

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

DNA Analysis of Human Bones of the Late Yayoi Period
Excavated at the Aoya-Kamijichi Site, Tottori, Tottori

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

青谷上寺地遺跡は道路建設に伴って発見された弥生時代後期の遺跡で、1998年度から3年間の発掘で、多量の土器や木製品などの考古遺物とともに約5300点の人骨がまとめて発掘されている。これらの人骨はSD38と名付けられた遺構に集団埋葬されていること、かなりの人骨に殺傷痕が認められること、泥湿地に埋葬されていたために比較的残りがよく、中には脳の残っていることがある事などから、発掘当初から大きな注目を集めた〔鳥取県教育文化財団2001・2002〕。人骨の形態学的な研究とともにDNA分析も試みられたが、この当時の分析技術ではミトコンドリアDNAの一部領域の解析を行うことしかできず、得られた遺伝情報はそれほど多くはなかった〔井上・松本2002〕。

一方、2010年以降に古人骨の解析に用いられるようになった次世代シーケンサは、それまで不可能とされていた古代人の核ゲノムの解析も可能にした。この方法を用いた解析によって飛躍的に多くの遺伝情報が得られるようになっており、人類史の解明に重要な知見を提供するようになっている（例えば〔Rasmussen et al., 2010〕）。

日本人の起源に関しては、過去100年以上にわたる各分野の研究の蓄積がある。その中で縄文時代から弥生時代への移行の状況の解明は中心的な課題となってきた。現在では、弥生時代の初期に在来の縄文人と大陸から渡来した集団が混合して、現代日本人につながる集団が成立したと考えられている〔Hanihara, 1991など〕。ただし、その過程を正確に知るためには、各地の弥生人集団の遺伝的な特徴を明らかにする必要があるが、渡来系弥生人骨の出土は北部九州・山口地方に偏在しており、その実態を全国レベルで捉えることは未だできていない。そんな中で、青谷上寺地遺跡は、これまで弥生時代人骨がほとんど出土していなかった山陰地方から、初めてまとまった人骨が得られた遺跡である。現在の技術レベルで解析を行えば、出土人骨のDNA分析から、現代に続く日本列島集団の形成過程を明らかにできることが期待できる。また、その特殊な埋葬方法も含めて、この遺跡に関してはまだ解明すべき多くの問題が残されているが、埋葬人骨から得られたDNA情報はその謎を解く有力なツールであることは間違いない。

今回、我々は鳥取県埋蔵文化財センター（現鳥取県地域づくり推進部文化財局鳥取弥生の王国推進課青谷上寺地遺跡整備室）の厚意を得て、青谷上寺地遺跡から出土した人骨から抽出した DNA を、次世代シーケンサを使って解析する機会を得た。解析対象とした多くの人骨から DNA 情報を得ることができた結果、弥生人の遺伝的な性格の一端を明らかにしたので報告する。

II 材料および方法

1. サンプル

青谷上寺地遺跡では多数の人骨が散乱状態で発見されているので〔鳥取県教育文化財団 2002, 井上 2006〕, 個体の識別は完全にできているわけではない。頭骨と下顎に関しても同一個体であると判断されているものもあるが、一致していないものもある。つまりサンプリングに際しては全てが別個体から採取されたものと断定できない状況にある（人骨の出土地点および出土状況については〔濱田他, 2020〕に概要がある）。

今回の研究で分析したサンプルを表 1 に示す。全部で 38 サンプルを分析したが、そのような理由からこれらの中には、同一個体の頭骨と下顎骨からサンプリングした可能性のあるものも含まれていることには注意する必要がある。

サンプルは、最近の研究で DNA が他の部位に比べて多く残っているとされる側頭骨を第一に選んだが〔Pinhasi et al., 2013〕, 側頭骨のサンプリングが難しい個体や、下顎骨しか残っていないものに関しては臼歯を用いた。上述したように青谷上寺地遺跡からはおよそ 5300 点の人骨が回収されているが、予備的な形態研究から、それらは 109 体ほどの人物のものであるとされている〔井上・松本 2003〕。従って、今回の DNA 分析は埋葬人骨のうちの 3 分の 1 程度を対象としたことになる。

表 1 解析した青谷上寺地遺跡出土のサンプル

No.	Code	部位	解析部分
1	29240	上顎骨	右第 2 大白歯
2	26530	上顎骨	左第 2 大白歯
3	27708	上顎骨	右第 2 大白歯
4	26396-1	上顎骨	右第 2 大白歯
5	29608-1 (26356-1 下顎)	下顎骨	左第 3 大白歯
6	29241-1	上顎骨	左第 2 大白歯
8	30943 (33762 下顎)	下顎骨	右第 3 大白歯
9	27704	側頭骨	右
10	27203	上顎骨	左第 3 大白歯
12	29617	上顎骨	左第 2 大白歯
14	27971-1	上顎骨	右第 2 大白歯
15	27893	側頭骨	左
19	31008	上顎骨	右第 2 大白歯
21	26349	側頭骨	右
22	27999	側頭骨	左
23	27674	側頭骨	右
25	26824	側頭骨	右
26	29942	側頭骨	右
27	26209-2	側頭骨	右
29	27866-1	側頭骨	右
30	32004	側頭骨	右
32	26356-1	下顎骨	右第 2 大白歯
33	7437-7446	上顎骨	右第 1 大白歯
SX1	27893	側頭骨	右
S1	27163-1	下顎骨	右第 3 大白歯
S2	27972	下顎骨	右第 2 大白歯
S3	29250-1	下顎骨	左第 3 大白歯
S4	29547	下顎骨	左第 3 大白歯
S5	30558	下顎骨	左第 3 大白歯
S6	30723	下顎骨	右第 2 大白歯
S7	30738	下顎骨	右第 3 大白歯
S8	31107	下顎骨	右第 1 大白歯
S10	31822	下顎骨	左第 1 大白歯
S11	31909	下顎骨	左第 1 大白歯
S13	32924-1	下顎骨	左第 3 大白歯
S14	33685	下顎骨	左第 3 大白歯
S15	30614	下顎骨	右第 2 大白歯
K12	32569	下顎骨	右第 2 大白歯

