

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19489

研究課題名（和文）日本人を対象としたY染色体ハプログループの細分類と個人識別への応用

研究課題名（英文）Subclassification of Y chromosome haplogroups in Japanese population and application to personal identification

研究代表者

落合 恵理子 (OCHIAI, Eriko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60760270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Y染色体ハプログループを個人識別などの法医学的応用を目的として利用するためには高い識別力が必要であり、系統の更なる細分化が求められる。日本人集団におけるYハプログループについて頻度調査を行うとともに、下流のサブグループを含めた細分類を試みた。日本人男性567名の分類の結果、C、D1、N、O*、01b、02、Q系統に大きく分かれた。さらに01b系統は01b*、01b2a*、01b2a1a1*、01b2a1a1a、01b2a1a1b、01b2a1a1cの6種に細分類された。新たに選定したY-SNPs32座位について次世代シーケンサーを用い配列解析したところ、D系統の検体で大幅に識別能力が向上した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

法医学実務でのDNA鑑定では微量試料や陳旧化のため断片化したDNAを扱うことがあり、通常の検査で用いるSTR（反復配列の多型）の鑑定結果が十分に得られない場合がある。増幅産物サイズの小さいSNP解析であれば検出できる可能性があるため、Y-SNPの識別能力が向上することで個人識別への利用が期待される。理論上では数十座位のY-SNPの分析で下流サブグループまで判定することができるため、例えば性犯罪事例における微量試料の鑑定を行うときに被疑者の絞り込みや冤罪の防止にも繋がると考えられる。民族推定の目的でもYハプログループの詳細な分類は有用であり、試料の所属集団を調べる際にも役に立つ。

研究成果の概要（英文）：In order to use Y-chromosome haplogroups for forensic applications such as personal identification, high discrimination power is required, and further subclassification of the lineage is required. We examined the frequency of Y haplogroups in the Japanese population and attempted to subdivide them including downstream subgroups. The results of the classification of 567 Japanese males showed that they were largely divided into C, D1, N, O*, 01b, 02, and Q lineages. The 01b lineage was further subdivided into six types: 01b*, 01b2a*, 01b2a1a1*, 01b2a1a1a, 01b2a1a1b, and 01b2a1a1c. Sequence analysis of the 32 newly selected Y-SNPs loci using next-generation sequencers showed that the discriminatory ability of the D lineage samples was greatly improved.

研究分野：法医学

キーワード：Y染色体ハプログループ Y-SNP Y-STR 個人識別

1. 研究開始当初の背景

Y染色体上の遺伝情報は、人類学や犯罪捜査など多領域において有用である。法医学領域では、個人識別の目的でY染色体上の short tandem repeat (STR) を分析し、性犯罪事例や血縁鑑定などに利用している。一方、Y染色体上の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) はその組み合わせ (ハプロタイプ) によってY染色体ハプログループが決定され、男性の遺伝学的系統とその分布を知ることができる指標として主に民族 (所属集団) 推定に応用されている¹⁾。

法医学領域では、陳旧化した骨などの劣化試料や、着衣や物体に付着した皮膚の脱落上皮細胞、汗などから得られる微量試料を扱うことがある。これらの試料から抽出されたDNAは極微量であったり断片化していることが多く、STR検査が対応できない場合がある。その場合、小さな増幅産物サイズで解析できるSNPが有用である。常染色体上のSNPを組み合わせた血縁関係推定の場合、同胞 (兄弟) 間で500、第二度近親間の血縁関係推定には数千座位のSNPが必要とされ、大規模なDNA解析が必須となる²⁾。一方、Y-SNP (Yハプログループ) を利用すれば、Y染色体はそのまま男系遺伝しているため、祖父 - 孫や父方のおじ - 甥といった第二度近親以上の父系の血縁関係も複雑な計算なく推定可能と考えられる。

しかし、現状ではYハプログループは識別力が低いとされ、個人識別目的で利用するための実用レベルに達していない。日本人に高頻度でみられるYハプログループはハプログループC、D、O (O1b、O2) 系統であるが、これらを更に細分化したサブグループについての研究は未だ発展途上である。現在最も多くのサブグループ分類が行われている報告³⁾においても、D系統のサブグループであるD1a2a1a2b-IMS-JST006841には日本人の約20%、O系統のO1b2a1a1-47zには約25%が属しており、更なる分類の余地が認められる。現在、日本人検体を用いてこれ以上の細分類を行った報告はない。Yハプログループを個人識別に応用していくためには詳細なサブグループの分類と、各グループにおける集団頻度の調査が必要となる。

