

愛知県清須市朝日遺跡出土 弥生人骨のミトコンドリアDNA分析

Mitochondrial DNA Analysis of Human Bones of the Yayoi Period
Excavated at Asahi Site, Kiyosu-shi, Aichi Pref.
SHINODA Ken-ichi, KANZAWA Hideaki, KAKUDA Tsuneo and ADACHI Noboru

篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登

I はじめに

朝日遺跡は東海地方西部を代表する弥生時代の遺跡であり、長期にわたる発掘調査によって、おびただしい数の遺物とともに人骨が出土している。1970年代の発掘では弥生中期から後期の人骨6体が発掘されている。その形質は古墳時代人骨に似るとされているが〔江原・木下, 1982〕, 少数例からの結論であるために確実なものではない。その後, 1980年代の発掘調査によっても人骨が出土したほか, 1995年には新たな資料館を建設するために遺跡内部の貝殻山貝塚の南側を発掘調査して, 合計で23体の人骨が出土した。保存状態は個体によって様々で, 中には形態が詳しく分かる個体もあるが, 全体としての集団の特徴は明らかになっていない〔多賀谷・山田, 2000〕。

このような形態学的な研究に対して, 90年代からは人骨に残るDNAの分析を行い, 遺跡から出土した人骨の血縁や系統に関する研究が行われるようになってきている〔例えば Shinoda & Kunisada, 1994〕。人骨の形態とは異なり, DNAは遺伝物質そのものであり, そこから得られる情報も非常に精度の高いものになることが期待される。ただし技術的な制約から, この時点で解析が出来たのは, コピー数が多く経年的な変成を受けても比較的残りやすいミトコンドリアDNAの一部領域だけだった。ミトコンドリアDNAは母系に遺伝するために, この解析で得られるのは母系に関する情報だけとなる。そのための限界も存在した。

一方, 2010年以降になると, 従来の方法とは全く異なる原理でDNA配列を決定する次世代シーケンサ (Next Generation Sequencer; NGS) を用いた研究が古人骨のDNA分析にも用いられるようになった〔たとえば Rasmussen et al. 2010〕。この方法は人骨に残るわずかなDNAを網羅的に解析するので, 両親から遺伝する核DNAや, その一部で父系に遺伝するY染色体DNAの解析も可能である。ある程度DNAの残りの良いサンプルを選定する必要があるが, この方法の古人骨への応用は, ミトコンドリアDNAの分析とは比較にならないほど精緻な情報を引き出すことを可能にした。

現在では, このNGSを使った研究が急速に進んでおり, 日本人の成立のシナリオも, NGSが生み出す情報をもとにして組み立てられるようになってきている〔たとえば Kanzawa-Kiriyama et al.

表1 研究に用いた朝日遺跡IV出土人骨及びAPLP分析の結果

No.	サンプル名	採取部位	性別	年齢	M/N	細分 APLP
1	IAS 95 No.1	右側頭骨	不明	14歳以上未成年	ND	—
2	IAS 95 No.2	右側頭骨	男性	20-25歳	ND	—
3	IAS 95 No.3	左側頭骨	男性	20歳台半ば	ND	—
4	IAS 95 No.5	右側頭骨	不明	4歳前後	ND	—
5	IAS 95 No.6	右側頭骨	男性	30歳台半ば	ND	—
6	IAS 95 No.8	右側頭骨	女性	25歳前後	ND	—
7	IAS 95 No.9	左側頭骨	不明	4-5歳	ND	—
8	IAS 95 No.12	右側頭骨	女性	40歳以上	M8の可能性	C1の可能性
9	IAS 95 No.13	右側頭骨	男性	20歳台前半	B	B4c
10	IAS 95 No.22	右側頭骨	女性	20歳台	Nの可能性	N9a

- * 性別と年齢の判定は[多賀谷・山田2000]による
- * NDは増幅バンドが観察されなかったことを示す
- * 「—」は実験を行わなかったことを示す

2019]。弥生人の遺伝的な特徴についての研究も進んでおり、各地の弥生人の特徴も明らかになりつつある[篠田ほか 2020a・b・c]。ただし、これまでの弥生人研究は、西日本から出土した人骨に偏っている。

