

性染色体上のマイクロサテライト の多型性とその遺伝的安定性 に関する研究

(課題番号 09670430)

平成9年度～平成10年度 科学研究費補助金
基盤研究 (C) (2)
研究成果報告書

平成11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 ~ 2
研究組織	3
研究経費	3
研究成果の概要	4 ~ 8
【研究発表】		
学会誌等	9
口頭発表	10
出版物	11
原著原稿・別刷の掲載	12 ~ 60

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。従来のサザン法を改変したフィンガープリント法に加え、鑑定の比較的困難な陳旧化した血痕、白骨死体、焼死体、脱落毛、精液など様々な法医学試料からDNAを精製し、種々のマイクロサテライト領域をポリアクリルアミド電気泳動法、塩基配列決定法を用いて解析することにより各種マイクロサテライトの法医学的有用性、人類遺伝学的特徴を検討してきた。

従来、法医学領域で個人識別などに用いられてきた多型マーカーは赤血球型、赤血球酵素型、白血球型、血清蛋白型が主体であった。これらはDNAレベルで考えると、エクソン上の多型を検索していることになる。ゲノムの90%以上は非翻訳領域が占めているので、DNA多型を用いることで、従来に比べ10倍以上の領域が検索可能となった。さらにこれらの領域は一般的に生物学的に淘汰を受けないので、従来の方法に比べ遥かに多彩な多型を示すことが多く、今まで以上に正確な個人識別が可能となった。特にマイクロサテライトは繰り返し配列が3～4と短いため、現在よく用いられているD1S80で増幅判定が困難な事例でも判定が可能となる可能性が高い。

一般に法医学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）_n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。また、Y染色体上のマイクロサテライトは人類遺伝学的な見地からすると、片親のみから遺伝するという点で、ミトコンドリアDNA塩基配列変異型が母系遺伝

の研究に重要であるのと同様にその重要性を秘めている。すなわち、Y染色体上のSTRを検索することで、性犯罪の証拠試料の検査や親子鑑定の父子鑑定で子が男の場合、男性試料由来のみの多型を判定することで鑑定可能となる利点がある。

ところで、これはSTR領域の形成に関わる問題でもあるが、減数分裂時のランダムな繰り返し数の増減する可能性が問題となる。すなわち突然変異の問題である。これは特に親子判定の際注意せねばならない問題であるが、これは精子を用いてミューテーションレートを確定する事で、その可能性の程度を確定する事が出来る。STR領域でどの位の頻度で突然変異が起きているかを明らかとする必要がある。しかし、最近加齢や発癌、あるいは特定の疾患に伴って遺伝的不安定性が高まるとの報告が相次ぎ、前述した生殖細胞内の遺伝性安定性とは別に体細胞内での遺伝性不安定性にも注意を払う必要がある。

常染色体領域のマイクロサテライトと比較し、さまざまな特徴を有する性染色体上のマイクロサテライトの法医学的有用性、また人種、民族形成の謎を探るといふ人類学的な試みに対する最適なルーツとしての有用性を検討することを目的とし、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）

福島 亨 （旭川医科大学・医学部・助手）

【研究経費】

平成 9年度 2,400 千円

平成 10年度 800 千円

合計 3,200 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その遺伝的安定性
に関する研究

【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 はその位置する染色体の特殊性から次のような有用性を有している。

1. Y 染色体上の STR は父系遺伝を示すという性格上、ミトコンドリアで検索されたいわゆるアフリカのイブと全く反対の男性のルーツ、人類遺伝学的研究のルーツとなる。
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。

これまで Y 染色体上の多型を示す部位を検索する試みはいくつも行われてきたが、Y 染色体は常染色体、X 染色体と比べて、例外的に多型を示すことが非常に少ないとのマラスピナらの報告にもあるように、STR 領域はこれまで知られている限り 27H39 しか存在しなかった。いくつかの地域を対象とした研究でこの領域 27H39 のアリル分布は報告されたが、基本的にわずか 5 つ程度のアリルのみが存在し、また 1 つのアリルに 40 ~ 50 % も集中しており、個人識別の有用性は高いとはいえなかった。

X 染色体上の STR は、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、法医学領域では性別判定や個人識別に有用である。