2. DNAの抽出方法

側頭骨からのDNA抽出に関しては、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200 mg）を採取した（図1）。臼歯はレプリカを作成後、歯冠と歯根の間で切断し、歯冠内部を削り取ることで同量のサンプルを採取した。DNAの抽出はAdachi et al. [2013] に従って行った。最初に、試料汚染（コンタミネーション）を防ぐために、側頭骨と臼歯の表面をDNA除去液（DNA Away, Molecular Bio Products）で拭き上げた後、再度DNase/RNase freeの滅菌蒸留水で拭き取り、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た。

試料粉末の脱灰は、サンプルに8 mlのEDTA pH 8.0の溶液を加え、56℃で低速回転させながら一晩かけた。その後、溶液を8000 rpmで1分間遠心して上清を除去し、残存したペレットに再度8 mlのEDTA pH 8.0の溶液を加え、56℃で低速回転させながら、さらに一晩脱灰を行った。脱灰後、溶液を8000 rpmで1分間遠心して上清を除去し、残存したペレットに1000 μ lのGenomic Lyse buffer（Genetic ID）および50 μ lの20 mg/ml proteinase Kを加えて懸濁し、低速回転させながら56℃で一晩かけてタンパク質を溶解した。溶解後の溶液を1500 μ lのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25:24:1）および1500 μ lのクロロホルムで抽出したのち、Fast ID DNA extraction kit（Genetic ID）を用いてDNA溶液を得た。DNAの溶出には、65℃に加温した130 μ lのBuffer EB（QIAGEN）を用いた。

3. APLP法によるミトコンドリアDNAハプログループ分析

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）[Umetsu et al., 2005]によるミトコンドリアDNAハプログループ分析を行った。方法は安達他[2014]とKakuda et al. [2016]の方法に従って実行した。まず、ミトコンドリアDNAのマクロハプログループであるMおよびNと、それぞれの下位のハプログループを決定するプライマーセットMおよびNを用いた6-plexのPCRを行い、マクロハプログループのMとNの判定およびその下位のハプログループの推定を行った。この実験で増幅が確認されたサンプルに対し、更にハプログループを細分するために、プライマーセットを用いたPCR反応を行った。得られたPCR溶液を電気泳動し、ハプログループの判定を行った。

4. 次世代シーケンサによる解析のためのライブラリ作成とDNAの濃縮

最初に次世代シーケンサ（NGS：Next Generation Sequencer）を用いて抽出したDNAを分析するために、Meyer and Kircher [2010] およびRohland et al. [2015]の方法に一部修正を加えて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。先行研究でも古人骨から抽出したDNAでは多くの場合、細菌由来のDNAが全体の99%を占めており、古代人由来のDNAはわずかであることが指摘されている[Green et al., 2008]。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断片を

[Maricic et al., 2010] の方法, 核 DNA 断片を MYbaits WGE (Whole Genome Enrichment) (Arbor Biosciences, Michigan, USA) のプロトコル (v4) の方法を用いて濃縮を試みた。

ミトコンドリア DNA の分析には MiSeq (Illumina 社) を用い, 核ゲノムの分析には HiSeq X Ten (Illumina 社) を用いた。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それぞれ, 篠田他 [2017, 2019] の方法を用いて行った。

5. DNA データの信頼性の確認とミトコンドリア DNA ハプログループの推定

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が知られている [Briggs et al., 2007]。また DNA の長さもほとんどが 100 塩基以下の長さに断片化しているため [Sawyer et al., 2012], ヒトリファレンスゲノムにマップされたリード長が長いものはコンタミの可能性もある。従ってリードの長さも古代人由来の DNA であるかの判断材料となる。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, 脱アミノ化によってウラシル塩基となったシトシン塩基は, PCR による増幅を経てチミン塩基に置換される。そのため, リファレンスゲノムのシトシン塩基がマップされたリードでは, チミン塩基として観察される (以下 C/T と記載)。相補鎖のシトシン塩基に脱アミノ化が起きた場合, グアニン塩基がアデニン塩基に置換される (以下, G/A と記載)。そこでミトコンドリア DNA 標準配列 (rCRS) [Andrews et al., 1999] に再マップされたリードを用いて, そのリード長と 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どうかを判定した。調べる際には, ソフトウェア MapDamage2.0 [Jónsson et al., 2013] を使用した。また, リード長は挿入・欠失の有無に関係なく, リファレンスゲノムのマッピングされた領域のスタートサイトとエンドサイトから計算した。

古代人由来の DNA を含むと判定されたライブラリについては, ミトコンドリア DNA のハプログループを決定するために SNPs の検出を行った。検出された SNPs から PhyloTree-Build 17 [van Oven and Kayser, 2009] を参照してハプログループを判定し, 最後に, 判定されたハプログループの結果を APLP 法で得られた結果と比較した。また, Kanzawa-Kiriyama et al. [2017] の手法を用いて汚染率の推定を行い, データの信頼性を確認した。

