

## 7. ロシア・ブリヤート人集団におけるミトコンドリア DNA 多型

国立遺伝学研究所・進化遺伝研究部門

嶋田 誠 金 衝坤 高橋 文 斎藤 成也

国立遺伝学研究所・遺伝情報分析研究室

池尾 一穂 五條堀 孝

Laboratory of Ecogenetics, Research Center of Medical Genetics

Spitsyn, V. A.

### 1. はじめに

日本人の起源をめぐる問題は、近年の技術の進歩により従来の考えの修正をせまりながらも、依然として統一見解に収束してはいない。ロシアに住む蒙古系民族であるブリヤート人 (Buryats) は、世界各地の蒙古系民族における免疫グロブリン Gm 型の対立遺伝子の分布とその遺伝子頻度の研究<sup>1),2)</sup>により、日本人の起源に最も近いとされた集団である。

本稿では、ブリヤート人の中でも比較的遺伝子交流の少ないと考えられる奥地の村落より 1989 年に行われた集団サンプリングの際から保存されていた血清サンプルを用いて、ミトコンドリア DNA の超可変領域のタイピングを行った結果を発表する。

さらに、アジア系のミトコンドリア DNA に比較的多く観察される C 塩基の連続 (いわゆる poly-C 配列) を解読するために PYROSEQUENCING 法の使用を検討した。

### 2. 材料と方法

#### (1) 試料

ロシア連邦ブリヤート共和国マクソホン (Mogsohon) 村 [人口 1600 人] において、1989

年夏に採取し、凍結保存してあった 151 個体の血清標本から、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 社) によって、DNA を抽出した。

#### (2) 配列決定

ミトコンドリア DNA 調節領域中超可変領域 I を含む約 630 bp をはさんだ primer set (L 15926: 5'-TAC ACT GGT CTT GTA AAC C-3', H 16555: 5'-TGA TCC ATC GTG ATG TCT TA-3') を設計し、EX Taq (TAKARA 社) によって、次の条件で PCR を行った。94°C.5 min - (94°C.30 sec - 50°C.30 sec - 72°C.60 sec) × 30 - (94°C.30 sec - 52°C.30 sec - 72°C.90 sec) × 20 - 72°C.3 min - 4°C.∞ (PCR 反応液 50 μL)。PCR 産物を Dye Terminator 法によりシーケンス反応を行い、配列を決定した。それぞれの PCR primer により双方向からシーケンスを解読した。

#### (3) 分子進化的解析

ブリヤート人の配列の系統的な位置付けを全体的に把握するため、得られた配列を Genbank/EMBL/DDBJ 遺伝子データベースに登録し、ネアンデルタールの配列を query にして BLAST 検索を行って、データベース中の相同性の高いと判断された 76 entry について NJ 系統樹を作成した。また、縄文人との関連を調べるため、すでに公表されている 15 配列<sup>3)-5)</sup>を query にした

#### Mitochondrial DNA control region sequences for a Buryats population in Russia

Makoto K. Shimada\*<sup>1</sup>, Choong-Gon Kim\*<sup>1</sup>, Aya Takahashi\*<sup>1</sup>, Victor A. Spitsyn\*<sup>2</sup>, Kazuho Ikeo\*<sup>3</sup>, Takashi Gojobori\*<sup>3</sup>, Naruya Saitou\*<sup>1</sup>. \*<sup>1</sup>Laboratory of Evolutionary Genetics, National Institute of Genetics. \*<sup>2</sup>Laboratory of Ecogenetics, Research Center of Medical Genetics. \*<sup>3</sup>Laboratory for DNA Data Analysis, National Institute of Genetics.

BLAST 検索を行った。

(4) PYROSEQUENCING 法による poly-C 配列を含んだハプロタイプの解析

Dye Terminator 法では、途中で poly-C 配列

を含んだサンプルは poly-C サイト以降 sequence 反応が進まなかった。それらの配列は片側から解読した配列データを poly-C のところで連結して、遺伝子データベースに登録した。その際 C の連

