

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670342

研究課題名(和文) 日本近縁ヒト集団間で異なる新規分散型繰り返し領域の探索とその集団の推定法の確立

研究課題名(英文) Detection of novel interspersed repeat regions to differentiate among human populations in/near Japan and development of a method to estimate the populations

研究代表者

山本 敏充 (Yamamoto, Toshimichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50260592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝的に非常に近縁なヒト集団間の異質性を突然変異率の非常に高い分散型反復配列であるAlu配列の中で、より新規なファミリーであると考えられているAlu Yファミリーに着目し、日本近縁ヒト集団で異なる配列を、新規に見出すための第一段階であるトランスポゾンディスプレイ法を確立することができた。また、縦列反復配列であるSTRsでも100以上の座位を用いれば、日本人と朝鮮族との間でも、区別できる可能性があることがカテゴリー分析により示され、これらのデータから統計学的判別法を検討したところ、その判別分析によるベイズ因子から、約92%の日本人が、朝鮮族から容易に区別できることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, younger Alu Y family was focused on among some kind of interspersed Alu elements which have very high mutation rates to differentiate between genetically very close populations such as Japanese and Koreans. A transposon display method as the first step to detect novel interspersed repeat regions to differentiate among human populations in/near Japan and development was completed. Alternatively, using more than 100 loci for short tandem repeats (STRs), a kind of tandem repeats, 2D dots for individuals by a factorial correspondence analysis revealed that Japanese and Korean populations could be categorized into two groups. When we calculated Bayes factors for these individuals based on Dirichlet multi-nominal distribution. Summary of those factors for two populations, showed about 92% of Japanese were strongly suggested as Japanese. More number of data for each population could be necessary to differentiate between both populations more accurately.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 人類学 遺伝的異質性 反復配列 分散型 Alu配列 縦列型 STR

### 1. 研究開始当初の背景

法医学遺伝学分野では、個人識別や血縁関係を調べる解析方法は、ほぼ確立されているが、これらは全て対照資料がある場合の比較解析である。その一方で、ヒトの表現型などをゲノム情報から検出し、個人の遺伝的形質の一部の情報を得るような (FDP: Forensic DNA Phenotyping) 試みが、ヨーロッパを中心としてなされ、マルチプレックスシステムにより虹彩・皮膚・毛髪の色などを特定できるような SNPs の型判定が行われ、ある程度の成果を得てきている。また、最近では身長や顔貌の形質の一部に関連する遺伝子も特定されてきている。しかし、このような FDP は、特に歴史的にアフリカ系の人種差別問題が根強いアメリカ社会では倫理的問題も提起されている。ただ、そのようなアメリカでも、200 程度の SNPs を型判定して、アフリカ系・ヨーロッパ系・東アジア系・アメリカ先住民系の混合比、いわゆる生物地理学的祖先を調べるようなビジネスがある。

一方、東アジアでは、日本の近縁諸国の韓国や中国の人々とは、形質的にも非常によく似ており、また、ゲノムワイドの SNP 解析によりこれらのヒト集団とを遺伝的に区別することは可能になってきているが、犯罪現場に残るような少量の DNA 試料からはその解析困難である。そこで、本研究では、今までの研究で、少ないマーカーでは困難とされてきた近縁ヒト集団の遺伝的区別 (生物地理学的祖先系の検出) に対し、分布数も多く、より倫理的に問題の少なく、より突然変異率が高いとされるレトロトランスポゾンの一つである SINEs (short interspersed nuclear elements) の多くを占める *Alu* 配列をその目的のために利用して、判別できる方法を確立してはどうかという着想に至った。

### 2. 研究の目的

対照資料がない場合の犯罪現場試料からの個人特定法の一手段として、虹彩、毛髪、皮膚の色など倫理的に問題が生ずるような遺伝的形質を型判定するのではなく、遺伝子をコードしていないため比較的そのような問題が少なく、また、ゲノム上に 100 万か所以上といわれるほど分布数も多く、かつ突然変異率が非常に高いため、非常に近縁なヒト地域集団が区別可能であろう分散型繰り返し配列 (特に *Alu* 配列) に着目し、その相同性配列を利用した検出法により、近縁な生物地理学的祖先、例えば、日本人と日本近縁ヒト集団 (韓国人や中国人) とを区別可能な新規 *Alu* マーカーを利用した個人特定の一手法の開発、将来的には、その手法を利用して犯罪現場に遺留された DNA 試料からの個人特定の一助となる方法の確立を目的として行った。

