

岡山県内古墳出土人骨の ミトコンドリア DNA 分析

Mitochondrial DNA Analysis of the Human Skeletal Remains
Excavated from the Mound Tombs in Okayama Pref.

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

篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登・清家 章

I はじめに

次世代シーケンサ（Next Generation Sequencer; NGS）が実用化したことで、古人骨から抽出した DNA の解析は、ゲノムレベルの情報を得ることが可能になっている [例えば Green et al. 2010]。日本でもこの技術を使って、縄文時代から弥生時代にかけての日本列島集団の遺伝的な変遷の解明が進んでおり、縄文時代以降に集団の遺伝的な組成が大きく変化したことが明らかとなった [篠田 2019]。これまでは骨の形態学的な研究によって、弥生時代に大陸から稲作農耕民が渡来し、在来集団と混血して現代日本人につながる集団が形成されたと考えられてきた [Hanihara 1991]。しかし、渡来系弥生人のゲノム解析からは、大陸からの人々の流入は弥生時代以降も続いたことが示唆されている [篠田ほか 2020]。その結果、人類学の分野でも基層集団である縄文人と大陸からの渡来集団の混合は、弥生から古墳時代にかけての長期のスパンで考える必要がある事が明らかとなった。しかしこの集団の融合がどのように進んだのかについては、古墳時代の人骨のゲノム解析が進んでいないことから、ほとんど理解が進んでいない。

このような状況の中で、今回岡山県内から出土したまとまった数の古墳人骨の分析を行う機会を得た。岡山県を中心とした吉備地域は古代に畿内や出雲国と並んで大きな勢力を持っていたと考えられており、古墳文化が栄えた地域である。この地域の集団の遺伝的な特徴を明らかにすることは、古代国家形成期に集団がどのように形成されていったのかを明らかにすることにつながっており、考古学や歴史学にも重要な知見を提供する可能性がある。

更に古代 DNA 分析では、埋葬された人物の遺伝的な特徴を明らかにするだけでなく、埋葬人骨間の血縁関係を知ることも可能である。今回分析したのはミトコンドリア DNA なので、母系の血縁関係しか追うことはできないが、それでも従来の形態に頼った方法に比べて、格段に精度の高い推定ができるので、古墳時代の親族構造についても新たな知見をもたらすことが期待される。将来的には両親の系統を追うことのできる核ゲノムの解析も視野に入れているが、今回は分析が完了しているミトコンドリア DNA の結果のみを報告することにした。

表 1 解析試料

遺跡	個体 ID	年齢・性別	分析部位
久米三成古墳群 4 号墳	1 号主体 No.1	壮年後半～熟年前半・男性	下顎右第二大臼歯
	1 号主体 No.2	壮年・女性	上顎右第一大臼歯
	2 号主体 No.1	熟年後半・女性	下顎左第二大臼歯
	2 号主体 No.2	11 歳前後・性別不明	上顎右第一大臼歯
赤羽根古墳群	6 号主体	壮年・男性	上顎右第三大臼歯
	7-1	壮年・男性	下顎右第三大臼歯
	7-2	熟年・女性	上顎左第二大臼歯
	8 号主体	壮年前半・男性	上顎右第三大臼歯
中島第 1 号墳	No.1	壮年期・男性	下顎左第一大臼歯
	No.2	壮年期前半・女性	上顎右第三大臼歯
勝負砂古墳	—	—	下顎右第一大臼歯
飯盛山東 1 号墳	—	50 歳代・女性	下顎右第二大臼歯
狩谷遺跡	5 号	熟年～老年・女性	遊離歯
	6 号墓男性	—	左大腿骨
	6 号墓女性	—	下顎左第二大臼歯

II 材料及び方法

分析した人骨は、岡山理科大学が所蔵する久米^{さんなり}三成古墳群 4 号墳出土人骨、赤羽根古墳群出土人骨、中島第 1 号墳出土人骨、岡山大学が所蔵する勝負^{しょうぶご}砂古墳出土人骨、飯盛山東 1 号墳出土人骨、^{かりや}狩谷古墳群 5 および 6 号墳出土人骨の合計 15 体である。分析部位は表 1 にまとめてある。またそれぞれの遺跡の概要と分析した人骨については以下の通りである。