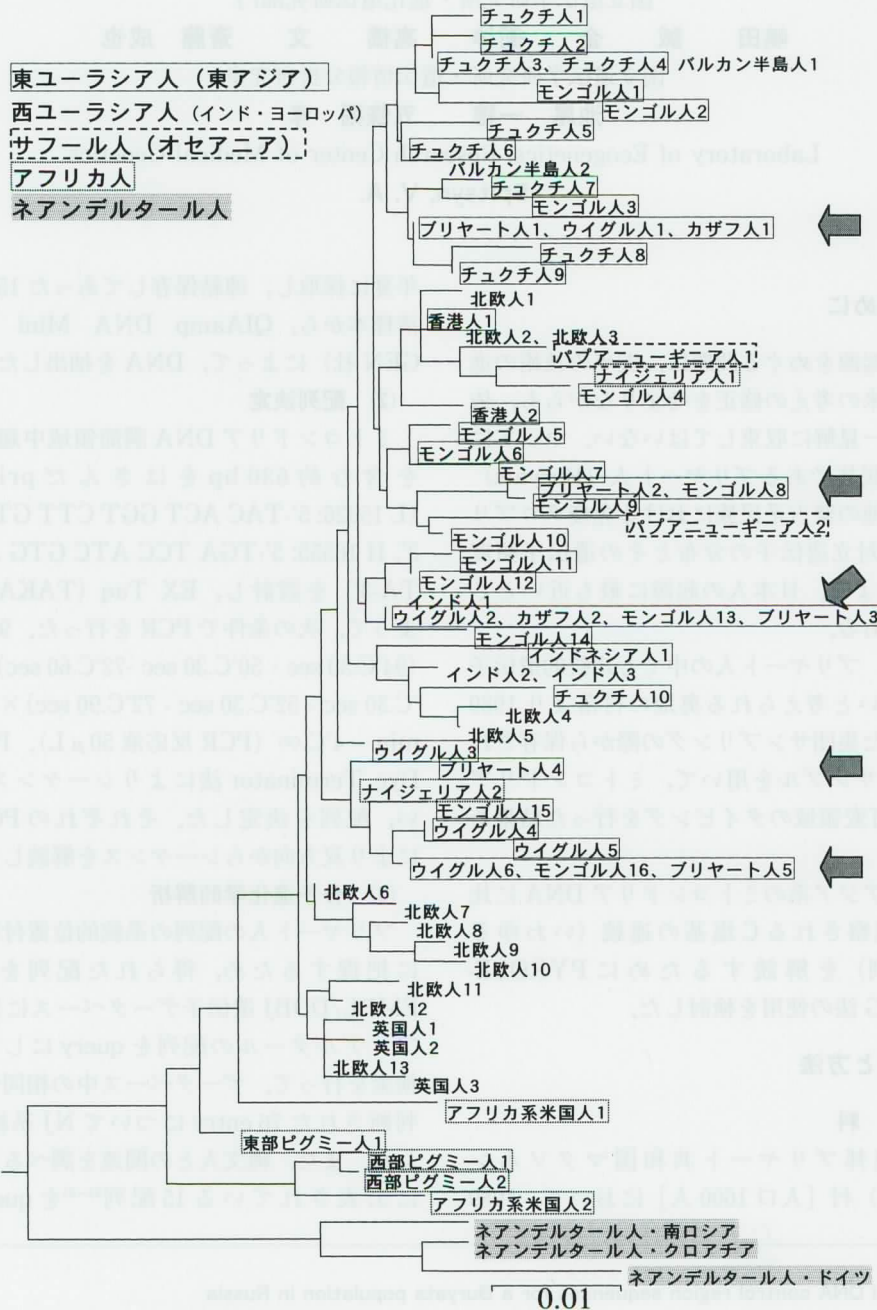


図1 ヒトのミトコンドリアDNA, 76配列によるNJ系統樹。データベースからのランダムサンプリングになるように、ネアンデルタール人の塩基配列との相同性検索で上位76配列を選んだ。数字は配列のID番号。矢印で本研究によって得られた配列を示した。

続する塩基数は不明であるので、nを1塩基分挿入し、その旨注釈を加えた。これらのデータは片側からのシーケンス反応だけであるので、そのデータを再確認するために、PYROSEQUENCING法を利用して、poly-Cサイトの先数bpを解読することを試みた。PYROSEQUENCINGは、株式会社バイオット (pyroinf@biott.co.jp) により行われた。片側のsequenceをピオチンでラベルし、上記と同様の条件でPCRを行った。Poly-Cサイト近傍でシーケンスプライマーをSNP Primer Designソフトウェアを利用して設計した。PCR産物35 $\mu$ LおよびSNP用regentを使用して、PYROSEQUENCING法を行った。dNTP添加の順番は、以下の2通りで行った。

