

性染色体上のマイクロサテライトの  
多型性と同一個体内での  
突然変異率の解析

(課題番号 11670405)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金  
基盤研究(C)(2)  
研究結果報告書

平成13年3月

研究代表者 塩野 寛  
(旭川医科大学・医学部・教授)

性染色体上のマイクロサテライトの  
多型性と同一個体内での  
突然変異率の解析

(課題番号 11670405)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金  
基盤研究(C)(2)  
研究結果報告書

平成13年3月

研究代表者 塩野 寛  
(旭川医科大学・医学部・教授)

## 目 次

はしがき	.....	1
研究組織	.....	2
研究経費	.....	2
研究成果の概要	.....	3～7
[研究発表]		
学会誌等	.....	8
口頭発表	.....	9
原著原稿・別冊の掲載	.....	10～46

## は し が き

本研究代表者は、個人識別の確定診断にマイクロサテライト (STR) の有用性を確認して以来、一般的に非遺伝子領域の繰り返し配列であるマイクロサテライトを研究対象に選び、特に法医学領域の鑑定に重要である性染色体上のマイクロサテライトを法医学的、人類遺伝学的に検索してきた。

一般に法医試料を鑑定する場合、個人識別、性別判定を別途に求められることは少なく、同時の判定が求められる事が多い。「ヘテロであれば女性で2つ、男性で1つのアリルを持つ」というX染色体上のSTRをいくつか検索することで解決が可能となる。例えば、我々が検索を進めているX染色体上のSTRのなかでHUMARA (AGC)<sub>n</sub>領域には30ものアリルがあり、それだけでも高い個人識別能を有している。

一方、Y染色体上のDNA多型は父由来遺伝という点で、ミトコンドリアDNA塩基配列変異型が母親由来と同様に重要性が秘められている。Y染色体のSTRを検索することで性犯罪の証拠試料の検査で、男性由来の試料のみの多型で加害者を個人識別可能である。

親子鑑定 (父子鑑定) で児が男であるときは男一子のYの多型のみで肯定、否定が可能となる。

今回は、最近見出されたY染色体上の種々のマイクロサテライト (DYS388、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393) について

1) そのアリル数、2) 日本人のアリル頻度、3) ドイツ人との頻度の比較、4) 同一個体内での突然変異率を明らかにする。同一個体内での突然変異率を明らかにするため、分裂の速い、腫瘍細胞と正常細胞を比較して genomic DNAを比較検討する。

以上を目的として、科学研究費補助金の交付を受けた。

## 【研究組織】

研究代表者：塩野 寛 (旭川医科大学・医学部・教授)

研究分担者：佐々木雅弘 (旭川医科大学・医学部・助手)  
平成 11 年度のみ  
清水 恵子 (旭川医科大学・医学部・助手)  
平成 12 年度のみ  
上園 崇 (旭川医科大学 医学部 助手)

## 【研究経費】

平成 11 年度	2500 千円
平成 12 年度	1400 千円
合 計	3900 千円

---

## 研究課題：性染色体上のマイクロサテライトの多型性と同一個体での突然変異率の解析

### 【研究成果の概要】

#### (1) 性染色体上のマイクロサテライト

マイクロサテライト (Short Tandem Repeat) は繰り返しが比較的短く、DNAの低分子化が予想される古い試料への応用も可能であることなどより、法医学領域の個人識別法として有用である。中でも性染色体上のSTRは以下のような利点を持つ。

1. Y染色体上のSTRは父系遺伝を示すという性格上、ミトコンドリアDNAが母系遺伝するのに比較して父一男児の遺伝を確立する上で重要である。
2. Y染色体上のSTRは女性では対象となる領域を持たないため、性犯罪などで女性由来のコンタミネーションを考える必要が無い。
3. X染色体上のマイクロサテライト、伴性遺伝の原因究明や発生時の片方の不活化の問題などのルーツとなることが期待され、法医学的領域では性別判定や個人識別に有用である。
4. X、Y染色体上のマイクロサテライトとも法医学領域では性別判定への応用が考えられる。X染色体上のSTRを検索対象に用いた場合、女性なら2本男性なら1本の増幅バンドが出現することが期待され、個人識別と同時の性別判定が可能となる。

我々はY染色体上の5つのSTR (DYS388、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393) について日本人一般集団200人、ドイツ人111人を対象としてアليل頻度をもとめた。

5. 同一個体内での突然変異率を明らかにするため、分裂の速い、腫瘍細胞と正常細胞の変化率をみた。腫瘍細胞として子宮癌を選び、同一正常細胞との多型の突然変異の有無について検討した。

#### (2) 方法

Y染色体上のSTRではDYS388、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、X染色体上のSTRとしてアンドロゲンレセプターのエクソン1に存在するAR (CAG) と (GGC) に関して日本人200人とドイツ人111人を対象としてアليل分布を決定した。DNA抽出の方法はヨウ化ナトリウム法を用いた。これらを試料としてそれぞれの領域を増幅するプライマーを合成し、PCR増幅した。その後尿素を加えた6-

10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して繰り返し配列を決定した。アレル分析の方法は一度泳動した試料を長さに応じて並び替え、ラダーを作成し、そのうちのいくつかに関しては実際にシーケンスして反復回数を確認するという手順で行った。シーケンスの方法はDYE TERMINATOR REACTION KITを用いてABI社のキャピラリー式の自動シーケンサー（ABI 311）を用いて行った。

### (3) アレル分布

それぞれのSTRの分布を表1に示す。DYS388、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393はそれぞれ8、7、5、10、5のアレルの存在が確認された。このうちDYS390をのぞく、DYS388、DYS391、DYS392、DYS393では特定の1つのアレルに頻度が偏在し、法医学的応用は難しい事が明らかとなった。一方DYS390では、繰り返し数25に日本人頻度が35%を示したが、比較的平均的に分布し、法医学的応用が可能であった。