久米三成古墳群 4 号墳は、津山市久米町中北下字三成に所在する前方後円墳〔柳瀬 1979〕とされているが、方墳が 2 基つながったものであるという理解もある〔小郷 1991〕。第 1 主体部第 1 号人骨は壮年後半から熟年前半の男性、第 1 主体部第 2 号人骨は壮年の女性、第 2 主体部第 1 号人骨は熟年後半の女性、第 2 主体部第 2 号人骨は 11 歳前後の性別不明個体である〔川中 1982〕。赤羽根古墳群は高梁市落合に所在する小古墳であり、3 世紀中ごろから 4 世紀後半までに作られたとか考えられている〔江見 1981〕。今回の分析では合計 3 体を対象とした。第 6 主体人骨は壮年の男性、第 7 主体には 2 体の人骨が残っており、第 1 号人骨は壮年の男性、2 号人骨は熟年の女性、第 8 主体人骨は壮年前半の男性であるとされる〔川中 1982〕。中島第 1 号墳は赤磐市の山林にあった一辺 18 m の方墳である〔山陽町史編集委員会 1986〕。本研究では 2 体の人骨を分析しており、1 号人骨は壮年期の男性、2 号人骨は壮年期前半の女性である〔清家 2000〕。

勝負砂古墳は、倉敷市真備町下二万に所在する前方後円墳で、被葬者の性別や年齢に関する記載はないが、5 世紀後半の古墳であると考えられている〔岡山大学考古学研究室編 2009〕。飯盛山東 1 号墳は、岡山市北区松尾に所在するに前方後円墳で、石棺の形態から前期に属すると推定されている。埋葬されていたのは、形態学的な観察から 50 歳代の女性と考えられている〔清家ほか編 2021〕。狩谷古墳群 5、6 号墳は総社市久代に所在する小古墳で〔前角 2018〕、5 号墳出土人骨は熟

年から老年の女性、6号墳には壮年の女性と成年の男性が埋葬されている〔中川 2019〕。

DNA 抽出部位としては、外部からの汚染を除去しやすく、かつ DNA が多く残っていると考えられている臼歯をサンプリングの対象とした〔Woodward et al.〕。近年では側頭骨の内耳に多くの DNA が残っていることが分かっており〔Sirak et al. 2017〕、この部位が解析に用いられることが多いが、今回解析対象とした人骨はいずれも保存状態が良く、頭骨も完全なものであったので、側頭骨の内部にアプローチすることができなかった。

全ての歯の精巧なレプリカを作成し、その後に歯根と歯冠を切り離して、DNA を抽出用の粉末を採取した。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）によるミトコンドリア DNA ハプログループ分析を行った。解析は安達ほか〔2014〕と Kakuda et al.〔2016〕の方法に従って実行した。

次に NGS を用いたミトコンドリア DNA の全塩基配列を決定するために、篠田ほか〔2017〕の方法に従って 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バクテリアなどの混入 DNA が含まれている可能性がある〔Green et al. 2010〕。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 断片のみを、Maricic et al.〔2010〕の方法を用いて濃縮した。

塩基配列の決定には MiSeq（Illumina 社）を用い、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〕の方法を用いて行った。DNA データの信頼性の確認には、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と〔Briggs et al. 2007〕、古代 DNA ではほとんどが 100 塩基以下の長さに断片化しているという事実を利用した〔Sawyer et al. 2012〕。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、ヒト標準配列と比較すると、末端でチミン塩基として観察される（以下 C/T と記載）部位とグアニン塩基がアデニン塩基に置換される部位（以下、G/A と記載）が増加する。そこで、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否かを判定した。

Ⅲ 結果

1. APLP 分析

APLP 分析の結果を図 1 および表 2 に示す。多くのサンプルで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。マクロハプログループ M/N を分離するプライマーセットで分析した後に、細分 APLP 分析を実施した。その結果、ハプログループ N9 までは判定できたが、それ以降の細分ができなかった狩谷 6 号墓の女性を除く 14 体で、ハプログループを判定することができた。

