

大阪府堺市野々井二本木山古墳出土 人骨のミトコンドリアDNA分析

Mitochondrial DNA Analysis of Human Bones of the Kofun Period
Excavated at Nonoi-Nihongiyama Kofun, Sakai-shi, Osaka Pref.
SHINODA Ken-ichi, KANZAWA Hideaki, KAKUDA Tsuneo, ADACHI Noboru and SEIKE Akira

篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登・清家 章

I 調査の概要

清家章・篠田謙一と国立歴史民俗博物館（以下、歴博）の藤尾慎一郎は、大阪府堺市野々井二本木山古墳から出土した古人骨の年代測定とDNA分析を行うため、2019年4月22日に大阪府文化財調査事務所におもむいた。後述するように本古墳には2体の人骨が埋葬されており、これらの人骨から、DNA用と年代測定・食性分析用の試料を採取し、前者については国立科学博物館（以下、科博）が、後者については歴博が持ち帰って、それぞれ分析を行った。これらのDNA分析を行ったので報告する。

II 遺跡の概要と資料の考古学的特徴

1. 古墳の概要

野々井二本木山古墳は、大阪府堺市野々井に所在する古墳である。松林を開墾中に和泉砂岩製の刳拔式石棺が見つかり、その中から2体の人骨が頭位を同じ方向に向けて葬られていたという〔藤沢1962〕。棺蓋と棺身の合わせ目から刀が一本検出されたほかは、副葬品は存在しなかった。この古墳は大阪府教育委員会によって1977年に再調査され、その結果、直径13m程度の円墳であることが判明している〔中村・宮野1990〕。出土した2体の人骨は、両者ともに頭蓋がよく遺存している。埋葬の先後関係は不明であるが、概報の記載からは埋葬姿勢や追葬時の片づけについての記述が特に無いことから、2体の人骨は自然な姿勢で棺内にあったものと推察する。この想定が正しいとすると、初葬者が埋葬されて追葬者が葬られるまでの時期的間隔は長期には至らないと考えられる。

2. 副葬品と古墳の時期

上記の通り副葬品は刀1本だけで、それ以外に遺物は知られておらず、古墳の築造年代を決める手がかりに欠けるが、刳拔式石棺の形態から古墳時代前期末葉～中期前葉に位置づけられる〔和田1994〕。

3. 出土人骨

2体のうち一方は壮年後半から熟年期の男性(209号人骨)であり、もう一方は、頭蓋以外の残りが悪いので確実なことは言えないが、熟年期の女性(210号人骨)であろうとされる[島1959]。

墳丘の規模は小さいが石棺の形状などから、被葬者はこの地域を治めた小首長だと推定されている。被葬者の生きた時代は、日本の古代国家が形成される時期であり、二人の血縁関係や彼らがどのような遺伝的な特徴を持っていたのかには興味を持たれる。

III DNA 分析の方法

1. 古代 DNA 分析の現状と今回の分析

これまで古人骨に由来する DNA 分析は、ミトコンドリア DNA の一部領域を対象としていた。ところが近年では、従来とは異なる DNA 配列の決定法を用いた次世代シーケンサ(Next Generation Sequencer; NGS)が実用化されたことで、古人骨の核 DNA を解析することが可能になっている。例えば[Rasmussen et al. 2010]。これによって両親から受け継いだ遺伝情報の全てを解析することができるようになった。この方法を用いることで、現在では地域集団の成立についての研究は飛躍的に進んでいるだけでなく、例えば[Fu et al. 2016]、被葬者間の血縁関係についての詳細な議論が可能になっている[Sikora et al. 2017]。

このように DNA 研究は古代人の DNA を解析できるようになっているものの、これまで近畿地方の古墳に埋葬された人物に関する DNA 分析の報告はない。そこで本研究では、この古墳に埋葬された被葬者間の血縁関係や各自の遺伝的な特徴を明らかにする目的で、NGSを用いた分析を行うことにした。

ただしこの手法には多額の費用と手間がかかることから、出土した人骨全てに適応できるものでもない。通常は、まず従来法でサンプルに解析に足る DNA が残っているかをチェックし、分析可能と判断されたサンプルのみを NGS の分析に回すという手順がとられている。例えば、[篠田ほか2019]。そこで今回の解析では、APLP 法(Amplified Product-Length Polymorphism method)によるミトコンドリア DNA の簡易分析を行い、次に NGS を用いたミトコンドリア DNA の全塩基配列の決定を試みた。