自然人類学では、在来の縄文人の世界に、弥生時代の初期に大陸から水田稲作を携えて渡来した集団、いわゆる渡来系弥生人が流入し、両者の混血によって現代日本人が成立したと考えている[Hanihara, 1991]。ただし、この渡来系集団の影響が、どのような形で日本列島全体に及んだのかは捉えきれていない。その中で、朝日遺跡は稲作とともに拡散したと考えられている遠賀川系土器が出土する東の分布限界になる。そのため、この遺跡に居住した人々の遺伝的な特徴がどのようなものであるのかを知ることは、混合の様子を明らかにするために重要となる。

今回、愛知県埋蔵文化財センターのご厚意で、同センターが所蔵する朝日遺跡出土人骨のDNA解析を行う事ができた。ただし朝日遺跡の人骨の多くは泥湿地から出土したために保存状態の悪いものが多い。そのため、今回の研究では、提供された人骨に解析可能なDNAが残っているかを調べるために、予備的なAPLP法(Amplified Product-Length Polymorphism method)によるミトコンドリアDNA分析を行い、次にNGSを用いたミトコンドリアDNAの全塩基配列の解析を試みることにした。

II 材料及び方法

今回の解析に用いたのは表1に示す10個体である。すべて1995年の発掘調査によって出土したものである。朝日遺跡から出土した人骨は、状態の悪いものが多い。これまでのNGSを用いた研究では、側頭骨に最もDNAが残存することが確認されているので[Sirak et al. 2017]、この部位が残っておりサンプリング可能な個体を解析することにした。

DNAの抽出は[Adachi et al. 2013]に従って行った。抽出したDNA溶液に充分な量のDNAが残っているかを確認するために行ったAPLP法は、[安達ほか2014]と[Kakuda et al. 2016]のプロトコールに従った。

