

学位論文 博士(医学) 甲

Highly sensitive sex determination method using
the exon 1 region of the amelogenin gene
(アメロゲニン遺伝子の Exon 1 領域を用いた高
感度性別判定法)

藤本 佳那

山梨大学



Short Communication

Highly sensitive sex determination method using the exon 1 region of the amelogenin gene



Kana Fujimoto^{a,b,*}, Gento Fujii^{b,c}, Hideki Shojo^b, Hiroaki Nakanishi^d,
Hideaki Kanzawa-Kiriyama^e, Masao Saitoh^f, Kunio Yoshizawa^a, Tomoya Aono^g,
Tetsuya Horita^b, Aya Takada^h, Kazuyuki Saito^d, Koichiro Ueki^a, Noboru Adachi^b

^a Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi. 1110 Shimo-kato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan

^b Department of Legal Medicine, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi. 1110 Shimo-kato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan

^c Laboratory of Systems Genomics, Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 272-8562, Japan

^d Department of Forensic Medicine, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8421, Japan

^e Department of Anthropology, National Museum of Nature and Science, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

^f Center for Medical Education and Sciences, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi. 1110 Shimo-kato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan

^g Department of Historic Heritage (archaeology), Faculty of Arts, Tohoku University of Art and Design, 3-4-5, Kamisakurada, Yamagata, Yamagata 990-9530, Japan

^h Department of Forensic Medicine, Saitama Medical University, 38 Morohongo, Moroyama, Saitama 350-0495, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Amelogenin

Exon

Sex determination

Ancient skeleton

ABSTRACT

Sex determination is a crucial factor in the identification of unidentified human remains. Sex determination by DNA analysis is particularly useful because it can be applied to samples for which morphological characteristics are unavailable. Because samples handled in forensic DNA typing are easily degraded by environmental factors and microorganisms, there is a need for a method that can accurately determine sex even in highly decayed samples. Previous studies mainly used sex differences in an intron of the amelogenin gene. However, this region is highly polymorphic, and there are cases where accurate sexing cannot be performed because of genetic mutations in the target region. Thus, for reliable sex determination, it is desirable to select loci with as few non-sexual polymorphisms as possible. In this study, we focused on the exon 1 region of the amelogenin gene, which has very little polymorphism other than sex differences. We developed a primer set for sex determination and compared it with the GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (GF), which is widely used for forensic DNA typing. The results showed that the amount of DNA required for accurate sex determination was 25 pg for both methods, achieving equivalent sensitivity. Next, we compared the two methods using ancient human skeletons and found that the present method with its shorter amplicon was considerably superior to GF. The present method is simple, rapid, inexpensive, and suitable for analyzing highly degraded samples. Therefore, this method is expected to contribute to forensic sciences and physical anthropology.

1. Introduction

Sex determination of unidentified human remains is indispensable for forensic personal identification. In physical anthropology, the sex of

human skeletons excavated from archeological sites is crucial information to interpret the burial. Sex determination by DNA analysis is particularly useful in these fields because it can be applied to samples for which morphological anthropological characteristics are unavailable.

* Corresponding author at: 1110 Shimo-kato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan.

E-mail addresses: fkana@yamanashi.ac.jp (K. Fujimoto), 9260968520@edu.k.u-tokyo.ac.jp (G. Fujii), hshohjoh@yamanashi.ac.jp (H. Shojo), hakani@juntendo.ac.jp (H. Nakanishi), hkanzawa@kahaku.go.jp (H. Kanzawa-Kiriyama), masaos@yamanashi.ac.jp (M. Saitoh), yoshizawak@yamanashi.ac.jp (K. Yoshizawa), aono.tomoya@aga.tuad.ac.jp (T. Aono), htetsuya@yamanashi.ac.jp (T. Horita), takaaya@saitama-med.ac.jp (A. Takada), saitok@juntendo.ac.jp (K. Saito), kueki@yamanashi.ac.jp (K. Ueki), nadachi@yamanashi.ac.jp (N. Adachi).

<https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2022.102136>

Received 26 May 2022; Received in revised form 11 August 2022; Accepted 17 August 2022

Available online 22 August 2022

1344-6223/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Most previous studies on genetic sex determination used sex differences in an intron of the amelogenin gene [1–5]. In humans, the amelogenin X gene (AMEL-X) and amelogenin Y gene (AMEL-Y) are located in the p22.1–22.3 and Yp11.2 regions of the X and Y sex chromosomes, respectively, and are involved in the synthesis of amelogenin proteins [1,2]. However, it has been reported that an intronic region of this gene is occasionally deleted [1,6–8]. Therefore, accurate sexing is impossible for such samples. Even using the GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (GF; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which is widely used in forensic DNA typing, the sex of some samples cannot be determined, presumably because of a genetic mutation that has occurred in the relevant region (personal communication). Therefore, to ensure successful sex determination using DNA, it is necessary to select regions with as few genetic mutations other than sex-related differences as possible.

Additionally, samples used in forensic and archeological DNA analyses are easily degraded by environmental factors and the passing of time. Therefore, to accurately determine the sex of such samples, a method that is applicable to highly deteriorated samples is required [9,10].

The amelogenin gene has seven exons that differ between the sexes, while the introns also exhibit such differences [3–5]. Among them, exons 1, 2, and 7 are unaffected by splicing or skipping [11] and are likely to be regions of low polymorphism other than sex differences.

Thus far, a sex determination method using an exon of the amelogenin gene has only been reported from our two previous studies [12,13]. In these studies, exon 2 was analyzed, but the sexual difference in this region involves only three bases. If regions with greater sex differences are analyzed, the specificity of sexing is expected to be higher.

The PCR products used in these studies for sex determination were 50–60 bp in length. This length is short enough even for highly degraded samples. However, in the case of particularly degraded samples such as those from ancient skeletons, the peak length of DNA fragments in the sample may be less than 50 bp [14–17]. Therefore, it is desirable to select a region where the length of the PCR product can be even shorter.

In this study, we investigated the degree of sex difference and the genetic conservation of exons 1, 2, and 7. Then we developed a new sex determination method that can be applied to extremely degraded samples by using a region with high degree of conservation and large sex differences.

2. Selection of the target region

To ensure sex determination by DNA analysis, it is necessary to use loci with as few polymorphisms other than sex differences as possible. To investigate whether exons 1, 2, and 7 of the human amelogenin gene were particularly conserved, a sequence homology search by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was performed for each full-length sequence [18–20].

The results showed that exon 1 of AMEL-X shared the same sequence as primate *Pan paniscus* (bonobo, XM_003805678.2) and various ape species such as *Theropithecus gelada* (gelada baboon, XM_025372335.1). The amelogenin Y gene (AMEL-Y) also showed a complete sequence match with *Pan troglodytes* (chimpanzee, NM_001102459.1) (query cover: 100 %; E-value: 6e–19; per. ident: 100 %). The result of the sequence alignment by CLUSTALW indicated that exon 1 of AMEL-X was highly conserved, although there were some sequence differences between Hylobatidae (*H. moloch* and *N. leucogenys*) and phylogenetically distant Lemuridae (*L. catta*) and Galagidae (*O. garnettii*). Moreover, exon 1 of AMEL-Y showed a high level of genetic conservation similar to AMEL-X (Supplementary Fig. 1).

In exon 2, similar to exon 1, AMEL-X shared sequences with various ape species, including *Pan paniscus*, *Hylobates moloch* (silvery gibbon, XM_032756568.1), and other apes (query cover: 100 %; E-value: 2e–24; per. ident: 100 %). However, in AMEL-Y, there were no primates with complete sequence matches.

In exon 7, AMEL-X showed a complete sequence match only with the primate *Pan paniscus* (query cover: 100 %; E-value: 8e–52; per. ident: 100 %; ident: 100 %). In AMEL-Y, only *Pan troglodytes* showed a complete sequence match (query cover: 100 %; E-value: 4e–55; per. ident: 100 %). Thus, genetic conservation was considered to follow the following order: exon 1 > exon 7 > exon 2.

By comparing sex differences along the whole length of each exon, the sequence difference in exon 1 was 13 out of 56 bases and 3 out of 66 bases in exon 2. In exon 7, AMEL-Y was six bases longer than AMEL-X, with a sequence difference of 10 bases. In this study, exon 1 was selected as the region of analysis because of its high degree of conservation and large sex differences (Table 1).

To confirm the sequence conservation of the exon 1 region within the human population, we searched for known single-nucleotide variants (SNVs) in AMEL-X and AMEL-Y using dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) and examined the allele frequencies in the human population for mutations within exon 1. Nine and two SNVs were found in exon 1 of AMEL-X and AMEL-Y, respectively (Supplementary Fig. 2), and the frequency of alternative alleles was very low in these SNVs (Supplementary Table 1). Therefore, these SNVs were virtually absent from the human population and had a limited effect on the analysis. Furthermore, in dbSNP, no insertions or deletions were observed in the region.

3. Materials and methods

3.1. Primer design

Primers were designed for the exon 1 region by selecting a segment in the primer sequence with the largest possible sex difference in the nucleotide sequence, to increase specificity (Table 2). The amplified products were designed to be short (AMEL-Y: 45 bp; AMEL-X: 48 bp) to improve the efficiency of amplification in highly fragmented samples.

3.2. PCR conditions and detection of PCR products

The total volume of the PCR system was 10 µL and the composition of the reaction solution was 1 × QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN, Hilden, Germany), 0.2 µM of each primer, and template DNA. The reaction was performed in a Takara PCR Thermal Cycler Fast (Takara, Otsu, Japan). The temperature conditions were 95 °C for 15 min to activate the enzyme, followed by five cycles of 94 °C for 30 s and 64 °C for 5 min, and then 35 cycles of 94 °C for 30 s and 64 °C for 90 s. The final elongation reaction was performed at 72 °C for 3 min. Each reaction was performed at a ramp speed of + 2.5 °C/s.

All PCR products were mixed with 2 µL of 6 × loading buffer (Takara), and 2 µL of this was used for undenatured polyacrylamide gel electrophoresis (10 % T, 5 % C, 1 × TBE; TEFCO, Tokyo, Japan). The electrophoresis apparatus was STC-808 (TEFCO) at 200 V (constant voltage) for about 45 min. After electrophoresis, PCR products were stained with SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Takara) for 36 min and visualized fluorescently by blue light irradiation.

3.3. Sensitivity measurement

Commercially available male and female DNA [male: 2800 M Control DNA (Promega, Madison, WI, USA); female: Human Genomic DNA: Female (Promega)] was used to determine the sensitivity of our new method.

The concentration and purity ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) of the DNA were determined using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The DNA was diluted with DNase/RNase-free distilled water (Thermo Fisher Scientific) to 1 ng/µL.

The male and female DNA was serially diluted twofold from 100 to 0.78 pg/µL using DNase/RNase-free distilled water. Experiments were performed twice in duplicate for sensitivity measurements. The presence

Table 1

Amelogenin gene exon 1 nucleotide sequence.

AMEL-X exon 1 (5' → 3') AAAGGATCAA	GCATCCCTGA	GTTTCAAACA	GAAACTTGCA	CTGAATACAT	TCAAAG
AMEL-Y exon 1 (5' → 3') AGAGGACCAA	GCCTCCCTGT	GTAGCACAAA	GAAAGTTTCT	CTGAATATAT	TTAAAG

Thirteen out of 56 nucleotides show sex differences. Nucleotides with sex differences are shown in bold italic type.

Table 2

Primer sequences used in this study.

Primer		Sequence (5'→3')	Amplicon length
Exon 1-X	Forward	AAAGGATCAAG GCATCCCTGA	48 bp
	Reverse	GTATTCAGTGCAAGTTTCTGTTGA	
Exon 1-Y	Forward	AGAGGACCAAG CCTCCCTG	45 bp
	Reverse	TTCAGAGAAACTTTCTTTGTGCTAC	

Nucleotides with sex differences are marked in bold italic type.

of contamination was monitored by simultaneously measuring the negative PCR control.

3.4. Comparison experiment with GF

To evaluate the utility of this method in forensic practice, the detection sensitivity was compared with that of GF, which is widely used for DNA typing. Commercially available single male-derived DNA was used for the analysis.

