

南九州古墳時代人骨の ミトコンドリアDNA分析

島内地下式横穴墓群・町田堀遺跡・立小野堀遺跡

Mitochondrial DNA Analysis of Human Bones of the Kofun Period Excavated in South Kyushu. :
Shimauchi Underground Corridor Style Burial Chambers, Machidabori Site
and Tachionobori Site.

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

篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登・竹中正巳

I はじめに

南九州の東側の地域では、5世紀初めから7世紀前半の古墳時代にかけての時代、墳丘を造らず地下の玄室に遺体を葬る地下式横穴墓が造られていた。そこには複数の人骨が埋葬されており、基本的には親族の墓だと考えられている。従って、それぞれの墓地に埋葬された人骨間の血縁関係が分かれば、当時の社会構造について推測する重要な知見を得ることができる。

考古学の分野では、これまで埋葬人骨間の血縁関係は、埋葬状態や副葬品などの情報をもとに推定が行われてきたが、それは必ずしも確実なものとは言い切れない。一方、形質人類学の分野では、歯冠の計測値などをもとにした推定がおこなわれてきたが〔土肥ほか1986〕、実際には歯の形態形成に関する遺伝的なメカニズムには不明な点が多く、その結論は推定の域を出ない。いずれにせよ、文献による資料がない限り、被葬者間の血縁に関して、確実な情報を得ることは難しかった。

しかし近年、古人骨に残るDNA分析が可能になったことで、従来の形態学的な特徴に頼った方法よりも格段に精度の高い推定が可能になっている。特に、DNA情報は同一遺跡に埋葬された個体間の血縁関係の推定に確度の高い情報を提供できるので、DNAの解析によって埋葬人骨間の血縁関係について新たな知見をもたらすことが可能である〔例えばSikora et al. 2017〕。

本研究では、南九州の地下式横穴に埋葬された人骨から集団の遺伝的な特徴や被葬者間の血縁関係を明らかにすることが可能かを知るために、近年古人骨に応用され、大きな成果をあげている次世代シーケンサ（Next Generation Sequencer; NGS）を用いた分析を行うことにした。ただしこの解析には多額の費用と手間がかかることから、出土した人骨全てを分析することは現実的ではない。特に地下式横穴に埋葬された人骨の状態は悪いものが多く、形態学的な研究にも適さないものが多い。そこで今回の解析では、分析の第一段階として、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ることにした。これらの分析を通じて、南九州古墳人

の遺伝的な特徴を捉えるとともに、最終的に血縁関係の推定が可能になるかを調べるための予備的な分析を行うことにした。

I 分析した人骨について

島内地下式横穴墓群は、1905年に短甲と冑が出土して以来古墳群として周知されており、これまで断続的な調査によっておびただしい数の副葬品と共に人骨が出土している。特に南九州山間部における甲冑の出土として周知されている重要な遺跡である。今回分析の対象としたのは、2012年～2015年にかけて行われた緊急調査によって出土した人骨である。この調査では23基の地下式横穴から、少なくとも65体の人骨が出土している。全体としての保存状態は良くないが、なかには全身の形態を保っているものもある。

その形態からは、この墓群に埋葬された人々の特徴は、縄文人的な形質を残す周辺の南九州山間部の古墳人に近似するとされるが、中には高顔性を示すなど、宮崎の平野部と類似した渡来系の形質を持つ個体もあるという。頭蓋小変異22項目の出現頻度データを用いたクラスター分析では、島内は宮崎平野の古墳人や北部九州の弥生人と同じクラスターに属することが示されている〔竹中2017a〕。

立小野堀遺跡は鹿児島県鹿屋市に所在し、2010年～2014年にかけて東九州自動車道の建設に伴って発掘された遺跡で、合計で200基の地下式横穴墓が検出され、30体の人骨の形態学的調査が行われている。

町田堀遺跡も、立小野堀遺跡同様、東九州自動車道の建設に伴う調査によって発掘された遺跡で、地下式横穴墓が88基見つかっている。形態学的な調査が出来たのは12体で、立小野堀と同様に大隅半島の地下式横穴墓から出土した人骨に共通の形態的な特徴を有している〔竹中・下野2016〕。

