

生物遺骸に残された "DNA の記録" を読み解く

水野 文月

(東邦大学)

ご紹介いただきまして、ありがとうございます。東邦大学の水野と申します。本日は、このような機会をいただきまして、ありがとうございます。関係のプロジェクトの諸先生方、皆様に心より感謝申し上げます。今、ご紹介いただきましたように、私の所属は医学部の法医学講座です。医学部教育、司法解剖にも参加させていただいております。研究としましては、次世代シーケンサを用いた古代ゲノム分析を、現在専門として取り組まさせていただいております。本日は、ご参加の皆様のご期待に沿えるかどうか、大変不安でございますが、どうぞよろしくお願い申し上げます。

本日、私からは古代 DNA 研究に関連する用語や手法について、また、これまでに自分が関わらせていただいた研究をいくつか交えながら、古代ゲノム研究の一端をご紹介させていただければと思っております。

DNA とゲノムと遺伝子

では、本日のタイトルにも含まれています、DNA から始めたいと思います。DNA は、デオキシリボ核酸という物質のことです。地球上の多くの生物において、遺伝情報の継承と発現を担う高分子生体物質と説明されているかと思えます。DNA の塩基には、グアニン、シトシン、アデニン、チミンの 4 種類があります。皆様にとって DNA はなじみのある言葉かと思えますけれども、ゲノムとは何が違うのか、ご存じない方もいらっしゃるかと思えます。ゲノムは、ある生物をその生物たらしめるのに必要な遺伝情報の総体と定義されています。さらに遺伝子という言葉もありますが、遺伝子は、例えば耳垢がドライかウェットかを定める遺伝子、ABO 式血液型を決める遺伝子、といったように特定の遺伝情報の最小単位を指しています。DNA は物質、ゲノムは総体、そして DNA の特定の部分が遺伝子ということになるかと思えます。

次に、私たちの DNA はどこにあるのか。ご存じのとおり、細胞に存在しています。細胞中の核には両親から受け継ぐ DNA が、常染色体、X、Y 染色体、といった構造で格納さ

れています。そして、ミトコンドリアという細胞小器官には、母親のみから受け継ぐもう一つの DNA (ミトコンドリア DNA) が存在しています。核ゲノム (核 DNA) は約 30 億塩基から構成されているのに対して、ミトコンドリアゲノムは 16,569 塩基となっています。多くの場合「ミトコンドリアゲノムを解析した」と言えば、16,569 塩基全ての配列情報を解読したのだと受け取ることができません。それに対して、「核ゲノムを解析した」というのは、核ゲノムの約 30 億の塩基配列情報を全て明らかにしたことを意味してはなりません。大量の塩基配列情報を、次世代シーケンサを用いて得ることを慣用的にゲノム解析と称して使われている場合が多いかと思えます。

ゲノム解析に関連した身近なニュースとして、現在、猛威を振っている新型コロナウイルスが挙げられるかと思えます。2021 年末までに、日本の全人口の約 4.1%、170 万人以上が新型コロナウイルスに感染したと診断されています。このウイルスは、増殖と流行を繰り返すなかで、その遺伝子を 2 週間で 1 ヶ所程度のスピードで変化させています、すなわち、塩基配列に変化が生じています。2021 年末からは、オミクロン株が注目を浴びていますが、どの株に相当するのか、変異株同定のために行われるのがゲノム解析です。(なお、2022 年 6 月時点で、オミクロン株の新たな変異系統が次々と確認されています。) 後ほどご紹介します次世代シーケンサの登場と普及によりまして、以前よりも容易に、大量の塩基配列を決定することが可能となりました。新型コロナウイルス変異株解析では、約 3 万塩基のウイルスゲノム配列を全て明らかにすることで、新たな変異種であるかを見極めていきます。

古代 DNA 分析から古代ゲノム分析へ

初めて古代 DNA 分析が行われたのは 1984 年、20 世紀初頭に絶滅して博物館に保管されていた Quagga (クアッガ) の筋肉から DNA を抽出、分析したのが古代 DNA 研究のはじまりと言われています (Higuchi et al. 1984)。このとき、229 塩基のミトコンドリア DNA 情報を取得したと報告されています。次世代シーケンサが登場する以前の、主な古代 DNA の分析手法の概略を図 1 に示します。左から、試料から抽出した DNA 断片を (黒色の直線で) 示しています。目的とする領域に相補的な塩基をデザインした (ピンク色の直線の) プライマーを結合させ、(赤色の矢印のように) PCR ポリメラーゼによって DNA 合成を行いま

図1

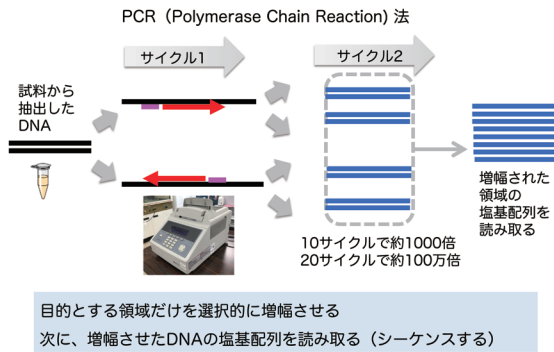
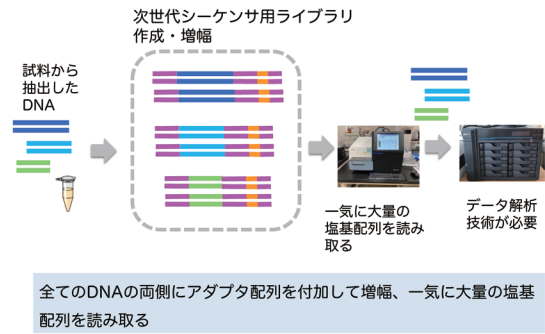


