

鹿児島県内出土縄文人骨の ミトコンドリアDNA分析

出水貝塚・柘原貝塚

Mitochondrial DNA Analysis of Human Bones of the Jomon Period Excavated in Kagoshima Pref. :
Izumi Shell Midden and Kunugibaru Shell Midden
SHINODA Ken-ichi, KANZAWA Hideaki, ADACHI Noboru,
KAKUDA Tsuneo and TAKENAKA Masami

篠田謙一・神澤秀明・安達 登・角田恒雄・竹中正巳

I はじめに

出水貝塚は鹿児島県出水市にある縄文時代後期の遺跡である。1919年には貝塚である事が確認されており、1954年には本格的な発掘調査が行われ、4体の人骨が出土した〔鹿児島県教育委員会2005〕。この出水貝塚人骨は、現状では南九州で出土した最古の人骨だと考えられており、この時代の九州縄文人の遺伝的な特徴を知るための貴重な資料である。そこで今回は、これらの人骨のうち、鹿児島女子短期大学が保管する1号から3号の3体のDNA分析を行うことにした。

更に南九州の縄文人の遺伝的な特徴を明らかにするために、同じく鹿児島県垂水市にある柘原貝塚から出土した縄文時代後期の1体も同時に解析することにした。この貝塚は、県の農道整備事業に伴う発掘調査によって発見されたもので〔峰ほか1999〕、1997年の調査では合計で3体の人骨が発見されている。今回はそのうちの3号人骨を分析の対象とした。

我々は、過去2年間の研究で北部九州と南西諸島の縄文時代相当期の人骨のDNA分析を行ってきた。その結果、この時代の人骨の持つミトコンドリアDNAは、ほとんどがM7a1系統であるが、南西諸島と北部九州の系統は1万年以上前に分岐した異なるものであることを明らかにしている〔篠田ほか、2019〕。しかしながら南九州の縄文人に関しては、これまでDNA分析の報告が無く、北部九州と南西諸島集団のどちらの系統に属するのかが判明していない。そこで本研究では、両遺跡から出土した人骨の持つミトコンドリアDNAの系統を詳細に分析することで、この問題の解明を目指すことにした。

I 材料および方法

これまで古人骨のDNA分析では、容易に採取することが出来てレプリカの作成も簡単なこと、内部には外在性のDNAが含まれず、コンタミネーションの影響を受けにくいことなどの理由から、歯をサンプルとすることが多かった。しかし近年、側頭骨の内耳を囲む骨性部分には、歯よりも多くのDNAが含まれている事が明らかになっている〔Pinhasi et al. 2013〕。そこで今回の分析でも、サンプリングに際しては内耳部分が含まれる側頭骨の錐体を用いることにした。ただし、頭骨から

表1 実験に用いたサンプルと APLP 分析の結果

No.	遺跡名	サンプル名	採取部位	備考	M/N	細分 APLP
1	出水貝塚	1号	右側頭骨	♂	ND	—
2	出水貝塚	2号	左側頭骨	♀	M7	M7a1
3	出水貝塚	3号	右側頭骨	♀	M7	M7a1
4	柘原貝塚	97-3	右上顎第3 大白歯		D (D4でない)	D (D4?, D5, D6, D4jではない)

※ ND は結果が出なかったことを、— は実験をしなかったことを示す

錐体部を分離することが出来ない個体に関しては、臼歯を採取した。実験に用いたサンプルを表1に示した。出水貝塚の3体はいずれも側頭骨を用い、柘原貝塚の1体は臼歯を用いている。

今回の分析では、出水貝塚出土人骨については、APLP 分析 (Amplified Product-Length Polymorphism method, [Kakuda et al. 2016]) と次世代シーケンサ (NGS) を用いたミトコンドリア DNA の全塩基配列の決定を行ったが、柘原貝塚出土人骨については、時間の関係で APLP 分析のみを行った。なお、DNA 抽出、APLP 分析および NGS によるミトコンドリア DNA の分析は [篠田ほか 2020] に従って行った。

