

氏名	藤本 佳那
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第79号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	Highly sensitive sex determination method using the exon 1 region of the amelogenin gene (アメロゲニン遺伝子の Exon1 領域を用いた高感度性別判定法)
論文審査委員	委員長 教授 森石 恆司 委員 准教授 三宅 邦夫 委員 准教授 大石 直輝

## 学位論文内容の要旨

### (研究の目的)

身元不明遺体における個人識別や自然人類学における古人骨の鑑定では、性別は重要な鑑定事項である。特に、DNA解析による性別判定は、形態人類学的特徴を利用できない試料にも適用でき、有用性が高い。法医DNA型鑑定で取り扱う試料は環境要因や微生物の影響をうけ容易に分解されるため、高度に変性した微量な試料から正確に判定を行うことが求められている。

従来の報告では、主にアメロゲニン遺伝子のIntron領域の男女差を用いた判定が行われている。しかし、この領域は多型性が非常に高く、判定領域の遺伝子変異によって正確な判定が行えない事例が存在する。つまり、確実な性別判定には、性差以外の多型が可能な限り少ない座位を選定することが望ましい。本研究では男女差以外には多型性がほとんどないアメロゲニン遺伝子のExon 1領域に着目して、性別判定用プライマーセットを開発し、極度に劣化したサンプルにも適用可能な新しい性別判定法を開発することを目的とした。

### (方法)

アメロゲニン遺伝子には、男女間で塩基配列の異なる7つのExonがあり、Intronにもそのような差異が見られる。中でも、性差以外の多型が少ない領域であると考えられるExon 1、2、7の性差の程度と遺伝的保存性を調査した。その結果、性差以外の多型がほとんどないアメロゲニン遺伝子のExon 1領域に着目し、性別判定用のプライマーセットを開発した。濃度が既知である市販の男女DNAを使用し、それぞれ段階的に希釈系列をつくり、本法の感度を測定した。本法の法医実務における有用性を検証するため、検出感度について、法医学的DNA型鑑定に広く用いられているGlobalFiler<sup>TM</sup>PCR Amplification Kit (GF) と比較検討した。

次に、高度に変性した微量DNAに対する有用性を検証するため縄文人骨(約2500年前)について、本法およびGFで性別判定を行った。得られた結果を、人骨の形態人類学的特徴から判定した性別と比較し、妥当性を検証した。

### (結果)

正確な性別判定に必要なDNA量は両法とも25 pgであり、同等の感度を達成することができた。次に、古代人の試料を用いて両法を比較したところ、増幅産物が短い本法がGFよりもかなり優れていることがわかった。

### (考察)

アメロゲニン遺伝子を用いた性別判定は、法医学や人類学の研究において広く用いられている。DNA型解析による性別判定で最も普及しているのは、アメロゲニン遺伝子のIntronを利用する方法である。例えば、Promega社のPowerPlex® Fusion 6C systemやThermo Fisher Scientific社のGlobalFiler™ PCR Amplification Kitなどが挙げられる。これらのキットの性別判定用PCR産物の長さは、前者はAMEL-Xで89 bp、AMEL-Yで95 bpであり、後者はAMEL-Xで99 bp、AMEL-Yで105 bpである。しかし、古代人骨のような極度に劣化した試料では、試料中のDNA断片は50 bpより短い場合がある。このような高度に断片化したDNAに対しては、従来の方法では性別の判定が困難であった。本研究で設計したプライマーセットは、AMEL-Xで48 bp、AMEL-Yで45 bpと、これまでに報告されているどの性別判定反応系よりも短い鎖長を有している。したがって、本法は古代人試料のような高度に断片化したDNAの解析において、より高い成功率が期待される。また、標的領域が非常に安定しており、本法による性別判定は、これまでの研究よりも信頼性が高いと考えられる。

### (結論)

本法は法医学領域で現在広く用いられている性別判定法と同等の感度を持ち、古人骨DNAのような極めて高度に断片化した試料にも適用可能である。さらに、手技が簡便で迅速、安価であることから、法医学及び自然人類学に貢献できると考える。

## 論文審査結果の要旨

### 1. 学位論文研究テーマの学術的意義。

法医学分野や人類学分野において、人骨やその他ヒトサンプルから性別などを判定することが重要なファクターとなる。その場合、サンプル量(核酸量など)の回収が十分でない場合、判定が困難なことが少なくない。一般的に、PCRなど高感度手法を用いて同定を行うが、より高い確度が必要となってくる。本研究では、性別判定に用いられるアルメゲニン遺伝子を標的にし、遺伝子内の各領域を検討した結果、Exon 1の領域が性別判定に適していることが分かった。実用的な面を考えると非常に簡便で正確である本手法は、法医学分野や人類学分野において意義ある成果と言える。

### 2. 学位論文及び研究の争点、問題点、疑問点、新しい視点等。

性別判定法に広く用いられているGlobalFiler™ PCR amplification法は、汎用されている性別判定方法である。しかしながら、アメロゲニン遺伝子は多型性が高く、判定領域におけるSNPにより、正確性に問題が生じることがある。本研究では、アメロゲニン遺伝子内に比較的保存されている領域を霊長類や各人種において検討し、Exon1を標的にし、増幅条件に

絞ることで、確度が高い手法を確立することができた。Global Filer™ 法と比較し、本方法は同等の感度を持ち、高度に断片化した DNA の解析において、性別判定がより本信頼できる結果を得られることが分かった。。

3. 実験及びデータの信頼性。

GlobalFiler™法において、アメロゲニン遺伝子 X 染色体 (AMEL-X) および Y 染色体 (AMEL-Y) の増幅産物の長さはそれぞれ 99 と 105 bp である。DNA の断片化は 50bp 程度前後と短いことがあり、従来の方で検出が難しい場合が多い。本研究では、それより短い長さを設定 (50bp 程度) することで、断片化された DNA サンプルでも増幅可能になるよう確度を高めた。また、比較的保存されている Exon 1 を鋳型にすることで、増幅高率と安定性を高めた。結果的に、必要な DNA 量は GlobalFiler™法と同程度であるが、古人骨の資料においてより本法のほうが、高い正確性をもつことがわかった。

4. 学位論文の改善点、等々。

検討したサンプル数が少ない点、また、各人種を対象として用いてないことが問題点として指摘された。また、サンプルによっては、Extra band が生じるなど問題点が指摘され、PCR 増幅条件やプライマーセットの種類などの検討が必要と考えられる。さらに、増幅物の配列確認の重要性なども指摘されていた。これらのことを今後確認し、より高い手技の確立が望まれる。しかしながら、本手法は手技が簡便で迅速かつ安価であることを考えると、法医学および人類学の領域において本論文の意義は高いものと思われる。

本論文内容は DNA サンプルからの高感度性別判定方法の基盤的研究として重要な情報を含んでおり、当該学術領域において有用な結果であると思われる。

委員との討議の結果、藤本佳那氏の博士論文は学位に値するという結論に至った。