The DNA, the concentration of which was adjusted to 1 ng/μL, was serially diluted twofold using DNase/RNase-free distilled water from 100 to 0.78 pg/μL. Experiments were performed twice in duplicate. Maleness was determined by detection of the Y-chromosome-derived amelogenin gene. Detection sensitivity was defined as the lowest concentration at which the Y-chromosome-derived amelogenin gene was detected reproducibly. The presence of contamination was monitored by simultaneously measuring the negative PCR control in each experiment. The PCR conditions for GF were in line with the manufacturer's recommended protocol for trace sample analysis. The PCR system was the Takara PCR Thermal Cycler Fast. Capillary electrophoresis was performed with a SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Data were analyzed using GeneMapperID-X software (Thermo Fisher Scientific). A peak was considered to have been detected if its fluorescence intensity was greater than 100 RFU, which was determined by the validation in our laboratory as the analytical threshold, in accordance with the manufacturer's advice.

To evaluate the effectiveness of this method for highly degraded, trace amounts of DNA, we determined the sex of 11 latest Jomon human skeletons (about 2,500 years old) excavated from Grave No. 18 at the Usu Moshiri Site, Date City, Hokkaido, Japan, using our method and GF. DNA was extracted from the petrous part of temporal bones from these skeletons (Supplementary Table 2), as described by Takahashi et al. [21]. Two microliters of the DNA solution was extracted and used as the PCR template. The conditions for PCR, electrophoresis, and detection were the same as those in the sensitivity comparison experiment. Two independent assays were performed to confirm the reproducibility of the results. Negative extraction and negative PCR controls were also analyzed along with the ancient samples. In the analyses, if the Y-chromosome-related allele was reproducibly detected, the sample was determined to be a male. The obtained results were validated by comparing them with the sex determined by the morphological characteristics of the skeletons. The study on ancient skeletons was approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine, the University of Yamanashi (Approval No. 2454).

4. Results

4.1. Sensitivity measurement

Before performing the dilution experiment, we checked whether the sex of each DNA solution could be successfully determined by our method (Fig. 1). For male DNA, the minimum concentration at which sex was successfully determined reproducibly by our method was 12.5 pg. The minimum concentration at which both X- and Y-chromosome-derived amelogenin genes were consistently detected was 25 pg. For female DNA, the minimum concentration required for reliable sex determination was 12.5 pg, and 6.25 pg would be acceptable for detection (Supplementary Tables 3 and 4).

4.2. Comparison with GF

The results of male DNA dilution experiments for our reaction system and GF are shown in Supplementary Tables 3 and 5, respectively. Our reaction system had the same detection sensitivity as GF.

4.3. Sex determination of ancient skeletons

Our method was able to determine sex in all ancient individuals studied (Fig. 2). The results were consistent with those obtained from the morphological analysis. However, sex was determined by GF in only 4 of the 11 individuals (18B, 18C, 18D, and 18G) (Supplementary Fig. 3).

5. Discussion

Sex determination using the amelogenin gene has been used extensively in forensic practice and physical anthropological research. The most widespread method for sex determination by DNA analysis is the method using an intron of the amelogenin gene developed by Sullivan et al. [3]. Their method generates amplicons of 106 and 112 bp for the X- and Y-chromosomes, respectively. Subsequently, an intron of the amelogenin gene has been used for sexing in many commercially available STR kits. Examples include Promega's PowerPlex® Fusion 6C system and Thermo Fisher Scientific's GlobalFiler™ PCR Amplification Kit. The PCR products for sex determination in these kits are shorter than those of

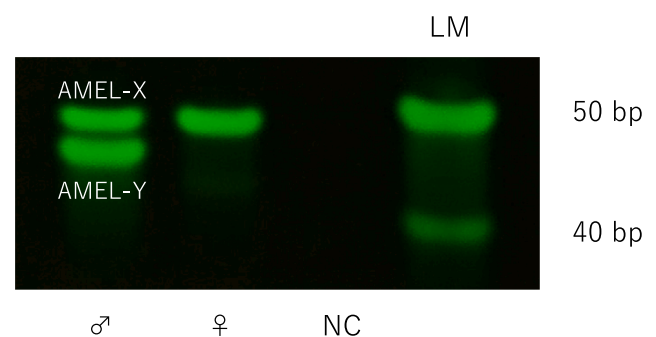


Fig. 1. The results of sex determination by our new method using commercially available male and female DNA. LM denotes 10 bp DNA ladder markers (Thermo Fisher Scientific) and NC indicates negative PCR control.

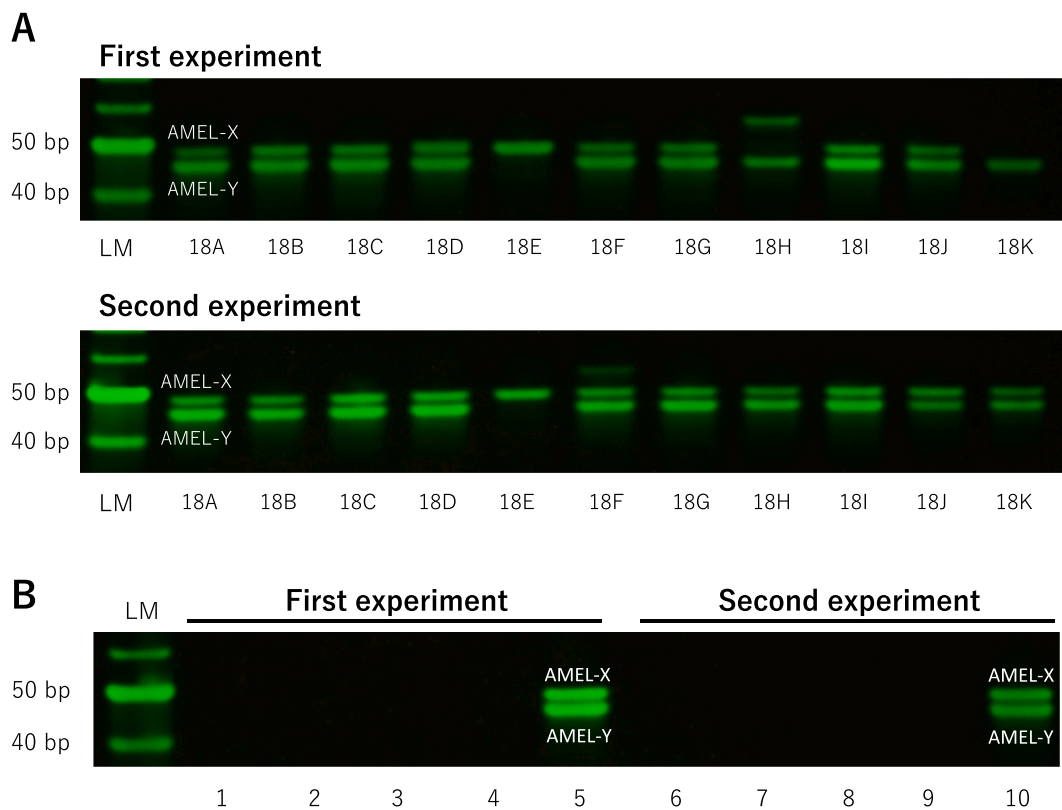


Fig. 2. The results of sex determination of ancient human skeletons by our new method (A). LM: 10 bp DNA ladder markers (Thermo Fisher Scientific). The results of the control samples that were analyzed in parallel with ancient human skeletons (B). Lanes 1 and 6: negative extraction control for samples 18A to 18 E. Lanes 2 and 7: negative extraction control for samples 18F and 18 J. Lanes 3 and 8: negative extraction control for sample 18 K. Lanes 4 and 9: negative PCR control. Lanes 5 and 10: positive PCR control.

Sullivan et al. [3]: the former is 89 bp for AMEL-X and 95 bp for AMEL-Y, while the latter is 99 bp for AMEL-X and 105 bp for AMEL-Y. Thus, these kits are considered to be more suitable for the sexing of degraded samples than the method of Sullivan et al. [3]. However, as mentioned above, in extremely degraded samples such as ancient skeletons, the DNA fragments in the sample may mainly be shorter than 50 bp [14–17]. For such highly fragmented DNA, it is difficult to determine sex by conventional methods. The primer sets designed in this study have shorter strand lengths of 48 bp for AMEL-X and 45 bp for AMEL-Y, which are shorter than those of any other sex determination reaction system reported to date. Therefore, this method is expected to have a higher success rate in the analysis of highly fragmented DNA such as that of ancient human skeletons.

The results of sex determination using commercially available male and female DNA showed that accurate sex determination was possible at 12.5 pg for both sexes with sensitivity comparable to that of Masuyama et al. [12]. Because the primers used in our new method have sex differences of more than a few bases inside their sequences, the possibility of primer mis-annealing is expected to be lower than for the APLP primers used in our previous studies [12,13]. Along with the extreme stability of the target region, sexing by our new method was considered to be more reliable than that in our previous studies. However, because of targeting a highly conserved region, this method could not be used for human/animal discrimination.

There was no difference between our method and GF in terms of the amount of DNA required. However, in the analysis of ancient skeletons, the success rate of our new system was considerably higher than that of GF. This was clearly attributable to the shorter length of PCR products in our method. Because of its stability and robustness in analyzing highly deteriorated samples, our method is expected to contribute to forensic and anthropological sex identification.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank Mitchell Arico from Edanz (<https://jp.edanz.com/ac>) for editing a draft of this manuscript.

Funding

This study was supported by Grants-in-aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (Nos. 20K18803, 18K17087, 18H05507, 20H01374, 20H01375, 20H03332, and 22H00741).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2022.102136>.

References

- [1] H.R. Dash, N. Rawat, S. Das, Alternatives to amelogenin markers for sex determination in humans and their forensic relevance, *Mol. Biol. Rep.* 47 (3) (2020) 2347–2360.
- [2] Y. Nakahori, O. Takenaka, Y. Nakagome, A human X-Y homologous region encodes “amelogenin”, *Genomics* 9 (2) (1991) 264–269, [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90251-9](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90251-9). PMID: 2004775.

