

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590854

研究課題名(和文) 37ローカスを用いた高精度DNA鑑定法の構築とその実務への応用

研究課題名(英文) Development of a novel DNA typing method using 37 STR loci

研究代表者

尾関 宗孝(OZEKI, Munetaka)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80549618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体上37ローカスの日本人におけるアレル頻度を明らかにした。D5S818、D19S433、F13B、FGAの4ローカスにおいて、新規なアレルを観察し、その塩基配列を決定した。また、染色体15番上に位置するPenta EとFESFPSが連鎖不平衡にあることが示唆された。そこで、FESFPSを除く36ローカスについて、シミュレーションにより二者間での血縁鑑定における尤度比の分布を評価し、血縁鑑定における対象ローカスの増加の有用性を検討した。このアレル頻度データをもとに、劣化試料のDNAタイピングを効率良く行えるよう7ローカスのマルチプレックスPCRをデザインした。

研究成果の概要(英文)：Allele frequencies for 37 short tandem repeat (STR) autosomal loci were obtained from a sample of 175 unrelated individuals in a Japanese population. Novel variant alleles were observed and defined by its sequence on D5S818, D19S433, F13B and FGA. Linkage disequilibrium was observed between FESFPS and Penta E on chromosome 15. To aid DNA identification using 36 STR loci for kinship analysis, likelihood ratio distributions were estimated. However, a typing kit targeting 36 STR loci is not suitable for the analysis of damaged DNA. In this study, we developed a novel multiplex DNA identification system targeting 7 STR loci (D3S1744, D5S818, D8S1179, D10S2325, Penta D, Penta E, and vWA) that was optimized for use in combination with MiniFiler for the Japanese population.

研究分野：医歯薬学/社会科学・法医学

キーワード：DNA鑑定 アレル頻度 法医学

1. 研究開始当初の背景

現在日本において行われている DNA 鑑定には、アプライドバイオシステムズ社の AmpFISTR Identifiler Kit(以下 Identifiler)が用いられている。本 DNA タイピングキットではヒト常染色体上の 15 ローカスをターゲットとしてその反復配列を PCR にて増幅し、得られたフラグメントの長さから反復回数を判別して各個人のアレル型とする。各ローカス単独では識別能力(アレルのバリエーションや頻度の差)はそれほど大きくなくとも、15 のローカスを組み合わせることで各個人に固有の情報となり、高い識別能力を持って個人を特定することが可能となる。日本人においてはおよそ 2×10^{17} 人に一人を特定することが可能とされている。

一方、この高い識別能力でさえ不十分な例もある。近年複雑な人間関係の中でおこる刑事事件においては、現場より採取された試料に複数人の DNA が含まれることも少なくなく、個人の特定に困難を来す。死後経過時間の長い遺体や遺骨からの DNA サンプルは微量且つ劣化が進んでいることが多く、個人を特定するに十分な情報が得られない。第三度血縁であるいとこや第二度血縁でも片親のみが同じ兄妹間等離れた血縁間における鑑定においては、共有する染色体情報が限られることから一般に明確な判定が難しい。本申請者も法医実務に携わる中でこのような例を経験し、限られたサンプルからより多くの情報を得ることの必要性を痛感している。

以上のような例について、Y 染色体やミトコンドリア DNA を用いた鑑定法により解決を試みる研究がなされてきた。これらは完全一致を鑑定の根拠とすることから判別が容易であるが、その遺伝的性質のため父系もしくは母系といった系統判断のみに限られる。これらの問題点を解決し現在の DNA 鑑定法の精度を向上させるために、われわれは常染色体

上のローカスの増加が最も適していると考えた。このため Identifiler に加えて現在日本で入手可能な以下の市販の DNA タイピングキット、プロメガ社 PowerPlex ESX17 System(以下 ESX17)、同社 PowerPlex CS7 System(以下 CS7)、キアゲン社 HDplex Kit(以下 HDplex)を組み合わせることにより最大 37 ローカスによる鑑定が可能となる。これにより性別に依存しない DNA 鑑定をより高精度に行うことが可能となり、日本人においてはおよそ 1×10^{40} 人に一人を特定することができるものと推定される。さらに、このことは現法において懸念される同胞間での偶然の一致の可能性を排除するだけでなく、これまでに調べられている遺伝子変異の頻度も確率的に問題とならず、血縁鑑定の信頼性は飛躍的に向上する。37 ローカスによる高精度 DNA 鑑定を用いることにより、これまで判別不能であった事案が解決に結びつくことが望まれる。すなわち、特定不能であった身元不明遺体や同胞等の第三度血縁関係の鑑定等への応用は、実務上においても非常に重要であり社会的有用性も高いことは想像に難くない。特に東日本大震災にみられるような大規模災害時における身元特定では、DNA 鑑定が重要な意味をもつものの、その精度が十分とは言えない場合もある。さらには、本研究によって詳細且つ正確なアレル出現頻度に関するデータが得られれば、法医学のみならず人類遺伝学や分子考古学への応用も十分期待される。