2. 次世代シーケンサによる分析

古代人の DNA 解析では、ごく微量の DNA を解析するために、常にコンタミネーション（外在

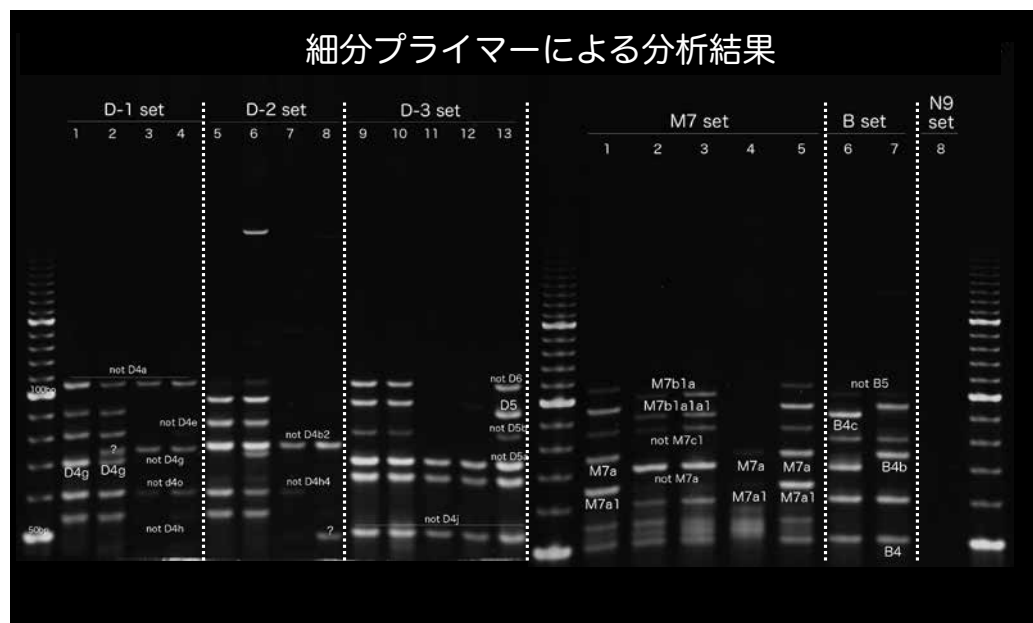


図 1 細分 APLP 分析の結果

D-12,3 set: それぞれ左から久米三成 4 号墳 1 号主体 No.1, 赤羽根古墳 8 号主体, 狩谷 5 号, 狩谷 6 号

M7 set: 左から久米三成 4 号墳 2 号主体 No.1, 赤羽根古墳 7-1, 7-2, 中島 1 号墳 No.1, No.2

B set: 左から久米三成 4 号墳 1 号主体 No.2, 赤羽根古墳 6 号主体

N9 set: 狩谷遺跡 6 号

APLP 法は, 特定の塩基配列を検出する方法で, ここではミトコンドリア DNA のハプログループを決める一塩基の置換部位を, DNA 断片の長さの違いとして可視化している。それぞれのバンドの長さが, 特定のハプログループに対応しているため, 電気泳動によってそれを知ることができる。各プライマーのセットで示されるバンドの位置からハプログループを決定している。

性の DNA の混入) が問題となる。今回の NGS 分析の結果では, DNA 末端では高い頻度でシトシン塩基の脱アミノ化が観察され (データ未掲載), かつ各断片の長さも大部分が 100 塩基以下であることが判明した (図 2)。これらの結果から, 解析された DNA が古代人に由来することの条件を満たしていると判断した。従って人骨から回収された DNA は, それぞれの人物が本来持っていたものだと考えて問題はない。

DNA の配列情報から得られた結果を表 2 に示した。ミトコンドリア DNA に由来する DNA 断片 (リード) は, 久米三成 4 号墳 1 号主体 1 号人骨で最も多く, 勝負砂古墳人骨で最も少なかったが, 大多数の個体でハプログループ推定に十分なリード数を得ることができている。APLP 分析では結果を得ることのできなかった狩谷 6 号女性人骨についてもハプログループを決定できた。ただし, 狩谷 5 号人骨と 6 号墓男性人骨では, 分析の途中でインデックスホッピングという試料同士の混入が起きた可能性があることから, 最終的な判断を保留した。そのためこれらのサンプルについては再度の実験が必要となる。しかし今回は時間の都合でそれができなかったため, この 2 体については APLP 分析の結果をもって本報告の結論をしている。再実験については今後の課題としたい。

