

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590849

研究課題名(和文) JapanesePlex: 日本人特異的SNPによる日本人証明法の開発と応用

研究課題名(英文) JapanesePlex: a method for identification of being Japanese using Japanese-specific SNPs

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：日本人特異的SNPを検索するために、鳥取と沖縄の日本人、韓国人、モンゴル人、漢民族2集団、チベット人、ドイツ人、アフリカ人875名のDNAを用いて調べた。67例の(ほぼ)日本人特異的SNPをみつけ、このうち、57例は沖縄で高い頻度を示し、43例は韓国人でも低頻度ながらも検出された。北海道の縄文遺骨から得られたDNAを用いて、3種のSNPについて調べたところ、いずれも沖縄より高い頻度を示し、沖縄で頻度が高いSNPは縄文由来であることが示唆された。法医学実務のために、頻度が高く、連鎖不平衡を認めない150種のSNPを利用したマルチプレックス判定法JapanesePlex法を確立した。

研究成果の概要(英文)：To find out Japanese-specific SNPs, a total of 875 DNA samples from Japanese in Tohoku and Okinawa, Koreans, Mongolians, Hans, Tibetans, Germans and Africans were investigated. Sixty-seven (nearly) Japanese-specific SNPs were observed. Of them, 57 showed the highest frequencies in Okinawa, and 43 were also observed in Koreans at lower frequencies. DNA samples from Jomon remains in Hokkaido were investigated for three SNPs at the GALNT11, H19 and PLA2G12A genes, and showed higher frequencies in every SNP than those from Okinawa, suggesting that the SNPs observed at the highest frequencies in Okinawa were of Jomon lineage. For forensic practice, 50 SNPs with high frequency and no linkage disequilibrium were selected. A multiplex typing method based on single-based primer extension technology were established. This JapanesePlex method permitted the identification of being Japanese with high probability.

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：日本人 特異遺伝子 個人識別 PCR DNA解析

1. 研究開始当初の背景

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。現時点では、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)の判定は、主に、世界の主要3集団を識別することが目的であるが、さらに、東アジア人のなかで、日本人を識別していくことは、日本の法医学にとって重要な鑑定項目である。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が日本人であることを特定する必要性が痛感されるところである。

2. 研究の目的

本研究の目的は従来の個人識別法になかった新しい個人識別法として、日本人であること、日本人由来であることを推定、証明する方法を確立することである。日本人特異的 SNP とは日本列島に何代にもわたって住み続けた人々の末裔である現代人のなかに見出され、他の地域の人々から見出されないか、あるいはきわめて低頻度の SNP である。今日の SNP に関するデータベースは、日本人特異的な SNP がかなり多数存在していることを示しており、日本人の証明法の開発を手掛けることはまさに時宜を得た研究と言える。われわれはいくつかの日本人特異的 SNP を報告してきた。今回、新しい SNP をデータベース上で検索し、非蛍光 APLP 法による予備実験で最適なマーカーを 50 個程度選択し、SNP のタイピング技術を応用して、多重増幅に基づいた JapanesePlex PCR 法を開発する。

3. 研究の方法

日本人特異的と考えられる GALNT11、H19、PLA2G12A 遺伝子の中の 3 種の SNP について、日本人特異的であるかどうかを世界の 26 集団について、同時三重増幅法の増幅産物断片長多型 (APLP) 法を

用いて検討した。この 3 種の SNP について、北海道の縄文遺跡(船泊遺跡等)から発掘された 54 例の遺骨から抽出した DNA についても調べた。データベースで日本人特異的であることが示唆される SNP について、沖縄と鳥取の日本人、ソウルの韓国人、ウランバートルのモンゴル人、無錫と長沙の漢民族、ネパールのチベット族、ミュンヘンのドイツ人、ナイジェリアとガーナのアフリカ人から得た DNA874 例を用いて、日本人特異的遺伝子かどうかを調べた。さらに、実務応用にむけて、日本人特異的 SNP を用いて、一塩基プライマー伸長法に基づいている SNaPshot を用いた多重増幅法を検討した。