II 結果

1. 出水貝塚人骨のミトコンドリア DNA 分析

分析した3体の人骨のうち、APLP 解析では、2号と3号で結果を得た (表1)。細分 APLP 分析によって、いずれもハプログループ M7a1 であることが判明した (図1)。更に今回はサンプルの重要性を考慮して、結果の出なかった1体を含む3体すべてのライブラリを作成し、NGS を用いたミトコンドリア DNA の全塩基配列の決定を試みた。その結果、APLP 分析では結果の得られ

なかった1号を含めた全てのサンプルでミトコンドリア DNA の全塩基配列を決定することが出来た (表2)。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 DNA 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がある。従ってリードの長さも古代人由来の DNA であるかどうかの判断材料となる。

図2A は鹿児島県出水貝塚から出土した3個体の塩基断片の末端の配列を

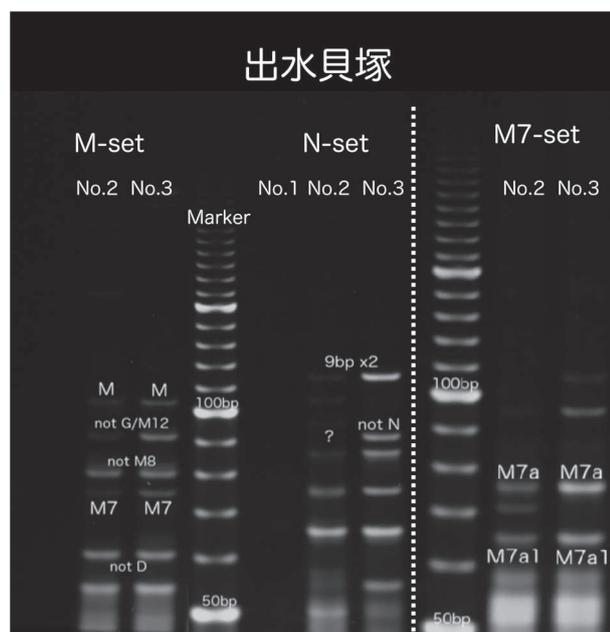


図1 出水貝塚 APLP 解析結果

表 2 NGS を用いたミトコンドリア DNA 分析の結果

分析個体	出水1	出水2	出水3	柁原貝塚
総ペアリード数 (n)	239,427	408,973	501,720	228,239
ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n)	18,909	48,908	111,171	81,750
(%)	8.51 %	12.53 %	23.24 %	41.62 %
重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n)	6,140	13,163	38,844	18,215
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)	M7a1a	M7a+16324	M7a1a2	M
(Quality)	0.9902	0.9104	0.9741	0.9604
ハプログループ推定 (1)	M7a1a*	M7a1a2	M7a1a2	M7a1a"
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	0.340 [0.295-0.385]	0.285 [0.250-0.320]	0.130 [0.105-0.155]	0.165 [0.125-0.205]
ハプログループ不一致 (%) [95 % 信頼区間] (1)	1.08 % [0-3.11]	8.78 % [6.48-11.09]	1.35 % [0.72-1.98]	15.79 % [12.51-19.07]
ハプログループ	M7a1a*	M7a1a2	M7a1a2	M7a1a*

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

リファレンス DNA と比較して、本来シトシン塩基と考えられる塩基がチミン塩基として観察された (以下 C/T と記載) 数と、その相補的な置換であるグアニン塩基がアデニン塩基に置換された (以下, G/A と記載) 数を示している。結果を見ると 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と判断できる。

3体の持つハプログループは、いずれも M7a1 系統に属しており、2号と3号については APLP 分析の結果と一致している。ただし2号に関しては、ハプログループの特異的な変異と一致しないリードが多く、汚染率も高めなので、他の2個体よりも結果の信頼性は低い。このような場合、原因としては次世代シーケンサでのシーケンス時に生じるインデックスホッピング (インデックスのミスアサインメントによる他個体のデータの混入) の可能性が考えられるが、残念ながらその原因となったと考えられる汚染源のハプログループは特定できなかった。しかし総合的に考えて、本データについてはその可能性は低いと判断した。一方、1号、3号は回収されたミトコンドリア DNA のデータ量も多く、コンタミ率も低いことから、次のステップである核 DNA が可能であると考えられた。

