

## 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11日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249046

研究課題名（和文） 集団特異的形態形成に関与する遺伝子群の多型検索および機能解析

研究課題名（英文） Search for polymorphisms of genes regulating population-specific morphological traits and functional analyses.

研究代表者

神田 芳郎 (KODA YOSHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90231307

研究成果の概要（和文）：ヒトの指紋や皮膚色など観察が容易な形態は形質学分野で研究されてきた。最近集団間差を示す形質の形成には複数の遺伝子が関与することがわかってきた。当該研究では、DNA マイクロアレイ法による網羅的多型解析をおこない、形態形質の中で特に遺伝の影響が強いとされている総隆線数（手指十本の隆線数の総和）の決定に関与する遺伝子多型群を探索した。またヒトに特徴的な会話や言語の発達に関与する FOXP2（forkhead box P2）遺伝子を指標にした人獣鑑別法を開発した。

研究成果の概要（英文）：The easily-observed morphological traits such as fingerprints and skin colors had been studied in morphologic field. Recent studies suggest that many genes are responsible for regulation of traits with population-specific manner. In this study, we searched for polymorphisms of genes determining the total ridge counts of ten fingers by genome-wide polymorphism array technique. In addition, we developed a method to distinguish human animal origin based on FOXP2（forkhead box P2） that is involved in speech and language development in humans.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	23,100,000	6,930,000	30,030,000

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：指紋、総隆線数、遺伝子多型、多因子遺伝

## 1. 研究開始当初の背景

人類学分野では皮膚色、虹彩色、毛髪の色や形状、歯牙の形状といった外見上観察が容易で集団に特徴的な形態について研究がなされてきた。近年の遺伝子解析研究によりこうした形態の形成に関わる遺伝子群が環境による自然選択を受けている可能性を示すデータが蓄積しつつある。また集団間で差異がある形質の形成には複数の遺伝子が

関与しており集団内での多型性も認められている。皮膚色、虹彩色、毛髪の色や形状、歯牙の形状の相違は集団特異的な表現型多型であり、こうした形態形成に関与する遺伝子多型の部位や頻度には集団間の相違があることが予想される。また、身長や指紋のパターンあるいは隆線数といった形質にも集団内の個人差や集団間差が報告されている。指紋はその紋様のパターンにより、弓状紋、

渦状紋、蹄状紋に分類される表現型多型であり、おそらくこの紋様形成にも遺伝が関与しているものと推定されている。しかしながら10指の隆線数の総和である総隆線数は紋様パターン以上に遺伝性が強く、遺伝率という遺伝の関与を示す係数は0.9程度と身長より高いとされている。一方、最近の遺伝子解析法の進歩は著しく、複数の遺伝子が複雑に関与していることが予想されるような形態についても、表現型が異なる2群間でゲノムワイドSNPs解析法(DNAマイクロアレイ法)をおこない、その結果を比較すること(ゲノムワイドアソシエーションスタディ)により、対象とする表現型多型に関与する候補遺伝子群を同定することが可能になった。

## 2. 研究の目的

当該研究では、遂行の実現性を考慮し、多くの集団に特徴的な形態のうち、法医学領域で古くから扱われてきている指紋のパターンや、前述の通り身長よりもさらに遺伝の影響が強いとされている10本の指の指紋の総数である総隆線数にターゲットを絞り、これらの決定に関わっている遺伝子多型群(おもに一塩基多型、SNPs)を同定し、それらがどのような生物学的機能を有し、さらに多型によってどのような機能差があるのかを明らかにすることを目的とした。また、抽出された遺伝子多型については、さまざまな集団で多型解析をおこない、帰属集団推定マーカーの探索も併せて実施する。また、これまでおこなってきた転写因子FOXP2の、他動物種と比しヒトに特徴的な言語や会話の発達に関与しているアミノ酸多型を指標とした遺伝子解析法の改良を行うことも目的として挙げた。

