

香川県高松市高松茶白山古墳出土 古墳前期人骨のDNA分析

DNA Analysis of Human Bones from the Early Kofun Period Excavated
at the Chausuyama Burial Mounds, Takamatsu, Kagawa

SHINODA Ken-ichi, KANZAWA Hideaki, ADACHI Noboru and KAKUDA Tsuneo

篠田謙一・神澤秀明・安達 登・角田恒雄

I はじめに

香川県高松市にある高松茶白山古墳は、古墳時代前期の讃岐における最大規模の前方後円墳である [清家他 2020, II - 1. 参照]。1967 年に発掘調査が行われ、第 I 主体部から第 VIII 主体部までの 8 つの埋葬施設が検出されている。このうち、第 I 主体部から 2 体 (E 地区, W 地区)、第 III 主体部から 1 体の人骨が出土している [信里他 2014]。本古墳は、その規模から讃岐の盟主的古墳であると理解されており、埋葬されていた人物の遺伝的な背景や個体同士の血縁関係に関心が持たれる。

これまで古人骨由来の DNA 分析では、母系に遺伝するミトコンドリア DNA の一部領域が対象とされており、その比較解析から人骨の系統 [例えば, Adachi et al., 2009, 2011] や血縁関係 [西本 2008] が議論されてきた。最近では、2006 年に登場した次世代シーケンサ (NGS: Next Generation Sequencer) によって、古代 DNA 研究においてもミトコンドリアの全ゲノムや核ゲノムを対象とした解析が可能となっている [例えば, Rasmussen et al., 2010]。それにより、系統や血縁についてこれまでより詳細な情報に基づいた議論が可能となっている。そこで今回は、NGS を用いて高松茶白山古墳の人骨のミトコンドリアゲノムの分析を行い、埋葬人骨の系統と血縁関係についての解析を試みた。

II 材料および方法

1. 分析試料の選定と DNA 抽出

第 I 主体部と第 III 主体部から出土した人骨が分析候補である。従来の研究では、歯が最も DNA が残っているとされてきた [Woodward et al., 1994]。しかし NGS の分析では側頭骨錐体にある内耳の骨が最も成績が良いことが知られている [Pinhasi et al., 2013]。そこで今回の実験では、側頭骨のサンプリングが可能だった第 I 主体部 W 地区と第 III 主体部の人骨 (以下、茶白山 1, 茶白山 3) を分析対象とした (表 1)。サンプリングに際しては、骨の形状をなるべく損なわないようにする為に、錐体部の上面にドリルで小さな穴を開けて、そこから内耳にアプローチすることで試料粉末 (約 200 mg) を採取した (CYAU1, CYAU3)。第 I 主体部については後日、追加サンプリングを

表1 解析した高松茶臼山古墳出土のサンプル

個体番号	分析個体番号	試料番号	部位	解析部分
後円部第I主体部西群出土人骨	茶白山1	CYAU1	側頭骨	左
		CYAU1-再	側頭骨	左
前方部第III主体部出土人骨	茶白山3	CYAU3	側頭骨	右

行い、その際には錐体部の上面から内耳の骨を含む領域をブロック状に1cm角で切り出し、破碎して試料粉末(約200mg)を採取した(CYAU1-再)。DNAの抽出はAdachi et al. [2013]に従って行った。

2. ミトコンドリアDNA分析

最初に試料に解析可能なDNAが残存しているかを確かめるためにAPLP法[Amplified Product-Length Polymorphism method, Kakuda et al., 2016]を用いてミトコンドリアDNAのハプログループを決定する簡易分析を行い、その後にNGSによる分析を行った。APLP法による分析では、最初にミトコンドリアDNAのマクロハプログループであるMおよびNと、それぞれの下位のハプログループを決定するプライマーセットMおよびNを用いた6-plexのPCRを行い、マクロハプログループのMとNの判定およびその下位のハプログループの推定を行った。この実験で増幅が確認されたサンプルに対し、更にハプログループを細分するために、プライマーセットD4およびM7を細分するセットでの6-plex PCRを行った。得られたPCR反応溶液を電気泳動し、ハプログループの判定を行った。