2. 材料及び方法

野々井二本木山古墳人骨は、1958年に大阪市立大学医学部解剖学講座の島五郎教授によって調査が行われ、現在は大阪府教育委員会によって管理されている。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が、今回は出土した2体(209号と210号)の頭骨が完全に残っており、側頭骨錐体部をサンプリングすることが難しかった。そこで次善の策として、やはり比較的 DNA が残っているとされ[Woodward et al. 1994]、サンプリングも容易な臼歯を対象とした。なおサンプリングした個体の情報を表1に示した。

DNA の抽出は[Adachi et al. 2013]に従って行った。抽出 DNA 溶液に解析に充分な量の 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。

表 1 研究に用いた野々井二本木山古墳出土土人骨及び APLP 分析の結果

| No. | サンプル名 | 採取部位 | 性別 | 細分 APLP | NGS (mtDNA) |
|-----|-------|--------|----|----------------------|-------------|
| 1 | 209 号 | 右上顎 M2 | 男性 | D4 (a,b,g,h,j,o でない) | ND |
| 2 | 210 号 | 左下顎 M3 | 女性 | D4g | D4g1b |

*性別の判定は島 [1959] による

NGS による分析に際しては [Rohland et al. 2015] の方法で NGS 分析用ライブラリの作成を行った。ただし、一般に古人骨から抽出した DNA には、土壌微生物などに由来する DNA が多量に含まれており、人骨自体の DNA はさほど多くはない。そのため、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 [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 [篠田ほか 2017] の方法に [神澤ほか 2019] に示した修正を加えて実施した。

IV 結果と考察

APLP 法で得られた結果を表 1 に示す。またハプログループ D を細分する APLP 法の結果を図 1 に示した。マクロハプログループを判定する APLP 分析では、共にマクロハプログループ M に属することが明らかとなったが、細分 APLP 分析では、210 号に関してはハプログループ D4g であると推定されたものの、209 号は D4 である可能性があることまでしか判定できなかった。

209 号と 210 号について、NGS を用いたミトコンドリア DNA 全配列を決定する実験の結果では、いずれの個体でもミトコンドリア DNA にマップされたリードが多く得られている。最初に得られたリード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。その結果、C/T、G/A の置換率はいずれも断端部で高く (図 2A)、リード長のピークは、いずれのライブラリにおいても 100 bp 以下であり、古代 DNA の特徴が観察された。特に図 2B に示すように、双方のサンプルとも 50 ~ 70 ベース程度の断端が多数を占めており、古人骨に由来する特徴を有していた。

これらの結果から、209 号および 210 号から抽出された DNA は、これらの個体が本来持っていたものであると判断したが、やはり APLP 分析で結果が明確ではなかった 209 号からはあまり多くのミトコンドリア DNA が回収されなかった。そのため 209 号での正確なハプログループ推定はできなかった。上述したように 209 号は、C/T の特徴が見られることから古代 DNA を含むと思われるが、検出した SNPs からでは特定のハプログループに細分できなかった。検出した SNPs とその不一致率などから、コンタミやシーケンス時のインデックスホッピングにより、複数個体のデータが混成していると推察され、その SNPs のパターンは、2 個体の混成であると仮定すると大部分を説明できる。そのうち 1 つはインデックスホッピングによる可能性が高いが、もう 1 つは 209 号が本来持っていたものであるかは現時点では判断できないため、今後追加分析が必要であると考えている。