- 1) poly-Cサイトまでは配列通りに滴下し、poly-Cサイトでは同じdNTPを2回滴下後にネガティブコントロールになるdNTPを滴下した。poly-Cサイト以降は4種のdNTPを順番に添加した。
- 2) poly-Cサイトまでは上と同様に行いpoly-Cサイト以降は登録された配列どおりに添加した。

### 3. 結果と考察

#### (1) DNA抽出およびdirect sequencing

151血清すべて本法によりDNA抽出およびPCRを行うことができた。134検体で塩基配列が決定できた (AB 059865-AB 059998)。

#### (2) 分子進化的解析

ネアンデルタール人の塩基配列との相溶性検索で選ばれた上位76配列のうち、ブリヤート人の配列は5配列認められた。それらによって得られたNJ系統樹を図1に示した。ブリヤート人の5配列は、東ユーラシア人に観察される配列の属するクラスター全般にわたって偏りなく分布していた。

公表されている縄文人の15配列それぞれについての相溶性検索の結果を図2に示した。縄文人配列5-8, 11, 13はDNAデータベースに同一配列は存在していなかった。検索によって検出された同一配列中に現代日本人として登録されているエントリーを含む配列は縄文人配列1-3, 10, 14, 15の6配列であった。検索された同一

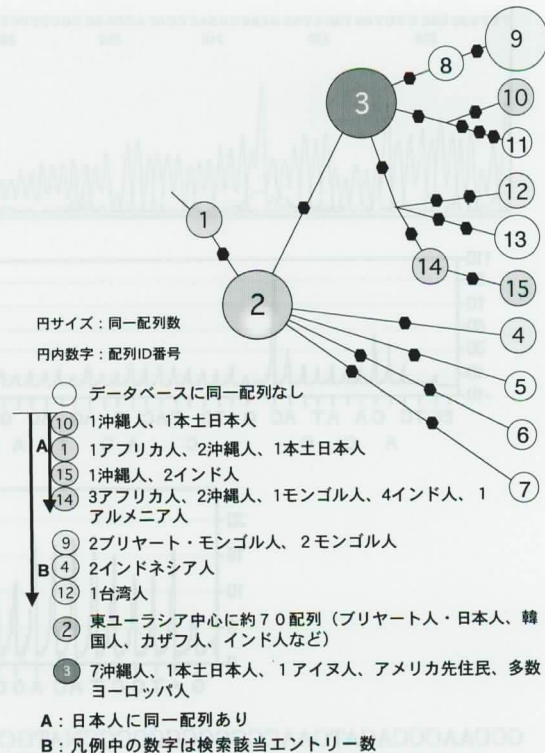
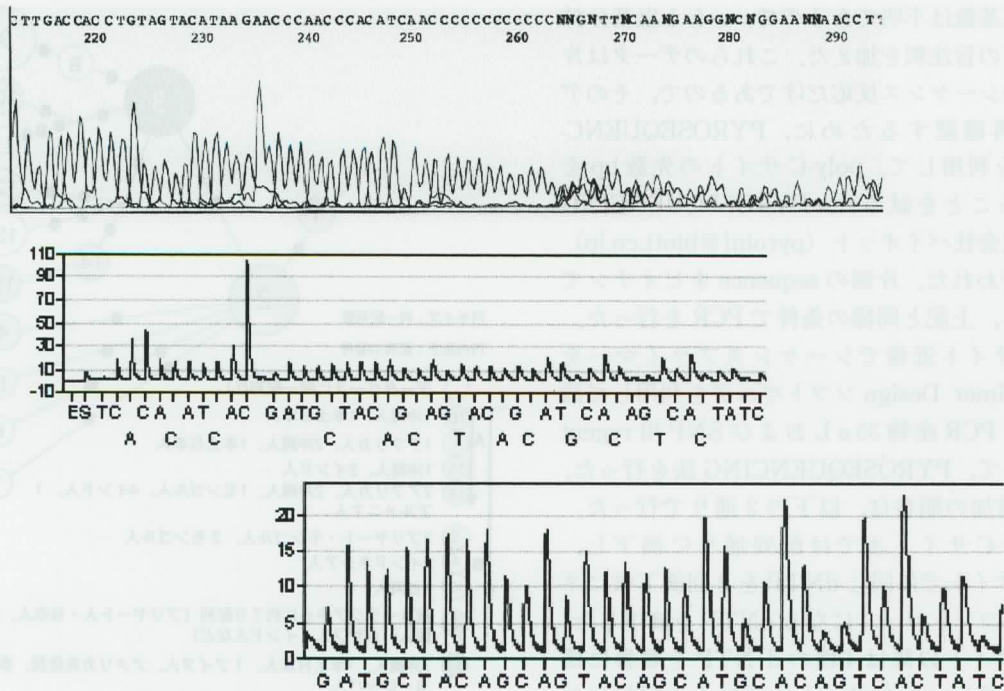