2. 柁原貝塚出土人骨の APLP 分析の結果

柁原貝塚出土人骨ではマクロハプログループを決定するプライマーセットでの解析の結果、D4 ではないハプログループ D に属することが判明したので、引き続きハプログループ D を細分するプライマーセットでの判定を行った。しかし、このプライマーセットでの分析では、逆に D4 である可能性も指摘され、サブハプログループを確定することは出来なかった (図 3)。

これまで我々が行った縄文人の DNA 分析では、ハプログループ D が見つかることは極めて稀で、北海道を除けば D4b 系統のみが見いだされている。従って本サンプルをそれとは異なるハプログ

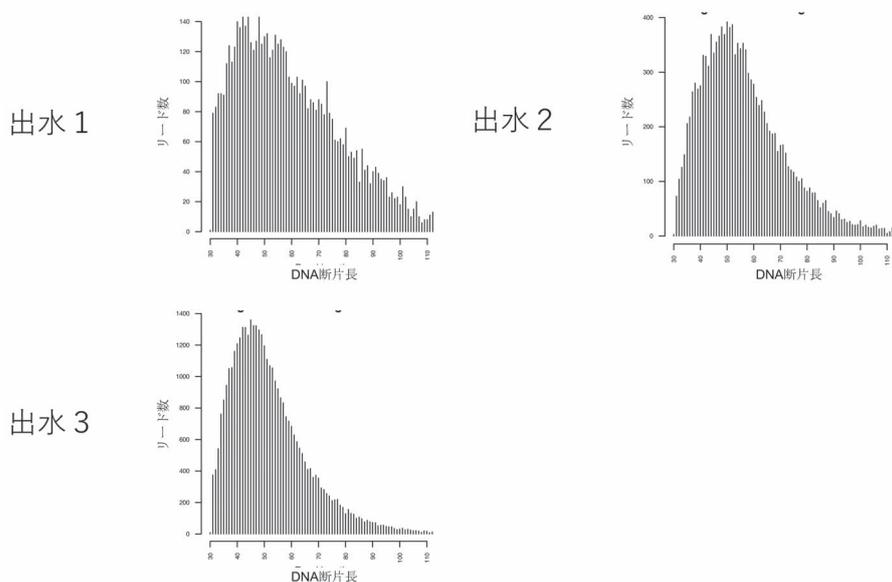


図3 回収された塩基配列の長さ

ループDの系統に属すると判断するには、更なる解析が必要である。結果が安定しないことも含めて、現段階では確定的な結論を出すことは難しい。出水貝塚人骨で見たように、APLP分析で結果の出ないサンプルでもNGSを使うと分析が可能になることもある。本サンプルについても、近い将来に出水貝塚のサンプルと同様のNGSを用いてのミトコンドリアDNAの全塩基配列の決定と、核DNAの解析を実施することにした⁽¹⁾。

III 考察

ミトコンドリアDNAの全配列が決定できた出水貝塚3体の結果をもとに考察を進める。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る[Adachi et al. 2011]。そのため「縄文人的遺伝子型」と認識されている[Adachi et al. 2009]。現代日本人でも本土で7.5%、沖縄本島で26%の頻度で観察されており、本土日本と南西諸島では明確に頻度分布に違いがある[Tanaka et al. 2004]。

これまでに我々が行った分析から、南西諸島の貝塚前期の遺跡から出土した人骨のほとんどがこのハプログループ、特にサブグループであるM7a1aを持っていることが分かっている[篠田ほか2019]。また九州の縄文人や、縄文人の系統を引くと考えられている西北九州弥生人にも、ハプログループM7a1aを持つものが存在するが[篠田ほか2017]、これまでの系統解析では北部九州と南西諸島には共通する系統はない。

出水貝塚人骨の持つM7a1aを他の九州と沖縄の縄文から弥生時代のそれとを合わせて系統樹を描いてみると、出水貝塚人骨は南西諸島の集団の系統ではなく、北部九州の縄文人や弥生人が持つ系統に属することが判明した[篠田ほか2021]。出水貝塚は鹿児島県北部、熊本県との県境に近い場所に位置しており、北部九州の系統に近いことは不思議ではない。今回の分析で、縄文時代にお

ける九州本土と南西諸島の集団の遺伝的な違いがより明確になった。今後、更に南九州の縄文人のDNAデータを蓄積していけば、九州から沖縄にかけての基層集団の成立の精緻なシナリオを描くことができる⁽²⁾と考えられる。今後の課題としたい。

