

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2日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20370099

研究課題名（和文）

常染色体STRマーカーを用いた日本国内及びその周辺のヒト集団の同定法の確立

研究課題名（英文）

Establishment of a method for regional human population identification in/around Japan using autosomal STR markers

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

研究成果の概要（和文）：

日本国内の地域集団及び日本周辺諸国の地域集団から採取されたDNA試料について、多数のほぼ均等に常染色上分布する4塩基リピートのSTRs (short tandem repeats) マーカーが型判定された。そのうち、105座位のSTRsが、日本人5地域（秋田・名古屋・大分・沖縄）、中国人（漢民族）5地域（北京・陝西・湖南・福建・広東）、タイ人（バンコク）、ミャンマー人（ヤンゴン）、モンゴル人2地域（オラーゴン・ダランザドガド）、韓国人（ソウル）及び中国人（朝鮮族）（瀋陽）のDNA試料が型判定され、系統遺伝学的、構造遺伝学的、3次元分布などの集団遺伝学的解析が行われた。その結果、日本人と中国人とが統計学的に区別できる可能性が示唆された。そこで、各座位のアレルごとの中国人に対する日本人らしさの割合を算出し、その割合を各個人ごとに積算した分布を正規分布に補正したところ、ある程度日本人と中国人とを確率的に区別できる方法が確立できた。

また、同様に250以上のSTRs座位を型判定できるマルチプレックスシステムを構築した。このシステムを利用することにより、日本人と韓国人、あるいは日本人国内の地域差を調べることができる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

DNA samples collected from regional human population in/around Japan were genotyped for hundreds loci of tetra-nucleotide repeat STR (short tandem repeat) markers almost equally distributed on human autosomes. One hundred and five loci of them were genotyped for DNA samples collected from five regional Japanese (Akita, Nagoya, Oita, Nagasaki and Okinawa), 5 regional Han Chinese (Shaanxi, Hunan, Guangdong, Fujian and Beijing), one Thais (Bangkok), one Burmese (Yangon), two regional Mongolian (Ulaagom and Dalanzadgad), one Korean Chinese (Shenyang) and one Korean (Seoul), total 16 regional Asian populations. Then those genotype data were analyzed with some population genetical methods such as phylogenetic, structural-genetic, and 3D-plotted programs. As a result, it was suggested to distinguish between Japanese and Han-Chinese statistically. Therefore, the ratios of likelihood for Japanese to Chinese at each allele for each STR locus were calculated, and the ratios of each individual were multiplied for all loci, and then the distribution for all of the ratios was corrected to a normal distribution, which has the possibility to establish a system to identify the ethnicity (which Japanese or Chinese) statistically.

Furthermore, we constructed a similar multiplex typing system for more than 250 autosomal tetra-nucleotide repeat STR loci. This multiplex system would made it possible to examine the statistical differentiation between regionally closer populations, such as Japanese and Koreans and/or regional populations in Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：STR、常染色体、東アジア、集団遺伝、同定法、遺伝子プール、遺伝的異質性

1. 研究開始当初の背景

現在では、法医学分野では個人識別や血縁関係を調べるために STR (short tandem repeat)あるいはマイクロサテライトと呼ばれる繰り返し領域の多型が利用されている。特に、常染色体上の座位では、2塩基リピートや3塩基リピートに比べ型判定が容易なため、1リピート単位が4塩基のものが利用されている。一方、集団遺伝学あるいは最近では分子人類学と呼ばれる領域では、常染色体上のマーカーやY染色体上のマーカー、あるいはmtDNAのマーカーを利用して、ヒト集団の遺伝的系統関係や遺伝子プールの構造遺伝学的研究がなされてきている。これらの遺伝的情報を利用して、ヒト集団あるいは個人の帰属祖先集団を調べるような、分子人類学と法医学にオーバーラップするような学際的研究、つまり今まで形態学的な要素が強かった法人類学の範疇に新たに入るような法分子人類学とも呼ばれるべき研究が発展しつつある。世界的に見ると、mtDNAやYハプロタイプを利用して、母系・父系の面からヒト集団や個人の系統関係を調べようとする主流的な研究がある。これらの遺伝関係を調べた結果から、帰属祖先集団を推定することは、もちろん可能な場合もあるが、法医学上やはり、確率論的に立証される必要があるため、そのためには、非常に大きなデータベースを作成する必要がある。一方で、ヒト全ゲノム解析の結果から、分布の濃密を考えず、平均すると1.9 kbに一つ位の割合で、SNPs (一塩基多型: single nucleotide polymorphisms) が存在することがわかり、それらSNPsの情報を利用して帰属祖先集団を検査する民間会社も現れてきている。この会社が開発した方法論としては、300ものSTRsを利用して世界中のヒト集団を調べたところ、大よそヨーロッパ系 (EU)、アフリカ系 (AF)、東アジア系 (EA) 及び先住アメリカ系 (NA) の4集団に分類されるという報告を元に、ゲノムワイドのSNPsの中から、

