

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<sup>72</sup>、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る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<sup>73</sup>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

血縁関係のない大阪在住の日本人の司法解剖例 120 例について、剖検時採取血液より DNA 抽出を行い、検体試料として用いた。HV1 領域は 120 例、HV2 領域は 60 例について解析を行った。

### 3.1.2. Klinefelter 症候群の親子の mtDNA コントロール領域の解析

Klinefelter 症候群の子は兵庫県の山中で発見されたバラバラ白骨死体（頭蓋骨片 3 片と脛骨 1 片）及び被疑者宅で発見された肉片と左手の 6 点を用い、アメロジェニン PCR 及び性染色体 STR 検査により 47XXY 型の同一人物のものであると診断されたものを用いた。その両親の試料は、被害者の両親と思われる男女から血液を採取し、性染色体 STR 検査により被害者との親子関係を確認したものをを用いた。尚、Klinefelter 症候群は父の XY と母の X に由来するものであった<sup>74</sup>。

### 3.1.3. Turner 症候群の親子の mtDNA コントロール領域の解析

Turner 症候群の子は生後 1 ヶ月で死亡した児の剖検時に採取した血液を用い、アメロジェニン PCR 及び性染色体 STR 検査により 45XO 型と診断された試料を用いた。尚、児は概観にて翼状頸、四肢浮腫、肉眼所見において心奇形と左多嚢胞性腎異形成、索状卵巣を認めた。その両親の試料は、それぞれ血液を採取し、性染色体 STR 検査を行い児と親子関係が確認されたものをを用いた。児の Turner 症候群は父の性染色体が欠落していることに由来するものであった。

## 3.2. DNA 抽出(フェノール・クロロホルム法)

血液からの DNA 抽出は全血を、骨片からの DNA 抽出は電気鋸で粉末化したものを EDTA 処理してからサンプルとして用いた。

1. サンプル 0.5ml に 5×Tris EDTA buffer pH8.0(20mM Tris-HCl pH8.0, 15mM NaCl, 100mM EDTA, 1%SDS) 0.5ml を加える。
2. Proteinase K(100 $\mu$ g/ml)を 200 $\mu$ l 加え、60°C、1 時間 インキュベーション
3. 0.1M Tris EDTA/Phenol を 1.0ml 加える。
4. 室温、約 1 時間混和する。
5. 5000g、5 分、4°Cにて遠心し、上清をとる。
6. 3-5 を数回繰り返す。
7. 70% Phenol / Isoamyl alcohol/Chloroform を 1.0ml 加える。
8. 4-5 を繰り返す。

9. Isoamyl alcohol/Chloroform を 1.0ml 加える。
10. 4-5 を繰り返す。
11. 上清を取り除く。
12. 3M Sodium acetate PH4.6 を 100 $\mu$ l、100% ethanol を 2.0ml 加える。

### 3.3. PCR

HV1 及び HV2 の PCR を GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Network, CT) を用い、テンプレート DNA 1ng と反応液 (10mM Tris-HCl(pH8.4)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM each dNTP、0.25 $\mu$ M each primer、0.75U Taq Polymerase) で 50 $\mu$ l とし、温度条件を 94°C 45 秒 (denaturation)、55°C 30 秒 (annealing)、72°C 30 秒 (extension) を 30 サイクルの後、72°C 7 分 (Final extension) として行った。Primer は以下のとおりである。

HV1 : F 15996 (5' CCACCATTTATGCACCCAAAGC 3')

R 16401 (5' TGATTTTCACGGAGGATGGTG 3')

HV2 : F 29 (5' TCTATCACCCCTATTAACCAC 3')

R 408 (5' GTTAAAGTGCATACCGCCA 3')

### 3.4. サイクルシーケンス法

PCR 増幅された mtDNA を QIA Quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) にて調整したのち、4 $\mu$ l の PCR 産物を ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit の添付書類に従い、PCR と同様の Primer を用いて温度設定 96°C 3 分、96°C 10 秒、55°C 5 秒、70°C 1 分を 15 サイクル、96°C 10 秒、70°C 1 分を 15 サイクルとしてシーケンス反応を行った。反応終了後、ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, City, CA) を用いて 18-21mA、980-2500V、50°C 8 時間で泳動した。シーケンス反応を行ったデータは Apple Computer ソフト、Sequencher software (Version 3.1 Gene Codes Corporation) にて HV1 は 16091-16380 まで、HV2 は 33-393 まで解析した。

尚、核内のミトコンドリア pseudogenes のエラー増幅や、DNA polymerase の slipping を排除するよう、解析は順方向・逆方向双方から行った。

## 4. 結果

### 4.1. mtDNA コントロール領域の多型