

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790725

研究課題名(和文)複合的DNA多型分析による個人識別法の確立

研究課題名(英文)Established methods of a human identification from the multiple DNA typing.

研究代表者

高坂 友和 (TAKASAKA, TOMOKAZU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20551469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は複数のDNA型を組み合わせ得られる情報を合わせたDNA型鑑定(個人識別法)を確立することである。本研究ではヨーロッパ、アジア、アフリカの集団から採取された尿資料から抽出されたDNAを用いてmtDNA型、JCV DNA型、男性資料のみY染色体DNAハプログループ(Y-HG)の解析を行った。本研究によりY-HG、mtDNA、JCV DNA型の組み合わせ解析を行うことで出身地域や民族集団の推定が可能であることが示された。本研究の成果は法医遺伝学分野の国際学術集会[DNA IN FORENSICS 2012]の場において報告された。

研究成果の概要(英文)：Both mtDNA and Y chromosomes were used to investigate how modern humans dispersed within and out of Africa. JC virus (JCV) is usually transmitted from parents to children. JCV strains globally can be classified into more than 10 major genotypes, with each genotype occupying a unique geographical domain, suggesting that the evolution of JCV occurred in association with the division of human populations. Research on the origin of humans in the fields of Virology, Anthropology and Forensic Medicine research used only JCV, mtDNA, Y-chromosome analysis respectively from the DNA samples of different humans. Until now no study has analyzed the JCV, mtDNA and Y-chromosome from individual human samples. The aim of this study is to analyze the JCV, mtDNA and Y-chromosome of individual humans from around world and try to provide evidence that may indicate the relative reliabilities and validities of different methods when determining the genetic origin of humans.

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：DNA typing mtDNA Y-chromosome JC virus

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、DNA 鑑定(多型分析)は試薬や機器の技術開発に伴い、高い個人識別能力がある手法が先進国の警察機関を中心に広く用いられている。しかし、DNA 鑑定は個人識別の手法において万能では無いことも理解しなくてはならない。その一例としては、2004年12月26日インド洋大津波による災害である。被災地域の一つであるタイ南部のリゾート地ではクリスマス休暇で滞在していた欧米など世界各地からの観光客と地元住民が津波の犠牲者となった。犠牲者の多くは津波により身元を確認できる所持品等は消失。先進国の救援組織を中心に身元不明遺体のDNA型分析を行ったが、タイ津波犠牲者身元確認センターによるとDNA型分析で身元が判明したのは1112名中、わずか3名であった(Health Concerns Associated with Disaster Victim Identification After a Tsunami - Thailand, December 26, 2004-March 31, 2005 MMWR 54(14):349-352)。その一つの要因としては現地住民の照合するDNA情報が存在しなかった為であった。次に外観から容易に現地住民と区別できるはずであった欧米人観光客の犠牲者の特定は、熱帯地域であった為、遺体の腐敗が進み現地住民との区別ができなくなっていた。さらに現地住民に似ている隣国(ミャンマー、ラオス)からの不法就労者の遺体が混在している状態であり、さらに困難を極めたとされる。そのような状態であった為、歯型と指紋で身元が確認できない遺体1112名についてすべてDNA型分析を行った(Interpol Disaster Victim Identification Guide)。この際のDNA鑑定法は染色体上に存在する複数の領域のとても短い繰り返し塩基配列(マイクロサテライト)の回数による分析であり、欧米のDNA試薬を扱うメーカーにより様々キット化されている。一部のキットは民族や集団をわずかながら区別できるとされているが、欧米人にデータが偏って

いる傾向がある。本来このキットは民族や集団を識別する目的で開発されてはいない。本邦においては、高い個人識別力があるこのキットは2006年から警察庁で採用され全国の科学捜査研究所で使われている(AmpFISTR R Identifiler R Applied Biosystems User's Manual (4):44-58)。