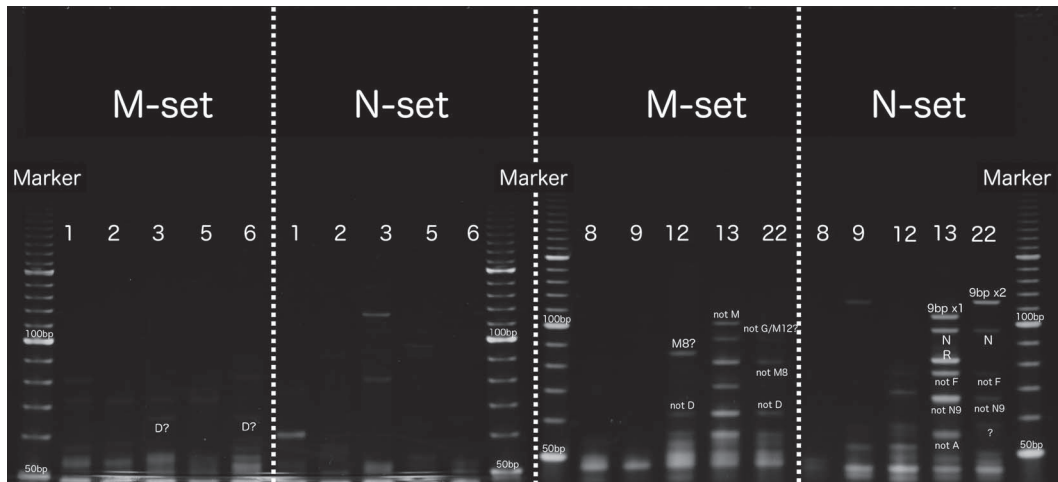


図1 朝日遺跡出土人骨のAPLP分析

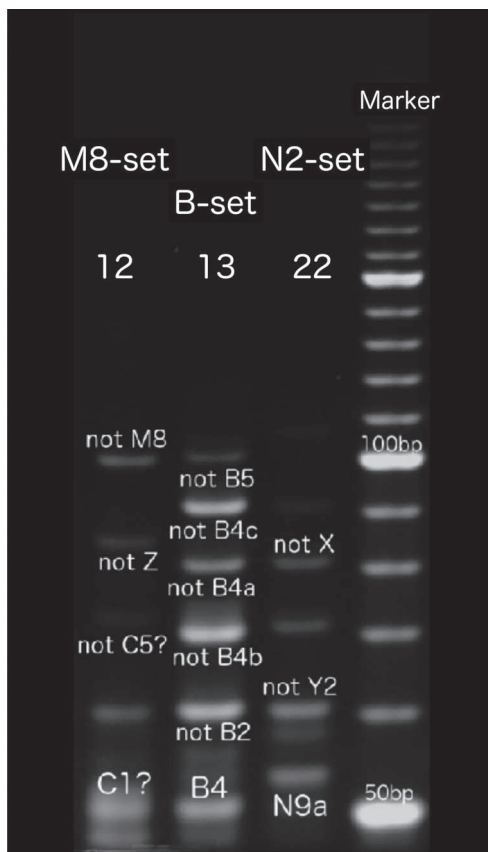


図2 朝日遺跡出土人骨の細分APLP分析

7割のサンプルの分析が可能なので、この遺跡のサンプルは極めてDNAの残りが悪かったことになる。

実際、泥湿地から発掘された朝日遺跡の人骨は黒褐色をしており、通常では付着しない有機物を多量に含んでいることが推測される。低分子の有機物は通常のDNA抽出方法では除去が難しく、

NGS分析のために、[Rohland et al. 2015]の方法を用いてNGS分析用ライブラリの作成を行った。その際に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、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[Marcic 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[篠田ほか2017]の方法に[神澤ほか2020]に示した修正を加えて実施した。

III 結果

図1と2にAPLP分析の結果を示す。マクロハプログループMとNを判定する予備的な分析(図1)では12, 13, 22号を除く7個体ではいずれの増幅バンドも観察されなかった。つまりこの7体から抽出されたDNA溶液には分析可能なDNAが残されていないことになる。通常、古人骨のDNA分析の場合、6～

表2 ミトコンドリアDNA分析の結果

分析個体番号	No.1	No.2	No.3	No.5	No.6
総ペアリード数 (n)	37,319	135,873	23,432	51,281	117,751
ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n)	1	2,803	1	273	295
(%)	0.01%	2.25%	0.01%	0.58%	0.30%
重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n)	1	153	1	46	28
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)	不明	M7a1a	不明	H2a	不明
(Quality)		0.538		0.629	
ハプログループ推定 (1)	不明	M7a1a	不明	不明	不明
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]					
ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] (1)					
APLP					
ハプログループ	—	—	—	—	—

(1) [Kanzawa-Kiriyama et al. 2017] の手法。

No.8	No.9	No.12	No.13	No.22
80,468	202,919	123,967	659,750	268,994
240	75	1,434	94,222	1,344
0.31%	0.04%	1.27%	17.71%	0.56%
42	5	1,258	49,826	314
不明	不明	D4g1b	B4c1a1a1a	H2a2a1
		0.924	0.901	0.500
不明	不明	D4g1b	B4c1a1a1a	不明
		0 [0-0.950]	0 [0-0.005]	
		6.25% [0-14.23]	0.90% [0.40-1.40]	
		C1?	B4c	N9a
—	—	D4g1b	B4c1a1a1a	—

我々のこれまでの経験からも、それがPCR反応を阻害することがある(データ未発表)。朝日遺跡の場合は、元々DNAが分解されていたことと、PCR反応を阻害する物質が存在したことが、成績を悪くした原因であると推測される。

一方、マクロハプログループの解析が可能だった3体については更に細分APLP分析を行った(図2)。その結果、12号については、ハプログループCを示す場所にごく薄いバンドが確認された。13号はハプログループB4c、22号はN9aであることが示唆された。

次にNGSを用いたミトコンドリアDNAの全塩基配列の決定を試みた。通常はAPLP分析でポジティブな結果が得られたサンプルのみを対象とするが、今回は遺跡の持つ重要性に鑑みて、全てのサンプルについて実験を行うことにした。結果を表2に示す。

