

機関番号：15101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590678
 研究課題名（和文） 集団間の分布が著しく異なる色素形成関連遺伝子多型の個人識別への応用
 研究課題名（英文） APPLICATION OF POLYMORPHISMS AT PIGMENTATION GENES TO PERSONAL IDENTIFICATION
 研究代表者
 湯浅 勲（YUASA ISAO）
 鳥取大学・医学部・准教授
 研究者番号：00093633

研究成果の概要（和文）：個人識別は法医学鑑定上最も重要な項目の一つであり、通常、繰り返し配列多型（STR）が用いられている。しかしながら、個人の帰属集団の推定することは困難であり、異なった方法の開発が必要である。本研究では集団間の遺伝子頻度が異なる色素形成遺伝子多型の頻度を解析し、さらに東アジアおよび日本人に特異的遺伝子を新たに検索調査した。これらの知見に基づいて、識別同定の方法を開発した。

研究成果の概要（英文）： Personal identification is one of the most important investigations in forensics, and the STR polymorphisms are usually used all over the world. However, the investigation of STR does not provide information of the ancestry and population to which an individual belongs. In this study, the frequencies of pigmentation gene polymorphisms and new East Asian- and Japanese-specific alleles were investigated. On the basis of these data, methods were developed for the inference.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 法医学

科研費の分科・細目： 社会医学・法医学

キーワード：色素形成遺伝子、多型、個人識別、帰属集団、祖先集団

1. 研究開始当初の背景

最近の DNA 鑑定法は目覚しく進歩している。とくに繰り返し配列 (STR: short tandem repeat) 多型の応用は画期的で、法医学の個人識別法をがらりと変えてしまった。STR 多型を利用した方法は断片化した短い DNA 鎖に対応させるなどの多少の改良余地が有るものの、ほぼ完成の域に達している。

国際化に伴って、日本人が海外に旅行し、居住することも少なくないが、現地先の安全がいつも確保されているとは限らない。日本国内にも多くの外国人が居住し、加害者や被害者になる事例は日増しに多くなっている。さらには外国からの漁船、難民船などの船舶事故や死体遺棄のために日本人以外の死体や白骨に遭遇することも稀ではない。昨今、きわめて大規模なテロや地震による災害といった不特定多数の犠牲者が生じる大事件が起きている。しかも、犠牲者は多種多様の集団 (いわゆる人種) から由来していることが多い。これらの大事件が日本国内で起きないという保証はなく、また、海外で起きた場合も国際協力として解決にあたらねばならない。

上記のような状況下における死体や遺留試料から得られた STR 多型の情報は、対照とされるべきデータもしくは試料がなければ、十分に役立たない。とくに目撃情報がない場合や不特定多数の犠牲者が生じた場合などにおいては、STR 多型を中心とした DNA 鑑定では、その試料が日本人から由来したものなのか、外国人のものなのかといった出身地あるいは人種や帰属している集団といった個人の特徴 (地理的起源や帰属集団) について知ることは困難であり、データベースとの比較においても異なった地理的起源の集団資料と比較した場合、誤った結果に陥る可能性がある。STR 鑑定において、これらの情報はきわめて重要であるにもかかわらず、今日の個人識別法には欠落している。このように、目撃情報がなく、しかも大多数の犠牲者などの遺体や断片化した生物学的資料から犠牲者の地理的起源を特定する必要がある。

2. 研究の目的

STR 多型より多型性の低い単一塩基多型 (SNP) は、分子遺伝学の技術の発展により、同時に多数判定できるようになり、それによって高い確率が得られるようになった。しかも、STR 多型と異なって突然変異率がきわめて低い。利用すべき SNP の一つは、どの集団においても比較的多型性が高い SNP であり、

これによって汎用性が高まる。もう一つは、集団間での分布が著しく異なる SNP であり、これが本研究で注目する SNP である。

地理的起源や帰属集団を推定するためには少なくともヒトの主要 3 集団についての情報が必要である。メラニン色素形成関連遺伝子は独立した染色体上に多数存在し、分布がたいへんユニークである。色素形成関連遺伝子は紫外線の影響に対する正の自然淘汰の結果として集団に特異的な多型が最近の集団遺伝学的解析で見つかった。

