

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06632

研究課題名(和文)新規X染色体STR多型の検出と個人識別への適応

研究課題名(英文)Analysis of a novel X-chromosomal short tandem repeat marker

研究代表者

西 健喜(Nishi, Takeki)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70759472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体上に存在する新たなShort Tandem Repeat(STR)の検出を行い、多型指標および連鎖不平衡について検討を行った。本研究により新たに検出されたSTRを以下に示す。

1) X染色体q28領域に存在するTGCCとTTCCの連続したSTR、2) X染色体p22領域において71kb以内に存在する4つのSTR、3) X染色体p22.3領域に存在するTATAAを基本とした5塩基STR、4) X染色体p22.3領域の90kb以内に存在する3つのSTR。集団において算出された法医学的指標より、これらのSTRが法医遺伝学的に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified novel tetranucleotide STR loci located in the X chromosome, which is the basis of X-STR research. The major findings of the study are summarized in the following.

1) Two novel tetranucleotides X-chromosomal short tandem repeats (X-STRs) in Xq28 region, 2) Four novel X-STRs within 71 kb of the Xp22.3 region, 3) Detection of a novel Pentanucleotide X-STRs in Xp22.3, 4) Three novel X-STR within a 90 kb region of the Xp22.3 region. These STRs are useful as DNA testing for forensic genetics.

研究分野：法医学

キーワード：DNA多型 X染色体 STR マイクロサテライト 個人識別 血縁鑑定

1. 研究開始当初の背景

近年、犯罪の多様化や容疑者特定能力の必要性に応じて DNA の多型を用いた個人識別技術は飛躍的な向上を見せている。用途に応じて様々な方法が用いられるようになり、常染色体 STR (Short Tandem Repeat: 短鎖縦列反復配列) を用いた個人識別、性犯罪における Y 染色体 STR の利用、長期における劣化サンプルに対するミトコンドリア DNA の利用など選択性にも広がりを見せている。一方で X-STR (X 染色体 STR) を用いた鑑定法は、複雑な血縁鑑定に有用とされるにも関わらず、その報告は他の染色体に比べ遅れている現状である。現在の X-STR の研究は、人種統計的データの報告 [1] や、X-Linkage group (X 染色体連鎖解析群) を用いた実践的な応用方法などが報告されているが [2]、それらの研究の基礎となる、個人識別へと適応可能な新しい X-STR の報告は数少ない。近年の新規 X-STR の報告は Szibor R らのグループによる報告が多く [3]、国際的にも新たな領域の報告を行うグループが少ない現状である。本研究における X-STR の検出及び、その多型性と内部構造の解析は、法医学領域における個人識別に利用可能な STR 領域数を拡大する役割を担うものである。

2. 研究の目的

本研究では X 染色体上に存在する 4~6 塩基をベースとした STR 領域を検出し、その多型性と反復配列構造の解析、人種・民族間における個体群の Allele (対立遺伝子・STR において反復回数を表す) 出現頻度の調査および法医学的指標の検討を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 検索方法

X 染色体の短腕および長腕の末端付近に位置する、p22, p23, q26, q27, q28 を検討領域とし UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Browser を用いて反復配列の検索を行う。個人識別に利用しやすい 4~6 塩基の反復配列を中心に検索を行い、NCBI データベースを用いて候補領域における報告の有無を確認する。

(2) 解析方法

Sequence 解析によって反復配列の構造を解析し、解析済サンプルをコントロールとして Fragment (塩基長) 解析を行う。上記の解析から日本人及び他人種・他民族における Allele の出現頻度を調査する。

(3) 統計解析

Allele 出現頻度から、多型性を示す指標として用いられる HET (Heterozygosity: 異型接合度)、および PIC (polymorphic information contents: 多型情報含有値) を求め、法医学的統計指標として用いられる PD

(power of discrimination: 識別能) 親子鑑定における平均排除率を示す MEC (mean exclusion chance: 平均排除率) について算出する。またハプロタイプ解析により相互間の関係性を検討する。これらにより STR の有用性の評価を行う。

4. 研究成果

本研究で得られた研究成果は主に以下の 4 件である。

(1) X 染色体 q28 領域に存在する STR

X 染色体 q28 領域において TGCC と TTCC が連続して存在する、単純 4 塩基反復配列を検出した。2 つの反復配列は各々に多型性を有し、TGCC では Allele 5-9 (5~9 回の反復)、TTCC では Allele 10-21 までの多型が確認された。人種民族別の Allele 出現頻度を表 1 に示した。

表 1 Allele 出現頻度

	日本	モンゴル	アメリカ (白人)	コロンビア (先住民)
TGCC allele				
5		0.0381	0.0140	0.0037
6	0.2800	0.2095	0.2867	0.3150
7	0.1800	0.2857	0.1818	0.1685
8	0.5400	0.4667	0.4895	0.4835
9			0.0280	0.0293
TTCC allele				
10		0.0095	0.0070	
11	0.0100		0.0140	
12	0.0200	0.0095	0.0280	0.0110
13	0.0300	0.0190	0.0769	0.0879
14	0.2000	0.2571	0.2098	0.4249
15	0.5000	0.4381	0.4615	0.3480
16	0.1600	0.1714	0.1259	0.1209
17	0.0200	0.0095	0.0559	
18		0.0095	0.0210	
19	0.0100	0.0190		
20	0.0400	0.0381		
21	0.0100	0.0190		

