
- 全ゲノム増幅を行ったものはマイクロサテライト解析同様、検出が困難であった。

A：全ゲノム増幅, B：Barocycler＋通常抽出,
C：Barocycler無し＋通常抽出

【考察】

○古代骨からのDNA抽出・PCRによるゲノミックDNAの検出は、DNAの断片化や収量不足により困難である。今回の検討においても、150 bp以上のものは増幅が困難であった。しかし、従来の検出法と異なり、Barocyclerを用いることで、より効率的且つDNAへのダメージを最小にした回収を行うことが可能であると思われる。また、シークエンシングによる解析は確実性は高いが、そのために必要な高収量のPCR産物を得ることが難しい状況では、蛍光物質を用いる検出方法がより検出感度が高く、これまで困難であった解析も可能になると思われる。

○マイクロサテライトでは、新しいプライマーの選定と、条件設定、Luminex法では各プローブの蛍光値のカットオフ値の判断基準が今後の課題である。

しかし、今回の結果から、≪Barocyclerを用いたDNA回収→蛍光物質を用いた解析≫という方法を改良していくことで、これまで困難とされていた古代骨のゲノミックDNA解析がより効果的に行えることが示唆された。