NGSによる分析するために、Rohland et al. [2015]の方法でNGS分析用ライブラリの作成を行った。調整したNGS用ライブラリには、古代人由来の核DNAやミトコンドリアDNAに加えて、死後に骨や歯に侵入した細菌などの混入DNAが含まれている可能性がある。このようなライブラリから効率的に古代人のミトコンドリアDNAの分析を行うために、本研究ではNGS用ライブラリに含まれるヒトミトコンドリアDNAに由来するDNA断片をMaricic et al. [2010]の方法を用いて濃縮した。濃縮後のDNAライブラリはMiSeq(Illumina社)を用いてシーケンスした。得られたDNA配列データのマッピングおよびデータフィルタリングは篠田他[2017]の方法に以下の修正を加えて行った:(1) インデックスホッピングを排除するために、正しいインデックス配列が組み込まれているシーケンスデータのみを回収した,(2) PCRにより生じた重複リードの除去にDeDup(version 0.11.3)(<https://github.com/apeltzer/DeDup/releases/download/v0.11.3/DeDup.jar>)を用いた。

次に、ミトコンドリアDNAのハプログループを決定するためにSNPsの検出を行った。検出されたSNPsからPhyloTree-Build 17[van Oven and Kayser, 2009]を参照してハプログループの判定と個体特異的変異を検出し、最後に、判定されたハプログループの結果をAPLP法で得られた結果と比較した。また、HaploGrep2[Weissensteiner et al., 2016]を用いた推定も並行して行い、結果の比較をした。

3. DNA データの信頼性の確認

古代 DNA では、死後に DNA 配列のシトシン塩基に脱アミノ化が起こる現象が知られている [Briggs et al., 2007]。また DNA の長さもほとんどが 100 塩基以下の長さに断片化しているため [Sawyer et al., 2012]、ヒトリファレンスゲノムにマップされたリード長が長いものはコンタミの可能性がある。従ってリードの長さも古代人由来の DNA であるかの判断材料となる。シトシン塩基の脱アミノ化はリードの末端に高い頻度で起こり、脱アミノ化によってウラシル塩基となったシトシン塩基は、PCR による増幅を経てチミン塩基に置換される。そのため、リファレンスゲノムのシトシン塩基がマップされたリードでは、チミン塩基として観察される（以下 C/T と記載）。相補鎖のシトシン塩基に脱アミノ化が起きた場合、グアニン塩基がアデニン塩基に置換される（以下、G/A と記載）。そこでミトコンドリア DNA 標準配列 (rCRS) [Andrews et al., 1999] に再マップされたリードを用いて、そのリード長と C/T および G/A の割合を調べて、マップされたリードが古代 DNA に見られる特徴を有しているかどうかを判定した。調べる際には、ソフトウェア MapDamage2.0 [Jónsson et al., 2013] を使用した。また、リード長は挿入・欠失の有無に関係なく、リファレンスゲノムのマッピングされた領域のスタートサイトとエンドサイトから計算した。

分析試料に残存する古代人由来の DNA 量はごく微量であることから、分析の際には現代人からの DNA の汚染のリスクを伴う。そこで古代人由来の DNA を含むと判定したのち、ソフトウェア schmutzi [Renaud et al., 2015] を用いて汚染率の推定を行い、データの信頼性を確認した。また、Kanzawa-Kiriyama et al. [2017] の方法に以下の修正を加えた手法での推定も並行して行い、結果を比較した:得られたデータに限られる場合（今回は茶白山 1）は、深度が 1 以上のハプログループ特異的な SNP サイトのみを解析に用いた。