各集団に特異的アリルを持つSNPsを200マーカーほど選択し、これらのタイピング結果から、それら4集団の要素の割合を調べるといふものである。しかしながら、この方法でも、中国人や日本人といった非常に遺伝的に近縁なヒト集団を区別することが不可能である。実際にこの会社のデータを見ると、ほとんどの中国人と日本人はほぼ100%に近い割合でEAの要素を持っている。

他方、最近、我々は、法医学で汎用されている市販のキットに含まれる15座位のSTRについて、秋田、名古屋、大分及び沖縄における約200名ずつの個人をタイピングし、その遺伝的系統関係について周辺諸国のヒト集団のデータベースを利用して研究してきたが、これら日本人集団が他の集団とは別のクラスターを形成することがわかってきた。さらに、105座位の4塩基リピートのSTRsを用い、中国人やタイ人など日本周辺諸国のヒト集団における系統遺伝学的・構造遺伝学的解析を行い、日本人が周辺のヒト集団と比べると比較的単一であることをHum Genet (2006)で報告した。その後の別の解析を用い、105座位のSTRを用いることにより、日本人が中国人と確率論的に区別できるほどの異質性があることを、第60回日本人類学会 (2006)で発表した。本研究では、このような研究の経緯から、これらの結果を発展させ、多数の常染色体上のSTRsを利用して、日本周辺の大陸アジア人 (特に、すでに可能性のある中国人) との異質性を確率論的に示すことができる方法を確立すべく着想に至った。

さらに、より多くのSTRsを利用すれば、より近縁な遺伝的関係をもつ韓国人、さらには、日本国内における地域差についても発展できる可能性を導き出せるのではないかと、本研究所の背景にあった。

2. 研究の目的

これまで積み重ねてきたデータを利用して、日本人と中国人の確率論的同定方法を

確立する。これまでに、日本における5地域集団（秋田、名古屋、大分、長崎及び沖縄）、並びに中国における漢民族の5地域集団（北京、湖南、陝西、福建及び広東）から収集した各32名における105座位のSTRsを型判定した genotype データに基づいて、確率論的に区別できる計算方法を作成する。その上で、未知の中国人及び日本人の個人をタイピングし、どの程度の精度があるか検討し最終的な方法を確立する。また、これらのデータベースに、他の東・東南アジアのヒト地域集団（韓国、インドネシア、モンゴルなど）の DNA 試料を加えて、帰属集団が推定できる方法も策定する。さらに、日本国内に目を向けて、今までに採取した5地域集団の DNA 試料について、より多くの STR 座位、できれば300座位以上をタイピングして、その地域差を判定可能かどうか模索すると共に、より正確な、より地域に密着した（より土着性の高い）DNA 試料とは何かについて、地域の歴史・家系などを検討しながら採取を試み、それら試料をタイピングし、集団遺伝学的・分子人類学的解析を試みる。最終的に、本研究では、多数の常染色体 STR マーカーを用いて、日本国内及びその周辺ヒト集団の帰属祖先集団を確率論的に同定する方法を確立することを目的として行う。