- [3] K.M. Sullivan, A. Mannucci, C.P. Kimpton, P. Gill, A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, *Biotechniques* 15(4) (1993) 636–638, 640–641. PMID: 8251166.
- [4] A. Akane, H. Shiono, K. Matsubara, Y. Nakahori, S. Seki, S. Nagafuchi, M. Yamada, Y. Nakagome, Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods, *Forensic Sci. Int.* 49 (1) (1991) 81–88, [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(91\)90174-h](https://doi.org/10.1016/0379-0738(91)90174-h). PMID: 2032670.
- [5] H. Haas-Rochholz, G. Weiler, Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test, *Int. J. Legal Med.* 110 (6) (1997) 312–315, <https://doi.org/10.1007/s004140050094>. PMID: 9387013.
- [6] K. Drobnic, A new primer set in a SRY gene for sex identification, *Int. Congr. Ser.* 1288 (2006) 268–270, <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.08.020>.
- [7] L. Laverde, Sex determination problems in forensic genetic analysis, *Forensic Sci. Int.* 4 (1) (2013) e350–e351.
- [8] M. Steinlechner, B. Berger, H. Niederstätter, W. Parson, Rare failures in the amelogenin sex test, *Int. J. Legal Med.* 116 (2) (2002) 117–120, <https://doi.org/10.1007/s00414-001-0264-9>. PMID: 12056519.
- [9] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 645–679, <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143214>. PMID: 15568989.
- [10] S. Pääbo, Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *PNAS* 86 (6) (1989) 1939–1943, <https://doi.org/10.1073/pnas.86.6.1939>. PMID: 2928314; PMCID: PMC286820.
- [11] A. Veis, Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (1) (2003) 38–55, <https://doi.org/10.1007/s00180300003>. PMID: 12613657.
- [12] K. Masuyama, H. Shoji, H. Nakanishi, S. Inokuchi, N. Adachi, D. Hoon Shin, Sex Determination from Fragmented and Degenerated DNA by Amplified Product-Length Polymorphism Bidirectional SNP Analysis of Amelogenin and SRY Genes, *PLoS ONE* 12 (1) (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169348>. PMID: 28052096; PMCID: PMC5214517 e0169348.
- [13] F. Saeki, N. Adachi, M. Yoneda, T. Suzuki, J. Sawada, T. Kakuda, K. Masuyama, H. Ozaki, T. Omori, Y. Hagihara, T. Nara, Analyzing the Final Jomon human remains from the Nonomae shellmound, Ofunato City, Iwate Prefecture, *Anthropol. Sci. (Japanese Series)* 124 (1) (2016) 1–17, in Japanese.
- [14] N. Adachi, H. Kanzawa-Kiriyama, T. Nara, T. Kakuda, I. Nishida, K. Shinoda, Ancient genomes from the initial Jomon period: new insights into the genetic history of the Japanese archipelago, *Anthropol. Sci.* 129 (1) (2021) 13–22, <https://doi.org/10.1537/ase.2012132>.
- [15] K. Shinoda, H. Kanzawa-Kiriyama, T. Kakuda, N. Adachi, Genetic characteristics of Yayoi people in Northwestern Kyushu-Ancient genome analysis of human skeletons excavated from Shimomotoyama Rock Shelter, Sasebo, Nagasaki Prefecture, Japan, *Anthropol. Sci. (Japanese Series)* 127 (1) (2019) 25–43.
- [16] K. Shinoda, H. Kanzawa-Kiriyama, T. Kakuda, N. Adachi, Mitochondrial DNA Analysis of Human skeletons of the Yayoi Period Excavated at Asahi Site, Kiyosushi, Aichi Pref, *Bull. Nat. Museum Japanese History* 228 (2021) 277–285.
- [17] H. Kanzawa-Kiriyama, T. Kakuda, N. Adachi, K. Shinoda, Nuclear DNA Analysis of Human Bone of the Late Yayoi Period Excavated at Aoya-Kamijichi Site, Tottori-shi, Tottori Pref, *Bull. Nat. Museum Japanese History* 228 (2021) 295–307.
- [18] I. Ladunga, Finding homologs to nucleotide sequences using network BLAST searches, *Curr. Protoc. Bioinform.* 3 (2002) 3.3, <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0303s00>. PMID: 18792938.
- [19] M. Cameron, H.E. Williams, Comparing compressed sequences for faster nucleotide BLAST searches, *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 4 (3) (2007) 349–364, <https://doi.org/10.1109/TCBB.2007.1029>. PMID: 17666756.
- [20] W.R. Pearson, An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching, *Current Protocols Bioinform.* 42 (1) (2013).
- [21] R. Takahashi, R. Koibuchi, F. Saeki, Y. Hagihara, M. Yoneda, N. Adachi, T. Nara, Mitochondrial DNA analysis of the human skeletons excavated from the Shomyoji shell midden site, Kanagawa, Japan, *Anthropol. Sci.* 127 (1) (2019) 65–72, <https://doi.org/10.1537/ase.190307>.

Supplementary Table 1. Variants observed in the target regions and their frequencies in populations

Study				ALFA project											gnomAD						TopMed	KOREAN population from KRGDB			
rsID	Position	Variation Type	Alleles	Total	European	African	African Others	African American	Asian	East Asian	Other Asian	Latin American 1	Latin American 2	South Asian	Other	Global	European	African	American	Ashkenazi Jewish	East Asian	Other	Global	KOREAN	
rs1301053489	Chr X: 11293418 (hg38)	SNV	A>T	4470 A=0.9980 T=0.0020	4462 A=0.9980 T=0.0020	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	8 A=1.0 T=0.0	104536 A=0.999971 T=0.000029	57307 A=0.99995 T=0.00005	31495 A=1.00000 T=0.00000	9368 A=1.0000 T=0.0000	2526 A=1.0000 T=0.0000	2261 A=1.0000 T=0.0000	1579 A=1.0000 T=0.0000			
rs1188807825	Chr X: 11293422 (hg38)	SNV	A>G	14050 A=1.00000 G=0.00000	9690 A=1.0000 G=0.0000	2898 A=1.0000 G=0.0000	114 A=1.000 G=0.000	2784 A=1.0000 G=0.0000	112 A=1.000 G=0.000	86 A=1.00 G=0.00	26 A=1.00 G=0.00	146 A=1.000 G=0.000	610 A=1.000 G=0.000	98 A=1.00 G=0.00	496 A=1.000 G=0.000										
rs2048027849	Chr X: 11293433 (hg38)	SNV	G>C																						
rs1482601683	Chr X: 11293438 (hg38)	SNV	A>C	14050 A=1.00000 C=0.00000	9690 A=1.0000 C=0.0000	2898 A=1.0000 C=0.0000	114 A=1.000 C=0.000	2784 A=1.0000 C=0.0000	112 A=1.000 C=0.000	86 A=1.00 C=0.00	26 A=1.00 C=0.00	146 A=1.000 C=0.000	610 A=1.000 C=0.000	98 A=1.00 C=0.00	496 A=1.000 C=0.000								264690 A=0.999996 C=0.000004		
rs1603028802	Chr X: 11293439 (hg38)	SNV	A>G																					2922 A=0.9993 G=0.0007	
rs890268618	Chr X: 11293441 (hg38)	SNV	C>T	14050 C=1.00000 T=0.00000	9690 C=1.0000 T=0.0000	2898 C=1.0000 T=0.0000	114 C=1.000 T=0.000	2784 C=1.0000 T=0.0000	112 C=1.000 T=0.000	86 C=1.00 T=0.00	26 C=1.00 T=0.00	146 C=1.000 T=0.000	610 C=1.000 T=0.000	98 C=1.00 T=0.00	496 C=1.000 T=0.000	104416 C=0.999971 T=0.000029	57226 C=0.99995 T=0.00005	31474 C=1.00000 T=0.00000	9366 C=1.0000 T=0.0000	2529 C=1.0000 T=0.0000	2247 C=1.0000 T=0.0000	1574 C=1.0000 T=0.0000	264690 C=0.999981 T=0.000019		
rs1769799369	Chr X: 11293447 (hg38)	SNV	C>G	10680 C=1.00000 G=0.00000	6962 C=1.0000 G=0.0000	2294 C=1.0000 G=0.0000	84 C=1.00 G=0.00	2210 C=1.0000 G=0.0000	108 C=1.000 G=0.000	84 C=1.00 G=0.00	24 C=1.00 G=0.00	146 C=1.000 G=0.000	610 C=1.000 G=0.000	94 C=1.00 G=0.00	466 C=1.000 G=0.000								264690 C=0.999996 G=0.000004		
rs2048028190	Chr X: 11293466 (hg38)	SNV	A>T	10680 A=1.00000 T=0.00000	6962 A=1.0000 T=0.0000	2294 A=1.0000 T=0.0000	84 A=1.00 T=0.00	2210 A=1.0000 T=0.0000	108 A=1.000 T=0.000	84 A=1.00 T=0.00	24 A=1.00 T=0.00	146 A=1.000 T=0.000	610 A=1.000 T=0.000	94 A=1.00 T=0.00	466 A=1.000 T=0.000										
rs2048028288	Chr X: 11293468 (hg38)	Indel	delG	10680 GG=1.00000 G=0.00000	6962 GG=1.0000 G=0.0000	2294 GG=1.0000 G=0.0000	84 GG=1.00 G=0.00	2210 GG=1.0000 G=0.0000	108 GG=1.000 G=0.000	84 GG=1.00 G=0.00	24 GG=1.00 G=0.00	146 GG=1.000 G=0.000	610 GG=1.000 G=0.000	94 GG=1.00 G=0.00	466 GG=1.000 G=0.000										
rs2054070290	Chr Y: 6873989 (hg38)	SNV	G>A													29887 G=0.99997 A=0.00003	16126 G=0.99994 A=0.00006	8531 G=1.0000 A=0.0000	3236 G=1.0000 A=0.0000	778 G=1.000 A=0.000	753 G=1.000 A=0.000	463 G=1.000 A=0.000			
rs2054070314	Chr Y: 6874021 (hg38)	SNV	G>A													29826 G=0.99993 A=0.00007	16126 G=1.00000 A=0.00000	8499 G=0.9998 A=0.0002	3218 G=1.0000 A=0.0000	769 G=1.000 A=0.000	754 G=1.000 A=0.000	460 G=1.000 A=0.000			

Supplementary Table 2. Ancient skeletons analyzed in the present study

Sample no.	DNA samples	Morphological sex
18A	Right temporal bone	Male
18B	Right temporal bone	Male
18C	Right temporal bone	Male
18D	Right temporal bone	Male
18E	Left temporal bone	Female
18F	Left temporal bone	Male
18G	Left temporal bone	Male
18H	Left temporal bone	Male
18I	Right temporal bone	Male
18J	Right temporal bone	Male
18K	Left temporal bone	Male

Supplementary Table 3. Dilution series experiments with our new primer set [Male DNA: 2800M Control DNA (Promega)].

	1 st		2 nd		3 rd		4 th	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
50 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>25 pg</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
12.5 pg	+	+	-	+	-	+	-	+
6.25 pg	+	+	-	-	-	+	+	-
3.13 pg	-	-	-	-	+	+	-	-
1.56 pg	-	-	-	-	-	-	-	-
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	-	-

Bold italic: Limit for stable detection of both AMEL-X and -Y.

Supplementary Table 4. Dilution series experiments with our new primer set [Human Genomic DNA: Female (Promega)].

	1 st		2 nd		3 rd		4 th	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
50 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
25 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>12.5 pg</i>	+	-	+	-	+	-	+	-
6.25 pg	+	-	+	-	-	-	-	-
3.13 pg	+	-	+	-	+	-	-	-
1.56 pg	-	-	+	-	-	-	-	-
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	+	-

Bold italic: Limit for stable detection of AMEL-X.

Supplementary Table 5. Dilution series experiment using GF [Male DNA: 2800M Control DNA (Promega)].

	1 st		2 nd		3 rd		4 th	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
50 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>25 pg</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
12.5 pg	-	+	+	+	+	+	+	+
6.25 pg	+	-	+	-	-	-	+	-
3.13 pg	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56 pg	-	-	-	-	-	-	-	-
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	-	-

Bold italic: Limit for stable detection of both AMEL-X and -Y.

