

## 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23年 5月11日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590742

研究課題名（和文） 法医学的試料におけるDNAメチル化プロファイルの解析

研究課題名（英文） Analysis on DNA methylation profiles in forensic evidence

研究代表者

中屋敷 徳（NAKAYASHIKI NORI）

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：10146029

研究成果の概要（和文）：

1. 血液および唾液斑痕を、各種環境下（温度や湿度の差異、光や酸素の有無等）で1ないし6時間保存し、SNRPN 遺伝子上流の DNA メチル化プロファイルを調べたが、明らかな変化は観察されなかった。
2. H19 遺伝子上流の 23SNPs からなるハプロタイプ多型について、9 外国人集団を調べた結果、集団特異的ハプロタイプを含む 21 ハプロタイプの各地域集団における分布が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

1. Methylation status in forensic evidences under eight different environmental conditions (temperature, humidity, light etc.) was analyzed, however, no significant difference was observed.
2. A haplotype polymorphism composed of 23 SNPs upstream of the H19 gene was investigated, and 21 haplotypes including several ethnicity-specific haplotypes were observed from nine ethnic groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：DNA メチル化，経時変化，DNA 多型，ethnicity

## 1. 研究開始当初の背景

法医学分野において、親由来を知る・証明することは、父子鑑定や家系分析の際に大変重要である。以前の研究において、複数のインプリント遺伝子の DMR (differentially methylated region) 内に存在する多型（主

に SNP) が、メチル化感受性酵素およびメチル化部位切断酵素を用いることで、アレルの親由来を選択的に検出できることを報告した。その後、確認のために行った個人由来 DNA のクローン分析では、該当領域内のメチル化 CpG が異なる割合で混在し、あるいはメチル

化状態が完全に逆転したクローンも観察されたことから、DMR 内が完全なメチル化/非メチル化状態ではないことが判明した。これまで法医学的試料について、時間経過や様々な環境に伴う DNA メチル化状態についての検討は全く行われていなかった。

## 2-1 研究の目的 (メチル化分析)

法医学で扱う試料、たとえば身体から離れた細胞 (血痕や体液斑痕) や死後の組織内の DNA について、DMR 内のメチル化状態を指標として多型を検出する場合に、その試料 DNA 中のメチル化状態 (メチル化プロファイル) が、環境 (時間経過や保存環境) により変化が生ずる (脱メチル化やメチル化) ことがないのか、または変化を受けるとすれば、どのような環境下でその現象が促進されやすいのか、について検討しておく必要がある。

## 3-1 研究の方法 (メチル化分析)

(1) 体外環境下におけるメチル化状態の検討  
 ・同一人由来の血液および唾液 10 $\mu$ l を FTA カード上に滴下して斑痕を作成

・経時変化 1 時間ないし 6 時間後の比較

・環境要因: 温度, 湿度, 光, 酸素 等

- ①コントロール (-80 $^{\circ}$ C)、②遮光/乾燥、
- ③暗所/湿潤 (H<sub>2</sub>O 飽和)、④遮光/湿潤 (EtOH 飽和)、⑤蛍光灯/無酸素 (CO<sub>2</sub> 飽和)、
- ⑥高温 (120 $^{\circ}$ C)、⑦蛍光灯/室内 (20 $^{\circ}$ C)、
- ⑧遮光/室内

各環境下に静置. 1 ないし 6 時間後に回収して、実験開始まで -80 $^{\circ}$ C 冷凍庫に保存した。

全試料が揃った段階で、直径 2 mm 径のディスクを切り出してバイサルファイト処理を行い、メチル化されていないシトシンをウラシルに転換させた。その後、対象 DMR 領域 (以前の研究で対象とした: SNRPN 遺伝子上流 228bp 内に 16-17 CpGs および 2 SNPs を含む、PEG3 遺伝子上流 269bp/20-21 CpGs/1 SNP) を PCR 増幅し、その産物についてクローニングを行って、各試料について目安として 20 クローンのシーケンシングを行いメチル化プロファイルの傾向を分析した。