これまでの研究によって南九州の古墳時代には、宮崎の平野部と山間部で形質の異なる集団が居住していたことが指摘されているが、これまで大隅半島の古墳時代人についての報告は少なく、その実態は知られていなかった。人骨形態を調査した竹中によれば、大隅半島集団は宮崎平野の平野部や山間部とも異なり、山間部集団よりは縄文的な形質が弱く、かつ平野部集団より渡来系の形質が弱いという独特の形質を持つという〔竹中2017b〕。本研究ではこの3つの遺跡から出土した人骨についてDNA分析を試みた。

II 材料および方法

NGSによるDNA解析では、近年側頭骨がサンプル採取部位として選ばれる事が多い。側頭骨錐体の内部にある内耳を取り囲む骨は、密度が高く、かつ外側を骨に包まれていることから、コンタミネーションの影響を受けにくい。これまで行われた多くの研究でも、良好な結果が得られている〔Pinhasi et al. 2013 Sirak et al. 2017〕。そこで本研究でも発掘されたすべての個体のうち、側頭骨がサンプリングできるものを用いることにした。その結果、島内地下式横穴墓群からは3体、立小野堀遺跡3体、町田堀遺跡1体の合計7体をNGS解析用のサンプルとした(表1)。

DNAの抽出は〔Adachi et al. 2013〕に従って実施した。抽出したDNA溶液に充分量のDNAが残っているかを確認するために行ったAPLP法(Amplified Product-Length Polymorphism

表 1 解析に用いた人骨と APLP 分析の結果

No	遺跡名	遺構名	採取部位	年齢・性別	APLP M/N	細分 APLP
1	島内地下式横穴	147 号墓 1 号	左側頭骨	壮年・女性	ND	—
2		148 号墓 3 号	左側頭骨	壮年後期・男性	D4 の可能性	D4a,b,e,g,h,j,o ではない
3		151 号墓 1 号	右側頭骨	成人・性別不明	D4 の可能性	D4b2 の可能性
4	立小野堀横穴	90 号墓	左側頭骨	壮年・男性	M7	M7a1
5		130-3 号墓	左側頭骨	壮年・男性	M8 の可能性	C1 の可能性
6		166 号墓	右側頭骨	壮年・男性	ND	—
7	町田堀横穴	76 号墓	右側頭骨	熟年・性別不明	D4	D4b2

ND は結果が得られなかった事を示す
性別と年齢は [竹中 2016・2017a・b] による

method) は, [安達ほか 2014] と [Kakuda et al. 2016] のプロトコールに従った。

NGS 分析用ライブラリの作製は, [Rohland et al. 2015] の方法に従った。古人骨から抽出した DNA には, 土壌細菌などのヒト以外の生物に由来する DNA が含まれていることが知られている [例えば Green et al. 2010]。そのため, 作製した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, 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 2020] に示した修正を加えて実施した。

III 結果

図 1 と表 1 に島内地下式横穴の 3 体の APLP 分析の結果を示す。マクロハプログループ M と N を判定する分析では, 147-1 号人骨は増幅バンドを確認できなかった。従ってこのサンプルには APLP 分析に必要な量の DNA が残っていなかったことが示唆された。一方, 148-3 及び 151-1 号人骨ではマクロハプログループ M のうちのハプログループ D であることを示すバンドが検出された。そこで, ハプログループ D を細分するプライマーセット, D-1,D-2,D-3 を用いて細分 APLP 分析を行った。その結果, 151-1 号では D4b2 を示すバンドが確認されたが, 148-3 号ではこのプライマーセットで細分できる D4a, b, e, g, h, j, o のいずれのバンドの増幅も見られないことから, ハプログループ D4 の中のそれら以外のサブハプログループに属することが示唆された。

