

## 日本DNA多型学会第14回学術集会ご案内(第3報)

平成17年11月吉日

会員のみなさまにおかれましては益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。このたび、日本DNA多型学会第14回学術集会へのご参加、演題登録をいただき誠にありがとうございました。下記の日程・要領で開催いたします。また、抄録が出来ましたので、PDFファイルをダウンロードしてご覧下さい。皆様方のご来場をお待ち申し上げます。

開催日時：平成17年11月24日(木)、25日(金)

会場：群馬会館

〒371-0026 群馬県前橋市大手町2丁目1番地1号

TEL/FAX：027-221-0813 (学会直通)

<http://www5.wind.ne.jp/maebashi-convention-bureau/welcome/gunma.htm>

<http://www.pref.gunma.jp/a/11/a1100209.htm>

JR 両毛線前橋駅下車バス約6分、またはJR 新前橋駅下車バス約7分  
関越自動車道前橋インターチェンジから国道17号経由約10分

### 1 プログラムの概要(予定)

第1日 11月24日(木)

8:30 開場  
9:45 開会式(2階ホール)  
10:00～11:30 展示発表(1階広間)  
12:00～13:00 評議員会(地階第1会議室)  
12:00～13:00 テクニカルセミナー(1階広間)  
13:30～17:40 口演発表(2階ホール)  
18:00～ 懇親会(1階広間)

第2日 11月25日(金)

9:30～11:30 展示発表(1階広間)  
13:00～13:30 総会(2階ホール)  
13:30～14:00 口演発表(2階ホール)  
14:10～15:10 シンポジウム(2階ホール)  
15:30～ 学会賞授与式、次期会長挨拶および閉会式(2階ホール)

## 2 参加手続き

参加申し込みは8月31日をもって終了いたしました。当日参加ができますので、会場にいらしてください。非学会会員の方も参加できます。

## 3 当日参加の参加費等の支払い

当日参加の方は会場受付で、学術集会参加費4,000円、懇親会費5,000円をお支払い下さい。

## 4 発表される方へ

### 1) 口演発表

発表7分、質疑応答3分を予定しております。発表スライドはコンピュータ(1台)からの直接出力し、Windows XP、PowerPoint 2002 (Office XP) (Microsoft 社) で作動させます。発表スライドはPowerPoint で作成して下さい。Windows で作成したスライドをCD-R にファイルし、11月17日(必着)までに学術集会事務局にお送り下さい。

スライド作成に際しては、下記の項目に注意して下さい。

注1: 標準以外のフォントや外字は使用しないで下さい。

注2: 写真スライドによる発表および動画は受け付けません。

注3: Windows XP、PowerPoint 2002 (Office XP) で作動するコンピュータを用いて、スライドが作動することを確認して下さい。

会場には、ご送付頂いたスライドをファイルしたパソコンを準備いたしますので、口演発表30分前には作動を確認して下さい。

なお、スライドのコマ送りは事務局で行います。

### 2) 展示発表

発表3分、質疑応答2分を予定しております。展示スペースは、縦200cm、横90cmで、ボードの色は淡い青色です。なお、左上隅の縦20cm、横25cmは演題番号表示に使用致します。演題番号札は事務局で用意します。

ポスターの貼り付けは11月24日(木)午前8時30分から午前10時までにお問い合わせいたします。また、撤去は11月25日(金)午後3時から午後4時までにお問い合わせいたします。

## 5 「DNA多型Vol. 14」の原稿作成

第14回学術集会の発表内容を、例年通り「DNA多型Vol. 14」として刊行を予定

しております。記載様式等は同封の注意事項、投稿規定等をご参照下さい。原稿、原稿を入力した CD-R および著作権の委譲承諾書は学術集会当日、必ず受付へ提出して下さい。

プログラムは送付しません。なお、参加証、領収書および抄録集などは、当日受付でお渡し致します。

日本DNA多型学会第14回学術集会

大会長 岸 紘一郎

事務局連絡先：〒371-8511 前橋市昭和町3-39-22  
群馬大学大学院医学系研究科生態防御機構学講座  
病態遺伝法医学分野  
日本DNA多型学会第14回学術集会  
事務局；小湊 慶彦、中島たみ子  
TEL: 027-220-8033  
FAX: 027-220-8035  
E-mail: dnapol@med.gunma-u.ac.jp

= ご提出いただくもの =

☆ 学会当日提出書類(チェックリスト 11月25日まで)

- 1) 「DNA多型」収載原稿の CD-R ファイル
- 2) 「DNA多型」収載原稿のプリントアウト
- 3) 著作権の委譲承諾書

学会賞に関する実施細則の変更

日本DNA多型学会賞受賞者審査選考実施細則中、「優秀研究賞選考基準」の一部が下記のように変更になりました (DNA多型 Vol.13, p.307)。ご注意下さい。

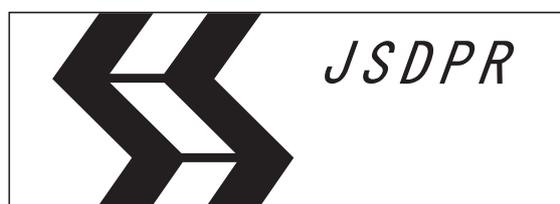
『第5条、第5項 受賞式において、該当候補者（共同演者を含む）が不在の場合は辞退とみなし、受賞を取り消すことがある。この際に次点演題を繰上げ受賞する。この決定は学会長が行う。』

# DNA POLYMORPHISM

## 第14回学術集会 抄録集

2005年11月24日(木)～25日(金)

前橋市 群馬会館



日本DNA多型学会



# 日本DNA多型学会第14回学術集会

会 期： 平成17年11月24日(木)、25日(金)

会 場： 群馬会館

〒371-0026 群馬県前橋市大手町2丁目1番地1号

TEL/FAX：027-221-0813(学会直通)

<http://www5.wind.ne.jp/maebashi-convention-bureau/welcome/gunma.htm>

<http://www.pref.gunma.jp/a/11/a1100209.htm>

大会長： 岸 紘一郎

群馬大学大学院医学系研究科生態防御機構学講座病態遺伝法医学分野

〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22

TEL：027-220-8033

FAX：027-220-8035



# 目 次

会場案内（群馬会館）..... p.1～2

お知らせとお願い..... p.3～4

プログラム 概要..... p.6

学会功績賞授与式..... p.7

シンポジウム..... p.8

口演発表..... p.9～13

展示発表.....p.14～20

テクニカルセミナー.....p.21

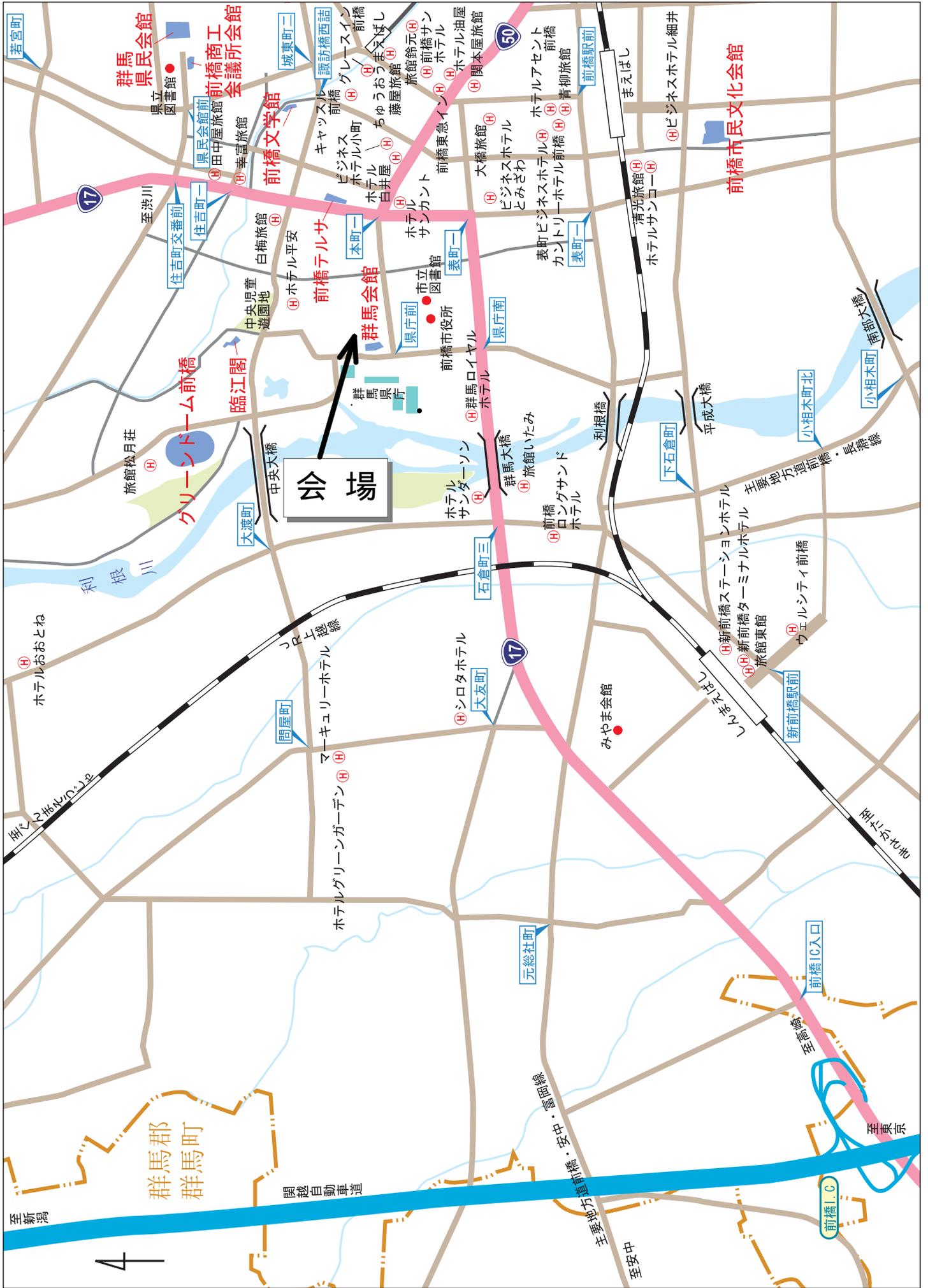
抄録 シンポジウム.....p.22～24

口演発表.....p.26～51

展示発表.....p.52～92

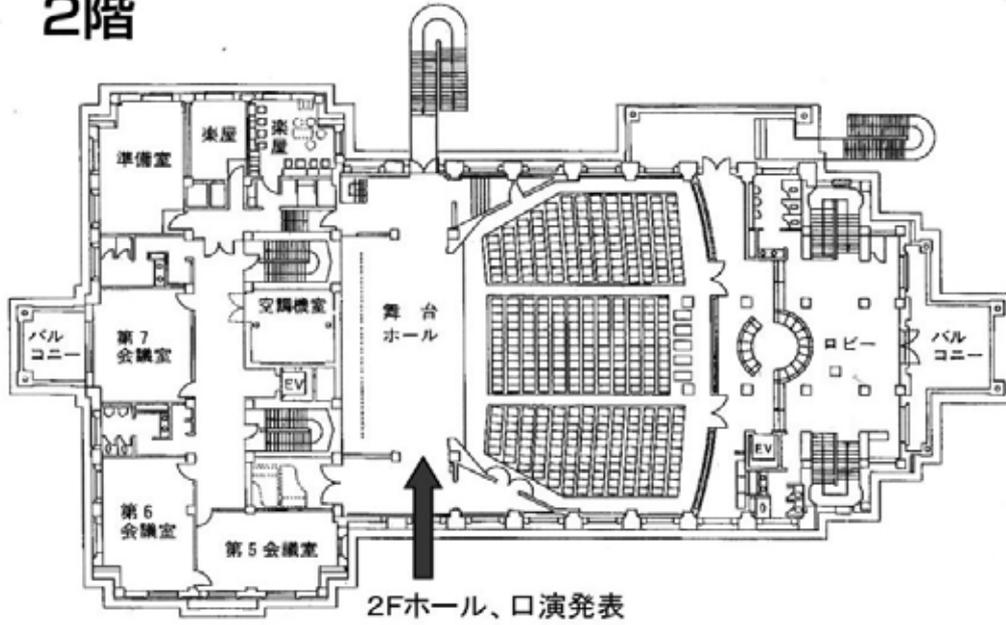
テクニカルセミナー.....p.94

# 会場(群馬会館)周辺地図

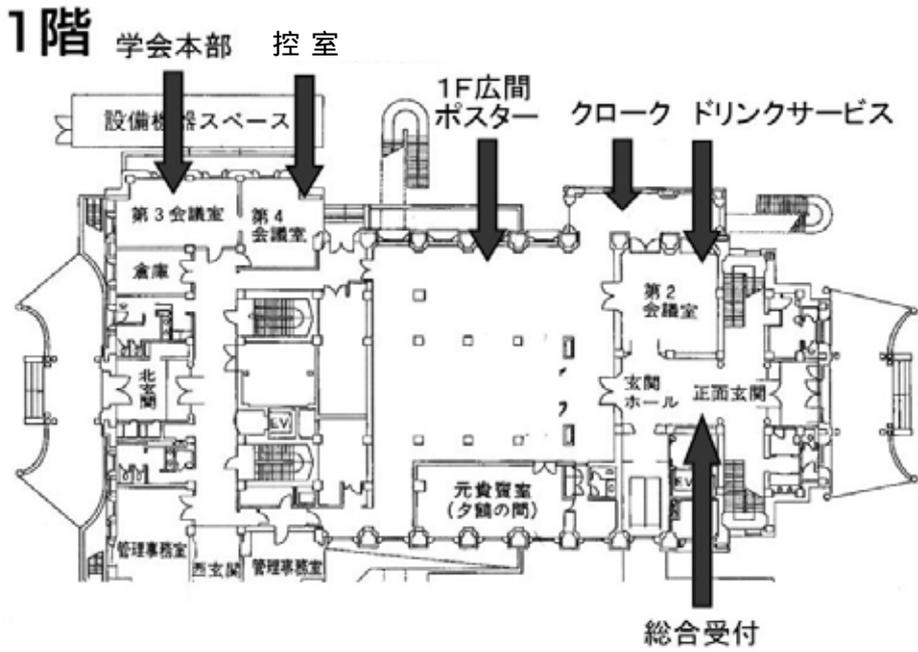


4

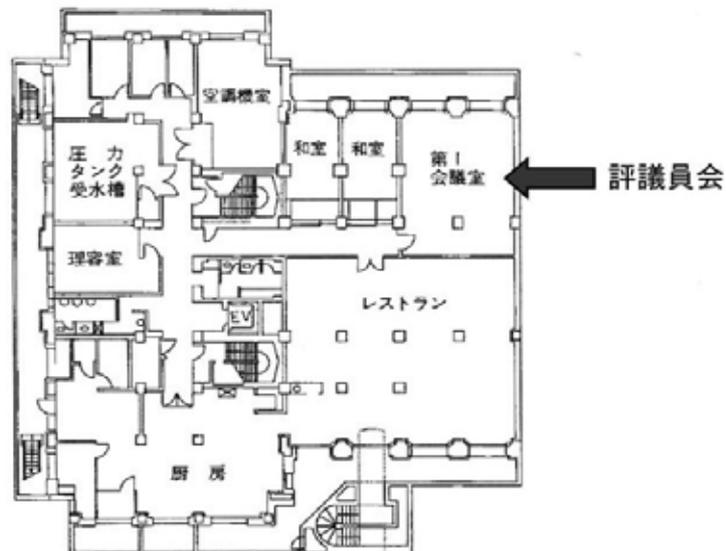
2階



1階



地階



# お 願 い

## 1) 口演発表、展示発表およびシンポジウム発表者の方へ

『DNA多型学会Vol.14』掲載原稿、原稿を入力したCD-Rおよび著作権の委譲承諾書等を学術集会受付(1階玄関ホール)へ提出して下さい。

## 2) 口演発表される方へ

会場は群馬会館2階ホールです。

発表7分、質疑応答3分を予定しております。発表スライドはコンピュータ(1台)からの直接出力で行い、Windows XP、PowerPoint 2002(Office XP)(Microsoft社)で作動させます。学術集会受付(1階玄関ホール)に、ご送付頂いたスライドをファイルしたパソコンを準備いたしますので、口演発表30分前には作動を確認して下さい。なお、スライドのコマ送りは事務局で行います。

## 3) 展示発表される方へ

会場は群馬会館1階広間です。

11月24日(木)8:30~10:00に、ポスターをお貼りください。

展示スペースは、縦200cm、横90cmです。なお、左上隅の縦20cm、横25cmに演題番号を表示してあります。

発表3分、質疑応答2分をお願いします。

撤去は11月25日(金)15:00~16:00をお願いします。

## 4) シンポジウムで発表される方へ

会場は群馬会館2階ホールです。

発表20分を予定しております。発表スライドはコンピュータ(1台)からの直接出力で行い、Windows XP、PowerPoint 2002(Office XP)(Microsoft社)で作動させます。学術集会受付(1階玄関ホール)に、ご送付頂いたスライドをファイルしたパソコンを準備いたしますので、口演発表30分前までに作動を確認して下さい。なお、スライドのコマ送りは事務局で行います。

## 5) 懇親会へ参加される方へ

懇親会日時：11月24日(木)18:00

会場：群馬会館1階広間

会費：5000円

## 6) テクニカルセミナーへ参加される方へ

日時：11月24日(木)12:00~13:00

会場：群馬会館1階広間

昼食：先着70名までの参加者にお弁当とお茶を無料配布します。

# お知らせ

- |    |                                           |           |             |                 |
|----|-------------------------------------------|-----------|-------------|-----------------|
| 1  | 評議員会(第30回)<br>(現評議員及び監事の先生方のみご参集下さい)      | 11月23日(水) | 17:00~18:00 | 群馬会館<br>地階第1会議室 |
| 2  | 開場                                        | 11月24日(木) | 8:30        |                 |
| 3  | 受付                                        | 11月24日(木) | 8:45 ~      | 1階玄関ホール         |
| 4  | 開会式                                       | 11月24日(木) | 9:45 ~      | 2階ホール           |
| 5  | 総会及び功績賞授与式                                | 11月25日(金) | 13:00~13:30 | 2階ホール           |
| 6  | 評議員会(第31回)<br>(新評議員及び監事に選出された先生方のみご参集下さい) | 11月24日(木) | 12:00~13:00 | 地階第1会議室         |
| 7  | 懇親会                                       | 11月24日(木) | 18:00~      | 1階広間            |
| 8  | 口演発表                                      | 11月24日(木) | 13:30~17:40 | 2階ホール           |
|    |                                           | 11月25日(金) | 13:30~14:00 | 2階ホール           |
| 9  | 展示発表                                      | 11月24日(木) | 10:00~11:30 | 1階広間            |
|    |                                           | 11月25日(金) | 9:30~11:30  | 1階広間            |
| 10 | シンポジウム                                    | 11月25日(金) | 14:10~15:10 | 2階ホール           |
| 11 | テクニカルセミナー                                 | 11月24日(木) | 12:00~13:00 | 1階広間            |
| 12 | 学会賞授与式、次期大会長挨拶及び閉会式                       | 11月25日(金) | 15:30~      | 2階ホール           |

## 学会賞の規定の変更

日本DNA多型学会賞受賞者審査選考実施細則の中の、「優秀研究賞選考基準」の一部が下記のように変更になりました(DNA多型 Vol.13, p.307)。ご注意下さい。

### 『第5条、第5項

受賞式において、該当候補者(共同演者を含む)が不在の場合は辞退とみなし、受賞を取り消すことがある。この際に次点演題を繰上げ受賞する。この決定は学会長が行う。』



プログラム



# プログラム概要

## 第1日 11月24日(木)

- 8:30 開場
- 8:45 受付
- 9:45 開会式 (2階ホール)
- 10:00~11:30 展示発表 P1~P17 (1階広間)
- 12:00~13:00 評議員会 (地階第1会議室)
- 12:00~13:00 テクニカルセミナー (1階広間)
- 13:30~17:40 口演発表 1~23 (2階ホール)
- 18:00~ 懇親会 (1階広間)

## 第2日 11月25日(金)

- 9:30~11:30 展示発表 P18~P41 (1階広間)
- 13:00~13:30 総会及び功績賞授与式 (2階ホール)
- 13:30~14:00 口演発表 24~26 (2階ホール)
- 14:10~15:10 シンポジウム S1~S3 (2階ホール)
- 15:30~ 学会賞授与式、次期大会長挨拶及び閉会式  
(2階ホール)

学会功績賞授与式 (2階ホール)

第2日目 11月25日(金)

13:00~13:30

受賞者(年齢順)

松本秀雄先生  
(前大阪医科大学教授)

三澤章吾先生  
(前筑波大学教授)

原田勝二先生  
(前筑波大学教授)

## シンポジウム (2階ホール)

第2日目 11月25日(金)

### 『ヒト多型学の進歩2005』

14:10~14:30

座長 梅津和夫(山形大学医学部 法医病態診断学分野)

S1 Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) 等電点電気泳動と遺伝子解析

湯浅 勲

(鳥取大学医学部法医学分野)

14:30~14:50

座長 神田芳郎(久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座)

S2 ABO式血液型遺伝子上流域多型と転写調節

小湊慶彦

(群馬大学大学院医学系研究科病態遺伝法医学)

14:50~15:10

座長 鈴木廣一(大阪医科大学法医学教室)

S3 ヒトDNase Iの分子多様性と心疾患

安田年博

(福井大学医学部病態遺伝生化学)

15:30~ 学会賞授与式、  
次期大会長挨拶(矢野 博:近畿中国四国農業研究センター)  
及び閉会式(2階ホール)

## 口演発表 (2階ホール)

### 第1日目 11月24日(木)

13:30~14:10 DNAデータベース

座長 斎藤成也 総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻および  
国立遺伝学研究所

- 1 Y染色体上の多型性の変異率について -家族ドナープールの必要性-  
出羽厚二、鷲見博和、内藤笑美子、徐 紅徳、福田祐明、山内春夫  
(新潟大学大学院医歯学総合研究科法医学分野)
- 2 APLP法によるミトコンドリアハプログループの東アジア集団における出現  
頻度  
梅津和夫<sup>1</sup>、湯浅 勲<sup>2</sup>、安達 登<sup>3</sup>、三好 綾<sup>4</sup>、渡辺剛太郎<sup>5</sup>、  
田中雅嗣<sup>6</sup>、大澤資樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山形大・医・法医病態診断学、<sup>2</sup>鳥取大・医・法医学、<sup>3</sup>東北大・  
医・人体構造、<sup>4</sup>福岡大・医・法医学、<sup>5</sup>山形県警本部科学捜査研  
究所、<sup>6</sup>東京都総合老人研究所)
- 3 北海道縄文・続縄文人骨のミトコンドリアDNA解析  
安達 登<sup>1</sup>、篠田謙一<sup>2</sup>、梅津和夫<sup>3</sup>、坂上和弘<sup>1</sup>、大島直行<sup>4</sup>、  
百々幸雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大・医・人体構造、<sup>2</sup>国立科学博物館・人類研究部、<sup>3</sup>山形大・  
医・法医病態診断学、<sup>4</sup>北海道伊達市教育委員会)
- 4 マレーシア・クアラルンプール周辺に在住するマレー人のミトコンドリア  
DNA多型解析  
水口 清<sup>1</sup>、丸山 澄<sup>1</sup>、野平 千鶴<sup>1</sup>、佐々木継泰<sup>1</sup>、石川 昂<sup>1</sup>、  
Phrabakaran Nambiar<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東京歯科大学法歯学講座、<sup>2</sup>Dept. of Oral Biology,  
University of Malaya)

14:10～14:50 検出技術1

座長 福島弘文 信州大学医学部法医学教室

- 5 DigiTag法を用いたマルチプレックスSNPタイピング  
西田奈央<sup>1,2</sup>、田邊哲也<sup>3</sup>、高須美和<sup>1</sup>、金子善興<sup>2</sup>、徳永勝士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室、<sup>2</sup>オリンパス株式会社、<sup>3</sup>株式会社ノバスジーン)
- 6 マルチプレックスSNP検査法による個人識別  
渡辺剛太郎<sup>1</sup>、梅津和夫<sup>2</sup>、湯浅 勲<sup>3</sup>、大澤資樹<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>山形県警察本部科学捜査研究所、<sup>2</sup>山形大学医学部法医病態診断学、<sup>3</sup>鳥取大学医学部法医学講座、<sup>4</sup>東海大学医学部法医学講座)
- 7 ABO式遺伝子型と多座位Y-STR型のマルチプレックス法によるフラグメント分析  
園田祥司<sup>1</sup>、辻田浩司<sup>1</sup>、三谷友亮<sup>1</sup>、松田裕史<sup>1</sup>、水野なつ子<sup>2</sup>、  
吉田日南子<sup>2</sup>、笠井賢太郎<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所、<sup>2</sup>科学警察研究所)
- 8 個人識別を目的とした迅速SNPs解析  
橋谷田真樹<sup>1</sup>、板倉征男<sup>2</sup>、長嶋登志夫<sup>3</sup>、舟山真人<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大学大学院法医学分野、<sup>2</sup>情報セキュリティ大学院大学、<sup>3</sup>NTTデータテクノロジー株式会社)

14:50～15:00 休憩

15:00～15:40 検出技術2、動物のDNA多型1

座長 徳永勝士 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室

- 9 Mini X-STR multiplex systemを用いた8ローカスの日本人集団遺伝子頻度と陳旧性試料への応用  
浅村英樹、酒井洋徳、太田正穂、小林寛也、塚田和彦、沖 貴仁、  
福島弘文  
(信州大学医学部法医学教室)
- 10 血液型亜型斑痕からのフラグメント解析による法科学的ABO式血液型判定  
佐藤耕一<sup>1,2</sup>、伊藤幸夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>順天堂大学医学部法医学研究室、<sup>2</sup>警視庁科学捜査研究所)

- 11 マウスの年齢依存性発現分子、M-LP、の細胞質局在型イソフォーム  
飯田礼子<sup>1</sup>、高塚尚和<sup>1</sup>、坪田悦子<sup>1</sup>、松木孝澄<sup>1</sup>、安田年博<sup>2</sup>、岸 紘一郎<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>福井大学医学部法医学・人類遺伝学領域、<sup>2</sup>福井大学医学部病態遺伝  
生化学領域、<sup>3</sup>群馬大学大学院病態遺伝法医学分野)

- 12 アコヤガイとベニコチョウガイの判別手法の開発  
正岡哲治<sup>1</sup>、小林敬典<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所、<sup>2</sup>中央水産研究所)

15:40 ~ 16:10 植物のDNA多型 1

座長 松山知樹 理化学研究所FRS・加速器利用展開グループ

- 13 大麻の「ドラッグタイプ」と「ファイバータイプ」におけるTHCA生合成酵  
素遺伝子の多型解析  
高上馬希重<sup>1</sup>、關 光<sup>2</sup>、吉田茂男<sup>2</sup>、村中俊哉<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科、<sup>2</sup>理化学研究所PSC)

