

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590748

研究課題名（和文） 網羅的動物ゲノム解析による新しい法科学技術の開発

研究課題名（英文） A comprehensive analysis of animal genome to establish a new forensic method

研究代表者

近江 俊徳 (TOSHINORI OMI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40296091

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要（和文）：多様化する犯罪現場で動物試料の遺留物が見つかるケースは欧米同様増加傾向にあると考えられる。そこで、動物の DNA 個体識別マーカー検索として、イヌ mtDNA HV1 多型解析（447 個体）ならびに 18STR 座位とアメロゲニン遺伝子座位（市販イヌ遺伝子型判定キット使用、80 個体）の解析を行い、一つのデータセットを提供するとともに、個体識別の可能性を明らかとした。また、マイクロアレイ解析による網羅的 SNP 解析の結果、17000SNP 中、106191 箇所（48 個体）で多型性のある座位を同定した。網羅的 SNP 解析に得られた候補遺伝子座の同定により SNP マーカーによる新しい DNA 個体識別技術を確立する基盤が構築された。

研究成果の概要（英文）：研究成果の概要（英文）： Animal hair and other type of animal samples are often found at crime scene, and that can provide us secondary transfer from the criminals or victims because the common environment of dog and human. In this reason, DNA analysis of animal is progressing in forensic science. We here showed the one of the data set for dog mtDNA HV1 haplotypes and dog STR makers (18 STR loci and Amelogenin) because there were little information for dog DNA identification in Japan. To development of new method for dog DNA identification, we typed 170000 SNP in 48 dogs. Although further selection of informative SNP need to development of DNA identification, we proposed here the possibility of DNA identification by SNP analysis in dogs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：動物ゲノム、DNA 多型、個体識別、法科学技術

1. 研究開始当初の背景

犯罪が年々複雑している現在において物体検査や個人識別などの法科学的解析は、犯罪捜査の鑑定項目として重要であることから、その分析技術は常に社会変化に対応し向上する必要がある。欧米では、すでに法医学者、FBI、動物遺伝学者からなる動物法医遺伝学委員会（国際動物遺伝学会内）が2004年から立ち上がるなど、動物ゲノム分析を対象とした法科学技術に関する研究が勢力的に実施されている（Bellis et.al. Forensic Sci. Int. 2003; Gundry et.al. J Forensic Sci. 2007; Baute et. al. J. Forensic. Sci., 2008 など多数）。しかし、我が国の法医実務の現状において、多様化する犯罪現場で動物試料の遺留物が見つかるケースは欧米同様増加傾向にあると考えられるが、動物試料を対象とした鑑定技術の開発は必ずしも十分とは言えず、法医学分野における動物ゲノム解析研究の促進が望まれている。

2. 研究の目的

本研究課題では、動物ゲノム試料を対象とした法科学技術の基盤の確立に向け、まずこれまで欧米で個体識別マーカーとして報告のあるイヌ mtDNA 多型解析およびイヌ STR マーカーを用い我が国で使用されているイヌ個体を対象とした個体識別能の検討を行った。さらに、新しい技術開発のため、マイクロアレイ法による網羅的解析、血液型関連解析、その他の DNA 多型解析など、包括的な研究を促進する事により複雑化する法医試料の解析技術向上に貢献する事を目的とした。

3. 研究の方法

①イヌ mtDNA 多型解析は、Himmelberger et al. (J Forensic Sci, 2008) に準じ HV1 領域を増幅後、サイクルシーケンシング法 (ABI) により塩基配列を決定した。品種間解析は 88 品種 154 例、品種内解析は 5 品種 293 例のハプロタイプを解析した。
②市販されているイヌ遺伝子型判定キットの個体識別能の評価は、Canine Genotypes Panel 1.1 Kit (Finzymes, フィンランド) により Golden Retriever と Miniature

Dachshund 各 40 例の遺伝子座 (18STR 座と Amelogenin) を増幅後、Gene Scan 500 [LIZ] Size Standard (ABI 社) と共に、キャピラリー電気泳動後 (ABI 310) で泳動後、Gene Mapper Ver. 4.0 (ABI) により遺伝子型を決定し、遺伝的統計解析により実施した。

