

佐賀県唐津市大友遺跡第5次調査出土 弥生人骨の核DNA分析

Nuclear DNA Analysis of a Human Bone of the Yayoi Period Excavated in the 5th
Examination of Otomo Site, Karatsu-shi, Saga Pref.
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

大友遺跡は、佐賀県唐津市呼子町大友の玄界灘に面した砂丘上に位置する。1968年から1980年にかけての計4次の調査、1999年および2000年の5次、6次調査により、それぞれ100体以上、28体、22体の人骨が発掘されている〔中橋 2001, 2003〕。これらの人骨に伴う副葬品の分析から、弥生時代早期から古墳時代初期に属することが明らかとなっている。本遺跡は、朝鮮半島由来の支石墓をはじめとして様々な様式の埋葬施設が見られることで知られる〔宮本 2003〕。一方で人骨の形態的特徴は、支石墓人骨を中心に縄文人と共通する形質と抜歯風習を有する西北九州タイプであることが知られている。これらの説明として、在来集団が朝鮮半島の墓制だけ取り入れた状況を想定する、あるいは（現状では朝鮮半島の弥生相当期の人骨が少なく判断は困難であるが）墓制の保守性・伝統性を重視し、被葬者は大陸起源であると解釈する〔中橋 2003〕、2つの仮説が考えられる。

この集団の由来を明らかにすることは、我々日本人の成立過程を考える上での重要な問題のひとつである。日本人の成立に関しては、形態学的な研究から弥生時代に大陸から朝鮮半島経由で北部九州に渡来した大量の渡来人が在地の縄文系集団と混血して成立したという、いわゆる「二重構造説」が唱えられている〔Hanihara 1991〕。ただし、この説の元となった人骨は、弥生時代中期以降のものが大半であり、最も重要である縄文弥生移行期における資料を解析の対象とはしていないことは留意する必要がある。その後二重構造説は、現代人を対象としたDNA研究や、古人骨のDNAを分析対象とした古代DNA研究からも支持されており〔Jinam et al. 2012; Adachi et al. 2009〕、本土の日本人の成立の大枠を説明するものとなっている。

日本の古代DNA研究は1990年ごろから始まり〔Horai and Hayasaka 1990〕、ミトコンドリアDNAが分析対象とされてきた。ミトコンドリアDNAは細胞内に数百コピー存在するので、DNAの分解が進んだ古人骨でも分析できる可能性がある。ミトコンドリアDNAでは、蓄積した突然変異に基づいたハプログループという分類体系が確立している。ハプログループは、人類拡散の過程で集団に共有されたり、あるいは新規に形成されていくので、その分布を調査することで、古代から現代における人類集団の移住と拡散の歴史を明らかにすることができる。

一方で、これまでの分析は既存のハプログループに基づいてミトコンドリア DNA の一部領域のみを分析していることから、情報量が限られている。また、ミトコンドリア DNA は母系に遺伝するため男系系統の情報が欠落する。さらに、縄文人と渡来系弥生人の混血度合いといった定量的な分析では、誤差も多いことから必ずしも有効な手段ではないなど、複数の点で課題があった。この状況は、2010年から次世代シーケンサ (Next Generation Sequencer, NGS) が古代 DNA 研究にも利用されるようになったことで、大きく変化した。NGSにより古人骨の DNA の網羅的な分析が可能になったことで、より膨大な情報を持つ核 DNA の解析が可能となった [例えば Rasmussen et al. 2010]。またミトコンドリア DNA についても、新規のハプログループや個体特異的な突然変異の検出も可能となった。それらの解析から描かれる集団成立のシナリオは、これまでよりも精緻なものとなっている [例えば Gamba et al. 2014; Fu et al. 2016]。

これまでの形態学的な研究から、西北九州弥生人は縄文人の系統を引く集団であると捉えられてきた。しかし最近、我々は NGS を用いて弥生時代末期の西北九州弥生人 2 体の DNA 分析を行い、共に縄文系と渡来系弥生人の双方の DNA を併せ持ち、両系統の混血がかなり進んでいたことが明らかとなった [篠田ほか 2017, 2019a]。一方で、混血の地理的・時期的な変遷は依然として不明であることから、この 2 体を持って西北九州弥生人の実態について結論づけるのは早計である。そのような中、我々は今回、大友遺跡の弥生早期の西北九州弥生人の DNA を分析する貴重な機会を得た。DNA の保存状態が良好であったことから、膨大な遺伝情報を持つ核 DNA の分析まで試みたので、その成果報告を行う。