- 14 ラオス北部のイネ・モチ遺伝子の多型  
武藤千秋<sup>1</sup>、川野和昭<sup>2</sup>、谷坂隆俊<sup>3</sup>、佐藤洋一郎<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大学大学院連合農学研究科、<sup>2</sup>鹿児島黎明館、<sup>3</sup>京都大学、  
<sup>4</sup>総合地球環境学研究所)

- 15 RLGS法によるシロイヌナズナのDNA多型の検出  
高宮知子<sup>1,2</sup>、岡田有裕<sup>1,2</sup>、細淵朗子<sup>1,2</sup>、岡本裕行<sup>1</sup>、村上康文<sup>2</sup>、  
奥泉久人<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農業生物資源研究所、<sup>2</sup>東京理科大学)

16:10 ~ 16:50 植物のDNA多型 2

座長 矢野 博 近畿中国四国農業研究センター

- 16 葉緑体DNAに基づく実ウメおよび花梅の類縁関係の解明  
太田 智<sup>1,2,3</sup>、林 恭平<sup>4</sup>、八重垣英明<sup>3</sup>、三井信弥<sup>4</sup>、大村三男<sup>1,2</sup>、  
西谷千佳子<sup>3</sup>、山本俊哉<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大学大学院連合農学研究科、<sup>2</sup>静岡大学農学部、<sup>3</sup>果樹研究所  
遺伝育種部、<sup>4</sup>和歌山県農林水産総合技術センター果樹試験場うめ  
研究所)

- 17 蛍光二次元ゲノム比較解析法によるコンニャクの品種特異的ゲノム差異の検索  
 山下秀次<sup>1</sup>、作村健彦<sup>1</sup>、本田大輔<sup>1</sup>、芝田 猛<sup>1</sup>、飯塚弘明<sup>2</sup>、奥泉久人<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>九州東海大学、<sup>2</sup>群馬県農業技術センター、<sup>3</sup>農業生物資源研究所 )
- 18 ゲノムスキニング多型解析によるシロイヌナズナ突然変異体の変異遺伝子迅速同定  
 松山知樹<sup>1</sup>、市田裕之<sup>1,2</sup>、阿部知子<sup>1</sup>、浅見忠男<sup>3</sup>、中山秀人<sup>4</sup>、小池邦昭<sup>5</sup>、戎崎俊一<sup>5</sup>  
 ( <sup>1</sup>理化学研究所FRS・加速器利用展開グループ、<sup>2</sup>千葉大学大学院・自然科学研究科、<sup>3</sup>理化学研究所・辻本細胞生化学研究室、<sup>4</sup>株式会社PFU、<sup>5</sup>理化学研究所・戎崎計算宇宙物理研究室 )
- 19 キャベツ萎黄病抵抗性DNAマーカー周辺領域の解析  
 市田裕之<sup>1,2,3</sup>、米山勝美<sup>2</sup>、阿部知子<sup>3</sup>、松山知樹<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>千葉大学大学院自然科学研究科、<sup>2</sup>明治大学農学部、<sup>3</sup>理研FRS 加速器利用展開グループ )

16:50 ~ 17:00 休憩

17:00 ~ 17:40 動物のDNA多型 2

座長 山本敏充 名古屋大学大学院医学系研究科 ( 法医・生命倫理学 )

- 20 ヘアトラップ法による野生ツキノワグマの個体識別  
 森光由樹、名矢結香、泉山茂之  
 ( 野生動物保護管理事務所 )
- 21 同所性食肉目イタチ科3種の調査における分子遺伝学的アプローチ ( 予報 )  
 黒瀬奈緒子<sup>1</sup>、佐々木 浩<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>岩手医科大学医学部法医学講座、<sup>2</sup>筑紫女学園大学短期大学部 )
- 22 マウス悪性リンパ腫責任遺伝子座の同定  
 鶴山竜昭<sup>1</sup>、平塚拓也<sup>2</sup>、日合 弘<sup>3</sup>、玉木敬二<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>京都大学医学研究科法医学講座、<sup>2</sup>京都大学附属病院病理部、<sup>3</sup>滋賀県成人病センター )
- 23 東アジアにおける人類集団の遺伝的近縁関係  
 斎藤成也、石橋みなか  
 ( 総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻および国立遺伝学研究所 )

18:00 ~ 懇親会 ( 1階広間 )

## 第2日目 11月25日(金)

13:30~14:00 親子鑑定、人獣鑑別

座長 玉木敬二 京都大学医学研究科法医学講座

24 新しい市販のY-STR型判定用マルチプレックスキットで観察された突然変異  
吉本高士、山本敏充、打樋利英子、李士林、勝又義直  
(名古屋大学大学院医学系研究科(法医・生命倫理学))

25 p53遺伝子解析による法医試料からの動物種の鑑別  
安積順一、浅利 優、清水恵子、塩野 寛  
(旭川医科大学法医学講座)

26 mtDNA-HV領域の増幅断片長の相違による人獣鑑別法  
室 友紀  
(島根県警察本部科学捜査研究所)

14:10~15:10 シンポジウム(2階ホール)

15:30~ 学会賞授与式、次期大会長挨拶及び閉会式(2階ホール)

## 展示発表 (1階広間)

### 第1日目 11月24日(木)

10:00～10:20 臨床応用

座長 水口 清(東京歯科大学法歯学講座)

- P 1 喫煙習慣に及ぼす遺伝子多型の影響と職場ストレスとの関連  
渡辺洋子<sup>1</sup>、勝山博信<sup>2</sup>、日高和夫<sup>1</sup>、富田正文<sup>3</sup>、奥山敏子<sup>3</sup>、  
為近美栄<sup>4,5</sup>、伏見滋子<sup>2</sup>、東真由美<sup>1</sup>、湊川洋介<sup>1</sup>、角南重夫<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>川崎医科大学学生化学、<sup>2</sup>川崎医科大学公衆衛生学、<sup>3</sup>川崎医科大学  
医用中毒学、<sup>4</sup>川崎医科大学中央検査部、<sup>5</sup>大阪大学大学院・生体情  
報科学講座)
- P 2 薬物中毒とGlutathione S-Transferase M1及びT1遺伝子多型の関連  
中留真人、加藤光司、望月 薫、宮地章高、貴志有望、的場梁次  
(国立大学法人 大阪大学大学院医学系研究科予防環境医学専攻社会環境  
医学講座 法医学教室)
- P 3 CATERPILLAR遺伝子群のSNPタイピングによる本態性高血圧症との関連解析  
北村歌奈子<sup>1</sup>、近江俊徳<sup>1,2</sup>、熊田真樹<sup>1,2</sup>、後藤孝也<sup>1,2</sup>、宇津見七海<sup>1</sup>、  
ルハグワスレン ムンフトルガ<sup>1</sup>、坂本敦司<sup>2</sup>、岩本禎彦<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>自治医科大学地域医療学センター人類遺伝学部門、<sup>2</sup>自治医科大学地域  
医療学センター法医学部門)
- P 4 心筋症の遺伝子解析 –心筋 ミオシン重鎖遺伝子の変異解析–  
橋本千香子、中村茂基、永井智紀、中前琢磨、中丸尚美、小林英樹、  
杉江秀明、古川理孝  
(北里大学医学部法医学教室)

10:20～10:40 検出技術1

座長 向山明孝(日本獣医畜産大学)

- P 5 高GC含量領域のPCR増幅におけるDNA脱アミノ化処理の有効性  
大澤資樹、堀内英和、田 煒、北野 誉、梅津和夫  
(山形大学医学部環境病態統御学講座法医病態診断学分野)

- P 6 DMPA(differentially methylated parental allele)検出法に関する  
検討 II  
中屋敷 徳<sup>1</sup>、高宮正隆<sup>1</sup>、黒瀬奈緒子<sup>1</sup>、橋谷田真樹<sup>2</sup>、青木康博<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岩手医科大学医学部法医学教室、<sup>2</sup>東北大学大学院医学系研究科  
社会医学講座法医学分野)
- P 7 塩基配列特異的熱溶出クロマトグラフ(SSTEC)法によるヒト嗅覚受容体  
遺伝子のDNA多型解析  
郡山豊泰<sup>1</sup>、新井絢子<sup>1</sup>、時田佳治<sup>1</sup>、近藤壽彦<sup>1</sup>、笠井賢太郎<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>群馬大学医学部保健学科、<sup>2</sup>科学警察研究所)
- P 8 Phi29 DNA polymeraseで増幅したヒト口腔粘膜細胞DNAのPCRによる遺伝  
子多型分析への適用例と条件検討  
伊藤未来<sup>1</sup>、井上幸子<sup>2</sup>、前田純夫<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>奈良女子大学大学院・人間文化研究科、<sup>2</sup>奈良女子大学・生活環境学部)

10:40 ~ 11:05 検出技術 2

座長 赤根 敦(関西医科大学法医学講座)

- P 9 蛍光標識プライマーを用いたX-STRの同時検出  
田村明敬、岩田美佐、高瀬 泉、坪井健人、福西新弥、宮崎時子、  
西尾 元、鈴木廣一  
(大阪医科大学法医学教室)
- P 10 温度勾配電気泳動法によるABO遺伝子のSNP解析  
三谷友亮<sup>1,2</sup>、小林哲哉<sup>1,2</sup>、赤根 敦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>関西医科大学法医学教室、<sup>2</sup>大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所)
- P 11 TaqMan法を用いたABO式血液型遺伝子型タイピング  
篠根光太郎<sup>1</sup>、橋谷田真樹<sup>2</sup>、那谷雅之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>三重大学大学院医学系研究科環境社会医学講座法医学科学、  
<sup>2</sup>東北大学大学院医学系研究科社会医学講座法医学)
- P 12 SSCPパターン解析により検出されたABO血液型遺伝子の hybrid allele  
中村貴子、本田克也  
(筑波大学人間総合科学研究科法医学)
- P 13 塩基配列特異的熱溶出クロマトグラフ (SSTEC)法によるヒトABO遺伝子の  
遺伝子型解析  
時田佳治、安戸博美、蛭田芽公美、郡山豊泰、近藤壽彦  
(群馬大学医学部保健学科)

11:05 ~ 11:30 動物のDNA多型

座長 津田とみ (徳島文理大学人間生活学部)

P 1 4 ペンギン類のMHC領域 (主要組織適合性遺伝子複合体) における多型解析

吉川枝里<sup>1</sup>、津田とみ<sup>1,2</sup>、成瀬妙子<sup>3</sup>、炭山大輔<sup>1</sup>、福田道雄<sup>4</sup>、  
栗田正徳<sup>5</sup>、津田道雄<sup>1</sup>、村田浩一<sup>6</sup>、猪子英俊<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、<sup>2</sup>徳島文理大学人間生活学部、<sup>3</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野、<sup>4</sup>東京都葛西臨海水族園、<sup>5</sup>名古屋港水族館、<sup>6</sup>日本大学生物資源科学部)

P 1 5 日本の雑種犬におけるマイクロサテライト多型

大石 昇<sup>1,4</sup>、前田眞理<sup>1,2</sup>、楨村浩一<sup>2,3</sup>、澤口聡子<sup>5</sup>、林屋牧男<sup>6</sup>、  
久保拓也<sup>7</sup>、加納 壘<sup>8</sup>、長谷川篤彦<sup>8</sup>、笠原道弘<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>帝京大学医学部物理学教室、<sup>2</sup>帝京大学ゲノム解析リサーチ・センター、<sup>3</sup>帝京大学医真菌研究センター、<sup>4</sup>帝京大学生物工学研究センター、<sup>5</sup>東京女子医科大学法医学教室、<sup>6</sup>林屋動物診療室、<sup>7</sup>北愛動物病院、<sup>8</sup>日本大学生産資源科学部獣医臨床病理学研究室)

P 1 6 Dog serotonin transporter polymorphism and the association with behavioral traits

Kyung-Won Hong<sup>1</sup>, Masami Maejima<sup>2,3</sup>, Miho Inoue-Murayama<sup>2</sup>,  
Mitsuo Morita<sup>4</sup>, Yuichi Murayama<sup>5</sup>, Shin ichi Ito<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, <sup>2</sup>Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, <sup>3</sup>Tokyo Central Pathology Laboratory Co., LTD, <sup>4</sup>Livestock Improvement Association of Japan, Inc., <sup>5</sup>National Institute of Animal Health)

P 1 7 タヌキにおけるマイクロサテライトDNAによる個体識別

松木吏弓、竹内 亨、阿部聖哉、梨本 真

(電力中央研究所生物環境領域)

12:00 ~ 13:00 評議員会 (地階第1会議室)

12:00 ~ 13:00 テクニカルセミナー (1階広間)

先着70名までの参加者にお弁当とお茶を無料配布します。

## 第2日目 11月25日(金)

9:30~10:00 水産領域のDNA多型

座長 正岡哲治(独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所)

P18 ナメクジウオの分子進化学的研究

松崎雄三<sup>1,2</sup>、向田政博<sup>2</sup>、今井利夫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東邦大学理学部生物学科、<sup>2</sup>防衛医科大学校法医学講座)

P19 水産生物を対象としたDNA多型データベースの構築

小林敬典<sup>1</sup>、大原一郎<sup>1</sup>、正岡哲治<sup>2</sup>、猿渡敏郎<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>中央水産研究所、<sup>2</sup>養殖研究所、<sup>3</sup>東京大学海洋研究所)

P20 一塩基置換を用いた太平洋サケマス類の種判別

大原一郎、小林敬典、中山一郎

(中央水産研究所)

P21 トモメヒカリの生活史 塩基配列が明かすその概略

猿渡敏郎<sup>1</sup>、平川直人<sup>2</sup>、茂木正人<sup>2</sup>、大野 淳<sup>2</sup>、正岡哲治<sup>3</sup>、張 成年<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>東京大学海洋研究所、<sup>2</sup>東京海洋大学、<sup>3</sup>養殖研究所、<sup>4</sup>中央水産研究所)

P22 岩手県宮古湾におけるヒラメ放流魚による再生産の可能性

篠塚由美、朝日田 卓

(北里大学水産学部)

P23 日本周辺におけるヒレグロのミトコンドリアDNA多型解析

柳本 卓<sup>1</sup>、小林敬典<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所、<sup>2</sup>中央水産研究所)

10:00~10:15 DNA鑑定

座長 小室歳信(日本大学歯学部法医学教室)

P24 擬父、擬母不在家系の親子鑑定における肯定確率の意義

赤根 敦<sup>1</sup>、三谷友亮<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>関西医科大学法医学講座、<sup>2</sup>大阪府警科学捜査研究所)

P25 ミトコンドリアの12S及び16SリボソームRNA遺伝子を利用した種属識別

北野 誉、梅津和夫、田 煒、大澤資樹

山形大学医学部環境病態統御学講座法医病態診断学分野

P 2 6 LAMP 法による歯髄DNAからの性別判定

堤 博文、向山レイ、小室歳信  
( 日本大学歯学部法医学教室 )

10:15 ~ 10:30 植物のDNA多型

座長 木村鉄也 ( 種苗管理センター )

P 2 7 コンニャクにおける R L G S 品種識別マーカーの開発

飯塚弘明<sup>1</sup>、細渕朗子<sup>2,3</sup>、高宮知子<sup>2,3</sup>、村上康文<sup>3</sup>、山下秀次<sup>4</sup>、奥泉久人<sup>2</sup>、  
加藤晃<sup>1</sup>、内田秀司<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>群馬県農業技術センター、<sup>2</sup>農業生物資源研究所、<sup>3</sup>東京理科大学、  
<sup>4</sup>九州東海大学 )

P 2 8 小麦加工食品からのDNA抽出法およびDNA断片化程度の評価

藤田由美子、池田達哉、荒木悦子、矢野 博  
( 農業・生物系特定産業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター )

P 2 9 分子マーカーによるニホンナシとマルメロの属間雑種の解析

山本俊哉<sup>1</sup>、木村鉄也<sup>2</sup>、副島淳一<sup>1</sup>、眞田哲朗<sup>1</sup>、伴 義之<sup>2</sup>、林 建樹<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>果樹研究所、<sup>2</sup>種苗管理センター )

10:30 ~ 10:50 DNAデータベース 1

座長 大澤資樹 ( 山形大学医学部法医病態診断学分野 )

P 3 0 日本人とドイツ人のC1S遺伝子の多様性について

中川真由美<sup>1</sup>、湯浅 勲<sup>2</sup>  
( <sup>1</sup>鳥取大学医学部病態検査学講座、<sup>2</sup>鳥取大学医学部法医学分野 )

P 3 1 ABO血液型遺伝子における5 上流域の多型 ( )

沖浦達幸<sup>1,2</sup>、三宅 仁<sup>2</sup>、西村浩治<sup>1</sup>、西向弘明<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>愛媛大学医学部環境社会医学講座法医学分野、<sup>2</sup>愛媛県警察本部科学  
捜査研究所 )

P 3 2 多人種間におけるメラニン合成系遺伝子の多型と表現型の比較検討

増井聡亮<sup>1</sup>、中留真人<sup>1</sup>、的場梁次<sup>1</sup>、西 克治<sup>2</sup>  
( <sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科予防環境医学専攻社会環境医学講座法医学  
教室、<sup>2</sup>滋賀医科大学法医学講座 )

P 3 3 AIM-1遺伝子に働くヨーロッパ人特異的な正の自然選択  
副島美貴子、神田芳郎  
(久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座)

10:50~11:10 DNAデータベース2

座長 西向弘明(愛媛大学医学部環境社会医学講座法医学分野)

P 3 4 トルコ人集団及びアフリカオバンボス集団におけるdeoxyribonuclease  
I多型解析  
藤原純子<sup>1</sup>、今村真二<sup>2</sup>、室友紀<sup>2</sup>、竹下治男<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>島根大学医学部法医学講座、<sup>2</sup>島根県警察本部科学捜査研究所)

P 3 5 日本人におけるY-STR17座位の遺伝頻度分布  
橋谷田真樹<sup>1</sup>、梅津和夫<sup>2</sup>、湯浅勲<sup>3</sup>、田村明敬<sup>4</sup>、三好綾<sup>5</sup>、  
舟山真人<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科法医学分野、<sup>2</sup>山形大学医学部法医学教室、<sup>3</sup>鳥取大学医学部法医学教室、<sup>4</sup>大阪医科大学法医学教室、<sup>5</sup>福岡大学医学部法医学教室)

P 3 6 中国人におけるY染色体上STRの遺伝子頻度とハプロタイプ解析  
王秀玲、澤口聡子  
(東京女子医科大学医学部法医学教室)

P 3 7 日本人を対象としたAmpF/STR-Yfilerによる5種のY-STRの追加と21-YSTR  
haplotypeおよびBinary Haplogroupとの関連  
伊藤春雄、笠原育、水口清  
(東京歯科大学法歯学講座)

11:10~11:30 検出技術3

座長 吉田日南子(科学警察研究所)

P 3 8 湿潤がDNA型検出に及ぼす影響  
廣重憲一、山口裕樹  
(福岡県警察本部科学捜査研究所)

P 3 9 Differex<sup>TM</sup> Systemを用いた混合斑痕からのDNA抽出  
塚田和彦<sup>1,2</sup>、野尻真依子<sup>1</sup>、倉沢佳延<sup>1</sup>、笠原浩一<sup>1</sup>、浅村英樹<sup>2</sup>、  
太田正穂<sup>2</sup>、福島弘文<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>長野県警察本部刑事部科学捜査研究所、<sup>2</sup>信州大学医学部法医学教室)

P 4 0 REPLI-g Kitを用いた法科学試料のDNA多型検出について

鉄 堅、芹沢優花、岩上悦子、押田茂實  
(日本大学医学部社会医学講座法医学部門)

P 4 1 AmpFISTR® Identifiler PCR Amplification Kitを用いた溺死体の大動脈、  
脳硬膜からのSTR分析例

佐藤彌生、茂谷久子、早川 睦、矢島大介、岩瀬博太郎  
(千葉大学大学院医学研究院法医学教室)

13:00 ~ 13:30 総会及び功績賞授与式 ( 2 階ホール )

13:30 ~ 14:00 口演発表 ( 2 階ホール )

## テクニカルセミナー (1階広間)

第1日目 11月24日(木)

12:00~13:00

司会 安田年博(福井大学医学部病態遺伝生化学)

演題 『DNA多型解析の現状と展望』

東 きょう

(アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)

先着70名までの参加者にお弁当とお茶を無料配布します。

13:30~17:40 口演発表(2階ホール)

抄 録

シンポジウム  
(S1~S3)

口 演 発 表  
(1~26)



# S1

## Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) —等電点電気泳動と遺伝子解析—

湯浅 勲（鳥取大学医学部法医学分野）

N-結合型糖鎖は発生、分化、がん転移、免疫、細胞内輸送、細胞接着などきわめて広範な生命現象に深くかかわっている。N-結合型糖鎖の合成やプロセシングの過程に関与するたんぱく質の遺伝的欠損などにより、多種類の原因からなるN-結合型糖たんぱく質の糖鎖異常を示す疾患群が先天性糖鎖合成異常症(CDG)である。これは、1980年代ヨーロッパにおいて、シアル酸の欠乏したトランスフェリン(TF)が見出されることによって確立されてきた疾患群である。TFには通常2個のシアル酸を非還元末端にもつ2分岐型の糖鎖が2本結合しており、TFの多く分子は4個のシアル酸を有している(tetrasialo-TF)。CDGの多くは、このtetrasialo-TFの減少と2個のシアル酸もつTF(disialo-TF)やシアル酸のないTF(asialo-TF)が増加し、このような異常は他の多くの血清糖たんぱく質に認められており、容易に等電点電気泳動で検出できる。

CDGは小胞体における合成に異常が認められるタイプ I(CDG-I)と小胞体からゴルジ体にかけて起こるプロセシングに異常が認められるタイプ II(CDG-II)に分類され、現在までに、CDG-Iには a から l までの12種の原因遺伝子が、CDG-IIには a から f の6種の原因遺伝子が同定されている。

1992年われわれは、乳児期肝機能障害、内斜視、知的障害、小脳失調、末梢神経障害などをもつ姉弟に血清糖たんぱく質の異常を認め、日本人にもヨーロッパ人と同一の疾患が存在することを明らかにした。以来、現在までに日本人で少なくとも14家系19症例発見されており、われわれもそのうち10家系14人の症例をTFの等電点電気泳動によるスクリーニングを通じて見出した。

多数の原因遺伝子が知られている中で、もっとも患者が多く見つかったのがCDG-Iaである。その原因遺伝子は糖供与として重要な、マンノース6リン酸をマンノース1リン酸にかえるフォスフォマンノムターゼ2(PMM2)であり、多数の変異が検出されており、日本人でも6家系9症例で、6種の変異が同定されている。

最近は、O-結合型糖鎖の異常による疾患も報告され、糖鎖合成異常に関する領域はきわめて重要な研究分野となりつつある。

小湊慶彦

群馬大学大学院医学系研究科病態遺伝法医学分野

ABO 式血液型は 20 世紀初頭にランドスタイナーによって発見され、輸血医療の道を開くだけでなく、個人識別に重要な指標として法医学に応用され今日に至っている。1960 年代に ABO 式血液型の抗原構造が解析され、1990 年にワシントン大学バイオメンブレン研究所、箱守仙一郎教授らのグループによって遺伝子構造が明らかにされた。しかしながら、遺伝子構造の情報のみでは、癌細胞における血液型転換の原因、エクソン部分に塩基置換のない亜型血液型の原因、細胞特異的な血液型遺伝子の発現機序、上皮組織や造血組織における細胞分化に伴って血液型抗原が発現する機序等は解明できなかった。そこで、ABO 式血液型遺伝子の転写調節機構の解明を行い、以下のことが明らかとなった。

- 1) ABO 式血液型遺伝子の構造、5' RACE や転写物の定量から、赤血球系細胞と上皮系細胞の両方において ABO 遺伝子の転写はエクソン 1 またはエクソン 1a から開始され、エクソン 1a から開始される転写産物量はエクソン 1 から開始される転写産物量の 1/20 であることを明らかにした。即ち、ABO 遺伝子は第 9 染色体長腕に存在する、約 19 kb にわたる 8 個のエクソンから構成されることを解明した。
- 2) ABO 遺伝子上流域の構造、エクソン 1 の転写開始点付近の塩基配列は GC 含有率が高いこと、その周囲約 1.3 kb は CpG island を有すること、その周囲約 150 bp に細胞非依存的なプロモーター活性があること、赤血球系細胞と上皮系細胞の両者において転写因子 Sp1 がプロモーター活性に重要であることなどの特徴があった。
- 3) エクソン 1 の転写開始点上流 0.11—0.27 kb は転写抑制領域であり、N-box (CACGAG) が存在していた。プロモーターアッセイやゲルシフトアッセイから、この N-box が転写抑制に関与していることを解明した。
- 4) ABO CpG の 5' 辺縁にエクソン 1a の転写開始点が存在し、この周囲約 160 bp に細胞特異的なプロモーター活性が存在していた。
- 5) エクソン 1 の転写開始点上流 0.95—2.2 kb に LINE 配列や Alu 配列があり、DNA メチル化を受けていた。
- 6) 腫瘍における ABO 抗原の欠失の原因は少なくとも遺伝子欠失とプロモーター領域のメチル化である。

細胞特異的な血液型遺伝子の発現機序、細胞分化に伴う血液型抗原発現の機序等の解明は今後の課題である。

安田年博 (福井大学医学部病態遺伝生化学)

はじめに

ヒト deoxyribonuclease I (DNase I) は少なくとも 6 個の対立遺伝子によって決定される遺伝的多型形質であり、法医学・人類遺伝学領域において有用な遺伝マーカーの一つとして活用されてきた。近年、DNase I に関して全身性エリテマトーデスや心疾患との関連性が注目されている。そこで、多型性を含めた分子多様性を基盤として、DNase I と心疾患、特に虚血性心疾患との関連性に関する我々の最近の研究成果を紹介したい。

#### 心筋梗塞感受性遺伝子としての DNase I

心筋梗塞罹患群と安定狭心症罹患群について DNase I 多型に関するケース・コントロール関連分析から、主要対立遺伝子の一つである *DNASE1\*2* が心筋梗塞の新規な疾患感受性遺伝子であることが明らかとなった。

#### 急性心筋梗塞の超急性期生化学的診断マーカーとしての DNase I

急性心筋梗塞の発症に伴い、血清中の DNase I 活性レベルは顕著な一過性上昇を示す；発症後約 3 時間で最高値となり、その後 24 時間以内に正常値に復帰する。さらに、このような一過性の上昇は胸痛発作を伴う冠動脈疾患のうち心筋梗塞特異的である。他方、従来から急性心筋梗塞の診断に利用されてきた troponin T などの生化学的診断マーカーは発症後数時間経過しないと適用できない。特異度、発症後の適応期間、感度などに優れていることから、血清 DNase I は急性心筋梗塞発症直後に適応できる迅速生化学的診断マーカーとしてその高い有用性が注目されている。さらに、経皮的冠動脈インターベンションによって誘起される一過性心筋虚血が血清 DNase I 活性レベルの一過性上昇をもたらすことが明らかとなり、血清 DNase I は一過性心筋虚血を検出する高感度の生化学的マーカーとして期待される。

