

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

DNA Analysis of Human Bones of the Early Shell Midden Period
Excavated at the Oike Site B, Takarajima, Kagoshima

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

神澤秀明・角田恒雄・安達 登・篠田謙一

I はじめに

鹿児島県十島村宝島にある大池遺跡には、縄文時代中期中ごろに併行する遺物が出土する A 地点と、縄文晩期最終末併行にかかる遺物が出土する B 地点がある [歴博研究報告 60, 70 集を引用]。1993～1995 年に発掘調査が行われ、大池遺跡 B 地点（以下、大池 B）の箱式石棺墓からは、オオツタノハ製の貝輪を装着した熟年女性の人骨が 1 体出土している [歴博研究報告 60, 70 集を引用]。オオツタノハ製の貝輪は貝塚前期から南西諸島で広く用いられるが、その一方で南西諸島の箱式石棺墓は西北九州から貝塚時代後期に伝播したとされる。そのため両系統の合流が、吐噶喇列島の人類集団の遺伝構成にどのような影響を与えたのか、関心が持たれる。これまでの古人骨由来の DNA 分析では、母系に遺伝するミトコンドリア DNA の一部領域が対象であったが [例えば, Adachi et al., 2009, 2011], 2006 年に登場した次世代シーケンサ (NGS: Next Generation Sequencer) によって、古代 DNA 研究においてもミトコンドリアゲノムや核ゲノムを対象とした解析が可能となっている [例えば, Rasmussen et al., 2010]。そこで今回は、NGS を用いて大池 B の人骨のミトコンドリアゲノムの全周配列を決定し、この人物の遺伝的な特徴と両系統との関係についての解明を試みた。

II 材料および方法

1. 分析試料の選定と DNA 抽出

箱式石棺墓から出土した人骨 1 体（大池 1 号）を分析対象とした。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]。しかし NGS の分析では側頭骨錐体にある内耳の骨が最も成績が良いことが知られている [Pinhasi et al., 2013]。そこで今回の実験では、右側頭骨から錐体部をサンプリングし、実験に用いた。その際には、錐体部の上面から内耳の骨を含む領域をブロック状に 1 cm 角で切り出し、破碎して試料粉末（約 200 mg）を採取した。DNA の抽出は Adachi et al. [2013] に従って行った。

2. ミトコンドリア DNA 分析

最初に試料に解析可能な DNA が残存しているかを確かめるために APLP 法 (Amplified Product-Length Polymorphism method, [Kakuda et al., 2016]) を用いてミトコンドリア DNA の簡易分析を行い、その後に NGS (Next Generation Sequencer) による分析を行った。NGS による分析のために、Rohland et al. [2015] の方法で NGS 分析用ライブラリの作成を行った。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。このような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、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他 [2017] の方法に以下の修正を加えて行った: (1) インデックスホッピングを排除するために、正しいインデックス配列が組み込まれているシーケンスデータのみを回収した、(2) PCR により生じた重複リードの除去に DeDup (version 0.11.3) (<https://github.com/apeltzer/DeDup/releases/download/v0.11.3/DeDup.jar>) を用いた。

次に、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の判定と個体特異的変異を検出し、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、HaploGrep2 [Weissensteiner et al., 2016] を用いた推定も並行して行い、結果の比較をした。

3. DNA データの信頼性の確認

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。

分析試料に残存する古代人由来の DNA 量はごく微量であることから、分析の際には現代人からの DNA の汚染のリスクを伴う。そこで古代人由来の DNA を含むと判定したのち、ソフトウェア

