

鹿児島県西之表市小浜遺跡出土 中世人骨のミトコンドリアDNA分析

Mitochondrial DNA Analysis of Medieval Human Bones
Excavated from Obama Site, Nishinoomote, Kagoshima Pref.
SHINODA Ken-ichi, KANZAWA Hideaki,
KAKUDA Tsuneo, ADACHI Noboru and TAKENAKA Masami

篠田謙一・神澤秀明・角田恒雄・安達 登・竹中正巳

I はじめに

日本列島の南西、約 1000 km にわたって連なる琉球列島からは、日本では最古となる旧石器時代に遡る人骨化石の発見が続いている。このことはホモ・サピエンスが初期拡散によって東アジアに展開していく中で、この地域にもヒトが進入したことを示しており、琉球列島は日本列島への南からのヒトの進入ルートとして注目されてきた。また近年、考古学や歴史学の研究が進んだことで、琉球列島がこれまでに考えられてきた以上にダイナミックな独自の歴史を持っていることも分かってきた [高宮編 2018]。これまでの日本人形成の定説である二重構造説 [Hanihara 1991] では、琉球列島集団を本土日本の周辺集団として捉えてきた。しかし独自の人類史を持っていることが示唆されるようになった今、この地域の集団形成史を明らかにすることは、日本人の形成を考える上でも重要な意味を持っている。

我々はこの地域における人類史を明らかにするために、貝塚前期から中世に至る人骨の DNA の分析を続けてきた。その結果、九州本土と琉球列島の間には、縄文時代前期に遡る母系の断絶があることを明らかにしている [篠田ほか 2019]。しかしながら、数千年にわたる人類史を明らかにするためには、少数例の解析結果からその全体像を掴むことは難しく、今後も時代の幅と地域を広げて分析を続けていく必要がある。

今回は、種子島の東海岸の北側、西之表市伊関浜走に所在する小浜遺跡から出土した中世人骨 3 体（小浜遺跡 1 号人骨、5 号人骨、6 号人骨）の分析を手がける機会を得た。小浜遺跡は小さな海岸砂丘部に立地している。付近の工事によって人骨が発見されたことをきっかけとして、1997 年に熊本大学を中心とする調査団（小浜遺跡発掘調査団）が発掘調査を行い、3 基の墓からそれぞれ 1 体ずつ、合計 3 体の埋葬人骨が出土している [甲元・蔵富士 1998]。1997 年調査で出土した人骨は、小浜遺跡 1 号人骨（性別不明・小児 6～7 歳）、同 2 号人骨（女性・壮年）、同 3 号人骨（男性・壮年）と呼称されている。また、採砂等の工事の際に出土した人骨は、小浜遺跡 4 号人骨（男性・壮年）、同 5 号人骨（男性・壮年）、同 6 号人骨（男性・熟年）と呼称されている。1997 年の調査では、副葬品などは出土しなかったものの、墓と層位的に時期が近いと考えられた層から古墳時代並行期の

上能野式土器が出土したことから、出土人骨は古墳時代相当期のものとして報告された。今回、DNA分析を行う3体の人骨について、国立歴史民俗博物館による炭素14年代法による再検査を行ったところ、中世人骨であることが明らかになっている〔竹中ほか2021〕。

種子島には弥生時代から古墳時代にかけての大規模な埋葬遺跡である広田遺跡が存在する。広田の人骨の形態は基本的には縄文人に似るが、南九州弥生人として括られる独特の形態をしていることが指摘されてきた〔内藤1984〕。この広田遺跡から出土した古墳時代人骨については既にミトコンドリアDNAの分析結果が報告されており〔篠田ほか2021a〕、九州の縄文人や沖縄の貝塚前期人骨に特徴的なミトコンドリアDNAハプログループであるM7a1ではなく、B4fを持つことが分かっている。核ゲノム解析の結果を待たなければならないが、この結果は、広田遺跡の人々を単純に縄文時代から続く系統の属する人であると結論づけることが難しいことを示している。広田集団のその後の展開を考える上で、種子島における人類史の復元は重要で、今回の小浜遺跡中世人骨の解析も重要な意味を持っている。

II 材料及び方法

分析に用いた人骨を表1に示す。合計3体を用いており、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と側頭骨をサンプリングの対象とした〔Woodward et al. 1994, Pinhasi et al. 2013〕。中でもDNAが多く含まれているとされる側頭骨を最初に選定し、側頭骨が使えない場合には、臼歯をサンプリングした。その結果、側頭骨1体分と大白歯2体分をサンプリングした。