#### 低酸素による DNase I 遺伝子発現誘導

一過性心筋虚血に伴う血清 DNase I 活性上昇の分子論的基盤を解明するため、培養細胞を用いた DNase I の低酸素誘導を調べたところ、低酸素暴露による DNase I 遺伝子発現の誘導が確認された。従って、低酸素による DNase I 遺伝子の転写制御が一過性虚血によって誘起される DNase I の活性変動に関与することが示唆された。さらに、DNase I 遺伝子上で新規な転写開始点となる新しいエキソンが同定され、異なる転写開始点の利用や alternative splicing などによって DNase I 転写産物に著しい分子多様性が見られることが明らかとなった。



# 1

## Y染色体上の多型性の変異率について - 家族ドナープールの必要性 -

出羽厚二、鷺見博和、内藤笑美子、徐紅徳、  
福田祐明、山内春夫

(新潟大・法医)

Y染色体上のSNPsやSTR等の有用性はもはや論をまたないところとなっている。しかし、それを日本国内で実施応用するためには、(1)日本人データの登録と公開 (2)各STR座の変異率の公開 (3)重複アリルやインターアリル等の問題を解決しなければならない。今回、我々は特に親子サンプルを用いて変異率の検討を試み、実施実用化のためには多機関にわたるサンプルの相互供与と協力が不可欠である事を再認識した。

[試料と方法]

日本人父子49組についてApplied Biosystems社のYfiler Kitを用い16種類のSTR型を検出し、その結果を既発表データと比較した。

[結果および考案]

日本人父子49組の16STRで2種類のSTRについて親子間で変異を観察した。また1種類の遺伝する重複アリルを観察した。この率は既発表データと比較し差はないと考えられるが、データがあまりにも少数すぎ変異率の算出は不可能である。

かつて演者等は1030組のドイツ人について13種類のSTR座を検出し24の変異を観察した(未発表)。このような研究の場合、信頼性を高めるため、一度、変異が検出されればその変異の起った組の親子鑑定を再確認し、変異座についてはシーケンスの確認をしなければならない。

一方、任意のDNA提供を受ける「家族ドナー」の確保の困難さは経験したものの誰もが指摘することであり、その数を確保するためには多大な労力を必要とする。

これらの点を考慮すると変異率の検討を行うことはもはや一研究機関にゆだねられるテーマではないのは明白である。

現在の医学研究では匿名化が必須の環境となっておりそれも当然のことではあるが、逆に人類遺伝学、法医学の多型研究では出身地域等のしっかりとした情報のある家族サンプルの確保が重要である。「出所のしっかりとしたサンプル」を有効に活用する方法である。参加協力機関で少数の家族ドナーに登録してもらいこれをプールし、学会、研究会レベルでそれを管理して相互供与しあう方法等を考慮していただけたら幸いである。

## 2

### APLP 法によるミトコンドリアハプログループの東アジア集団における出現頻度

梅津和夫（山形大・医・法医病態診断学）、湯浅 勲（鳥取大・医・法医学）、安達 登（東北大・医・人体構造）、三好 綾（福岡大・医・法医学）、渡辺剛太郎（山形県警本部科学捜査研究所）、田中雅嗣（東京都総合老人研究所）、大澤資樹（山形大・医・法医病態診断学）

ミトコンドリアDNAのコード領域のSNPをもとに決められるハプログループは、系統分析やD-ループ領域の解析結果の評価に大きな役割を果たしている。我々はこれまで36 SNPを用いてハプログループ分析を行ってきたが、この中で頻度の高いハプログループを中心にさらに細分化できるSNPを追加しハプログループ分析を行い、再度東アジア集団における頻度を調査した。

#### 【材料と方法】

ハプログループ分析は従来の4セット(A, B, C, D)に、今回新たに設定したEセットを加えたmultiplex APLP法を行った。未変性の10%ポリアクリルアミドゲルで泳動し、SYBR Green I染色を行い、ハプログループを判定した。なお、EではD4b2b, D4d1, D5a, C, M7a1a, F1, B4bde, A1, Rを識別するプライマーセットを用いた。

#### 【結果と考察】

従来のプライマーセットでは東アジアの集団を30程度のハプログループに細分化できたが、今回のSNPを追加することにより東アジアの集団では約40の系統に識別できた。この方法により、10%を超える出現頻度を示すハプログループはほとんどなくなったので、より詳細な系統分析と共に個人識別能も上昇した。現在数多くのハプログループが識別され命名されている。しかし、これらを正確に識別しようとするればミトコンドリアDNAの各SNPは密接に連鎖しているので、ハプログループの数以上のSNPの検査が必要となるので、あまり実用的な方法ではない。色々の系統で複数回独立して突然変異を起こしたSNPを少数分析することにより、進化上の系統関係の把握はやや困難となるが、個人識別の目的は十分達成できると考えられる。

### 3

## 北海道縄文・続縄文人骨のミトコンドリアDNA解析

安達 登(東北大・医・人体構造)、篠田謙一(国立科学博物館・人類研究部)、梅津和夫(山形大・医・法医病態診断学)、坂上和弘(東北大・医・人体構造)、大島直行(北海道伊達市教育委員会)、百々幸雄(東北大・医・人体構造)

#### [目的]

北海道の縄文・続縄文人は、その骨形態において時代差や地域差が小さく、かつ弥生時代以降の本土日本人集団とは大きく異なることがわかっている。しかし、北海道縄文・続縄文人の遺伝学的位置づけは未だ明らかでない。今回我々は札幌医科大学所蔵の北海道縄文・続縄文人骨資料、計 76 体を対象にミトコンドリア DNA (mtDNA) を用いた系統分析をおこなった。

#### [試料および方法]

資料の歯もしくは骨より市販の DNA 抽出キットを用いて DNA 溶液を得た。mtDNA の hypervariable region I および II の一部の塩基配列を direct sequence 法により決定し、さらに coding region の多型を APLP (amplified product-length polymorphism) 法および direct sequence 法により検出した。得られたデータをもとに北海道縄文・続縄文人の mtDNA を haplogroup に分類し、その頻度を古代人および現代人のデータベースと比較した。

#### [結果]

北海道縄文・続縄文人の haplogroup の頻度分布は本土日本人を含む現代の東アジア人集団におけるそれとは全く異なっており、ミトコンドリア DNA 分析からは北海道先史時代人の特異性が示唆された。

## 4

### マレーシア・クアラルンプール周辺に在住する マレー人のミトコンドリアDNA多型解析

水口 清<sup>1)</sup>、丸山 澄<sup>1)</sup>、野平 千鶴<sup>1)</sup>、佐々木継泰<sup>2)</sup>  
石川 昂<sup>2)</sup>、Phrabhakaran Nambiar<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 東京歯科大学法歯学講座

<sup>2)</sup> 東京歯科大学学生

<sup>3)</sup> Dept. of Oral Biology, University of Malaya

【目的】私達は前学会において30人のマレーシアのクアラルンプール周辺に在住のマレー人につき、ミトコンドリアDNAのcoding領域とcontrol領域の多型を総合したデータによりその系統分化を報告してきているが、今回マレー人の試料を追加検討した結果について報告する。

【材料と方法】試料DNAは血縁関係のないマレー男性78人から得たDNAを用いた。検査はcontrol領域については全塩基配列を決定し、489の変異の有無でM、N系統を推定した後、すでに報告している日本人データ、Tanaka et al.、Kong et al.、Maca-Meyer et al.、Ingman and Gyllensten、Palanichamy et al.、Macaulay et al.、Thangaraj et alのmtDNA全ゲノム配列データに加えて、その他の東アジア地域のcontrol領域のデータとの比較を行い、各資料の系統を推定した。Coding領域の変異については資料ごとに考慮しながら塩基配列を決定した。

【結果および考察】前学会において30例のマレー人の検査で、mtDNAの系統はM、Nが大部分を占めることを報告したが、今回資料数を増加することにより、マレー人のmacrohaplogroupはユーラシア、オセアニアにひろがるR系統も存在することがわかった。全体の分布はM7、E、B4/5、F1aがそれぞれ10.3%、10.3%、19.2%、12.8%で、その他東アジアに多いG2a+D4a+D4+N9aの6.4%を加えると全体の59%を占める。その他R系統の6.4%を除くと、残りの34% (27例) は東アジアに余り認められないMおよびN系統に属すると考えられた。27例中21例はM系統で、これらはD6、M22を含む16のハプログループからなり、6例はN系統であったが4~5のハプログループからなると思われる。東アジアに認められていない系統はcontrol領域の変異では、現状のデータでは精度の高い系統の推定が困難で、coding領域の情報をさらに加えていく必要がある。

今回のマレーシアのマレー人集団のミトコンドリアDNA多型の系統分布は東アジアと共通する系統についてはM7b2、M7c1c、B4c1b1、B5a、F1aなどの同じ系統に集中する傾向が高く、これらの系統の集団との交流は比較的限られたものであった可能性が高い。しかし東アジアに稀な系統については極めて多様性が高く、おそらくマレー半島が何回ものヒトの移動経路にあたっていたためであろうと考えている。

## 5

### DigiTag 法を用いたマルチプレックス SNP タイピング

西田奈央<sup>1,2</sup>、田邊哲也<sup>3</sup>、高須美和<sup>1</sup>、金子善興<sup>2</sup>、徳永勝士<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室、<sup>2</sup> オリンパス株式会社、<sup>3</sup> 株式会社ノバスジーン

#### 〔背景〕

生活習慣病などありふれた疾患の疾患感受性遺伝子を特定するために、多くの SNP マーカーを用いた関連解析が行われる。現在では 10 万を超える SNPs を同時にタイピングする技術が確立され、疾患感受性候補領域の探索に大きな役割を果たすと期待されている。しかしながら、これらのゲノムワイド連鎖分析あるいはゲノムワイド関連分析によって検出された候補領域において、疾患感受性遺伝子多型を特定するためには、数十から数百種類の SNPs をもれなくタイピングできる技術を確立することが求められる。

#### 〔目的〕

数十から数百種類の異なる SNPs を正確に、かつ高い成功率で同時にタイピングすることのできる手法を確立することが本研究の目的である。

#### 〔方法〕

DigiTag 法では、SNP の対立遺伝子型は DCNs と呼ばれるオリゴ DNA へと一対一に変換される。DCNs は物理的、化学的に性質が一樣となるように設計したオリゴ DNA のことで、DCNs を使うことで正確な DNA 分子反応を並列的に行うことが可能となる。DCNs は 3 つの部分配列（名称：SD、D1、ED）で構成されている。SD、ED はすべての DCNs に共通な配列で PCR を行う際にプライミング部位として使用する。D1 は各 DCNs に特異的な配列とし、DCNs の種類を識別するために用いる。SNP 情報から DCNs への変換反応（エンコード反応）はライゲーション反応で行い、複数の SNP 部位から同時に遺伝子型情報を変換することができる。変換された SNP 情報は共通のプライマーペアで一様に増幅し、キャピラリーアレイを用いてすべての DCNs の読み出しを行うことで対立遺伝子型が決定される。

#### 〔結果〕

本研究では、5 番染色体長腕上の *IL-4*、*IL-13* を中心とした 500 kb の領域に存在する SNPs を対象として本手法の開発を行った。その結果、検討した SNPs の約 9 割でタイピングが可能であり、これらの SNPs のタイピング結果はダイレクトシーケンシングの結果と 100% 一致した。また、エンコード反応に用いるプローブ DNA にミスマッチを導入することでタイピング成功率がさらに上がることが明らかとなった。

## 6

### マルチプレックスSNP検査法による個人識別

渡辺剛太郎<sup>1</sup>、梅津和夫<sup>2</sup>、湯浅 勲<sup>3</sup>、大澤資樹<sup>4</sup>

<sup>1</sup>山形県警察科学捜査研究所、<sup>2</sup>山形大学医学部法医病態診断学

<sup>3</sup>鳥取大学医学部法医学講座、<sup>4</sup>東海大学医学部法医学講座

[目的] マルチプレックスSTR型判定法は、犯罪鑑識における個人識別法として広く用いられている。しかし、現在市販されている検査法は、PCR増幅産物の鎖長が比較的長いDNAフラグメントを組み合わせたものであり、高度に分解したDNAから型判定を行うことは、しばしば困難であった。

そこで、できるだけ短いDNAフラグメントを用いて、新たなマルチプレックスSNP検査法を構築し、断片化したDNAにも対応できる高感度な個人識別法について検討を行った。

[方法] それぞれ異なる染色体上に存在する塩基置換部位を選び出し、SNPを検出するためのアレル特異的プライマーを合成した。PCR増幅産物の鎖長が重ならないように、いくつかのプライマーの5'末端に非相補的オリゴヌクレオチドを結合させ、APLP法を用いたマルチプレックスSNP検査法を構築した。血縁関係のない日本人およびドイツ人の血液から抽出したDNAについて、新しく構築した検査法を用いてマルチプレックスSNP型判定を検定した。今回採用したSNP部位の対立アレル頻度を算出し、本法を用いた個人識別力を明らかにした。また、分解DNAを用いた型判定を行うとともに、本検査法の特異性および検出感度についても検討を行った。

[結果] 第1、7、8、11、14、15、19、20、21、22染色体上の塩基置換部位、計10カ所のSNPを同時に検出する検査法を構築した。検査に必要となる実質的な鋳型DNAの鎖長は35～41 bpと非常に短いため、高度に分解したDNAからの検査が可能と考えられた。日本人における各SNPのアレル出現頻度は0.4～0.6と多型性に富み、高い個人識別力を持っていた。本法は、特殊な装置を必要とせず、安価に検査が行える利点を持っており、電気泳動を含めても5時間以内に、数十～百サンプルの型判定が可能であった。簡便、迅速、高感度な本検査法は、犯罪鑑識における個人識別法として非常に有用と考えられた。

# 7

## ABO 式遺伝子型と多座位 Y-STR 型の マルチプレックス法によるフラグメント分析

園田祥司<sup>1</sup>、辻田浩司<sup>1</sup>、三谷友亮<sup>1</sup>、松田裕史<sup>1</sup>、  
水野なつ子<sup>2</sup>、吉田日南子<sup>2</sup>、笠井賢太郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所、<sup>2</sup>科学警察研究所

### 【目的】

新たな Y 染色体 STR の同定や多型分析が進み、法科学分野においてその有用性が示されている。また多座位の Y-STR 型検出キットも販売供給され、今後性犯罪関連の証拠資料などへの実務応用が期待される。現在、主に常染色体 STR 型検出による DNA 型鑑定が行われているが、限られた DNA 試料から ABO 式遺伝子型や性染色体の STR 型等を分析できれば、特異事例への対処など鑑定検査の補助として有効に活用することができる。今回、ABO 式遺伝子型や Y 染色体の STR 型をメインとした DNA 型の同時検出を目的として、それらのマルチプレックスシステムの確立と法科学的有用性について検討を行った。

### 【材料と方法】

インフォームドコンセントを得て採取した血液試料からの精製 DNA を検討材料とした。Y 染色体 STR 型として DYS439、392、438、460、19、456、458、390、Y-GATA-H4 を、性別判定用にアメロゲニン、SRY を、また X 染色体 STR として DXS6789 を選択し、主要な検出アレルが 200bp 以下でかつサイズが重ならないように 5 色対応の蛍光標識プライマーを設定した。ABO 式遺伝子型解析用には APLP 法による検出用プライマーを用い、これら 14 種類の DNA 型の同時検出を行った (Gset14A システム)。さらに、上記 Y-STR に DYS426、576、557 を加えた 13 種類の Y-STR 型のみでの同時検出を行った (Gset13Y システム)。これらの同時分析についてマルチプレックス法による PCR 増幅条件等を確立し、鋳型 DNA 量による反応性やアレルピークの特性、混合 DNA 試料からの検出について検討した。型判定用アレリックラダーは、市販キットに付属の Y-STR アレリックラダー及び型既知の DNA 試料を用いて作製し、GeneMapperID v3.2 で解析した。

### 【結果】

PCR 増幅は、いずれもアニーリング温度 61℃、サイクル数 29 回で設定したが、検出される ABO のアレルピークは他の DNA 型と比較してピーク高が全体に低かった。Y-STR は市販の Y-filer キットと比較するとスターピークが高く検出される傾向にあったが、DXS6789 を含めて鋳型 DNA 量 0.125ng から検出が可能であった。混合 DNA 試料からは、X および Y-STR 型において 10 : 1 まで、ABO で 4 : 1 まで混合した型として検出することができた。Y-STR 型のみでの Gset13Y システムでは、総鋳型 DNA 量が増えると 200bp を越えるサイズ領域に非特異ピークが観察されたが、女性 : 男性 = 1000 : 1 の比率からも型判定が可能であった。

## 8

# 個人識別を目的とした迅速SNPs解析

橋谷田真樹<sup>1</sup>, 板倉征男<sup>2</sup>, 長嶋登志夫<sup>3</sup>, 舟山真人<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>東北大学大学院法医学分野, <sup>2</sup>情報セキュリティ大学院大学,  
<sup>3</sup>NTTデータテクノロジ株式会社

### [はじめに]

一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNPs)は, ヒトゲノム中に多数存在し, かつ遺伝的に安定であることから法医学的な研究が進み, 実務に応用されつつある. しかしながら, 一つ一つのSNP座位における識別精度が低いため, 多数の座位を検査しなければ十分な個人識別精度を得ることはできない. 今回我々は, 多数のSNP座位を迅速に検査できるシステムを確立したので報告する.

### [材料および方法]

血縁関係のない100人のボランティアの頬粘膜を擦過した綿棒から, QuickGene-800 (FUJIFILM)によりゲノムDNAを抽出し, 試料とした. SNP座位は, 性染色体を除いた22染色体から3座位づつ, JSNPデータベース([http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index\\_ja.html](http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html))およびTaqMan SNP Genotypingデータベース([http://myscience.appliedbiosystems.com/common/search.jsp?\[assayType\]=genotyping](http://myscience.appliedbiosystems.com/common/search.jsp?[assayType]=genotyping))を基に, 遺伝子領域以外, もしくはイントロン領域から物理的に距離の離れている計66座位のSNPを選択した. Universal PCR FAST Master Mix (Applied Biosystems)を用いたTaqMan法によりSNPタイピングを行った. 使用した機器は7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)もしくは, 9800 Fast Thermal Cycler およびABI PRISM 7700 (Applied Biosystems)である. TaqMan反応はまず, 95°C20秒でdenatureを行ない, その後62°C30秒, 95°C3秒のサイクルを40回行った.

### [結論および考察]

SNPs各座位における同値確率は最も低いもので0.375, 最も高いもので0.465を示した. 66座位の平均は0.384であり, SNP66座位の総同値確率は  $3.27 \times 10^{-28}$  となった. 我々が持つ日本人のSTRデータベースによれば, PowerPlex 16 System (Promega)によるSTR15座位の同値確率が  $5.369 \times 10^{-18}$  であり, AmpFISTR Identifiler (Applied Biosystems)のそれが  $1.440 \times 10^{-17}$  である. これらと同等の同値確率を求めるならば, 今回検討したSNPs座位のうちで同値確率の良いもの42座位 ( $1.93 \times 10^{-18}$ )が必要となる. また, 各SNPs座位における相関はなく, ハーデイワイベルグの平衡も保っていた. 今回我々が用いたSNPタイピングシステムは, FASTシステムと呼ばれ, サーマルサイクルが早いTaqMan反応にも十分対応できる試薬および機器を使用した. その結果, DNAの抽出からSNPsの型判定まで約1時間しか要さず, 近い将来STRに代わるものとして期待されている.

## 9

## Mini X-STR multiplex system を用いた 8 ローカスの日本人集団遺伝子頻度と陳旧性試料への応用

浅村英樹、酒井洋徳、太田正穂、小林寛也、塚田和彦、  
沖 貴仁、福島弘文 (信州大学医学部法医学教室)

[目的] 現在の個人識別では常染色体 STR 解析が主流であるが、性染色体 STR 解析あるいはミトコンドリア DNA 解析が有用な鑑定例も少なくない。Y-STR については、市販のキットが汎用し、本邦を含めて多くの集団での遺伝子頻度が報告されている。一方、X-STR では近年多型を呈す多くのローカスが報告されつつあるが、遺伝子頻度が解析されている集団は少ない。また、法科学鑑定では対象 DNA 試料が低分子化した陳旧性試料であることが避けられない場合がある。今回、PCR 後の増幅産物が 150bp 前後以下になるように X-STR プライマーを 8 ローカス設定し、2つの mini-multiplex system を開発した。これを用いて、日本人集団での遺伝子頻度および陳旧性試料への応用を試みた。

[方法] 健康な血縁関係のない日本人 300 人の DNA を対象とした。DXS7423, DXS6789, DXS101, GATA31E08, DXS8378, DXS7133, DXS7424, GATA165B12 の 8 ローカスについて PCR 後の増幅産物がより短くなるように設定したプライマーを用いて 2つの multiplex PCR を行った。フラグメント解析後の長さの異なる男性試料を混合し Allelic ladder を作成した。また各ローカスについて少なくとも 2つ以上の男性試料をシーケンスし、繰り返し数から型を決定した。AmpflSTR Identifiler と比較検討するため、変性 DNA10 サンプルを用いて各々 PCR を行い、フラグメント解析を行った。

[結果と考察] 2つの multiplex system によって 8つのローカスの型判定が可能であった。これまでの報告と比較し、19bp (DXS8378) から 127bp (GATA31E08) の増幅産物のサイズ縮小が確認され、増幅産物の長さは 76bp (DXS7133) から 169bp (DXS101) までが検出された。統計解析の結果、これらのローカスの解析が法科学鑑定に有効であることが判明した。また変性 DNA の解析の結果、いずれの試料でも市販のキットより多くのローカスでの型判定が可能であり、さらにより高い蛍光ピークが検出された。従って、本 mini-multiplex system が日本人集団における変性 DNA の解析に有効であることが証明された。

## 血液型亜型斑痕からのフラグメント解析による法科学的 ABO 式血液型判定

佐藤耕一<sup>1,2</sup>、伊藤幸夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 順天堂大学医学部法医学研究室

<sup>2</sup> 警視庁科学捜査研究所

**【目的】** ABO 式血液型データベースには塩基配列に起因する ABO 式血液型遺伝子型のアリル名が 114 種類以上見られるようになった。しかし、同一の塩基配列であるにも関わらず、血清学的な血液型が異なるものもあるため、塩基配列を決定することによって血液型亜型、変異型までを決定できるものではない。

我々はこれまで、法科学的試料から、DNA レベルで ABO 式血液型を判定する際には、A 型、B 型、O 型、AB 型の 4 種類に分類するに留めることが極めて重要であり、そのためには 261、796、802、803 の 4 塩基を調べればよいことを報告してきた。297 や 526、703 の変異を検査しても、A アリルと B アリルで同様の塩基置換をしている場合もあり、これらの部位を ABO 式血液型決定のための SNPs 部位として用いた場合、血液型を誤判定してしまう試料が出てきてしまうため、検査部位として適用するには問題がある。他方、261、796、802、803 の 4 塩基についてはそのようなことは報告されておらず、ABO 式血液型決定のための SNPs 部位として用いるのに適している部位である。

今回、血液型亜型の一つである A2 型、A3 型、Aend 型及び Bm 型血痕について、DNA を用いたフラグメント解析による ABO 式血液型判定を行い、A2 型、A3 型及び Aend 型はいずれも A 型、Bm 型は B 型と判定できるか否か、つまり、血液型亜型の試料においても A 型、B 型、O 型、AB 型の 4 種類に分類することができるのか否かについて検証を行ったので報告する。

**【方法】** A2 型、A3 型、Aend 型、Bm 型の血痕から、QIAamp DNA キットを用いて DNA を抽出・精製し、検査に用いた。

261、796、802、803 のそれぞれの部位及びその前後に蛍光標識した sequence specific primer を設計し、261、796 については PCR-SSPPC 法、802、803 については PCR-CTPP 法を行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer、Gene Mapper Software(Applied Biosystems 社)を用いたフラグメント解析を行った。

**【結果と考察】** A2 型、A3 型、Aend の試料はいずれも A 型、Bm は B 型と判定することができた。

血液型亜型の試料においても、フラグメント解析により DNA レベルで A 型、B 型、O 型、AB 型の 4 種類に分類することができる本検査法は、法科学的試料への応用に適しているものであると思われた。

飯田 礼子<sup>1</sup>, 高塚 尚和<sup>1</sup>, 坪田 悦子<sup>1</sup>, 松木 孝澄<sup>1</sup>,  
安田 年博<sup>2</sup>, 岸 紘一郎<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>福井大学医学部法医学・人類遺伝学領域, <sup>2</sup>福井大学医学部  
病態遺伝生化学領域, <sup>3</sup>群馬大学大学院病態遺伝法医学分野)

我々は先に, 年齢推定マーカーの開発を目的として年齢依存的な発現様式を示す遺伝子の検索を行い, ペルオキシソーム膜に局在するマウス腎の新規タンパク質M-LP<sub>L</sub> (Mpv17-like protein, long form) を見出した [1-3]。今回, M-LP遺伝子の選択的スプライシングによって生じる第2のイソフォーム M-LP<sub>S</sub> (M-LP, short form) を同定し, M-LP<sub>S</sub>が細胞質に局在していることや抗酸化酵素の発現を制御している可能性を明らかにしたので報告する [4]。

【材料と方法】1) M-LPsの全長cDNAのクローニングは, SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。2) M-LPsの細胞内局在は, GFPで標識されたM-LPs発現用vectorを導入したCOS-7細胞を, 共焦点レーザー顕微鏡で観察することによって解析した。3) M-LPs発現細胞における各抗酸化酵素のmRNA量およびマウス腎におけるM-LP<sub>L</sub>とM-LP<sub>S</sub>のmRNA量は, 定量的real-time PCRにより測定した。

【結果と考察】1) M-LP遺伝子を構成する5個のエクソンのうち, 第2エクソンを含まない新たなスプライシング産物が存在し, この産物はペルオキシソーム膜局在型イソフォーム (M-LP<sub>L</sub>, 194アミノ酸残基) のC末端側よりなるイソフォーム (M-LP<sub>S</sub>, 90アミノ酸残基) をコードしていた。2) M-LP<sub>S</sub>は, ペルオキシソーム局在化シグナルを含まず, 細胞質に局在していた。3) M-LPs発現細胞では, SOD-2のmRNA量が増加し, Gpx1およびGpx3のmRNA量が減少していた。4) M-LPsは, 生後6週以降のマウス腎で特異的に発現し, 生後9ヶ月齢に達するとM-LP<sub>S</sub>のmRNA量はM-LP<sub>L</sub>のその約1/8にまで増加した。

これらのイソフォームの発現制御には, それぞれ別のプロモーターが関与し, 発達・加齢の過程において異なった機能を持つ分子種が産生されることが予測された。

#### 【文献】

- [1] Iida, R. et al. (2000) Mech. Age. Dev., 113, 135-144.
- [2] Iida, R. et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun., 283, 292-296.
- [3] Iida, R. et al. (2003) J. Biol. Chem., 278, 6301-6306.
- [4] Iida, R. et al. (2005) Exp. Cell. Res., 302, 22-30.

