

平成 21 年 12 月 25 日現在

研究種目：若手（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791646
 研究課題名（和文）
 法歯学的資料からの DNA 多型による個人識別と人種推定のデータベースの作成
 研究課題名（英文）
 Making of data base for personal identification and race identification by DNA polymorphism with the sample of Forensic Odontology
 研究代表者
 丸山 澄 (MARUYAMA SAYAKA)
 東京歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：30366190

研究成果の概要（和文）：

近年国際化している日本の犯罪において、DNA 鑑定は個人識別に留まらず、人種の推定も求められている。実際の鑑定でも行っているミトコンドリア DNA を用いて日本人の頻度を調べさらに日本人における系統樹を確立した。さらにマレー人のミトコンドリア DNA および STR 多型を調べることにより、アジアにおける人種識別にも応用できるようになった。実際の事例では DNA の殆が変性しているため、今回は変性 DNA を用いてより実践に近い状況で行った。

研究成果の概要（英文）：

Recently, the crime of Japan has been internationalized. Therefore, the personal identification and the race identification are requested as for the DNA Profiling. Japanese frequency was examined by using mitochondria DNA, and mtDNA tree was established. In addition, when mitochondria DNA and STR polymorphism of Malay population were examined, it came to be able to apply it also to race identification of Asia. It went by using degraded DNA this study because DNA denatured in an actual case in a situation near practice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：ミトコンドリア DNA、個人識別、人種識別、系統分類、STR 多型、マレーシア

1. 研究開始当初の背景

(1) DNAによる法医学的検査は常染色体のSTR検査、Y染色体多型検査、mtDNA多型検査が主に

行われている。これまで日本人を対象にmtDNAの全control領域と一部のcoding領域の変異について検査、比較を行い (Int J Legal Med 2003) mtDNA多型が個人識別のみならず近縁のアジア集団との識別にも役立つ結果を得たが、さらに検査領域を広め分類と、より詳細な系統樹作製を行う必要が認められた。また、現在マレー人について調査を行っているが、ようやく文献にもマレー人に関する報告が出てくるようになってきた。またアフリカからインドを通り広がって来た集団がマレー周辺から北へ向かった集団と南へ向かった集団に分かれているという報告 (V. Macaulay, SCIENCE 2005) もあり、東南アジアのDNA多型に関する情報がとても重要であることが示唆されている。

(2) マレー人のmtDNAおよびSTR多型検査を行うことで東アジアにおける人種の広がりより詳細に判明し、近年の国際化の影響から検査対象者が日本人か否かについて、さらには人種の識別についても求められてきている状況に対し解決・予防に多いに寄与できるものと確信し、きわめて社会的意義が高いと考えられる。

(3) 常染色体STR多型検査はそれぞれの人種の報告は見られるが、日本を含む東アジア全体で比較した報告は見られない。今回、日本人およびマレー人の検査を行い、東アジアのみならず、ユーラシア、オセアニア、ヨーロッパ地方とも比較することにより、人種による違いが見出されるだろうと考える。

(4) 通常、他の研究者はDNAの純度が高いものを試料としているが、我々の研究室に実際に持ち込まれるDNAは、殆どが高度に変性しているものや微量な資料が対象であった。今回研究対象としたものは歯牙から抽出したDNAであり、これを変性DNAとして用いている。多型検出の増幅効率の検討は、実際に個人識別を行っている他の研究者にも役立つ方法を見出すこととなる。人体の中で最後まで残り、且つDNAが採取できる可能性の高い歯牙からの抽出、検査方法および研究内容は、法医学のみならず人類学など様々な分野に応用が可能となるであろう。

2. 研究の目的

(1) これまで日本人のmtDNA多型を用いた個人識別を主な研究とし、日本人における系統樹などのデータベースはほぼ確立した。さらにこれらが個人識別において重要な役割を果たすだけでなく、人種の推定にも応用可能となる事が判明してきている。そこで、すでにデータベースに登録されている配列を参考に、日本人の系統樹をより詳細な系統樹として確立し、日

