

韓国高霊池山洞44号墳出土 人骨のミトコンドリアDNA分析

Mitochondrial DNA Analysis of Human Bones Excavated from
Jeoksan-dong No.44 Tumulus, Jinsan-dong, Goryeong, Korea.
SHINODA Ken-ichi, KANZAWA Hideaki, KAKUDA Tsuneo, ADACHI Noboru,
SEIKE Akira, LEE Jaefan and PARK Cheunsoo

篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登
清家 章・李在煥・朴天秀

I はじめに

これまでの形質人類学の分野の研究では、現代日本人の形成を考える際に重要なのは、縄文人と弥生人の関係とされ、多くの研究が行われてきた [中橋 2019]。その結果、現在では基層集団である縄文人の社会に、大陸から水田稲作と金属器の技術を持った渡来系弥生人が進入し、本州を中心とした地域では、両者の混合によって現代日本人が成立したと考えられている [Hanihara 1991]。一方、古人骨を用いた DNA 分析が進んだことで、渡来系弥生人の遺伝的な特徴も明らかとなりつつあり [例えば篠田ほか 2019a・b]、両者の混合の状況をより正確に把握することが可能になっている。ただし、渡来系弥生人の故地であると考えられる朝鮮半島の弥生～古墳時代相当期の人骨の DNA 分析は行われておらず、肝心の渡来人の遺伝的な性格が不明なために、その実態を知ることはできていない。

II 遺跡の概要

今回、韓国慶北大学校博物館・慶北大学校人文大学考古人類学科のご好意によって、朝鮮三国時代の古墳出土人骨として有名な、慶北高霊池山洞 44 号墳という首長墓から出土した人骨の DNA 分析を行う機会を得た。

池山洞 44 号墳は、慶尚北道高霊郡に所在する。5 世紀後葉に位置づけられる大加耶の王墓である。直径 25～27 m の墳丘を持ち、墳丘中央に長さ 9.4 m × 1.75 m の大型竪穴式石室（主槨）を持つ。30 以上の殉葬墓が主槨を取り囲むような状態で見つかり、残念ながら主槨の人骨は失われていたが、殉葬墓からは多くの人骨が発掘されている。これらの人骨から直接渡来系弥生人の遺伝的な特徴を推定することはできないが、この時期の朝鮮半島南部の集団の遺伝的特徴を知ることは、弥生から古墳時代にかけての日本列島集団の成り立ちを知る上で、重要な情報を提供すると考えられる。

表1 実験に用いた池山洞44号墳サンプルとAPLP分析の結果

No.	サンプル名	採取部位	備考	M/N	細分APLP
1	No.13-1	右側頭骨	壮年男性	G/M12	G2
2	No.20	右側頭骨	壮年女性	N9 または B	B4c
3	No.27-1	下顎左 M1	小児	D (not D4)	D5b
4	No.30	上顎右 M3	壮年男性	B	B5

今回の研究では、提供された人骨に解析できる DNA が残っているかを調べるために、予備的なミトコンドリア DNA 分析を行い、更に次世代シーケンサ (Next Generation Sequencer;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たので、報告する。

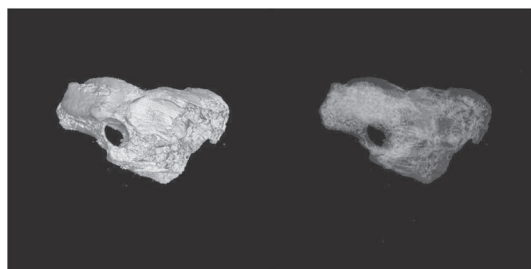
III 材料及び方法

今回の解析に用いたのは表1に示す4個体である。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ので [Sirak et al. 2017], この部位を解析用のサンプルとした。ただし、側頭骨のサンプリングが出来なかった2個体については、従来の研究では歯が最もDNAが残っているとされてきた [Woodward et al. 1994] ことから臼歯を用いた。

