

鹿児島県南種子町広田遺跡出土 人骨のミトコンドリアDNA分析

Mitochondrial DNA Analysis of Human Bones Excavated at Hirota Site,
Minamitane-cho, Kagoshima Pref.
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

広田遺跡は、鹿児島県種子島南種子町にある弥生時代後期後半から古墳時代併行期（3世紀から7世紀頃）にかけて形成された集団墓地遺跡である。これまでの発掘調査で、合計158体の人骨とおびただしい数の貝製品が出土している。弥生時代から古墳時代にかけて行われた北部九州と南西諸島の貝交易のルート上にあることから、この時代のヒトとモノの流通に重要な役割を果たした遺跡だと考えられている [木下 2020]。

人骨の形態は極端な短頭で、成人男性で平均約154cm、女性で平均約143cmと小さく、この時代の北部九州の弥生人と比べて極端に小さい。その特異な形質から「南九州弥生人」としてまとめられている [中橋 2019]。広田遺跡の人々の系統は、南島の貝文化について考察する上で、重要な情報を提供すると考えられるが、その起源と周辺集団との関係については、現状では自然人類学的な研究からは確定的な結論が出ていない。

2003年から2006年にかけて行われた発掘調査で出土した人骨については、ミトコンドリアDNAの予備的な研究が行われている [篠田 2007]。しかし、この時代の分析技術では得られるDNA情報もそれほど精緻なものではなく、結論も限定的なものに留まっている。一方、2010年より古人骨に本格的な応用が始まった次世代シーケンサ（Next Generation Sequencer; NGS）は、核DNAの解析も可能にしたので、その後の古代DNA分析に大きな進展をもたらした [例えば Rasmussen et al. 2010]。そこで、本研究では2005年に発見された1体について、この方法を用いてミトコンドリアDNAの全DNA解析を行うことにした。

II 材料及び方法

今回分析に用いたのは、2005年に南種子町教育委員会が行った発掘調査で得られた南区2号墓人骨である。これまでのNGSを用いた研究では側頭骨が最もDNAが残存することが確認されているので [Siraki et al. 2017]、この部位をサンプリングした。その際は側頭骨の形状をなるべく壊すことなく行う為に、錐体部の上面にドリルで小さな穴を空けて、そこから内耳にアプローチする

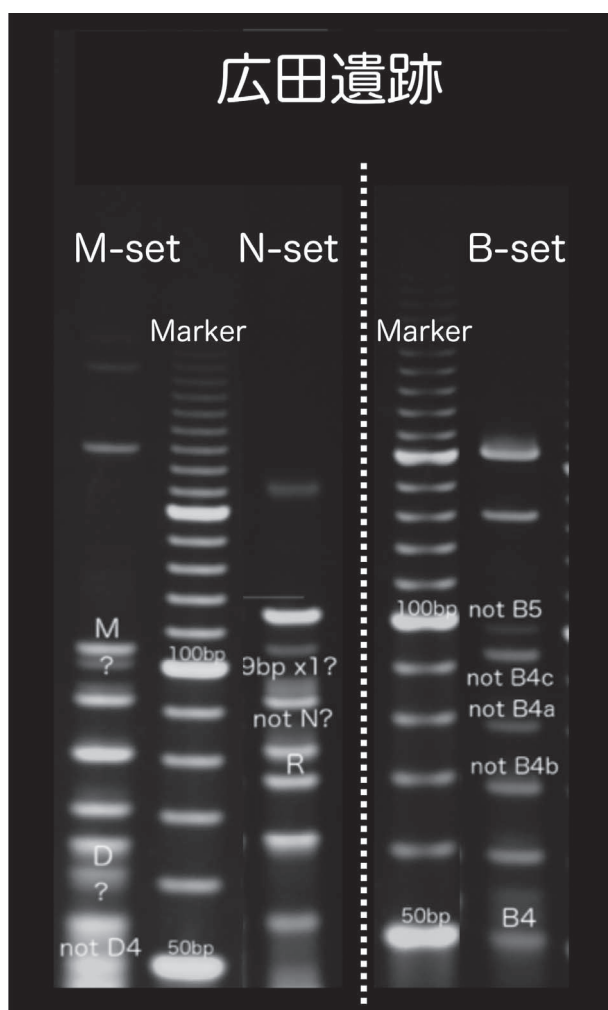


図1 広田遺跡出土人骨のAPLP解析結果

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 [Green et al. 2010]。このようなライブラリから効率的に古代人の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断片のみを、[Maricic et al. 2010]の方法を用いて濃縮した。