### (4) 同一個体内での突然変異率

1. 検索を行った25例中11例で腫瘍細胞の(CAG)<sub>n</sub>反復領域でアレル数の変動を確認した。
2. これらは全て正常細胞より繰り返し数を増加させる変化であった。
3. 変異が確認された症例に関しては全て、より長いアレルが実際に発現していた。
4. AR(CAG)<sub>n</sub>部位では他STR部位(0~26%)よりも高い変異率を示した事より、この部位の変異が腫瘍の発癌過程に関与している可能性が示された。
5. 各種の癌を対象として他のSTRを検索した報告では10~20%に不安定性が認められている。(CAG)部位の不安定性は比較的高いと考えられる。
6. STRを法医学的検索に用いる場合には生殖細胞中の変異率のみならず、体細胞中の変異をも考慮に入れる必要がある。

**Table 1.** 日本人とドイツ人のDYS388、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、の対立遺伝子の出現頻度

DYS388

繰り返し回数	日本人	ドイツ人
9	0.005	0.000
10	0.010	0.000
11	0.120	0.036
12	0.805	0.829
13	0.055	0.081
14	0.005	0.027
15	0.000	0.018
16	0.000	0.009
$\chi^2$ test in the two populations	n=200	n=111
0.001<p<0.025		

DYS390

繰り返し回数	日本人	ドイツ人
21	0.015	0.027
22	0.155	0.153
23	0.185	0.261
24	0.215	0.378
25	0.350	0.153
26	0.070	0.027
27	0.010	0.000
	n=200	n=111
$\chi^2$ -test in the two populations	p<0.001	

DYS391

繰り返し回数	日本人	ドイツ人
9	0.095	0.037
10	0.610	0.603
11	0.160	0.297
12	0.105	0.063
13	0.030	0
	n=200	n=111
$\chi^2$ -test in the two populations	p<0.001<0.01	

DYS 3 9 2

繰り返し回数	日本人	ドイツ人
7	0.005	0.009
8	0.005	0.009
9	0.000	0.000
10	0.085	0.018
11	0.530	0.523
12	0.145	0.108
13	0.205	0.279
14	0.020	0.027
15	0.000	0.018
16	0.005	0.009
	n=200	n=111
$\chi^2$ -test in the two populations	0.10 < p < 0.25	

DYS 3 9 3

繰り返し回数	日本人	ドイツ人
11	0.015	0.036
12	0.275	0.117
13	0.485	0.685
14	0.19	0.126
15	0.035	0.036
	n=200	n=111
$\chi^2$ -test in the two populations	0.001 < p < 0.01	

**Table 2. 繰り返し数に変動の見られた事例**

	genomic DNA		Hpa II		RNA	
	正常細胞	腫瘍細胞	正常細胞	腫瘍細胞	正常細胞	腫瘍細胞
case1	23、25	→ 24	23	→ 24	23	→ 24
case2	24	→ 24、29	24	→ 29	24	→ 29
case3	18、24	→ 23、24	18	→ 23	n t	
case4	24、25	→ 25	24	→ 25	n t	
case5	22、25	→ 25	25	→ 25	n t	
case6	22、23	→ 22、22、31	23	→ 31	23	→ 31
case7	25、27	→ 25、sema	25	→ s m e a	n t	
case8	22、26	→ sema (>30)	26	→ sema (>30)	n t	
case9	24、26	→ 26、>31	26	→ >31	26	→ >31
case10	22	→ 22、29	22	→ 29	22	→ 29
case11	22、26	→ 26	22	→ 26	n t	

## 【研究発表】

### 学会誌等

- 1) Sasaki, M. , Shiono, H. : The polymorphism of DYS 388 on the Y Chromosome in Japanese and German population. *Int J Legal Med*, 112(2), 132-133, 1999.
- 2) 水上 創、佐々木雅弘、上園 崇、塩野 寛 : Y染色体上に存在する STR の人類遺伝的考察. *DNA多型*、7、175-177、1999.
- 3) Sasaki, M. Dahiya, R. : The polymorphism of various short tandem repeats on the Ychromosome in Japanese and German populations. *Int J Legal Med*. 113(3), 181-188, 2000.
- 4) 水上 創、清水恵子、上園 崇、小川研人、斉藤 修、吉田将亜、塩野 寛、赤根 敦 : MN式血液型の変異型の解析. *DNA多型*、8、213-221、2000.
- 5) 赤根 敦、吉村澄孝、沖井 裕、吉田 学、時安太久磨、綿引利充、水上 創、塩野 寛 : MN式血液型M対立遺伝子の解析(2). *DNA多型*、8、222-224、2000.
- 6) Akane, A. , Mizukami, H. , Shiono, H. : Classification of Standard Alleles of MN Blood Group System. : *Vox Sanguinis* 79(3)183-187, 2000.
- 7) 水上 創、吉田将亜、斉藤 修、小川研人、上園 崇、清水恵子、塩野 寛 : DNA鑑定の威力.  
旭川医科大学研究フォーラム1、1-7、2000.

## 口頭発表

- 1) 水上 創、赤根 敦、塩野 寛、吉田将亜、小川研人、斉藤 修、上園 崇、清水恵子：グリコフォリンA遺伝子多型の細検討．第9回DNA多型学会．平成12年、横浜、2000．
- 2) 水上 創、赤根、塩野 寛、吉田将亜、小川研人、斉藤 修、上園 崇、清水恵子：MN式血液型の変異型の解析．第8回DNA多型学会．平11年、千葉、1999．