今回の分析では、後の形態学的な研究への影響をなるべく軽減するために、臼歯と側頭骨ともに左右が揃っている個体の片方を使った。また、側頭骨のサンプルを採取する際には、事前に μ CT(島津製作所 InspeXio SMX-225CT)を使って側頭骨錐体の内部をX線撮影し、データとして保管した(図1および図2)。また、骨粉のサンプリングは、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開けて、そこから内耳にアプローチすることで試料粉末(約200mg)を採取した。臼歯に関しては、精巧なレプリカを作成した。

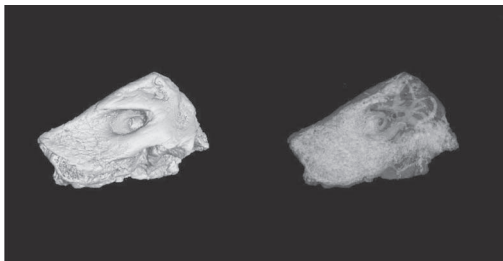
DNAの抽出は [Adachi et al. 2013] に従って行った。抽出DNA溶液に解析に充分な量のDNAが残っているかを確認するために行ったAPLP法 (Amplified Product-Length Polymorphism method) は、[安達ほか2014] と [Kakuda et al. 2016] のプロトコールに従った。

NGSによる分析するために、[Rohland et al. 2015] の方法で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 [Maricic et al. 2010]



左は表面形状を再現したもの、右は内部を投射した画像

図1 池山洞13-1号人骨右側頭骨CT画像



左は表面形状を再現したもの、右は内部を投射した画像

図2 池山洞20号人骨右側頭骨CT画像



図3 APLP分析の結果 (M/N分析)