本研究の目的は、メラニン色素形成に関連する遺伝子の多型を中心に、集団間で著しく分布の異なった SNP ならびに STR 多型を、少なくとも人類の主要 3 集団で調査し、集団特異的な多型を見出し、この多型の分布が生じた遺伝的背景を考察する。優れた多型を多重増幅 (multiplex PCR) する簡便・迅速な判定法を確立する。

このように、色素形成関連遺伝子は集団特異的な変異を多数有しており、ヒトの外見とも関連する特異な遺伝子群である。本研究では、色素形成関連遺伝子の長所を生かして、個人の地理的起源や帰属集団の推定を行うための分子遺伝学に基づいた基礎的研究と法医学の個人識別への応用的研究を行うのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 人類集団の DNA サンプル収集

本研究には人類の主要 3 集団の DNA サンプルが必要である。遺伝子頻度を算出する、すなわち、集団分布の遺伝的特徴を調べる。

(2) 色素形成関連遺伝子の多型の探索

多数の色素形成関連遺伝子はほとんど異なった染色体上にあり、独立して遺伝している。これらの遺伝子には、集団の分化度を表す F_{st} が高い多型が多く存在していることがデータベースから読み取れるが、さらに多くの候補遺伝子多型、とくにイントロンの多型を探索する。

(3) 候補 SNP の遺伝子頻度の算出

少なくともアフリカ系集団、ヨーロッパ系集団、アジア系集団の 3 集団について遺伝子調査を実施して、集団特異的な変異を見出す。

(4) 候補遺伝子の STR 多型の調査

STR 多型の変異は一般に SNP ほど集団間で相違がない。しかしながら、SNP で F_{st} が高い領域に含まれている STR 多型は高い集団特異的分布を示すものがあることを発見したので、STR 多型の調査も実施する。あわせて、塩基配列の決定も行う。

(5) 集団遺伝学的解析

遺伝子頻度や塩基配列データに基づいて、遺伝子多様度、平均ヘテロ接合度、連鎖不平衡などを調べる。

(6) SNP と STR 多型の判定法の開発

これらの多型の multiplex PCR を開発する。

(7) 地理的起源・帰属集団の推定法の確立
Triangle plot, Arlequin や STRUCTURE などを利用しながら、確率的に推定する方法を構築する。

(8) 法医学的試料への応用

解剖試料などの実務試料、また、科学捜査研究所の研究協力者の協力を得て、鑑定試料への応用を試み、multiplex PCR をベースにした方法の評価を試みる。

4. 研究成果

(1) 本研究のために、新たにネパールのチベット人、中国東北部のエヴェンキ人、オロチョン人、南米のコロンビアの住人の DNA の贈与を受け、既存のサンプルのアフリカ人、ヨーロッパ人、トルコ人、インド人に加えて、東アジア、南米の集団サンプルが 19 集団となった。一部は全ゲノム増幅によりサンプル量を増加させた。

(2) 色素形成関連遺伝子 MATP (SLC45A2) 遺伝子がヨーロッパ人ではほとんど Phe 型であるのに対してアフリカ人、アジア人には混血がない限りみられないことを報告してきた。特に今回、西ヨーロッパの北部から、アフリカ北部までの詳細な地理的分布を調査したところ、北から南に向かって頻度が下がる地理的勾配を観察した(論文 11)。同様に、新しく入手したサンプルを含めて OCA2 遺伝子の Ala481Thr と His615Arg の変異を詳細に調べたところ、481Thr はオロチョン人で頻度が最も高く (0.52)、主に北の東アジア人を特徴づけた。615Arg は長沙の漢民族で最も高く (0.67)、長沙を中心に拡散していた(論文 1)。

(3) 補体 I 因子の多型を調べたところ、たんに多型の A 型遺伝子に相当するものが二つ DNA レベルで見つかり、一つは本土日本人のみに生ずる日本人特異的 SNP であり、他は、東アジア人特異 SNP で、これもまた、長沙の漢民族を中心に分布しており、この地域、もしくは、近郊の民族が東アジア人の変異の発生と拡散の中心であると示唆された(論文 20)。高い Fst を示す多型として HERC1 についても調べた(論文 14)。

(4) これに関連して、補体 I 因子のイントロンの STR に、東アジア人に特異的な配列が挿入された STR をみいだした。しかも、最も高い頻度は長沙の漢民族で観察された。このように、頻度高いアレルを有する STR はきわめて稀有であった。この東アジア人特異的ア