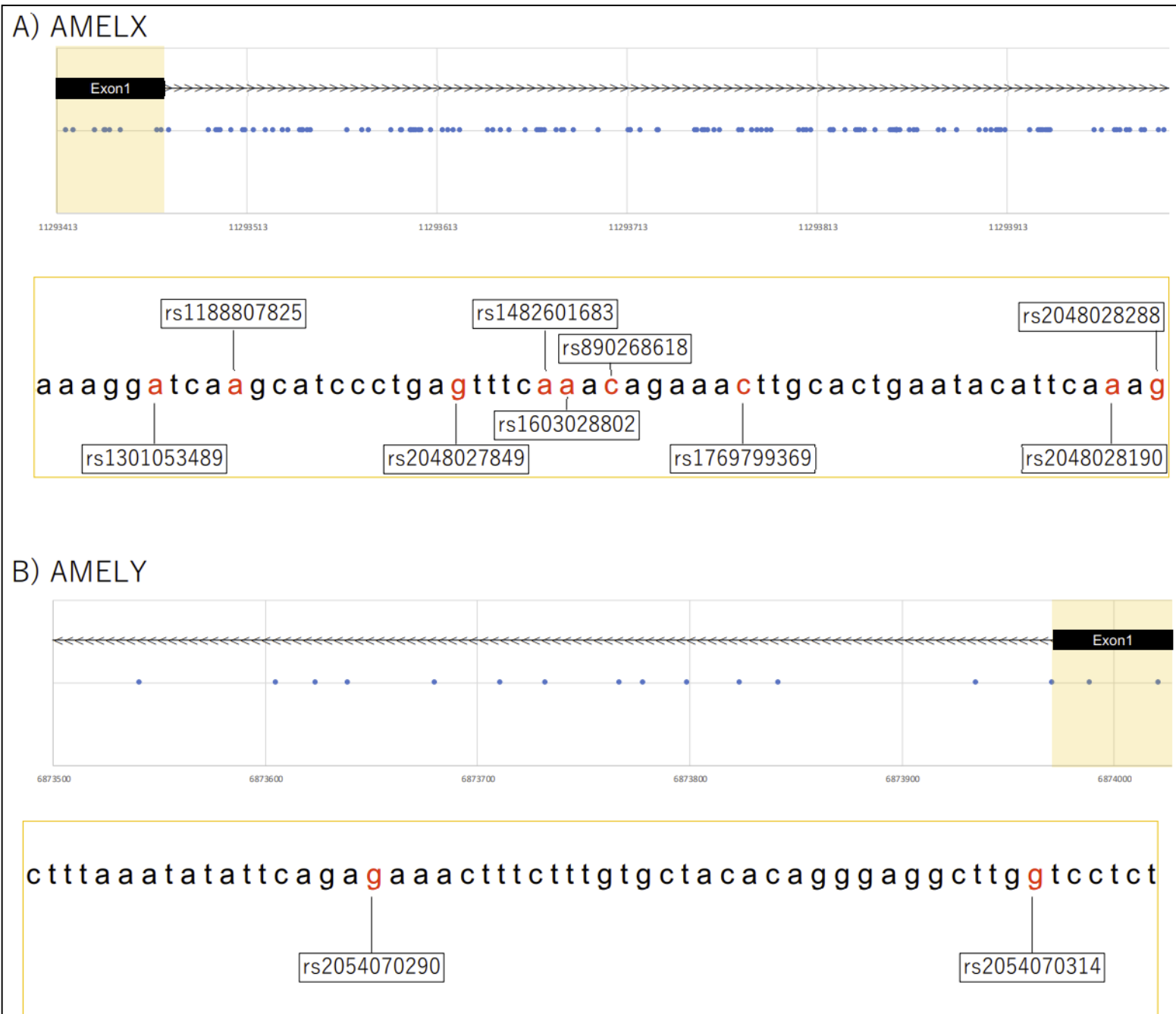
Supplementary Fig. 1.

A) AMELX Exon1	
01. H_sapiens_AY694827.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
02. H_sapiens_AY694828.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
03. H_sapiens_AY694854.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
04. Pan_tro_AB091781.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
05. Pan_tro_AY694820.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
06. G_gorilla_XM_004063779.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
07. G_gorilla_XM_004063780.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
08. G_gorilla_XM_004063781.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
09. P_abelii_XM_024240707.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
10. P_abelii_XM_024240708.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
11. P_abelii_XM_024240709.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
12. H_moloch_XM_032756565.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
13. H_moloch_XM_032756567.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
14. H_moloch_XM_032756568.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
15. N_leucogenys_XM_003261017.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
16. N_leucogenys_XM_003261018.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
17. N_leucogenys_XM_003261019.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
18. M_mulatta_XM_028841805.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
19. L_catta_AB091785.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGGGTTTCAAGACAGAAACTTACTCTGAATACATTCAAAG
20. O_garnettii_AB091787.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGGATT-CAGACAGAAACTT-GCTCTGAATACATTCAAAG
	***** ***** ** ** ***** * ***** **
B) AMELY Exon1	
01. H_Sapiens_NM_001364814.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
02. H_sapiens_NM_001143.2	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
03. Pan_tro_AB091782.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
04. Pan_tro_NM_001102459.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
05. H_moloch_XM_032756141.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
06. M_mulatta_XM_028834403.1	--AGGACCAAGCCTCCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
07. C_imitator_XM_017518860.2	AGAGGATCAAGCCTCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTGAAAG
08. C_imitator_XM_017518861.1	--AGGATCAAGCCTCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTGAAAG
09. S_sciureus_AB091784.1	AGAAGACCAACCTCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTGAAAG
	* ** *** ** ***** ***** ***** *****

The result of the sequence alignment of exon 1 by CLUSTALW.

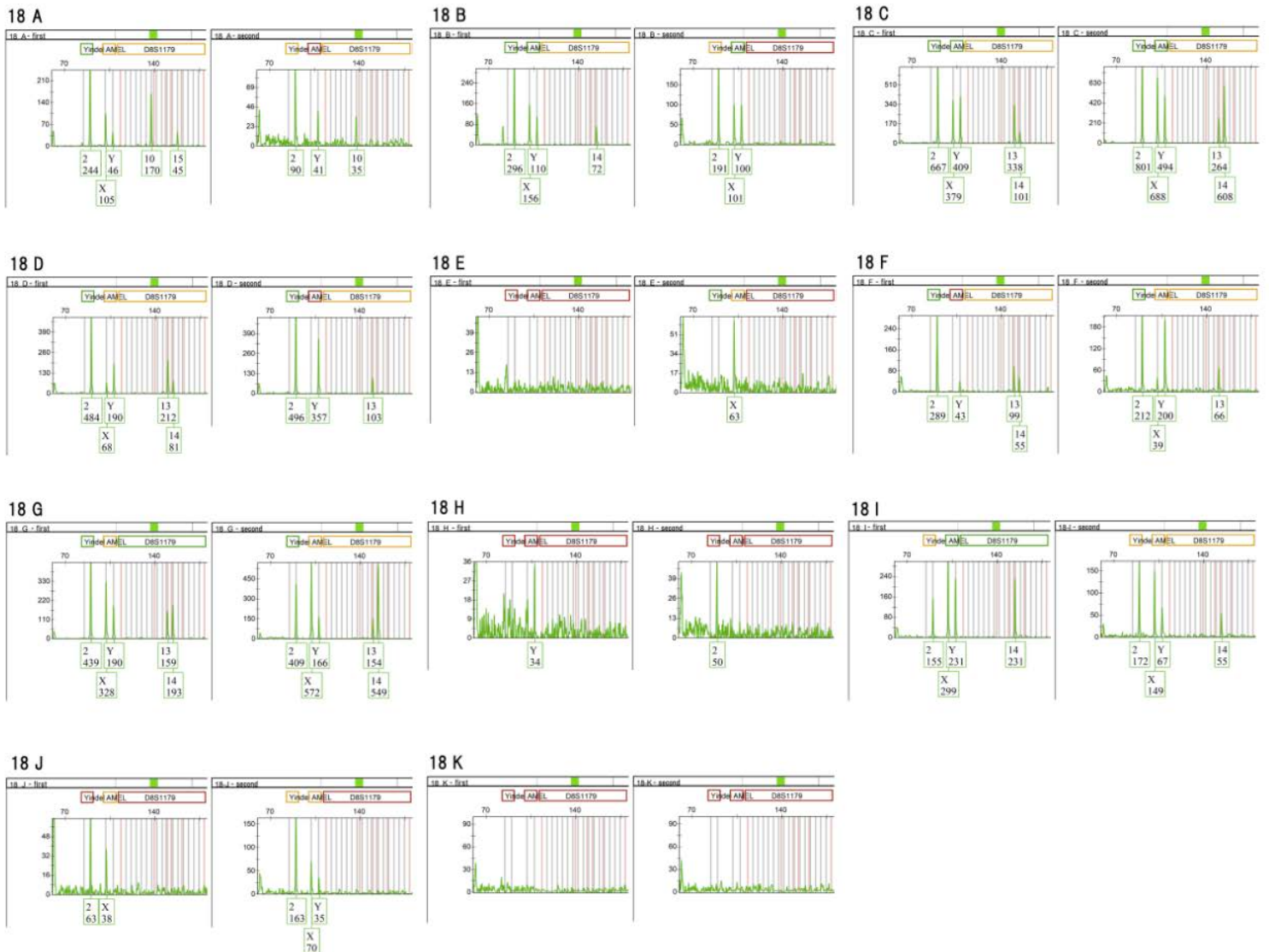
The first two bases of Macaca mulatta and Cebus imitator were missing in the BlastN results.

Supplementary Fig. 2.



The mutation sites reported within exon 1. Allele frequencies of these mutations in the human population are shown in Supplementary Table 1. The x-axis indicates the position on the chromosome. Blue dots indicate SNVs.

Supplementary Fig. 3.



Two independent assays were performed to confirm the reproducibility of the results. Sexing was successful in 4 out of 11 individuals (18B, 18C, 18D, and 18G). If the Y-chromosome-related allele was reproducibly detected (≥ 100 RFU), the sample was determined to be a male.

補足審査資料①

Highly sensitive sex determination method using
the exon 1 region of the amelogenin gene
(アメロゲニン遺伝子の Exon 1 領域を用いた高
感度性別判定法)

藤本 佳那

【補足審査資料①】は英文論文の Supplementary Table および Figure を組み込み、和文論文としたものである。

Highly sensitive sex determination method using the exon 1 region of the amelogenin gene (アメロゲニン遺伝子の Exon 1 領域を用いた高感度性別判定法)

ABSTRACT

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、性別判定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 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、現在広く法医 DNA 型鑑定に用いられている GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (GF)との比較検討を行った。

その結果、正確な性別判定を安定しておこなうために必要な DNA 量は、本法および GF で共に 25 pg であり、感度の面では同等であった。そこで、高度に断片化した古人骨試料を用いて両者を比較したところ、増幅産物の鎖長が短い本法は GF に比べてかなりの優位性が認められた。本法は高度断片化試料についても適用可能、かつ手技が簡便で迅速、安価であり、法医学及び自然人類学に貢献できると考える。

Keywords: Amelogenin, Exon, Sex determination, Ancient skeleton

1. Introduction

身元不明遺体における性別判定は、個人識別上重要な鑑定事項である。また、自然人類学においては、遺跡等から発見された古人骨の鑑定で、性別判定は不可欠である。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ような試料にも適用でき、有用性が高い。従来の性別判定の報告は、その多くがアメロゲニン遺伝子の Intron 領域の男女差を利用している¹⁻⁵⁾。ヒトでは、アメロゲニン X 遺伝子 (以下: AMEL-X) とアメロゲニン Y 遺伝子 (以下: AMEL-Y) の両方が性染色体の p22.1-22.3 領域と Yp11.2 領域にそれぞれ存在しており、アメロゲニンタンパク質の合成に関与している^{1,2)}。しかし、この遺伝子の Intron 領域は時に欠失することが報告されており^{1,6-8)}、その場合には正確な判定が行う

ことができなかつた。現在法医 DNA 型鑑定に広く用いられている GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (GF; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) においても、キットの検査対象領域は不明であるものの、当該領域に起こった何らかの遺伝子変異によるものと推定される判定不能事例があることが分かってきた(私信)。よって、DNA を用いた性別判定を確実なものとするためには、正確な解析を妨げるような遺伝子変異が可能な限り少なく、かつ、明瞭な男女差が認められる領域を選定する必要がある。

さらに、法医 DNA 型鑑定で取り扱う試料は環境要因等の影響をうけ容易に分解されるため、高度に断片化した微量な試料からも正確に判定を行えることが求められる^{9, 10)}。

アメロゲニン遺伝子は7つの Exon を持ち、Intron 領域と同様に男女差があることが知られている³⁻⁵⁾。このうち、Exon1、2、7は、スプライシングやスキッピングの影響を受けない¹¹⁾ことから、男女差以外には多型性が低い領域である可能性が高い。

アメロゲニンの Exon 領域を用いた性別判定法は、これまで我々が発表した2つの論文のみである^{12, 13)}。これらの論文ではいずれも Exon2 が分析されているが、この領域の男女差は3塩基のみである。塩基配列の男女差がより大きい領域を分析すれば、さらに特異性の高い男女の判別が期待できる。

また、これらの研究では判定に用いた PCR 産物の長さが 50 から 60 bp であった。この長さは分解が進んだ試料にも十分対応可能なものであるが、古人骨など特に分解が進んだ試料の場合、試料中の DNA 断片長のピークが 50 bp 以下になる場合もある¹⁴⁻¹⁷⁾ことから、PCR 産物の長さをさらに短く設定できる領域を選定することが望ましい。

本研究では、Exon 1、2、7 の性差の程度と遺伝的保存性を調べた。そして、保存度が高く性差の大きい領域を用いることで、極度に劣化したサンプルにも適用可能な新しい性判定法を開発した。