1, 3, 6, 8, 9号の合計5個体では全くDNAデータを得ることができなかった。一般にNGSは最も感度の高い解析方法だと考えられているが、やはり朝日遺跡人骨にはほとんどDNAが残されていないことが再確認された結果となった。一方、2, 5, 12, 13, 22号人骨では何らかのDNA情報を取得できた。ただし5号に関しては回収されたDNA断片が極めて少なく、またその配列から推測されるハプログループはH2aというヨーロッパ人の持つものだった。恐らく決定できたDNA配列がごく短いものであるためにアーティファクトの結果を見ているのだと思われる。これ

表3 朝日遺跡出土人骨のミトコンドリア DNA ハプロタイプ

個体番号	ハプログループ	個体特異的変異
No.12	D4g1b	—
No.13	B4c1a1a1a	CA16179C, A16183C, T16519C

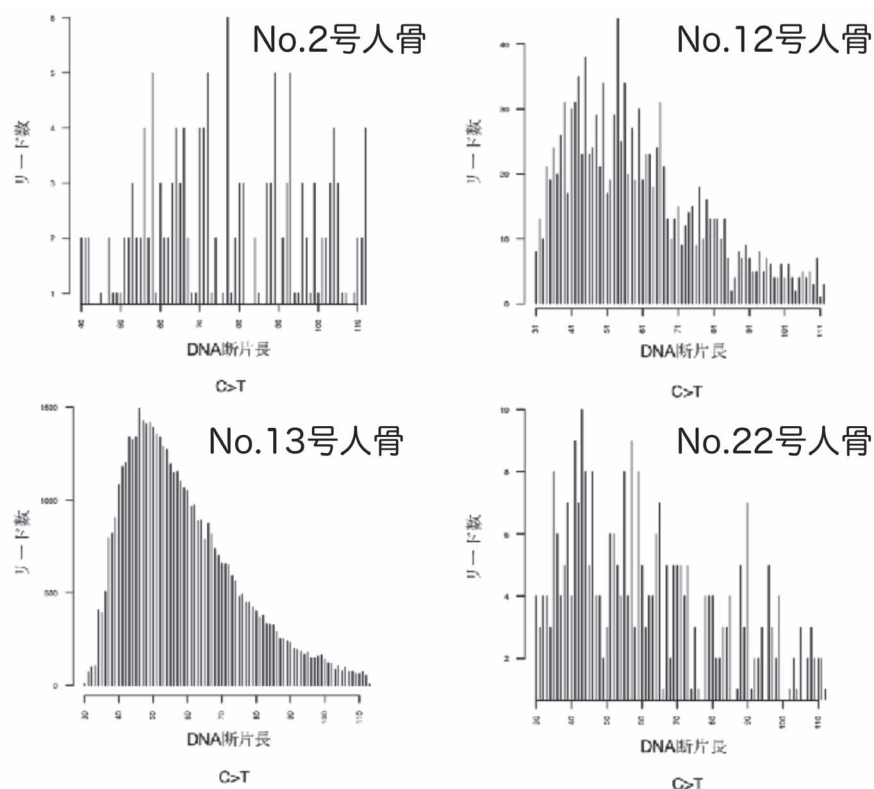


図4 朝日遺跡出土人骨 DNA のリード長

以外の4体については、古代DNAが分析されているかを確認するために、DNA断片の末端の配列を標準配列と比較した。得られたリード（各DNA断片）が古代人に由来するかを調べるために、リード長およびC/T、G/Aの置換率を調べた（図3）。その結果M7a1aと判定されている2号は、末端にC/Tの特徴が見られないので、コンタミの結果を見ていると判断した。DNA断片の末端に古人骨特有の置換が見られた12と13号は、末端での置換が観察され、かつリード長のピークは、いずれのライブラリにおいても100塩基長以下であり、古代DNAの特徴が観察された（図4）ので、古代DNAを解析できていると判断した。なお、特に13号はMtDNAのデータ量も多く、コンタミ率も低いことから、核DNAが可能であることが示唆された。