多型性の指標である HET は 0.7466-0.7886、PIC は 0.7148-0.7886 を示し、単純な 4 塩基反復配列でありながら比較的高い値を示した。また 2 つの反復配列をハプロタイプ解析したところ、アメリカ (白人) とコロンビア (先住民) では連鎖不平衡が確認され、地域・人種民族的な隔離状態が多型情報に示されていると考えられた。

(2) X 染色体 p22 領域に存在する近接した 4 つの STR

X 染色体 p22 領域において 71kb 以内に存在する 4 つの反復配列を検出した。短腕側から TAAA、CTTT、TATC、GATA の反復配列であり、比較的単純な 4 塩基反復構造を示した。座位名称、Sequence 解析によって得られた反復配列構造を表 2 に示した。

4 つの座位の HET は 0.635-0.729、PIC は 0.597-0.687 であり、既存の座位に比べて多型性は若干劣る結果であったが、近接した領

域であることからハプロタイプ解析を行ったところ、LC149476、LC149479、LC149480の3つの座位間において連鎖不平衡が確認された。また3家系において4座位の遺伝性を確認したところ、組み換えが生じずに遺伝していることが確認された。4座位の組合せにおいて、1つの座位の反復回数が少ない場合は、他の座位においても反復回数が少なく、多い場合でも同様の傾向が示されており、このことから4座位間の連鎖した関係性が示唆された。

表2 4座位の反復配列構造

座位	Allele	反復配列構造
LC149476	8	TAA-(TAAA) ₈ -TCAC
	9	TAA-(TAAA) ₉ -TCAC
	11	TAA-(TAAA) ₁₁ -TCAC
	12	TAA-(TAAA) ₁₂ -TCAC
	13	TAA-(TAAA) ₁₃ -TCAC
LC149479	11	(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₇ -CTTC
	13	(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₉ -CTTC
	15	(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₁₁ -CTTC
	16	(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₁₂ -CTTC
	17	(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₁₃ -CTTC
	18	(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₁₄ -CTTC
	21.3	(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₄ -TTT-(CTTT) ₁₃ -CTTC
LC149480	8	ATTT-(TATC) ₈ -CCTC
	9	ATTT-(TATC) ₉ -CCTC
	11	ATTT-(TATC) ₁₁ -CCTC
	12	ATTT-(TATC) ₁₂ -CCTC
	13	ATTT-(TATC) ₁₃ -CCTC
LC149484	10	GACA-(GATA) ₁₀ -TAGGG
	11	GACA-(GATA) ₁₁ -TAGGG
	12	GACA-(GATA) ₁₂ -TAGGG
	13	GACA-(GATA) ₁₃ -TAGGG
	14	GACA-(GATA) ₁₄ -TAGGG
	11	GACA-(GATA) ₁₅ -TAGGG

4つの座位は同時に解析することで有用性が高いと考えられ、簡便かつ迅速に同時解析する方法として、Fragment解析を用いたマルチプレックスPCR法を開発した(図1)。この方法を用いる事で、他研究機関においても4座位の研究および解析が容易となると考えられた。

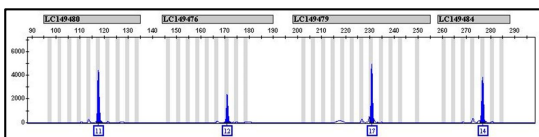


図1 マルチプレックスPCR法を用いたFragment解析像

本研究で検出された4つの座位(少なくともLC149476、LC149479、LC149480の3座位)は連鎖して遺伝しており、複雑な血縁の鑑定に有用だと考えられた。

(3)X染色体p22.3領域に存在する5塩基STR X染色体p22.3領域においてTATAAを基本とした5塩基の反復配列を検出した。配列間に介在するTAAの配列によって3ヶ所に分けられており、そのすべてにおいて多型性を確

認した(表3)。Fragment解析によって得られたデータから統計解析を行ったところ、HETは0.604、PICは0.558と、多型性には若干乏しい結果であったが、5塩基のSTRはFragment解析においてスタッターピーク(本来の検出ピーク周辺に現れる副産物)が生じにくいとされており、本研究においてもRFU(蛍光強度)8000を超える泳動像にもスタッターピークは見られなかった(図2)。このことからFragment解析を用いた個人識別方法において扱いやすく、またマルチプレックスPCRに適応しやすいことが考えられた。

