

1. 序論

個人識別は、身元不明屍体を扱う犯罪捜査にとって重要な情報であり、法医学分野の中核の一つである。Jeffreys が DNA フィンガープリント法^{1,2}を用いて以来、点変異多型分析^{3,4}、シングルローカス VNTR 法^{5,6}といった DNA 解析法を応用したさまざまな個人識別法が開発されてきた。また、PCR^{7,8}の開発は少量の試料からの DNA 抽出を可能とし、わずかな試料からの分析を可能とした^{9,10}。しかし、法医学分野で得られる試料から DNA 解析を行うにあたり、最も問題になるのはその正確さであり、陳旧化し、外部からの影響を受けて変性・変化した微量な試料から、いかに精度の高い DNA 解析を行うかということは重要な命題である。

特に硬組織においてはミトコンドリア DNA (以下 mtDNA) が非常によく保存され、増幅率が高いことはすでに知られている。それは mtDNA が核 DNA より変性しにくいこと、ひとつの細胞に数百～千コピー存在すること、特に骨格筋で多量に存在すること等が理由としてあげられる。1981 年に Anderson らが初めて mtDNA の全塩基配列を報告した¹¹。しかし、mtDNA はその変異率が核 DNA より 5～10 倍早いことで知られており¹²、その変異率は 100 万年で 2～4%の塩基配列に達する。さらにその変異は mtDNA の D-loop と呼ばれる、非コード領域に集中していることも報告されている¹³。それはすなわち、mtDNA の解析、特に D-loop の解析を行うことにより精度の高い個人識別を行うことができることを示唆している。さらに、同一人種間において mtDNA 高変異部位の複数の遺伝子座位で共通の変異パターンがあることも報告されている¹⁴。人種の同定は国際化する犯罪社会においても十分応用できると考えられる。しかし、実際に mtDNA を個人識別に応用するには、更に多数のデータベースの比較・検討が必要と思われる。

また、ミトコンドリア異常が様々な疾患を引き起こすことは知られているが、その解明には mtDNA 変異を含め、更なる基礎分野の研究が必要である。ミトコンドリア病の概念もいまだ確立されたものはなく、核 DNA 異常や染色体異常が原因とされながらも mtDNA との関連が示唆されている疾患もある。

すなわち、mtDNA の塩基配列変異を健常群及び各疾患群において解析することは、法医学分野のみならず人類学、臨床医学等の分野においても重要なことである。

2. 背景

2.1. ミトコンドリアの構造と機能

ミトコンドリアは人体の全ての正常細胞に存在し、その生存を維持する上で必要なエネルギーを生産する細胞内小器官である¹⁵。その形態は存在する臓器、器官の細胞によって異

なるが電子顕微鏡において、およそ $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ の顆粒状として観察される¹⁶。

個々のミトコンドリアは外膜と内膜の二重膜からなり、内膜は迷路状にヒダを持つクリステを形成している¹⁷。すなわち内部は膜間部とマトリックスと呼ばれる部分に分けられており、ここにおいてエネルギーが合成されている。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって高エネルギー化合物である ATP を合成し、細胞へ生体エネルギーを膜を介して輸送している。そのためミトコンドリアはエネルギー消費が多い臓器、例えば脳、心、骨格といった場所に多量に存在する^{15,18}。心筋細胞におけるミトコンドリアの占める割合は全細胞中の 30%である¹⁵。ミトコンドリアはエネルギー代謝以外にもアンモニア代謝¹⁹、Ca 濃度調節²⁰等にもかかわっている重要な器官であり、最近ではアポトーシスとの関連も示唆されている²¹。さらにミトコンドリアはそれ自身 DNA を有しており²²、数種の rRNA や tRNA が翻訳される。しかし、ミトコンドリア自体の機能の維持にはそれだけでは不十分であり、電子伝達系の蛋白複合体や輸送系キャリアーに核遺伝子がエンコードする蛋白の供給を必要とする¹⁸。

2.2. ヒトミトコンドリア DNA

2.2.1. 特徴

mtDNA の特徴は母系遺伝^{23,24}とマルチコピー²⁵、そしてその変異率の高さ¹²に集約される (Figure 1)。

mtDNA は母からのみ継承される母系遺伝である。それは精子が卵に受精したときに精子中の mtDNA が排除されるためである。受精前の精子には約 50~100 分子が、主にその頭部に存在している²⁶。しかし、卵には $10^5\sim 10^6$ といった数千倍から数百万倍の mtDNA が含まれており²⁷、たとえ精子の mtDNA が混入したとしてもそれは卵 mtDNA の 1%にも満たないが、そのような量的な比率の問題ではなく、受精後排除される機構が働いて、mtDNA の母系遺伝は成立している。