## 4-1 研究成果 (メチル化分析)

(1) 法医学試料の各種環境下におけるメチル化プロファイルの比較

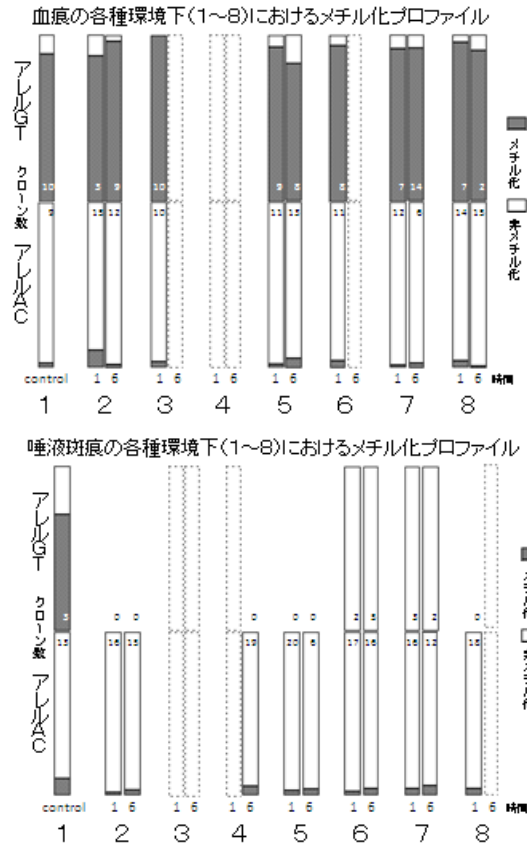
<予備実験>

斑痕を作成する DNA 保持性の FTA カード (オリジナルおよび elute) とバイサルファイトキットについて検討した。その結果、両カード由来 DNA の複数のクローン間でメチル化状態に差がなく、処理キットによる非メチル化シトシンのウラシルへの完全な転換が確認できた。そこで以後は FTA カード上の乾燥斑痕から 2 mm 径のディスクを切り取り、その DNA について実験を行った。また、2 か所

のターゲット領域のうち、メチル化状態が安定しており、かつ遺伝子と離れている SNRPN の DMR を調べた (調べた PEG3 の対象領域はエクソンを一部含んでいたが、予備実験の結果、DMR 状態が不安定な状態であった)。

<本実験>

SNRPN 遺伝子は父性発現するインプリント遺伝子であり、DMR では母由来アレルがメチル化、父由来アレルが非メチル化状態にある。図はメチル化プロファイルの検査結果である (上: 血痕、下: 唾液斑痕)。



各条件下で処理したところ、④のアルコール環境下で処理した場合、PCR 増幅は血痕では得られず、唾液斑痕の 6 時間処理のみであった。その他の条件下で増幅が確認されなかったのは、血痕の③および⑥の 6 時間処理、唾液斑痕では、③の 1 時間および 6 時間処理、そして⑧の 6 時間処理試料であった。これらの結果については、FTA カード自体に含まれている DNA 安定化成分もあるので、その詳細は不明である。増幅バンドを精製し、クローニング後にシーケンシングを行った (プライマーは CpG 配列を含まないように設計してあるので、バイサルファイト処理後の増幅も可能である)。

2 つの SNPs により、アレル GT (メチル化) とアレル AC (非メチル化) のクローン識別が可能であり、それぞれに含まれる 16 および

17 CpGs のメチル化状態について調べた。

血痕では、メチル化アレル (GT) では約 11% 未満の非メチル化 CpG が存在し、一方非メチル化アレルではより低い割合 (3%) でメチル化 CpG が検出された。異常メチル化や非メチル化 CpG の出現部位には出現し易い傾向はみられたものの、その出現頻度に関しては、各条件間および保存時間の違いによる大きな差異が見られなかった。すなわち、この実験系では特定の保存条件/時間によるメチル化状態の変化の要因を明らかにすることはできなかった。唾液斑痕でもアレル AC における異常メチル化の出現頻度については血痕同様、有意差は見られなかった。

本研究におけるクローニング実験において、無作為にクローン含有コロニーを選択したにも関わらずアレル AC クローンの割合が極めて多かった。血液由来クローンでは GT:AC=40.5:59.5、唾液はより極端な偏りを示した (GT:AC=5.8:94.2)。FTA カードからの DNA 抽出やその後の PCR による不均等増幅は考えにくい、その成因は不明であり、別な実験系を考える必要があるかもしれない。

