

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590847

研究課題名(和文)劣化DNA試料分析の標準化に関する研究

研究課題名(英文)The standardization of forensic genetic analysis of degraded DNA samples

研究代表者

浅村 英樹 (ASAMURA, Hideki)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80324250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、個人識別法としてのDNA解析技術の進歩の中、唯一の課題として残されている劣化試料を対象とした解析法の構築に関する研究である。今回、劣化DNA試料分析の標準化の1つとして、PCRの短鎖化に基づいたY染色体及びミトコンドリアDNAの系統分類をすべくSNPs解析に着目し、マルチプレックスシステムの構築を試み、Y染色体系統分類には22のSNPs、ミトコンドリアDNAの系統分類には46SNPsの解析を可能とするシステムの開発に成功した。さらに、これらシステムを応用して日本人集団の頻度解析を行うと共に、劣化DNA試料の有効性を実証するに至った。

研究成果の概要(英文)：The problem with which forensic scientists have recently been confronted involves the technical difficulty of analyzing degraded DNA samples. We designed minimultiplex PCR systems using single-base extension reactions to identify Japanese Y chromosome haplogroups and mitochondrial DNA haplogroups. We selected a group of 22 Y chromosome single nucleotide polymorphisms(SNPs) and 46 mitochondrial DNA SNPs, respectively. We designed primers to render amplicons of <150 bp. Applying these systems, we classified the Japanese population into haplogroups and confirmed the applicability of these system in forensic degraded DNA analysis.

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学、法医学

キーワード：DNA多型 個人識別 劣化DNA試料 Y系統分類 ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA型を用いた個人識別への社会的要請が極めて高まっている。特に、現在の最も汎用している市販キットで分析し得る常染色体15座位による異同識別は、4兆7000億分の1と高率であることが知られている。一方、米国同時多発テロや大規模災害の犠牲者の中には、高度死体損壊、熱への暴露、さらには長期に及ぶ死後経過時間などの影響によって、DNA型解析に適した良好な状態のDNAが得られず、未だに身元が判明していないものが存在するという現実がある。また、すでに結審した数十年前の殺人事件において、当時のDNA鑑定技術の精度が話題となり、現在の技術を用いて再度の鑑定が行われているが、このような長時間置かれた試料では試料の劣化が進み、必ずしも十分な鑑定成果が得られているとは言えない。すなわち、DNA型による個人識別が飛躍的に進歩している一方で、劣化DNA試料の鑑定技術の精度向上が今後の課題であることは言うまでもない。

このような点に着目し、我々はこれまでに劣化DNA試料に有効なDNA解析システム構築し、常染色体14座位、Y染色体24座位、X染色体8座位のSTR型解析法を報告してきた。このようなシステムを応用することで、市販のキットでは不可能な劣化試料についても識別可能であることを実証してきた。しかしながら、識別能の向上という点では、さらなる座位の解析や異なるアプローチからの分析も必要と考え、X染色体の16SNPsに着目して、劣化試料をターゲットとしたMiniPCR-SNPs法によるマルチプレックスを考案した。今回、これまでの実績に加えてさらなる技術を開発し、劣化DNA試料分析法の確立を目的とし、1つの標準化を試みた。

2. 研究の目的

DNA鑑定技術が飛躍的に進歩した今日、劣化DNA試料においても同様に精度の高いDNA鑑定が可能となるシステムの構築が急務である。我々は、これまでにこのような劣化試料の分析に有効なMiniSTR法及びMiniPCR-SNPs法(マルチプレックスSNaPshot法)など多数のシステムを構築してきた。

今回、さらなる精度向上を目的として、Y染色体系統分類、ミトコンドリア系統分類に着目し、劣化試料への応用を前提とした解析技術の構築を試みた。特に、このような系統分類では人種による偏りが多いため、包括的な大別に加え、日本人集団での頻度解析に基づいた細分化についても試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Y染色体系統分類法の開発

マルチプレックスシステム開発

東アジアの主要な系統であるC, D, N, O, Qの分類、さらには日本人に多く分布するDとOに対する細分化を目的として、22のSNPs

を解析すべく一塩基伸長反応(SNaPshot法)によるマルチプレックスシステムの構築を試みた。劣化DNA試料はDNAの断片化が解析を困難にさせる主要因であることから、PCR産物をより短鎖化することが有効であると考えられ、今回のシステムの構築にはPCR産物が最大でも150bpを超えないようにプライマーの設計を行った。ハプログループC, D, N, O, Qの大別には、各々RPS4Y711, IMS-JST021355, M231, P191, M242を識別SNPとし、日本人集団に特異的なハプログループD2については、M15, M179, M116.1, M125, P42, P12, IMS-JST022457, M151, P120, P99のSNPによって11のサブハプログループに分類するシステムを構築し、同様に日本人の3割程度を占めるハプログループO2については、M119, P31, M95, M88, PK4, SRY465, M122のSNPによって8のサブハプログループに分類できるシステムを作成した。