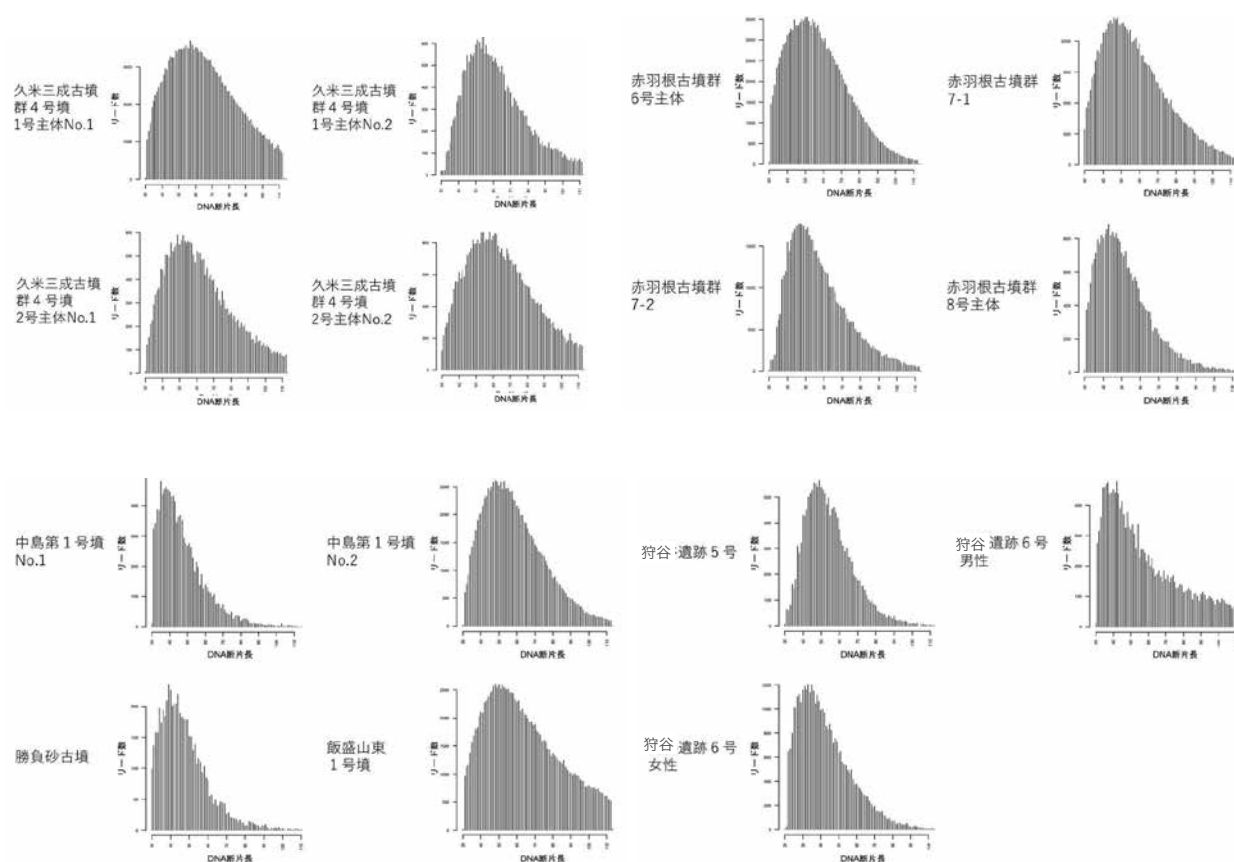


図2 それぞれの個体から得られた DNA 断片長のヒストグラム

全ての個体で DNA の断片長は 100bp. 以下で、古代 DNA の特徴を示している。現代人の DNA 断片の場合は、これよりもはるかに長くなるので、このように短い断片ばかりあるサンプルは、古代人の DNA であると判定できる。

IV 考察

今回は、岡山県内の古墳から出土した人骨 15 体のミトコンドリア DNA に全塩基配列を解析した。その結果、ほとんど全ての個体で分析に充分な量の DNA を回収し、細分されたハプログループを決定できた。予備的に行った APLP 分析と NGS を用いた解析で結果に矛盾はなく、正確なハプログループが推定できたと考えられる。

ミトコンドリア DNA は母系に遺伝するので、全配列が完全に一致した場合は、かなりの確立で母系の血縁があると判定して良い。表 3 に全配列から得られた各ハプログループ内での特異的な変異部位を列挙した。狩谷 6 号女性をはじめとして、かなり特殊な配列を持っている個体もあり、将来的に古墳人骨のミトコンドリア DNA の分析が進んでいけば、それを手掛かりとして地域の母系の系統を追求することができると考えられる。