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。

註

(1)——本稿提出後に行ったNGSを用いたミトコンドリアDNA全配列の分析によって、柘原97-3号がもつハプログループもM7a1aであることが判明した（結果については表2に示してある）。したがって分析した出水貝塚と柘原貝塚のすべての縄文人がM7a1a系統であることが判明した。

(2)——柘原貝塚縄文人のミトコンドリアDNAハプログループの系統は、M7a1aの根幹部分からT720Cの変異だけを持っていた。現時点でもその変異を共有するM7a1aの個体は現代人、古代人いずれからも見られず、この個体が九州か南西諸島のどちらの系統を引くのかは、ミトコンドリアDNAだけでは判定できなかった。

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.
- Briggs AW., Stenzel U., Johnson PLF., Green RE., 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.14616-16621.
- 鹿児島県教育委員会 2005:「出水貝塚」『先史・古代の鹿児島資料編』pp.313～316, トライ社.
- 峰和治・小片方彦・竹中正巳 1999:「垂水市柘原貝塚出土の縄文人骨」『平成9年度、垂水市埋蔵文化財発掘調査報告書』4. pp.122～132, 垂水市教育委員会.
- 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.
- 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.
- 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・安達登・角田恒雄・土肥直美 2019:「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 2020:「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.163～178.

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.

Tanaka M., Cabrera V.M., Gonzalez 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.

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)

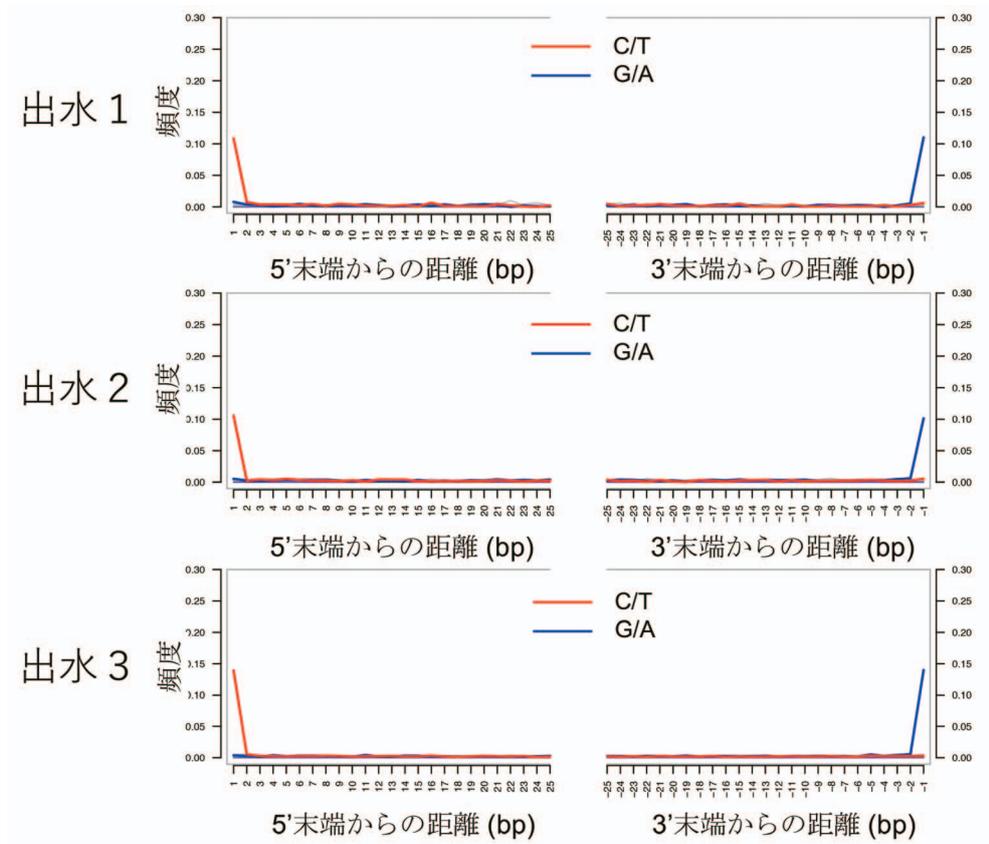


図2 配列の末端における C/T および G/A の置換