図 2 および表 1 には, 立小野堀遺跡の 3 個体と町田堀遺跡の 1 個体の APLP 分析の結果を示す。マクロハプログループ M と N を分離する分析では, 立小野堀 166 号で増幅が確認されず, この個体にも APLP 分析に必要な DNA が残っていないことが示唆された。一方, 立小野堀 90 号は M7 を示すバンドが増幅したので, 引き続きこのハプログループを細分する APLP 法分析を行い, その結果 M7a1 に属することが示唆された。一方, 130-3 号はいずれの増幅バンドも弱く, DNA 量が少ないことが判明した。ただし, この微弱な増幅結果が正しいとすると, ハプログループ C であることになる。町田堀 76 号はマクロハプログループの分析で D4 であることが示され, 島内地下式横穴のサンプルと同様にハプログループ D の 3 つのハプログループを細分するプライマーセットで分析した結果, D4b2 に分類された。

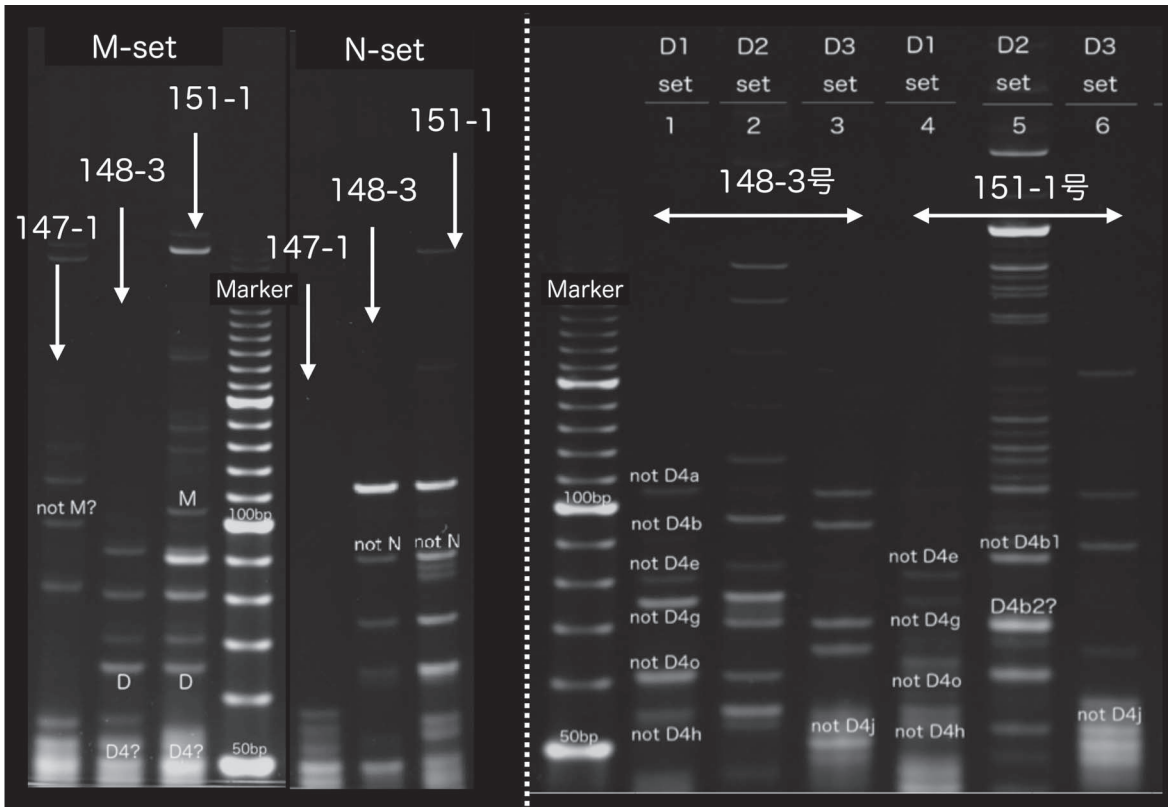


図1 島内地下式横穴墓群のAPLP解析結果

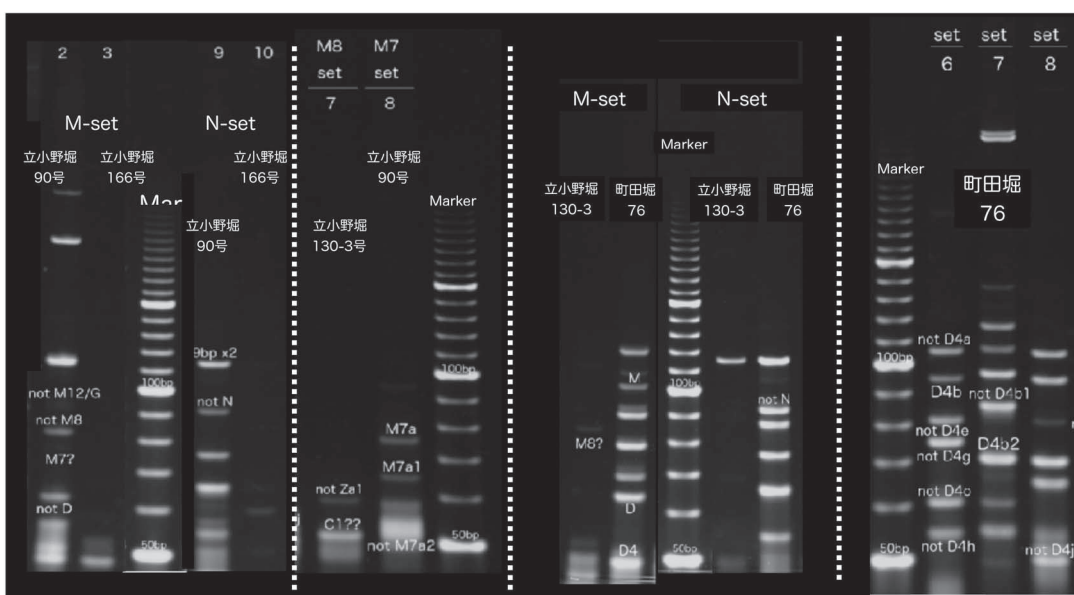


図2 立小野堀遺跡と町田堀遺跡のAPLP解析結果

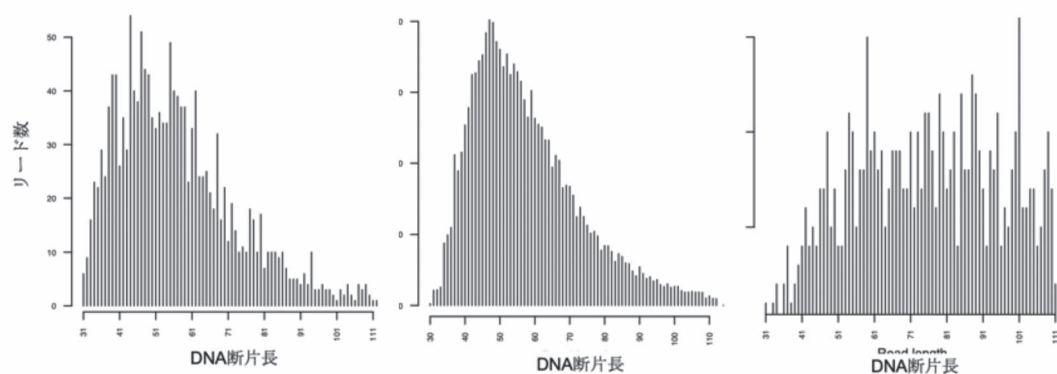
表2 ミトコンドリアDNA分析の結果

分析個体番号	島内 147-1	島内 148-3	島内 151-1	立小野堀 90	立小野堀 130-3	立小野堀 166	町田堀 76
総ペアリード数 (n)	64,639	240,535	108,944	431,611	137,675	806,903	132,204
ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n)	19	1,282	160	17,527	121	60,601	1,187
(%)	0.03%	0.65%	0.16%	4.19%	0.09%	8.86%	1.07%
重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n)	6	695	42	6,714	85	35,481	577
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)	不明	M7a1a2	不明	M7a1a7	不明	D4a1c	D4b2b
(Quality)		0.6909		0.9903		1.0000	0.8094
ハプログループ推定	不明	M7a1a2	不明	M7a1a7	不明	D4a1c	D4b2b
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	-	0.145 [0.04-0.25]	-	0.205 [0.160-0.250]		0 [0-0.005]	
ハプログループ不一致 (%) [不一致数 / 全体]		0% [0/20]		1.82% [0-3.92]		0.84% [0.24-1.44]	
APLP	notM?	D4?	D4b2?	M7a1	C1 の可能性	不明	D4b2
ハプログループ	-	M7a1a2	-	M7a1a7	-	D4a1c	(D4b2)