II 材料及び方法

1. 分析サンプルの選定

時期が古い弥生時代早期の支石墓 (下部構造は土壙墓) の人骨に着目した。過去の古代 DNA 分析では主に臼歯を用いてきたが、最近、側頭骨岩様部の DNA の残存がより良いことが明らかとなっている [Pinhasi et al. 2013]。本研究でも、側頭骨が残存する個体のうち、オオツタノハ貝製腕輪を着装した 5 次 8 号支石墓の熟年女性を分析に用いた。

2. 分析方法

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。DNA の抽出は [Adachi et al. 2013] に従って行った。

最初に抽出した 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、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 [安達ほか 2014] と [Kakuda et al. 2016] の方法に従って実行した。

抽出 DNA を次世代シーケンサ (NGS: Next Generation Sequencer) で分析するために NGS 分析用ライブラリの作成を行った。作成時には、まず DNA 末端に見られる古代 DNA 特有の脱アミノ化を検出するために、“no uracil-DNA-glycosylase treatment” (以下、no-UDG) で作成を行

い [Matsumura et al. 2018], 検出後の追加作成では [Rohland et al. 2015] の “partial uracil-DNA-glycosylase treatment” (以下, half-UDG) にてライブラリ作成を行った。

本研究では, NGS 用ライブラリから効率的に古代人のミトコンドリア DNA および核 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, 核 DNA に由来する DNA 断片を MYbaitsWGE (Whole Genome Enrichment) (Arbor Biosciences, Michigan, USA) を用いて濃縮した。濃縮後のシーケンス, データ解析は [神澤ほか 2021] に従った。ただし, 集団比較解析は主成分分析までとした。

III 結果

1. APLP 分析の結果, および NGS による分析で得られたリードの信頼性について

はじめにミトコンドリア DNA を APLP 法にて分析し, DNA の残存状況を調べた。M,N および細分セットで判定を試みたが, 特定のハプログループまでは絞り込めなかった (表 1)。次に NGS によるミトコンドリア DNA 分析を行い, ミトコンドリア DNA にマップされ解析に必要なだけのユニークリード (n=1556) が得られた。取得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 51 bp と非常に短く (図