塩基配列の決定にはMiSeq (Illumina社)を用い、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]の方法を用いて行った。DNAデータの信頼性の確認には、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と [Briggs et al. 2007]、古代DNAではほとんどが100塩基以下の長さに断片化しているという事実を利用した [Sawyer et al. 2012]。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、ヒト標準配列と比較すると、末端でチミン塩基として観察される (以下C/Tと記載) 部位とグアニン塩基がアデニン塩基に置換される部位 (以下、G/Aと記載) が増加する。そこで、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否かを判定した。

ことで試料粉末 (約200mg) を採取した。DNAの抽出は [Adachi et al. 2013] に従って行った。最初に、コンタミネーションを防ぐために、側頭骨の表面をDNA除去液 (DNA Away, Molecular Bio Products) で拭き上げた後に、再度DNase/RNase freeの滅菌蒸留水で拭き取った。更にUVリンカーにより、45分間の紫外線照射を上下面の双方に対して行って外在性のDNAを除去した。

最初に、抽出したDNA溶液に解析に十分な量のDNAが残っているかを確認するために、APLP法 (Amplified Product-Length Polymorphism method) によるミトコンドリアDNAハプログループ分析を行った。解析は [安達ほか2014] と [Kakuda et al. 2016] の方法に従って実行した。

次にNGSを用いたミトコンドリアDNAの全塩基配列を決定するために、[篠田ほか2017]の方法に従って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

Ⅲ 結果

APLP 解析の結果を図 1 に示した。抽出 DNA に対し、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、双方のセットで増幅が確認できた。この結果から、南区 2 号墓人骨では、少なくとも APLP 解析に充分な量の DNA が回収されたことが判明した。更に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、2 号はハプログループ B4 にアサインされたが、更に B4a, B4b, B4c を細分するプライマーでは分離できなかったため、B4 に属するものの、他のサブハプログループの系統である事が示唆された。

NGS 分析の結果では、DNA 末端では高い頻度でシトシン塩基の脱アミノ化が観察され (図 2A)、かつ各断片の長さも大部分が 100 塩基以下であることが判明した (図 2B)。従って南区 2 号墓人骨から回収された DNA は、この人物が本来持っていたものと判断された。

配列情報から得られた結果を表 1 に示す。ミトコンドリア DNA に由来する DNA 断片 (リード) は、それ程多くはないが、ハプログループ推定に十分なリード数を得ることができている。このデータから推定された南区 2 号墓人骨が持つハプログループは B4 に属しており、これは APLP 分析の結果と一致している。ただし、B4f のサブハプログループである B4f1 の持つ変異は存在しなかったため、その祖型から派生したハプロタイプであると考えられる (B4f* と記載した)。

Ⅳ 考察

これまでの研究では、南西諸島では縄文時代相当期には、ミトコンドリア DNA のハプログループは M7a1 系統が卓越することが知られている [篠田ほか 2019a]。形態学的には南方の縄文人の系統と考えられている広田遺跡の人骨も、このハプログループを持つことが予想されたが、実際は B4f という、これまでに縄文人から検出されたことのないものだった。このハプログループの現代

表 1 ミトコンドリア DNA 分析の結果

分析個体番号	広田遺跡南区 2 号墓
インデックス 1	D501
インデックス 2	D711
総ペアリード数 (n)	294,426
ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n)	16,542
(%)	5.80%
重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n)	7,919
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)	B4f
(Quality)	0.7711
ハプログループ推定 (1)	B4f*
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	0.560 [0.530-0.590]
ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] (1)	4.13% [2.12-6.13]
APLP	B4 (a,b,c でない)
ハプログループ	B4f*