6. 核ゲノムデータの解析

ヒト由来の DNA の濃縮を行うために, MYbaits を用いた。濃縮後のライブラリは, 次世代シーケンサ HiSeq X Ten の 4 レーンを用いて 150 bp ペアエンドでシーケンシングした。得られたデータをフィルタリングしたのち, ヒトリファレンスゲノム (GRCh37) へマッピングした。さらにマッピングクオリティでフィルタリングしたあと, PCR 重複を除去した。一連の解析作業は篠田他 [2019] に準拠した。フィルタリング後のデータから 1) DNA 断片長の分布, 2) C/T 置換の検出, 3) 性別判定, 4) 現代人 DNA の汚染率推定を分析し, 次の統計解析に耐えうるデータであるかを確認した。確認後, 各個体の Y 染色体ハプログループと核ゲノムのカバレッジを分析した。

青谷上寺地遺跡のゲノムを他の集団と比較するために, 最初に複数のデータを統合したデータセットを用意した。データセットには, The 1000 Genomes Project Consortium (1KG) [2012] と Simons Genome Diversity Project (SGDP) [Mallick et al., 2016] を統合した現代人のゲノムデー

タに、古代人のゲノムデータとして本研究で得られた青谷上寺地のデータ、船泊縄文 5 号, 23 号 [Kanzawa-Kiriyama et al., 2019], 三貫地 131464 号 [Kanzawa-Kiriyama et al., 2017], McColl et al. [2018] の伊川津縄文 IK002, 下本山 2 号, 3 号 [篠田他, 2019], Tianyuan (40,000 年前の古代東アジア人) [Yang et al., 2017], Devil' s Gate 1 と 2 (7,700 年前のアムール川下流域の古代東アジア人) [Siska et al., 2017] を統合して作成した (集団の略称については付表 1)。一般に古代人ゲノムはシークエンスの平均深度が低く遺伝子型の決定が困難であることから, 古代人ゲノムを統合する際には, ソフトウェア pileupCaller (<https://github.com/stschiff/sequenceTools>) を用いて, 重複する各 SNP サイトについて一方のアリルをランダムサンプリングした。続いて, C/T 置換の影響を避けるためにトランスバージョンサイト (プリンとピリミジン間での変異) のみを抽出した。統合後のデータセットの SNP 数は 5,000K SNPs となった。統合データセットはソフトウェア EIGENSOFT [Patterson et al., 2006] の convertf を用いて PLINK フォーマットへ変換した。

集団を比較するために, 主成分分析 (PCA) を行った。解析前にソフトウェア PLINK [Purcell et al., 2007] にてゲノムデータのフィルタリング (--geno 0.1 --maf 0.01) を行なった。フィルタリングの後, EIGENSOFT の convertf を用いて EIGENSTRAT フォーマットに変換し, 変換後のデータから EIGENSOFT の smartpca を用いて PCA を行なった。この際, 古代人については, lsqproject オプションを用いて現代人の PC へのプロジェクションを行い, 現代人と重複している SNP 数が 2,000 を超えている個体のみを PCA の図に反映させた。

Ⅲ 結果

1. ミトコンドリア DNA 分析

抽出された DNA について, 最初に APLP 法を用いて, 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 反応を行い, 更にハプログループを細分するプライマーセットを用いた分析を行った。電気泳動によって, 実験を行った 38 サンプルについて, ミトコンドリア DNA ハプログループの簡易的な判定を行った (図 2)。次に NGS を用いて, これらのサンプルのミトコンドリア DNA の全配列を決定して, その配列情報を基に各サンプルのハプログループを決定した (表 2)。その結果, 4 つのサンプルでは結果が安定しなかった。これらのサンプルは, 経年的な変成によって, 解析するために十分なクオリティの DNA が残っていなかったと考えられる。従ってミトコンドリア DNA のハプログループが決定できたのは全部で 34 サンプルである。決定できたサンプルのピークリード長はいずれも短く, また脱アミノ化の影響による C/T の割合がリードの末端で増加していたことから, 決められたハプログループは古代人のものと判断した。

このうち, 頭骨から採取したサンプルと下顎の臼歯のサンプルの間で, ミトコンドリア DNA の全配列が完全に一致したものが 2 組あった。ミトコンドリア DNA は母系に遺伝するので, この 2 組は同一個体の頭骨と下顎骨である可能性がある。従って, 34 サンプルの最少個体数は 32 個体であると判断した。

異なる個体間で, ミトコンドリア DNA の配列が完全に一致したものは 3 組存在した。これらには, 個体間で母系での血縁関係があると判断される。従って 32 個体のうち, 母系の血縁がある可能性のある個体は 6 体, 全体の約 2 割ということになり, 残りの 26 体, 8 割の人々の間には母系の