mtDNA は個々のミトコンドリアに多数コピー存在する。ミトコンドリア自体がひとつの細胞に 100~1000 個ほど存在するので、1細胞あたり数千コピーも存在することになる²⁵。このため、遺伝子情報としては全体のわずか 0.0005%である mtDNA が、総量としては全 DNA の 0.5%にまで達する。一般にこれらマルチコピーの mtDNA は全て同じ遺伝情報を有し、この状態をホモプラスミー²⁸という。これに対し変異型 mtDNA が混在する状態をヘテロプラスミー^{29,30,31}という。

mtDNA は突然変異率が核 DNA の 5~10 倍と推定されている¹²。これは mtDNA が内外より酸化的障害を受けやすいこと、修復機構が脆弱であること、また突然変異が速やかに定着しやすい機構が存在すること等が考えられている。血縁関係のない 2 人のヒトの mtDNA の塩基配列の違いは平均 0.4%であるという報告がある^{32,33}。

2.2.2. 構造

mtDNA は電子顕微鏡において、ミトコンドリア内にある DNA 様線維として 1960 年代に発見された³⁴。mtDNA はミトコンドリア内のマトリックスに存在し、その内膜に付着している³⁵。

ヒト mtDNA は 2 本鎖のスーパーコイル状の閉鎖環分子で³⁶、およそ $4.5\sim 5\mu\text{m}$ ³⁷である (Figure 2)。その塩基は 16,569bp であり、核 DNA の 20,000 分の 1 しかない。しかし、mtDNA は 37 種類の遺伝子をコードしており、非常に密に配列されている¹¹。イントロンは全く存在しない。非コード領域は全体の 10% 以下の約 1.1kbp であり、遺伝子は存在しないが、mtDNA の複製・転写を制御する部分がありコントロール領域と呼ばれる^{38,39}。

mtDNA を構成する 2 本鎖はその組成に極端な違いがある。分子量の違いにより、一方はアデニン(A)、グアニン(G)といったプリンが多く重鎖 (H 鎖)、もう一方は、チミン(T)、シトシン(C)といったピリミジンが多く軽鎖 (L 鎖) と呼ばれる¹¹。このように mtDNA は厳密には二重鎖であるが、コントロール領域内に重鎖が 1 本鎖となったディスプレイメント・ループ(D-loop)という小さな部分があり 3 番目の鎖としてみなされる¹³ (後述)。

2.2.3. 遺伝暗号

37 遺伝子のうち、軽鎖はわずか 9 個の遺伝子をコードし、残りの 28 遺伝子は重鎖がコードしている。重鎖は 2 つのリボソーム RNAs(rRNA)、14 の転移 RNAs(tRNA)、12 のポリペプチドが転写され、軽鎖からは 8 つの tRNAs と 1 つのポリペプチドが転写される¹¹。

mtDNA の遺伝暗号は 64 のコドンをつた 22 個の tRNAs によって独自に認識している (Table 1)。すなわち、ひとつの tRNA が複数のコドンを認識している。8 個の tRNA は 3 番目の塩基のみ異なる 4 種類のコドンを認識し、14 個は最初の 2 つが同じで 3 番目はプリンかピリミジンかを認識する。つまり、 $(8\times 4)+(14\times 2)=60$ のコドンを認識し、残りの 4 つは終止コドンとして働く。この理由にはメチオニン tRNA を除く全てのアンチコドンの 1 番目の塩基は U か G であり、この G-U ゆらぎ結合によって 2 種類のコドンを認識していることが考えられる。このように、ミトコンドリアは遺伝暗号に自身の多様性を含んでいることが知られている。

2.2.4. コントロール領域

プロリン tRNA 遺伝子とフェニルアラニン tRNA 遺伝子の間の約 1.1kbp の非コード領域をコントロール領域という。この領域は mtDNA の複製・転写を制御するため、そう呼ばれているが、さらに多くの変異が見られることでも知られている。特に種ごとの相同性は

ほとんど認められない。

コントロール領域の下流付近に重鎖複製開始点 (O_H) があるが、その O_H とプロリン tRNA との間に短い DNA が L 鎖と相補的に存在し、H 鎖が 1 本鎖となっていることによって 3 本鎖構造をとる領域があることが知られている。この領域を displacement loop (D-loop) といい、ヒトは長さの異なる数種類の D-loop 構造をとりうるということが知られている³⁹。