図2



す。理論的には、10 サイクルで約 1000 倍、20 サイクルで約 100 万倍と、PCR のサイクル数を増やせば、目的とする領域のコピー（青色の直線）が合成されます。最後に、増幅できた DNA 領域をサンガーシーケンス法によって、塩基の並びを読み取ることになります。

では、次世代シーケンサは何が違うのか（図2）。微量な古代 DNA を分析するためには DNA を増幅するステップは不可欠ですが、大きな違いは、目的とする領域だけではなく試料から抽出した DNA 全てに対して、増幅ステップを含んだライブラリ化を行っている点です。具体的には、試料から抽出した DNA 断片に対して、両側にアダプタ配列と呼ばれる共通の配列を付加します。これを次世代シーケンサ用ライブラリと呼んでいます。このライブラリをもちいて一気に大量の塩基配列情報として読み取って、大きなデータを取得するのが次世代シーケンサの特徴と言えます。現在、世界的に最もシェアの大きい次世代シーケンサは、イルミナ社のシリーズですが、取得データ量が小さいものから大きいものまで、目的に合わせて多様な機種が販売されています。

次世代シーケンサの登場によって、一気に大量のデータを得られるようになり、古代 DNA 分析も大躍進を遂げました。しかし、全ての試料で成功するとは限りません。その理由は、古人骨などの生物遺骸から抽出した DNA には、いくつかの固有の問題点があるためです。代表的なものは、残存 DNA 量が少ないこと。また、DNA は断片化されて短くなっていること等が挙げられます。このため、次世代シーケンサを用いた初期の DNA 分析では、その対象は極めて保存状態の良い試料に限られていました。永久凍土から発見された毛髪のケラチン試料や、冷涼な洞窟や石灰岩層といった良好な保存環境から出土した骨試料などで（Gilbert et al. 2008, Reich et al. 2010）。これらは、試

料から抽出した DNA のうち、例えば 84% や 70% といった極めて高い割合で、目的とするヒトの DNA が試料中に含まれていました。

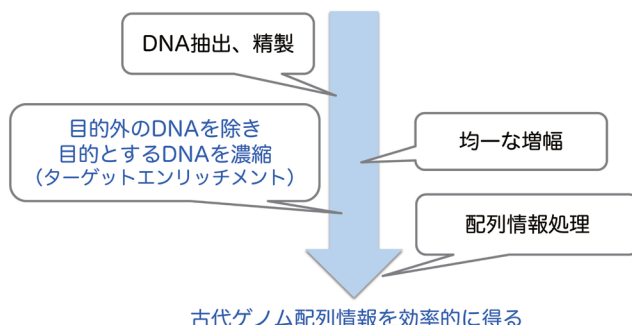
2021 年時点で、数千の標本資料から DNA のデータが収集されていますが、かなり古い時代までさかのぼるようになっていきます。例えば、最も古いものでは、カナダの 50 万年以上前の永久凍土から出土したウマの骨から、分析に成功しています。得られた DNA 情報を用いて、現生のウマやロバと併せて解析をしますと、その共通祖先は 400 万年から 450 万年前にさかのぼることがわかったという報告です (Orlando et al. 2013)。また、絶滅種の一つ、マンモスの分析もあります。44,800 年前のシベリア北東部の個体、絶滅直前と言われる 4,300 年前、このウランゲリ島のマンモスの DNA 分析なども行われています (Palkopoulou et al. 2015)。

一方、日本列島を含むアジア地域は、DNA の保存状態は厳しいことが多いです (Hofreiter et al. 2015)。理由は、骨に残存する DNA の量が少ないことに加えて、抽出した DNA の大部分が土壌菌に由来する DNA であり、目的とする DNA が微量であることが挙げられます (Jans et al. 2004)。加えて、日本列島は火山が多く、火山灰による酸性土壌であることで骨が残っていない、あるいは骨が残っていても DNA の保存に悪い影響を与えている状況があります。以上のような“特徴”がありますので、次世代シーケンサを用いた古人骨 DNA 分析に対する私たちの戦略は、それぞれのステップで工夫を重ねていくということにはなりますが、特に大きなポイントとしましては、ターゲットエンリッチメントという手法をカップリングさせることで（図3）。目的外の DNA を除き、目的とする DNA を選択的に濃縮する手法です。その結果、ヒト DNA を 0.0006% しか含まない古人骨からでも、目的のゲノム情報を効率的