III 結果

APLP 法による簡易的な分析の結果、前方部第 3 主体（茶白山 3）では明瞭なバンドが見られ、充分な量の DNA を含むことが確認された（図 1）。また、ミトコンドリア DNA ハプログループは D4 (a,b,e,g,h,j,o ではない) に分類された。後円部西群第 1 主体（茶白山 1）は、DNA 量が極少量と判断されたことから二度のサンプリングと分析を行ったが、分析結果が安定しなかった。これは、分析に充分な量の DNA が含まれていなかったためと考えられる。次に、NGS を用いてミトコンドリアゲノム全周配列とハプロタイプの決定を試みた。その結果、茶白山 3 はハプログループの D4m1 に細分された（表 2）。個体特異的の変異は認められなかった。茶白山 1 はハプログループ M7a2 の可能性が示されたが、取得できたデータに限られており、相対的に DNA 汚染の影響も大きいことから、結果は暫定的である。

結果の信頼性を確認するために、古代 DNA 特有の特徴の有無を調べた。茶白山 3 では DNA 末端に明瞭な C/T の置換が見られたが、茶白山 1 では DNA 汚染が相当量あるのか、不明瞭である（図 2A）。DNA 断片長は両個体とも全体的に短い（図 2B）、茶白山 1 は断片長の分布がテーリングしており、DNA 汚染によって長断片の混入が起きている可能性がある。茶白山 1 でハプログループ M7a2 の SNPs を持つ DNA 断片も、50 bp 以下の短いものから、80 bp よりも長いものまであることから、茶白山 1 が確実に M7a2 かを判断することは難しい。以上の特徴から、茶白山 3 から