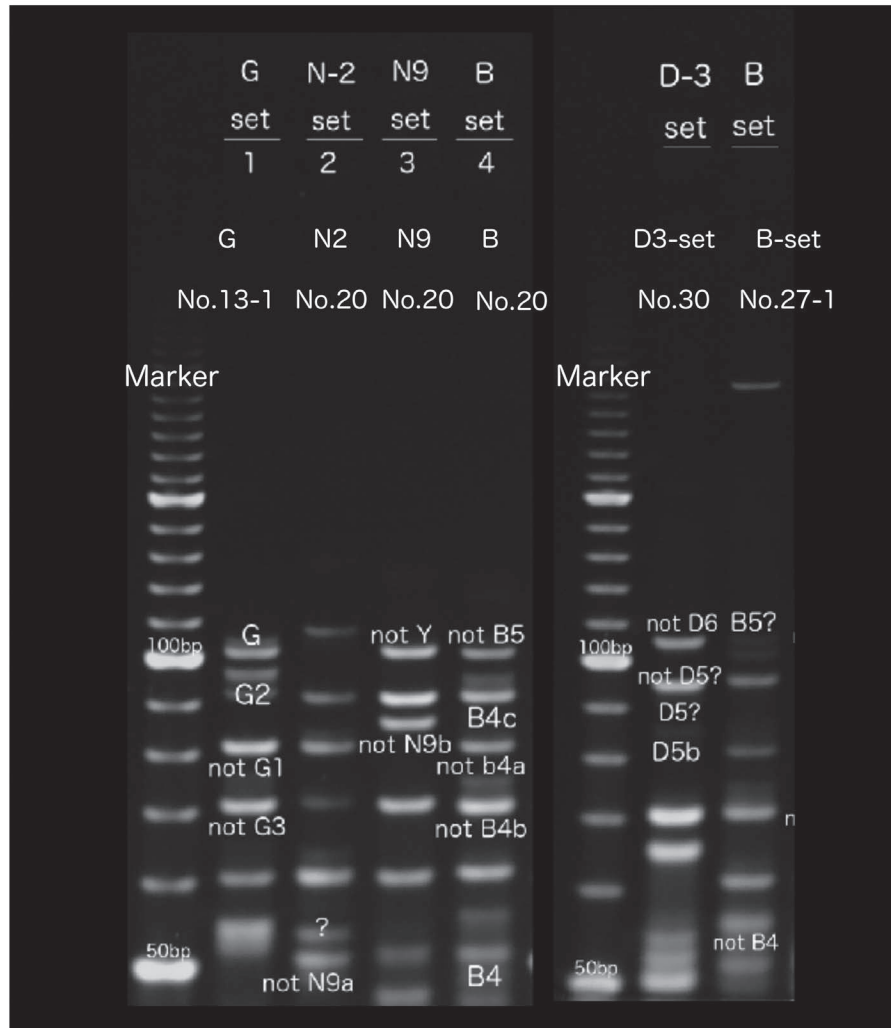


図4 細分APLP分析の結果⁽¹⁾

表2 NGSを用いたミトコンドリア DNA 分析の結果

分析個体番号	池山洞 44 号墳 13-1 号	池山洞 44 号墳 20 号	池山洞 44 号墳 27-1	池山洞 44 号墳 30
インデックス 1	D501	D502	D507	D508
インデックス 2	D703	D704	D711	D712
総ペアリード数 (n)	101,177	223,523	322,599	299,591
ミトコンドリア DNA 由来の リード数 (n)	3,058	4,642	98,316	43,326
(%)	3.46%	2.35%	32.53%	18.96%
重複リードの除去, mapq20 後の リード数 (n)	505	904	25,897	15,702
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)	M32'56	D4	D5b1b1	B5a2a1b
(Quality)	0.7176	0.7046	0.9970	0.8928
ハプログループ推定 (1)	N.D.	N.D.	D5b1b1	B5a2a1b
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	-	-	0 [0-0.005]	0.435 [0.405-0.465]
ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] (1)	-	-	3.23% [2.18-4.27]	1.82% [0.67-2.97]
APLP	G2	B4c	D5b	B5
ハプログループ	-	-	D5b1b1	B5a2a1b

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

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 結果及び考察

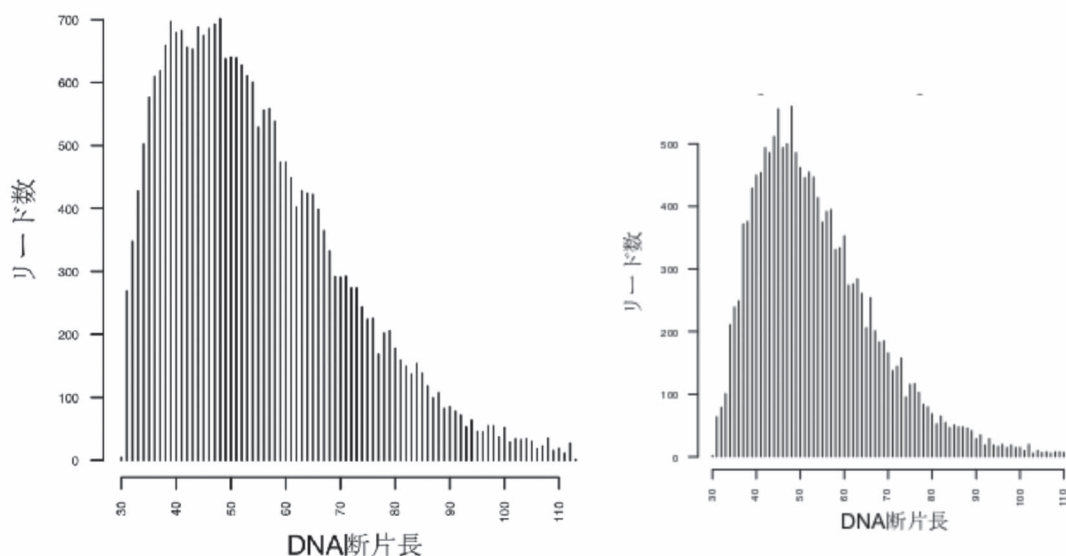
APLP 分析の結果を表 1 および図 3, 4 に示す。いずれの個体でも明瞭なバンドが確認されており、マクロハプログループ M,N およびハプログループ B,D,G を細分するプライマーセットでの判定を行う事ができた。その結果 13-1 号がハプログループ G に、20 号がハプログループ B4c に、27-1 号がハプログループ D5b に、30 号がハプログループ B5 に属することが明らかとなった。