2. 研究の目的

我々は本研究の準備として各ローカスにおける日本人の出現頻度に関する論文検索を行うとともに、少人数においてアレル出現頻度の調査を行った。その結果、D10S1248、D22S1045、Penta E といったいくつかのローカスでアレルの定義が異なると思われるデ

ータが発表されていることがわかった。これは各研究者が独自のアレル命名とDNA タイピング法に基づき行った結果であることに起因すると考えられる。例として D22S1025 のアレル出現頻度分布の違いを図1に示す。なおデータは Chung ら、Han らによる韓国人、Asamura らによる日本人のアレル出現頻度を論文より引用しグラフ化したものである。このようなデータを用いて鑑定を行った場合、間違っただ判断を引き起こす。われわれが市販のキットを組み合わせたことを選択した理由もここにある。すなわち、世界中の誰もが統一した方法を用いて同手法により収集されたデータに基づく解析を行うことで、信頼性の高い鑑定を高い精度で行うことができるようになる。また、現在 DNA 鑑定を行っている研究室であれば容易に導入が可能となることもメリットのひとつである。

前述のように、現在の DNA 鑑定において「混合」、「微量」、「劣化」の3点は、大きな課題となっている。実際の試料においては、これが複合的な要因となって、鑑定が困難になることが多い。このうち、「劣化」については、PCR 産物を小さくしたアプライドバイオシステムズ社の AmpFISTR Minifiler Kit(以下 Minifiler)が市販されているが、対象ローカス数が少ないために、明確な鑑定判断に至らないことが多々有る。そこで、本研究を通して得られた日本人のアレル頻度を元に、高い精度で血縁鑑定が可能となるローカスを選択し、本市販キットを補完し劣化試料からより多くの情報を得られるような新規 DNA 鑑定キットの開発を試みることにする。

以上を踏まえ、本研究では特に以下の3点について検討を行った。

- 各ローカスにおける日本人におけるアレル出現頻度
- 血縁鑑定におけるローカス数増加の有用性

- 劣化 DNA の解析を目的とした新規タイピングキットの開発

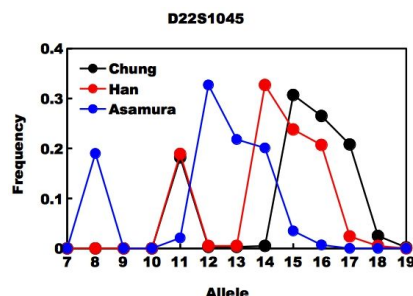


図1 アジア人の D22S1025 アレル頻度比較

[参考文献]

1. Chung U, Shin KJ, Park MJ, Kim NY, Yang WI, Cho SH, Lee HY. Forensic Sci Int. 168(2-3) e51-3 (2007)
2. Han MS, Kim YS, Jin HJ, Kim JJ, Kwak KD, Lee JE, Song JM, Kim W. Leg Med (Tokyo). 11(4) 209-12 (2009)
3. Asamura H, Uchida R, Takayanagi K, Ota M, Fukushima H. Int J Legal Med. 120(3) 182-4 (2006)

3. 研究の方法

(1)DNA タイピングとアレル頻度

京都大学大学院医学研究科法医学講座において行われた司法解剖例にて採取された日本人 175 人分の血液試料を研究対象として、Identifiler、ESX17、CS7、HDplex の4種のDNA タイピングキットにより37ローカスについて各個人のアレル型判定を行い、各ローカスにおけるアレル出現頻度を調べた。得られたアレル出現頻度について各種法医学的パラメータの解析を行った。また、タイピングの過程において見られたバリエーションについては、PCR 断片をクローニングし、塩基配列を決定した。

(2)コンピューターシミュレーションによる

血縁鑑定におけるローカス増加の有用性の検討

(1)において得られたアレル頻度を元に、親子、同胞1万組について血縁鑑定のコンピュータシミュレーションを行い、尤度比の分布について検討した。

(3)劣化 DNA 試料の解析を目標とした新規ミニプレックスの作成

37ローカスのうちMinifilerに採用されているものを除き、識別力が高くアレルのバリエーションが少ない7ローカスを選択した。各ローカスに対するプライマーをデザインし、PCR産物の大きさから組み合わせを考え、4つの蛍光色素に振り分けた。PCR条件やプライマーの濃度を適正化し、新規マルチプレックスPCR(Miniplex)をデザインした。