## 3. 研究の方法

本研究計画は、それぞれ久留米大学倫理委員会の了承を得た上で実施した。

(1) 指紋のパターン、総隆線数の決定に関与する遺伝子群の同定

### ①試料

インフォームド・コンセントの得られた日本人成人ボランティア、男性754名、女性317名について、10指の指紋の採取、ならびに唾液あるいは血液を採取した。唾液からのDNA抽出はOragene Purifier(DNA genotek)とGentra Puregene Blood Kit(Qiagen)を用い、血液からはGentra Puregene Blood Kitを用いておこなった。

### ②指紋の分類と隆線数のカウント

用紙に印象された各指紋について分類をおこない、実体顕微鏡を用いて隆線数をカウントし、その総数を算出して総隆線数とした。

### ③DNAマイクロアレイ法を用いたゲノムワイドアソシエーションスタディ

総隆線数と指紋パターンはほぼ相関する

ため、総隆線数でサンプルに順位をつけ、最も多い群と最も少ない群の2群について、男性では148サンプル、女性は48サンプルを対象とし、Illumina社の660W-Quad Bead Chip(男性)あるいはHuman OmniExpress-12

(女性)を用い、約50万SNPsについて多型解析をおこなった。男性サンプルのデータ統計解析は、スタージェン社に依頼した。

### ④リアルタイムPCRによる多型解析

DNAマイクロアレイ法をおこなった結果、男性で総隆線数の多いグループと少ないグループで、多型の分布が異なる上位8座位(rs943842, rs4878617, rs9303634, rs1511196, rs9382471, rs10098260, rs7150478, rs10786132, rs2063483, rs3013595, rs2198652, rs16999999, rs10498828)について、TaqMan predesigned SNP genotyping assay(Life Technologies)を用いてゲノムワイド解析を実施しなかった他の男性サンプル、ならびに全ての女性サンプルの多型解析をおこなった。反応は、FastStart TaqMan probe Master (Roche)、TaqMan Genotyping Master (Life Technologies)、Perfect Realtime (TaKaRa)のいずれかを用い、annealing & extensionは60°Cか62°Cでおこなった。

## (2) FOXP2を指標とした人獣鑑別法の確立

### ①試料

さまざまなヒト集団由来DNA96サンプル、33種、56個体の脊椎動物由来DNAを鋳型に用いた。DNAは、QIAamp DNA Blood Mini KitあるいはGentra Puregene Blood Kitを用いて抽出し、Quant-iT dsDNA HS Assay KitsとQubit fluorometer (Life Technologies)を用い定量した。

### ②リアルタイムPCRのデザインと条件

FOXP2のエクソン7に存在するヒトとヒト以外の主な脊椎動物で異なる配列を検出するプローブとプライマーは、Life Technologies社にデザインと合成を依頼した。配列は、

5' -TCACTACTAACAATTCCTCCTCGACTAC-3'

(forwardプライマー)、

5' -GATGAGTTATTGGTGGTGATGCTT-3' (reverseプライマー)、

5' -FAM-TCCTCCAACACTTCC-MGB-3' (ヒトプローブ)、5' -VIC-TCCTCCCAACTTCC-MGB-3' (獣プローブ)である。20 μlの反応液の組成は、

3 pgから50 ngのゲノムDNA、10 μlのPremix Ex Taq (Perfect Real Time; Takara)、各primerを450 nM、ヒトプローブ100 nMと獣プローブ100、200、300、400、500 nMである。獣プローブは最適な条件を得るためにさまざまな濃度で検討した。条件検討の際、反応は4回ずつおこない、データとしてこれらの平均と標準偏差を採用した。リアルタイム

PCR は Mx3000P Real-Time PCR System (Agilent Technologies) で実施した。温度条件は、95° C で 30 秒加熱後、95° C 5 秒、60° C 30 秒を 45 サイクルで、各サイクルの最後に蛍光を測定し MxPro software (version 4.10; Agilent Technologies) でデータ解析をおこなった。反応産物をチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA Microchip Electrophoresis System (Shimadzu Biotech) に供し、特異的な増幅を確認した。