4. 研究成果

GALNT11、H19、PLA2G12A の 3 種の SNP について、東アジアの 22 集団を含む計 26 集団 2,505 人を調べたところ、GALNT11 と PLA2G12A は日本人と韓国人のみに検出されたが、H19 は中国東北部のオロチョン族においても低頻度で観察された。3 種とも沖縄で観察された頻度がもっとも高く(0.26-0.13)、韓国人は最も低く(0.03-0.004)、本州の 3 集団では両者の中間の値を示した。このように、沖縄、本州、韓国の 3 集団間で、頻度に著しい差が認められ、GALNT11 と PLA2G12 は韓国でも認められたので、ほぼ日本人特異的であった。

(ほぼ)日本人特異的 SNP の存在が示めされたので、ゲノム中の SNP を 874 例の DNA を用いて調べた。その結果、67 例の(ほぼ)日本人特異的 SNP が検出された。これらは日本人、韓国人以外では検出されなかった。この SNP のうち、57 種では沖縄での頻度が高く、残りは鳥取で高い頻度が観察された。日本人にのみ検出された SNP は 24 種で、日本人特異的であった。残りは韓国人でも低頻度で観察されたのでほぼ日本人特異的であった。これらの中で最も高い頻度を示したのは STOML2 遺伝子内の SNP であった。67 種 SNP の平均頻度は、沖縄で 0.119、鳥取で 0.063、韓国で 0.008 であった。

北海道の縄文遺跡から出土した遺骨から抽出した DNA は、一部のみが再現性よくタイピングされた。遺伝子頻度は 3 種とも沖縄の頻度より高く、とくに、H19 と PLA2G12A では、0.8-0.9 の高い頻度を示し、縄文人において高い遺伝子であることがわかった。したがって、沖縄で高く検出された SNP は縄文由来と考えられた。鳥取で観察されたものは、朝鮮半島や本州で発生した弥生系の SNP である可能性が示唆された。縄文系の SNP を個人が持っている割合は個人差がかなりあり、個人の縄文度が推定できた。

これらの結果を法医学実務に応用するために、頻度が高く、連鎖平衡を示さない独立した SNP を選択して、およそ 10 種の SNP からなる primer セットを 5 組つくり、一塩基プライマー伸長法に基づく市販の SNaPshot キットを用いた多重増幅法を考案、確立した。この方法により約 80%の日本人が日本人として判定できることがわかり、実務に寄与できると考えられた。