レルは、補体 I 因子の SNP と連鎖不平衡状態にあり、優れた集団マーカーであった(論文 6)。

(5) 日本人特異的 SNP は日本人の証明のために有用であるが、今回、GALNT11 に特異的遺伝子を見出した。沖縄では 0.15、本州九州 5 集団では 0.07-0.10、韓国 2 集団では 0.02 以下であり、他の集団では観察されなかった。このような多型分布パターンを示す SNP が染色体上にかなり多く存在していることが示唆され、日本人証明のための方法が作成可能であることがわかった(論文 9)

(6) 東アジアに特異的な分布を示す耳垢型遺伝子 ABCC11 の SNP も調べた(論文 26)。

(7) Y 染色体の SNP は特異的な分布を示す論文 4、6、10)。これらの中から 7 種の SNP を利用して、人類の主要 3 集団の識別を行う SNaPshot 方法を確立した(論文 4)。

(8) 集団間の分布が異なる色素形成関連遺伝子 (ASIP, MATP, MC1R, MLPH, OCA2, SLC24A4, SLC24A5, SLC45A2, TYRP1 など) や既知の集団特異的遺伝子 (FY, HB など) を組み合わせることで多重増幅し、クラスター分析などの統計処理をすることにより高い確率でもって、主要 3 集団の識別が可能となり、法医学的生物資料の帰属・祖先集団の推定が可能となった(準備中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件) すべて査読有り。

- 1) Yuasa I, Harihara S, Jin F, Nishimukai H, Fujihara J, Fukumori Y, Takeshita H, Umetsu K, Saitou N: Distribution of OCA2*481Thr and OCA2*615Arg, associated with hypopigmentation, in several additional populations. *Legal Medicine* (印刷中).
- 2) Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Kimura-Kataoka K, Soejima M, Koda Y, Kato H, Panduro A, Yuasa I, Takeshita H: Global genetic analysis of all single nucleotide polymorphisms in exons of the human deoxyribonuclease I-like 3 gene and their effect on its catalytic activity. *Electrophoresis* (印刷中).
- 3) Guillard M, Wada Y, Hansikova H, Yuasa I, Vesela K, Ondruskova N, Kadoya M, Janssen A, Van den Heuvel LP, Morava E, Zeman J, Wevers RA, Lefeber DJ. Transferrin mutations at the glycosylation site complicate diagnosis of congenital disorders of

- glycosylation type I. Journal of Inherited Metabolic Disease (印刷中).
- 4) Muro T, Iida R, Fujihara J, Yasuda T, Watanabe Y, Imamura S, Nakamura H, Kimura-Kataoka K, Yuasa I, Toga T, Takeshita H: Simultaneous determination of seven informative Y chromosome SNPs to differentiate East Asian, European and African populations. *Legal Medicine* 13(3) 134-141, 2011.
 - 5) Fujihara J, Yasuda T, Kato H, Yuasa I, Panduro A, Kunito T, Takeshita H: Genetic variants associated with arsenic metabolism within human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) show wide variation across multiple populations. *Archives of Toxicology* 85(2) 119-125, 2011.
 - 6) Yuasa I, Irizawa Y, Nishimukai H, Fukumori Y, Umetsu K, Nakayashiki N, Saitou N, Henke L, Henke J: A hypervariable STR polymorphism in the complement factor I (CFI) gene: Asian-specific alleles. *International Journal of Legal Medicine* 125(1): 121-125, 2011.
 - 7) Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Kimura-Kataoka K, Soejima M, Koda Y, Kato H, Panduro A, Yuasa I, Takeshita H: Global analysis of single nucleotide polymorphisms in the exons of human deoxyribose I-like 1 and 2 genes. *Electrophoresis* 31(21) 3552-3557, 2010.
 - 8) Ueki M, Fujihara J, Takeshita H, Kimura-Kataoka K, Iida R, Nakajima T, Kominato Y, Yuasa I, Yasuda T: Genetic and expression analysis of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease I-like 1 and 2 genes. *Electrophoresis* 31(12) 2063-2069, 2010.
 - 9) Yuasa I, Umetsu K, Matsusue A, Nishimukai H, Fukumori Y, Harihara S, Saitou N, Jin F, Chattopadhyay PK, Henke L, Henke J: A Japanese-specific allele at the GALNT11 gene. *Legal Medicine* 12(4) 208-211, 2010.
 - 10) Okamoto K, Ishida C, Ikebuchi Y, Mandai M, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I: The genotypes of IL-1 beta and MMP-3 are associated with the prognosis of HCV-related hepatocellular carcinoma. *Internal Medicine* 49(10) 887-895, 2010.
 - 11) Lucotte G, Mercier G, Diéterlen F, Yuasa I: A decreasing cline of 374F allele frequencies in the skin pigmentation gene SLC45A2 from the north of West Europe to North Africa. *Biochemical Genetics* 48(1-2) 26-33, 2010.
 - 12) Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Iida R, Yuasa I, Nakajima T, Kominato Y, Yasuda T: Genetic and expression analysis of all 7 non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human deoxyribonuclease II gene, with potential relevance to autoimmunity. *Clinica Chimica Acta* 411(1-2) 92-98, 2010.
 - 13) Nakayashiki N, Shimamoto K, Takamiya M, Hashiyada M, Yuasa I, Dewa K: Investigation of SNP haplotypes in the H19 imprinted gene. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2(1) 540-541, 2009.
 - 14) Yuasa I, Umetsu K, Nishimukai H, Fukumori Y, Harihara S, Saitou N, Jin F, Chattopadhyay PK, Henke L, Henke J: HERC1 polymorphisms: population-specific variations in haplotype composition. *Cell Biochemistry and Function* 27(6) 402-405, 2009.
 - 15) Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Iida R, Yuasa I, Kato H, Panduro A, Nakajima T, Kominato Y, Yasuda T: Caucasian-specific allele in non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the gene encoding deoxyribonuclease I-like 3, potentially relevant to autoimmunity, produces an inactive enzyme. *Clinica Chimica Acta* 407(1/2) 20-24, 2009.
 - 16) Iwata H, Kitano T, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Kemkes-Matthes B, Ichinose A: Distinct carboxy-terminus of the B subunit for factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and

