

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792365

研究課題名(和文) X染色体多型の利点を応用した法歯学的個人識別における弱点の克服

研究課題名(英文) Improvement in DNA identification using STR on an X chromosome.

研究代表者

中村 安孝 (Nakamura, Yasutaka)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40598851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体上にあるSTRから18座位を選択して、一度のPCR操作で増幅し、検査を可能とするMultiplex PCR systemを作成し、日本人男性378人、女性175人より人口データを取得した結果、X染色体を1つしか持たない男性の個人識別においても0.9999999992のpower of discriminationが得られ、女性の場合は0.999999999999997のpower of discriminationがある結果となり、十分な個人識別精度を持っていた。これらはミトコンドリアやY染色体が使用不可能であり、常染色体が不得手とする世代を隔てた同胞鑑定においても有効であった。

研究成果の概要(英文)：An X-chromosomal multiplex amplifying 18 STRs in one single PCR reaction was developed and optimized in this study. The multiplex system included the DXS7424, GATA172D05, HPRTB, DXS8377, GATA31E08, DXS6810, DXS7423, DXS981, DXS6795, DXS6803, DXS6789, DXS6800, DXS6809, DXS7133, DXS7132, DXS9902, DXS101 and DXS6807 loci, which are distributed over the whole X-chromosome. It was designed as a potential first option in determining recombination within the whole X chromosome in kinship testing. Allele frequencies were obtained from samples from 378 male and 175 female Japanese individuals, all unrelated. The combined power of discrimination of the 18 loci was 0.999999999999997 in females and 0.9999999992 in males. A case is presented in which this system allowed considerable efficacy in reaching a solution. The present multiplex system amplified the largest number of loci among the X-STR multiplex systems tested, indicating its potential in personal identification and determining kinship.

研究分野：法歯学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：DNA鑑定

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、DNA 鑑定の主流は常染色体上にあるマイクロサテライト多型(short tandem repeat 以後 STR と表記する)を検査する事であった。STR は 2 から 4 塩基の同一配列が繰り返されるもので、その繰り返しの数を検査して個人識別に応用が可能である。その検査対象となる STR の数を拡大させる事で、個人を識別する精度を高め、16 座位の STR を検査する事により常染色体鑑定は個人識別や親子鑑定等で、そのみで十分に活用できるようになっていた。

しかし、それより血縁が遠くなる兄弟、姉妹といった同胞鑑定や、祖父母と孫、従兄弟同士といった第二度以上の血縁関係においては十分な鑑定精度を得られなくなる場合も少なくなかった。それらを補うために、母からのみに伝わり、女性の系統を示すミトコンドリア DNA と、男性のみが備え、男性の系統を示す Y 染色体が併用されるようになった。だが、この 3 種類の DNA を用いても、父親と娘の間での同胞鑑定には対応できず、更に血縁の離れた同胞鑑定での識別での精度が求められた結果、X 染色体上の STR の DNA 鑑定活用の必要性が増してきていた。

### 2. 研究の目的

X 染色体は性別に関わらず備わる為、いかなる組み合わせの同胞鑑定においても使用可能で、その遺伝様式からミトコンドリアと Y 染色体で補佐できない場合にも対応してである。また、22 対の染色体から 16 箇所を検査する常染色体 STR 鑑定( AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit, applied biosystems が広く使われている )では、16 箇所の内、繰り返し数の一致した座位数の多さが重要となるが、X 染色体上の STR は同一染色体上にある事から、複数箇所を調べ、物理的距離の近い座位同士を、組み換えによって容易に切り離されず、一塊となって遺伝する可能性が高いハプロタイプとして考えることにより、血縁の離れた者同士での DNA 鑑定において、その有用性が高まるのではないかと考えられた。

そこで X 染色体上の複数の STR を検査可能とする Multiplex PCR system を作成し、日本人の多型出現頻度を求めて、X 染色体 STR 鑑定が実用に耐えうる個人識別精度を持ち、同胞鑑定に応用して、常染色体、ミトコンドリア、Y 染色体を用いた DNA 鑑定を更に補佐可能な事を実証し、DNA 鑑定の更なる精度向上を実現する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

既報の論文において発表されている X-STR を調査し、比較検討が可能、他民族や他地域での人口データ、個人識別に応用可能と思われる多型頻度を備えたものを複数選択して検査対象とした。それら全てを、法医学の現状でも多い、死後長期に渡り放置された白

骨等から得られる、劣化した状態の悪い DNA への使用を考慮し、増幅しやすいように、80bp から 300bp を目安とした比較的小さな PCR 産物サイズ内で増幅し、4 種類の蛍光でラベルしたプライマーを設定する事で重複しないように配置した。作成した Multiplex PCR system を使用して、日本人 553 人を対象とした DNA 多型検査を行い、その識別力を求めた。