### (3) PCR 阻害物質の影響

PCR 阻害物質の影響を調べるためにヘマチン (Alfa Aesar, Heysham) とフミン酸 (和光純薬) を 1 ng のヒト DNA に加えた。ヘマチンは 0, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 40  $\mu$  M、フミン酸は 0, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15, 30 ng/ $\mu$ l の最終濃度になるように 20  $\mu$  l の反応液に加えた。試薬は 50 mM NaOH に溶解し 1  $\mu$  l を DNA と混和した。反応は 4 回ずつ実施し、その平均と標準偏差をデータとして用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 指紋のパターン、総隆線数の決定に関与する遺伝子群の同定

#### ① DNA マイクロアレイ法を用いたゲノムワイドアソシエーションスタディ

ボランティアの男性 754 名から指紋を採取し、総隆線数の多い群と少ない群、それぞれ 75 名程度について、約 50 万 SNPs の DNA マイクロアレイによる解析を実施した。なお、性別によりグループ分けした理由は、指紋の総隆線数の平均値には男女差があり、男性の総隆線数が 10~20 程度多いためである。その結果、指紋の総隆線数に関与が疑われる SNPs が同定された。しかしながら、これらの SNPs についてはいずれも統計的に有意な値は得られなかった。その理由として解析を行った多型数 (約 50 万 SNPs) の中で、隆線数の決定に関与する遺伝子数が予想以上に多く、個々の多型の影響が小さい可能性が予想された。統計的に有意な多型を同定するためには、解析対象検体数を増やすか、独立した系による解析をおこなうかいずれかを実施する必要があると考えた。そこで、新たに女性ボランティアを募り 317 名から指紋サンプルを採取し、男性で行った手法と同様に総隆線数上位群と下位群のゲノム DNA それぞれ 24 サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を実施した。時間の経過により、用いた DNA マイクロアレイチップは別のものを使用せざるを得ず、調べた多型は完全には一致していないものの、男性と女性の 2 つの独立に得られた系のデータを比較からは、両者に共通する 2 群 (上位と下位) 間で遺伝子頻度差の大きな SNPs、つまり隆線数の決定に関与する変異を見出すことは出来なかった。

### ② リアルタイム PCR による多型解析

DNA マイクロアレイ法をおこなった結果、男性で総隆線数の多いグループと少ないグループで、多型の分布が異なる、つまり指紋の総隆線数への関与が疑われる上位 8 座位について、ゲノムワイド解析を実施しなかった他の総隆線数が“中くらい”の男性サンプル、ならびに全ての女性サンプルの多型解析を統計解析に加え男性で隆線数が多い群と少ない群のみでは有意差が得られなかった遺伝子座で有意になる多型の有無を検討したが、隆線数の多い、少ないの傾向に相関する遺伝子多型ならびに関与の度合いが大きいハプロタイプは検出できなかった。前記のとおりに、遺伝率は高いとされているものの、今回の結果から、総隆線数やパターンの形成には、かなり多数の遺伝子が関与していることが推定され、今後更に多くのサンプルを集めて解析をおこなうことで目的を達成したいと考えている。

### (2) FOXP2 を指標とした人獣鑑別法の確立

#### ① TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR 法の確立

ヒトと獣由来の DNA を識別する簡易で迅速な検査法を確立するために、FOXP2 遺伝子のエクソン 7 のヒト (アデニン) と多くの脊椎動物 (シトシン) で異なる塩基を認識するプローブを合成した。ヒトとアフリカミドリザル (以下サルとする) のゲノム DNA 3 ng を鋳型とし、ヒトと獣プローブを同じ濃度で添加しリアルタイム PCR を実施した。ヒトを鋳型とした場合、ヒトに特異的なシグナル (FAM) のみの増幅が認められたものの、サルでは獣シグナル (VIC) に加え、ヒトシグナルも増幅した (表 1)。