4. 研究成果

(1)日本人アレル頻度

常染色体上37ローカスの日本人におけるアレル頻度を明らかにした。D5S818、D19S433、F13B、FGAの4ローカスにおいて、新規なアレルを観察し、その塩基配列を決定した。また、染色体15番上に位置するPenta EとFESFPSが連鎖不平衡にあることが示唆された。

(2)血縁鑑定におけるローカス増加の有用性

そこで、FESFPSを除く36ローカスについて、シミュレーションにより二者間での血縁鑑定における尤度比の分布を評価し、血縁鑑定における対象ローカスの増加の有用性を検討した。図2に示すように、親子、同胞、半同胞のいずれにおいても、36ローカスを対象とすることで尤度比が上昇し、従来よりも明確な判断が期待できることが示唆された。

(3)劣化DNA試料解析のためのMiniplex

アレル頻度データをもとに、劣化試料のDNAタイピングを効率良く行えるよう7ローカス((D3S1744、D5S818、D8S1179、D10S2325、Penta D、Penta E、vWA)のマルチプレックスPCRをデザインした。Minifilerとの組み合わせによりcombined matching probabilityは 4.8×10^{-19} となり、Identifilerの 4.3×10^{-17} と比較して、より良い鑑定ができると期待される。

Miniplexの解析例を図3に示す。ヒトDNAとして、肝癌細胞株HepG2よりDNAを調整し実験に供した。D5S818ではヘテロのピークのバランスにばらつきが見られたが、その他のローカスでは良好な結果が得られた。一方、アフリカミドリザル腎由来細胞株COS7のDNAからは有意なピークは認められず、ヒトDNAに特異的であることが示唆された。

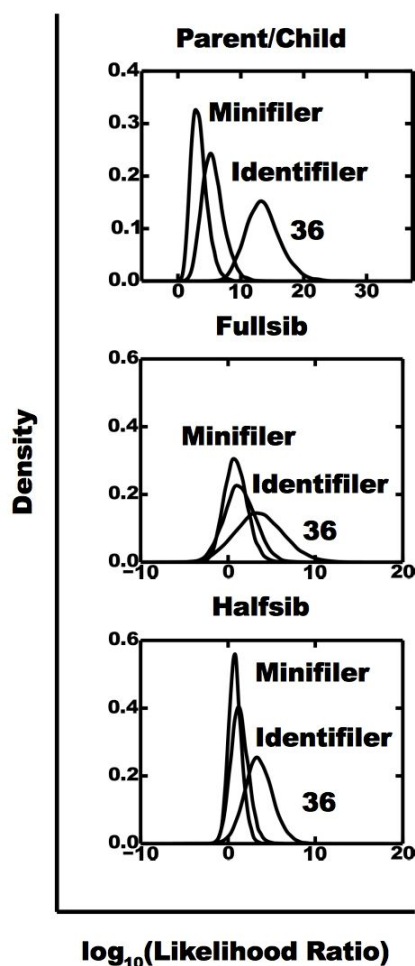


図2 血縁鑑定における尤度比分布

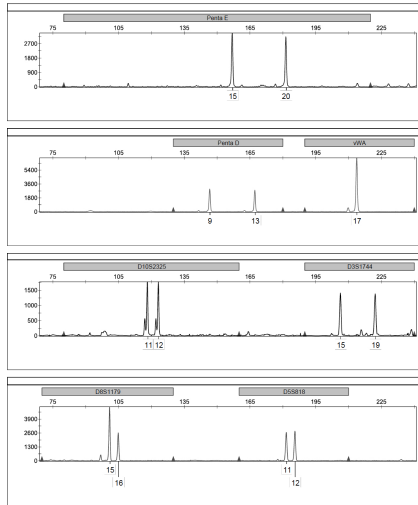


図3 新規 Miniplex

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 2 件)

1. Ozeki M, Kato H, Tamaki K. Development of a novel miniplex DNA identification system for the Japanese population. Leg Med (Tokyo). 17(3) 205-9. (2013) doi: 10.1016/j.legalmed.2014.12.007.
2. Ozeki M, Tamaki K. Allele frequencies of 37 short tandem repeat loci in a Japanese population. Leg Med (Tokyo). 15(6) 342-6. (2013) doi: 10.1016/j.legalmed.2013.08.006.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 尾関宗孝、阿比留仁、南博蔵、堀元英、小谷泰一、玉木敬二 「常染色体 37STR ローカスにおける日本人アレル頻度」 日本 DNA 多型学会, 京都 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾関宗孝 (OZEKI, Munetaka)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：80549618

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

玉木敬二 (TAMAKI, Keiji)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号：90217175