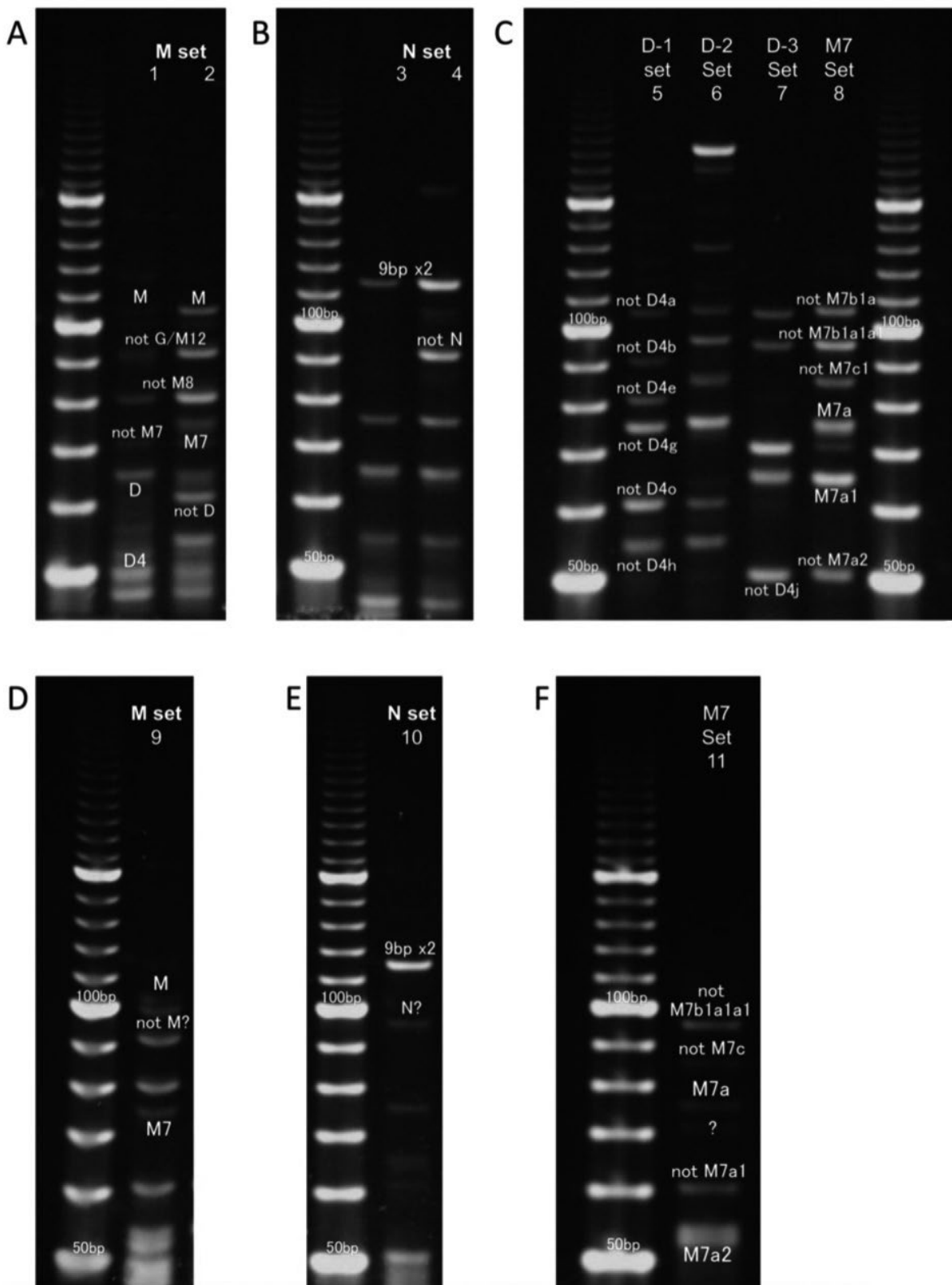


図1 茶臼山古墳人骨のAPLP分析の結果

CYAU1の結果は、2, 4, 8。CYAU1-再の結果は、9, 10, 11。CYAU3の結果は、1, 3, 5, 6, 7。CYAU1のバンドパターンはハプログループM7a1の可能性を示す。CYAU1-再のバンドパターンはハプログループM7a2の可能性を示す。CYAU3のバンドパターンはハプログループD4*(a,b,e,g,h,j,oでない)の可能性を示す。A, D, Mセット。B, E, Nセット。C. D-1, D-2, D-3, M7セット。F. M7セット。

表2 ミトコンドリア DNA 分析の結果

分析個体番号	茶臼山 1				茶臼山 3	
	CYAU1		CYAU1- 再		CYAU3	
インデックス 1	D501	D502	D506	D505	D503	D508
インデックス 2	D712	D711	D707	D707	D705	D709
総ペアリード数 (n)	103,564	56,768	58,513	82,893	296,325	449,466
ミトコンドリア DNA 由来のリード数(n)	383	300	278	52	7,568	6,362
(%)	0.37%	0.53%	0.48%	0.06%	2.55%	1.42%
重複リードの除去、mapq20 後の リード数 (n)	243	214	204	28	5,678	4,453
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0) (Quality)	-	M7a2a (0.5549)	H2a2a (0.5858)	-	D4m1 (0.9528)	D4m1 (0.9701)
ハプログループ推定 *1	(M7a2?)	M7a2?	M7a2?	-	D4m1	D4m1
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	-	-	-	-	0 [0-0.005]	0.02 [0-0.075]
ハプログループと一致 / 不一致 (n)	1/0	4/0	6/3	-	63/3	62/2
ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] *1	0%	0%	33.3% [0-64.1]	-	4.55% [0-9.57]	3.13% [0-7.39]
APLP	M7a1?			M7a2?	D4* (a,b,e,g,h,j,o でない)	

*1 Kanzawa-Kiriyama et al. [2017] の手法。茶臼山 3 の汚染率推定では Transversion サイトのみを用いて解析。

得られた結果は古代人に由来すると判断したが、茶臼山 1 の結果は DNA 汚染に影響されている可能性があり、暫定的なものであるとした。なお、茶臼山 3 の DNA の汚染率は 3.13 ~ 4.55 % と推定された (表 1)。

茶臼山 1 の結果を信じるならば、両者は母系系統で血縁関係に無いことを示す。ただし、茶臼山 1 に生じている DNA 汚染が M7a2 そのものである可能性もあるので、茶臼山 1 が茶臼山 3 と同じハプログループ D4m1 である可能性を検証した。その結果、茶臼山 1 のデータに D4m1 の SNPs を持った DNA 断片は全く検出されなかった。よって、茶臼山 1 のデータが DNA 汚染によって大部分を占めていない限りは、両者は母系系統で血縁には無いと判断できる。