以前の実験において、1 日程度の保存期間によるメチル化プロファイルの変化が見られたことを基準として立案した今回の実験系では、メチル化プロファイルという点で、血痕および唾液において明らかな変化は認められなかった。この結果をもたらした一つの原因としては、FTA カードという DNA 保持媒体の特殊性があるのかもしれない (含まれる成分等) が、その可能性を検討することはできなかった。今後は、斑痕を作成する媒体を変えること、あるいは保存期間をもう少し延長することによって、以前に示唆されたようなメチル化プロファイルの変化をもたらす原因を追究してみたい。

もう一方の研究 (H19HP ハプロタイプ分析) に関して

## 2-2 研究の目的

H19 遺伝子上流の DMR 内には、以前に報告したハプロタイプ多型 (H19FR) を構成する 3 SNPs に近接して、多くの SNPs が報告されていた。そこで、より多くの SNPs からなる新たなハプロタイプ多型 (H19HP と命名) について、複数のエスニック集団調査を行いそ

の分布と特徴を明らかにする。

## 3-2 研究の方法 (ハプロタイプ分析)

H19 インプリント遺伝子上流の 1.2 kb 配列を対象とした。9つのエスニック集団 (597 日本人、154 朝鮮人、158 中国人、99 モンゴル人、100 タイ人、77 ビルマ人およびドイツ在住の 77 トルコ人、68 アフリカ人および 93 ドイツ人)、そのうち日本人は 6 地域 (岩手、青森、新潟、鳥取、宮崎、沖縄)、2 地域の朝鮮人 (ソウル、中国国内) と 2 地域の中国人 (瀋陽、南京) 由来の DNA を対象とした。本研究を遂行するにあたり、岩手医科大学倫理委員会の承認を得た (一部試料の分析は名古屋大学および中華医科大学の承認を得た)。

登録されている H19 遺伝子配列 AF125183 の 7,053-8,270 領域 (1,218 bp) を PCR 増幅し、シーケンシングを行った。ハプロタイプは、優勢的に分布しているものを指標として経験的に判定され、稀なハプロタイプについては、親由来アレル検出法としてのメチル化感受性制限酵素の使用による方法、もしくは PCR 産物のクローニングで確定した。統計学的分析には、カイ二乗検定、Powerstat V12 ソフトウェア、PHYLIP3.69、CLUSTALW、NJplot 2.3、NETWORK 4.10 等を用いた。

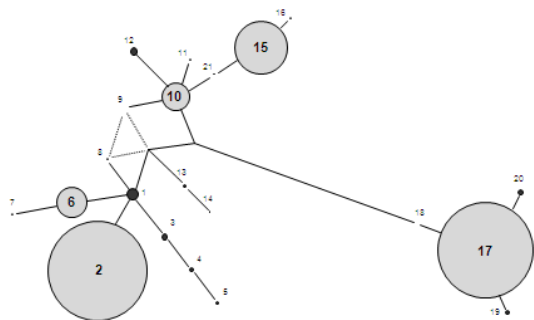
## 4-2 研究成果

### (1) H19HP ハプロタイプ

対象領域 (約 1.2 kb) は H19 インプリント遺伝子上流のインプリンティングセンター領域 (ICR: imprinting center region) 内に位置している。ICR を構成する反復配列内には複数のインプリント機構維持に関連するタンパク結合部位も存在している。

この領域には多くの SNPs が存在し、本研究で最初に行ったアフリカ人やドイツ人集団には、日本人に観察されない 9 SNPs が検出されたことから、23 SNPs で構成される新しいハプロタイプ多型 (H19HP) とした。その 19 SNPs は GenBank に登録されていたが、残る 4 SNPs のうちの 3 つはアフリカ人集団にのみ検出された。これまでに調べた 9 エスニック集団において 21 ハプロタイプが同定されている。