2.2.5. 転写・複製

mtDNA は H 鎖、L 鎖にひとつずつ複製開始点をもち⁴⁰、それぞれ重鎖複製開始点 (O_H)、軽鎖複製開始点 (O_L) と呼ばれる^{41,42,43}。mtDNA 複製は O_H より L 鎖を鋳型として時計回りに開始される。約 3 分の 2 周し O_L に到達すると、L 鎖の複製が反時計回りに始まる。両鎖の複製が完了した時点でトポイソメラーゼにより 2 つに分断される。

mtDNA においては複製・転写を一連の流れとして捉える必要がある。 O_H の上流には L 鎖の転写開始点 (LSP) 及び H 鎖転写開始点 (HSP) がそれぞれ 1 つのみ存在している。転写調節因子 (mtTFA) が LSP に結合すると、mtRNA Pol. によって転写が始まる。やがてコントロール領域下流付近の CSB 付近において親 H 鎖 DNA と置き換わり、RNA-DNA ハイブリッドが形成される。これが RNaseMRP によって切断され RNA プライマーとなり、DNA Pol. が DNA を伸長していく (Figure 3)。この H 鎖伸長は約 700bp 下流で停止し、その部分だけ一本鎖の親 H 鎖を持つ 3 本鎖構造となる。この部位を D-loop と呼ぶ⁴⁴。

また、LSP からの転写産物は一続きの長い多因子転写物として生成される (一次転写物)。これはその後切断され mRNA と rRNA はポリアデニル酸添加酵素によりポリ A が付加され最終的転写物となる。

2.2.6. D-loop

D-loop とは 3' 末端がプロリン tRNA 遺伝子の上流、16104-16106bp に存在し、5' 末端がフェニルアラニン tRNA 遺伝子の下流に存在する約 700bp の部分である (Figure 4)。D-loop はいくつかの特徴付けられた部位に分けられている。D-loop 上流には ETAS (extended termination associated sequence) 1 及び ETAS2 と呼ばれる、複製・転写の調節に関係している部分が存在している。その 2 つの ETAS の間には約 100bp の IS (insertion sequences) と呼ばれる、D-loop の中でも特に変異が多く報告されている部位が存在する^{45,46}。下流付近には CSB (conserved sequence block) と呼ばれる、変異にとんだ D-loop のなかでも例外的に種属をこえて相同性の高い部分が 3 箇所認められ、それぞれ CSB I、II、III と名づけられている⁴⁷。この CSB 領域は前述のとおり、H 鎖の複製開始にかかわっていると考えられている。

2.2.7. HV 領域

D-loop 領域は mtDNA のなかでも変異率が 10 倍と集中している⁴⁸。法医学分野における個人識別、また人類学における塩基置換速度の分子時間への応用等にはこの部位の解析が非常に重要である。そこで多数散見される変異を HV (hypervariable region) 1、HV2 領域として特徴づけ、多型解析がなされている⁴⁹。HV1 は 1993 年に Wakeley が命名したもので 16024-16365bp 付近⁵⁰、HV2 は 1996 年に Miller が命名したもので 73-340bp 付近である⁵¹。最近では 2000 年に Lutz が命名した HV3 (438-574bp 付近) についても検討され始めている^{52,53}。

2.3. ミトコンドリア DNA 異常

最初に報告された mtDNA 異常は欠失であった^{54,55}。その後、点変異、重複といった mtDNA の質的変異が多数発見されたが、その病態には量的異常が密接にかかわっていることが次第に明らかにされてきた⁵⁶。つまり mtDNA の質的異常が一概にミトコンドリア病を意味するものではないということである。さらに、質的異常が無くても mtDNA の欠乏状態により引き起こされる病態が存在することもわかってきた⁵⁷。さらには、mtDNA 複製に関連した核 DNA 異常によるミトコンドリア病も判明してきており⁵⁸、詳細は今後の研究がまたれる。

2.3.1. 点変異、欠失・重複

現在 100 以上の mtDNA 病的変異が報告されている⁵⁹(Figure 5)。MELAS(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)の 3243A→C 点変異⁶⁰、慢性進行性外眼筋麻痺症候群(CPEO)の欠失・重複等である^{55,56}。しかし、この点変異を持つ患者の母親の mtDNA を調べると、同様の変異を持つにもかかわらず発病していない例も報告されており、この点変異の存在が、必ずしも発病を意味するものではないことが知られている。

欠失のメカニズムに関しては slipped mispairing 説が考えられている⁶¹。mtDNA 複製の際に 1 本鎖になった DNA の繰返し配列部分で組換えが起こり、欠失部分が生じるというものである。しかし、これだけで全ての欠失を説明できるわけではない。

2.3.2. ヘテロプラスミー

ミトコンドリアは通常、同一細胞・組織内には単一の mtDNA が存在する(ホモプラスミー)が、2 種類以上の mtDNA が共存することがあり、これをヘテロプラスミーと呼ぶ⁶²。

mtDNA 変異が原因とされている疾患においても、ヘテロプラスミーがほぼ全てに認められることが確認されている。正常 mtDNA と変異 mtDNA との割合は決して病態と相関しないこともわかっている。