2. Selection of the target region

先に述べたように、DNA 型鑑定による性別判定を確実なものとするためには、男女差以外の多型が可能な限り少ない座位を用いる必要がある。そこで、ヒトアミロゲニン遺伝子の Exon 1、2、7 の中で、どれが特に保存的かを調査するため、各々の全長配列について、BLAST : Basic Local Alignment Search Tool を用いた塩基配列の相同性検索を行った¹⁸⁻²⁰⁾。

その結果、Exon 1 では、AMEL-X では霊長類の *Pan paniscus* (一般名 : ボノボ, アクセッション番号 XM_003805678.2) のみならず、*Theropithecus gelada* (一般名 : ゲラダヒヒ, アクセッション番号 XM_025372335.1 他) など、霊長類以外の

様々なサルとも共通の配列を持ち、AMEL-Yでも *Pan troglodytes* (一般名：チンパンジー, アクセッション番号 NM_001102459.1 他)との完全な配列一致がみられた(Query Cover : 100 %, E-value : 6e-19, Per. Ident : 100.00 %)。CLUSTALWによるアライメントでも、AMEL-Xの Exon 1 ではテナガザル科や系統的に離れたキツネザル科、ガラコ科との塩基置換が見られるが配列の保存性は高く、AMEL-Yの Exon 1 でも保存的である (Fig. 1: 英文論文 Supplementary Fig. 1)。

次いで Exon 2 では、Exon 1 と同様に、AMEL-X では霊長類の *Pan paniscus* (一般名：ボノボ, アクセッション番号 XM_003805678.2) や、*Hylobates moloch* (一般名：ワウワウテナガザル, アクセッション XM_032756568.1)など、霊長類以外の様々なサルとも共通の配列を持っていた(Query Cover : 100 %, E-value : 2e-24, Per. Ident : 100.00)。しかし、AMEL-Y では完全な配列一致のある霊長類はいなかった。

さらに Exon 7 では、AMEL-X では霊長類の *Pan paniscus* (一般名：ボノボ, アクセッション番号 XM_003805678.2) のみで完全な配列一致が見られた (Query Cover : 100 %, E-value : 8e-52, Per. Ident : 100.00 %)。AMEL-Y では *Pan troglodytes* (一般名：チンパンジー, アクセッション番号 NM_001102459.1 他) のみで完全な配列一致が見られた (Query Cover : 100 %, E-value : 4e-55, Per. Ident : 100.00 %)。この結果から、遺伝的保存性は Exon 1、7、2 の順番で高いものと考えられた。

各 Exon の全長における男女差を比較すると、Exon 1 で 56 塩基中 13 塩基、Exon 2 で 66 塩基中 3 塩基、Exon 7 では全長で 6 塩基 AMEL-Y が長く、10 塩基の男女差があった。本研究では、保存性の高さや男女差の大きさを兼ね備える Exon 1 領域を解析領域として選定した (Table 1: 英文論文 Table 1)。

ヒト集団内における Exon 1 領域の配列の保存性を確認するために、dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) にて AMEL-X および AMEL-Y に見られる既知の single nucleotide variant (SNV) を探索し (Fig. 2: 英文論文 Supplementary Fig.2)、Exon 1 にみられる変異のヒト集団でのアレル頻度を調べた。AMEL-X と AMEL-Y の Exon 1 に見られる SNV はそれぞれ 9 箇所と 2 箇所見られ、いずれの SNV も alternative allele の頻度は極めて低かった (Table 2: 英文論文 Supplementary Table 1)。以上より、これらの SNV はヒト集団内ではほぼ見られず、本論文での解析への影響は限定的であると考えられた。さらに、dbSNP では当該領域に insertion あるいは deletion は認められなかった。

3. Materials and Methods

3.1. Primer design

Exon 1 領域から、特異性を高めるためプライマー配列内に塩基配列の男女差が可能な限り大きくなる領域を選び、プライマーを設計した (Table 3: 英文論文 Table 2)。増幅産物の鎖長は AMEL-Y : 45 bp、AMEL-X : 48 bp と短く設計し、

高度に断片化した試料における増幅効率を向上させた。

3.2. *PCR conditions and detection of PCR products*

PCR 反応系の総量は 10 μ L とし、反応液の組成は 1 \times QIAGEN Multiplex PCR kit (QIAGEN, Hilden, Germany)、各プライマー 0.2 μ M、鋳型 DNA とした。

反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast (TaKaRa, Otsu, Japan)を用い、温度条件は、95 $^{\circ}$ Cで 15 分の酵素活性化後、94 $^{\circ}$ Cで 30 秒、64 $^{\circ}$ Cで 5 分を 5 サイクル、94 $^{\circ}$ Cで 30 秒、64 $^{\circ}$ Cで 90 秒を 35 サイクル行った。最終伸長反応は 72 $^{\circ}$ Cで 3 分行った。各反応は Ramp Speed > 2.5 $^{\circ}$ C/秒で行った。

PCR 産物の全量を 2 μ L の 6 \times ローディングバッファー (TaKaRa)と混合し、このうち 2 μ L を用いて、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(10%T, 5%C, 1 \times TBE 含有/TEFCO, Tokyo, Japan)を行った。電気泳動装置は STC-808 (TEFCO)を用い、200 V (Constant voltage)、泳動時間は約 45 分で行った。電気泳動後、SYBR[®] Green I Nucleic Acid Gel Stain (TaKaRa)にて PCR 産物を 36 分間の染色後、青色光の照射で蛍光的に可視化した。

3.3. *Sensitivity measurement*

市販の男女 DNA[男性: 2800M Control DNA(Promega, Madison, WI, USA)、女性: Human Genomic DNA: Female(Promega)]を使用し、本法の感度を測定した。

DNA の濃度及び純度 260/280 は、分光光度計 Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific) で測定した。DNA は DNase/RNase-free distilled water(Thermo Fisher Scientific)を用いて 1 ng/ μ L に希釈した。次いで、それぞれ男女の DNA を 100 pg/ μ L から 0.78 pg/ μ L に段階的に 2 倍希釈し、two times duplicate で感度測定を行った。コンタミネーションの有無は Negative PCR control を同時に判定することを確認した。

3.4. Comparison experiment with GF

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、DNA 型鑑定に広く用いられている GF との比較検討を行った。検討には、市販の単一男性由来 DNA(2800M Control DNA; Promega)を用い、100 pg/ μ L から 0.78 pg/ μ L まで DNase/RNase-free distilled water(Thermo Fisher Scientific)にて段階的に 2 倍希釈したものを two times duplicate で測定した。男性の判定は、Y 染色体由来アメロゲニン遺伝子の検出で決定し、2 回のいずれも検出できた最少濃度を検出感度とした。コンタミネーションの有無は、各実験において Negative PCR control を同時に判定することで確認した。GF の PCR 条件は、微量試料解析用にメーカーが推奨しているプロトコルを用いた。PCR 装置は、TaKaRa PCR Thermal Cycler Fast(TaKaRa)を用いた。SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)でキ

ャピラリー電気泳動を行った。製造元のアドバイスに従い、当研究室でのバリデーションで分析閾値とした 100RFU 以上の蛍光強度を持つピークが検出された場合、ピークの検出と判断した。

また、高度に変性した微量 DNA に対する有用性を検証するため、北海道伊達市有珠モシリ遺跡の 18 号墓から出土した 11 体の縄文晩期人骨(約 2500 年前)について、本法および GF で性別を判定して結果を比較した。まず、これらの人骨から高橋ら²¹⁾の方法に従って、側頭骨岩様部を試料として DNA を抽出した (Table 4: 英文論文 Supplementary Table 2)。これらの人骨から抽出した DNA 溶液 2 μ L をテンプレートとして用い、PCR、電気泳動、および検出の条件は感度比較実験の場合と同様とした。two independent assay を行って結果の再現性を確認し、negative extraction and negative PCR controls も古人骨試料と共に分析した。これらの解析においては、Y 染色体関連アレルに再現性があれば男性とした。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。

なお、古人骨を用いた研究は、山梨大学医学部倫理委員会の承認を得ている (承認番号 2454)

Results

4.1 Sensitivity measurement

希釈実験を行う前に、各 DNA 溶液の性別を本法で判定できるかどうかを確認した (Fig. 3: 英文論文 Fig. 1)。本法を用いた性別判定にて、再現性のある男性の判定の可能だった最低濃度は 12.5 pg であり、X および Y 染色体由来アメロゲニン遺伝子が共に検出される最低濃度は 25 pg という結果となった。再現性のある女性の判定可能だった最低濃度は、12.5 pg であり、6.25pg あれば検出の可能性を認めた (Table 5, 6: 英文論文 Supplementary Table 3, 4)。

4.2 Comparison with GF

本反応系と GF の男性 DNA 希釈実験の結果を Table 5, 7 (英文論文 Supplementary Table 3, 5) に示す。我々の反応系は、GF と同等の検出感度を有していることが分かった。

4.3 Sex determination of ancient skeletons

我々の方法では、調査したすべての古人骨で性別を判定することができた (Fig. 4: 英文論文 Fig. 2)。その結果は、形態学的分析から得られた結果と一致していた。しかし、11 個体のうち、GF によって性別が決定されたのは 4 個体 (18B、18C、18D、18G) だけであった (Fig. 5: 英文論文 Supplementary Fig. 3)。

3. Discussion

アメロゲニン遺伝子を用いた性別判定は、法医実務や自然人類学的研究にも幅広く使用されている。かつて最も普及していた DNA 分析による性別判定法は Sullivan³⁾らによって開発されたアメロゲニン遺伝子の Intron 領域を用いた方法である。これらは X 及び Y 染色体に対し、それぞれ 106 bp、112 bp のアンプリコンを生成する。このアメロゲニン遺伝子 Intron 領域を性別判定に利用している STR キットは現在数多く市販されている。例えば Promega 社の PowerPlex® Fusion 6C system、Thermo Fisher Scientific 社の GlobalFiler™ PCR Amplification Kit 等がある。これらのキットにおける性別判定用の PCR 産物は、前者が AMEL-X : 89 bp、AMEL-Y : 95 bp、後者が AMEL-X : 99 bp、AMEL-Y : 105 bp のように、Sullivan³⁾らのものより短い。よって、断片化していることの多い法医学的試料にも対応可能になっている。しかし、先に述べたように古人骨等の高度変性試料では、試料に含まれる DNA 断片の長さは 50 bp 以下が主体となる場合もある¹⁴⁻¹⁷⁾。つまり、このような高度断片化試料については、従来の方法では性別の判定が困難である。今回設計したプライマーセットは増幅産物の鎖長を AMEL-X では 48 bp、AMEL-Y では 45 bp と、これまで発表されているどの性別判定用反応系よりも短く設計することによって、古人骨試料の様に高度に断片化した DNA についてもより高い確率で正確な性別判定が可能になった。

市販の男女の DNA を用いた性別判定の結果、増山ら¹²⁾と同程度の感度で、男女とも 12.5 pg で正確な性別判定が可能であることが示された。本法で用いるプライマーは、その配列内部に数塩基以上の性差があるため、プライマーのミスアニーリングの可能性は、これまでの研究で用いられてきた APLP プライマーよりも低いと予想される^{12,13)}。また、標的領域が非常に安定していることもあり、本手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。しかし、本法は高度に保存された領域を標的としているため、ヒトと動物の識別には使用できない。

また、必要な DNA 量については、本法と GF に差はなかった。しかし、古人骨を用いた分析では本法の成功率は GF と比較してかなり高かった。これは、本法の方が PCR 産物の鎖長が短いことに明らかに起因すると考えられた。

本法は GF と同等以上の感度を持ち、かつ高い安定性および断片化試料に対する強さがあることから、法医学および自然人類学的研究に貢献できると考える。

References

- [1] H.R. Dash, N. Rawat, S. Das, Alternatives to amelogenin markers for sex determination in humans and their forensic relevance, *Mol. Biol. Rep. Mar*; 47(3) (2020) 2347–2360. doi: 10.1007/s11033-020-05268-y. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31983014.
- [2] Y. Nakahori, O. Takenaka, Y. Nakagome. A human X-Y homologous region encodes “amelogenin”, *Genomics*. 9(2) (1991) 264–269. doi: 10.1016/0888-7543(91)90251-9. PMID: 2004775.
- [3] K.M. Sullivan, A. Mannucci, C.P. Kimpton, P. Gill, A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, *Biotechniques*. 15(4) (1993) 636–638, 640–641. PMID: 8251166.
- [4] A. Akane, H. Shiono, K. Matsubara, Y. Nakahori, S. Seki, S. Nagafuchi, M. Yamada, Y. Nakagome, Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods, *Forensic Sci. Int.* 49(1) (1991) 81–88. doi: 10.1016/0379-0738(91)90174-h. PMID: 2032670.
- [5] H. Haas-Rochholz, G. Weiler, Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test, *Int J Legal Med.* 110(6) (1997) 312–315. doi: 10.1007/s004140050094. PMID: 9387013.
- [6] K. Drobnič, A new primer set in a SRY gene for sex identification, *International Congress Series*. 1288 (2006) 268–270. doi: 10.1016/j.ics.2005.08.020.
- [7] L. Laverde, 2013. Sex determination problems in forensic genetic analysis. *Forensic Sci. Int.* e350–e351. doi: 10.1016/j.fsigss.2013.10.178.
- [8] M. Steinlechner, B. Berger, H. Niederstätter, W. Parson, Rare failures in the amelogenin sex test, *Int. J. Legal Med.* 116(2) (2002) 117–120. doi: 10.1007/s00414-

001-0264-9. PMID: 12056519.