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。性別判定を行う場合、アメロゲニン等の X、Y 両染色

体に存在する領域を判定に用いるとシングルコピーのため判定効率が落ち、逆にマルチコピーの領域を検索対象とすると、X染色体上の領域が増幅されない事より、PCR増幅が不可能であった場合と女性であった場合との判別がつけにくいという問題が生じた。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、個人識別と同時に性別判定が可能となるが、それはHETEROZYGOSITYが十分に高いという条件を満たしていなければならない。現在まで最も詳細にアレル分布が解析された領域はHPR T遺伝子の4塩基反復の領域であるが、この領域にはわずか5つのアレルのみが存在し、また1つのアレルに全体の40%もが集中するため、識別の精度は高くはなかった。近年、性染色体上のマイクロサテライトが新しくいくつかが報告された事より、我々は以下に述べる領域を日本人、ドイツ人を対象として検索した。

2) 方法

Y染色体上のSTRではDYS 384、DYS 388、DYS 389、DYS 390、DYS 391、DYS 392、DYS 393、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177人を対象としてアレル分布を決定した。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クエンスして反復回数を確認するという手順で行った。シークエンスの方法はDYE TERMINATOR REACTION KITを用いてABI社のキャピラリー式の自動シークエンサー (ABI 311) を用いて行った。

3) アリル分布

それぞれのSTRの分布を表にして示す。DYS388、DYS389、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393でそれぞれ6、10、8、10、6、6のアリルの存在が確認された。このうちDYS388、DYS391、DYS392、DYS393では特定の1つのアリルに頻度が偏在し、法医学的応用は難しい事が明らかになった。DYS384に関しては20近くもの多数のアリルが確認されたが、女性由来の試料からでもバンドの増幅が確認される事、男性で2つのアリルを所持するものが存在する事などから、完全なるY染色体特異性を有していない事が明らかとなった。これらの結果を他文献よりの報告と比較検討するとDYS388、DYS392は日本人のアリル頻度は中国人集団、モンゴル人集団、台湾少数民族集団（アミ族）のそれとは大きく異なっており、「日本人の起源、アジア諸国での遺伝子移行性」の検索などの人類遺伝学的応用が可能である事が明らかとなった（Table 1,2）。

4) 親子鑑定への応用

実際の親子鑑定に応用した。「判定例1」は子どもが男性の場合の鑑定例である。Y染色体上のマイクロサテライトを検索することにより、配偶者のアリルを考慮に入れる必要がなくなる。27H39での検索の場合、伝わったアリルがBなので40～50%の男性が該当するが、今回調べたSTRで検索するとそれぞれ4～20%と該当者を絞り込むことが可能になる。「判定例2」は子どもが女性の場合の鑑定例である。X染色体上のSTRを検索することにより該当男性が有する1つのアリルが伝わっているかどうかのみが問題になる。これまで最も検索が進んでいる領域、HPRTで検索した場合40%程度が該当するが、AR(CAG)nでの検索では7%程度にまで絞り込むことが可能となった。

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

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	0.35	0.153
26	0.07	0.027
27	0.01	0
	n=200	n=111
χ^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	0.61	0.603
11	0.16	0.297
12	0.105	0.063
13	0.03	0
	n=200	n=111
χ^2 -test in the two populations 0.001<p<0.01		

DYS393

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
χ^2 -test in the two populations 0.001<p<0.01		

Table 2. DYS 388 及び DYS 392 のアリル分布

DYS 388

number of repeats	Japanese	German	Catalans*	Basques*
9	0.005	0.000	0.000	0.000
10	0.010	0.000	0.000	0.000
11	0.120	0.036	0.030	0.000
12	0.805	0.829	0.860	0.890
13	0.055	0.081	0.030	0.060
14	0.005	0.027	0.030	0.020
15	0.000	0.018	0.030	0.040
16	0.000	0.009	0.000	0.000
	n=200	n=111	n=29	n=53
				*de Kayser et al.

DYS 392

number of repeats	Japanese	German	Chinese*	Mongolian*	Ami*
7	0.005	0.009	0.000	0.000	0.000
8	0.005	0.009	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.085	0.018	0.000	0.000	0.000
11	0.530	0.523	0.080	0.720	0.140
12	0.145	0.108	0.050	0.020	0.000
13	0.205	0.279	0.310	0.070	0.710
14	0.020	0.027	0.500	0.150	0.000
15	0.000	0.018	0.050	0.000	0.140
16	0.005	0.009	0.000	0.020	0.000
	n=200	n=111	n=36	n=40	n=7
				*de Kayser et al.	