③CGH 解析網羅的 DNA 多型解析は、品種の異なる 2 個体を用い、イヌマイクロアレイ (385K-1plex, NimbleGen) による網羅的 CGH 解析を行い DNA コピー数のプロファイリングを実施した。

④イヌ網羅的 SNP 解析による新規マーカー探索は、複数品種 48 個体について SNP Chip (Canine HD, Illumina) を用い 170000 SNP のタイピングを実施した。

⑤イヌのヒト ABO 相同遺伝子の同定は、ヒトの ABO 遺伝子情報を基に、イヌ各組織由来の total RNA、RACE 法、塩基配列解析により実施した。

⑥ニホンザルにおける Y-STR 座位の開発は、ヒト Y-STR マーカー 82 種類よりニホンザル特異的なマーカー選択を行い、開発したマーカーのみ福島県のニホンザル 123 個体で特徴を検討した。

⑦イヌ特異的血液型の品種別頻度の解析は、ラビッドベット-H 犬血液型判定キット (共立製薬) を用いて 5 品種 80 例を実施した。

4. 研究成果

本研究では、研究課題遂行のため動物ゲノムの網羅的・包括的な解析を行い、動物試料を法科学的解析するための、基礎データ、新規技術開発のための基盤的研究を行い下記のおもな成果を得た。

①イヌ mtDNA 多型解析

イヌ 447 個体の mtDNA HV1 領域の 660bp を解析した。その結果、解析領域内に 47 SNP と 2 箇所 of in/del 多型の検出により、58 のハプロタイプを見出し GenBank に登録した。また、5 品種 293 例を用いた品種内解析による遺伝的多用度は 0.624~0.992、88 品種 154 例の品種間解析による遺伝的多様度は 0.929 であった (表 1)。以上の結果から我が国におけるイヌの mtDNA HV1 領域の多型解析は、諸外国の報告同様に一定の個体識別能を有する事を明らかとした。

表1 イヌ mtDNA HV1 の遺伝的多様度

| | N | Haplotype Diversity |
|---------------------|-----|---------------------|
| Interbreed | | |
| Golden Retriever | 53 | 0.624 ± 0.052 |
| Labrador Retriever | 67 | 0.722 ± 0.029 |
| Miniature Dachshund | 61 | 0.922 ± 0.010 |
| Toy Poodle | 62 | 0.877 ± 0.020 |
| Welsh Corgi | 50 | 0.443 ± 0.084 |
| Interbreed | | |
| 88 breeds | 154 | 0.929 ± 0.011 |

②市販されているイヌ遺伝子型判定キットの個体識別能の評価

Golden Retriever (G.R) と Miniature Dachshund (M.D.) の各 40 検体の遺伝子型決定し、種々の遺伝的統計解析を実施した。表 2 および表 3 に、ヘテロ接合度観察値等の各値を明らかとした。個体識別能力の指標となる総合識別能力は G.R で $1-1.4337 \times 10^{-14}$ 、M.D で $1-1.61466 \times 10^{-15}$ であった。最も見られる確率が高い個体の遺伝子型頻度は、G.R で約 5300 億頭に 1 頭、M.D で約 2 兆頭に 1 頭であった。世界のイヌの頭数は約 4 億頭、日本で飼育されているイヌは約 1100 万頭と推定されていることから、本キットの個体識別能は極めて高いことを明らかとした。その一方で、各遺伝子座は、主に 2 塩基繰り返し配列多型で構成されているため、判定は複数回行う必要があるため、ヒトの DNA 個体識別マーカーと同様な 3 から 4 塩基繰り返し配列マーカーの開発が今後と課題であると考えた。今回、2 品種のみのデータではあるが、品種により検出される遺伝子座のアリルの種類およびその頻度に一部特徴的なパターンも認められ、今後さらに解析を進めることで、品種の推定もある程度可能になるのではないかとと思われる。