正岡哲治<sup>1)</sup>, 小林敬典<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所  
生産技術部育種研究グループ

<sup>2)</sup>独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所  
水産遺伝子解析センター

【緒言】水産上重要な真珠養殖では、母貝であるアコヤガイの大量斃死により、アコヤガイ近縁種の外国産ベニコチョウガイが母貝として導入され、国内産アコヤガイへの遺伝的影響や新しい病原体の導入が懸念されている。このため、種苗生産管理や資源管理に応用できる両種を明確且つ簡便に判別する手法の開発が求められてきた。しかし、アコヤガイとベニコチョウガイは遺伝的に極めて近縁であり、外部形態やアロザイムはもとより、核およびミトコンドリア DNA の rRNA 遺伝子及び核 rRNA 遺伝子の ITS および IGS 領域の塩基配列で、両者の判別に有効な情報は得られなかった。また、アコヤガイ属の遺伝学的情報はほとんどない。そこで、塩基配列の情報が無くとも PCR 法を利用して多数の DNA 領域を増幅し、この増幅 DNA 断片の有無により多型を検出する RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 法を用いてアコヤガイまたは外国産ベニコチョウガイに特異的な増幅 DNA 断片を探索し、判別マーカーとしての有効性を検討した。

【材料と方法】日本産アコヤガイとして外国産ベニコチョウガイが導入されていない石川県穴水と、由来が明らかな三重県志摩、愛媛県宇和島、愛媛県×高知県の人工種苗を用いた。ベニコチョウガイとして鹿児島県甕島ナマコ池産の天然種苗と、中国海南島、Liusha 及び産地詳細不明の 2 系統の人工種苗を用いた。40 種類のプライマーで RAPD を、64 種類のプライマーの組合わせで AFLP を、40 種類のプライマーで ISSR を行い、両者間で特異的に検出される増幅 DNA 断片を探索した。特異的増幅 DNA 断片が確認された場合は、ミャンマー、カンボジア、沖縄県石垣島、西表島、座間味諸島、鹿児島県奄美大島産のベニコチョウガイと、中国産ベニコチョウガイと日本産アコヤガイの交雑後代 (F1) を材料に追加して当該増幅 DNA 断片の出現頻度を求めた。

【結果と考察】RAPD, AFLP では、用いたプライマーの多くで再現性のある複数の増幅 DNA 断片パターンが得られたが、集団特異的な増幅 DNA 断片は確認できなかった。しかし、ISSR の 1 個のプライマーで中国産ベニコチョウガイに高頻度にみられる増幅 DNA 断片が 1 個確認できたため、サンプル数を増やし、出現頻度を求めた。中国産 4 集団 77.9% (88/113), ミャンマー産 91.7% (11/12), カンボジア産 25% (20/80), 西表島 62.5% (10/16), 石垣島 70% (21/30), 座間味諸島 60% (3/5), 奄美大島 50% (5/10) の個体で本増幅 DNA 断片がみられたが、日本産 5 集団では 0% (0/50) であった。中国産と日本産アコヤガイの F1 では、76.7% (23/30) の個体で本増幅 DNA 断片が見られた。これにより、本増幅 DNA 断片はベニコチョウガイの判別マーカーとして有効と考えられた。

# 13

## 大麻 *Cannabis sativa* L. の「ドラッグタイプ」と「ファイバータイプ」におけるTHCA生合成酵素遺伝子の多型解析

高上馬 希重 (東京大学大学院・農学生命科学)

關 光, 村中 俊哉, 吉田 茂男 (理化学研究所・PSC)

### 【目的】

大麻(アサ, *Cannabis sativa* L.)はアサ科の一年生草本で繊維や油をとるため古くから栽培されている。しかしながら未熟花や葉に麻酔性幻覚物質を含有するため多くの国々で法律の規制を受けている。麻酔性化学成分は数十種類のcannabinoid類化合物である。特に麻酔性の高い成分がtetrahydrocannabinol(THC)である(THCは植物体中では通常tetrahydrocannabinolic acid(THCA)の状態にあるため以下THCAと表記)。大麻は地域や系統によってcannabinoid化合物の含有量に大きな変異がある。繊維生産用に栽培される大麻は「ファイバータイプ」と呼ばれ、THCAが検出されない、あるいは含有量が非常に低い。一方、麻薬を得るため違法に育てられる大麻はTHCA含有量が高く「ドラッグタイプ」と呼ばれる。ファイバータイプとドラッグタイプのTHCA含有量の違いがどのようにして引き起こされているのかは明らかになっていない。そこで本研究ではTHCA含有量変異の原因を明らかにするため、多くの成分変異系統を用いそれらの試料におけるTHCA生合成酵素遺伝子の解析を行った。

### 【方法・結果】

人工気象室において同一環境で育てた13系統の大麻の葉中のTHCA含有量をHPLCで測定したところ高含量6系統(ドラッグタイプ)と低含量7系統(ファイバータイプ)の2群に分かれた。次に各系統のTHCA生合成酵素遺伝子の解析を行った。Sirikantaramaら<sup>1)</sup>の配列情報をもとに新たに設計したプライマーを用いて葉から抽出したゲノムDNAを用いてPCRを行った。その結果ファイバータイプを含む13系統全てに約1.6 kbのシングルバンドが得られた。全バンドの塩基配列を決定したところ13系統は2群に分かれた。すなわちドラッグタイプ6系統とファイバータイプ7系統の2群となった。

1) Sirikantarama et al., *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 39767

# 14

## ラオス北部のイネ・モチ遺伝子の多型

武藤千秋<sup>1</sup>・川野和昭<sup>2</sup>・谷坂隆俊<sup>3</sup>・佐藤洋一郎<sup>4</sup> (1.岐阜大連合農, 2.鹿児島黎明館, 3.京大, 4.地球研) Muto, C.<sup>1</sup>, K.Kawano<sup>2</sup>, T.Tanisaka<sup>3</sup> and Y-I.Sato<sup>4</sup> (1.Uni. Grad. Agr., Gifu Univ., 2.Kagoshima Pref. Mus. Cul. Reimeikan, 3.Kyoto Univ., 4.RIHN)

### 【緒言】

ラオスはモチ米を常食としており、現在でも多くのモチイネ在来品種が栽培されているため、モチイネの起源や伝播を調べるのには適した地域と考えられる。しかし調査事例はいまだ少ない。そこで本研究ではラオス山間部の焼畑陸稲栽培地域を対象として栽培イネのモチ遺伝子の多型を調査し、起源や伝播を調べることを目的とした。

### 【材料および方法】

ラオス北部、ルアンパバン県およびウドムサイ県の村より採集した在来イネ品種 156 系統を供試した。まずヨードヨードカリ溶液で胚乳のモチウルチ性を調べた。次に、これまでに見つかっているモチ品種に共通にみられる、モチ遺伝子座の第 2 エクソンにおける 23bp の重複の有無を調べた。さらに第 1 エクソンにある SSR である RM190 を調査した。SSR のアレル記号については bp の小さいほうから順に a', b', c'... と名付けた。

### 【結果および考察】

ヨードヨードカリ染色では、供試した 156 系統中 135 系統がモチ、21 系統がウルチであった。そしてすべてのモチ系統は 23bp の重複があり、反対にすべてのウルチ系統は 23bp の重複を持たなかった。このことから本調査地域においてもモチイネのモチ性突然変異の起源は一つであることがわかり、これまでの考えを支持する結果となった。

一方 RM190 では a'~f' の、計 6 アレルが確認できた。a' および b' はウルチ特異的なアレルであり、c' はモチ特異的なアレルであった。またモチ系統内だけをみてみても c', d', e', f' の 4 アレルが存在した。さらに、アレル頻度は一部を除きどの民族・地域でも似通った値を示した。このことから本調査地域では、モチ陸稲在来品種は民族・地域を越えて、活発に交流していることがわかった。

今後はラオス全土および周辺国も対象として研究を進めていく予定である。

高宮知子<sup>1,2</sup> 岡田有裕<sup>1,2</sup> 細湊朗子<sup>1,2</sup>  
岡本裕行<sup>1</sup> 村上康文<sup>2</sup> 奥泉久人<sup>1</sup>  
農業生物資源研究所<sup>2</sup> 東京理科大学

### 〔緒言〕

シロイヌナズナは全世界に分布している雑草であり、異なる産地に由来する様々なエコタイプ（生態型）が研究に用いられてきた。エコタイプ間では形態や生育特性に大きな違いがあり、これらの遺伝的なバックグラウンドには、DNA 塩基配列の違い(DNA 多型)や DNA メチル化などのエピジェネティックな変異が含まれ、その解析は生物進化・環境適応を理解するうえで非常に重要である。今回、我々は制限酵素ランダムマークゲノムスキヤニング(RLGS)法を用いて、シロイヌナズナのエコタイプである Columbia(Col)、Wassilewskija(WS)、Landsberg erecta(Ler)の DNA 多型の検出を試みた。

### 〔材料と方法〕

シロイヌナズナの Col、WS、Ler を 4 週間栽培し、地上部から CTAB 法でゲノム DNA を抽出した。それぞれのゲノム DNA を対象に NotI-MspI-HindIII の制限酵素の組合せで RLGS 分析を行い、RLGS パターンを比較した。RLGS スポットの同定には、公開されている Col のゲノムシーケンスデータを用い、仮想的な RLGS 実験(in silico-RLGS)を行った。

### 〔結果と考察〕

Col では 20 個、WS は 22 個、Ler においては 20 個の RLGS スポットが検出された。Col と WS の RLGS パターンの比較から、10 個(38%)のスポットが多型を示していた。このうち、Col 特異的に検出された 4 つのスポットのうち、DNA 多型と考えられた 2 つについて解析したところ、WS では、塩基の欠失と制限酵素サイトの変異が検出された。また、Col と Ler の比較を行ったところ、10 個(40%)のスポットが多型を示していた。そのうち Col 特異的なスポットは 5 つあり、そのうち DNA 多型と考えられた 2 個のスポットは塩基の欠失変異であった。WS と Ler のパターンの比較では、12 個(44%)のスポットが多型を示していた。今回は比較したスポット数が少ないが、制限酵素の組合せを変えることで、さらに多型を検出することが可能であり、系統間の DNA レベルの近縁度を効果的にサーベイできる。

# 16

## 葉緑体 DNA に基づく 実ウメおよび花ウメの類縁関係の解明

太田 智<sup>1,2,3</sup>、林 恭平<sup>4</sup>、八重垣英明<sup>3</sup>、三井信弥<sup>4</sup>、  
大村三男<sup>1,2</sup>、西谷千佳子<sup>3</sup>、山本俊哉<sup>3</sup>

1. 岐阜大学大学院連合農学研究科
2. 静岡大学農学部
3. 果樹研究所遺伝育種部
4. 和歌山県農林水産総合技術センター果樹試験場うめ研究所

**【緒言】** ウメ(*Prunus mume* Siebold et Zucc.)は、バラ科サクラ属の植物で、果実を食用にする実ウメと、花を観賞するための花ウメに便宜的に類別されている。これらの品種の分類は、形態的特徴、アイソザイム、RAPD、自家不和合性遺伝子および SSR 分析などにより行われてきた。これらの研究から、一部のウメ品種の形成には、同じスモモ亜属のアンズやスモモとの交雑が関与していることが示唆されている。しかしながら、葉緑体など細胞質ゲノムの解析はなされておらず、母系や類縁関係は十分に解明されていない。我々は、サクラ属各種の葉緑体 DNA に、種内および種間変異があることを示し、葉緑体の SSR マーカーを作成した。本研究では、葉緑体の *trnL-trnF* spacer (*trnL-trnF*) および SSR マーカーにより、実ウメおよび花ウメの多型を調べ、アンズやスモモとの交雑の影響について考察を行った。

**【材料および方法】** 実ウメ 58 個体、花ウメ 35 個体、アンズ 2 個体、スモモ 2 個体およびスモモウメ雑種 3 個体、合計 100 の品種または系統を供試した。*trnL-trnF* の解析では、この他にアンズ 17 品種およびスモモ 22 品種を供試した。幼葉から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社)または、Genomic-tip 20/G (QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。*trnL-trnF* および 9 種類の葉緑体 SSR のプライマーセットを用い、PCR 法により増幅した。*trnL-trnF* の増幅産物は、1%アガロースゲルで分離し、断片長を解析した。SSR の増幅産物は、DNA シークエンサー (ABI PRISM 3100) により分離・検出し、GeneScan ソフトを用いて断片長を解析した。解析結果をもとに、NTSYSpc ソフトを用い UPGMA 法による樹形図を作成した。

**【結果および考察】** これまでの研究で、*trnL-trnF* において、ウメには他のサクラ属植物と比べ 198bp の欠失があることを明らかにした。本実験では、アンズ 19 品種およびスモモ 24 品種すべてが、欠失のないタイプだった。スモモとウメの雑種とされる 3 品種/系統は、スモモと同じ欠失のないタイプであった。ウメでは、西洋梅、豊後、太平、興津花梅など 8 品種/系統だけが欠失のないタイプを示した。

SSR マーカーの解析結果から、樹形図は幾つかのクラスターに分かれた。一つ目は、アンズ、およびアンズとの雑種とされるウメのクラスター。二つ目は、スモモ、およびスモモウメのクラスター。三つ目は、ウメのクラスターである。ウメのクラスターには、台湾産とされるウメのサブクラスターがみられた。その他、ウメには幾つかのタイプが存在したが、実ウメと花ウメの区別、果実の大きさ、または核の遺伝マーカーとは、関連がみられなかった。実ウメは花ウメから選抜されたと考えられており、それを支持する結果となった。また、実ウメの形成には、様々な花ウメが関与したと考えられた。

*trnL-trnF* において、アンズと同じ欠失のないタイプであったウメ 8 品種/系統は、SSR の結果でもアンズのクラスターに含まれた。従って、これらのウメは、母系をアンズとしたウメとの交雑に由来するものと考えられた。

# 17

## 蛍光二次元ゲノム比較解析法によるコンニャクの品種特異的ゲノム差異の検索

山下秀次<sup>1</sup>、作村健彦<sup>1</sup>、本田大輔<sup>1</sup>、飯塚弘明<sup>2</sup>、奥泉久人<sup>3</sup>

<sup>1</sup>九州東海大学、<sup>2</sup>群馬県農業技術センター、<sup>3</sup>農業生物資源研究所

**【目的】**近年、品種育成者の権利を保護するために農作物のDNA品種鑑定技術の確立が進められている。しかしながら、農作物のDNA品種鑑定はコメ、インゲンマメ、イチゴ、イグサにおいて実用化されているに過ぎず、さらに多くの農作物に関してDNA品種鑑定技術の開発が求められている。本研究では、コンニャクの品種鑑定に適用可能なDNAマーカーを作出するために、演者ら自らが考案した蛍光二次元ゲノム比較解析法によってコンニャク品種間におけるゲノム差異を検索することを目的とした。

**【方法】**供試コンニャクには、群馬県農業技術センターにおいて交配・育成された「みやままさり」、「あかぎおおだま」、「みょうぎゆたか」、「はるなくろ」の4品種を用い、球茎の主芽よりCTAB法で抽出したDNAを材料とした。蛍光二次元ゲノム比較解析法は、定法に従って① ランドマーク制限酵素消化、② 切断部位特異的アダプター連結、③ 蛍光PCR増幅、④ 一次元アガロースディスクゲル電気泳動、⑤ ゲル内での二次元展開制限酵素消化、⑥ 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動、⑦ 蛍光シグナル検出を行い、ゲノムプロファイルを作成した。なお、ランドマーク制限酵素には3種類のレアカッター *BssH II*、*Eag I*、*Not I* を用い、二次元展開制限酵素には *Hinf I* を用いた。

**【結果】**1. **ランドマーク制限酵素の選択**：「みやままさり」のDNAを材料にして3種類の制限酵素を用いてゲノムプロファイルを作成した結果、一次元方向約0.6~2.0kb、二次元方向約0.2~2.0kbの範囲において *BssH II* で約110スポット、*Eag I* で約600スポット、*Not I* で約20スポットが検出された。したがって、コンニャクゲノムの蛍光二次元ゲノム比較解析には *Eag I* がランドマーク制限酵素として適しているものと考えられた。2. **品種間におけるゲノム差異**：ランドマーク制限酵素に *Eag I* を用いて4品種のゲノムプロファイルを作成し、比較した結果、いずれの品種においても約600スポットが検出され、そのパターンはほぼ一致した。しかしながら、各品種に特異的なスポットの有無がそれぞれ数スポットずつ認められた。今後は、これらのゲノム差異をクローニングして塩基配列を決定する予定である。

## ゲノムスキニング多型解析による シロイヌナズナ突然変異体の変異遺伝子迅速同定

松山知樹<sup>1)</sup>、市田裕之<sup>1)・2)</sup>、阿部知子<sup>1)</sup>、浅見忠男<sup>3)</sup>、  
中山秀人<sup>4)</sup>、小池邦昭<sup>5)</sup>、戎崎俊一<sup>5)</sup>

- 1：理化学研究所 FRS・加速器利用展開グループ
- 2：千葉大学大学院・自然科学研究科
- 3：理化学研究所・辻本細胞生化学研究室
- 4：株式会社 PFU
- 5：理化学研究所・戎崎計算宇宙物理研究室

**【緒言】** RLGS (Restriction Landmark Genome Scanning) 法は制限酵素の認識配列そのものを放射標識し、二次元電気泳動により、分離・展開を行う高精度ゲノム解析法である。一方、我々が開発したバーチャル RLGS (Vi-RLGS) システムはゲノムの全塩基配列情報を基に *in silico* シミュレーションを行い、実際の RLGS パターンとの比較のみでスポット同定を行うものである。これらにより、バーチャルパターンで現れ、実際のパターンで現れないスポット情報を集めることによるシロイヌナズナでのゲノムワイドメチル化領域解析 (NAR 31: 4490-4496,2003) や、物理的変異原誘発の植物変異体解析における多型スポット検出の著しい効率化を実現した (J Radiat Res. 43: S157-S161,2002)。マウスゲノム解析 (Genome Res. 14:1733-1740,2004、PNAS 102: 3336-3341,2005) や根粒菌などのバクテリアゲノム解析 (第 13 回学術集会) においても良好な結果を得ている。ここでは、シロイヌナズナ突然変異体解析における、ラフマッピングとの併用による変異遺伝子迅速同定への本システムの適用について報告する。

**【結果および展望】** 物理的変異原 (速中性子線、重イオンビーム等) 誘発変異群の中から、緑化に関するシロイヌナズナ突然変異系統を得た。一遺伝子座関与を確認し、戻し交雑を繰り返した後、本実験に供試した。まず、3種類のランドマーク制限酵素を用いて平均 10kb の RLGS を行ったところ、*BspEI* のパターン中で一カ所多型スポットが検出された。同時にラフマッピングを行い 20 程度の BAC クローンでカバーされた領域まで絞り込み、この領域でのバーチャル RLGS パターンを作成した。両パターンの比較から多型スポットを同定し、詳細に調べたところ、DNA メチル化の変異による多型であることが Bisulfite 法により確認された。また、この領域の 1つの候補遺伝子について明瞭な発現の差異を検出した。本研究では全塩基配列情報不足や特異的塩基配列による異常異動あるいは DNA メチル化等に起因するプロファイリング不能なケースでも変異遺伝子同定の著しい効率化を実現しており、Vi-RLGS システムによる突然変異体の変異遺伝子迅速同定の高い実用性を示すものである。今後、シロイヌナズナのように全ゲノム塩基配列情報を有する生物種の変異体解析に積極的に利用していく予定である。

市田裕之<sup>1,2,3)</sup>, 米山勝美<sup>2)</sup>, 阿部知子<sup>3)</sup>, 松山知樹<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>千葉大学大学院自然科学研究科

<sup>2)</sup>明治大学農学部

<sup>3)</sup>理研 FRS 加速器利用展開グループ

### 【緒言】

キャベツ萎黄病は病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* によって引き起こされる土壌伝染性の病害である。本病に対する抵抗性は優性の単一遺伝子 (YR 遺伝子) によって付与されることが知られている。一般に、病害抵抗性遺伝子を導入した新品種の栽培を開始すると数年以内に抵抗性を打破する菌系 (レース) が出現し、しばしば壊滅的な被害を引き起こす。しかし、YR 遺伝子による抵抗性は 90 年以上の長期にわたって広く利用されているにも関わらず、今日でも極めて安定した抵抗性を維持している。このことから、特に本病が発生しやすい夏を生育期間とするキャベツ作型においては、YR 遺伝子による抵抗性を有する品種の利用が必須である。演者らは DNA マーカーを用いた迅速かつ簡便な本病抵抗性検定法の確立を目標として、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法を用いて本遺伝子と連鎖する DNA 断片を探索し、共優性の STS マーカーを作出したことを報告した (第 13 回学術集会)。本研究では、この STS マーカーによって増幅される領域 (CAA-454 領域) における多型について解析を試みたので報告する。

### 【結果および考察】

キャベツ萎黄病抵抗性連鎖マーカー CAA-454 の周辺領域についてサザンハイブリダイゼーションにより解析したところ、本領域における用いた制限酵素サイトの並びは抵抗性親株 (PR) および感受性親株 (PS) 品種間で共通していた。しかし、各サイト間の断片長は大きく異なっており、本領域周辺における挿入・欠失変異の集積が示唆された。

PR および PS 品種における CAA-454 領域の塩基配列を決定したところ、PS 品種に 2 種類の異なる反復単位からなるミニサテライト (Unit1 および Unit2) がタンデムに挿入されたことで共優性となっていることが明らかとなった。これらのミニサテライトは CAA-454 のユニーク配列に挟み込まれる形で存在しており、全長を含むものと考えられた。また、挿入部位両端において 9 塩基のユニーク配列部分の重複が見い出された。

Unit1 および Unit2 それぞれについて、*Brassica* 属およびその近縁属植物における増幅の有無を調査したところ、いずれも *Brassica* 属植物において強い増幅が起こっている傾向がみられた。Unit1 は特に *Brassica* 属の A, B, C ゲノム種およびこれらの複二倍体種において、Unit2 は B, C ゲノム種とこれらの複二倍体種において強い増幅が起きていることが推測された。これらのミニサテライトは互いに増幅スペクトラムが異なることから、品種識別や核型解析のプローブ、あるいはマッピングにおける VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) マーカー作出の材料として有用であると考えられた。

森光由樹、 名矢結香、 泉山茂之

野生動物保護管理事務所

**目的** ツキノワグマの個体群の絶滅の危険性を予測する資料として、個体数を把握することは重要である。しかし、現行の区画法は、我が国特有の急峻な地形や森林などで、見通しがきかない箇所が多数あり調査には大変な労力が費やされている。また捕獲再捕獲法では、捕獲される動物に偏りがある可能性があり、得られた結果の精度にはそれぞれ限界や問題がいくつかある。ヘアートラップによって得られた毛から遺伝分析を行えば、遺伝子によって1頭1頭を識別することが可能であり個体数推定の精度は格段に向上すると考えられている。そこで報告者らは、調査地に実際に、有刺鉄線を利用したヘアートラップを設置してクマの毛の採取を試み、マイクロサテライト領域による個体識別を実施した。

**方法** 長野県関東山地に、有刺鉄線によるヘアートラップ100台を設置した。また、調査地内に学術捕獲檻19台を設置した。捕獲檻を設置した箇所では、檻の周辺に有刺鉄線で囲って、ヘアートラップを設置した。捕獲並びに毛の採取期間は、8月から11月までの3ヶ月間を採取期間とした。有刺鉄線から採取した毛、および捕獲された個体の血液を試料に、毛の場合は毛髪用DNA抽出用キット（ISOHAIR、ニッポンジーン）血液の場合はEasy-DNA Kit（Invitrogen）を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型にPaetkauら（1994）により明らかにされている8つのマイクロサテライト配列に対応するプライマーセットを用いてPCRにて増幅した。各領域のPCR産物をABI PRISM MODEL3100を用いてフラグメント解析を実施した。

**結果** 22頭のクマが捕獲された。また、ヘアートラップ100台のうち動物の毛が321箇所採取された。その中には明らかにクマの毛ではないものが、計54箇所含まれていた。それらのサンプルは分析の試料から除外した。残り267箇所から採取されたクマの毛サンプルのうち、毛根が付着している毛を優先して327本を適宜選んで分析を実施した。ヘアートラップの毛分析から25頭が個体識別された。そのうち12頭は捕獲された個体と同じ遺伝子をもつものであった。捕獲および毛の分析から調査地には32頭のツキノワグマの生息が確認された。

黒瀬奈緒子<sup>1</sup>, 佐々木浩<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岩手医科大学医学部法医学講座,

<sup>2</sup>筑紫女学園大学短期大学部

野生動物の糞分析からは食性や種などの情報が得られるが、糞の形状が類似するものにおいては、判断が難しい場合が多い。しかし糞から抽出した DNA を分析し、種や性別の判定、さらには個体識別ができれば、野生動物の調査は格段に進歩する。よって、本研究ではこれまでに取り組んできたイタチ科の DNA データを基に、福岡県、佐賀県県境に位置する五ヶ山地域において同所的に分布する食肉目イタチ科 3 種について、動物にストレスを与えない非侵襲的なサンプルである糞から抽出した DNA を用いた分析法の開発を目的とした。

対象種は日本固有種であるイタチ属ニホンイタチ *Mustela itatsi*, 移入種であるイタチ属シベリアイタチ *Mustela sibirica*, 両種を調査する際に最も混同されやすいテン属ニホンテン *Martes melampus* とした。ニホンイタチは、近年では西日本の平野部では分布を狭めており、多くの県で準絶滅危惧種に指定されている。分布縮小の原因としては、生息域の環境破壊と、同所的に分布する移入種シベリアイタチとの競合が考えられている。

対象種 3 種の糞は小さく、また野外に長期間放置されていた糞も多いため、これらの糞から解析が可能となるよう、分析方法の開発を行った。その結果、状態の悪い糞 DNA でも十分に解析可能であることが解った。

以上、開発した糞 DNA 分析法の有用性と今後の可能性について議論する。

鶴山竜昭<sup>1</sup>、平塚拓也<sup>2</sup>、日合弘<sup>3</sup>、玉木敬二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学医学研究科法医学講座、<sup>2</sup>京都大学附属病院  
病理部、<sup>3</sup>滋賀県成人病センター

SL/Khマウスのリンパ腫は内在性レトロウイルスのプロウウイルスの挿入による遺伝子の活性化により発生するが、その病型は宿主遺伝要因と活性化遺伝子の組み合わせによって決まる。SL/Khリンパ腫の一部は、プロウウイルスにより活性化された Stat5aが、cMycなど下流遺伝子を活性化し、かつ IL7Rなど上流因子、宿主遺伝的背景などに多面的に対応し、Pro-B細胞の腫瘍性増生に至るものであり、B細胞の初期分化過程とそのがん化の優れたモデルである。この宿主の遺伝的背景としてPro-B細胞の前腫瘍性のポリクリーナルな増生が必要であることが明らかとなりその責任遺伝子座が第3染色体D3Mit19とD3Mit346にマッピングされた。この遺伝子にはLEF-1, ATP-binding cassetteなどの候補遺伝子が報告されておりそれらの発現の変化、多型性によるPro-B細胞の増生との関係を検討している。

## 23 東アジアにおける人類集団の 遺伝的近縁関係

齋藤成也・石橋みなか

総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻

および国立遺伝学研究所集団遺伝研究部門

東アジアにおける人類集団の遺伝的近縁関係は、これまでに多くの研究がなされてきた。かつては血液型やタンパク質の多型が調べられたが、最近ではミトコンドリア DNA の塩基配列や核 DNA のマイクロサテライト多型を用いて、遺伝的關係が推定されている。集団の近縁関係をより詳細に推定するためには、多くの多型 DNA マーカーを用いる事が有益である。そこで私達は、中国人 5 集団と日本人 2 集団を対象として、核ゲノム中に散在する 35 個の Alu 挿入多型と 21 番染色体上の 25 個の SNP を多型マーカーとして用い、それらの検索を行っている。これらのデータから東アジア人類集団の近縁関係について報告する。

## 24

# 新しい市販の Y-STR 型判定用マルチプレックスキットで観察された突然変異

吉本高士、山本敏充、打樋利英子、李士林、勝又義直  
(名古屋大学大学院医学系研究科法医・生命倫理学)

### 【緒言】

父子鑑定などに用いられる Y 染色体上の STR マーカー(Y-STRs)では、有用なローカスが多数報告されているが、最近 10 数個の Y-STR ローカスが一度に型判定できるマルチプレックス PCR タイピングキットがいくつか市販され、世界レベルで汎用されつつある。我々は、突然変異に関する知見を得るため、これまでに日本人父-男児 147 組の DNA 資料について 14 種類の Y-STR ローカス(DYS19、DYS385、DYS389I、DYS389II、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、DYS435、DYS437、DYS438、DYS439、DYS460、Y GATA H4)を解析し、5組の父子で突然変異が観察されたことを報告した(Kurihara et al.)。本研究では、最近 Applied Biosystems 社から発売された AmpFISTR Yfiler kit を用いて、新たな4ローカス(DYS448、DYS456、DYS458、DYS635)を含む計 17 ローカスについてタイピングを行ったところ、さらに4組の父子の4ローカスで突然変異を観察したので報告する。

### 【材料及び方法】

前回使用した他の DNA マーカーで生物学的な父子関係が存在すると判断された日本人の父-男児家系のうち 128 組の DNA 資料について、Applied Biosystems 社の AmpFISTR Yfiler kit を用いて、DYS19、DYS385a/b、DYS389I、DYS389II、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、DYS437、DYS438、DYS448、DYS456、DYS458、DYS635、Y GATA H4 の 17 ローカスの Y-STRs を増幅した。PCR 産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer によりキャピラリー電気泳動し、GeneMapperID ソフトウェア v3.2 を用いて自動的に型判定し、父子間のハプロタイプの比較を行った。

### 【結果および考察】

父-男児 128 組の DNA 資料について、17 ローカスの Y-STRs のハプロタイプを解析したところ、今回新たに型判定された4ローカス(DYS448、DYS456、DYS458、DYS635)のうち、DYS458 及び DYS635 の2ローカスにおいてそれぞれ2組、合計4組の父子間で突然変異が観察された。そのいずれも父から男児への1リピートの gain であった。前回観察された突然変異とあわせて算出された突然変異率は 0.41% (/locus/meiosis)であり、これまでに報告されている突然変異率とほぼ同程度の値であった。また、これら 128 組の非血縁関係者間において、前回の 14Y-STR ローカスでは識別できなかった3組のハプロタイプが、新たに4ローカスが型判定されたことにより識別された。さらに、1組の父子で DYS448 において allele dropout が観察された。突然変異の観察されたローカスの各アレルの塩基配列を確認するとともに、この allele dropout が生じた原因究明のためにシーケンシングを行う予定である。

### 【参考文献】

Kurihara et al. (2004) Int. J. Legal Med., 118: 125-131.

安積 順一・浅利 優・清水 恵子・塩野 寛  
旭川医科大学法医学講座

近年の DNA 多型分析技術の進歩により物体検査は DNA 多型分析によるヒトの個人識別が中心であり、その前提としての人獣鑑別についての報告は多くない。

p53 遺伝子は、色々な動物種間でアミノ酸配列が共通に保存されている領域と動物種によって異なっている領域の存在することが知られている。このことを利用して、殺人、死体遺棄事件被害者の胃内容物の肉片と被害者自宅冷蔵庫で見つかった肉片の動物種の異同鑑別を行ったので報告する。

【方法】各々約 10mg の肉片を採取し、10mM トリス緩衝液を 1ml 加えホモジナイザーでホモジナイズした後、Sepa Gene（三光純薬）にて DNA 抽出を行った。人獣鑑別はヒト特異的増幅産物が得られるように、プライマーを作成し、PCR 法にて増幅を行った。肉片の動物種の鑑別は、動物種間で類似したアミノ酸配列が認められる p53 遺伝子第 7 エクソンと第 8 エクソンの領域にプライマーを作成し、第 7 イントロンの大きさと塩基配列の違いから動物種の特定を行った。

【結果および考察】1) 人獣鑑別：ヒトにおいては 449bp に 1 本の増幅バンドがみられたが、肉片試料では 449bp に増幅バンドがみられず、それ以外のところに数本の増幅バンドがみられ、これらの試料はヒト（霊長類）以外の動物の肉片であった。2) 動物種の鑑別：ヒトにおいて 422bp に 1 本の増幅バンドがみられたが、試料ではすべて約 400bp のところに 1 本の増幅バンドがみられ、p53 遺伝子第 7 イントロンの大きさおよび塩基配列は全て同じであった。われわれが以前に報告した各種動物における第 7 イントロンの大きさおよび塩基配列のデータと比較したところ、肉片はブタ肉であった。これらのことから p53 遺伝子の解析は、法医試料からの人獣鑑別および動物種の特定に有効な手段であることが明らかになった。

室 友紀<sup>1</sup>, 中村博明<sup>1</sup>, 今村真二<sup>1</sup>, 湯浅 勲<sup>2</sup>

<sup>1</sup>島根県警察本部科学捜査研究所,

<sup>2</sup>鳥取大学医学部法医学分野

【はじめに】 法医鑑定において生物試料からの人獣鑑別は重要な検査項目のひとつであり, 近年, DNA分析を応用した種々の人獣鑑別法が報告されている。われわれは, mtDNA-HV1領域両端に存在する哺乳類間で相同性の高い塩基配列上に設定した共通プライマーとHV2/3領域両端に設定したヒト特異的プライマーとで同時増幅を行い, その増幅産物の電気泳動像から人獣鑑別と動物種の推定が可能であることを示した。今回, 本法を用いた鑑定例を紹介するとともに, 魚類についても共通のプライマーを設定し, その増幅産物のサイズから種の識別を試みたので報告する。

【材料及び方法】 哺乳類9種, 魚類3種のDNAを試料とした。ヒトを含む哺乳類の識別にはプライマー-mt-U1, U2およびmt-HV2f, 2rを, 魚類の識別にはmt-Fh1f, 1rおよびmt-Fh2f, 2rを使用した。各動物DNAを用いPCR増幅を行った後, アガロースゲル電気泳動によって増幅産物のサイズを確認した。

【事例】 島根県内で発生した2事件の現場血痕に本法を使用した。動物由来と考えられた血痕について, 増幅産物の塩基配列を決定し, DDBJのBLAST解析によって動物種を決定した。

【結果及び考察】 Genbankから取得した各種魚類のmtDNA-HV領域の塩基配列を比較し, 相同性の高い部位を調査した。哺乳類では極めて相同性の高い配列が存在したため1組のプライマー(mt-U1, U2)で増幅可能であったが, 魚類では種間で塩基配列に差異が認められたため, 2組のプライマー(mt-Fh1f, 1rおよびFh2f, 2r)を設定した。これらの2組のプライマーによるPCR増幅では, 検査した哺乳類に増幅産物は認められず, 3種の魚類(タイ, カツオ, メバチマグロ)にそれぞれのmtDNA配列から予想されるサイズの産物が検出された。この結果から, 魚類においても哺乳類と同様にHV領域の増幅断片長の相違による種の推定が可能であると考えられた。実務鑑定2例の血痕由来のDNAについてプライマー-mt-U1, U2およびmt-HV2f, 2rを用い, 哺乳類の識別を実施した。1例目の増幅産物のサイズは約390 bpであり, タヌキと推定された。2例目では, われわれが検査した動物の増幅産物のサイズとは異なる約350bpの産物が検出された。各事例で得られた増幅産物の塩基配列を決定し, BLAST解析によって検索した結果, 1例目はタヌキ, 2例目はイタチと判明した。

本法は, 簡便なアガロースゲル電気泳動によって人獣鑑別と動物種の推定が可能であること, さらに塩基配列解析とBLAST解析によって動物種の判定も可能であることから法科学鑑定の有効な手法になることが期待される。

# 抄 録

展 示 発 表  
(P1~P41)

テクニカルセミナー



# P1

## 喫煙習慣に及ぼす遺伝子多型の影響と職場ストレス

### との関連

渡辺洋子<sup>1</sup>, 勝山博信<sup>2</sup>, 日高和夫<sup>1</sup>, 富田正文<sup>3</sup>, 奥山敏子<sup>3</sup>,  
為近美栄<sup>4, 5</sup>, 伏見滋子<sup>2</sup>, 東真由美<sup>1</sup>, 湊川洋介<sup>1</sup>, 角南重夫<sup>2</sup>  
川崎医科大学<sup>1</sup>生化学, <sup>2</sup>公衆衛生学, <sup>3</sup>医用中毒学, <sup>4</sup>中央検査部, <sup>5</sup>大阪大学大学院・生体情報科学講座

【目的】近年、ニコチン代謝酵素や神経伝達物質関連遺伝子などの様々な遺伝子多型が明らかになり、喫煙習慣との関連が指摘されるようになった。一方、生活習慣の獲得や維持には、職場や家庭などの環境要因が大きく影響する。今回、ニコチン代謝に関与する CYP2A6 遺伝子、ニコチンへの依存性形成との関わりが示唆されているドーパミンレセプターDRD2 遺伝子、およびアルコール脱水素酵素 ALDH2 遺伝子の多型解析を行い、喫煙習慣に及ぼす遺伝子多型の影響と飲酒、職場ストレスとの関連を検討した。

【方法】インフォームドコンセントにより研究に参加した 133 名の某製造業労働者を対象とした。DNA は血液から抽出し、CYP2A6, DRD2 および ALDH2 の遺伝子多型解析を行なった。血漿中のコチニン量は HPLC により測定した。喫煙状況と飲酒状況はアンケート調査し、職場ストレスは職業性ストレス簡易調査票により総合健康リスクスコアを算出し評価した。

【結果と考察】CYP2A6 多型遺伝子の出現頻度は、\*4, \*7, \*8, \*9 および\*10 型がそれぞれ、17.7%, 20.7%, 3.0%, 23.3%および 3.0%であった。\*7 型の出現頻度は従来報告されているものより高く、地域差が考えられた。DRD2 多型遺伝子は A2 型が 65.0%, A1 型が 35.0%で、日本人の頻度と一致していた。全対象者で喫煙歴、飲酒歴、総合健康リスク、CYP2A6 多型、DRD2 多型、ALDH2 多型を項目として因子分析を行なったところ、喫煙習慣の獲得にニコチン代謝活性との関連が示唆されるとともに、総合健康リスクで示される職場ストレスの関わりが強く示された。一方、飲酒習慣の獲得には、職場ストレスとの関連は認められず、ALDH2 遺伝子多型との相関が示された。また、喫煙者 82 名のみを対象として、1日喫煙本数、血漿中コチニン量、総合健康リスク、CYP2A6 多型、DRD2 多型、年齢、を項目として因子分析を行なったところ、喫煙1日本数と CYP2A6 遺伝子多型、血漿コチニン量との相関が認められた。DRD2 多型の喫煙習慣に及ぼす影響は認められなかった。以上の結果から、CYP2A6 遺伝子多型に基づくニコチン代謝活性の違いが喫煙量の制御に関わり、喫煙習慣の獲得には職場ストレスで示される環境要因の影響が大きいと思われた。

## P2

### 薬物中毒と Glutathione S-Transferase M1 及び T1 遺伝子多型の関連

中留真人、加藤光司、望月薫、宮地章高、貴志有望、的場梁次  
大阪大学大学院医学系研究科 予防環境医学専攻  
社会環境医学講座 法医学教室

#### 【目的】

GST (glutathione S-transferase) は、生体外の異物とグルタチオンとの抱合反応を触媒する解毒酵素であり、活性酸素や脂質過酸化物質などを不活性化作用がある。この GST ファミリーの中で、GSTM1 及び GSTT1 遺伝子には遺伝子が欠失している遺伝子欠失多型が存在しており、この遺伝子の欠失は薬物の効き方や解毒能力に大きく影響すると考えられ、肺がん発病リスクと相関するとの報告や、花粉やディーゼル廃棄物質に対するアレルギー反応を増強するとの報告もある。そこで今回我々は、社会的にも問題となっている薬物（覚醒剤、向精神薬等）中毒と、GSTM1 及び GSTT1 多型との関連性について検討するため、多型解析を試みた。

#### 【材料と方法】

同意の得られた健常な日本人 150 名、及び当教室にて司法解剖にふされた薬物中毒者 80 名の末梢血から抽出したゲノム DNA を PCR の鋳型とした。GSTM1 及び GSTT1 遺伝子の欠失多型領域内にプライマーを設定し、それぞれ内部コントロール遺伝子も同時に PCR 増幅することで、欠失多型を検出した。

#### 【結果と考察】

GSTM1 欠失多型の対立遺伝子頻度においてカイ 2 乗検定を行った結果、健常群と薬物中毒者群間に有意差は認められなかった。一方、GSTT1 欠失多型の対立遺伝子頻度において、薬物中毒者群における GSTT1 遺伝子ホモ欠失型の割合が有意に高かった。これらの結果から、GSTT1 遺伝子の完全欠失が、薬物の代謝能力低下と関連している可能性が示唆され、今後はサンプル数を増やすと同時に、他の GST ファミリー遺伝子多型についても解析する予定である。

## P3

### CATERPILLAR 遺伝子群の SNP タイピングによる本態性 高血圧症との関連解析

北村歌奈子<sup>1</sup>、近江俊徳<sup>1,2</sup>、熊田真樹<sup>1,2</sup>、後藤孝也<sup>1,2</sup>、宇津見  
七海<sup>1</sup>、ルハグワスレン ムンフトルガ<sup>1</sup>、坂本敦司<sup>2</sup>、岩本禎彦<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学 地域医療学センター 人類遺伝学部門 <sup>2</sup>法医学部門

【目的】CATERPILLER (CARD, transcription enhancer, R (purine)-binding, pyrin, lots of leucine repeats) family protein は、炎症、アポトーシス、免疫応答に関与している。最近、我々は *CATERPILLER family* 遺伝子群の一つである *CIAS1* 遺伝子が、本態性高血圧症の原因候補遺伝子であることを明らかにした (第 89 次日本法医学会総会)。そこで、今回 *CIAS1* 遺伝子以外の *CATERPILLER family* 遺伝子群について本態性高血圧症との関連解析を試みた。

【方法】関連解析には、インフォームドコンセントを得て収集した pooled DNA パネル 1 (高血圧群 95 例、健常者群 95 例)、パネル 2 (一般集団 267 例) を使用した。*CATERPILLER family* 遺伝子群に属する 22 個の遺伝子に合計 40SNP の TaqMan プローブ (ABI) を選択し、ABI PRISM 3700 DNA analyzer を用いてタイピングを実施した。統計学的に解析は SNPalyze (ダイナコム、神奈川) を用いた。パネル 2 は遺伝子型と血圧値との相関解析に使用した。また、gene specific TaqMan プローブ (ABI) を用いて白血球における遺伝子発現と遺伝子型についても検討した。【結果および考察】パネル 1 を用いた Case-Control Study の結果、40SNP のうち 4SNP (4 遺伝子座) において統計学的な有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた。また他の 5 つの SNP については統計学的な有意差は認められなかったものの、Case 群と Control 群で遺伝子頻度に差が認められた。次に、これらの 9SNP について、パネル 2 の各遺伝子型と血圧値との相関について検討した結果、統計学的に有意な相関を示す SNP は検出されなかった。また、健常者 43 例の 9 遺伝子座について遺伝子型と遺伝子発現の相関を検討した結果、遺伝子型と発現量に有意な相関を示す SNP は認められなかった。しかし、2 つの遺伝子については、遺伝子の発現量に著明な個人差が認められた。今後は、症例数を増やし 2 次スクリーニングおよび遺伝子発現に影響を及ぼしている新規 SNP 探索などを行い *CATERPILLER family* 遺伝子群と本態性高血圧症との関連を検討する予定である。

## －心筋βミオシン重鎖遺伝子の変異解析－

橋本千香子、中村茂基、永井智紀、中前琢磨、  
中丸尚美、小林英樹、杉江秀明、古川理孝  
北里大学医学部法医学教室

## 【はじめに】

肥大型心筋症は心筋症の中でも若年者の突然死の原因となっていることから、臨床的にも注目されており、現在までに9種類のサルコメアを構成する遺伝子が原因遺伝子として同定されている。我々は第89次日本法医学会総会において、検案・解剖された心筋症症例について、原因遺伝子の一つであるトロポニンI遺伝子の変異解析を行い、報告した。

今回さらに、最も遺伝子変異の報告が多い心筋βミオシン重鎖遺伝子(MYH7)の変異解析を行ったので報告する。

## 【材料および方法】

肥大型心筋症10例、拡張型心筋症5例、不整脈原性右室心筋症1例を対象に、御遺族の同意を得て取得した血液試料からQuick Gene-800(FUJIFILM)を用いて抽出を行った。また、対照にはすでに連結不可能匿名化して保存されている特記すべき疾患のない健常人18例を用いた。DNA試料はMYH7のExon3～10についてプライマーを作製しPCR増幅を行った。PCR産物はABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver3.1を用いてダイレクトシーケンス反応を行った後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Sequencing Analysis 3.4.5を用いて泳動および塩基配列決定を行った。なお、本研究は北里大学医学部倫理委員会およびヒトゲノム倫理審査小委員会の審査と承認を得ている。

## 【結果および考察】

今回、心筋症症例16例および健常人18例についてMYH7遺伝子のExon3～10まで変異解析を行った結果、拡張型心筋症2例でExon8のcodon244でサイレント変異、Exon3の-25でG→T変異、Exon7の+31でC→T変異が検出された。また、Exon3のcodon63およびExon10の+17に一塩基多型が検出された。

心筋症の遺伝子変異は多岐にわたり発現の仕方も様々であることから今後解析部位を増やし、病因を解明していくことが必要であると考えられた。

# P5

## 高 GC 含量領域の PCR 増幅における DNA 脱アミノ化処理の有効性

大澤資樹、堀内英和、田 煒、北野 誉、梅津和夫

山形大学医学部 環境病態統御学講座 法医病態進学分野

GC 含量の高い領域は PCR 増幅にしばしば抵抗し、十分な産物を得られない場合が少なくない。また、繰り返し構造を調べる際に短い対立遺伝子が優先的に増幅され、一方のホモ接合と誤ってしまう現象もおこりうる。これらは、高 GC 領域が局所的な二次構造を形成することに原因があるとされている。この PCR 阻害作用を防ぐ目的で、反応液に DMSO や 7-deaza-dGTP などを添加するが、必ずしも有効とは限らない。今回の検討では、PHOX2B 遺伝子内ポリアラニン繰り返し構造の検出に際し、DNA に対し sodium bisulfite 処理による脱アミノ化反応を行い、C 残基をウラシルに変換することにより PCR 増幅が可能となったので報告する。

### 【方法】

DNA の bisulfite 処理は Clark らの方法に従い、2 時間及び 10 時間行った。DNA を精製後、脱アミノ化配列に特異的なプライマー(mPHF1・mPHR2)を用い PCR 増幅を行い、産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。承諾のもと採取した血液検体から DNA を精製し、実験は学内倫理委員会の承認を得た上で行った。

### 【結果・考察】

PHOX2B 遺伝子 20 回ポリアラニン繰り返し領域は、GC 含量が約 88%と非常に高く、通常の増幅では産物を得られない。DMSO などを添加した場合に 400~600 bp 程度の産物が増幅可能となるが、allele dropout 現象が認められ、異常伸長の検出は難しいものとなっていた。今回、bisulfite 処理を行った DNA を鋳型として増幅を行ったところ、通常の 20 回ポリアラニン繰り返しは 122 bp のフラグメントとして検出できた。異常伸長も通常繰り返しと同等の産物を得た。また、脱アミノ化処理は 2 時間で十分増幅可能となり、サブクローニング後の C→T から計算すると 70%程度の変換率であった。PHOX2B 遺伝子ポリアラニン異常伸長は、乳幼児期に発症する睡眠時無呼吸を主症状とする中枢性肺胞低換気症候群(CCHS, Ondine の呪い)の遺伝的原因であり、本法は今後有効な遺伝子診断法になると考えられた。

## P6

### DMPA (differentially methylated parental allele) 検出法 に関する検討 II

中屋敷徳、高宮正隆、黒瀬奈緒子、橋谷田真樹\*、青木康博  
岩手医科大学医学部法医学教室、  
\*東北大学大学院医学系研究科社会医学講座法医学分野

我々はインプリント遺伝子内の DMPA (differentially methylated parental allele) 状態を利用して親アリルを選択的に検出する方法(DMPA 検出法)を開発した。5つの遺伝子(*HYMAI*, *MEST*, *H19*, *SNRPN*および *PEG3*)の特定 SNP(s)が本法に有用であり、併せてその信頼性に関して昨年(2007)の第13回 DNA 多型学会において報告した。現在のところ、本法で確認されている多型は SNP だけであり、本法の有用性をさらに高めるためには、異なる遺伝子上の複数の SNP を同時に検出することが一つのアプローチと考えられる。そこで、まずこれら SNP のアリル分布を調べ、識別能力の高い SNP (=ヘテロ接合率が高い)の組合せを検討し、さらにその同時検出について検討した。

#### 材料と方法

インフォームド・コンセントが得られている日本人 DNA サンプルについて、本法に有用な各 SNP の型判定を PCR-RFLP 法(*MEST*, *SNRPN* および *PEG3*)、-SSCP 法(*HYMAI*)または-CDGE 法(*H19*)で行った。同時検出法は、未処理 DNA ならびに酵素処理 DNA について、APLP 法ならびに mini-sequencing 法で検討した。

#### 結果と考察

158 人の検査結果から、ヘテロ接合体の出現頻度は、*H19*が 0.61、*SNRPN*が 0.49、*PEG3*が 0.43 と高く、*MEST*はアリル頻度の偏りがあったために 0.17 と低い数値を示した。*HYMAI* は日本人の頻度が 0.36 と報告されている。前者4アリルに関して、158 サンプル中、少なくとも1つ以上のヘテロ型が存在したのは 147 例(93%)、4アリルすべてがヘテロ型であったのは4例(2.5%)であった。最もヘテロ接合頻度の低い *MEST* を除いても、146 例(92%)が3マーカーのいずれかでヘテロ型を示したことから、*H19*、*SNRPN*および *PEG3*の3アリル同時検出が、効率的な親アリル判定に適していると推測された。これらの同時検出法に関しては、現在検討中である。

## P7

### 塩基配列特異的熱溶出クロマトグラフ(SSTEC)法によるヒト嗅覚受容体遺伝子の DNA 多型解析

郡山 豊泰<sup>1</sup>、新井 絢子<sup>1</sup>、時田 佳治<sup>1</sup>、近藤 壽彦<sup>1</sup>、笠井賢太郎<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>群馬大学医学部保健学科、<sup>2</sup>科学警察研究所

【目的】 ヒトには 910 種の嗅覚受容体遺伝子(以下 OR 遺伝子)が存在し、その約 6 割は偽遺伝子である。また、約半数の OR 遺伝子は第 11 番染色体に集中するが、他は第 8 番、20 番、Y 染色体を除く全ての染色体上に分散し、クラスターを成している。興味あることに OR 遺伝子のコード領域にはイントロンが含まれず、アレル型とハプロ型を含む多数の SNPs (一塩基多型)が見出されている。そこで我々は、ヒト OR 遺伝子を対象とする新規 DNA 検査法の開発をめざして、SSTEC 法を用いる DNA 多型解析を行った。

【方法】 ヒトの第 17 番染色体に座位(17p13.3)する OR3A2 遺伝子に存在する 3 つの SNPs 部位 (550、657 および 828)に着目し、SSTEC 法による DNA 多型解析を行った。SSTEC 法とは HPLC システムに基本をおき、カラム内に充填した樹脂担体上に DNA プローブを固相化しておき、これとハイブリダイズする被検 DNA を一定の昇温勾配下に熱溶出するときのクロマトグラフ的挙動から遺伝子変異の有無等を検出する技術である。本法は全自動で被検 DNA の溶出パターンとともに、融解温度( $T_m$ )を $\pm 0.1^\circ\text{C}$ の高精度で決定できる。分析用の試料は、被検者の口腔粘膜から調製したゲノム DNA を PCR 法で遺伝子特異的に増幅し、更に蛍光標識した DNA 断片を用いた。

【結果】 DNA 多型を有する各種分析試料を用いて SSTEC 解析を行った結果、OR3A2 遺伝子の 550 位にみられる野生型から変異型へのトランスポージョン変異 (C/G)では  $T_m$  の  $2.6^\circ\text{C}$ の差が、また、657 位と 828 位とにみられるトランジクション変異 (T/C と G/A)では、 $T_m$  に夫々  $2.9^\circ\text{C}$ と  $4.3^\circ\text{C}$ の明確な差が確認された。また、550 位の変異解析用のプローブを用いた SSTEC 解析において、通常のピークが検出されない家系のあることが発見され、新規の遺伝子変異の存在が示唆された。

【考察】 ヒト OR 遺伝子は多数の SNPsが存在し、多数の染色体に分散していることから、個人識別には格好の標的遺伝子と言うことができる。また、嗅覚が対象であるため倫理上の問題が少ないばかりか、偽遺伝子を対象とすることで倫理上の問題は完全に回避することができる。更には、OR 遺伝子が多重遺伝子ファミリーであるため、共通又は縮重プライマーを用いれば、一度に多数の OR 遺伝子を分析対象とすることも可能である。今後、SSTEC 法が多プローブ化が実現できれば、新規 DNA 検査法として極めて優れたツールになると考えている。

## P8

### Phi29 DNA polymerase で増幅したヒト口腔粘膜細胞

#### DNA の PCR による遺伝子多型分析への適用例と条件 検討

伊藤未来<sup>1</sup>、井上幸子<sup>2</sup>、前田純夫<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>奈良女子大学大学院・人間文化研究科

<sup>2</sup>奈良女子大学・生活環境学部

〔目的〕 PCR による多サンプルの遺伝子多型分析においては、一定品質以上の鋳型 DNA を十分量確保することが重要である。近年 Dean らにより、新たな *in vitro* DNA 増幅法として phi29 DNA polymerase を用いる方法が開発され (PNAS 2002; vol.99 no.8 5261)、遺伝子多型分析への応用可能性が示されたが、その適用例は未だ十分報告されていない。本報告では、phi29 DNA polymerase によるゲノム遺伝子増幅の量的・質的検討を行うとともに、いくつかのヒト遺伝子多型分析への適用を試みた。

〔方法〕 swab 法で採取したヒト口腔粘膜細胞からゲノム DNA を粗精製後、Amersham Biosciences 社の GenomiPhi DNA Amplification kit を用いて DNA 増幅を行った。増幅した DNA は 5 倍に希釈後、ALDH2、ABO 式血液型等の allele-specific PCR 等の鋳型として用いた。

〔結果〕 上記 kit の使用により、ヒト口腔粘膜細胞由来 DNA10ng をコンスタントに約 1000 倍の 10–15 $\mu$ g に増幅できることを確認した。この増幅した DNA は、ALDH2、ABO 式血液型等の遺伝子多型分析に再現性良く用いることができ、PEG 沈殿処理を行った未増幅 DNA サンプルと同等、もしくはそれ以上の精度での遺伝子多型分析が可能であることを見出した。これらの結果から、Phi29 DNA polymerase によるゲノム DNA 増幅法は、数千–数万サンプル程度の PCR 遺伝子多型分析に必要な鋳型 DNA を極少量の口腔粘膜細胞から調製しうる好適な方法であり、PCR の再現性や精度等の点でも十分な品質の鋳型を供給しうることが示された。

田村明敬、岩田美佐、高瀬 泉、坪井健人、福西新弥、宮崎時子、  
西尾 元、鈴木廣一

大阪医科大学法医学教室

### 目 的

父親に存在するX染色体はその娘だけに伝達されるので、その上に存在するShort Tandem Repeat (X-STR)は親子鑑定の中なかでも父娘の鑑定に有効なDNAマーカーである。我々は、これらのX-STRの中なかから16種を選び日本人集団における対立遺伝子の出現頻度と変異の解析を行った。しかし、それぞれのX-STRを個別に解析するには、多くの時間と労力が必要である。そこで本研究は、1回のPCRで複数のX-STRの同時検出を行う目的で、6種のSTR (GATA172D05、DXS6789、DXS6807、DXS6803、DXS101、HPRTB)を選び、蛍光標識プライマーを用いた解析を試みた。

### 方 法

試料は親子鑑定肯定例1例(母、娘、父)を用いた。GATA172D05、DXS6789、DXS6807はTAMRAで、DXS6803、DXS101、HPRTBはJORで5'末端を標識したプライマーを作成した。PCRは反応液量は50 $\mu$ l、GeneAmp 10xPCR Buffer (15 mM MgCO<sub>2</sub>を含む)、0.2 mM dNTPs、5 unit AmpliTaq DNA Polymerases、25 ngの鋳型DNAで行った。反応温度は初期変性は94 $^{\circ}$ C、変性94 $^{\circ}$ C、アニーリング60 $^{\circ}$ C、伸長72 $^{\circ}$ Cを30回行い、最終伸長は72 $^{\circ}$ Cで5分間行った。反応物はABI PRISM 310 Genetic Analyzerで解析した。本研究は、大阪医科大学倫理委員会の承認を得ている。

### 結 果

図1の上段にはTAMRAで標識した、下段にはJORで標識した母-娘-父の泳動パターンを示した。いずれのピークも報告されている塩基数に検出された。GATA172D05とDXS6803は、親子とも1本のピークとして検出されてそれぞれのバンドは両親と娘で一致していた。DXS6789、DXS6807、DXS101は母と娘は2本のピークとして、父は1本のピークとして検出された。これらのピークも両親と娘で矛盾はなかった。

PCRの条件検討として、アニーリング温度と鋳型濃度について調べた。アニーリングの温度を61、62、63 $^{\circ}$ Cと上昇させたところ、すべてのピークの高さが低くなる傾向にあり、63 $^{\circ}$ Cでは検出できなかった。つぎに鋳型量を0.1、1、10、25、50 ngと変化させたところ、10 ngまではすべてのSTRの検出が可能であった。

現在、常染色体やY染色体上のSTRについては、16または17種の同時検出が行われて

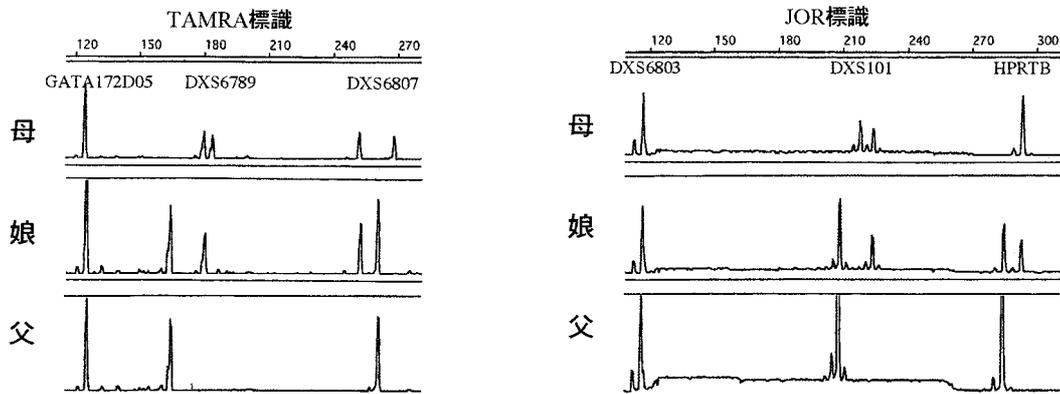


図1 蛍光標識プライマーを用いたX-STRの同時検出

# P10

## 温度勾配電気泳動法による *ABO* 遺伝子の SNP 解析

三谷友亮<sup>1,2</sup>, 小林 哲哉<sup>1,2</sup>, 赤根敦<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 関西医科大学法医学教室

<sup>2</sup> 大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所

### 【緒言】

*ABO* 遺伝子には, SNPs に起因する主要なアリルと稀な変異型アリルの存在が報告されている. 今回, 主要なアリルの SNPs の同定とその他の SNPs の存在を同時に確認する検査法として, DNA 断片の温度安定性を利用した SNPs 検出法である温度勾配電気泳動 (TGGE) 法を適用し, *ABO* 遺伝子の Exon6 および Exon7 領域中の SNPs 高速検出法の開発を行った.

### 【材料及び方法】

主要な各 *ABO* 遺伝子型の DNA を試料として, Exon6 全領域 (216-bp) および Exon7 領域の一部 (245-bp) について, GC クランプを付加したプライマーセットを用いて, PCR 増幅産物を得た. 尚, 各 DNA 試料は, Exon6 および Exon7 全領域のシーケンシングによって SNPs の確認を行った. 各増幅産物について, TAITEC 社製 Micro-TG を用いた TGGE 法によるホモ二重鎖およびヘテロ二重鎖の解析を行った. 各遺伝子型の増幅産物を組み合わせたものについて, 再会合反応前後での TGGE のバンドパターンの変化を調べた.

### 【結果及び考察】

垂直式 TGGE で確認された各領域の増幅産物の融解開始温度を基に, 平行式 TGGE の温度勾配を決定した. 型既知のアリル (*A102*, *B101*, *O01*, *O02*) の増幅産物と再会合反応を行うことによって, 各アリルの組み合わせに特有のヘテロ二重鎖が出現し, 再会合反応前後での TGGE のバンドパターンの変化から *ABO* 遺伝子型の判定が可能であった. TGGE 法によるヘテロ二重鎖解析は, 未知の SNPs 検出にも対応可能な検査法であり, 稀な変異型アリルの検出に適している. また, *ABO* 遺伝子型判定のための簡便かつ迅速な検査法としても, Micro-TG を用いた TGGE 法は効果的である.

篠根光太郎<sup>1</sup>, 橋谷田真樹<sup>2</sup>, 那谷雅之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 三重大学大学院医学系研究科環境社会医学講座法医学科学

<sup>2</sup> 東北大学大学院医学系研究科社会医学講座法医学

#### 【はじめに】

法医学領域での個人識別に STR、SNP が汎用されているが、ABO 式血液型が重要な検査項目であることに変わりはない。今回、我々は簡便、迅速な ABO 式血液型遺伝子型タイピング法について検討したので報告する。

#### 【材料及び方法】

健常ボランティアの頬粘膜を擦過した綿棒から、Quickgene800 (FUJIFILM) を用いて genomic DNA を抽出した。ABO 式血液型糖転移酵素 cDNA の 261, 297, 526, 557, 703, 796, 803, 930 番の 8 カ所を識別するプローブを設計、作製し、Universal PCR FAST Master Mix (AppliedBiosystems) を用いた TaqMan 法により SNP タイピングを行った。使用した機器は 7500 Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems) もしくは、9800Fast Thermal Cycler と ABI PRISM 7700 (AppliedBiosystems) である。TaqMan 反応は 95°C20 秒で DNA を変性させた後、62°C30 秒, 95°C3 秒を 40 サイクル行った。

#### 【結果及び考察】

ABO 式血液型糖転移酵素 cDNA における 8 カ所の変異座位についての迅速な SNP タイピングが可能であった。TaqMan 法を用いることにより、作業工程が少なく、所要時間が短縮され、DNA 抽出から SNP 解析までを約 1 時間で行うことができた。簡便かつ迅速にタイピングできる本法は、法医学的有用性が高いと考えられる。

# P12 SSCP パターン解析により検出された ABO 血液型遺伝子の hybrid allele

中村 貴子、本田 克也  
筑波大学人間総合科学研究科法医学

## 【緒言】

我々は血液型検査に酵素抗体法とともに ALF Express を使用した PCR-SSCP 法パターン解析による遺伝子型検査も併用している。(DNA 多型 Vol.11,12,13)  
当教室において親子鑑定を行った家族の血液型検査を行ったところ 非常に稀な遺伝子型が検出され、その遺伝子が親子3代にわたり遺伝したことが確認されたので報告する。

## 【試料】

祖父、祖母、母、男は血液より DNA を抽出した。子供の双生児2名は口腔粘膜より採取した細胞から DNA を抽出した。

## 【方法】

ABO 血液型遺伝子の3領域を所定の方法にて PCR 増幅の後 SSCP パターン解析により判定した。

## 【結果】

母の血液型は抗体法で A 型と判定されたが、遺伝子型検査で ABO 遺伝子 Exon 6 Fragment I において BO<sup>A</sup> 型 np261del/G, np297A/G として検出された。さらに Exon7、Fragment II では np467C/C ,np526C/C となり Fragment III で np703G/A ,np771C/T となるパターンが検出された。このパターンは Fragment I と III において A204(R101)型のパターンと同じであるが Fragment II の np526 が C であることから A204 型と異なる遺伝子型と考えられる。この Allele は子供2名からも検出され さらに母の父親(祖父)から受け継がれていることがわかった。

## 【考察】

A204 (R101) 型は B101 型 と O201 型の hybrid allele であるが 今回検出された allele は B107 型と O201 型の hybrid allele ではないかと推察される。

# P13

## 塩基配列特異的熱溶出クロマトグラフ(SSTEC)法によるヒト ABO 遺伝子の遺伝子型解析

時田 佳治、安戸 博美、蛭田 芽公美、郡山 豊泰、近藤 壽彦  
群馬大学医学部保健学科

【目的】近年、ABO 遺伝子の塩基配列が決定され、A、B、O、各対立遺伝子の塩基配列の相違が明らかになった。また、亜型の塩基配列や種々のバリエーションも発見された。これらの情報により、DNA レベルでの血液型判定や血清学的に判定が困難な各種亜型の遺伝子判定が可能となった。このような状況下に、既に数多くの ABO 遺伝子型判定法が開発されている。しかし、これらの方法の多くは判定結果が反応条件に影響を受けやすく、操作が煩雑であるといった問題点が指摘されている。今回、我々は信頼性が高く、迅速かつ簡便な ABO 遺伝子の遺伝子型解析法の開発を目指し、SSTEC 法による ABO 遺伝子の遺伝子型解析を行った。

【方法】ヒトの第 9 番染色体長腕に座位 (9q34) する ABO 遺伝子の各アレルを規定する塩基変異部位のほとんどはエクソン 6 とエクソン 7 に集中している。そこで、日本人にみられる遺伝子型 (A、B、O、*cis*-AB01 およびこれらの亜型の組み合わせ) を一度の分析で判別することができるように、エクソン 6 領域の 261 位と 297 位およびエクソン 7 領域の 657 位、796 位、802 位そして 803 位の変異に焦点を当て、それぞれ固相化 DNA プローブを設計して、SSTEC 法による ABO 遺伝子の遺伝子型解析を行った。分析試料は鋳型となるゲノム DNA を被験者の口腔粘膜から調製し、それぞれのエクソン領域を特異的に増幅するように設計したプライマーを用いて PCR を行い、それに非対称 PCR をして得られた蛍光標識 DNA 断片を用いた。

【結果】10 種の遺伝子型をもつ試料について SSTEC 解析を行った。その結果、融解温度 ( $T_m$ )として、261 位では G アレルは  $89.8^{\circ}\text{C}$ 、G の欠失で  $86.6^{\circ}\text{C}$ を示し、297 位では A アレルで  $82.3^{\circ}\text{C}$ 、G アレルで  $78.4^{\circ}\text{C}$ 、657 位では T アレルで  $72.4^{\circ}\text{C}$ 、C アレルで  $69.8^{\circ}\text{C}$ 、796 位と 802 位と 803 位を含むプローブではそれぞれが C、G、G のときに  $61.9^{\circ}\text{C}$ を示した。なお、アレル頻度が低く試料を得られない遺伝子型は合成 DNA により検討したが明確な温度差が得られた。SSTEC 法の精度が  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ であることから、それぞれ明確な温度差として検出でき、プローブ間の  $T_m$  が異なるため、一度の分析で今回対象としたすべての遺伝子型の判定が可能であった。

【考察】本方法は従来の方法と異なり、エクソン特異的増幅プライマーにより PCR 増幅した試料を一度の SSTEC 法の分析操作で ABO 遺伝子型が判定できるため、迅速かつ簡便であり、SSTEC 法を用いることで信頼性の高い結果を得ることができる。また、SSTEC 法は既知の変異に限らず、プローブ領域内であればどんな塩基変異でも検出でき、未知の変異でも  $T_m$  の変化として検出することが可能であるため、新規バリエーションの検索にも有用であると考えられる。

## P14

### ペンギン類の MHC 領域（主要組織適合性遺伝子複合体） における多型解析

吉川 枝里<sup>1</sup>、津田 とみ<sup>1,2</sup>、成瀬 妙子<sup>3</sup>、炭山 大輔<sup>1</sup>、福田  
道雄<sup>4</sup>、栗田 正徳<sup>5</sup>、津田 道雄<sup>1</sup>、村田 浩一<sup>6</sup>、猪子 英俊<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、<sup>2</sup> 徳島文理大学人間  
生活学部、<sup>3</sup> 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野、<sup>4</sup>  
東京都葛西臨海水族園、<sup>5</sup> 名古屋港水族館、<sup>6</sup> 日本大学生物資源科  
学部。

[目的] ペンギン類は、絶滅危惧種を含め現在 6 属 17 種に分類されている。ペンギン類の起源については、現在でも謎が多いが、形態学的研究などから、ウミガラスなどの飛翔性と潜水性とをあわせもつ小型の海鳥類から進化したと考えられている。しかし、形態による分類については未だ統一した見解が得られておらず議論的になっているため、遺伝子レベルでの系統分類が期待されている。また、ペンギン類の分布域が、南極から赤道直下の島々と広範囲であるため、免疫に関わる遺伝子が多く存在する MHC 領域にそれぞれの種に特異的な配列が存在する可能性を考え、系統分類や個体識別などへの応用を視野に入れて、MHC の多型解析を行ってきた。

これまでに我々は、フンボルト属 3 種の MHC 領域 DRB 様遺伝子第 2 から第 3 エキシソンの 807 bp の塩基配列を決定し報告した。それらと、以前決定したペンギン類数種間における第 2 エキシソン内 198 bp の塩基配列とを比較することで、それぞれの種に特有な多型を見出すことができた。これらの結果より、未解析の属もしくは種においても、塩基配列を決定し比較解析を行うことで、特異性を検出できる可能性が高いと期待される。

[結果] 今回新たに、絶滅危惧種であるキガシラペンギン 4 検体について、第 2 エキシソンからイントロンを含めた第 3 エキシソンの塩基配列を決定し、フンボルトペンギンと比較した結果、第 2 エキシソンに 5 箇所、第 3 エキシソンに 3 箇所、そして第 2 イントロンに 6 箇所のキガシラペンギンに特有と思われる多型と 9 bp の欠失が認められた。また、ペンギンの中では最も原始的な種で、フンボルトペンギンに近縁であると考えられているコガタペンギンについても、現在塩基配列を決定中であるので報告する予定である。

## P15 日本の雑種犬におけるマイクロサテライト多型

大石昇<sup>1,4)</sup>, 前田眞理<sup>1,2)</sup>, 槇村浩一<sup>2,3)</sup>, 澤口聡子<sup>5)</sup>, 林屋牧男<sup>6)</sup>, 久保拓也<sup>7)</sup>, 加納壘<sup>8)</sup>, 長谷川篤彦<sup>8)</sup>, 笠原道弘<sup>1,2)</sup>  
<sup>1)</sup> 帝京大学医学部物理学教室, <sup>2)</sup> 帝京大学ゲノム解析リサーチ・センター,  
<sup>3)</sup> 帝京大学医真菌研究センター, <sup>4)</sup> 帝京大学生物工学研究センター, <sup>5)</sup> 東京女子医科大学法医学教室, <sup>6)</sup> 林屋動物診療室, <sup>7)</sup> 北愛動物病院, <sup>8)</sup> 日本大学生産資源科学部獣医臨床病理学研究室

### 【目的】

マイクロサテライト・マーカーは、動物の個体識別や類縁鑑定に有効である。イヌにおいても、従来の血液タンパク質やミトコンドリアの多型解析に加えて、マイクロサテライト多型が特に純系のイヌに関して調べられてきている。しかしながら、これまでの結果の多くはハーディ・ワインバーグ平衡(HWE)が成り立つことが示されていないため、親子鑑定など血縁関係の推定等の統計解析には十分ではない。本研究において、日本各地から採取した雑種犬の血液を用い、18個のマイクロサテライト・マーカーの遺伝的多型についてHWEが成立するかどうか調べた。

### 【材料・方法】

北海道から沖縄までの各地より、類縁関係のない雑種犬 182 頭のDNAを調べた。10個のマーカー (AHT121, AHT130, AHTk253, PEZ3, PEZ12, Ren37A11, Ren42N13, Ren48E01, Ren277K09, ZuBeCa30)については、Tailed primer pairs (Applied Biosystems) を作成し、8個のマーカー (FH2010, FH2054, FH2079, PEZ1, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ20) については StockMarks キット (Applied Biosystems) により、マイクロサテライト多型を調べた。データは“5の法則”を用いて、それぞれのマーカーの稀なアリルをまとめた後、解析した。

### 【結果・考察】

18個のマーカーすべてについて、“5の法則”でまとめたアリル群の分布において、Guo and Thompson の Exact test により、HWEが成立していた。同様の結果は、 $\chi^2$  検定でも確かめられた。これまで、日本産の純系のイヌにおいて遺伝的な地方差があることが報告されており、北海道、京都、沖縄産のそれぞれの集団差について Fisher の Exact test を行ったが有意差は見出されなかった。また、Observed Heterozygosity は 0.57~0.82, Power of Discrimination (PD)は 0.80~0.94, Polymorphic Information Content (PIC) は 0.56~0.80, Mean Exclusion Chance (MEC) は 0.35~0.66 の範囲にあった。18個のマーカーを組み合わせた MEC は 0.9999988 であり、犬の血縁鑑定に有効であることが示された。

# P16

## Dog serotonin transporter polymorphism and the association with behavioral traits

Kyung-Won Hong<sup>1</sup>, Masami Maejima<sup>2,3</sup>, Miho Inoue-Murayama<sup>2</sup>, Mitsuo Morita<sup>4</sup>, Yuichi Murayama<sup>5</sup>, Shin'ichi Ito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, <sup>2</sup>Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, <sup>3</sup>Tokyo Central Pathology Laboratory Co., LTD, <sup>4</sup>Livestock Improvement Association of Japan, Inc., <sup>5</sup>National Institute of Animal Health

<Object> As the dog genome sequence becomes available, canine geneticists are turning their attention to the identification of genes associated with behavior, because dogs showed psychiatric disorders similar to humans such as anxiety, panic disorder and cognitive dysfunction. Although human studies suggested that serotonin transporter gene (*5-HTT*) associates with the complex behavioral traits, no association study was published in dogs. Here, we report the microsatellites loci in the dog *5-HTT* gene which modulates the released serotonin in synapse.

<Methods> Through searching dog genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), we found the dog *5-HTT* gene contained nucleotide repeats, (GAAA)<sub>n</sub>ATA(GAAAA)<sub>n</sub> at the 12<sup>th</sup> intron. In this study, we genotyped the 24 breeds including 275 individuals. For these breeds behavioral traits scored by the questionnaire to 191 dog specialists, such as veterinarians, trainers and groomers were obtained (Tanabe and Yamazaki, 2001). We compared average scores of two groups (A and B) divided by genotypes using the one way ANOVA.

<Results> Ten alleles (10 to 19 repeats) in the (GAAA)<sub>n</sub> and the other 10 alleles (5 to 14 repeats) in the (GAAAA)<sub>n</sub> were found, and a total of 60 haplotypes were identified. Four to twelve haplotypes were observed in each breed and the average heterozygosity was 0.77. The phylogenetic association was constructed for the 24 dog breeds by Nei's genetic distance and neighbor-joining tree. From the order of the breed on the tree, we divided all the breeds into two groups (Group-A and Group-B) which included 9 and 15 breeds, respectively. The (GAAA)<sub>14</sub>ATA(GAAAA)<sub>6</sub> was the most common haplotype in both Group-A (0.11) and Group-B (0.38). The (GAAA)<sub>13</sub>ATA(GAAAA)<sub>6</sub> and the (GAAA)<sub>15</sub>ATA(GAAAA)<sub>6</sub> was also frequent in Group-A (0.10) and Group-B (0.17), respectively. The average scores of Group A were higher in 'aggressiveness' ( $P < 0.01$ ) and lower in 'reactivity' ( $P < 0.05$ ) than those of Group-B. The great diversity of the *5-HTT* repeat region and the association with behavioral traits might be a useful psychiatric marker in dogs.

## P17 タヌキにおけるマイクロサテライトDNAによる 個体識別

松木 吏弓、竹内 亨、阿部 聖哉、梨本 真  
電力中央研究所 生物環境領域

タヌキ (*Nyctereutes procyonoides*) は、古くから人里近くにも生息し、民話などにもよく登場するなど、日本人にとってなじみ深い動物の一つである。近年、里山などの身近な自然の重要性が再認識されるようになり、タヌキは里山生態系の代表的な種として注目されている。本研究では、タヌキの生息数の推定や社会構造の解析に適用することを目的に、個体識別のためのマイクロサテライト DNA マーカーの開発を行った。

マイクロサテライト DNA の単離は、以下の方法で行った。まず、(1) DOP-PCR によるタヌキゲノム DNA の増幅を行い、この増幅産物について、(2) ビオチンオリゴ DNA を用いて 4 塩基反復領域(GATA)を濃縮した。次に、(3)ベクターにクローニングし、得られたコロニーについて、(4)GATAx8 プライマーと M13 正逆プライマーセットを同時に PCR にかけて、スクリーニングを行った。複数本のバンドが得られたプラスミド DNA について塩基配列を決定し、マイクロサテライト DNA 領域の確認を行った。

PCR スクリーニングした 204 クローンのうち、33 クローン(16%)で GATA 反復配列が確認され、塩基配列から 15 種の配列に分類された。反復配列の前後にプライマーを作成し、PCR 増幅およびフラグメント解析を試行したところ、8 種のマーカーで良好な増幅と多型が確認された。

本方法は、通常のスクリーニングのようなリンカーライゲーションやフィルターハイブリを行うことなく、簡便に効率良くマイクロサテライトマーカーを単離できる有効な方法であった。

松崎雄三<sup>1, 2</sup>、向田政博<sup>2</sup>、今井利夫<sup>1</sup>

1 東邦大学理学部生物学科

2 防衛医科大学校法医学講座

ナメクジウオは原索動物頭索亜門に属し、脊椎動物の祖先型の諸特性を有する可能性がある生物種である。日本に生息するナメクジウオ *Branchiostoma belcheri* (*B. belcheri*) の進化を解明するため、*B. belcheri* と *B. lanceolatum* および *B. floridae* の類縁関係を検索した。類縁関係の推定にはミトコンドリア DNA に存在する 15 の遺伝子と NC sequence 領域について塩基配列およびアミノ酸配列を比較検討した。多重整列解析の結果から、4 個体の *B. belcheri* 間あるいは大西洋を挟み対岸に生息する *B. lanceolatum* および *B. floridae* 間で高い相同性が認められたが、*B. belcheri* と *B. lanceolatum* あるいは *B. floridae* 間では相同性が低かった。これらの結果は、その生息域から太平洋海域の *B. belcheri* と大西洋海域の *B. lanceolatum* および *B. floridae* との 2 つのグループに区分できることを分子系統樹を用いて示した。これら 2 グループの分岐は、約 2 億年前と推定され、*B. belcheri* 間あるいは *B. lanceolatum* と *B. floridae* 間の分岐は約 5 百万年前と考えられ、大陸移動に伴った分岐が示唆された。今回、我国の異なる海域で採取された *B. belcheri* のミトコンドリア DNA に関する解析により、地球上に生息するナメクジウオの類縁系統関係が初めて明らかになった。

小林敬典<sup>1</sup>, 大原一郎<sup>1</sup>, 正岡哲治<sup>2</sup>, 猿渡敏郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup>独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所

<sup>2</sup>独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所

<sup>3</sup>東京大学海洋研究所

【目的】 実験データと生物学情報の比較は、研究を行う上で非常に重要であり、この作業で重要な役割をする物にデータベースがある。本報では、水産生物のDNA多型情報と生物情報を一元管理するデータベースの構築を試みた。本システムは、DNA多型情報と形態、生態、病気、実験方法、画像データ、各種文献などを一元管理できる機能を有し、本システムは、実用データベースとして遺伝情報に関連する情報が簡単に誰でも取り出せ、煩雑であった遺伝情報の効率利用を可能とすることを目的とした。

【方法】 本システムは、マザーデータベースに当たる水産総合研究センターで管理する水生生物データベースとリンクし、誰でも簡単に水産研究の先端成果をすぐに取り出せ、すぐに活用できるように設計を行った。本システムは、水産分野で利用率が高くなっているDNA多型研究分野に対応するように設計を試みた。本データベースは、国立遺伝学研究所の日本DNAバンク (DDBJ) とリンクし、DNA配列情報の登録、取得が簡単に行えるように設計した。

【結果】 DDBJに格納されているDNAデータは塩基配列のみである。実際の研究では、DNA上の繰り返し配列であるマイクロサテライト等のDNA配列上の変異部分を利用したDNA多型解析を行っている場合が多い。DNA多型情報を整理し使いやすく加工しているデータベースは無く、利用者が個人で管理しているのが現状である。本システムでは、マイクロサテライト、AFLPなど水産分野で用いられるDNA多型分析法を遺伝情報と生DNA多型情報とリンクする形態、生態、魚病等の生物情報の一元管理し、インターネット上での公開に努めている。また、このようなシステムは、既存のデータベースには無く、本システムが、ゲノム研究で初めての実用データベース構築の試みとなる。

## P20 一塩基置換を用いた太平洋サケマス類の種判別

大原 一郎、小林 敬典、中山 一郎  
(独立行政法人水産総合研究センター 中央水産研究所)

【目的】 カルタヘナ議定書を日本が批准し、国内法が整備された。そこで、種の同定と、異種の DNA を含んだ組換え体の同定を、単一の DNA チップ上で同時に行えるような技術の開発が求められている。その際必要な種の同定技術を、ミトコンドリア DNA 情報と SNPs 法を用いて開発することを目的とした。

【方法】 組換え体作出上重要と思われるサケマス類について、ミトコンドリア DNA の ATPase6 と COIII にまたがる領域で塩基配列のアラインメントを行い、1 塩基置換を探索した。その結果に基づき、SNPs 法を利用してサケマス類の種判別を行うためのプライマーを設計した。

【結果】 サケマス類の ATPase6 と COIII にまたがる領域 1020 塩基の中で、1 塩基置換を示すサイトが多数みつかった。これらのうち 8 サイトにおける塩基置換データを組み合わせれば、タイセイヨウサケ、ギンザケ、シロサケ、マスノスケ、ノドキリマス、サクラマス、カラフトマス、ベニザケ、コジマスの 9 種を判別可能であることがわかった。これらの 1 塩基置換 (SNPs) を検出するためのプライマーを設計した。カラフトマスの PCR 産物と SnapShot Multiplex Kit (AB) を用いて 8 種のプライマーの有効性を確認した。

## P21

### トモメヒカリの生活史 塩基配列が明かすその概略

猿渡敏郎 国立大学法人 東京大学 海洋研究所

平川直人・茂木正人・大野淳 国立大学法人 東京海洋大学

正岡哲治 独立行政法人 水産総合研究センター 養殖研究所

張成年 独立行政法人 水産総合研究センター 中央水産研究所  
横須賀庁舎

近年、底曳網漁業の投棄魚が未利用水産資源として注目を集めている。特にアオメエソ属 (*Chlorophthalmus*) 魚類は、非常に美味しいこともあり、メヒカリという地方名兼商品名で全国的に注目されるようになった。福島県いわき市は、マルアオメエソ (*C. borealis*) を市の魚とし、地元水産業の振興に活用している。

アオメエソ属魚類は極域を除く全海洋の大陸棚縁辺部から斜面に棲息する小型底魚類である。世界から 19 種が報告されているが、その分類、生態、生活史は未だ不明な部分が多い。昨年の本学会において、16SrDNA 塩基配列分析により、2001 年 5 月に薩南・東シナ海南部において採集された本属魚類仔稚魚がアオメエソ (*C. albatrossis*) であると報告された (Saruwatari et al, 2005)。アオメエソは、黒潮を用いて未知の産卵場から日本列島太平洋岸へと仔稚魚を輸送・分散させる、大回遊を行う小型底魚であると推察された。現在本種の全生活史解明に向けて研究中である。

2004 年 11 月に、台湾北東方海域で行なわれた俊鷹丸調査航海 (独立行政法人水産総合研究センター遠洋水産研究所) においてアオメエソ属仔稚魚が採集された。これらアオメエソ属仔稚魚 6 個体の 16SrDNA 塩基配列と、Saruwatari et al, (2005) の結果とを比較したところ、アオメエソが 3 個体、トモメヒカリが 1 個体、不明 2 個体であった。これは、トモメヒカリ仔稚魚の最初の採集報告事例である。トモメヒカリは標準体長 200~300mm に達する大型のアオメエソ属魚類である。

東京海洋大学所属練習船海鷹丸がインドネシア沖において採集したトモメヒカリ成魚を解剖したところ、両性生殖腺の発達が進んだ個体が多数確認された。アオメエソ属魚類では、未だ成熟個体の採集報告例がない。本種がインドネシア周辺海域において成熟・産卵していることを示唆する貴重な生態情報である。現在生殖腺の組織学的観察など、繁殖生態に関する基礎的研究を実施中である (平川 他 投稿準備中)。

得られた新知見を統合すると、トモメヒカリ仔稚魚もアオメエソ同様、日本列島の南西に位置する産卵場から黒潮により日本列島周辺へと輸送され、着底、成長することが示唆された。本種もウナギ同様の回遊を行なう底魚である。

## P22

岩手県宮古湾におけるヒラメ放流魚による再生産の可能性

On the possibility of reproduction of released Japanese flounder  
in Miyako Bay, Iwate.

篠塚由美・朝日田 卓（北里大学水産学部）

【目的】種苗放流事業には対象魚種の資源量を増やすという重要な目標があるが、これを効果的に行うためには放流魚が天然海域で再生産を行うことが望ましい。しかし、遺伝的に単純化した種苗や、放流場所の天然集団と異なる遺伝的特性を持つ種苗が天然海域で再生産を行った場合、天然集団の遺伝的特性が急速に失われていくことが数理モデルによって示されている。このため、放流種苗の遺伝的多様度を維持することが重要となるが、放流魚の再生産への寄与についての知見はほとんどない。そこで、放流された種苗の再生産への寄与を推定することを目的として、宮古湾で漁獲されたヒラメ天然魚の分析を行い、日裁協宮古事業場のヒラメ雌親魚集団および日本周辺海域で漁獲されたヒラメ天然集団との遺伝的特性比較を行った。

【材料・方法】1994年、1996年および1999年に定置網、小型定置網、刺網および延縄の4漁法によって宮古湾で漁獲され、宮古魚市場に氷揚げされたヒラメ天然魚148個体を分析に用いた。ヒラメ筋肉よりTNES-Urea法を用いて抽出した全DNAを材料に、mtDNAの調節領域を中心とした1098塩基対のPCR-RFLP分析と、調節領域内に存在する反復配列数の変異分析を行った。得られた結果に基づき、ハプロタイプ間の類縁関係や遺伝的多様度の推定等を行った。

【結果・考察】PCR-RFLP分析と反復配列分析の組み合わせにより、宮古湾天然集団148個体から123ハプロタイプが検出され、そのうち7ハプロタイプ9個体が日裁協宮古事業場の雌親魚集団のものと一致した。この一致した7ハプロタイプは、他の海域の天然集団や種苗生産施設からは検出されない日裁協宮古事業場の雌親魚集団に特有のタイプであった。日裁協宮古事業場ではヒラメ親魚集団の定期的な入れ替えは行われておらず、へい死等で個体数が減少した場合にのみ親魚を追加していたため、親魚集団のハプロタイプ組成にはあまり変化がなかったと考えられる。したがって、分析した148個体のうちの6%にあたるこれらの個体の持つ遺伝的特性は放流魚由来のものである可能性が高く、日裁協宮古事業場で生産・放流された種苗が、宮古周辺海域で成長し、再生産に寄与していることが示唆された。

## P23

# 日本周辺におけるヒレグロのミトコン ドリア DNA 多型解析

柳本 卓・小林敬典

北海道区水産研究所・中央水産研究所

【目的】ヒレグロはカレイ目カレイ科ヒレグロ属に属し、ナメタガレイ、ヤナギガレイなどと呼ばれ、主に干物として利用されている。ヒレグロは太平洋側では千島列島南部から駿河湾まで、また日本海全域と東シナ海東北部と日本近海に広く分布している。ヒレグロはこのように広く分布し漁業対象種として利用されているが、遺伝的な変異性について調べられていない。そこで、遺伝的な変異性を明らかにして、ヒレグロの有効な資源管理のために系群に関する情報を得ることを目的とした。

【材料及び方法】鳥取沖、北海道日本海沖、オホーツク海、道東沖、東北沖で採集したヒレグロを用いた。生物学的な測定を行った後、DNA 抽出キットにより粗 DNA を抽出した。ユニバーサルプライマーを用いて、PCR 法により D-Loop 領域を増幅した。カラムにより精製し、DyeTerminator 法によりシーケンス反応を行った。精製後、蛍光シーケンサーにより電気泳動し、塩基配列データを得た。ユニバーサルプライマーによりヒレグロの D-Loop 領域約 1500bp を増幅することができたが、シーケンス反応を行った結果、前半領域は読めるものの、後半領域は読めなかった。そのため、塩基配列が読めた 5 末端側に新たにプライマーを設計し、D-Loop 領域の前半域を PCR 法により増幅し、シーケンスを行った。得られた塩基配列データから海域特有の塩基置換があったかを検討した。MEGA3 ソフトウェアを用いて Kimura2-パラメーター法により遺伝距離を求め、UPGMA 法にて系統樹を作成した。

【結果と考察】ヒレグロ 143 個体の D-Loop 領域前半域を含む領域の塩基配列を決定した。アライメント分析の結果、海域特有の塩基配列は見られなかった。また、塩基配列データを用いて系統樹を作成した所、海域ごとにクラスターを形成しなかった。また、遺伝的な多様性は非常に高かった。カレイ類は卵から孵化後、長い浮遊生活を送り、その後変態して着底生活をする。着底までの時間は種により異なると言われており、一般的に沖合域に生息する種が着底時間が長いと言われている。着底するまでの期間が長いということは、海流などにより移送されることによる稚魚の生残戦略の一つとも考えられ、また、その遺伝的多様性を広めるということも重要であると考えられる。ヒレグロのような沖合に生息するカレイは、その分布の広さから稚魚の生残戦略と種の遺伝的多様性を広げるという目的から遺伝的多様性が高かったと推測された。

## P24

# 擬父、擬母不在家系の親子鑑定における 肯定確率の意義

赤根 敦<sup>1</sup>、三谷友亮<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>関西医科大学法医学講座

<sup>2</sup>大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所

### [目的]

親子鑑定において多種類の遺伝形質で否定されない場合は肯定確率を計算する。父子鑑定における擬父、母子鑑定における擬母の検査ができない場合には、血縁者の検査結果から各種の遺伝子型を推定して、原告の子と比較・鑑定しなくてはならない。そのような親子鑑定事例において興味深い肯定確率の計算結果が得られ、肯定確率の意義について考察した。

### [方法]

戸籍上の7人姉弟で、末弟が戸籍上の姉を実母と訴えて母子鑑定を行った。姉弟の両親、訴えられた姉（擬母）は既に死亡し、利用できる資料はない。原告と5人の姉弟、擬母の実子の7名から資料を採取し、15種類のSTRおよび11種類のY-STRを検査した。

5人の姉弟および擬母の実子の検査結果から擬母の遺伝子型を推測し、原告との母子関係は否定されなかったため、肯定確率を既報の方法で計算した。同時に、原告が戸籍上の父母の子である確率を同様の計算方法で求めた。

### [結果と考察]

原告が擬母（戸籍上の姉）の実子で、実の父が不明の男性と仮定した場合の肯定確率は0.999966となり、「真の母と判定できる」高値の確率になった。

一方、原告においてY-STR 11種類のうち8種類が戸籍上の兄と一致せず、戸籍上の父の子である可能性は否定された。

しかし原告が戸籍上の母の実子で、実の父が（戸籍上の父以外の）不明の男性と仮定した場合の肯定確率は0.999960となり、同じく「真の母と判定できる」高値の確率になった。

### [考察]

戸籍上の母と姉を擬母とみなす両方の場合でほぼ同じ肯定確率になった理由として、①両者が死亡しており、遺伝子型を同じ血縁者から推定したこと、②いずれの場合も子の父を不明の男性としたこと、③両者が実の母子で、もともと共通するアリルをもっていることなどがあげられる。すなわち不確定要素が多く、しかも血縁者どうしで比較しているため、明確に識別することができなかったということになる。

前提とする血縁関係が異なるのに、それぞれの場合で通常なら真の親子と判断できる肯定確率が得られた本鑑定結果は、親子鑑定に携わる者にとって肯定確率の意義の再考を課す重大な教訓を含んでいると思われる。

## P25

# ミトコンドリアの 12S 及び 16S リボソーム RNA 遺伝子を利用した種属識別

北野 誉、梅津和夫、田 焯、大澤資樹

山形大学医学部環境病態統御学講座法医病態診断学分野

### 【目的】

法医分野において、骨や毛髪、血痕などさまざまな陳旧試料の種属識別は、重要な問題のひとつである。今回我々は、哺乳類のミトコンドリア DNA において、高度に保存されている領域の検索を行い、共通プライマーを作製し、PCR ダイレクトシーケンス法による種属識別について検討した。さらに、形態から種の判別不能な長幹骨について、骨片から精製した DNA に対し設定したプライマーを用いて、種の判別を実際に行なった。

### 【方法】

DNA データベースから哺乳類 30 種のミトコンドリア DNA の全ゲノム配列を取得し、ウインドウ解析を用いて保存領域の検索を行なった。保存領域は 12S および 16S リボソーム RNA 遺伝子に多く存在したため、12S と 16S のそれぞれの保存領域に 1 セットずつプライマーを作製した。

### 【結果と考察】

PCR 産物のサイズはヒトでは、214 bp と 243 bp であり、2 つのプライマーセットとも、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、マウスの哺乳類 7 種、さらにはニワトリやコイでも PCR 産物を得ることができた。また、それらの塩基配列の平均の差異は、それぞれ 26.8 と 35.2 であり、種の識別をするための十分な塩基の差異があるということが確認された。さらに、骨片から得られた塩基配列はブタのものと一致した。従来、種属識別のための共通プライマーの設計には、cytochrome b 遺伝子座が利用されてきた。しかし、cytochrome b 遺伝子座の配列は必ずしも高度に保存されているとはいえず、共通プライマーの設計には 12S、16S リボソーム RNA 遺伝子座が適当と考える。

堤 博文、向山レイ、小室歳信  
日本大学歯学部法医学教室

### 【目的】

Loop-Mediated Isothermal Amplification 法（以下、LAMP 法とする）は、標的遺伝子の 6 つの領域に対して 4 種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させて目的の部位を増幅し、その際に生じる大量の副産物（ピロリン酸マグネシウム）が反応液を白く濁らせることを利用し、目視検出あるいはリアルタイム濁度検出によって判定を可能とするものである。

今回、我々はアメロゲニン領域を指標とした、LAMP 法による性別判定について検討した。

### 【方法】

試料は当教室に 1～20 年間保存されている歯から抽出した歯髄 DNA を用いた。アリアル特異的なプライマーセットを設計し、LoopampDNA 増幅試薬キット（栄研化学）を使用し、リアルタイム濁度測定装置を用いて等温条件下(63℃)で約 100 分間にわたって経時的に反応液の濁度変化の観察を行った。また、増幅の確認のため 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、EtBr で増幅産物を確認した。

### 【結果および考察】

Y染色体用のプライマーセット（Y-primer）を用いた場合は男性のみの試料から、また、X染色体用のプライマーセット（X-primer）の場合は男性および女性の試料から反応液の白濁と電気泳動による増幅産物がすべての試料から認められた。白濁を認めるまでの時間は、男性の場合、Y-primer では 50～75 分程度、X-primer が 55～80 分程度であった。X-primerの方が Y-primer より白濁するまでの時間が長かったことから、時間短縮を目的に X-primer にさらにループプライマーを設計して検討したところ、27～45 分程度まで短縮することができた。

以上のことから、短時間で性別判定を行うことができる本法は、犯罪捜査等において有用性は高いと思われる。

## P27

# コンニャクにおけるRLGS品種識別マーカーの開発

飯塚弘明<sup>1</sup>、細渕朗子<sup>2,3</sup>、高宮知子<sup>2,3</sup>、村上康文<sup>3</sup>、  
山下秀次<sup>4</sup>、奥泉久人<sup>2</sup>、加藤晃<sup>1</sup>、内田秀司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>群馬県農業技術センター、<sup>2</sup>農業生物資源研究所

<sup>3</sup>東京理科大学、<sup>4</sup>九州東海大学

### 【緒言】

農産物の輸入が年々増大する中で、我が国で育成・品種登録されたものが不正に国外に持ち出され、その収穫物・加工品が輸入される事例が相次いでいる。この農産物の海賊版は育成者の権利を著しく侵害しており、我が国の農業に多大な影響を及ぼしている。

コンニャクでは主要品種の国外持ち出しが確認されており、不正流通を防ぐためにDNAレベルで品種識別する必要がある。しかし、DNA鑑定はコメ、インゲンマメ、イチゴ、イグサなど一部の作物で実用化されているに過ぎない。

そこで、本研究ではコンニャクの品種識別マーカーの開発を目的に、RLGS(Restriction Landmark Genome Scanning)法を用いて品種間多型の検出を試みた。

### 【材料と方法】

群馬県で育成したコンニャク(*Amorphophalus konjac*)品種、「みょうぎゆたか」「あかぎおおだま」の2品種を材料に用いた。球茎頂芽を採取し、液体窒素で凍結磨砕後、CTAB法でゲノムDNA抽出した。

このDNAを制限酵素(*NotI*、*EcoRI*)で消化後、*NotI*サイトを持つDNA断片のみを磁性ビーズ(Dynabeads M-280)を用いて濃縮し、RLGS分析に供試した。二次元目展開酵素には、*BamHI*を用いた。オートラジオグラフィーは、フジBAS2000システムを用いて行った。

### 【結果および考察】

*NotI*-*EcoRI*-*BamHI*の組み合わせで得られたRLGS二次元スポットパターンにおいて、合計84スポットが検出された。「みょうぎゆたか」で78スポット、「あかぎおおだま」では67スポットを検出したうち、計23スポット(27%)において品種間での多型が認められ、品種識別マーカーとして有用であると考えられた。品種特異的なスポットは、「みょうぎゆたか」で17個、「あかぎおおだま」では6個検出できた。今後、これら品種特異的なスポットをクローニング、塩基配列を決定することでSTS化し、プライマーを設計して、DNA品種鑑定PCRマーカーとして実用化することが期待される。

## P28

# 小麦加工食品からの DNA 抽出法および DNA 断片化程度の評価

藤田由美子・池田達哉・荒木悦子・矢野博  
農業・生物系特定産業技術研究機構  
近畿中国四国農業研究センター

### 【目的】

国内産小麦は安全性の観点から需要が増加しており、地域独自の品種の開発と利用が進められているため、製品の原材料表示を証明する方法の確立が求められている。小麦は、麺やパン、菓子のように加工された状態で市場に流通することがほとんどであるため、加工食品から小麦を検出し、品種を判別できる技術が必要である。そこで我々は、加工食品の段階でも適用可能な DNA マーカーを開発し、簡便な PCR 法を用いて主要栽培品種を判別する技術の開発を目指している。今回、加工工程の異なる市販の小麦加工食品から DNA の抽出を試み、断片化が予想されるそれらの DNA について、小麦特異的な増幅長の異なるプライマー5対を用いて PCR を行い、限界増幅長を評価した。

### 【材料および方法】

市販の加工食品は、クッキー2種類、クラッカー、パン、半生うどん（加熱前、加熱後）、パイ、および対照として小麦粉を供試した。小麦粉を除く、それぞれのサンプル毎に、個包装に含まれるすべて（半生うどんは一部）を遊星型ボールミル（フリッチェ社）で粉碎し、1g を計量した。Genomic-tip (QIAGEN) によるイオン交換樹脂カラムを用いた方法で DNA の抽出を行い、分光光度計により吸光度を測定することで、純度と抽出量を調査した。

プライマーは、Dihydroflavonol-4-reductase の塩基配列をもとにして、92bp、288bp、489bp、968bp、1498bp の増幅長になるよう設計した。他植物等の DNA では増幅せず、小麦特異的な増幅であることを確認し、本実験を行った。

### 【結果】

サンプルの原材料組成や粉碎程度に起因すると考えられる抽出量の差異は生じたが、すべてのサンプルから DNA の抽出が可能であり、260/280nm 値は、1.66~1.81 であった。アガロースゲル電気泳動でゲノム DNA の状態を調べたところ、小麦粉以外の DNA で断片化が進んでいることが確認された。また、すべての DNA で 92bp および 288bp の PCR 増幅が可能であった。小麦粉から抽出した DNA のみ、5つのサイズすべての増幅が確認された。

DNA の断片化の程度は異なるものの、ほとんどの小麦粉食品で DNA が抽出でき、300bp 以下の PCR 増幅は可能であると考えられた。PCR 法を用いた加工食品における小麦の品種判別では、増幅長が 300bp 以下のマーカーを用いることで、確実な判別が可能であると推測される。

## P29

# DNAマーカーによるニホンナシとマルメロの属間雑種の解析

山本俊哉<sup>1)</sup>、木村鉄也<sup>2)</sup>、副島淳一<sup>1)</sup>、眞田哲朗<sup>1)</sup>、伴義之<sup>2)</sup>、林建樹<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>農研機構・果樹研究所・遺伝育種部、<sup>2)</sup>種苗管理センター・調査研究課

ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai)、セイヨウナシなどのナシ類は、バラ科ナシ亜科に属し、日本を含め広く世界の温帯地域で栽培される重要な果樹である。マルメロ (*Cydonia oblonga* Mill.) は、同じバラ科ナシ亜科に分類される果樹で、近年特産果樹として注目されており、またナシの台木にも利用されてきた。これまでに、耐病性や耐寒性などの有用形質や新しい形質の付与を目的に、ナシ亜科内の属間雑種作成、たとえばナシ vs. リンゴ、リンゴ vs. ボケ、ナシ vs. マルメロが試みられてきた。志村ら (1983) は、ニホンナシとマルメロを交雑し、形態の特徴とアイソザイム分析を報告している。本研究では、ニホンナシとマルメロの交雑で得られた個体を SSR マーカーにより解析し、属間雑種であることを確認した。

### <材料および方法>

ニホンナシ品種「幸水」にマルメロ系統「C-98-4」を交雑した。52 花の交雑から 25 の果実が結実し、42 粒の種子を獲得した。は種後、31 個体の実生を獲得した。そのうちの 4 個体について、SSR マーカーによる解析、形態的特徴の調査、フローサイトメーターによるゲノム量の測定を行い、雑種性の確認を行った。

ニホンナシ、マルメロおよび雑種 4 個体から改変 CTAB で、ゲノム DNA を抽出した。ニホンナシおよびマルメロで利用可能な SSR マーカーを 13 種類選び、解析を行った (Yamamoto et al. 2004)。なお、ニホンナシとマルメロ双方で単一座由来と考えられる SSR マーカーを選び、その内訳はナシ由来の SSR が 10 種類、リンゴ由来が 3 種類である。PCR 反応後、DNA シークエンサー (ABI PRISM377) で増幅産物を分離・検出し、GeneScan ソフトウェアで解析した。また、ニホンナシ、マルメロおよび雑種のゲノム量の測定は、Pactec 社プロイディーアナライザー PA 型を用いて行った。

### <結果および考察>

用いた 13 種類の SSR マーカーすべてで、ニホンナシ品種「幸水」とマルメロ系統「C-98-4」から異なるサイズのバンドがそれぞれ 1-2 本 得られた。「幸水」でヘテロ型 / 「C-98-4」でホモ型の SSR マーカーが 4 種類、「幸水」でホモ型 / 「C-98-4」でヘテロ型のものが 3 種類、両方ともホモ型が 6 種類であった。雑種 4 個体では、ナシでヘテロ / マルメロでホモ型の場合、ナシ由来の対立遺伝子のどちらか片方と、マルメロ由来の対立遺伝子を持っていた。ナシでホモ / マルメロでヘテロ型の SSR では、ナシ由来の対立遺伝子と、マルメロ由来の対立遺伝子のどちらか片方を持っていた。両方ともホモ型の場合、両親の対立遺伝子を有していた。雑種 4 個体では、両親からの対立遺伝子が矛盾なく遺伝していたことから、属間雑種であることが確認できた。

なお雑種では、両親の間もしくはややナシに近い形態を有しており、またフローサイトメーターで測定したゲノム量では、両親の間であった。

## P30

## 日本人とドイツ人の C1S 遺伝子の多様性について

中川真由美<sup>1)</sup>、湯浅 勲<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>鳥取大学医学部病態検査学講座、

<sup>2)</sup>鳥取大学医学部法医学分野

補体第一成分のs因子(C1s)は、C1r、C1q と複合体を形成し、補体活性化の古典的経路の開始に重要な機能を担っている。C1s は等電点電気泳動によって現在までに4種のアリルが同定されているが、C1r と異なり、多型性は低い<sup>1)2)</sup>。今回、C1s の遺伝子レベルでの多様性について解析したので報告する。

### 【材料と方法】

日本人 143 名とドイツ人 100 名の血清を用い、等電点電気泳動により C1s 型を決定した。そのうち、日本人 8 名(変異型を示した 1 名を含む)、ドイツ人 8 名(変異型を示した 3 名を含む)について全コーディングエクソン(Ex2-12)の変異を分析した。検出された変異について、RFLP 分析により日本人 63 名とドイツ人 69 名のタイピングを行った。ハプロタイプの解析は Alrequin 2.001 を用いた。

### 【結果と考察】

等電点電気泳動により C1s は 3 種のバンドが分離され、移動度から Kamboh ら<sup>1)2)</sup>により報告された C1S\*1、C1S\*2、C1S\*3 に相当すると考えられた。アリルの頻度は、ドイツ人 100 名では C1S\*1 が 0.980、C1S\*2 が 0.020 を、日本人 143 名では C1S\*1 が 0.997、C1S\*3 が 0.003 の値を示した。C1S 遺伝子の Ex2-12 の塩基配列を調べたところ、エクソン部分では Ex4 c.G558A、Ex5 c.C643T、Ex7 c.C1058T、Ex8 c.G1145A および c.G1181C、Ex10 c.A1369G、Ex12 c.C1715G および G2333T の 8 箇所に変異が検出された。また、イントロンでは IVS11+G6A と IVS11+T38C の 2 箇所に変異が観察された。C1S\*2 は Ex8 の c.G1145A(D300N)により、C1S\*3 は Ex7 の c.C1058T(R271C)により決定されていた。現在までに 10 部位のうち c.G1181C と G2333T を除く 8 部位のタイピングを行った。その結果、変異遺伝子の頻度は両集団とも低く、多型性を示したのはドイツ人で 5 部位、日本人で 2 部位だった。8 座位のハプロタイプ解析の結果、日本人(63 名)、ドイツ人(69 名)ともに 4 種のハプロタイプが推定された。

1) Kamboh MI. et al. : J Immunogenet 14: 231-238, 1987

2) Lyons LA. et al. : Complement Inflamm 6: 81-87, 1989

## P31 ABO血液型遺伝子における5'上流域の多型(Ⅱ)

沖浦 達幸<sup>1, 2)</sup>, 三宅 仁<sup>2)</sup>, 西村 浩治<sup>1)</sup>,  
西向 弘明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 愛媛大学医学部環境社会医学講座法医学分野