- [9] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA, *Annu. Rev. Genet.*; 38 (2004) 645–679. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143214. PMID: 15568989.
- [10] S. Pääbo, Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86(6) (1989) 1939–1943. doi: 10.1073/pnas.86.6.1939. PMID: 2928314; PMCID: PMC286820.
- [11] A. Veis, Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules, *Cell Mol. Life Sci.* 60(1) (2003) 38–55. doi: 10.1007/s000180300003. PMID: 12613657.
- [12] K. Masuyama, H. Shojo, H. Nakanishi, S. Inokuchi, N. Adachi, 2017. Sex Determination from Fragmented and Degenerated DNA by Amplified Product-Length Polymorphism Bidirectional SNP Analysis of Amelogenin and SRY Genes. *PLoS One*. 12(1), e0169348. doi: 10.1371/journal.pone.0169348. PMID: 28052096; PMCID: PMC5214517.
- [13] F. Saeki, N. Adachi, M. Yoneda, T. Suzuki, J. Sawada, T. Kakuda, K. Masuyama, H. Ozaki, T. Omori, Y. Hagihara, T. Nara,. Analyzing the Final Jomon human remains from the Nonomae shellmound, Ofunato City, Iwate Prefecture, *Anthropological Science (Japanese series)*. 124(1) (2016) 1–17 (in Japanese).
- [14] N. Adachi, H. Kanzawa-Kiriyama, T. Nara, T. Kakuda, I. Nishida, K. Shinoda, Ancient genomes from the initial Jomon period: new insights into the genetic history of the Japanese archipelago, *Anthropological Science*. 129(1) (2021) 13–22. doi: 10.1537/ase.2012132
- [15] K. Shinoda, H. Kanzawa-Kiriyama, T. Kakuda, N. Adachi, Genetic characteristics

of Yayoi people in Northwestern Kyushu-Ancient genome analysis of human skeletons excavated from Shimomotoyama Rock Shelter, Sasebo, Nagasaki Prefecture, Japan, *Anthropological Science (Japanese series)*. 127(1) (2019) 25–43 (in Japanese).

- [16] K. Shinoda, H. Kanzawa, T. Kakuda, N. Adachi, Mitochondrial DNA Analysis of Human skeletons of the Yayoi Period Excavated at Asahi Site, Kiyosu-shi, Aichi Pref, *Bulletin of the National Museum of Japanese History*. 228 (2021) 277–285.
- [17] H. Kanzawa, T. Kakuda, N. Adachi, K. Shinoda, Nuclear DNA Analysis of Human Bone of the Late Yayoi Period Excavated at Aoya-Kamijichi Site, Tottori-shi, Tottori Pref, *Bulletin of the National Museum of Japanese History*. 228 (2021) 295–307.
- [18] I. Ladunga, Finding homologs to nucleotide sequences using network BLAST searches, *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 3 (2002) 3.3. doi: 10.1002/0471250953.bi0303s00. PMID: 18792938.
- [19] M. Cameron, HE. Williams, Comparing compressed sequences for faster nucleotide BLAST searches, *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 4(3) (2007) 349–364. doi: 10.1109/TCBB.2007.1029. PMID: 17666756.
- [20] W.R. Pearson, An introduction to sequence similarity (“homology”) searching, *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 3 (2013) 3.1. doi: 10.1002/0471250953.bi0301s42. PMID: 23749753; PMCID: PMC3820096.
- [21] R. Takahashi, R. Koibuchi, F. Saeki, Y. Hagihara, M. Yoneda, N. Adachi, T. Nara, Mitochondrial DNA analysis of the human skeletons excavated from the Shomyoji shell midden site, Kanagawa, Japan, *Anthropological Science*. 127(1) (2019) 65–72. doi: 10.1537/ase.190307.

Table 1. アメロゲニン遺伝子 Exon 1 塩基配列

AMEL-X exon 1 (5'→3')				
AAAGGATCAA	GCATCCCTGA	GTTTCAAACA	GAAACTTGCA	CTGAATACAT
TCAAAG				

AMEL-Y exon 1 (5'→3')				
AGAGGACCAA	GCCTCCCTGT	GTAGCACAAA	GAAAGTTTCT	CTGAATATAT
TTAAAG				

56 塩基のうち 13 塩基に性差がある。性差のある塩基は太字のイタリック体で表示している。

Table 2. Variants observed in the target regions and their frequencies in populations

Study				ALFA project											gnomAD						TopMed	KOREAN population from KRGDB			
rsID	Position	Variation Type	Alleles	Total	European	African	African Others	African American	Asian	East Asian	Other Asian	Latin American 1	Latin American 2	South Asian	Other	Global	European	African	American	Ashkenazi Jewish	East Asian	Other	Global	KOREAN	
rs1301053489	Chr X: 11293418 (hg38)	SNV	A>T	4470 A=0.9980 T=0.0020	4462 A=0.9980 T=0.0020	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	0 A=0 T=0	8 A=1.0 T=0.0	104536 A=0.999971 T=0.000029	57307 A=0.99995 T=0.00005	31495 A=1.00000 T=0.00000	9368 A=1.0000 T=0.0000	2526 A=1.0000 T=0.0000	2261 A=1.0000 T=0.0000	1579 A=1.0000 T=0.0000			
rs1188807825	Chr X: 11293422 (hg38)	SNV	A>G	14050 A=1.00000 G=0.00000	9690 A=1.0000 G=0.0000	2898 A=1.0000 G=0.0000	114 A=1.000 G=0.000	2784 A=1.0000 G=0.0000	112 A=1.000 G=0.000	86 A=1.00 G=0.00	26 A=1.00 G=0.00	146 A=1.000 G=0.000	610 A=1.000 G=0.000	98 A=1.00 G=0.00	496 A=1.000 G=0.000										
rs2048027849	Chr X: 11293433 (hg38)	SNV	G>C																						
rs1482601683	Chr X: 11293438 (hg38)	SNV	A>C	14050 A=1.00000 C=0.00000	9690 A=1.0000 C=0.0000	2898 A=1.0000 C=0.0000	114 A=1.000 C=0.000	2784 A=1.0000 C=0.0000	112 A=1.000 C=0.000	86 A=1.00 C=0.00	26 A=1.00 C=0.00	146 A=1.000 C=0.000	610 A=1.000 C=0.000	98 A=1.00 C=0.00	496 A=1.000 C=0.000								264690 A=0.999996 C=0.000004		
rs1603028802	Chr X: 11293439 (hg38)	SNV	A>G																					2922 A=0.9993 G=0.0007	
rs890268618	Chr X: 11293441 (hg38)	SNV	C>T	14050 C=1.00000 T=0.00000	9690 C=1.0000 T=0.0000	2898 C=1.0000 T=0.0000	114 C=1.000 T=0.000	2784 C=1.0000 T=0.0000	112 C=1.000 T=0.000	86 C=1.00 T=0.00	26 C=1.00 T=0.00	146 C=1.000 T=0.000	610 C=1.000 T=0.000	98 C=1.00 T=0.00	496 C=1.000 T=0.000	104416 C=0.999971 T=0.000029	57226 C=0.99995 T=0.00005	31474 C=1.00000 T=0.00000	9366 C=1.0000 T=0.0000	2529 C=1.0000 T=0.0000	2247 C=1.0000 T=0.0000	1574 C=1.0000 T=0.0000	264690 C=0.999981 T=0.000019		
rs1769799369	Chr X: 11293447 (hg38)	SNV	C>G	10680 C=1.00000 G=0.00000	6962 C=1.0000 G=0.0000	2294 C=1.0000 G=0.0000	84 C=1.00 G=0.00	2210 C=1.0000 G=0.0000	108 C=1.000 G=0.000	84 C=1.00 G=0.00	24 C=1.00 G=0.00	146 C=1.000 G=0.000	610 C=1.000 G=0.000	94 C=1.00 G=0.00	466 C=1.000 G=0.000								264690 C=0.999996 G=0.000004		
rs2048028190	Chr X: 11293466 (hg38)	SNV	A>T	10680 A=1.00000 T=0.00000	6962 A=1.0000 T=0.0000	2294 A=1.0000 T=0.0000	84 A=1.00 T=0.00	2210 A=1.0000 T=0.0000	108 A=1.000 T=0.000	84 A=1.00 T=0.00	24 A=1.00 T=0.00	146 A=1.000 T=0.000	610 A=1.000 T=0.000	94 A=1.00 T=0.00	466 A=1.000 T=0.000										
rs2048028288	Chr X: 11293468 (hg38)	Indel	delG	10680 GG=1.00000 G=0.00000	6962 GG=1.0000 G=0.0000	2294 GG=1.0000 G=0.0000	84 GG=1.00 G=0.00	2210 GG=1.0000 G=0.0000	108 GG=1.000 G=0.000	84 GG=1.00 G=0.00	24 GG=1.00 G=0.00	146 GG=1.000 G=0.000	610 GG=1.000 G=0.000	94 GG=1.00 G=0.00	466 GG=1.000 G=0.000										
rs2054070290	Chr Y: 6873989 (hg38)	SNV	G>A													29887 G=0.99997 A=0.00003	16126 G=0.99994 A=0.00006	8531 G=1.0000 A=0.0000	3236 G=1.0000 A=0.0000	778 G=1.000 A=0.000	753 G=1.000 A=0.000	463 G=1.000 A=0.000			
rs2054070314	Chr Y: 6874021 (hg38)	SNV	G>A													29826 G=0.99993 A=0.00007	16126 G=1.00000 A=0.00000	8499 G=0.9998 A=0.0002	3218 G=1.0000 A=0.0000	769 G=1.000 A=0.000	754 G=1.000 A=0.000	460 G=1.000 A=0.000			

Table 3. 本研究で用いたプライマー配列

Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon length
Exon 1-X	Forward AAAGGATCAAGCATCCCTGAG	48 bp
	Reverse GTATTCAGTGCAAGTTTCTGTTGA	
Exon 1-Y	Forward AGAGGACCAAGCCTCCCTG	45 bp
	Reverse TTCAGAGAACTTTCTTTGTGCTAC	

性差のある塩基は太字の斜体で表示している。

Table 4. 実験に用いた 11 体の縄文人骨

Sample no.	DNA samples	Morphological sex
18A	Right temporal bone	Male
18B	Right temporal bone	Male
18C	Right temporal bone	Male
18D	Right temporal bone	Male
18E	Left temporal bone	Female
18F	Left temporal bone	Male
18G	Left temporal bone	Male
18H	Left temporal bone	Male
18I	Right temporal bone	Male
18J	Right temporal bone	Male
18K	Left temporal bone	Male

Table 5. 新規プライマーセットにて、[Male DNA: 2800M Control DNA (Promega)]

を使用した希釈系列実験。

	1 st		2 nd		3 rd		4 th	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
50 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
25 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
12.5 pg	+	+	-	+	-	+	-	+
6.25 pg	+	+	-	-	-	+	+	-
3.13 pg	-	-	-	-	+	+	-	-
1.56 pg	-	-	-	-	-	-	-	-
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	-	-

AMEL-X および AMEL-Y の安定した検出限界値を太字のイタリック体で表示している。

Table 6. 新規プライマーセットにて [Human Genomic DNA: Female (Promega)]を

使用した希釈系列実験。

	1 st		2 nd		3 rd		4 th	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
50 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
25 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
12.5 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
6.25 pg	+	-	+	-	-	-	-	-
3.13 pg	+	-	+	-	+	-	-	-
1.56 pg	-	-	+	-	-	-	-	-
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	+	-

AMEL-X の安定した検出限界値を太字のイタリック体で表示している。

Table 7. GlobalFiler™ PCR Amplification Kit にて [Male DNA: 2800M Control DNA

(Promega)]を使用した希釈系列実験。

	1 st		2 nd		3 rd		4 th	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
50 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
25 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
12.5 pg	-	+	+	+	+	+	+	+
6.25 pg	+	-	+	-	-	-	+	-
3.13 pg	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56 pg	-	-	-	-	-	-	-	-
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	-	-

AMEL-X および AMEL-Y の安定した検出限界値を太字のイタリック体で表示している。

Fig. 1.