### 4. 研究成果

Primer 設定位置の変更、PCR 条件の変更、検査座位の変更等を重ね、最終的に X 染色体上の 18 の STR、DXS7424, GATA172D05, HPRTB, DXS8377, GATA31E08, DXS6810, DXS7423, DXS981, DXS6795, DXS6803, DXS6789, DXS6800, DXS6809, DXS7133, DXS7132, DXS9902, DXS101 ( 図 1 ) を選択し、増幅範囲は 80-300bp に収め、PCR 条件は、第 1 段階 95 11 分を行った後、第 2 段階で 95 で 50 秒、58 で 105 秒のサイクルを DNA の状態に合わせて 27 から 34 回を行い、第 3 段階は 60 60 分で反応を完了する、18 座位を一括増幅して検査を可能とする Multiplex-PCR system を独自に作成した。

			Locus	Physical localization (Mbp)
			DXS6807	4,735
Xp22.31	10Mbp		DXS9902	15,234
	20Mbp		DXS6795	23,254
	30Mbp			
	40Mbp		DXS6810	42,804
	50Mbp			
Xp11.21	60Mbp		DXS7132	65,002
Xq12			DXS981	68,414
Xq13.1	70Mbp			
	80Mbp		DXS6800	78,567
			DXS6803	86,670
	90Mbp		DXS6809	94,825
Xq21.33	100Mbp		DXS6789	95,336
			DXS7424	100,505
	110Mbp		DXS101	101,299
			DXS7133	108,928
	120Mbp		GATA172D05	113,061
Xq26.3	130Mbp		HPRTB	134,002
	140Mbp		GATA31E08	140,062
Xq28			DXS8377	149,371
	150Mbp		DXS 7423	149,461

図 1 検査対象とした 18 の STR

これを用いて日本人 (男性 378 女性 175) を検査し、日本人の多型頻度情報を取得した。その結果、個人識別において、X 染色体を 1 つしか持たない男性の個人識別においても 0.999999992 の power of discrimination が

得られ、女性の場合は0.99999999999997のpower of discriminationがある結果となり、その鑑定精度の高さを立証した。

検査対象が同一の染色体上にあることから、物理的距離の近いものを組み換えが起こっても一塊となって遺伝するハプロタイプと見なし、これら2座位1組、3座位1組のハプロタイプだけでの一致でも、最高で0.97ものpower of discriminationが得られる結果となった。このハプロタイプとしての活用は、常染色体の弱点である世代を隔てた鑑定での運用を強く補助するものであった。

集団遺伝学的研究として、既報のヨーロッパ集団、韓国人集団、中国人集団と比較した結果、韓国人集団とは18座位すべてで強い類似性を示し、有意差は殆ど認められない結果を得た。中国人集団も多数のSTRで同様の結果を得たが、いくつか有意に分布が異なる座位を発見し、韓国人集団の方がより日本人集団と近かった。ヨーロッパ集団との比較では、alleleの頻度分布が大きく異なる座位が多数発見され、強い類似を示すSTRもいくつか存在したが、東アジア人集団とヨーロッパ人集団間での大きな相違を示した結果となった。

現在、当講座は、研究期間中に発売されたArgus X-12 kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)、や、Argus kitを拡張する目的で作成した、12座位一括検査法も作成し、三種類のX-STR検査によって、重複を除き、34座位のX-STR多型の日本人人口データを取得した他、約200人のマレーシア人集団の人口データを取得し、国内でも有数のXSTRの多型情報を所持している。

今後はこれらXSTRの多型情報を元に、SNPを用いたX染色体鑑定そのものの識別力向上や、新たなアジア人集団の調査を視野に入れて研究を続けていきたい。

#### 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 3 件)

1. Multiplex PCR for 18 X-chromosomal STRs in Japanese population.

Yasutaka Nakamura, Michinaga Samejima, Kiyoshi Minaguchi.

Leg Med, 査読有, 15(3):164-170, (2013).

2. Deletion polymorphism at chromosome 3q26.1 and oral squamous cell carcinoma.

Kawachi H, Sugahara K, Nakamura Y, Katakura A, Minaguchi K, Shibahara T.

Int J Oncol, 査読有, 42(2):384-90, (2013).

3. Genetic study of 12 X-STRs in Malay population living in and around Kuala Lumpur using Investigator Argus X-12 kit.

Michinaga M Samejima, Yasutaka Y Nakamura, Kiyoshi K Minaguchi.

Int J Legal Med, 査読有, 126(4):677-83, (2012).

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 中村安孝, 鮫島道長, 水口清: クアラルンプール周辺のマレー人における18 X-STRの多型出現頻度. 第97次日本法医学会学術全国集会. 2013 6/28 :札幌.

2. 鮫島道長, 中村安孝, 水口清: クアラルンプール及びその周辺のマレー人集団における12座位のX-STRの分析. 第96次日本法医学会学術全国集会. 2012 6/7-6/9 :浜松.

3. 鮫島道長, 中村安孝, 水口清: X染色体上の近接した1つのSTR blockを含むSNP検査と法医学的応用性の検討. 日本DNA多型学会第21回学術集会. 2012 11/7-11/9 :京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 安孝 (NAKAMURA, Yasutaka)

東京歯科大学・法歯学座・助教

研究者番号：40598851

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：