日本人集団頻度解析

血縁関係のない日本人健常成人432人のDNAを用いて、本システムによるハプログループ解析を試みた。これによって日本人のハプログループ頻度解析を行った。

劣化試料への有効性の検討

DNaseによる酵素処理を行い、人工的に断片化したDNA試料、及び市販Y-STR解析キットで解析不良であった実務試料検体を劣化DNA試料として本システムへの応用を試みた。

(2) ミトコンドリアDNA系統分類法の開発

マルチプレックスシステム開発

ミトコンドリアハプログループA-Zの大別のため、塩基番号14776(HV), 4529(I), 3594(L), 12308(Uk), 10400(M), 6371(X), 10118(P), 11947(W), 8404(S), 4216(TJ), 6392(F), 4833(G), 663(A), 9090(Z), 5843(Q), 13626(E), 13263(C), 5178(D), 8281(B), 8392(Y), 9055(Uk), 7028(H), 4580(V), 10873(N), 12708(J), 10034(I), 4917(T), 12705(R)を識別するSNPを標的として解析すべく、一塩基伸長反応による3つのマルチプレックスを構築した。さらに、日本人に多く分布するハプログループM, N, D, B, Gの細分化を行うために、塩基番号8414(D4), 14979(D4a), 8020(D4b), 11215(D4e), 13104(D4g), 11696(D4j), 5301(D5), 6455(M7), 2626(M7a), 4164(M7b), 5442(M7c), 4491(M9), 8200(G1), 13563(G2), 5417(N9), 12358(N9a), 13183(N9b), 8584(B5)を識別するSNPを標的とした一塩基伸長反応による3つのマルチプレックスを作成した。すなわち、全46のSNPsを合計6つのマルチプレックスで解析するシステムである。尚、劣化DNA試料解析を前提としたシステムとするため、PCR産物が最大でも150bpを超えないように各プライマーを設計した。

日本人集団頻度解析

血縁関係のない日本人健常成人214人から

の DNA を試料として、本システムによるハプログループ解析を試みた。これによって日本人のハプログループ頻度解析を行った。

劣化試料への有効性の検討

約 400 bp を増幅産物とするミトコンドリア Hypervariable region の PCR 増幅ができなかった劣化 DNA 試料を本システムに応用した。

(3) 縄文人骨の解析

長野県小諸市七五三掛遺跡出土の縄文後期から晩期に相当する縄文人骨について、今回考案した Y 染色体系統分類及びミトコンドリア DNA 系統分類を試み、極めて劣化した試料における本システムの解析の有効性を評価した。

4. 研究成果

(1) Y 染色体系統分類法の開発

マルチプレックスシステム開発

Y 系統分類の C, D, N, O, Q の大別及び D1, D2, D3, O1a, O2, O3 を分類する 11-plex、日本人特異的ハプログループである D2 を細分化する 8-plex、ハプログループ O2 を細分化する 5-plex の構築に成功した。最小検出 DNA 濃度の解析では、50 pg でも解析は可能であるが、ピークの不均衡の出現などがみられることから、最小検出濃度を 100 pg と設定した。

日本人集団頻度解析

最も多く占めたのはハプログループ O2b で 0.322 を占め、次いで O3 の 0.218 であった。D2 については全体の約 3 割を占めたが、細分化によって D2a1b が最多で 0.162 の頻度であり、D2a* の 0.067 が次いだ。

劣化試料への有効性の検討

DNase を用いて人工的に DNA を断片化させた試料では、市販の Y-STR 解析キットでは、全 16 座位中半数以下の 7 座位でしか分析できなかった試料でも、本システムでは全 22SNPs の解析に成功し、ハプログループ分類が可能であった。さらに、実務試料の解析では、前記市販キットで 6 座位以上解析できなかった全 30 試料を劣化試料と設定して本システムに応用したところ、1 例を除いた全 29 例でハプログループの分類が可能であることが判明した。すなわち、このような結果は本システムが劣化 DNA 試料に対しての Y 染色体系統分類に極めて有効である結果を示唆するものと言え、実践的に活用可能なシステムと評価できる。