表 1 反応液中の獣プローブ量の蛍光シグナル強度と  $C_T$  値への影響

		ヒト		アフリカミドリザル	
ヒト: 獣		FAM	VIC	FAM	VIC
1:1	蛍光強度	13527 (2048)	283 (56)	4118 (651)	7139 (1344)
	$C_T$ 値	28.35 (0.07)	Not $C_T$	36.06 (0.52)	30.83 (0.44)
1:2	蛍光強度	11700 (1047)	381 (206)	2808 (135)	13716 (936)
	$C_T$ 値	28.51 (0.18)	Not $C_T$	39.27 (1.30)	29.82 (0.12)
1:3	蛍光強度	11806 (1573)	734 (300)	1864 (130)	19757 (793)
	$C_T$ 値	28.58 (0.11)	Not $C_T$	Not $C_T$	29.4 (0.09)
1:4	蛍光強度	11313 (1730)	978 (210)	1578 (232)	22729 (1972)
	$C_T$ 値	28.45 (0.17)	Not $C_T$	Not $C_T$	29.10 (0.23)
1:5	蛍光強度	8217 (561)	1332 (202)	809 (128)	21086 (3077)
	$C_T$ 値	29.01 (0.36)	Not $C_T$	Not $C_T$	28.95 (0.28)

“Not  $C_T$ ”の反応ではシグナルが閾値に達していない。

そこで、ヒトプローブ濃度を一定 (100 nM) にして獣プローブの濃度を 500 nM まで段階的に増加させた結果、ヒトプローブ 100 nM

に対し、獣プローブ 200 nM~400 nM であれば、ヒトとサル DNA を区別できることが分かった。そこで獣プローブの濃度を 300 nM とし以降の実験をおこなった。さまざまな集団に由来するヒト DNA と各種脊椎動物種の DNA について実施した結果を表 2 に示す。ヒトシグナルはヒト DNA を用いた場合にのみ観察され、カエルでは、獣シグナルが増幅したが蛍光強度は弱く、マウス、カメ、トカゲ、魚ではシグナルが得られなかった。シグナルの有無あるいは強度は使用しているプローブとプライマーの両方、あるいはいずれかの配列とその動物種の配列との間の差異に起因するものと予想される。

表 2 リアルタイム PCR によるヒト、さまざまな動物 DNA のシグナルの検出

種	N	リアルタイム PCR	
		ヒトシグナル	獣シグナル
<b>哺乳類</b>			
ヒト	96	+	-
チンパンジー	1	-	+
ゴリラ	1	-	+
アフリカミドリザル	1	-	+
ニホンザル	1	-	+
マントヒヒ	1	-	+
イヌ	6	-	+
ネコ	7	-	+
ウマ	3	-	+
ウシ	4	-	+
ブタ	5	-	+
ヤギ	1	-	+
シカ	1	-	+
ネズミ	1	-	+
ラビット	1	-	+
ウサギ	1	-	+
イタチ	2	-	+
トラ	1	-	+
コウモリ	1	-	+
アライグマ	1	-	+
<b>鳥類</b>			
ニワトリ	1	-	+
ハト	1	-	+
カラス	1	-	+
カモ	2	-	+
サギ	2	-	+
キジ	1	-	+
ペンギン	1	-	+
<b>爬虫類</b>			
カメ	1	-	-
トカゲ	1	-	-
<b>両生類</b>			
カエル	1	-	+
<b>魚類</b>			
タイ	1	-	-
サバ	1	-	-
イサキ	1	-	-
ゼブラフィッシュ	1	-	-

次に、特異的な増幅を確認するために、PCR 産物の電気泳動をおこなった。シグナルが認められたサンプルに加え、マウス、カメ、トカゲでも同サイズのバンド(特異的増幅産物)が検出された。一方、魚類では薄い様々なサイズのバンド(非特異的増幅産物)が検出される若しくは全く検出されなかった。リアルタイム PCR 法は電気泳動を必要とせずクロスコンタミネーションが回避できることを利点とする方法ではあるが、マウス、カメ、

トカゲといった生物の由来が疑われる検体を扱う場合には電気泳動は有効であるものと考えられる。

## ②ヒト DNA の定量

次に、ヒト DNA、50 ng~3 pg の 4 倍希釈系列を利用し、定量可能な濃度範囲を決定した。実験は 4 回おこなったが、50 ng から 12 pg の全反応で増幅が認められ、この範囲では  $C_T$  値(閾値に達するまでのサイクル数)と DNA 量の対数は座標で直線上にプロットされた(図 1)。