Yハプログループのサブグループを決定するSNPsは現在International Society of Genetic Genealogy (ISOGG; <https://isogg.org/tree/>) で系統樹とともに公開されている。これらのSNPsが日本人検体に適用可能かどうかを検討していく。また、従来のY-SNPハプロタイプ解析は、複数のY-SNPsをマルチプレックスPCRで同時増幅しキャピラリーシーケンサー等を用いて判定を行うことが多いが、蛍光標識の都合などで同時増幅できる座位数に限りがあるため、多座位ないし多検体の解析には時間と労力がかかる。そのため、細分類を行うための簡便な分析法の確立も望まれる。

2. 研究の目的

Y染色体ハプログループを個人識別に応用するためには、日本人における集団頻度の調査が必要である。また、その識別力を高めるために、日本人に高頻度でみられるハプログループについて、下流のサブグループを細かく分け、再分類していく必要がある。詳細なサブグループ分類のためのSNPsは海外のデータベース上にて報告されているが、一部のサブグループを除いて未だ日本人検体を用いた検討は行われていない。Yハプログループの細分化とその頻度の情報は、法医学的な分析だけでなく民族推定や人類学的にも有用である。

そこで、日本人集団におけるYハプログループの頻度調査を行うとともに、特に日本人に多いハプログループD、O1b系統について細分化を試みた。また、次世代シーケンサーを用いて多数のY-SNPsの同時分析を行い、Yハプログループを一度の手技で下流のサブグループまで決定する方法を検討した。

3. 研究の方法

(1) 日本人集団におけるY染色体ハプログループの頻度調査

血縁関係のない日本人男性567名について、口腔粘膜細胞から常法にてDNAを抽出し、試料とした。本研究は東海大学医学部医の倫理委員会の承認を得て行われた。Y-SNPsのプライマーパネルとしてHID-Ion AmpliSeq Identity Panel (Thermo Fisher Scientific) を使い、鋳型DNA 10ngでY-SNP34座位を同時にPCR増幅した。Ion PGMシーケンサーにて配列解析を行い、型判定の結果からYハプログループを決定した。一部の試料についてはサンガー法で型判定を行った。

(2) Y-SNPマーカーの追加選定

YハプログループD系統とO系統を細分類するY-SNPsについて、ISOGGと先行研究^{3,4)}を参考に32のマーカーを選定した。ハプログループD1a2a-M55系統、O1b2a-IMS-JST022454系統より下流のサブグループを構成するものを中心とし、D系統、O系統でそれぞれ16ずつのマーカーを選んだ。劣化試料への対応を想定し、増幅産物が250bp程度以下となるようにプライマーを設計した。なお、ハプログループの系統名はISOGGのY-DNA Haplogroup Tree 2019-2020 (Version 15.73) に準じた。

(3) ハプログループ O1b 系統の細分類

(1)で分類された試料のうち、Y ハプログループ O1b-M268 系統を有する 127 検体を対象とした。(2)で選定した Y-SNP マーカーより IMS-JST022454、CTS713、CTS1875、Z24598、CTS203 をターゲットとし、PCR 増幅後サンガー法で塩基配列を決定した。各マーカーは順に、ハプログループ O1b2a*、O1b2a1a1*、O1b2a1a1a、O1b2a1a1b、O1b2a1a1c に該当する。CTS713 は従来使用されてきた 47z と同等のマーカーである。さらに、AmPFLSTR Yfiler PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて Y-STR 解析を行い、得られた STR 型について、各ハプログループにおける haplotype diversity と gene diversity を計算した。また、同一ハプログループ内の二検体間における STR のリピートサイズの違いを座位ごとに計算し合計した値について比較を行った。

