

沖縄県北谷町出土貝塚後期人骨のDNA分析

伊礼原D遺跡・平安山原A遺跡

DNA Analysis of Human Bones of the Late Shell Midden Period
Excavated in Chatan, Okinawa

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

篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登・土肥直美

I はじめに

琉球列島集団の形成史は、これまで二重構造説 [Hanihara 1991] の枠組みの中で捉えられてきた。このモデルは、均一な縄文人社会が大陸由来の水田稲作と金属器の加工技術をもった集団を受け入れたことによって、本土日本を中心とした中央と南西諸島・北海道という周辺に分化していくというシナリオだが、このような視点で、南北三千キロを超え、寒帯から亜熱帯の気候を含む日本列島・南西諸島の集団の成立を正確に説明できるのかについては疑問があり、それが原因となって、現在に至るまで日本人の成立に関しては議論が続いている [篠田 2015]。この状況を打開するためには、列島の各地域で、集団の成立のシナリオを組みあげていく必要がある。その際に重要な役割を果たすのは、旧石器時代に遡る人骨が発見されており、東南アジアからの人類の進入のルートにあたる琉球列島集団の形成史である。ただし、琉球列島からは旧石器時代人は発見されているものの、歴史時代を通じてそれ程多くの古人骨が見つかるわけではない。

北谷町には、貝塚時代の遺跡が多くあり考古学的な研究は進んでいるが、出土した人骨のDNA分析は行われていない。そこで今回は、貝塚時代後期の遺跡である伊礼原D遺跡と平安山原A遺跡から出土した人骨について、解析に足る量のDNAが残っているかを調べる目的で、ミトコンドリアDNAの予備的な解析を行うことにした。

II 材料および方法

今回の研究で分析したのは、伊礼原D遺跡と平安山原A遺跡から出土した人骨であり、いずれも北谷町教育委員会が管理している。伊礼原D遺跡は、貝塚時代後期からグスク時代、近現代の遺跡で、平成9年度の試掘調査で発見され、桑江伊平土地区画整理事業の一環で平成18年度、平成19年度に発掘調査が行われた [北谷町教育委員会 2008]。貝塚時代後期の地層からは人骨も回収されている。今回の実験ではこの遺跡から出土した2体からDNA分析用のサンプルを採取した(表1)。

平安山原A遺跡は、貝塚時代後期から戦前にかけての遺跡で、標高約4メートルから5メートル

表 1 解析した伊礼原 D 遺跡および平安山原 A 遺跡出土のサンプル

個体番号	分析個体番号	年代*	解析部分	ハプログループ
伊礼原 D 遺跡				
	No.3	A.D.679-773	右側頭骨	M7a1
	No.5	A.D.1161-1250	右下顎第 2 大臼歯	(M)
平安山原 A 遺跡				
	No.3	A.D.770-889	左側頭骨	M7a1
	No.5	A.D.944-1018	左側頭骨	M7a1
	No.11	A.D.1167-1258	左下顎第 3 大臼歯	M7b1a1a1
	No.12	A.D.418-540	左下顎第 3 大臼歯	(B4a)

*年代については調査報告書にある値を引用した。

ルの沖積地に形成されている。遺跡は桑江伊平土地区画整理事業の一環で平成 18 年度から平成 23 年度にかけて発掘調査が行われた [北谷町教育委員会 2016]。人骨も回収されており、今回は表 1 に示す 4 体をサンプリングした。なお、それぞれの個体の帰属年代は、調査報告書によれば 5 世紀から 13 世紀までと広いが、概ね貝塚時代後期に属していると判断される。

III DNA 分析のプロトコール

分子生物学の発展によって、現在では DNA の情報に基づいた人類の起源や拡散についての研究が世界の各地で行われ、地域集団の成立に関する新たなシナリオが提示されるようになってきている。特に 2010 年以降は、次世代シーケンサ (NGS: Next Generation Sequencer) が用いられようになったことで、古人骨の DNA 分析でもミトコンドリア DNA の全塩基配列と核ゲノムの解析が可能になり、これまでとは比較にならない精度で人類史の復元が行われるようになってきている。我々も現在ではこの手法を用いた分析を行っているところである。DNA 抽出は篠田他 [2017] の方法に従って用意し、その後分析結果を確実に得るために以下に記載する 4 段階のステップを踏んで実施している。