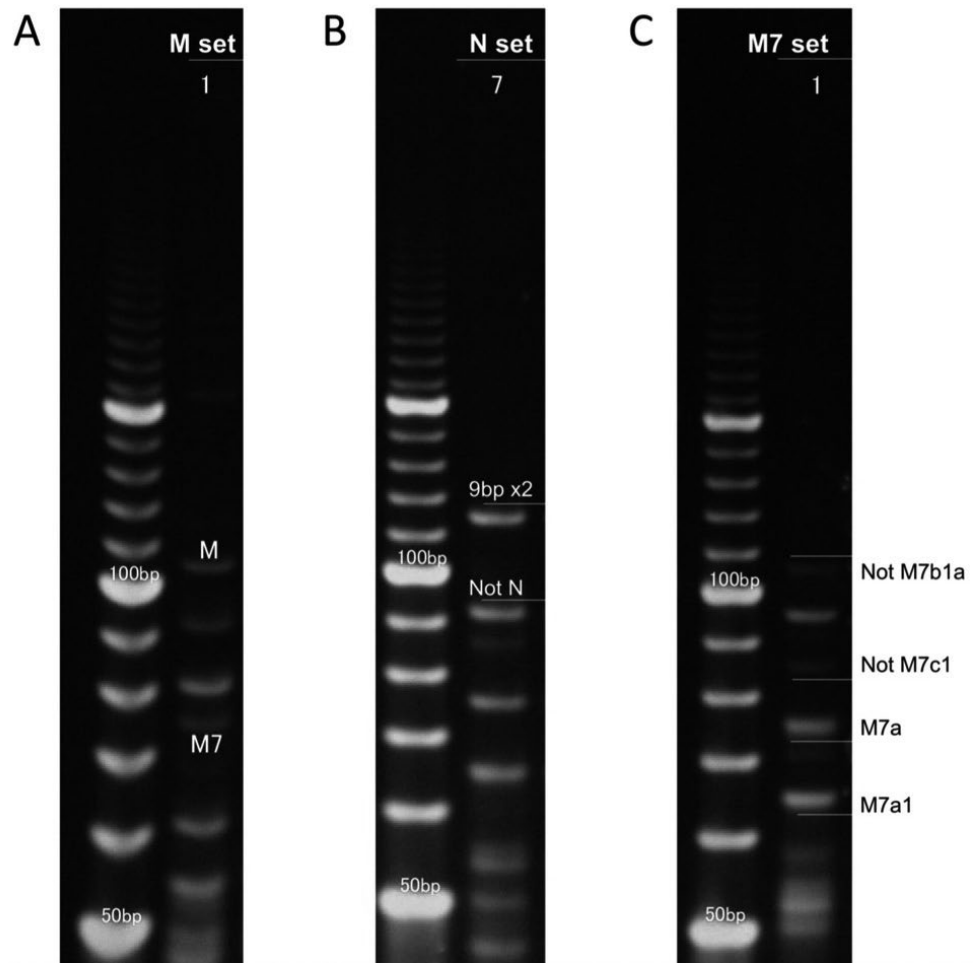


図1 大池1号のAPLP分析の結果
 バンドのパターンはハプログループM7aを示す。
 A. Mセット。B. Nセット。C. M7セット。

schmutzi [Renaud et al, 2015] と 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。

Ⅲ 結果

APLP法による簡易的な分析の結果、明瞭なバンドが見られ、十分な量のDNAを含むことが確認された(図1)。また、ミトコンドリアDNAハプログループはM7a1に分類された。次に、NGSを用いてミトコンドリアゲノム全周配列とハプロタイプの決定を行った。その結果、ハプログループのM7a1aにさらに細分された(表1)。ただし、サブハプログループに細分される変異を持たないことから、大池1号はM7a1aの祖型(M7a1a*)である。その一方で、個体特異的な変異も確認されている(表2)。結果の信頼性を確認するために、古代DNA特有の特徴の有無を調べた。DNA末端には明瞭なC/Tの置換が見られ(図2A)、DNA断片長も全体的に短いことから(図2B)、得られた結果は古代人に由来する。DNAの汚染率も0~1.67%と低いことが確認された(表1)。

表1 ミトコンドリア DNA 分析の結果

分析個体番号	大池1号
インデックス1	D501
インデックス2	D709
総ペアリード数 (n)	98,315
ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n) (%)	8,728 9.61%
重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n)	7,824
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0) (Quality)	M7a1a (0.9409)
ハプログループ推定 *1	M7a1a*
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	0 [0-0.005]
ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] *1	1.67% [0-4.83]
APLP	M7a1