(4) 次世代シーケンサーを用いた Y 染色体ハプログループの細分類

(1)の試料より、Y ハプログループが既知である 7 検体 (D1*-M174、D1a2a1*-M116.1、D1a2a1a-M125、O1b*-M268、O1b2a*-IMS-JST022454、O1b2a1a1-CTS713、O2-P198) を用いた。(2)で選定した 32 の Y-SNP マーカーを一つのプライマーセットとしてマルチプレックス PCR し、その増幅産物から Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用してライブラリを作成した。増幅産物にアダプターとバーコードを付加したのち精製、定量し、100pM に希釈したライブラリ 7 検体分を混合して、Ion OneTouch 2 Instrument と Ion PGM Hi-Q OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific) でエマルジョン PCR (emPCR) を行った。emPCR 産物はエンリッチメント後、Ion PGM シーケンサーと Ion PGM Hi-Q view Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Ion 316 Chip Kit v2 上でシーケンスした。

得られた配列は、hg19 をリファレンスとしてマッピングし variant 解析を行った。マッピングと variant 解析は Torrent Suite Software 5.2.2 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。目的の Y-SNPs の配列から Y ハプログループを決定した。

4. 研究成果

(1) 日本人集団における Y 染色体ハプログループの頻度調査

日本人 567 検体の Y 染色体ハプログループは C、D1、O*、O1b、O2、N、Q 系統に大きく分類された (表 1)。今回得られた頻度分布は、先行研究^{3,5)}とおおむね同様であった。

表 1 日本人の Y 染色体ハプログループ頻度 (n=567)

ハプログループ	C-M130	D1-M174	N-M231	O*-P186	O1b-M268	O2-P198	Q-M242
検体数 (%)	57 (10.1)	211 (37.2)	2 (0.4)	13 (2.3)	163 (28.7)	118 (20.8)	3 (0.5)

(2) ハプログループ O1b 系統の細分類

日本人 127 検体についてハプログループ O1b 系統の分類を行った結果、O1b*-M268、O1b2a*-IMS-JST022454、O1b2a1a1*-CTS713、O1b2a1a1a-CTS1875、O1b2a1a1b-Z24598、O1b2a1a1c-CTS203 の 6 種の系統に分けることができた。その頻度はそれぞれ O1b 系統全体において 6.3%、26.8%、20.5%、30.7%、11.8%、3.9%であった。特に O1b2a1a1 系統を細分類する 3 種の追加マーカーによって、先行研究³⁾より下流の系統 (O1b2a1a1a、O1b2a1a1b、O1b2a1a1c) まで分けることができた。

各ハプログループについて、Y-STR 型の haplotype diversity、STR 各ローカスごとの gene diversity の平均値 (GD) ならびに同じハプログループに属する検体同士の STR リピートサイズの違いの平均値 (ACDR)⁴⁾を表 2 に示した。STR のリピートサイズの違いは集団内における多様性の大きさを表す。新たに分類された O1b2a1a1a、O1b2a1a1b、O1b2a1a1c 系統の GD と ACDR は上流のハプログループと比較すると値が小さく、Y-STR 型の多様性が低いことを示した。その中で、O1b2a1a1* の ACDR は細分類後であるにもかかわらず、下流の 3 グループや O1b2a* に比べて値が大きく、さらに新たな系統が分かれていく可能性が示唆された。

(3) 次世代シーケンサーを用いた Y 染色体ハプログループの細分類

今回用いた 7 検体について、次世代シーケンサーでの配列解析で得られたリード数は 18,353 ~ 32,160 であった。新たに選定した 32 の Y-SNPs を用いてハプログループの細分類を行った結果、表 3 の通り、元の分類が D1*-M174 系統であった検体が D1a2a2a1-CTS10495 系統と判定されるなど、D 系統においてかなり下流のサブグループまで詳細に分類することができた。判定不能となった 3 検体は、サンガー法での結果と SNP の型が一致せず、ハプログループの決定ができなかったものである。一致しなかった SNP はヘテロ接合として判定されていたことから、原因として、コンタミネーションや手技の問題が考えられた。また、M55 や M116.1 など、カバレッジが少なかったマーカーが複数あり、増幅産物の長さやプライマー配列、プライマーの濃度など、改良すべき点がみられた。

図2 01b 系統の各ハプログループにおける STR diversity

ハプログループ	検体数	HD	GD	ACDR
01b*	8	1.0000	0.56 ± 0.25	15.86 ± 6.17
01b2a*	34	1.0000	0.36 ± 0.21	7.16 ± 2.90
01b2a1a1*	26	0.9978	0.37 ± 0.21	9.06 ± 4.05
01b2a1a1a	39	0.9752	0.22 ± 0.17	4.00 ± 2.25
01b2a1a1b	15	0.9709	0.25 ± 0.21	4.57 ± 1.72
01b2a1a1c	5	1.0000	0.19 ± 0.26	3.40 ± 1.26