(1) APLP 法によるミトコンドリア DNA ハプログループの決定

APLP 法 (Amplified Product-Length Polymorphism method) [Umetsu et al, 2005] は、ミトコンドリア DNA に存在する点的な突然変異 (SNP: Single nucleotide polymorphisms) を電気泳動によって検出する方法で、従来の古人骨分析で用いられてきた [例えば Adachi et al. 2013]。この方法を用いて、ミトコンドリア DNA のハプログループが決定できたサンプルに関しては、NGS を用いた解析に進む。

(2) NGS を用いたミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定

抽出した DNA からライブラリを作成する。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。効率的に古代人の DNA の分析を行うために、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 断片と核 DNA 断片を、それぞれ個別に濃縮するステップを踏む。NGS を使ってミトコンドリア DNA の 16,500 余の塩基配列を全て決定する

ことで、より詳細な系統解析を行う事ができる。

この後、核ゲノムの解析に進むが、それには(3)ドラフトシーケンスの獲得(4)高精度ゲノムの取得、という段階がある。ただし今回は(1)の段階までの実験しか行っていないので詳細の記述は省略する。

IV APLP 分析の実際

DNAの抽出はAdachi et al. [2013]に従って行った。篠田他 [2020]に詳細を記述した。APLP法によるミトコンドリアDNAハプログループ分析は、安達他 [2014]とKakuda et al. [2016]に従って実行した。まず、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、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、M7、M9やM10、M11など、そしてBを細分するセットでの6-plex PCRを行った。PCR条件は、95℃ 15分の後、94℃ 30秒、64℃ 5分を5サイクル、さらに94℃ 30秒、64℃ 90秒で33サイクル行い、最後に72℃ 3分反応させて12℃で保存した。

得られたPCR産物は、ポリアクリルアミドゲル(10% T, 5% C)を使用し、150Vで分離後、SYBR® green I (Thermo Fisher Scientific)にて30分染色を行い、トランスイルミネーターを用いてPCR産物を可視化し、ハプログループの判定を行った。

V 結果と考察

(1) APLP 分析

6個体のAPLP分析の結果を表1に示した。また、各段階のAPLP分析のゲル電気泳動の結果のうちマクロハプログループM、Nを解析した結果を図1に示した。また、判明したマクロハプログループの中で細分した結果は図2に示した。それぞれの抽出DNAに対し、マクロハプログループMとNを細分するプライマーセットでPCR反応を試みた結果では、図1に示すように全ての個体で増幅が確認できた。ただし、伊礼原D遺跡の5号では、マクロハプログループM、Nを分離するプライマーセットで、Nでは無いことが確認されたものの、Mセットでの増幅は十分ではなかった。そこで暫定的にこのサンプルがMに属するものと仮定して、更にマクロハプログループMを細分するプライマーセット、M-2での増幅を試みた。しかし既知のハプログループの細分を更に細分するプライマーセットでの増幅は出来なかったため、暫定的にマクロハプログループMに属すると判断した(図2)。伊礼原D遺跡5号では、APLP分析に十分な量のDNAが回収されなかったことも予想される。

平安山原A遺跡12号人骨は、マクロハプログループM、Nを分離するプライマーセットで、マクロハプログループNに属し、かつRegion Vと呼ばれる領域に9塩基の欠損を持つことが明らかになった。これはハプログループBに属することを示している。ただし細分プライマーによる分析の結果ではそれ程バンドが明瞭ではなかったために、暫定的にサブハプログループはB4aであると判定した(図2)。それ以外の個体に関しては、MとNを区分するプライマーと細分プライマーの双方で明瞭な増幅バンドを得ることができたので、各個体のサブハプログループを判定すること