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

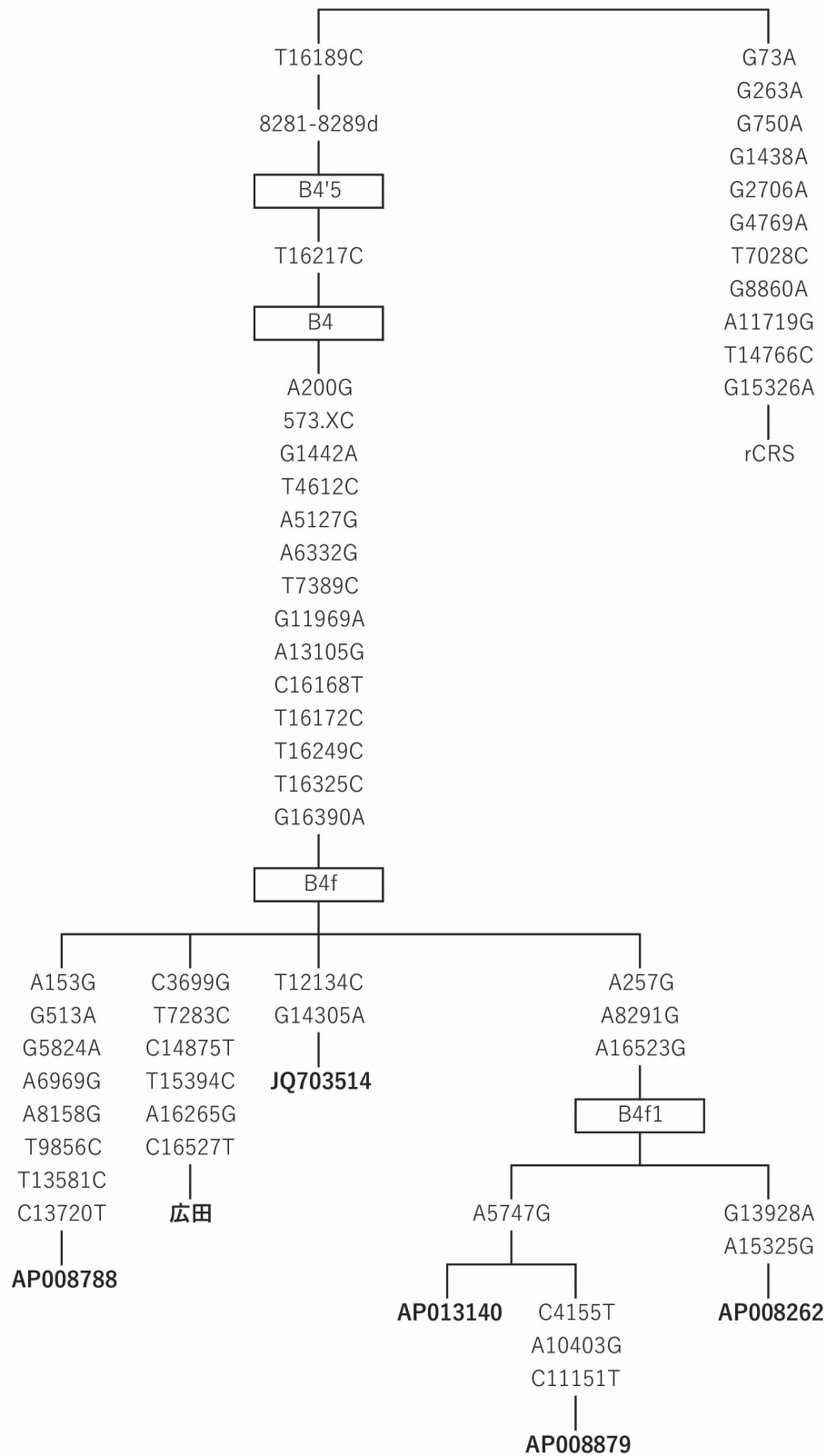


図3 系統樹

日本人に占める割合は 0.7%であり、中部地方でやや多いことが報告されている [Yamamoto et al. 2020]。

次にこれまで報告されている現代人のハプログループ B4f を持つ個体のミトコンドリア DNA の全塩基配列と、南区 2 号人骨の配列を用いた系統樹を作製した (図 3)。B4f に分類される個体はこれまで 5 体報告されているが、地域不明の 1 体を除きすべて日本人である。そのうち 3 体は B4f1 に分類されたが、広田の系統はそれとは別の系統となる。つまり、日本人に多数を占める B4f1 が成立する以前に分離した系統である。解析した個体数が少ないので結論は限定的にならざるを得ないが、これまで報告があるのが日本人に限定されることから、この系統は日本列島で誕生したと考えることもできる。

この人物の生きた時代は、炭素 14 年代測定によって古墳時代相当期であることが判明している [竹中ほか 2021]。従って、このハプログループは弥生時代以降の渡来系集団から持ち込まれたものとも考えられる。一方で、その形態は明らかに在来系の特徴を残しているので縄文人の系統と判断できるが、同じく縄文人の系統と考えられる西北九州弥生人では、形態的に縄文系と推定される個体でも DNA を解析すると渡来系集団の影響を受けているものがあることが知られている [篠田ほか 2019b]。従って、この個体の由来を正確に捉えるためには、核 DNA の解析を行うしかない。幸いなことに本サンプルでは、コンタミ率は少し高いものの、核 DNA 分析は可能であると判断されている。今後は、試料の重要性を考えて核 DNA 分析を進める予定である。

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 DNA 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・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.
- Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F., 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.14616-16621.
- Green R.E., Krause J., Briggs A.W., et al. 2010: A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 328: pp.710-722.
- 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., Kryukov K., Jinam T., 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.
- 木下尚子編 2020: 『広田遺跡の研究—一人の形質・技術・移動—』平成 29 年度～令和元年度科学研究費補助金基盤研究 (B) 研究報告書, 熊本大学人文社会科学部。
- Maricic T., Whitten M., and Pääbo S. 2010: Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE* 5(11): e14004.