### 3. 研究の方法

(1) *Alu* Y ファミリーに着目し、銀染色法によるトランスポゾンディスプレイ法を確立し、

その後、ゲル電気泳動 - 銀染色法に続いてゲル切り出しを行い、塩基配列決定をする。

(2) *Alu* Y ファミリーに着目し、キャピラリー電気泳動法によるトランスポゾンディスプレイ法を確立し、その後、次世代シーケンサ MiSeq により、日本人及び韓国人の各 100 名の塩基配列決定をする。

(3) 日本人と韓国人で異なる特異的な塩基配列を選出し、データベース検索から、2 つのヒト集団間で新規の *Alu* 配列を探索する。

(4) 選出された新規 *Alu* 配列について、低分子化した DNA 試料にも対応できるように、各増幅産物が、約 100 bp 以下になるようにプライマー設計を行い、約 10 マーカーを同時判定できるマルチプレックスシステムを構築する。

### 4. 研究成果

(1) 本研究では、申請時に計画していた手法であるトランスポゾンディスプレイ法を確立することが第一の目的である。申請時には、銀染色法によるトランスポゾンディスプレイ法を確立した後、各個人間・ヒト集団間で異なる各バンドを切り出し、塩基配列を決定する方法がよいと考えていた。しかし、それ以降、技術も発展し、また、前年度までの研究により、蛍光ラベルして PCR 増幅を行い、この増幅産物を Genetic Analyzer 310 によりキャピラリー電気泳動を行った方がより効率的に個人間・ヒト集団間の差異を検討することができることがわかった。そこで、*Alu* 配列の中で、より新規なファミリーであると考えられている *Alu* Y ファミリーに着目し、そのファミリーの共通配列領域に存在する制限酵素 *Mse* I 切断部位を切断し、アダプター付加後、アダプター付加サイトを PCR 増幅した。その結果、非常に均等なスミアのゲル電気泳動像が得られたので、最終的に 2 回目の PCR 増幅に蛍光色素 (6-FAM) 標識した *Alu* 特異的プライマー (GACGGAGTCTCGTCTG) を用いて増幅した。その PCR 産物を、キャピラリー電気泳動を行ったところ、様々な大きさのフラグメントを得ることができた。そこで、日本人数名の DNA 試料に、この方法を応用したところ、共通のフラグメントばかりでなく、個人間で異なる大きさのフラグメントを得ることができた (図 1) ので、ヒト *Alu* Y に関するトランスポゾンディスプレイ法を確立することができた。挑戦的萌芽研究である本研究の目的とする、この新しい手法を途中段階までであるが、基盤研究 (一般) へと応用・発展させる基盤となる結果が得られた。基盤研究へと応用する際には、各個人の異なる塩基配列 (15 bp 程度) を二次プライマーにラベルして、トランスポゾンディスプレイ法を行い、新しい技術である次世代シーケンサ (MiSeq) を利用すれば、数百名の各個人

ゲノム内に分布する個別の全ての *Alu* Yファミリーの塩基配列決定が可能となるので、一度に新規 *Alu* Yファミリーが見つかる可能性はきわめて高い。また、その際に、例えば、日本人男性 200 名、韓国人男性 200 名の DNA 試料を使用し、日本人試料には、日本人特異配列と各個人特異的配列、及び韓国人試料には、韓国人特異配列と各個人特異的配列を二次プライマーにラベルして、トランスポンジディスプレイ法を行い、次世代シーケンサ (MiSeq) により、一度に 400 名の塩基配列決定を行う。そうすれば、日本人と韓国人にそれぞれ特異的な、つまり日本人と韓国人の男性を区別できる新規 *Alu* Yファミリーを、一度に見つけ出すことができる。このように、本研究の最終目標へと発展性が非常に見込まれる方法を本研究で確立できた。

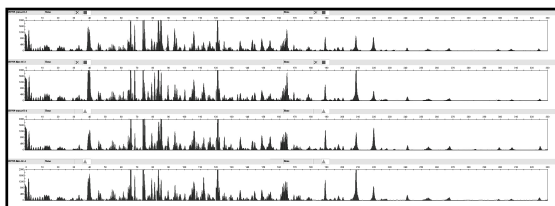


図1 トランスポンジディスプレイ法によるキャピラリー電気泳動像

(2)一方、本研究の当初の目的は、日本人や韓国人など遺伝的に非常に近縁なヒト集団間の異質性を突然変異率の非常に高い分散型の繰り返し配列 (特に *Alu* 配列) に着目して新たな配列を探索することがその一つであった。しかし、研究の途中で、我々が今までに保有している分散型ではないが、縦列反復配列型である常染色体上の STRs (short tandem repeats) においても、100 以上の座位を用いれば、その可能性があることが、因子対応分析 (FCA: factorial correspondence analysis) によるカテゴリー分析 (図2) により示された。