3. 研究の方法

- 1) 今までに承認を得ている研究計画でも継続可能かもしれないが、ヒト集団間の同定という面で、また、日本人の中で「地域性の高い」DNA 試料を解析することを目的としているため、新たに名古屋大学医学部倫理委員会に申請し、承認を得る。
- 2) 現在、既に収集したモンゴルの5地域集団（ウランバートル、オラーゴン、ダランザドガド、チョイバルサン及びウンドゥルクハーン）、インドネシアの1地域集団（フロレスト島）、並びに中国の1地域集団（瀋陽）について、すでに我々が作成したシステムを使用して105座位のSTRsのタイピングを行う。
- 3) 韓国のDNA 試料については、韓国の研究協力者である誠信女子大学校朴京淑教授を通じて倫理委員会での承認を得た後、試料を直接韓国に赴いて受領する。また、その他の東・東南アジアのDNA 試料についても、国外研究者、あるいは既に国外でDNA 試料を収集した研究者と連携などで、新たに入手を図る。これらについても105座位のSTRsのタイピングを行う。
- 4) 愛知県史や各市町村史などの編纂を担当する県・市町村の教育委員会の文化財担当者などと相談し、愛知県においてどのような家系の人が、愛知県の各市町村などの地域を代表する（地域に密着したあるいは土着性の高い）人であるかを検討する。これは、あくまで今までに検討されたことのない調査である。従って、最終的に日本の都道府県から5～10ほど選んで採取する予定であり、各地域にはそれぞれの歴史があるので、一般化は難しいと考えるが、愛知県においてまずそのモデルとして調査を行い、他の地域への応用を模索する。このために、新たに大学の歴史学者や、各地域の郷土史研究家などと協力する必要性もある。採取が可能になった地域から順に、より土着性の高いと考えられた家系から、試料採取に協力可能な中で最年長の直系者から、インフォームド・コンセントをとり、頬粘膜（可能ならば血液）試料を採取する。各地域で約50家系程度の試料を採取することを目標とする。
- 5) 日本における5地域集団（秋田、名古屋、大分、長崎及び沖縄）、中国における漢民族の6地域集団（北京、湖南、陝西、福建、広東及び瀋陽）、モンゴルの5地域集団（ウランバートル、オラーゴン、ダランザドガド、チョイバルサン及びウンドゥルクハーン）、韓国、タイ、ミャンマー並びにインドネシアの各地域集団から得られた105座位のSTRsの genotype データを利用して、STRUCTURE-Distruct プログラム及び Genetix ソフトウェアなどを用いた構造遺伝学的解析、並びに DA-NJ 遺伝系統樹などによる系統遺伝学的解析などの集団遺伝学的解析を行い、これらの地域集団の遺伝的関係について調べる。
- 6) 日本における5地域集団（秋田、名古屋、大分、長崎及び沖縄）、並びに中国における漢民族の6地域集団（北京、湖南、陝西、福建、広東及び瀋陽）から収集した各32名における105座位のSTRsを型判定した genotype データに基づいて、確率論的に区別できる計算方法を作成する。これらの genotype が未知の日本人及び中国人各16名をタイピングし、日本人と中国人間の確率論的判別法を用いて、これら各16名の帰属祖先集団を確率と共に計算する。このトライアルには、既収集DNA 試料ではなく、新たに、名古屋大学の学生・大学院生などからその出身地方、両親及び可能ならば祖父母の出身地方に関する情報と共に、インフォームド・コンセントをとり、採取する。
- 7) ヒトゲノムデータベースである GDB や NCBI のデータベース、あるいはインビトロジェン社などの連鎖解析用 STR マーカーのセットから、4塩基リピートで、ヒ

トゲノムにほぼ均一に分布する STR を 300 座位程度選択する。これらを型判定するための新たなマルチプレックスシステムを構築する。これを、日本における 5 地域集団 (秋田、名古屋、大分、長崎及び沖縄) をタイピングしながら行う。このシステムを利用して、日本人とより近縁な韓国人、また、日本人の中で新たに採取したより地域を代表する (地域に密着したあるいは土着性の高い) 人の型判定を行う。これら約 300 座位の STRs のタイピング結果を利用して、日本国内の地域集団における構造遺伝学的・系統遺伝学的解析を行う。

- 8) 最終的に、約 300 座位の STRs の genotype データに基づいて、韓国人における日本人と韓国人とを確率論的に区別できる計算方法を作成する。また、日本国内の 5 地域集団の判別法も開発して、同様に採取した genotype 未知の DNA 試料をから、この計算 (判別) 方法の有効性・精度について検討する。

4. 研究成果

- 1) 常染色体上の 105 座位の STR 型について、日本人 (秋田・名古屋・大分・長崎・沖縄)、中国人 (北京・陝西・湖南・福建・広東)、タイ人 (バンコク)、ミャンマー人 (ヤンゴン)、モンゴル人 (オラーゴン・ダランザドガド) の結果に加え、韓国人 (ソウル) 及び朝鮮族が多いといわれる中国人 (瀋陽) の結果を加えて系統遺伝学的解析を行ったところ、図 1 に示すように日本人と他の大陸アジア人の間に位置した。