表2 G.R40 検体の遺伝統計学的解析結果

| 遺伝子座位 | H _a | H _i | P-Value | F _{is} | PIC | PD | PE |
|------------|----------------|----------------|---------|-----------------|--------|--------|--------|
| AHTk211 | 0.5250 | 0.5155 | 0.7036 | -0.0187 | 0.4761 | 0.7260 | 0.3016 |
| CXK279 | 0.5000 | 0.8642 | 0.0986 | 0.2496 | 0.5973 | 0.8229 | 0.3959 |
| REN169D018 | 0.7750 | 0.6975 | 0.5390 | -0.1127 | 0.6336 | 0.8480 | 0.4308 |
| INU0055 | 0.7250 | 0.6889 | 0.5405 | -0.0531 | 0.6323 | 0.8497 | 0.4339 |
| REN54P11 | 0.5500 | 0.6392 | 0.2629 | 0.1411 | 0.5781 | 0.8109 | 0.3870 |
| INRA21 | 0.6250 | 0.7639 | 0.1886 | 0.1838 | 0.7139 | 0.8992 | 0.5282 |
| AHT137 | 0.8000 | 0.8541 | 0.4241 | 0.0641 | 0.8253 | 0.9574 | 0.6900 |
| REN169D01 | 0.7000 | 0.6975 | 0.6440 | -0.0037 | 0.6392 | 0.8536 | 0.4430 |
| AHTk260 | 0.5000 | 0.5532 | 0.3067 | 0.0972 | 0.5067 | 0.7546 | 0.3260 |
| AHTk253 | 0.6750 | 0.6579 | 0.9580 | -0.0263 | 0.5765 | 0.8040 | 0.3580 |
| INU0005 | 0.4750 | 0.4706 | 0.6657 | -0.0095 | 0.4361 | 0.6849 | 0.2708 |
| INU030 | 0.6250 | 0.5453 | 0.2089 | -0.1494 | 0.4378 | 0.6863 | 0.2452 |
| FH2848 | 0.6750 | 0.6608 | 0.8773 | -0.0218 | 0.5907 | 0.8175 | 0.3898 |
| AHT121 | 0.4250 | 0.6171 | 0.0378 | 0.3140 | 0.5455 | 0.7835 | 0.3400 |
| FH2054 | 0.8250 | 0.8025 | 0.3483 | -0.0284 | 0.7606 | 0.9251 | 0.5902 |
| REN162C04 | 0.7000 | 0.7218 | 0.1998 | 0.0306 | 0.6572 | 0.8619 | 0.4510 |
| AHTk171 | 0.5250 | 0.5323 | 0.3518 | 0.0138 | 0.4812 | 0.7305 | 0.3025 |
| REN247M23 | 0.6000 | 0.6294 | 0.0332 | 0.0473 | 0.5571 | 0.7923 | 0.3562 |
| 平均 | 0.6264 | 0.6714 | | 0.0599 | 0.5914 | 0.8116 | 0.4021 |

赤: 最大値 APD $1-1.4337 \times 10^{-14}$
 青: 最小値 (=0.9999999999999986)
 緑: P<0.05 APE 0.9999934