本人と近縁な韓国人、台湾人および大陸中国人との識別を進める。

(2) 同時にマレー在住のマレー人の抜去歯および抜去時の止血に用いた脱脂綿(止血血痕資料)から採取したDNAを用い、人種の移動に重要な地域と考えられる東南アジア地方のmtDNAの塩基配列を決定する。さらにマレー人の系統を調べることにより3大人種の識別のみならずユーラシア大陸に広がった集団との比較が行え、日本およびアジア人種間の推定も可能なデータ作りを行う。

(3) 以上の結果をもとに、鑑定資料などの高度に変性したDNAの型判定にも有効なプライマーを設計し、変性したDNAからの型判定も可能にするとともに、限られた量の対象資料から最も有効な増幅領域を選択できるシステムを確立する。

(4) マレー人のDNAを用いて常染色体のSTR検査を行い、変性したDNAからも一度で型判定が出来るよう最適なPCR条件を導き出す。常染色体のSTRは様々な市販Kitが利用されており、実際の鑑定にも用いられているが、高度変性DNA検査では16座位のうち大きなサイズのSTRが判定されない場合もある。しかしながら当研究室において高度に変性した資料に遭遇する場合は多々あり、また常染色体のSTRで判定しなければならないこともある。このような状況において、いかに多量のDNAを採取し、良好な結果が得られるかが重要である。それと同時にマレー人の結果と他のアジア人種と頻度の比較を行い、識別能力の向上および人種の違いを導き出す。

3. 研究の方法

(1) 試料

日本人試料は多検体の歯牙、抜去時の止血血痕資料、血液試料を用いた。マレー人試料はクアラルンプール周辺に在住するマレー人から抜去された歯牙及び抜去時の止血血痕資料から抽出したDNAを用いた。

(2) 方法

① mtDNAの多型・系統検査

DNA抽出-PCR増幅-精製-Sequencing PCR-Primer除去-Sequencing-データ解析
以上の工程を1人の全領域の塩基配列を決定するまで繰り返す。

日本人211人のmtDNAの全領域16,569bpの塩基配列を決定する。すでにデータベースに登録されている配列やKivisildらの論文データを参考に新しいcoding領域の多型を検索し、日本人の系統をさらに細分化、

より詳細な系統樹を作成し個人識別能力を向上させる。また、マレー人122人のmtDNA多型検査および系統を調べる。日本人、マレー人の結果を他人種の報告と比較検討し、アジアに広がる人種の流れを系統から求め、それが人種の推定に応用できる。

② 常染色体STR多型検査

日本人およびマレー人のDNAを資料とし、AmpF/STR Identifier PCR Amplification Kitを用いる。GeneScanによる結果をGenotyperのsoftwareにてタイピングを行いPowerStats Programにて頻度等の計算を行う。

さらに東アジア、ユーラシア、オセアニア、ヨーロッパ地方のデータと比較することにより、人種による頻度の違いを見出す。

- ③ 以上の研究資料に抜去歯牙を用いることにより、これを変性したDNAとして我々が実際に行っている法医学的事例を想定した状態を作り、如何に良好な結果を導き出せるかの対策検討を同時に行う。

4. 研究成果

(1) 日本人の mtDNA 多型解析

半数近くの試料において、全塩基配列を決めることができ、日本人における末端まで分類された系統樹が作製された。このデータを他の日本人データと総合、比較検討することでより膨大な日本人データとして今後、法医学的事例に対し非常に有用なものとなった。また、今回の塩基配列をDDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録することにより、法医学領域のみならず、遺伝学・人類学等の他分野の研究者にも活用されると考えられる。