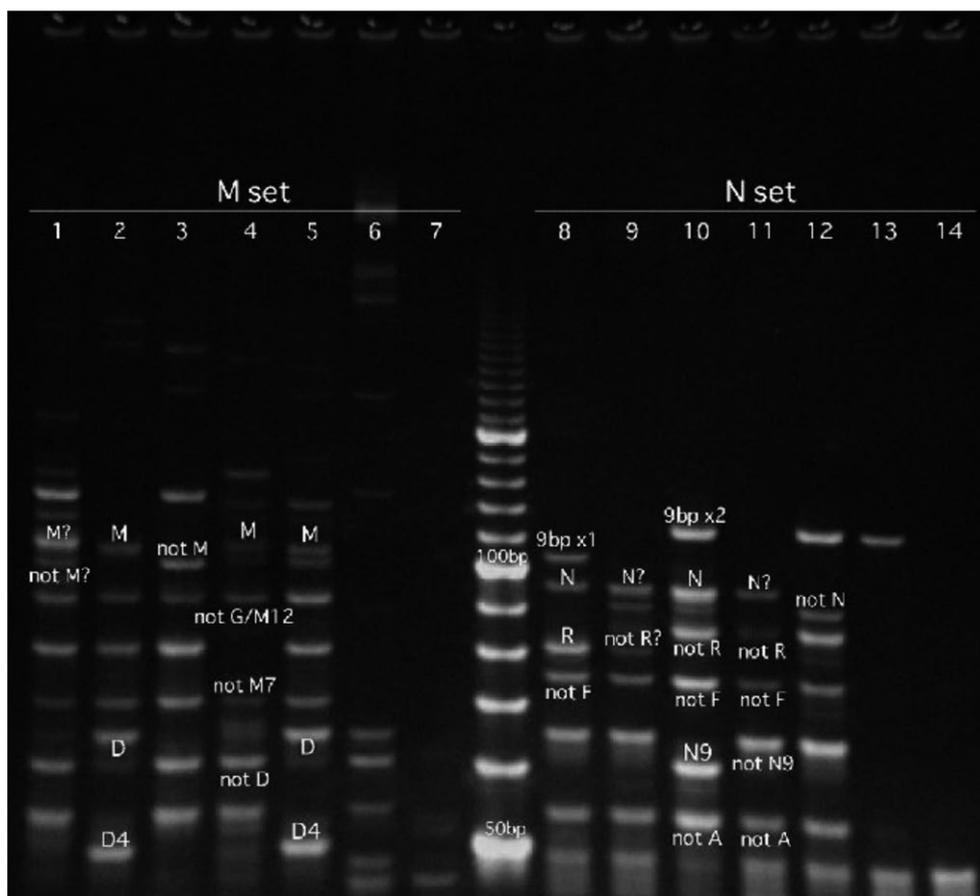


図 2 APLP 分析の結果 (例)

1-5 レーンは、マクロハプログループ M を判別するプライマーセットによる PCR 反応の結果。8-12 レーンはマクロハプログループ N を判別するプライマーセットによる結果。いずれも明瞭な増幅のバンドが確認されている。レーン 1 と 8 は頭骨 No.5, レーン 2 と 9 は頭骨 No.6, レーン 3 と 10 は頭骨 No.8 (下顎), レーン 4 と 11 は頭骨 No.10, レーン 5,12 は頭骨 No.12 の結果。レーン 6 と 13 はブランクコントロール, レーン 7 と 14 はネガティブコントロールの結果を示す。

血縁が認められず、合計すると 29 系統の母系が認められることになった。

ミトコンドリア DNA のハプログループ別の内訳を図 3 に示した。ハプロタイプの多様性を反映して、13 種類のハプログループに分類されている。このうち最も大きな比率を持つのはハプログループ D4b の 24 % で、次が N9a の 15 % であり、それ以外は 10 % 以下の比率だった。現代日本人で最も多いハプログループである D4a は 2 体のみだったが、ハプログループ D4 に属するものは全体の 45 % を占めており、現代日本人の 32 % [Tanaka et al., 2004] を大きく上回っている。注目すべきは、この中で明らかに縄文系と考えられるハプログループがほとんどないことである。縄文の代表的なハプログループは M7a と N9b であるが [Adachi et al., 2011], 青谷上寺地遺跡のサンプルでは、前者が 1 例認められるだけだった。すなわち、青谷上寺地遺跡に見られる母系の DNA 系統は、ほとんどが弥生時代以降に日本列島にもたらされたものだと考えられる。

2. 核 DNA の分析

NGS を用いたミトコンドリア DNA 分析で、十分な量の DNA が残っていると予想された 6 サンプルについて、核ゲノムの解析を行った。解析に用いたサンプルと結果を表 3 に示す。内訳は大白

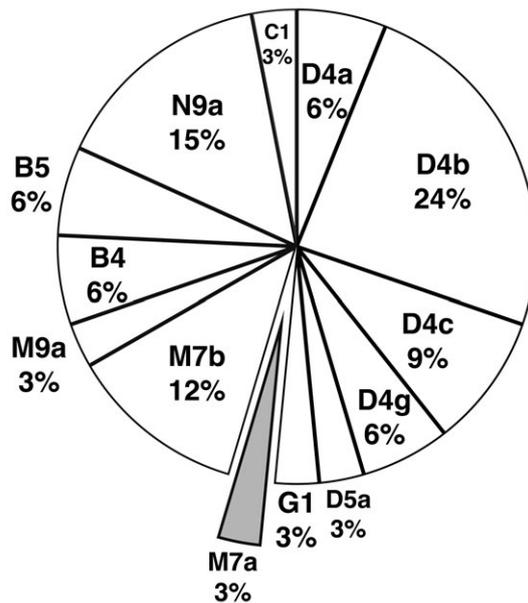


図3 ミトコンドリア DNA ハプログループの内訳

各ハプログループの比率を示したもの。縄文系集団が持っていたと考えられるハプログループである M7a の比率は小さく、残りの大部分は渡来人に由来するハプログループである。