表3 M.D. 40 検体の遺伝統計学的解析結果

| 遺伝子座位 | H _a | H _i | P-Value | F _{is} | PIC | PD | PE |
|------------|----------------|----------------|---------|-----------------|--------|--------|--------|
| AHTk211 | 0.5250 | 0.6921 | 0.0368 | 0.2438 | 0.6333 | 0.8497 | 0.4336 |
| CXK279 | 0.7250 | 0.7184 | 0.8064 | -0.0094 | 0.6538 | 0.8600 | 0.4480 |
| REN169D018 | 0.4000 | 0.4902 | 0.1258 | 0.1859 | 0.4582 | 0.7080 | 0.2926 |
| INU0055 | 0.6000 | 0.6994 | 0.7515 | 0.1436 | 0.6360 | 0.8497 | 0.4384 |
| REN54P11 | 0.4000 | 0.4870 | 0.3815 | 0.1806 | 0.4361 | 0.6857 | 0.2605 |
| INRA21 | 0.8000 | 0.7747 | 0.0876 | -0.0331 | 0.7254 | 0.9052 | 0.5399 |
| AHT137 | 0.6250 | 0.7573 | 0.0023 | 0.1765 | 0.7060 | 0.8946 | 0.5204 |
| REN169D01 | 0.5750 | 0.6497 | 0.0847 | 0.1163 | 0.6058 | 0.8358 | 0.4219 |
| AHTk260 | 0.5750 | 0.5535 | 0.9350 | -0.0394 | 0.5198 | 0.7677 | 0.3472 |
| AHTk253 | 0.5750 | 0.6434 | 0.3100 | 0.1075 | 0.5641 | 0.7957 | 0.3614 |
| INU0005 | 0.7000 | 0.7047 | 0.2674 | 0.0068 | 0.6468 | 0.8584 | 0.4311 |
| INU0030 | 0.6250 | 0.6668 | 0.8032 | 0.0634 | 0.5990 | 0.8239 | 0.3989 |
| FH2848 | 0.7500 | 0.7709 | 0.3860 | 0.0274 | 0.7237 | 0.9055 | 0.5430 |
| AHT121 | 0.6500 | 0.7190 | 0.3141 | 0.0971 | 0.6888 | 0.8947 | 0.5250 |
| FH2054 | 0.8000 | 0.8516 | 0.7941 | 0.0613 | 0.8214 | 0.9552 | 0.6822 |
| REN162C04 | 0.7500 | 0.6921 | 0.4759 | -0.0848 | 0.6277 | 0.8441 | 0.4279 |
| AHTk171 | 0.7000 | 0.7212 | 0.9136 | 0.0298 | 0.6700 | 0.8750 | 0.4810 |
| REN247M23 | 0.5000 | 0.4927 | 0.6314 | -0.0150 | 0.4204 | 0.6702 | 0.2398 |
| 平均 | 0.6264 | 0.6714 | | 0.0699 | 0.6187 | 0.8322 | 0.4340 |

赤: 最大値 APD $1-1.61466 \times 10^{-15}$
 青: 最小値 (=0.9999999999999986)
 緑: P<0.05 APE 0.9999975

③CGH 解析網羅的 DNA 多型解析

新規 DNA 多型マーカー開発およびイヌ特異的血液型候補遺伝子探索の一環として、イヌ マイクロアレイ (385K-1plex, NimbleGen) による網羅的 CGH 解析を行い DNA コピー数のプロファイリングを実施した。その結果、2 番染色体、5 番染色体 (図 1)、9 番染色体、23 番染色体、27 番染色体の特定領域において興味あるコピー数変異が認められた。今後さらに各領域の詳細な解析が必要と考えられた。

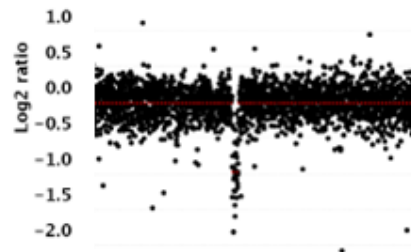


図1 イヌ CGH 解析結果 (第5番染色体)

④イヌ 170000SNP の網羅的 SNP 解析による新規マーカー探索

個体識別に有効な候補 SNP を探索するため、48 献体のイヌゲノムを用い、約 170000SNP (Canine HD, Illumina) の網羅的ゲノム解析を実施した。その結果、Sample Success Rate 100%, Locus Success Rate 99.0%, Call Rate 99.0%のタイピング解析結果を得た。また、本解析群内でマイナーアレル頻度 0.10 以上の SNP 座位は 173662SNP 中、106191 座位 (61.1%) で、全染色体に分布していた。以上の結果は SNP 解析による同種個体識別マーカーを絞り込むために有用な知見と考えられる。