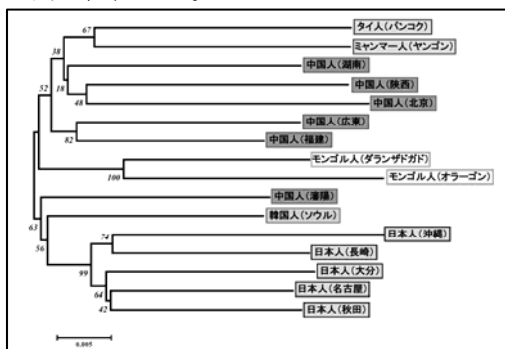


図 1. DA-NJ 遺伝系統樹

また、それらのヒト地域集団を Genetix により、3 次元プロットしたところ、図 2 のように日本人と中国人 (主に漢民族) の地域集団の間に分布した。

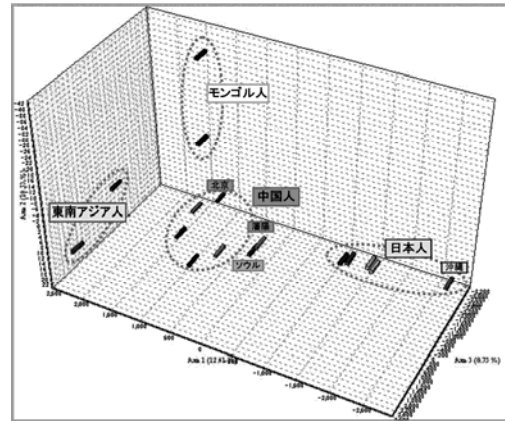


図 2. Genetix による 3 次元プロット

さらに、遺伝構造学的解析においても、これらの集団は、日本人と中国人的な構成要素を保持していた (図 3 参照)。これらの結果については、第 62 回日本人類学会 (2008) 及び第 23 回国際法医学遺伝学会 (ISFG, 2-009) で発表し、現在、論文を作成中である。

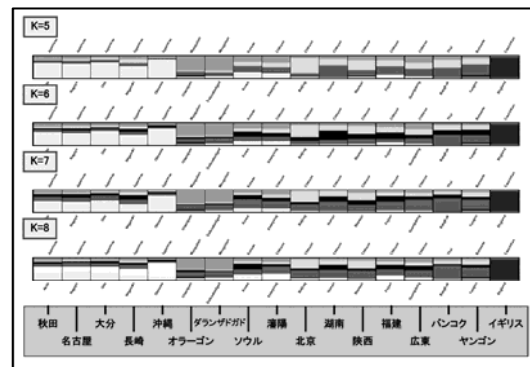


図 3. Structure-Dist による遺伝構造解析

- 2) 日本人 2 地域集団 (名古屋、沖縄)、中国人 5 地域集団 (北京、長沙、湖南、福建、広東) の各 32 名における、105 座位の STRs における各座位のアレル頻度を算出し、各アレルの中国人に対する日本人らしさの比を求め、各個人の 105 座位における積算値をヒストグラムに分布させ、その分布を正規分布に反したところ、図 4 に示すような日本人及び中国人の判別分布曲線が得られた。また、同意の得られた日本人 2 名 (J1 と J2) と中国人 1 名 (C1) の genotype データから換算された尤度比の積算値を、この正規分布曲線に当てはめたところ、日本人は、1.2 と 3.9、中国人は -1.5 となり、その尤度比は、J1 は 5.25 倍、J2 は 4160 倍日本人らしく、中国人は 38.3 倍中国人らしい、と言う結論が得られた。同様に、東南アジア人の 2 地域集団 (タイのバンコク、ミャンマーのヤンゴン)

と日本人についても、さらに分離脳の良い正規分布曲線を得ることができた。

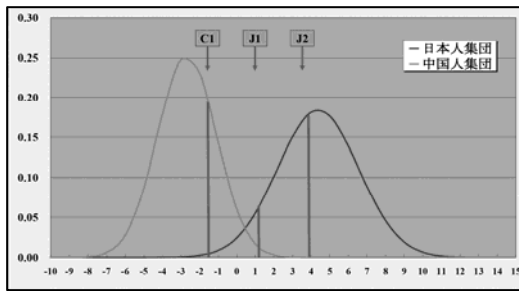


図4. 日本人と中国人の判別分布曲線

さらに、ベイズ的アプローチに基づいたSTRUCTUREプログラムを利用することにより、各国別地域集団間、例えば、日本人と韓国人、日本人と中国人のような区別が確率的に行える可能性が示唆された。