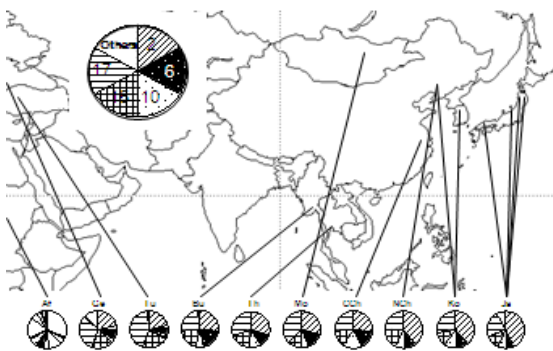
### (2) H19HP ハプロタイプの起源と分化



Phylogenetic network of the H19HP haplotypes

21 種類のハプロタイプを構成している 23 SNPs についてネットワーク分析を行ったところ (上図参照)、ハプロタイプ 10 もしくは 1 が起点となっていることが示唆された。GenBank の SNP 登録情報における祖先アシルでは、18 SNPs のうちの 17 か所でハプロタイプ 10 と一致した。さらに、数種類の高等霊長類 (チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、テナガザル等) の相当部位と配列比較を行ったところ、いずれもハプロタイプ 10 と相同性が高かった (異なるヌクレオチド数は、ゴリラが 0、チンパンジーが 1、オランウータンが 2、テナガザルが 3 か所であった)。これらの結果は、すべてハプロタイプ 10 がヒトの祖先型であることを支持している。そこで、この祖先型から① (アフリカ人特異的なハプロタイプ 1 を介して) ハプロタイプ 2 あるいはハプロタイプ 6、②ハプロタイプ 15、そして③ハプロタイプ 17 の主要タイプが分化していったと推定された。祖先型の 2~4 か所に塩基置換が生じた他の主要タイプに比べ、ハプロタイプ 17 では 7 か所も塩基配列が異なっていたが、その中間的な型は観察されなかった。

(2) H19HP ハプロタイプの分布



Distribution of five dominant H19HP haplotypes: 2, 6, 10, 15 and 17. Af, African; Ge, German; Tu, Turk; Bu, Burmese; Th, Thai; Mo, Mongolian; CCh, Central Chinese (Nanjing); NCh, Northern Chinese (Shenyang); Ko, Korean (Yanbian, Seoul); Ja, Japanese (Aomori, Iwate, Niigata, Tottori).

上図は主要 5 ハプロタイプ (2, 6, 10, 15, 17) の分布を示したものである。特にアジア人集団においてこれらの占める割合が高かった。アフリカ人ではアフリカ人特異的な 9 ハプロタイプを含む 15 ハプロタイプ

が観察され、ドイツ人では 9 ハプロタイプが観察されたが、祖先型であろうハプロタイプ 10 は検出されなかった。アジア人では、トルコ人が 9、ビルマ人が 8、タイ人が 6、モンゴル人が 8、中国人が 5、朝鮮人が 6、そして日本人も 6 ハプロタイプが検出された。各集団における各ハプロタイプの頻度分布から、ハプロタイプ 2 が南から北方に増えている傾向を示したが、他のハプロタイプでは判然としなかった。ハプロタイプ 17 はアフリカ人の頻度は少ないものの (0.015)、ドイツ人 (0.317)、トルコ人 (0.435)、アジア人集団 (0.227-0.365) では優勢なタイプとなっていることから、人類が世界中へ拡散移住する初期において、祖先型に生じた 7 SNPs を伴うこの型が爆発的に増え、その後安定した頻度を保っているのかもしれない。興味深いことに、日本人の 4 集団 (青森、岩手、新潟、鳥取) 内、および朝鮮人の 2 集団 (韓国・ソウルおよび中国・Yanbian) 間では各ハプロタイプの出現頻度分布に差が見られなかったのに対し、中国の 2 集団 (瀋陽および南京) にはわずかながら有意差が見られた (0.047)。また、エスニック集団特異的と思われるハプロタイプが、アフリカ人に 9 (1, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14)、ドイツ人に 2 (16, 18)、ビルマ人に 1 (21) そして日本人に 1 (19) 存在した。H19HP システムにおける法医学的有用性を下表に示すが、いずれも高い値を示した。

Forensic information of the H19HP haplotype

Population	Region	n	Statistical Information*			
			MP	PD	PE	PI
Asian						
JAPANESE	total	398	0.107	0.893	0.466	1.81
	Aomori	98	0.110	0.890	0.484	1.88
	Iwate	114	0.110	0.890	0.445	1.73
	Niigata	88	0.097	0.903	0.549	2.20
	Tottori	98	0.130	0.870	0.403	1.58
CHINESE		158				
	Shenyang	105	0.144	0.856	0.530	2.10
	Nanjing	53	0.097	0.903	0.518	2.04
KOREAN	total	154	0.104	0.896	0.372	1.48
	Seoul	103	0.093	0.905	0.412	1.61
	Yanbian	51	0.135	0.865	0.300	1.28
MONGOLIAN		99	0.099	0.901	0.364	1.46
THAI		100	0.093	0.907	0.460	1.79
BURMESE		77	0.089	0.911	0.633	2.75
TURK		77	0.123	0.877	0.430	1.67
Non-Asian						
GERMAN		93	0.074	0.926	0.631	2.74
AFRICAN		68	0.048	0.952	0.701	3.40