赤羽古墳群 7 号墓の第 1 主体の 2 体（壮年男性と熟年女性の組み合わせ）はミトコンドリア DNA の配列が完全に一致したので、母系の血縁関係があると判断される。一方、それ以外の個体については同一配列を持つものではなく、母系の血縁は認められなかった。

表 2 ミトコンドリアゲノム分析の結果

遺跡	個体 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)	ピークリード長 (n)	平均深度 (x)	カバレッジ	Quality (%)	ハプログループ推定 *1	APLP 分析による推定	ハプログループ
久米三成古墳群 4 号墳	1 号主体 No.1	1,070,104	191,182	57	752.20	1.000	0.9819	D4g1c	D4g	D4g1c
	1 号主体 No.2	226,033	23,834	55	90.64	1.000	0.8384	B4c1a1a	B4c	B4c1a1a
	2 号主体 No.1	129,728	25,633	49	95.86	1.000	0.9903	M7a1a7	M7a1	M7a1a7
	2 号主体 No.2	208,661	42,553	54	166.09	1.000	0.9637	D5c1a	D5 (D5a でない)	D5c1a
赤羽根古墳群	6 号主体	706,550	148,098	48	513.21	1.000	0.9105	B4b1a1	B4b	B4b1a1
	7-1	603,997	98,546	48	346.48	1.000	0.9969	M7b1a1a1	M7b1a1a1	M7b1a1a1
	7-2	537,825	59,684	48	206.42	1.000	1.0000	M7b1a1a1	M7b1a1a1	M7b1a1a1
	8 号主体	301,498	26,622	42	82.79	1.000	0.9922	D4g1	D4g	D4g1
中島第 1 号墳	No.1	303,763	11,214	35	31.74	1.000	0.9908	M7a1a1a	M7a1	M7a1a1a
	No.2	395,847	103,953	49	366.54	1.000	0.9903	M7a1a7	M7a1	M7a1a7
勝負砂古墳	—	95,847	5,721	40	16.34	1.000	0.9609	D4i	D4 (D4e, g, h, j, o でない)	D4i
飯盛山東 1 号墳	—	922,420	129,104	52	497.20	1.000	0.8990	B4c1a1c	B4c	B4c1a1c
狩谷遺跡	5 号	139,681	16,170	49	52.88	1.000	— *2	— *2	D4 (a, e, g, h, j, o, b2 でない)	—
	6 号墓男性	292,456	16,832	37	58.63	1.000	— *2	— *2	D4 (a, e, g, h, j, o, b2 でない)	—
	6 号墓女性	290,806	37,412	44	115.62	1.000	0.9299	N9b1	N9	N9b1

*1 Kanzawa-Kiriyama et al. (2017) の方法で推定

*2 Inex hopping のため、ハプログループ推定不可

表 3 ミトコンドリアゲノムに見られた DNA 多型

遺跡	個体 ID	ハプログループ	個体特異的変異 *
久米三成古墳群 4 号墳	1 号主体 No.1	D4g1c	C16193T
	1 号主体 No.2	B4c1a1a	G14249A, T14311C, CA16179C, T16519C
	2 号主体 No.1	M7a1a7	—
	2 号主体 No. 2	D5c1a	TCC149T, T16093C, A16183AC, T16519C
赤羽根古墳群	6 号主体	B4b1a1	T146C, T16519C
	7-1	M7b1a1a1	—
	7-2	M7b1a1a1	—
	8 号主体	D4g1	—
中島第 1 号墳	No.1	M7a1a1a	—
	No.2	M7a1a7	A3156G
勝負砂古墳	—	D4i	T204C, G207A, C16184T, T16519C
飯盛山東 1 号墳	—	B4c1a1c	T16519C
狩谷遺跡	6 号墓女性	N9b1	T195C, C198T, G7598A, A16066G, A16183C, T16519C

*「—」は追加変異が見られないことを示す

ミトコンドリア DNA のハプログループは地域的に偏在しているので、それを手掛かりとして集団の遺伝的な構成について考察することが可能である。日本列島では、基層集団（縄文人）は基本的にはハプログループ N9b と M7a を持つことが知られている [Adachi et al. 2011]。主として N9b は東日本から北日本に、M7a は西日本に分布する。今回見いだされた縄文系のハプログループは M7a 系統が 3 体、N9b が 1 体であった。