- fibrinolytic systems. *Journal of thrombosis and haemostasis* 7(7) 1084-1091, 2009.
- 17) Fujihara J, Yuasa I, Muro T, Iida R, Tsubota E, Nakamura H, Imamura Shinji, Yasuda T, Takeshita H: Allele frequencies and haplotypes for 28 Y-STRs in Ovambo population. *Legal Medicine* 11(4) 205-208, 2009.
 - 18) Iida R, Tsubota E, Yuasa I, Takeshita H, Yasuda T: Simultaneous genotyping of eleven non-synonymous SNPs in the four glutathione peroxidase genes using the multiplex single base extension method. *Clinica Chimica Acta* 402(1-2) 79-82, 2009.
 - 19) Nakamura H, Muro T, Imamura S, Yuasa I: Forensic species identification based on size variation of mitochondrial DNA hypervariable regions. *International Journal of Legal Medicine* 123(2) 177-184, 2009.
 - 20) Yuasa I, Nakagawa M, Umetsu K, Harihara S, Matsusue A, Nishimukai H, Fukumori Y, Saitou N, Park KS, Jin F, Lucotte G, Chattopadhyay P, Henke L, Henke J: Molecular basis of complement factor I (CFI) polymorphism: One of two polymorphic suballeles responsible for CFI A is Japanese-specific. *Journal of Human Genetics* 53(11-12) 1016-1021, 2008.
 - 21) Yuasa I, Irizawa Y, Nakamura H, Matsusue A, Umetsu K: Haplotype analysis of seven Y-STRs (eleven loci) in two Japanese populations. *Legal Medicine* 10(6) 316-318, 2008.
 - 22) Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Takatsuka H, Yuasa I, Iida R, Yasuda T: Three single nucleotide polymorphisms leading to non-synonymous amino acid substitution in the human ribonuclease 2 and angiogenin genes exhibit markedly less genetic heterogeneity in six populations. *Cell Biochemistry and Function* 26(6) 718-722, 2008.
 - 23) Hashiyada M, Umetsu K, Yuasa I, Tamura A, Matsusue A, Suzuki K, Kashimura S, Funayama M: Population genetics of seventeen Y-chromosomal STR loci in Japanese. *Forensic Science International: Genetics* 2(4) e69-e70, 2008.
 - 24) Okanishi T, Saito Y, Yuasa I, Miura M, Nagata I, Maegaki Y, Ohno K: Cutis laxa with frontoparietal cortical malformation: a novel type of congenital disorder of glycosylation. *European Journal of Paediatric Neurology* 12(3), 262-265, 2008.
 - 25) Ueki M, Iida R, Fujihara J, Takeshita H, Yuasa I, Kominato Y, Yasuda T: Development of genotyping methods for single nucleotide polymorphism in the human pancreatic ribonuclease gene (*RNASE1*) and their application to population studies. *Biochemical Genetics* 46(3/4) 145-153, 2008.
 - 26) Kitano T, Yuasa I, Yamazaki K, Nakayashiki N, Miyoshi A, Park K-S, Umetsu K: Allele frequencies of a SNP and a 27-bp deletion that are the determinant of earwax type in the ABCC11 gene. *Legal Medicine* 10(2) 113-114, 2008.
- [学会発表] (計 11 件)
- 1) 室友紀、今村真二、渡部有希菜、中村博明、藤原純子、飯田礼子、安田年博、木村かおり、湯浅 勲、副島美貴子、神田芳郎、竹下治男. Y染色体のハプロタイプグループを利用した民族推定法の開発. 第18回日本DNA多型学会2010年11月、三島.
 - 2) 湯浅 勲、遠藤 実、入澤淑人、中川真由美、岡西 徹、大野耕策. ATP6V0A2の変異による先天性グリコシル化異常症. 第18回日本DNA多型学会、2010年11月、三島.
 - 3) 湯浅 勲、入澤淑人、梅津和夫、西向弘明、中屋敷 徳、出羽厚二. 補体I因子のイントロン7にみられるSTRについて(2). 第94次日本法医学会学術全国集会、2010年6月、東京.
 - 4) 沖浦達幸、西向弘明、湯浅 勲、福森泰雄、針原伸二、辻村隆介、織本千年、植田規史. ハンガリー人集団とロマ人集団におけるC7C106Rアレル及びC9R95Xアレルについて. 第94次日本法医学会学術全国集会、2010年6月、東京.
 - 5) 湯浅 勲、松尾宗明、副島美貴子、神田芳郎. CDGの検査で遭遇したトランスフェリンの二つの変異型. 第17回日本DNA多型学会 2009年11月、久留米.
 - 6) Kudo T, Tsuchida M, Shinohara H, Fukushima H, Yuasa I, Ohno K, Sumazaki R: A probable case of congenital