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 13 件)すべて査読あり。

- 1) Koder H, Ando N, Yuasa I, Wada Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitoh S, Matsumoto N, Saito H.: Mutations in *COG2* Encoding a Subunit of the Conserved Oligomeric Golgi Complex Cause a Congenital Disorder of Glycosylation. *Clinical Genetics* (印刷中).
- 2) Koder H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saito H.: *De novo* mutations in *SLC35A2* encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Human Mutation* 34(12) 1708-1714, 2013.
- 3) Lucotte G, Yuasa I: Near fixation of 3741 allele frequencies of the skin pigmentation gene *SLC45A2* in Africa. *Biochemical Genetics* 51(9/10) 655-665, 2013.
- 4) Yuasa I, Jin F, Harihara S, Matsusue A, Fujihara J, Takeshita H, Akane A, Umetsu K, Saito N, Chattopadhyay PK.: A hypervariable STR polymorphism in the *CFI* gene: Southern origin of East-Asian-specific group H alleles. *Legal Medicine* 15(5) 239-243, 2013.
- 5) Yuasa I: A commentary on assignment of Y-chromosomal SNPs found in Japanese population to Y-chromosomal haplogroup tree. *Journal of Human Genetics* 58(4) 181, 2013.
- 6) Yuasa I, Nakayashiki N, Umetsu K, Nishimukai H, Matsusue A, Dewa K: A hypervariable STR polymorphism in the *CFI* gene: mutation rate and no linkage disequilibrium with *FGA*. *Legal Medicine* 15(3) 161-163, 2013.
- 7) Fujihara J, Takeshita H, Kimura-Kataoka K, Yuasa I, Iida R, Ueki M, Nagao M, Kominato Y, Yasuda T.: Replication study of the association of SNPs in the *LHX3-QSOX2* and *IGF1* loci with adult height in the Japanese population; wide-ranging comparison of each SNP genotype distribution. *Legal Medicine* 14(4) 205-208, 2012.
- 8) Takeshita H, Fujihara J, Ueki M, Iida R, Koda Y, Soejima M, Yuasa I, Kato H, Nakajima T, Kominato Y, Yasuda T.: Non-synonymous single-nucleotide polymorphisms of the human apoptosis-related endonuclease - DNA fragmentation factor beta polypeptide, endonuclease G, and flap endonuclease-1 - genes show a low degree of genetic heterogeneity. *DNA and Cell Biology* 31(1) 36-42, 2012.
- 9) Fukao T, Maruyama S, Ohura T, Hasegawa Y, Toyoshima M, Haapalainen AM, Kuwada N, Imamura M, Yuasa I, Wierenga RK, Yamaguchi S, Kondo N: Three Japanese patients with beta-ketothiolase deficiency who share a mutation, c.431A>C (H144P) in *ACAT1*: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. *JIMD Reports* 3: 107-115, 2012.
- 10) Nakayashiki N, Fujita M, Dewa K, Ding M, Wei W, Wang X, Yamamoto T, Yuasa I: The distribution of H19HP haplotypes in Asian populations. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3(1) e341-e342, 2011.
- 11) 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. *J Inher Metab Dis* 34(4) 901-906, 2011.
- 12) Takeshita H, Fujihara J, Soejima M, Koda Y, Kimura-Kataoka K, Ono R, Muro T, Tongu M, Yuasa I, Iida R, Ueki M, Yasuda T: Confirmation that SNPs in the high mobility group-A2 gene (*HMG2*) are associated with adult height in the Japanese population; wide-ranging population survey of height-related SNPs in *HMG2*. *Electrophoresis* 32(14) 1844-1851, 2011.
- 13) Ueki M, Fujihara J, Takeshita H, Kimura-Kataoka K, Iida R, Yuasa I, Kato H, Yasuda T: 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 32(12) 1465-1472, 2011.

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 松末 綾、湯浅 勲、梅津和夫、柏木正之、原 健二、Brian Waters、高山みお、高本睦夫、久保真一：日本人集団並びにドイツ人における *SCN5A* 遺伝子 R1193Q 変異の頻度調査．第 63 回日本法医学会学術九州地方集会 2013 年 10 月 18-19 日(福岡)。
- 2) 湯浅 勲、松末 綾、赤根 敦、藤原純子、竹下治男、梅津和夫：日本人およびほぼ日本人特異的 SNP について．第 97 次日本法医学会学術全国集会 2013 年 6 月 26-28 日(札幌)。
- 3) 湯浅 勲、梅津和夫：常染色体にみられる日本人特異的遺伝子の分布．第 66 回日本人類学会大会 2012 年 11 月 2-4 日(日吉)。
- 4) 湯浅 勲、入澤淑人、松末 綾、竹下治男、針原伸二、梅津和夫：PLA2G12A にみられるほぼ日本人特異的(極東)特異的 SNP について．第 96 次日本法医学会学術全国集会 2012 年 6 月 7-9 日(浜松)。
- 5) 湯浅 勲、遠藤実、入澤淑人、針原伸二、西向弘明、松末 綾、藤原純子、竹下治男、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 (3) 東アジアにおける分布．95 次日本法医学会学術全国集会 2011 年 6 月 15-17 日(福島)

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) 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

(3) 連携研究者

赤根 敦 (AKANE Atsushi)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：70202520