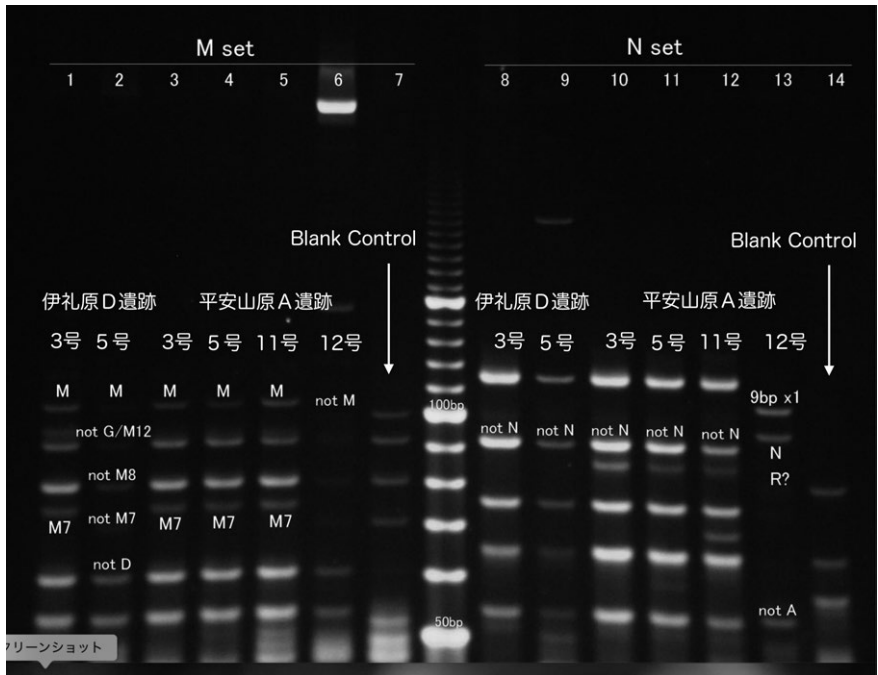


図1 APLP分析の結果
(マクロハプログループMとNの分離)

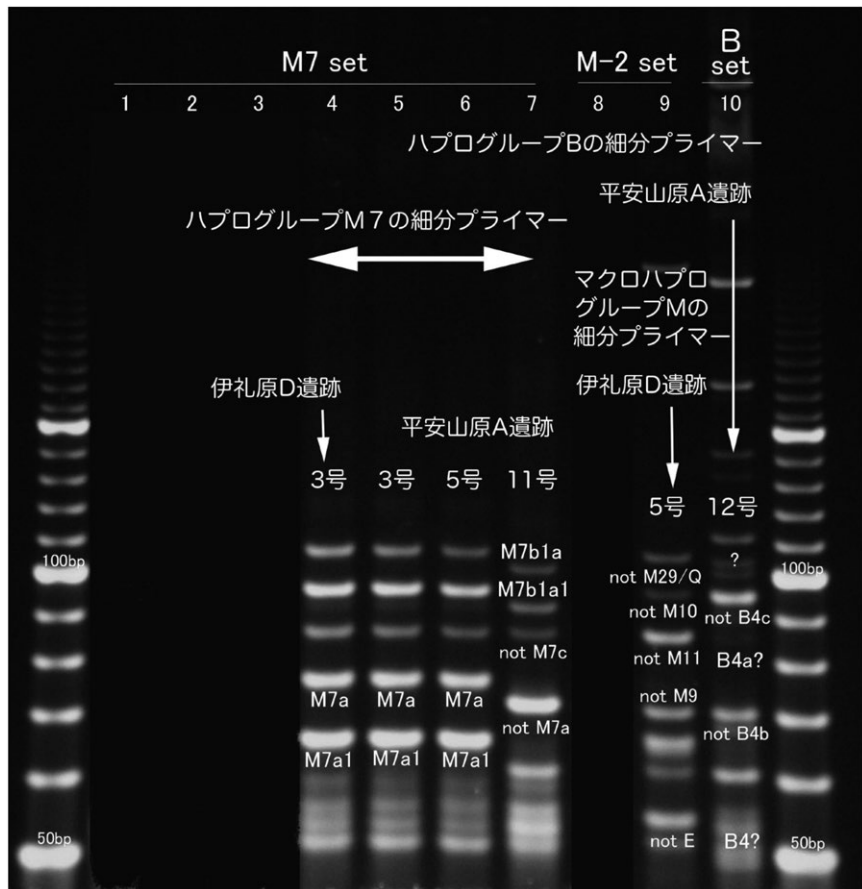


図2 APLP分析の結果
(ハプログループMとNを細分した結果)

が可能だった。ハプログループを細分するプライマーセットによる APLP 分析を行った結果得られた、各サンプルのミトコンドリア DNA ハプログループは表 1 に示した。

(2) ミトコンドリア DNA のハプログループ

北谷町から出土した貝塚後期人骨 6 個体のサンプルのうち、マクロハプログループ M までの判定しか出来なかった伊礼原 D 遺跡の 5 号人骨を除く 5 体については、サブハプログループまでを決定できた。その結果、3 体は M7a1, 1 体が M7b1, そして残り 1 体は B4 に属することが判明した。