(2) 人類学の領域では以前からミトコンドリアDNA(mtDNA)のD-loop塩基配列の多型による分析方法が使われている。mtDNAハプログループと民族の関係について長年多くの研究者によりデータの蓄積が行われている。近年になってY染色体上のマイクロサテライトや一塩基多型(YSNPs)の分析によりmtDNAの研究と同じようにハプログループと民族の関係が明らかになってきた。mtDNAやYSNPsの分析で欧米人、アジア人、アフリカ人などおおまかに区別できるようになっているが、出身国や地域まで絞り込むことは難しい。

2. 研究の目的

(1) 現在、DNAタイピング(型)を用いた個人識別法は機器の配備により、全国の警察機関で行われている。近年の国際化に伴い、今後様々な人種や集団からDNA型情報を取得する可能性が予想される。しかし、現在の個人識別法では人種や民族の識別には不十分であり、取得した情報が有効に生かされない場合がある。本研究では国内外(約20カ国、約2500人)の尿から抽出されたDNAをミトコンドリアDNA多型、常染色体マイクロサテライト、Y染色体一塩基多型、JCウイルスDNA型を個人ごとに分析する。本研究の目的は、得られた個人のDNA多型情報を複合的に組み合わせて、国際化に対応できる精度の高い個人識別法を確立することである。

(2) 出身国や地域を絞り込む方法として2004年に余郷らによりヒトの尿中に排出されるDNAウイルスのJCウイルスからヒト集団の起源を解明する新しい方法が確立され

た。

Yogo Y, Sugimoto C, Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Kitamura T.(2004) JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Reviews in medical virology*.14:179-91. JC ウイルスはヒト集団と共に進化したと考えられる。親から子に感染する為、JC ウイルスの DNA 型はヒト集団や地域と密接な関係がある事が報告されている。

Suzuki M, Zheng HY, Takasaka T, Sugimoto C, Kitamura T, Beutler E, Yogo Y.(2002) Asian genotypes of JC virus in Japanese-Americans suggest familial transmission. *Journal of virology*. 76:10074-8. これらの知見で得た方法と現在行われている個人識別法を組み合わせた分析する事によって、事前にその集団が存在する地域や出身国を絞り込む事ができる。特にこの方法では、従来の分析(STRによるDNA型分析)のデータを有効に生かすことができる。特に前述したタイ南部の国際的なリゾート地での身元不明死体が発生した状況においては、より精度の高い個人識別を行うことができると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 26カ国の地域から収集した尿(図1)から抽出されたDNAを用いたこれらの資料からJCV DNAをPCRにて増幅し、陽性検体のスクリーニングを行った。本研究で解析に用いた増幅領域はJCV研究でよく利用されている領域 Intergenic region (IG)を用いた(Kunitake et al., 1995)。増幅したPCR産物を精製後 Big Dye Terminator 3.1 (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA)にて反応させた。反応産物を 3130 Genetic Analyzers (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA)を使用して塩基配列の決定を行った。

(2) JCV 陽性検体の試料から宿主側のミト

コンドリア DNA を PCR にて増幅した。増幅するミトコンドリア DNA の領域は遺伝子のコードしない D-Loop 領域を用いた。この領域は比較的に変異が多い領域であり Hiper variable region (HV) と呼ばれている。この領域の中でも HV1 と HV2 領域は法医学の分野でよく利用されている (Sekiguchi et al., 2008)。この領域を PCR で増幅し上記と同じように塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列をバイオインフォマティクス技術により開発されたウェブツール mtDNAMAN: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *BMC Bioinformatics* (2008), 9:483 にて解析を行い mtDNA のハプログループを決定した。

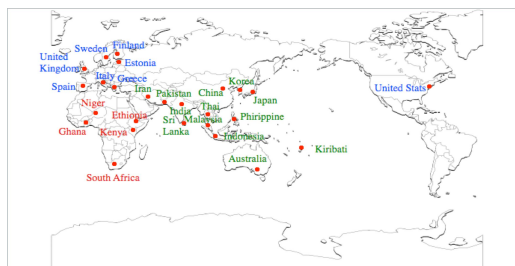


図1 本研究に用いた尿資料は26カ国地域に由来する (19th IAFS 資料から一部抜粋)