<sup>2)</sup> 愛媛県警察本部科学捜査研究所

我々はABO血液型遺伝子の5'上流域における多型とABOサブアレルとの関連を調べており、これまでにいくつかのSNPsや挿入-欠失多型(insertion-deletion polymorphism), そして-8506番塩基から-8500塩基に存在する塩基の数と種類が共に異なる多型(ローカス名はABO-8506)を報告した。今回、-9100番付近の塩基を検索したところ、新規の多型が検出され、これはABO-8506多型に似た特徴を持っていることがわかった。今回はこれら2種類の多型の発生過程を考察したので報告する。

**【材料と方法】**本研究に同意した日本人の末梢血由来DNA試料についてPCR法およびPCRダイレクトシーケンシングを行い、-9225番塩基から-9052番塩基の配列を解析した。ABO-8506多型については、既報のように-8586番塩基から-7749番塩基解析用プライマーを用い、同様の方法で検索した。

**【結果と考察】**新規の多型は-9129番塩基から-9125番塩基の範囲に検出され、5塩基(AATAA)のアレルと21塩基(TTATTTCTTTTATTATTATTT)のアレルが見られた。この多型はアレル間で塩基の数と種類が異なっており、既報のABO-8506多型(7塩基TCCGCAGと12塩基GGCCTTCTGCAA)と似ている。そこでこれら2種類の多型について発生過程を検討したところ、変異部に存在する回文配列が原因となって形成されたヘアピンループが多型の発生に関わっているのではないかと推測された。

## P32

### 多人種間におけるメラニン合成系遺伝子の多型と表現型の比較検討

増井 聡亮、中留 真人、的場 梁次  
大阪大学大学院医学系研究科予防環境医学専攻社会環境医学  
講座法医学教室  
西 克治  
滋賀医科大学法医学講座

#### 【目的】

近年、日本国内では外国人が関与する犯罪の発生件数が増加傾向にあり、被疑者像を推定するにあたり外国人犯罪の可能性も考慮しなくてはならない。また犯行現場には、血痕、体液等の被疑者特定につながる貴重な資料が遺留されている場合もあり、これら遺留資料から被疑者像（毛髪、皮膚、虹彩の色）を推定することが出来れば、犯罪捜査の有力な武器となりうると考えられる。そこで今回我々は、メラニン合成に関連する2遺伝子(MC1R、OCA2)について、既知の多型と表現型（毛髪、皮膚、虹彩の色）を比較し、これら2遺伝子の多型分析が被疑者像推定に有効か否かを調べるための基礎的検討を行った。

#### 【方法】

インフォームドコンセントにより同意を得た日本、南北アメリカ、欧州、アフリカをはじめとした様々な地域の出身者の口腔粘膜上皮細胞から、QIAamp DNA Micro Kit(Qiagen)を用いてDNAを抽出しPCRの鋳型とした。資料採取の際は予め用意しておいた毛髪、皮膚、虹彩それぞれのカラーチャートを提示し、これより自己申告で色分類を行い、その回答結果を記録シートに記載した。また、本人の承諾があった場合のみ顔の写真も撮影した。多型検出はエクソン、イントロン合わせてMC1Rが3領域17SNPs、OCA2が12領域16SNPsについてそれぞれプライマーを設計し、BigDye Terminator v3.1と310 Genetic Analyzer(ABI)を用い、ダイレクトシーケンスにより判定した。その判定結果と毛髪、皮膚、虹彩の色、出身地域の情報とを比較し、MC1R及びOCA2遺伝子内の多型と表現型・出身地域との関係について検討を行った。

#### 【結果】

MC1R及びOCA2遺伝子内の多型と表現型・出身地域とを比較した結果、日本人においてのみMC1RのrefSNP ID:rs885479部位と、OCA2のrefSNP ID:rs749846部位が共にアデニン(A)となる傾向を示した。さらに、OCA2遺伝子内の他の多型領域においても、虹彩の色との関連性が認められた。これらの結果から、メラニン合成系遺伝子内の多型が、人種特有の表現型と関連している可能性が示唆され、今後さらに検体数を増やし、包括的な多型解析を行う予定である。

副島美貴子、神田芳郎

久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座

[目的] AIM-1はメラノサイト分化抗原をコードしており、いくつかの遺伝子変異はアルビノの責任変異として報告されている。一方、二つのミスセンス変異、E272KとL374Fについて272Kはアジア人に、374Fはヨーロッパ人に特徴的であるという結果が報告されている。このことはこれら二つのSNPsが人の皮膚色の多様性に関与している可能性を示唆している。374Fのヨーロッパ人での頻度は圧倒的に高く高緯度等日射量の少ない地域でこの多型に正の選択が働いている可能性があると考えシーケンス解析をおこなうことを思い立った。

[方法] 南アフリカ在住ヨーロッパ人、Xhosa族、ガーナ人、中国人、スリランカのタミル人、シンハラ人、更にチンパンジーのゲノムDNAを用いAIM-1の蛋白コード領域とエクソン隣接領域、L374F多型の周囲7.55-kbについてダイレクトシーケンスをおこなった。統計解析にはDNAsp、ハプロタイプ解析にはPHASE、Network、ms programを用いた。

[結果] 蛋白コード領域とエクソン隣接領域のシーケンス解析の結果ヨーロッパ人でのみ低い多様性を示した。さらにL374F多型の周囲7.55-kbで4つの統計解析をおこなった結果ヨーロッパ人にみられる多様性のパターンは有意に中立的ではないという結果であった。またハプロタイプ解析により374Fを含む1つのハプロタイプがこの集団に高頻度で存在し、多様性が低く、selective sweepが起こっている事が統計的に有意に示された。これらの結果から、メラニン合成に関与するAIM-1の少なくとも今回解析をおこなった領域に比較的最近正の自然選択が作用し有利なハプロタイプがヨーロッパ集団で急速に広がったのではないかということが示唆された。

# P34

## トルコ人集団及びアフリカオバンボス集団における deoxyribonuclease I 多型解析<sup>1)</sup>

藤原純子<sup>1)</sup>、今村真二<sup>2)</sup>、室友紀<sup>2)</sup>、竹下治男<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>島根大学医学部法医学講座 <sup>2)</sup>島根県警察本部科学捜査研究所

### 【目的】

遺伝的多型形質であるヒト deoxyribonuclease I (DNase I) 遺伝子では、これまでに 6 箇所の SNP 部位が見出され、個人識別等に有用であることが知られている。ヒト DNase I 多型分析の調査は、日本人集団とドイツ人集団のみに限られていた。そこで、本研究では DNA 試料からの PCR を用いた遺伝子型判定法を用いて、2 人種（トルコ人集団及びアフリカオバンボス集団）について DNase I 型判定を行い、4 集団間における差異の検討を行った。

### 【試料および方法】

トルコ北部アダナ地方のトルコ人 136 名及びナミビアのアフリカオバンボス 176 名の血痕から抽出した DNA を用いた。DNase I 型判定には、ARMS(amplification refractory mutation system)法あるいは mismatched PCR 法を用いた。

### 【結果および考察】

トルコ人、アフリカオバンボス両集団においては、主要表現型の 1、1-2 及び 2 型のみが観察された。各対立遺伝子の出現頻度を算出したところ、トルコ人では  $DNASE1*1$  0.2206、 $DNASE1*2$  0.7794 ( $\chi^2 = 0.4753$ ,  $0.90 > p > 0.75$ )であった。一方、アフリカオバンボスでは  $DNASE1*1$  0.8722、 $DNASE1*2$  0.1278 ( $\chi^2 = 0.5770$ ,  $0.90 > p > 0.75$ )であった。トルコ人集団の出現頻度はドイツ人集団に類似しており  $DNASE1*2$  の出現頻度は日本人集団及びアフリカオバンボス集団に比べ有意に高かった。アフリカオバンボス集団では  $DNASE1*1$  の出現頻度が他集団に比して有意に高かった。これらの結果から、DNase I 多型には集団間で相違がみられることが明らかとなった。

### 【文献】

1) Fujihara, J. et al. (2005) Biochem Genet, in press.

# P35

## 日本人におけるY-STR17座位の遺伝頻度分布

橋谷田真樹<sup>1</sup>, 梅津和夫<sup>2</sup>, 湯浅 勲<sup>3</sup>, 田村明敬<sup>4</sup>, 三好 綾<sup>5</sup>,  
舟山真人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科法医学分野,

<sup>2</sup>山形大学医学部法医学教室, <sup>3</sup>鳥取大学医学部法医学教室,

<sup>4</sup>大阪医科大学法医学教室, <sup>5</sup>福岡大学医学部法医学教室

### [はじめに]

Y染色体上に座位するSTR, すなわちY-STRの法医学的有用性は周知のことであり, 数種類の増幅キットも市販されている. 今回われわれは仙台, 山形, 鳥取, 大阪, 沖縄からの試料を市販のY-STRキットを用いて増幅・解析を行ない, 日本人集団におけるY-STRデータベースを構築したので報告する.

### [材料および方法]

血縁関係のないボランティアより, 頬内膜細胞, または血液等の提供を受け, DNAを抽出し, 試料とした. その数は仙台212名, 山形185名, 鳥取193名, 大阪92名, 沖縄82名の計764名分である. Y-STRは市販のAmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) を用いて, DYS19, DYS385I, DYS385II, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, GATA H4の計17座位を増幅した. 電気泳動はABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて行ない, GeneMapper ID Ver. 3.2 software (Applied Biosystems)にて対立遺伝子の同定を行った. また, ARLEQUIN Ver 2.000 softwareにて統計的な解析を行った.

### [結論および考察]

地域差を考慮して沖縄を除く仙台, 山形, 鳥取, 大阪の計682名の試料について, 得られたSTRデータを解析したところ, 635種のハプロタイプが確認された. 最も頻度が高いハプロタイプは10サンプルが同じハプロタイプを示したものである. 他に6サンプルが同じタイプであったハプロタイプが1種, 4サンプルが1種, 3サンプルが5種, 2サンプルが20種のハプロタイプを示した. 全体としてY-STRの多型性を示す指標であるdiscrimination capacityは0.932を示し, またhaplotype diversityは0.9981という値が得られた. 沖縄の82サンプルについては76種のハプロタイプが確認され, 2つのサンプルが同じハプロタイプを示すものが6種観察された. また, discrimination capacityは0.927であり, haplotype diversityは0.986という値であった. 以上より, 17座位のY-STR情報を得ることができるこの検査システムの有用性を確認することでき, さらに日本人集団としては充実した部類に入るのであろうと思われるY-STRデータベースを構築することができた.

# P36

## 中国人における Y 染色体上 STR の遺伝子頻度と ハプロタイプ解析

王 秀玲, 澤口 聡子

東京女子医科大学医学部法医学教室

### 【はじめに】

Y 染色体上の遺伝子は、男性のみに存在し、父親から男性の子どもに遺伝され、ほとんど組換えが起こらず先祖の持つ塩基配列が保存されている。そのような特徴により、Y 染色体上の遺伝子マーカーは、法医鑑識科学の犯罪捜査、個人識別、父子鑑定などの男性関係の生物学的な証拠として応用可能である。また、Y 染色体の遺伝子は、人種や民族によって特徴があり、人類遺伝学や歴史学の研究に期待されている。特に、Y 染色体上の STR (Y-STR) 解析法は、従来の常染色体 DNA 分析手法では解析できなかった性的暴力犯罪の解決には非常に重要な役割を果たしている。今回我々は、遼寧省在住の中国人における Y-PLEX™ 5 および Y-PLEX™ 6 (ReliaGene Technologies, USA) キットを用いて 10 ローカスの Y-STR (DYS389I, DYS389II, DYS439, DYS438, DYS392, DYS393, DYS19, DYS390, DYS391, DYS385a/b) 遺伝子頻度の分布、ハプロタイプ解析を行うとともにデータベースを作成した。

### 【材料及び方法】

血縁関係ない遼寧省在住の中国男性 141 名から血液を採取し、フェノール・クロロホルム法によって DNA を抽出した。Y-STR 多型は、Y-PLEX™ 5 および Y-PLEX™ 6 を用いた ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer 及び GeneScan™ Analysis Software により、解析を行った。

### 【結果及び考察】

中国人における 11 ローカスの Y-STR から 65 遺伝子および 135 ハプロタイプが検出され、haplotype diversity は 0.99998 であることが確認された。DYS385a/b 以外の各ローカスから観察された遺伝子数は 5～8 種であり、gene diversity は 0.4869 (DYS391) ～0.7801 (DYS389II) であった。DYS385a/b では鎖長の異なる 14 種の遺伝子から 54 種の遺伝子型が観察され、gene diversity は 0.8921 と最も高い値が得られた。各人種集団 (中国、日本、ブラジル、イタリア、アメリカ、アフリカ、スペインなど) における 10 ローカスの Y-STR の遺伝子出現頻度とハプロタイプには相異なる傾向が観察され、統計学的に有意差があった。

## P37

### 日本人を対象としたAmpFSTR-Yfilerによる5種のY-STRの追加と21-YSTR haplotypeおよびBinary Haplogroupとの関連

伊藤春雄、笠原 育、水口 清

東京歯科大学法歯学講座

【目的】 私達はすでに日本人男性についてDYS19/388/3891/3892/390/391/392/393/385/156Y/434/435/436/437/438/439の16STRのハプロタイプ解析とbinary markerとの関連について報告しているが、今回、同じ資料をAmpFSTR-Yfilerにより多型検査を行い、新たにDYS448、456、458、635、Y GATA H4のデータを追加検討し、binary haplogroupとの相関を調査したので報告する。

【材料と方法】 試料DNAは血縁関係のない247例の日本人男性から得たDNAを用いた。STR解析はAmpFSTR-Yfilerを用いて、キットの仕様に従って検査を行った。

【結果および考察】 AmpFSTR-Yfilerは16 locusのmulti-plex kitであるが、11 locusについてはすでにデータ解析が終了しているため、残りの5 locusの解析を行った。既報の11 locusについては、すべて前回と同じ結果が得られた。今回データに加えた5 locusのそれぞれのgene diversityは51.3%、80.9%、63.9%、57.5%、69.4%でDYS438が最も多型性が高かった。すでに報告している16種類のSTR haplotype数は210型認められており、最も頻度の高いhaplotypeは3.6% (9例) で、HD (haplotype diversity)は99.3%であったが、5 locusを追加し、21 locusにしたことによって、haplotypeの総数は237型となり、最も頻度の高いhaplotypeは1.2% (3例) のものが3型認められ、HDは99.5%に上昇した。特に日本人で頻度が高く、均一性の高いO2b1がDYS458でかなり細分され、この座位は個人識別においては利用価値が高い。各allele分布と20型のbinary haplogroupとの相関を検討したところ、ハプログループごとに、それぞれのlocusで、あるalleleを中心とした分布を示したが、一部のbinary haplogroupは特徴的なSTR haplotypeを示した。つまり、DYS448/456/458/635/Y GATA H4のhaplotypeでは、日本人に頻度の高いD2b\*は17/16/X/X/12に偏り、D2b1/022457は19/15/X/X/11に偏る、またO2b\*とO2b1は、それぞれX/X/X/21/11、X/X/X/20/12に偏ることなど、STRからbinary haplogroupを推測することに役立つ情報が得られた。

結論的にAmpFSTR-Yfilerに用いられているlocusはY-STR haplotypeによる個人識別能力をかなり上昇させ、法医学的に利用価値の高いlocusの組み合わせで構成されている。

廣重 憲一 山口 裕樹  
福岡県警察本部科学捜査研究所

#### 【はじめに】

我々は、比較的新鮮と考えられる血痕であるにも関わらず、時として血液型やDNA型が検出できない事例を経験することがある。これらの資料について、後から採取場所、保存状況を調べてみると、台所、浴室等の水周りで採取された資料であったり、速やかに乾燥させてない資料であることが多い。

今回、一般的に血痕採取に用いられる生理的食塩水、滅菌水等を用いて、湿潤がDNA型検出に及ぼす影響について検討を行った。

#### 【実験材料と方法】

- (1) 一定量の血痕を作製し、生理的食塩水、滅菌水および抗生物質含有の血球保存液(アルバー液‘栄研’)を含ませた綿棒で拭き取り、チャック付ポリ袋に密封した。
- (2) 上記綿棒について、湿潤状態が一定時間経過したのちに、風乾させ、それぞれについて、フェノール-クロム法によりDNA抽出を行った。
- (3) 上記抽出DNAについて、AmpFISTR Profiler Kit (Applied Biosystems)を用いてPCR増幅し、増幅産物をABI PRISM310 Genetic Analyzerで泳動後、GeneScan Analysis及びGenotyperの各Softwareを用いて型判定を行った。
- (4) 同時に抽出DNAを5%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、抽出DNAの状態を確認した。

#### 【結果と考察】

滅菌水および生理的食塩水で作製した血痕は、早い段階(2,3日)で外観的な変化(色調の変化、臭気)が見られ、5%アクリルアミドゲルを用いた電気泳動においても時間経過とともにDNAの低分子化が認められ、DNA型が検出されなくなった。

その一方で、抗生物質が含有される保存液で作製した血痕については、湿潤状態が10日経過した試料についても、外観的な変化は認められず、5%アクリルアミドゲルを用いた電気泳動においてもDNAの低分子化は認められず、すべての試料においてDNA型が検出された。

したがって、DNA型検出においては湿潤の影響はきわめて大きい。その理由としては、細菌の増殖を抑制する抗生物質含有の保存液が有効であったことから、細菌の関与が推定された。

血痕を採取する際、採取した血痕を速やかに乾燥させるのが望ましいが、細菌の増殖を抑え、DNAを良好な状態を保つ上では、抗生物質が含有される血球保存液による採取も有効な手段のひとつと考えられた。

塚田和彦<sup>1,2</sup>、野尻真依子<sup>1</sup>、倉沢佳延<sup>1</sup>、笠原浩一<sup>1</sup>、浅村英樹<sup>2</sup>、  
太田正穂<sup>2</sup>、福島弘文<sup>2</sup>

1 長野県警察本部刑事部科学捜査研究所

2 信州大学医学部法医学教室

#### [目的]

犯罪捜査に欠かせない個人識別法の一つとして DNA 型鑑定法が挙げられる。犯罪現場に遺留される資料の多くは血痕であるが、性犯罪の場合には精子+唾液、精子+膣液などの混合斑痕が主となる。しかしながら、混合斑痕からの精子 DNA の抽出には多くの時間を要しているのが現状である。最近、プロメガ社より、数時間で混合斑痕から精子画分を分取出来る Differex™ System が発売された。今回、我々は従来の 2 段階抽出法と Differex™ System との抽出効率の検討を試みた。

#### [方法]

女性由来の上皮細胞には培養細胞を用い、精子は健康な成人男性から提供を受けた。それぞれを計数盤を用いてカウントし、濃度を変えて脱脂綿に付着させて混合斑痕とした。混合斑痕から Differex™ System を用いて精子画分を分取し、IQ System, QIAamp DNA Micro Kit, phenol/chloroform のそれぞれの方法で精子 DNA を精製した。また、2 段階抽出法によっても抽出を行った。DNA は一定量の TE<sup>4</sup> に溶解し、その 1ul を AmpFISTR Profiler Kit で増幅し、ABI 310 Genetic Analyzer で泳動・解析を行った。

#### [結果・考察]

抽出効率はシグナル強度から判断した。Differex™ System を用いた場合、従来の 2 段階抽出法と同程度のシグナル強度が得られた。今回行った精製方法の組み合わせでは、Differex™ System+QIAamp DNA Micro Kit の組み合わせが最も高いシグナルを示し、QIAamp DNA Micro Kit+phenol/chloroform 法が最も低いシグナルを示した。精子画分の分取および DNA の精製に要した時間は、従来の 1~2 日から 2~3 時間に大幅に短縮され、Differex™ System を用いた抽出効率は、2 段階法と同程度と推察された。また、短時間での抽出が可能となることから、本キットの使用は鑑定の迅速化に大きく寄与するものである。

# P40

## REPLI-g Kit を用いた法科学試料の DNA 多型

### 検出について

鉄 堅、芹沢優花、岩上悦子、押田茂實  
日本大学医学部社会医学講座法医学部門

ヒトの血痕、毛髪、爪および骨などの法科学試料は体外において長時間を経過すると、DNA が変性して高分子 DNA が少なくなる。親子鑑定や個人識別などの法医学的な検査には現在の検査法では型判定の不安定や再鑑定に必要な試料量が不足などで実際の応用には困難なことが多い。全ゲノム PCR 増幅法は微量のゲノムコピーから DNA を増やして目的とする領域の増幅により解析する方法であり、ゲノム配列などの解析に応用されている。我々は既に第 12 回と 13 回 DNA 多型集会において Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) 法を用いてホルマリン固定臓器、毛髪および爪などの法科学試料からの DNA 型の検出について検討して報告した。今回、新しい全ゲノム増幅試薬として REPLI-g Kit を用いて陳旧な血痕、毛髪及び爪などからの DNA 型検出について検討した。

試料として 5~20 年間の室温に保存した血痕について、フェノール・クロロホルム法にて、毛髪と爪について ISOHAIR (ニッポンジーン社) でそれぞれ DNA の抽出を行った。REPLI-g Kit を用いて総量 50  $\mu$ l の反応液でマニュアルどおりに全ゲノム増幅を行った。一方、DOP-PCR は Telenius らの方法に基づいて、22bp のランダムプライマーを用い 30 サイクルの増幅を実施した。得られた全ゲノム産物を鋳型 DNA として、STR 多型の vWA、D5S818、TH01、CSF1PO 及び Amelogenin ローカスなどの検査には Promega 社のキットを使用した。それぞれのプロトコールに一部変更をした方法で PCR 増幅を行った。1.2% のアガロース電気泳動で全ゲノム後のプロダクトを確認した。STR 多型の検出には 6.5% ポリアクリルアミドゲルを用い電気泳動をし、銀染色法により多型を判定した。

REPLI-g と DOP-PCR 全ゲノム増幅法を用いて以上の法科学試料より、STR 多型を検出したところ、両方法とも型判定ができた。アガロース電気泳動上では REPLI-g 法は DOP-PCR より微量の試料においても増幅されたプロダクト量が多く確認できた。しかし STR 型検査において REPLI-g では DOP-PCR より検出率は高くなかった。試料によって REPLI-g ではエクストラバンドが検出され、型判定に影響を受けた。コントロール DNA と比較してこれらの法科学試料では十分量の REPLI-g プロダクトが得られても型判定のできない試料も観察された。REPLI-g 全ゲノム増幅法は実際に応用するためには、さらに詳細な研究をする必要があると考えられる。

# P41

## AmpF0STR® Identifiler PCR Amplification Kit を用いた 溺死体の大動脈、脳硬膜からの STR 分析例

佐藤 彌生、茂谷 久子、早川 睦、矢島 大介、岩瀬 博太郎  
千葉大学大学院医学研究院法医学教室

### 「概要」

本例は河川内(干潮で干潟状態)で発見された腐乱溺死体であり、釣り人による発見時に身元不明であり、後頭部、顔面、左上肢、下肢に皮下出血が認められたために司法解剖を行った。血液は採取できず、大動脈と脳硬膜を用いて ABO 型、アメロゲニンによる性別判定の他に AmpF0STR® Identifiler PCR Amplification Kit を用いて STR (Short tandem repeat) 分析を行ったのでその結果を報告する。なお、後に指紋から身元が判明し、死後経過時間は3日から1週間前後と推定された。

### 「材料と方法」

解剖時に採取した大動脈と脳硬膜をエタノールで固定して乾燥後、約 20 mg を PUREGENE™ DNA Isolation Kit (Gentra Systems) を用いて DNA 抽出を行った。定量は分光光度法にて実施した。DNA 約 10 ng について AmpF0STR® Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) のプロトコールに従って15種の STR 型 (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA) と、アメロゲニンによる性別型を分析した。ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer により GeneMapper® ID Software (Applied Biosystems) で解析を行った。

### 「結果」

腐乱溺死体から採取した大動脈、脳硬膜について AmpF0STR® Identifiler PCR Amplification Kit を用いて STR 分析を行ったところ、両試料から一致した良好な結果がえられた。15 種の STR 型は D8S1179 13-16, D21S11 30-30, D7S820 11-11, CSF1PO 9-12, D3S1358 15-15, TH01 9-9, D13S317 8-12, D16S539 9-11, D2S1338 18-20, D19S433 12-14.2, vWA 18-21, TPOX 11-12, D18S51 19-24, D5S818 10-14, FGA 24-25 型、またアメロゲニンから XY 型が検出された。大動脈、脳硬膜は蛋白量も少なく前処理が容易であるために法医試料として有用であることは以前に報告した。今回は 16 種のマルチローカスを同時に検出する STR Kit を用いて個人識別を試みた結果、脳硬膜において一部反応の弱い箇所もあったが、上述の通り型判定が容易であった。症例数を増やして検討を続けたいと考えるが本例のように腐敗が進行した溺死体からも 16 種のマルチローカス型判定の可能性を示唆した例を報告した。



# 「テクニカルセミナー」

## DNA 多型解析の現状と展望

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社  
アプリケーションサポート 東 きょう

PCR 法の改良により、DNA 多型を手軽に確認し、個体識別や産地特定などに利用されるようになった。一般的になりすぎたゆえに、PCR 原理がおろそかになることもあるため、原理を再認識し、DNA 多型解析について見つめ直す。さらに得られた遺伝子多型はタンパク質ではどのような観察ができるか紹介する。PCR 法で重要な要素として Primer 配列、Primer の Tm 値、Primer の濃度、DNA の濃度、塩濃度等たくさんのファクターが存在する。PCR の高速化も進みこれらのファクターの重要性がますます高まると考えられる。このことを踏まえ PCR 法の原点と DNA 多型解析法について紹介する。

### PCR 法の原理

1. Primer 設計。
2. 酵素の選択と PCR ステップ。

### ヒト個人識別を初めとした DNA 多型解析法の分類

1. 繰返し配列に注目し、近縁ほど一致しやすい。一致を見分けるのに有利な方法。多型性に富むため、観察するローカス数が少なくて済むという利点がある。
2. 塩基配列置換 (SNPs) に注目し、近縁でも異なるタイプが出現するため近縁内観察にも有利な方法。繰返し配列と比較した場合、低分子化したゲノム DNA に対しても有効な判定が得られることが多い。多型は限られるため、ハプロタイプとして複数ローカスを同時に観察する必要がある。
3. ゲノム配列が分からない生物に対しての多型解析法。PCR 法はある程度塩基配列が判明していなければならない方法ではあるが、まだ解析が進んでいない生物に対しては RFLP や AFLP のようなパターン解析法が適している。
4. 変異による発現量の変化を予測。変異に伴う発現量の変化を DNA の観察で予測することが可能になる。

### DNA 多型解析では補えない範囲のタンパク質や低分子解析

1. 遺伝子変異があり、たんぱく質の構造解析を観察。
2. 遺伝子に差はなく、表現型に差がある場合は RNA やタンパク質での観察が必要。量的変化、構造変化など。
3. 生物が生成する物質や環境あるいは加工段階で混入する化合物の分析。