図2 縄文人のミトコンドリアDNAの遺伝子系統樹および遺伝子データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) における相溶性検索。配列2と3については、データベース中に多数の同一配列が検索され、その数は示していない。他の配列については、同一配列の検索数を図中凡例に示した。

配列の内訳・エントリー数は図中に示してあるが、縄文人配列2と3については多数のエントリーが検索されたのでエントリー数は省略した。これら縄文人配列2と3は頻度のみならずハプロタイプの系統樹上でのトポロジーからも、その属するハプログループの起源となる配列であると考えられる。本研究により登録したブリヤート人の配列は縄文人配列2と9の検索結果に含まれた。縄文人配列9はShinoda & Kanai<sup>5)</sup>において最も高頻度に観察された配列であるが同一配列は現代日本人には存在せず、本研究のブリヤート人2エントリーと他のモンゴロイド2エントリーに存在した。このことは、Matsumoto<sup>1),2)</sup>に矛盾しない。

#### (3) PYROSEQUENCING法によるpoly-C配列の解読

図3にpoly-C配列を含む同一DNA標本から



CCCAACCCACATCAACCCCCCCCCCNATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTAT  
(AB059919)

図3 Dye Terminator 法および、PYROSEQUENCING 法による同一 DNA 標本のダイレクト PCR 結果. 上段: Dye Terminator 法, ABI 社 3700 sequencer による. 中段: PYROSEQUENCING 法による結果, 最も高いピークは poly-C 配列を示す. 下段: 中段の poly-C 配列によるピークより右側の部分の拡大.

Dye Terminator 法 (上段) および, PYROSEQUENCING 法 (中段) によるダイレクト PCR 解析の結果を示す. Dye Terminator 法では poly-C 配列以降ピークが重なり解読不可能であっても, PYROSEQUENCING 法では配列を得ることができた.

本研究ではミトコンドリア DNA 超可変領域 I 中の poly-C 配列の解読について PYROSEQUENCING 法が有効であることを示した. この技術は基本的に他の領域における全ての 1 塩基繰り返し配列 (homomeric sequence) に適用可能であると考えられる. 従来 Dye Terminator 法によって homomeric sequence 以降解読不可能であった場合には, 正逆両方向から homomeric 部位までの配列結果をそれぞれ連結させて, 配列データとすることが一般的な対処法であった. ところがそれでは 1) 片側からの伸長反応のみの解読結果に基づくために結果の信頼性が低下

する. 2) homomeric 部位が必ずしも 1 カ所であることを証明できない. そのため, 仮に 2 カ所以上の homomeric 部位が存在した場合, その間の配列を無視することになる. PYROSEQUENCING 法を用いることにより, homomeric 部位の数を決定することができ, homomeric 部位にはさまれた配列をも解読できるので(2)の問題を解決することが期待される. 本研究で得られたように homomeric 部位以降の配列情報を基に再度 primer を設計し, sequence 反応を行うことにより双方向の解析結果が得られ, (1)のデータの質の低下を防ぐことができる. さらにショットガン・シーケンス法において, ランダムな位置から解読し始めた多数の配列結果をアライメントし contig 配列を構築する際に, homomeric 配列で各々の配列データが途切れてしまい, contig 配列の端が homomeric 配列で終わってしまうことがある. そのような場合に, PYROSEQUENC-

ING 法によって得た homomeric 配列以降の約 20 bp の情報が隣接する contig 配列を検索する際の手がかりとして有効であると考えられる。

**謝辞:** 血清標本の手配および運搬をしてくださりました NHK 浦林竜太氏, PYROSEQUENCING を行っていたいただきました株式会社バイオットの皆様, ロシア語の解説をしてくださりました遺伝研 Kirill Kryukov 氏に感謝申し上げます。

文 献

1) Matsumoto H: Characteristics of Mongoloid and neighboring populations based on the genetic markers of human immunoglobulins. *Hum Genet*, 80: 207-218, 1988.