HD: Haplotype diversity

GD: Average gene diversity at each locus within each haplogroup

ACDR: Average cumulative number of differences in repeat size in pairwise comparison within each haplogroup

図3 新規プライマーセットを用いたハプログループの細分類

検体	既知ハプログループ	細分類後ハプログループ
#1	D1*-M174	D1a2a2a1-CTS10495
#2	D1a2a1*-M116.1	D1a2a1c1a-IMS-JST022456
#3	D1a2a1a-M125	D1a2a1a*-M125
#4	01b*-M268	判定不能
#5	01b2a-JST022454	判定不能
#6	01b2a1a1*-CTS713	01b2a1a1*-CTS713
#7	O2-P198	判定不能

(4) 結語

今回の研究では、日本人における Y 染色体ハプログループの細分類を試みた。サンガー法でのハプログループ 01b 系統の分類、次世代シーケンスでの D 系統の分類では、先行研究で報告されていたグループよりさらに下流まで新たに分けることができ、ISOGG データベース上の Y-SNPs が日本人検体にも適用可能であることが示された。

日本人 567 名のハプログループ頻度調査に用いたプライマーパネルは、34 の Y-SNPs を用いてハプログループ B から R 系統までを大きく分類するもので、日本人試料では主に C、D、01b、02 の 4 系統しか分類できない。そこで今回日本人向けのプライマーセットとして、新たに 32 の Y-SNPs を選定した。次世代シーケンスの結果を見る限りまだ多くの課題があるが、改良を重ねて一度のランで複数検体を下流のサブグループまで分類できるような系を確立したいと考えている。

現状の日本人の分類データでは D1a2a1a2b-IMS-JST006841 に約 20%、O 系統の 01b2a1a1-47z には約 25%が属している。また、本研究の結果から、01b2a1a1 系統はさらに新たな系統が分岐する可能性があり、新規のマーカーの探索も今後の課題である。今後は日本人検体について可能な限りの細分類を行っていき、各サブグループにおける日本人頻度を調査し、劣化試料における個人識別への応用を目指していく予定である。

<引用文献>

- Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(8):598-612.
- Inaoka Y, Tajima A, Tamura T, Satoh F, Osawa M. Kinship analysis based on SNP data from microarray assay. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2011;3:e275-e276.

Naitoh S, Kasahara-Nonaka I, Minaguchi K, Nambiar P. Assignment of Y-chromosomal SNPs found in Japanese population to Y-chromosomal haplogroup tree. *J Hum Genet.* 2013;58:195-201.

Nonaka I, Minaguchi K, Takezaki N. Y-chromosomal Binary Haplogroups in the Japanese Population and their Relationship to 16 Y-STR Polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2007;71:480-495.

Hammer MF, Karafet TM, Park H, Omoto K, Harihara S, Stoneking M. Dual origins of the Japanese: common ground for hunter-gatherer and farmer Y chromosomes. *J Hum Genet.* 2006;51:47-58.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 落合恵理子, 水口清, 金子悠, 中留真人, 大澤資樹	4. 巻 28
2. 論文標題 日本人のY染色体ハプログループO1b系統の細分類	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 116-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai E, Osawa M, Satoh S, Tamura T, Nakatome M, Kaneko Y, Kakimoto Y, Minaguchi K	4. 巻 66
2. 論文標題 Y chromosome analysis for common surnames in the Japanese male population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 731-738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00884-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 落合恵理子, 水口清, 松島裕, 中留真人, 大澤資樹
2. 発表標題 日本人の姓とY染色体DNA多型の関連解析
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ochiai E, Minaguchi K, Nakatome M, Osawa M
2. 発表標題 RELATED ANALYSIS OF SURNAME AND Y CHROMOSOME HAPLOTYPE IN THE JAPANESE POPULATION
3. 学会等名 The 28th Congress of the International Society for Forensic Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 落合恵理子, 水口清, 金子悠, 中留真人, 大澤資樹
2. 発表標題 日本人のY染色体ハプログループ01b系統の細分類
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------