

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	原 山 雄 太
論文審査担当者	主 査 花 岡 正 幸 副 査 中 山 淳 ・ 野 見 山 哲 生
論文題目	Analysis of Y chromosome haplogroups in Japanese population using short amplicons and its application in forensic analysis (短鎖増幅産物を応用した日本人集団の Y 染色体ハプログループの解析と法医学試料の解析への応用)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景・目的】 今日、DNA 型解析による個人識別は法医学分野において極めて一般的となっている。しかしながら、法医実務では、腐敗・変性等の影響を受けた劣化 DNA 試料を扱うことがあり、市販されている個人識別キットでは解析が困難な場合が少なくない。加えて、検査できる DNA 量が微量であることもしばしばである。</p> <p>一方、Y 染色体上にある男性特有の領域は組換えがなく、突然変異が起こりにくいことから男系血縁の身元確認に用いられる。現在 Y 染色体上の SNP 変異を用いることで、約 300 の系統分類としてのハプログループ分類が可能である。本研究は、日本人に特異的な Y 染色体のハプログループに着目し、法医実務試料に対応可能なハプログループ分類のためのシステムを構築することを目的とした。劣化した DNA 試料は高度に断片化されていることから、PCR 産物の短鎖化を行うとともに、微量な DNA 試料を解析し、同時に複数の SNP を解析するマルチプレックスシステムを構築し、法医実務試料に対する有効性について検討した。</p> <p>【方法】 日本人に変異が多いと推測される Y 染色体上の 22 個の SNP を、3 つのマルチプレックス PCR 法により分類するシステム (システム 1~3) を構築した。システム 1 により日本人を大別し (ハプログループ C, D, D1, D2, D3, O, O1a, O2, O3, N, Q を分類する)、システム 2 によりハプログループ D2 の細分化、システム 3 によりハプログループ O2 の細分化を行った。いずれの SNP 解析も、法医実務試料で散見される断片化した DNA の解析のため、可能な限り短い PCR 増幅産物(77~150bp)を生成するプライマーを新たに設計して施行した。これらのシステムを用いて、血縁関係のない日本人男性 432 人の血液或いは口腔粘膜細胞を用いて分類を行い、その頻度を確認した。また、DNA を人工的に分解させた試料及び劣化が予想される硬組織から抽出した DNA について、現在市販されている Y 染色体の検査試薬 (AmpFISTR Yfiler Kit) と、本システムの比較検討を行った。</p> <p>【結果】 今回新たに構築した 3 つのマルチプレックスシステムが良好に機能することを確認した。日本人 432 人の分類では、全 13 のハプログループに分類することができたが、0.9% (4 人) には変異が認められず、分析の標的とは異なるハプログループに属すると推定された。高度に劣化している DNA 試料を用いて、本システムの有効性を検討したところ、市販の AmpFISTR Yfiler Kit を用いた解析では高分子領域で極端に PCR 増幅効率が低下し判定が困難であったのに対し、本システムではこれらの劣化試料に対して有効な解析結果を得ることができた。</p> <p>【考察】 組換えや突然変異の少ない Y 染色体上の SNP を用いることは、男系の血縁関係の推定に極めて効果的であると考えられ、今回複数の SNP を迅速に解析できるシステムを構築した。現在汎用されている Y 染色体の検査試薬と本システムの劣化 DNA の解析では、検査試薬である AmpFISTR Yfiler Kit は高分子領域の解析が不良な傾向にあった。原因として、高度に劣化した DNA 試料は様々な要因により DNA の断片化が進んでいるためと考えられる。一方、今回構築したシステムは短い PCR 増幅産物を解析対照とすることで高度に断片化した DNA の解析においても有効な結果が得られ、法医学的試料に適した検査方法であることが示唆された。また、ミトコンドリア DNA などの SNP 解析を併用することにより、劣化試料において、個人識別能力が飛躍的に向上すると考えられる。</p>