そもそも、1 細胞内に数千コピー存在する mtDNA が全て同一のものに保たれていることが驚くべきことである。この理由を説明するものにボトルネック効果がある^{63,64}。卵形成期において、数十万の mtDNA をもつ受精卵が受精後その数を減らし、胎児始原生殖細胞の段階では 100~500 コピーまで減少する。すなわち、ここで単一分子の mtDNA に選択されたのち増幅が起こるのではないかと考えられている。ヘテロプラスミーはこの際に不完全な入れ替えであったため生じると想像できる。しかし、次第にホモプラスミーに回復される過程、または疾患に関する変異が選択される過程等においては未だ不明な点も多い。

2.3.3. 欠乏状態

mtDNA 欠乏状態には薬物による後天的なもの、核 DNA 異常による先天的なものがある。AIDS 治療薬の idothymidine(AZT)がミトコンドリアパターの誘因となることは有名である^{65,66}。核 DNA 異常による mtDNA 欠乏状態には MNGIE (mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy) などがあげられ⁶⁹、核 DNA 異常に伴いミトコンドリア DNA の増幅や修復機構に異常が生じるものである^{67,68}。

2.4. DNA 鑑定

2.4.1. 背景

1985 年 Jefferys が縦列反復配列におけるコアーの繰り返し回数の個体差に着目して個人識別を行うという、DNA フィンガープリント法を発表した^{1,2}。VNTR の繰り返し数を 1 度に検出する方法という意味でマルチローカス VNTR 法とも呼ばれる。VNTR 領域は一般的には 15~35bp のコアーを縦列反復する領域でありその回数は個体差があり遺伝する。その後単一ローカスの VNTR 反復を検出するシングルローカス VNTR 法も開発されたが^{5,6}バンドシフトなどの問題点多かった。1985 年アメリカ・シータス社が PCR 法^{7,8}を発表して以来改良を重ね、DNA 個人識別に応用されるようになると HLA-DQR⁶⁹や ABO 遺伝子⁷⁰といった single nucleotide polymorphisms (SNPs)解析が行われるようになった。また縦列反復配列多型においてもローカスが長い VNTR 領域よりもコアー配列が数 bp と短い STR 領域の方が増幅率よく、現在多数研究されている。特に Y-STR タイピングは、性犯罪における性別決定のみならず、その多様性より個人識別にも応用されている⁷¹。

DNA による個人識別に必要な条件は、その SNPs やローカスの出現頻度が集団において

偏りが無いことである。現在までに常染色体においては 300 万以上の SNPs が知られているが⁷²、このうち実用性にたる多様性が存在する部位は限られており、XY-STR ローカスにおいてもある程度の多様性はあるものの、個人識別に活用するには、さらに多数の人種における正常人のデータベースが必要である。

2.4.2. mtDNA の応用

mtDNA は早くから人類学の分野において研究されていたが、全塩基配列の決定、D-loop の特徴などが明らかになるにつれ、DNA 個人識別にも用いられるようになった。特に桁外れの増幅率の良さは法医学で得られる極僅かな試料からの個人識別を可能にし、さらにその SNPs の頻度の高さと種類の豊富さは個人識別の精度をあげた。すでに、個人識別に関する DNA 鑑定的重要因子となりつつあるにもかかわらず、未だに新たな SNPs の報告がなされている。また、母系遺伝という特徴を活かした母子鑑定においては mtDNA 多型を用いた鑑定が最も有用である。

2.5. 実験の目的

今まで述べてきたように、mtDNA はその特徴から、陳旧化した極僅かな試料からの分析が可能であり、加えてその多型性は他の DNA 分析法よりも個体特異性が高い。母系遺伝という特徴も親子鑑定の重要な一端を担う。mtDNA 多型の包括的な解析は法医学の分野において新たな展開を生むものと思われる。

今回我々は、健常人における mtDNA コントロール領域の HV1、HV2 について塩基配列を解析し、その変異の割合の解析を試みた。

また、性染色体異常症として知られている Klinefelter 症候群及び Turner 症候群は奇形合併率の高さや社会的背景より若年での死亡率が高いこと、さらに Klinefelter 症候群は犯罪加担率が高いこと⁷³等から、法医学領域においては解剖・鑑定対象となることが多く、その生物学・遺伝学的特徴を理解することは不可欠である。我々は Klinefelter 症候群の親子及び Turner 症候群の親子において mtDNA コントロール領域の塩基配列を解析して正常集団と比較し、それぞれの特徴の解析を試みた。

3. 試料と方法

3.1. 試料

3.1.1. 健常人における mtDNA コントロール領域の多型解析