歯が4サンプル、側頭骨を用いたものが2サンプルだった。解析できたゲノムの量を示すカバレッジは、最も良かった8号頭骨で約40%、最も悪いのが下顎10号の1%程度とバラツキがある。特にDNAの残りが良かった8号は、内部に脳が残っていたサンプルでもあることから、軟部組織の残りの良いサンプルは、やはりDNAの残りの良いということが確認された。

各個体のDNA断片から、X染色体とY染色体由来の断片の比を求めて性別を判定した。その結果、第15頭骨を除いて、5体が男性だった。これは形態学的な研究から導かれた結論と一致している[井上・松本2002]。更に男性と判定された5体について、Y染色体DNAのハプログループを推定した(表3)。下顎10号はDNA断片の数が足りずに決定に至らなかったが、他の4個体に関しては、2体でサブグループまでを判定し、2体で大分類までのハプログループの決定ができた。興味深いことに、決定できた4体のハプログループのうち、渡来系の弥生人のハプログループと考えられるものは21号頭骨の一体のみ(ハプログループO)で、残りは縄文系と考えられているタイプだった(ハプログループC1とD)。この結果は、ミトコンドリアDNAとは全く逆の傾向を示すことになった。

核DNAデータからSNP情報を抽出し、アジアの他集団との比較を行った結果では、青谷上寺地の各個体は、現代日本人の範疇に入ったが(図4)、狭い範囲に固まることはなく、現代日本人の中に広範に散在する形となった。いくつかの個体では、分析できたSNPの数が少ないので、そのためによるバイアスを見ている可能性はあるが、比較的ゲノムのカバレッジが高かった15号と8号は大きく離れており、今回分析した個体同士の遺伝的な構成がバラついていることは間違いない。

表2 ミトコンドリアゲノム分析の結果

遺物番号	ペアリード数 (n)	フィルタリング後のユニークリード数(n)	ピークリード長 (n)	平均深度 (x)	カバレッジ	5pCtoT, 1st	ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)*1	Quality (%)	ハプログループ推定 *2
頭骨 No.1 (29240)	152,305	7,165	55	25.24	0.999	0.328	B5b1a2	89.9	B5b1a2
頭骨 No.2 (26530)	208,641	2,599	49	9.15	0.978	0.305	D	81.61	D4g1c
頭骨 No.3 (27708)	411,161	28,937	57	113.5	1.000	0.312	D4b2b1d	98.34	D4b2b1d
頭骨 No.4 (26396-1)	243,328	2,024	57	7.26	0.974	0.263	M7b1a1a1	88.06	M7b1a1a1*
頭骨 No.5 (26356-1)	421,385	5,231	43	16.71	0.998	0.087	B4f	80.13	B4f
頭骨 No.6 (29241-1)	218,674	2,014	55	7.35	0.963	0.297	D4c2	69.61	D4c2*
頭骨 No.8 (33762)	1,132,987	32,955	41	107.97	1.000	0.102	N9a2a1	98.02	pre-N9a2a1
頭骨 No.9 (27704)	406,183	1,921	52	7.24	0.986	0.279	D4b2b1	92.10	pre-D4b2b1d
頭骨 No.10 (27203)	188,084	1,578	51	5.45	0.949	0.247	M9a1a1	78.17	M9a1a1 (a?)
頭骨 No.12 (29617)	317,197	5,653	51	19.81	0.994	0.300	D4b2b	91.67	D4b2b1d
頭骨 No.14 (27971-1)	124,905	324	49	1.15	0.662	0.239	H2a2a	60.63	(M7b1a?)
頭骨 No.15 (27893)	1,826,315	2,941	52	11.05	0.996	0.239	D4b2a2a	87.82	D4b2a2a1
頭骨 No.19 (31008)	636,686	30,203	37	95.19	1.000	0.077	M7b1a1a1	100.00	M7b1a1a1*
頭骨 No.21 (26349)	477,880	1,595	56	5.88	0.962	0.227	D4c1b1	79.35	D4c1b1
頭骨 No.22 (27999)	484,949	577	50	2.04	0.793	0.282	D4b2	62.48	D4b2 (a?)
頭骨 No.23 (27674)	744,085	1,405	47	5.15	0.960	0.305	N9a2a1	71.32	pre-N9a2a1
頭骨 No.25 (26824)	1,306,065	42,947	41	136.16	1.000	0.087	D4c1b2	100.00	D4c1b2
頭骨 No.26 (29942)	749,696	9,940	39	31.44	1.000	0.074	M	89.57	D4a2a
頭骨 No.27 (26209-2)	437,004	246	58	0.92	0.563	0.288	HV	74.33	-
頭骨 No.29 (27866-1)	957,043	9,799	38	32.74	1.000	0.074	M7b1a1a1	86.82	M7b1a1a1*
頭骨 No.30 (32004)	225,715	414	53	1.71	0.831	0.260	N9b	75.80	(N9b)
頭骨 No.32 (26356-1)	535,484	68,051	37	211.23	1.000	0.087	D4b2a2a1	97.14	D4b2a2a1
頭骨 No.33 (7437-7446)	448,181	19,280	47	70.80	1.000	0.296	D4g1a	94.57	D4g1a
頭骨 No.SX-1	76,723	5	88	0.02	0.025	0.000	-	-	-
下顎 S1 (27163-1)	145,412	655	36	1.96	0.796	0.089	R	67.21	B4c1a1a1a
下顎 S2 (27972)	348,851	4,201	54	14.91	0.969	0.312	M7b1a1	77.30	M7b1a1a1?
下顎 S3 (29250-1)	228,394	5,745	37	17.43	0.999	0.168	M	90.00	D4b2a2b
下顎 S4 (29547)	404,894	5,976	53	21.25	0.995	0.294	C	86.97	C1a
下顎 S5 (30558)	273,790	38,544	37	117.2	1.000	0.104	D4b2b1+146	99.08	pre-D4b2b1d
下顎 S6 (30723)	317,441	27,852	49	97.28	1.000	0.102	D4b2a2	98.35	D4b2a2
下顎 S7 (30738)	315,181	27,611	38	81.69	1.000	0.101	D4a1a1	100.00	D4a1a1*
下顎 S8 (31107)	787,115	56,674	44	186.93	1.000	0.077	M7b1a1a1	98.49	M7b1a1a1
下顎 S10 (31822)	562,158	79,941	42	249.71	1.000	0.094	N9a2a	96.64	N9a2a*
下顎 S11 (31909)	874,685	117,732	40	380.46	1.000	0.079	G1a1a2	98.32	G1a1a2
下顎 S13 (32924-1)	221,989	13,455	43	41.98	1.000	0.104	N9a2d	97.49	N9a2d
下顎 S14 (33685)	100,818	3,657	37	10.41	0.995	0.109	B4b1a1b	83.45	B4b1a1b
下顎 S15 (30614)	276,613	15,793	38	48.04	1.000	0.088	M7a1a1a	97.82	M7a1a1a
下顎 K12 (32569)	378,589	82,972	45	290.29	1.000	0.053	D5a1a1	97.67	D5a1a1