表1 解析した小浜遺跡出土のサンプル

人骨番号	解析部位	備考
小浜1号	左側頭骨	性別不明・小児(5-6歳)
小浜5号	上顎左第2大白歯	男性・壮年
小浜6号	上顎右第2大白歯	男性・熟年

今回の分析では、最初にサンプルに解析可能な量のDNAが残っているかを調べるために簡易分析であるAPLP分析〔Amplified Product-Length Polymorphism method, Kakuda et al. 2016〕を用いた解析を行い、次に次世代シーケンサ(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。なお、DNAの抽出と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〕のプロトコールに従って実施した。

NGSによる分析では、最初に得られたリードが古代人に由来するかを調べるために、APLP分析で用いた抽出DNA溶液からライブラリを作成して塩基配列を決定し、得られたDNA断片のリード長(各DNA断片の長さ)およびC/T、G/Aの置換率を調べ、DNA断端の末端に古人骨特有の置換が観察されるかどうかを調査した。この際、ミトコンドリアDNAだけを濃縮する操作を行って、回収率を上げる操作をしている。また、リード長のピークを調べ、古代DNAの特徴である100bp以下であるかどうか調べて、抽出DNAが人骨本来のものであるかを検定した。

Ⅲ 結果

1. APLP 分析

APLP 分析の結果を図 1 および表 2 に示す。1 号人骨は側頭骨，5 号と 6 号は上顎の大白歯から DNA を抽出した。その結果，実験を行った 3 体全てでマクロハプログループ M と N を分離するプライマーによる解析，ならびに細分 APLP 分析の双方が可能で，これらのサンプルには古代 DNA 解析に十分な量の DNA が残っていたことが示された。なお，この簡易分析で，1 号人骨のハプログループは N9a，5 号は B5，6 号は M9a を持つことが判明した。

次に 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。図 2 には得られたミトコンドリア DNA のリード長と末端の置換率を示した。全てのサンプルで末端に古人骨固有の置換が観察され，また 50～70 塩基程度のリードが多数を占めるといふ古人骨に由来する特徴を有していた。これらの結果から，今回解析したサンプルから抽出された DNA は，これらの個体が本来持っていたものであると判断した。なお，側頭骨から DNA を抽出した 1 号人骨は，やはり DNA の含有率が高く，核ゲノムの解析も可能である事が示されている。これまでの我々の経験からも，核ゲノム解析まで行えるのは側頭骨サンプルの場合が多く，今回もそれを追認することになった。

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, 3）。得られたミトコンドリア DNA 断片の数は充分で，全配列を正確に決定することができている。そこか

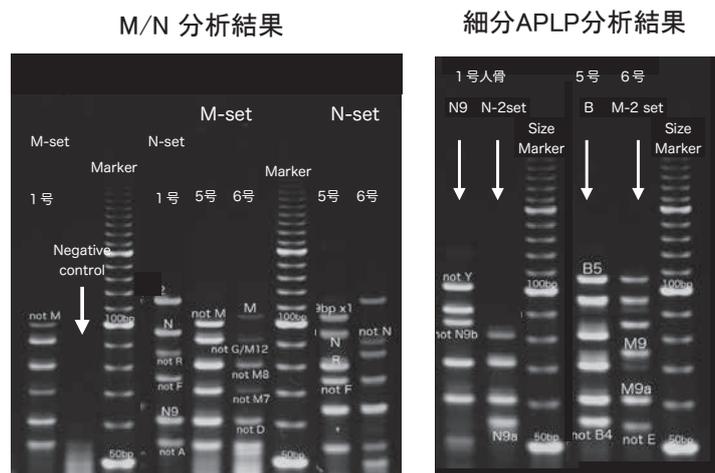


図 1 APLP 分析

APLP 分析は，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する。本分析では，各個体がミトコンドリア DNA のマクロハプログループ（大分類）である M と N のどちらに属するかを判定するための解析を行い（左図），次にそれぞれを細分するプライマーセットで解析し，ハプログループを決定している（右図）。

電気泳動の結果得られ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。図中で各個体が持つハプログループは，その根拠となるバンドの位置にアルファベットと数字で表している。