*1 Kanzawa-Kiriyama et al. [2017] の手法。汚染率推定では Transversion サイトのみを持ちいて解析。

表2 大池1号のミトコンドリア DNA ハプロタイプ

個体番号	ハプログループ	個体特異的変異
大池1号	M7a1a*	A2833G, G15314A, A15758G

IV 考察

ミトコンドリア DNA ハプログループ M7a は、縄文時代人の主要なハプログループのひとつであり [Adachi et al., 2011], 「縄文人的遺伝子型」とされる [Adachi et al., 2009]。現代日本人でも本土で 7.5 %, 沖縄本島で 26 % の頻度で観察される [Tanaka et al., 2004]。今回、大池1号からも M7a1a* が検出されたことから、母系系統では縄文系であると判断される。大池1号には、南西諸島の系統であるオオツタノハ製の貝輪と、西北九州弥生からの影響と思われる箱式石棺の両系統が認められる。沖縄本島の貝塚後期人骨では、M7a1 が主要なハプログループであり [篠田他, 2020a], 一方で西北九州弥生人では、縄文系のハプログループ M7a1a4 と渡来系のハプログループ D4a1 がこれまで報告されている [篠田他, 2017]。現時点では、沖縄本島の貝塚後期人骨のミトコンドリアゲノムが未分析であることから、大池1号との詳細な系統関係は不明である。よって、大池1号が母系系統で南西諸島と西北九州のどちらに帰属するのか判断できない。今後、貝塚後期人骨のミトコンドリアゲノムが明らかとなることで、大池1号と両系統との関係はより詳細に議論できるであろう。

別の解析手法として、大池1号の核ゲノム分析を予定している。核ゲノムには膨大な情報が含まれており、わずか1個体でも詳細な解析が可能である [例えば、篠田他, 2019, 2020a, 2020b 参照]。今後、大池1号と並行して、沖縄本島の貝塚後期人骨の核ゲノム分析も予定している [篠田他, 2020a 参照]。それらの核ゲノム配列を比較することで、大池1号を含む南西諸島集団の遺伝的背景とその成立過程がこれまでより詳細に明らかになると期待される。そこから、文化要素との関係について検証と議論を試みたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、貴重なサンプルを分析する機会をいただいた国立歴史民俗博物館の藤尾慎一郎氏に感謝いたします。なお、本研究は文部科学省科学研究活動費の新学術領域（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。

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., and Matsumura H. 2009: Mitochondrial DNA analysis of Jomon skeletons from the Funadomari site, Hokkaido, and its implication for the origins of Native American. *American Journal of Physical Anthropology*, 138: pp. 255-265
- 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
- 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
- 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., Umetsu K., and Adachi N. 2016: Multiplex APLP system for high-resolution haplogrouping of extremely degraded East-Asian mitochondrial DNAs. *PLoS ONE*, 11 (6) : e0158463
- 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
- 宝島大池遺跡発掘調査班 1995 :「吐喝喇列島宝島大池遺跡」『国立歴史民俗博物館研究報告』第60集, pp. 261 ~ 282, 国立歴史民俗博物館
- 宝島大池遺跡調査班 1997「トカラ列島宝島大池遺跡」『特定研究「列島内諸文化の相互交流の研究」1994年度第2次発掘調査概報』『国立歴史民俗博物館研究報告』第70集, pp. 219 ~ 251, 国立歴史民俗博物館
- 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
- 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
- Renaud G., Slon V., Duggan A.T., and Kelso J. 2015: Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome Biology*, 16: 224
- 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
- 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>
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020a :「沖縄県北谷町出土貝塚後期人骨のDNA分析 - 伊礼原D遺跡・平安山原A遺跡 -」『国立歴史民俗博物館研究報告』第219集, pp. 321 ~ 326
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登 2020b :「福岡県那珂川市安德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. 199 ~ 210
- Tanaka M., Cabrera V.M., González A.M., Larruga J.M., Takeyasu T., et al. 2004: Mitochondrial genome variation in Eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Research*, 14: pp. 1832-1850
- 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
- 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

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)

篠田謙一 (国立科学博物館人類研究部)

(2019年5月10日受付, 2019年8月5日審査終了)