22号は、APLP分析でハプログループN9aという結果が得られているが、NGSで回収されたミトコンドリアDNA断片は1000以下であり、かつ末端のC/TおよびG/Aの置換も見られないことから、これもアーティファクトの結果であると判断した。結局、NGSを用いてハプログループが決定できたのは、12および13号の2個体で、ハプログループはそれぞれD4g1bとB4c1a1a1aだった（表3）。後者はAPLP分析の結果と一致している。

IV 考察

今回の解析で、保存状態が極めて悪く形態学的な研究からもほとんど情報が得られなかった朝日遺跡人骨から、わずか2体ではあるが、ミトコンドリアDNAハプログループを判定することができた。またNGSを用いた解析は、APLP分析よりも詳細な情報を得ることができることも確認できた。この方法はAPLP分析と比較して、格段に手間と費用がかかるが、今回の結果は、重要な遺跡であれば、骨の状態が悪くてもチャレンジする価値があることを示している。

朝日遺跡の2体が持つハプログループD4g1bとB4c1a1a1aは、これまで縄文人からは検出されておらず、基本的には弥生時代以降に大陸からもたらされたものであると考えられる。朝日遺跡は典型的な渡来系弥生人の遺跡と考えられるので、そこに住んでいた住人が、これらのハプログループを持っていたとしても不思議ではない。そこからは北部九州に渡来した稲作農耕民が、数を増やしながら東進したというシナリオが想像される。ただしミトコンドリアDNAは母系に遺伝するので、混血の状況を理解するためには更に解析個体数を増やす必要があり、今回の結論は限定的である。遺跡から出土した人骨の大部分がDNAを含まないことが予想される以上、この問題は少数例の核DNA解析を行うことで結論を確かなものにするしかない。今後、13号人骨の核DNA解析を進めることで、混血の状況についての理解を進めることにしたい。

現代日本人における比率は、D4g1が3.1%、B4c1は3.8%である[Yamamoto et al. 2020]。どちらも中部地方で若干比率が高いという特徴を持っている。この結果は、このハプログループが弥生時代から中部地方で比較的多数を占めていたことを示している可能性がある。すでに東海地方では縄文人についても核DNAの情報が得られている[McColl et al. 2018]。中部地方での年代幅を広げた解析が進めば、時代と共にどのように遺伝子が増えたか、あるいはなかったのかを理解できるはずで、これも今後の課題としたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、資料の提供などにご尽力いただいた愛知県教育委員会生涯学習課文化財保護室主任主査の原田幹氏に感謝いたします。なお、本研究は文部科学省科学研究費補助金の新学術領域（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。

参考文献

- Adachi N., Sawada J., Yoneda M., et al. 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.
- 安達登・狸々英紀・梅津和夫 2014: 「東アジア人集団のミトコンドリアDNA多型解析を目的とした新しいAPLPシステム」『DNA多型』22 (1) : pp.140 ~ 143.
- 江原昭善, 木下実 1982: 「朝日遺跡出土人骨について」『朝日遺跡I』愛知県教育委員会. pp.249 ~ 251.
- Hanihara, K. 1991: Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review*, 2: pp.1-33.
- Kakuda, T., Shoji, H., Tanaka, M., et al. 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.
- Kanzawa-Kiriyama H., Jinam A.T., Kawai Y., Sato T., Hosomichi K. et al. 2019: Late Jomon male and female genome sequences from the Funadomari site in Hokkaido. Japan. *Anthropological Science* 127 (2) : pp.83-108.
- 神澤秀明・角田恒雄・安達登・篠田謙一 2020 : 「鹿児島県宝島大池遺跡 B 地点出土貝塚前期人骨の DNA 分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 219 集, pp.253 ~ 259.
- Maricic T., Whitten M., and Pääbo S. 2010: Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE* 5 (11) : e14004.
- McColl H., Racimo F., Vinner L., Demeter F., Gakuhari T., Moreno J.V., et al. 2018: The prehistoric peopling of Southeast Asia. *Science* 361, pp.88-92.
- 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.
- 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.
- Shinoda, K. & T. Kunisada, 1994: Analysis of ancient Japanese society through mitochondrial DNA sequencing. *Int. J. Osteoarchaeology* 4: pp.291-297.
- 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 2020a. 「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 2020b : 「鳥取県鳥取市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 2020c : 「福岡県那珂川市安德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.
- Sirak K.A., Fernandes D.M., Cheronet O, et al. 2017: A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *BioTechniques* 62: pp.283-289 (June 2017) doi 10.2144/000114558.
- 多賀谷昭・山田博之 : 2000 「朝日遺跡出土の人骨について」『朝日遺跡 VI』—新資料館地点の調査—, 愛知県埋蔵文化財センター, pp.557 ~ 574.
- Yamamoto K., Sakaue S., Matsuda K., Murakami Y., Kamatani Y., Ozono K., Momozawa Y., Okada Y. 2020: Genetic and phenotypic landscape of the mitochondrial genome in the Japanese population. *COMMUNICATIONS BIOLOGY* 3:104, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0812-9> | www.nature.com/commsbio.