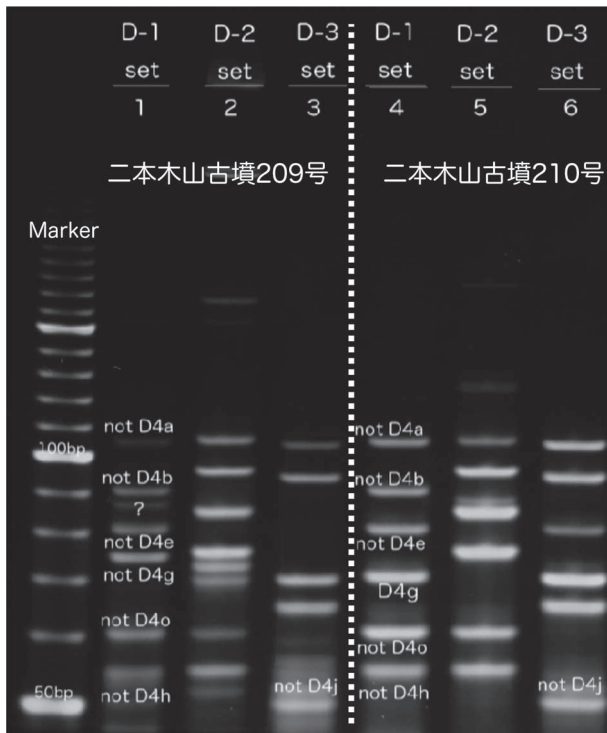


図1 野々井二本木山古墳出土人骨の APLP 分析結果

一方、多くのミトコンドリア DNA 断片を回収できた 210 号ではハプログループは D4g1b であることが判明した。これは APLP 分析の結果と一致している。また個体特異的な変異の蓄積は見られなかったため、典型的な D4g1b ハプログループであると考えられる。210 号でミトコンドリア DNA を使ったコンタミ率（外部 DNA の混入の割合）を推定すると、1.15% 程度となった。これは古代 DNA 分析の結果としては良い値だと考えられ、このサンプルは更に核 DNA の解析も可能であることが示唆された。

ハプログループ D4 の系統は D4b と D4h の一部系統を除いて、これまで縄文人からは検出されておらず、渡来系弥生人と考えられる青谷上寺地遺跡では 2 個体に見いだされている [篠

田ほか 2020]。従って弥生時代以降に日本に流入したものである可能性が高い。自然人類学では、古墳時代は在来の縄文系の人々と大陸から渡来した人々が混合する時代だと考えられており、古墳に埋葬された小首長の持つ母系に遺伝するミトコンドリア DNA が大陸系であることは不思議ではない。ただしその混血の状況は両親の DNA の混合である核 DNA を解析する必要がある。結論は今後行う予定である核 DNA 解析の結果を待つ必要がある。

野々井二本木山古墳人骨は、同一の古墳に埋葬された男女ということでその血縁についても関心が持たれている。歯の歯冠計測値からは夫婦ではなく「キョウダイ」の関係にあることが示唆されている [清家, 2010]。今回の APLP 分析の結果をそのまま解釈すると、両者のハプログループは異なっている可能性があるため、「キョウダイ」ではないことになるが、NGS の結果から判断すると、209 号についてはハプログループを決定できるほどミトコンドリア DNA が残っていなかったことが予想されるので、今回の分析からは結論を導くのは難しい。209 号については、更に側頭骨錐体部などを用いた DNA 解析を行う事で、この問題に結論を出すことが望ましい。

今回の解析は時間と資料的な制約から、得られた結論も中途半端なものにならざるを得なかったが、更に分析を進める事で、この重要な遺跡に埋葬された人物の特徴についての情報を得ることとしたい。

表2 ミトコンドリアDNA分析の結果

| 分析個体番号 | 二本木山 209 | 二本木山 210 |
|-------------------------------|--------------|-------------------|
| インデックス 1 | D503 | D504 |
| インデックス 2 | D703 | D704 |
| 総ペアリード数 (n) | 166,586 | 650,567 |
| ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n) | 3,782 | 122,921 |
| (%) | 2.52% | 22.93% |
| 重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n) | 2,465 | 83,761 |
| ハプログループ推定 (Haplogrep2.0) | R | D4g1b |
| (Quality) | 0.9677 | 0.9928 |
| ハプログループ推定 (1) | 不明 | D4g1b |
| Schmutzi による汚染率推定 [min, max] | 0 [0-0.008] | 0 [0-0.005] |
| ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] (1) | | 1.15% [0.75-1.54] |
| APLP | D4 | D4g |
| ハプログループ | — | D4g1b |

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

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大阪府文化財調査事務所調査管理グループの小浜成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。

註

(1)——本古墳の古人骨資料は長らく大阪市立大学にて保管されており、これらの人骨は 209 号と 210 号の整理番号を与えられていた。本分析においてもこの番号を使用している。

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.
- 藤沢一夫 1962: 「野々井二本木山古墳の調査」『大阪府の文化財』大阪府教育委員会.
- Fu Q., Posth C., Hajdinjak M., Petr M., et al. 2016: The genetic history of Ice Age Europe. *Nature* 534: pp.200-205.
- 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.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020: 「鹿児島県宝島大池遺跡 B 地点出土土人骨の DNA 分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 219 集, pp.257 ~ 264.
- Maricic T., Whitten M., and Pääbo S. 2010: Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE* 5 (11) : e14004.
- 中村浩・宮野淳一 1990: 「二本木山古墳の調査」『陶邑Ⅶ』大阪府教育委員会, pp.137 ~ 141.
- 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.
- 清家章 2010 : 『古墳時代の埋葬原理と親族構造』大阪大学出版会.
- 島五郎 1959 : 「古墳時代人及び石山石器時代人に見た歯牙磨耗について」『人類学雑誌』67 卷3号 : pp.113 ~ 126.
- 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 : pp.25 ~ 43.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020 : 「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.
- Sikora M., Seguin-Orlando A., Sousa VC., Albrechtsen A., Korneliusen T., et al. 2017: Ancient genomes show social and reproductive behavior of early Upper Paleolithic foragers. *Science* 358, pp.659-662.
- 和田晴吾 1994 : 「近畿の刳拔式石棺—4・5世紀における首長連合体制と棺—」『古代文化』46 卷6号, pp.2 ~ 17, 古代学協会.
- 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)