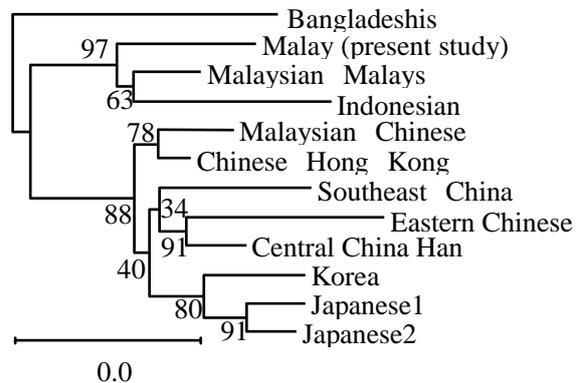
(2) マレー人の mtDNA 多型解析

殆どの試料の全塩基配列が決定された。さらに系統分類し、他のアジア集団との比較を行ったところ、東南アジアの中でもさらにマレーに特徴的な系統や分布が認められ、東南アジアのみならず、日本を含む東アジアや他のアジア地域との地理的かわりや民族の移動の解明にも役立つと考えられる。

(3) マレー人の STR 多型

STRの16座位についてマルチに検査できるKitを用いて行った。変性DNAを想定した歯牙及び血痕から抽出したDNAを用いたのだが、いくつかの試料では大きなサイズの座位がなかなか検出されないこともあったが、反応液やDNA量・反応時間を調整することにより改善された。マレー人の結果から対

立遺伝子頻度を算出し、他のアジア地域との近縁性の推定(Neighbor-joining tree)を行ったところクラスターを形成しそれぞれの特徴が表れていた。



- (4) 今回の日本人・マレー人における mtDNA 多型、マレー人の STR 多型解析の結果はいずれも学会・論文発表することができ、一定の成果は得られたと思われるが、mtDNA に関しては残りの資料の全塩基配列を決定したいと考えている。

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4件)

- ① S Maruyama, C Nohira-Koike, K Minaguchi, P Nambiar: MtDNA control region sequence polymorphisms and phylogenetic analysis of Malay population living in or around Kuala Lumpur in Malaysia. Int J Legal Med, 2009 [Epub ahead of print]
- ② Nohira C, Maruyama S, Minaguchi K: Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA polymorphisms in a Japanese population. Int J Legal Med, 2008 [Epub ahead of print]
- ③ 丸山 澄, 野平千鶴, 佐々木継泰, 石川 昂, 水口 清, Phrabhakaran Nambiar: 全ゲノム配列による比較から見たマレーシア・クアラルンプール周辺に在住するマレー人の mtDNA の系統評価. DNA 多型 16, 303-307, 2008
- ④ S. Maruyama, K. Minaguchi, N. Takezaki, and P. Nambiar: Population data on 15 STR loci using AmpF1STR Identifier kit in a Malay population living in and

around Kuala Lumpur, Malaysia. Legal
Medicine, 10, 160-162, 2008
<http://hdl.handle.net/10130/751>

[学会発表] (計 5 件)

- ① 丸山 澄、水口 清
一般マレー人のミトコンドリア DNA 多型
による系統解析
第 78 回日本法医学会学術関東地方集会
平成 21 年 10 月 31 日 東京:血脇記念ホール
- ② 丸山 澄、花岡洋一、水口 清、P. Nambiar
マレーシア・クアラルンプール周辺に在住
するマレー人のミトコンドリアDNA多型解
析
第51回歯科基礎医学会学術大会・総会
平成21年9月9日-11日 新潟市:朱鷺メッ
セ 新潟コンベンションセンター
- ③ 丸山 澄、水口 清
マレーシア・クアラルンプール周辺に在住
するマレー人のミトコンドリアDNA多型解
析
第287回東京歯科大学学会(例会)
平成21年6月1日 千葉市:東京歯科大学
- ④ 丸山 澄、野平 千鶴、水口 清
mtDNA 全ゲノム情報を利用した追加日本
人資料の系統解析
第 7 7 回日本法医学会関東地方会
平成 20 年 11 月 1 日 東京:東京大学
- ⑤ 丸山 澄、花岡 洋一、水口 清
マレーシア・クアラルンプール周辺に在住
するマレー人における 15 座位の STR 多型
解析と東アジア集団との比較
第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会(創
立 50 周年記念大会)
平成 20 年 9 月 23-25 日 東京:TOC 有明、
東京ファッションタウン、昭和大学上條講
堂

[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

丸山 澄 (MARUYAMA SAYAKA)
東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 30366190

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: