

|         |                                                                                                                |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 関 口 和 正                                                                                                        |
| 学位の種類   | 博 士 (農 学)                                                                                                      |
| 学位記番号   | 論 農 博 第 2517 号                                                                                                 |
| 学位授与の日付 | 平 成 16 年 1 月 23 日                                                                                              |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当                                                                                        |
| 学位論文題目  | Analysis of human mitochondrial DNA heteroplasmy for human identification<br>(個人識別のためのヒトミトコンドリアDNAヘテロプラスミーの分析) |

論文調査委員 (主 査) 教 授 安 達 修 二 教 授 井 上 國 世 教 授 永 尾 雅 哉

### 論 文 内 容 の 要 旨

核DNAを用いた個人識別が難しい骨や毛髪などの試料では、ミトコンドリアDNA (mtDNA) を用いた個人識別法が非常に有効な方法となるが、mtDNAには、1個人または1試料中に塩基配列が一部異なった複数種が混在するヘテロプラスミーと呼ばれる現象があり、mtDNA分析を個人識別に利用する際の問題になると考えられる。

本論文は、日本人におけるmtDNAの多型を分析することにより、mtDNA分析を利用した個人識別法の有効性を確認するとともに、mtDNAに存在するヘテロプラスミーの、各種生体試料における割合や母系親族間の遺伝について検討した結果をとりまとめたもので、4章よりなる。

第1章では、血縁関係のない日本人55人の血液から抽出したmtDNAを試料として、そのコントロール領域 (HV1: 16008-16391, HV2: 28-429) の多型性を調べ、HV1及びHV2領域の93ヶ所に97種類の変異を観察した。その塩基配列は52通りに分類でき、3組に同じ塩基配列を観察した。日本人のmtDNAの塩基配列をコーカソイド (白色人種) などと比較し、日本人と他人種との間で変異が観察され易い塩基位置が異なることを明らかにし、民族間の違いを確認した。また、塩基配列の解析を困難にする“C-stretch”と呼ばれる現象は、HV1及びHV2領域ともに観察され、特にHV1領域の塩基位置16189を中心とする変異は、コーカソイドで10%程度であるのに対して、日本人では約3分の1に観察されることから、“C-stretch”を考慮した個人識別の必要性を示した。これらのことから、mtDNAコントロール領域の塩基配列分析は有用な個人識別法であることを示した。

第2章では、mtDNAの塩基配列を分析する際に問題となるC-stretch部分を含まないプライマーセットとキャピラリーシーケンサーを利用することにより、迅速で確実なmtDNA検査法を検討し、限られた量でmtDNAの型判定を行わねばならない法科学試料のmtDNA分析を可能にした。本法により、mtDNAの塩基位置234番にA/Gのヘテロプラスミーをもつ女性に由来する各種試料を分析し、口腔内細胞や爪試料のヘテロプラスミーの割合は毛髪試料のそれと異なることを示した。さらに、毛髪試料間において、また同一毛髪であっても採取位置により、ヘテロプラスミーの割合が異なることを明らかにし、同一人の毛髪試料においても採取毛髪や採取位置により、mtDNA塩基配列解析において異なる配列が得られる可能性を示した。

第3章では、mtDNAの塩基位置16291番にC/Tのヘテロプラスミーをもつ女性を中心とした親族を対象として、3世代13人のヘテロプラスミーの割合を分析し、mtDNAのヘテロプラスミーの母系親族間の遺伝について検討した。さらに、一部のヒトについては、毛髪や爪などの組織におけるヘテロプラスミーの分布についても検討し、ヘテロプラスミーの割合は、母子や兄妹でも大きく異なる場合があり、母系親族間で見かけ上、1塩基が異なる場合があることを示した。また、血液や口腔内細胞にヘテロプラスミーが検出されるヒトの場合、ほぼ16291Cのみが観察される毛髪から16291Tのみが観察される毛髪まで、様々なヘテロプラスミーの割合を示す毛髪をもち、同一人で毛髪のmtDNAの塩基配列が1塩基異なる場合があることを示した。さらに、一部には、塩基位置16291と異なる位置に1塩基変異も観察した。これらの結果から、試料が同

一人または同一母系親族に由来するとしても、試料間でmtDNAの塩基配列が1塩基または2塩基異なっている可能性があることを示した。

最終の第4章では、同一人の毛髪におけるmtDNA塩基配列の同一性について検討した。3人のヒトの頭毛の毛幹部から抽出したDNAについて、微量に含まれる変異を高感度に検出できる変性グラジエントゲル電気泳動法（DGGE法）を用いて、mtDNAコントロール領域の変異を検出した。血液試料のmtDNA塩基配列解析ではヘテロプラスミーが観察されなくても、DGGE法を用いることによりわずかなヘテロプラスミーの存在が認められるヒトも存在し、このとき、毛髪では同一塩基位置にヘテロプラスミーが多数観察された。しかし、この部位を除いては、ほとんどの場合毛髪間でヘテロプラスミーが観察される塩基位置は異なった。ヘテロプラスミーをもつ毛髪は、個人内で3.8～8.8%の頻度で観察され、その割合は毛髪によって異なった。毛髪によっては、見かけ上、血液から得られた配列とは1塩基異なる毛髪も存在した。また、ヘテロプラスミーが観察された塩基位置は、必ずしもデータベース上で変異が多く観察される位置とは限らなかった。これらの結果から、塩基配列解析でヘテロプラスミーが観察されない場合でも、1個人の試料間でmtDNAの塩基配列が1塩基異なっている可能性を示した。

### 論文審査の結果の要旨

核DNAを用いた個人識別が難しい法科学試料では、ミトコンドリアDNA（mtDNA）を用いた個人識別法が非常に有効な方法となるが、1個人または1試料中に塩基配列が一部異なった複数種が混在するヘテロプラスミーという現象があり、mtDNA分析を個人識別に利用する際の問題点と考えられる。

本論文は、日本人におけるmtDNAの多型性、各種生体試料におけるヘテロプラスミーの割合、及び母系親族間でのその遺伝について分析し、mtDNA分析による個人識別の有効性と留意点について検討したものであり、成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. ヒトmtDNAコントロール領域の多型性を利用した個人識別法を確立し、血縁関係のない55人の日本人におけるmtDNAコントロール領域の塩基配列が52通りに分類できる高い識別性を明らかにした。また、変異が観察される塩基位置は人種により異なることを示した。

2. キャピラリー電気泳動法を用いた迅速かつ確実なmtDNA検査法を確立し、ヘテロプラスミーをもつヒトでは、口腔内細胞、爪、毛髪といった組織及び同一毛髪でも採取位置により、ヘテロプラスミーの割合が異なることを明らかにした。

3. 3世代13人の母系親族のヘテロプラスミーの割合の遺伝について検討し、親族間でヘテロプラスミーの割合が異なることを明らかにした。さらに、ヘテロプラスミーをもつヒトでは、毛髪や爪といった組織及び同一試料でもその採取位置により、ヘテロプラスミーの割合が異なることを明らかにし、同一人の試料でもmtDNAの塩基配列が1または2塩基異なっている可能性があることを示した。

4. 同一人について多数の毛髪を用いてヘテロプラスミーの割合を分析し、各試料で3.8%～8.8%の頻度でヘテロプラスミーを観察した。また、ヘテロプラスミーが観察される塩基位置はデータベース上で変異が多く観察される位置とは限らないことを示し、同一人でも試料によってmtDNAの塩基配列が1塩基異なっている可能性があることを明らかにした。

以上のように本論文は、微量の法科学試料を用いた、ミトコンドリアDNAコントロール領域の塩基配列に基づく個人識別法の確立に対して多くの重要な知見を得たものであり、応用生化学、生体情報応答学及び生物工学に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成15年12月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。