IV 考察

茶臼山 3 にみられるミトコンドリア DNA ハプログループ D4m1 は、現在の日本列島人に低頻度であるが存在しており [0.3 %, Sekiguchi et al., 2008], 姉妹系統の D4m2 は北東アジアを中心に観察される (<http://www.phylotree.org>)。また、縄文時代人からはこれまでのところ D4m は検出されていないことから、茶臼山 3 の D4m1 は弥生時代以降の渡来系集団に由来すると考えられる。現代の日本列島人は、基層集団である縄文系集団と渡来系集団が弥生時代以降、日本列島内で混合して成立したと考えられている [Hanihara, 1991]。最近では、弥生時代人の核ゲノム解析による遺伝学的手法からも両系統の混血が明らかにされている [例えば、篠田他, 2020a]。今回、讃岐において古墳時代前期では最大級の高松茶臼山古墳で渡来系由来の D4m1 が検出されたことは、混血後の集団が広く波及している可能性を改めて浮き彫りにした。一方の茶臼山 1 は、暫定的ではあるがハ

プログループ M7a2 に分類された。M7a2 を含む M7a は縄文時代人の主要なハプログループのひとつであり [Adachi et al., 2011], 「縄文人的遺伝子型」とされる [Adachi et al., 2009]。現代日本人でも本土で 7.5%, 沖縄本島で 26 % の頻度で観察される [Tanaka et al., 2004]。このことから, 茶臼山 1 は母系系統で縄文系である可能性がある。これは, 茶臼山 1 と 3 の母系の出自が大きく異なっている可能性を示している。ただし, 茶臼山 1 のデータは信頼性に乏しいことから, 今後は追加分析を行うなどして, 茶臼山 1 からより信頼性の高い結果を得る努力を続ける必要がある。

讃岐の人類集団の成立史を詳細に解析することを目的として, 今後は茶臼山 3 の核ゲノム分析を予定している。核ゲノムには膨大な情報が含まれており, わずか 1 個体でも詳細な解析が可能である [例えば, 篠田他, 2019; 篠田他, 2020b; 篠田他, 2020a 参照]。得られる核ゲノム配列を日本列島の古代人・現代人のゲノムと比較することで, 讃岐の人類集団の遺伝的背景とその成立過程がこれまでより詳細に明らかになると期待される。そこから, 考古学的知見と合わせた検証と議論を試みたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり, 香川県埋蔵文化財センター所長 西岡達哉氏, 香川県埋蔵文化財調査センターの古野徳久氏他, および岡山大学の清家章氏, 国立歴史民俗博物館の藤尾慎一郎氏にお世話になった。ここに感謝の意を表します。なお, 本研究は文部科学省科学研究活動費の新学術領域(研究領域提案型「古代人ゲノム配列解析にもとづくヤポネシア人進化の解明」(代表 篠田謙一, 課題番号 18H05507) を用いて実行した。

なお, 本調査は平成 30 年度新学術領域研究「ゲノム配列を核としたヤポネシア人の起源と成立の解明」(代表 国立遺伝学研究所 斎藤成也), 計画研究 A02 班「古代人ゲノム配列解析にもとづくヤポネシア人進化の解明」(代表 国立科学博物館 篠田謙一) の成果の一部である。