図3

次世代シーケンサをもちいた古人骨DNA分析：私たちの戦略

- ✓ 残存DNA量が少ない
- ✓ DNAは断片化されている
- ✓ その上、残存DNAの大部分は土壌菌等のDNA



に獲得することができるようになりました (Kihana et al. 2014)。

イルミナ社の次世代シーケンサ MiSeq (マイシック) は、データ量や読み取れる DNA 断片長、ランニングコストの点から、研究室の共同利用機器として多く利用されているパーソナル型の機種です。出力データ量は通常のノート PC で解析可能な範囲です。先ほどご説明したターゲットエンリッチメントによって、この MiSeq でもミトコンドリアゲノム全長配列の取得が可能になりました。一方、HiSeq (ハイシック) という機種になりますと、個人差を示す核ゲノム配列の大多数の取得が可能になっています。

イングランド王リチャード3世の系譜を辿る (King et al. 2014 より)

ここからは、少し研究例をご紹介させていただければと思います。ご存じの方も多くいらっしゃるかも知れませんが、イングランド王、リチャード3世の報告からご紹介したいと思います (King et al. 2014)。600年を経て、エスター修道院跡から出土した人骨に関する DNA 分析です。リチャード3世の遺体が埋葬されたという教会が壊されて正確な埋葬場所がわからなくなりましたが、2012年に古地図を手掛かりに、その埋葬場所が突き止められました。全身の骨が残っていましたので、形態学的な情報も多く得られており、例えば脊椎が湾曲していた特徴なども明らかになりました。DNAの保存状態もよく、瞳や髪の色などの形質に関わる遺伝情報や、ミトコンドリア DNA 情報が、個人同定に貢献しました。

ここで、ミトコンドリア DNA がなぜ有用な母系の遺伝指標として人類学的研究に用いられてきたのか、少しご説明したいと思います。最初に申し上げましたとおり、ミトコンドリアという細胞小器官には、核と別の、独自の DNA が存在しています。組織によって数に違いはありますが、一つの細胞の中にミトコンドリアは複数あります。そして、そのミトコンドリアの中に環状の DNA が複数ありますので、トータルしますと1細胞あたりのミトコンドリア DNA は数十から、数千コピー存在することになります。一方、核 DNA は膨大な情報を持っていますが、一つの細胞に2コピーしかありませんので、時間の経過した古い試料や劣化した試料の DNA の場合、ミトコンドリア DNAの方が分析できる(成功する)可能性が広がります。さらに、ミトコンドリア DNA は全長 16,569 塩基の小さなゲノムですが、進化速度が早いため個人間での塩基配列の違いが大きいです。そして核ゲノムとは異なり、基本的に組み換えがありません。またミトコンドリア DNA は、母から子ども、その子どもが女性の場合にはさらにその子どもへと母系で受け継がれていきます。したがって、シンプルに母系を追うことができる遺伝指標になります。

リチャード3世の母系に関する家系図の中で、3人のミトコンドリア DNA を分析し、得られた全長配列を比較しています。Anne of York (アン・オブ・ヨーク) はリチャード3世のお姉さんですが、彼女から19世代を経た子孫の方の配列は、リチャード3世と思われる人骨の配列と完全に一致していたことが明らかになりました。また、21世代を経たもう一人の子孫の方の配列は、8,994番目の塩基が1ヶ所違っている結果でした。先ほど申し上げたよ

うに、ミトコンドリア DNA は進化速度が早いため、21 世代を経るなかで、どこかで 1 塩基の置換が起こり子孫に受け継がれていくことはまったく不思議ではありません。

ミトコンドリア DNA の 8,994 番目の塩基が 1 ヶ所違うといった変異について、Single Nucleotide Polymorphism の略で SNP と呼んでいます。このような塩基の違いは、ミトコンドリア DNA でも核 DNA でも観察されるものです。SNP は日本語では 1 塩基多型と呼び、多型という呼び名が付いています。多型という定義は、かつては集団内頻度が 1 % 以上存在するという暗黙の理解がありました。ですが今は、癌変異に関する研究の影響が大きいかもしれませんが、SNV すなわち 1 塩基変異という呼び方も医学系ではよく見られます。ここでは、SNP と表記させていただきます。それから、STRP (Short Tandem Repeat Polymorphism) は、2 塩基から 5 塩基の反復配列の反復回数の違いです。STRP にも別の呼び方がありまして、VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) と呼ばれることもあります。このように、ゲノム中には STRP や SNP が多数存在しています。

リチャード 3 世に関しては、父系も分析されています。つまり核 DNA の Y 染色体の情報を見えています。X 染色体と Y 染色体は、ご存じのとおり生物学的性別に関わる染色体です。Y 染色体は、父から息子、さらにその息子へと受け継がれていきます。リチャード 3 世から父系を辿り 24 から 26 世代離れた子孫の方 5 人について、Y 染色体の幾つかの SNP や STRP を分析して比較が行われました。この 5 人の子孫の間では、4 人のものが共通していたのですが、いずれもリチャード 3 世の Y 染色体のタイプと、この 5 人の子孫のタイプは異なる結果でした。この結果から、子孫の中に公式の家系図に書かれた父親とは違う父親を持つ子どもがいたことを示唆する、との興味深いことが論文で述べられています。

以上、リチャード 3 世の個人同定には、母系の子孫の方との比較にはミトコンドリア情報を、父系の子孫の方との比較には Y 染色体の情報を用いています。そして、ミトコンドリア DNA の情報は、子孫の方とほぼ一致し、人骨がリチャード 3 世のものである確率が非常に高いとする証拠の一つとして示されました。