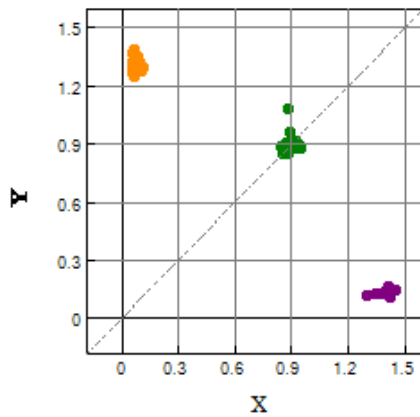


図2 106191 座位 SNP 検出の 1 例
BICF2S23551762

⑥ニホンザルにおける Y-STR 座位の開発

近年、野生動物による殺傷事例や農作物被害などが社会的問題となりつつある。それらの問題に対応する法医科学的技術の一つとして、ヒトの Y-STR マーカーからニホンザル特異的な Y-STR マーカーの開発を試みた。その結果、6 座位の STR マーカーを開発した。123 個体の解析では、23 アレル、28 ハプロタイプ、遺伝的多様度は、0.925 であった。これらの結果は、ニホンザルの個体識別にとって需要であるばかりでなく、霊長類における Y-STR の分化・進化研究にも有用なツールと考える。

⑦イヌ特異的血液型の品種別頻度の解析

イヌの血液型 DEA1.1 の血清学的解析により 5 品種 80 例の型判定を行い、陽性率は 85% であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

①Udagawa C, Chong YH, Shito M, Kawakami T, Tada N, Ochiai K, Ishioka K, Tsuchida S, Omi T. cDNA cloning and expression analysis of canine uncoupling protein 2 and 3 genes. Journal of Pet Animal Nutrition, 査読有, 14(2), 68-75.

②Ochiai K, 他 10 名 (9 番目). Valine 1532 of human BRC repeat 4 plays an important role in the interaction Between BRCA2 and RAD51. FEBS Letters, 査読有, 585(12): 1771-1777.

③Omi T, Koda Y, Soejima M, Iwamoto S. Distribution of 42-bp variable tandem repeat polymorphism of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene in eight human populations. Legal Medicine, 査読有, (Tokyo), 13(1):44-46.

④Omi T, Tsuchida S, Ikemoto S. Xg allele frequencies in Japanese male. Journal of Comparative Clinical Medicine, 査読有, 18(1):14-16.

⑤Tsuchida S, Yamada Y, Fukui E, Kawada T, Omi T 他 4 名. Distribution of single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and association with calf diseases in Japanese Black cattle. Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, 72(12):1609-1614.

⑥Munkhtulga L, 他 17 名 (7 番目). Regulatory SNP in the RBP4 gene modified the expression in adipocytes and associated with BMI. Obesity, 査読有, 18(5):1006-1014.

⑦Chung YH, Akiyama S, Yamada K, Omi T. Breed differences in phenotype frequency of dog erythrocyte antigen 1.1. Japanese Journal of Comparative Clinical Medicine, 査読有, 17(1), 19-22. 2009.

⑧ Chung YH, Morita M, Omi T. Identification and characterization of a single nucleotide substitution in the Canis familiaris Rh antigen-like protein (Rh30) gene. Japanese Comparative Clinical Medicine, 査読有, 17(1), 10-13, 2009.

[学会発表] (計 13 件)

①河上 剛、市東正幸、宇田川智野、落合和彦、杉山 将、多田尚美、坂本敦司、土田修二、近江俊徳。市販されているイヌ遺伝子型判定キットの個体識別能力の検討。第 20 回日本 DNA 多型学会学術集会。平成 23 年 12 月。横浜。

②市東正幸、名切幸枝、河上 剛、宇田川智野、多田尚美、落合和彦、土田修二、羽山伸一、近江俊徳。ニホンザルの Y-STR 解析マーカー開発と集団遺伝学的应用。第 20 回日本 DNA 多型学会学術集会。平成 23 年 12 月。横浜。

③近江俊徳、鄭 英和、市東正幸、宇田川智野、河上 剛、落合和彦、杉山 将、土田修一. イヌにおけるヒト ABO 組織血液型遺伝子に相同な full length cDNA の同定と特徴. 第 152 回日本獣医学会学術集会. 平成 23 年 12 月. 堺.

④市東正幸、名切幸枝、河上 剛、杉山 将、鄭 英和、宇田川智野、多田尚美、落合和彦、羽山伸一、土田修一、近江俊徳. ニホンザルにおける Y 染色体特異的 Short tandem repeat (STR) 座位の同定. 第 27 回日本霊長類学会大会. 平成 23 年 7 月. 犬山.