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)

清家 章 (岡山大学社会文化科学研究科)

(2020年4月9日受付, 2020年8月20日審査終了)

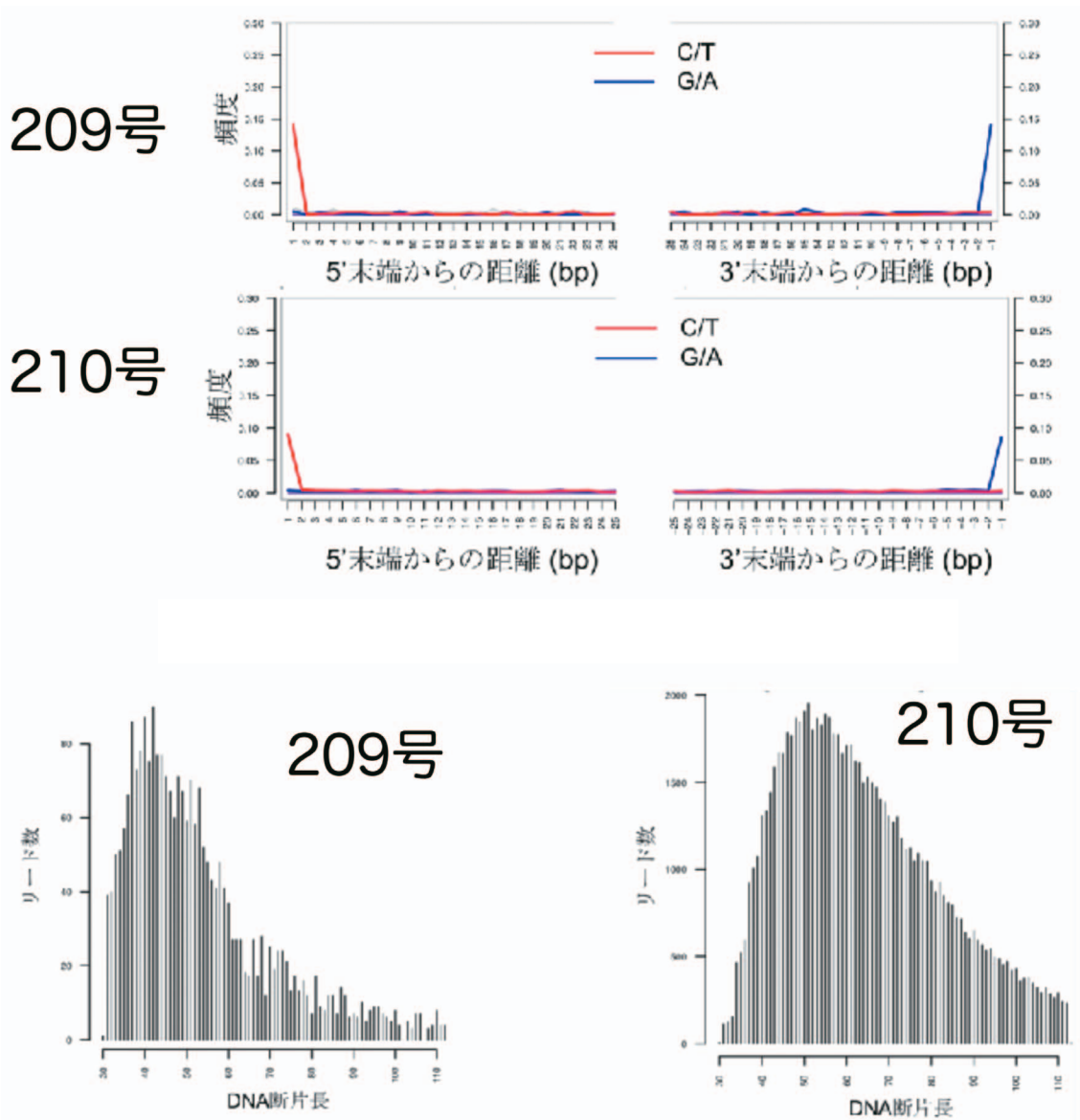


図 2B 回収された各塩基断片の長さ