イングランド出身の最初のサムライ像を探る — 伝・三浦按針墓出土人骨の分析から —

図4

1954年に建立された伝・三浦按針墓

長崎県平戸市

三浦按針は1620年、現在の長崎県平戸市にて55歳で亡くなった



写真：水野文月

それでは、次のトピックに移らせていただきます。人骨を分析することで、そのヒストリーを探るという試みをご紹介したいと思います。伝・三浦按針墓から取り上げられた人骨に関する報告で、科学分析を組み合わせることでその人物像を捉えることができないかという試みをご紹介したいと思います (Mizuno et al. 2020)。

ご存じかと思いますが、ウィリアム・アダムスは江戸時代初期に、徳川家康に外交顧問として仕えた人物で、日本名、三浦按針と呼ばれています。1598年6月に、アダムスらを乗せた5隻からなる船団は、オランダロッテルダムを経て極東を目指しました。しかし、航海は困難を極め、リーフデ号のみが1600年4月19日に現在の大分県臼杵市に到着するに至ったと言われています。アダムスは徳川家康に重用され、通訳や大型船建造を任せられ、活躍の場を得ていきました。その功績によって旗本に取り立てられて、名字帯刀を許されただけでなく領地も与えられました。「三浦按針」という名前はここで誕生しました。「按針」は、水先案内人を意味し、「三浦」は領地の相模国三浦郡、現在の横須賀市に由来すると言われています。

徳川家康の死後、幕府は鎖国政策を取り、按針は1620年5月16日に現在の長崎県平戸市にて55歳で亡くなったと言われています (図4)。1637年の島原の乱以後のキリスト教弾圧のなかで外国人墓地の破壊が行われたため、埋葬地の正確な場所ははっきりしませんでした。しかし文献を参照しますと、按針墓としてひっそりと守り伝えられてきたという墓から、1931年に遺骨の一部が発掘されました。図5に示す写真は、長崎県平戸市の崎方公園にある、伝・三浦按針墓の写真です。今は、三浦按針墓地公園となっています。この墓石の下の調査が行われました (図6)。右側の記念碑は2020年に、按針没後400年の記念に贈呈されたものです。

図5

三浦按針墓地公園



写真：水野文月

1931年の発掘では、その後埋め戻されましたが、2017年に平戸市教育委員会によって再発掘が行われ、陶器製の壺に入った人骨が見つかりました。しかし、被葬者を特定できるような副葬品は残っていませんでした。さらに、人骨の入った陶器製の壺の下層からは、直方体の墓抗が現われました。近世すなわち江戸時代では、座葬を示す円柱形が一般的ですが、そうではなく直方体であったことから、寝棺が使用され、埋葬姿勢は伸展葬だったと考えられました。近世で、伸展葬で埋葬されるのは西洋人かキリスト教徒の場合であり、出土した人骨は西洋人である可能性が示唆されました。なお、1931年の発掘時の記録では、石碑のすぐ下に頭、肩、上肢、脊柱、腰、下肢の順序で骨が残っていたため、頭部と足の位置から、人骨の身長は170センチあまりと推定されています。2017年の再発掘によって壺から検出された人骨の保存状態は非常に厳しく、残存する骨は限定的となっていますが、1931年に改葬された際の記述、その文献に含まれる部位と一致していました。具体的な部位は、頭蓋、下顎骨、大腿骨、脛骨の一部などです。

これらの人骨を用いた科学分析として、まず年代測定が行われました。骨の有機成分は死後、置き換わることがないため、生きていた頃の情報を得ることができます。骨の成分の一つである、コラーゲンに含まれる放射性炭素を測定することによって年代測定が行われました。放射性炭素の濃度を測定し、国際的に使用されている標準物質と比較することで年代が推定されます。例えば、 450 ± 25 BP という放射性炭素年代値が得られたとします。しかし、大気中の放射性炭素の減衰は理論値からずれるため、この年代をそのまま用いることはできません。較正曲線に基づいた補正をしますと、較正後の値は暦年代として扱うことができるようになります。ここでは、西暦1415年から

図6

伝・三浦按針墓地



写真：水野文月

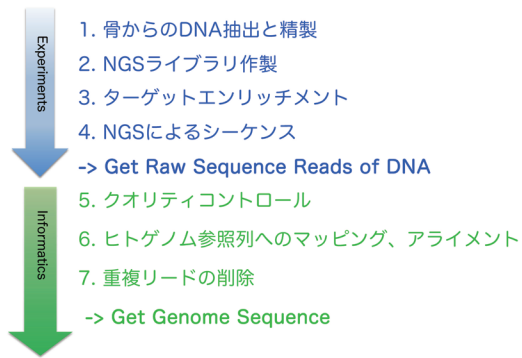
1470年という値が較正後の値になります。較正によって得られる暦年代には、幅が生じることが知られています。それ以外にも、内陸部と海岸部の放射性炭素年代値は異なるため、海洋リザーバー効果といった補正も考慮しなければなりません。

今回の出土人骨試料から得られた放射性炭素年代値は、 410 ± 30 BP という値でした。江戸時代は、較正年代の幅が広く出してしまう難しい時代ですが、較正曲線 IntCal20 を用いた較正と、海洋リザーバー効果を考慮して求められた年代は、三浦按針が亡くなった1620年と矛盾のない結果となりました。