*1 Weissensteiner et al. [2016] の手法
*2 Kanzawa-Kiriyama et al. [2017] の手法

表3 核ゲノム分析の結果

遺物番号	ライブラリID	ペアリード数 (n)	フィルタリング 後のユニーク リード数 (n) *1	ピークリー ド長 (n)	リード数 (X染色体)	リード数 (Y染色体)	YX比	性別	Y染色体 ハプログ ループ	汚染率 *2	核ゲノム のカバ レッジ (%)
頭骨 No.15 (27893)	1	44,870,105	1,908,102	48	91,430	173	0.0019	女性	-	4.35 %	12.83 %
	2	132,335,941	4,488,834	41	222,774	445	0.0020				
	3	54,702,377	2,454,533	46	123,729	263	0.0021				
	4	83,404,050	2,948,634	48	146,448	275	0.0019				
頭骨 No.21 (26349)	1	37,654,217	345,091	55	9,055	968	0.1069	男性	O	2.63 %	2.78 %
	2	71,048,662	742,699	41	20,336	2,208	0.1086				
	3	47,270,334	526,690	47	14,473	1,513	0.1045				
	4	42,781,433	438,684	48	11,966	1,307	0.1092				
下顎 S7 (30738)	1	64,244,163	452,879	53	13,224	1,334	0.1009	男性	C1a1	0.23 %	2.34 %
	2	69,018,427	486,583	46	14,110	1,488	0.1055				
	3	38,309,703	291,934	52	8,415	906	0.1077				
	4	32,941,957	270,650	53	7,679	802	0.1044				
下顎 S8 (31107)	1	58,225,003	823,020	55	26,178	2,989	0.1142	男性	D	0.98 %	5.66 %
	2	99,133,717	1,138,814	58	35,675	3,984	0.1117				
	3	61,519,792	771,060	59	24,414	2,839	0.1163				
	4	60,960,205	699,384	59	21,814	2,483	0.1138				
下顎 S10 (31822)	1	96,676,146	297,120	49	7,781	840	0.1080	男性	不明	1.43 %	1.24 %
	2	63,657,880	233,137	50	6,169	621	0.1007				
	3	59,712,249	196,068	51	5,154	542	0.1052				
	4	53,296,535	176,148	49	4,610	516	0.1119				
頭骨 No.8 (33762)	1	175,542,773	7,455,919	54	211,656	23,425	0.1107	男性	C1a1	1.08 %	39.53 %
	2	247,484,225	12,066,349	49	346,280	37,768	0.1091				
	3	162,649,739	9,520,187	52	275,367	30,232	0.1098				
	4	60,885,029	4,627,784	52	137,033	15,371	0.1122				

*1 Dedupにより重複除去処理まで行ったデータ

*2 Kanzawa-Kiriyama et al. [2017]の方法で推定

IV 考察

2010年以降、次世代シーケンサーが古人骨DNA分析に用いられるようになった事で、古代人のゲノムが解析され、これまでには知ることのできなかった集団の成立のシナリオが語られるようになってきている〔例えば Gamba et al., 2014; Fu et al., 2016〕。日本列島の人類集団の形質は、縄文から弥生時代にかけて大きく変化したことが知られており〔例えば Dodo and Ishida, 1990; Matsumura, 1994〕、弥生時代は日本人の成立を考える上で重要な時期である。基本的には、弥生時代を通して在来集団と渡来してきた集団の混血が進んだと考えられるので、今回解析した青谷上寺地遺跡集団の遺伝的な変異が大きいという事実は納得できる。一方で、母系に遺伝するミトコンドリアDNAの多くが渡来人に由来するものであるのに対し、父系に伝わるY染色体DNAの大部分が在来の縄文人に由来するものだと考えられることは、婚姻が在来系集団と渡来系集団の間でランダムに行われなかった可能性を示唆している。しかし解析できたY染色体ハプログループのデータが4例と少ないので、現段階ではこの問題に結論を出すことは難しい。その解明は今後の課題としたい。