(3) 日本人特異的 SNP / ハプロタイプ

Distribution of haplotype 19

Ethnicity	Region	n	Frequency
Japanese	total	398	0.0804
	Aomori	98	0.0867
	Iwate	114	0.0877
	Niigata	88	0.0682
	Tottori	98	0.0765
	Miyazaki*	99	0.0606
	Okinawa*	100	0.1100
Korean	total	154	0.0032
	Seoul	103	0.0049
	Yanbian	51	0.0000

ハプロタイプ 19 はハプロタイプ 17 に 1 SNP (rs76162918) が生じたタイプであるが、調べた日本の 4 県の集団から 0.68~0.88 というやや高頻度で検出されたが、(韓国・ソウルの 1 試料を除いて) 他どの集団にも存在が確認されず、日本人特異的であることが推定された。そこで、宮崎および沖縄の試料について、該当 SNP のみを検出する PCR-RFLP 法で調べたところ、両地域集団からも宮崎でやや低く、しかし沖縄でより高い頻度で検出された。沖縄地域で頻度が高いことは、これまでも他の複数の遺伝マーカーで見られている傾向と一致している。これは、日本で独自に生じた突然変異が沖縄では保持されたものの、本島内では他集団の移入により頻度の現象が生じた、あるいは極端な遺伝的浮動の結果であるのかもしれない。

(4) その他

本研究の 9 エスニック集団の分析において、これまでに GenBank に登録されていない新規の 12 SNPs が検出され、(出現数は少ないものの)それぞれ単一エスニック集団に観察された。本研究の対象領域には、一般的な出現頻度以上に多くの SNPs が検出された。ICR および DMR 内という特殊な領域内でもあることから、塩基置換の部位や複数であった場合にはその組合せによって、インプリント機構に関連した正常な胎発生や疾病に影響を与える可能性も否定できないと思われる。

本研究では、試料の提供が得られた 9 エスニック集団についての情報が得られたが、他のエスニック集団におけるハプロタイプの分布について調べることで、より多くの情報が得られると考えられることから、今後も継続して研究していきたい。本 H19HP ハプロタイプシステムは、親アレル判別が可能で、法医学的な遺伝的情報量も多いことから個人

識別や血縁鑑定に有用なツールとなるであろうし、また、H19 インプリント ICR 関連の研究においても役立つマーカーになるであろうと考えられる。

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 3 件)

Nakayashiki N, Shimamoto K, Takamiya M, Hashiyada M, Yuasa I, Dewa K. Investigation of SNP haplotypes in the H19 imprinted gene. *Forens. Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 2*: 540-541, 2009. 査読有  
中屋敷徳, 出羽厚二, 湯浅勲, 山本敏充. H19 インプリント遺伝子のハプロタイプ分析～2. *DNA多型 19*: 151-154, 2011. 査読無  
Nakayashiki N, Fujita M, Dewa K, Ding M, Wei W, Wang X, Yamamoto T, Yuasa I. The distribution of H19HP haplotypes in Asian populations. *Forens. Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 3*: e341-e342, 2011. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

Nakayashiki N, Shimamoto K, Takamiya M, Hashiyada M, Yuasa I, Dewa K. Investigation of SNP haplotypes in the H19 imprinted gene. The 23<sup>rd</sup> World Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2009 Sep 18, Buenos Aires, Argentina.

中屋敷徳, 高宮正隆, 橋谷田真樹, 湯浅勲, 山本敏充, 出羽厚二. H19 インプリント遺伝子上流の SNP ハプロタイプ分析. 日本法医学会総会. 2010, 6月25日, 東京.

中屋敷徳, 出羽厚二, 湯浅勲, 山本敏充. H19 インプリント遺伝子のハプロタイプ分析～2. 日本DNA多型学会第 19 回学術集会. 2010, 11月18日, 三島.

Nakayashiki N, Fujita M, Dewa K, Ding M, Wei W, Wang X, Yamamoto T, Yuasa I. The distribution of H19HP haplotypes in Asian populations. The 24<sup>th</sup> World Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2011 Sep 1, Vienna, Austria.

[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 中屋敷 徳  
(なかやしき のり)

研究者番号：10146029

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：