- 3) 一方、DNA サンプル収集に関しては、日本国内の地域差を調査することを目的として、愛知県史の編纂担当者、あるいは、岡崎市の郷土史博物館の学芸員とも相談したが、愛知県においてより地域に密着したあるいは土着性の高い家系を選択することは、行政サイドとしても協力が難しく、かつ歴史的な背景からも非常に困難である可能性が高いことが考えられた。しかし、一方で、仙台市周辺など地域により、歴史的なつながりが比較的明らかなどころでは、ある程度の試料収集が行える可能性が考えられた。日本本土の地域差を調査することを目的としての資料収集も、歴史的にある程度家系の繋がりが比較的明らかなどころでは、ある程度の試料収集が行える可能性が考えられたが、予期せぬ東日本大震災のため、このことを発展するに至らなかった。ただ、日本国内で先住性の高い家系からDNA試料を採取することは、短期間では難しく、中・長期的な計画が必要であることを理解した。
- 4) 4年間継続して行ってきたインビトロジェン社の連鎖解析用STRマーカーのセットのうち、4塩基リピートで、ヒトゲノムにほぼ均一に分布するSTRを約250座位を型判定できるマルチプレックス化については、117回のPCR増幅、60回のローディングにより、計269座位を型判定するシステムを構築した。このシステムを使って、日本人(名古屋)のローディングがほぼ終了し、今後得られたデータの統計学的・集団遺伝学的解析を行う予定である。今回は、4色の蛍光色を2セット利用したシステムを使用して、2つのシステム

をオーバーラップする座位を型判定することにより、型判定の精度も考慮したが、5色の蛍光標識色素を用いれば、87回のPCR増幅、30回のローディングでより効率的な型判定することが可能になる。今後は、この方法に移行しながら、現在までに得られた韓国のDNA試料を型判定したデータを利用して、日本人との判別方法について、検討したいと考えている。そうすることにより、日本人と韓国人のアレル頻度分布の有意差の大きい座位の選択が可能になる。

さらには、そのような選択された座位を利用することにより、日本国内での地域差を効率よく判定することがかのようになるであろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- ① T. Yamamoto, T. Gomyoda, et al (他4名, 1番目). Family selection study among DNA samples collected from Amerindian ethnic group (Wayuu) in northern Colombia. *Forensic Sci. Int. Genet. Supple. Ser.* 3, e234-e235, 2011. 査読有
- ② C. Vullo, A. Borosky, T. Yamamoto, et al (他2名, 5番目). Frequency data for 12 mini STR loci in Argentina. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4: e79-e81, 2010. 査読有
- ③ Q-H. Yuan, A. Tanaka, T. Yamamoto, K. Tamaki et al (他5名, 7番目). Minisatellite MS32 alleles show population specificity among Thai, Chinese, and Japanese. *J. Mol. Evol.* 172: 208-10, 2009. 査読有
- ④ T. Yamamoto, M. Fukami, N. Saitou et al (他4名, 1番目). Usefulness of a hundred of autosomal tetranucleotide STR markers for genetic analysis among geographically close human regional populations in East Asia. *Forensic Sci Int: Genet Suppl Ser* 2. 376-377. 2009. 査読有

[学会発表] (計19件)

- ① Toshimichi Yamamoto. Family selection study among DNA samples collected from an Ameriindian ethnic group (Wayuu) in Northern Colombia. 12th International Congress of Human Genetics and the 61st ASHG Annual Meeting, Oct. 15th, 2011, Vienna, Austria.
- ② Toshimichi Yamamoto. Family selection

study among DNA samples collected from an Ameriindian ethnic group (Wayuu) in Northern Colombia. 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics (ISFG), Sept. 1st, 2011, Vienna, Austria.

- ③ 山本敏充. アレル特異的 PCR による日本及びモンゴル男性の Y ハプログループの比較. 第 64 回日本人類学会大会. 2010 年 10 月 3 日, 伊達.
- ④ 山本敏充. アルゼンチンにおける “Midi-6” STR マルチプレックスシステムと他のヒト集団との比較. 日本 DNA 多型学会第 18 回学術集会, 2009 年 11 月 21 日, 久留米.
- ⑤ 山本敏充. 21 種類の法科学用マイクロサテライト多型マーカーから見た日本人とモンゴル人の遺伝的異質性. 第 63 回日本人類学会大会, 2009 年 10 月 3 日, 東京.
- ⑥ Toshimichi Yamamoto. Usefulness of a hundred of autosomal tetranucleotide STR markers for genetic analysis among geographically close human regional populations in East Asia. 23rd World Congress of the International Society for Forensic Genetics (ISFG), Sept. 18th, 2009, Buenos Aires, Argentina.
- ⑦ 山本敏充. モンゴルの 5 地域ヒト集団及び日本人集団における 17 Y-STRs の比較. 日本 DNA 多型学会第 17 回学術集会, 2008 年 11 月 21 日, 東京.
- ⑧ 山本敏充. 105 ローカスのマイクロサテライト多型による日本及びその周辺諸国のヒト地域集団の遺伝学的解析. 第 62 回日本人類学会大会, 2008 年 11 月 1 日, 名古屋.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

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

齋藤 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

打樋 利英子 (UCHIHI RIEKO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 20223571
(2008～2009 年)

(3) 連携研究者

なし