今回の解析では、解析した32サンプルで29のミトコンドリアDNAの種類（ハプロタイプ）を確認した。ミトコンドリアDNAは母系に遺伝するので、同一の配列を持つもの同士は、母系につながる親戚、例えば母と子、同じ母から生まれた子ども同士などの関係にある。その中で共通するミトコンドリアDNAのハプロタイプが全体の1割に満たないことは注目に値する。青谷上寺地遺跡では、狭い溝の中から5300点もの人骨が散乱状態で出土した。同時期に遺棄されていることから同時代を生きた人々であると判断でき、先祖と祖先の関係を見ているわけではないので、この事実は彼らの大部分が同時期に生きた母系の血縁関係のない人々であったことを示している。核ゲノム解析でも、解析した個体のゲノムは広く現代日本人集団の中に散在しており、集団として遺伝的な多様性が高かったことが示されている。

ヒトの流入が少ない長く続いた村落では、同族の婚姻が増えることで、やがて構成するミトコンドリアDNAのハプロタイプは少なくなるのが一般的である。その場合は、特定の数種類のタイプが多数を占めるようになることが、これまでに行われた縄文時代の遺跡で確認されている〔Shinoda and Kanai, 1999〕。これに対し、都市のように多くの人々が流入や離散を繰り返しているような地域では、同時期に多数のミトコンドリアDNAのタイプが観察されることが予想される。

青谷上寺地遺跡の集団埋葬人骨は、その中に多数の殺傷痕が認められることから、由来について関心が持たれている。彼らはある時期には、この集落を構成していた人々であると考えられており、仮に彼らがこの遺跡に長期間居住した人々であったとすれば、互いがほとんど血縁関係を持たない人びとで、それがまとめて殺傷されたということになる。年代測定から、これらの人骨はいわゆる「倭国大乱」の時代に生きた人々であることも分かっている〔濱田他, 2020〕。このことと併せて考えると、青谷上寺地遺跡は、当時の混乱した社会状況を示す代表的な遺跡である可能性がある。

青谷上寺地遺跡は、これまで弥生時代人骨がほとんど出土していなかった山陰地方から、初めてまとまったサンプルが得られた遺跡である。そのゲノム解析から、弥生後期の山陰地方では、在来集団と渡来系集団の混血が進み、総体としては現代日本人に近い遺伝的な組成をしていることが判明した。また、個体同士の遺伝的な違いは大きく、十分な混血が進んでいなかったことも示唆され

ている。従来の研究で空白地帯だったこの地域の集団の遺伝的な特徴を捉えることが出来たという意味で、日本人成立論に関する本研究の貢献は大きなものがある。しかしながら、その特殊な出土状況も含めて、この遺跡に関してはまだまだ解明すべき問題が残されている。DNA 分析はその謎を解く有力なツールであることは間違いなく、更にゲノムの解析を進めることで、この問題に関しても新たな情報を提供していきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、貴重なサンプルの使用を許可していただいた鳥取県地域づくり推進部文化財局鳥取弥生の王国推進課青谷上寺地遺跡整備室に感謝いたします。また本研究では、情報・システム研究機構国立遺伝学研究所が有する遺伝研スーパーコンピュータシステムを利用しました。

本研究は文部科学省科学研究活動費基盤研究 A「全ゲノム解析法を用いた縄文人と渡来系弥生人の関係の解明」(代表 篠田謙一, 課題番号 25251043)と新学術領域(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。

なお、本調査は平成 30 年度新学術領域研究「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。

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., Kobayashi K., and Itoh S. 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
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D. M., and Howell N., 1999: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23: 147
- Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F., Green R.E., Kelso J., 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. 14616-14621
- Dodo Y. and Ishida H., 1990: Population history of Japan as viewed from cranial nonmetric variation. *Journal of the Anthropological Society of Nippon*, 98: pp. 269-287
- Fu Q., Posth C., Hajdinjak M., Petr M., et al., 2016: The genetic history of Ice Age Europe. *Nature*, 534: pp. 200-205
- Gamba C., Jones E.R., Teasdale M.D., et al., 2014: Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications*, 5: 5257
- Green R.E., Malaspina A.S., Krause J., Briggs A.W., Johnson P.L.F., et al., 2008: A Complete Neandertal Mitochondrial Genome Sequence Determined by High-Throughput Sequencing. *Cell*, pp. 134: 416-426
- 濱田竜彦・坂本稔・瀧上舞 2020 :「鳥取県青谷上寺地遺跡出土弥生中・後期人骨等の年代学的調査」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 219 集, pp.147 ~ 162
- Hanihara K., 1991: Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review*, 2: pp. 1-33