(3) 男性 DNA 資料のみ Y 染色体 DNA 型の解析を行った。研究当初は Y-SNP を解析する為、Signet™ Y-SNP Screening Kit (ORIGENE Inc.) という試薬を使用していたが、研究中に発売中止になるという当初は予想しない事態に見舞われた。そこで Y 染色体のマイクロサテライト (Y-STR) を使う方法に変更することになった。Y-STR のアリルデータをウェブ上に入力しハプログループを推定した。 Haplogroup predictor (<http://www.hprg.com/hapest5/>) Haplogroup Prediction from Y-STR Values Using an Allele-Frequency Approach. *Journal of Genetic Genealogy* 1:1-7, 2005

4. 研究成果

(1) DNA 資料から JCV DNA を PCR にて増幅し、陽性検体のスクリーニングを行った。これらの資料は、余郷らによって解析されてきたものであるが、本研究を行う際に、再度陽性資料を確認する必要があったため再度確認を行った。その結果、余郷らの解析どおり 159 資料から JCV 陽性を確認することができた。検出できた地域の株名の略字：国名を以下に示す。IN:インド、UK:イギリス、EST:エストニア、SW:スウェーデン、FL:フィンランド、SP:スペイン、IT:イタリア、GR:ギリシャ、ET:エチオピア、KE:ケニア、NG:ニジェール、GH:ガーナ、SO:南アフリカ、IRN:イラン、PA:パキスタン、SL:スリランカ、TL:タイ、ML:マレーシア、CB:中国、ID:インドネシア、KB:キリバス、MMW:フィリピン、SK:韓国、JP:日本、AT:日本(秋田)、HR:日本(弘前)、HT:日本(八戸) AU:オーストラリア、US:アメリカ。塩基配列を決定後、分子系統解析を行いゲノム型も確認した(図2)。

(2) JCV 陽性検体の試料から宿主側のミトコンドリア DNA のハプログループを分類した。バイオインフォマティクスソフトの mtDNAManager による分類で、以下のように分類された。

Sample ID: Expected HGEST-6: W6, IN-1(1402): M35b, IN-1415: R30a*, IN-1417: D4b1, IN-1419: J1c7, IN-1421: M3, IN-1425: M45a, IN-1426: M25, IN-1427: HV2, IN-1430: M37a, IN-1433: N9b, IN-1434: A11, IN-2(1406): U2a, IN-3(1407): M*-489, IN-4(1408): U4, IN-5(1411): M49, IN-6(1412): D1, IRN-3113: J, IRN-908: H, PA-857: R5a2, SL-1529: D4j3, SL-1535: M2a1, SL-1586: M4b1KB-1: B4b1, KB-10: B4b1, KB-11: M7c1, KB-12: B4a1a, KB-13: B4a1a, KB-2: B4a1a, KB-20: B4b1KB-21: B4b1, KB-22: B4a1a, KB-23: B4b1, KB-25: B4a1a, KB-3: B4a1a, KB-5: B4b1, KB-6: B4a1a, KB-8: B4b1, MMW-18: B4a1a, MMW-36: U5b, MMW-9: U5b, FL-11: U5b1b, FL-13: U4a2, FL-3: H, FL-4: H27, FL-7: HV0, FL-8: U5b1b, GR-1: H21, GR-10: J1c2, GR-15: J, GR-7: U3, IT-1250: H, IT-1