表2 ミトコンドリアゲノム分析の結果

人骨番号	小浜1号	小浜5号	小浜6号
総ペアリード数 (n)	1,029,164	308,281	274,619
ミトコンドリア DNA 由来のリード数 (n)	361,567	80,068	72,241
(%)	37.51 %	27.27 %	37.59 %
重複リードの除去, mapq20 後のリード数 (n)	226,142	67,584	29,019
ハプログループ推定 (Haplogrep2.0)	N9a2c	B5b2b	M9a1a1a
(Quality)	1.0000	0.9165	0.9960
ハプログループ推定 (1)	N9a2c	B5b2b	M9a1a1a
Schmutzi による汚染率推定 [min, max]	0.090 [0.065-0.115]	0.515 [0.490-0.540]	0.145 [0.105-0.185]
ハプログループ不一致 (%) [95% 信頼区間] (1)	0.30 % [0.17-0.44]	2.50 % [1.91-3.09]	0.46 % [0-1.36]
APLP 分析の結果	N9a	B5	M9a
ハプログループ	N9a2c	B5b2b	M9a1a1a

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

表3 ミトコンドリアゲノムに見られた DNA 多型

人骨番号	ハプログループ	個体特異的変異
小浜1号	N9a2c	
小浜5号	B5b2b	C1192T, G10685A, T16519C
小浜6号	M9a1a1a	T195C

ら判定したミトコンドリア DNA のハプログループは、1号が N9a2c、5号が B5b2b、6号が M9a1a1a であり、APLP 分析の結果と一致し、更に細分されたサブハプログループの判定までが可能だった。更に全配列情報から、それぞれの個体が持つ固有の塩基置換を表3に示した。1号人骨ではこの系統の中で特異的な変異を持たなかったが、5号と6号では、これまでに知られていない変異を持っていたので、同様の変異を持つ人骨が発見されれば、母系の血縁関係があることが予想される。

IV 考察

これまでに我々が行った分析から、琉球列島の貝塚前期の遺跡や、九州の縄文時代の貝塚から出土した人骨のほとんどがハプログループ 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 [篠田ほか 2017]。つまりミトコンドリア DNA ハプログループ M7a1 は、九州沖縄の縄文時代を代表するハプログループであると言える。しかし、今回の解析では M7a1 系統が出現せず、弥生期以降に大陸からもたらされたと考えられるハプログループのみが確認された。

一方、1号人骨が持つハプログループである N9a 系統が日本人に占める割合は 4.6 %、5号の B5 系統は 4.3 %、6号の M9 系統は 3.5 % [Tanaka et al. 2004] であり、渡来集団が日本にもたら

したハプログループの主体である D4 系統は、今回の解析では 1 体も検出されなかった。これを少数例によるサンプルの偏りとみるか、この地域の中世集団が特殊な遺伝的な構成をしていたと考えるのか、その判断するためには核ゲノムの解析までが可能だと考えられる 1 号人骨の結果を参照する必要がある。今後の課題としたい。また、引き続き 5, 6 号についても核ゲノム解析が可能かどうかを精査していく予定である。

南九州の古墳を分析した結果では、この M7a1 系統と弥生時代以降に日本に入ったと考えられる系統の双方が認められている [篠田ほか 2021b]。また先に指摘したように、古墳時代の広田遺跡から検出されたハプログループも、縄文時代から連続するものではなかった。少なくとも古墳時代以降、中世に至る時期に南九州では種子島など島嶼部を含む地域で、集団の遺伝的な特徴が大きく変わったことは、今回の結果を見ても間違いない。それは弥生時代以降における大陸から本土日本への集団の移住と、その後続く列島内部での在来集団との混血という大きな変化の中で起こったと考えられるが、地理的な状況とそれまでの歴史的な経緯の中で、一律に語ることはできないはずである。南九州における集団の変遷を明らかにすることは、列島における集団の変遷史の一端を明らかにすることに繋がっている。今後も更に解析例を追加して、この地域の集団の形成史を明らかにしていきたい。

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。

参考文献

- Hanihara K. 1991: Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review*, 2: 1-33.
- Kakuda et al., 2016: Kakuda T, Shojo H, Tanaka M, Nambiar P, Minaguchi K, Umetsu K, Adachi N. 2016. Multiplex APLP system for haplogrouping extremely degraded East-Asian mtDNAs. *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.
- 甲元真之・蔵富士寛 1998：小浜遺跡調査概要、環東中国海沿岸地域の先史文化、pp.3-12、金曜会
- 内藤芳篤 1984：九州における縄文人骨から弥生人骨への移行、日本人類学会編『人類学—その多様な発展—』、日経サイエンス、pp.52-59
- 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.
- 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.159-172
- 篠田謙一、神澤秀明、角田恒雄、安達登、竹中正巳 2021a：「鹿児島県南種子町広田遺跡出土人骨のミトコンドリア DNA 分析」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 228 集、pp.433-439
- 篠田謙一、神澤秀明、角田恒雄、安達登、竹中正巳 2021b：「南九州古墳時代人骨のミトコンドリア DNA 分析—島内地下式横穴墓群・町田堀遺跡・立小野堀遺跡—」『国立歴史民俗博物館研究報告』第 228 集、pp.417-425