今回の実験では、APLP 分析と NGS による分析の検出能力の違いを検証するために、全てのサンプルについて、APLP 分析に用いたものと同じ抽出 DNA を用いて、NGS によるミトコンドリア DNA の全配列の解析を試みた。その結果を表 2 に示す。島内地下式横穴の 147-1 は APLP 分析と同様に結果を得ることが出来なかった。また APLP 分析では一応結果が出た 151-1 号は、得られたミトコンドリア DNA 配列が少なく、配列を決定することが出来なかった。一方 148-3 号は APLP 分析とは異なり、ハプログループ M7a1 を持ち、全塩基配列から、この個体のハプログループ M7a1a2 であることが示された。

立小野堀遺跡の 3 体に関しては、APLP 分析で明確な結果の出せなかった 130-3 号では、やはり結果を得ることが出来なかった。一方、APLP 分析でバンドを検出できなかった 166 号では、ミトコンドリア DNA の全配列を決定することができて、そこからこの個体のハプログループは D4a1c であることが判明した。APLP 分析で M7a1 であることが示されていた 90 号は、NGS の分析でも同じハプログループであることが判明し、その細分ハプログループは M7a1a7 だった。以上、島内地下式横穴と立小野堀遺跡では、解析した 6 体のうち、3 体でミトコンドリア DNA のハプログループを決定することが可能だった。

一方、町田堀遺跡 76 号は、APLP 分析で D4b2 であることが示され、NGS を用いた解析でも同様の結果が得られている。しかし、得られた DNA が古人骨に由来するかを示す DNA 断片の長さ、および末端の C/T, G/A の置換率を調べて見ると (図 3, 4, 5)、島内 148-3 号、立小野堀 90,166 号では、DNA 断片の末端に古人骨特有の置換が見られ、またリード長のピークは、いずれのライブラリにおいても 100 塩基以下であり、古代 DNA の特徴が観察されたのに対し、町田堀 76 号では、C/T 置換の特徴が見られず、また DNA 断片長の分布も一様だった。このことから、町田堀 76 号の結果は、現代人によるコンタミネーションの結果を見ているという可能性を排除できず、今回の



立小野堀90

立小野堀166

町田堀76

図4 回収された塩基配列の長さ

結果からは除外することにした。

以上の結果から、解析した7体で、最終的にミトコンドリア DNA のハプログループが決定できたのは3体（島内地下式横穴 148-3号、立小野堀遺跡 90号および166号）だった。APLP分析の結果とNGSの結果は概ね一致していた。しかし、人骨に残るDNAが少なくなるとAPLP分析の結果は安定せず、異なる結果を提示する可能性のあることが判明した。理想的には全てのサンプルについてNGSを用いた分析をすべきだが、費用と手間の問題でそれが難しいという現実がある以上、今回のような併用した研究を積み重ねて、ノウハウを蓄積していくことが必要だと考えられる。なお、立小野堀遺跡の2体はミトコンドリアDNAのデータ量も多く、コンタミ率も低いことから、核DNAが可能であると判断した。

IV 考察

上述したように、南九州では古墳時代に比較的狭い地域に異なる集団が存在したことが形質学的な研究から指摘されている。人骨の形態学的な研究からは、日本人は在来の縄文人と弥生時代に渡来してきた集団が混血することによって形成されたと考えられている [Hanihara 1991]。従って古墳時代は、在来集団と渡来集団の混血が進んだ時代と捉えられ、地域によって遺伝的に異なる集団が棲み分けていたとしても不思議ではない。

南九州では、山間部に縄文系の形質が残り、宮崎の平野部では渡来系が卓越し、大隅半島では両者の混合が進んでいたことが示唆されている [竹中 2017a・b]。これを今回のミトコンドリアDNA分析の結果からどのように解釈できるのかを検討した。