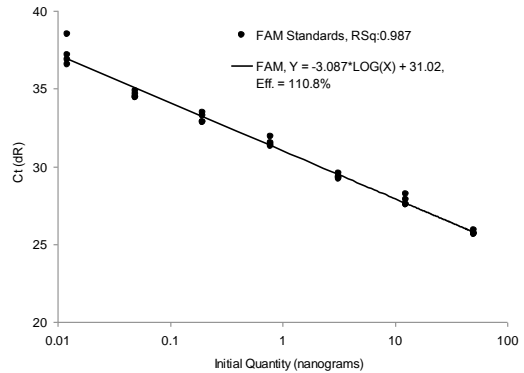


図 1 ヒト DNA の検量線

50 ng から 12 pg の DNA を用いて得られた  $C_T$  値を y 軸、DNA 量の対数を x 軸とした。dR は基線で補正した蛍光値を意味する。

一方 3 pg の DNA を用いた場合、4 回の反応のうち 2 回で増幅が認められなかったが、理論上 3 pg の DNA は核遺伝子 1 コピーを含む程度の DNA 量であることを考慮すればこの結果は妥当であるものと考えられた。

さらに、混合試料中の動物 DNA の影響を調べるために 1 ng のヒト DNA に対し、さまざまな濃度(1 ng~30 ng)のイヌ DNA を加えたものを鋳型に反応をおこない、 $C_T$  値の比較により結果を評価した。蛍光強度は、イヌ DNA の濃度によって影響を受けたものの、 $C_T$  値はほとんど影響を受けることがなく、夾雑している動物 DNA の量によらず正確なヒト DNA の定量が可能である可能性が示唆された。

## ③PCR 阻害物質の影響

抽出 DNA 溶液中の PCR 阻害物質の存在は、DNA の分解とともに法医試料では考慮すべき問題である。血液試料に含まれるヘマチン(0~40  $\mu$ M)と、土壌に含まれるフミン酸(0~30 ng/ $\mu$ l)を 1 ng のヒト DNA に加え反応をおこなった。結果は、市販のヒト DNA 定量システムである Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit と文献的に比較した。結果を表 4 に示す。本システムはヘマチンに対しては比較的抵抗性があり、Taq ポリメラーゼを含む反応液の組成によるものではないかと考えた。一方、フミン酸については、

Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit と同レベル、つまり 7.5 ng/μl より高濃度になると反応は完全に阻害された。またフミン酸の濃度が上がるにつれ C<sub>T</sub> 値も上昇したがヘマチンではほとんど変化が無かった。この結果からもフミン酸による阻害の影響がヘマチンより大きいことが示唆された。

本法はダイナミックレンジが広く、その検出限界は1コピー程度のFOXP2遺伝子であると考えられる。また高いヒト特異性を有するため、霊長類を含む多くの動物種とヒト由来DNAを識別することができ、30倍の獣DNAが混在した試料においても影響を受けることなく正確にヒトDNA量の推定が可能であった。今後、多検体の法医試料を用いた検討と検証が必要ではあるものの、本法はSTR解析の前段階での人獣鑑別とDNA定量の同時解析ツールとして有用であるものと考えられる。

#### 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28件)

Soejima M, Hiroshige K, Yoshimoto J, Koda Y. Selective quantification of human DNA by real-time PCR of FOXP2. *Forensic Sci Int Genet. in press.* 査読有

[学会発表] (計22件)

① 副島美貴子, 廣重憲一, 吉本譲爾, 神田芳郎. FOXP2を用いた人獣鑑別法. 日本DNA多型学会第20回学術集会抄録集, 2011; p62, 横浜.

② 副島美貴子, 神田芳郎. FOXP2を用いたヒトDNAの選択的定量法. 第61回日本法医学会学術九州地方集会, 要旨集, 2011; p12, 長崎.

[図書] (計3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

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/foren/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神田 芳郎 (KODA YOSHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90231307

##### (2) 研究分担者

副島 美貴子 (SOEJIMA MIKIKO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：80279140

##### (3) 連携研究者

埴原 恒彦 (HANIHARA TSUNEHICO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00180919