続いて、人骨を用いた食性分析です。こちらもコラーゲンをを用いた分析になりまして、コラーゲンに含まれる炭素・窒素同位体の割合から、生前の主な食性を推定できます。これら元素の置換速度は10年以上になりますので、10年以上の長期間における平均的な食性を知ることができると考えられています。伝・三浦按針墓から出土した人骨の炭素・窒素安定同位体比を見てみます。当時の江戸時代の日本人と比較して、この人物はどうだろうかという目的で、先行研究の江戸時代の人骨170個体 (Kusaka et al. 2011, Tsutaya et al. 2014, Tsutaya et al. 2016) を比較対照として一緒にプロットしましたところ、同じクラスターの中に含まれるということが分かりました。この結果から、この人物は江戸時代の日本人の食生活に馴染んでいた、言い換えますと、長期間にわたり死亡するまで日本に居住していたと考えられます。20年にわたり日本で生活し、亡くなったという三浦按針の歴史と矛盾はありませんでした。

そして、DNA分析です。骨から抽出したDNAを分析することによって、ここでは、その人物の遺伝的背景、ルーツを推定しています。DNA分析に用いる試料について、

図7
次世代シーケンサをもちいた古人骨DNA分析

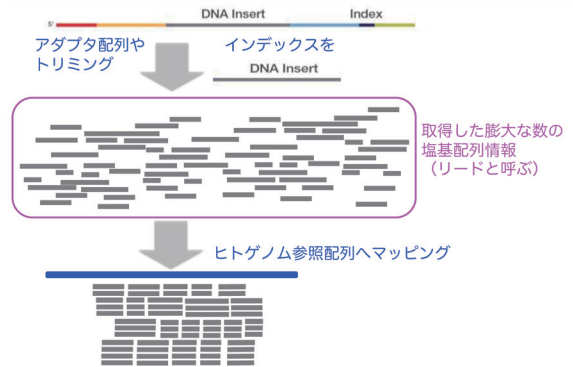


少しご紹介させていただきたいと思います。現在、DNA分析の対象となっている多くは、側頭骨の錐体部や歯です。錐体部は、かなり緻密でDNAの残りが良いとされています (Gamba et al. 2014)。それだけでなく、骨の内側からサンプリングを行いますので、貴重な試料の外観に影響を与えないという利点もあります。一方、歯の場合には、歯髄を取り出して採取し、それ以外の部分をお返すことが可能です。実際には、よりさまざまな部位からサンプリングさせて頂いています。大腿骨骨頭の内側からサンプリングしたこともあります。外観に傷を付けないという利点もありますし、人の手が触れにくい内側の方が、現代人のDNAの混入は少ないだろうと期待されます。

伝・三浦按針墓出土人骨につきましては、右側の側頭骨の錐体部を使わせていただき、次世代シーケンサーとターゲットエンリッチメントを組み合わせた手法で、塩基配列情報を取得しました (図7)。切り出した後、粉碎機を使って骨をパウダー状にします。液体窒素で十分に冷却した骨とステンレスビーズを、強度の高いスクリーチューブに入れまして、立体8の字振動によって細かい粉末状にしています。粉碎を終えたら、骨粉末をEDTA溶液で脱灰し、タンパク質やDNAが混在したまま溶液にします。さらにタンパク質を除きDNAの精製をして、DNA溶液を得るという流れで行っています。このような古人骨DNA実験全般につきましては、所属機関に設置された研究倫理委員会の承認を得て実施します。

先ほど、実験のプロセスをご紹介しましたので、そこから先のステップについても、少しご紹介したいと思います。次世代シーケンサで、生データを取得した後の情報(データ)解析になります。次世代シーケンサで得られる生データはどのようなものか、文字の羅列の中に、フローセルやシーケンスランのID、ライブラリを識別するインデック

図8
次世代シーケンサで得られたデータの解析



ス、サンプルの塩基配列情報などが記載されています。ここから一次解析に進みます。

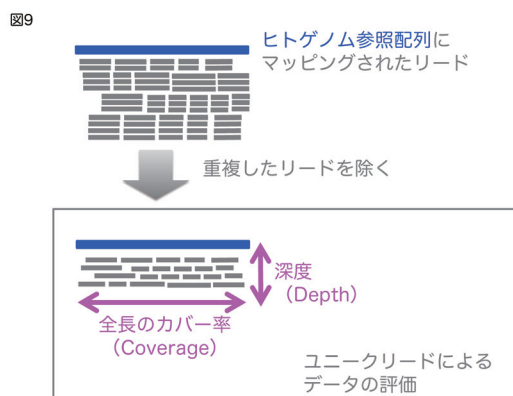
最初の出力データは、図8に示したような状態になっています。サンプルのDNAは、このイラストで灰色で示されているDNA insertの部分になります。次世代シーケンサのライブラリを作成するときに、DNA断片の両側にアダプタ配列を付加しましたので、実験上で付加した配列を、データ解析上で取り除くトリミングという作業を最初に行います。一度の次世代シーケンスのランで、膨大な数のDNA断片が読み取られます。読み取ったDNA断片をリードと呼んでいます。次に、この膨大な数のリードを、ヒトゲノム参照配列にマッピングしていきます。似ている配列、つまり相同性の高い配列を識別しながらリードを貼り付けて、整理させ、つなげていく作業になります。

