

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18803

研究課題名（和文）新規プライマーセットを用いた高感度性別判定法の開発

研究課題名（英文）Development of a highly sensitive sex determination method using the novel primer set

研究代表者

藤本 佳那（FUJIMOTO, Kana）

山梨大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30866489

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では男女差以外には多型性がほとんどないExon 1領域に着目して、性別判定用プライマーセットを開発し、法医DNA鑑定に用いられているGlobalFiler Amplification Kitと比較検討を行った。結果、性別判定を安定して行う為に必要なDNA量は、プライマーセットおよびGlobalFiler共に25 pgと、感度の面では同等であった。そこで、高度に断片化した古人骨試料を用いて両者を比較したところ、増幅産物の鎖長が短い本研究の方法はGFに比べ優位性が認められた。本法は高度変性試料についても適用可能、かつ手技が簡便で迅速、安価であり、法医科学及び自然人類学に貢献できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身元不詳遺体の性別判定は、個人識別上重要な鑑定事項である。特に、DNA解析による性別判定は、形態人類学的特徴を利用できない試料にも適用でき、有用性が高い。法医DNA鑑定で取り扱う試料は環境要因や微生物の影響を受け容易に分解されるため、高度に変性した微量な試料から正確に判定を行うことが求められている。本法は高度変性試料についても適用可能、かつ手技が簡便で迅速、安価であり、法医科学及び自然人類学に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）： In this study, we focused on the exon 1 region of the amelogenin gene, which has very little polymorphism other than sex differences. We developed a primer set for sex determination and compared it with the GlobalFiler PCR Amplification Kit (GF), which is widely used for forensic DNA typing. The results showed that the amount of DNA required for accurate sex determination was 25 pg for both methods, achieving equivalent sensitivity. Next, we compared the two methods using ancient human skeletons and found that the present method with its shorter amplicon was considerably superior to GF. The present method is simple, rapid, inexpensive, and suitable for analyzing highly degraded samples.

研究分野：Sex determination

キーワード：Amelogenin DNA Exons

## 1. 研究開始当初の背景

身元不詳死体の個人識別は、歯科医師にとって極めて重要な責務の一つである。東日本大震災の身元確認では、歯の情報から約 15%の身元確認がなされている事は周知の事実である(山下喜世弘ら.東日本大震災の身元確認作業岩手派遣業務報告 2011:11-20)。この様に、体内で最も硬く、高熱などの極端な環境への曝露に耐え、死後変化の影響を受けにくい歯は個人識別に大きな役割を果たしていることが改めて認識された。

法歯学的個人識別は、歯式や、歯から抽出した DNA を用いた DNA 鑑定を用いて行われる。中でも、DNA 解析による性別の判定は対象試料としての生前の記録を必要としないため有用性が高く、従来から多くの研究報告がなされてきた (Sullivan et al.1993, Eng et al.1994, Reynoldos and Varlaroka 1996.など)。これらの研究では、歯のエナメル質を構成する主要タンパク質をコードしているアメロゲニン遺伝子の男女差を利用している。

従来の方法の多くは、このアメロゲニン遺伝子のうち、疾患との関わりが報告されていないイントロン領域の性差を利用している。しかし、このイントロン領域は人類集団によっては欠失することが知られており、性別判定そのものが行えなかったり、男性が女性と誤判定される事例が報告されている。よって、確実な性別の判定には、男女差以外には多型性のない、塩基配列の保存性の高い領域を選定する必要がある。

また、従来最も感度が高い方法は、申請者が出向中の山梨大学法医学講座で開発された方法 (Masuyama, et al. PLoS ONE, 2017)であり、検出感度は男性で 20 pg、女性で 10 pg である。しかし、この方法はアメロゲニン遺伝子の男女差を僅か一塩基の違いのみで検出しているため、鋳型 DNA 量が少なくなると性別判定が不確実になる傾向がみられた。

ヒトの 1 細胞あたりの DNA 量は約 6 pg であることが知られており、理論的にはこの量の DNA でも性別判定が行える方法が確立できるはずである。従来より判定の確実性が高く、高感度で、断片化した DNA にも適用可能、かつ迅速な判定が可能な性別判定法を開発できれば、昨今我が国で頻発している大規模災害時の身元確認に大きく貢献できるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