⑤近江俊徳、坂本敦司、土田修一. イヌにおける mtDNA HVI 領域のハプロタイプ同定とその法科学的考察. 第 95 次日本法医学会全国学術集会. 平成 23 年 6 月. 福島.

⑥鄭 英和、土田修一、青木 博史、近江俊徳. イヌのヒト ABO 組織血液型相同遺伝子の cDNA クローニングと発現解析. 第 41 回日本比較臨床医学会. 平成 22 年 12 月. 相模原.

⑦杉山 将、鄭 英和、市東正幸、河上 剛、宇田川智野、盆子原 誠、奥田 浩、土田修一、近江俊徳. 我が国で飼育されているイヌの mtDNA HV1 ハプロタイプの検出 (第 1 報). 日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会. 平成 22 年 11 月. 三島.

⑧河上 剛、杉山 将、鄭 英和、宇田川 智野、市東 正幸、坂本 敦司、土田 修一、近江俊徳. 19 種のイヌ STR 座位における種特異性の検討と法科学分野応用への一考察. 日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会. 平成 22 年 11 月. 三島.

⑨市東正幸、河上 剛、杉山 将、鄭 英和、宇田川 智野、坂本 敦司、土田 修一、名切 幸枝、羽山伸一、近江俊徳. ニホンザル集団の父系解析に向けた Y-STR 多型マーカー探索. 日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会. 平成 22 年 11 月. 三島.

⑩近江俊徳、市東正幸、河上 剛、宇田川智野、鄭 英和、杉山 将、奥田 浩、名切幸枝、羽山伸一、土田修一. 福島市に生息するニホンザルの DNA 多型解析とその意義. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 平成 22 年 9 月. 帯広.

⑪鄭 英和、杉山 将、土田修一、青木博史、福所秋雄、近江俊徳. イヌにおけるヒト ABO-like cDNA の部分的クローニングとその特徴. 第 149 回日本獣医学会学術集会. 平成 22 年 3 月. 武蔵野.

⑫杉山 将、鄭 英和、市東正幸、河上 剛、

宇田川智野、盆子原誠、近江俊徳. ゴールデン・レトリバーにおける mtDNA HV1 領域の多型性解析. 第 40 回比較臨床医学会学術集会. 平成 21 年 9 月. 東松山.

⑬近江俊徳、市東正幸、石見香織、内田裕子、鄭 英和、杉山 将、河上 剛、宇田川智野、名切幸枝、羽山伸一. 福島県ニホンザルの mtDNA 多型解析. 日本 DNA 多型学会第 18 回学術集会. 平成 20 年 11 月. 久留米.

特徴. 第 149 回日本獣医学会学術集会. 平成 22 年 3 月. 武蔵野.

[図書] (計 5 件)

①日本 DNA 多型学会編(分担部分: 日本ザル集団の父系解析に向けた Y-STR 多型マーカー探索. 東洋書店. DNA 多型. Vol. 19. 2011 年. pp25-27.

②日本 DNA 多型学会編(分担部分: 18 種のイヌ STR 座位と Amelogenin 座位における種特異性の検討と法科学分野応用の一考察報). 東洋書店. DNA 多型. Vol. 19. 2011 年. pp54-55.

③日本 DNA 多型学会編(分担部分: 我が国で飼育されているイヌの mtDNA HV1 ハプロタイプの検出 (第 1 報)). 東洋書店. DNA 多型. Vol. 19. 2011 年. pp56-58.

④日本 DNA 多型学会編(分担部分: 福島県に生息するニホンザルの mtDNA ハプロタイプ解析). 東洋書店. DNA 多型. Vol. 18. 2009 年. pp50-52.

⑤日本 DNA 多型学会編(分担部分: イヌにおけるヒト ABO 類似遺伝子の多型性解析). 東洋書店. DNA 多型. Vol. 17. 2009 年. pp44-46.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近江 俊徳 (TOSHINORI OMI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号: 40296091

(2) 研究分担者

土田 修一 (TSUCHIDA SHUICHI)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号: 20217326