今回検出されたミトコンドリアDNAのハプログループは、M7aとD4aである。このうちM7aは全国の縄文人から検出されており、縄文時代人の主要なハプログループのひとつであるとされている [Adachi et al. 2011]。これが島内地下式横穴と立小野堀遺跡の双方から検出されていることは、共に縄文系の遺伝的な要素を持っていた遺跡であることを示しているのだろう。一方、立小野堀遺跡から検出されたD4a1cはこれまで分析された縄文人には存在せず、大陸渡来のハプログループであると考えられているので、この遺跡では混血が進んでいたことが示唆される。ただし、今回解

析したミトコンドリア DNA の少数例だけからは混血の状況に関する結論を導くことは難しい。更に核 DNA の解析を行ってこの問題を検討することが必要で、今後の課題としたい。

なお、今回判明した南九州の古墳人に見られる M7a1 系統は、縄文時代の南西諸島集団の持つ系統とは異なり、九州本土の縄文人の系統に属するものだった。南九州から南西諸島に至る地域では、長期間に渡って海を隔てた棲み分けが行われていた可能性がある。中世になると、奄美群島でも人口が増加し、人骨の出土例も増えるが、その集団の由来を知るためにも、今回の南九州古墳人の DNA データは重要なものになるはずである。引き続き、解析個体数を増やして地域集団の遺伝的な特徴を明らかにしていくことを目標としたい。また、立小野堀遺跡の 2 体は核 DNA の解析も可能であるという見通しがついたことから、更に同一墳墓に埋葬された個体間の血縁を DNA 解析によって明らかにする試みを続けていきたい。

謝辞

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., 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., 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・猩々英紀・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.
- 土肥直美・田中良之・船越公威, 1986 : 「歯冠計測値による血縁者推定法と古人骨への応用」『人類学雑誌』, 94-2, pp.147 ~ 162.
- Green R.E., Krause J., Briggs A.W., Maricic T., Stenzel U., et al. 2010: A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 328: pp.710-722.
- 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.
- 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.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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sikora M., Seguin-Orlando A., Sousa VC., Albrechtsen A., Korneliussen T., et al. 2017: Ancient genomes show social and reproductive behavior of early Upper Paleolithic foragers. *Science* 358, pp.659-662.
- 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 doi 10.2144/000114558.

竹中正巳, 下野真理子 2016:「鹿児島県鹿屋市町田堀遺跡地下式横穴墓群出土人骨」『町田堀遺跡』鹿児島県文化振興財団文化財調査センター発掘調査報告書第7集. pp.1～8.

竹中正巳 2017a:「宮崎県えびの市島内地下式横穴墓群出土の人骨—131号墓～162号墓から出土した人骨—」『島内地下式横穴群』えびの市埋蔵文化財調査報告書第54集. pp.281～292. 宮崎県えびの市教育委員会.

竹中正巳 2017b:「鹿児島県鹿屋市立小野堀遺跡地下式横穴墓群出土人骨」『立小野堀遺跡I』鹿児島県文化振興財団文化財調査センター発掘調査報告書第16集. pp.335～337.

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)

竹中正巳 (鹿児島女子短期大学)

(2020年4月9日受付, 2020年8月20日審査終了)

