

## 1 研究課題名

ハプロタイプ解析による生物学的資料の個人識別に関する研究

## 2 研究担当者

主担当者氏名 中原 弘明 法科学第一部  
他研究員 4名

## 3 研究期間

平成22年4月 ～ 平成26年3月（4年計画）

## 4 研究予算

平成22年度 44,520千円  
平成23年度 40,985千円  
平成24年度 38,129千円  
平成25年度 37,261千円

## 5 研究の目的

一塩基多型（SNP）検査は、現行の繰り返し多型による個人識別法と比較して、より断片化したDNAからでも型判定が可能となることが期待されている一方で、対立遺伝子が二つしか存在していないために混合した試料の判別が困難であるという欠点を持つ。法科学的DNA型検査のためには、混合資料の判別は重要であることから、SNP型検査の利点は、そのまま生かしつつ、混合資料の判別が可能となる技術の開発を行う。

## 6 成果

### (1) 当初予定していた成果

SNPデータベースより選び出した27部位のうち、HRM法による多型性の推定とダイレクトシーケンス法による確認を併用することで、最終的に3型以上のハプロタイプを含む座位を7部位特定することができた。それらの7部位について、日本人116名以上の塩基配列を解析し、ハプロタイプの確認及び頻度データを得ることができた。その内、第一染色体FAM129A領域、第三染色体histone acetyltransferase KAT2B領域、及び第20染色体Syndecan4領域に存在する部位は、それぞれ、3つのハプロタイプが、第一染色体COG2領域、第10染色体CUGBP Elav-like family member2領域、第11染色体ATP-binding cassette, subfamily C, member8領域及び第14染色体neuronal PAS domain protein3領域に存在する部位からは4つのハプロタイプが確認された。なお、全てのハプロタイプ部位は、直接遺伝子発現にかかわらないイントロン領域上に存在している。得られた頻度データから個々の部位のハプロタイプによる個人識別力を算出したところ、PD値は0.744~0.860となり、一番高いものでは現行のSTR型検査の座位に匹敵するものもあった。アレル数の豊富な繰り返し多型においては、複

数人由来の DNA が混合していた場合に 3 つ以上のアレルが同時に検出されることでそのことを判断できる。ハプロタイプ部位の場合でも、3 つ以上のハプロタイプが検出されれば、DNA 資料の混合を判断することが可能であると考えられたことから、得られた頻度データより、二人に由来する DNA が混合した場合、どれぐらいの確率で 3 つ以上のハプロタイプが検出され得るかを算出した。その結果、個々の部位では 24.4～56.5%、7 部位すべてを検査することで、95.4%の確率で少なくともいずれかの部位で 3 つ以上のハプロタイプが検出され、DNA が混合していることがわかると推定された。

## (2) 当初予定していなかったが副次的に（あるいは発展的に）得られた成果

現在、当研究室で主要な塩基配列解析法として通常使用しているサンガー法によるダイレクトシーケンス法では、検査部位の遺伝子型がヘテロ型として検出された場合に個々のハプロタイプを決定することは困難であることは、当初より想定されていた。一方、一分子単位で塩基配列解析を行うことが可能な次世代シーケンス法を用いれば、この問題点は解決されることも予測されていたものの、研究開始当初は本研究室で次世代シーケンス装置を保有しておらず、利用が不可能であった。しかし、研究期間内に試験的に次世代シーケンス法を使用する機会が得られたことから、一部の部位について実際に検査を実施した。その結果、実験的に混合させた DNA サンプルから、想定通りにハプロタイプが混在する状態が定量的に検出された。一方、手技的な限界により、必ずしも本来の DNA の混合比率が結果に反映されない、また本来存在していないはずの塩基配列も多く検出されるといった問題点も同時に見出され、将来的には判定基準の設定など、新たな課題も浮き彫りとなった。

さらに、本研究で特定されたハプロ座位のうちの一部（COG2 遺伝子内イントロン）が、2015 年に Kidd らによる検証の一部に採用され、これらのハプロタイプが人類遺伝学的にも応用可能であることが示された。

## (3) 当初想定していたが得られなかった成果

ハプロタイプの同定と平行して、インベーター法による SNP 型検査をデジタル PCR に応用することで、次世代シーケンス法を使用しなくとも定量的な SNP 型判定が可能となり、それにより資料 DNA の混合判断ができないかと期待されたが、インベーター法の反応条件設定と、判定基準の策定に想定以上の時間を要し、研究期間内に十分な成果を得ることができなかった。

## 7 成果の発表

### (1) 論文・総説・著書 (Publication to academic journals)

- 1) 一塩基多型のハプロタイプ解析による個人識別の検討. 中原弘明, 藤井宏治, 北山哲史, 岩嶋泰樹 & 関口和正 (2013) DNA 多型, 21, 218-223.
- 2) Approaches for identifying multiple-SNP haplotype blocks for use in human identification. H. Nakahara, K. Fujii, T. Kitayama, K. Sekiguchi, H. Nakanishi &

K. Saito (2015) Legal Medicine (in press).

(2) 学会における口頭発表 (Oral presentation at the academic meeting and conference)

- 1) 断片化 DNA からの STR 型及び SNP 型検出結果の比較. 中原弘明, 北山哲史 & 関口和正 (2011) 第 80 回日本法医学会学術関東地方集会, 29.
- 2) Comparison of detection rate between SNP and STR for typing of degraded DNA. Kitayama, T., H. Nakahara, S. Inokuchi, K. Fujii, N. Mizuno, K. Sekiguchi & K. Kasai (2011) 22nd International Symposium on Human Identification, 80.
- 3) 一塩基多型のハプロタイプ解析による個人識別の検討. 中原弘明、藤井宏治、北山哲史、岩嶋泰樹、関口和正. 2012. In 日本 DNA 多型学会誌第 21 回学術集会抄録集, 78.
- 4) 混合資料の DNA 型鑑定結果の評価について. 関口和正. 2012. 日本法科学技術学会誌 17, 25.
- 5) 混合資料の DNA 型鑑定における微量 DNA の課題. 関口和正. 2013. 日本法科学技術学会誌, 18, 27.
- 6) Human DNA identification involving the analysis of haplotypes containing multiple single nucleotide polymorphisms. Nakahara, H., K. Fujii, T. Kitayama, Y. Iwashima & K. Sekiguchi. (2013). 25th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, 139. Melbourne, Australia.
- 7) High Throughput SNP Typing Based on Invader Assay on Integrated Fluidic Circuits. Nakahara, H., K. Fujii, T. Kitayama & K. Sekiguchi. (2013). American Academy of Forensic Sciences, 65th Anniversary Meeting, A48.

(3) 招待講演 (Invited oral presentation at the academic meeting and conference)

- 1) Forensic DNA Typing for mixture samples in Japanese police laboratories. Sekiguchi, K. (2014) 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine, S2-4. Fukuoka.