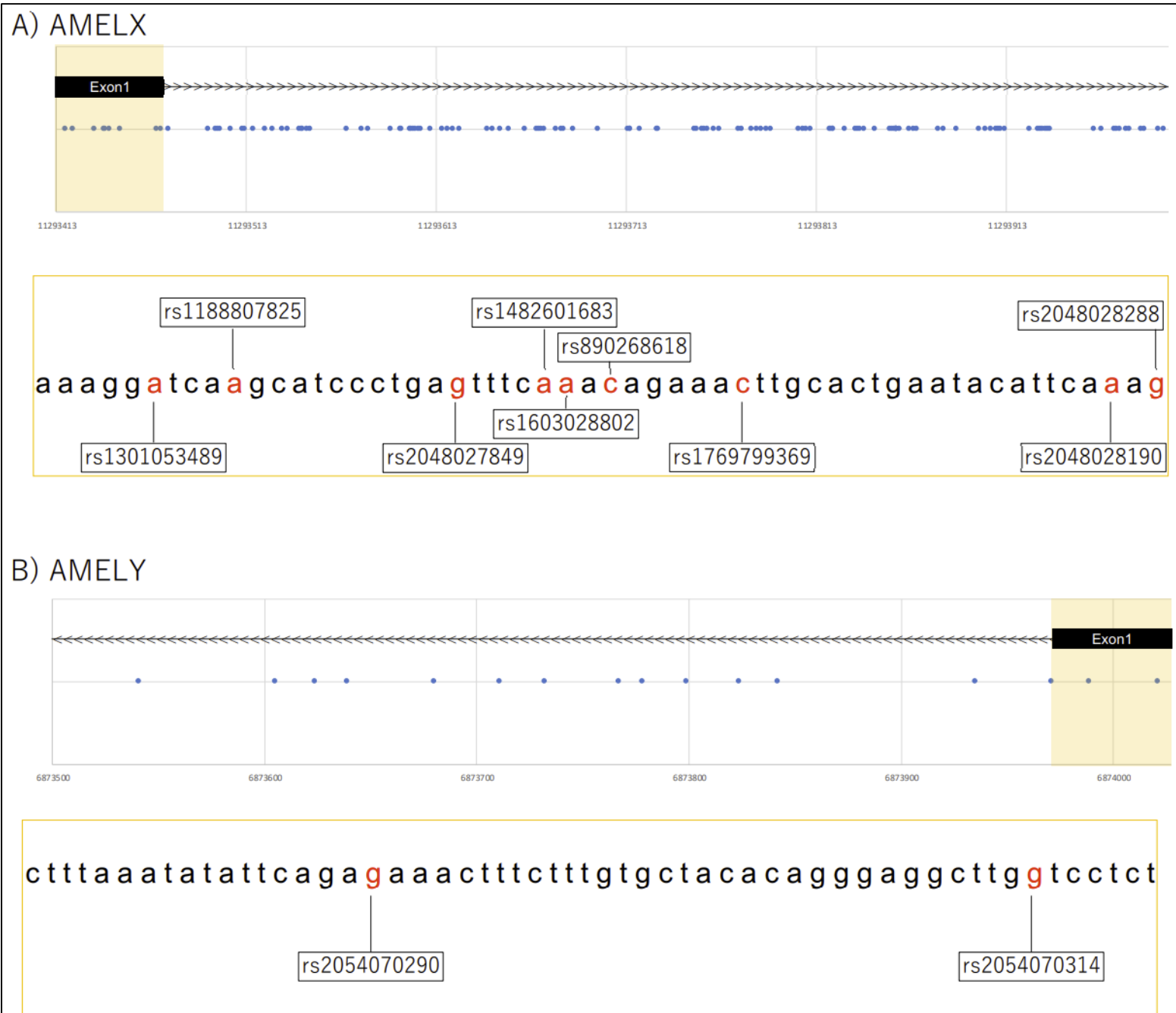
A) AMELX Exon1	
01. H_sapiens_AY694827.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
02. H_sapiens_AY694828.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
03. H_sapiens_AY694854.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
04. Pan_tro_AB091781.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
05. Pan_tro_AY694820.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
06. G_gorilla_XM_004063779.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
07. G_gorilla_XM_004063780.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
08. G_gorilla_XM_004063781.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
09. P_abelii_XM_024240707.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
10. P_abelii_XM_024240708.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
11. P_abelii_XM_024240709.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
12. H_moloch_XM_032756565.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
13. H_moloch_XM_032756567.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
14. H_moloch_XM_032756568.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
15. N_leucogenys_XM_003261017.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
16. N_leucogenys_XM_003261018.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
17. N_leucogenys_XM_003261019.1	AAAGGATTAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTGAAG
18. M_mulatta_XM_028841805.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAACAGAACTT-GCACTGAATACATTCAAAG
19. L_catta_AB091785.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGGTTTCAAGACAGAACTTACTCTGAATACATTCAAAG
20. O_garnettii_AB091787.1	AAAGGATCAAGCATCCCTGGATT-CAGACAGAACTT-GCTCTGAATACATTCAAAG
	***** ***** ** ** ***** * ***** **
B) AMELY Exon1	
01. H_Sapiens_NM_001364814.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
02. H_sapiens_NM_001143.2	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
03. Pan_tro_AB091782.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
04. Pan_tro_NM_001102459.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTAGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
05. H_moloch_XM_032756141.1	AGAGGACCAAGCCTCCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
06. M_mulatta_XM_028834403.1	--AGGACCAAGCCTCCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTTAAAG
07. C_imitator_XM_017518860.2	AGAGGATCAAGCCTCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTGAAAG
08. C_imitator_XM_017518861.1	--AGGATCAAGCCTCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTGAAAG
09. S_sciureus_AB091784.1	AGAAGACCAACCTCCTGTGTGCACAAAGAAAGTTTCTCTGAATATATTGAAAG
	* ** *** ** ***** ***** ***** *****

CLUSTALW による Exon 1 の配列アライメントの結果。

BlastN の結果では、*Macaca mulatta* と *Cebus imitator* の最初の 2 塩基が欠落して

いた。

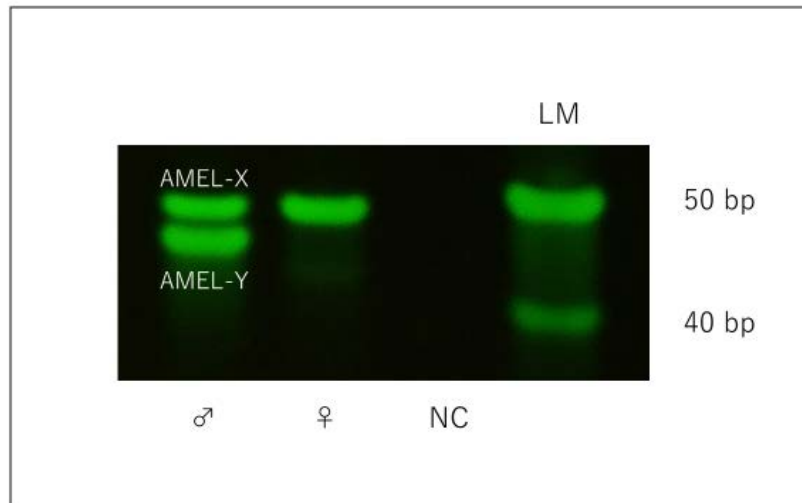
Fig. 2.



Exon 1 内の変異部位が報告されている。ヒト集団におけるこれらのアレル頻度

を示す。X 軸は染色体上の位置を示す。青い点は SNV を示す。

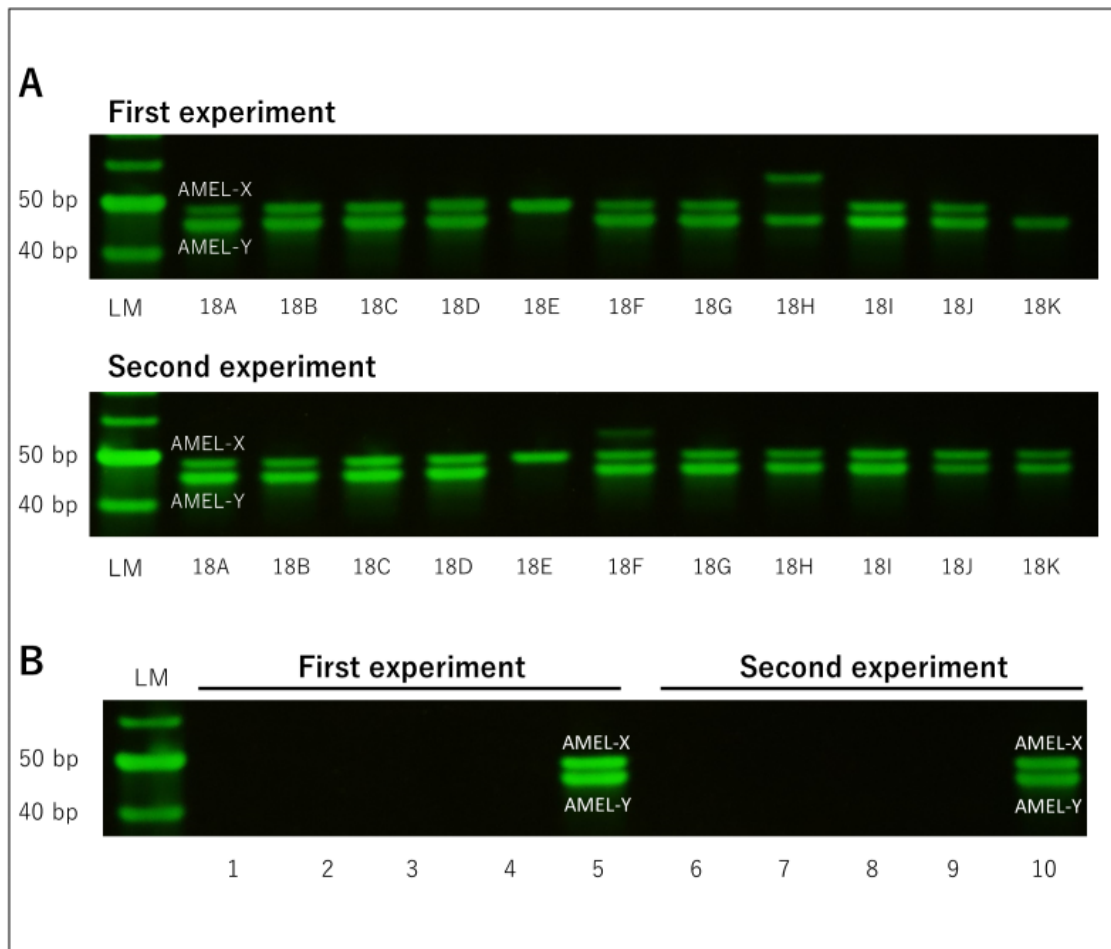
Fig. 3.