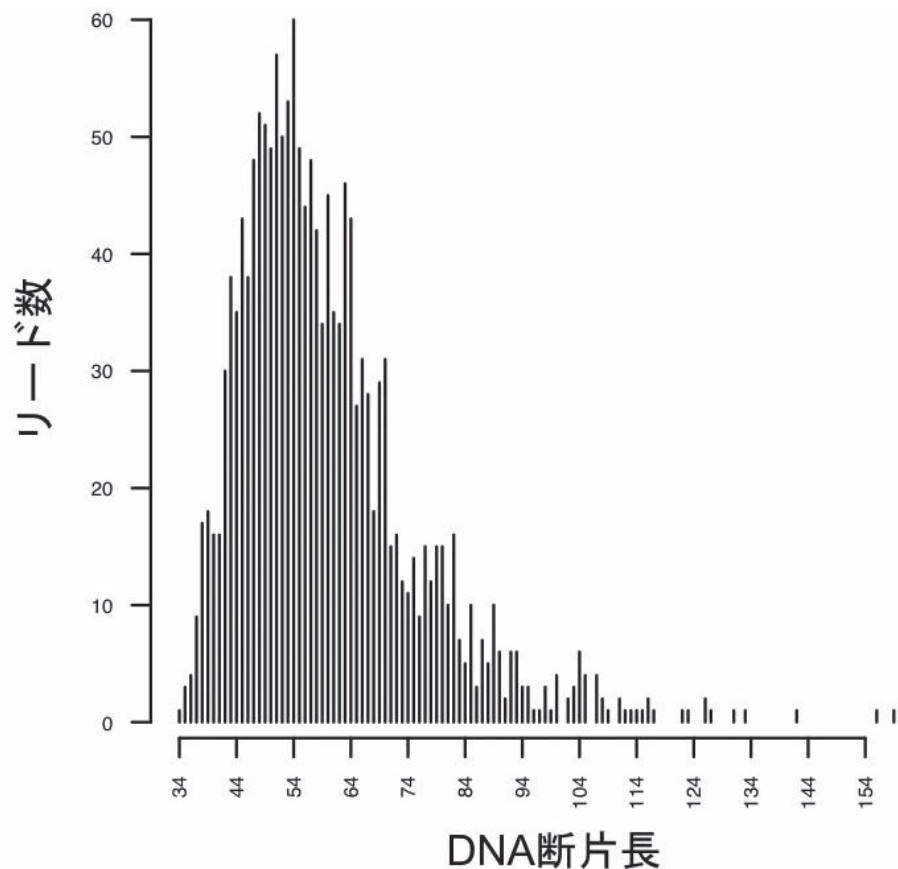


図 1 大友 5 次 8 号支石墓出土人骨から得られた DNA の断片長の分布
横軸は DNA 断片長, 縦軸は各断片長でのリード数

表1 ミトコンドリア DNA 分析の結果

分析個体番号	大友5次8号
インデックス1	D506
インデックス2	D710
総ペアリード数 (n)	350,455
ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n)	6,274
(%)	2.36%
重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n)	1,556
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)	M7a1a
(Quality)	0.7866
ハプログループ推定 (1)	M7a1a6
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	0.00 [0.000-0.005]
ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] (1)	7.84% [0.46-15.22]
APLP	M (D?, not D5, D6)
ハプログループ	M7a1a6

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

1), また古代 DNA の特徴である C/T, G/A の置換が観察された (図2)。以上の結果から, 大友5次8号支石墓出土人骨から抽出されたDNAは, この個体が本来持っていたものであると判断した。

2. NGS による分析から推定された大友遺跡人骨のミトコンドリア DNA ハプログループについて

ミトコンドリア DNA ハプログループは M7a1a6 と判定された (表1)。APLP 法による分析ではマクロハプログループの M までには判定されており, その結果とは矛盾しない。ハプログループを決定する SNPs を用いて推定した現代人 DNA からの汚染率は, 概ね 0.8% であった。この数値は, これまでの古代 DNA 研究で得られている汚染率と概ね違いはない [e.g. Sánchez-Quinto et al. 2012; Fu et al. 2013]。schmutzi ソフトウェアでは低い値を示したが, ハプログループとの一致率を基に調べた解析では少々高い結果となった。

3. 核 DNA データの信頼性, 性別の判定および Y 染色体ハプログループについて

NGS によるミトコンドリア DNA 分析では, DNA の汚染率は少々見られたが, 試料の重要性を考慮して核 DNA 分析を試みた。シーケンスにより 1095 万のユニークリードを取得し (表2), 核 DNA の 15.89% の領域の配列を決定した。DNA の平均深度はおよそ 0.19 となった。現代人の DNA の汚染率は 3% 以下と低頻度だった。次に, X 染色体と Y 染色体にマップしたリード数の比から性別を判定したところ, 大友5次8号支石墓出土人骨は女性と判断する基準である 10:1 に近いことから女性と判定した。これは, 人骨の形態学的な所見と一致する。

4. 集団の比較

SNP のデータを元に, 主成分分析によって東アジアの現代人・古代人と比較した。東アジア大陸部の集団は, 北から南にかけて, 集団ごとにクラスターを形成しながら図3の中央付近で左右方向に連続的に分布した (図3)。本土日本人は上方に離れてクラスターを形成し, さらに上方に縄

表 2 核 DNA 分析の結果

遺物番号	ライブラリ ID	ペアリード数	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
大友5次8号	1	110,768,247	1,399,015	53	64,341	84	0.1 %	女性
	2	180,055,188	4,827,479	40	233,991	299	0.1 %	
	3	113,058,090	2,801,953	41	136,963	204	0.1 %	
	4	69,818,986	1,922,634	39	92,873	121	0.1 %	

ライブラリ ID	Schmutzi による汚染率推定 (核) (%) [min, max]	Schmutzi による汚染率推定 (MT) (%) [min, max]	MT ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] *2	核 DNA のカバレッジ
1	0.0 % [0.0-0.5 %]	0.0 % [0.0-0.5 %]	2.86 % [0.00-8.38 %]	15.89 %
2	0.0 % [0.0-0.5 %]	0.0 % [0.0-1.0 %]	1.33 % [0.00-2.82 %]	
3	0.0 % [0.0-0.5 %]	23.0 % [18.0-28.0 %]	0.67 % [0.00-1.97 %]	
4	0.0 % [0.0-0.5 %]	3.0 % [0.0-9.5 %]	0.00 %	