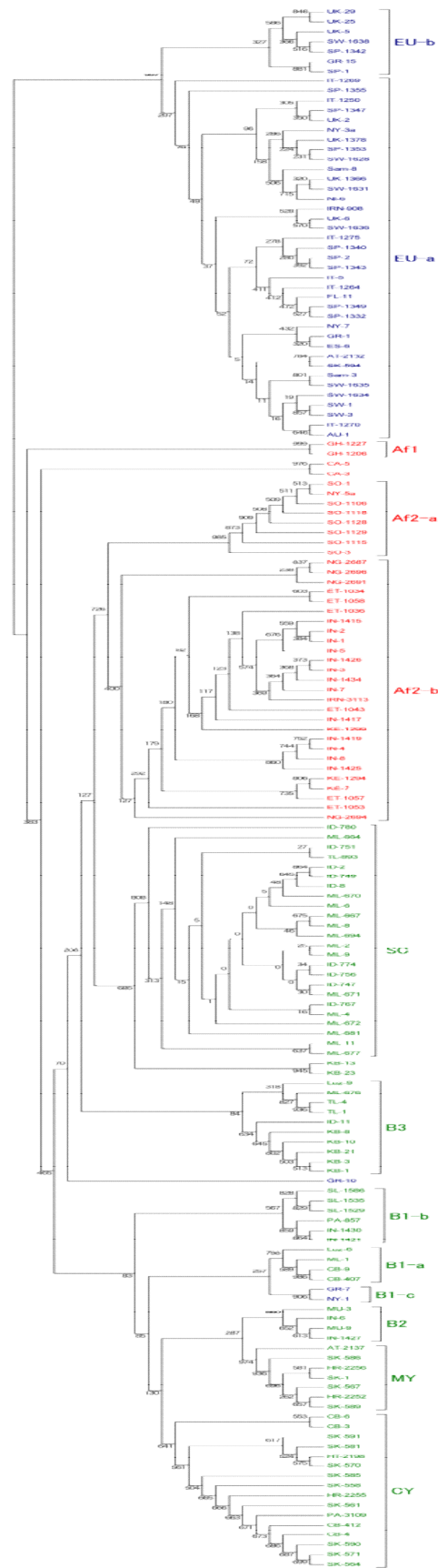


図2 JCV 1G 領域を用いた近隣結合法により作成した分子系統樹(19th IAFS 資料から一部抜粋)

264:U2e, IT-1269, J2a, IT-1270:H, IT-1275:W6, IT-5:U5a1, Sam-12:X2c, Sam-15:U5b1b1, Sam-3:U5b, Sam-8:U5b1b, Sam-9:U5b1b1, SP-1:H12, SP-1332:H, SP-1340, HV1, SP-1342:H, SP-1343:H, SP-1347:T1a, SP-1349:W6, SP-1353:H, SP-1355:H, SP-2:T, SP-20:M34, SW-1:U3a, SW-1628:H, SW-1631:T2b, SW-1634:H13a*, SW-1635:L3f1b, SW-1636:U3, SW-1638:H, SW-3:U4c1, UK-1076:H, UK-1366:T2, UK-1378:H, UK-25:H, UK-29:K, UK-5:H, UK-6:U5b, ET-1034:U9a, ET-1036:L3h1a2, ET-1043:M1a1, ET-1049:L0, ET-1050:U5b1b1, ET-1053:L3x1, ET-1057:L2a, ET-1058:L2a1, ET-1062:R0a1a, GH-1206:L2a1*, GH-1227:L4b2, KE-1287:L3i1, KE-1288:L0, KE-1294:L3e1, KE-1297:L3b, KE-1299:L3f*, KE-1311:L3h1a2*, KE-1312:T2f, KE-7:L3x1, NG-2687:L3b1b, NG-2691:L0, NG-2694:K2a, NG-2696:L3b1a, SO-1:L0d, SO-1106:L3e2b, SO-1115:L0, SO-1118:L0d, SO-1124:L3e1b, SO-1128:L0a1b, SO-1129:D4a4, SO-3:L3e2b, AT-2132:D4a, AT-2137:M7a1, CB-4:A4, CB-407:D4/G, CB-412:D5a2, CB-6:D4b1, CB-9:Z, HR-2252:N9a1, HR-2255:D4a, HR-2256:G2a3, HR-2258:D4/G, HT-2198:G1a1, ID-11:D5d, ID-747:B4a1a, ID-749:D4/G, ID-751:M17c, ID-755:D5d, ID-756:B5, ID-774:M7b1, ML-661:F1a1, ML-664:M*-489, ML-667:F1a1, ML-670:F1a1, ML-671:Y2, ML-672:4/G, ML-676:F1a1, ML-677:F1a1, ML-681:M46*M51, ML-694:F1a4, SK-1:D4b2a, SK-558:M7c1, SK-561:M8a2, SK-564:D4b1, SK-567:D5a3, SK-570:D4h1, SK-571:M7b2, SK-581:D6cF1bde, SK-585:D5, SK-586:B4a, SK-589:M7a1, SK-590:N9a2, SK-591:D5b1a, SK-594:N9a5, TL-893:M25 M34 であった。