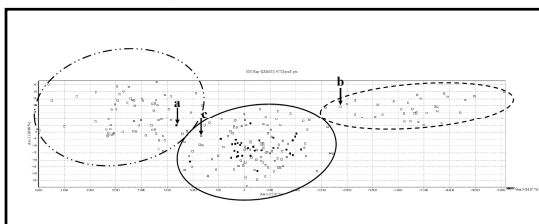


図2 カテゴリー分析結果

日本人 (本土) 128 名のうち、朝鮮族のカテゴリーに 1 名 (a)、日本人 (沖縄) のカテゴリーに 1 名 (b)、朝鮮族 64 名のうち、日本人 (本土) のカテゴリーに 1 名 (c) の計 3 名のみが本来のカテゴリーと異なるカテゴリーに分布した。そこで、これらのデータを元に、統計数理学研究所の間野修平准教授の協力の下、Bayes 的判別分析法による統計学的判別法を検討し、交差確認法として leave-one-out 法を用いたところ、日本人 5 地域 (160 名) と朝鮮族 (64 名) のデータを利用した場合には、日本人 160 名のうち、ベイズ因子 (BF) が 10 以上は 139 名、1 以上 10 未満は 8 名、0.1 以上 1 未満は 11 名、0.1 未満は 2 名であった。他方、朝鮮族 64 名の

うち、BF が 10 以上は 19 名、1 以上 10 未満は 6 名、0.1 以上 1 未満が 18 名、0.1 未満は 21 名であった。通常、BF が 10 以上 (直観的に言えば、分子のモデルは分母のモデルの 10 倍以上尤もらしい) あれば強い証拠とされるので、91.9% の日本人が、朝鮮族から容易に区別できることが判明した。一方、朝鮮族であると考えられる BF が 0.1 未満の日本人検体は、わずか 1.2% であった。他方、BF が 0.1 未満の朝鮮族検体は、28.1% であった。このことから、日本人由来であるというのは容易であるが、朝鮮族由来であるというのは難しいという、全体的な傾向が見られた。このことについて、サンプルサイズを各 50 検体にして検証したところ、サンプルサイズの不均衡が、その原因としてある程度説明できると考えられた。また、ROC 曲線により本判別法の判別性能を評価したところ、ROC 曲線の下部面積は 0.867 であった。さらに、沖縄日本人を含めないでも判別性能はほぼ同じであった。このことは、重要な問題に本判別法を適用する場合は、この程度の判別力では、どのような検体に対しても高精度で判別できる、とは言い難い。しかし、各検体の判別の結果から明らかのように、検体により結果は非常に異なる (幅がある) ので、実際の検体について強い証拠が得られれば、それで十分であると考えられる。

さらに、105 座位のうち、日本人と朝鮮族で  $F_{ST}$  値の大きい座位を 47 座位選んで、FCA 分析を行ったが、105 座位の結果に比べ、カテゴリーから外れる個人が多く観察された。今後、本判別法の精度を高めるために、日本人と朝鮮族の検体を共に増やすことが望ましいと考えられた。その成果を、クラクフで開催された第 26 回国際法医学遺伝学会等で発表し、論文としても掲載された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Toshimichi Yamamoto, Yuuji Hiroshige, Hisae Ogawa, Takashi Yoshimoto, Shuhei Mano, Potential statistical differentiation between Japanese and Korean populations with about 100 STRs, 査読有, Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 査読有, 5 巻, 2015, e348-349

山本敏充, 廣重優二, 小川久恵, 吉本高士, 間野修平, 日本人と近隣ヒト集団における多座位 STRs による遺伝統計学的判別法の検討 (第 1 報), DNA 多型, 査読無, 23 巻, 2015, 128-130

Eiko Yamamoto, Kaoru Niimi, Kanako Shinjo, Toshimichi Yamamoto, Masaharu Fukunaga, Fumitaka Kikkawa, Identification of causative pregnancy of gestational trophoblastic neoplasia diagnosed during pregnancy

by short tandem repeat analysis、  
Gynecologic Oncology Reports、査読有、  
9巻、2014、3-6  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gynor.2014.04.001>

Yasushi Ogawa、Takuya Takeichi、  
Michihiro Kono、Nobuyuki Hamajima、  
Toshimichi Yamamoto、Kazumitsu Sugiura、  
Masashi Akiyama、Revertant Mutation  
Releases Confined Lethal Mutation、  
Opening Pandora's Box: A Novel  
Genetic Pathogenesis、PLOS Genetics、  
査読有、10巻、2014、e1004276  
doi:10.1371/journal.pgen.1004276