-
- 中橋孝博 2019:『日本人の起源—人類誕生から縄文・弥生へ—』講談社学術文庫。
- 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.
- 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.
- 篠田謙一 2007:「種子島広田遺跡出土人骨のDNA分析」『廣田遺跡』南種子町埋蔵文化財発掘調査報告書(15), pp.187～191.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2017:「佐世保市岩下洞穴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・安達登・角田恒雄・土肥直美 2019a:「貝塚前期を中心とした人骨のDNA分析」『沖縄考古学会2019年度研究発表会資料集』pp.25～26.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2019b:「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分析—」『Anthropological Science (Japanese Series)』127: pp.25～43.
- 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.
- 竹中正巳・坂本稔・瀧上舞 2021:「鹿児島県南種子町広田遺跡出土人骨の年代学的調査」『国立歴史民俗博物館研究報告』第228集, pp.427～432.
- 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)

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)

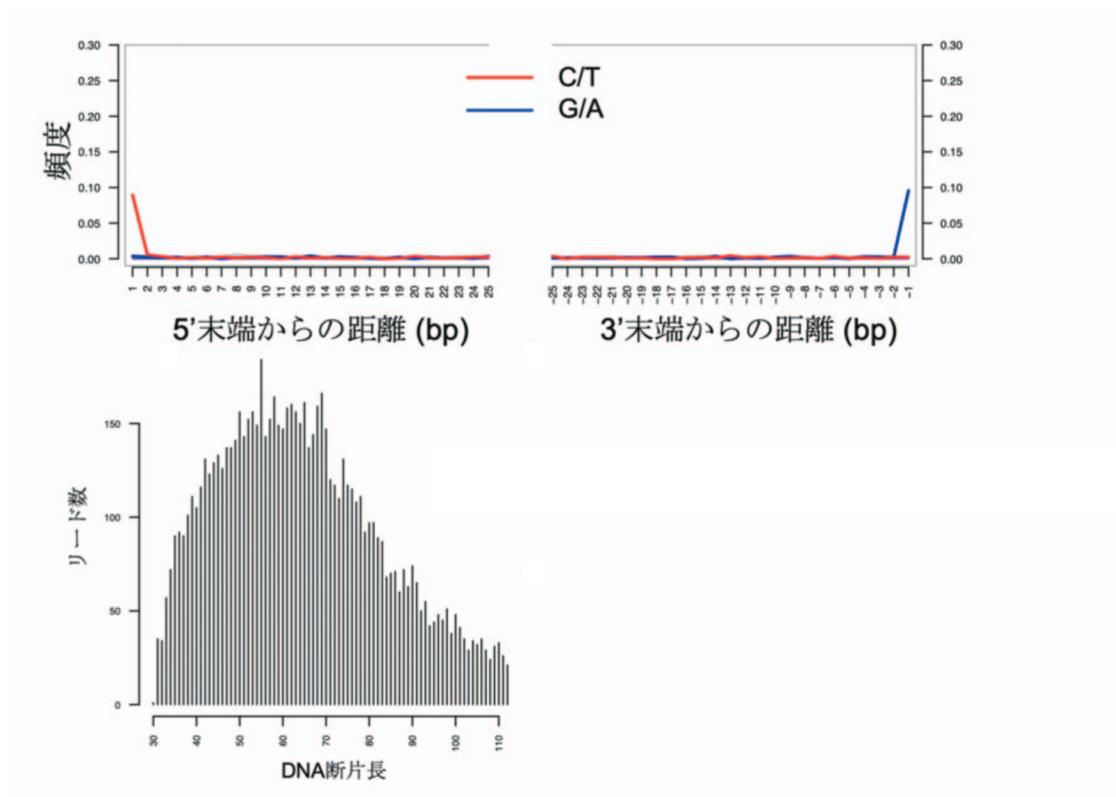


図2 A: 配列の末端における C/T および G/A の置換, B: 回収された各塩基断片の長さ