*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] の手法。

文人が位置している。この分布は、縄文人が東アジアの中で遺伝的な特異な集団であることに加えて、本土日本人が縄文人由来の遺伝要素を受け継いでいることを示している。弥生時代早期の西北九州弥生タイプである大友5次8号支石墓出土人骨は、縄文人の分布の範囲内となり、東アジア大陸部や本土日本人のプロットから大きく離れた。一方、同じく西北九州弥生人である弥生時代末期の長崎県佐世保市下本山岩陰遺跡の2体は、縄文人と本土日本人の間に位置した。

IV 考察

大友遺跡出土人骨は、形態学的には典型的な西北九州弥生タイプであり、縄文人と共通する形質を有することから、その遺伝的な背景とその由来に関心が持たれる。DNA 分析を行った大友5次8号支石墓出土人骨についても、土圧などによる歪みが強く計測は行われていないものの、形質的には著しい低顔傾向であるなどの縄文人的な特徴が見られるとされる。DNA についても、ミトコンドリア DNA ハプログループは M7a1a6 となり、縄文人に典型的なハプログループとなった。最近、南西諸島の古人骨のミトコンドリア DNA 分析から、南西諸島の集団のハプログループ M7a は、サブハプログループのレベルで九州以北の古代人や現代本土集団と異なることが明らかとなっており [篠田ほか2021]、今回の大友5次8号支石墓出土人骨の M7a も本土集団と共通する。一方、この熟年女性は副葬品として南海産のオオツタノハ貝製の腕輪をしている。しかしながら遺伝的には、母系系統に限られるが南西諸島集団からの遺伝的影響は見出されない。

核 DNA データを用いた主成分分析から、大友5次8号支石墓出土人骨は縄文人のクラスターの範疇に収まり、大陸系集団との混血の影響は見出されなかった。これは人骨の形態的な特徴と矛盾しない [中橋 2001]。支石墓は朝鮮半島に起源を持つ墓制であるため、解釈としては (1) 土着 (在来?) 住人が朝鮮半島の墓制を取り入れた、(2) 朝鮮半島で支石墓を墓制とする集団を起源とする、が考えられる。後者の場合は、朝鮮半島にも西北九州弥生人のようなタイプの人びとがいたのかが

問題となる。人骨の形態学的な証拠は現時点では乏しいが〔中橋 2003〕, DNA からは〔篠田ほか 2019b〕が韓国加徳島^{ジャンハン}遺跡出土の約 6300 年前の人骨 2 体の核 DNA を分析しており, 現代の韓国人よりも縄文的であることを見出している〔篠田ほか 2019b〕。しかし両個体の縄文の度合いは本土日本人と同程度かそれ以下であり, 西北九州人である大友 5 次 8 号支石墓出土人骨や下本山 2, 3 号とは遺伝的に大きく異なる。以上より, 現時点では朝鮮半島に西北九州弥生人と遺伝的に同質の集団を想定するよりも, 在来の人びとが朝鮮半島の墓制を取り入れたとする方が妥当であろう。

西北九州弥生人の中でも, 弥生早期の大友 5 次 8 号支石墓出土人骨とは異なり, 弥生末期の下本山 2, 3 号では渡来集団との混血がかなり進んでいる。これを地域差と捉えるべきなのか, それとも時期的な違いと解釈すべきなのか, 現段階では DNA 分析した試料が限られていることから明らかではない。一方で, 大友人骨の同位体分析による食性分析では, 当初の漁撈依存から時期を経るごとに次第に穀物依存の度合いが高まることが明らかとなっている〔三原ほか 2003〕。また, 古墳時代初期とかなり時代は下るが, 大友人骨の中に九州北部弥生人と強く類似した人骨が 1 体だけではあるが混入しており, 渡来系弥生人が流入した可能性が指摘されている〔中橋 2003〕。以上を踏まえると, 西北九州弥生人でも時期的, 地理的に地域差を持ちつつ混血が進んだと考えられるが, 今後, 同時期の朝鮮半島南部および九州北部集団の古人骨の DNA 分析を継続することで, その実態はより精緻なものとなることが期待される。本研究がその一助となれば幸いである。

謝辞

本研究に際して, 九州大学の舟橋京子氏より貴重な大友遺跡の人骨の DNA 分析を行う機会をいただきました。ここに記して感謝いたします。また本研究では, シークエンスデータの解析のために, 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。なお, 本研究は新学術領域(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. et al. 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., 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・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.
- Fu Q., Meyer M., Gao X., et al. 2013: DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110: 2223-2227.
- 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.