法医 DNA 型鑑定で取り扱う試料は環境要因や微生物の影響を受け容易に分解されるため、高度に変性した微量な試料から正確に判定を行うことが求められている。

従来報告では、主にアメロゲニン遺伝子の Intron 領域の男女差を用いた判定が行われている。しかし、この領域は多型性が非常に高く、判定領域の遺伝子変異によって正確な判定が行えない事例が存在する。つまり、確実な性別判定には、性差以外の多型が可能な限り少ない座位を選定することが望ましい。本研究では男女差以外には多型性がほとんどない E Exon-1 領域に着目して、性別判定用プライマーセットを開発し、極度に劣化したサンプルにも適用可能な新しい性別判定法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒトアメロゲニン遺伝子の Exon 1、2、7 の中で、どれが特に保存的かを調査するため、各々の全長配列について、BLAST : Basic Local Alignment Search Tool を用いた塩基配列の相同性検索を行った。

各 Exon の全長における男女差を比較し、保存性の高さや男女差の大きさを兼ね備える Exon-1 領域を解析領域として選定した。

ヒト集団内における Exon-1 領域の配列の保存性を確認するために、dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) にて AMEL-X および AMEL-Y に見られる既知の single nucleotide variant (SNV) を探索し、Exon-1 と重複する変異とヒト集団でのアリル頻度を調べた。AMEL-X と AMEL-Y の Exon-1 に見られる SNV はそれぞれ 9 箇所と 2 箇所見られ、いずれの SNV も alternative allele の頻度は極めて低く、これらの SNV はヒト集団内ではほぼ見られず、本論文での解析への影響は限定的であると判断できた。dbSNP では当該領域に insertion あるいは deletion は認められなかった。

Exon-1 領域から、特異性を高めるためプライマー配列内に塩基配列の男女差が可能な限り大きくなる領域を選び、プライマーを設計した

DNA 型解析による性別判定で最も普及しているのは、アメロゲニン遺伝子の Intron を利用する方法である。例えば、Promega 社の PowerPlex® Fusion 6C system や Thermo Fisher Scientific 社の GlobalFiler™ PCR Amplification Kit などが挙げられる。これらのキットの性別

判定用 PCR 産物は、前者は AMEL-X で 89 bp、AMEL-Y で 95 bp であり、後者は AMEL-X で 99 bp、AMEL-Y で 105 bp である。しかし、古代人骨のような極度に劣化した試料では、試料中の DNA 断片は主に 50 bp より短い場合がある。このような高度に断片化した DNA に対しては、従来の方法では性別の判定が困難であった。本研究で設計したプライマーセットは、AMEL-X で 48 bp、AMEL-Y で 45 bp と、これまでに報告されている性別判定反応系よりも短い鎖長を有している。

濃度が既知である市販の男女 DNA を使用し、それぞれ段階的に希釈系列をつくり、本法の感度を測定した。

本法の法医実務における有用性を検証するため、検出感度について、法医学的 DNA 型鑑定に広く用いられている GlobalFiler™PCR Amplification Kit (GF) と比較検討した。

次に、高度に変性した微量 DNA に対する有用性を検証するため縄文人骨(約 2500 年前)について、本法および GF を用いて性別判定を行った。得られた結果を、人骨の形態人類学的特徴から判定した性別と比較し、妥当性を検証した。

#### 4 . 研究成果

本法を用いた性別判定にて、再現性のある男性の判定の可能だった最低濃度は 12.5 pg であり、X および Y 染色体由来アメロゲニン遺伝子が共に検出される最低濃度は 25 pg という結果となった。再現性のある女性の判定可能だった最低濃度は、12.5 pg であり、6.25pg あれば検出の可能性を認めた。

そこで、高度に断片化した古代人骨試料を用いて両法を比較したところ、増幅産物の鎖長が短い本法は GF に比べてかなりの優位性が認められた。

標的領域が非常に安定しており、本法による性別判定は、これまでの研究よりも信頼性が高いと考えられる。

しかし、本法は高度に保存された領域を標的としているため、ヒトと動物の識別には使用できない。

本法は高度断片化試料についても適用可能、かつ手技が簡便で迅速、安価であり、法医学及び自然人類学に貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujimoto K, Fujii G, Shojo H, Nakanishi H, Kanzawa-Kiriyama H, Saitoh M, Yoshizawa K, Aono T, Horita T, Takada A, Saito K, Ueki K, Adachi N.	4. 巻 59
2. 論文標題 Highly sensitive sex determination method using the exon 1 region of the amelogenin gene.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2022.102136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤本佳那, 藤井元人, 狸々英紀, 角田恒雄, 上木耕一郎, 安達登	4. 巻 28
2. 論文標題 新規プライマーセットを用いた高感度性別判定法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA多型 DNA Polymorphism	6. 最初と最後の頁 96-98p
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本佳那, 小泉舞, 藤井元人, 狸々英紀, 角田恒雄, 井口蘭, 齋藤正夫, 上木耕一郎, 安達登.
2. 発表標題 Development of a highly sensitive sex determination method using the novel primer set.
3. 学会等名 第104次日本法医学会全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------