表3 5塩基反復配列の構造

Allele	反復配列構造	frequency
13	(TATAA) ₄ -TAA-(TATAA) ₅ -TAA-(TATAA) ₄	0.586
16	(TATAA) ₄ -TAA-(TATAA) ₇ -TAA-(TATAA) ₅	0.190
17	(TATAA) ₄ -TAA-(TATAA) ₈ -TAA-(TATAA) ₅	0.121
17	(TATAA) ₅ -TAA-(TATAA) ₇ -TAA-(TATAA) ₅	0.017
18	(TATAA) ₄ -TAA-(TATAA) ₉ -TAA-(TATAA) ₅	0.034
18	(TATAA) ₄ -TAA-(TATAA) ₈ -TAA-(TATAA) ₆	0.017
19	(TATAA) ₄ -TAA-(TATAA) ₁₀ -TAA-(TATAA) ₅	0.034

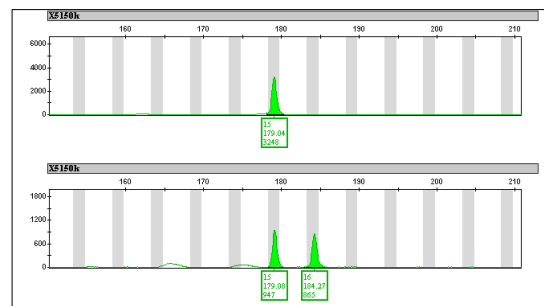


図2 5塩基反復配列のFragment解析像

本研究の座位は(2)に記載した座位と80~150kbと離れた場所に存在しているが、Allele出現頻度に類似した傾向が伺えることから、座位間の連鎖した関係性が推測された。今後は周辺領域を合わせたの解析が必要だと考えられた。

(4)X染色体p22.3領域に存在する3つのSTR X染色体p22.3領域において、90kb以内に存在しているTTTA、TATC、AAGAを基本とした4塩基反復配列を検出した(以下X5667k、X5707k、X5753kとする)。反復配列の構造を表4に示す。

表4 3座位の反復配列構造

Locus	反復配列構造
X5667k	CCCCAAATT-(TTTA) _n -TTTTTGAG
X5707k	CATA-(TATC) _n -TA-(TATC) _m -AACC
X5753k	(AAGG) ₃ -AAGA-(AAGA) _n -AAAG-(AAGG) ₇ - (AGGCAGGGAGGG) ₃

HETは0.693~0.818、PICは0.631~0.794であり、比較的高い値を示した。ハプロタイプ解析を行ったところ、各座位間における連鎖不平衡は確認されなかった。

本研究で検出された3つの座位は、複雑な

血縁関係の証明には有用であるとは示されなかったが、多型性・識別能共に既存の STR 座位と比較しても遜色なく、独立した座位として個人識別に適応可能であると考えられた。また全ての座位で挿入や欠失は見られず、Fragment 解析を用いた個人識別手法において扱いやすいと考えられた。

以上、X 染色体に存在する 9 つの新たな STR を検出した。今後は更に新たな領域の検出を行うとともに、周辺領域に存在する既知の座位との関連性を調査し、複雑な血縁関係を高確率に証明しうる解析方法の検討を行う予定である。

〔引用文献〕

- [1] Rebała K, Kotova SA, Rybakova VI, et al. Variation of X-chromosomal microsatellites in Belarus within the context of their genetic diversity in Europe. *Forensic Sci Int Genet.* 2015. 16:105-11
- [2] Israr M, Shahid AA, Rahman Z. Development and characterization of a new 12-plex ChrX miniSTR system. *Int J Legal Med.* 2014 Jul;128(4):579-87.
- [3] Edelmann J, Hering S, Augustin C, Kalis S, Szibor R. Validation of six closely linked STRs located in the chromosome X centromere region. *Int J Legal Med.* 2010 Jan;124(1):83-7

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Takeki Nishi, Kenji Fukui, Iwate Kimihiro、Analysis of four novel X-chromosomal short tandem repeats within 71 kb of the Xp22.3 region、*International Journal of Legal Medicine*、査読有、2017、DOI: 10.1007/s00414-017-1553-2

Takeki Nishi, Takako Nakamura, Katuya Honda、Detection of a Novel X-Chromosomal Short Tandem Repeat Marker in Xq28 in Four Ethnic Groups、*Legal Medicine*、査読有、Volume 19、2016、43-46
DOI: 10.1016/j.legalmed.2016.01.010

〔学会発表〕(計 3 件)

西健喜、福井謙二、菅藤裕子、岩楯公晴、X 染色体 p22.3 領域において 90kb 以内に存在する STR 多型の 3 座位、日本 DNA 多型学会 第 25 回学術集会、千葉 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

西健喜、福井謙二、菅藤裕子、岩楯公晴、X 染色体 Penta nucleotide short tandem

repeat (STR)の検出と解析、第 85 回日本法医学会学術関東地方集会、神奈川 2016 年 10 月 29 日

西健喜、福井謙二、菅藤裕子、岩楯公晴、X 染色体 p22 領域に存在する新規 STR 多型の検出、第 100 次日本法医学会学術全国集会、東京 2016 年 6 月 15-17 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西 健喜 (Nishi, Takeki)

東京慈恵会医科大学・法医学講座・助教

研究者番号：70759472