disorder of glycosylation type Ib in Japan. The 11th Congress of the Asia Pan-Pacific Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition APPSPGHAN 2009 September, Seoul, Korea.

- 7) Nakayashiki N, Shimamoto K, Takamiya M, Hashiyada M, Yuasa I, Dewa K: Investigation of SNP haplotypes in the H19 imprinted gene. The 23rd World Congress of the International Society for Forensic Genetics. 2009 Sep. Buenos Aires, Argentina.
- 8) 湯浅 勲、入澤淑人、梅津和夫. 補体I因子のイントロン7にみられるSTRについて. 第93次日本法医学会総会、2009年5月、大阪.
- 9) 湯浅 勲、入澤淑人、中川真由美、梅津和夫、針原伸二、松末 綾、西向弘明、福森泰雄、齋藤成也. 補体I因子のCFI*Aは二つの集団特異的遺伝子からなる. 第17回日本DNA多型学会、2008年11月、東京.
- 10) 梅津和夫、湯浅 勲、渡辺剛太郎、山崎健太郎. APLP法によるYのハプログループ解析. 第92次日本法医学会総会、2008年4月、長崎.
- 11) 湯浅 勲、入澤淑人、梅津和夫. OCA2遺伝子のSTR: Fstの高いSNPの近くのSTRもFstが高い. 第92次日本法医学会総会、2008年4月、長崎.

[図書] (計1件)

- 1) 平山良道、大野耕策、湯浅 勲: 先天性グリコシル化異常症. 小児科臨床ピクシス23: 見逃せない先天代謝異常 (高柳正樹専門編集) pp. 202-205, 中山書店、東京 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 勲 (YUASA ISAO)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号: 00093633

(2) 研究分担者

入澤淑人 (IRIZAWA YOSHITO)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号: 90112226

(3) 連携研究者

梅津和夫 (UMETSU KAZUO)
山形大学・医学部・准教授

研究者番号: 10091828

赤根 敦 (AKANE ATSUSHI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70202520