(2) ミトコンドリア DNA 系統分類法の開発

マルチプレックスシステム開発

ミトコンドリア DNA 系統分類の A-Z を大別する 3 つのマルチプレックス (10-plex, 10-plex, 8-plex)、ハプログループ D を細分化する 7-plex、ハプログループ M 及び G を細分化する 7-plex、ハプログループ N 及び B を細分化する 4-plex の構築に成功し、これら

によって系統分類するための全 46SNPs の解析が可能となった。最小検出 DNA 濃度の解析では、5 pg で解析が可能である試料もみられたが、extra-peak の出現頻度が増すことから、最小検出 DNA 濃度を 25 pg と設定した。

日本人集団頻度解析

ハプログループ D が占める割合が全体の 0.397、B が 0.159、G が 0.117、M が 0.103、A が 0.079、F が 0.070、Z と Y が各々 0.009、C が 0.005 と判明し、その他のハプログループは存在しなかった。全体の約 4 割を占める D については、D4b が 0.126、D4a が 0.079、D4* が 0.065、D4e と D4g が各々 0.033、D4j が 0.005 と細分化に成功した。

劣化試料への有効性の検討

ミトコンドリア DNA による個人識別に際してシーケンス解析がなされる D-loop 領域の Hypervariable region1 を約 400 bp で増幅するプライマーを用いて PCR 増幅を試みたものの、増幅産物が得られなかった劣化試料に対しても本システムを応用することでハプログループの分類に成功した。これは、本システムが劣化 DNA 試料に対しても有効なシステムであることを実証するものである。

(3) 縄文人骨の解析

放射性同位元素分析によって縄文後期から晩期に相当すると判明した長野県小諸市七五三掛遺跡出土の縄文人骨の骨片から採取した DNA を試料として Y 染色体系統分類及びミトコンドリア DNA 系統分類を試みた。その結果、8 名分の人骨のうち、2 名は全く解析不能であったが、残りの 6 名について全例で Y 染色体及びミトコンドリア DNA の系統分類に成功した。6 名のうち 2 名が男性試料で、Y 染色体系統分類ではハプログループ D2 に分類され、ミトコンドリア DNA の系統分類では全 6 例がいずれも N9b に属していることが判明した。N9b はこれまでも北海道や東北地方の縄文人で多く検出されているハプログループであり、黒曜石の産地として知られる長野県にも同様なハプログループが検出されたことは極めて興味深い結果である。特に、縄文人の Y 染色体系統分類に成功した例はこれまでに皆無であり、本システムが劣化試料に有効であることを実証したのみならず、考古学的に極めて貴重なデータと言える。これまでの現代人の Y 染色体系統分類の結果から、ハプログループ D2 が北海道アイヌで有意に多く偏在していることが判明していたため、この D2 が縄文遺伝子型ではないかという推論がなされてきた。今回の結果はこれを実証したものであり、D2 が他の諸国ではほとんどみられない日本固有のハプログループであることから、縄文人が日本固有に発展してきた背景が推察でき、さらに現代人の中でも北海道と東北地方に多くみられるハプログループであることから、日本人の祖先が北方から移住して日本に渡来し、縄文文化を固有に育んできた背景が示唆され、さらなる解

析が期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Harayama Y, Kamei S, Sato N, Hayashi T,
Shiozaki T, Ota M, Asamura H, Analysis
of Y chromosome haplogroups in Japanese
population using short amplicons and its
application in forensic analysis, Legal
Medicine, 査読有, Vol.16, No.1, 2014,
pp.20-25,

DOI: 10.1016/j.legalmed.2013.10.005.Epub
2013 Nov 1.

原山 雄太、沖 貴仁、塚田 和彦、林 徳
多郎、太田 正穂、浅村 英樹、性染色体上
SNPs 解析法に関する比較検討(第2報)、
DNA 多型 Vol.20、査読有、2012、pp.187-189

[学会発表](計2件)

布谷 美弥、佐藤 紀子、原山 雄太、高津
香奈絵、塩崎 哲也、林 徳多郎、太田 正
穂、浅村 英樹、変性 DNA に有効なミトコ
ンドリア DNA 系統分類法の開発、第 22 回
日本 DNA 多型学会学術集会、2013.11.20、
仙台市戦災復興記念館

原山 雄太、亀井 佐矢子、佐藤 紀子、林
徳多郎、塩崎 哲也、太田 正穂、浅村 英
樹、Short amplicon に基づいた SNP 解析
による Y 染色体系統分類法と法医実務試
料への応用、第 21 回日本 DNA 多型学会学
術集会、2012.11.9、京都教育文化センタ
ー

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

浅村 英樹 (ASAMURA, Hideki)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：80324250

(2) 研究分担者

林 徳多郎 (HAYASHI, Tokutaro)
信州大学・医学部・助手
研究者番号：50600607