それ以外のハプログループは弥生時代以降、大陸から列島にもたらされたものと考えている [篠

田 2019]。その点から今回判明したハプログループを眺めてみると、在来の縄文系と考えられるものが 4 例 (30 %), 渡来系と考えられるものが 11 例 (70 %) である。いずれにせよ分析個体数が少ないので確実な事は言えないが、現代日本人では、M7a が占める割合はおよそ 7 % 程度である [Tanaka et al. 2004] ことを考えると在来系がやや多い傾向が認められる。また両者が同一の古墳に混合する状況からは、在来系の母系のハプログループが、特に排除されることもなく渡来集団に吸収されていった状況もうかがえる。なお、実際の混合の様子は核ゲノムを解析することで更に明確になるので、引き続き解析を進める予定である。

今回の分析で古墳人骨にもゲノム解析が可能な DNA が残存していることが明らかとなった意義は大きい。更に詳細な解析を進めて、集団の遺伝的な性格や人骨間の血縁関係を明らかにし、古代史研究に貢献することを今後の課題としたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、資料の提供などにご尽力いただいた岡山理科大学の富岡直人教授と環境考古学教室の皆さまに感謝いたします。また人骨の分析を許可して頂いた岡山県教育委員会にも感謝します。なお、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。

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: 346-360.
- 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): 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
- Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L.F., 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): 14616-14621.
- 江見正己 1981: 「X 発掘調査報告〔1〕赤羽根古墳群発掘調査報告」『岡山県埋蔵文化財報告』11, 岡山, pp.85-97
- Green R.E., Krause J., Briggs A.W., et al. 2010: A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science*, 328: 710-722.
- Hanihara K. 1991. Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review*, 2: 1-33.
- 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.
- Kanzawa-Kiriyama H., Kryukov K., Jinam T., et al. 2017: A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. *Journal of Human Genetics*. 62:213-221.
- 川中健二 1982: 「鑑定結果報告〔1〕久米三成 4 号墳出土人骨〔2〕赤羽根古墳群出土人骨」『岡山県埋蔵文化財報告』12, 岡山, pp.163-184
- 前角和夫 2018: 「土砂採取事業にともなう狩谷遺跡群の発掘調査 2」『総社市埋蔵文化財調査年報』27 総社市教育委員会, 岡山, pp.47-51

Maricic T., Whitten M., and Pääbo S. 2010. Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE*, 5(11): e14004.

中川朋美 2019:「岡山県総社市狩谷古墳群出土人骨」『総社市埋蔵文化財調査年報』28

小郷利幸 1991:「久米三成 4 号墳」近藤義郎編『前方後円墳集成』中国・四国編 山川出版社, 東京, p.283

岡山大学考古学研究室編 2009: 勝負砂古墳:『勝負砂古墳調査概報』学生社, 東京

山陽町史編集委員会 1986: 中島第 1 号墳:『山陽町史』山陽町, 岡山, p.137

Sawyer S., Krause J., Guschanski K., Savolainen V., Paabo S. 2012: Temporal Patterns of Nucleotide Misincorporations and DNA Fragmentation in Ancient DNA. *PLoS ONE* 7(3): e34131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034131>.

清家章・坂本稔・瀧上舞 2020:「岡山県内古墳出土人骨の年代学的調査—飯盛山東 1 号墳・勝負砂古墳・狩谷古墳群・久米三成 4 号墳・赤羽根古墳群・中島 1 号墳—」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 228 集, pp.345-359

清家章 2001:「吉備における同棺複数埋葬とその親族関係」『古代吉備』23 号 古代吉備研究会, pp.57-72

清家章・清山隆編 2021:『飯盛山東 1 号墳発掘調査報告書』岡山大学考古学研究室 (印刷中)

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) Vol.125, pp.49-63

篠田謙一 2019: 日本人になった祖先たち. NHK 出版

篠田謙一, 神澤秀明, 角田恒雄, 安達登 2020: 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.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.

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, 1832-1850.

Woodward, S.R., M.J. King, N.M. Chiu, M.J. Kuchar and C.W. Griggs. 1994: Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR methods and Applications*, Vol.3, pp.244-247.

柳瀬昭彦編 1979:『久米三成 4 号墳』岡山県埋蔵文化財発掘調査報告 (30) 岡山県教育委員会, 岡山

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)

(2020 年 12 月 11 日受付, 2021 年 5 月 24 日審査終了)