-
- 井上貴央 2006 :『青谷上寺地遺跡の弥生人と動物』鳥取県教育委員会
- 井上貴央・松本充香 2002 :「青谷上寺地遺跡から検出された人骨」『青谷上寺地遺跡4』鳥取県教育文化財団調査報告書 74, pp. 436 ~ 480
- Jónsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L., and Orlando L., 2013: mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*, 29: pp. 1682-1684
- Kakuda, T., Shoji, H., Tanaka, M., Nambiar, P., Minaguchi, K., 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
- Kanzawa-Kiriyama H., Kryukov K., Jinam T.A., Hosomichi K., Saso A., 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
- Mallick S., Li H., Lipson M., Mathieson I., Gymrek M., et al., 2016: The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature*, 538: pp. 201-206
- 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., et al., 2018: The prehistoric peopling of Southeast Asia. *Science*, 361: pp. 88-92
- Matsumura H., 1994: A microevolutionary history of the Japanese people from a dental characteristics perspective. *Anthropological Science*, 102: pp. 93-118
- Meyer M. and Kircher M., 2010: Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010 (6) : pdb-prot5448
- Patterson N., Price A.L., and Reich D., 2006: Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genetics*, 2:e190.
- 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
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., et al., 2007: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81: pp. 559-575
- 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
- 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
- Shinoda K. and Kanai S., 1999. Intracemetery genetic analysis at the Nakazuma Jomon site in Japan by Mitochondrial DNA sequencing. *Anthropological Science*, 107: pp. 129-140
- 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: <https://doi.org/10.1537/asj.1904231>
- Siska V., Jones E.R., Jeon S., Bhak Y., Kim H-M., et al., 2017: Genome-wide data from two early Neolithic East Asian individuals dating to 7700 years ago. *Science Advances*, 3: e1601877
- Tanaka M., Cabrera V.M., González A.M., Larruga J.M., Takeyasu T., et al., 2004: Mitochondrial genome variation in East Asia and the peopling of Japan. *Genome Research*, 14: pp. 1832-1850
- The 1000 Genomes Project Consortium, 2012: An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491: pp. 56-65
- 鳥取県教育文化財団 2001 :『青谷上寺地遺跡 3』
- 鳥取県教育文化財団 2002 :『青谷上寺地遺跡 4』
- Yang M.A., Gao X., Theunert C., Tong H., Aximu-Petri A., et al., 2017: 40,000-Year-Old Individual from Asia Provides Insight into Early Population Structure in Eurasia. *Current Biology*, 27: pp. 3202-3208
-

-
- Umetsu K., Tanaka M., Yuasa I., Adachi N., Miyoshi A., et al., 2005: Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis*, 26: pp. 91-98
- Van Oven M. and Kayser M., 2009: Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30 (2) : pp. E386-E394
- Weissensteiner H., Pacher D., Kloss-Brandstätter A., Forer L., Specht G., et al., 2016: HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, 44(W1): pp. W58-W63

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）

（2019年5月10日受付，2019年10月25日審査終了）

付表 1 集団の略称

JPT	Japanese in Tokyo, Japan
CHB	Han Chinese in Beijing, China
CHS	Han Chinese South
KHV	Kinh in Ho Chi Minh City, Vietnam
CDX	Chinese Dai in Xishuangbanna, China



図1 実験に用いた側頭骨の錐体部

左はサンプルを採取する以前の写真。右は錐体の内部から0.3グラム程度の骨片を採取した後のサンプル。矢印で示した部位にドリルで穴を空け、錐体の内部にある内耳の部分からサンプリングしている。

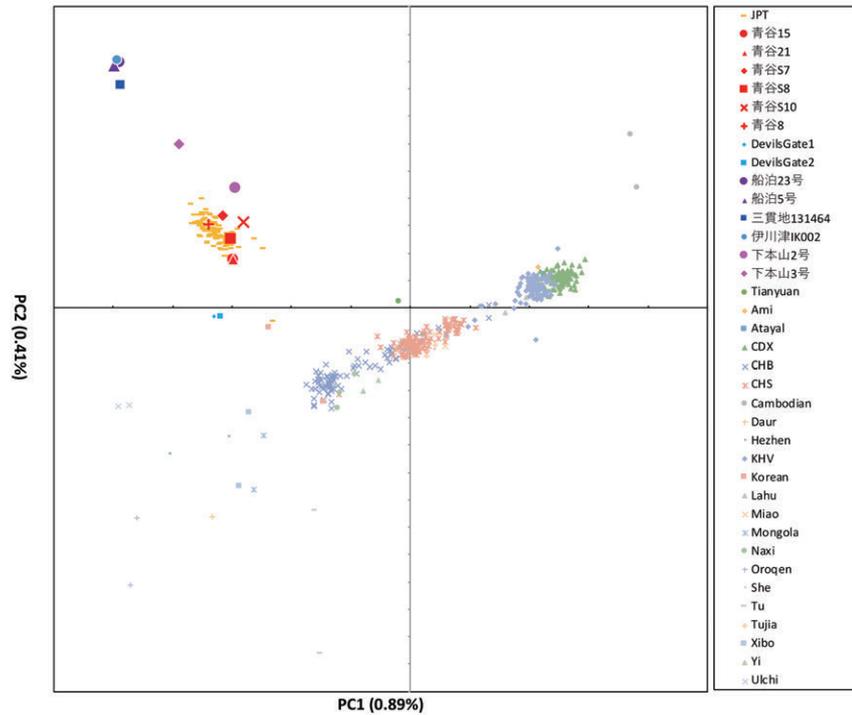


図4 主成分分析の結果

青谷上寺地遺跡のサンプルと、東アジアの古代人と現代人グループを併せた主成分分析の結果。図の下から斜め右上の方向に向かって、大陸の集団が北から南に向かって並んでいる。現代日本人はこの大陸集団から離れた部分に位置しており、北京の中国人と現代日本人の間には韓国人が位置している。そして、その反対側のはるか離れた位置に縄文人がいる。青谷上寺地遺跡のサンプルはいずれも現代日本人の範疇に入っているが、小さな範囲に固まることなく散在している。