次に歯から DNA を抽出した 27-1 と 30 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を行った。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た。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、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。双方で 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。図 5 に得られたミトコンドリア DNA の断端長を示す。これらの結果から、27-1 号および 30 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。

27-1 号および 30 号のミトコンドリア DNA の塩基配列データから推定されたハプログループは

表3 ミトコンドリア DNA のハプロタイプと変異

個体番号	ハプログループ	個体特異的変異
池山洞 44 号墳 27-1	D5b1b1	T16519C
池山洞 44 号墳 30	B5a2a1b	G16129A, T16189C, T16519C



池山洞27-1号

池山洞30号

図5 得られたミトコンドリア DNA の断端の長さ

それぞれ D5b1b1 と B5a2a1b であり (表 2), APLP 法を用いた分析を行った結果と矛盾はない。表 3 にそれぞれの個体が持つ特異的な変異を示した。これらのハプログループを持つ現代人がどこに分布するかをデータベースで検索すると, B5a2a1b に分類される個体はこれまで 3 体報告されているが, いずれも日本人だった。また同様に, D5b1b1 に分類される個体もこれまで 3 体報告されているが, こちらも日本人だった。

韓国人に一致する個体なかったのは, DNA データベースに現代韓国人がほとんど登録されていないことに起因するためであると考えられる。日本人と韓国人が持つミトコンドリア DNA ハプログループはよく似ているので, これらが現代の韓国人にあっても不思議ではない。なお, ハプログループレベルでは, B5 は 3.8 %, D5 は 6.5 % 程度韓国人に存在する [Hong et al. 2017]。

一方, これまで報告されている縄文人のミトコンドリア DNA では, これらのハプログループは検出されていない。これに対し, まとまった数のミトコンドリア DNA が分析されている弥生時代後期の青谷上寺地遺跡では, ハプログループ B5 と D5 を持つ個体があり [篠田ほか 2020b], 弥生時代中期の渡来系弥生人である安徳台 5 号人骨もハプログループ B5 を持っていた [篠田ほか

2020a]。これらのハプログループが現代日本人に占める割合はさほど大きくはなく、また東アジアでの分布を見ると南の地域に多い傾向がある [Tanaka et al. 2004]。現状では、古代における分布を推定することはできないが、弥生時代の開始期以降に日本列島に進出した人々の中には、これらのハプログループを持った人が含まれていた可能性がある。

池山洞 44 号墳のサンプルのうち、まだ NGS によるミトコンドリア DNA 分析を行っていない 13-1 号と 20 号については引き続き実験を行う予定である⁽²⁾。また、DNA の残りが良好と判断されたサンプルがあれば NGS による核 DNA 解析を予定している。同一の墓地に殉葬された人々の由来及び血縁関係は、古代の社会構造を考える上で重要な情報を提供すると考えられる。引き続き解析を進めて、これらのデータを提供できるように努力したい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、貴重なサンプルの使用の仲介をいただいた明治大学黒耀石研究センターの谷畑美帆博士に感謝します。

なお、本研究は新学術領域研究「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。

註

(1)——図 4 で No.30 と No.27-1 のレーンは逆になっている。

(2)——本稿提出後、13-1 号と 20 号人骨についても NGS を用いたミトコンドリア DNA の分析を行った。結果は表 2 に示したが、いずれも回収されたミトコンドリア DNA の断片が少なく、全塩基配列とハプログループを決定することができなかった。

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.
- Hong SB., Kim KC., Kim W. 2014: Mitochondrial DNA haplogroups and homogeneity in the Korean population. *Genes Genom.* DOI 10.1007/s13258-014-0194-9.
- Kakuda, T., Shojo, 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 2019: 「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.
- 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.
- 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. and 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: 「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.159 ~ 172.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020b: 「福岡県那珂川市安徳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.195 ~ 205.
- 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* 62:283-289 (June 2017) doi 10.2144/000114558.
- 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)

李在煥 (慶北大学校博物館)

朴天秀 (慶北大学校人文大学考古人類学科)

(2020年4月9日受付, 2020年8月20日審査終了)