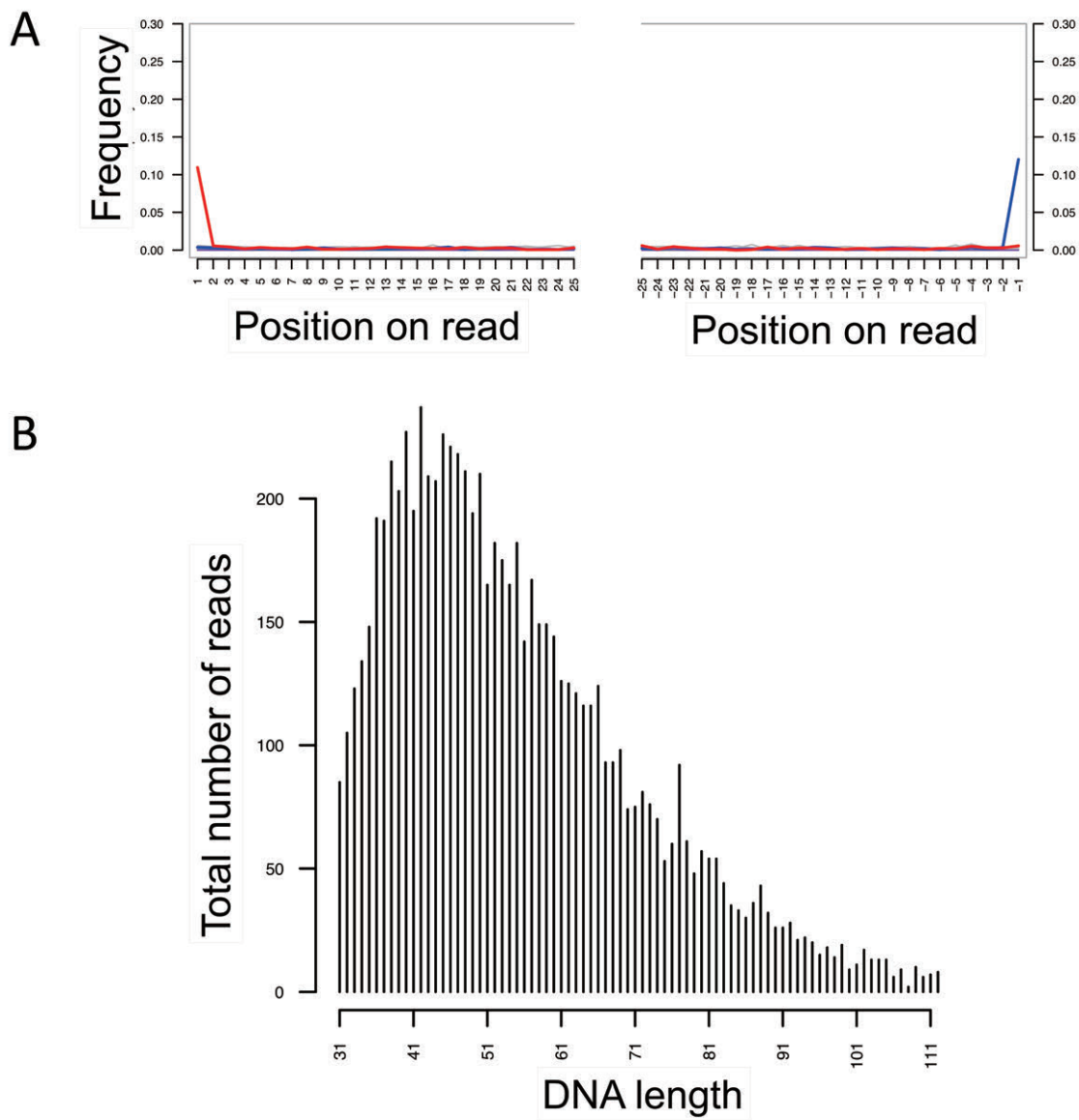


図2 大池1号のリード末端のC/T, G/Aの置換率及びリード長
 A. 5'末端及び3'末端の置換率。B. リード長の分布。