-
- 高宮広土編 2018:『奄美・沖縄諸島 先史学の最前線』, 南方新社
- 竹中正巳, 坂本稔, 瀧上舞 2021:「鹿児島県西之表市小浜遺跡出土人骨の年代学的調査」『国立歴史民俗博物館研究報告』第229集, pp.169-173
- Tanaka M, Cabrera VM, Gonz-lez AM, Larruga JM, Takeyasu T, et al. 2004: Mitochondrial genome variation in East Asia and the peopling of Japan. *Genome Res* 74: 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.

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)

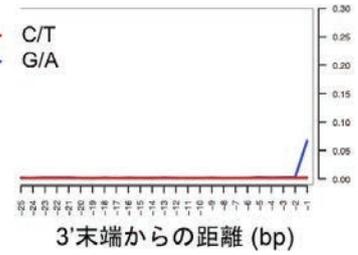
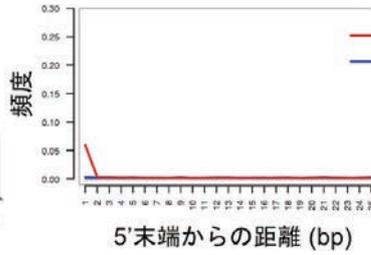
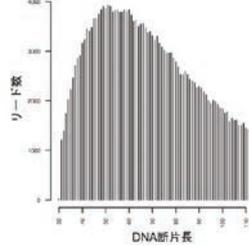
角田恒雄 (山梨大学医学部法医学講座)

安達 登 (山梨大学医学部法医学講座)

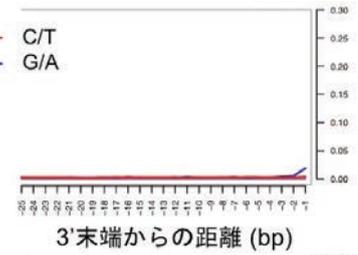
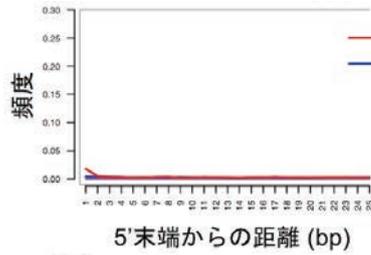
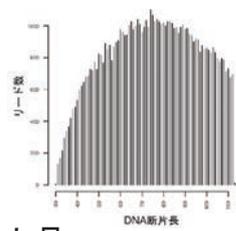
竹中正巳 (鹿児島女子短期大学)

(2020年12月11日受付, 2021年5月24日審査終了)

1号人骨



5号人骨



6号人骨

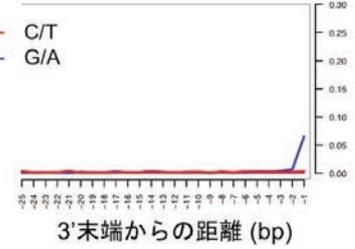
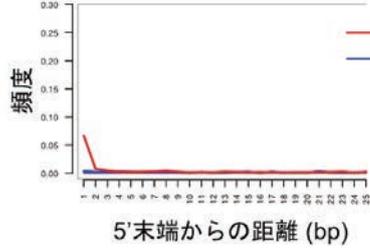
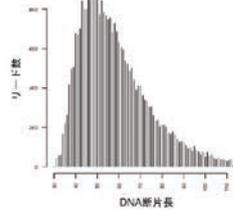


図2 断片長と末端の置換率

それぞれの個体から得られた DNA 断片長のヒストグラム (左)
 全ての個体で DNA の断片長は 100b.p. 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、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。
 末端の置換率 (右)
 経年変化をした DNA は末端部分でシトシン (C) からチミン (T)、アデニン (A) からグアニン (G) に変異することが知られている。そこで断端部分をヒト標準配列と比較して、このような変異が観察されるかを調べることで、分析した DNA が古代試料に由来するかを知ることができる。本研究で分析した DNA には、そのような特徴を観察することができる。