Kaho Fujii、Yoriko Yamashita、  
Toshimichi Yamamoto、Koji Takahashi、  
Katsunori Hashimoto、Tomoko Miyata、  
Kumi Kawai、Fumitaka Kikkawa、Shinya  
Toyokuni、Tetsuro Nagasaka、Ovarian  
mucinous tumors arising from mature  
cystic teratomas - a molecular genetic  
approach for understanding the  
cellular origin、Human Pathology、査  
読有、45巻、2014、717-724  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2013.10.031>

山本敏充、廣重優二、小川久恵、吉本高士、  
5地域のモンゴル人におけるYハプ  
ログループ及びY-STRsハプロタイプ解  
析並びに日本人との比較、DNA多型、査  
読無、22巻、2014、105-108

[学会発表](計10件)

山本敏充、廣重優二、小川久恵、吉本高士、  
石井晃、Tuntas Dhanardhono、インドネシ  
アにおける“Midi-6”のアレル頻度分布及  
び他のヒト集団との比較、日本DNA多型学  
会第24回学術集会、2015年11月19-20  
日、岡山大学創立五十周年記念館(岡山  
県・岡山市)

山本敏充、佃康司、間野修平、105座位の  
STRsによる日本人と近隣ヒト集団間の遺  
传的異質性、第69回日本人類学会大会、  
2015年10月10-(12)日、産業技術総合研  
究所臨海副都心センター別館(東京都・江  
東区)

Toshimichi Yamamoto、Akira Shirakawa、  
Tuntas Dhanardhono、Analysis on Y-STRs  
and Y haplogroups in Indonesia、7th  
European Association of Forensic  
Science Conference 2015、September 6 -  
September 11、2015、プラハ、チェコ  
Toshimichi Yamamoto、Yuuji Hiroshige、  
Hisae Ogawa、Takashi Yoshimoto、Shuhei  
Mano、Potential statistical  
differentiation between Japanese and  
Korean populations with about 100 STRs、  
26th International Congress 2015 of the  
International Society of Forensic  
Genetics、August 31 - September 5、2015、

クラクフ、ポーランド

山本敏充、小川久恵、廣重優二、吉本高士、  
草野麻衣子、財津桂、石井晃、日本人に  
おける257座位の4塩基リピートSTRsの  
アレル頻度及び統計学的解析、第99次日本  
法医学会学術全国集会、2015年6月11-12  
日、高知市文化プラザかるぽーと(高知  
県・高知市)

Toshimichi Yamamoto、Further potential  
application of autosomal and  
Y-chromosomal STRs、2015 International  
Symposium of Forensic DNA in Law、2015  
年3月26-27日、ソウル、大韓民国(招待  
講演)

山本敏充、小川久恵、廣重優二、吉本高士、  
間野修平、日本人と近隣ヒト集団における  
多座位STRsによる遺伝統計学的判別法の  
検討(第1報)、日本DNA多型学会第23  
回学術集会、2014年11月27-28日、ウイ  
ンクあいち(愛知県・名古屋市)

Tuntas Dhanardhono、Toshimichi  
Yamamoto、Sigid Kirana、Kunthi Yulianti、  
Rika Susanti、Erwin Kristanto、Akira  
Ishii、Population Genetic Study of Six  
Mini STR 'Midi-6' System in Indonesian  
Population、International Association  
of Forensic Science 2014、2014年10月  
15-17日、ソウル、大韓民国

Toshimichi Yamamoto、Yuuji Hiroshige、  
Hisae Ogawa、Tomoki Senda、Daiki Horiba、  
Masatoshi Sakuma、Yuuka Kawaguchi、  
Yuuichi Kano、Kei Zaitso、Takashi  
Yoshimoto、Akira Ishii、Y-STR haplotype  
network analysis in Mongolian  
populations、9th International  
Symposium on Advances in Legal Medicine、  
2014年6月16-20日、福岡国際会議場(福  
岡県・福岡市)

Toshimichi Yamamoto、Hajime Araki、  
Masatoshi Sakuma、Yuuka Kawaguchi、  
Yuuichi Kano、Tomoki Senda、Daiki Horiba、  
Inaho Danjoh、Yukio Nakamura、Network  
analysis for Y-STRs among ethnic  
minority groups in South America、  
English Speaking Working  
Groups-International Society of  
Forensic Genetics 2014、2014年5月  
28-30)日、アテネ、ギリシャ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 敏充 (YAMAMOTO, Toshimichi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 50260592

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

斎藤 成也 (SAITOU, Naruya)  
国立遺伝学研究所・集団遺伝学系・教授  
研究者番号: 30192587