- Hanihara K. 1991: Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review* 2: pp.1-33.
- Horai S., and Hayasaka K. 1990: Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics* 46: pp.828-42.
- Jinam T., Nishida N., Hirai M. et al. 2012: The history of human populations in the Japanese Archipelago inferred from genome-wide SNP data with a special reference to the Ainu and the Ryukyuan populations. *Journal of Human Genetics* 57: pp.787-795.
- 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 2021:「鳥取県鳥取市青谷上寺地遺跡出土弥生後期人骨の核DNA分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第228集, pp.295～307.
- Maricic T., Whitten M., and Pääbo S. 2010: Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE* 5(11): e14004.
- Matsumura H., Shinoda K., Shimanjuntak T. et al. 2018: Cranio-morphometric and aDNA corroboration of the Austronesian dispersal model in ancient Island Southeast Asia: Support from Gua Harimau, Indonesia. *PLoS ONE* 13(6): e0198689.
- 三原正三・宮本一夫・中村俊夫・小池裕子 2003:「名古屋大学タンデム質量分析計による大友遺跡出土人骨の¹⁴C年代推定」『佐賀県大友遺跡Ⅱ—弥生墓地の発掘調査—』, pp.64～69.
- 宮本一夫 2003:「大友墓地的変遷」『佐賀県大友遺跡Ⅱ—弥生墓地の発掘調査—』, pp.70～82.
- 中橋孝博 2001:「大友遺跡第5次調査出土人骨」『佐賀県大友遺跡—弥生墓地の発掘調査—』, pp.60～67.
- 中橋孝博 2003:「大友遺跡第6次調査出土人骨」『佐賀県大友遺跡Ⅱ—弥生墓地の発掘調査—』, pp.50～63.
- 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.
- Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S., Pedersen J.S., 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.
- Sánchez-Quinto F., Schroeder H., Ramirez O., et al. 2012: Genomic affinities of two 7,000-year-old Iberian hunter-gatherers. *Current Biology* 22: pp.1-6.
- 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・角田恒雄・安達登 2019a:「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 2019b:「韓国加徳高嶺項遺跡出土人骨のDNA分析」『文物』第9号, pp.167～206.
- 篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達登・竹中正巳 2021:「鹿児島県徳之島所在遺跡出土人骨のミトコンドリアDNA分析—面縄第1貝塚・トマチン遺跡・下原洞穴遺跡—」『国立歴史民俗博物館研究報告』第228集, pp.449～457.
- Umetsu K., Tanaka M., Yuasa I., 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.

神澤秀明 (国立科学博物館人類研究部)

篠田謙一 (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)

(2020年4月9日受付, 2020年8月20日審査終了)

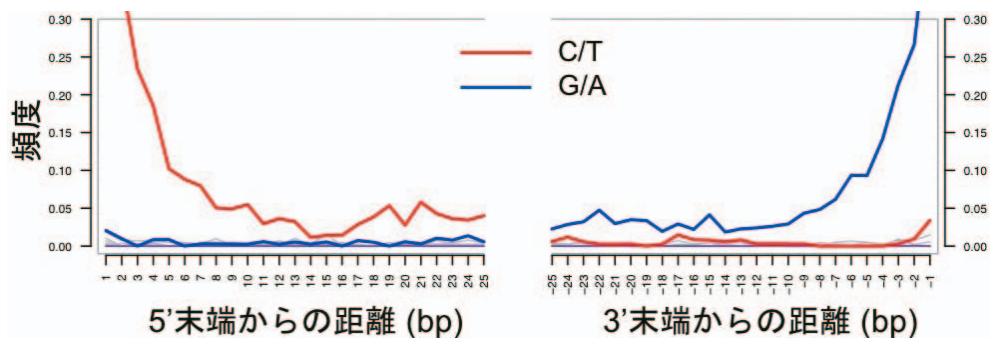


図2 大友遺跡5次8号支石墓出土土骨のリード末端のC/T, G/Aの置換率
 横キャプチャ後、ミトコンドリアDNAにマッピングされたリードの末端の置換率を示す。横軸は末端からの距離、縦軸は各距離での置換率。リファレンスでシトシン (C)、古代DNAでチミン (T) となる塩基置換の頻度を末端からの距離ごとに示す。3'末端からの場合は、リファレンスでグアニン (G)、古代DNAでアデニン (A) となる。

