博士論文審査結果の要旨

学位申請者　杵　渕　貴　子

主論文 1 編

The genome profiling method can be applied for species identification of biological materials collected at crime scenes.

BMC Genetics 20:50, 2019

審　査　結　果　の　要　旨

犯罪現場において，ヒトとは関連のない様々な試料が見つかることがある．そして，それらの起源の解明が重要になる時もしばしばある．通常いくつかの生物種に共通した遺伝子座に対しては，ユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅を行って生物種を同定する．しかし，1 つの遺伝子座のみ利用するだけでは全ての生物種を同定できないことがある．

申請者は, Genome profiling (GP)法を用いて 1 種あたり複数の検体を用いた場合でも生物種の鑑別, 同定は可能かを検証した．GP 法とは 1991 年に Nishigaki らが発表した方法論で，ランダム PCR と Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE；温度勾配ゲル電気泳動)法を用いて DNA の塩基配列の解析をすることなく生物種を鑑別，同定する方法である．対象の生物には日常生活で接することの多い 12 種類の生物種，ウシ，ブタ，ヒツジ，ニワトリ，カンパチ，マグロ，サーモン，アジ，ヒラメ，イヌ，ネコ，ラットおよびヒトを用いて GP 法による検証を行った．まず対象の生物 1 種類から検体を複数個採取した後各々から DNA を抽出し，計 49 個の抽出液を得た．そして各抽出液に 3 種類のランダムプライマーのうち 1 つを添加し，1 検体あたり 3 種類の溶液を作製した．また，解析の際の基準とするための Reference DNA 液 2 種類(Ref1, Ref2)を全ての溶液に加えた溶液を 6%ポリアクリルアミドゲルに注いで TGGE を行い，泳動終了後ゲルを 0.05%の GelRed で 5 分間染色し撮影した. その後ゲルの DNA バンドの屈曲部に点(species identification dots: spiddos)を打ち, Reference DNA の spiddos を基準に補正を行い，各検体の spiddos pattern を作成した．そして各検体の spiddos pattern 同士の類似度(the Pattern Similarity Scores: PaSS)を求め, Ward 法にて系統樹を作成した. 結果, 1 つのプライマーの PaSS から作成した系統樹では異なる生物種でクラスターが形成されたが，各々の検体の SP1～3 プライマー使用時の PaSS の平均値から作成した系統樹では，全ての生物種で同種の検体のみのクラスターが形成された．

今回の研究で, 申請者は 3 つのプライマーの各々の PaSS の平均値を用いたことで 1 つのプライマーの PaSS を用いた場合よりも正確な分類ができた．この結果は，複数のランダムプライマーを使って GP 法を行えば，非常に正確な種の同定が可能であることを示している．現状では複数の生物種が含まれる試料に用いることが難しく, それぞれの種に特異的な spiddos の特定が必要ではあるが, GP 法は時間，労力，費用を節約でき，ゲノム全体の大まかな情報が得られる手段である．

以上が本論文の要旨であるが, GP 法は生物種の分類に有用かつ犯罪捜査にも使用できると言えることから，医学上価値ある研究と認める．

令和 2 年 6 月 5 日

審査委員　教授　　上　原　里　程　　㊞
審査委員　教授　　中　屋　隆　明　　㊞
審査委員　教授　　田　中　秀　央　　㊞