ここで、ヒトゲノム参照配列について少しご説明したいと思います。参照配列は、既知の配列のことを指しています。例えば、ヒトのミトコンドリアDNA参照配列は、1980年代に最初の発表、その後1999年に改訂され、現在、世界中の研究者が用いている配列です (Andrews et al. 1999)。rCRSと略称で呼んでいます。あるイギリス出身者のミトコンドリアDNA配列で、ハプログループはH2a2a1というタイプです。すなわち、rCRSはヒトの祖先型配列ということではありません。ある一人のイギリス人の配列をヒトミトコンドリアDNA参照配列として用いているだけです。この参照配列と、自分たちが分析したサンプルの配列を並べて比較することによって、差異などを見だしていく作業になります。核DNAの参照配列では、こちらはhg19といった番号が付いていますけれども、精度を上げるべく何度も追加解析が行われています。

話は戻りまして、古人骨から読み取ったDNA断片すなわちリードをヒトゲノム参照配列にマッピングしますと、

古代 DNA は短く断片化されていますけれども、多数の DNA 断片を読み取ることで精度を上げています。その理由は、シーケンスエラーやヘテロプラスミーの可能性のあるものも含めて、塩基が少し違っている箇所が存在しています。さらに、古代 DNA の特徴とされている「リードの 5' 末端での C から T への置換」も観察されます。これらの多数のリードから、その個体の持つゲノム配列を再構築していくということになりますので、たくさんのリードが得られていれば精度が上がります。しかし、もし、リードの少ない薄いデータから再構築を試みてしまうと、エラーがそのまま採用されてしまう、すなわち、誤った配列を再構築してしまう可能性が生じます。そこで次世代シーケンサは、同じ塩基の場所を異なるリードで繰り返し読むことで精度を上げています。次世代シーケンサはシーケンスエラーの頻度が従来法に比べて高いため、量で質をカバーしています（カバーする必要があります）。

また、微量な DNA からスタートするために、PCR のサイクル数がどうしても実験プロセスで多くなってきますが、ヒトゲノム参照配列にマッピングされたリードのうち重複したリードを除く必要があります。PCR によって生じた重複リードを除いたユニークリードで、データを評価します（図 9）。次世代シーケンサをもちいた塩基配列の読み取り（決定）では、それが重要と考えられています。例えば、ヒトのミトコンドリア DNA 参照配列に対してリードを貼り付けた場合、全長の 16,569 塩基のうち、どれだけの範囲、すなわち、どれだけの塩基ポジションを読めたのかというのが、Coverage（カバー率）になります。同じ塩基を独立に、すなわち、重複リードを除いて何回読み取ったかという信頼度につながる指標として Depth（深度）があります。どちらもデータの信頼度（精度）を評価する際の重要な指標です。



そして、いよいよ結果ということになるのですが、その結果の前に、ミトコンドリア DNA の系統関係、ハプログループについてもお話ししたいと思います。ミトコンドリア DNA 塩基配列の比較によって母系が辿れると申し上げましたが、世界中の人に目を向けてみますと、ハプログループというミトコンドリア DNA の分類方法があります。これは、配列の類似したものをグループ分けして名前を付けています。2000 年に入ってミトコンドリア DNA 全塩基配列の解析が可能になってきたことと、世界中の多数の個体が分析に用いられるようになってきたことによって、多数のハプログループが定義されました。さらに、それぞれのハプログループの系統関係を知ることができるようになり体系化されました。塩基配列の相違から、このような系統関係を描くことができるのですが、アフリカ出身者のミトコンドリア DNA が最も多様性に富んでいます。そこからの派生型がアフリカ以外のミトコンドリアの DNA のタイプとなっています。ヒトのミトコンドリア DNA ハプログループの体系は、アルファベットの大文字でまず大きな分類を行っています。大きな分類のハプログループとして L、M、N、R 等々あります。PhyloTree のウェブサイト (Van Oven 2015) (<http://www.phyloree.org/>) には数字や小文字のアルファベットで、さらに細かいサブハプログループの分類が記載されています。細かいサブハプログループになるほど、後ろにつくアルファベットと数字が多く並ぶこととなります (例 D5b1a)。

ミトコンドリアゲノムはそのサイズが小さいこともあり、研究が非常に進んでいきましたので、世界中のデータを利用することが可能となっています。日本にフォーカスしてみると、現代日本人集団で観察されるハプログループの種類と頻度も、非常に多様です。そして東アジア集団の間で共通して観察されるものが多いです。したがって、このハプログループだから日本人である、と断定することは難しいですが、いくつか日本人集団に特徴的なハプログループもあります。例えば、M7a や N9b というグループは、現代日本人集団に特徴的な縄文系のハプログループと言われています。EMPOP というミトコンドリアのデータベース (Parson and Dür 2007) (<https://empop.online>) では、ミトコンドリア DNA のハプログループの分布を世界地図上で見ることができます。例えば、複数の地域集団に共通して見られるようなハプログループもあります。一方で N9b のように、日本列島に特徴的な（正確には、特徴的ですが限定的ではない）ハプログループもあります。