(3) Y染色体DNA解析は2種類の方法で行った。Y-SNPからYハプログループの分類を行った。

FL-3:N, FL-8:N, FL-11:N, FL-13:N, Sam-8:N, SW-1628:FGHI, SW-1631:FGHI, SW-1636:R1b, SW-3:FGHI, UK-1076:R1b, UK-1366:E, UK-1378:F

GH I, UK-5:FGHI, UK-6:E, SP-1340:R1b, SP-1342:FGHI, SP-1343:FGHI, SP-1347:J, SP1349:R1b, SP-1350:R1b, SP-1355:E, SP-2:R1b, IT-1269:R1b, IT-1270:R1b, IT-1275:FGHI, GR-1:FGHI, GR-10:J, GR-15:E, GR-7:FGHI, GH-1227:E, S0-1:E, S0-1106:E, S0-1115:E, S0-1118:E, S0-1128:E, S0-3:E, NG-2696:AB, ET-1034:E, ET-1043:E, ET-1049:AB, ET-1050:AB, ET-1058:E, KE-1287:E, KE-1288:E, KE-1294:E, KE-1297:E, KE-1299:E, KE-1311:E, KE-7:E, IRN-3113:L, IRN-908:J, PA-857:FGHI, IN-1:R1b, IN-2:L, IN-4:J, IN-1415:R, IN-1419:R, IN-1421:R, IN-1425:R, IN-1426:R, IN-1427:R, IN-1430:J, IN-1434:R, SL-1529:L, SL-1586:J, TL-893:FGHI, ML-1:N, ML-664:O, ML-667:J, ML-671:FGHI, ML-672:O, ML-676:N, ML-677:O, ML-681:O, ML-694:J, ID-11:N, ID-8:O, ID-756:O, ID-774:E, MMW-18:N, MMW-36:N, CB-4:O, CB-407:O, SK-1:D2, SK-558:D2, SK-561:D2, SK-564:J, SK-567:D2, SK-570:D2, SK-571:C1, SK-581:D2, SK-585:J, SK-586:D2, SK-589:O, SK-590:D2, SK-591:D2, JP-1966:D2, JP-1967:D2, JP-3105:D2, JP-3335:C1, JP-3435:C1, JP-3437C1, JP-3480:D2, HR-2256:D2, HR-2252:D2, HR-2255:O2, HT-2198:C1, AT-2137:D2, NY-1:FGHI, NY-5:E, NY-7:R1b, AU-1:R1b であった。

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)

[学会発表](計 3件)

「A comparison of mtDNA, Y-SNP and JC virus DNA analysis when determining the ethnic origin of humans」Tomokazu Takasaka, Kanji Yoshimoto, Hiroshi Ikegaya 第95次日本法医学会学術全国集会 演題発表

「Implication of human mtDNA, Y-chromosome and JC virus genotype analysis when determining the ethnic origin of humans」Tomokazu Takasaka, Stuart McLean, Daisuke Miyamori, Hiroshi

Ikegaya. 19th World meeting of the international association of forensic sciences Poster exhibition

「Determine of the Y chromosome DNA haplotype and mtDNA haplotype from 50 males in 17 countries」Tomokazu Takasaka. DNA in Forensics 2012 Poster exhibition

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高坂 友和 (TAKASAKA, TOMOKAZU)

京都府立医科大学・助教

研究者番号：20551469