参考文献

- Adachi N., Shinoda K., Umetsu K., and Matsumura H. 2009: Mitochondrial DNA analysis of Jomon skeletons from the Funadomari site, Hokkaido, and its implication for the origins of Native American. *American Journal of Physical Anthropology*, 138: pp. 255-265
- Adachi N., Shinoda K., Umetsu K., Kitano T., Matsumura H., et al. 2011: Mitochondrial DNA analysis of Hokkaido Jomon skeletons: remnants of archaic maternal lineages at the southwestern edge of former Beringia. *American Journal of Physical Anthropology*, 146: pp. 346-360
- Adachi N., Sawada J., Yoneda M., Kobayashi K., and Itoh S. 2013: Mitochondrial DNA analysis of the human skeleton of the initial Jomon phase excavated at the Yugura cave site, Nagano, Japan. *Anthropological Science*, 121 (2) : pp. 137-143
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., and Howell N. 1999: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23: 147
- Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F., Green R.E., Kelso J., et al. 2007: Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (37) : pp. 14616-14621
- Hanihara K. 1991: Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review*, 2: pp. 1-33
- Jónsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L., and Orlando L. 2013: mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*, 29: pp. 1682-1684
- Kakuda T., Shoji H., Tanaka M., Nambiar P., Minaguchi K., Umetsu K., and Adachi N. 2016: Multiplex APLP

- system for high-resolution haplogrouping of extremely degraded East-Asian mitochondrial DNAs. *PLoS ONE*, 11 (6) : e0158463
- Kanzawa-Kiriyama H., Kryukov K., Jinam T.A., Hosomichi K., Saso A., et al. 2017: A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. *Journal of Human Genetics*, 62: pp. 213-221
- Maricic T., Whitten M., and Pääbo S. 2010: Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE*, 5 (11) : e14004
- 信里芳紀・松本豊胤・高畑知功・清家章 2014:『高松市茶臼山古墳』香川県埋蔵文化財センター
- 西本豊弘 2008:「血縁関係の推定-中妻貝塚の事」(小杉康・谷口康浩・西田泰民・水ノ江和同・矢野健一編『縄文時代の考古学』10 -人と社会-人骨情報と社会組織
- Pinhasi R., Fernandes D., Sirak K., Novak M., Connell S., et al. 2013: Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *PLoS ONE*, 10 (6) : e0129102. doi:10.1371/journal.pone.0129102
- Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S., Pedersen J.S., Albrechtsen A., et al. 2010: Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*, 463: pp. 757-762
- Renaud G., Slon V., Duggan A.T., and Kelso J. 2015: Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome Biology*, 16: 224
- Rohland N., Harney E., Mallick S., et al. 2015: Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370 (1660) : 20130624
- Sawyer S., Krause J., Guschanski K., et al. 2012: Temporal Patterns of Nucleotide Misincorporations and DNA Fragmentation in Ancient DNA. *PLoS ONE*, 7 (3) : e34131
- 清家他 2020.II - 1
- Sekiguchi K., Imaizumi K., Fujii K., Mizuno N., Ogawa Y. et al. 2008: Mitochondrial DNA population data of HV1 and HV2 sequences from Japanese individuals. *Legal Medicine*, 10 (5) : pp. 284-286
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2017 :「佐世保市岩下洞窟および下本山岩陰遺跡出土人骨のミトコンドリア DNA 分析」*Anthropological Science* (Japanese Series) ,125: pp. 49 ~ 63
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2019 :「西北九州弥生人の遺伝的な特徴-佐世保市下本山岩陰遺跡出土人骨の核ゲノム解析-」*Anthropological Science* (Japanese Series) 127: <https://doi.org/10.1537/asj.1904231>.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020a :「鳥取県青谷上寺地遺跡出土弥生後期人骨の DNA 分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 219 集, pp. 163 ~ 178
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020b :「福岡県那珂川市安徳台遺跡出土弥生中期人骨の DNA 分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 219 集, pp. 199 ~ 210
- Tanaka M., Cabrera V.M., González A.M., Larruga J.M., Takeyasu T., et al. 2004: Mitochondrial genome variation in Eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Research*, 14: pp. 1832-1850
- Van Oven M. and Kayser M. 2009: Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30 (2) : pp. E386-E394
- Weissensteiner H., Pacher D., Kloss-Brandstätter A., Forer L., Specht G., et al. 2016: HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, 44 (W1) : pp. W58-W63
- Woodward S.R., King M.J., Chiu N.M., Kuchar M.J., and Griggs C.W.1994: Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR methods and Applications*, 3: pp. 244-247