このように特徴的なハプログループを利用しますと、帰属集団推定のスクリーニングに用いることなども可能です。

そして、ようやく結果になります。伝・三浦按針墓から出土した人骨のミトコンドリア DNA 分析結果です。残念ながらミトコンドリア全長の決定は叶わなかったのですが、全長 16,569 塩基中の 96.4% の塩基を決定することができました。取得できた塩基配列情報を用いてワールドワイドなハプログループと合わせて系統樹を作成しますと、この人骨は、H や HV といったグループとクラスターし、H1 の配列と最も近くに位置することがわかりました。すなわち、この人物はハプログループ H1 と近縁であることがわかります。決定できた 96.4% の配列情報からハプログループを推定しますと、H1e2b ということがわかりました。

ハプログループ H という系統ですが、こちらは先ほど、現代日本人の中に出現していなかったことからお気付きのように、縄文人、弥生人を含めまして、現代日本人ではまず観察されないハプログループになります。一方ヨーロッパでは、非常に高頻度で観察されていまして、現在の西ユーラシアの多くの地域で 40% 以上を占めています。European founder lineages、ヨーロッパの基層系統と言われるグループです。したがって、この人物はヨーロッパを出自とすることが示されました。さらに、もう少し詳しくサブグループの H1e の分布まで調べてみますと、現在のイベリア半島に高頻度に分布しているということも示されました。もちろん、これらは現在の分布でありますし、複雑な人の移動や、このデータベースに全てが反映されているわけではないといったことがありますけれども、母系の系統の起源を辿る道標にはなるのかと思います。

以上をまとめますと、埋葬状況、年代、食性、DNA などの複合的な視点で考察をした結果、人骨の出自、死亡時期、生前の食生活などに関する知見が得られました。これらについて、同じ状況、同じ特徴を満たす別人の可能性を完全に否定することは、もちろん今回の結果からはできないのですが、「伝・三浦按針墓から出土した人骨（人物）のヒストリー」を考察することができました。

列島日本人のヒストリーを探る – 旧石器時代人／縄文時代人／弥生時代人の分析から –

続きまして、列島日本人のヒストリーを探るというトピックに移らせていただきます (Mizuno et al. 2021)。日本列

島では、1 万ヶ所以上の旧石器時代の遺跡が発見されていますが、人骨の出土は、非常に数が限られています。その理由は、前半で申し上げましたとおり、日本列島を広く覆う火山灰による酸性土壌や温暖多湿な気候などにより、動物骨や人骨などの有機物が残らないためです。古人骨 DNA 分析にとっては厳しい環境ではあります。遺跡の証拠から、旧石器時代には日本列島に現生人類がいたことがわかっていますが、旧石器時代の遺跡から人骨が出土したという例は少なく、日本列島では数値年代の判明している旧石器時代の遺跡は 7 ヶ所にとどまっています (藤田 2019)。

旧石器時代の遺跡の一つである、沖縄南部にあります港川フィッシャーは、石灰岩の採石場で発見された遺跡で、人骨は第 3 層と第 4 層から発見されています。人骨近傍の木炭の分析から、放射性炭素年代は校正後で 22,000 年と 19,000 年前と推定されています (Kaifu and Fujita 2012)。そして、形態的には 4 体の類似性が繰り返し指摘され、同一集団と捉えられています (Suzuki and Hanihara 1982)。DNA 分析の機会をいただきましたのは、港川 1 号人骨になります。右大腿骨の骨頭の内側からサンプリングし、これまでにご紹介してきた実験と解析のステップを実施し、分析結果を取得するに至りました。

港川 1 号のハプログループは M であることがわかりました。また、これまで分析の機会をいただき、ミトコンドリア DNA 全長配列を決定できました人骨は、縄文時代は、古い順番に、居家以、東名、轟、姥山、加曾利、摩文仁ハンタバル遺跡です。弥生時代は、土井ヶ浜、花浦遺跡です。そして、現代日本人集団は、共同研究先で決定された、長浜の約 2,000 個体のミトコンドリア全長配列です。先行研究の船泊 (kanzawa-Kiriyama et al. 2019) ならびに伊川津 (McColl et al. 2018) の縄文時代遺跡出土人骨のデータも加えて、現代日本人と古人骨を多次元尺度構成法 (MDS) を用いますと、ミトコンドリア DNA 塩基配列の類縁度が反映されていますので、おおよそハプログループごとにまとまっていることがわかります。縄文時代人、弥生時代人のミトコンドリア DNA は、それぞれ現代日本人のいずれかのグループに含まれているということがわかります。一方、港川 1 号は、どのグループにも含まれていないところに位置する結果になりました。

次に、全長配列を用いた系統樹を見てみますと、MDS と同様で、縄文、弥生の配列はそれぞれ、現代日本人集団のいずれかのグループとクラスターしているということが

わかります。一方、港川1号は、どのグループともクラスターを形成しませんでした。港川1号の配列に関しましては、中国や東南アジアの現代人、古人骨の配列を含めまして、先行研究のさまざまな配列と比較をしましたが、港川1号から派生するという系統は観察されませんでした。

以上の結果をまとめますと、今回のデータセットからは、港川1号のミトコンドリアゲノム配列は、縄文時代人、弥生時代人、現代日本人だけでなく、中国などの東アジアの人々に直系でつながる系統はないことが示されました。一方、ハプログループMの祖型を持つミトコンドリアゲノム配列であったことから、東アジアを含むハプログループM系統の祖先集団、別の言い方をすると基層集団に属しており、旧石器時代人から現代日本人への遺伝的多様性に、広義での連続性があると言えます。