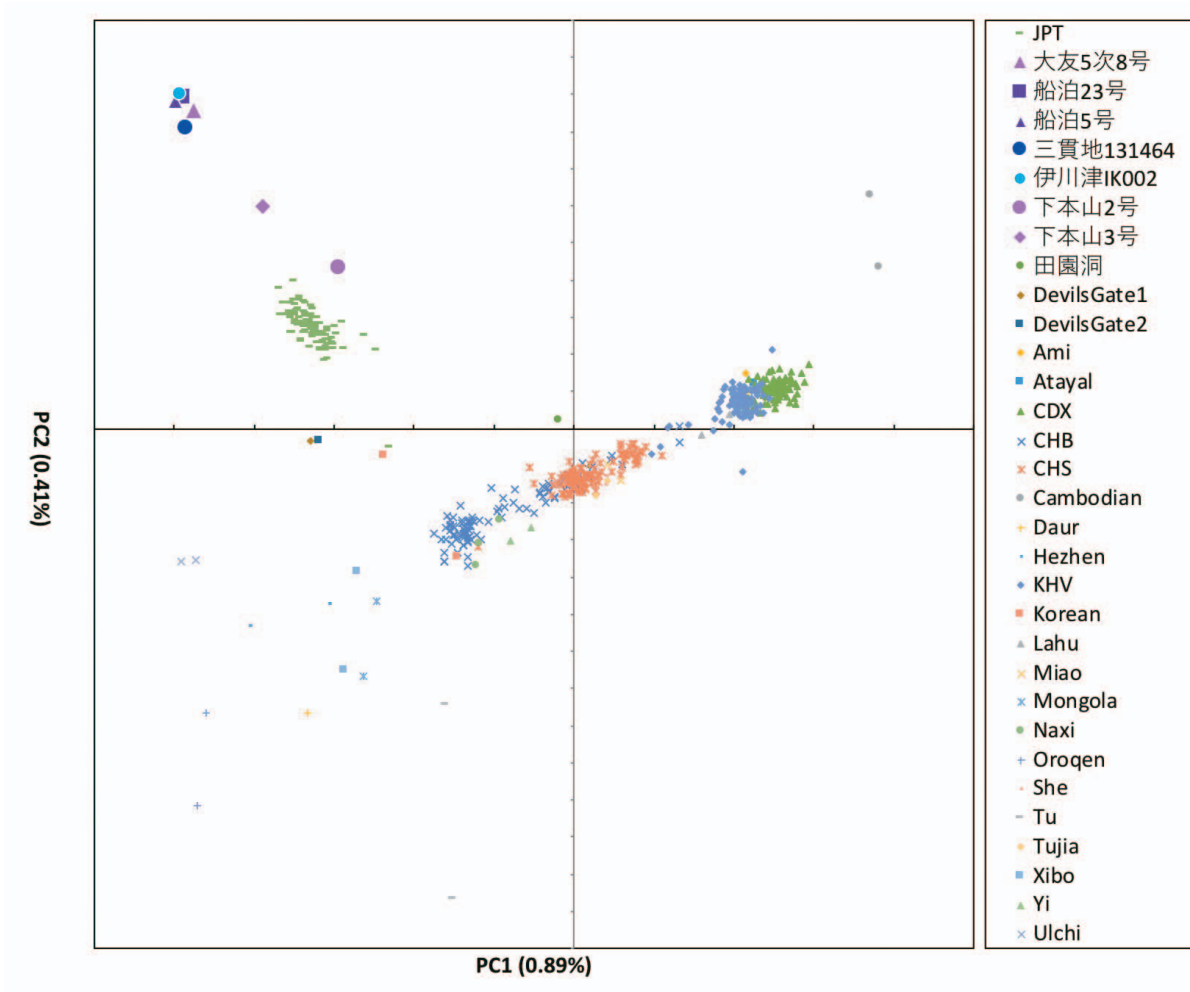


図3 主成分分析による古代人と現代人の比較