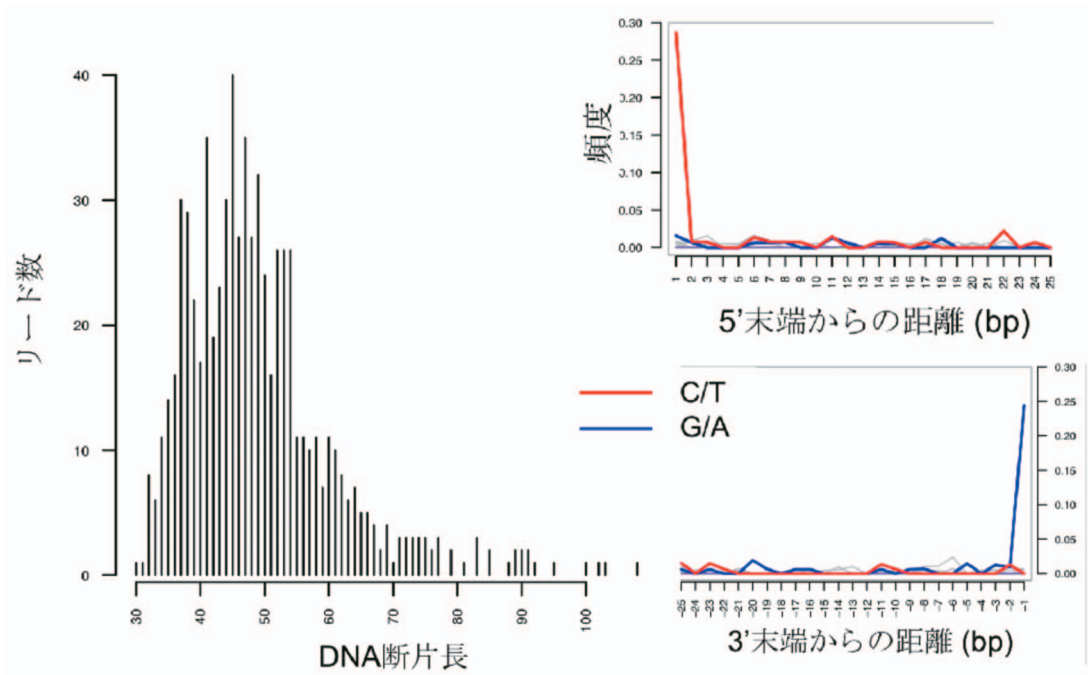


図3 配列の末端における C/T および G/A の置換

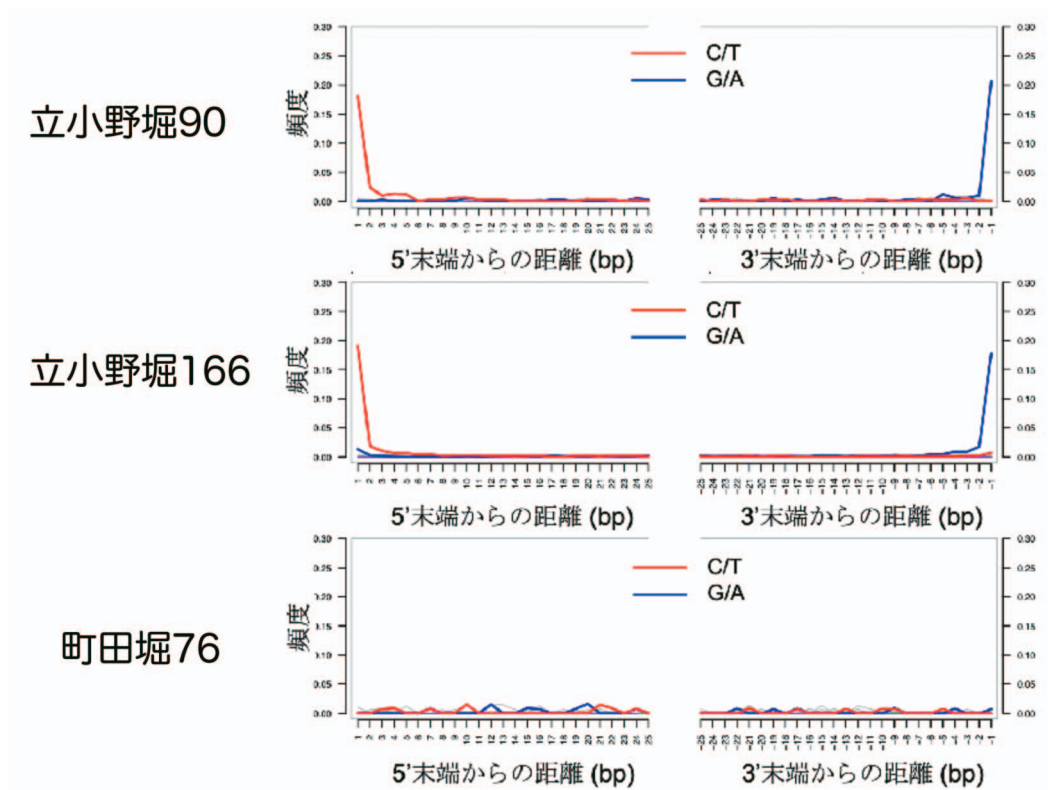


図5 配列の末端における C/T および G/A の置換