東アジアにおいて、旧石器時代人のゲノム分析に成功した先行研究としては、中国の田園洞人の例があります (Fu et al. 2013)。4万年前の田園洞人のミトコンドリアゲノム分析の結果、ハプログループBの祖型に近い配列で、現代の東アジアの人々に直接つながる系統ではなかった、すなわち田園洞人も、同じミトコンドリアゲノム配列を持つ現代の人々はいなかったという結果でした。後に、この田園洞人は核ゲノムの分析も行われ、現在の東アジアならびに東南アジアの集団の直接的な祖先集団ではないことがミトコンドリアならびに核ゲノムの両方から示されています (Yang et al. 2017)。今後は、港川1号の核ゲノム情報や、他の旧石器時代人のミトコンドリアゲノムならびに核ゲノムの情報を得ることで、本研究の検証が待たれます。長い時間にわたりご静聴いただきまして、ありがとうございました。

参考文献

Higuchi, R., et al. "DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family." *nature* 312.5991 (1984): 282-284. <https://doi.org/10.1038/312282a0>

Gilbert, M. Thomas P., et al. "Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland." *Science* 320.5884 (2008): 1787-1789. <https://doi.org/10.1126/science.1159750>

Reich, D., et al. "Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia." *nature* 468.7327 (2010): 1053-1060. <https://doi.org/10.1038/nature09710>

Hofreiter, M., et al. "The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts." *BioEssays* 37.3 (2015): 284-293. <https://doi.org/10.1002/bies.201400160>

[org/10.1002/bies.201400160](https://doi.org/10.1002/bies.201400160)

Orlando, L., et al. "Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse." *Nature* 499.7456 (2013): 74-78. <https://doi.org/10.1038/nature12323>

Palkopoulou, E., et al. "Complete genomes reveal signatures of demographic and genetic declines in the woolly mammoth." *Current Biology* 25.10 (2015): 1395-1400. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.007>

Jans, M. M. E., et al. "Characterisation of microbial attack on archaeological bone." *Journal of Archaeological Science* 31.1 (2004): 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2003.07.007>

Kihana, M. and Mizuno, F., et al. "Emulsion PCR-coupled target enrichment: An effective fishing method for high-throughput sequencing of poorly preserved ancient DNA." *Gene* 528.2 (2013): 347-351. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.040>

King, T. E., et al. "Identification of the remains of King Richard III." *Nature communications* 5.1 (2014): 1-8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6631>

Mizuno, F., et al. "A biomolecular anthropological investigation of William Adams, the first SAMURAI from England." *Scientific reports* 10.1 (2020): 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78723-2>

Tsutaya, T., et al. "Stable isotopic reconstructions of adult diets and infant feeding practices during urbanization of the city of Edo in 17th century Japan." *American Journal of Physical Anthropology* 153.4 (2014): 559-569. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22454>

Tsutaya, T., et al. "The diet of townspeople in the city of Edo: carbon and nitrogen stable isotope analyses of human skeletons from the Ikenohata-Shichikencho site." *Anthropological Science* (2015): 150914. <https://doi.org/10.1537/ase.150914>

Kusaka, S., et al. "Stable isotope analysis on human skeletal remains from the Edo-period Fushimi castle site in Japan." *Anthropological Science Japanese Series* 119.1 (2011): 9-17.

Gamba, C., et al. "Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory." *Nature communications* 5.1 (2014): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms6257>

Andrews, R M., et al. "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA." *Nature genetics* 23.2 (1999): 147-147. <https://doi.org/10.1038/13779>

Van Oven, M. "PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5 (2015): e392-e394. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.155>

Parson, W., and Dür, A. "EMPOP—a forensic mtDNA database." *Forensic Science International: Genetics* 1.2 (2007): 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.018>

Mizuno, F., et al. "Population dynamics in the Japanese Archipelago since the Pleistocene revealed by the complete mitochondrial genome sequences." *Scientific reports* 11.1 (2021): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91357-2>

藤田祐樹. 2019. 「形態科学」『沖縄の旧石器時代遺跡と人骨』 22, 2, p.49-58.

Susuki, H. and Hanihara, K. (Eds) *The MinatogawaMan : the Upper Pleistocene man from the island of Okinawa*. Bulletin No.19, University Museum of the University of Tokyo, University of Tokyo Press. (1982.)

Kaifu, Y., and Fujita, M. "Fossil record of early modern humans in East Asia." *Quaternary International* 248 (2012): 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2011.02.017>

Kanzawa-Kiriyama, H., et al. "Late Jomon male and female genome sequences from the Funadomari site in Hokkaido, Japan." *Anthropological Science* (2019): 190415. <https://doi.org/10.1537/ase.190415>

McColl, H., et al. "The prehistoric peopling of Southeast Asia." *Science* 361.6397 (2018): 88-92. <https://doi.org/10.1126/science.aat3628>

Fu, Q., et al. "DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.6 (2013): 2223-2227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221359110>

Yang, M. A., et al. "40,000-year-old individual from Asia provides insight into early population structure in Eurasia." *Current Biology* 27.20 (2017): 3202-3208. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.030>