琉球列島集団の成立を考える際に重要な問題のひとつに、貝塚時代前期から後期に至る時代に住んでいた人々の由来と、双方の関係がある。現状ではこの時期のものと考えられる人骨で正確な年代測定と DNA 分析の結果が報告されているものはほとんどないが、我々が近年解析を進めている貝塚時代前期から後期初頭の調査では [篠田他 2019] ハプログループ M7a1 と N9b のみが検出されている。この二つのハプログループは本土日本の縄文人からも検出されており、日本の基層集団が持っていたハプログループであると考えられている [篠田 2015]。北谷町の貝塚後期遺跡の人骨から、このハプログループを持つ個体が 3 体見いだされたことは、琉球列島では貝塚時代前期から引き続いて、このハプログループを持つ人々が多数を占めていたことを示しているのだろう。なお、このハプログループは現代の沖縄でも多数を占めており [Tanaka et al., 2004], 貝塚時代から現代まで続く琉球列島集団の遺伝的な連続性が示されている。

一方、貝塚時代前期には見いだされていないハプログループである B4 と M7b1 が出現することも示唆的である。弥生時代から平安時代にかけての数百年の歴史の中で、琉球に本土日本から徐々に、弥生時代以降に列島に入ったハプログループを持つ人々が流入し、在来の集団に吸収される形で人口を増やしていった可能性がある。本土日本では弥生時代の開始期以降に朝鮮半島を經由した稲作農耕民が流入して本格的な農耕社会に移行したのに対し、海洋によって隔てられ、稲作農耕に適した耕地をほとんど持たない琉球列島にはその波が急速に訪れることはなかった。この地域に農耕が伝播するのは、考古学的な研究から 10 世紀以降のことと考えられている [高宮 2002]。従って、琉球列島の農耕開始期以前に、本土日本のハプログループが流入するのは、農耕の伝播以外の理由を考える必要がある。南西諸島と九州の間には、弥生時代に「貝の道」と呼ばれる物流の経路が存在したことが知られている [木下 1996]。北部九州の弥生人が用いた貝輪製品の材料となったゴホウライガイやイモガイは、この道を通って運ばれていたとされている。弥生時代以降の本土日本から南西諸島へのヒトの移動は、こういった交易をきっかけとしたものだった可能性も考えられるだろう。

形質人類学や考古学の研究からは、グスク時代の前後に大きな文化的経済的転換とともに、ヒトの形質も大きく変化し、特徴的な貝塚時代人から本土日本の中・近世人と変わらない琉球列島集団が成立したとされている [安里・土肥 1999]。その前後の時期の様子を明らかにするためには、貝塚時代後期の集団の遺伝的な性格を明らかにしておく必要がある。今回、ミトコンドリア DNA のハプログループを決定した個体については、更に詳細なミトコンドリア DNA の全塩基配列を用いた系統解析を進めるとともに、核ゲノムの解析も行っていく予定である。更にこの時代に属する他の遺跡からのサンプルの解析を進めることで、琉球列島における貝塚時代後期人の遺伝的な性格を明らかにしていきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、貴重なサンプルの使用を許可していただいた北谷町教育委員会に感謝いたします。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., 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
- 安達他 2014
- Hanihara K. 1991 Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review*, 2, pp. 1-33
- 安里進・土肥直美 1999 :『沖縄人はどこから来たか』ポスターインク
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0158463
- 木下尚子 1996 :『南島貝文化の研究-貝の道の考古学』法政大学出版局
- 沖縄県北谷町教育委員会編 2008 :『伊礼原 D 遺跡』北谷町文化財調査報告書第 28 集. キャンプ桑江北側返還に伴う発掘調査事業平成 10 ~ 13 年度
- 沖縄県北谷町教育委員会編 2016 :『平安山原 A 遺跡』北谷町文化財調査報告書第 38 集. 桑江伊平土地区画整理事業に伴う発掘調査事業平成 19・21・22・23 年度
- 篠田謙一 2015 :『DNA で語る日本人起源論』岩波書店
- 篠田他 2017
- 篠田謙一・神澤秀明・安達登・角田恒雄・土肥直美 2019 :「貝塚前期を中心とした人骨の DNA 分析」沖縄考古学会, 2019 年 6 月
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020 :「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
- 高宮広土 2002 :「狩猟採集から農耕へ: 沖縄でのケース」『国立民族学博物館調査報告』(33), pp. 257-273, 12-20
- Tanaka M., Cabrera V.M., Gonz-lez A.M., Larruga J.M., Takeyasu T., et al. 2004: Mitochondrial genome variation in East Asia and the peopling of Japan. *Genome Research* 14: pp. 1832-1850
- Umetsu K., Tanaka M., Yuasa I., et al. 2005: Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis*, 26: pp. 91-98

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)

角田恒雄 (山梨大学医学部法医学講座)

安達 登 (山梨大学医学部法医学講座)

土肥直美 (文化財サービス)

(2019 年 5 月 10 日受付, 2019 年 8 月 5 日審査終了)