【研究発表】

学会誌等

- 1) 佐々木雅弘、塩野 寛、清水恵子、福島 亨：多色ポストラベル法によるDNA多型検索。法医学の実際と研究, 40, 29-31, 1997.
- 2) Matsuda, T., Sasaki, M., Kato, H., Yamada, H., Cohen M., Barrett JC., Oshimura, M., Wake, N. : Human chromosome 7 carries a putative tumor suppressor gene(s) involved in choriocarcinoma. *Oncogene*, 15, 2773-2781, 1997.
- 3) Sasaki, M., Shiono, H., Fukushima, T., Shimizu, K. : Human identification by genotyping of personal articles. *Forensic Sci. Int.*, 90, 65-75, 1997.
- 4) 佐々木雅弘、清水恵子、福島 亨、塩野 寛、石川睦夫、藤本征一郎：STRと関連疾患での遺伝性不安定性。DNA多型, 6, 10-11, 1998.
- 5) Sasaki, M., Ishikawa, M, Fujimoto, S., Shiono, H., : Several STR Markers and Their Genetic Instabilities in Some Related Diseases. *Progress in Forensic Genetics 7 (Proc. 17th Int. ISFH Congress, Oslo, 2-6 September 1997)*, Elsevier, 469-470, 1998.
- 6) Sasaki, M., Shimizu, K., Fukushima, T., Shiono, H. : Unnecessary Surgical Operation Confirmed by Individual Identification by Analyses of Several Short Tandem Repeat (STR) Loci. *Jpn. J. Legal Med.*, 52(4), 257-260, 1998.

口頭発表

- 1) 佐々木雅弘、清水恵子、福島 亨、塩野 寛：STRと関連疾患での遺伝性不安定性．第81次日本法医学会総会（H9.4.16-18），鹿児島，1997.
- 2) 塩野 寛：特別講演「DNA多型と個人識別 —58億分の1の識別は可能か—」．日本小児科学会北海道地方会 第48回ブロック大会（H9.8.31），札幌，1997.
- 3) 佐々木雅弘、石川睦夫、藤本征一郎、塩野 寛：STRと関連疾患での遺伝性不安定性．第6回DNA多型学会（H9.12.4-5），長崎，1997.
- 4) Sasaki, M., Ishikawa, M., Fujimoto, S., Shiono, H. : Several STR markers and their genetic instabilities in some related diseases. 17th International Congress for Forensic Haematogenetics, Norway, 1997.
- 5) Sasaki, M., Ishikawa, M., Fujimoto, S., Shiono, H. : Genetic Instability of short tandem repeats of the Androgen Receptor Gene in human endometrial carcinoma. 29th annual meeting of the european society of human genetics, Italy, 1997.
- 6) 佐々木雅弘、湯浅 勲、清水恵子、福島 亨、塩野 寛：Y染色体上 Short Tandem Repeat の地域的移行性．第6回DNA多型学会（H9.12.4-5），長崎，1997.
- 7) 水上 創、佐々木雅弘、塩野 寛：Y染色体上に存在するSTRの人類学的考察．第7回DNA多型学会（H10.12.3-4），松本，1998.

出版物

- 1) Sasaki, M., Shiono, H. : ABO genotyping of suspects from sperm DNA isolated from the post-coital samples of sexual crimes. Research reports of the Akiyama foundation. 6, 74-77, 1997.
- 2) 塩野 寛、佐々木 雅弘、清水恵子：親子鑑定と遺伝子診断．周産期医学, 27(1), 47-51, 1997.
- 3) Sasaki, M., Shiono, H., Shimizu, K., Fukushima, T. : Several STR Loci on Sex Chromosomes. Advance in Research on DNA Polymorphisms, 133-134, 1997.
- 4) 塩野 寛：法医学 —推理する医学—．羊土社, pp142, 1998.
- 5) 佐々木 雅弘、塩野 寛：S T R解析法（マイクロサテライト）．呼吸器疾患の分子生物学, 医学書院, 327-329, 1998.