篠田謙一 (国立科学博物館人類研究部)

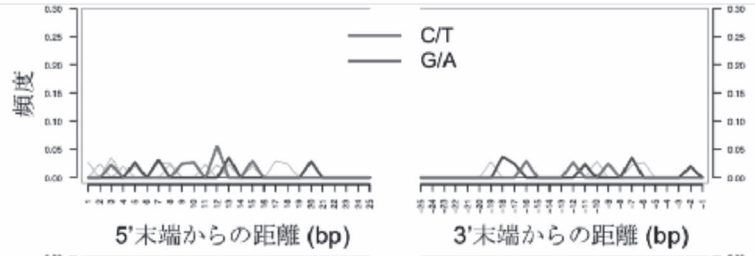
神澤秀明 (国立科学博物館人類研究部)

角田恒雄 (山梨大学医学部法医学講座)

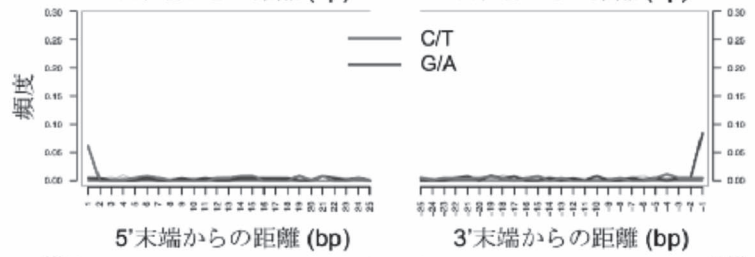
安達 登 (山梨大学医学部法医学講座)

(2020 年 4 月 9 日受付, 2020 年 8 月 20 日審査終了)

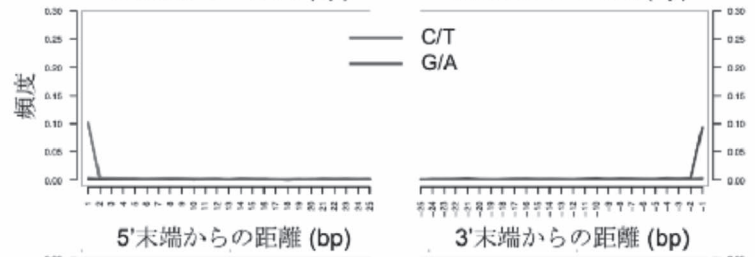
No.2号人骨



No.12号人骨



No.13号人骨



No.22号人骨

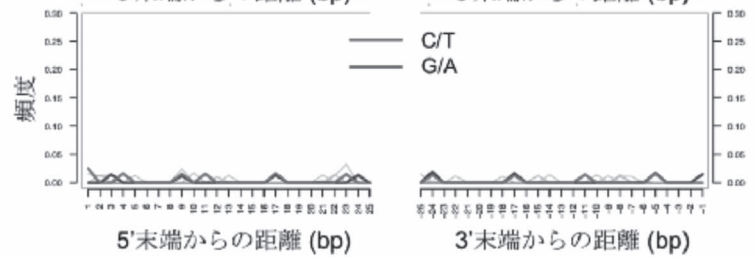


図3 朝日出土人骨 DNA 末端の C/T, G/A 置換