市販の男女 DNA 用いた我々の新しい方法による性別判定の結果。

LM は 10 bp の DNA ラダーマーカー (Thermo Fisher Scientific)、NC は Negative PCR control を示す。

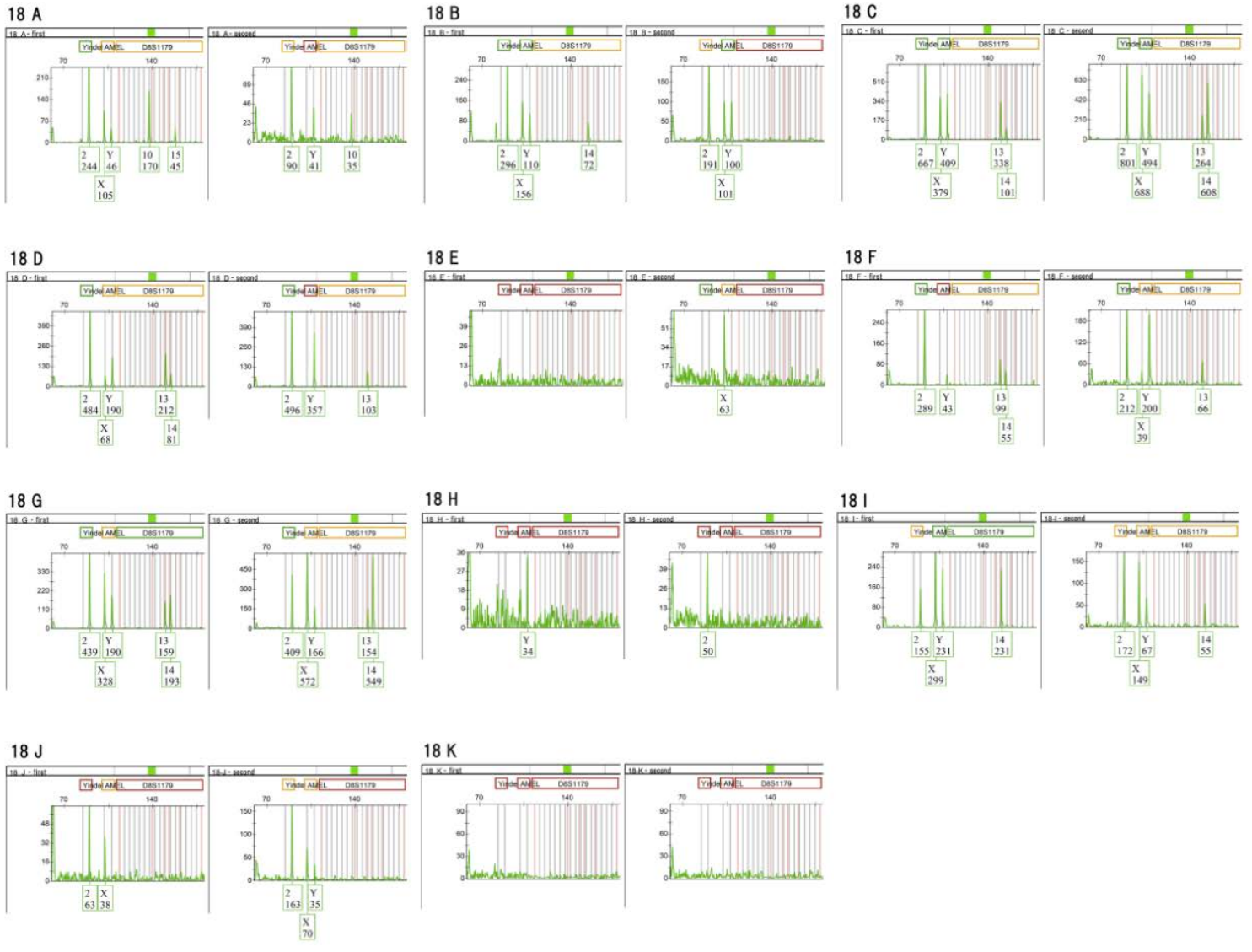
Fig. 4.



新しい手法による古代人骨の性別判定結果(A)。LM：10 bp の DNA ラダーマーカー (Thermo Fisher Scientific)。

古代人骨と同時に分析した control サンプルの結果(B)。1、6：サンプル 18A～18E の negative extraction。2、7：サンプル 18F、18J の negative extraction。3、8：サンプル 18K の negative extraction。4、9：Negative PCR control。5、10：Positive PCR control。

Fig. 5.



結果の再現性を確認するため、独立した2つのアッセイを実施した。11個体中4個体（18B, 18C, 18D, 18G）で性別判定に成功した。Y染色体関連対立遺伝子が再現性よく検出された場合（ $\geq 100\text{RFU}$ ）、そのサンプルは男性と判定した。

補足審査資料②

Highly sensitive sex determination method
using the exon 1 region of the amelogenin gene
(アメロゲニン遺伝子の Exon 1 領域を用いた
高感度性別判定法)

藤本 佳那

Comparative experiments using 1 cell

投稿論文中の比較では、我々の新しい性別判定法と GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (GF; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) には、正確な判定に必要な最少 DNA 量に差が見られなかった。検出感度の限界値を知るために、培養細胞から 1 細胞を単離し、これをテンプレートとして本法による性別判定を行えるか検討し、GF についても同様の実験を行い結果を比較した。培養細胞は、男性試料は肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 細胞、女性試料は子宮頸癌細胞である HeLa 細胞を用いた。

Materials and Methods

培養細胞を用いた実験系が問題なく行えることを確認するために、10 cm ディッシュに A549 細胞及び HeLa 細胞をコンフルエントになるように培養した。DNA の抽出は MonoFas®培養細胞 DNA 抽出キット VI (ANIMOS, Saitama, Japan) を使用した。DNA の濃度及び純度 260/280 は、分光光度計 Nano Drop 1000(Thermo Fisher Scientific)で測定したのちに、DNase/RNase-free distilled water(Thermo Fisher Scientific)を用いて 1 ng/μL になるように希釈した。さらに正確な濃度調整のために、Thermal Cycler Dice Real Time System Lite(TaKaRa, Otsu, Japan)にて Femto Human DNA Quantification Kit (ZYMO RESEARCH, Irvine, CA ,

USA) を用いてリアルタイム PCR 法による濃度測定を行った。実験は one time duplicate とし、濃度測定後、100 pg/ μ L から 0.78 pg/ μ L まで DNase/RNase-free distilled water(Thermo Fisher Scientific)にて段階的に 2 倍希釈を行った。

上記の希釈系列 DNA を用いて、培養細胞においても我々の方法による性別判定が行えるかどうか検討した。PCR および電気泳動の条件は Fujimoto et al. (2022)と同様とした。

次に、1 細胞を用いた実験を行った。10 cm ディッシュに 50 個程度となるように細胞懸濁液を希釈し培養した。顕微鏡を用いて目視にて細胞を確認し、ディッシュにマーキングした。細胞は FBS で洗浄した後、リキッドブローカーにて困った。ここに Fujimoto et al. (2022)の PCR 反応液 5 μ L を滴下して-80 $^{\circ}$ Cの冷凍庫で 5 分間静置した。その後、Dry Block Bath (AS ONE, Osaka Japan) 上で解凍した。この細胞含有反応液を新鮮な PCR 反応液 5 μ L が入った PCR チューブに加え攪拌し、PCR 増幅を行った。本法では各細胞において 50 回ずつ測定を行い、GF では各 10 回ずつ測定した。PCR、電気泳動、および検出の条件は、希釈系列実験の場合と同様とした。男性の判定は、Fujimoto et al. (2022)と同様に、Y 染色体由来アメロゲニン遺伝子の検出で決定した。希釈系列実験では、2 回のいずれも検出できた最少濃度を検出感度とした。コンタミネーションの有無は、各実験において Negative PCR control を同時に判定することで確認した。GF

の PCR 条件および電気泳動のプロトコールは、Fujimoto et al. (2022)と同じとした。製造元のアドバイスに従い、当研究室でのバリデーションで分析閾値とした 100RFU 以上の蛍光強度を持つピークが検出された場合、ピークの検出と判断した。

Results

本プライマーセットと GF の結果を Table 1.および Table 2.に示す。希釈系列実験の結果、本プライマーセットおよび GF にて安定して検出できる限界値は男性 50 pg、女性 25 pg となった。本プライマーセットにて、培養細胞 1 個での性別判定を 50 回行ったところ、その成功率は男性で 50 例中 24 例、女性で 50 例中 19 例であった。しかし、男性を女性と誤判定した例が 3 例、女性を男性と誤判定した例が 2 例あった。GF の成功率は男性 10 例中 1 例、女性 10 例中 3 例であり、性別の誤判定は認められなかった。

Discussion

希釈系列実験では、本プライマーセットおよび GF にて安定して正確な性別判定が行える限界値は男性 50 pg、女性 25 pg と同等であった。これ以下の濃度では、両者ともに性別の誤判定が生じる場合があった。市販の DNA を用いた場合と比べて検出感度が低下しているが、これは培養細胞故の DNA の変性が関与

している可能性があるものと推察された。

1細胞からの性別判定において、本法では男性の A549 細胞を用いた実験で 50 例中 3 例、女性の HeLa 細胞を用いた実験では 50 例中 2 例の誤判定がみられた。一方、GF を用いた性別判定では、どちらの細胞を用いた実験においても誤判定された例は無かった。ただし、1細胞からの性別判定は、本法では 50 例行っているが、GF では 10 例のみである。今回の実験において、本法と GF とで実験数に差が生じた理由は、COVID-19 の流行で海外からの試薬が迅速に入手できなかったこと、また協力機関も同様に試薬の入手が困難であり、限られた数のみの試薬提供であったためである。GF における実験数が本法の 1/5 であることから、数を増やすと誤判定が生じる可能性が高い。なぜなら、希釈実験の低濃度試料で誤判定が生じているからである (Table 1.参照)。性別判定の成功率自体は本法が GF を上回っていることから、極端に DNA 量の少ない試料における性別判定については、本法が GF より適しているものと考えられた。

Table 1. 培養細胞を用いた希釈系列実験。

A: A549 を用いた希釈系列実験。

	新規プライマーセット				GF			
	1 st		2 nd		1 st		2 nd	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
50 pg	+	+	+	+	+	+	+	+
25 pg	+	-	+	+	+	-	+	+
12.5 pg	+	-	+	-	+	+	+	-
6.25 pg	+	+	+	-	+	-	+	-
3.13 pg	-	-	-	-	+	-	+	-
1.56 pg	-	-	-	-	-	-	-	+
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	-	-

黄緑：AMEL-X および AMEL-Y の安定した検出限界値。

赤：誤判定。

B: HeLa を用いた希釈系列実験。

	新規プライマーセット				GF			
	1 st		2 nd		1 st		2 nd	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
100 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
50 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
25 pg	+	-	+	-	+	-	+	-
12.5 pg	-	-	+	-	-	-	+	-
6.25 pg	+	-	+	-	+	-	-	-
3.13 pg	+	-	-	-	+	-	+	-
1.56 pg	-	-	-	-	+	-	-	-
0.78 pg	-	-	-	-	-	-	-	-

黄緑：AMEL-X の安定した検出限界値。

AMEL-Y はいずれも検出されていない。

Table 2.1 細胞を用いた実験

AMEL-X および AMEL-Y の検出の内訳

	A549		HeLa	
	New Primer set	GF	New Primer set	GF
AMEL-X : + AMEL-Y : +	20/50	0/10	0/50	0/10
AMEL-X : + AMEL-Y : -	3/50	0/10	19/50	3/10
AMEL-X : - AMEL-Y : +	4/50	1/10	2/50	0/10
AMEL-X : - AMEL-Y : -	23/50	9/10	29/50	7/10

性別の誤判定が生じた場合は赤太字斜体で表記した。