篠田謙一 (国立科学博物館人類研究部)

神澤秀明 (国立科学博物館人類研究部)

安達 登 (山梨大学医学部法医学講座)

角田恒雄 (山梨大学医学部法医学講座)

(2019年5月10日受付, 2019年8月5日審査終了)

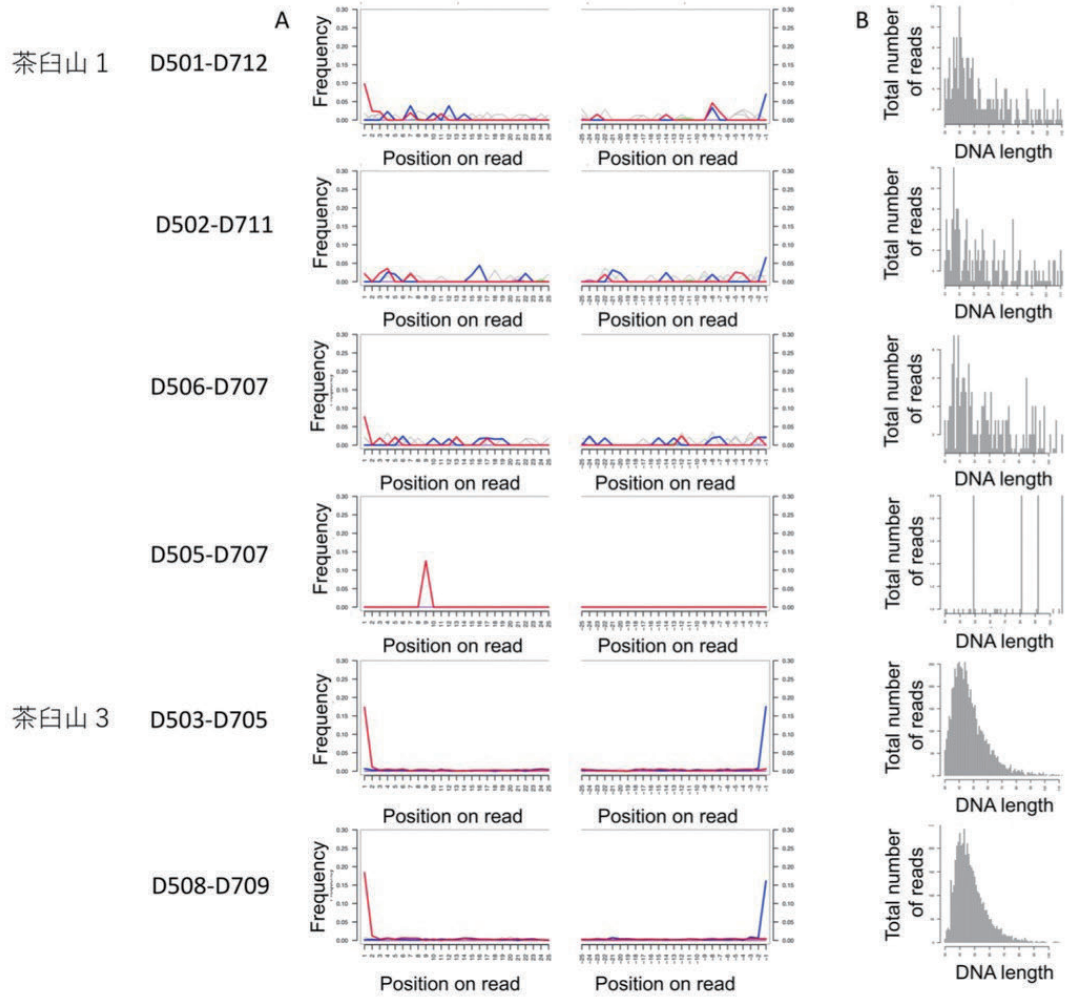


図 2 茶白山古墳人骨のリード末端の C/T, G/A の置換率及びリード長
 A. 5' 末端及び 3' 末端の置換率。B. リード長の分布。