2) Matsumoto H: Characteristics of Mongoloid populations and immunogenetics of various diseases based on the genetic markers of human immunoglobulins. *Exp & Clin Immunogenet*, 6:68-87, 1989.

3) Horai S, Hayasaka K, Murayama K, et al.: DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis, *Proc Jap acad* 65 B: 229-233, 1989.

4) Horai S, Kondo R, Murayama K, et al.: Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA, *Philos Trans R Soc Lond B* 333: 409-417, 1991.

5) Shinoda K, Kanai S: Intracemetery genetic analysis at the Nakazuma Jomon site in Japan by mitochondrial DNA sequencing. *Anthropol Sci*, 107: 129-140, 1999.

Haplotype of mitochondrial DNA control region in the Japanese population and comparison with other ethnic groups  
 Kazuo Haraoka, Kazuo Higashi, Hiroaki Nakai, Department of Forensic Immunology, Laboratory of Evolutionary Genetic, National Institute of Science

## 8. 日本人の mtDNA のハプロタイプと他人種との比較

東京歯科大学法歯学講座

丸山 澄 水口 清

国立遺伝学研究所進化遺伝研究部門

斎藤 成也

### 1. はじめに

Mitochondrial DNA (mtDNA) のコントロール領域には、HV 1, HV 2 と呼ばれる超可変領域 (Hypervariable region) が存在し、この領域の塩基配列はどの人種においても個人差が極めて高い。また、mtDNA は 1 細胞あたりのコピー数が多いことから変性 DNA の検査に適するなど、法医学上の利用価値は高い。法医学上の物体検査において、ある配列が日本人集団でどの程度で現れるかを評価するにあたり、類似したハプロタイプの頻度がわかれば結果の判断に非常に参考になる。しかし HV 1 及び HV 2 領域を総合したデータはあまり多く報告されていない。そこで 201 人の HV 1 及び HV 2 領域の多型検査を行うと共に、その配列の特徴からハプログループに分類し、各人種のデータと比較した。また同時に、アジア系で高度に認められる COII/tRNALys 9-bp deletion についての確認も行った。

### 2. 材料と方法

試料は血縁関係のない主に本州在住の 201 人の血液から Protease K 処理を行い、Phenol/chloroform 法にて DNA を抽出した。HV 1 及び HV 2 領域の PCR に用いた Primer は以下に示す通りである。

HV 1 15978 L : 5'- CACCATTAGCACCCA-AAGCTA-3'

16416 H : 5'- TTCACGGAGGATGGT-GGT-3'

HV 2 29 L : 5'- CTGTTAAAAGTGCAT-ACCGCCA-3'

601 H : 5'- CTTTGAGGAGGTAAG-CTACATA-3'

PCR 増幅は AmpliTaq Gold を用い、95°C, 9 分間変性後、95°C, 40 秒-58°C, 75 秒のサイクルを 35 回繰り返す。最後に 72°C, 10 分間延長した。PCR 増幅後、増幅産物を QIAquick purification kit を用いて精製し、ABI 373 A DNA Sequencer により直接塩基配列を決定した。HV 1 については 15024-16398, HV 2 については 49-369 の領域のデータを用いた。COII/tRNALys 9-bp deletion の PCR 増幅は Horai et al.<sup>1)</sup>の方法に従い、アクリルアミドゲル電気泳動後、銀染色により判定した。得られた塩基配列のデータを用いて、互いの塩基置換数を基に neighbor-joining (NJ) 法<sup>2)</sup>により系統樹を作成した。さらに日本人の系統のハプログループに分類し、他の日本人集団<sup>3)</sup>、韓国人<sup>4)</sup>、台湾人<sup>5)</sup>、白人<sup>6)</sup>、黒人<sup>7)</sup> (HV 1 領域のみ) のデータを用いて、ハプログループの出現頻度を比較し、人種識別の可能性について検討した。

Haplogroups of mitochondriaDNA control region lineages in the Japanese population and compararison with other ethnic groups

Sayaka Maruyama<sup>\*1</sup>, Kiyoshi minaguchi<sup>\*1</sup>, Naruya Saitou<sup>\*2</sup>. <sup>\*1</sup>Department of Forensic Odontology. <sup>\*2</sup>Laboratory of Evolutional Genetics, National Institute of Genetics.